

白鼠에서 蜈蚣藥鍼이 神經病症性 痛症에 미치는 影響

이삼로¹ · 김성철¹ · 구성태³ · 김성남¹ · 황우준¹ · 이진목¹ · 조남근¹ · 임규상²

원광대학교 ¹한외과대학 침구학교실, ²한외과대학 안이비인후피부과학교실, ³한의학전문대학원

Effects of Scolopendrid Water-Alcohol Extract Injection Applied to the Acupuncture Point on the Neuropathic Pain in Rats

Sam-ro Lee¹, Sung-chul Kim¹, Sung-tae Koo³, Sung-nam Kim¹, Woo-jun Hwang¹,
Geon-mok Lee¹, Nam-geun Cho¹, Kyu-sang Lim²

Dept. of ¹Acupuncture & Moxibustion, ²Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine,
³Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won-kwang University

Abstract

Objectives : In the present study, the effect of Scolopendrid Water-Alcohol Extract (SWAE) applied to acupuncture point BL23 (Shinsu) on the neuropathic pain was examined. A common source of persistent pain in humans is the neuropathic pain. Anti-convulsant drugs are used to treat the neuropathic pain. In the oriental medicine, Scolopendrid was used for long time to treat convulsant syndrome and back pain, etc.

Methods : On the bases of the Scolopendrid clinical application, the effect of SWAE applied to the acupuncture point was tested in the rat model of neuropathic pain. Neuropathic pain was induced by tight ligation of L5 spinal nerve. When rats developed pain behaviors, One hundred microliter of SWAE was applied into the ipsilateral BL23 point at a dose of 10 mg/ml under enflurane anesthesia. The foot withdraw latency of the hind limb was measured for an indicator of pain level after each manipulation.

Results : SWAE injection increased the mechanical threshold of the foot in the rat model of neuropathic pain significantly for the duration of 4h, suggesting a partial alleviation of pain. SWAE applied to BL23 point produced a significant improvement of mechanical sensitivity of the foot lasting for at least 4h. However, neither contralateral BL23 point, ST25 (Chonchu) point, nor LR3 (Taechung) point produce as much increase of mechanical sensitivity as ipsilateral BL23 point. And, this increase of mechanical sensitivity was dose-dependent. The improvement of mechanical threshold was interpreted as an analgesic effect. In addition, the analgesic effect of Scolopendrid 4 mg/kg injection is equivalent to that of gabapentin 50 mg/kg injection. The relations between SWAE-induced analgesia and endogenous nitric oxide(NO), inducible NO synthase (iNOS)/neuronal NO synthase (nNOS) were also examined. Results were turned out that both NO production and nNOS/iNOS protein expression which are increased by nerve injury were suppressed by SWAE injection applied to BL23 point.

Conclusions : The data suggest 1) that SWAE produces a potent analgesic effect on the neuropathic pain model in the rat and 2) that SWAE-induced analgesia modulate endogenous NO through the suppression of nNOS/iNOS protein expression.

Kew words : Neuropathic pain, Scolopendrid, NO, BL23, Analgesia

• 교신저자: 김성철, 광주광역시 남구 주월1동 543-8 원광대학교
광주한방병원 침구과, Tel. 062-670-6726,
E-mail : kscndl@hanmail.net

• 이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.
• 접수 : 2004/03/04 • 수정 : 2004/06/14 • 채택 : 2004/6/16

I. 서 론

약침요법은 기존의 침법과 한약을 결합하여 발전시킨 新針療法의 일종으로, 순수 한약제에서 정제, 추출하여 經穴에 극소량의 약물을 주입함으로써 침의 작용과 한약의 작용을 병행하여 치료를 극대화시키기 위한 新針療法을 말한다.

蜈蚣은 절족동물 다족류 중 왕지네과에 속하며 그 형상이 마치 사람의 척추처럼 마디마디 이어져 있고 그 움직임이 신속한 고로, 예로부터 관절질환으로 인한 통증에 가루를 내어 먹거나 술에 타 먹음으로써 널리 이용되어 왔다. 蜈蚣은 성질이 辛溫·猛燥하여 風·寒·濕을 가장 효과적으로 제거할 수 있어 腰脚痛을 비롯한 각종 운동기질환에 효과가 있다. 새롭게 약침요법으로 사용되고 있는 蜈蚣 藥鍼은 頭足尾를 제거한 왕지네를 추출, 가공하여 질병과 관련한 부위 및 經穴에 주입함으로써 자침의 효과와 왕지네가 지니고 있는 생화학적 약리작용을 질병의 치료에 이용하고 있다.

신경병증성 통증은 신경계통의 손상 등의 1차적인 병변 또는 신경기능 변화가 원인이 되어 초래되는 것으로 정의하며, 아주 다양한 기전들에 따른 증상의 다양성을 보여 치료에 있어 기존 신경차단 중심으로의 방법으로는 많은 어려움을 겪고 있다. 최근에 신경병증성 통증의 치료제로 말초에서 척추로 가는 신경계가 손상을 받은 경우에는 이온 통로에 이상이 생겨 자발방전이 일어나므로 항경련제 (carbamazepine, phenytoin), 항부정맥제 (mexiletine), 삼환계항우울제 (amitriptylline) 등과 같이 이온 통로를 차단하는 약제가 널리 쓰이고 있다.

우리나라에서 蜈蚣에 관한 실험적 연구로, 홍¹⁾은 蜈蚣의 약물학적 연구에서 蜈蚣이 中樞性痙攣抑制作用, 解熱鎮痛作用, 鎮靜作用 및 血壓

下降作用 등이 있음을 究明하였고, 정²⁾ 등은 蜈蚣水鍼이 鎮痛 및 鎮痙效果에 미치는 영향을 연구하기 위해 醋酸으로 疼痛을 유발시키고 strychnine과 picrotoxin으로 경련을 유발시킨 후 실험동물의 百會 (GV20)와 太衝 (LR3) 해당 穴位에 자극하여 관찰한 결과 모두 유의성 있는 결과를 얻었다. 이³⁾ 등은 蜈蚣이 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시켜 강력한 순환혈관 수축물질로 작용하는 ACE (angiotensin converting enzyme)를 저해하는 것으로 밝혀, 蜈蚣이 항고혈압제로 활용될 수 있을 것으로 보았다. 고⁴⁾ 등은 臨床에서 蜈蚣藥鍼을 요추간판탈출증 치료에 응용하여 유의성 있는 결과를 얻은 바 있다.

위에서 살펴본 바와 같이 임상에서 蜈蚣은 주로 鎮靜, 鎮痙, 鎮痛 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 이러한 효과에 대한 실험 결과도 대체로 임상 활용과 부합하는 내용으로 알려져 있다. 따라서 신경병증성 통증에 진통효과를 거둘 수 있을 것으로 예상하여 L5 척수신경을 손상시켜 유발하는 신경병증성 통증 동물 모델에서 蜈蚣 약침을 腎俞 (BL23), 天樞 (SR25), 太衝 (LR3)에 주입함으로써 진통효과를 알아보았다. 신경병증성 통증 실험 모델에서 蜈蚣 약침을 투여한 결과 유의한 성]적을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley (6주령, 170-190 g)가 사용되었으며, 원광대학교 한의학전문대학원에서 사육되었다. 동물은 온도 22±1 °C, 상대습도 55±10 %의 조건에서 12시간 주기로 주야를 바꿔주면서 (야간 사이클: 오전 8:00~오후 8:00)

한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일 동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 오공 약침 조제

蜈蚣 약침은 대한약침학회 연구실 무균실 (Clean Room)에서 水醇추출법⁵⁾(水提-Alcohol 浸法)으로 제조하였다.

- 1) 頭足尾를 제거한 국산 蜈蚣 분말 128.6 g 건조중량을 측정하여 시료를 준비한 후
- 2) 비커에 넣고 증류수 1000 ml를 부어 Electronic magnetic stirrer (Tost MS 300, KOREA)를 이용하여 3시간 정도 교반한다 (증류수 1차 추출).
- 3) 냉장고에 그대로 두어 가라앉은 재료가 손실되지 않게 윗물을 따라서 병에 넣고 남은 찌꺼기에 다시 증류수를 부어 Electronic magnetic stirrer로 교반한다 (증류수 2차 추출).
- 4) 위 3)과 같은 작업을 반복하여 다시 증류수를 부어 증류수 3차 추출을 한다.
- 5) 3차 추출이 끝나면 1, 2, 3차 추출용액을 와트만 여과지 2번 (8 μm)으로 걸러 그 여액을 Rotary Vacuum evaporator (EYELA, JAPAN)로 70°C에서 3시간 감압농축한다.
- 6) 농축된 양을 측정하여 90 % 알코올로 조정 한 뒤 1시간 교반하여 와트만 2번 (8 μm)으로 거르고 그 여액을 Rotary Vacuum evaporator로 최대한 농축한다.
- 7) 농축된 양을 측정하여 80 % 알코올로 조정 한 뒤 1시간 교반하여 와트만 2번 (8 μm)으로 거르고 그 여액을 Rotary Vacuum evaporator로 최대한 농축한다.

8) 또 다시 농축된 양을 측정하여 70 % 알코올로 조정 한 뒤 1시간 교반하여 와트만 2번 (8 μm)으로 거르고 그 여액을 Rotary Vacuum evaporator로 최대한 농축한다. 이 때 알코올을 완벽하게 다 제거하기 위해서 증류수를 약간 더 넣어 Rotary Vacuum evaporator로 재감압농축한다.

9) 전량을 최소 200 ml에서 최대 300 ml로 하여 와트만 여과지 2번 (8 μm), 와트만 여과지 0.45 μm , 와트만 여과지 0.1 μm 여과지로 여과하여 예비동결 후 Freezing dryer (일신, KOREA)로 200시간 동안 동결건조 하여 蜈蚣 건조분말 9.88 g 얻었다.

3. 신경병증성 통증 모델 유도

신경병증성 통증 모델은 Chung 모델⁶⁾을 사용하였다. Enflurane과 O₂로 혼합된 가스 마취 상태 하에서 쥐를 prone position으로 놓고 L4-S2 level에 있는 왼쪽 spinous process들 주위에 있는 근육들을 제거하였다. 작은 론저 (rongeur)로 왼쪽 L5 transverse process를 조심스럽게 제거하여 L5 척수신경이 잘 보이도록 한다. 왼쪽 L5 척수신경을 isolation하여 6-0 silk thread로 단단하게 묶은 후, 절개한 부분을 봉합하였다. 수술된 쥐는 수술 전과 똑같은 조건에서 사육되었다.

4. 동물행동 테스트

각 동물들은 up down 방법을 사용하여 von Frey filament의 기계적 자극에 대한 foot withdrawal threshold로 측정되었다. 테스트를 위해 쥐의 발바닥에 매우 쉽게 접근할 수 있도록 만들어진 금속철망바닥 (3×3 mm, 철망의 각 구멍크기)의 위에 transparent plastic box를 놓고 각 동물들을 각각 상자 안에 들여 놓는다. 대

약 0.22정도로 logarithmic하게 증가하는 bending forces를 갖는 8개의 von Frey filaments (von Frey 숫자들, 3.65, 3.87, 4.10, 4.31, 4.52, 4.74, 4.92, 5.16 ; 각 숫자들은 다음의 값에 상응한다. 0.45, 0.74, 1.26, 2.04, 3.31, 5.50, 8.32, 14.45 g)가 선택되었다. 테스트는 filament들의 중간 숫자들 중 하나인 4.31부터 시작한다. Von Frey filament는 ligation한 쪽과 동측인 왼쪽 발바닥 (hind paw)의 세 번째 혹은 네 번째 발가락의 ventral surface에 밑에서부터 수직으로 올리도록 한다. 자극에 대해 양성적인 반응 (positive response)이 나타날 때마다 더 작은 Von Frey hair를 가지고 다음 테스트를 하고, 음성적인 반응 (negative response)이 일어날 때마다 더 높은 Von Frey hair를 가지고 다음 테스트를 시행한다. 테스트는 반응에 대해 첫 번째 변화를 얻은 Von Frey filament 값부터 시작하여 6회의 자극에 대한 반응을 얻을 때까지 계속하였다. 양성 또는 음성 반응들의 형태들은 Dixon(1980)에 의해 제시된 공식을 사용하여 50% 역치 값으로 변환하였다 : $50\% \text{ threshold} = 10^{(X+kd)}/10^4$. 여기서 X는 로그단위로써 마지막 Von Frey filament 값을 가리키고, k는 1980년 Dixon에 의해 얻어진 양성/음성 반응들의 형태에 대한 tabular value이며, d는 로그단위 (0.22)에서 자극들 간의 편차 (mean difference)이다. 자극 범주내에서 양성 혹은 음성반응만 일관되게 관찰된 경우, 그 값은 각각 0.3 g 또는 15 g으로 설정했다. saturation value로서 15 g을 설정한 이유는 더 강한 bending force를 가지는 Von frey filament를 적용시키면 쥐의 발을 바닥으로부터 밀어 올리게 되고, 이렇게 되면 능동적인 foot withdrawal과 수동적인 foot lift를 구별하는데 어려움이 있기 때문이다. 동물들은 매회 테스트하기 적어도 15분전에 테

스트 환경에 적응하도록 플라스틱 상자에 넣어 놓았다. 쥐가 적응하면 baseline threshold를 측정하고, 실험적인 처치를 한 후 처치 후 0.5시간, 1시간, 2시간, 4시간째에 행동테스트(behavioral test)를 시행하였다. 모든 행동 테스트는 single-blind로 시행되었다.

5. 약물

蜈蚣 약침의 진통효과를 비교하기 위하여 Gabapentin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 50 mg/kg, 100 mg/kg 농도로 복강 내 주사하였다.

6. 단백질의 분리 및 정제

척수에서 iNOS (inducible NO synthase), nNOS (neuronal NO synthase) 단백질 발현을 측정하기 위하여 대조군, 신경병증성 통증 실험군 및 신경병증성 통증에蜈蚣 약침을 처리한 실험군의 동물들을 chloralhydrate 250 mg/kg 으로 마취한 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장관류하여 혈액을 제거하여 재빨리 척수를 박리하였다. 박리된 척수는 dry-ice powder에 신선하게 얼려 사용할 때까지 -80 °C에 보관하여 놓았다. 보관된 척수에 homogenization buffer 3 ml을 가하여 Homogenizer로 3회 (15초 같고 10초 쉬는 행위를 3회 반복) 균질화시킨 후, 3,000 rpm로 10분 동안 원심분리시켰다. 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80 °C에 저장하여 놓았다. 이 시료는 iNOS, nNOS 단백질을 분석하기 위해 사용되었다. 이 시료를 4 °C에서 13,000 rpm로 10분 동안 2회 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80 °C에 저장하여 놓았다.

7. 산화질소 정량 (NO assay)

척수조직내 산화질소 (NO : nitric oxide) 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 안정된 마지막 산물인 NO₂와 NO₃에 대해서 분석하였다.

간단히 말하면, 각 샘플 40 μ l와 MOPS buffer (50 mM MOPS/1 mM EDTA, pH 7.0) 45 μ l를 혼합하고 reconstituted *Escherichia coli* nitrate reductase (500 μ l MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5 μ l를 가한 후 2mM NADH 10 μ l를 가하여 20분 동안 실온에서 반응시킨다. 그 후 50 μ l Griess reagent A (1% sulfanilamide in 3N HCl)와 짧게 반응시키고, 50 μ l Griess reagent B (0.1 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2HCl)와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, purple azo dye가 생성되면 30분 이내에 Microtiter plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡수율을 측정하였다. Nitrite 농도의 표준곡선은 NaNO₂로부터 계산되었다.

8. Western blot 분석

단백질 Blotting을 위하여 보관하여 놓은 단백질 시료를 5배 농축된 SDS sample buffer (1×125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % glycerol, 0.003 % bromophenol, 1% β -mercaptoethanol)와 섞어서 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후 10,000rpm에서 5-10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel (nNOS는 7.5 % gradient 사용, iNOS는 10 % gradient 사용)에 걸어서 electrophoresis를 한다. 그리고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer시킨다. Membrane은 실온에서 blocking buffer (TBS-T에 5 % skim milk, 10 % NaH₃PO₄를 포함)에 blocking을 하고, anti-iNOS, anti-

nNOS antibody를 1:1000으로 하여 1시간 동안 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody(Anti-rabbit IgG)와 2시간 동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham) developing kit를 사용하여 발색, 감광시킨다.

9. 통계분석

데이터는 Mean \pm SEM으로 나타내었다. 통계 검사는 실험 방법에 따라서 Dunnett's post-hoc test에 의한 one-way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) 또는 two-way repeated measures ANOVA로 하였다. p값이 0.05 보다 작으면 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 신경병증성 통증에 대한 오폭약침의 진통효과

만성 통증 모델인 신경병증성 통증을 유발시키기 위하여 척수신경 결찰 (ligation) 모델을 유도하였다. 흰쥐의 L5 척수신경을 결찰하여 말초신경을 손상시켜 신경병증을 유발시키면 수술 후에 시간이 지나면서 기계적 자극에 대해서 이질통 (allodynia)이 발생하게 된다. Fig. 1에서 보이는 것과 같이 발바닥에 가하는 기계적 자극에 대해서 수술 전 정상 상태일 때는 15 g에 해당하는 자극을 가해도 회피 반응을 보이지 않았는데 결찰 후 3일부터 기계적 자극에 대한 역치가 낮아져서 0.5 g이하의 자극에도 회피반응을 보였다. 원래 통증을 유발하지 않았던 15 g이하

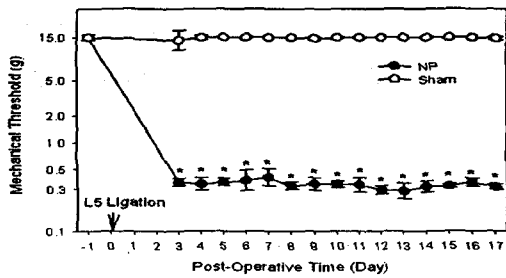


Fig. 1. Development of neuropathic pain followed by L5 ligation. Post-operative time is expressed as days after L5 ligation. A decreased mechanical threshold lasted from 3 day to more than 2 weeks after ligation. This figure shows average values(\pm SEM) of mechanical threshold in a group of 8 rats from 1 day before to various days for 17 days after L5 ligation. Asterisks(*) indicate the values that are significantly different ($p < 0.05$) from the control value of the 1 day before ligation by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test($n=8$).

NP : Neuropathic pain group caused by L5 ligation

Sham : Sham operated group without L5 ligation

의 자극에 통증을 줄이기 위한 행동으로 해석할 수 있는 회피반응을 보이는 것으로 보아 만성 통증이 유발된 것으로 보며, 이러한 통증 양상은 수술 후 2주가 지나도 지속되었다. 그러나 척수신경을 노출만 시키고 결찰하지는 않은 가수술 (sham operation)을 한 동물에서는 이러한 변화를 관찰할 수 없었다.

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과를 알아보았다. 蜈蚣 약침의 효과를 알아보기 위하여 신경병증성 통증이 유발된 동물을 두 군으로 나누어 한 군은 환측 腎俞

(BL23) 부위에 蜈蚣 약침 자극을 하고, 다른 한 군은 같은 부위에 생리식염수를 주사하였다. 주입한 蜈蚣은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 穴位에 100 μ l를 주입하였다. 이는 蜈蚣을 250g무게의 실험 동물에 4 mg/kg의 농도로 주사한 것과 동일한 양에 해당한다. 실험 동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지 않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 수 시간 동안 일정한 시간 간격으로 기계적 자극에 대한 회피반응을 살펴보았다. 처치 후, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 테스트를 실시하였다. 蜈蚣 약침군은 회피반응의 역치가 처치 전에 0.43 ± 0.0853 g의 압력이었던 것이 蜈蚣 약침 처치 후 2시간에 $1.64 \text{ g} \pm 0.0929$ g으로 현저하게 증가되었다. 이러한 회피반응 역치의 증가는 약침 주입 후 4시간 이상 지속되었다. 반면, 생리식염수를 동량 주입한 대조군에서는 실험하는 8시간 동안 유의성 있는 변화를 일으키지 않았다(Fig. 2).

2. 좌우 腎俞 (BL23)에서 오공약침의 진통 효과 비교

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과를 알아보았다. 蜈蚣 약침의 효과를 알아보기 위하여 신경병증성 통증이 유발된 동물을 세 군으로 나누어 한 군은 환측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침 자극을 하고, 다른 한 군은 건측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침을 주사하였으며, 나머지는 환측 腎俞에 생리식염수를 주사하였다. 주입한 蜈蚣은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 穴位에 100 μ l를 주입하였다. 이는 蜈蚣을 250 g 무게의 실험동물에 4 mg/kg의 농도로 주사한 것과 동일한 양에 해당한다. 실험 동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지

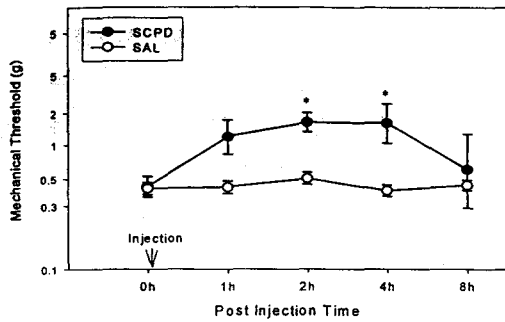


Fig. 2. Effect of injection of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) into the acupuncture point on the mechanical sensitivity of the foot in the rat model of neuropathic pain. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. After the injection of SWAE, foot withdrawal threshold on the mechanical sensitivity was measured at 1h, 2h, 4h, 8h. Saline injected group(SAL) was given a saline injection and experimental group was given a SWAE injection at the acupoints BL23. Only injection applied with SWAE produced a significant improvement of mechanical sensitivity, lasting for about 4h. However, injection applied with saline as a vehicle into the same point did not significantly affected mechanical sensitivity. Asterisks (*) indicate the values that are significantly different from the pre-injection baseline value(0h) ($p < 0.05$) by the one-way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

SCPD : Scolopendrid injected group
SAL : Saline injected group

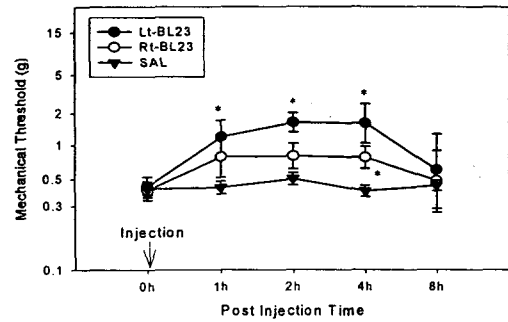


Fig. 3. Effect of injection of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) into the acupuncture point at ipsilateral side or contralateral side on the mechanical sensitivity of the foot in the rat model of neuropathic pain. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. After the injection of SWAE, foot withdrawal threshold on the mechanical sensitivity were measured at 1h, 2h, 4h, 8h. Saline injected group(SAL) was given a saline injection at the left acupoint BL23 and experimental group was given a SWAE injection at the left or right acupoint BL23. Injection applied with SWAE into ipsilateral BL23 point produced more powerful improvement of mechanical sensitivity, lasting for about 4h than contralateral BL23 point produced a mild improvement. However, injection applied with saline as a vehicle into the same point did not significantly affected mechanical sensitivity. Asterisks (*) indicate the values that are significantly different from the pre-injection baseline value(0h) ($p < 0.05$) by the one-way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

Lt-BL23 : Scolopendrid injected group at Left-BL23(Shinsu)
Rt-BL23 : Scolopendrid injected group at Right-BL23(Shinsu)
SAL : Saline injected group at Left-BL23(Shinsu)

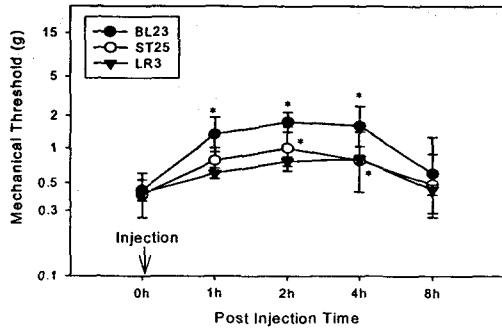


Fig. 4. Effect of injection of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) into the 3 different acupunctured points on the mechanical sensitivity of the foot in the rat model of neuropathic pain. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. After the injection of SWAE, foot withdrawal threshold on the mechanical sensitivity were measured at 1h, 2h, 4h, 8h. Experimental group was given a SWAE injection at the acupoint BL23 or ST25 point, or LR3 point. injection applied with SWAE into ipsilateral BL23 point produced more powerful improvement of mechanical sensitivity, lasting for about 4h than ST25 point or LR3 point produced a mild improvement. Asterisks (*) indicate the values that are significantly different from the pre-injection baseline value(0h) ($p < 0.05$) by the one-way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

- BL23 : Scolopendrid injected group at ipsilateral(Lt) BL23(Shinsu)
- ST25 : Scolopendrid injected group at ipsilateral(Lt) ST25(Chonchu)
- LR3 : Scolopendrid injected group at ipsilateral(Lt) LR3(Taechung)

않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 수 시간 동안 일정한 시간 간격으로 기계적 자극에 대한 회피반응 검사를 실시하여 기계적 자극에 대한 역치의 변화를 살펴보았다. 검사는 약침 처치 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 실시하였다. 환측 蜈蚣 약침군은 회피반응의 역치가 처치 전과 비교하여 약침 주입 후 1시간 후부터 상승하기 시작하여 주입 후 4시간 동안 현저하게 증가되었다. 반면, 건측 臂兪에 같은 양의 蜈蚣 약침을 주입한 군에서는 환측에 주입한 것보다 효과가 약했으며 주입한 후 4시간째에 기계적 자극에 대한 민감도가 유의하게 증가하였다. 생리식염수를 주입한 군에서는 실험하는 8시간 동안 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

3. 자침 부위별 오공 효과 비교

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과가 경혈의 위치에 유의성을 갖고 있는지 알아보았다. 蜈蚣 약침의 경혈 특이적인 효과를 알아보기 위하여 신경병증성 통증이 유발된 동물을 세 군으로 나누어 한 군은 환측 臂兪 부위에 蜈蚣 약침 자극을 하고, 다른 한 군은 복부에 있는 天樞 (ST25) 부위에 蜈蚣 약침을 주사하였으며, 나머지 한 군은 환측 太衝 (LR3) 에 蜈蚣 약침을 주사하였다. 주입한 蜈蚣은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 穴位에 100 μ l를 주입하였다. 이는 蜈蚣을 250g 무게의 실험동물에 4 mg/kg의 농도로 주사한 것과 동일한 양에 해당한다. 실험동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지 않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 수 시간 동안 일정한 시간 간격으로 기계적 자극에 대한 회피반응 검사를 실시하여

기계적 자극에 대한 역치의 변화를 살펴보았다. 실험은 약침 처치 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 실시하였다. 환측의 腎俞에 자극한 蜈蚣 약침군은 회피반응의 역치가 처치 전과 비교하여 약침 주입 후 1시간 후부터 상승하기 시작하여 주입 후 4시간 동안 현저하게 증가되었다. 반면, 天樞나 太衝에 같은 양의 蜈蚣 약침을 주입한 군에서는 기계적 자극에 대한 역치의 변화가 경미하였다. 天樞 자극군에서는 약침 자극 후 2시간 후에 유의한 정도의 경미한 상승이 보였으며, 太衝 자극군에서는 약침 자극 후 4시간 후에 기계적 자극에 대한 역치가 증가하였다(Fig. 4).

4. 농도별 오공의 효과

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과가 농도 의존적인지의 여부를 알아보는 실험을 실시하였다. 蜈蚣 약침의 농도의 의존적인 효과를 알아보기 위하여 신경병증성 통증이 유발된 동물에 蜈蚣 약침의 농도를 달리하여 환측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침을 주입하였다. 주입한 蜈蚣은 0.01, 0.1, 1, 4 mg/kg의 농도로 희석하였다. 한 병에 담겨있는 蜈蚣 약침의 분말이 50 mg씩 들어 있기 때문에 최대 농도를 4 mg/kg으로 희석하였고, 4 mg/kg을 주입하였을 때 나타나는 효과를 100 %로 하여 나머지 농도의 효과를 표시하였다. 실험동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지 않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 수 시간 동안 일정한 시간 간격으로 기계적 자극에 대한 회피반응 검사를 실시하여 기계적 자극에 대한 역치의 변화를 살펴보았다(Fig. 5).

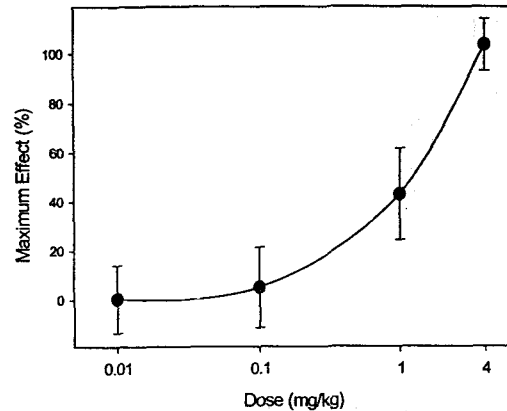


Fig. 5. Dose dependent effect of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) injection into the acupuncture point on the mechanical sensitivity of the foot in the rat model of neuropathic pain. Analgesic effects produced by graded doses of SWAE on the mechanical sensitivity of the foot. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. Several doses of SWAE(0.01mg/kg, 0.1mg/kg, 1mg/kg, 4mg/kg 100 μ l/200g rat) was injected into the BL23 point. After the termination of the treatment, behavioral test measuring mechanical threshold was periodically conducted.

5. 오공 반복투여 효과

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 반복 투여가 진통효과가 미치는 영향을 알아보았다. 반복 투여한 蜈蚣 약침의 진통효과를 알아보기 위하여 신경병증성 통증이 유발된 동물을 세 군으로 나누어 한 군은 환측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침을 1회 주입하였고, 다른 한 군은

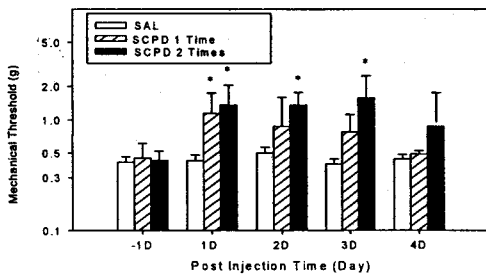


Fig. 6. Effect of repetitive injection of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) on the mechanical sensitivity in the neuropathic pain. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. After the injection of SWAE, foot withdrawal threshold on the mechanical sensitivity were measured at 1D, 2D, 3D, 4D. Saline injected group (SAL) was given a saline injection and experimental group was given a SWAE injection at the acupoint BL23 1 time a day or 2 times a day with 12 hour interval. SWAE injection applied 1 time a day increased mechanical threshold at 1 day after injection. SWAE injection applied 2 times a day increased mechanical threshold for 3 days after injection. Asterisks(*) indicate the values that are significantly different from the pre-injection baseline value(0h) ($p < 0.05$) by the one-way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

SAL : Saline injected group at ipsilateral (Lt) BL23(Shinsu)

SCPD 1 Time : Scolopendrid injected group at ipsilateral(Lt) BL23 (Shinsu) 1 Time a day

SCPD 2 Times : Scolopendrid injected group at ipsilateral(Lt) BL23 (Shinsu) 2 times a day with 12 hour interval

환측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침을 12시간 간격으로 2회 주입하였다. 나머지 한 군은 환측 腎俞에 생리식염수를 주사하였다. 주입한 蜈蚣은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 穴位에 100 μ l를 주입하였다. 실험동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지 않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 1일 1회씩 약침 주입 후 4일 동안 기계적 자극에 대한 회피반응 검사를 실시하여 기계적 자극에 대한 역치의 변화를 살펴보았다. 환측의 腎俞에 蜈蚣 약침을 1회 주입한 군은 약침 주입 1일 후에 약침 주입 전에 비해서 기계적 자극에 대한 역치 값이 유의하게 상승하였다. 약침 주입 후 2일째부터는 이러한 기계적 자극에 대한 역치 값이 약침 주기 전 역치 값과 유의한 차이를 보이지 않았다.

환측 腎俞에 12시간 간격으로 2회 蜈蚣 약침을 투여한 군에서는 환측 뒷발의 기계적 자극에 대한 회피반응의 역치가 처치 전과 비교하여 약침 주입 후 3일 동안 유의하게 증가해 있었다. 반면, 생리식염수를 주입한 군에서는 baseline의 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6).

6. Gabapentin과 오공의 효과 비교

L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통 효과를 gabapentin과 비교하는 실험을 실시하였다. 신경병증성 통증에 대한 진통 효과를 비교하기 위하여 실험동물을 세 군으로 나누어 한 군은 환측 腎俞 부위에 蜈蚣 약침을 주입하였고, 다른 한 군은 gabapentin을 100 mg/kg의 농도로 복강 내 주사를 하였으며, 나머지 한 군은 gabapentin 50 mg/kg을 복강 내 주사하였다. 주입한 蜈蚣은 10 mg/ml의 농도로 생리식염수에 희석하여 穴位에 100 μ l를 주입하였다.

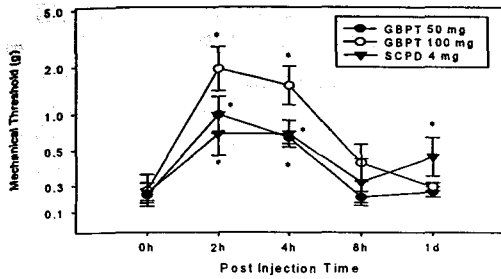


Fig. 7. Effect of gabapentin and Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) injection on the mechanical sensitivity in the neuropathic pain. All animals were subjected to the left L5 spinal nerve ligation. All animals developed mechanical hypersensitivity on the affected foot at 3 days after the surgery as evidenced by a dramatic lowering of the mechanical threshold when compared to the preoperative value. After the injection of drugs, foot withdrawal threshold on the mechanical sensitivity were measured at 2h, 4h, 8h, 1d. Gabapentin group(GBPT) was administered at a dose of 50mg/kg or 100mg/kg by peritoneum and Scolopendrid group(SCPD) was given an 4mg/kg injection at the acupoint BL23. GBPT group produced powerful improvement of mechanical threshold, lasting for about 4h. SCPD group also produced a significant increase in the mechanical threshold. In addition, SCPD injection affected the baseline value at the next day. Asterisks (*) indicate the values that are significantly different from the pre-injection baseline value(0h) ($p < 0.05$) by the one-way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

GBPT 50mg : Gabapentin 50 mg injected group by peritoneum

GBPT 100mg : Gabapentin 100 mg injected group by peritoneum

SCPD 4mg : Scolopendrid 4mg injected group at ipsilateral(Lt) BL23(Shinsu)

실험동물에 약침 자극을 주는 동안 스트레스를 주지 않기 위해서 enflurane 마취상태에서 약침을 주었다. 약침을 주사하고 난 후 수 시간 동안 일정한 시간 간격으로 기계적 자극에 대한 회피반응 검사를 실시하여 기계적 자극에 대한 역치의 변화를 살펴보았다. 검사는 약침 처치 후, 2시간, 4시간, 8시간, 1일 후에 실시하였다. 약물 투여 후 baseline 값에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 1일 후의 기계적 자극에 대한 민감도를 측정하였다. gabapentin 투여군은 강력한 진통효과가 주사 후 4시간가량 지속 되었으며, 투여 후 다음날의 baseline 값은 유의한 변화가 나타나지 않았다. 蜈蚣 약침을 4 mg/kg 농도로 주입한 군은 gabapentin 50 mg/kg을 복강내로 주사하여 얻은 진통효과와 비슷한 정도로 기계적 자극에 대한 역치를 상승시켰다. 蜈蚣 약침군에서는 gabapentin과는 달리, 자극 1일 후에 기계적 자극에 대한 역치가 유의하게 상승하였다(Fig. 7).

7. 신경병증성 통증 동물의 척수에서 NO 분석

L5 척수신경을 결찰 (ligation)하여 유도한 신경병증성 통증 실험 모델에서 蜈蚣 약침을 2일 동안 하루에 한 번씩 주고 3일째 척수에서 NO (nitric oxide)를 분석하여 말초신경 손상에 의해 증가된 NO에 대해 蜈蚣 약침이 미치는 영향을 알아보았다. 모든 동물은 척수신경을 결찰하여 신경병증이 유도된 후 환측 하지 발바닥의 기계적 자극에 대한 역치가 현저하게 감소하였다. 정상동물과 신경병증성 통증 동물 및 蜈蚣 약침을 처치한 동물들의 척수에서 NO를 분석해본 결과, 척수신경 손상을 받은 신경병증성 통증 동물은 정상동물에 비해 NO의 생산이 유의하게 증가하였으며, 蜈蚣 약침을 처치한 신경병증 동

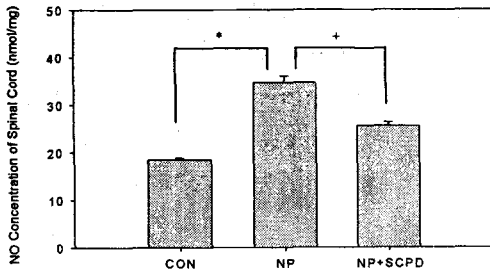


Fig. 8. Effect of Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) injection on the nitrite/nitrate levels of spinal cord in the different experiment groups. NO(nitric oxide) production on the spinal cord was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. Neuropathic group(NP) was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. SWAE injection was applied one time every day for 2 days on neuropathic rats of different group. Control group(CON) were not applied any other treatment. Data are expressed as means±SEM. * p<0.05, compared with the untreated control group. + p<0.05, compared with the neuropathic control group.

CON : untreated Control group
 NP : untreated Neuropathic group
 NP+SCPD : Scolopendrid treated Neuropathic group

물은 처치하지 않은 신경병증 동물에 비해 유의하게 NO가 감소하였다(Fig. 8).

8. 신경병증성 동물의 척수에서 iNOS 단백질에 대한 Western blot

L5 척수신경을 결찰 (ligation)하여 유도한 신경병증성 통증 실험 모델에서 蜈蚣 약침을 2일 동안 하루에 한 번씩 주고 3일째 척수에서 iNOS (inducible NO synthase) 단백질을 분석하여 말초신경 손상에 의한 iNOS 단백질의 증

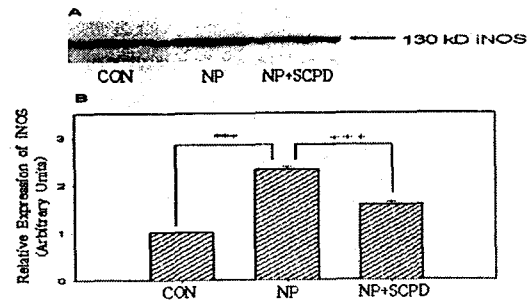


Fig. 9. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of iNOS(inducible NO synthase) expression in the spinal cord samples from the 3 groups. Neuropathic group(NP) was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) injection was applied one time every day for 2 days on neuropathic rats. Control group(CON) were not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to that of iNOS. The iNOS signal was enhanced in the sample from the neuropathic rat when compared with that from the untreated control group and attenuated in the sample from SWAE-treated neuropathic group(NP+SCPD) when compared with that from the neuropathic group. Each lane was loaded with 60µg protein. Data are expressed as mean±SEM. *** p<0.001, compared with the untreated control group. +++ p<0.001, compared with the neuropathic group.
 CON : untreated Control group
 NP : untreated Neuropathic group
 NP+SCPD : Scolopendrid treated Neuropathic group

가 여부와 이에 대한 蜈蚣 약침의 영향을 알아보기 위한 실험을 시행하였다. 모든 동물은 L5 척수신경을 결찰하여 신경병증이 유도된 후 환측 하지 발바닥에서 기계적 자극에 대한 역치가 현저하게 감소하였다. 정상동물과 신경병증 동물 및 신경병증 유도 후 蜈蚣 약침을 처치한 동

동물들의 척수에서 iNOS를 분석해 본 결과, 신경 병증 동물은 정상동물에 비해 iNOS가 유의하게 증가하였으며, 蜈蚣 약침을 처치한 신경병증 동물은 처치하지 않은 신경병증 동물에 비해 iNOS가 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

9. 신경병증성 동물의 척수에서 nNOS 단백질에 대한 Western blot

L5 척수신경을 결찰 (ligation)하여 유도한 신경병증성 통증 실험 모델에서 蜈蚣 약침을 2일 동안 하루에 한 번씩 주고 3일째 척수에서 nNOS (neuronal NO synthase) 단백질을 분석하여 말초신경 손상에 의한 nNOS 단백질의 증가 여부와 이에 대한 蜈蚣 약침의 영향을 알아보기 위한 실험을 시행하였다. 모든 동물은 L5 척수신경을 결찰하여 신경병증이 유도된 후 환측 하지 발바닥에서 기계적 자극에 대한 역치가 현저하게 감소하였다. 정상동물과 신경병증 동물 및 신경병증 유도 후 蜈蚣 약침을 처치한 동물들의 척수에서 nNOS를 분석해 본 결과, 신경병증 동물은 정상동물에 비해 nNOS가 유의하게 증가하였으며, 蜈蚣 약침을 처치한 신경병증 동물은 처치하지 않은 신경병증 동물에 비해 nNOS가 유의하게 감소하였다(Fig.10).

IV. 고 찰

蜈蚣은 절족동물 다족류중 大蜈蚣科 (왕지네과)에 속하는 지네⁷⁻¹⁰로서, 홍¹¹)은 한국산 蜈蚣의 형태학적 및 그 기원에 관한 연구에서 대부분이 노랑머리지네 *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch임을 보고한 바 있다. 흔히 石間 陰濕地의 낙엽 아래에서 서식하는 *Scolopendra* sp.(지네)의 蟲體로 체구는 扁平細長하고 전체 길이가 5-6寸 정도로, 頭部 및 下面은 청갈

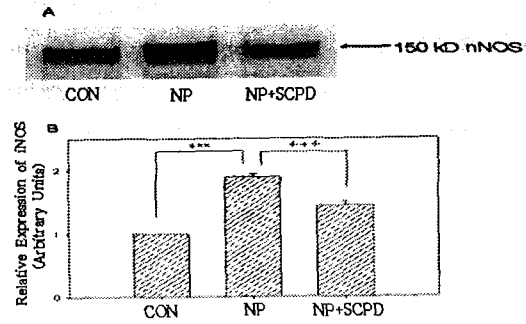


Fig. 10. Western blot (A) and densitometric (B) analysis of nNOS(neuronal NO synthase) expression in the spinal cord samples from the 3 groups. Neuropathic group (NP) was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Scolopendrid Water-Alcohol Extract(SWAE) injection was applied one time every day for 2 days on neuropathic rats. Control group(CON) were not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to that of nNOS. The nNOS signal was enhanced in the sample from the neuropathic rat when compared with that from the untreated control group and attenuated in the sample from SWAE-treated neuropathic group(NP+SCPD) when compared with that from the neuropathic group. Each lane was loaded with 30 μ g protein. Data are expressed as mean \pm SEM. *** p<0.001, compared with the untreated control group. +++ p<0.001, compared with the neuropathic group.

CON : untreated Control group
 NP : untreated Neuropathic group
 NP+SCPD : Scolopendrid treated Neuropathic group

색, 背部는 암녹색이며 전체가 많은 環節로 되고 각 環節마다 1대의 脚足이 있어 그 말단은 고리모양을 이룬다. 頭部에는 여러 개의 單眼과 1대의 鞭狀촉각을 갖는다⁷⁻¹⁰.

蜈蚣은 <神農本草經>에 “蜈蚣味辛溫 主鬼疰 猛毒 敢諸蛇虫魚毒 殺鬼物 老精溫瘡 去三虫” 이라고 최초로 기재되었다¹²⁾. <本草綱目>에는 小兒驚癇風搐, 躄風口噤, 丹毒禿瘡癩癧, 便毒痔漏, 蛇瘻蛇瘡蛇傷 등을 다스린다¹²⁾ 하였다. <臨床本草學>⁹⁾에 蜈蚣은 性味が 辛溫有毒하고, 歸經은 肝經이며, 效能은 祛風鎮痙, 攻毒散結, 解蛇毒이고, 祛風鎮痙의 效가 있기 때문에 急·慢驚風 등으로 인한 痙攣, 抽搐 口噤, 角弓反張 등에 응용하며, 解毒작용이 현저하여 瘡瘍腫毒 癩癧潰爛 등의 證을 다스리며 毒蛇咬傷을 다스린다. 急·慢驚風과 破傷風으로 痙攣, 抽搐, 角弓反張 등이 나타날 때 全蝎, 白僵蠶, 釣鉤藤과 배합하여 응용⁹⁾한다. 또한 蜈蚣은 通絡止痛의 효능으로 全蝎과 함께 防風, 獨活, 威靈仙 등 祛風, 除濕, 通絡 약물들과 써서 風濕痺痛, 流走不定, 痛勢極烈에 사용한다^{9,10)}. <醫學衷中參西錄>에 蜈蚣은 走竄의 힘이 신속하여 內로 臟腑와 外로 經絡에 氣血이 응제한 곳을 모두 능히 開하고, 微毒이 있어 毒을 善解⁷⁾한다고 하였다. 따라서 內로는 肝風萌動, 驚癇眩暈, 抽掣瘳癧, 小兒躄風을, 外로는 經絡中風, 口眼喎斜, 手足麻木 등을 다스리며, 뱀을 제압하므로 蛇證과 蛇咬中毒을 다스린다⁷⁾고 하였다. 蜈蚣은 頭尾가 모두 赤紅色으로 南方의 火毒의 性을 띠고 있으므로 능히 陰毒을 공격할 수 있다¹³⁾고 하였다.

蜈蚣에는 蜂毒과 유사한 유독물질, 즉 histamine성 물질과 용혈성 단백질이 들어 있는¹⁴⁾ 외에 지방유, 콜레스테롤, 개미산, 아미노산 등이 들어 있는 것으로 알려져 있다. 또 δ -hydroxylysine도 들어 있고, histidine, arginine, ornithine, lysine, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, serine, taurine, glutamine acid 등의 아미노산도 들어 있다^{7,15)}. 동속 동물인 Scolopendra morsitans L의 혈의 단백질은

전기영동에 의해 다음과 같은 5가지로 구분된다. 첫째는 사람의 혈청 albumin과 비슷한 것이고, 둘째는 α_1 -globulin이며, 셋째는 α_2 -globulin이고, 넷째는 γ -globulin이며, 다섯째는 단백질이 사람의 것과 다르다. 또 이 혈액은 fibrinogen성 물질이 들어 있지 않기 때문에 응고되지 않는다⁷⁾.

蜈蚣과 全蝎은 단독으로 응용시에 抗驚厥作用이 있는데, 抗驚厥작용을 비교하면 蜈蚣이 全蝎에 비하여 현저하다¹⁶⁾. 小棘巨蜈蚣과 墨江蜈蚣이 驚厥을 안정시키는데 뚜렷한 대항작용이 있는데, 이 두 종류의 蜈蚣의 鎮靜作用은 주로 脊髓에 작용한다¹⁷⁾. 止痙散(全蝎, 蜈蚣)은 1일 1g씩 1, 3, 9일 연속 경구 투여한 후 pentylenetetrazol (cardiazol), strychnine, pure nicotine의 반수 경련량에 의하여 나타난 마우스의 경련에 대해 鎮靜作用을 나타냈다. 동량을 투여할 경우에 상술한 3종의 약물에 의한 경련에 길항하는 효과는 蜈蚣이 全蝎보다 높았지만, 염산 코카인성 경련에 대해서는 효과가 없었다⁷⁾. 히스타민과 5-히드록실아민 매개로 생긴 大鼠 족과관절 종창에 또한 뚜렷한 억제작용이 있었다¹⁸⁾. 大鼠의 carboxymethyl cellulose로 일어난 백혈구의 복강내 유주에 있어 특히 현저하게 억제작용이 있다¹⁹⁾.

일반적으로 임상에서 약침액 용량은 대한약침학회 무균실에서 조제한 0.03 g 蜈蚣 분말을 9 ml 생리식염수에 용해시켜 3 ml syringe 3개로 나누어 1회당 1개씩 사용하였고, 한 穴位당 1~3 ml씩 주입하여 사용하는데, 실험동물의 경우에는 경혈 부위에 1~3 ml씩 주입할 수 없기 때문에 약 1/10 정도인 100 μ l를 주입하였다. 이러한 제한 때문에 본 연구에서는 4 mg/kg의 농도를 최대 농도 사용하였다. 그리고, 임상에서 주로 통증 유발부위에 약침을 주입하여 사용하

고 있으므로 본 연구에서도 신경병증성 통증을 유발시키는 부위에 있는 경혈인 腎俞(BL23)을 선택하였다. 대조군으로 흉복부에서 임의의 혈로 大腸의 募穴인 天樞(ST25)을 선택하였고, 하지부에서 足厥陰肝經의 原穴인 太衝(LR3)을 선택하였다. 腎俞(BL23)²⁰⁾는 足太陽膀胱經의 背俞穴로서, 제 2 腰椎下 兩傍 각 1.5寸에 위치하고 穴性은 滋補腎陰, 振氣化, 祛水濕, 強腰脊, 益水壯火, 益聰明目이며 主治는 腎臟炎, 腎虛腰痛, 遺精, 早漏, 小便濁, 月經不調, 帶下, 膀胱痙攣, 疝痛, 子宮炎, 虛勞, 腰痛, 水腫, 消渴, 食多, 尿頻, 耳聾, 耳鳴 등이다. 天樞(ST25)²⁰⁾는 足陽明胃經의 穴로서, 神闕(臍中) 兩傍 각 4寸에 위치하고 穴性은 疏調大腸 調中和胃 理氣健脾 扶土化濕 和營調經 理氣消滯이며 主治는 急慢性胃炎 腸炎 腹脹 腹痛 月經不調 便秘 泄瀉 嘔吐 腸鳴 繞臍痛 腰痛 등이다. 太衝(LR3)²⁰⁾은 足厥陰肝經의 原穴로서, 제 1·2中足骨間(行間後 2寸)에 위치하고 穴性은 清熄肝火 肝陽 疏泄下焦濕熱 疏肝理氣 通絡活血이며 主治는 肝機能障礙 黃疸 腹脹 消化不良 疝氣 渣泄 腸炎 關格 頭痛 頭暈 咽喉痛 腰痛引小腹 등이다.

본 실험에 사용된 신경병증성 통증 실험 모델은 기계적 이질통을 나타내는 동물 모델이다. Fig. 1에서 만성 통증 모델인 신경병증성 통증을 유발시키기 위하여 척수신경 결찰 (ligation) 모델을 유도하였다. 두 그룹, 즉 L5 척수신경 결찰 신경병증 유발군, L5 척수신경을 결찰하지 않은 가-수술(sham operation)군으로 나누어 실험한 결과, L5 척수신경 결찰 신경병증 유발군은 기계적 자극에 대한 역치가 유의하게 감소하였고, 가-수술군은 유의한 변화가 없었다. 따라서 L5 척수신경 결찰로 인해 신경병증이 유발된 것임을 의미한다.

Fig. 2에서는 L5 척수신경을 손상시켜 유발시

킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과를 알아보았다. 두 그룹, 즉 환측 腎俞(BL23)에 蜈蚣 약침 주입군, 생리식염수 주입군으로 나누어 실험한 결과, 蜈蚣 약침 주입군은 L5 신경 결찰에 의해 감소된 기계적 자극에 대한 역치를 유의하게 증가시켰으나, 생리식염수 주입군은 유의한 변화가 없었다. 이러한 기계적 자극에 대한 역치 상승은 蜈蚣 약침이 신경병증성 통증에 대해서 진통효과가 있음을 의미한다.

Fig. 3에서는 L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과를 알아보았다. 세 그룹, 즉 蜈蚣 약침의 환측 腎俞 주입군, 蜈蚣 약침의 건측 腎俞 주입군, 생리식염수의 환측 腎俞 주입군으로 나누어 실험한 결과, 생리식염수 주입군은 유의한 변화가 없었고, 蜈蚣 약침군은 건측에 주입하는 것 보다 환측에 주입하는 것이 더욱 강한 진통 효과가 있었다. 따라서 환측에 직접 주입하는 것이 더욱 강한 진통효과가 있음을 의미한다.

Fig. 4에서는 L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과가 경혈의 위치에 유의성을 갖고 있는지 알아보았다. 세 그룹, 즉 蜈蚣 약침의 환측 腎俞(BL23) 주입군, 복부 天樞(ST25) 주입군, 환측 太衝(LR3) 주입군으로 나누어 실험한 결과, 腎俞에서는 기계적 자극에 대한 역치가 현저하게 증가하였으나, 天樞나 太衝에서는 기계적 자극에 대한 역치가 유의한 정도의 경미한 상승이 있었다. 따라서 蜈蚣 약침은 환부 근처에 직접 주입하는 것이 더욱 효과적임을 의미하며, 신체의 다른 경혈 부위에 자극을 하더라도 일정한 시간이 지나면 진통효과를 발휘하는 것으로 보인다.

Fig. 5에서는 L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 진통효과가 농도 의존적인지의 여부를 알아보는 실험을 실시하였다. 신경병증성 통증이 유발된 동물에 蜈蚣 약침의 농도를 0.01, 0.1, 1, 4 mg/kg로 달리하여 주입하여 실험한 결과, 환측의 腎俞에 자극한 蜈蚣 약침은 농도 의존적으로 신경병증성 통증에서 진통효과를 나타내었고, 생리식염수 주입군은 유의한 변화가 없었다. 따라서 신경병증성 통증에 오피오이드 약침이 농도 의존적으로 진통효과가 있음을 의미한다.

Fig. 6에서는 L5 척수신경을 손상시켜 유발시킨 신경병증성 통증을 가지고 있는 실험동물에서 蜈蚣 약침의 반복 투여가 진통효과가 미치는 영향을 알아보았다. 세 그룹, 즉 오피오이드 약침의 환측 腎俞 1회 주입군, 오피오이드 약침의 환측 腎俞 2회 주입군, 환측 腎俞 생리식염수 주입군으로 나누어 실험한 결과, 오피오이드 약침의 환측 腎俞 1회 주입군보다 환측 腎俞 2회 주입군이 진통효과를 오랫동안 지속시켰고 환측 腎俞 생리식염수 주입군은 유의한 변화가 없었다. 따라서 蜈蚣 약침의 반복 투여가 진통효과를 더 오랫동안 지속시키는 것을 의미한다.

신경병증성 통증의 기전에 대해 최근에 Na^+ channels, NMDA (N-methyl D-aspartate) receptor complex, neurokinin-1 receptors, adrenergic receptors, cholinergic channels 등에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있고, 새로운 Ca통로차단제, Na통로차단제, 경구용 NMDA (N-methyl D-aspartate) 길항제 등을 개발하고 있으며 또한 유전적인 접근도 많이 시도되고 있다. 신경병증성 통증의 중요한 병리적 현상이 지속적인 신경의 firing이기 때문에 신경병증성 통증을 치료하는데 사용되는 약물은 채널 차단

제가 많이 사용되고 있다. 신경병증성 통증이 유발된 후 Na^+ 채널의 발현에 변화가 생기고 신경 손상 후에 척수 후근절 세포에서 Na^+ 채널의 활동성과 유전자 발현에 변화가 생기는데 이러한 변화가 신경병증성 통증과 관련된 1차 구심섬유의 민감도를 증가시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다^{21,22}. 그리고 실제로 Na^+ 채널의 차단제가 신경병증성 통증에 antinociceptive 효과를 나타내었다²³. 또한 Ca^{2+} 채널 길항제도 신경병증성 통증을 완화시킨다²⁴.

carbamazepine, phenytoin, felbamate 같은 항경련제가 신경병증성 통증을 치료하는데 사용되어 왔으며, gabapentin 또한 원래는 항경련제로서 개발되었으나 현재는 강력한 진통효과가 있는 것을 발견하여 신경병증성 통증을 조절하는 약물로서 이용되고 있는데²⁵ 이의 작용기전은 아직까지 분명히 밝혀지지 않았다. 현재까지 알려진 내용을 살펴보면 신경병증성 통증의 발생은 1차, 2차 통각과민, 말초와 중추 감각, wind-up 현상과 같은 일련의 변화를 포함한다. 신경전달물질은 이러한 과정에 중요한 역할을 수행한다. NMDA(N-methyl D-aspartate) 수용체의 입구를 막고 있는 Mg^{2+} 이 외부 조건에 의해서 입구로부터 멀어지면 세포안으로 Ca^{2+} 이 들어오게 되는데 이 Ca^{2+} 은 세포내에서 이차전령으로서 역할을 수행하여 PKC를 활성화시키고, PLC와 NOS의 생성과 protooncogene의 발현을 유발시킨다. 그러므로 NMDA 수용체가 활성화되면 유해수용 시스템의 반응성을 증가시킨다. 이러한 일련의 과정 중에서 gabapentin은 Ca^{2+} 채널의 $\alpha(2)\delta$ Subunit에 결합²⁶하여 채널을 차단함으로써 통증이 증가하는 과정을 차단함으로써 진통효과를 얻는 것으로 보인다.

본 연구의 결과 신경병증성 통증에 강력한 진통효과를 발휘하는 것으로 알려져 있는 gaba-

gabapentin의 효과와 蜈蚣 약침의 효과를 비교하면 蜈蚣 약침이 충분히 높은 농도의 자극인지는 알 수 없지만, 蜈蚣 약침 4 mg/kg이 gabapentin 50 mg/kg에 해당하는 진통 효과를 나타내었으며, 더욱이 gabapentin에서는 관찰할 수 없었던 1회 약침 주사 후 다음날 baseline이 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 蜈蚣도 항경련제로서 진통효과가 우수하다는 점과 본 연구에서 살펴보았던 것처럼 신경병증성 통증에 강력한 진통효과를 발휘한다는 점으로 보아 앞으로 蜈蚣 약침과 Na^+ 채널이나 Ca^{2+} 채널과 같은 이온 채널과의 관계를 더욱 깊이 연구하여야 할 것으로 사료된다.

또한, 본 연구는 L5 척수신경을 결찰함으로써 손상을 주어 유발시킨 신경병증성 통증 동물모델에서 蜈蚣 약침의 진통작용과 신경 손상으로 인해 척수에서 증가된 NO (nitric oxide) 및 NOS (NO synthase)가 어떤 관계가 있는지 밝히고자 하였다.

NO는 NOS (NO synthase)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는데, NOS는 많은 생리적 과정(physiological process)의 조절에 중요한 역할을 한다. NOS의 여러 가지 isoforms중에 주요한 3가지, 즉 iNOS (inducible NO synthase), nNOS (neuronal NO synthase), eNOS (endothelial NO synthase)가 있다. 신경세포에서는 칼슘 의존적으로 활성화되는 신경원세포의 nNOS가 항상 발현되고 있으며, 신경교세포들은 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β 등 각종 cytokine 등에 의해서 칼슘에 비의존적으로 합성되는 iNOS, 그리고 마지막으로 혈관내피세포와 별아교세포 등에서 칼슘의존적으로 항상 합성되고 있는 혈관내피세포의 eNOS가 있다^{27,29)}. L5 척수신경 손상에 의해 신경병증성 통

증이 유도된 후 척수에서 nNOS 및 iNOS 단백질 발현이 증가되어 NO 생산이 증가되며, 이러한 NO는 만성 통증에서 발생하는 통각과민(hyperalgesia)에 매우 중요한 역할을 하고 있다³⁰⁾. NO는 1980년대부터 중추신경계의 전령물질로서 인식되어 왔다²⁷⁾. NO의 활성화는 NOS라는 중요한 합성단백질에 의존한다. CNS의 통증 발생과정에서의 역할을 포함하여 NO에 대한 많은 기능들이 알려져 있다.

nNOS는 염증이 발생하면 활성화 및 발현이 모두 증가한다. 염증의 급성기에 NO가 증가되었다는 것은 arginine의 이용이 증가되었다는 것뿐만 아니라 NOS의 활성화와 발현 및 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase의 활성이 증가되었다는 가리킨다³¹⁾. 말초 신경을 결찰하면서 신경이 손상되는 과정에서 국소 염증이 발생하고 침해수용기(nociceptor)의 free nerve ending이 활성화된다. 염증이 시작된 후에는 C-fiber에서 높은 진동수의 신경방전이 생긴다. 이러한 높은 진동수의 신경방전은 구심성 신경섬유의 중추종말로부터 glutamate와 neurokinin들을 방출시킨다³²⁾. CNS에서 NO는 NMDA (N-methyl D-aspartate) 수용체와 밀접한 관계에 있다. 내인성 Glutamate에 의해 NMDA 수용체가 활성화되면 중추신경세포내로 칼슘이 유입되어 nNOS를 활성화시키고 NO가 방출되게 되는데, NO는 또한 cGMP를 증가시켜 guanylyl cyclase를 활성화시킨다²⁷⁾. non-NMDA 수용체 및 NK-1과 CGRP 수용체와 같은 펩타이드 수용체의 작용에 의해 흥분성 시냅스 전위가 발생하면 NMDA 수용체를 차단하고 있는 전압 의존성 Mg^{2+} block이 제거된다. 이 과정을 통하여 NMDA 수용체가 활성화되면 Ca^{2+} 이 NMDA 수용체의 이온통로를 통해 세포내로 들어오게 된다. nNOS는 Ca^{2+} -calmodulin

의존성으로, 세포내 칼슘이온에 의해 효소의 calmodulin 민감 부위에서 활성화된다. 많은 양의 칼슘이온 유입은 nNOS를 활성화시켜 NO 생산을 증가시킬 수 있다. 이러한 nNOS의 활성화는 칼슘이온을 유입하고 동원시키는 시냅스 후 신경전달물질 수용체에 달려 있을 뿐만 아니라, 전압 의존성 칼슘이온통로를 통해 칼슘이온의 유입을 유도하는 시냅스 전 신경의 활동전위에 달려 있다. 그러므로 신경병증성 통증 모델은 말초신경이 손상되면서 primary afferent에서 지속적인 자극에 의해 계속적인 칼슘이온 유입과 NO를 생성시킬 수 있는 만성 염증모델이다. 이러한 변화는 시냅스 전달을 가능하게 하며, 중추감작(central sensitization) 및 통각과민(hyperalgesia)와 같은 현상으로 나타난다. 척수에서 NMDA (N-methyl D-aspartate) 수용체가 hyperalgesia와 관련이 있고 또한 NMDA 수용체와 NO가 매우 밀접한 관계에 있기 때문에, 척수에서 hyperalgesia를 발생시키는 일련의 과정에 NO가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.

iNOS는 칼슘 비의존성으로 원래 사이토카인에 의해 자극된 대식세포에서 발견되며, 다른 두 형태의 NOS보다 염증과 더욱 밀접한 관계에 있다. 독성을 나타낼 수 있는 양의 NO를 생산할 수 있는 NOS가 바로 iNOS이다. iNOS는 또한 중추감작(central sensitization)과 관련있다고 증명되었다. 척수에서 iNOS는 정상동물 및 adjuvant 관절염 동물에서 pependymal cell layer와 central canal 주위에 있는 ependymal cell의 process에 분포하고 있다고 보고되었다³⁰⁾. Ependymal cell은 CNS에 있는 glial cell의 일종으로, 면역 및 염증반응에 관여한다. 통각과민(hyperalgesia)를 발생시키는 많은 말초자극들은 사이토카인과 같은 가용성 신호전달물질을

방출하여 척수나 뇌에 종결하고 있는 말초신경을 활성화시킨다. 말초 자극은 척수에서 glial cell들을 활성화시키며³³⁾, 척수의 glial cell에서 사이토카인, NMDA (N-methyl D-aspartate) 효현제, NO가 방출되기도 한다³⁴⁾. iNOS의 발현은 주로 전사단계에서 조절된다. 그러므로 말초 염증이 있으면 이러한 인자들은 말초뿐만 아니라 CNS에 있는 iNOS의 발현에 영향을 미칠 수 있다. Central canal을 둘러싸고 있는 부위는 serotonin³⁵⁾, SP³⁶⁾, glutamic acid decarboxylase³⁷⁾, vasoactive intestinal polypeptide³⁸⁾, calcitonin gene-related peptide³⁹⁾와 같은 여러 신경화학물질들을 유의성있는 농도로 함유하고 있는 곳이다. Ependymal cell들은 central canal 근처에서 방출되는 물질에 의해 활성화된 후 iNOS를 상향 조절한다.

본 연구는 L5 척수신경을 단단히 결찰하여 유발시킨 신경병증성 통증 모델의 척수에서 NO, iNOS, nNOS 단백질의 발현을 분석한 결과, 이전에 연구된 결과들과 마찬가지로 척수에서 NO, iNOS, nNOS의 발현이 현저하게 증가되는 결과를 얻었다(Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10). 이 모델에 蜈蚣 약침 자극을 하여 증가된 척수의 NO, iNOS, nNOS에 대한 이들의 효과를 분석한 결과, 蜈蚣 약침 자극은 척수에서 신경 손상에 의해 증가된 NO 및 iNOS, nNOS를 유의하게 감소시켰다(Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10). 신경병증성 통증에서 척수의 NO 및 iNOS, nNOS 증가는 말초 신경이 손상되면서 염증에 의해 통증이 발생한 것을 의미하며, 약침 자극을 가한 후 염증에 의해 증가된 NO 및 iNOS, nNOS 단백질의 발현이 감소되었는다는 것은 신경병증성 통증 모델에서 蜈蚣 약침이 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

이상으로 신경병증성 통증에서 蜈蚣 약침의

진통효과를 살펴보았다. 총괄하면, L5 척수신경을 손상시켜 유발한 신경병증성 통증 실험 모델에서 蜈蚣 약침은 강력한 진통효과를 발휘하였고, 이러한 진통효과는 환부에 직접 주입하는 것이 더욱 우수한 효과를 나타내었으며, 蜈蚣 약침의 반복투여는 진통효과를 더욱 오랫동안 지속시켰다. 蜈蚣 약침의 효과는 蜈蚣 약침의 농도에 비례하여 진통효과를 나타내었고, 蜈蚣 약침 4 mg/kg이 gabapentin 50 mg/kg에 해당하는 효과를 나타내었다. 그리고 蜈蚣 약침은 신경 손상으로 인하여 증가된 NO, nNOS, iNOS를 억제시키는 것으로 보인다.

침의 효능과 蜈蚣 자체의 효능을 결합시켜 그 효능을 극대화시킨 蜈蚣 약침을 적극적으로 효과적으로 활용한다면, 만성 질환이나 난치성 질환의 돌파구를 마련할 수 있으리라고 사료된다.

V. 결 론

本 研究에서 척수신경을 손상시켜 유발한 신경병증성 통증 모델을 사용하여 蜈蚣 약침의 진통효과를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 환측 腎俞(BL23)에 주입한 蜈蚣 약침은 농도 의존적으로 흰쥐의 신경병증성 통증에 강력한 진통효과를 나타내었다.
2. 신경병증성 통증에서 蜈蚣 약침은 환부에 직접 주입하는 것이 더욱 강력한 진통 효과를 나타내었으며, 원위부 자극에도 일정한 효과를 나타내었다.
3. 신경병증성 통증에서 蜈蚣 약침의 반복 투여는 진통효과를 더욱 오랫동안 지속시켰다.
4. 腎俞(BL23) 부위에 주입한 4 mg/kg의 蜈蚣 약침은 복강 내로 투여한 gabapentin 50 mg/kg의 효과에 해당하는 진통효과를

발휘하였다.

5. 신경병증성 통증에서 蜈蚣 약침이 신경 손상에 의해 증가된 NO와 nNOS/iNOS를 억제시켰다.

以上の 實驗結果를 통해 신경병증성 통증에 蜈蚣 약침이 진통효과가 있음을 확인하였다. 다른 종류의 만성 통증 모델을 사용하여 본 연구의 결과를 확인하는 深度있는 研究가 있어야 할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 홍남두. 경희약대논문집. 1977 ; 5 : 20-7.
2. 정병태, 장경전, 송춘호, 안창범. 蜈蚣수침이 진통 및 진경효과에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997 ; 14(2) : 219-30.
3. 이동희, 김호철, 안덕균. 蜈蚣의 항고혈압작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1997 ; 12(2) : 39-49.
4. 고강훈, 박소영, 이경운, 최희강, 소기숙, 이종덕, 김성철. 오공 약침을 이용한 요추간판탈출증 치료의 임상적 연구. 대한약침학회지. 2001 ; 4(3) : 47-57.
5. 대한약침학회. 약침제재와 임상응용(I). 서울 : 대한약침학회출판부. 1997 : 227.
6. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain. 1992 ; 50(3) : 355-63.
7. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균. 중약대사전. 정담. 1998 : 3919-23.
8. 고순구. 약물독성학. 여강출판사. 1993 : 243-9.
9. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991 : 665.
10. 時逸人. 中國藥物學. 台聯國風出版社. (中華民國六十五年) 1977 : 404-5.
11. 홍남두. 생약학회지. 1975 ; 6 : 137.

12. 이시진. 본초강목(하). 인민위생출판사. 1982 : 2345-9.
13. 장은엄, 섭천사, 진수원. 본초삼가합주. 의도한 국사. 1976 : 13.
14. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 한약임상응용. 서울 : 성보사. 1990 : 441-2.
15. 陰健. 中藥現代研究與臨床應用. 北京 : 中醫古籍出版社. 1995 : 370-1.
16. 顏行伍. 中醫雜誌. 1960 ; 6 : 39.
17. 遲程. 雲南中醫學院學報. 1992 ; 15(1) : 23.
18. 趙秦. 全國首屆藥物資源開發研討會論文匯編. 1992 : 289.
19. 遲程. 雲南中醫學院學報. 1992 ; 15(1) : 25.
20. 鍼灸經穴學教室 編著. 鍼灸學(上). 集文堂. 1991 : 371, 489, 667.
21. Waxman SG. The molecular pathophysiology of pain : abnormal expression of sodium channel genes and its contributions to hyperexcitability of primary sensory neurons. *Pain*. 1999 ; Suppl 6 : S133-40.
22. Baker MD, Wood JN. Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *Trends Pharmacol Sci*. 2001 ; 22(1) : 27-31.
23. Erichsen HK, Hao JX, Xu XJ, Blackburn-Munro G. A comparison of the antinociceptive effects of voltage-activated Na⁺ channel blockers in two rat models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2003 ; 458(3) : 275-82.
24. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain*. 2003 ; 105(1-2) : 159-68.
25. Nicholson B. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand*. 2000 ; 101 : 359-71.
26. Gee NS, Brown JP, Dissanayake VUK, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. The Novel Anticonvulsant Drug, Gabapentin (Neurontin), Binds to the alpha(2)δ Subunit of a Calcium Channel. *J Biol Chem*. 1996 ; 271 : 5768-76.
27. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium -derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*. 1988 ; 326 : 385-7.
28. Vincent SR. Nitric oxide : a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progr Neurobiol*. 1994 ; 42 : 129-60.
29. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 ; 87 : 682-5.
30. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res*. 1998 ; 118 : 457-65.
31. Traub RJ, Solobkin A, Meller ST, Gebhart GF. Spina cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide synthase immunoreactivity increase following carrageenan-produced hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res*. 1994 ; 668 : 204-10.
32. Woolf CJ. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth*. 1989 ; 63 : 139-46.
33. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC,

- Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) on lumbar spinal cord increases following sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 1991 ; 565 : 1-7.
34. Meller ST, Dykstra C, Grzynbycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology.* 1994 ; 33 : 1471-8.
35. Lamotte CC, Johns DR, Lanerolle NC de. Immunohistochemical evidences of indolamine neurons in monkey spinal cord. *J Comp Neurol.* 1982 ; 206 : 359-70.
36. Tessler A, Glazer E, Artymyshyn R, Murray M, Goldberg ME. Recovery of substance P in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral differentiation. *Brain Res.* 1980 ; 191 : 459-70.
37. Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.* 1982 ; 238 : 305-28.
38. LaMotte CC. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *J Comp Neurol.* 1987 ; 258 : 527-41.
39. Chung K, Lee WT, Carlton SM. The effect of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett.* 1988 ; 90 : 27-32.