대한경락경혈학회지 Vol.21, No.4, pp.101~115, 2004
The Korean Journal of Meridian & Acupoint

고빈도 120 Hz 전침이 Cold-Restraint 스트레스 유발 흰쥐의 위점막에 미치는 影響

조미형[1] · 안창범[1] · 송춘호[1] · 윤현민[1] · 김철홍[1] · 장경전[1]

[1]동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

The Effects of 120 Hz High Frequency Electroacupuncture on the Gastric Mucosa in Cold-Restraint Stressed Rats

Mee-Hyeong Jo[1], Chang-Beohm Ahn[1], Choon-Ho Song[1], Hyoun-Min Yoon[1], Cheol-Hong Kim[1], Kyung-Jeon Jang[1]

[1]*Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University*

Abstract

Objective : The present studies investigated the effects of 120 Hz high frequency electroacupuncture (EA) on the stress-induced stomach dysfunction in relation to its effect on the level of stress hormones and gastric mucosal damages. The gastric mucosal injury was induced by cold-restraint stress and two acupoints corresponding to Zusanli and Sanyinjiao in man were used.

Methods : Cold-restraint stress produced typical gastric lesions in all rats of the stressed groups, but the number of ulcers as well as the mean ulcer diameter were reduced by 120 Hz EA pre-treatment.

Results : The degranulation value of gastric mast cell was significantly higher in cold-restrained rats than in control ones. However, with the significant reduction of degranulation values of gastric mast cells in EA pre-treated rats compared with cold-restrained rats. Cold-restarint stress induced an elevated mRNA expression of pro-inflammatory gene such as cyclooxygenases-2 and tumor necrosis factor (TNF)-α, but these expression were down-regulated in EA pre-treated rats. Immunohistochemical analysis showed that while the inhibitory-κBα and TNF-α immunorection in the surface epithelium of the stomach tended to increase, both reactions in the EA pre-treated rats showed similar pattern as observed in controls.

Conclusion : These results suggest that 120 Hz EA may act as a therapeutical means for gastric mucosal damages through an activation of pituitary adrenal system. It could be concluded that 120 Hz high frequency electroaucupuncture affords a good protective potential against stress-induced gastrointestinal dysfunction.

Key words : Electroacupuncture, Gastric Mucosa, Cold-Restraint

• 교신저자 : 장경전, 부산광역시 진구 양정2동 동의의료원 침구3과,
Tel. 051-850-8612, E-mail : kjjang@dmc.demc.or.kr
·접수 : 2004/09/28 ·수정 : 2004/11/25 ·채택 : 2004/12/17

Ⅰ. 緖 論

電鍼 療法은 穴位에 刺鍼하여 감응이 있은 후 鍼에 전기적 자극을 주어 經絡穴位의 작용을 통하여 질병을 치료하는 新鍼療法중의 하나로[1], 근년에 電鍼 療法은 手術 後, 分娩 時, 急 · 慢性 痛症에 동통완화를 위해 응용되고 있으며 이외에 鍼術 痲醉 등에도 이용되고 있다. 현재 국내외적으로 電鍼의 임상적 효용과 그 기전에 대한 연구가 각 질환별로 이루어지고 있다[2-3].

지금까지 전침에 대한 연구로는 전침자극이 흰쥐의 중추신경계에 미치는 영향[4-5], 뇌파에 미치는 영향[6], 전침으로 치료한 동안신경마비에 대한 증례보고[7], 電鍼을 이용한 구안와사의 임상적 관찰[8], 足三里 전침자극이 뇌혈류에 미치는 영향에 관한 核醫學的 考察[9] 등이 있다.

일반적으로 스트레스는 내외적 자극에 의해 체내 항상성과 조화가 깨어지는 상태를 말하며 자가 면역성, 감염성 및 신경 퇴화성 질환, 암 등 다양한 질병과 연관되어 있다[10-12]. 스트레스에 의한 위궤양은 산성의 위액에 의해 야기되는 소화성 궤양의 일반적인 형태이다[13].

흰쥐를 이용한 cold-restraint스트레스는 低溫과 拘束이라는 두 가지 스트레스 原을 혼합한 모델로서 스트레스 연관 질환 특히 육안으로 관찰 가능한 위궤양 형성 연구에 널리 쓰인다[14-15]. 이 실험 모델은 스트레스의 고전적인 신경내분비 반응을 유발할 수 있을 뿐 아니라 다양한 스트레스가 인체에 미치는 영향에 응용할 수 있다.

현재까지 cold-restraint에 의한 위궤양의 형성과정에 대해 충분히 설명되어 있지 않으나 위근육 수축, 위점막 미세순환저해, 비만세포 탈과립, 여러 biogenic amine과 활성 산소생성이 급성 위손상과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다[16-18]. 또한 이 같은 급성 스트레스에 대한 반응은 시상하부-뇌하수체-부신을 연결하는 축과 교감신경계 활성이 관여하며[10], 대부분 질환에 있어 매우 중요한 요인인 심리적 요인에 의한 혈압, catecholamine, cortisol분비 증가 등과 함께 면역기능에도 영향을 미친다[19-21].

이에 본 연구는 스트레스에 의한 급성 위궤양 형성 모델로 널리 쓰이고 있는 cold-restraint스트레스 유발 위손상 모델에 고빈도 120 Hz 전침을 적용했을 때 나타나는 실제적 효과를 관찰한 후, 비만세포 탈과립정도, 점액벽 차이와 더불어 nuclear factor(NF)κ-B를 중심으로 한 염증관련 인자에 대한 전사수준과 단백질 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 면역조직화학적 검색을 통해 연구하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 실험동물 및 cold-restraint 스트레스

8주된 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 효창 사이언스(주)로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 48시간 물만 공급한 채 절식시킨 대조군, 120 Hz 전침처치한 전침군, cold-restraint스트레스만 가한 CRS군, 전침처치 후 cold-restraint 스트레스를 가한 EA+CRS군으로 나누어 각 군 당 8 마리 씩 배정하였다. Cold-restraint스트레스는 Senay와 Levine[22]의 방법에 따라 특별히 제작된 케이스에 꼬리를 노출시키고 고정한 후 4±1℃ 저온실에 3시간 방치하였다.

2. 전침 자극

스테인레스 0.25 mm×30 mm 침을 실험동물에서 三陰交(SP6)와 足三里(ST36)에 상응하는 양측 혈위에 자침한 후 전침기(세창메디칼, SM-

600)에 연결하여 120 Hz 빈도로 30분간 자극하였다. 강도는 10분 간격으로 순차적으로 1, 2, 3 mA로 조절하였다.

3. 위궤양 관찰

10% chloral hydrate(350 mg/Kg i.p.)로 마취한 후 위를 절취하여 大彎부위를 따라 절개하고 찬 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 세척한 위를 cold plate에 놓고 핀으로 고정한 후 해부현미경하에서 위점막에 나타나는 손상부위를 관찰하고 계수하였으며 병변의 긴 직경을 측정하였다. 궤양지수(ulcer index)는 0, 무증상; 1, 점막부종과 점상출혈; 2, 1-5개의 작은 궤양 (1-2 mm); 3, 5개 이하의 작은 궤양과 1개의 중간크기 궤양 (3-4 mm); 4, 2개 이하의 중간크기궤양과 1개의 큰 궤양 (4 mm 이상); 5, 위천공 등으로 나누어 그 평균치를 궤양지수로 삼았다.

4. RT-PCR을 이용한 RNA발현 분석

위체부를 절취하여 homogenize시킨 후 TRIzol을 이용하여 조직에서 RNA를 추출하였다. 1 ml의 TRIzol에 200 ul chloroform을 넣은 후 10초간 voltex mix하고, 냉하에 10분간 방치하였다. Microcentrifuge로 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합한 후 천천히 흔들어 주었다. 그리고 microcentrifuge를 이용하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet에 70% EtOH를 넣고 vortex한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-DW 20 ul에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

역전사반응은 준비된 total RNA를 75℃에서 5분간 변성시키고, 10 mM dNTPs, random sequence primer, RNase inhibitor, 100 mM DTT, 10×RT buffer를 가한 후, 0.5 ul의 M-MLV RT를 다시 가하고, DEPC-water로 부피가 20 ul가 되도록 하였다. 이 20 ul의 mixture를 잘 혼합한 뒤 낮은 원심분리를 이용하여 spin down시킨 후 42℃에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다.

유전자 증폭을 위한 PCR machine을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 2 ul의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 Table 1과 같으며 sense primer와 antisense primer를 혼합하여 1 ul를 가하고, master mixture에 최종부피가 20 ul되도록 멸균 증류수를 가하였다. Predenaturation 95℃ 10분, denaturation 95℃ 1분, annealing 50℃ 1분, elongation 72℃ 1분을 38 cycles한 뒤 postelongation을 72℃에서 10분 동안 수행하였다. 각 PCR products는 10 ul씩 1.2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 15분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Table 1. Sequences of Primer Used for RT-PCR

Gene name		Sequence
IL-1β	Sense	GTCTTTCATCACACAGGA
	Antisence	TCCTGTGTGATGAAAGAC
IL-6	Sense	CTGTTCTGCTTTCTCATATG
	Antisence	CTGTTCTGCTTTCTCATATG
TNF-α	Sense	CTCCTCTCCGCCATCAAGAG
	Antisence	TGGGCTCATACCAGGGCTT
COX-2	Sense	CACTCAGGATGCTCCTGTTTG
	Antisence	TCTTTGCCCAGCACTTCACTCA
GAPDH	Sense	GAACATCATCCCTGCATCCA
	Antisence	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA

5. 동결절편 제작 및 조직병리학적 관찰

위를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 30% sucrose 용액에 3일간 둔

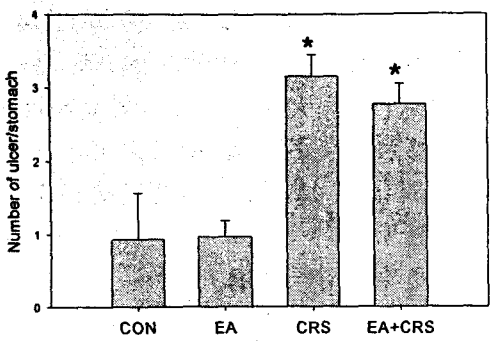

Fig. 1. Comparisons of number of ulcer in control(CON), electroacupuncture(EA), cold-restraint stress(CRS) and CRS after EA treatment groups(EA+CRS). The significant increase of gastric lesion formation were observed in CRS and EA+CRS compared with control ones, but slight decline in EA+CRS with CRS were detected. *, P<0.005 compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats.

후 cryostate로 10 ㎛ 동결절편을 제작하였다. 위의 조직병리학적 관찰을 위하여 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff's(PAS)염색을 실시하였다.

6. 비만세포 탈과립에 대한 조직화학적 관찰

0.25% toluidine blue(pH 4.0)로 염색하고 현미경 X400 시야에서 검경하여 다음과 같이 탈과립지수를 산출하였다. 탈과립지수(%) = [(정상 × 0) + (경도 × 50) + (강도 × 100)] / 비만세포의 총수]

7. 위표면 상피세포의 점액벽 측정

위표면상피세포의 산성 점액질과 중성 점액질을 모두 염색하는 alcian blue(AB) pH 2.5-PAS 염색법을 한 후 현미경하에서 micrometer로 점액벽 두께를 측정하였다.

8. 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해 10 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum(Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 NF-κBp65, inhibitory (I)-κBα, inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin(IL)-1α, tumor necrosis factor(TNF)-α, COX-2 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200:1로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit(Vector Lab., PK-6101)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit(Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS을 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

9. 통계처리

통계처리는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 6.0(SPSS, Chicago, IL)로 student's *t*-test로 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 위점막 손상 관찰

대조군과 전침군의 위점막에서는 점상충혈만이 일부 관찰되는데 비해 CRS군과 EA+CRS군 모두 심한 위점막 손상과 더불어 출혈이 관찰되

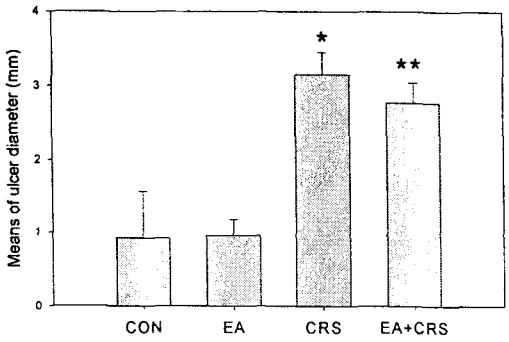

Fig. 2. Comparisons of means of uler diameter. Cold-restraint stress induced much longer gastric mucosal lesions than observed in controls, but these were reduced in EA+CRS. P<0.005 and ** P<0.01 compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

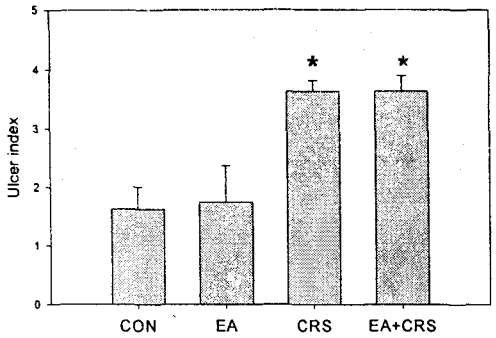

Fig. 3. Comparisons of means of ulcer index. The ulcer index were significantly increased in CRS and EA+CRS. * P<0.005 compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

었다. 각 군의 위점막에 관찰되는 평균 궤양수를 살펴보면 대조군과 전침군이 각각 0.75±0.41, 0.88±0.23 개로 통계적 유의성을 나타내지 않았으나 CRS군과 EA+CRS군은 각각 5.0±0.53, 4.0±0.37 개로 대조군에 대해 유의성(P<0.005)을 보여 주었다 (Fig. 1). 위점막 궤양의 평균 직경을 비교해 보면 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 0.93±0.64, 0.96±0.22, 3.15±0.30, 2.77±0.25 ㎜로 대조군에 비해 CRS군과 EA+CRS군은 각각 P<0.005, P<0.01 유의성을 보여 주었다 (Fig. 2).

관찰된 위점막 손상을 바탕으로 한 궤양지수를 살펴보면 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 1.63±0.38, 1.75±0.63, 3.63±0.18, 3.63±0.26을 나타내어 대조군에 비해 CRS군과 EA+CRS군은 유의성(P<0.005)을 보여 주었다 (Fig. 3). CRS군과 EA+CRS군을 비교해 볼 때 현저한 유의성을 보여 주지 않았으나 CRS군에 비해 EA+CRS군은 위점막에 관찰되는 평균 궤양수와 궤양직경이 줄었다.

2. 조직병리학적 관찰

대조군과 전침군에서 심한 위점막 손상은 관찰되지 않았으나 일부 자유표면상피세포의 탈락이 관찰되었으며 CRS군과 EA+CRS군에서 더 현저한 탈락이 관찰되었다. 특히 CRS군과 EA+CRS군에서 관찰되는 위궤양 부위에서 점막하층에 많은 염증세포 침윤, 심한 상피세포의 탈락과 더불어 위점막의 정형화된 구조가 상실된 부위도 관찰되었다.

3. 염증관련 유전자에 대한 위조직의 RT-PCR

위조직에 염증반응 유무를 알아보기 위해 염증관련 인자로 주요한 TNF-α, IL-1β, IL-6을 비롯하여 염증 뿐아니라 PGE_2 형성에도 관련되어 있는 COX-2에 대한 mRNA수준에서 발현을 관찰하였다. 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군의 mRNA발현을 비교해 보면 COX-2와 TNF-α

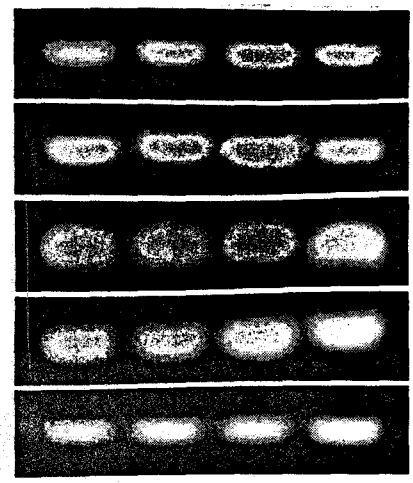

Fig. 4. Gel depicting RT-PCR products for COX-2, TNF-α , IL-1β and IL-6 from rats stomach. Note that COX-2 and TNF-α mRNA expression of CRS was slightly elevated compared with controls, but reduced in EA+CRS. There were no significant changes of IL-1β and IL-6 expression in all groups. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

의 mRNA 발현이 대조군에 비해 CRS군에서 다소 증가하였으며 EA+CRS군에 다시 감소하였다. IL-1β와 IL-6는 모든 군에서 유사한 mRNA 발현을 보였다 (Fig. 4).

4. 비만세포 탈과립 관찰

위체부의 점막하층에서 관찰되는 대부분의 비만세포는 0.25% toluidine blue에 강하게 염색되었으나 일부 경도의 탈과립을 나타내는 비만세포가 관찰되었다. 모든 군에서 강도의 탈과립을 나타내는 비만세포는 관찰되지 않았다. 비만세포 탈과립지수를 비교해 보면 대조군이 7.47±0.82%로서 전침군의 8.17±1.82%와 유의성을 보이지 않았으나 CRS군과 EA+CRS군이

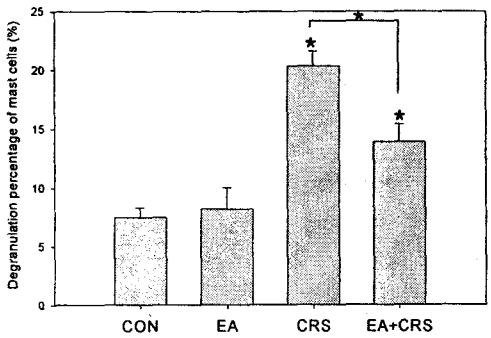

Fig. 5. Comparisons of degranulation value of gastric mast cells. CRS and EA+CRS groups were statically significant compared with controls, but EA+CRS were significantly reduced compared with CRS. * P<0.005 compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

각각 20.33±1.26, 13.88±1.49%로 유의성(P<0.005)을 보였다. CRS군에 비해 EA+CRS도 유의성(P<0.005) 있게 탈과립지수가 감소하였다 (Fig. 5 및 6).

5. 위표면 상피세포의 점액벽 관찰

AB pH 2.5-PAS 복합염색에 의한 위상피세포 점액질 양을 살펴보면 대조군에 비해 표면상피세포에서 점액양이 줄어들었으나 위소와상피세포에서 증가하였다. 각 군에 대한 점액두께를 측정해 본 결과 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 6.25±0.23, 6.58±0.18, 6.38±0.20, 6.50±0.18 ㎛으로 나타나 유사하였다 (Fig. 7 및 8).

6. 염증관련 인자에 대한 면역조직화학적 분석

소화성 궤양에서 주요한 보호작용을 하는 위

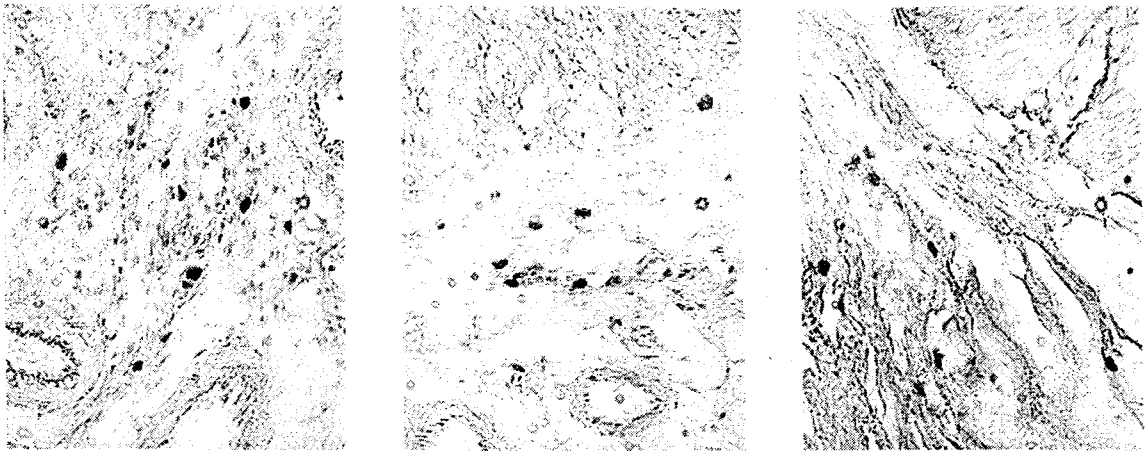

Fig. 6. 0.25 % toluidine blue stain in the stomach of the control(A), cold-restraint stress(CRS, B) and CRS after electroacupunture treatment (C). Note moderate degranulated mast cells in CRS rats(arrow). × 400.

상피세포의 염증관련 인자에 대한 면역조직 화학적 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 대조군의 NF-κBp65와 I-κBα는 표면상피세포에서 중등도 또는 이상의 반응으로 보이며 위소와 상피세포에서는 흔적적 내지 약한 반응을 보였다. 대조군에 비해 CRS군의 I-κBα가 다소 감소하며 EA+CRS군에서 회복되었다 (Fig. 9). COX-2는 대조군에서 반응을 나타내지 않았으나 특이하게 전침군과 EA+CRS군의 표면상피세포에서 약한 반응을 보였다.

TNF-α와 IL-1α의 면역반응은 대조군의 표면상피세포에서 약한 TNF-α을 보였으며 CRS군과 EA+CRS군에서도 유사한 반응을 보이나 궤양형성 부위에서 중등도의 반응을 나타내는 세포가 관찰되었다. iNOS는 표면상피세포에서 강한 반응을, 위소와에서 흔적적 내지 약한 반응을 보였으나 CRS군의 표면상피세포 면역반응이 감소한 반면 EA+CRS군에서 다시 증가하였다 (Table 2, Fig. 10)

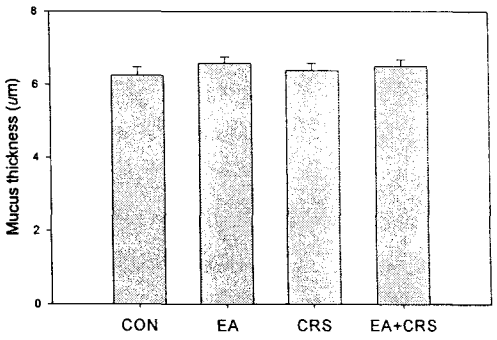

Fig. 7. The mucus thickness of the free surface epithelium in the stomach. There were no significant changes in all groups compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment. Cold-restrained rats than observed in controls. × 400.

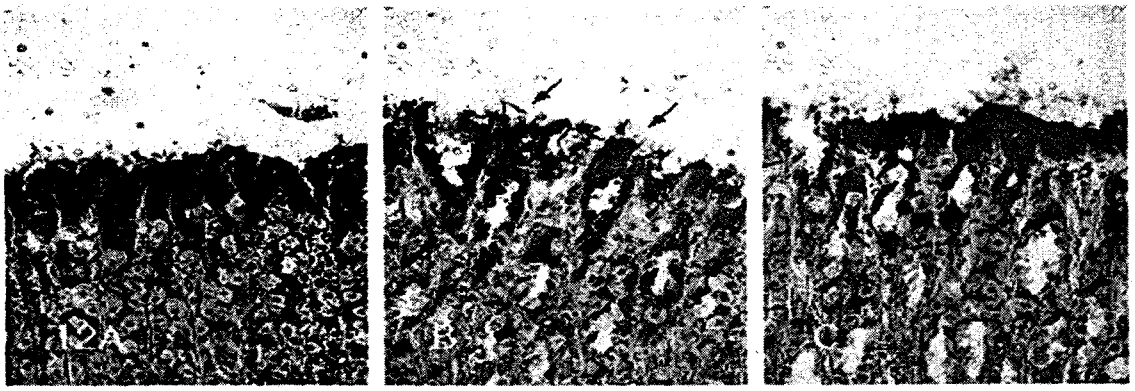

Fig. 8. AB at pH 2.5-PAS stain in the stomach of the control(A), cold-restraint stress(CRS, B) and CRS after electroacupunture treatment(C). Note slight gastric mucosal lesions in the free surface epithelium of CRS rats(arrows). × 400.

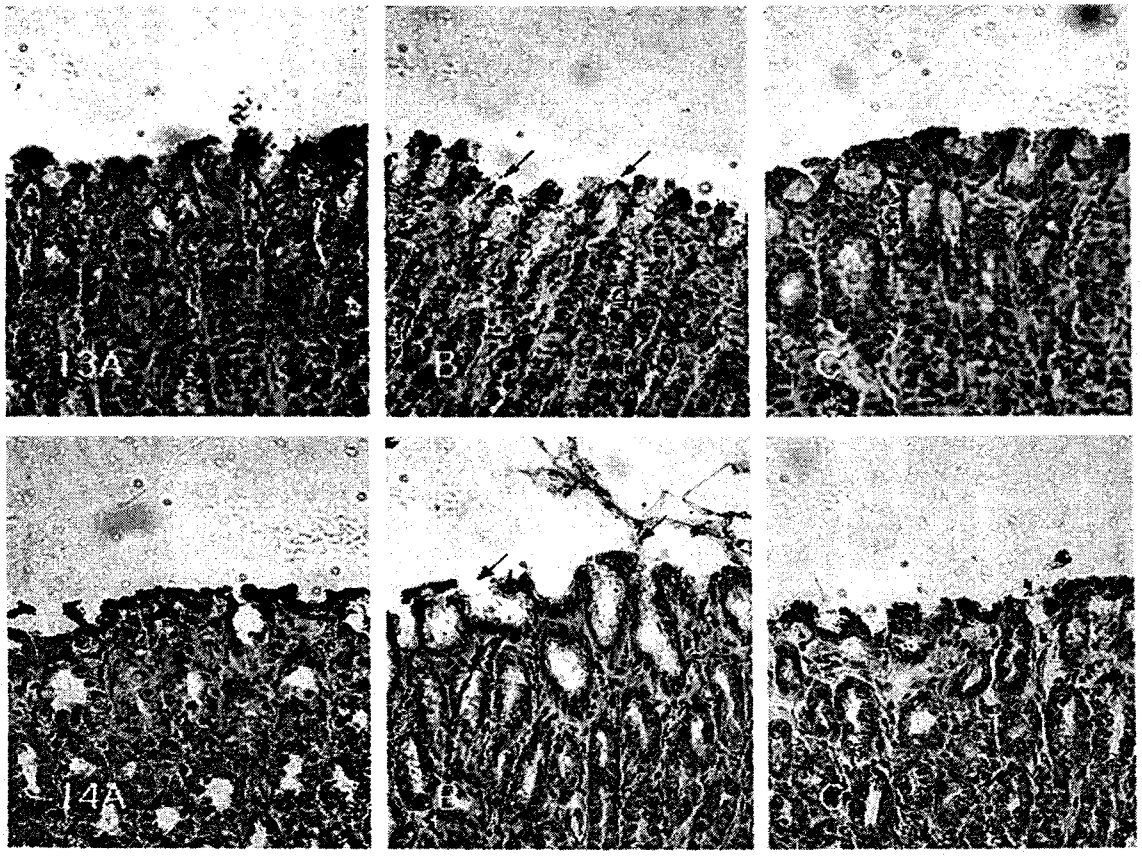

Fig. 9. and 10. I-κ Bα (Fig. 9) and iNOS(Fig. 10) immunoreaction of the stomach in the control(A), cold-restraint stress(CRS, B) and CRS after electroacupunture treatment(C). The intensive immunoreaction of both I-κ Bα and iNOS were mainly observed on the free surface epithelium of the stomach, but weaker reaction(arrows) were detected in cold-restrained rats than observed in controls. × 400.

Ⅳ. 考 察

전통적으로 소화성 궤양은 점액장벽와 위내강내 acid peptic attack 사이의 불균형으로 알려져 있다. 즉 위산과 pepsin 복합체는 공격인자로 보고 있고, mucin-bicarbonate 분비의 점액층, 지질층, 세포증식, prostaglandins, urogastrone/epidermal healing factor는 방어인자로 보고 있다[23-24]. 소화성 궤양 모델로서 잘 알려진 cold-restraint유발 궤양형성과정에 대한 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으나 미주신경의 외과적이거나 약리적 차단이 궤양형성을 저해하는 것으로 보아 위산분비보다 자율신경계의 관여 가능성이 높다[25].

위장관장애에 대한 鍼刺戟은 중추신경계를 통한 교감신경활성과 corticosterone 생성을 저하시킬 가능성을 가지고 있으나 위장관장애에 전침을 적용한 연구는 많지 않다[26-28].

해부생리학적으로 위교감원심성신경은 척수의 중하부 흉수분절에서 나와 내장신경을 거쳐 복강신경절에 도달하는데 7-12번째 늑간신경 자극은 내장신경내 분절반사를 형성함으로 복부에 침과 유사한 자극을 주었을 때 위교감 원심성신경을 통해 위반사를 저해한다[29-30]. 하지에 동일한 자극을 주었을 때 대퇴신경과 좌골신경 구심성신경 흥분에 따른 반사반응으로 위미주신경 원심성신경 활성을 증가시켜 위활성 증가를 유도한다[30].

침자극이 위장관에 미치는 영향에 대한 연구를 보면 足三里에 대한 전침자극은 위연동운동을 촉진 또는 저하시키는데 위산분비감소에 대한 효과는 내장 원심성신경에 의한다[28,31]. 위산분비에 대한 여러 자극의 영향을 살펴보면 여타 자극보다 전침과 transcutaneous electrical nerve stimulation가 현저한 위산분비 저해작용을 나타내고, 전통적인 침자극이나 laser acupuncture와 같은 미약한 자극에서는 작용하지 않으며 특히 경혈에 자극할 때만 위산감소가 나타났다[32].

전침에 대한 질환 치유 메커니즘은 동통을 중

Table 2. Immunohistochemical reactions of inflammation-related protein in the stomach

Antibody	Region	CON	EA	CRS	EA+CRS
NF-κ Bp65	FSE	++	++	++	++
	GPE	0-+	0-+	0-+	0-+
I-κ Bα	FSE	++-+++	++-+++	++	++-+++
	GPE	+	+	0-+	0-+
COX-2	FSE	0	0-+	0	0-+
	GPE	0	0	0	0
TNF-α	FSE	0-+	0-+	0-+,++*	0-+,++*
	GPE	0	0	0	0
IL-1α	FSE	0	0	0,++*	0,++*
	GPE	0	0	0	0
iNOS	FSE	+++	+++	++	+++
	GPE	0-+	0-+	0-+	0-+

0-+++ indicate the relative intensity of the reaction : +++, intense; ++, moderate; +, weak; 0, abscent. Abbreviations : FSE, free surface epithelium of the stomach; GPE, gastric pit epithelium of the stomach; CON, control; EA, eletroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment; NF, nuclear factor; I, inhibitory; COX, cyclooxygenases; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; *, mainly observed in the ulcer region.

심으로 한 척수와 시상에 대한 opioid 함유 신경원의 활성에 대한 보고가 주를 이루고 있다. 전침이 naloxone, opioid antagonist 등에 의해 저해되는 것으로 보아 endogenous opioid system이 관여하며 특정 빈도에 따라 중추신경계내 상이한 opioid system이 활성화되는 것으로 알려져 있다[33-34]. 그러나 전침이 위산분비 같은 내장운동성에 미치는 영향을 신경성, 호르몬, 傍分泌 메커니즘 등 다양한 원인에 의한 복합적인 효과로 볼 뿐 질환과 연관시킨 연구는 드물다[33].

電鍼 療法은 자극의 파형, 자극시간 및 빈도수에 따라 서로 다른 치료 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 근육조직의 손상을 최소화하는데 적합한 파형은 矩形波와 三角波가 결합된 spike wave이며 자극시간은 5분 또는 10-15분이 유효하고 빈도수는 得氣와 유사한 감각은 대개 1-5 Hz이고 마취는 1Hz가 효과적이고[35], Holmgren[36]은 빈도수가 높으면 鎭痛效果는 감소하고 筋緊張은 억제되며, 빈도수가 낮으면 鎭痛效果는 증대되나 이에 따른 筋緊張도 증대된다고 하였다. 電鍼 無痛覺의 연구를 보면 電鍼 빈도별 자극에 따라 중추신경계의 상이한 반응을 보이는데 2 Hz 같은 저빈도의 전기자극은 뇌와 척수 enkephalin과 β-endorphine을 분비하며 μ-와 δ-opioid receptor가 관계하고, 100 Hz 같은 고빈도 電鍼은 척수에서 dynorphin을 분비하며 척수배각의 κ-opioid receptor가 관여할 뿐 아니라 이 無痛覺 작용은 電鍼 처치 후에도 일정시간 지속된다[37-38].

일반적으로 자극 강도와 기간 사이에는 반비례 관계, 즉 강도가 강할수록 기간은 짧아져도 자극으로서 유효함을 알 수 있다[52]. 또한 빈도가 증가될수록 가중현상(summation)이 쉽게 일어나므로 고빈도 자극시에는 자극강도가 낮아져도 유효자극이 될 수 있다. 많은 실험에서 사용한 자극빈도는 25Hz의저빈도와 약 100Hz의 고빈도 자극으로 나누어지나, 특히 사용한 자극 강도에는 매우 큰 차이가 있다. 저빈도 자극시 12V 혹은 1mA미만의 약한 강도로 자극하여도 유의한 억제효과가 유발된다는 보고도 있는가 하면[53], 20-30mA 혹은 40-50V의 매우 강한 강도로 자극해야 유해자극반응이 억제되어 진통효과가 유발된다는 주장도 있다[54]. 따라서 고빈도 120 Hz 電鍼을 선택한 이유는 첫째로 저빈도 주파수에 비해 상대적으로 筋緊張이 억제되며 둘째로 電鍼 처치후 진통시간이 저빈도에 비해 상대적으로 오랫동안 지속된다고 보기 때문이다.

足三里는 足陽明胃經의 土穴로 理脾胃, 調中氣, 强健脾胃의 효능이 있어서 위장질환의 主治穴이고, 三陰交는 足太陰脾經의 穴로 補脾土, 助運化, 通氣滯의 효능이 있어 足三里와 三陰交를 배합하면 急慢性胃炎, 潰瘍病, 急慢性腸炎, 消化不良을 다스린다[2].

본 연구에서 소화성 궤양에 고빈도 120 Hz 전침을 足三里와 三陰交에 해당하는 혈위에 30분간 적용시켰을 때 육안적으로 cold-restraint에 의한 위궤양 형성 과정에 영향을 미침을 알았다. 대조군에 비해 전침처치만을 했을 때는 궤양 형성이 미미하나 CRS자극에 의해 궤양의 형성이 유의성 있게 증가하였다. CRS군과 EA+CRS군과 비교해 보았을 때 관찰되는 평균 궤양수와 궤양당 직경이 CRS군에 비해 전침처치 후 CRS자극을 가한 EA+CRS군에서 감소하였다(Fig. 1 및 2). 이는 cold-restraint유발 위궤양에 대한 전침의 완화작용을 육안적으로 관찰한 것이다.

중추신경계에서 opioid 형성은 다양한 자극에 의해 유도되기도 하나 전침에 의한 분비기전에 대해 잘 알려져 있다. 앞서 살펴본 바와 같이 2

Hz 같은 저빈도 전침은 뇌와 척수 enkephalin과 β-endorphin을 분비하며 μ-와 δ-opioid receptor가 관계하며 100 Hz 같은 고빈도 전침은 척수에서 dynorphin을 분비하며 척수배각(dorsal horn)의 κ-opioid receptor가 관여한다[37-38]. Tooth-pulp 자극시 증가한 plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine 수준이 전침자극에 의하여 저하되나 opioid antagonist인 naloxone을 처리하면 효과가 저하하는 것으로 보아 endogenous를 통해 스트레스반응을 저하시킨다[39]. 이는 위장관내 opioid peptide와 이들 수용체가 위장관 생리에 관여하며 스트레스성 위궤양의 병리과정에 관여할 가능성이 있음을 시사한다[40].

위궤양형성과정의 염증관련 유전자(proinflammatory gene)발현을 관찰하기 위하여 COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA발현을 RT-PCR을 이용하여 검정하였다. IL-1β와 IL-6에 대한 mRNA 발현은 그 차이가 현저하지 않았으나 COX-2와 TNF-α의 mRNA 발현은 CRS군에서 증가하였으며 이는 EA+CRS군에서 다소 감소하였다 (Fig. 4). 이로 보아 전침처치가 위궤양 형성과정에서 증가되는 COX-2와 TNF-α mRNA 발현을 저해함을 알 수 있다.

중추신경계가 매개된 cholinergic system을 통한 비만세포 자극은 스트레스로 유발된 위궤양에 주요한 병리적 요인이다[41]. Cold-restraint 스트레스를 주면 위점막 비만세포의 탈과립에 의해 평균 비만세포 관찰 수가 감소하는데 비해 위장관의 주된 prostglandin이라고 알려져 있는 PGD_2는 변화가 없으며 매우 높은 PGE_2가 관찰된다[42]. 이로 보아 장관점막 비만세포가 prostaglandin

형성에 관여하는 것은 잘 알려져 있으나 비만세포외 prostagladin을 변화시키는 요인이 있음을 알 수 있다[43-44]. 본 실험에서 비만세포의 탈과립정도가 대조군에 비해 CRS군에서 증가하며 전침처치는 이러한 증가를 저해하였다 (Fig. 5 및 6). 이는 측정된 PGE_2의 변화와도 일치하고 있다.

점액질은 점액세포에서 분비되는 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질 및 proteoglycan으로 구성된 물질로 기능에 대해 불분명한 점이 많으나 장관내 물리·화학적 보호, 윤활작용 등에 관여한다[22-23]. Cold-restraint 스트레스 모델 뿐 아니라 스트레스성 위궤양에 있어 점액생성능 감소는 매우 중요한 요인으로 알려져 있다[45-46]. 본 실험에서 이러한 점액양의 현저한 변화는 관찰되지 않았으나 병리조직학적으로 CRS군에서 많은 탈락된 위상피세포를 관찰할 수 있으며, 궤양형성 부위에는 많은 염증세포 침윤과 더불어 부정형화된 위점막 구조를 관찰할 수 있었다 (Fig. 7 및 8). 염증반응은 필수적인 숙주방어체계(host-defense mechanism)로 lipopolysaccharide, TNF-α, IL-1α과 같은 사이토카인, hydrogen peroxide, 고산소/저산소 (hyperoxia/hypoxia), 여러 화학요법 약물 등의 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다[47]. 세포는 염증 유발물질에 노출되면 세포막 연접에 관여하는 단백질과 COX, lipoxygenases 등과 같은 arachidonic acid 대사과정의 중요 효소, 그리고 염증성 사이토카인과 그 수용체 등을 암호화하고 있는 유전자들이 활성화되며 이들 유전자의 대부분은 프로모터 영역에 nuclear factor (NF)-κB가 결합할 수 있는 자리가 존재하며 이의 활성화는 거의 모든 염증 유발 물질에 의해 유도된다[48-50].

염증반응에 있어 정상적인 환경에서 NF-κB는 모든 유핵세포의 세포질에서 p50/p65 subunits의 heterodimer로 존재하며, inhibitory subunit인 I-κB와 결합하고 있다. 염증성 자극이

주어지면 수분 내에 I-κB 인산화 효소의 활성화로 인해 I-κB로부터 자유로워진 NF-κB는 세포핵 속으로 이동하고, NF-κB 결합영역이 있는 염증 유전자의 프로모터에 결합하여 그 유전자의 전사를 일으킨다. NF-κB에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 iNOS, COX-2 및 TNF-α 등이며, 이들이 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키는 것으로 알려져 있다[50].

면역조직화학적 결과로 대조군에 비해 위표면상피세포의 I-κBα와 iNOS면역반응이 cold-restraint스트레스시 감소하며 (Fig 9) TNF-α와 IL-1α는 위궤양형성 부위에 강한 반응을 나타내었다. I-κBα와 iNOS 면역반응은 전침처치시 대조군과 유사한 반응을 나타내었다 (Table 2, Fig.10). I-κBα의 분해가 NF-κB를 통한 염증관련 유전자를 발현한다는 점으로 보아 염증반응이 저해됨을 알 수 있다. Nitric oxide 생성은 위장관상피 장벽기능과 밀접한 연관성을 가지는데 외인성 위출혈이나 손상을 저해시킨다[18,51]. CRS군의 nitric oxide 생성에 관여하는 iNOS 면역반응의 감소는 위보호기능의 결여를 의미한다.

이상의 결과로 보아 실험동물에서 족삼리와 삼음교에 상응하는 혈위에 자침하여 고빈도 120 Hz 전침처치를 하였을 때 육안적 위궤양형성에 대한 완화효과를 관찰 할 수 있었다. 이것은 비만세포 탈과립을 조절할 뿐 아니라 염증인자의 mRNA 및 단백질 수준 발현을 지체시켜 위궤양이 억제됨을 알 수 있다. 따라서 고빈도 120 Hz 전침은 급성 스트레스에 의한 다양한 위장관장애 및 질환에 임상적으로 적용 가능하며 이에 대한 보다 정확한 메커니즘 규명을 위해서는 전침에 의한 자율신경계 전달물질을 포함한 보다 심화된 연구가 요구된다.

V. 結 論

고빈도 120 Hz 전침을 足三里와 三陰交에 자극하였을 때 cold-restraint스트레스 유발 위궤양에 미치는 영향을 육안적으로 살펴보고 염증인자에 대한 mRNA 및 단백질 발현을 살펴보았다.

1. 전침자극에 의해 cold-restraint스트레스에 의해 유도되는 평균 궤양수와 궤양직경이 감소하였다.
2. 위조직의 염증유전자 발현을 살펴보면 IL-1β와 IL-6 mRNA 발현 변화가 미약한 반면 COX-2와 TNF-α mRNA 발현은 대조군에 비해 CRS군에서 다소 증가하였으며 전침자극은 이를 저해하였다.
3. 면역조직화학적 반응로 보아 I-κBα와 iNOS는 cold-restraint스트레스 시 위표면상피세포에서 감소하며 TNF-α와 IL-1α는 일부 궤양부위에서 강한 면역반응을 보였고, 전침자극시 I-κBα와 iNOS 면역반응은 대조군과 유사하였다.

이상의 결과로 보아 족삼리와 삼음교에 자극한 고빈도 120 Hz 전침은 pituitary adrenal system을 통해 위체부 손상을 억제함으로 위궤양 형성 저해 작용을 나타내어 임상적으로 위장관 장애 뿐 아니라 급성 스트레스에 연관된 질환에 적용 가능할 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

1. 최용태, 이윤효, 김현제 편저. 최신침구학. 서울 : 성보사. 1991 : 264, 396-404.
2. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 침구학(上)(下). 서울 : 집문당. 2001 : 381, 404-6, 1447.
3. 서동민, 강성길. Pub Med 검색을 통한 전침의 최신 연구에 관한 고찰. 대한침구학회지

2002 ; 19(3) : 168-9.

4. 이혜정, 신형철, 진수희, 손양선, 윤동학, 임사비나. 족삼리의 전침자극이 흰쥐의 중추신경계에서 Interleukin-6의 활성에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000 ; 17(4) : 41-50.
5. 손영주, 원란, 정혁상, 김용석, 박영배, 손낙원. 전침자극에 의한 흰쥐 중추신경계내 대사활성 변화의 영상화 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18(3) : 56-68.
6. 이태영, 김영안, 이광규, 욱상원, 이창현, 이상룡. 내관 전침자극이 뇌파에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 26-40.
7. 전형준, 황욱, 김종인, 이홍민, 남상수, 김용석. 전침으로 치료한 동안신경마비에 대한 증례보고. 대한침구학회지. 2002 ; 19(4) : 200-7.
8. 이승우, 한상원. 전침을 이용한 구안와사의 임상적 관찰. 대한침구학회지. 1999 ; 16(4) : 149-63.
9. 김일두, 오희홍 등. 족삼리 전침자극이 뇌혈류에 미치는 영향에 관한 핵의학적 고찰. 대한침구학회지. 2001 ; 18(2) : 19.
10. Fricchione GL, Stefano GB. The stress response and autoimmunoregulation. Adv Neuroimmunol. 1994 ; 4 : 13-27.
11. Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. Life Sci. 2000 ; 31 : 1827-38.
12. Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. J Endocrinol. 2001 ; 169 : 429-35.
13. Soll AH. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. N Engl J Med. 1990 ; 322 : 909-16
14. Pare WP, Glavin GB. Restraint stress in biomedical research. Neurosci Biobehav Rev. 1986 ; 10 : 339-70.
15. Henry D, Chertok F, Keys C, Jegerski J. Organizational and family systems factors in stress among ministers. Am J Community Psychol. 1991 ; 19 : 931-52.
16. Garrick T, Leung FW, Buack S, Hirabayashi K, Guth PH. Gastric motility is stimulated but overall blood flow is unaffected during cold restraint in the rat. Gastroenterology 1986 ; 91 : 141-8.
17. Garg GP, Cho CH, Ogle CW. Ethacrynic acid and sulphasalazine inhibit the generation of leukotriene C4 in rat stomachs: a possible gastric anti-ulcer mechanism in cold-restraint-stressed rats. Pharmacology 1992 ; 44 : 177-89.
18. Coskun T, Yegen BC, Alican I, Peker O, Kurtel H. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction. Role of nitric oxide. Dig Dis Sci. 1996 ; 41 : 956-63.
19. Ader R. Animal models in the study of brain, behavior and bodily disease. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis. 1981 ; 59 : 11-26.
20. Simmons HF, James RC, Harbison RD, Patel DG, Roberts SM. Examination of the role of catecholamines in hepatic glutathione suppression by cold-restraint in mice. Toxicology 1991 ; 67 : 29-40.
21. Cao L, Filipov NM, Lawrence DA. Sympathetic nervous system plays a major role

in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol. 2002 ; 125 : 94-102.

22. Senay EC, Levine RJ. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. Proc Soc Exp Biol Med. 1967 ; 124 : 1221-3.
23. Sanyal AK, Mitra PK, Goel RK. A modified method to estimate dissolved mucosubstances in gastric juice. Indian J Exp Biol. 1983 ; 21 : 78-80.
24. Goel RK, Bhattacharya SK. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. Indian J Exp Biol. 1991 ; 29 : 701-14.
25. Innes DL, Tansy MF. Gastric mucosal ulceration associated with electrochemical stimulation of the limbic brain. Brain Res Bull. 1980 ; 5 : 33-6.
26. Li SR, You SZ, Zhang SL. The research of a new way to apply laser acupuncture. Zhen Ci Yan Jiu. 1988 ; 13 : 179-83.
27. Liu ZC, Sun FM, Shen DZ. Effect of acupuncture and moxibustion on antiobesity in the variation of plasma cyclic nucleotide and the function of vegetative nervous system. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1991 ; 11 : 83-6.
28. Li Y, Tougas G, Chiverton SG, Hunt RH. The effect of acupuncture on gastrointestinal function and disorders. Am J Gastroenterol. 1992 ; 87 : 1372-81.
29. Nosaka S, Sato A, Shimada F. Somatosplanchnic reflex discharges in rats. J Auton Nerv Syst. 1980 ; 2 : 95-104.
30. Sato A, Sato Y, Suzuki A, Uchida S. Neural mechanisms of the reflex inhibition and excitation of gastric motility elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. Neurosci Res. 1993 ; 18 : 53-62.
31. Zhou L, Chey WY. Electric acupuncture stimulates non-parietal cell secretion of the stomach in dog. Life Sci. 1984 ; 34 : 2233-8.
32. Lux G, Hagel J, Backer P, Backer G, Vogl R, Ruppin H, Domschke S, Domschke W. Acupuncture inhibits vagal gastric acid secretion stimulated by sham feeding in healthy subjects. Gut. 1994 ; 35 : 1026-9.
33. Wang JQ, Mao L, Han JS. Comparison of the antinociceptive effects induced by electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation in the rat. Int J Neurosci. 1992 ; 65 : 117-29.
34. Guo HF, Cui X, Hou Y, Tian J, Wang X, Han JS. C-fos proteins are not involved in the activation of preproenkephalin gene expression in rat brain by peripheral electric stimulation. Neurosci. Lett. 1996 ; 207 : 163-6.
35. 安昌範. 鍼 및 電鍼이 副腎皮質機能不全에 미치는 影響. 서울 : 경희대학교한의학박사학위논문. 1986 : 27.
36. Holmgren E. Increase of pain threshold as a function of conditionsing electrical stimulation. An experimental study with application to electro-acupuncture for pain suppression. Am J Chin Med. 1975 ; 3(2) : 133-42.
37. Chen XH, Han JS, Huang LT. CCK receptor antagonist L-365,260 potentiated electroacupuncture analgesia in Wistar rats but not in audiogenic epileptic rats. Chin Med J.

1994 ; 107 : 113-8.

38. Huang C, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. Neurosci Lett. 2000 ; 294 : 159-62.
39. Han SH, Yoon SH, Cho YW, Kim CJ, Min BI. Inhibitory effects of electroacupuncture on stress responses evoked by tooth-pulp stimulation in rats. Physiol Behav. 1999 ; 66 : 217-22
40. Ray A, Henke P, Sullivan R. Opiate mechanisms in the central amygdala and gastric stress pathology in rats. Brain Res. 1988 ; 442 : 195-8.
41. Ogle CW, Qiu BS. Nitric oxide inhibition intensifies cold-restraint induced gastric ulcers in rats. Experientia. 1993 ; 49 : 304-7.
42. Bulbena O, Masana N, Ramis I, Abdalla S, Perez R, Pique JM. Mast cells in the rat gastric mucosa are not primarily responsible for PGD2 generation. Prostaglandins. 1991 ; 41 : 383-93.
43. Kinoshita T, Nimura Y, Shionoya S, Goto H, Ozawa T. Predominance of prostaglandin D_2 and I_2 in the rat gastric mucosa. Analysis by high-performance liquid chromatography. Biochem Int. 1987 ; 14 : 303-9.
44. Heavey DJ, Ernst P, Stevens RL. Immunological mediated formation of LTC_4, PGD_2 and LTB_4 by mucosal mast cells from Nippon-strongylus brasilensis-infected rats. J Immunol. 1988 ; 140 : 1953-7.
45. Cho CH, Ogle CW. Does increased gastric mucus play a role in the ulcer-protecting effects of zinc sulphate? Experientia. 1977 ; 34 : 90-1.
46. Celebi N, Turkyilmaz A, Gonul B, Ozogul C. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats. J Control Release. 2002 ; 83 : 197-210.
47. Rastogi D, Ratner AJ, Prince A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. Paediatr Respir Rev. 2001 ; 2 : 245-52.
48. Sano H. A new mechanism of COX-2 in inflammation. Ryumachi. 2002 ; 42 : 560-72.
49. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. Front Biosci. 2002 ; 7 : 1899-914.
50. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 649-81.
51. Andrews FJ, Malcontenti-Wison C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia -reperfusion injury by nitric oxide generators. Dig Dis Sci. 1994 ; 39 : 366-73.
52. Ganong WF. Review of medical physiology. 20th ed. New York : McGraw-Hill Companies. 2001 : 52-53.
53. Cheng RSS, Pomeranz B. Monoaminergic mechanism of electro acupuncture analgesia. Brain Res. 1981 ; 215 : 77-92.
54. Romita VV, Suk A, Henry JL. Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in the rat model: Effect of intensity, frequency, and duration of stimulation on evoked antinociception. Brain Res Bull. 1997 ; 42 : 289-96.