

Carrageenan으로 유발된 근통증에 대한 TENS의 효과

광주보건대학 물리치료과

채 윤 원

The Effect of TENS on Muscle Pain Induced by Carrageenan

Chae, Yun-Won, P.T., Ph.D.

Dept. of Physical Therapy, Kwangju Health College

<Abstract>

The aim of this study was to investigate the effect of TENS on muscle pain induced by carrageenan. Muscle pain was induced in male Sprague-Dowley rats by intra-muscular injection of gastrocnemius with 3% carrageenan. nNOS was measured to assess the effect of TENS on muscle pain induced by Carrageenan. The lumbar enlargement of the spinal cord was removed in different groups of animals 24 h after induction of muscle pain. The level of nNOS mRNA was measured in the lumbar section of the spinal cord using RT-PCR. The expression of nNOS was analyzed in the dorsal horn of the lumbar spinal cord by immunohistochemistry. TENS decreased nNOS immunoreactivity in the dorsal horn of the lumbar spinal cord when compared with controls($p < .05$). In RT-PCR, TENS decreased nNOS mRNA level of lumbar spinal cord when compared with controls($p < .05$). These results suggested that application of TENS attributed to decrease muscle pain.

I. 서 론

생리학적 관점에서 볼 때 근통증은 유해수용성 자극이 척수의 후각에 있는 유해수용성 신경원과 연결된 특정한 유해수용기에 의해 포착된다는 점에서 피부통증과 유사하다. 그러나 통증에 대한 주관적 감각에 있어 근통증은 피부통증과 구별된다(Mense, 1990). 근통증의 감각은 쑤시는 듯하거나(aching) 쥐어짜는 듯한 반면(cramping), 피부통증은 날카롭고(sharp), 따끔따끔하며(pricking), 찌르는 듯하고(stabbing), 화끈화끈한(burning) 특성을 보인다(Mense, 1993). 또한 피부통증은 통증의 부위를 정확하게 국소화 할 수 있으나, 근통증은 낮은 신경지배율과 넓은 수용야를 가지기 때문에 국소화 하기 어려우며, 연관통(referred pain)에 의해 병변 조직의 위치에서 뿐 만 아니라 일정거리가 떨어진 부위에서도 통증을 느끼게 된다. 그리고 근통증은 혈압의 하강, 발한, 구역과 같은 자율신경계 반응이 나타나나, 피부통

증은 이러한 연관성을 보이지 않는다(Mense, 1990).

통증의 유발 후 나타나는 특징에는 자발적 통증 행동, 이질통(allodynia), 그리고 통각과민(hyperalgesia) 현상이 있다(Diring 등, 1998). 통각과민에는 말초성 통각과민인 일차성 통각과민과 중추성 통각과민인 이차성 통각과민이 있다(Hargreaves 등, 1988 ; Wu 등, 1998). 근통증에 의한 통각과민의 병태생리적 근거는 완전히 설명되고 있지는 않지만, 말초유해성 기전과 중추유해성 기전으로 통각과민에 대해 설명하고 있다(Kehl 등, 2000).

근육으로부터의 유해수용성 입력에 의해 척수에서는 흥분성 아미노산과 신경펩타이드가 방출되어 척수후각에서의 흥분성을 증가시키게 된다(Hoheisel 등, 1997). 이때 유리되는 신경전달물질인 흥분성 아미노산 및 신경펩타이드가 중추 감각을 유발하는데 있어 중요한 역할을 할 것이라 생각되고 있으며, 특히 glutamate 수용기중의 하나인 NMDA 수용기의 활성화가 매우 중요하다는 사실이 보고되고 있다(Meller와 Gebhart, 1993). 척수후각 신경원에 있어 glutamate에 의해 NMDA 수용기가 활성화되면 Ca^{2+} 의 투과성 증가(Conti 등, 1997)에 의해 산화질소합성효소(nitric oxide synthesis : NOS)를 자극하게 되는데, NOS는 L-arginine이 L-citulline으로 전환되면서 산화질소(nitric oxide : NO)를 만들게 된다(Meller와 Gebhart, 1993 ; Lancaster, 1996 ; Hukkanen 등, 1998 ; Lepore, 2000). 이렇게 생성된 NO는 척수에서의 중추 감각을 시작하게 하며, 또한 지속적인 중추 감각의 유지하는 것에도 관여하게 된다. Lam 등(1996)은 쥐의 뒷발에 포르말린을 주사한 후 척수후각의 층판 I-III에서 nNOS의 증가를 확인하였다. 그러나 아직까지 근통증에 대한 척수후각에서의 NOS의 변화에 대한 연구는 없는 실정이다.

근통증의 동물 모델중의 하나로서 carrageenan을 근육내에 주사하게 되는데, 이러한 염증성 물질에 의해 근육내의 화학적 유해수용성 자극을 유발하여 근육내의 유해수용기 그리고 group III 와 IV 구심성 섬유를 감각시키게 된다(Kehl 등, 2000). Diehl 등(1988)은 근육내에 carrageenan을 주입하면 국소 염증을 유발하여 백혈구의 양이 주입 후 2시간에 증가하기 시작하여 8시간까지 계속된다고 보고하였다. Hoheisel 등(1994)은 흰쥐의 비복근과 가자미근에 carrageenan을 주사한 후 6-8시간에 요수의 후각 신경원에서 흥분성이 증가되었음을 보고하였다. 흰쥐의 비복근과 가자미근으로부터 구심성 정보를 받는 척수의 위치는 제4 요수에서 제6 요수까지이다. 그러나 근통증의 유발 후에는 제3 요수에서도 증가된 흥분성을 보여 통증 전에는 비활동성을 보인 후각 신경원들이 통증으로 인해 활동성이 증가되어 척수에서의 흥분성 증가를 유발하게 된다고 보고하였다(Mense와 Craig, 1988 ; Hoheisel 등, 1997).

근골격계로부터 기인한 통증을 관리하기 위한 물리치료로는 크게 전기치료, 열치료, 도수치료를 적용한다(Wright와 Sluka, 2001). 통증치료를 위해 가장 많이 쓰이는 전기치료로는 경피신경전기자극(transcutaneous electrical nerve stimulation : TENS)으로서, 수술 후 통증, 급성과 만성 통증, 근통증, 신경병증 통증을 경감시키기 위해 사용되는 비침투적 임상 도구이다(Walsh, 1997). TENS에 의한 통증 경감의 기전에 대한 이론은 크게 두 가지로 제시된다. 첫 번째 이론은 관문조절 이론으로서 분절적 억제(segmental inhibition)를 통해 상행성 통증 경로를 차단하는 것으로서(Kumar와 Redford, 1982 ; Garrison과 Foreman, 1994 ; Wall과 Melzack, 1999), 이때 흔히 사용되는 TENS의 유형은 고빈도 TENS이다. 두 번째의 이론은 하행성 상척수 기전(descending supraspinal mechanism)으로서, 저빈도 TENS의 적용에 의해 내인성 아편양제제(endogenous opioid)가 방출되어 진통 효과를 얻게 된다는 것이다(Sjolund와 Eriksson, 1979).

Garrison과 Foreman(1996)은 유해한 자극을 고양이에게 가하는 동안 TENS를 적용하였

는데, TENS를 적용하는 동안 척수후각 세포의 활동이 감소되었다고 보고하였다. Sluka 등 (1998)은 흰쥐의 슬관절에 관절염을 유발시킨 후 발생한 이차성 통각과민에 대해 TENS의 효과를 연구하였다. TENS의 적용 후에 자발적 통증 행동과 관절 둘레의 변화는 없었으나, 복사열에 대한 발 움추림 잠복기(paw withdrawal latency)는 유의하게 증가함을 보여 이차성 통각과민에는 효과가 있음을 보였다. 그러나 TENS에 의한 이차성 통각과민의 감소에 있어 척수에서의 변화를 연구한 것은 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 carrageenan으로 실험적 근육통을 유발한 후에 중추 감각을 유발시키고, TENS를 적용하여 중추 감각에 기여하는 척수에서의 nNOS 변화를 보고자 한다.

II. 실험방법

1. 실험대상 및 실험기간

본 연구에 이용된 실험동물은 Sprague-Dawley계 숫쥐 (체중 230~250g)를 사용하였으며, 2003년 7월부터 10월까지 실험을 실시하였다.

2. 실험설계

실험동물의 비복근(gastrocnemius)에 carrageenan(Sigma, UK)을 투여하여 근육통증을 유발한 후 TENS의 효과를 보기 위하여 실험동물을 대조군과 실험군으로 나누었다. 대조군은 3% carrageenan 0.1ml만을 투여한 군으로 하였다. 실험군은 3% carrageenan 0.1ml를 투여한 후 TENS를 적용한 군으로 하였다.

실험동물을 halothane(대웅제약, 한국)으로 흡입 마취시킨 후 실험군과 대조군에 carrageenan을 투여하였다. 약물 투여 4시간 경과 후 실험군과 대조군에 대해 TENS를 적용하였다. 24시간이 지난 뒤에 조직표본을 작성하기 위해 요수 팽대부를 적출하였다. 실험동물은 각 군에 대해 무작위로 10마리씩을 사용하였다. 각 군에 사용된 실험동물의 적출된 요수는 면역조직화학법과 RT-PCR로 분석하기 위해 또다시 10마리의 각 군을 5마리씩 분리하였다. 면역조직화학법과 RT-PCR을 시행할 때 음성대조군 설정을 위해 carrageenan을 전혀 처리하지 않은 5마리를 추가하여 총 25마리를 사용하였다.

1) 근육통증의 유발

실험동물의 왼쪽 비복근에 무균의 Tyrode solution에 용해된 3% carrageenan 0.1ml를 주사하였다. 근육통증을 유발하기 위하여 carrageenan을 투여하기 전에 실험동물을 먼저 halothane으로 흡입 마취시켰다.

2) TENS 적용

TENS(EMPI, Eclipse™, US)를 적용하기 전에 halothane으로 흡입 마취를 시켰다. 마취된 실험동물의 비복근 부위에 털을 제거한 후, 두 개의 전극(linch, round)을 배치시켜 빈도는 100Hz, 펄스의 폭은 100 μ s, 자극의 강도는 감각자극하여 20분간 적용하였다. 감각자극은

근수축이 일어나는 강도에서 자극의 강도를 약간 줄여 근수축이 일어나지 않게 하였다. TENS 치료는 근통증 유발 4시간 후에 적용하였다.

3. 측정방법

1) 면역조직화학법

본 실험에 사용된 실험동물은 carrageenan 투여 24시간 후에 희생시켰다. 실험 동물을 thiopental로 마취한 후에 해부대 위에 고정하고 흉부를 절개하여 심장을 노출시켰다. pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 심장관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% neutral buffered paraformaldehyde(4% NBP)로 재관류하여 고정하였다. 이후 실험동물의 등을 절개하여 노출된 척추를 조심스럽게 제거한 후 척수 중 요수 팽대부를 적출하여 4% NBP에서 3시간 동안 실온에서 후고정한 후, 30% sucrose 용액속에서 4℃의 온도로 조직을 서서히 가라앉혔다. 조직을 optimal cutting temperature compound(O.C.T., American Optical)로 포매하였고, Cryo cut II(Lecica CM 3000, -25℃)를 사용하여 15µm 두께의 종단면 연속절편을 얻었다. 각 절편은 1% gelatin으로 코팅된 슬라이드 위에 thaw mount 한 후 슬라이드 상자에 넣어 면역조직화학법을 실행하기 전까지 deep freezer(-80℃)에서 보관하였다.

냉장 보관된 실험동물의 척수 조직들은 실온에서 면역조직화학법을 시행하였다. 준비된 조직들은 동시에 염색하여 염색처리에서 발생 할 수 있는 개체간 차이를 최소화하였다. 각 조직에서 nNOS의 면역조직화학적 염색은 기본적으로 Avidin Biotin Complex(ABC) horseradish peroxidase 기술을 사용하여 시행하였다. 먼저 조직 절편을 0.02M PBS, pH 7.4로 10분씩 3회 세척하였다. 비특이 면역 반응을 최소화하기 위해 0.1% normal goat serum을 30분 동안 처리하였다. 그 후 항체(anti nNOS)를 PBS에 각각 1:1000 비율로 희석하여 인접 조직위에 처리하고 습윤 상자에 조직을 넣어 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이 물질에 대한 면역반응을 동정하기 위해 nNOS에 특이한 anti mouse nNOS(BD Biosciences) 항체를 사용하였다.

항원 항체 복합체를 avidin biotin peroxidase 방법으로 발색시켰으며, 조직을 PBS로 3회 10분간씩 세척한 후, endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위하여 0.5% periodic acid를 5분간 처리하였다. Biotin 부착 제2항체(biotinylated goat anti mouse antisera, 1:200 in PBS)를 실온에서 50분 동안 처리한 후 다시 PBS로 3회 10분간씩 세척하였다. ABC complex(ABC kit, Vectastain)로 1시간 동안 반응시킨 후 조직을 0.02M PBS 완충액으로 다시 세척한 다음 정색 반응을 시행하였다. 조직을 0.05% diaminobenzidine(Sigma Co.), 0.04% NiCl, 0.003% H₂O₂가 첨가된 PBS 완충액에 5-10분간 반응시켜 항체들에 대한 면역 반응을 발색시켰다. 탈수, 투명화를 거친 후 canada balsam으로 mount하였다. nNOS에 대한 면역반응은 흑갈색으로 발색되었다. 대조군으로는 1차 항체를 제거한 처리를 하였으며, 대조군에서는 전혀 발색반응이 나타나지 않았다. 연구표본은 Nolmarskii interference microscope (Olympus)로 사진 작업을 수행하였다.

3) RT-PCR

본 실험에 사용된 조직을 얻기 위해 실험동물에 carrageenan 투여 24시간 경과 후에 경추를 탈구시켜 희생시켰다. 척수의 요수 팽대부를 분리한 후 바로 액체질소에 급속냉각을 시켜 -80°C 에서 RT-PCR을 시행하기 전까지 보관하였다. UltraspecTM RNA 분리제 (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, Tx, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법으로 요수로부터 total RNA를 분리해냈다. 즉 0.1 g의 얼린 조직을 1 ml의 UltraspecTM RNA 용액에서 Polytron homogenizer (KINEMATIKA)로 균질화한 후 4°C 에 5분간 incubation하여 nucleoprotein complexes가 완전히 분해되도록 하였다. 다음에 UltraspecTM RNA 용액 1 ml당 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 샘플을 격렬하게 섞고 4°C 에 5분간 incubation하였다. 균질액을 12,000 g, 4°C 에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 시료를 4°C 에서 10분간 incubation한 후 12,000 g, 4°C 에서 15분 동안 원심분리하여 RNA를 침전시킨다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 75% ethanol 1ml로 세번 세척하였다. RNA pellet을 공기 중에서 말린 후 DEPC를 처리한 물에 용해시켰다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였다. 역전사(reverse transcriptase)를 위하여 total RNA 1 μg 을 200 U reverse transcriptase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10 U RNasin, dNTP mix (0.5 mmol/L), DTT (10 mmol/L), MgCl_2 (2.5 mmol/L), oligo (dT) (0.5 μg), reaction buffer [200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 500 mmol/L KCl]에 첨가하여 최종 volume이 20 μl 가 되게 하여 Gibco사의 절차에 따랐다.

nNOS의 PCR 조건(Bobadilla 등, 1988)은 94°C 에서 1분간 denaturation, 58°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension step을 밟았다. β -actin은(Abassi 등, 1998) 94°C 에서 45초간 denaturation시킨 후, 56°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분 30초간 extension시켰다. nNOS와 β -actin의 oligonucleotide 서열은 다음과 같다. nNOS primers는 (sense primer, 5'-GAACCCCA-AGACCATCC-3', antisense 5'-GGCTTTGCTCCCACAGTT-3')를 이용하며, 최종산물은 308 bp fragment이다. β -actin primers는 (sense primer: 5'-GACTACCTCATGAAGATCCT-GACC-3', antisense primer: 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGCC-3')을 이용하며, 최종산물은 423bp fragments이다. PCR을 위하여 각 primer 20 pmole, dNTP mix (250 $\mu\text{mol/L}$), MgCl_2 (1.5 mmol/L), 1U Taq polymerase를 혼합하여 최종 volume 20 μl 를 만들어 사용하였다. PCR로 증폭된 cDNA는 2% agarose gel에 전기영동하였다. Ethidium bromide로 염색한 nNOS와 β -actin cDNA는 IMAGERTM & 1D MAIN (Bioneer, Korea)을 이용하여 정량화하였다. nNOS cDNA 양은 β -actin cDNA로 보정하였다.

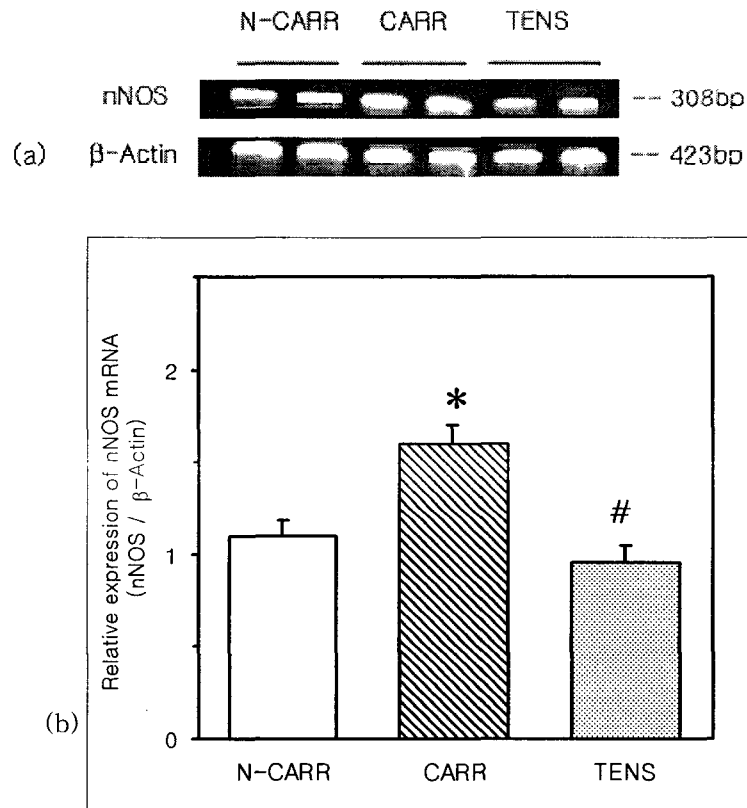
4. 자료처리

RT-PCR에서 얻은 nNOS mRNA의 결과와 면역조직화학법에서 얻은 nNOS의 면역반응성 결과는 student t-test를 이용하였다. 통계학적 유의수준은 .05로 하였고, SPSS 10.0 for Window를 사용하여 통계 처리하였다.

III. 결과

1. 요수 부위 nNOS mRNA의 변화

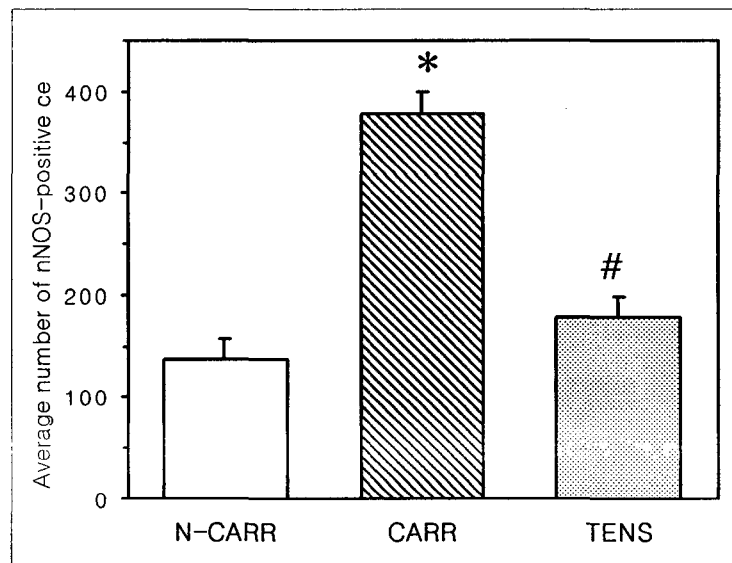
요수 부위에서 전체 RNA를 분리하여 nNOS mRNA의 발현 수준을 RT-PCR로 분석하였다. Carrageenan을 투여하지 않은 그룹과 carrageenan만을 투여한 실험군에서 nNOS mRNA의 발현 정도를 비교한 결과 carrageenan을 투여하지 않은 그룹에 비해 carrageenan만을 투여한 후 24시간이 지난 실험군에서 nNOS mRNA의 발현 정도가 증가하였다(Fig. 1). Carrageenan만을 투여하여 24시간이 지난 실험군과 carrageenan을 투여한 후 4시간이 지나서 TENS를 적용하고 20시간이 지난 후(carrageenan 투여 후 24시간)에 나타난 nNOS mRNA를 비교한 결과 TENS를 적용한 실험군에서 nNOS mRNA의 발현이 감소하였다(Fig. 1).



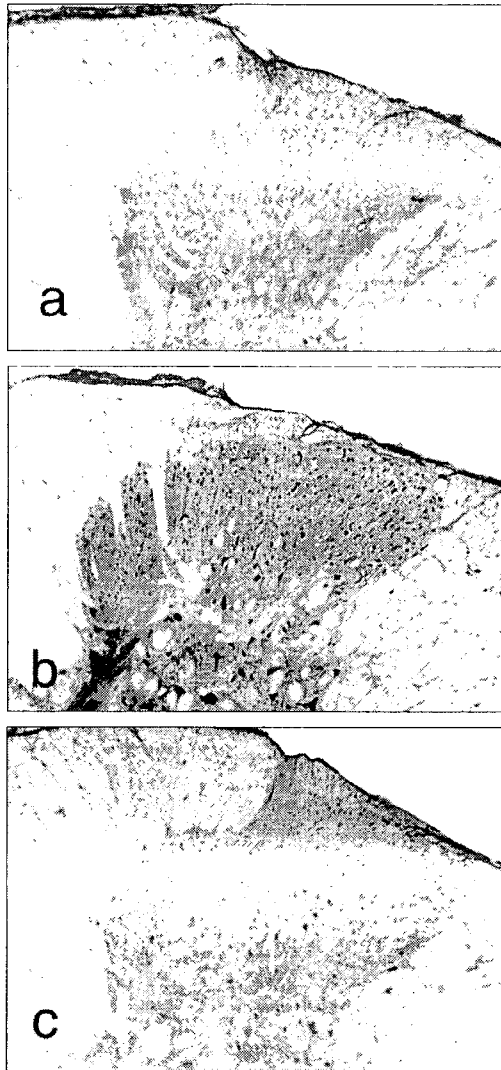
<Fig. 1> Relative expression of nNOS mRNA. Bar graphs showing the relative expression of nNOS mRNA in the lumbar spinal cord. Levels of spinal nNOS mRNA expression were determined using RT-PCR technique. Original data of 2 animals per groups were shown in (a). Each column was presented the densitometric analysis (b). * means $p < .05$, compared with the N-CARR by student t-test. # means $p < .05$, compared with the CARR by student t-test (N-CARR : non-carrageenan, CARR : carrageenan).

2. 요수 부위 nNOS의 면역조직화학 반응

각 그룹들의 조직들에 대해 nNOS 발현정도를 알아보기 위해 면역조직화학법을 시행하였다. Carrageenan을 투여하지 않은 그룹에 비해 carrageenan만을 투여한 실험군에서 더 높은 nNOS 면역 반응을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 면역 반응을 영상 분석(Image-Pro Plus win 4.0β, US)을 이용하여 비교한 결과도 약물을 투여한 실험군에서 더 높게 나왔다(Fig. 2)($p < .05$). Carrageenan을 투여한 실험군과 TENS를 적용한 실험군의 면역 반응을 비교해보면 TENS를 적용한 실험군에서 더 낮은 면역 반응을 볼 수 있으며(Fig. 3), 영상 분석한 결과도 더 낮게 나타났다(Fig. 2)($p < .05$).



<Fig. 2> Average number of nNOS immunoreactivity. Bar graphs showing average number of nNOS immunoreactivity in lumbar spinal cord. * means $p < .05$, compared with the N-CARR by student t-test. # means $p < .05$, compared with the CARR by student t-test(N-CARR : non-carrageenan, CARR : carrageenan).



<Fig. 3> nNOS immunoreactivity in lumbar spinal cord. Photomicrographics showing nNOS immunoreactivity in lumbar spinal cord. nNOS immunoreactivity in the dorsal horn of the spinal cord in non-carrageenan group(a, $\times 100$) ; carrageenan group at 24h after carrageenan injection (b, $\times 100$) ; TENS application group at 24h after carrageenan injection(c, $\times 100$).

IV. 고찰

근골격계 질환에 대한 TENS의 인간 적용에 있어 치료의 효율에 대한 척도로서 환자의 통증인지에 의존하게 되는데, 이러한 평가 방법은 환자의 감정적 동기 요인에 의해 TENS의 작용 효과를 해석하기 어렵게 만든다(Robinson, 1996 ; 채운원 등, 1999). 그리고 근골격계 질환의 환자들은 다양한 질환의 단계와 통증의 정도를 제시하기 때문에 연구의 결과를 더욱 해석하기 어렵게 만든다. Robinson(1996)은 이러한 문제를 해결하기 위해서는 잘 조절된 대조군과 질환과 통증의 단계가 유사한 실험군을 이용해야 한다고 지적하였으나, 인간 연구에 있어 이러한 실험상의 조절은 매우 어렵다고 하였다. 이와는 대조적으로 잘 조절된

동물모델에서의 연구는 근골격계 손상의 범위를 조절할 수 있으며, TENS의 치료효과에 대한 감정적인 동기 요인을 배제하여 객관적인 통증 행동의 특징을 밝힐 수 있게 된다.

Carrageenan은 염증과 염증성 통증을 연구하기 위해 흔히 사용되어 왔다. 흰쥐의 뒷발에 carrageenan을 주입하면 부종을 유발하며, 발의 체적을 증가시키고, 열자극이나 기계적 자극에 대한 과도한 민감성 증가인 통각과민을 유발한다. Carrageenan 주입에 의한 통각과민 반응의 말초 감각은 bradykinin, cytokines, 그리고 프로스타글란딘과 같은 염증성 매개물질의 방출과 국소적 합성에 의해 유발된다(Fock와 Mense, 1976 ; Diring 등, 1998). 또한 척수에서는 NMDA 수용기의 활성이 증가되고 말초 입력에 대한 척수 신경원의 증가된 반응성을 보이는 중추 감각도 유발하게 된다. 따라서 통각과민의 연구에 있어 carrageenan은 흔히 사용되어지고 있다. Hedo 등(1999)은 carrageenan을 투여한 어린 흰쥐의 행동학적 변화와 전기생리학적 기록을 통해 볼 때 통각과민은 초기단계와 후기단계가 있다고 보고하였다. Carrageenan 투여 후 3시간에서 보이는 초기단계의 통각과민은 말초 감각과 계속되는 말초 유해수용성 입력에 의존하는 중추기전에서 기인하며, 20시간 후에 보이는 후기단계의 통각과민은 계속되는 말초입력에 의한 영향보다 척수에서의 변화 때문이라고 하였다. Rygh 등(2001)은 carrageenan으로 유발된 염증의 초기단계(2-6시간)보다 후기단계(20시간)에서 중추의 변화가 더 크게 일어나며, 이러한 변화는 유해수용 전달에 매개된 척수 NMDA 수용기의 기능이 증가되었기 때문이라고 보고하였다. 말초 감각과 이로 인한 중추 감각에 의해 시작된 초기단계의 영향으로 NMDA 수용기의 기능이 변화되거나, NMDA 수용기의 활성을 유발하는 NO나 프로스타글란딘과 같은 신경조절물질의 상승조절에 의해 후기단계가 나타난다고 볼 수 있다(Stanfa 등, 1996).

본 연구를 통해 근통증의 초기단계에서 적용한 TENS가 후기단계에서 NMDA 수용기의 활성을 증가시키는 신경조절물질인 NO의 합성효소인 nNOS를 억제하였다는 것을 확인하였다. 흰쥐의 비복근에 carrageenan을 주입 후 24시간에서 nNOS의 면역조직화학 반응성과 mRNA에서의 변화를 TENS를 적용한 실험군과 아무런 치료도 적용하지 않은 carrageenan 투여군과 비교하였을 때 치료를 적용한 그룹에서 nNOS가 확실히 감소되었다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 중추 감각에 의해 유발된 이차성 통각과민에 nNOS가 관여한다는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 합성효소들의 감소에 TENS 적용이 효과가 있음을 알 수 있었다.

NMDA 수용기는 중추 감각과 이로 인한 통각과민에 있어 중요한 역할을 담당하고 있으며, 중추신경계에서의 NO는 NMDA 수용기와 밀접한 관계를 갖고 있다. 또한 NMDA 수용기는 carrageenan에 의해 생산된 말초 염증과 관계된 통각과민에도 연관된다고 보고되고 있다(Sluka와 Westlund, 1993). Lam 등(1996)은 흰쥐의 뒷발에 포르말린의 주입에 따른 nNOS의 상승조절은 NO가 말초 염증 후에 나타나는 통각과민의 중추기전에 중요한 역할을 담당하고 있다고 제안하였다. 정상적인 조건하에서 nNOS의 면역반응성은 척수의 후각, 중실관(central canal), 중간외측주(intermediolateral column) 그리고 전각에서 구조적으로 발현된다(Dun 등, 1993). 본 연구의 면역조직화학법에서도 nNOS가 척수의 후각에서 구조적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. Wu 등(1998)은 관절염이 유발된 흰쥐의 요수부에서 nNOS의 면역반응성이 더욱 증가되었다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다. 따라서 정상적인 생리적 조건하에서의 nNOS 역할은 염증이 유발되었을 때 그 발현과 활동이 증가됨을 알 수 있다.

Carrageenan의 주사에 의한 근육통의 유발 후에 국소 염증이 발생되었고, 유해수용기의

자유신경종말은 활성화된다. 또한 이러한 말초 염증뿐만이 아니라 지속적인 C-섬유의 고빈도 방전(high-frequency discharge)이 시작된다. C-섬유의 고빈도 방전은 구심성 섬유의 중추 종말에서 glutamate와 neurokinins의 방출을 초래하게 된다(Woolf, 1989). non-NMDA 수용기와 펩타이드 수용기에서의 작용에 의해 생성된 흥분성 연접 전위는 NMDA의 전압의 의존성 Mg^{2+} 차단을 제거한다. 따라서 NMDA 수용기는 활성화되고 Ca^{2+} 은 NMDA 수용기의 이온 채널을 통해 세포내로 유입된다. 많은 양의 Ca^{2+} 유입은 nNOS를 활성화시키게 되고 NO 생성이 증가하게 된다. 이러한 nNOS의 활성화는 Ca^{2+} 유입과 동원을 유발하는 연접 후 신경전달물질 수용기에 의존할 뿐만이 아니라 전압 의존성 Ca^{2+} 채널을 통한 Ca^{2+} 유입을 일으키는 연접 전 신경에서의 활동전위에도 의존한다. 따라서 carrageenan에 의한 근육통 모델에 있어 일차 구심성에서의 지속적인 입력은 Ca^{2+} 의 연장된 유입과 NO의 생성을 만들 수 있게 된다. 이러한 변화는 연접 전달의 상승작용을 유발하게 되어 carrageenan에 의한 근육통 모델에 있어 후기 단계의 통각과민과 중추 감각에 영향을 미치게 된다.

따라서 선행연구와 본 연구의 결과를 보면 carrageenan에 의한 근육통은 척수에서의 NMDA 수용기를 활성화시켜 nNOS의 생성을 증가시키고, 그에 따라 NO의 생성을 증가시킬 수 있었다. 또한 이러한 과정들이 중추 감각을 유발하게 되고, 이는 다시 척수 후각에서의 기능적 변화를 유발하여 후기 단계의 중추 감각과 통각과민을 일으키게 된다는 것을 알 수 있었다. 본 연구는 근육통에 의해 유발된 중추 감각 후에 TENS를 적용하여, 중추 감각에 의해 발생한 통각과민에 중요하게 기여하는 신경물질인 NO의 합성효소인 nNOS의 감소를 면역조직화학적 방법과 RT-PCR 분석을 통해 확인하였다.

V. 결론

Carrageenan에 의해 유발된 근육통에 대한 TENS의 효과를 알아보기 위해 본 실험에서는 통증 자극에 대한 척수의 중추 감각을 유발시킬 수 있는 물질인 nNOS의 변화를 제시하였다. 실험동물은 흰쥐를 사용하였고 carrageenan을 비복근에 주입하여 근육통을 유발시켰다. 행동 반응을 위해 크게 두가지의 그룹으로 나누었는데 carrageenan만을 주입한 대조군과 carrageenan 주입 후 TENS를 적용한 실험군으로 분류하였다. 그리고 면역조직화학적 방법과 RT-PCR의 분석에 있어 carrageenan 대신에 멸균된 Tyrode solution을 주입한 non-carrageenan군을 추가하였다. TENS의 적용은 약물 주입 후 4시간에서 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TENS의 적용으로 척수에서의 nNOS mRNA를 감소시켰다($p < .05$).
2. TENS의 적용으로 척수에서의 nNOS의 면역반응성을 감소시켰다($p < .05$).

이상의 결과로 carrageenan에 의해 유발된 근육통에 있어 TENS의 적용은 효과가 있었으며, 중추감각을 유발시킬 수 있는 nNOS의 감소에 TENS의 적용이 효과가 있었음을 알 수 있었다.

참고문헌

- 채운원, 남기석, 최진호, 황보각, 김진상 : 실험방법의 차이에 따른 지연 발생 근육통의 물리치료 효과에 대한 연구, 대한물리치료학회지, 11(3), 37-44, 1999.
- Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I, et al : Regulation of intrarenal blood flow in

experimental heart failure : role of endothelin and nitric oxide, *Am J Physiol*, 274(4Pt2), F766-774, 1998.

Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, et al : Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity : effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression, *Am J Physiol*, 274, F791-F798, 1988.

Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162, 156-159, 1987.

Conti F, Minelli A, De Biasi S, et al : Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex, *Molec Neurobiol*, 14, 1-18, 1997.

Diehl B, Hoheisel U, Mense S : Histological and neurophysiological changes induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat. *Agents Actions*, 25, 210-213, 1988.

Diring DM, Isakson PC, Yaksh TL : Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats, *JPET*, 285, 1031-1038, 1998.

Dun NJ, Dun SL, Wu SY, et al : Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat, cat and squirrel monkey spinal cord, *Neuroscience*, 54, 845-857, 1993.

Fock S, Mense S : Excitatory effects of 5-hydroxytryptamine, histamine and potassium ions on muscular group IV afferent units : a comparison with bradykinin, *Brain Res*, 105, 459-469, 1976.

Garrison DW, Foreman RD : Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation(TENS), *Pain*, 58, 309-315, 1994.

Garrison DW, Foreman RD : Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation(TENS) on spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cell activity in cats with transected spinal cord, *Neuroscience letters*, 216, 125-128, 1996.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al : A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia, *Pain*, 32, 77-88, 1988.

Hedo G, Laird MA, Lopez-Garcia JA : Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat : a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo, *Neuroscience*, 92(1), 309-318, 1999.

Hoheisel U, Koch K, Mense S : Functional reorganization in the rat dorsal horn during an experimental myositis, *Pain*, 59, 111-118, 1994.

Hoheisel U, Sander B, Mense S : Myositis-induced functional reorganization of the rat dorsal horn : effects of spinal superfusion with antagonists to neurokinin and glutamate, *Pain*, 69, 219-230, 1997.

Hukkanen MVJ, Polak JM, Hughes SPF : Nitric oxide in bone and joint disease, Cambridge, Cambridge University Press, 1998.

Kehl LJ, Trempe TM, Hargreaves KM : A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia, *Pain*, 85, 333-343, 2000.

Kumar VN, Reford JB : Transcutaneous nerve stimulation in rheumatoid arthritis, *Arch Phys Med Rehabil*, 63, 595-596, 1982.

- Lam HHD, Hanley DF, Trapp BD, et al : Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase(NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett*, 210(3), 201-204, 1996.
- Lancaster J : *NITRIC OXIDE*, California, Academic Press, 1996.
- Lepore DA : Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in muscle ischemia-reperfusion injury, *NITRIC OXIDE*, 4(6), 541-545, 2000.
- Meller ST, Gebhart GF : Nitric oxide(NO) and nociceptive processing in the spinal cord, *Pain*, 52, 127-136, 1993.
- Mense S, Craig AD : Spinal and supraspinal terminations of primary afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the cat, *Neuroscience*, 26, 1023-1035, 1988.
- Mense S : Considerations concerning the neurobiological basis of the muscle pain, *Can J Physiol Pharmacol*, 69, 610-616, 1990.
- Mense S : Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain, *Pain*, 54, 241-289, 1993.
- Robinson AJ : Transcutaneous electrical nerve stimulation for the control pain in musculoskeletal disorders, *J Orthoped Sports Phys Ther*, 24, 208-227, 1996.
- Rygh LJ, Sendsen F, Hole K, et al : Increased spinal N-methyl-D-aspartate receptor function after 20h of carrageenan-induced inflammation, *Pain*, 93, 15-21, 2001.
- Sjolund BH, Eriksson, MB : The influence of naloxone on analgesia produced by peripheral conditioning stimulation, *Brain Res*, 173, 295-301, 1979.
- Sluka KA, Westlund KN : Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats, *Pain*. 55, 367-377, 1993.
- Sluka KA, Bailey K, Bogush J, et al : Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint, *Pain*, 77, 97-102, 1998.
- Stanfa LC, Misra C, Dickeson AH : Amplification of spinal nociceptive transmission depends on the generation of nitric oxide in normal and carrageenan rats, *Brain Res*, 737, 92-98, 1996.
- Wall PD, Melzack R : *Textbook of Pain*, 4th. New York, Churchill Livingstone, 1999.
- Walsh DM : *TENS clinical applications and related theory*, New York, Churchill Livingstone, 1997.
- Woolf CJ : Recent advances in the pathophysiology of acute pain, *Br J Anaesth*, 63, 139-146, 1989.
- Wright A, Sluka KA : Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain, *Clin J Pain*, 17(1), 33-46, 2001.
- Wu J, Lin Q, McAdoo DJ, et al : Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin, *Neuroreport*, 9, 589-592, 1998.