

실험적 통증유발 모델에서 조기발현 유전자에 대한  
미세전류자극의 효과

동신대학교 한의과대학 물리치료학과

김 계 엽 · 김 태 열 · 오 명 화 · 김 선 은 · 정 미 선

동신대학교 한의과대학 간호학과

서 영 숙

The Effect of Microcurrent Stimulation on Immediately  
Early Gene in Pain Induced Model

Kim, Gye-Yeop · Kim, Tae-Youl · Oh, Myung-Hwa · Kim, Sun-Eun,  
Cheong, Mee-Sun

Department of Physical Therapy, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Suh, Young-Sook

Department of Nursing, College of Oriental Medicine, Dongshin University

<Abstract>

The purpose of study is that we will observe the change of c-fos with the immunohistochemistry method and then we will study the effect of micro current stimulation following the frequency after inducing pain to rats with capsaicin. Rat were classified to SD and they have grewed for 8 weeks. We classify to four groups, ordinal group is used in experiment I, the group which we induce pain is used in experiment II, the application group which we induce pain and then the high frequency micro current stimulation is used in experiment III, the application group which we induce pain and then the low frequency micro current stimulation is used in experiment IV, we get the following result.

Compare with experiment II, experiment III, and experiment IV from acute pain modal in the immunohistochemistry experiment which has c-fos protein as an antigen, c-fos immunoreactive positive neurons significantly after induced pain for two hours( $p<0.001$ ). According to these results, from rats induced pain, micro current stimulation effect to reducing pain, but following frequency micro current stimulation therapy isn't different from immunoreactive c-fos

---

\* 본 연구는 한국과학재단지정 동신대학교 산업융가속기이용생물연구센터 지원에 의한 것입니다

## I. 서론

통증에 관해 과거에는 염증반응시 염증세포나 주위 조직 세포에서 만들어진 화학물질들이 유해감수기를 활성화시켜 통각을 유발한다고 생각되었으나, 근래 들어 신경계 내부의 어떠한 변형을 초래하여 통증이 초래되는 것으로 생각되고 있다(Dray 등, 1994).

이러한 통증의 완화를 위해 다양한 약리학적 또는 전기 생리학적인 방법들이 이용되고 있는데, 최근 전기 생리학의 발달에 힘입어 통전법의 개발과 생체내의 통증억제 기전에 관한 새로운 이론적 근거에 의한 미세전류신경근자극(microcurrent electrical neuromuscular stimulation)이 통증에 유효한 것으로 알려져 왔다(Gersh, 1992; Kahn, 1991). 종래 사용하였던 일반적인 전기자극치료기, 경피신경 전기자극기, 고전압 맥동전류자극기 등은 모두 전류가 밀리암페어(mA)의 단위로 자극되어 왔으나, 미세전류 신경근 자극치료기는 마이크로암페어( $\mu$ A)로 1000 $\mu$ A 미만을 송출하여 자극시켜 치료하는 것이다. 미세전류(microcurrent)는 낮은 전류로서 신체의 미세한 생리적 전류 범위 정도이기 때문에 근수축이 일어나지 않으면서 감각적으로 편안하게 느껴지며, 전기적인 안정성도 탁월하다. 또한 부작용도 거의 없으며(정진우, 1991), 적은 양의 전류만으로도 상처치유촉진과 통증조절에 효과가 있어 급·만성 질환관리에 이용된다(Gersh, 1992). 미세전류자극은 인체내부에서 적절한 미세전류가 세포의 민감한 채널을 통하여 세포막 전위차를 만들어 세포막을 열게 하여  $Ca^{2+}$  이온을 세포막내로 이동시키고 그  $Ca^{2+}$  이온에 의한 화학적인 과정을 통하여 ATP(adenosine tri-phosphate)와 단백질 생성을 증가시킴으로써 세포의 복원과 치료를 촉진시킨다고 알려져 있다(Cheung, 1982).

Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)은 고추에서 매운 맛을 내는 성분으로 신경계통에 큰 영향을 미치는 일종의 신경독성물질로 알려져 있다 (Holzer, 1991). Capsaicin은 화학적 통증을 수반하는 자극물질로, 반응효과는 투여되는 양이나 동물의 발달정도에 따라 다르게 나타나며(Jancso 와 Kiraly, 1980; Jancso 등, 1980), 성숙 동물에 피하주사하였을 경우 다른 자극성 화학물질과 마찬가지로 통증을 수반하는 염증반응을 일으키고, 피부의 화학적 자극에 대해 전반적인 탈감작 (desensitization)을 보이는 것으로 보고되고 있다 (Szolcsanyi 등, 1975).

진통효과와 통증 정도를 검정하는 방법 중에 조기 발현 유전자(immediate early gene) c-fos의 생산물질인 c-fos 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 검정방법이 널리 사용되고 있다 (Bester 등, 1997).

c-fos는 조직손상이나 염증 등이 유발되었을 때 세포 내에 빠른 시기에 발현되는 세포 조기발현 유전자로서 일반적으로 표적 유전자(target gene)의 촉매부위(promotor region)에 있는 DNA-결합단백 또는 DNA에 직접 결합함으로써 신경계의 기능적 변화를 유도하는 전사인자(transcription factor)로 알려져 있다(Dubner와 Ruda, 1992). c-fos는 원종양유전자(proto-oncogene)인 v-fos의 세포동족체로서 성장인자(growth factor)나 신경전달물질에 의해 수분 내에 다양한 형태의 세포에서 활성화된다 (Greenberg 등, 1985). 또한 시냅스 후 뉴런에서 빠르게 발현되고 종종 감각자극 혹은 신경손상 후 척수의 신경세포 활성화에 대한 지표로도 사용된다(Hunt 등, 1987; Bullitt, 1990; Molander 등, 1992). 이러한 c-fos는 일차신경원인 척수신경절 신경원에서는 나타나지 않으며 주로 척수의 통증전달신경원에서 발현되고 기타 뇌에서 통증에 관계된 부위에서 특히 발현된다고 알려져 있다(Hathaway 등, 1995;

Lanteri-Minet 등, 1994). 최근까지 미세전류자극이 통증완화 및 상처치유에 효과가 있었다는 연구(Owoeye 등, 1987)는 보고되었으나 신경계내 신경전달물질의 형태학적인 변화에 관해서는 연구가 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 capsaicin으로 통증을 유발시킨 후 주파수에 따른 미세전류자극이 급성통증에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포내의 신경전달물질 c-fos의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 미세전류자극치료의 진통효과와 생체내 작용기전을 알아보고자 하는데 목적이 있다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물

생후 8주된 웅성 Sprague-Dawley계 랫트(체중 200±50g., 대한실험동물) 100마리를 사용하였다. 실험군 I은 정상대조군(n=25), 실험군 II는 통증 유발군(n=25), 실험군 III은 통증 유발 후 고주파수 미세전류자극 치료군(n=25), 실험군 IV는 통증 유발 후 저주파수 미세전류자극 적용군(n=25)으로 나누었다. 통증 유발 2시간 후, 8시간 후, 24시간 후, 3일 후, 7일 후에 각각 5마리씩 희생시켜 실험에 공시하였다(Table 1). 사육실 온도는 25±1 °C, 습도 55±10%를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

### 2. 통증 유발

Capsaicin(Sigma chemical co., St. Louis, MO, USA)은 용매(10% ethanol, 10% Tween 80, 80% 생리식염수)에 용해시켜 50mg/kg 농도로 오른쪽 슬픽근에 1회 피하주사 하였다. 투여 도중 또는 투여 직후 랫트의 상태에 따라 흉곽을 적절하게 눌러 심폐소생술을 시행하였다.

### 3. 미세전류자극 적용

미세전류자극(Excel Tech Ltd., MULTL III, USA)은 고주파수(100 Hz, 100  $\mu$ A, 20분)와 저주파수(0.5 Hz, 300  $\mu$ A, 20분)로 적용하였으며 이상파(bipolar)를 정사각파형의 2:1 빈도로 방출되게 하여 사용하였다. 전극 패드 2개는 대퇴 슬픽근의 중앙부에 접지하고, 흔히 사용되는 마취제 케타민(ketamine)은 c-fos를 억제시키므로 (Huang와 Simpson, 1999) 본 실험에는 적용하지 않았다.

### 4. 조직절편 제작

실험동물은 전신 마취제인 럼폰(Rompun, 바이엘 코리아)을 복강주사(0.4 ml)하여 마취한 후, 척추추추부분을 덮고 있는 피부를 가위로 절제하고 척추의 중간부위를 절개하여 척추관을 노출시켰다. 척수관을 통하여 21 gauge 바늘을 삽입하고 냉각 식염수가 들어있는 주사기를 부착하여 힘주어 식염수를 주입한 뒤 척수의 전부위가 경추의 개구부를 통하여 밖으로 나오도록 하여 요부 척수 부위만을 적출하였다. 적출된 척수는 2~24시간 3% paraformaldehyde - 3% glutaraldehyde - 0.1% picric acid 고정액에 고정한 후 microtome

을 사용하여 두께 5  $\mu\text{m}$ 로 박절하였다. 박절한 조직은 c-fos 단백질 면역조직화학 염색을 실시하였다.

### 5. 면역조직화학법

통증 유발 2시간 후, 8시간 후, 24시간 후, 7일 후에 희생시킨 실험동물의 L5 척수분절을 c-fos 단백질 면역화학염색을 시행하였다. 박절한 조직절편은 phosphate buffered saline(PBS)으로 여러 번 수세한 후 남아 있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 1% sodium borohydride로 1시간 처리하였다. 전처리과정으로 0.3%의 과산화수소(hydrogen peroxide) 용액에 20분간 처리하였다. PBS로 세척한 후 Novostain Super ABC Kit(Novocastra Lab., Benton Lane, UK)를 사용하여 비 특이적 반응을 억제하기 위해 Normal blocking serum에 20분간 반응시켜 1:1,000으로 희석한 anti-c-fos 항체(Sigma, F7799, USA)를 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 처리한 후 PBS로 세척하고 Diluted biotinylated secondary antibody solution으로 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 Novostain Super ABC Reagent로 30분간 배양하였다. 발색반응을 위해 DAB(serotec Ltd, BUF021B, UK)에 10분간 적용한 후 Mayer's Hematoxyline(Sigma, MHS-32, USA)으로 대조염색을 실시하였다. 흐르는 물에 5분간 수세하고 슬라이드 표본을 건조시킨 후 통상의 탈수과정을 거쳐 봉입 후 표본을 제작하였다.

### 6. 통계방법

면역조직학적 소견의 통계처리는 SPSS 10.0 ver. for windows<sup>®</sup>을 이용하였다. 측정값의 사전 정규분포를 확인하기 위해 Levene's test를 실시하였고, 시간에 따른 실험군간의 통계적 유의성을 검증하기 위하여 일요인 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후 검정으로 Tukey's multiple range test를 사용하였다. 각 실험군의 측정시각에 따른 변화에 대한 유의성을 검증하기 위하여 일표본 대응 T 검정(Paired t-test)를 실시하였다. 분석 시 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

**Table 1. Characteristics of each experimental group**

Group (N)	Age (week)	Treatment	Sacrifice time				
			2 Hours	8Hours	24Hours	3Days	7Days
I (n=25)	8	normal control	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
II (n=25)	8	pain induce	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
III (n=25)	8	pain induce + high pulsed microcurrent	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
IV (n=25)	8	pain induce + low pulsed microcurrent	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5

High pulsed microcurrent : 100Hz, 100 $\mu\text{A}$ , 20min.

Low pulsed microcurrent : 0.5Hz, 300 $\mu\text{A}$ , 20min.

### III. 결과

#### 1. c-fos 육안적 소견

척수 후각에서 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역화학적 방법으로 염색한 표본에서 c-fos 면역반응 양성구조는 척수 후각 신경원의 핵에 짙은 갈색 과립상으로 나타났다. c-fos 면역반응 양성 세포는 주로 척수 후각의 Rexed I, II 층판에서 관찰되었다. 실험군 I은 c-fos 면역반응 양성세포가 드물게 관찰되었으며, 관찰되는 경우에도 면역반응성이 열게 염색되었다(Fig. 2). 이에 비해 실험군 II는 통증 유발 2시간 후에서 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포의 수가 최고로 나타났고(Fig. 3), 8시간 이후에는 감소하는 경향을 보이다가 24시간 이후에는 거의 나타나지 않았다(Fig. 6). 실험군 III, IV는 미세전류전기자극 적용 결과 고주파수와 저주파군 두군 모두 통증 유발 2시간 후 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포수의 현저한 감소를 보였다(Fig 4, Fig 5, Table 2).

Table 2. Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn after Capsaicin Injection

Time Group	2Hours	8Hours	24Hours	7Days
I	± <sup>1</sup>	± <sup>1</sup>	± <sup>1</sup>	± <sup>1</sup>
II	+++ <sup>4</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	± <sup>1</sup>
III	++ <sup>3</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	± <sup>1</sup>
IV	++ <sup>3</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	± <sup>1</sup>

±<sup>1</sup> : Trace, +<sup>2</sup> : Slight to mild, ++<sup>3</sup> : Moderate, +++<sup>4</sup> : Severe

I : Control group

II : Capsaicin injection group

III : High frequency MC group

IV : Low frequency MC group

#### 2. c-fos 면역조직화학적 소견

척수 후각의 Rexed I, II 층판의 c-fos 면역반응 양성 신경원의 핵의 수를 유발 전, 유발 2시간 후, 8시간 후, 24시간 후, 7일 후에 계수하여 정량하였다. 아무런 조작을 가하지 않은 실험군 I의 L5 척수 후각 천층 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원 핵의 수는 평균 3.4 ±1.14개(n=5)로 나타났다. 실험군 II에서는 capsaicin 투여 2시간 후 척수 후각 천층의 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원의 수가 57.4±5.77로 나타났으며 실험군 III은 29.4±4.21, 실험군 IV는 35.0±2.23로 실험군 II에 비해 실험군 III과 실험군 IV는 capsaicin 투여 2시간 후면

역반응 양성 신경원 수가 적은 경향을 보였다. 시간에 따른 실험군간의 통계적 유의성 검정을 위하여 일요인 분산분석한 결과 2시간, 8시간, 24시간, 7일 모두 통계적으로 유의한 차이 ( $p<0.001$ )를 나타내었다(Table 3). 사후검정에서는 실험군Ⅱ에 비해 실험군Ⅰ은 모든 시간대에, 실험군Ⅲ은 2시간과 24시간, 실험군Ⅳ는 2시간 후에 통계적으로 유의한( $p<0.001$ )를 나타내었다(Table 3). 각 실험군에서 유발전을 기준으로 측정시기에 따른 차이를 검정하기 위하여 일표본 대응 T 검정(Paired t-test)를 한 결과 실험군Ⅱ는 2시간에서 ( $p<0.001$ ), 8시간에서( $p<0.01$ ), 24시간에서 ( $p<0.01$ )의 유의한 차이를 나타냈으며, 실험군Ⅲ은 2시간에서 ( $p<0.001$ ), 8시간에서( $p<0.01$ )의 유의한 차이를 나타냈다. 실험군Ⅳ는 2시간에서( $p<0.001$ ), 8시간에서( $p<0.01$ ), 24시간에서( $p<0.01$ )의 유의한 차이를 보였다(Table 3). 7일 후는 반응의 경과와 관계없이 지속적인 c-fos 면역반응 양성 신경원 수의 감소를 나타내었다.

**Table 3. Effect of Microcurrent Stimulation on Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn after Capsaicin Injection**

All value are showed mean±SD

Group	Time				
	Pre	2Hours <sup>#1)</sup>	8Hours <sup>#2)</sup>	24Hours <sup>#3)</sup>	7Days <sup>#4)</sup>
I	3.4±1.14	3.6±1.52 <sup>†</sup>	4.0±1.00 <sup>†</sup>	3.8±1.64 <sup>†</sup>	3.6±1.14 <sup>†</sup>
Ⅱ	3.2±0.84	57.4±5.77	18.8±5.02	11.4±2.30	4.0±1.58
Ⅲ	4.0±1.22	29.4±4.22 <sup>†</sup>	14.2±3.70	6.6±2.41 <sup>†</sup>	3.2±1.30
Ⅳ	3.8±0.84	35.0±2.24 <sup>†</sup>	16.6±5.50	8.8±2.17	3.4±0.89

I : Control group

Ⅱ : Capsaicin injection group

Ⅲ : High frequency MC group

Ⅳ : Low frequency MC group

Tested by one-way ANOVA(<sup>#</sup>: $p<0.001$ ) and multiple comparison test

<sup>1)</sup>; group Ⅱ-group I (<sup>†</sup>: $p<0.001$ ), group Ⅱ-group Ⅲ(<sup>†</sup>: $p<0.001$ ), group Ⅱ-group Ⅳ(<sup>†</sup>: $p<0.001$ )

<sup>2)</sup>; group Ⅱ-group I (<sup>†</sup>: $p<0.001$ ),

<sup>3)</sup>; group Ⅱ-group I (<sup>†</sup>: $p<0.001$ ), group Ⅱ-groupⅢ(<sup>†</sup>: $p<0.05$ )

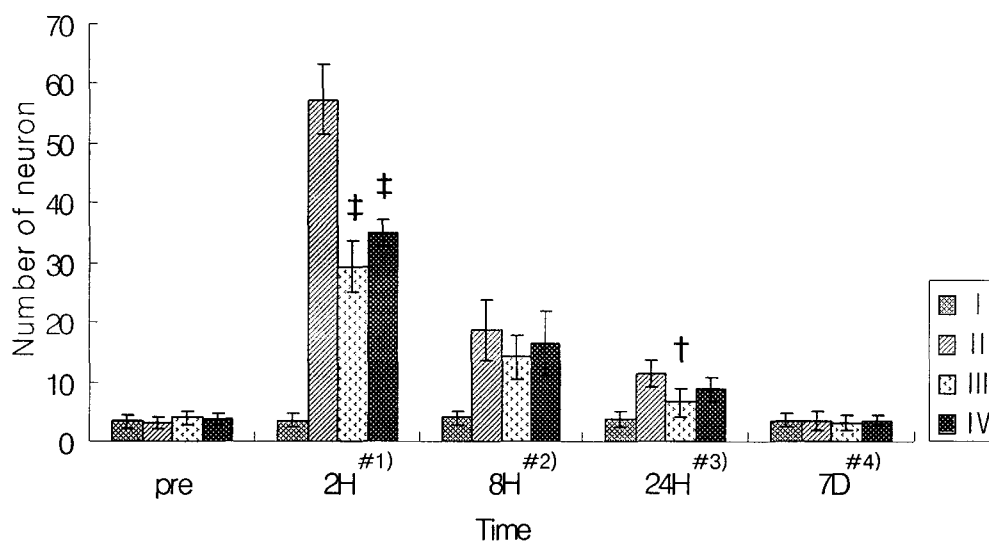
<sup>4)</sup>; group Ⅱ-group I (<sup>†</sup>: $p<0.001$ )

Tested by paired t-test

GroupⅡ: Pre-2H( $p<0.001$ ), Pre-8H( $p<0.01$ ), Pre-24H( $p<0.01$ )

GroupⅢ: Pre-2H( $p<0.001$ ), Pre-8H( $p<0.01$ )

GroupⅣ: Pre-2H( $p<0.001$ ), Pre-8H( $p<0.01$ ), Pre-24H( $p<0.01$ )



**Fig 1. Effect of Microcurrent Stimulation on Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn after Capsaicin Injection**

I : Control group

II : Capsaicin injection group

III : High frequency MC group

IV : Low frequency MC group

H : Hours

D : Days

Tested by one-way ANOVA(<sup>#</sup>:p<0.001)

Tested by post hoc

<sup>1)</sup>; group II-group I (<sup>†</sup>:p<0.001), group II-group III(<sup>†</sup>:p<0.001), group II-group IV(<sup>†</sup>:p<0.001)

<sup>2)</sup>; group II-group I (<sup>†</sup>:p<0.001),

<sup>3)</sup>; group II-group I (<sup>†</sup>:p<0.001), group II-groupIII(<sup>†</sup>:p<0.05)

<sup>4)</sup>; group II-group I (<sup>†</sup>:p<0.001)

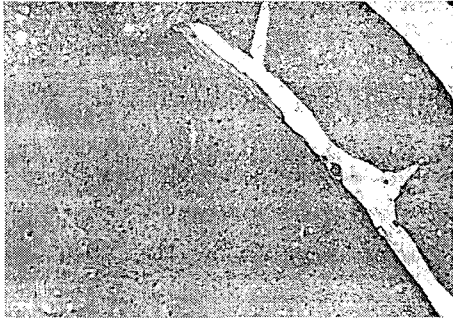


Fig. 2. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn before Capsaicin Injection Model (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )

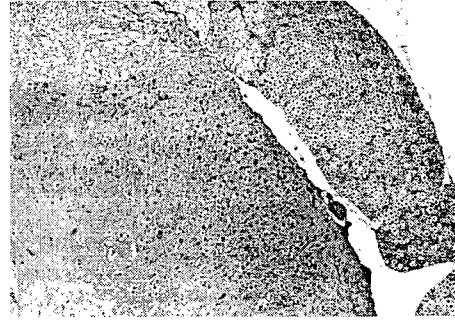


Fig. 3. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn at 2 Hours in Experimental Group II (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )

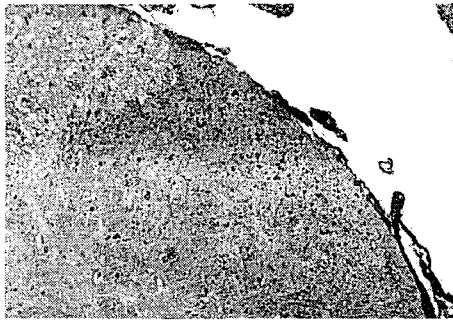


Fig. 4. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn at 2 Hours in Experimental Group III (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )

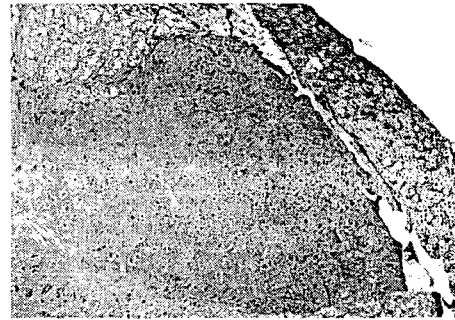


Fig. 5. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn at 2 Hours in Experimental Group IV (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )





Fig. 6. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn at 24 Hours in Experimental Group II (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )



Fig. 7. The Changes of c-fos Immunoreactive Neurons in Superficial Dorsal Horn at 24 Hours in Experimental Group III (immunohistochemical stain,  $\times 200$ )

#### IV. 고찰

본 연구는 capsaicin으로 통증 유발 벡서에서 주파수에 따른 미세전류자극의 효과를 알아보기 위하여 통증에 대한 형태학적인 지표 중 하나인 c-fos 단백질의 발현 변화를 관찰하고자 하였다.

통증은 질병이 이환 되었을 때 나타나는 최초의 징후이며 또한 통증 그자체가 질병이 되어 치료 대상이 되기도 한다. 통증은 한마디로 정의할 수 없는 복잡한 현상이다. Merskey(1979)는 통증을 불쾌한 감각이며 실제로 혹은 잠재적으로 조직손상과 관련이 있는 정서적인 경험일 뿐만 아니라 항상 주관적인 경험이라고 하였다. 그러나 통증은 신체적, 정신적, 사회적 요인 등에 의하여 그 예민도가 달라질 수 있으므로 결국 감각적인 통증과 그로 인한 정서적인 감정이 모두 광의의 통증이라고 할 수 있다(이충휘, 1989).

임상적으로 통증을 관리하기 위하여 여러 형태의 전기치료법이 널리 사용되고 있는데, 그 이유는 치료상 위험성이 거의 없고, 약물치료나 수술이 많은 부작용을 초래하는 데 비해 조직을 상하지 않게 하는 장점이 있기에 여러 분야의 임상가들이 급성, 만성 동통의 치유를 위해 적용하고 있다(Long, 1983). 그 중에서 미세전류신경근자극치료는 조직 치유나 통증감소를 위해 이용되었다(Kahn, 1991). Alverz 등(1983)은 24시간 동안 50-300 $\mu$ A의 지속적인 전류(continuous current)와 양극성(positive polarity)사용시 대조군과 비교했을 때 상피 형성과 콜라겐 합성에 유의한 효과가 있다고 보고하였다. 김현숙(1995)은 측두하악관절장애 환자 중에서 동통을 호소하는 환자를 대상으로 미세전류 치료시 하악 운동량의 증가와 동통의 완화에 효과가 있음을 보고하였다. 또한 Matteson와 Eberhardt(1985), Bertolucci(1995)의 임상적 연구 결과에서도, 미세전류 치료가 동통완화에 높은 효과를 나타냈다고 하였다. 전기치료에 의한 통증감소 효과를 조사하는데 있어서 전기자극의 단일 적용시와 반복적으로 장기간 적용하였을 때 그 통증감소 효과의 효율성에 관한 직접적인 연구보고는 문헌상에서 찾을

수 없었다.

신경계통에 영향을 미치는 capsaicin은 말초신경계통의 일차 감각신경, 특히 통각을 전달하는 신경원에 선택적으로 작용하여 수 분내에 흥분시키는 작용이 있다고 알려져 있다 (Fitzgerald, 1983; 임정길 등, 1998).

최근에는 급성통증이 신경계 내부의 변형을 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 생각되고 있다(Dray 등, 1994). 신경계 내부의 변형은 주로 분자와 유전자와 관계있다. 그중 중앙유전자인 c-fos의 생산물질인 c-fos 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 검정방법이 널리 사용되고 있다(이원택 등, 1997; Abbadie와 Besson, 1992). c-fos 발현은 막전위 정도와 리간드 혹은 전압 의존성 통로(voltage-gated channels)를 통한  $Ca^{++}$  유입과 관계있다(Williams 등, 1990). c-fos cDNA probe를 사용한 RNA blotting analysis에서는 백서의 발에 염증 유발 물질을 주입하여 급성 염증을 유발하였을 경우 30분에 증가하기 시작하여 2시간에 최고치를 이루고 8시간에 거의 정상으로 환원되는 것이 보고되었다(Draisci와 Iadarola, 1989). Bullitt(1989)는 뒷다리에 기계적 유해자극을 준 흰쥐에서 자극 2시간 후에 동측 척수와 양측 및 반대측 시상에서 자극에 의한 칼슘이온의 세포내 유입으로 c-fos가 발현되었다고 보고하였으며, Strassman 등(1986)은 흰쥐의 안면에 여러 가지 유해성 자극을 가했을 때 연수와 상부경수의 배측각에서 체성순서적(somatotopic)인 c-fos 발현이 관찰되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 말초의 유해한 자극에 비례하여 중추신경계에서 c-fos의 발현이 증가됨을 입증하는 것으로써 통증자극에 대한 신경활동의 지표로서 c-fos가 사용될 수 있음을 제시하였다. 유해자극 정보는 척수 혹은 삼차(caudal trigeminal)핵에 있는 유해성 신경원으로 유수신경섬유( $A\delta$ 섬유)와 무수신경섬유(C섬유) 일차 구심섬유에 의해 전달된다. 척수의 유해성 신경원은 원칙적으로 Rexed I, II의 바깥층 V와 VI, X에 위치한다(Harris, 1998). 또한 c-fos는 유수신경섬유( $A\delta$ 섬유)와 무수신경섬유(C섬유) 활성화에 의해서만 촉발된다(Herdegen 등, 1991). 여러 연구들에서 유해 자극 후 c-fos가 Rexed I, II와 V, X 층에서 발현한다고 하였다(Bullitt, 1990; Harris, 1998). 따라서 본 실험에서도 capsaicin을 주사하여 급성통증을 유발하여 주과수에 따른 미세전류가 c-fos 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화학적염색을 통해 형태정량학적으로 비교하였다. 그 결과, 척수 후각 lamina I, II에서 c-fos 단백질 양성 신경 세포의 수가 크게 증가하였는데 이는 통증 자극이 척수 후각으로 전해졌기 때문으로 해석 할 수 있다. 이는 대부분의 다른 연구자들의 실험결과와 일치하는 결과이다(Hunt 등, 1987; Williams 등, 1990; Abbadie와 Besson, 1993). 실험군 I의 L5 척수 후각 천층 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원 핵의 수는 평균  $3.4 \pm 1.14$ 개( $n=5$ )로 나타났다. 실험군 II에서는 capsaicin 투여 2시간 후 척수 후각 천층의 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원의 수가  $57.4 \pm 5.77$ 로 나타났으며 실험군 III은  $29.4 \pm 4.21$ , 실험군 IV는  $35.0 \pm 2.23$ 로 실험군 II에 비해 실험군 III과 실험군 IV는 capsaicin 투여 2시간 후면역반응 양성 신경원 수가 적은 경향을 보였다. 시간에 따른 실험군간의 통계적 유의성은 통증유발 2시간, 8시간, 24시간, 7일 모두 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.001$ )를 나타냈다(Table 3). 사후검정에서는 실험군 II에 비해 실험군 I은 모든 시간 대에, 실험군 III은 2시간과 24시간, 실험군 IV는 2시간 후에 통계적으로 유의한( $p < 0.001$ )를 나타내었다(Table 3). 본 실험에서 척수 후각에서 c-fos 발현의 억제는 미세전류자극이 통증전달 억제의 효과를 나타내는 직접적인 근거가 될 수 있다.

이상의 결과로 볼 때, capsaicin으로 통증을 유발 백서에서 미세전류자극이 이 c-fos 발현을 감소시켜 통증 억제에 효과가 있음은 확인할 수 있었으나, 주과수에 따른 미세전류자

극은 c-fos 면역반응에 의하여는 차이를 확인할 수 없었다. 고주파수 미세전류자극이 급성 통증에 효과가 있다는 임상적인 관점과는 달리 본 실험에서는 주파수에 따른 효과는 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 실험동물을 대상으로 한정된 부위에 통증을 유발하여 시행하였으며 통각역치측정을 시행하지 않은 제한점이 있다. 본 연구의 제한점을 보완하여 주파수, 치료강도, 치료시간 등에 따라 미세전류자극에 의한 통증완화 효과를 비교하는 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 capsaicin으로 통증을 유발시킨 모델에서 저주파수 미세전류자극치료와 고주파수 미세전류자극 치료의 효과를 알아보기 위하여 척수 후각에서 조기발현 유전자인 c-fos 단백질을 항원으로 면역조직화학적 연구를 하였다.

실험결과 급성 통증모델에서 통증 유발 후 실험군 III(고주파수 미세전류자극 치료군)과 실험군 IV(통증 유발 후 저주파수 미세전류자극 치료군)는 실험군 II(통증 유발군)에 비해 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학적 실험에서 c-fos 면역반응 양성 세포가 통증 유발 2시간 후에 통계학적으로 유의한 감소를 보였다 ( $p < 0.001$ ).

이상의 결과로 볼 때, 통증 유발 백서에서 미세전류자극이 통증 억제에 효과가 있음은 확인할 수 있었으나, 주파수에 따른 미세전류자극 치료는 면역반응 c-fos 의한 차이는 없었다.

## 참고문헌

- 김현숙 : 미세전류 적용에 따른 측두하악관절장애 환자에 대한 치료 효과, 연세대학교 석사 학위논문, 1995
- 이원택, 손민균, 정경승 등 : 말초신경손상이 실험적으로 유발된 흰쥐의 척수신경절 및 척수 등쪽뿌 내 신경세포의 형태학적 변화에 관한 연구, 대한해부학회지, 30, 495-510, 1997.
- 이충휘 : 통증 평가도구 개발을 위한 기초조사, 대한물리치료학회지, 1(1), 63-72, 1989.
- 임정길, 임태하, 이정락 등 : 신경병증 백서에서 척수신경절의 Capsaicin에 대한 반응성 및 나트륨 전류의 변화, 대한마취과학회지, 35, 259-268, 1998.
- 정진우: Microcurrent의 통증완화효과에 대한 고찰, 대한물리치료사학회지, 12(2), 195-205, 1991.
- Abbadie C, Besson JM : C-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis, Neuroscinece, 48, 985-993, 1992.
- Abbadie C, Besson JM : Effects of morphine and naloxone on basal and evoked fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats, Pain, 52, 29-39, 1993.
- Alverz O, Mertz PM, Smerbeck RV et al : The healing of superficial skin wounds is stimulated by external current, J Invest Dermatol, 81, 144-148, 1983.
- Bertolucci LE : Clinical comparative study of microcurrent electrical stimulation to

- mid-laser and placebo treatment in degenerative joint disease of the temporomandibular joint, *J Craniomand Pract*, 13(2), 116-120, 1995.
- Bester H, Matsumoto N, Besson JM et al : Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-fos study in the rat, *J Comp Neurol*, 199, 383-439, 1997.
- Bullitt E : Induction of c-fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation, *Brain Res*, 493, 391-397, 1989.
- Bullitt E : Expression of c-fos like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat, *J Comp Neurol*, 296, 517-530, 1990.
- Cheung N Van Hoff H, Bockx E et al : The effect of electrical current on ATP generation protein synthesis and membrane transport in rat skin, *Clin Orthop*, 171, 264-272, 1982.
- Draisci G, Iadarola M : Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNA in rat spinal cord, *Molecular Brain Res*, 6, 31-37, 1989.
- Dray A, Urban L, Dickenson A : Pharmacology of pain, *Trends in Pharmacol Sci*, 15, 190-197, 1994.
- Dubner R, Ruda MA : Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation, *Trends Neurosci*, 15, 96-103, 1992.
- Fitzgerald M : Capsaicin and sensory neurons: A review, *Pain*, 12, 109-130, 1983.
- Gersh MR : Electrotherapy in rehabilitation. Philadelphia, FA Davis company, 167-168, 1992
- Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB : Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient change in proto-oncogene transcription in PC12 cells, *J Biol Chem*, 260, 14101-14110, 1985.
- Harris JA : Using c-fos as a neural marker of pain, *Brain Res Bull*, 45, 1-8, 1998.
- Hathaway CB, Hu JW, Bereiter DA : Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the tempomandibular joint, *J Comp Neurol*, 356, 444-456, 1995.
- Herdegen T, Kovary K, Leah J : Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation, *J Comp Neurol*, 313, 178-191, 1991.
- Holzer P : Capsaicin: Cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons, *Pharmacol Rev*, 43, 143-201, 1991.
- Huang W, Simpson RK : Ketamine suppresses c-fos expression in dorsal horn neurons after acute constrictive sciatic nerve injury in the rat, *Neurosci Lett*, 269, 165-168, 1999.
- Hunt SP, Pini A, Evan G : Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, 328, 63-634, 1987.
- Jancso G, Kiraly E : Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the rat CNS, *J Comp Neurol*, 190, 781-792, 1980.
- Jancso G, Kiraly E, Jansco-Gabor A : Direct evidence for an axonal site of action of

- capsaicin, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 313, 91-94, 1980.
- Kahn J : Principles and practice of Electrotherapy, 2nd Edition, New York, Churchill Livingstone, 81-84, 1991
- Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J, et al : Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos and other immediate early gene proteins, Neuroscience, 58, 287-298, 1994.
- Long DM : Stimulation of the peripheral nervous system for pain control, Clin Neurosurg, 31, 323-343, 1983.
- Matteson JH and Eberhardt T : Pain management and the new generation of "intelligent" TENS, Am J of Acupuncture, 6, 149-151, 1985.
- Merskey H : Pain terms: A list with definitions and notes in usages, Pain, 6, 249-252, 1979.
- Molander C, Hongpaisan J, Grant G : Changing pattern of c-fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat, Neuroscience, 50, 223-236, 1992.
- Owoeye I, Spielholz NI, Fetto J et al : Low-intensity pulsed galvanic current and the healing of tenotomised rat achilles tendons: Preliminary report using load-to-breaking measurements, Arch Phys Med Rehabil, 68, 415-418, 1987.
- Strassman A, Mason P, Moskowitz M et al : Response of brainstem trigeminal neurons to electrical stimulation of the dura, Brain Res, 379, 242-250, 1986.
- Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A, Joo F : Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin, Arch Pharmacol(Weinheim), 287, 157-169, 1975.
- Williams S, Evan GI, Hunt SP : Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat, Neurosci, 36, 73-81, 1990.