

원저

Collagen 誘發 關節炎 동물모델에 對한 電鍼刺戟의 鎮痛效果 및 그 機轉에 關한 研究

- muscarinic cholinergic receptor와 關聯된 機轉研究 -

백용현* · 홍승훈** · 양형인*** · 박동석* · 최도영*

*경희대학교 한의과대학 침구학교실

**경희대학교 대학원 동서의학과

***경희대학교 의과대학 류마티스내과학교실

Abstract

The Study on the Analgesic Effect and its Cholinergic Mechanism of Electroacupuncture in the Rat Model of Collagen-induced Arthritis

Baek Yong-hyeon*, Hong Seong-hun**, Yang Hyung-in***, Park Dong-suk*
and Choi Do-young*

*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University

**Department of East-West Medicine, Graduate School, Kyung-Hee University

***Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, College of
Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, South Korea

- 본 연구는 2001년도 보건복지부 한방치료기술 개발사업 지원 연구비에 의하여 수행되었음(HMP-00-CO-01-0001)
- 접수 : 2004년 3월 16일 · 수정 : 2004년 3월 20일 · 채택 : 2004년 3월 22일
- 교신저자 : 최도영, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 부속한방병원 침구학교실
Tel. 02-958-9205 Fax : 02-957-4245 E-mail : Choi4532@unitel.co.kr

Objectives : To investigate the analgesic effect and its cholinergic mechanism of electroacupuncture(EA) in the rat model of collagen-induced arthritis(CIA).

Methods : Immunization of male Sprague-Dawley rats with bovine typeII (CII) collagen emulsified in Freund's incomplete adjuvant, followed by a booster injection 14 days later, leads to development of arthritis in more than 70% of rats by 21 days postinjection. After three weeks of first immunization, EA stimulation(2 Hz, 0.07 mA, 0.3 ms) was delivered into Jogsamni(ST₃₆) for 30 minutes. Analgesic effect was evaluated by tail flick latency(TFL). We compared the analgesic effect of EA with TFLs between pretreatment of normal saline and pretreatment of Atropine (1 mg/kg, intraperitoneal) and Neostigmine (100 μ g/kg, intraperitoneal) in CIA.

Results : 1. TFLs were gradually decreased in CIA as increasing severity of arthritis. 2. Jogsamni(ST₃₆) EA stimulation in CIA increased TFLs and the effect lasted for 60 minutes. 3. Increased TFLs with Jogsamni(ST₃₆) EA stimulation were inhibited with pretreatment of atropine in CIA. 4. Increased TFLs with Jogsamni(ST₃₆) EA stimulation did not show an obvious synergistic effect with pretreatment of neostigmine in CIA.

Conclusions : Jogsamni(ST₃₆) EA showed analgesic effects in CIA. The analgesic effects of Jogsamni(ST₃₆) EA were inhibited by atropine pretreatment and combined application of Jogsamni(ST₃₆) EA and neostigmine did not show a synergistic effect. These observations suggest that intrinsic muscarinic cholinergic pathways represent an important modulating system in pain perception of inflammatory pain in CIA. It is suggested that the active mechanism of analgesic effect in EA may involve the release of acetylcholine in the spinal cord.

Key words : electroacupuncture(EA), tail flick latency(TFL)
collagen induced arthritis(CIA), atropine, neostigmine, acetylcholine

I. 緒 論

류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis)은 대칭적으로 말초 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염을 특징으로 하는 관절 질환으로¹⁾, 유해 자극에 의해 손상된 조직으로부터 여러 가지 세포 내 물질의 유리 및 유해 감수기의 활성화

로 인해 만성 염증성 통증(chronic inflammatory pain)을 유발한다²⁾. 이러한 류마티스 관절염으로 인한 통증은 그 조절이 쉽지 않으므로 만성 관절염에서의 통증조절을 위한 다각적인 치료가 시도되고 있다.

그러나 만성 염증성 통증(chronic inflammatory pain)과 관련한 機轉研究는 아직 미비한 상황이며, 다만 Adjuvant 誘發 關節炎을 만성 통증의 관점에서 연구한 보고가 있었고³⁾, 류마티스

관절염에 있어서의 염증정도와 慢性痛症의 관련성을 kappa-opioid receptor 관점에서 연구한 보고가 있었으며⁴⁾, 關節炎에 의한 통증의 기전이 內因性 鎮痛抑制系(endogenous pain inhibitory system)와 유관함을 암시하는 보고⁵⁾와 류마티스 관절염성 통증이 말초 및 중추의 痛症傳達系(peripheral and central nociceptive processing system)의 변화에 의한 것을 암시하는 보고⁶⁾는 있었다.

한의학적 痛症治療方法 중 하나인 電鍼의 鎮痛效果에 대해서는 비교적 많은 연구가 이루어지고 있으며, 자극의 빈도 및 강도에 따라 상이한 진통효과가 있음이 밝혀졌다⁷⁾. 즉 1-4Hz의 電鍼刺戟은 β -endorphin, enkephalin, dynorphin 등의 opioid peptide를 매개하고⁸⁾, 100-200Hz의 電鍼刺戟은 serotonin, norepinephrine, dopamine 등의 monoamine을 매개하여 鎮痛效果를 나타냄이 보고되었다⁹⁾. 그러나 류마티스 관절염과 같은 慢性 炎症性痛症에 대한 電鍼의 鎮痛效果와 그 機轉에 대한 구체적이고 정량적인 연구는 미흡한 실정이다. 다만 Adjuvant 誘發 關節炎에 대한 電鍼效果의 機轉을 opioid 및 교감신경계와의 관련성을 통해 살펴 본 보고는 있었다¹⁰⁾.

이에 本 研究에서는 보다 류마티스 관절염에 가까운 Collagen-induced Arthritis(CIA) 모델에서 電鍼刺戟의 鎮痛效果와 그 機轉을 알아보기 위하여 慢性 炎症性痛症 유발 후 Tail Flick Latency(TFL)를 측정함으로써 통증역치의 변화와 足三里(Jogsamni, ST³⁶) 電鍼刺戟에 의한 鎮痛效果를 확인하고자 하였으며, 그 電鍼 鎮痛效果에 대한 intrinsic muscarinic cholinergic pathway와의 연관성을 알아보기 위하여 muscarinic cholinergic receptor agonist인 Neostigmine과 antagonist인 Atropine을 전처치함으로써 鎮痛

效果의 변화를 관찰하고자 하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 動物

動物은 샘타코(오산, 한국)에서 분양받은 5주령, 체중 200±10g의 Sprague Dawley계 음성 흰쥐로서 固形飼料(三養油脂, 小動物用)와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 材料

1) 藥物注入器

Sterile hypodermic syringe(보안메디카, 1ml, 26 Gauge)를 사용하였다.

2) Holder

圓筒形 아크릴통(6.0×18cm)으로 제작하여 사용하였다.

3) 鍼

Stainless steel 毫鍼(東方鍼灸, 直徑 0.25mm, 길이 30mm)을 사용하였다.

4) 電鍼刺戟器

電鍼刺戟器(Pointer F-3, ITO CO. LTD, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

5) Type II Collagen

Chondrex, Inc.(Washington, USA)에서 제작

된 type II collagen을 사용하였다.

6) Incomplete freund's adjuvant (ICFA)

Chondrex, Inc.(Washington, USA)에서 제작된 incomplete freund's adjuvant를 사용하였다.

7) Neostigmine과 Atropine

Research Biochemicals International(RBI) (Natick, MA)에서 제작된 Neostigmine과 Atropine을 사용하였다.

8) 生理食鹽水

중외제약(Korea)에서 제작된 normal saline을 사용하였다.

9) Tail flick unit

Acquired TFL change =

$$\frac{\text{Post. TFL} - \text{Control TFL}}{\text{Control TFL}} \times 100\%$$

Ugo Basile(Comrio, Italy)에서 제작된 tail flick unit를 이용하여 TFL을 측정하였다.

3. 方法

1) 實驗室 環境

實驗動物의 양육환경 및 실험실환경은 모두 specific pathogen free(SPF) 조건, 즉 22±1°C 항온, 55±5% 항습을 유지했으며, hepafiltered air를 공급하여 외부 항원의 감염에 의한 영향을 최소화시켰다.

TFL 측정을 용이하게 하기 위하여 圓筒形 아크릴통(6.0×18cm)으로 만든 홀더(holder)를 사용하였으며 TFL 측정을 시작하기 전 2주

간, 3회/週, 1시간정도 홀더(holder) 적용훈련을 하여 홀더로 인한 스트레스를 줄이고자 하였다.

2) Collagen 關節炎 誘發

Sprague Dawley계 Rat를 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후, 0.3% acetic acid에 용해시킨 500μg bovine type II collagen과 500μg incomplete freund's adjuvant를 섞어 만든 1 mL 용액을 Rat의 꼬리부분(꼬리가 몸체로 이어지는 부위)에 근육 내 (intradermal) 주사하였다. 2주 후 동일한 용액 0.5 mL를 좌측 발바닥에 피하(intracutaneous)로 주사하여 관절염을 유발시켰다.

3) 痛症閾值 測定

흰쥐의 꼬리 腹側面 피부에 가해진 유해성 방사 열자극에 대해 반응하는데 요구되는 尾逃避暫時(tail flick latency; TFL)를 통각의 지표로 삼았으며, TFL의 변화를 측정함으로써 鎮痛效果를 평가하였다¹¹⁻¹³. TFL은 자동화된 tail flick unit을 이용하여 측정하였는데, 측정대상 부위는 흰쥐의 꼬리를 6등분하여 遠位로부터 세 번째 등분에 해당하는 부위였다. TFL의 측정값은 1분 간격으로 3회 측정한 평균값을 이용하였는데 열자극 부위는 꼬리에 표시한 2cm 범위 내에서 약간씩 이동시킴으로써 자극부위에 큰 차이를 두지 않으면서도 한 지점에 지속적으로 열자극이 가해짐을 방지하였다¹⁴. 평균 기저선반응 시간이 6±0.5초가 되게 전구의 강도를 조정하였다. 또한 과도한 열에 의한 조직의 손상을 막기 위하여 열자극의 cut-off time을 10초로 정하였다¹³.

TFL은 電鍼刺戟 전 1회, 刺戟 후 10분, 20분, 30분, 45분 및 60분에 각각 측정하였으

며,鎮痛效果의 정도는 電鍼刺戟 전과 후에 측정 한 TFL의 백분을 변화로 환산하여 조사 하였다¹⁵⁾.

4) 取穴 및 電鍼刺戟

人體의 足三里(Jogsamni, ST³⁶)에 상응하는 부위와 말초 방향으로 5mm 떨어진 부위를 骨度分寸法에 준하여 취혈하였다¹⁶⁾.

電鍼刺戟은 毫鍼을 5mm 길이로 직자하고 電氣刺戟(2Hz, 0.07mA, 0.3ms)¹⁷⁾을 근수축이 유발되는 정도의 강도로 30분간 시행 하였다.

5) 實驗群 設定

흰쥐를 無處置群 10마리, 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 10마리, neostigmine 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 10마리, atropine 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 10마리, 생리식염수 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 10마리로 하여 5군으로 나누었다.

(1) 無處置群(None-Tx, n=10)

關節炎 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 군으로 type II collagen 주입하기 전 1회, 주입한 후 매 1주 간격으로 5주간 총 6회 TFL을 측정하였다.

(2) 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群(EA, n=10)

type II collagen 주입 3주 후 關節炎이 유발된 흰쥐에 電鍼刺戟을 가한 군.

(3) Neostigmine 先投與 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群(EA+Neo, n=10)

type II collagen 주입 3주 후 關節炎이 유발된 흰쥐에 neostigmine(100 μ g/kg, i.p.)을 생리

식염수에 희석하여 電鍼刺戟 30분전 복강내로 주사한 군.

(4) Atropine 先投與 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群(EA+Atro, n=10)

type II collagen 주입 3주 후 關節炎이 유발된 흰쥐에 atropine(1mg/kg, i.p.)을 생리식염수에 희석하여 電鍼刺戟 30분전 복강내로 주사한 군.

(5) 生理食鹽水 先投與 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群(EA+SL, n=10)

type II collagen 주입 3주 후 關節炎이 유발된 흰쥐에 생리식염수를 neostigmine 및 atropine 희석량과 동량으로 하여 電鍼刺戟 30분전 복강내로 주사한 군.

6) 統計處理方法

실험 결과는 Mean \pm S.D.으로 표시하였으며 통계적 처리는 실험군내의 시간에 따른 비교는 Friedman's rank test(followed by Dunnett's post-hoc test)를 이용하였고, 실험군간의 비교는 Mann Whitney U test를 사용하였으며 p-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 차이가 있다고 판정하였다. 통계프로그램은 SPSS 10.0 for windows를 이용하였다.

III. 結 果

1. collagen 關節炎 유발에 따른 TFL의 변화

Type II collagen으로 關節炎을 유발시

킨 후 1, 2, 3, 4 및 5주에 TFL을 측정
 결과 각각 $-17.3 \pm 3.7\%$, $-37.0 \pm 3.1\%$, $-45.5 \pm 3.1\%$, $-47.8 \pm 3.2\%$ 및 $-49.0 \pm 3.1\%$ 의 감소를

보였다. TFL 감소는 3주째까지 큰 변화를
 보였고, 이후에는 큰 변화를 보이지 않았
 다(Fig. 1).

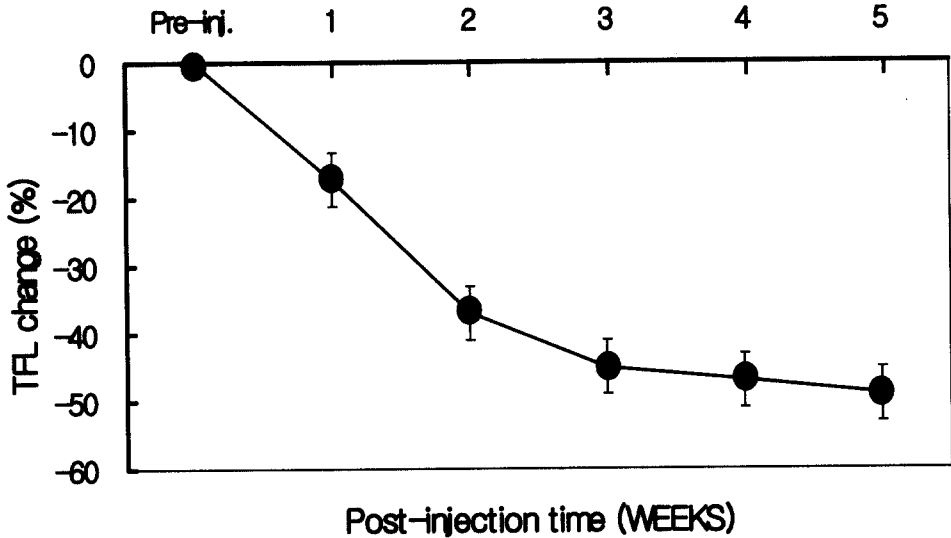


Fig. 1. Changes of tail flick latency in the collagen-induced arthritis rats. Sprague-Dawley Rats were immunized with bovine type II collagen in ICFA, followed by re-immunization at day 14 with collagen in ICFA. After injection of bovine collagen type II in ICFA (n=10), TFL decreased as time went by and reached the minimum value from 3rd to 5th week. Preinjection time is expressed as Pre-inj. Each value represents the mean±S.D. in percentage of TFL changes on each tested week

2. 電鍼刺戟의 鎮痛效果

足三里(ST36) 電鍼刺戟群의 평균 TFL 증가는 처치 후 10분, 20분, 30분, 45분 및 60분에 각각 $17.48 \pm 13.1\%$, $32.61 \pm 15.1\%$, $39.2 \pm 15.2\%$,

$15.25 \pm 6.6\%$ 및 $10.8 \pm 6.9\%$ 의 변화를 나타내어 대조군의 $-0.98 \pm 5.3\%$, $0.18 \pm 1.5\%$, $0.78 \pm 6.2\%$, $0.45 \pm 3.8\%$ 및 $0.01 \pm 3.4\%$ 에 비하여 20분후부터 유의성($p < 0.05$)있는 증가를 보였다(Table 1, Fig. 2).

Table 1. Changes of TFL by Electroacupuncture in the Collagen-induced Arthritis Rats

Group	No. of animal	Tail Flick Latency Increase (%)					
		pre	10min	20min	30min	45min	60min
None-Tx	10	0	-0.98±5.3	0.18±1.5	0.78±6.2	0.45±3.8	0.01±3.4
EA	10	0	17.48±13.1	32.61±15.1**	39.2±15.2**	15.25±6.6**	10.8±6.9*

Values are means±S.D.

None-Tx; group without electroacupuncture

EA; group of electroacupuncture (2Hz, 0.07mA, 0.3ms)

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ analyzed by Mann-Whitney U test

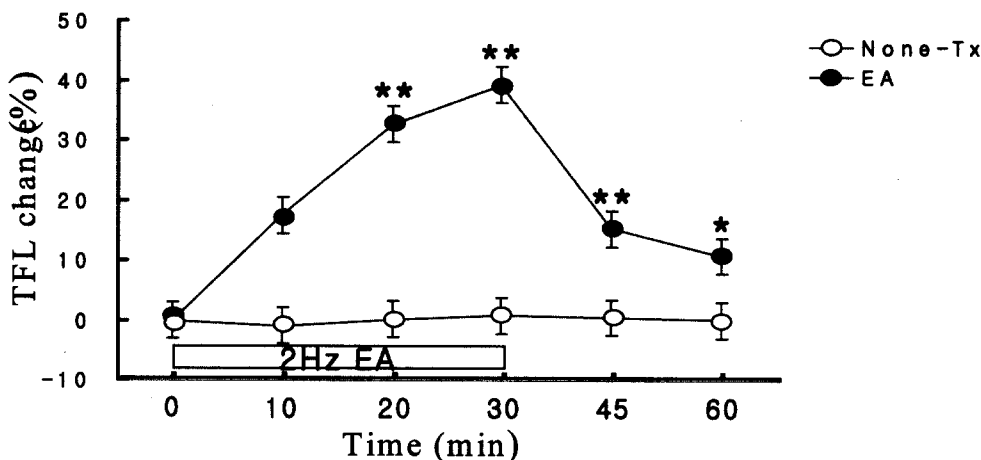


Fig. 2. EA induced TFL changes in the collagen-induced arthritis rats. None-Tx is a group which was tested in a holder without electroacupuncture. EA is a group which was received electroacupuncture (2Hz, 0.07mA, 0.3ms) at left Jogsamni (ST₃₆). The means±S.D. of TFL increase before and after treatment are plotted against 0, 10, 20, 30, 45 and 60. '0' indicates the time before treatment. '10, 20, 30, 45 and 60' indicate the time after the onset of treatment. Asterisks indicate significant difference between None-Tx and EA group after treatment(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, Mann-Whitney U test)

3. Neostigmine 전처치에 따른 電鍼刺戟의 鎮痛效果

Neostigmine 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟

群(EA+Neo, n=10)은 평균 TFL 증가율이 電鍼刺戟 후 10분, 20분, 30분, 45분 및 60분에 각각 15.13±15.8%, 33.70±15.3%, 36.47±10.7%,

17.80± 13.1% 및 7.62±5.5%의 변화를 나타내어 39.2±13.2%, 14.95±5.6% 및 11.3±5.8%와 비교 생리식염수 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 할 때 유의성있는 변화를 보이지 않았다(Table (EA+SL, n=10)의 16.28±10.2%, 30.51±11.9%, 2, Fig. 3).

Table 2. Changes of TFL in Electroacupuncture Pretreated with Neostigmine in the Collagen-induced Arthritis Rats

Group	No. of animal	Tail Flick latency increase (%)					
		pre	10min	20min	30min	45min	60min
EA+SL	10	0	16.28±10.2	30.51±11.9	39.2±13.2	14.95±5.6	11.3±5.8
EA+Neo	10	0	15.13±15.8	33.70±15.3	36.47±10.7	17.80±13.1	7.62±5.5

Values are means±S.D.

EA+SL; group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with normal saline before 15minutes to stimulate.
EA+Neo; group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with neostigmine (100 µg/kg, i.p.) before 15minutes to stimulate.

* : p<0.05, ** : p<0.01 analyzed by Mann-Whitney U test

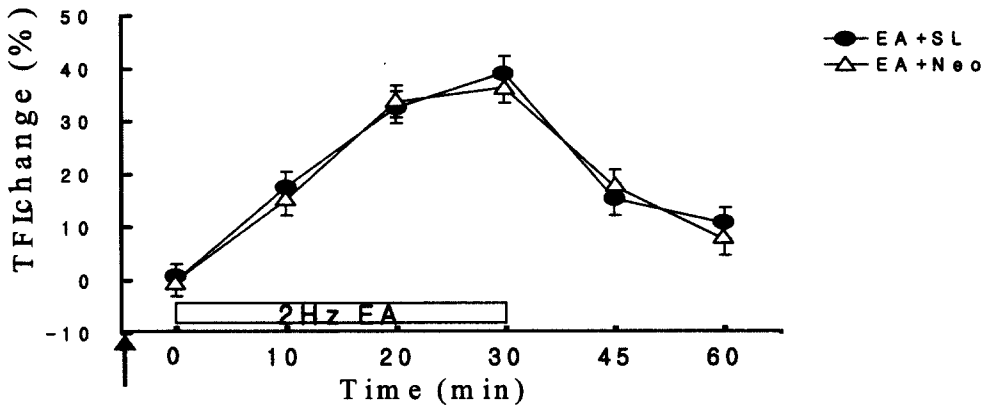


Fig. 3. The analgesic effects of EA by neostigmine pretreatment (arrow) in the collagen-induced arthritis rats. SL, normal saline. EA+SL is a group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with normal saline before 30minutes to stimulate. EA+Neo is a group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with neostigmine (Neo, 100µg/kg, i.p.) before 30minutes to stimulate. The means±S.D. of TFL increase before and after treatment are plotted against 0, 10, 20, 30, 45 and 60. '0' indicates the time before treatment. '10, 20, 30, 45 and 60' indicate the time after the onset of treatment. The analgesic effects of EA+Neo groups were not different from those of EA+SL groups

4. Atropine 전처치에 따른 電鍼刺戟의 鎮痛效果

Atropine 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群 (EA+Atro, n=10)은 평균 TFL 증가율이 電鍼刺戟 후 10분, 20분, 30분, 45분 및 60분에 각각 -5.20±5.3%, -5.75±7.9%, -2.40±7.7%, -5.78±

8.6% 및 -3.67±7.5%의 변화를 나타내어 생리 식염수 전처치 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟群(EA+SL, n=10)의 16.28±10.2%, 30.51±11.9%, 39.2±13.2%, 14.95±5.6% 및 11.3±5.8%에 비하여 모두 유의성(p<0.01)있는 감소를 보였다(Table 3, Fig. 4).

Table 3. Changes of TFL in Electroacupuncture Pretreated with Atropine in the Collagen-induced Arthritis Rats

Group	No. of animal	Tail Flick Latency Increase (%)					
		pre	10min	20min	30min	45min	60min
EA+SL	10	0	16.28±10.2	30.51±11.9	39.2±13.2	14.95±5.6	11.3±5.8
EA+Atro	10	0	-5.20±5.3**	-5.75±7.9**	-2.40±7.7**	-5.78±8.6**	-3.67±7.5**

Values are means±S.D.

EA+SL; group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with normal saline before 30minutes to stimulate.

EA+Atro; group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with atropine (1mg/kg, i.p.) before 30minutes to stimulate.

** : p<0.01 analyzed by Mann-Whitney U test

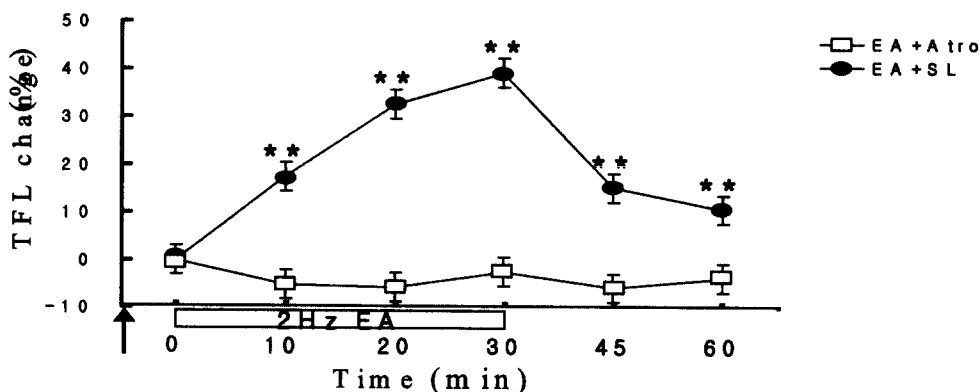


Fig. 4. Suppression of EA effects by atropine pretreatment (arrow) in the collagen-induced arthritis rats. Intraperitoneal injection of atropine (Atro, 1 mg/kg, i.p.) reversed the analgesic effect of EA. SL, normal saline. EA+SL is a group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with normal saline before 30 minutes to stimulate. EA+Atro is a group of electroacupuncture at left Jogsamni(ST₃₆) combined with atropine before 30 minutes to stimulate. The means±S.D. of TFL increase before and after treatment are plotted against 0, 10, 20, 30, 45 and 60. '0' indicates the time before treatment. '10, 20, 30, 45 and 60' indicate the time after the onset of treatment. Asterisks indicate significant difference between EA+SL and EA+Atro group after treatment(** : p<0.01, Mann Whitney U test)

IV. 考 察

류마티스 관절염은 자가면역질환의 일종으로서 관절부위에 발생하는 염증성질환이며 외상, 감염, 대사이상, 면역이상 및 종양 등 여러 가지 원인에 의해 발생하며¹⁸⁾, 관절의 홍반, 발열, 종창 및 관절부위의 격렬한 동통을 유발하는 慢性 炎症性痛症(chronic inflammatory pain) 질환이다¹⁹⁾. 류마티스 관절염과 같은 만성 염증성통증의 경우 그 통증조절이 쉽지 않으며, 특히 통증을 줄이지 못하면 환자의 운동능력이 현저하게 감소하게 되며 이로 인해 관절 주위 근육이나 인대 등의 약화를 초래하여 관절 기능약화 및 소실을 유발하는 신체장애를 일으키게 된다.

韓醫學에서는 이러한 關節炎을 痺症¹⁸⁾, 歷節風²⁰⁾, 痛風²¹⁾의 범주로 보았다. 특히 <靈樞九鍼論>²²⁾에서는 “八正之虛風, 八風傷人, 內舍於骨解腰脊節腠理之間, 爲深痺也.”라고 하여 關節痺症을 深痺라고 인식하였으며, 주요한 임상증상으로 關節疼痛, 運動障礙, 硬直, 發熱, 腫脹, 發赤을 언급하여²¹⁾ 關節炎과 痛症의 相關성을 다루었다.

韓醫學에서는 痛症調節手段으로서 鍼刺療法을 사용하여 왔는데, <靈樞: 刺節眞邪論>에서는 “用鍼之類 在於調氣”, <素門: 寶命全形論>에서는 “凡刺之道 必先治神”이라고 하여 調氣治神의 作用으로 “佳痛移疼”의 효과를 말하였다²³⁾. 이러한 鍼鎮痛效果가 과학적 연구의 대상이 된 것은 1972년부터이며²⁴⁾, 이후 鍼에 다양한 자극의 빈도 및 강도를 조절할 수 있는 電鍼의 鎮痛效果와 機轉에 대한 연구가 진행되었다. 즉

낮은 빈도의 자극 (1-4 Hz)은 뇌하수체에서 β -endorphin을 분비하고 척수에서 Met-enkephalin, dynorphin 등의 opioid peptide를 매개로 鎮痛效果를 발휘하며⁸⁾, 상대적으로 높은 빈도의 자극 (100-200 Hz)은 serotonin, norepinephrine, dopamine을 매개로 鎮痛效果에 參與함이 보고되었다⁹⁾.

鎮痛效果를 알아보기 위한 통증역치를 평가하는 방법으로, 본 실험에서는 tail flick latency (TFL)를 사용하였다. TFL은 D'Armour와 Smith가 1941년 발전시킨 방법으로서 유해자극에 대한 역치를 평가하는 방법으로 鍼鎮痛 연구에 다용되고 있다²⁵⁾. Takeshige는 20°C의 실내온도에서 TFL의 평균기저선이 2초가 되는 강도의 빛 조사를 유해자극으로 하여 조직손상을 막기 위해 7초의 cut-off time을 설정하고 30초 간격으로 5회 측정된 평균값의 변화율을 비교하는 방법을 사용하였다¹²⁻¹³⁾. 이러한 TFL의 측정에 있어 본 실험에서 고려해야 할 사항으로는 실험실 및 주위 온도²⁶⁾, 체온 및 꼬리의 피부온도, 자극부위, 복사열의 강도, 평균기저선 반응시간, 스트레스 등이 있다. 이에 대해 Lichtman 등은 체온과 꼬리의 피부온도가 TFL에 미치는 영향은 무시할 만하다는 것을 보고하였으며²⁷⁾, 꼬리의 온도는 腹側, 背側, 側面의 동맥과 정맥의 분포가 다르므로 TFL 측정시 자극부위는 일정해야 한다고 보고하였다²⁸⁾. 이상의 보고들은 본 연구에서 慢性 炎症性痛症의 鎮痛效果를 알아보는 데 있어서, TFL을 이용한 통증역치의 측정이 효과적임을 의미한다.

본 실험에서 電鍼刺戟을 가한 足三里(ST36)는 胃經의 合土穴로서 理脾胃, 調中氣, 和脹消滯, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血하여 胃

痛, 腹痛, 心痛, 頭痛, 胸脇痛, 膝關節痛, 下肢痛 등의 통증조절 기능이 있다¹⁹⁾. 金 등²⁹⁾은 TFL을 지표로 한 실험에서 足三里(ST₃₆) 電鍼刺戟의 鎮痛效果를 보고하였고, Vito V. Romita 등³⁰⁾은 足三里(ST₃₆)의 낮은 빈도(1-4 Hz) 電鍼刺戟은 TFL에 대해 짧은 억제 효과와 긴 억제효과를 동시에 유발한다고 보고하였다.

본 연구에서는 류마티스 관절염과 관련된 만성 염증성통증에 대한 실험 model로 collagen-induced arthritis(CIA) Rat model을 이용하였다. type II collagen-induced arthritis(CIA)는 Trentham 등에 의해 1977년에 처음 발표된 이후로, 현재까지도 인체에서 자가면역과 관련된 류마티스 관절염의 치료 및 병리와 관련된 연구를 위해 널리 사용되어 지고 있다³¹⁾. CIA는 류마티스 관절염과 면역병리학적으로 유사하며 통각과민을 유발하므로 慢性 炎症性痛症의 말초 및 중추의 痛症傳達係를 연구해 볼 수 있는 실험 모델이다³²⁾. 본 실험에서도 Type II collagen으로 關節炎을 유발시킨 후 TFL은 지속적인 감소를 보여 관절염이 통각과민을 유발한다는 보고³²⁾와 일치하였으며, 또한 3주 후에 최고변화량을 보인 이후에는 통증역치에 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 1). 이를 바탕으로 본 실험에서는 adjuvant 關節炎이 유발된 3주 후에 전침자극의 鎮痛效果 및 機轉을 평가하였다.

本 實驗에서 CIA model에 전침자극을 30분간 시행한 결과, 10분 후부터 유의성 있는 진통효과를 나타내었고, 그 효과는 전침자극이 종료된 30분 이후까지 유지되었다. 이와 관련하여 정상 흰쥐에서 Takeshige¹³⁾는 足三里(ST₃₆)에 시행한 1Hz, 0.5mA의 電鍼刺戟에서 반응군의 경우 45분 자극후에 40%의 TFL 변

화를 보였다. 또 다른 보고에 의하면 총 60분 자극 시 35분에 60%의 최고 변화율을 보였으며, 鍼刺戟 종료 후 30분간 鎮痛效果가 유지되었다³³⁾(Fig. 2).

본 연구에서는 전침자극이 CIA model에서 보인 진통효과를 바탕으로 intrinsic muscarinic cholinergic mechanism을 규명하기 위한 연구를 진행하였다.

우선 muscarinic cholinergic receptor antagonist인 atropine을 전처치한 후 電鍼刺戟의 鎮痛效果를 비교해 본 결과, 電鍼刺戟의 鎮痛效果는 유의하게 억제되었다(Fig. 4). 이는 전침자극의 진통효과가 intrinsic muscarinic cholinergic facilitatory pathway와 관계한다는 것을 의미한다. intrinsic muscarinic cholinergic facilitatory pathway는 급성통증 동물모델에 있어 통각 시스템을 조절하는 중요한 경로임을 나타내는 보고³⁴⁾와 acetylcholine(Ach)의 척수내 유리와 통증역치는 밀접한 관련이 있음을 나타내는 보고³⁵⁾도 있다. 따라서 전침자극의 진통효과는 intrinsic muscarinic cholinergic pathway를 경유하며, acetylcholine(Ach)의 유리와도 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

또한 본 연구에서는 muscarinic cholinergic receptor agonist로서 작용하는 acetylcholine 분해 효소 억제제인 neostigmine을 전처치한 후 電鍼刺戟의 鎮痛效果를 비교해 본 결과, 전침자극 단독치료보다 진통효과가 더 뛰어나지는 않았다(Fig. 3). acetylcholine 분해 효소 억제제인 neostigmine은 척수 콜린신경내 내인성 acetylcholine(Ach)을 증가시킴으로써 鎮痛效果를 나타낸다는 보고³⁶⁾와 neostigmine이 내인성 신경전달물질인 acetylcholine(Ach)을 증가시킴으로써 염증성통증을 감소시킨다는 보고³⁷⁾가 있다. 그러므로 intrinsic muscarinic cholinergic facilitatory

pathway에 關여하는 전침자극과 neostigmine 을 동시에 사용한 경우 synergistic effect가 기대되었으나, 본 연구에서는 상승효과는 나타나지 않았다. 다른 보고에 의하면 intravenous morphine과 intrathecal neostigmine을 동시에 처리한 경우 진통효과의 상승이 나타났다³⁸⁾. 이러한 차이는 neostigmine을 intrathecal로 투여하는 경우 효과의 최고점이 투여 후 5-10분에 나타나고 그 효과는 30-45분 정도 지속된다는 보고³⁸⁾로 볼 때, 본 연구에서는 복강 내로 투여되었으므로 반감기에 차이가 있을 수 있겠으나, 전침자극 30분전에 neostigmine을 투여한 것이 문제점으로 지적될 수 있겠다. 이와 關連하여 복강 내 투여 시에도 전침자극 직전에 neostigmine을 투여하는 연구와 intrathecal로 투여하는 연구를 새롭게 진행할 필요성이 있겠다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 電鍼刺戟은 collagen-induced arthritis로 인한 慢性 炎症性痛症에 有의한 鎮痛效果를 나타내며 그 鎮痛機轉은 intrinsic muscarinic cholinergic mechanism과 밀접한 關連이 있고, 이는 곧 전침자극이 척수내 acetylcholine(Ach)의 분비를 증가시킴으로써 진통효과를 나타내는 것을 간접적으로 보여 준다. 향후 전침자극이 척수내 acetylcholine(Ach)의 분비에 미치는 영향을 직접적이고 정량적인 방법으로 연구해 볼 필요가 있겠다. 이로써 電鍼刺戟은 collagen-induced arthritis 실험동물에서 有의한 鎮痛效果가 인정되므로 임상에서 慢性 炎症性痛症의 治療에 有效하게 적용될 수 있을 것으로 사려되며, 아울러 본 실험의 결과를 토대로 慢性 炎症性痛症에 대한 電鍼刺戟의 鎮痛效果 및 그 機轉에 關한 연구가 지속적으로 이루어질 수 있기를 기대한다.

V. 結 論

慢性 炎症性痛症 model인 collagen-induced arthritis 동물모델 흰쥐의 偏側 足三里(ST₃₆)에 電鍼刺戟(2Hz, 0.07mA, 0.3ms)을 가한 후, TFL을 지표로 한 鎮痛效果와 intrinsic muscarinic cholinergic pathway와 關連된 機轉을 알아보기 위하여 atropine과 neostigmine을 전처치한 후 전침자극의 鎮痛效果를 觀察하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Type II collagen으로 關節炎이 유발된 이후의 통증역치는 점점 떨어지는 양상을 보이면서 痛覺過敏을 유발하였다.
2. Collagen-induced arthritis 동물모델 흰쥐의 偏側 足三里(ST₃₆)에 시행한 電鍼刺戟은 통증역치를 증가시키면서 鎮痛效果를 나타내었고, 자극 종료 후 30분간 鎮痛效果가 유지되었다.
3. Collagen-induced arthritis 동물모델 흰쥐에 intrinsic muscarinic cholinergic receptor antagonist인 atropine (1 mg/kg, i.p.)을 전처치한 경우, 電鍼刺戟의 鎮痛效果가 減弱되는 양상을 보여 척수내 acetylcholine(Ach)의 분비를 조절하는 intrinsic muscarinic cholinergic pathway와 밀접한 關連이 있음을 보여주었다.
4. Collagen-induced arthritis 동물모델 흰쥐에 intrinsic muscarinic cholinergic receptor agonist로서 작용하는 acetylcholinesterase 억제제인 neostigmine (100 µg/kg, i.p.)을 전처치한 경우, 電鍼刺戟의 鎮痛效果가 더 증가되지는 않았다.

VI. 參考文獻

1. 대한정형외과학회 편저. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 1995 : 175.
2. 김전, 정승준. 통증의 병태생리. 대한신경과 학회지. 2002 ; 20(1) : 1-7.
3. Lin C, Wang CH, Wu P, Wen ZH, Buerkle H, Yang LC. Apraclonidine attenuates the increases in spinal excitatory amino acid release in rats with adjuvant-induced inflammation. *Anesth Analg.* 2002 ; 94(3) : 701-5.
4. Gunji N, Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Expression of kappa-opioid receptor mRNA in human peripheral blood lymphocytes and the relationship between its expression and the inflammatory changes in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2000 ; 19(3) : 95-100.
5. Jones AK, Cunningham VJ, Ha-Kawa S, Fujiwara T, Luthra SK, Silva S, Derbyshire S, Jones T. Changes in central opioid receptor binding in relation to inflammation and pain in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1994 ; 33(10) : 909-16.
6. Dhondt W, Willaeyts T, Verbruggen LA, Oostendorp RA, Duquet W. Pain threshold in patients with rheumatoid arthritis and effect of manual oscillations. *Scand J Rheumatol.* 1999 ; 28(2) : 88-93.
7. Lee JH, Beitz AJ. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain.* 1993 ; 52 : 11-28.
8. 宋淙圭, 林圭彦, 金庚植. 鍼刺가 慢性腰痛의 血漿內 β -endorphin, ACTH 및 Cortisol含量에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1989 ; 6(1) : 63-82.
9. Cheng RS, Pomeranz B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. *Brain Res.* 1981 ; 215 : 77-92.
10. 백용현, 최도영, 박동석. Adjuvant 誘發 關節炎에 對한 電鍼刺戟의 鎮痛效果 및 그 機轉에 對한 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2003 ; 20(3) : 117-30.
11. 李惠貞. 脊髓神經系統에서 2-deoxyglucose代謝에 關한 鍼刺戟 役割 研究, 慶熙韓醫大 論文集. 19(2), 1996.
12. Takeshige C. differentiation between acupuncture point and non-acupuncture point by association with analgesia inhibit system. *Acupuncture & Electro-therapeutics Res. Int.* 1985 ; 10 : 195-203.
13. Takeshige C, Kobori, Hishida, Igarashi. Analgesia inhibitory system in nonacupuncture point-stimulation-produced analgesia. *Brain Res.* 1992 ; 28 : 379-91.
14. Romita VV, Suk A, Henry JL. Parametric study on electroacupuncture like stimulation in a rat model - effects of intensity, frequency and duration of stimulation on evoked antinociception. *Brain Res.* 1997 ; 42(4) : 289-96.
15. Pitcher GM, Yashpal K,Coderre TJ. Mechanism underlying antinociception provoked by heterosegmental noxious stimulation in the rat tail-flick test. *Neuroscience.* 1995 ; 65 : 273-81.

16. 고흥균. 흰 쥐에서의 골도분촌에 의한 상응 혈위. 大韓鍼灸學會誌 1999 ; 16(3) : 115-22.
17. Hwang BG, Min BL, Kim JH, Na HS, Park DS. Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain. *Neurosci letters*. 2002 ; 320(1-2) : 49-52.
18. 全國韓醫科大學 再活醫學科教室 編. 東醫再活醫學科學. 서울: 書苑堂. 1995 : 95-96, 108, 111-114.
19. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編. 鍼灸學下. 서울: 集文堂. 1988 : 1286, 1294-1296, 1457.
20. 張機. 金匱要略. 서울: 成輔社. 1985 : 117-9.
21. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1982 : 14-21, 206, 207.
22. 洪元植 校勘直譯. 黃帝內經素問. 서울: 傳統文化研究會. 1993 : 234-40.
23. 金賢濟, 崔容泰, 林種國, 李潤浩. 最新鍼灸學. 서울: 成輔社. 1983 : 234.
24. Tsuei JJ. The science of acupuncture theory and practice. *Engineering in Med. & Bio*. 1996 ; 15(3) : 52-57.
25. Grossman ML, Basbaum AI, Fields HL. Afferent and efferent connections of the rat tail flick reflex(A model used to analyze pain control mechanism). *J. Comp. Neurol*. 1982 : 206, 9-16.
26. Rand RP, Burton AC. The tail of the rat in temperature regulation and acclimatization. *Can J. Physiol., Pharmacol*. 1965 : 43, 257-267.
27. Lichtman AH, Smith FL, Martin BR. Changes in tail skin temperature are unlikely to be a confounding factor in the tail-flick test. *Pain*. 1994 : 57, 257-8.
28. Sapsed-Byrne S, Holdcroft A, Ridout D. The influence of colonic temperature changes in anaesthetised rats on tail skin temperature and repeated testing of tail-flick latencies. *Pain*. 1995 : 63, 255-61.
29. 金志勳. 捻轉法이 竝行된 鍼刺戟 및 電鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響. 慶熙大 韓醫學碩士學位論文. 1998.
30. Vito V, Romita, Kiran Yashpal. Intense peripheral electrical stimulation evokes brief and persistent inhibition of the nociceptive tail withdrawal reflex in the rat. *Brain Res*. 1997 : 761, 192-202.
31. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977 ; 146 : 857-68.
32. Rosenthal ME, Capetola RJ. Adjuvant arthritis - immunopathological and hyperalgesic features. *Fed Proc*. 1982 : 581, 2577-82.
33. Takeshige C, Sato T, Mera T, Hisamitsu T, Fang J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull*. 1992 ; 29(5) : 617-34.
34. Pinardi G, Sierralta F, Miranda H. F. Atropine reverse the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2003 ; 74 : 603-8.
35. Klsa S. P., Abelson A, Urban Hoglund. Intravenously administered lidocaine in therapeutic doses increases the intraspinal release of acetylcholine in rats. *Neuroscience*

- Letters. 2002 ; 317 : 93-6.
36. Kenji Honda, Akitsugu Harada, Yukio Takano, Hiro-o Kamiya. Involvement of MB muscarinic receptors of the spinal cord in formalin-induced nociception in mice. *Brain Research*. 2000 ; 859 : 38-44.
37. Buerkle H et al. Central and peripheral analgesia mediated by the acetylcholinesterase-inhibitor neostigmine in the rat inflamed knee joint model. *Anesth Analg*. 1998 ; 86 : 1027-32.
38. Eisenach J. C., Gebhart G. F. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine and carbamylcholine in rats. *Anesthesiology*. 1995 ; 83(5) : 1036-45.