

## 梔子 藥鍼이 白鼠 모델 足踝 捻挫 痛症에 미치는 影響

구성태<sup>1</sup> · 조명수<sup>1</sup> · 박성섭<sup>1</sup> · 김영태<sup>1</sup> · 박귀중<sup>1</sup> · 손인철<sup>1</sup> · 김경식<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 경혈학교실

### Effect of Frutus gardeniae herbal acupuncture on the rat model of ankle sprain pain

Sung-Tae Koo<sup>1</sup>, Myoung-Soo Cho<sup>1</sup>, Sung-Sub Park<sup>1</sup>, Young-Tae Kim<sup>1</sup>,  
Kwi-Jong Park<sup>1</sup>, In-Cheul Sohn<sup>1</sup>, Kyoung-Sik Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Acupoint & Meridian, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

#### Abstract

**Objective** : Frutus gardeniae, seed of *Gardenia jasminoides* Ellis is one of the crude drugs used for the treatment of inflammatory condition in oriental medicine.

**Methodes** : The present study aimed to examine the analgesic effect and anti-inflammatory effect of Frutus gardeniae extract (FGE) on a rat model of ankle sprain pain, and the relations between FGE-induced effect and endogenous nitric oxide (NO) and inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and c-Fos protein expression in the spinal cord. As a chronic pain model, ankle sprain pain model was used to test the effect of FGE injection applied to acupuncture point. After the induction of ankle sprain, rats subsequently showed a reduced stepping force of the affected limb for at least the next 4 days. The reduced stepping force of the limb was presumably due to a painful knee. FGE dissolved in normal saline was injected several acupoints.

**Results** : After the treatment, behavioral tests measuring stepping force were periodically conducted during the next 8 hours. FGE produced significant improvement of stepping force of the hindlimb affected by the ankle sprain lasting at least 4 hours. FGE produced the improvement of stepping force of the affected hindlimb in a dose-dependent manner. In addition, FGE injection showed inhibitory effect on the paw edema induced by ankle sprain. Both NO production and iNOS, COX-2 protein expression increased by ankle sprain were suppressed by FGE. FGE on combination with electroacupuncture (EA) produced more powerful and longer lasting improvement of stepping force of the hindlimb affected by the ankle sprain than either FGE or EA did. The present study suggest that FGE produces a potent analgesic effect on the ankle sprain pain model of the rat and that FGE-induced analgesia modulate endogenous NO through the suppression of iNOS/COX-2 protein expression.

**Key words** : Frutus gardeniae herbal acupuncture, ankle sprain pain

---

· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학  
경혈학교실, Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458,  
E-mail : meridi1@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2005/05/30 · 수정 : 2005/02/20 · 채택 : 2005/06/21

## I. 서 론

梔子(Gardenia jasminoides Ellis)는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속하는 상록관목인 치자나무의 과실을 건조한 것으로, 性이 寒, 無毒하고, 味는 苦하다. 淸熱, 利濕, 涼血, 解毒의 작용이 있어, 血淋, 熱淋, 血熱出血, 吐血, 癰腫瘡毒, 瘀血消腫治療에 사용되었다<sup>1-5)</sup>.

치자는 임상에서 心肺胃三焦 四經의 火熱을 淸泄하면서 除煩하는 작용이 있으므로 熱病으로 인한 煩熱, 懊憹, 躁擾不寧 등의 병증에 응용하며<sup>1)</sup>, 淸熱利濕작용을 하기 때문에 濕熱의 鬱結로 인한 發黃에 사용하였다. 이 밖에도 生用으로 研末하여 水酒醋, 혹은 鷄子白과 혼합하여 붙이면 散瘀消腫 및 瘀熱을 제거하므로 四肢關節, 肌肉 등의 損傷을 치료할 수 있다고 하였다<sup>1,2)</sup>.

최근 연구를 통하여 치자는 항산화효과<sup>6,7)</sup>가 있으며, 치자의 추출물이 항균작용<sup>7,8)</sup>을 하는 것이 알려지게 되었다. 그리고 치자 추출물에서 항미생물 활성을 갖는 물질을 분리<sup>9)</sup>하기도 하였다. 아울러 치자로부터 분리한 geniposide는 신생혈관억제효과<sup>10,11)</sup>와 항트롬빈(antithrombotic) 효과<sup>12)</sup>가 있는 것이 보고되었다. 또한 Geniposide는 항염증효과가 있어서 연부조직 손상으로 인한 염증에 효과가 있었다<sup>13)</sup>.

藥鍼療法은 경락학설의 이론에 의거하여 질병과 유관한 약물과 혈위를 이용한 침과 약물의 상승작용을 통하여 질병을 치료하는 新鍼療法의 하나로, 약효의 신속성을 비롯해서 약물의 경구 투여에서 발생할 수 있는 위, 소화기관에서 약물의 변화 및 파괴를 방지할 수 있고, 최소화할 수 있다는 장점이 있다<sup>14)</sup>. 현재 한의학 임상에서 다양한 종류의 약침이 활용되고 있으며 그 치료의 유효성이나 효과 기전에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

족과 염좌 모델은 만성 통증 모델로서 통증을

적절하게 측정할 수 있는 방법과 함께 보고되었으며, 족과 염좌 모델은 사람에서 발생하는 족과 염좌의 특징인 통증과 부종을 잘 반영하고 있다. 이 모델은 모르핀 같은 진통제에 잘 반응하였고, 전침 자극에 의해 통증이 경감되는 것이 보고되었다<sup>15)</sup>.

이 연구에서는 족과 염좌 실험동물 모델을 사용하여 임상에서 족과 염좌에 활용되는 치자를 약침으로 투여하여 치자 약침이 통증과 부종에 미치는 효과와 척수에서 통증과 부종에 관련된 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보려 하였다. 그 결과 저자는 다음과 같은 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

실험동물로는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley (6주령, 170-190 g)가 사용되었으며, 원광대학교 한의학전문대학원에서 사육되었다. 동물은 온도 22±1℃, 상대습도 55±10%의 조건에서 12시간 주야로 주기를 바꿔 주면서 한 케이지에 3-4마리씩 soft bedding으로 사육하였다. 동물들은 실험 시작하기 전 적어도 5일간동안 이러한 환경에서 적응하면서 사육되었다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

### 2. 방법

#### 1) 치자 약침액의 제조

건조된 치자(Gardenia jasminoides Ellis)를 분쇄기를 사용하여 분말상태로 분쇄한 후, 이 치자 분말 100 g에 증류수 1000 ml를 가하여 함께

환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 2시간 동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 52℃에서 진공농축으로 감압 농축시켜 -70℃에서 24시간 동결시켰다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결 건조하여 분말시료를 얻었다. 이 분말시료에 생리식염수를 가하여 100 mg/ml 농도의 약침액을 만들고 pH 6.7로 조절하여 사용하였다.

## 2) 약침 투여

치자 약침은 인슐린 주사기(0.5 cc, 29 gauge 1/2")를 사용하여 健側 및 患側 丘墟(GB<sub>40</sub>)와 患側 足三里(ST<sub>36</sub>)에 10, 50  $\mu$ l 씩 주입하였다. 실험동물에서 구허와 족삼리는 인체에 상응하는 부위에서 취혈하였다. 구허는 족외과의 앞 아래쪽 오목한 곳에서 취혈하였으며, 족삼리는 무릎에서 1.5 cm 내려간 곳으로 경골(Tibia)과 전경골근(Tibialis anterior) 사이에서 취혈하였다.

## 3) 전침자극

치자 약침과 전침의 결합 치료효과를 알아보기 위하여 전침자극을 하였다. 직경 0.25 mm, stainless-steel 재질의 한 쌍의 침(0.25×30 mm, 동방침구제작소)을 건측 양로(SI<sub>6</sub>)에 자침하였다. 동물에서 취혈은 사람의 경혈 자리에 상응하는 부위로 요골두와 척골두 사이로 하였다. 침은 pulse generator(stimulator)에 연결되어 1 ms duration, 4 pulse의 train(1 ms의 정사각파, 100 Hz의 intra-train frequency)이 출력되었다. 실험하는 동안 사각파의 주파수(frequencies)는 2 Hz 가 쓰였으며, 강도(intensity)는 2 mA (muscle twitch threshold의 10배정도의 강도로써, muscle twitch threshold는 보통 200  $\mu$ A 근방이다)의 자극강도를 사용하였다. 양극(+,-)은 전극의 분극(polarization)을 막기 위해 1분마다 역

전되었다. 전침 치치가 끝난 즉시 마취는 중단되었으며 5~10분 내에 동물은 완전히 깨어나 정상적으로 활동하기 시작하였다. 총 자극시간은 30분으로 하였다. 관절염모델에서 weight bearing force는 전기적 자극 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간에 측정하였다.

## 4) 염좌 모델 유도

Enflurane과 O<sub>2</sub>로 혼합된 마취상태에서 (마취 유도 3%, 마취상태 유지 1.5-2.0%), 사람에게 발생하는 외측 족과 염좌와 비슷하게 유발시키기 위해 손가락으로 쥐의 오른쪽 족과 외측인대를 과도하게 신전시킴으로써 족과염좌모델을 유도하였다. 염좌 모델 유도는 Koo 등이 보고한 방법<sup>16)</sup>을 사용하여 유도하였다. 오른손 엄지손가락과 검지 손가락으로 쥐의 오른쪽 발의 안팎에 위치한 복숭아 뼈를 잡고 손가락 힘을 점진적으로 증가시켜서 발목이 자연스럽게 내번(inversion)되면서 발바닥이 굴곡(flexion)되는 방향으로 1분 동안 60회 반복적으로 쥐의 발목을 구부렸다. 이렇게 해서 결국 안정자세(resting position)에 있는 자세로부터 90° 발목내전, 90° 발바닥 굴곡 된 자세로 구부러져 있을 수 있었다. 더욱 더 발목을 내번시키기 위해 다음 1분 동안 반복적으로 60회 발목을 구부렸다. 그래서 결국 180° 내번되어 발바닥이 완전히 위를 향하게 하였다. 위의 두 과정을 한번 더 반복 시행하였다. 그러므로 족과염좌를 유도하는데 총 4분이 소요되었다. 염좌가 유도된 후 바로 마취를 중단하였으며, 그 후 5~10분 내에 마취에서 회복되었다.

## 5) 동물행동 검사

통증 정도를 측정하기 위해서 관절염이 유발된 후의 바닥을 딛는 힘을 측정하였다. 동물을 투명한 아크릴로 만든 긴 통로(폭 10 cm, 높이

10 cm, 길이 60 cm)를 자유스럽게 걷게 하고, 통로 바닥의 절반에 전자저울(Acculab, Pocket pro 250-B, Newton, PA, USA)을 설치하여 한 쪽 발이 디디는 압력만을 측정하였다. 전자저울에서 나오는 전기신호는 압력의 변화를 전압의 변화로 보여주는데 이를 CED(1401 plus)에 연결하여 spike 2 프로그램(Cambridge Electronic Design Ltd, UK version 4.12)으로 전압의 변화를 관찰하였다. 발이 딛는 압력(Weight Bearing Force; WBF)은 총 회복률(Full Recovery Rate; FRR)로 변환하여 측정값으로 사용하였는데 이는 다음과 같은 공식으로 구하였다.

$FRR(\%) = (\text{梔子 藥鍼 투여 후 증가한 WBF} / \text{염좌로 감소한 WBF}) \times 100$

관절염 모델 동물의 WBF가 시간 경과에 따른 변화를 측정하기 위하여 관절염 유발 후 일정한 시간마다 측정하였다. 모든 행동검사는 각 측정 시간마다 3회 실시하여 평균값을 취하여 측정값을 얻었으며 행동검사는 맹검법으로 시행하였다.

## 6) 발의 부종 측정

족과 염좌로 인한 발의 부종을 측정하기 위하여 뒷발의 부피를 측정하였다. 50 ml 비이커에 물을 채운 후 0.01 g까지 측정 가능한 저울 위에 올려놓고 염좌가 유발된 쪽 뒷발을 족외과침 부위까지 물에 담귀서 증가한 무게를 측정하여 1 g을 1 ml로 환산하여 부피를 계산하였다.

## 7) 단백질의 분리 및 정제

척수에서 c-Fos, COX-2, iNOS 단백질 발현을 측정하기 위하여 대조군, 족과 염좌군 및 염좌에 치자 약침을 투여한 군의 동물들을 chloralhydrate 250 mg/kg으로 마취하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장 관류하여 혈액을 제거한 후 재빨리 척수를 박리

하였다. 박리된 척수는 dry-ice powder에 신선하게 얼려 사용할 때까지 -80℃에 보관하여 놓았다. 보관된 척수에 homogenization buffer 3 ml를 가하여 homogenizer로 3회(15초 같고 10초 쉬는 행위를 3회 반복) 균질화시킨 후, 3,000 ×g로 10분 동안 원심분리시켰다. 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80℃에 저장하여 놓았다. 이 시료는 COX-2, iNOS 단백질을 분석하기 위해 사용되었다. 이 시료를 4℃에서 13,000 ×g로 10분 동안 2회 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 ependorf tube에 담아서 사용할 때까지 -80℃에 저장하여 놓았다. 이 시료는 c-Fos 단백질을 분석하기 위해서 사용되었다.

## 8) 산화질소 정량

척수조직내 산화질소 (NO) 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 안정된 마지막 산물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>에 대해서 분석하였다.

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

### 9) Western blot 분석

단백질 blotting을 위하여 보관하여 놓은 단백질 시료를 5배 농축된 SDS sample buffer (1×125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol, 0.003% bromophenol, 1% β-mercaptoethanol)와 섞어서 98℃에서 5분간 끓인 후 10,000 rpm에서 5~10초간 원심분리한다. 그 후 샘플들을 polyacrylamide gel에 걸어서 electrophoresis를 한다. 그리고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer시킨다. Membrane은 실온에서 blocking buffer (TBS-T에 5% skim milk, 10% NaH3를 포함)에 blocking을 하고, anti-iNOS, anti-COX-2, anti-c-Fos antibody를 1:1,000으로 하여 1시간 동안 반응시킨 후 4℃에서 밤새 incubation한다. Membrane을 TBS-T로 3번 10분씩 washing한 후, 실온에서 alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Anti-rabbit IgG)와 2시간 동안 반응시키고 TBS-T로 3번 10분씩 washing한다. Develop은 실온에서 NBT/BCIP solution (Sigma, St. Louis, LO, USA)에 5분 동안 반응시켜 발색하였다.

### 10) 통계분석

데이터는 Mean±SEM으로 나타내었다. 통계 검사는 Dunnett's post-hoc test에 의한 one way repeated measure analysis of variance (ANOVA)로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## Ⅲ. 실험결과

### 1. 족과 염좌 모델에서 딛는 압력의 변화

염좌 모델에서 뒷발로 딛는 압력 (Weight Bearing Force; WBF)의 변화를 측정하였다. 염

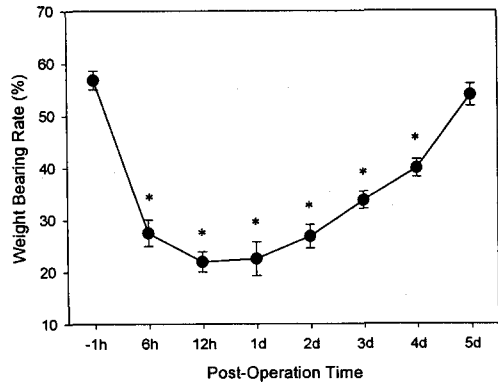


Fig. 1. Time course of ankle sprain pain model. Post-operation time is expressed as hours(h) and days(d) after ankle sprain induction. Control (-1h) was taken 1 hour before the induction. Asterisks indicate values significantly different from the control value by one-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test (n=8)

좌를 유발하기 전에 건강한 흰쥐에서 뒷발에 대한 WBF를 측정된 결과 정상 상태에서는 몸무게의 55% ~ 60% 가량의 힘이 가해지는 것을 관찰할 수 있었다. 발목에 염좌를 유발하면 통증으로 인하여 딛는 압력이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 족과 염좌를 유발시킨 동물에서는 주입한 후 6시간 후부터 현저하게 WBF가 감소하기 시작하여 12시간 후에 최대 감소하였다. 이러한 통증 행동은 시간이 지나면서 차츰 회복되었는데 약 4일 정도 통증이 유지되었다(Fig. 1).

염좌 모델에서 실험동물은 발목 주위 인대손상과 주위 조직 염증으로 인한 통증을 느끼기 때문에 염증이 유도된 쪽 발로 딛는 압력을 줄여서 통증을 덜 느끼기 위한 행동을 하는 것으로 생각하여 본 연구에서는 이러한 행동양상을 이용하여 줄어든 압력을 통증에 대한 척도로 삼았다.

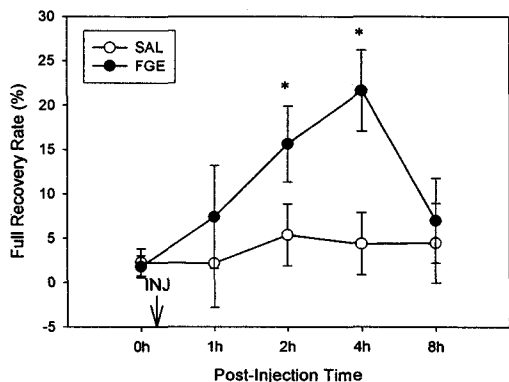


Fig. 2. Effect of FGE injection applied to GB40 on foot stepping force in a rat model of ankle sprain pain.

FGE (100 mg/ml, 50 $\mu$ l) or normal saline (SAL) was injected to ipsilateral GB40 point of the rats (n=8). After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 1h, 2h, 4h, 8h. FGE injection showed a significant improvement of stepping force of the limb at 2h and 4h after FGE injection. Asterisks indicate the values that are significantly different from the pre-treatment baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

## 2. 염좌 모델에 대한 치자 약침의 진통효과

염좌 모델에서 오른쪽 하지의 weight bearing에 대한 梔子 藥鍼의 진통 효과를 알아보았다. 모든 동물은 염좌가 유도된 후 같은 쪽 하지의 weight bearing이 현저하게 감소되었다. 실험군은 患側 丘墟에 梔子 藥鍼을 100 mg/ml의 농도로 50  $\mu$ l를 주입하였으며, 대조군은 생리식염수를 患側 丘墟에 같은 부피를 주입하였다. 약침 투여 후, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 동물 행동 테스트를 실시하였다. 치자 약침군은 주입 후 2시간, 4시간에 약침주사하기 전 값에 비해 WBF가 유의하게 개선되었다. 대조군은 실험하는 8시간동안 유의한 변화가 나타나지 않았다.

약침 투여군은 4시간째 stepping force의 변화가 가장 높았으며, 시간이 지남에 따라 점차 감소하기 시작하였으며, 치자의 진통효과는 적어도 4시간정도 유지되었다(Fig. 2).

## 3. 염좌 모델에 있어서 치자의 농도에 따른 진통효과

염좌 모델에서 농도에 따른 치자 약침 투여가 미치는 압력에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 다음날, 실험군은 10 mg/ml, 100 mg/ml 농도의 치자를 50  $\mu$ l씩 患側 丘墟에 약침 주사하였고, 대조군은 생리식염수 50  $\mu$ l를 患側 丘墟에 주사하였다. 처치 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

생리식염수를 주사한 동물은 감소된 WBF의 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 치자를 10 mg/ml을 투여한 실험군에서는 약침 주입 후 경미하게 weight bearing이 증가하는 경향이 있었으며, 4시간째에 유의한 증가를 보였다(FRR:14.5  $\pm$  3.5 %). 이에 비해, 치자 100 mg/ml를 투여한 군에서는 2시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며 (FRR:15.6  $\pm$  4.2 %) 이러한 효과는 4시간까지 지속되었다(FRR:20.5  $\pm$  4.0 %) (Fig. 3).

## 4. 염좌모델에 있어서 전침, 치자 및 전침과 치자의 결합치료의 진통효과

전침과 치자를 각각 단독으로 또는 결합하여 처치하였을 때 염좌에 의해 감소된 weight bearing에 대해 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 염좌를 유발하고 健側 養老에 전침 자극을 하고 患側에 梔子 藥鍼을 주어서 효과를 비교하였다. 실험군은 전침군, 치자군, 전침과 치자 결합군으로 나누어 실험하였다. 전침군은 염좌가 유도된 동물의 건측 하지의 養老에 마취

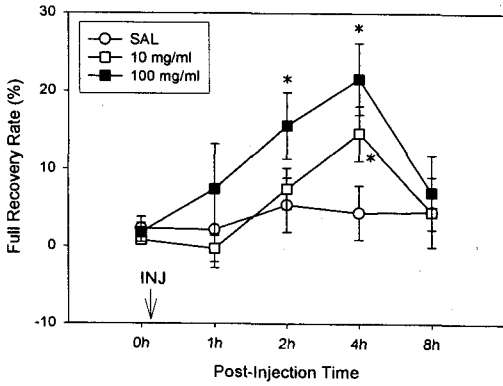


Fig. 3. Dose dependent effect of FGE injection on ankle sprain pain.

Two doses of FGE solution (10 mg/ml, 100 mg/ml) or normal saline (SAL) was injected to rats in a volume of 50 $\mu$ l. After the termination of the treatment, behavioral test measuring foot stepping force was periodically conducted at 0h, 1h, 2h, 4h, 8h. In 8 rats with ankle sprain, normal saline and two doses of FGE dissolved in saline were applied after the induction of ankle sprain in random order and a single-blind manner. Asterisks indicate values significantly ( $p < 0.05$ ) different from the pre-treatment baseline value by one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test.

상태에서 30분간 전침 자극을 하였다. 결합치료군은 전침군과 같이 養老에 전침을 자극하고 자극이 끝난 5분 후에 치자를 患側 丘墟에 약침을 주사하였다. 치자군은 전침자극이 끝나는 시간에 투여하였다.

健側 養老 전침자극군은 감소한 weight bearing이 전침 자극 후 1시간에서 2시간까지 유의하게 증가하였으며, 치자 약침군은 weight bearing이 2시간 후부터 증가하기 시작하여 4시간까지 지속되었다. 이에 반해 치자와 전침 결합치자군은 염좌에 의해 감소된 weight bearing을 더욱 강력하게 개선시켰으며, 그 효과는 4시간

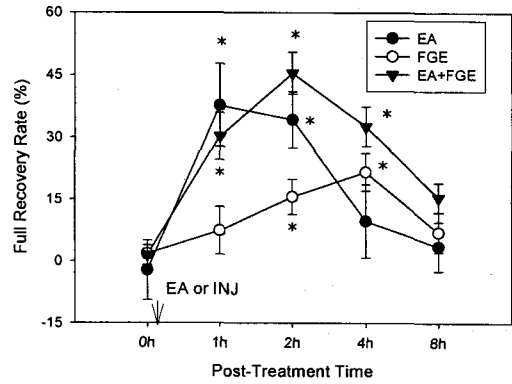


Fig. 4. Effect of EA, FGE, and co-treatment of EA and FGE on ankle sprain pain.

Eight rats were divided into 3 groups on random order. One group applied EA to the SI<sub>6</sub> acupoint of contralateral fore limb. In the other group, FGE (100 mg/ml, 50 $\mu$ l) was injected ipsilateral GB<sub>40</sub>. In the third group, FGE was injected after EA stimulation. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, 4h and 8h after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

까지 지속되었다(Fig. 4).

## 5. 건측과 환측 약침 효과 비교

건측과 환측 약침 효과를 비교하기 위하여 梔子를 健側 丘墟와 患側 丘墟에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 다음날, 100 mg/ml 농도의 치자를 50  $\mu$ l씩 患側과 健側 丘墟에 약침 주사하였고, 처치 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

健側 丘墟에 약침 주사한 동물은 약침 주입 후 행동검사를 실시하는 동안 유의한 변화를 보이지 않았으나 患側 丘墟에 약침 주사한 동물은 2시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가

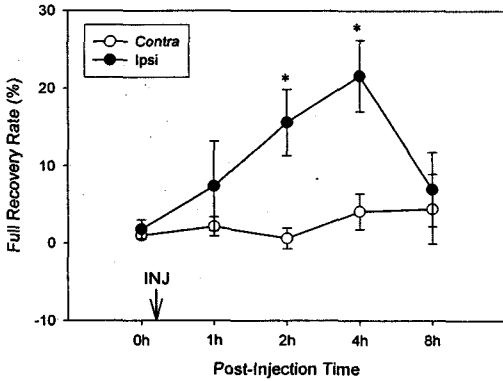


Fig. 5. Effect of FGE injected into unilateral GB<sub>40</sub> on ankle sprain pain.

Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, FGE (100 mg/ml, 50 $\mu$ l) was injected to contralateral GB<sub>40</sub> acupoint of foot. In the other group, same concentration and volume of FGE solution was injected ipsilateral GB<sub>40</sub>. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, 4h and 8h after the treatment. Each experiment was applied for 2 days after the induction of ankle sprain in a single-blind manner. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

하였으며(FRR;15.6 $\pm$ 4.2 %), 이러한 효과는 4시간까지 지속되었다(FRR;20.5 $\pm$ 4.0 %)(Fig.5).

### 6. 환부 주위혈과 원위부 경혈의 효과 비교

환부 주위혈 약침의 효과와 원위부 혈위의 약침 효과를 비교하기 위하여 치자를 患側 丘墟와 足三里에 약침 주입하여 weight bearing에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 다음날, 100 mg/ml 농도의 치자를 50  $\mu$ l씩 患側 丘墟와 足三里에 약침 주사하였고, 처치 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간째에 동물행동검사를 실시하였다.

患側 足三里에 약침 주사한 동물은 검사를 실

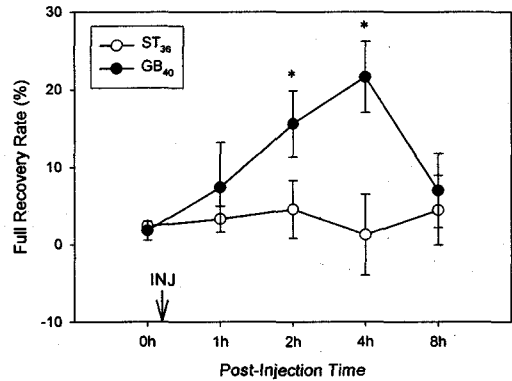


Fig. 6. Effect of FGE injected into GB<sub>40</sub> or ST<sub>36</sub> on ankle sprain pain.

Eight rats were divided into 2 groups on random order. In one group, FGE (100 mg/ml, 50 $\mu$ l) was injected to ipsilateral GB<sub>40</sub> acupoint of the foot. In the other group, same concentration and volume of FGE solution was injected ipsilateral ST<sub>36</sub>. WBF was measured at 0h, 1h, 2h, 4h and 8h after the treatment. Asterisks indicate the values that are significantly different from the baseline value ( $p < 0.05$ ) by the one way repeated measure Analysis of Variance(ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.

시한 전 시간에 걸쳐서 유의한 weight bearing 증가를 관찰할 수 없었다. 이에 비해, 患側 丘墟에 약침 주사한 동물은 2시간 후부터 weight bearing이 유의하게 증가하였으며(FRR;15.6 $\pm$ 4.2 %) 이러한 효과는 4시간(FRR;20.5 $\pm$ 4.0 %)까지 지속되었다(Fig.6).

### 7. 치자 약침이 염좌 모델의 부종에 미치는 영향

염좌 모델에서 치자 약침의 항염증효과를 알아보기 위하여 약침 주입 전후로 발의 부피를 측정하였다. 뒷발의 평균 부피는 염좌를 유도하기 전에는 2 ml를 넘지 않았다(1.88 $\pm$ 0.02 ml). 족과 염좌를 유발시키면 급격하게 부종이 유발되



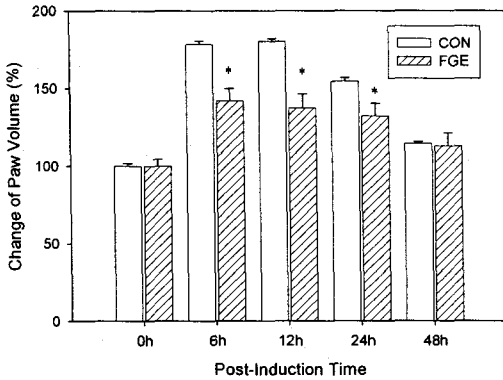


Fig. 7. Anti-inflammatory effect of FGE on ankle sprain pain.

FGE injection was sufficient to produce a significant decrease in the paw volume in affected foot at 6h after FGE injection and later time point.

\*, <0.05 from control values (n=8).

어 염좌를 유발시킨 후 6시간에서 12시간 사이에 최대로 부여 거의 부피가 2배가 되었다 ( $3.38 \pm 0.05$  ml). 염좌를 유발시킨 후 바로 100 mg/ml 농도의 치자를 50  $\mu$ l씩患側 丘墟에 약침 주사하고, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 발의 부종의 변화를 측정하였다.

염좌 유발 6시간 후에 대조군은 유발시키기 전보다 178% 부피가 증가했으나 치자 약침 투여군은 132%로 유의하게 부종을 억제하였다. 치자 약침의 부종 억제효과는 24시간동안 지속되었다(Fig. 7).

### 8. 염좌 동물의 척수에서 NO 분석

염좌를 유발시킨 후患側 丘墟 부위에 100 mg/ml 농도의 치자 약침액 50  $\mu$ l를 주입한 후 치자 약침이 척수에서 NO에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 후 치자 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 NO를 분석하였다. 정상동물과 염좌동물 및 염좌 유도 후 치

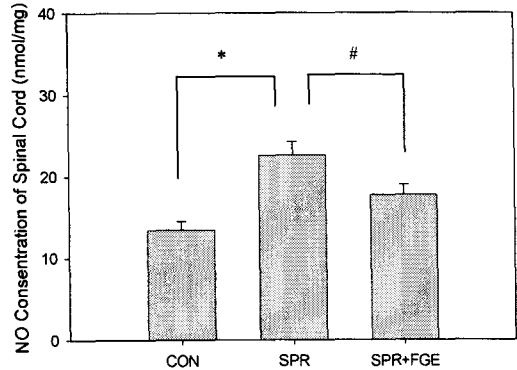


Fig. 8. Effect of FGE on the nitrite/nitrate levels of spinal cord in the different experiment groups. NO production on the spinal cord was measured by Griess reaction assay method as described in the Methods section. Sprain group (SPR) was not performed any other treatment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \* p<0.05, compared with the untreated control group. # p<0.05, compared with the sprain group.

자를 처치한 동물들의 척수에서 NO를 분석해본 결과, 염좌 동물은 정상동물( $13.4 \pm 0.3$  nmol/mg)에 비해 NO의 생산이 유의하게 증가하였으며 ( $22.6 \pm 1.6$  nmol/mg), 치자를 처치한 염좌 동물은 염좌 동물에 비해 유의하게 NO가 감소하였다( $17.7 \pm 1.2$  nmol/mg).

### 9. 염좌 동물의 척수에서 iNOS 단백질에 대한 Western blot 분석

염좌를 유발시킨 후患側 丘墟 부위에 100 mg/ml 농도의 치자 약침액 50  $\mu$ l를 주입한 후 치자 약침이 척수에서 iNOS 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 후 치자 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 iNOS를 분석하였다.

정상동물과 염좌동물 및 염좌 유도 후 치자를 처치한 동물들의 척수에서 iNOS를 분석해본 결

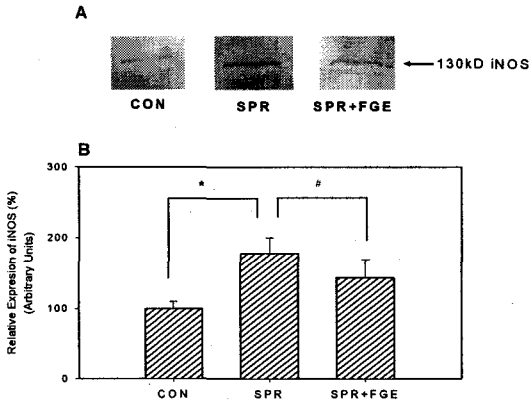


Fig. 9 Western blot (A) and densitometric (B) analysis of iNOS expression in the spinal cord samples from the several groups. Sprain group (SPR) was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The molecular weight of the protein band corresponded well to that of iNOS. The iNOS signal was enhanced in the sample from the ankle sprain when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from FGE-treated sprain group when compared with that from the sprain group. Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$ , compared with the untreated control group. #  $p < 0.05$  compared with the sprain group.

과, 염좌 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 iNOS의 발현이 유의하게 증가하였으며(177.7 $\pm$ 20.3 %), 치자를 처치한 염좌 동물은 염좌 동물에 비해 유의하게 iNOS의 발현이 감소하였다(144.2 $\pm$ 21.9 %). (Fig.9)

## 10. 염좌 동물의 척수에서 COX-2 단백질에 대한 Western blot 분석

염좌를 유발시킨 후 患側 丘墟 부위에 100 mg/ml 농도의 치자 약침액 50  $\mu$ l를 주입한 후 치자 약침이 척수에서 COX-2 발현에 미치는 영향을

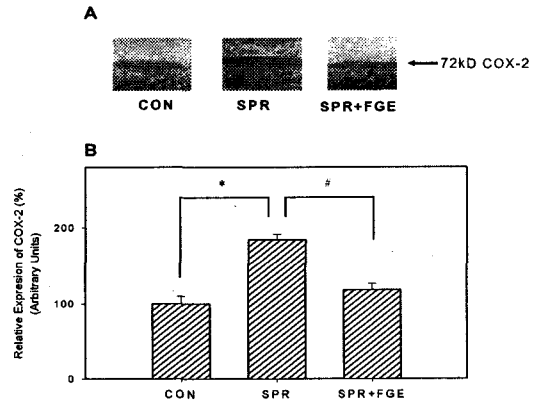


Fig. 10. Effect of FGE on the COX-2 expression in the spinal cord.

Western blot (A) and densitometric (B) analysis of COX-2 expression in the spinal cord samples from the several groups. Sprain group (SPR) was not performed any other treatment except for enflurane anesthesia. Control group (CON) were not applied any other treatment. The COX-2 signal was enhanced in the sample from the ankle sprain when compared with that from the untreated control group and attenuated in the samples from FGE-treated sprain group when compared with that from the sprain group. Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$ , compared with the untreated control group. #  $p < 0.05$  compared with the sprain group.

조사하였다. 염좌를 유발시킨 후 치자 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 COX-2를 분석하였다.

정상동물과 염좌동물 및 염좌 유도 후 치자를 처치한 동물들의 척수에서 COX-2 발현을 분석해본 결과, 염좌 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 COX-2의 발현이 유의하게 증가하였으며(184.3 $\pm$ 6.8 %), 치자를 처치한 염좌 동물은 염좌 동물에 비해 유의하게 COX-2의 발현이 감소하였다(118.4 $\pm$ 7.2 %). (Fig.10)

## IV. 고찰

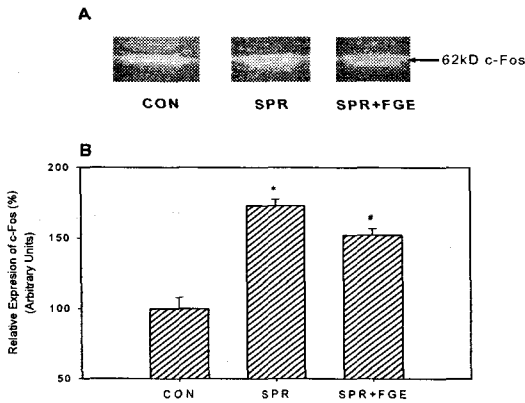


Fig. 11. Effect of FGE on the c-Fos expression in the spinal cord.

Representative Western blot (A) and densitometric analysis (B) of c-Fos in the spinal cord in rats with control (CON), ankle sprain (SPR), and FGE treatment with sprain (SPR+FGE). Each lane was loaded with 60  $\mu$ g protein. Each data represents mean  $\pm$  SEM of 5 experiments. \*  $p < 0.05$ , compared with control. #  $p < 0.05$  compared with the sprain group.

### 11. 염좌 동물의 척수에서 c-Fos 단백질에 대한 Western blot 분석

염좌를 유발시킨 후 患側 丘墟 부위에 100 mg/ml 농도의 치자 약침액 50  $\mu$ l를 주입한 후 치자 약침이 척수에서 c-Fos 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 염좌를 유발시킨 후 치자 약침 주입을 하고 4시간 후에 척수 조직을 적출하여 c-Fos를 분석하였다.

정상동물과 염좌동물 및 염좌 유도 후 치자 약침을 처치한 동물들의 척수에서 c-Fos 발현을 분석해본 결과, 염좌 동물은 정상동물에 비해 L3-S1 부위의 척수에서 c-Fos의 발현이 유의하게 증가하였으며(173.0 $\pm$ 4.5%), 치자 약침을 처치한 염좌 동물은 염좌 동물에 비해 유의하게 c-Fos의 발현이 감소하였다(152.5 $\pm$ 4.7%). (Fig.11)

치자는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속하는 상록관목인 치자나무의 과실을 건조한 것으로, 性이 寒無毒하고, 味는 苦하며, Gardenin,  $\alpha$ -Croctin, Essential oil, mannit 및 Chlorogenin 등을 함유하고 있어, 해열 및 강온효과를 가지고 있다. 本草綱目에서는 “釋名 木丹, 越桃, 鮮支 去熱毒風, 除時疾熱, 解五種黃病, 利五淋, 通小便, 解消渴, 瀉三焦火, 清胃脘血, 治熱厥心痛, 解熱鬱, 行結氣, 治吐血衄血, 血痢下血血淋, 損傷瘀血, 湯火傷”이라 하였고<sup>5)</sup>, 清熱, 瀉火, 利濕, 涼血, 解毒 작용<sup>1-3)</sup>이 있어, 五黃, 五淋, 血熱出血, 瘡瘍, 挫傷痛, 瘀血消腫 치료에 사용되었다<sup>3)</sup>.

藥鉞療法은 자침과 약물작용을 결합시킨 것으로, 경락학설의 원리에 의거하여 각종 약물을 유관한 혈위 또는 압통점에 주입해서 “通氣經脈, 調氣血氣”하는 자침효과와 약리작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고, 병리상태를 회복시켜 질병치료의 목적을 달성하는 치료방법이다<sup>14)</sup>.

이 연구에서 치자 약침은 염좌 모델에서 100 mg/ml 농도로 50  $\mu$ l를 주입하였을 때, 주입한 후 2시간에서 4시간 동안 진통효과를 나타내었다. 그리고 이러한 치자 약침의 진통효과는 약침액의 농도에 의존적이었다. 건측 양로혈 전침 자극과 약침 자극을 함께 하였을 때의 진통효과는 전침 단독으로 유도한 진통효과나 약침 단독으로 유도한 진통효과보다 강력하였다.

건측과 환측 독비에 같은 양의 치자 약침을 주입하였을 때 나타나는 진통효과의 차이는 염좌 모델에서 치자 약침요법은 손상부위에서 더욱 효과가 강력함을 시사한다. 환측의 환부 주위혈이 원위혈보다 진통효과가 더 잘 나타난 것도 이와 같은 결과에 잘 부합하고 있다. 또한 이와 같이 자극하는 경혈의 부위에 따라 효과의 차이

가 나타난다는 것은 약침요법이 약물의 단순한 약리작용으로 인한 작용뿐만 아니라 경혈자극으로 인한 작용이 함께 나타남을 볼 수 있다.

염좌를 유도하면서 국소부위에 염증반응을 초래하여 부종이 발생하는데 치자 약침은 이러한 염증반응을 억제하여 부종을 효과적으로 억제하였다. 이는 치자가 항염증작용을 한다는 보고<sup>13)</sup>와 일치하는 결과이다.

일반적으로 말초에서 발생한 위해자극이나 염증반응은 척수에서 자극에 대한 hypersensitivity (중추감작; central sensitization)를 초래하고, 이러한 중추감작은 만성통증의 중요한 기전 중의 하나이다. 척수에 존재하는 NO, prostaglandin 등은 중추감작을 유발시키는 물질로서 알려져 있고, c-Fos는 흥분적 자극 후 20분 이내에 시작되어 24시간 이상 지속됨으로써 myc, jun, kroc 등과 함께 일명 immediate-early gene protein이라 하고 세포내 대사활동성의 변화를 측정하는 표식자로 널리 이용되고 있다<sup>16)</sup>. 치자 약침은 염좌 유발로 인하여 척수에서 증가된 NO, COX-2, c-Fos 단백질의 발현을 억제함으로써 척수수준에서 통증을 억제한 것으로 사료된다.

NO는 1980년대부터 중추신경계의 전령물질로서 인식되어 왔다<sup>17)</sup>. NO의 활성은 nitric oxide synthase (NOS) 라는 중요한 합성단백질에 의존한다. NOS는 Ca<sup>++</sup>에 의존적인 neuronal NOS (nNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial NOS (eNOS)와 Ca<sup>++</sup>에 비의존적인 inducible NOS (iNOS)로 구분하는데 이중 염증이거나 외상에 의해서 주로 반응하는 것이 iNOS이다. iNOS 외에도 nNOS는 염증이 발생하면 활성 및 발현이 모두 증가한다.

iNOS는 칼슘 비의존성으로 원래 사이토카인에 의해 자극된 대식세포에서 발견되며, 다른 두

형태의 NOS보다 염증과 더욱 밀접한 관계에 있다. 독성을 나타낼 수 있는 양의 NO를 생산할 수 있는 NOS가 바로 iNOS이다. Adjuvant 유도성 관절염 동물에서 iNOS에 대한 immunoreactivity가 synovial tissue에서 나타난다고 한다<sup>20)</sup>. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine과 N-iminoethyl-L-lysine은 adjuvant 관절염과 관련된 혈장 및 관절액에서 nitrite를 농도의존적으로 억제시킬 수 있었다. iNOS는 또한 central sensitization과 밀접한 관련이 있다. iNOS 선택적 억제제는 발바닥내 Zymosan을 주입하여 발생한 thermal hyperalgesia를 농도의존적으로 억제할 수 있다<sup>21)</sup>. iNOS 선택적 억제제인 aminoguanidine은 thermal hyperalgesia를 차단시킬 수 있다<sup>22)</sup>. 척수에서 iNOS는 정상동물 및 adjuvant 관절염 동물에서 ependymal cell layer와 central canal 주위에 있는 ependymal cell의 process에 분포하고 있다고 보고되었다<sup>23)</sup>. Ependymal cell은 CNS에 있는 glial cell의 일종으로, 면역 및 염증반응에 관여한다. Hyperalgesia를 발생시키는 많은 말초자극들은 사이토카인과 같은 가용성 신호전달물질을 방출하여 척수나 뇌에 종결하고 있는 말초신경을 활성화시킨다. 말초 자극은 척수에서 glial cell들을 활성화시킬 수 있다<sup>24)</sup>. 척수의 glial cell은 사이토카인, NMDA 효현제, NO를 방출시킬 수 있다<sup>22)</sup>. iNOS의 발현은 주로 전사단계에서 조절된다. 그러므로 말초염증이 있으면 이러한 인자들은 말초 뿐만 아니라 CNS에 있는 iNOS의 발현에 영향을 미칠 수 있다. Central canal을 둘러싸고 있는 부위는 serotonin<sup>25)</sup>, SP<sup>26, 27)</sup>, glutamic acid decarboxylase<sup>28)</sup>, vasoactive intestinal polypeptide<sup>29)</sup>, calcitonin gene-related peptide<sup>30)</sup>와 같은 여러 신경화학물질들을 유의한 농도로 함유하고 있는 곳이다. Ependymal cell들은

central canal 근처에서 방출되는 물질에 의해 활성화된 후 iNOS를 상향조절한다.

본 연구는 족과 염좌를 유도한 후 치자 약침을 준 실험군, 치자 약침과 전침 결합치료를 한 실험군, 마취만 처치한 대조군에서 척수의 iNOS 발현양을 분석하였다. 그 결과 정상동물들에 비해 마취만 처치한 관절염 동물의 척수에서의 iNOS가 유의하게 증가되었으며, 치자약침 단독 혹은 치자 약침과 전침 결합치료를 실시한 실험군은 관절염으로 인해 척수에서 증가된 iNOS를 유의성 있게 억제시켰다. 또한 치자약침과 전침을 함께 처치한 실험군이 치자약침만 처치한 실험군에 비해 iNOS가 유의하게 억제하였다. 족과 염좌에서 척수의 iNOS 증가는 염증에 의해 central sensitization 및 hyperalgesia가 발생하였다는 것을 의미하며, 치자약침이나 치자약침, 전침의 결합치료를 시행한 후 염증에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현이 감소된 사실은 염좌 모델에서 치자 약침이 부분적으로 iNOS를 억제함으로써 진통효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 역할을 하는 효소이다<sup>31)</sup>. COX에는 COX-1과 COX-2로 두 가지 효소가 있는데, 이들은 서로 아미노산의 60% 정도가 동일하며, 비슷한 효소작용을 가지고 있다<sup>32)</sup>. COX-1은 house keeping gene으로 COX-1에 의해 생성된 prostanoid는 위점막의 세포 보호, 신장의 혈관 확장 및 thromboxane의 합성에 관여한다<sup>31)</sup>. 반면 COX-2는 immediate early gene 으로 염증 반응, 배란 과정 및 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 대부분의 조직에 본질적으로 존재하는 효소임에 비해, COX-2는 정상상태에서는 잘 검출되지 않지만, 염증 cytokine, mitogen, 성장인자 또는 phorbol ester 같은 중

양 유도 물질에 의해 증가한다<sup>33)</sup>.

정상적인 생리상태에서 COX 단백질의 발현은 COX-1이 필요한 방어 기전을 수행하고 있지만 비정상적인 상황과 같은 상처, 병의 발현, 임신과 같은 상황에서는 COX-2 단백질이 유도되어서 COX-1과는 달리 COX-2의 발현은 제한된 상황에서만 일어나는 현상으로서 대장의 상피조직을 관찰한 결과 비정상적인 세포 조직은 주위의 정상적인 조직과 현격한 대조를 이루고 있어서 대장의 상피 조직에서의 암으로 변환하는 조직을 진단하는데 그 표시로서 사용될 수 있다고 하는데 면역조직화학의 비정상적 발달과 다른 중요 기관의 비정상을 초래하는 중요한 원인이 되어서 이들 두 종류의 COX 단백질의 작용 특이성을 잘 보여주었다. COX 단백질 염색을 통한 대장암 조직 관찰 결과에서도 COX-1의 발현은 거의 발견되지 않은 수준이지만 COX-2의 발현은 2배에서 50배까지의 높은 염색된 세포를 발견할 수 있었다<sup>34)</sup>.

염증반응에 의하여 COX-2가 변화하는 동안에도 척수에서의 COX-1의 발현양은 전혀 변화가 없었다. 또한 COX-2 억제제를 이용한 관절염의 연구를 보면 반드시 일치된 견해는 보이지 않고 있다. 한 연구에서는 COX-2 억제제에 의하여 혈장의 삼출액, PGE2의 생성, granuloma 및 혈관 신생작용이 억제됨으로서 류마티스 관절염에 효과적이었다고 보고하고 있으나 COX-2 억제제가 monoarthritic rat에서 효과가 없었다는 연구보고도 있다<sup>35)</sup>.

여러 자극에 의하여 활성화된 c-Fos 유전자는 전사와 번역과정을 거쳐 c-Fos 단백질이 합성된다. c-Fos 단백질은 다른 형태의 oncogene인 jun 유전자에서 발현된 Jun 단백질과 결합하여 이중결합체를 형성하며 이것은 다시 핵으로 이동하여 DNA의 activator protein one site

(AP-1)에 결합한다. 이러한 결합은 세포에서 다른 유전자의 전사를 조절하여 다양한 세포기능을 조절함으로써 c-Fos 단백질은 일명 전사인자(transcription factor) 또는 제 3의 번역인자로 불리운다<sup>36)</sup>. 중추신경계 뉴론들에서 c-Fos 단백질은 다양한 흥분성 반응에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있는데 간질유발약물, 고농도 칼륨, 흥분성 후시냅스성 전위, 전기자극, 통증 유발 등에 의하여 대뇌 피질, 해마, 척수의 후근뉴론 등에서 c-Fos 단백질이 발현된다<sup>37)</sup>. c-Fos 단백질의 발현은 흥분적 자극 후 20분 이내에 시작되어 24시간 이상 지속됨으로써 myc, jun, kroc 등과 함께 일명 immediate-early gene protein 이라 하고 세포내 대사활동성의 변화를 측정하는 표식자로 널리 이용되고 있다<sup>36)</sup>. 특히 Hunt 등<sup>38)</sup> 처음으로 마취된 흰쥐의 말초부위에 유해성 자극을 가하여 척수에 존재하는 신경 세포에서 c-Fos 단백질을 관찰하였고, 그 뒤 다양한 유해성 자극에 대한 통증 정도를 확인하는데 활용되었으며<sup>39)</sup>, 흰쥐에서 하지의 피하에 formalin 주입시 척수 및 후근 신경절에서 시간경과에 따른 c-Fos 단백질의 발현 양상 및 척수 부위별 분포 양상이 관찰되었다<sup>40)</sup>. c-Fos 단백질이 formalin 주입 후 척수 수준에서 발현하며, 이것이 통증 반응을 반영하는 것으로 알려져 있으나, 그에 대한 역할에 대하여 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 통각에 대한 척수내 신호처리과정에 관여한다고 추정되고 있으며, Fos mRNA antisense oligonucleotide를 척수강 주입한 후 흰쥐 척수 후근 신경 세포들에서 formalin에 의한 preprodynorphin mRNA의 전사를 억제하고 제 2차 통증반응을 억제한다고 보고되고 있다<sup>41)</sup>. 따라서 Jun계 단백질과 함께 c-Fos 단백질이 다양한 통각자극에 의해 발현되며 preprodynorphin, preproenkephalin과 같은 유전자의 전사를

조절함으로써 장시간 동안 척수내 통증신호전달 체계의 기능 변화를 초래한다고 한다.

足少陽經筋과 足太陽經筋을 損傷시켜 유발시킨 足踝捻挫痛症 모델에서 치자약침의 鎮痛效果를 알아보았다. 足踝捻挫痛症 모델은 유도시키는 과정이 족과 관절 부위의 經筋에 損傷을 주는 과정으로 이루어져 있어서 足太陽經筋과 足少陽經筋 등이 損傷되는 모델이다. 만성 통증 모델로서 족과 염좌 모델을 사용한 이유는 經筋의 損傷을 통해서 유발된 만성 통증에 한의학 이론을 적용시켜서 효과가 있는 혈을 선택하여 그 효과를 살펴볼 수 있기 때문이다. 이 모델을 사용하여 대조군을 갖춘 조절된 실험 디자인을 통하여 한의학 이론을 객관화시키는 노력을 하고자 하였다. 十二經筋을 살펴보면 열두 종류의 근육군은 주로 사지부에서 기시하며 軀幹 및 頭部에 분포되며 經筋이 患病하면 주로 痺證과 筋肉의 拘急不收 등 症을 유발시키게 된다<sup>42)</sup>. 그 중에서 본 연구에 사용된 足踝捻挫 모델은 주로 足太陽經筋의 損傷을 통하여 유발 되었는데 足太陽經筋은 足小趾에서 起하여 上向해서 外踝에 結하고 옆으로 빗겨나 상행하여 膝部に 結한다. 그리하여 外踝를 循行해서 足根에 結하고, 踵을 循行하여 위로 膝窩에 結한다. 그 分支는 腓의 外側에 結하고, 膝窩內側으로 上行하여 膝窩의 筋과 并行 上向해서 臀部에 結한다<sup>42,43)</sup>고 하였다. 이러한 經筋은 근육이나 관절의 굴신, 지체의 운동에 대하여 중요한 작용을 한다. 그러므로 경근의 병후는 대개 운동방향으로 표현된다. 이상과 같은 사실을 비추어 보면 본 연구에서 사용된 족과 염좌 모델은 經筋 損傷으로 인한 운동 장애라는 병후가 잘 나타나는 실험모델이라고 사료된다.

본 연구에서는 실험 시 자침 후 手技를 대신하여 電鍼療法과 刺鍼理論중의 하나인 巨刺法을

사용하여 養老를 選穴하여 刺鍼하였다. 電鍼療法<sup>44,45)</sup>은 穴位部에 자침하여 手技法에 의한 침강응의 기계적 자극을 得한 후, 침병에 적당한 전류를 통과시키는 전기적 자극을 결합시킨 치료법으로서, 최초로 1825년 Sarlandiere가 신경계 통질환체 電鍼을 사용하였고, 최근에는 Huang<sup>46)</sup> 등이 각종 질환 치료에 응용하였을 뿐만 아니라 마취분야에 까지 도입하여 자침에 관한 학술적 이론을 발전시키는 데 이바지하였다. 巨刺法은 健側에 자침하는 방법으로 “素問調經論” “素問 繆刺論”에서 언급되기 시작하였으며, 針灸大成에서 “巨刺者經脈, 繆刺者絡脈, 所以別也. 岐伯曰 痛在於左而右脈病者 則巨刺之. 邪客於經 左盛則右病 右盛則左病 亦有移易者 左痛未已 以右脈先病 如此者 必巨刺之 必中其經 非經絡也.” 라고 하여 繆刺法과 비교하여 설명<sup>47)</sup>하였다. 이는 통증이나 표부에 존재하는 질병치료에 있어 환부를 기준으로 인체를 좌우로 나누어 건측에 대하여 자침하는 것으로 임상에서 통증질환에 多用되고 있다. 이 연구에서 養老를 전침자극하였는데 手太陽小腸經의 郄穴인 養老(SI<sub>6</sub>)는 小腸經의 機能衰退를 抑制하는 穴이라는 뜻을 가지고 있으며, 老人의 養生을 돕기 위하여 施灸하는 穴이라고 알려져 있다. 아울러 舒筋, 通絡, 明目하는 혈성이 있어서 腕關節痛, 腕麻痺, 肩關節周圍炎, 眼球充血, 目昏, 視力減少, 落枕 등에 활용되고 있으며, 膀胱經上捻挫에 사용할 수 있는 경혈<sup>42)</sup>로서 이 실험결과 한의학 이론이 잘 부합하는 것으로 사료된다.

이 연구는 만성통증 모델로서 족과 염좌 모델을 사용하여 치자 약침의 진통효과와 항염증효과를 알아보았고, 말초성 염증으로 인해 척수에서 증가된 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 치자 약침은 염좌모델에서 환측 약침 자극은 농도 의존적으

로 진통효과를 발휘하였으며, 건측, 원위혈위 자극보다 환측 근위혈위 자극이 보다 유의한 효과를 나타내었다. 치자약침의 진통효과는 전침과 병용했을 때 더욱 효과적이었다. 아울러 치자약침은 조직손상으로 인해 발생한 부종을 억제하였고, 척수에서 증가한 NO 및 iNOS, COX-2, c-Fos 단백질의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과를 종합하면 치자 약침은 족과 염좌 통증에 진통효과가 있으며, 염좌로 인한 부종에 항염증효과가 있으며 이 기전에 부분적으로 NO와 COX 경로가 관여하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 흰쥐의 족과 염좌 모델에서 치자약침이 통증과 부종에 미치는 효과와 척수에서 통증지표 중 하나인 NO 생성 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현양상에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 염좌로 인해 감소된 딛는 힘에 대하여 치자약침은 유의한 진통효과를 보여주었으며, 이러한 진통효과는 적어도 4시간정도 유지되었고 농도 의존적이었다.
2. 치자약침은 건측 자극에 비하여 환측 자극이 더욱 강력한 진통효과를 나타내었고, 원위 취혈보다 근위 취혈이 더욱 효과가 좋았다.
3. 족과 관절 염좌에서 전침자극과 치자약침을 함께 자극했을 때 보다 강력하고 지속적인 진통효과를 거두었다.
4. 족과 관절 염좌에서 치자약침 약침은 척수에서 증가된 NO 생성 및 iNOS, COX-2, c-Fos 발현을 유의하게 억제하였다.

본 연구의 결과는 만성 통증에 치자약침이 강력한 진통효과와 항염증효과를 나타내며, 약침과 침을 함께 사용하면 그 치료효과가 상승됨을

보여주었다. 그러나 치자약침의 진통기전에 대해서는 NO-COX 계통 외에 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림사. 1997 : 376.
2. 신민교. 도해 향약(생약) 대사전 (식물편). 서울 : 영림사. 1990 : 925.
3. 강병수. 방제의 체계적 구성을 위한 임상배합 본초학. 서울 : 영림사. 1994 : 225-6.
4. 이상인. 본초학. 서울 : 영림사. 1986 : 495-6.
5. 이시진. 본초강목. 북경 : 인민위생출판사. 1982 : 2085-8.
6. 이미순, 한용남, 황금희, 오희경. 치자의 항산화 활성성분에 관한 연구. 생약학회지. 1994 ; 25(3) : 226-32.
7. 김정균, 강영미, 엄광식, 고영민, 김태영. 천연 한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과. 농업생명과학연구. 2003 ; 37(4) : 69-75.
8. 양용태, 정상인, 신승식, 최철순. 치자(梔子) 수용성 추출액의 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대한 항균작용. 대한미생물학회지. 1986 ; 21(1) : 53-62.
9. 박근형, 문제학, 임철근. 치자 열매에서 항미생물 활성을 갖는 3, 4 - Dihydroxybenzoic Acid 의 분리. 한국식품과학회지. 1999 ; 31(5) : 1386-91.
10. Park EH, Joo MH, Kim SH, Lim CJ. Antiangiogenic activity of *Gardenia jasminoides* fruit. *Phytother Res.* 2003 ; 17(8) : 961-2.
11. Koo HJ, Lee S, Shin KH, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Planta Med.* 2004 ; 70(5) : 467-9.
12. Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Med.* 2001 ; 67(9) : 807-10.
13. Yao Q, Zhou G, Zhu Y, Pan Y, Hu J, Xue H, Zhang Q. Screening studies on anti-inflammatory function of traditional Chinese herb *Gardenia jasminoides* Ellis and its possibility in treating soft tissue injuries in animals. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 1991 ; 16(8) : 489-93.
14. 전국한의학대학교 경혈학교실. 침구학(하). 서울 : 집문당. 1988 : 1457.
15. Koo ST, Park YI, Lim KS, Chung K, Chung JM. Acupuncture analgesia in a new rat model of ankle sprain pain. *Pain.* 2002 ; 99(3) : 423-31.
16. Morgan JI, and Curran T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12(9) : 343-9.
17. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature.* 1988 ; 326(6197) : 385-8.
18. Solodkin A, Trauband RJ, Gebhart GF. Unilateral hindpaw inflammation produces a bilateral increase in NADPH-diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neurosci.* 1992 ; 51(3) : 495-9.
19. Traub RJ, Solobkin A, Meller ST, Gebhart GF. Spinal cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide



- synthase immunoreactivity increase following carrageenan- produced hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res.* 1994 ; 668(1-2) : 204-10.
20. Cannor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 1995 ; 273 : 15-24.
  21. Murray CW, Cowan A, Larson AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain.* 1991 ; 44(2) : 179-85.
  22. Meller ST, Dykstra C, Grzynbycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology.* 1994 ; 33(4) : 1471-8.
  23. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res.* 1998 ; 118(4) : 457-65.
  24. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) on lumbar spinal cord increases following sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 1991 ; 565(1) : 1-7.
  25. Lamotte CC, Johns DR, Lanerolle NC de. Immunohistochemical evidences of indolamine neurons in monkey spinal cord. *J Comp Neurol.* 1982 ; 206(4) : 359-70.
  26. Tessler A, Glazer E, Artymyshyn R, Murray M, Goldberg ME. Recovery of substance P in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral denervation. *Brain Res.* 1980 ; 191(2) : 459-70.
  27. Oldfield BJ, Sheppard A, Nilaver G. A study of the substance P innervation of the intermediate zone of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol.* 1985 ; 236(1) : 127-40.
  28. Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.* 1982 ; 238 : 305-28.
  29. LaMotte CC. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *J Comp Neurol.* 1987 ; 258 : 527-41.
  30. Chung K, Lee WT, Carlton SM. The effect of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett.* 1988 ; 90 : 27-32.
  31. Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase : regulation and enzyme expression. *Biochim Biophys Acta.* 1991 ; 1083 : 121-34.
  32. Loll PJ, Gravito RM. The isoforms of cyclooxygenase : structure and function. *Expert Opin Invest Drugs.* 1994 ; 3 : 1171-80.
  33. Vane J. Towards a better aspirin. *Nature.* 1994 ; 367 : 215-6.
  34. Dong YL, Gangula PRR, Fang L, Yallampalli C. Differential expression of cyclooxygenase-1 & -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and

- in myometrial cells. Prostaglandins. 1996 ; 52 : 13-34.
35. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. Cyclooxygenase-2 inhibitor in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. Neuropharmacology. 2001 ; 40(7) : 937-46.
36. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system : involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. Neurosci. 1991 ; 14 : 421-51.
37. Birder LA, Roppolo JR, Iadarole mjDe Groat WC. Electrical stimulation of vescceral afferent pathways in the pelvic nerve increase cFos in the rat lumbosacral spinal cord. Neurosci Lett. 1991 ; 129 : 193-6.
38. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of cFos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature. 1987 ; 328 : 632-4.
39. Abbadie C, Besson JM. cFos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. Neurosci. 1992 ; 48 : 985-93.
40. Gagas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory controls : correlation of nociceptive behaviour and cFos expression. Neurosci. 1991 ; 42 : 617-28.
41. Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hunghe J. cFos antisense oligodexynucleotide increase formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. Neurosci. 1995 ; 65 : 485-92.
42. 전국한외과대학 침구경혈학교실편. 鍼灸學上. 서울 : 集文堂. 1988 : 159-160, 443.
43. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯解; 經筋篇, 서울 : 성보사. 1980.
44. 朱子揚, 黃芸. 實用鍼灸新醫療法大全. 香港 : 得利書局. 1975 : 48, 99, 227-8.
45. 馮天蔭. 電鍼灸治療學. 香港 : 商務印書館. 1976 : 1-4.
46. Huang Guangling. Investigation on the mechanism of acupuncture for treating perforation of peptic ulcer-animal experimentation, Advances in acupuncture and acupuncture anesthesia, tiantan Xili Beijing China, the people's medical publishing house. 1980 : 78.
47. 楊維傑著(대전대학교 韓醫科大學譯). 鍼灸經緯解釋. 서울 : 一中社. 1995.