

# 전침이 carrageenan유발 동통모델의 척수배각내 cyclooxygenase 발현에 미치는 영향

최병태\* · 최영현<sup>1</sup> · 이용태<sup>2</sup>

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실 · 한방바이오연구센터

## Effects of Electroacupuncture on the Expression of Cyclooxygenase in the Spinal Cord of Carrageenan-injected Rat

Byung Tae Choi\*, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Yong Tae Lee<sup>2</sup>

Department of Anatomy, 1: Biochemistry,

2: Physiology · Biomedical Research Center of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

We investigated the effects of electroacupuncture (EA) on the expression of cyclooxygenase in the spinal cord of acute inflammatory pain model. Inflammation was induced by an intraplantar injection of 1% carrageenan into the right hind paw of Sprague-Dawley. Bilateral 2 Hz EA stimulation with 0.5 mA, 1 mA and 3 mA were delivered at those acupoints corresponding to Zusanli and Sanyinjiao in man via the needles in carrageenan-injected rats. Three hours after carrageenan injection, effects of EA on cyclooxygenase (COX) expression were observed in the dorsal horn of the spinal cord using immunohistochemical method. The immunoreaction of COX-1 tended to increase in the superficial laminae and the neck of the dorsal horn as compared with normal. The COX-2 immunoreaction in the carrageenan-injected rat was also significantly increased in the all regions of the dorsal horn as compared with normal one. However, COX-1 immunoreaction in carrageenan-injected rat were decreased in the superficial laminae and neck of the dorsal horn by low intensity of EA stimulation. Except high intensity of EA stimulation in the superficial laminae, COX-2 expression was attenuated in all regions of the dorsal horn by all types of EA treatment. It is concluded that EA treatment may attenuate inflammatory pain in carrageenan-injected rat through modulating expression of COX-2 in the dorsal horn of the spinal cord.

Key words : Electroacupuncture, Carrageenan, Cyclooxygenase, Spinal cord

### 서 론

동통은 생리적, 염증성, 신경성의 3가지 범주로 분류되며 실제적이거나 잠재적인 조직손상과 연관된 불쾌한 감각 또는 정서적으로 상해와 연관된 경험에서 배우는 감각을 말한다<sup>1)</sup>. 전통적인 침과 달리 매개변수 조절이 가능한 전침은 동통제에 탁월한 효과를 나타내며 그 기전연구가 다양하게 이루어지고 있다. 특히 전침 무통각은 4 mg/kg의 모르핀 투여와 유사한 효과를 내는 부작용 없는 진통방법으로 주목받고 있으며<sup>2)</sup>, 중추신경계의 opioid계가 관여한다고 알려져 있다<sup>3,4)</sup>.

Prostaglandin (PG) 중 특히 PGE2는 cyclooxygenase (COX) 대사과정을 거치는 arachidonic acid산물로서 염증성 유해수용기 감각에 관여하는 물질이다<sup>5)</sup>. COX는 상이한 두 유전자에 의해 형성되며 이중 COX-1은 대부분 세포나 조직에서 구조적으로 발현되나 COX-2는 염증성 자극 등에 의해 형성된다<sup>6)</sup>. 비스테로이드성 항염증제 (non-steroidal anti-inflammatory drug)와 특이 COX저해제는 항염증효과와 더불어 무통각 효과를 가지는데 이들 약제는 PGE2합성을 저해하거나 차단시킨다<sup>5,7)</sup>.

최근 국소적 염증에 의해 척수내 COX-2 mRNA 발현이 유도되며 척수내 PGE2합성은 역으로 말초성 부종형성과 통각과민에도 관여한다고 보고하고 있다<sup>8)</sup>. 동통과 관련된 말초성 유해수용기인 유수 기계수용기 Aδ-fiber와 무수 다양상 수용기인 C-fiber가 대부분 척수배각내 층판 I 과 II에, 일부는 층판 V에

\* 교신저자 : 최병태, 부산시 부산진구 진리1로 10 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653

· 접수 : 2005/03/21 · 수정 : 2005/04/18 · 채택 : 2005/05/24

종말가지를 낸다<sup>9)</sup>. 본 연구는 항부종과 부통각에 효과적인 전침이 중추신경계 COX발현 변화를 통해 말초성 부종과 통각과민 저해할 가능성을 검증하고자 carrageenan유발 동통모델을 이용하여 면역조직화학적으로 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

8주된 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 효창사이언스(주)로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 국소적 염증유발을 위해 1% carrageenan (Sigma, USA) 50  $\mu$ l을 우측 족저에 주사한 대조군과 carrageenan 주사 후 전침 자극을 준 전침군, 그리고 동일 양의 saline용액을 주사한 정상군으로 나누어 사용하였으며 각 군당 8마리를 사용하였다.

### 2. 전침자극

Carrageenan주사와 동시에 전침 자극을 시작하였다. 스테인레스 0.25 mm 침을 전침기 (세창메디칼, SM-600)에 연결하여 2 Hz로 삼음교와 족삼리에 해당하는 양측 혈위에 30분간 자극하였으며 세기에 따라 낮은, 중간, 높은 군으로 나누어 각각 0.5 mA, 1 mA, 3 mA로 연속 자극하였다.

### 3. 척수의 조직절편제작

전침자극 후 10% chloral hydrate (350 mg/kg i.p.)로 마취한 후 4% paraformaldehyde로 관류고정 시켰다. 추궁제거를 통해 척수를 분리하여 척수 요천공대의 L4-5에 해당하는 부위를 절취하여 동일 고정액으로 4°C에 12시간 후고정하였다. 30% sucrose에 48시간 둔 후 Tissue-Tek compound에 포매하며 30  $\mu$ m 동결절편을 얻었다. 조직병리학적 관찰을 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

### 4. 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해 free-floating method를 사용하였다. 동결절편을 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척한 후 1% goat normal serum과 0.3% triton X-100의 PBS에 30분간 실온에서 처리하였으며 COX-1 및 COX-2 (SantaCruz, USA)를 1  $\mu$ g/ml로 희석하여 4°C 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab., USA)를 실온에서 30분 동안 반응시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab., USA)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab., USA)로 실온에서 5분간 발색시켰다. 비 특이적 반응은 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색하여 비교하였다.

### 5. Integrated optical density (IOD) 측정 및 통계처리

척수내 COX발현을 정량하기 위해 척수배각을 천층판(SDA, 층판 I-II), 고유핵(NP, 층판 III-IV), 경부(NECK, 층판 V-VI)으로 나누어 100배 배율에서 디지털 카메라 (AxioCam,

Carl Zeiss, Jena, Germany)로 촬영하였다. 각 부위의 IOD는 Visus Image Analysis software (Foresthill Products Ista-Video Test, Foresthill, CA, USA)를 이용하여 1002 pixel 당 평균 IOD를 측정하였다. 통계처리는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 6.0 (SPSS, Chicago, IL)을 사용하여 Student's t-test로 유의차를 검사하였다.

## 결 과

척수에 대한 조직병리학적 관찰에서 정상군, 대조군 및 전침 자극군 모두에서 유사한 구조를 보여 군별 차이를 보이지 않았다. Carrageenan에 의해 형성되는 COX 발현은 COX-1에 비해 COX-2 발현이 더욱 현저하였다. 척수배각을 천층판, 고유핵 및 경부로 나누어 COX-1 면역반응에 대한 IOD를 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Carrageenan을 주사한 대조군의 COX-1 평균 IOD는 정상군에 비해 척수배각의 천층판과 경부에서 현저히 증가하였다. 전침자극을 주었을 때 대조군에 비해 천층판과 경부에서 낮은 세기의 자극에 의해 유의성 있는 감소를 보였다. COX-2는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군의 평균 IOD는 정상군에 비해 척수배각 모든 부위에서 현저히 증가하였다.

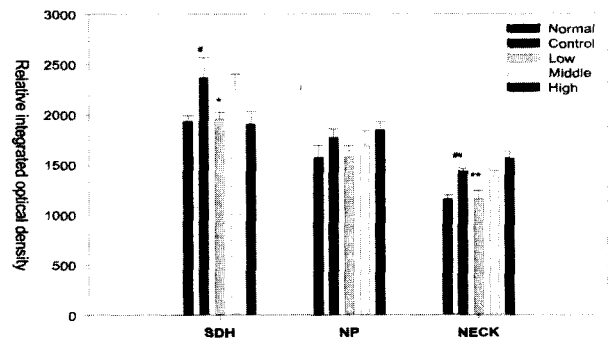


Fig. 1. Effect of EA at different intensities on the mean IOD of COX-1 expression in the dorsal horn of the L4-5 segment in rat. Each bar indicates the means $\pm$ S.D. (n=8). Note a marked decrease of the mean IOD in the SDH and NECK of dorsal horn by low intensity of EA stimulation. The dorsal horn of the spinal cord was divided into 3 regions: the superficial laminae (SDH, laminae I and II), the nucleus proprius (NP, laminae III and IV) and the neck of the dorsal horn (NECK, laminae V and VI). # P<0.05 and ## P<0.005 as compared with the normal group. \* P<0.05 and \*\* P<0.005 as compared with the control group.

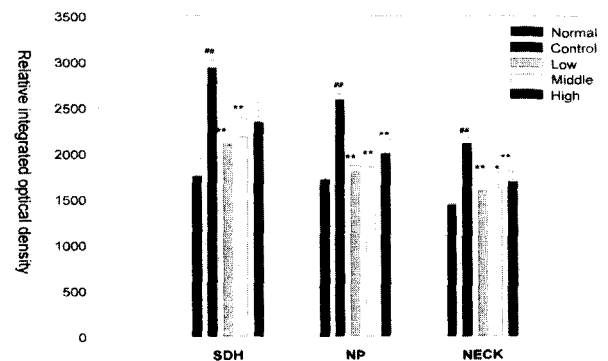


Fig. 2. Effect of EA at different intensities on the mean IOD of COX-2 expression in the dorsal horn of the L4-5 segment in rat. Each bar indicates the means $\pm$ S.D. (n=8). Note a marked decrease of the mean IOD in all regions of the dorsal horn except SDH with high intensity by all types of EA stimulation. Abbreviations listed in Fig. 1. ## P<0.005 as compared with the normal group. \* P<0.05 and \*\* P<0.005 as compared with the control group.

대조군의 증가된 반응은 높은 세기자극에 의한 천층판을 제외하고 모든 척수배각부위에서 모든 종류의 전침 자극에 의해 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 3). 전침자극에 의한 COX 변화는 COX-1에 비해 COX-2가 현저한 변화를 보여 전침의 무통각 기전에 COX-2발현 저해가 수반됨을 알 수 있다.

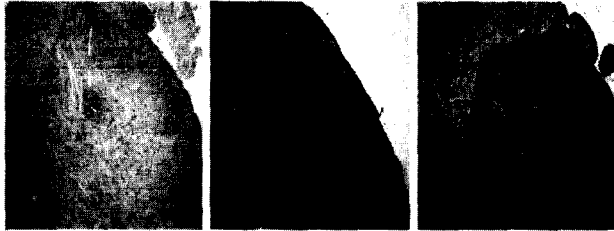


Fig. 3. Photomicrographs of 30- $\mu$ m-thick sections of the dorsal horn of lumbar L4-5 segments showing COX-2 immunoreaction. A, normal group; B, carrageenan-injected control group; C, low intensity EA-stimulated group after carrageenan-injection. Note significant reduction of immunoreaction in the dorsal horn of EA-stimulated group as compared with control group. Bar, 200  $\mu$ m.

## 고찰

전침의 중추신경계를 통한 무통각 효과는 잘 알려져 있으며 상이한 자극에 의해 상이한 opioid계 분비를 가져 온다<sup>4)</sup>. 저주파 전침은 뇌와 척수의 enkephalin과  $\beta$ -endorphin 분비하며  $\mu$ -와  $\delta$ -opioid receptor가 관계하고 고주파 전침은 척수에서 dynorphin을 분비하며 척수배각의  $\kappa$ -opioid receptor가 관여한다<sup>10,11)</sup>.

Carrageenan유발 동통 모델은 통각과민을 동반하며 이는 PGE2생성과 밀접한 연관을 가진다<sup>12)</sup>. Carrageenan을 족부에 주사했을 때 조직내 COX-2와 PGE2의 증가로 이어지며 이것이 말초성 통각과민을 지속적으로 나타낸다<sup>13,14)</sup>. 즉 PGE2는 유해수용기이며 대부분이 척수 배각 특히 SDH에 종말가지를 내는 A $\delta$ -와 C-fiber 신경세포막에 작용하여 반응을 증대시킨다<sup>9,15)</sup>.

국소적 염증반응에 의해 증가되는 PGE2는 중추신경계의 COX를 매개로 한 신경생리학적 요인을 포함한다<sup>16)</sup>. Carrageenan처리에 의해 요수에서 현저한 COX-1 및 COX-2발현을 볼 수 있다<sup>13,17)</sup>. 또한 특정 단일 항체처리가 carrageenan유발 부종과 통각과민을 막을 수 있는데<sup>18)</sup>, NS-398같은 COX-2저해제는 유해수용기의 PG합성을 저해 한다<sup>19)</sup>.

이로 보아 전침 자극에 의해 형성되는 무통각도 말초조직이 아닌 중추신경계내 COX계 효소 발현과 PGE2생성 변화에 의해 설명 할 수 있을 것이다. 본 실험실의 선행연구를 보면 carrageenan을 주사한 동통모델에서 전침이 항부종 효과와 함께 물리적, 열적 자극에 대한 통각과민을 완화하는 효과를 보여 주었다. 또한 이들 모델의 말초성 염증조직과 척수 두 곳 모두에서 carrageenan에 의해 현저히 증가된 COX발현과 PGE2합성은 전침 자극에 의해 감소하였다.

본 실험의 COX계 효소에 대한 면역조직화학적 결과도 유사하게 carrageenan에 의한 COX계 효소의 현저한 증가를 보여 주었다. COX-1보다 COX-2의 변화가 현저하여 척수배각 모든 부위에서 증가하였다. 전침 자극의 효과도 COX-1보다 COX-2의 변화가 현저하여 높은 강도에 의한 SDH 부위의 변화를 제외하고 모

든 부위에서 유의성 있는 COX-2감소를 보여 주었다. 이로 보아 척수내 COX-2발현이 전침 무통각 기능과 연관성이 있음을 알 수 있다. 최근 중추신경계를 매개로 한 PG이 열적, 물리적 통각과민 모두에 중요하다고 보고 있다<sup>17,20)</sup>. 기능적으로 PGE2는 척수의 synaptosomes부터 glutamate와 aspartate분비조절과 일차 구심성신경원의 substance P와 calcitonin gene-related protein분비를 조절함으로<sup>21,22)</sup> NMDA receptor 매커니즘과의 연관성을 가지고 있다<sup>23)</sup>. 열적 자극에 의해 척수에서 분비된 PGE2는 흥분성 amino acid 분비를 증가시킨다<sup>24)</sup>.

말초성 염증에 따라 척수내 COX-2발현이 증가하므로 염증성 통각과민을 막기 위해서는 COX-2저해제가 척수부위에 직접적으로 작용해야 한다<sup>25)</sup>. 이로 보아 전침자극이 중추신경계를 통해 말초적 부종과 통각과민에 영향을 줄 수 있다. 전침자극은 중추신경계에서 carrageenan에 의해 형성되는 COX-2발현과 PGE2합성을 조절함으로써 궁극적으로 말초성 유해수용에도 영향을 미쳐 통각과민을 완화시키는 것이다. 따라서 전침은 중추신경계의 COX-2발현과 PGE2생성 저해를 통해 통각과민을 완화시키는 유용한 처치수단임을 알 수 있다.

## 결론

Carrageenan 동통모델에서 전침의 항부종, 통각과민 완화효과와 척수배각내 COX발현에 대한 관계를 면역조직화학적 방법으로 살펴보았다. COX-1은 carrageenan에 의해 천층판과 경부에서 증가하고 낮은 강도의 전침자극에 의해 감소하였다. COX-2는 carrageenan주사에 의해 척수배각 모든 부위에서 증가하며 천층판의 높은 강도에 의한 전침자극을 제외하고 모든 부위에서 모든 종류의 전침자극에 의해 유의성 있는 감소를 보였다. 이로 보아 전침은 척수배각내 COX 특히 COX-2발현 억제를 통해 통각과민 완화 효과를 나타냄을 알 수 있다.

## 참고문헌

- Riedel, W., Neeck, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z. Rheumatol.* 60, 404-415, 2001.
- Guo, X.Q., Liu, N.A., Li, P. Inhibitory effect of a microinjection of morphine into the ventral medulla on ventricular extrasystoles induced by hypothalamic stimulation in the rabbit. *Sheng Li Xue Bao* 39, 132-138, 1987.
- Zhang, M., Sun, Q., Wan, Y., Yao, L., Yu, Y., Han, J.S. OFQ reverses the  $\kappa$  opioidreceptor-mediated depression of calcium current in rat dorsal root ganglion neurons. *NeuroReport* 9, 2095-2098, 1998.
- Ceccherelli, F., Gagliardi, G., Visentin, R., Sandona, F., Casale, R., Giron, G. The effects of parachlorophenylalanine and naloxone on acupuncture and electroacupuncture modulation of capsaicin-induced neurogenic edema in the rat hind paw, A controlled blind

- study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17, 655-662, 1999.
5. Sinatra, R. Role of COX-2 inhibitors in the evolution of acute pain management. *J. Pain Symp. Manag.* 24, S18-S27, 2002.
  6. Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J., O'Neill, G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 111, 445-454, 1996.
  7. Katz, W.A. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors in the management of acute and perioperative pain. *Cleveland Clin. J. Med.* 69, S165-S175, 2002.
  8. Daher, J.B., Tonussi, C.R. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. *Brain Res.* 962, 207-212, 2003.
  9. Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1-164, 1999.
  10. Chen, X.H., Han, J.S. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: another cross-tolerance study. *Behav. Brain Res.* 47, 143-149, 1992.
  11. Huang, C., Wang, Y., Chang, J.K., Han, J.S. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci. Lett.* 294, 159-162, 2000.
  12. Nakayama, Y., Omote, K., Namiki, A. Role of prostaglandin receptor EP1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. *Anesthesiology* 97, 1254-1262, 2002.
  13. Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K., Isakson, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1069-1075, 1997.
  14. Ebersberger, A., Grubb, B.D., Willingale, H.L., Gardiner, N.J., Nebe, J., Schaible, H.G. The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience*, 93, 775-781, 1999.
  15. Sann, H., Pierau, F.K. Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Z. Rheumatol.* 57, 8-13, 1998.
  16. Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Pro. Nat. Aca. Sci. USA.* 95, 13313-13318, 1998.
  17. Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chan, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Brit. J. Pharmacol.* 128, 853-859, 1999.
  18. Portanova, J.P., Zhang, Y., Anderson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L., Seibert, K., Gregory, S.A., Isakson, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 883-891, 1996.
  19. Suzuki, M., Hayash, I., Nara, Y., Kumaga, Y., Okamoto, H., Hoka, S., Majima, M. Participation of cyclooxygenases in cutaneous thermal nociception under non-inflamed and inflamed conditions. *Inflamm. Res.* 50, 283-287, 2001.
  20. Ito, S., Okuda-Ashitaka, E., Minami, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci. Res.* 41, 299-332, 2001.
  21. Nicol, G.D., Klingberg, D.K., Vasko, M.R. Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J. Neurosci.* 112, 1917-1927, 1992.
  22. Vasko, M.R., Campbell, W.B., Waite, K.J. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 14, 4987-4997, 1994.
  23. Ferreira, S.H., Lorenzetti, B. B. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm. Res.* 45, 499-502, 1996.
  24. Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 271, 293-299, 1994.
  25. Goppelt-Struebe, M., Beiche, F. Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Advan. Exp. Med. Biol.* 433, 213-216, 1997.