

원저

흰쥐의 neuronal NOS 신경세포의 activity에 대한 전침자극 효과

김후동* · 남상수** · 김창환*

*경희대학교 한의과대학 침구학교실

**경희대학교 강남경희한방병원 침구과

Abstract

Effect of Electroacupuncture Stimulation on Activity of Neuronal NOS in Rats

Kim Hoo-dong*, Nam Sang-soo** and Kim Chang-hwan*

Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical Hospital, Kyung Hee University
Department of Acupuncture & Moxibustion, Kangnam Kyung-Hee Korean Hospital, Kyung-Hee University

Objectives : The aim of this study was to investigate the effect of various electroacupuncture stimulation on neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in cerebral cortex, brain stem, cerebellum of spontaneously hypertensive rats.

Methods : We evaluated the changes of nNOS-positive neurons using a immunohistochemical method. The staining intensity of nNOS positive neurons was assessed in a quantitative fashion using a microdensitometrical method based on optical density by means of an image analyzer.

Results : The average optical density of nNOS-positive neurons of 100 Hz (bipolar square wave 0.2 ms duration and 100 Hz frequency) electroacupuncture treatment group significantly decreased in most cortical areas comparison between the manual acupuncture and 2 Hz (bipolar square wave 0.2 ms duration and 2 Hz frequency) electroacupuncture groups.

In the brain stem, the optical density of nNOS-positive neuron at superficial gray layer of the superior colliculus area, dorsolateral periaqueductal gray area and paralemniscal nucleus were same as cerebral cortex.

Conclusion : We conclude that the morphological evidence for nNOS-positive neurons may be have regional change in cerebral cortex brain stem and cerebellum according to various electroacupuncture stimulations.

· 접수 : 2006년 9월 6일 · 수정 : 2006년 9월 8일 · 채택 : 2006년 9월 8일
· 교신저자 : 김창환, 서울시 동대문구 회기동 경희의료원 한방병원 침구과
Tel. 02-958-9202 E-mail : Kcuacu@Khmc.or.kr

Key words : Electroacupuncture stimulations, neuronal nitric oxide synthase(nNOS), Cerebral cortex, Brain stem, Cerebellum

I. 서 론

韓醫學에서 經穴은 經絡을 通하여 體內 臟腑 機能의 外部 發現과 外部 刺戟의 體內 傳達 및 이를 통한 臟腑間의 機能的 相互制約, 相互協助하는 體系로, 經穴에의 鍼刺戟은 全身 臟腑의 病證을 治療하는 效能을 가지고 있다¹⁾. 美國 및 西歐의 鍼療法에 대한 既存의 研究는 主로 鍼刺戟의 疼痛 抑制 機轉을 中心으로 이루어져 鍼療法이 가지고 있는 全身의 臟腑 機能의 調節 機轉에 대한 研究가 不足했었으나 양전자방출단층촬영기(positron emission tomography, PET), 기능적 자기공명영상(functional magnetic resonance imaging, fMRI)을 비롯한 映像技法을 利用하여 鍼刺戟에 對한 視覺 및 運動領域에의 生理 變化를 確認함으로써 鍼療法이 腦의 統制過程을 通해서 效果를 發顯한다는 假說을 提示하기에 이르렀다²⁻⁵⁾. 鍼刺戟이 中樞神經系에 미치는 影響에 관한 研究는 神經 傳達 物質 中 細胞 사이의 作用을 媒介하는 메신저 물질로 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO)의 活性 變化에 대한 研究와 기타 神經傳達物質과 鍼療法과의 關係에 관한 研究가 있다⁶⁻¹⁴⁾.

중추신경계에서 NO는 synaptic plasticity에 관여하거나 long-term potentiation이나 depression 등의 기억과 연관된 신경생리화학적 현상에 관여하며 국소적인 뇌 혈류량의 조절 및 주위의 synapse들로부터 neurotransmitter의 분비를 촉진하는 역할 등을 수행하지만 뇌의 저산소증, 허혈증이나 뇌졸중 등의 질병상태에서는 glutamate의 농도가 증가되면 세포 내로 칼슘이온이 유입되어 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 유발하기도 한다^{9,15-16)}.

이와 같은 NO의 뇌세포 보호효과와 뇌세포 손상 효과에 대한 작용기전을 이해함으로써 뇌질환에서 뇌세포 손상을 완화할 수 있는 새로운 치료법의 개발이 가능하리라 기대되고 있다.

이에 저자는 電鍼療法의 效果와 腦內의 神經傳達物質인 neuronal nitric oxide synthase(nNOS)와의

相關關係를 糾明하여 鍼療法과 腦와의 聯關性을 把握하기 위하여 흰쥐에게 鍼 및 2Hz, 100Hz 電鍼刺戟을 시행한 후 흰쥐의 대뇌겉질, 뇌줄기 및 소뇌 영역에서 신경전달물질인 NO를 합성하는 효소 중 nNOS를 면역조직화학적 방법으로 염색한 후 microdensitometry를 이용하여 nNOS의 염색성 변화를 측정하여¹⁷⁾ 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

2주간 실험 환경에 적응시킨 체중 300g±30g, 11주 ± 1주령의 白鼠를 사육장(실내온도 24—26℃, 습도 30-50%, 명암주기 12:12hr)내에서 물과 고형사료(pellet, 삼양유지사료, 서울)를 충분히 공급하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 각 군당 13마리씩 배당하였다.

2) 재료

침은 길이 0.8mm, 직경 0.15mm의 stainless steel (정화침구사, 한국)호침을 사용하였고, 전침기는 일본 Ito사 PG-7형을 사용하였다.

2. 방법

1) 혈위의 선정

實驗動物의 체표 상에 고¹⁸⁾의 방법에 따라 人體의 足三里(ST36)에 相應하는 部位를 骨度 分寸法에 따라 取穴하였다.

2) 실험군 설정

① 침군(Acupuncture) : 족삼리(ST36)에 침자극만

준 군

- ② 2Hz 전침군 : 족삼리(ST36)에 2 Hz로 근육수축이 현저히 보이는 정도로 전침자극을 준 군
- ③ 100Hz 전침군 : 족삼리(ST36)에 100 Hz로 근육수축이 보이는 정도로 전침자극을 준 군

3) 침 및 전침자극

침 및 전침자극은 주 3회 오전 10-11시에 10분씩 총 10회 자극하였다. 전침자극은 연속파, 직각파, 0.2 ms duration으로 시행하였다.

3. 조직처리

실험동물은 pentobarbital sodium(60mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 원심실을 통하여 0.05M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde용액(4%)을 10분간 관류시켰다. 이때 관류속도는 50~60 ml/min이 되도록 하였다. 관류고정 후 각각 대뇌겉질, 뇌줄기 및 소뇌영역을 적출하여 4~6mm두께로 관상절개하여 동일한 고정액에 담가서 4°C에서 16시간 후 고정된 후 0.1 M PBS에 탄 20% sucrose 용액에서 2~5일간 보관하였다.

뇌조직의 절단은 Cryocut(Leica, Germany)을 이용하여 40 μ m 두께의 연속횡단절편을 제작하였고, 다른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하여 염색을 시행하였다.

조직절편은 내재성 페록시다제(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H₂O₂에서 15분간 반응시킨 다음 5분씩 3회 PBS로 세척한 후 rabbit anti-nNOS를 1:4,000으로 희석한 항체를 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 및 0.3% Triton X-100이 들어있는 1차 항체용액에 넣고 4도에서 overnight하였다. 1차 항체용액에서의 반응이 끝나면 조직을 PBS로 5분씩 3번 씻은 후, 2차 항체용액(Vectastain-Elite kit의 biotinylated anti-IgG를 1:200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켜 항체 용액에서 반응이 끝난 후 PBS로 5분씩 3차례 씻은 후 avidin-biotin-

peroxidase complex 용액(Vectastain-Elite kit의 A 용액 1:100, B 용액 1:100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간동안 실온에서 반응시켰으며 발색제로는 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma)를 0.05 M Tris 완충액에 0.02%, H₂O₂는 0.003으로 사용하였다. 발색반응은 상온에서 3-5분간 시켰으며, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 histomount로 봉입하였다.

4. 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 7.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차(Mean±standard error)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Duncan test 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 대뇌겉질 영역에서의 nNOS 염색성의 변화

대뇌겉질 영역에서의 nNOS 염색성은 침군과 2 Hz군에 비해서 100Hz로 자극을 준 실험군에서 일차 운동겉질(primary motor cortex, M1.), 시각겉질(visual cortex, V1.), 후각뇌주위겉질(perhinal cortex, PRh.) 뇌섬겉질(insular cortex, Ins.)의 부위에서 유의성 있는 염색성의 감소(p<0.05)를 나타내었고 침군과 2Hz군 간에는 일차운동겉질(primary motor cortex, M1.)에서 유의성있는 염색성의 차이(p<0.05)가 관찰되었다. 띠겉질(cingulate cortex, Cg.)에서는 2Hz 군에 비해서 침군과 100Hz군에서 유의성 있는 염색성의 감소를 나타내었고 두 군간의 차이는 없었다. 일차몸통감각겉질(primary somatosensory cortex, S1.)과 청각겉질(auditory cortex, Au.)에서는 세군간에 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.(Table 1).

Table 1. Staining Intensity of nNOS Positive Neurons in the Cerebral Cortex of rats

	Acup	2Hz EA	100Hz EA
M1	111.0±3.0a	128.8±2.5b	87.7±1.73c
S1	115.4±3.7a	116.2±3.6a	118±3.5a
Vi	127.6±1.96a	122±2.0a	111±3.8b
Au	123±3.0a	124±3.1a	114±2.6a
Cg	95±4.4a	120±3.5b	83±5.3a
PRh	105±3.0a	115.3±3.2a	94±6.8b
Ins	112±4.7a	107±5.1a	92±3.4b

Data are mean ± SEM of average optical density. The means with same letter is not significantly different (Duncan's multiple range test, $\alpha=0.05$) M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; Vi, visual cortex; Au, auditory cortex; Cg, cingulate cortex; PRh, perirhinal cortex; Ins, insular cortex.

Table 2. Staining Intensity of nNOS Neurons in the Brain Stem and Cerebellum of rats

	Acup	2Hz EA	100Hz EA
SuG	88.4±3.04a	90.9±1.42a	75.4±2.69b
DLPAG	85.0±2.3a	95.2±2.7b	61±2.3c
PPTg	55.9±2.76a	54.5±2.53a	65.9±2.08b
Pr	91.6±2.76a	92.4±2.03a	87.1±2.38a
Gi	86.1±2.2a	75.1±3.14a	82.2±4.9a
PL	130.1±2.0a	170.4±2.03b	134.5±2.5a
CBILL	98.7±0.27a	80.7±1.48b	62.3±0.86c

Data are mean ± SEM of average optical density. The means with same letter is not significantly different (Duncan's multiple range test, $\alpha=0.05$) SuG, superficial gray layer of the superior colliculus; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; PPTg, pedunculo-pontine tegmental nucleus; Pr, prepositus nucleus; Gi, gigantocellular reticular nucleus; PL, paralemniscal nucleus; CBLL, granular layer of cerebellum.

2. 뇌줄기 영역에서의 nNOS 염색성의 변화

뇌줄기 영역에서의 nNOS 염색성은 침군 및 2 Hz에 비해서 100 Hz로 자극을 준 실험군에서 위 둔 덕층(superficial gray layer of the superior colliculus, SuG), 뒤가쪽 수도관주위 회색질(dorsolateral periaqueductal gray), paralemniscal nucleus에서 유의성 있는 감소를 보였다. paralemniscal nucleus에서는 2Hz 실험군에 비하여 침군과 100Hz 자극군의 염색성이 유의성 있게 감소하였으며 prepositus nucleus, gigantocellular reticular nucleus에서는 세군간에 유의한 차이가 없었다. 대뇌 피질과 비교하여 뇌줄기와 소뇌영역에서

는 전반적으로 염색성이 떨어지는 결과가 나타났다 (Table 2).

3. 소뇌 영역에서의 nNOS 염색성의 변화

세군간의 유의성 있는 염색성의 차이가 관찰되었고 100Hz 실험군에서 염색성이 가장 떨어지는 결과가 나타났다(Table 2).

IV. 고 찰

韓醫學에서 經穴은 經絡을 통하여 體內 臟腑 機能의 外部 發顯과 外部 刺戟의 體內 傳達 및 이를 통한 臟腑間的 機能의 相互 制約, 相互 協助하는 體系로 經穴에의 鍼刺戟은 全身 臟腑의 病證을 治療하는 效能을 가지고 있다¹⁾. 鍼은 전신적인 장부기능의 조절 및 장부기능 부조화에 대한 치료에 있으나 미국 및 서구에서는 침자극의 동통억제 기전에 대한 연구를 중심으로 시행되고 있다¹⁹⁾.

電鍼療法은 1800年代와 1900年代 初 Louis Berlioz, Sarlandiere, Goulden 등에 의해 발표됨으로써 電鍼治療의 기초를 이루었다²⁰⁾. 電鍼療法은 수술 후, 분만시, 급만성 통증에 疼痛 緩和를 위해 應用되고 있으며 이외에도 鍼術麻醉 등에도 이용되고 있다. 침의 진통기전에 관한 초기의 신경학적 연구를 통하여 β -endorphin이 침진통기전에 영향을 미칠 수 있음²¹⁾이 보고된 이래로 Takeshige²²⁻²³⁾ 등의 연구를 통하여 침자극의 구심성경로의 최종 도달부인 내측 궁상핵과 하행성 동통억제 체계와 관련된 원심성 경로의 시작부인 후궁상핵 사이의 도파민 신경원과 β -endorphin이 작용되어 침진통기전이 이루어지는 것으로 보고 되고 있으나, 이러한 침진통에 대한 연구는 침요법이 가지고 있는 장부조절 기능을 해석하는 데에는 부족한 점이 있다.

經絡에 관한 研究는 西洋醫學에서 많은 疾患이 腦에 의해 統制를 받는다고 알려지고 PET, functional MRI을 비롯한 映像技法을 이용하여 대뇌결질의 변화를 확인함으로써 뇌의 統制 過程을 통해서 效果를 發揮한다는 假說을 提示하기에 이르렀다²⁻⁵⁾. 이러한 연구는 침요법의 효과를 나타내는 기전을 설명함에 있어 중간단계로 뇌의 역할을 규명하여 침요법이 뇌의 특정기능을 활성화시키고 이에 의해서 해당장기에 영향을 미쳐 효과를 나타내는 기전을 설명하는 것으로 평가할 수 있다.

鍼刺戟이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 신경전달 물질과 관련지어서도 진행되고 있다^{6-14,19)}. 손²⁾ 등은 鍼刺戟을 가한 실험군의 대뇌 활성도를 컴퓨터 영상분석기를 사용하여 동위원소 standard와 비교 분석한 결과 실험군 뇌세포의 여러 구역에서 활성이 증가된 것을 관찰하였고, 특히 진통효과에 있어서 鍼刺戟의 전달 통로가 된다고 추측하고 있는 arcuate nucleus와 median eminence 부위에서 유의한 optical density의 차이를 관찰하였다. 김¹⁹⁾ 등은 電鍼刺戟이 대뇌 피질의 신경전달물질에 미치는 영향에 대해 電鍼刺戟 후 nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate-diaphorase(NADPH-d) 신경세포와 neuropeptide Y(NPY) 신경세포의 염색성을 관찰한 결과, Nitric oxide synthase(NOS)와 NPY가 電鍼刺戟 부위에 따라 각각 다른 신경세포의 변화를 보여, 신경전달물질에 따라서 電鍼刺戟에 의한 영향을 받는 기전이 다를 것이라는 결론을 지으면서 電鍼療法이 중추신경계의 수많은 peptide system를 활성화시킨다는 가설을 제시하였다. 또한 김²⁴⁾ 등은 耳鍼刺戟의 신경전달물질에 대한 영향을 연구, 특히 음식섭취와 관련된 인자인 cholestykinin(CCK)의 변화를 관찰하였는데 耳鍼刺戟 후 대뇌결질 대부분의 영역에서 유의한 증가를 나타내어 CCK가 耳鍼刺戟에 의해 신경세포의 변화를 가져올 수 있으며, 신경전달물질이 鍼刺戟에 의해서 활성화될 수 있다는 가능성을 보여주었다.

Nitric oxide(NO)는 작고 비교적 불안정한 두 개의 원자로 이루어진 물질로 사람을 포함한 고등 동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 생성된다. NO는 L-arginine이 NOS에 의해 L-citrulline으로 변환되는 과정에 의해 생성된다²⁵⁻²⁶⁾. NO는 지용성의 무기질이므로 세포막을 자유롭게 통과하여 쉽게 세포주위로 확산될 수 있으며 인체내 여러 정상 생리반응의 신호전달 물질로 작용한다²⁶⁾. NO는 다른 신호 전달 물질과는 달리 생체내에 저장되지 않으며 특이한 운반체나 채널이 필요하지 않고 구조 또한 간단하며 지용성이고 전기적으로도 중성이기 때문에 주위세포로 쉽게 확산되어 작용할 수 있다. NO의 작용은 산화 환원 상태에 따라서 달라지는데 iNOS에 의해 지속적으로 생성된 많은 양의 NO는 주위의 산소 유리 라디칼과 반응하여 nitrogen dioxide나 peroxyntirite (ONOO-)라는 강력한 산화력을 갖는 물질을 형성하여 세포막의 지질 성분을 과산화시키거나 세포내 단백질의 구조와 기능을 변화시켜서 세포손상을 유발한다²⁷⁾.

현재까지 3개의 NOS 유전자가 발견되었는데, 쥐의 소뇌에서 처음 확인된 Type I NOS는 neuronal NOS (nNOS)로 명명되었고, 대식세포에서 처음 확인된 Type II NOS는 immunologic NOS (iNOS)로 명명되었으며, Type III NOS는 endothelial NOS (eNOS)로 명명되었다. 또한 이들 효소들은 활성화의 기전에 따라서 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)로 구분된다^{9,28-29)}.

중추신경계에서 NO는 신경계에서 synaptic plasticity에 관여하거나 long-term potentiation이나 depression

등의 기억과 연관된 신경생리학적인 현상에 관여하며 국소적인 뇌혈류량의 조절 및 주위의 synapse들로부터 neurotransmitter의 분비를 촉진하는 역할 등을 수행한다³⁰⁾. 중추신경계의 nNOS는 특정 신경세포에 항상 존재하여 신경세포가 자극되어 세포내의 칼슘 이온이 증가하게 되면 효소가 활성화되어서 소량의 NO를 합성하며, 이렇게 합성된 NO는 주위 조직에 확산되어 신경전달 물질로의 역할을 수행하지만 뇌의 저산소증, 허혈증이나 뇌졸중 등의 질병상태에서 glutamate의 농도가 증가되면 세포내로 칼슘 이온이 유입되어 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 유발하기도 한다^{27,31)}. 신경독성물질인 kainic acid에 의하여 흰쥐의 대뇌 피질에서 nNOS 신경세포가 새로 유도되는 등 nNOS 신경세포는 외부 자극에 대하여 적극적으로 반응하는 신경전달 물질이다³²⁾.

nNOS를 갖고 있는 신경세포를 면역 조직학적으로 관찰하는 방법으로는 nNOS 면역조직화학을 사용한다^{8,34-36)}. 본 실험에서는 nNOS의 염색성을 영상 분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다.

대뇌결질 영역에서의 nNOS 염색성은 침군과 2 Hz군에 비해서 100 Hz로 자극을 준 실험군에서 일차운동결질(primary motor cortex, M1.), 시각결질(visual cortex, V1.), 후각뇌주위결질(perhinal cortex, PRh.) 뇌섬결질(insular cortex, Ins.)의 부위에서 유의성 있는 염색성의 감소 ($p < 0.05$)를 나타내었고 침군과 2Hz군 간에는 일차운동결질(primary motor cortex, M1.)에서 유의성 있는 염색성의 차이가 관찰되었다. 띠결질(cingulate cortex, Cg.)에서는 2Hz 군에 비해서 침군과 100Hz군에서 유의성 있는 염색성의 감소를 나타내었고 두 군간의 차이는 없었다. 일차몸통감각결질(primary somatosensory cortex, S1.)과 청각결질(auditory cortex, Au.)에서는 세 군간에 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

뇌줄기 영역에서의 nNOS 염색성은 침군 및 2 Hz에 비해서 100Hz로 자극을 준 실험군에서 위 둔덕층(superficial gray layer of the superior colliculus, SuG.), 뒤가쪽 수도관주위 회색질(dorsolateral periaqueductal gray), paralemniscal nucleus에서 유의성 있는 감소를 보였다. paralemniscal nucleus에서는 2Hz 실험군에 비하여 침군과 100Hz 자극군의 염색성이 유의성있게 감소하였으며 prepositus nucleus, gigantocellular reticular nucleus 에서는 세 군간에 유의한 차이가 없었고 대뇌 결질의 염색성 보다는 전반적으로 감소

되어 있는 결과로 나타났다.

소뇌 영역에서의 nNOS 염색성은 세 군간의 유의성 있는 염색성의 차이가 관찰되었고 100Hz 실험군에서 염색성이 가장 떨어지는 결과가 나타났으며 2Hz 군과 침군간에도 유의성 있는 차이가 관찰되었으며 대뇌결질의 염색성보다는 전반적으로 감소되어 있는 결과로 나타났다.

V. 결 론

침 및 2Hz, 100Hz 전침자극이 뇌의 NO에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 일정한 방법으로 자극 후 흰쥐의 대뇌결질, 뇌줄기 및 소뇌 영역에서의 염색성을 nNOS 면역조직화학적 방법으로 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대뇌결질 중 일차운동결질, 시각결질, 후각뇌주위결질, 뇌섬결질의 영역에서 nNOS의 염색성은 100Hz 군이 침자극군과 2Hz의 자극군보다 유의한 감소를 보였다.
2. 뇌줄기 영역 중 위 둔덕층, 뒤가쪽 수도관주위 회색질 영역에서 nNOS 염색성은 100Hz 군이 침자극군과 2Hz의 자극군보다 유의한 감소를 보였고 paralemniscal nucleus에서는 100Hz 자극군과 침군이 2Hz의 자극군보다 유의한 염색성의 감소를 보였다.
3. 소뇌 영역에서도 nNOS 염색성은 세 군이 유의한 염색성의 차이를 보였으며 이중 100Hz 자극군에서 염색성이 가장 감소하였다.

VI. 참고문헌

1. 전국한의과대학 침구경혈학교실 편저. 침구학(하). 서울. 집문당. 1988 ; 382-383.
2. 손낙원, 원란, 손영주, 김용석, 박영배. 침자극이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 영상화 연구. 전국한의학 학술대회. 2000 ; 75-76.
3. Kenneeth K, Kwong JW, Belliveau DA, Inna E, Goldberg RM, Weisskoff BP,

1. Poncelet DN, Kennedy BE, Hoffel MS, Hong MJ, Thomas J and Bruce LR. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 ; 89 : 5675-5679.
2. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, Wong EK and Min BI. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95(5) : 2670-3.
3. Lee DS, Lee JS, Kim KM, Chung JK and Lee MC. Functional brain mapping using H215O positron emission tomography (I) : Statistical Parametric Mapping Method. Korean J Nucl Med. 1998 ; 32 : 225-237.
4. 정희철, 한미정, 박상균, 안성훈, 김경식, 손인철. 鍼刺戟에 의해 誘導되는 norepinephrine과 serotonin의 증가가 NO의 생성에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(3) : 367-378.
5. 이정현, 김이화, 이은용. 耳鍼자극이 絶食 Stress로 인한 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase 신경세포에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(2) : 79-90.
6. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM and Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. Neuron. 1991 ; 7 : 615-624.
7. Bredt DS and Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron. 1992 ; 8 : 3-11.
8. Monda M, Viggiano A, Sullo A and De Luca V. Nitric Oxide reduces hypophagia induced by threonine free diet in the rat. Brain Res. 1998 ; 808(2) : 129-133.
9. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide : a physiologic messenger molecule. Ann Rev Biochem. 1994 ; 63 : 175-195.
10. Brobeck Jr, Tepperman J, Long CNH. Experimental hypothalamic hyperphagia in albino rat. Yale J Biol Med. 1943 ; 15 : 831-853.
11. Bucinskaite V, Lunderberg T, Stenfors C, Ekblom A, Dahlin L and Theodorsson E. Effects of electro-acupuncture and physical exercise on regional concentration of neuropeptide in rat brain. Brain Res. 666 : 128-132, 1994.
12. Bucinskaite V, Theodorsson E, Crumpton K, Stenfors C, Ekblom A and Lunderberg T. Effects of repeated sensory stimulation (electroacupuncture) and physical exercise (running) on open field behavior and concentrations of neuropeptides in the hippocampus in WKY and SHR rats. Eur. J. Neurosci. 1996 ; 8 : 382-387.
13. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM and Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1991 ; 88 : 7797-7801.
14. Marletta MA. Nitric oxide : biosynthesis and biological significance, Trends Biol Sci 1989 ; 14 : 488-492.
15. Vincent. SR and Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain Neuroscience 1992 ; 46 : 755-784.16.
16. 고희균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈 위. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 115-122.
17. 김창환, 김용석, 허영범, 유진화. 電鍼刺戟이 SHR 흰쥐 大腦의 NADPH- diaphorase와 Neuropeptide Y 神經細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(4) : 283-291.
18. 김재규 외. 전침치료의 이론과 임상. 서울 : 서원당. 1993 ; 14-17.
19. Zhang A, Luo F, Pan Z, Zhou Y. Influence of cerebral traumatic dementia treated with acupuncture at houxi and shenmen. Chen Tzu Yen Chiu. 1996 ; 21(1) : 12-4.
20. Takeshig C, Zhao WH, Guo SY. Convergence from the preoptic area and arcuate nucleus to the median eminence in acupuncture and nonacupuncture point stimulation analgesia. Brain Res Bull. 1991 ; 26 : 771-8.
21. Takeshig C, Tsuchiya M, Guo SY, Sato T.

- Dopaminergic transmission in hypothalamic arcuate nucleus to produce acupuncture analgesia in correlation with the pituitary gland. *Brain Res Bull.* 1991 ; 26 : 113-22.
24. 김이화, 김연정, 임백빈, 장미현, 정주호, 김창주. 耳鍼이 絶食시킨 흰쥐의 大腦皮質에서 CCK 活性變化에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(3) : 168-175.
 25. Giatgen A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -Cell. *New Physiol Sci.* 1999 ; 14 : 49-53.
 26. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide : Physiology, Pathology and Pharmacology. *Rev.* 1991 ; 43 : 109-142.
 27. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins, Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci.* 1993 ; 8 : 2153-2163.
 28. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. : Endothelial nitric oxide synthase : molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1996 ; 89 : 6348-6352.
 29. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Trosco T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992 ; 256 : 225-228.
 30. Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, Maceachern K, Johnston HM and Nolan AM. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase : evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology.* 1997 ; 36 : 1589-1599.
 31. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News.* 1993 ; 26-38.
 32. Huh Y, Heo K, Park C, Ahn H. Transient induction of neuronal nitric oxide synthase in neurons of rat cerebral cortex after status epilepticus. *Neurosci. Lett.* 2000 ; 281 : 49-52.
 33. Brecht DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM and Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 1991 ; 7 : 615-624.
 34. Hope BT, Michael GJ, Krigge KM and Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991 ; 88 : 2811-2814.
 35. Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, Maceachern K, Johnston HM and Nolan AM. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase : evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology.* 1997 ; 36 : 1589-1599.
 36. Vincent SR and Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 1992 ; 46 : 755-784.