ORIGINAL ARTICLE

KOREAN JOURNAL OF ACUPUNCTURE

pISSN 2287-3368 / eISSN 2287-3376
Korean Journal of Acupuncture Vol.30, No.1, pp.37-46, 2013

白鼠의 經穴(LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4) 針刺가 Nitric Oxide Synthase 및 Norepinephrine의 변화에 미치는 影響

김영선[1] · 최동희[1] · 장호선[1] · 나창수[1] · 신헌태[1] · 조주현[2] · 이경인[2] · 김선민[2] · 표병식[2] · 윤대환[1]

[1]동신대학교 한의과대학, [2]동신대학교 생물자원산업화지원센터

Effects of Acupuncture at the River Points(LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4) on the Changes of Nitric Oxide Synthase and Norepinephrine in Rats

Youngsun Kim[1], Donghee Choi[1], Hosun Jang[1], Changsu Na[1], Heontae Shin[1], Joohyun Cho[2], Kyoungin Lee[2], Sunmin Kim[2], Byoungsik Pyo[2], Daehwan Youn[1]

[1]College of Oriental Medicine, Dongshin University, [2]Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University

Objectives : The Meridians and acupuncture points are the fundamental theories for acupuncture therapy. They have been associated with nervous system, but It is not well defined. We investigated that the effects of acupuncture at the river points(LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4) on the changes in the expression of nNOS, iNOS, eNOS, and NE in rats. **Methods :** The Male Sprague-Dawley rats were divided into 6 groups each non-acupuncture and acupuncture group . We inserted needle and retained for 5 minutes on both left and right sides of LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 which were the river points of five transport points for 6 yin meridian vessels. After that, blood was drawn via cardiac puncture, and tissues for each point near meridian vessels were extracted to examine the changes in the changes of nNOS, eNOS, iNOS and NE. **Results :** The LU8 and HT4 group showed a significant decrease on nNOS. In terms of eNOS and iNOS, the LU8 group decreased significantly while the KI7 group increased significantly. However, the experimental groups didn't show any significant changes on the plasma and tissue norepinephrine without plama NE in SP5 group. **Conclusions :** The effect on the nNOS, iNOS, eNOS of acupuncture at LU8 and KI7 could be observed, and it is considered that the effect of acupuncture related with on nervous system could be studied by additional researches based on this one.

Key words: five transport points, river point, nNOS, iNOS, eNOS, norepinephrine(NE)

Received December 26, 2012; Revised February 28, 2013, Accepted February 28, 2013

Corresponding author: **Daehwan Youn**
College of Oriental Medicine, Dongshin University, 185, Geonjae-ro, Naju 520-714, Korea
Tel: +82-61-330-3527, Fax: +82-61-330-3519, E-mail: human22@dsu.kr

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology(No. 2012-0003540).

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/ by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013, SOCIETY FOR MERIDIAN AND ACUPOINT

서 론

경락은 經脈과 絡脈을 포함하고 있으며, 내부로는 五臟六腑를, 외부로는 皮膚와 肢節을 연결하는 氣血運行하는 통로가 되며, 유기적 정체의 기능 활동들을 실현시키고 있는 기능적 체계 및 구조적 체계이다[1,2].

五輸穴은 十二經의 인체의 팔꿈치와 무릎 아래에 분포하는 5개의 특정 혈자리를 말하며, 경락 중의 經氣 운행을 자연계의 흐르는 물에 비유한 특정 혈위로, 오행의 상생과 상극의 원리에 맞추어 虛實을 補瀉하여 경락의 기능을 조절하고, 소속 장부 및 연계 장부의 기능 조절을 담당한다. 五輸穴 중 經穴은 경기의 흐름이 강물이 흐르는 듯하여 經이라고 칭하였으며, 대부분이 손목과 발목 관절 부근과 그 사이에 위치하고 있다[3].

Nitric oxide synthase(NOS)는 체내에서 생성되어 중추신경계와 말초 신경계의 신경신호 전달물질 역할을 하는 nitric oxide (NO)를 생성하여 혈관 확장과 같은 생리학적 과정에서 중요한 작용을 하며, 신경 퇴행성 질환의 진행에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[4-7]. NOS는 neuronal NOS(nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS(eNOS)로 세 개의 isotype으로 알려져 있는데, nNOS는 신경조직에서 NO를 생성하여 세포간의 정보전달을 담당하는 기능으로, 말초신경계, 중추신경계, 혈관계에 작용한다고 알려져 있으며[5-7], eNOS는 혈관내피세포 및 세포질에 가장 풍부하게 존재하고 있다고 알려져 있고[8], iNOS는 백혈구나 상피세포 등에서 발현되어 NO를 생성하며 염증 반응시 NO의 생성은 대부분이 iNOS에 의하여 생성된 것이라 할 수 있다고 알려져 있다[9,10]. Norepinephrine(NE) 또한 신경전달 물질이며, 집중력, 섭식행동, 불면증, 수면 등에 영향을 준다고 알려져 있다[11].

이에 관련된 최근의 침 연구로는 Jeong[12]과 Lee 등[13]이 足三里 배합 침자가 중추신경의 NO에 영향을 미친다고 보고하였으며, Kang과 Lee[14]는 足厥陰肝經의 行間과 曲泉에 補瀉를 시행한 침자가 자율신경의 흥분상태와 안정 상태를 유발하였다고 보고하였고, Chang 등[15]은 足陽明胃經의 足三里 자침이 atropine으로 유발된 교감신경 항진에 영향을 미친다고 보고하였고, Kim 등[16]은 商陽과 足竅陰에 瀉法을, 足通谷과 俠谿에 補法을 시행한 자침이 야간 간호사의 자율신경 불균형을 조절하였다고 보고하였으며, Knardahl 등[17]은 手陽明大腸經의 曲池 등에 시행한 전침이 muscle sympathetic activity 측정을 통한 교감신경의 활성도에 미치는 영향을 보고하였으나, 침자와 관련된 경혈 국소부를 비롯한 생체에서의 신경전달물질의 변화에 대한 연구 및 신경활성 기전에 대한 영향 연구 보고가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 해당 혈위에 침자 했을 때 혈위 내 국소적인 작용 변화에 관찰하고자 하여 흰쥐를 대상으로 五輸穴의 經穴에 해당하는 LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4의 鍼刺를 시행하였으며, 그 결과 신경 전달 관여물질 중의 nNOS, iNOS, eNOS 및 NE의 발현 변화를 다음과 같이 관찰하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 16주령(400～430 g, Samtaco, Korea) 수컷 흰쥐들을 준비하여, 동신대학교 실험윤리에 따라 사육하고 처치하였다. 사육되는 동물은 12h light-dark cycle의 명암조절이 되었고, 항온 항습(21±2°C, 40～60%)이 유지되는 사육실에서 사육되면서 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 군 분리

실험군들은 手太陰肺經의 經渠(LU8, n=3), 手少陰心經의 靈道(HT4, n=3), 手厥陰心包經의 間使(PC5, n=3), 足太陰脾經의 商丘(SP5, n=3), 足少陰腎經의 復溜(KI7, n=3), 足厥陰肝經의 中封(LR4, n=3)에 자침하지 않은 정상군과, 침자를 시행한 침자군으로 각각 분리하였으며, 모든 군들은 사육단계부터 호흡마취과정까지 모두 동일하게 처치되었다.

3. 경혈 및 침자

12개 경맥의 五輸穴에서 經穴에 해당하는 6개 혈위에 대하여 인체에 상응하게 취혈하였다.

LU8는 아래팔 앞가쪽면의 노뼈붓돌기와 노동맥 사이로서, 완횡문 상 1寸에, SP5는 안쪽 복사 아래 앞쪽과 안쪽 복사 융기의 연결선의 가운데 함중에, HT4는 아래팔 요측, 완횡문에서 몸쪽으로 1.5寸에, KI7는 발꿈치힘줄앞쪽에서 안쪽복사 융기 위쪽으로 2寸에, PC5는 긴 손바닥근 힘줄과 요측 손목 굽힘근 힘줄의 사이로 완횡문에서 몸쪽으로 3寸에, 中封은 앞정강근힘줄 안쪽, 안쪽복사과 앞쪽의 오목한 곳에 각각 취혈하였다[18,19]. 침자 시술 전에 isoflurane (Choongwae, Korea)과 O_2로 혼합된 가스 마취를 시행하였고, 가스 마취는 3% isoflurane으로 호흡마취를 유도한 후에 2% isoflurane으로 마취 상태를 계속 유지 시킨 후 각 경혈 좌우 모두에 직자로 자침하고, 5분간 유침하였다. 침자에 사용된 침은 호침(0.25×15 mm, Dongbang, Korea)이며, 실험기간 동안 숙련된 전문가 1인이 계속하여 시술하였다.

4. 혈장 준비

침자 후 5분간의 유침 과정이 끝난 후에 심장 천자하여 6 ml의 혈액을 채혈하였다. 채혈 한 혈액은 K3 EDTA(Green VAC-tube EDTA K3 liquid 3.0 mm 13×75, Greencross, Korea)에 넣고 3,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Vision Scientific Co., LTD, Korea)하여 혈장을 얻어 이를 NE content의 분석을 위해 급속냉동 시킨 후 -80°C에 보관하였다.

5. 조직 준비

심장천자를 통하여 혈액을 채혈한 후 각 군들에 해당하는 경혈 부위에서 깊이 2~10 mm의 조직(1×1 cm)을 적출하였다. nNOS, iNOS, eNOS assay를 얻기 위한 조직은 1X Protease Cocktail inhibitor(BD, USA)가 포함된 NP40 lysis buffer 500 μl를 넣어 homogenization하였다. 이 sample을 20분간 ice상태에 놓아둔 후 12,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)한 후 supernatants을 분리하였다. NE production을 얻기 위한 조직은 해당 경혈 부위를 포함하는 조직을 분리하여 0.1 M perchloric acid 0.5 ml와 함께 homogenize (KIKA Works[Asia] Sdn. Bhd., Malaysia)하였고, 이를 10,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatants만 분리하였다.

6. Assay of NOS

1) Immunohistochemistry

경혈 부위의 조직은 골격이 포함된 근육절편을 적출하여 Bouin 용액에 24시간 고정하였으며, 2.5% 질산(nitric acid) 용액에서 30일 동안 3일간 1회씩 질산액을 교환하면서 탈회(decalcification)를 실시하였다. 파라핀 블록의 제작을 위해 채취한 조직은 Tissue Processor(Tissue-Tex II, Japan)를 사용하였다. 파라핀 블록은 microtome을 사용하여 10 μm 두께로 절편을 제작한 후 2% BSA와 15%의 Goat Serum으로 3시간 동안 반응시킨 후 Rabbit anti-nNOS(Invitrogen. USA), anti-iNOS (Abcam, England), anti-eNOS(Abcam, England) andtibody를 0.05% Sodium azide와 2% BSA가 함유된 PBS로 희석시켜 조직을 48시간 동안 4oC에서 반응을 시킨 후 50 mM PBS에 세척하고, biotinylated universal Secondary Antibody(Quick Kit : Vector Laboratories, Burlingame, USA)에 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 50 mM PBS에 세척하고, Streptavidin peroxidase preformed complex(Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, USA)에 10분 동안 반응시킨 후에 다시 50 mM PBS에 세척하고, 조직을 3,3'-diaminobenzidine발색용액(Vector Laboratories, Burlingame, USA)으로 반응시킨 후, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 세척하여 hematoxyline으로 대조 염색 후 슬라이드를 dehydtration한 후에 200배의 광학현미경(Eclipse 80i, Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 염색된 NOS의 number는 연구자 2인이 count하였다.

7. Assay of NE production

NE production은 Lakshmana와 Raju의 방법[20]을 변형하여 측정하였다. HPLC(LC-10Avp[Shimadzu, Japan])의 column으로 TSK-gel ODS-80 TM(5 μm, 0.45×15 cm, Tosho, Japan)을 사용하였고, 이동상 용매는 모두 HPLC급으로서 50 mM sodium acetate:acetonitril:methanol을 92:5:3 (v/v %)의 비율로 혼합하여 진공 여과 후 사용하였으며, 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 검체의 주입은 autoinjector로 하였고, 검출은 fluorimetric detector(RF-10AXL, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 표준물질로서 NE(Sigma, USA)를 사용하였으며, 각 물질의 함량은 10 ppm(1 ng/100 μl), 50 ppm(5 ng/100 μl), 100 ppm(10 ng/100 μl)과 0 ppm을 standard로 하여 이들과 비교한 검체의 relative peak areas를 계산하여 weight gram당으로 환산하여 계산하였다.

8. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program(Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준오차(mean±standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS(SPSS, USA)를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여 α=0.05 수준(p<0.05)에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. nNOS 발현에 미치는 영향

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 경혈 조직 내 nNOS 발현 변화를 관찰한 결과, 침자를 시행하지 않은 LU8군은 232.0±29.37(number), HT4군은 164.7±18.49(number), PC5군은 21.3±5.70(number), SP5군은 28.3±6.36(number), KI7군은 19.7±2.60(number), LR4군은 91.7±12.45(number)를 나타내었으며, 鍼刺를 시행한 LU8군은 20.7±7.75(number), HT4군은 66.3±22.36(number), PC5군은 25.3±3.76(number), SP5군은 17.3±1.20(number), KI7군은

65.7±24.91(number), LR4군은 97.7±20.99(number)를 나타내었다.

鍼刺를 시행하지 않는 각각 군들과의 비교에서 LU8군과 HT4군가 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(Fig. 1, 2).

2. iNOS 발현에 미치는 영향

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 경혈 조직 내 iNOS 발현 변화를 관찰한 결과, 침자를 시행하지 않은 LU8군은 87.7±8.11(number), HT4군은 24.0±6.11(number), PC5군은 17.3±4.84(number), SP5군은 17.3±0.88(number), KI7군은 18.0±1.15(number), LR4군은 48.3±9.40(number)를 나타내었으며, 鍼刺를 시행한 LU8군은 24.7±4.63(number), HT4군은 36.0±2.31(number), PC5군은 35.7±14.17(number), SP5군은 38.0±7.55(number), KI7군은 47.7±4.37(number), LR4군은 74.3±6.94(number)를 나타내었다.

鍼刺를 시행하지 않는 각각 군들과의 비교에서 LU8군은 유의한 감소를, KI7군은 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Fig. 3, 4).

3. eNOS 발현에 미치는 영향

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 경혈 조직 내 eNOS 발현 변화를 관찰한 결과, 침자를 시행하지 않은 LU8군은 178.7±5.46(number), HT4군은 162.7±55.98(number), PC5군은 27.7±3.71(number), SP5군은 148.0±11.53(number), KI7군은 54.3±6.44(number), LR4군은

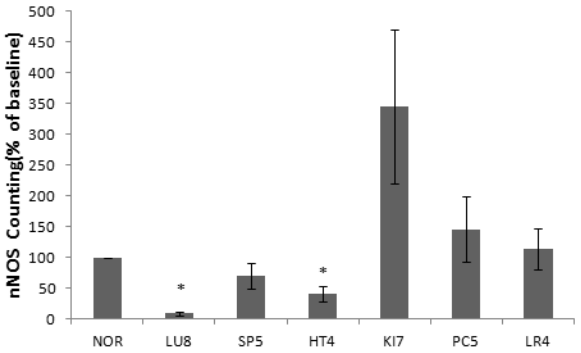

Fig. 1. Effect of acupuncture on immunoreactivity for neuronal nitric oxide synthase(nNOS) on the acupoints in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. Results are shown as mean±S.E. *$p<0.05$ as compared with the corresponding data of each Non-Acupuncture group.

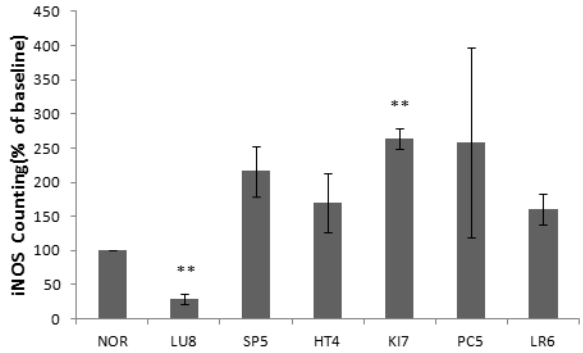

Fig. 3. Effect of acupuncture on immunoreactivity for inducible nitric oxide synthase(iNOS) on the acupoints in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. Results are shown as mean±S.E. **$p<0.01$ as compared with the corresponding data of each Non-Acupuncture group.

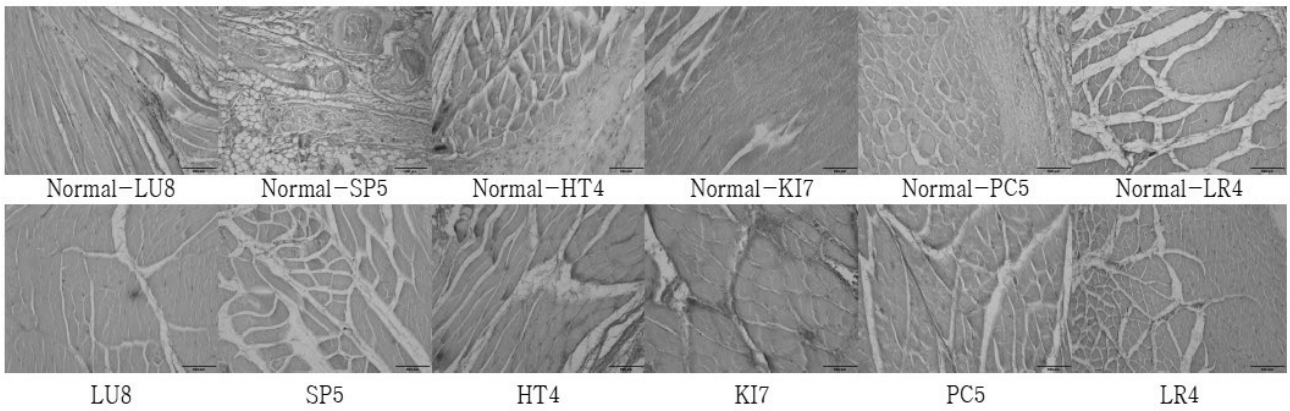

Fig. 2. Representive microphotographs of immunoreactivity pattern for neuronal nitric oxid esynthase(nNOS) in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. ×200.

103.7±11.46(number)를 나타내었으며, 鍼刺를 시행한 LU8군은 19.3±8.35(number), HT4군은 147.7±19.62(number), PC5군은 32.0±1.73(number), SP5군은 38.0±3.06(number), KI7군은 106.3±24.90(number), LR4군은 152.0±18.25(number)를 나타내었다.

鍼刺를 시행하지 않는 각각 군들과의 비교에서 LU8군은 유의한 감소를, KI7군은 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Fig. 5, 6).

4. 조직 내 Norepinephrine 생성에 미치는 영향

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 조직 내 Norepinephrine 생성 변화를 관찰한 결과, 침자를 시행하지 않은 LU8군은 3.5±0.21(ppm), HT4군은 4.7±0.47(ppm), PC5군은 4.2±0.17(ppm), SP5군은 4.2±0.50

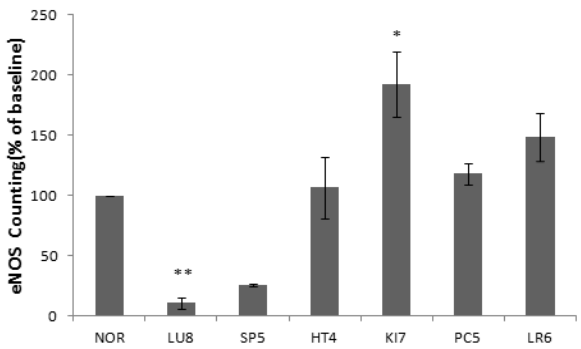

Fig. 5. Effect of acupuncture on immunoreactivity for endothelial nitric oxide synthase(eNOS) on the acupoints in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. Results are shown as mean±S.E. *$p<0.05$, **$p<0.01$ as compared with the corresponding data of each Non-Acupuncture group.

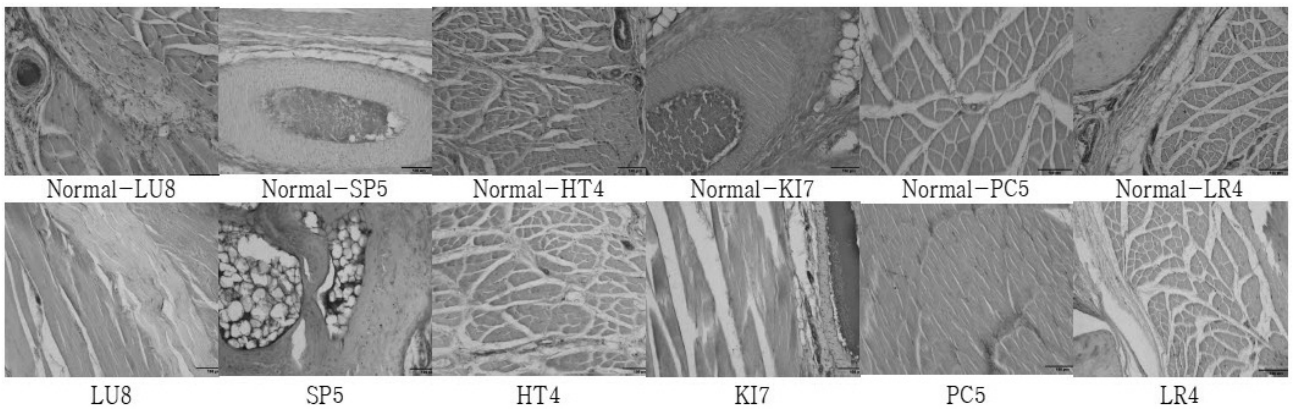

Fig. 4. Representive microphotographs of immunoreactivity pattern for inducible nitric oxid esynthase(iNOS) in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. ×200.

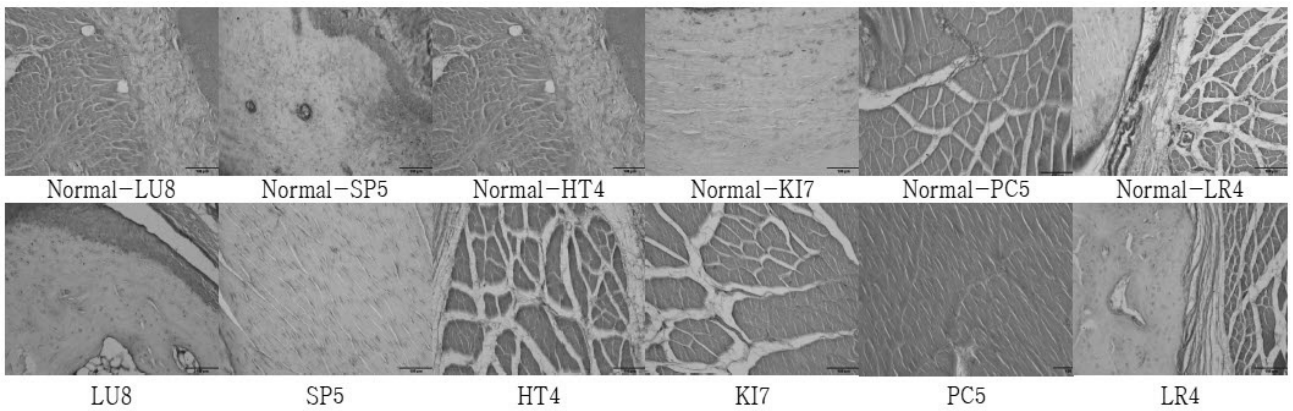

Fig. 6. Representive microphotographs of immunoreactivity pattern for endothelial nitric oxide synthase(eNOS) in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. ×200.

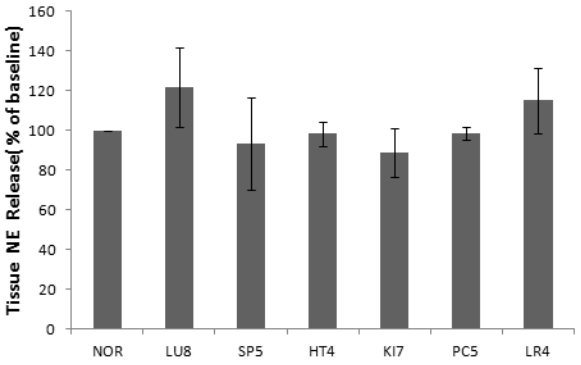

Fig. 7. Effect of acupuncture on tissue norepinephrine release on the acupoints in rats.
Each Normal group didn't get any other treatment. LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint.

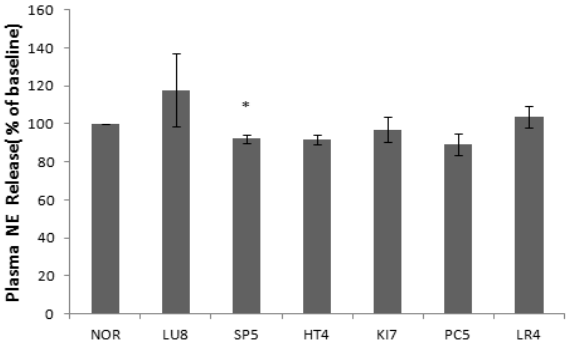

Fig. 9. Effect of acupuncture on plasma norepinephrine release in rats.
Each Normal group didn't getany other treatment. LU8, HT4, PC5, SP5, KI7, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint. Results are shown as mean±S.E. *$p<0.05$ as compared with the corresponding data of each Non-Acupuncture group.

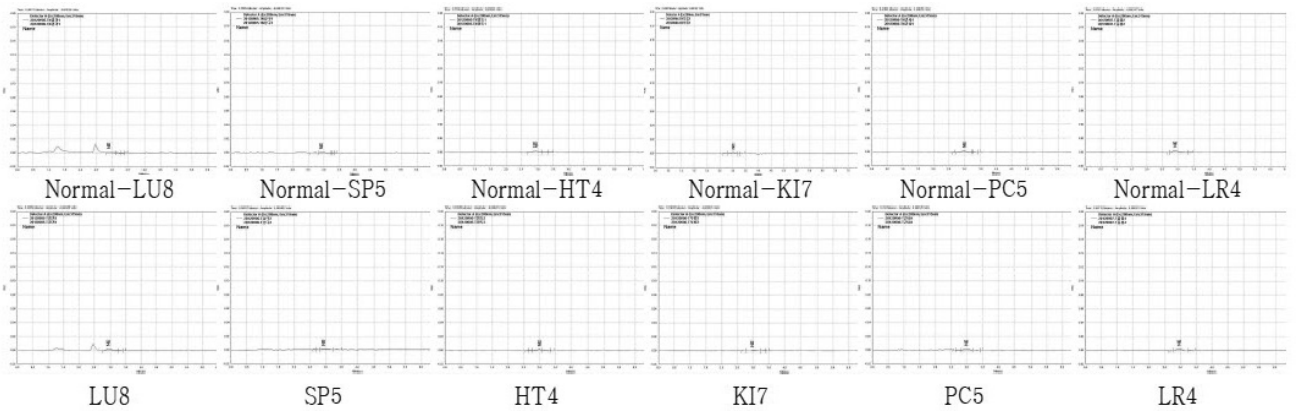

Fig. 8. Chromatograms of tissue norepinephrine release using fluorimetric detector.
Normal group didn't get any other treatment. LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint.

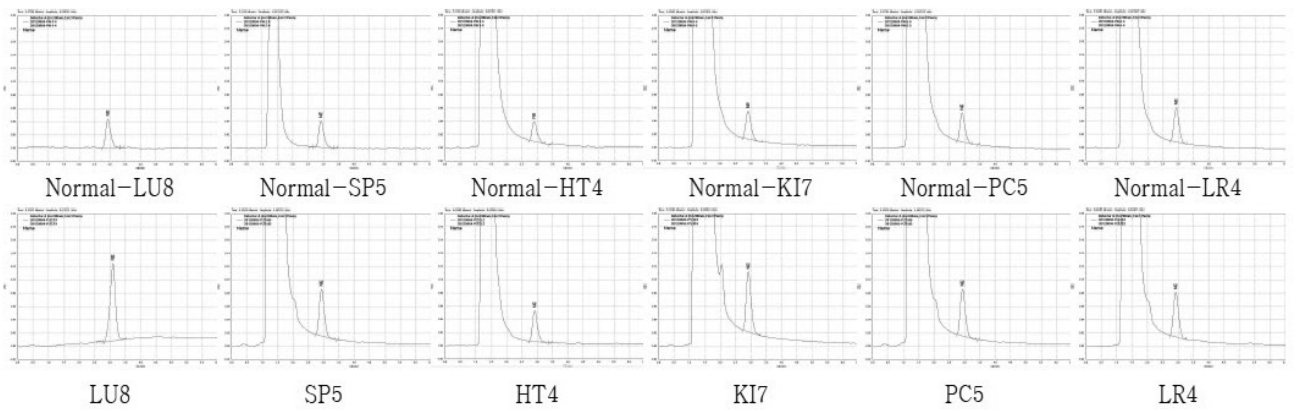

Fig. 10. Chromatograms of plasma norepinephrine release using fluorimetric detector.
Normal group didn't get any other treatment. LU8, SP5, HT4, KI7, PC5, LR4 groups were treated acupuncture at each acupoint.

(ppm), KI7군은 4.2±0.17(ppm), LR4군은 4.0±0.13(ppm)을 나타내었으며, 鍼刺를 시행한 LU8군은 4.1±0.40(ppm), HT4군은 4.6±0.54(ppm), PC5군은 4.1±0.05(ppm), SP5군은 3.6±0.21(ppm), KI7군은 3.7±0.28(ppm), LR4군은 4.6±0.51(ppm)을 나타내었다.

鍼刺를 시행하지 않는 각각 군들과의 비교에서 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 7, 8).

5. 혈장 내 Norepinephrine 생성에 미치는 영향

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 혈장 내 Norepinephrine 생성 변화를 관찰한 결과, 침자를 시행하지 않은 LU8군은 52.4±3.46(ppm), HT4군은 52.7±1.77(ppm), PC5군은 56.5±2.66(ppm), SP5군은 54.4±0.44(ppm), KI7군은 55.0±1.86(ppm), LR4군은 53.6±0.51(ppm)를 나타내었으며, 鍼刺를 시행한 LU8군은 64.1±14.98(ppm), HT4군은 48.2±0.47(ppm), PC5군은 50.1±1.75(ppm), SP5군은 50.1±1.02(ppm), KI7군은 53.6±4.80(ppm), LR4군은 55.5±2.59(ppm)를 나타내었다.

鍼刺를 시행하지 않는 각각 군들과의 비교에서 SP5군에서 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(Fig. 9, 10).

고 찰

十二經脈과 任脈과 督脈 上에 존재하는 穴을 "十四經穴"이라 하여, "經穴"이라 칭하며, 이 經穴들이 상호 연계되어 분류되고 이론화 된 것이 經絡이며, 인체 내의 기혈 운행의 통로로서 유기적 정체의 기능 활동을 하는 구조적, 기능적인 체계의 성격을 가지고 있다. 또한, 經穴은 經脈과 관계가 있어 本經의 病證을 主治하는 作用 및 經脈과 소속된 臟腑의 病證에도 반영된다[21].

十二經脈의 四肢에서 肘膝關節 以下에 분포한 五輸穴은 5개의 특정 혈자리인 井·滎·兪·經·合을 말하며, 四肢末端에서 肘膝 방향으로 차례대로 배열되어 있다. 즉, 작은 곳에서 큰 곳으로, 얕은 곳에서 깊은 곳으로의 經氣의 흐름이 있다[3,21]. 井穴은 經氣가 出하는 곳으로 지하의 수원에서 물이 흘러나오는 듯하며, 맥기가 가늘고 얕은 것을 의미하고 四肢末端에 분포하며, 滎穴은 經氣가 流行하는 곳으로 經氣의 흐름이 샘물이 흐르는 듯하며, 掌指와 跖趾關節 앞에 분포하고, 兪穴은 經氣가 점점 盛해지는 곳으로 물이 얕은 곳에서 깊은 곳으로 힘 있게 흘러 들어가는 것과 같으며, 掌指와 跖趾關節 뒤에 분포하고, 經穴은 經氣가 盛한 곳으로 강물이 흐르는 것 같은 경기의 흐름으로 腕과 關節以下에 분포하고, 合穴은 經氣가 臟腑 부위와 會合하는 곳으로 모든 강물이 모여 바다에 흘러들어가는 것과 같으며, 주로 肘膝關節 附近에 분포한다[3,21].

본 연구에서는 임상에서 다용되고 있는 치료혈중의 하나인 오수혈중 經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)은 모두 陰經에 해당하는 혈위들로 陽經에 비하여 취혈조건과 신경 및 혈관분포 등 해부학적 조건 등이 비교적 우수하여 이들을 대상으로 해당 경혈 국소부위와 혈장에서 침자가 신경활성과 관련있는 NOS와 NE의 변화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

산화질소(nitric oxide, NO)는 신경전달 물질로 알려져 있으며, 혈관 내피세포와 뇌 조직에서도 생산된다. NO는 우리 몸에서 많은 생리적 기능을 하는데, 그중에서도 혈관의 이완과 혈류량을 조절하고, 혈소판 응집억제와 성기능 장애개선과 항미생물 작용 및 항암작용 등 여러 가지의 생물학적 기능을 하고, 다른 세포에서 살균작용을 나타내며, 중추신경계와 말초신경계에서 뉴런의 신경전달물질로도 쓰이기도 한다[22]. 이에 대하여 NO가 인체 내에서도 발생하여 생리적 기능과 병리적 기능을 가지고 있는 것이 알려진바 있다고 Yim[23]은 보고하였고, 이는 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 만들어 진다. Nitric oxide synthase(NOS)는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS(iNOS), endothelial NOS(eNOS) 3가지의 isotype이 알려져 있는데, nNOS와 eNOS는 항상 발현되어 있어 constitutiveNOS(cNOS)라고도 한다. 특히 신경조직에서 NO를 생성하는 nNOS는 세포간의 정보전달과 신경전달을 담당하여, 중추신경계와 말초신경계 및 혈관계에 작용하는 것으로도 알려져 있다[5-7,23]. 중추신경계에서의 nNOS는 외부 자극에 대해 민감하게 반응하며, 이는 신경세포가 자극되고, 세포내의 칼슘이온이 증가하면서 효소가 활성화되어 NO를 합성하고, 주변의 조직에 확산되어 신경전달 물질 역할을 담당 하지만, 뇌의 저산소증, 허혈증, 뇌졸중 등의 질병이 있는 상태에서는 세포내로 칼슘이온이 증가하여 많은 NO가 생성되고 신경세포에 손상이 나타나기도 한다[24,25]. eNOS는 동맥, 소동맥의 벽, 또는 벽주위의 혈관 내피와 평활근에서 발생되어, NO를 증가시킴으로 혈관의 활동성을 조절한다고 알려져 있다[26]. iNOS의 증가는 염증에 의한 조직을 손상 가속화시킨다고 알려져 있다[27].

이와 관련된 연구보고로 足三里, 足三里配曲池, 足三里配陰陵泉에 전침자극을 시행하여 nNOS 활성을 측정한 결과, 뇌줄기 영역에서 足三里와 足三里配曲池 전침자극군은 정상군에 비하여 유의한 감소를, 足三里配陰陵泉 전침자극군은 足三里와 足三里配曲池 전침자극군에 비하여 유의한 증가를 보였으며, 소뇌 영역에서는 足三里와 足三里配曲池 전침자극군이 정상군에 비하여 유의한 감소를,

足三里配陰陵泉 전침자극군은 足三里와 足三里配曲池 전침자극군에 비하여 유의한 증가를 나타내어 足三里의 배합이 중추신경계의 NO system에 각기 다른 영향을 미치는 것을 Lee 등[13]이 보고하였고, 전침효과가 nNOS 신경세포의 activity에 대한 효과를 관찰한 결과, 대뇌 겉질 영역의 nNOS에서 100 Hz군이 침자군과 2 Hz군에 비하여 일차운동겉질, 후각뇌주위겉질, 시각겉질, 뇌섬겉질의 부위에서 유의한 감소를, 뇌줄기 영역의 nNOS에서 100 Hz군이 침자군 및 2 Hz군에 비하여 위둔덕층, 뒤가쪽 수도관주위회색질, paralemniscal nucleus에서 유의한 감소를, 소뇌 영역의 nNOS에서 100 Hz군이 가장 떨어지는 결과를 각각 나타내었다고 Kim 등[28]이 보고하였다. 足三里와 曲池에 침자극을 시행한 후 흰쥐의 뇌줄기와 소뇌의 신경세포에서 nNOS 활성을 측정하여, 뇌줄기 영역 중 SuG와 DLPAG에서 曲池 침자군은 정상군과 足三里침자군보다 유의한 감소를, 소뇌 영역에서 足三里 침자군 및 曲池 침자군에서 nNOS의 활성에 대하여 유의한 차이가 없다는 것을 확인하고, 침자극이 경혈 선택과 NOS 활성에 관계가 있다는 것을, 경혈의 침자극이 NO system에 영향을 준다는 것을 Kim 등[29]이 보고하였으며, 농도별 봉독약침이 생쥐의 Type II Collagen 유발 관절염에 미치는 영향에서 봉독 약침액 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다고 Lee 등[30]은 보고하였다.

본 연구에서 LU8의 침자가 해당 경혈부위내 nNOS, iNOS, eNOS 활성 감소에 영향을 주었으며, HT8은 nNOS활성 감소에, KI7은 iNOS, eNOS 활성 증가에 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 이는 오수혈중 모든 경혈이 NOS활성과 관련되지 않는다는 것을 알 수 있으며 각 혈위마다의 특징적 혈성이 작용함을 관찰할 수 있으며, 또한 LU8 침자시 NOS과 관련한 nNOS, iNOS, eNOS의 모든 isotype 활성에서 감소를 보이는 것은 LU8와 NO의 자극에 대한 활성과 관련된다고 추론할 수 있다.

이는 Lee 등[13]이 보고한 曲池, 足三里 침자연구와 일치된 결과로 일정 혈위에 대한 침자는 뇌 뿐만 아니라 혈위에서도 NOS와 관련된 인자의 변화를 관찰할 수 있었다.

Norepinephrine(NE)은 교감신경의 자극으로 인해 부신수질에서 발생되는 스트레스성 호르몬이며, 이는 집중력, 섭식행동, 불면증, 수면 등에 영향을 주며, 스트레스와 운동자극에 민감한 반응을 보이며, 청반핵(locus coeruleus)과 뇌간핵(brainstemnucleus)에서의 신경전달물질로 이용되고 있다[31,32]. 이와 관련된 연구보고로 然谷, 陰谷, 少府, 少海 鍼刺가 norepinephrine에 미치는 영향에 대하여 관찰한 결과, 然谷, 陰谷, 少府, 少海 鍼刺 중에서 腎經의 水穴 KI10군 및 心經의 水穴 HT3군에서 유의한 감소를, 腎經의 火穴 KI2군 및 心經의 火穴 HT8군에서 유의한 차이가 보이지 않았다고 Youn 등[33]은 보고하였으며, 12經脈의 合穴 刺鍼 후 조직 및 혈장 내 Norepinephrine생성 변화를 관찰한 결과, 조직에서는 normal군에 비하여 HT3군, SP9군, KI10군은 유의하게 감소하였으며, PC3군과 LR8군은 유의하게 증가하였고, 혈장에서는 TE10군, SP9군, LR8군, GB34군, BL40군은이 유의하게 증가하였다고 Kim 등[34]은 보고하였다. Nitric oxide(NO)는 가스형태로 nitric oxide synthase에 의하여 생성되는데, NO는 plasma membrane에 침투할 수 있으며, 주위 세포에게 까지도 영향을 미친다[27]. 자율신경계의 교감신경 활성이 증가되면 피부나 장에 분포된 혈관 수축으로 인하여 혈류가 증가하고, 에너지를 효과적으로 쓸 수 있도록 하며, 동공이 산대되고, 기관지가 확장됨으로서 산소유입량이 증가하고, 심수축력과 심박동률이 증가하여 골격근과 뇌의 관류량이 커지게 된다. 또한, 부신수질을 자극하여 혈관내로 epinephrine과 norepinephrine을 유리시키며, 에너지 동원 기능을 활발하게 한다. 즉, 교감신경섬유는 많은 臟腑에 연계되어 있으며, 말초신경계로서 작용한다[11]. 교감신경과 반대로 부교감신경은 장의 연동운동을 증가시키고, 동공수축, 피부와 장의 혈관 이완을 유도하고, 심박동을 느리게 하기도 한다. 교감신경에서 나타나는 norepinephrine은 평활근에 작용하고, 피부 및 피하 근육 등에 분포하는 말초혈관의 긴장을 촉진시킨다[11].

본 연구에서는 오수혈중 6가지의 경혈침자가 해당 경혈 부위의 NE 농도 변화에는 영향을 미치지 못하였으며 다만 혈장 내 NE농도는 SP5군에서 유의한 감소를 보였다. 이로 보아 SP5는 체내 혈류에서 교감신경이 관련된 NE 활성 감소에 일정한 영향을 주는 것으로 추론되며, 실험에 응용된 오수혈은 각각의 해당 경혈 부위의 NE농도에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

이런 결과로 보아, 오수혈중 LU8, HT8, KI7에 대한 침자는 신경전달물질의 생성과 관련된 NOS에 일정한 영향을 주지만 NE의 농도변화에 영향을 주지 않는다는 것을 관찰할 수 있었으며, 추후 다양한 신경전달물질에 대한 관련성과 자침효과에 대한 기본적인 생리활성기전에 대한 심도있는 연구 필요하리라고 사료된다.

결 론

經渠(LU8), 靈道(HT4), 間使(PC5), 商丘(SP5), 復溜(KI7), 中封(LR4)에 대한 鍼刺가 nNOS, iNOS, eNOS 및 Norepinephrine에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. nNOS 발현 변화에서 鍼刺를 시행하지 않는 각각의 군에 비해

LU8군과 HT4군가 유의한 감소를 보였다.

2. iNOS 발현 변화에서 鍼刺를 시행하지 않는 각각의 군에 비해 LU8군은 유의한 감소를, KI7군은 유의한 증가를 보였다.
3. eNOS 발현 변화에서 鍼刺를 시행하지 않는 각각 군에 비해 LU8군은 유의한 감소를, KI7군은 유의한 증가를 보였다.
4. 조직 내 Norepinephrine 생성에 미치는 영향에서 鍼刺를 시행하지 않는 각각의 군에 비해 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다.
5. 혈장 내 Norepinephrine 생성에 미치는 영향에서 鍼刺를 시행하지 않는 군에 비해 SP5군에서 유의한 감소를 보였다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology(No. 2012-0003540).

참고문헌

1. Introduction of Korean Traditional Medicine. Seoul : Esdang. Na Chang-Su. 2001 : 366.
2. Lee SR. Study of Acupuncture Points. Seoul : Jisangsa. 2007 : 36, 37.
3. Jie YW. Yang Wei Jie' complete works 3. Gyeonggi : Daesung Publishing Company. 2007 : 303-6, 310, 311, 314.
4. Cho HS, Shin MS, Kim CJ, Baek SS. Effect of treadmill exercise on inflammatory markers in the substantia nigra in 6-OHDA-induced Parkinson's rats. Exercise Science. 2012 ; 21(1) : 51-8.
5. Zhuang W, Eby JC, Cheong M, Mohapatra PK, Bredt DS, Disatnik MH, et al. The susceptibility of muscle cells to oxidative stress is independent of nitric oxide synthase expression. Muscle Nerve. 2001 ; 24(4) : 502-11.
6. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis : biological functions and pathophysiology. Free Radic Res. 1999 ; 31(6) : 577-96.
7. Feng C. Mechanism of nitric oxide synthase regulation: electron transfer and interdomain interactions. Coord Chem Rev. 2012 ; 256(3-4) : 393-411.
8. Kim WJ, Yun YS, Kim MS, Kim SH, Choi HR. Immunohistochmical Study of Nitric Oxide Synthase in Salivary Glands. The Korean Journal of Anatomy. 2000 ; 33 : 487-95.
9. Hung YC, Guh JH, Cheng ZJ, Chang YL, Hwang TL, Liao CH, et al. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophage by 7HQ derivatives: involvement of ikappaB-alpha stabilization. Eur J Pharmacol 2001 ; 418 : 133-9.
10. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Supression of inducible cyclooxigenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis 1999 ; 20 : 1945-52.
11. Dale P, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantina AS, Mcnamara JO, et al. Neuroscience. 3rd ed. Seoul : World Science. 2007 : 150.
12. Jeong IG, Lee JD, Kim CH. Effect of joksamni combination on NADPH-diaphorase, neuronal nitric oxide synthase, neuropeptide y and vasoactive intestinal peptide in the crebral cortex of spontaneously hypertensive rat. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(5) : 118-32.
13. Lee HM, Kim CH, Kim YS. Acupoint combination-related changes of NADPH-d diaphorase and neuronal nitric oxide synthase in the brainstem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2003 ; 20(6) : 148-59.
14. Kang HC, Lee SG. The effects of fire point(LR2), water point(LR8) through reinforcement-reduction acupuncture stimulation on ANS & EEG. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2010 ; 21(2) : 87-101.
15. Chang CH, Huang JL, Ting CT, Chang CS, Chen GH. Atropine-induced HRV alteration is not amended by electroacupuncture on zusanli. Am J Chin Med. 2005 ; 33(2) : 307-14.
16. Kim HK, Lee SH, Kim YS. Effects of sa-am acupuncture (Damjeonggyeok) on autonomic nervous system in night nurses. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2007 ; 24(4) : 13-23.
17. Knardahl S, Elam M, Olausson B, Wallin BG. Sympathetic nerve activity after acupuncture in humans. Pain. 1998 ; 75(1) : 19-25.
18. Meridians & acupoints compilation committee of Korean

Oriental Medical colleges. Details of Meridians & Acupoints; A Guidebook for College Students. 6th ed. Gangwon : Yibang. 2010 : 34, 337, 416, 744, 809, 1074.
19. Koo ST, Kim SK, Kim EH, Kim JH, Youn DH, Lee BH, et al. Acupuncture point locations for experimental animal studies in rats and mice. The Korean Journal of Meridian & Acupoint. 2010 ; 27(3) : 67-78.
20. Lakshmana MK, Raju TR. An isocratic assay for norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine using their native fluorescence by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection in discrete brain areas of rat. Anal Biochem. 1997 ; 246 : 166-70.
21. Meridians & acupoints compilation committee of Korean Oriental Medical colleges. Introduction of meridians & acupoints. 6th ed. Daejeon : JongRyeoNaMu Publishing. 2012 : 274, 307-15.
22. Lee BH, Baik DS, Yun SU, Shin JM, Kim JH, Yun SY, et al. Peripheral nitric oxide activity in patients with Liver cirrhosis. The Korean Journal of Internal Medicine. 2007 ; 73(3) : 251-7.
23. Yim CY. Nitric oxide and cancer. The Korean Journal of Internal Medicine. 2010 ; 78(4) : 430-6.
24. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured corticalvneurons to damage by endotoxins, Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J Neurosci. 1988(6) ; 8 : 2153-63.
25. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News. 1993 : 26-38.
26. Berman JR, McCarty MM, Kyprianou N. Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. Urology 1998 ; 51 : 650-6.
27. Anggard E. Nitric Oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994 ; 9 : 1199-206.
28. Kim HD, Nam SS, Kim CH. Effect of electroacupuncture stimulation on activity of neuronal NOS in rats. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2006 ; 23(5) : 199-206.
29. Kim JD, Kang SK, Kim CW. The effects of acupuncture on and nNOS in the brain stem and cerebellum oF SHR. The Journal of Korea Acupuncture on Moxibustion Society. 2004 ; 21(5) : 1-12.
30. Lee SW, Kim YJ, Kim EJ, Lee SD, Kim KS. The Effect of Varying Concentrations of Bee Venom Pharmacoupunture Treatments on Type II Collagen Induced Arthritis in Mice. The Journal of Korean Acupunture & Moxibustion Society. 2012 ; 29(1) : 75-87.
31. Jung IG, Park WH. The effect of cognitive stress during maximal exercise on blood β-endorphine and norepinephrine concentrations. Journal of Sport and Leisure Studies. 2006 ; 27 : 285-91.
32. Chung HC, Han MC, Park SK, Ahn SH, Kim KS, Sohn IC. Effects of norepinephrine and serotonin increase induced by acupuncture stimulation on the nitric oxide synthesis. The Journal of Korea Acupuncture on Moxibustion Society. 1999 ; 16(3) : 367-78.
33. Youn DH, Park CK, Kim JS, Chae WS, Na CS. Effects of acupuncture at the acupoint yongok(KI2), umgok(KI10), sobu(HT8), sohae(HT3) on aquaporin-2 expression, RSNA, MAP, HR, serum ANP, renin and norepinephrine in rats. The Korean Journal of Meridian & Acupoint. 2004 ; 21(1) : 1-14.
34. Kim YS, Choi DH, Choi TJ, Jang HS, Na CS, Shin HT, et al. Effects of acupunture at the Sea Point on the Changes of Plasma and Tissue Levels of NO, nNOS, Norepinephrine in Rats. Korean Jounal of Acupuncture. 2012 ; 29(2) : 300-12.