

腎俞(BL₂₃) 위령선약침이 白鼠의 L5 Spinal Nerve의 결찰로 유발된 신경병리성 동통에 미치는 영향[※]

김성필¹, 최선미¹, 김정은¹, 김주희¹, 신경민¹, 김재홍^{2,*}

¹한국한의학연구원 의료연구본부 침구경락연구센터

²동신대학교 한의과대학 침구학교실



[Abstract]

Effects of *Clematidis Radix* Pharmacopuncture Injected at *Sinsu*(BL₂₃) on Neuropathic Pain in Rats[※]

Sung Phil Kim¹, Sun Mi Choi¹, Jeong Eun Kim¹, Joo Hee Kim¹, Kyung Min Shin¹ and Jae Hong Kim^{2,*}

¹ Acupuncture, Moxibustion & Meridian Research Group, Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine

²Department of Acupuncture and Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives : The purpose of this study is to examine if *Clematidis Radix*(CR) pharmacopuncture may be effective to the neuropathic pain(mechanical allodynia) in a rat model of neuropathic pain.

Methods : To produce the model of neuropathic, L5 spinal nerve was ligated by 6-0 silk thread. After neuropathic surgery, the author examined if the animals exhibited the plantar withdrawal response of allodynia. The plantar withdrawal response was assessed by dynamic plantar aesthesiometer three days after the neuropathic surgery, CR pharmacopuncture was injected at BL₂₃ 1time/week for 6 weeks. After that, the author examined the plantar withdrawal response of rats' leg by dynamic plantar aesthesiometer. And also the author examined mGluR5, Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2 ratio in spinal cord, and c-Fos. Also the author observed the change of aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) count in the blood serum of neuropathic rats.

Results : 1. The withdrawal response of allodynia decreased in the PT3, PT4 group as compared with control group.

2. The mGluR5 increased in the PT1, PT2, PT3, and PT4 group.

3. The Bax and Bax/Bcl-2 ratio decreased in the PT4 group.

4. The c-Fos increased in the PT1 group, and decreased in the PT4 group.

5. The changes of AST in blood serum decreased in the every group excluded control group and the changes of ALT in blood serum isn't shown the significant change.

Conclusions : These results are suggested that CR pharmacopuncture at BL₂₃ decreased mechanical allodynia, can act on anti-apoptotic, neuroprotective effects and liver fuction in the model of neuropathic pain.

Key words :

Neuropathic pain;
Clematidis radix
 pharmacopuncture;
Sinsu(BL₂₃)

Received : 2014. 11. 10.

Revised : 2014. 11. 10.

Accepted : 2014. 11. 23.

On-line : 2014. 12. 20.

※ This study was supported by Acupuncture, Moxibustion & Meridian Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine(K14011)

* Corresponding author : Department of Acupuncture and Moxibustion Medicine, Gwangju Oriental Medicine Hospital of Dongshin University, 141, Wolsan-ro, Nam-gu, Gwangju, 503-232, Republic of Korea

Tel: +82-62-350-7209 E-mail : nahonga@hanmail.net

© 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.

The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)

Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

I. 서 론

신경병리성 동통(neuropathic pain)은 Mitchell¹⁾이 처음으로 정의하였는데, 말초신경 또는 조직이 손상을 받아 발생하는 만성 통증으로 특별한 자극 없이 발생하는 자발통, 정상적으로는 통증을 일으키지 않는 자극에 의하여 발생하는 이질통, 정상적으로 통증을 일으킬 만한 자극에 더욱 민감하게 반응하여 발생하는 과통증 등의 증상이 있다²⁾. 현재 우리나라에서도 이와 유사한 통증을 호소하는 환자가 많으며³⁾, 이에 대한 정확한 기전이나 치료방법이 아직 확실하게 밝혀지지 않았다⁴⁾.

한의학에서 痺症은 閉阻不通의 의미로 血氣가 막혀 통하지 않아 통증을 나타내는 증상이며, 痺症의 범주에 腰脚痛, 腰脚痠攣, 股幹痛, 脚筋痛 등이 포함되며 신경병리성 동통과 유사하다고 할 수 있다⁵⁾.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종으로 침구요법은 경락론을, 약물요법은 기미론을 바탕으로 하므로 약침요법은 경락론과 기미론을 근간으로 하는 한의학의 치료 기술로 임상에서 진정, 소염, 동통 질환에서 효과를 인정받고 있는 새로운 침구치료의 방법이다⁶⁾.

본 연구에서 선정된 혈위 腎俞(BL₂₃)는 足太陽膀胱經의 穴位로 滋補腎陰, 強腰脊, 祛水濕 효과가 있어서 임상에서 腎虛腰痛, 遺精, 疝痛, 虛勞, 腰膝痠痛 등에 활용된다⁷⁾. 《鍼灸資生經》⁸⁾, 《鍼灸大成》⁹⁾에서 腎俞(BL₂₃)는 '腰膝拘急'을 치료한다고 기재되어 있다. 약재로 선정된 威靈仙(clematidis radix: CR)은 미나리아재비과에 속한 다년생 落葉性 蔓莖植物인 아리의 根과 根莖을 건조한 것으로 性은 溫, 味는 辛鹹하며 祛風除濕, 通絡止痛하는 효능으로 風濕痺痛, 肢體麻木, 筋脈拘攣 등을 치료하는 데 상용하는 약물이다¹⁰⁾.

신경병리성 동통에 대한 실험적 연구로는 Kim et al¹¹⁾이 環跳에 蜈蚣藥鍼을, Lee et al¹²⁾이 環跳에 蜂藥鍼을, Jung et al¹³⁾이 委中·後谿의 鍼刺를, Oh et al¹⁴⁾이 委中·後谿에 電鍼 및 鍼刺를, Bang et al¹⁵⁾이 環跳에 草烏藥鍼을, Chiang et al¹⁶⁾이 腎俞·大腸俞에 蜂藥鍼을 사용하여 신경병리성 동통이 유발된 白鼠의 통증 감소에 유의한 효과가 있음을 각각적으로 보고하였으나 威靈仙藥鍼을 이용한 연구보고는 아직 접하지 못하였다.

이에 威靈仙藥鍼이 신경병리성 동통에 미치는 영향을 연구하고자, L5 척수신경 결찰에 의해 신경병리성 동통이 유발된 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙藥鍼을 시술한 후 철화반응, mGluR5의 발현, Bax의 발현, Bcl-2의 발현, Bax/Bcl-2 ratio의 변화, c-Fos 단백질 발현, aspartate amino-transferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)의

변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중이 약 230~250 g의 Sprague Dawley계의 웅성의 백서를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 24 ± 1 °C, 습도 60 ± 5 %) 내에서 고형사료(동아원, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안에도 물과 고형사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약침 조제

동신대학교 부속한방병원에서 구입한 위령선(Clematis mandshurica Rupr.) 200 g을 증류수 1,000 ml와 함께 3시간 동안 끓인 다음 원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary evaporator(Buchi, Netheland)로 수분을 증발시켜 100 ml로 감압 농축하였으며, 농축된 약침액을 동결건조기(삼원주식회사)로 -70 °C에서 동결 건조시켜 최종 12.32 g을 얻었다. 이를 소분하여 생리식염수로 희석하였으며, pH meter(ORION, USA)로 각각 pH 7 산도를 조절하여 약침으로 조제한 후 냉장 보관하였다가 시술에 사용하였다.

2. 방법

1) L5 spinal nerve ligation으로 인한 동통 유발

Isoflurane 2.5 %와 O₂로 혼합된 가스 호흡마취상태에서 백서를 prone position으로 놓고 L4-S2 level에 있는 왼쪽 spinous process들 주위의 근육들을 제거하였다. 작은 론저(rongeur)로 왼쪽 L5 transverse process를 조심스럽게 제거하여 L5 척수신경이 잘 보이도록 한 다음, 왼쪽 L5 척수신경을 isolation하여 6-0 silk thread로 단단하게 묶은 후, 절개한 부분을 봉합하였다.

2) 군 분리

35마리의 백서는 각각 L5 spinal nerve 결찰로 동통을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(CON, n=5), 腎俞(BL₂₃) 부위에 syringe로 침 시술만 시행한 침시술군(neuropathic pain induced and dry needling(NDL), n=5), BL₂₃에 saline을 주입한 saline군(SAL), BL₂₃에 위령선약침(0.004 $\mu\text{g/g}/\mu\text{l}$)을 시행한 약침1군(PT1, n=5), BL₂₃에 위령선약침(0.008 $\mu\text{g/g}/\mu\text{l}$)을 시행한 약침2군(PT2, n=5), BL₂₃에 위령선약침(0.02 $\mu\text{g/g}/\mu\text{l}$)을 시행한 약침3군(PT3, n=5), BL₂₃에 위령선약침(0.04 $\mu\text{g/g}/\mu\text{l}$)을 시행한 약침4군(PT4, n=5)으로 분리하였다.

3) 취혈 및 약침시술

취혈은 족태양방광경의 腎俞(BL₂₃)에 시행되었으며, 위치는 뒤 정중선의 제2요추 하에서 양방 1.5촌에서 인체와 상응하게 정하였다. 약침시술은 약침은 insulin syringe (31G \times 8 mm, BD, USA)를 이용하여 수술 후 3일째부터 시작하였으며, 1주에 각각 1회씩 총 6회를 腎俞 좌우에 20 μl 의 약침이 시행되었다.

4) Dynamic Plantar Aesthesiometer 측정

수술 후 3일째부터 1주에 1회씩 Dynamic Plantar Aesthesiometer(UGO BASILE 37450, Italy)를 이용하여, 각각 이에 대한 철회반응(withdrawal response)을 망으로 된 cage에 옮겨 5분간 안정시킨 후 관찰하였다.

Stimulator 자극에 의한 이질통 측정 방법은 0 g에서부터 50 g 강도까지 환측 발바닥 부위에 자극하여 발 철회반응의 react time(stimulator가 발바닥에 contact하여 다시 떨어질 때까지의 시간: second)과, force intensity(실험체가 stimulator를 피한 순간의 힘: gram)를 얻었다.

5) 혈청 검사

분리된 혈청은 측정하기 전까지는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)는 GOT/AST -P III Slide(Fujifilm Corporation, Japan)로, glutamic pyruvic transaminase(GPT)는 GPT/ALT -PIII Slide(Fujifilm Corporation, Japan)로 Fuji Dri-Chem Clinical Chemistry Analyzer (DRI-Chem 4000ie, Fujifilm Corporation, Japan)를 이용하여 측정하였다.

6) Immunohistochemistry

모든 실험이 끝난 직후 백서를 urethane(Sigma, USA)

으로 마취시킨 후, 0.9 % saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4 % formalin 용액(fixative) 800 ml로 심장을 통해 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 24시간 경과 후 고정시키고, 30 % sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μm 의 두께로 잘랐다.

뇌 조직을 초기에 0.1 M PBS에 3회 정도 세척하였고, 2 % 토끼 혈청으로 30분 blocking한 후, 각각 primary mouse monoclonal c-fos anti-body(1:40, Novocastra, United Kingdom) 를 사용하였다. 1차 항체는 0.1 M PBS에 2 % 토끼 혈청과 0.1 % sodium acid(Sigma, St Louis, MO, USA) buffer로 100배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 0.1 M PBS로 세척한 다음 biotinylated universal Secondary Antibody (Quick Kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 0.1M PBS로 3번 세척한 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 streptavidin peroxidase preformed complex(Quick Kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 담갔다. 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음 조직을 착색제로서 diaminobenzidine(DAB)을 사용하여 발현시키고, 0.1 PBS로 발색을 정지시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 cover glass를 덮은 후 광학 현미경(Nikon, Japan)을 200배 확대하여 central gray에서 c-Fos에 대한 immunoreactive 신경세포를 counting 하였다.

7) Total ribonucleic acid(RNA) 분리 및 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)

(1) Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 spinal cord 부위의 조직(20mg)을 500 μl TRIZOL reagent(Gibco-BRL, USA)로 균질화하고 균질액에 200 μl 의 chloroform(Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들어서 잘 혼합한 후, 실온상태에서 5분 방치하고 난 후 세포 유산물을 제거하기 위하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻은 상층액과 500 μl 의 isopropanol(Sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로

분리된 pellet에 냉장 보관된 70 % ethanol과 함께 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 넣고 4 °C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음, DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer(Eppendorf, Germany)에서 OD₂₆₀ 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다. 이들 spinal cord의 total RNA는 사용 시까지 -70 °C에서 보관하였다.

(2) RT-PCR

분리된 total RNA 3 µg과 2.5 µl Oligo(dT), DEPC-treated water를 RT premix(Bioneer, Korea)에 넣어 mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)를 이용하여 20 µl cytosine deoxyribonucleic acid(cDNA)를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)(sense primer: 5'-ACTCCATCA CCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTT CACCACCTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42 °C에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94 °C에서 5분 동안 denature 그리고 4 °C에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Bax, Bcl2, mGluR5 유전자에 대한 백서의 특이 primer는 PCR-premix kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Polymerase chain reaction은 cDNA 2 µl, sense primer 1 µl, antisense primer 1 µl, DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣었다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95 °C에서 30초 동안 pre-denaturation, 94 °C에서 40초 동안 melting, 55 °C에서 40초 동안 annealing, 72 °C에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72 °C에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 Bax 유전자 증폭을 primer(sense primer: 5'-CATCTTCT TCCAGA TGGTGA-3', antisense primer: 5'-GTTTCATCCAGGA TCGAGCAG-3'), Bcl2 유전자증폭을 primer(sense primer: 5'-CGGTTCAGGTA CTAGTCAT-3', antisense primer: 5'-ACTTTGCACAGATGTCCAGT-3'), mGluR5 유전자증폭을 primer(sense primer: 5'-TCCAATCTGCT CCTCC TACC-3', antisense primer: 5'-CAACGATGAA GAACTCT GCG-3')를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

이렇게 증폭된 Bax, Bcl2, mGluR5의 DNA를 ethidium bromide(EtBr, 10 mg/ml)를 포함한 1.5 % agarose gel에서 0.5x tris-borate-EDTA(TBE) buffer(80 mM Tris-

HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 70 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 image station(Kodak, USA)을 이용하여 촬영하였으며, Kodak MI Software(Kodak, USA)로 측정하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균값과 표준오차(mean ± SE)로 표시하였으며, Window용 SPSS(version 10.05, SPSS)를 이용하여, 비모수적 방법 중 Mann-Whitney U test를 시행하여 실험군 간의 통계적 유의성을 관찰하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

III. 결 과

1. Plantar 철회반응의 react time 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약 침을 처치한 후 withdrawal react time에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 1주째 100.0 ± 0.00 %, 2주째 120.7 ± 21.34 %, 3주째 99.9 ± 15.84 %, 4주째 133.1 ± 44.39 %, 5주째 106.4 ± 35.20 %, 6주째 77.7 ± 15.93 %를 나타내었다.

이에 비하여, 2주째에 PT3군이 69.4 ± 9.58 %를, 3주째 PT4군이 60.3 ± 10.25 %를, 그리고 6주째에 PT3군이 38.5 ± 9.37 %를 나타내어 각각 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$)(Table 1, Fig. 1).

2. Plantar 철회반응의 force intensity 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약 침을 처치한 후 withdrawal force intensity에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 1주째 100.0 ± 0.00 %, 2주째 114.9 ± 18.24 %, 3주째 95.2 ± 9.07 %, 4주째 96.3 ± 17.25 %, 5주째 85.7 ± 19.20 %, 6주째 81.9 ± 14.84 %를 나타내었다.

이에 비하여, 2주째에 PT3군이 71.4 ± 8.61 %를, 3주째 PT4군이 60.9 ± 10.07 %를, 4주째에 PT3군이 56.9 ± 6.87

Table 1. Effects of Pharmacopuncture(Clematis mandshurica Rupr.) on the WithdrawalReactTime in Neuropathic Pain Rats(%)

Weeks Group	1	2	3	4	5	6
CON	100.0 ± 0.00	120.7 ± 21.34	99.9 ± 15.84	133.1 ± 44.39	106.4 ± 35.20	77.7 ± 15.93
NDL	100.0 ± 0.00	127.9 ± 24.13	103.5 ± 8.70	101.4 ± 15.56	94.5 ± 12.35	91.3 ± 14.05
SAL	100.0 ± 0.00	141.7 ± 39.59	147.6 ± 41.23	129.4 ± 22.35	108.9 ± 15.36	111.3 ± 12.96
PT1	100.0 ± 0.00	93.3 ± 6.02	84.0 ± 9.97	78.4 ± 20.18	80.3 ± 27.39	66.5 ± 7.96
PT2	100.0 ± 0.00	89.9 ± 13.54	67.3 ± 11.44	62.6 ± 16.24	142.8 ± 80.60	57.2 ± 11.43
PT3	100.0 ± 0.00	69.4 ± 9.58*	70.2 ± 22.94	55.1 ± 7.75	57.5 ± 7.55	38.5 ± 9.37*
PT4	100.0 ± 0.00	85.9 ± 9.19	60.3 ± 10.25*	67.7 ± 4.70	69.6 ± 9.00	63.1 ± 10.67

Pharmacopuncture was treated on the rats for 6 weeks.

Results are shown as means ± SE.

* : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

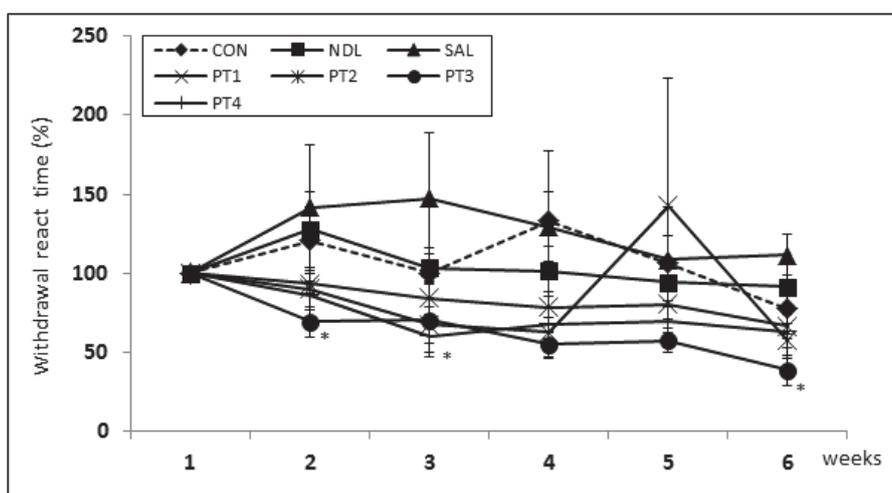


Fig. 1. Effects of pharmacopuncture(Clematis mandshurica Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the withdrawal react time in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment.

NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.

SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.

PT1 : neuropathic pain induced and 0,004 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT2 : neuropathic pain induced and 0,008 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT3 : neuropathic pain induced and 0,02 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT4 : neuropathic pain induced and 0,04 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.

Results are shown as mean ± SE.

* : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

%, 그리고 6주째에 PT3군이 40.0 ± 8.98 %를 나타내어 각각 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$)(Table 2)(Fig. 2).

3. mGluR5 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약

침을 처치한 후 L5 신경조직의 mGluR5 발현정도를 비교 관찰한 결과, control군은 113.3 ± 3.14(×1,000 OD), NDL군은 114.3 ± 2.74(×1,000 OD), SAL군은 118.3 ± 2.68(×1,000 OD), PT1군은 122.6 ± 2.76(×1,000 OD), PT2군은 125.2 ± 3.01(×1,000 OD), PT3군은 125.5 ± 4.36(×1,000 OD), PT4군은 124.4 ± 4.12(×1,000 OD)를 나타내었다.

Table 2. Effects of Pharmacopuncture(Clematis Mandshurica Rupr.) on the withDrawal forCe intensity in Neuropathic Pain Rats.(%)

Weeks Group	1	2	3	4	5	6
CON	100.0 ± 0.00	114.9 ± 18.24	95.2 ± 9.07	96.3 ± 17.25	85.7 ± 19.20	81.9 ± 14.84
NDL	100.0 ± 0.00	120.6 ± 22.84	108.3 ± 4.49	96.4 ± 15.11	99.7 ± 8.38	95.6 ± 10.10
SAL	100.0 ± 0.00	138.6 ± 36.69	144.2 ± 38.44	128.7 ± 21.86	108.5 ± 15.06	105.0 ± 15.36
PT1	100.0 ± 0.00	96.1 ± 3.40	86.4 ± 8.27	79.6 ± 19.00	82.4 ± 26.32	68.9 ± 7.02
PT2	100.0 ± 0.00	98.0 ± 16.67	73.3 ± 13.19	68.0 ± 16.53	70.0 ± 11.08	67.6 ± 13.09
PT3	100.0 ± 0.00	71.4 ± 8.61*	71.8 ± 22.18	56.9 ± 6.87*	59.3 ± 6.68	40.0 ± 8.98*
PT4	100.0 ± 0.00	86.2 ± 9.08	60.9 ± 10.07*	68.2 ± 4.67	70.1 ± 8.94	63.6 ± 10.42

Pharmacopuncture was treated on the rats for 6 weeks.

Results are shown as means ± SE.

* : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

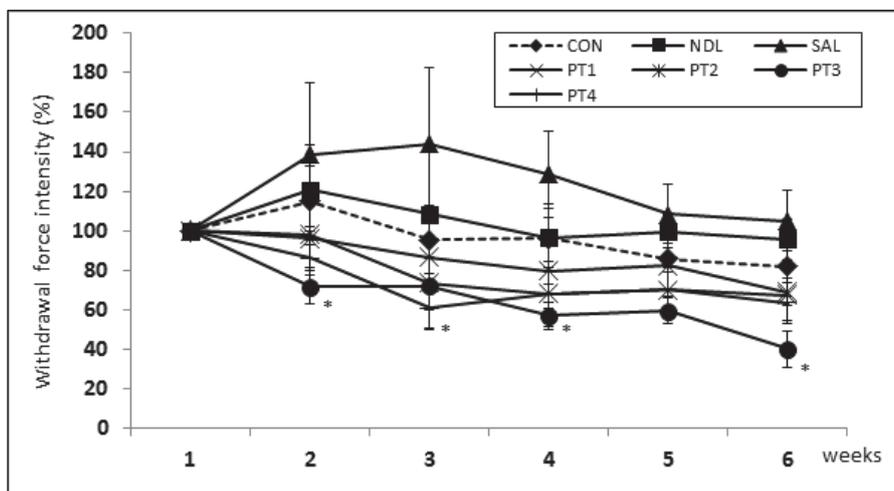


Fig. 2. Effects of pharmacopuncture(clematis mandshurica Rupr) at BL₂₃ acupoint on the withdrawal force intensity in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment.

NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.

SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.

PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.

PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.

Results are shown as mean ± SE.

* : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

Control군에 비하여 PT1군, PT2군, PT3군, 그리고 PT4군에서 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 3).

4. Bax 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약

침을 처치한 후 L5 신경조직의 Bax 발현 정도를 비교 관찰한 결과, control군은 105.3 ± 2.64(×1,000 OD), NDL군은 104.4 ± 1.20(×1,000 OD), SAL군은 112.0 ± 3.91(×1,000 OD), PT1군은 105.5 ± 3.93(×1,000 OD), PT2군은 101.8 ± 5.41(×1,000 OD), PT3군은 102.5 ± 4.49(×1,000 OD), PT4군은 94.2 ± 0.60(×1,000 OD)를 나타내었다.

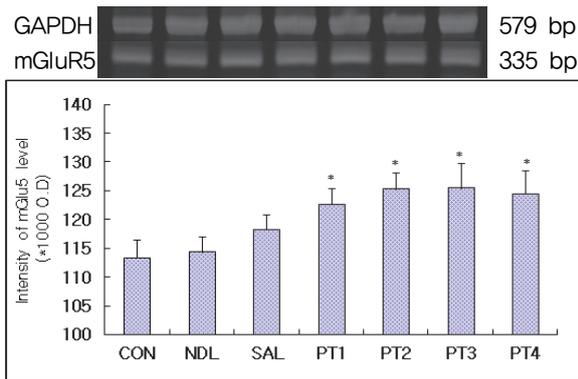


Fig. 3. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the the intensity of mGluR5 mRNA of nerve tissue in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment,
 NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃,
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃,
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.
 * : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

Control군에 비하여 PT4군에서 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 4).

5. Bcl-2 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치한 후 L5 신경조직의 Bcl-2 발현 정도를 비교 관찰한 결과, control군은 $98.9 \pm 3.52(\times 1,000 \text{ OD})$, NDL군은 $101.4 \pm 4.19(\times 1,000 \text{ OD})$, SAL군은 $102.7 \pm 4.56(\times 1,000 \text{ OD})$, PT1군은 $104.8 \pm 3.52(\times 1,000 \text{ OD})$, PT2군은 $104.3 \pm 4.24(\times 1,000 \text{ OD})$, PT3군은 $104.3 \pm 2.74(\times 1,000 \text{ OD})$, PT4군은 $103.4 \pm 1.16(\times 1,000 \text{ OD})$ 를 나타내었다.

Control군에 비하여 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 5).

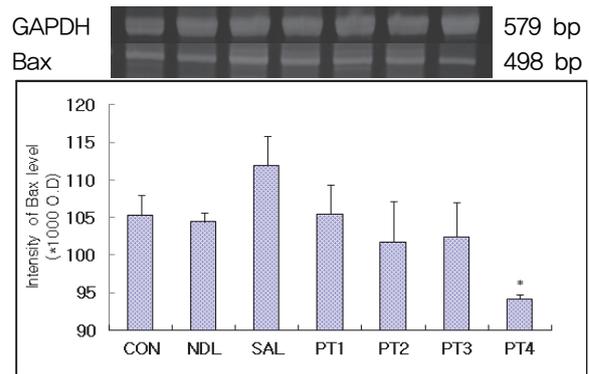


Fig. 4. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the the intensity of Bax mRNA of nerve tissue in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment,
 NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃,
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃,
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.
 * : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

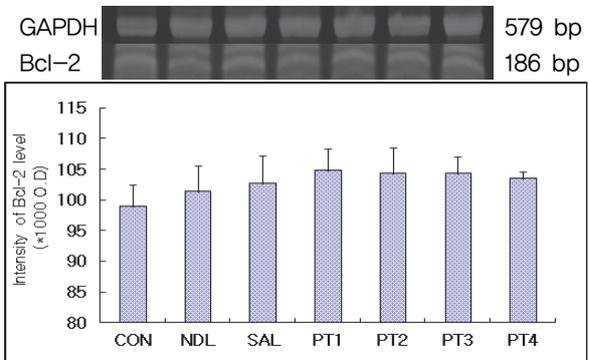


Fig. 5. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the the intensity of Bcl-2 mRNA of nerve tissue in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment,
 NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃,
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃,
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃,
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 µg/g/µl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.

6. Bax/Bcl-2 ratio 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약 침을 처치한 후 L5 신경조직의 Bax/Bcl-2 ratio 변화 정도를 비교 관찰한 결과, control군은 1.07 ± 0.063, NDL군은 1.04 ± 0.053, SAL군은 1.10 ± 0.086, PT1군은 1.01 ± 0.070, PT2군은 0.98 ± 0.091, PT3군은 0.99 ± 0.068, PT4군은 0.91 ± 0.014를 나타내었다.

Control군에 비하여 PT4군에서 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 6).

7. c-Fos 단백질 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약 침을 처치한 후 central gray 부분의 c-Fos 단백질 발현 정도를 비교 관찰한 결과, control군은 7.8 ± 3.07 numbers, NDL군은 17.8 ± 7.92 numbers, SAL군은 6.1 ± 1.72 numbers, PT1군은 62.7 ± 11.64 numbers, PT2군은 3.0 ± 1.21 numbers, PT3군은 83.1 ± 44.88 numbers, PT4군은 2.4 ± 2.37 numbers를 나타내었다.

Control군에 비하여 PT1군에서 유의한 증가를($p < 0.05$),

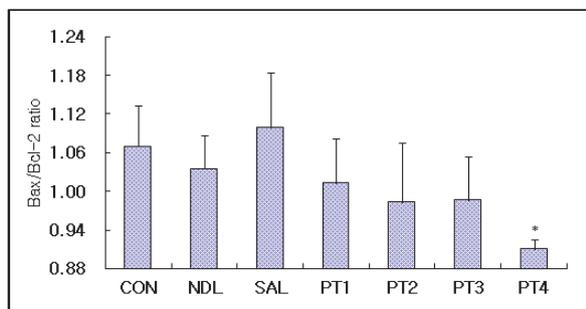


Fig. 6. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the the intensity of Bax/Bcl-2 ratio in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

Con : neuropathic pain induced and no treatment,
 NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.
 * : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

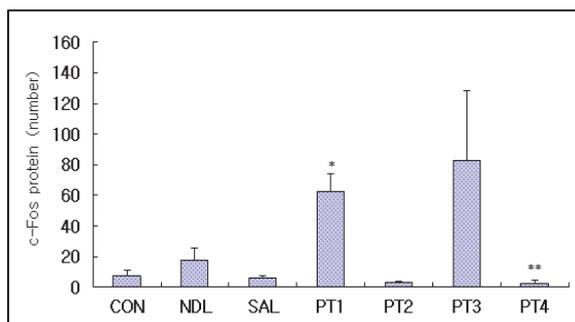


Fig. 7. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the c-Fos protein in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve
 Con : neuropathic pain induced and no treatment,
 NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$ as compared with the corresponding data of control group.

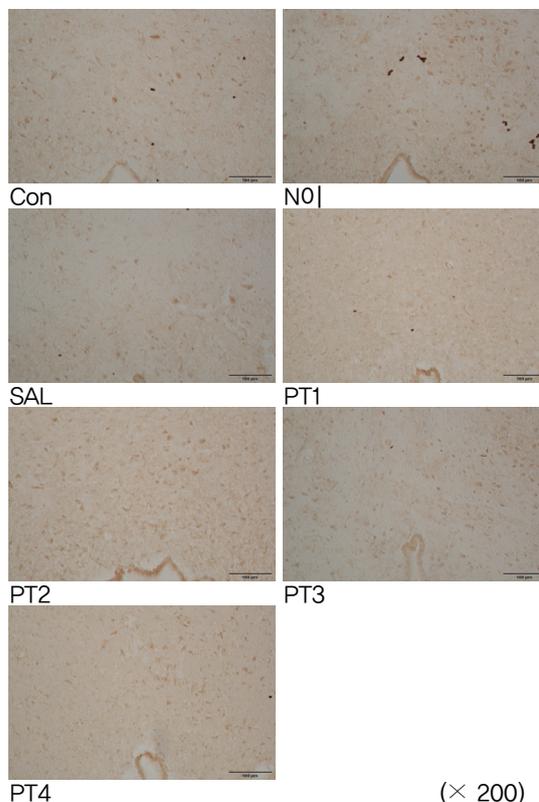


Fig. 8. Representative microphotographs of coronal sections for observation of c-Fos expression (× 200)

PT4군에서는 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.001$)(Fig. 7, 8).

8. AST 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치한 후 AST 변화정도를 비교 관찰한 결과, control군은 104.5 ± 5.25 U/l, NDL군은 100.0 ± 12.53 U/l, SAL군은 83.4 ± 6.58 U/l, PT1군은 74.8 ± 7.73 U/l, PT2군은 79.8 ± 5.68 U/l, PT3군은 74.0 ± 4.20 U/l, PT4군은 69.8 ± 5.43 U/l를 나타내었다.

Control군에 비하여 NDL군을 제외한 모든 실험군들에서 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 9).

9. ALT 변화

신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치한 후 ALT 변화 정도를 비교 관찰한 결과, control군은 28.5 ± 2.92 U/l, NDL군은 30.0 ± 2.92

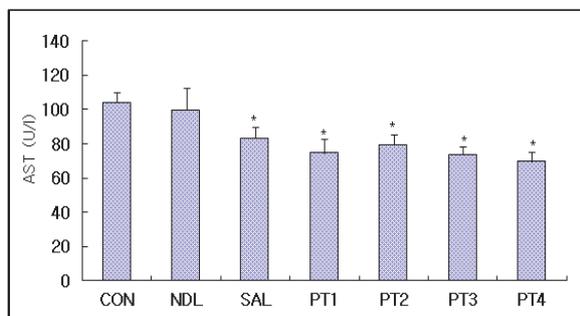


Fig. 9. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the AST in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve Con : neuropathic pain induced and no treatment.

NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.

Results are shown as mean±SE.

* : $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of control group.

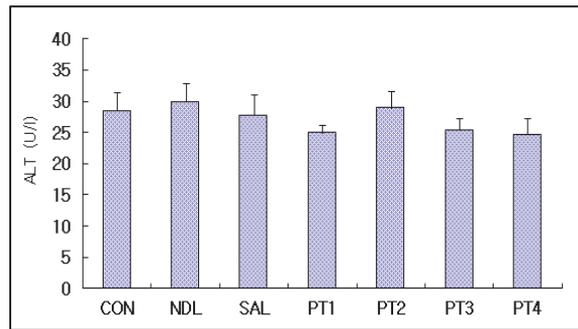


Fig. 10. Effects of pharmacopuncture(*Clematis mandshurica* Rupr.) at BL₂₃ acupoint on the ALT in neuropathic pain rats induced by ligation of L5 spinal nerve

NDL : neuropathic pain induced and dry needling at BL₂₃.
 SAL : neuropathic pain induced and saline injection at BL₂₃.
 PT1 : neuropathic pain induced and 0.004 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT2 : neuropathic pain induced and 0.008 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT3 : neuropathic pain induced and 0.02 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 PT4 : neuropathic pain induced and 0.04 μg/g/μl pharmacopuncture at BL₂₃.
 Results are shown as mean ± SE.

U/l, SAL군은 27.8 ± 3.35 U/l, PT1군은 25.0 ± 1.14 U/l, PT2군은 29.0 ± 2.61 U/l, PT3군은 25.4 ± 1.89 U/l, PT4군은 24.8 ± 2.58 U/l를 나타내었다.

Control군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 10).

IV. 고찰

통증이란 조직손상이나, 이러한 손상에 관련하여 표현되는 정상결과이며 일반적으로 모든 질병에 대해 생체가 자신의 상태를 인식하는 척도라고 볼 수 있다¹⁷⁾. 이런 통증은 일반적으로 치유되면서 자연히 소실된다. 그러나 신경계의 손상은 손상 부위가 치유되고 난 후에도 수개월에서 수년 까지도 지속적인 통증을 일으키기도 한다. 이때 통증은 외상이나 질환에 의해 말초신경, 척수 후근, 척수, 뇌 부분에서 손상이 발생하며 이러한 신경계 손상의 결과 발생하는 통증을 신경병리성 동통이라고 한다. 또한, 반사성 교감신경성 위축증과 같이 신경계에 뚜렷한 손상 없이 유사한 통증을 나타내는 경우가 있는데 이런 경우에도 치유된 후 오랜 기간 통증이 지속되고 증상이 유사하며 발견되지 않은 신경계의 기능장애에 의한다고 여겨지며, 이 또한 신경병

리성 동통으로 생각된다⁸⁾.

신경병리성 동통은 1872년 Mitchell¹⁾이 처음 보고한 이후로 현재까지 그 기전이 명확하게 규명되지는 않았으나, 현재까지 밝혀진 신경병리성 동통의 병태생리학적 원인으로는 말초성 기전으로 절단된 신경말단부위에서 신경중이 생성되어 자발방전하거나, 자극에 과도하게 반응하거나 주위 신경의 방전에 함께 반응하는 기전과, 중추신경계 기전으로 척수 부위에서 자극원의 소실과 그에 따른 변성으로 유해 자극에 대한 흥분성 항진 및 상척수부에서의 조절이상 등의 기전이 있다⁹⁾. 또한 유전적 요인, 관련된 신체 부위의 미사용, 중추신경계 손상 등의 비심리적인 요인 이외에 정서, 성격, 행동 등 여러 가지 심리적인 요인 또한 영향을 미칠 수 있다²⁰⁾.

신경병리성 동통은 만성통증의 하나로서 임상적으로 신경병리성 동통이 있는 환자에서 관찰되는 증상으로는 자발적 통증, 이질통, 과통증 등이 있으며, 자주 교감신경계와 관련된 동통을 수반한다. 자발적 통증은 아무런 자극을 가하지 않아도 통증감을 느끼는 것이 특징적이며 정상적으로는 동통을 일으키지 않는 자극에 대해서도 동통을 느끼는 것을 이질통(allodynia)라고 한다. 과통증(hyperalgesia)은 정상적으로도 동통을 일으키는 자극에 대해 더 심한 통증을 느끼는 것을 말한다.

이러한 신경병리성 동통을 연구하는 동물 모델로는 Bennett와 Xie²¹⁾의 만성적 압박 손상 모델이나, Seltzer et al²²⁾ 부분적 좌골신경 결찰 모델, Kim과 Chung²³⁾ 척수 신경 결찰 모델, DeLeo et al²⁴⁾이 개발한 좌골신경 동결 모델 등이 있으며, 이번 실험에서는 L5 신경을 직접 결찰하는 모델을 사용함으로써 임상에서 보는 환자들이 겪는 추간판탈출증으로 인한 신경병리성 통증과 보다 유사한 병리 상태를 유발하여 근접한 조건을 조성하였다.

한의학에서 통증의 발생은 經絡氣血의 運行阻滯, 즉 不通則痛으로 보는데, 氣血運行이 阻滯하면 經맥의 영양작용이 실조되어 麻木이 발생하며, 또한 인체 국소의 經脈氣血이 壅阻하므로 流行不暢하고, 氣血이 응체되면서 국소조직에 종창, 동통이 발생한다고 하였다. 추간판탈출증은 신경병리성 동통 모델에 근접하며 한의학적으로는 腰脚痛, 腰脚痠攣, 股髀痛 등으로 痺의 범주에 두고 있다. 경락을 통한 氣血運行이 장애를 받음으로써 생겨나는 痺證에 대하여 《黃帝內經·素問·痺論》에서 “痺者閉也, 氣血凝滯不行也, 有風寒濕三氣之痺, 有皮肌脈筋骨五臟外合之痺”라 하였고, 그 증상으로 《諸病源候論·四肢痛無常處候》에서 “其痛處不腫, 色亦不異, 但肉裏掣痛與錘刀所刺”라 하여 신경통증의 증상을 표현하고 있으며, 《黃帝內經·靈樞·經脈篇》에서 所生病으로서 跗外廉, 足趺上的 통증은 胃經의 病이고, 腰, 尻,

臑, 膕, 脚의 통증은 膀胱經의 病이며, 髀, 膝外, 脛, 絕骨, 外踝 前側의 통증은 膽經의 病이라 하여 통증의 부위에 따라 관계된 경락이 다르다는 것을 밝혔다.

腎俞(BL₂₃)는 足太陽膀胱經의 23번째 經穴이며 背俞穴로서 오장육부의 氣가 背部의 특정 혈위에 유주하는 곳으로 腎臟의 氣가 유주한다⁷⁾. 《黃帝內經·靈樞·背俞》에서 “五臟之俞 出於背 … 按其處 應在中而痛解 乃其俞也 氣盛則瀉之 虛則補之”라 하여 배수혈의 치료활용을 언급하였다. 취혈은 척추 부위, 뒤 정중선 가쪽으로 1.5촌, 허리 척추뼈의 가시 돌기 아래와 수평인 부위에서 하며 滋補腎陰, 強腰脊, 祛水濕 등의 穴性이 있어서 임상에서 腎虛腰痛, 遺精, 疝痛, 虛勞, 腰膝痠痛 등에 응용되어⁷⁾ 본 연구에서 선정하였다.

약침요법은 경락학설에 의거하여 질병과 유관한 혈위, 반응점 혹은 체표의 양성 반응점 등에 한방 약물을 직접 주입하여 자침과 약물작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法이다²⁵⁾. 따라서 약침의 效能은 鍼術의 신속성과 韓藥의 안정성과 유효성이 인체 내에서 상승작용을 하며 직접적으로 나타나는 데 이러한 效能은 모든 疾患에서 발휘되지만 특히 慢性 難治病, 成人病, 腫瘍 및 疼痛性 疾患 등에서 특수한 효과를 나타내고 있다²⁶⁾.

威靈仙은 미나리아재비과에 속한 多年生 落葉性 蔓莖植物인 아리아와 威靈仙 및 棉團鐵線蓮의 根과 根莖을 건조한 것으로 약리학적 주요 성분은 anemonin, anemonol, sterol, saccarides, saponin, lacton, phenols and amino acid 등으로 밝혀져 있으며, 性味가 辛散溫通하고 性猛善走하므로 肌表에 작용하여 表에 있는 風濕의 邪氣를 祛하며 經絡을 通하게 하여 止痛케 되므로 風濕痺痛을 치료하는 要藥이 되며, 風邪가 偏勝하여 流走性으로 肢體가 疼痛하는 證에 사용된다¹⁰⁾. 《本經疏證》²⁷⁾에는 宣通五臟하며 腹內冷滯와 心膈痰水久積, 癱瘓, 痲痺, 腰膝冷痛을 다스린다고 하였고, 《景岳全書》²⁸⁾에는 性味가 溫하여 腰膝肢體冷痛을 치료하며, 性利善走하여 痛風을 치료하는 要藥이라 하였고, 《醫學入門》²⁹⁾에서는 歷節痛風이 身體上下部로 돌아다닐 때와 腰, 膝, 脚이 冷痛할 때, 皮膚風痺, 白癩 등을 치료하며 十二經脈을 疏通케 하는 治痛의 要藥이라하여 威靈仙이 痛症을 치료하는데 쓰였음을 알 수 있다.

이에 저자는 신경병리성 동통 모델에 관한 연구 중 Chiang et al¹⁶⁾의 신경병리성 동통 모델에 腎俞(BL₂₃)에 봉독요법을 통한 연구와 威靈仙약침을 이용한 연구 중 Chang et al³⁰⁾의 통풍에 관한 연구, Choi et al³¹⁾의 급성 통증에 관한 연구, Lee et al³²⁾의 류마티스성 관절염에 대한 연구에서 착안하여 신경병리성 동통 모델 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 응용한 본 연구에서 유의한 결과를 얻었기에

보고하는 바이다.

본 연구에서 시행한 행동학적 검사 중 물리적 자극에 의한 회피반응의 측정에 사용한 Dynamic Plantar Aesthesiometer는 자동화된 Von Frey 방식으로 Von Frey 방식이란 Von Frey filament를 이용하여 이질통에 대한 철회반응(withdrawal response)의 정량화를 통하여 측정할 수 있기 때문에 신경병리성 동통 동물 모델에서 사용되는 방법으로²³⁾ 본 연구에서는 점진적으로 힘을 증가시켜며 기계적 이질통을 유발하여 철회반응(withdrawal response)의 react time과 force intensity를 측정할 수 있어 Von Frey 측정법보다 보완된 측정법으로 이번 연구에 채택하였다.

Dynamic Plantar Aesthesiometer를 이용하여 물리적으로 이질통을 발생시킨 후 plantar 철회반응의 react time의 변화를 관찰한 결과 대조군에 비해서 2주째에 PT3군이 69.4 ± 9.58 %를, 3주째 PT4군이 60.3 ± 10.25 %를, 그리고 6주째에 PT3군이 38.5 ± 9.37 %를 나타내어 각각 유의한 감소를 보였으며, plantar 철회반응의 force intensity의 변화를 관찰하니 대조군에 비해서 2주째에 PT3군이 71.4 ± 8.61 %를, 3주째 PT4군이 60.9 ± 10.07 %를, 4주째에 PT3군이 56.9 ± 6.87 %를, 그리고 6주째에 PT3군이 40.0 ± 8.98 %를 나타내어 각각 유의한 감소를 보였다. 이는 葸靈仙약침이 신경 결찰로 인해 손상된 白鼠 신경의 낮아진 역치를 높여줌으로써 회피반응의 감소를 보이는 것으로 말초신경손상에 의한 통증을 억제시킬 가능성을 제시한다.

Glutamate는 중추신경계에서 가장 널리 분포하며 주요한 흥분성 신경전달물질로, 이러한 신경전달 물질은 허혈 세포에서 방출되어 신경세포를 흥분시켜 나트륨과 칼슘을 세포 내로 유입하여 비가역적인 세포 손상을 일으킨다. 증가된 glutamate 농도 혹은 이후의 자극 반응이 간질, 뇌경색, 우울증, 통증 등의 중추신경계질환의 병리학적 기전에 관련되어 있으며, 신경병리성 통증의 동물모델에서 통증의 유도 및 유지에 glutamate receptor modulator가 연관됨이 밝혀졌다³³⁾.

Glutamate receptors에는 iGluRs(ionotropic glutamate receptors)와 mGluRs(metabotropic glutamate receptors)가 있는데 mGluRs는 제1군 mGluRs(mGluR1, 5)와 glutamatergic terminal에서의 시냅스 전 억제작용에 의한 신경보호 작용이 있는 것으로 알려진 제2군(mGluR2, 3)과 제3군(mGluR4, 6, 7, 8) mGluRs의 세 군으로 분류된다³⁴⁾. 특히 mGluR5는 산소결핍이나 nitric oxide 독성에 대한 신경보호 및 신경조직형성의 작용이 있으며 허혈 상황에서 그 기능이 감소되는 것³⁵⁾으로 알려져 있다.

본 연구에서, 각 군의 L5 신경조직의 mGluR5 발현정도

를 비교 관찰한 결과, control군에 비하여 PT1군, PT2군, PT3군, 그리고 PT4군들에서 유의한 증가를 나타내었다. 이는 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 葸靈仙약침 처치가 mGluR5 발현에 유의한 효과가 있음을 알 수 있다($p < 0.05$)(Fig. 3).

Bcl-2/Bax family는 apoptosis 초기 단계의 조절자로서 pro-apoptotic protein인 Bax와 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 상호작용은 apoptosis 과정에서 필수적이다³⁶⁾. Bcl-2와 Bax는 서로 dimer를 이루며, 만일 Bax가 주중단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고, Bcl-2가 주중이면 apoptosis가 억제된다. 즉 Bax와 Bcl-2는 서로 heterodimer를 이루므로써 미세한 발현의 차이로 이 현상을 조절한다³⁷⁾. 최근에 척수 신경 결찰에 의한 척수신경 세포에서의 변화가 세포사멸과 관련되어 있다는 보고²³⁾들이 있어 본 연구에서 측정하였다.

본 연구에서, 각 군의 L5 신경조직의 Bax발현 정도를 비교 관찰한 결과, control군에 비하여 PT4군에서 유의한 감소를 나타내어 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 葸靈仙약침 처치가 Bax 발현의 감소에 유의한 효과가 있음을 알 수 있다($p < 0.05$)(Fig. 4). 이어서, 각 군의 L5 신경조직의 Bcl-2 발현정도를 비교 관찰한 결과, control군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았으나(Fig. 5), Bax/Bcl-2 ratio 변화정도를 비교 관찰한 결과, Control군에 비하여 PT4군에서 유의한 감소를 나타내어($p < 0.05$)(Fig. 6) 이상의 결과로 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 葸靈仙약침 처치가 heterodimer를 이루는 Bax 발현을 감소시킴으로써 Bax/Bcl-2 ratio 역시 감소되며 최종적으로 apoptosis의 억제에 유의한 효과를 보여 손상부위의 신경세포 보호에 긍정적인 것으로 사료된다.

진통 효과가 있는 약물의 효능 검증 방법 중에서 조기 발현 유전자(immediate early gene)의 하나인 c-Fos에 의하여 생산되는 c-Fos 단백질을 면역조직화학염색법을 이용하여 관찰하는 신경해부학적 방법이 널리 사용되고 있다³⁸⁾. c-Fos 발현에 따른 Fos 면역 반응성 세포를 찾는 것은 자극의 종류에 따라 반응하는 부위가 다르기 때문에 중추 신경계를 해부학적으로 규명하는데 이용되며 각종 감각 수용체가 자극된 후의 신경 전달 경로를 보여주는 지표와 신경 손상에 따른 중추 신경의 활성을 보여주는 간접적인 지표로 이용되며, 유해성 자극에 대한 통증 정도를 확인하는데 활용되고 통증 정도와 Fos 단백질 발현량이 비례하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. 이에 대하여 Min et al⁴⁰⁾ 등에 의하면 신경병리성 통증 모델 白鼠의 뇌 가운데 대뇌피질, 편도핵, 시상, 시상하부에서 Fos 단백질의 발현이 유의성 있게 증

가함이 관찰되었다.

이에 본 연구에서, 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치한 후 central gray 부분의 c-Fos 단백 변화 정도를 비교 관찰한 결과, ontrol군에 비하여 PT1군에서 유의한 증가를($p < 0.05$), PT4군에서는 유의한 감소를 나타내어($p < 0.001$)(Fig. 7, 8) 객관적으로 PT1군에서는 신경병리성 동통이 증가되었고, PT4군에서는 신경병리성 동통이 감소된 것을 보여주는 수치이다. 그러나 다른 군과 비교했을 때 농도 의존성 경향을 보이는 것이 아니므로 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침이 중추신경계 손상에 의한 신경병리성 동통에 미치는 영향에 대하여 향후 실험 및 임상연구를 통하여 명확히 구명해야할 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서 威靈仙약침이 간 기능에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 혈청 내 AST(aspartate transaminase), ALT(alanine transaminase)를 측정하였다. AST, ALT는 일반적으로 간장의 손상 정도를 확인하는 효소 관련 검사법으로 AST는 간, 심장, 근육, 신장에 존재하는 효소로서 이들 조직이 손상되면 혈중으로 유리되어 수치가 증가된다. ALT는 간에 대부분 존재하는 효소로 간 손상 시 수치가 증가한다.

본 연구에서, 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치한 후 AST, ALT 변화 정도를 비교 관찰한 결과, AST에서는 control군에 비하여 NDL군을 제외한 모든 실험군에서 유의한 감소를 나타내었고($p < 0.05$)(Fig. 9), 威靈仙약침의 농도 의존성을 보였으며, ALT에서는 control군에 비하여 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 10). 이것으로 보아 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침을 처치하는 것이 간 기능에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, AST에 대해서는 威靈仙약침의 농도에 따라 의존적으로 유의한 효과를 나타내었음을 알 수 있다. 이에 대해서는 穴位보다 威靈仙약침의 효과를 더욱 기대해 볼 수 있음을 시사하며 추가적인 연구가 필요 하리라 사료된다.

이상의 결과들을 종합해보면 L5 척수신경 결찰에 의한 신경병리성 동통을 유발한 白鼠의 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침 중 PT3, 4군이 물리적 이질통으로 인한 Plantar 철회반응에 유의한 효과를 보였고, mGluR5 발현에서 모든 약침군이 유의한 효과를 보였으며, Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2 ratio의 변화에서 PT4군이 유의한 효과를 보였으며, c-Fos 단백 발현 변화에서 PT1군이 유의한 증가를, PT4군이 유의한 감소를 보였으며, 威靈仙약침이 ALT, AST를 통하여 간 기능에 부정적인 영향을 미치지 않고, 나아가 AST에서 유의한 효과를 보이는 것을 확인했다. 즉, 腎俞(BL₂₃)에 威靈仙약침이 신경병리성 동통을 억제하며, 나아가

anti-apoptosis 작용과 신경보호 작용에도 영향을 미치며, 간 기능에 부정적인 영향이 없음을 시사하였다.

V. 결 론

腎俞(BL₂₃) 威靈仙약침의 농도별 처치가 L5 척수신경 결찰로 인해 신경병리성 동통이 유발된 白鼠의 plantar 철회반응의 변화, mGluR5 발현 정도, Bax, Bcl-2의 발현 정도, Bax/Bcl-2 ratio 변화, c-Fos 단백 발현 정도, 혈청 내 AST, ALT 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 물리적 이질통으로 인한 plantar 철회반응의 변화를 대조군에 비하여, react time에서 2주째에 PT3군이, 3주째 PT4군이, 그리고 6주째에 PT3군이 각각 유의한 감소를 보였으며, force intensity에 있어서 2주째에 PT3군이, 3주째 PT4군이, 4주째에 PT3군이, 그리고 6주째에 PT3군이 각각 유의한 감소를 보였다.
2. mGluR5의 발현 변화에서 대조군에 비하여 PT1, 2, 3, 4군에서 유의한 증가를 보였다.
3. Bax, Bcl-2의 발현 변화, Bax/Bcl-2 ratio에서 대조군에 비하여 PT4군만이 Bax 발현의 유의한 감소를 보이고, 또한 Bax/Bcl-2 ratio의 유의한 감소를 보였다.
4. c-Fos 단백 발현 변화에서 대조군에 비하여 PT1군에서 유의한 증가를, PT4군에서 유의한 감소를 보였다.
5. AST, ALT 변화에서 대조군에 비하여 NDL군을 제외한 모든 실험군에서 유의한 감소를 나타내었다.

VI. References

1. Mitchell SW. Injuries of nerve and their consequences. Philadelphia, PA : JB Lippincott, 1872 : 252.
2. Loeser JD, Butler SH, Chapman CR et al. Painful nertopathies, Bonica's management of pain, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001 : 371-85.

3. Lee BH, Son JH, Park YG. Effectiveness of opioids in the management of neuropathic pain. *The Journal of Korean Society for Brain and Neural Science*. 2001 ; 1(1) : 53-64.
4. Baron R. Peripheral neuropathic pain from mechanism to symptoms. *Clinical Journal of Pain*. 2000 ; 16(2) : S12-S20.
5. Jung JH, Cho MR, Wei TS, Ryu CR. Effects of acupuncture, electro acupuncture, low level He-Ne laser therapy at TE₅, GB₄₁ on spinal nerve ligation model in rats. *The Acupuncture*. 2007 ; 24(5) : 137-50.
6. Scientific Committee of Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopuncturology*. Seoul : Elsevier Korea, 2008 ; 3, 6-8.
7. The Compilation Committee of The Korean Acupuncture & Moxibustion Society. *The acupuncture & moxibustion I*. Gyeonggi : Jipmoondang. 2008 : 136-7.
8. Wang JJ. *Acupuncture & Moxibustion Ja-Seng-Gyeong*. Seoul : Iljungsa, 1991 : 78.
9. Chea WS. *GyeongHyuljipseong*. Seoul : Deaseong-munhwasa, 1995 : 185-6.
10. Korean Medicine Univ Herbology prof coeditorship. *Herbology*. Seoul : Younggrimsa, 1991 : 261-2.
11. Kim SN, Kim SC, Choi HG et al. Inhibitory effect of scolopendrid aqua-acupuncture injected at GB₃₀ on neuropathic pain in rats. *The Acupuncture*. 2004 ; 21(3) : 145-67.
12. Lee DH, Youn DH, Na CS, Yoon YC. Effect of bee venom acupuncture injected at GB₃₀ on neuropathic pain in rats. *The Acupuncture*. 2005 ; 22(5) : 67-77.
13. Jung JH, Yun DW, Na CS, Ryu CR, Yun YC, Cho MR. Effects of acupuncture at SI₃, BL₄₀, SI₃ · BL₄₀ on neuropathic pain control and c-Fos protein expression in rats. *The Acupuncture*. 2004 ; 21(1) : 240-51.
14. Oh CL, Na CS, Lyu CY, Cho MR. Inhibitory effects of electroacupuncture & acupuncture at SI₃, BL₄₀, SI₃ · BL₄₀ on neuropathic pain in rats. *The Acupuncture*. 2005 ; 22(1) : 77-90.
15. Bang SP, Ryu MS, Kim JH, et al. Effects of radix aconiti herbal acupuncture injected at GB₃₀ on neuropathic pain in rats. *The Acupuncture*. 2009 ; 26(6) : 67-76.
16. Chiang SY, Bang SP, Kim JH et al. Effects of bee venom acupuncture at BL₂₃ and BL₂₅ in different concentration on neuropathic pain induced by tibial and sural nerve injury in rats. *The Acupuncture*. 2010 ; 27(5) : 13-24.
17. Lee BH, Won R, Beck EJ, Moon CH. Electrophysiological study on sympathetically independent neuropathic pain produced by injury of the sciatic nerve branches. *The J of Korean Psychology*. 1998 ; 10(1) : 19-29.
18. Yun DM. Neuropathic pain. *The Korean Journal of Pain*. 1995 ; 8(2) : 219-24.
19. Robert WJ. A hypothesis on the physiological basis for causalgia and related pains. *Pain*. 1986 ; 24(3) : 297-311.
20. Lee BH, Son JH. Diagnosis, treatment and psychology of chronic pain. *Korean Psychology Society Spring Symposium*. 1996 : 227-8.
21. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988 ; 33(1) : 87-107.
22. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990 ; 43(2) : 205-18.
23. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992 ; 50(3) : 355-63.
24. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S et al. Characterization of a neuropathic pain model: Sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain*. 1994 ; 56(1) : 9-16.
25. Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopuncture matter and clinical practice(I)*. Seoul : The Publishing Department of Korean Pharmacopuncture Institute. 2001 : 227.
26. Baik SI, Ahn JC, Kim YJ, Kim HS, Kwon KR. Type analysis of pharmacopuncture patters published in *The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion*. *The Acupuncture*. 2006 ; 23(6) : 19-27.

27. Im JS. *Bongyeongsojeung ha*. Seoul : Ahteejeon, 1998 : 708-8.
28. Jeon YM redaction. Reorganization *Gyeongak-jeonseo Bonchojeung*. Seoul : Daeseong Publishing Company, 1999 : 392.
29. Ahn BG. Korean translation *Euhakibmun II Bonchosang*. Seoul : Namsandang, 1974 : 214-5.
30. Chang HS, Han SW, Choi JB. The effect of aqua-acupuncture with *Clematis florida* thubn extract solution on the pathological findings of the gout induced in rats. *The Acupuncture*, 1994 ; 11(1) : 485-98.
31. Choi WJ, Kim KB, Kim KH, Kim JH. Analgesic effect of *Clematidis radix* herbal acupuncture on the test rats with induced acute pain. *The Acupuncture*, 2009 ; 26(6) : 91-100.
32. Lee JS, Kim KH, Lee SD, Kim KS. The effect of *Clematidis radix* herbal acupuncture solution, on collagen, adjuvant, Lipopolysaccharide and phospholipase A2 induced rheumatoid arthritis in mice. *The Acupuncture*, 2012 ; 29(1) : 127-37.
33. Schkeryantz JM, Kingston AE, Johnson MP. Prospects for metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in the treatment of neuropathic pain. *J Med Chem*, 2007 ; 50(11) : 2563-8.
34. Kim HG, Kim PJ, Beck SW, Kim IS, Jung GS. Molecular biologic study on the changes of glutamate receptor(mGluR5) in rat hippocampus after brain ischemia. *The Korean Journal of Critical Care Medicine*, 2000 ; 15(2) : 75-81.
35. Yeh TH, Wang HL. Global ischemia downregulates the function of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 2005 ; 29(3) : 484-92.
36. Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 1997 ; 20 : 245-67.
37. Park C, Choi YH, Lee WH, Choi BT, Lee YT, Kim GC. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 in oak smoke flavoring(holyessing)-induced apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, 2003 ; 17(1) : 85-90.
38. Bester H, Matsumoto N, Bessen JM. Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-Fos study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 1997 ; 383(4) : 439- 58.
39. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*, 1990 ; 296(4) : 517-30.
40. Min JH, Park JM, Moon DU, Kim SN, Jung C, Kim GH. Fos expression in the brain of neuropathic pain rats. *Korean Journal of Anesthesiology*, 2001 ; 41(2) : 229-37.