



## 족삼음경의 락혈에 시술된 침 자극에 의한 NO, NOS, NE 발현 연구

이유미 · 신 욱 · 최동희 · 김미래 · 나창수 · 윤대환

동신대학교 한의과대학 경락경혈학교실

### Studies on NO, nNOS, eNOS, iNOS and NE Expression by Acupuncture at SP4, KI4 and LR5

Yumi Lee, Wook Shin, Donghee Choi, Mirae Kim, Changsu Na, Daehwan Youn

Department of Acupoint & Meridian, College of Korean Medicine, Dongshin University

**Objectives :** The acupuncture about acupoint affects the production of NO, NOS, and NE. Local action of acupuncture is important for acupuncture treatment. To prove this, the revelation degree of NO, NOS, and NE was observed by stimulating the acupuncture at the connecting point of SP4, KI4, and LR5 in the depths of Superficial layer, Middle layer and Deep layer. **Methods :** Needles were inserted into rats, on each right and left sides of the connecting point, SP4, KI4 and LR5 acupoints which are the stream points of the foot meridian. After insertion, needles were retained for three minutes. After the retention, rat was sacrificed via cardiac puncture, and tissues of each SP4, KI4 and LR5 point near meridian vessel was extracted to examine the changes in the expression of NO, NOS and NE. **Results :** In terms of the effect in NO production, there was significant increase in the Superficial layer, Middle layer and Deep layer at KI4. In terms of the effect in NE production, there was significant decrease in the Superficial layer at SP4 and increase in the Superficial layer, Middle layer and Deep layer at LR5. In terms of the effect in nNOS production, there was significant increase in the Superficial layer, Middle layer and Deep layer at SP4 also in the Superficial layer at KI4. In terms of the effect in eNOS production, there was a significant increase in the Superficial layer, Middle layer and Deep layer at SP4, KI4 and LR5. In terms of the effect in iNOS production, there was significant increase in the Superficial layer, Middle layer and Deep layer at SP4, KI4 and LR5. **Conclusions :** The effect of acupuncture applied at the connecting point of six meridians of the foot on the activities of NO, NOS and NE could be observed, and it can be induced from the effect of needle stimulation on disrupted local and systemic nervous responses.

**Key words :** connecting point, NO, nNOS, eNOS, iNOS, norepinephrine

## 서 론

NO(Nitric Oxide)는 신경 전달과 같은 뇌하수체 기능이나 관상 동맥 색소, mRNA 유전자 등을 조절하는 기능을 가져 그 조절이 허혈성 뇌졸중, 심장마비, 뼈 및 결합 조직 치료 등 의학적으로 많은 관심을 가지고 있는 질병의 치료와 예방에 도움이 되는 중요한

지표로서 사용되고 있다<sup>1)</sup>.

NO는 nNOS(neuronal NOS), eNOS(endothelial NOS)와 iNOS(inducible NOS)의 작용에 의해 생성되어지며, NOS도 활성 정도에 따라 조직과 세포간의 항염 및 치유 작용 등에 영향을 미친다<sup>2)</sup>. NE(norepinephrine)는 항염증 및 신경보호 기능을 가진 신경 전달물질로서 세포독성을 조절함으로써 알츠하이머 등의 뇌 병변 치

Received March 13, 2017, Revised March 21, 2017, Accepted March 21, 2017

Corresponding author: Daehwan Youn

Department of Acupoint & Meridian, College of Korean Medicine, Dongshin University, 185 Gunjae-ro, Naju 58245, Korea  
Tel: +82-61-330-3527, Fax: +82-61-330-3519, E-mail: human22@dsu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

료에 효과가 있는 것으로 보아 신경전달물질은 스트레스, 우울증, 외상 또는 내상 등의 회복에 있어서 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다<sup>3-5)</sup>.

Lim<sup>6)</sup>은 심혈관 질환이나 당뇨병 등에 대해 eNOS의 활성을 증가시켜 NO생성을 유도함으로써 혈관보호 작용이 발휘된다고 하였고, Cho<sup>7)</sup>는 nNOS가 후두의 기능회복에 영향을 미친다고 하였으며, Oh<sup>8)</sup>는 iNOS 조절이 고지방식이 유도 지방조직의 섬유화 및 염증 방지 작용이 있음을 보고하였고, Yang 등<sup>3)</sup>은 NE 조절 작용에 의한 뇌신경보호 기능과 항염증 작용이 있음을 보고하였다.

최근 연구에서 NO는 면역 조직, 심혈관 조직, 신경 조직에서 발견되는 free radical로서 생물의 병리 및 생리 작용에서 중요한 역할을 하며<sup>2)</sup>, 경혈의 위치가 NO의 생성 위치와 흡사하다는 점을 통해 경혈에 침 자극을 시행한 한의학적인 접근 방법이 NO와 NOS 및 NE 발현 작용에 기인함으로써 치료효과가 있음을 보고한 바 있는데, 즉 Kim<sup>9)</sup>은 수경의 五腧穴 중 經火穴에 침자를 시행하기 전후 차이에서 침에 의한 자극이 혈위의 속성과 부위에 따라 NO와 NOS 및 NE 발현 정도가 다를 수 있다고 하였으며, Choi<sup>10)</sup>는 족경의 五腧穴 중 輸穴에 침자를 시행하기 전후 차이에서 혈위마다 조직 및 혈장내 NO, NOS, norepinephrine 및 epinephrine에 영향을 미침을 보고하였다.

경혈에 대한 침자의 작용은 得氣에 의하여 발현되며, 得氣는 해당 혈위의 수기 자극에 의한 작용이 주요한 영향을 나타내는 것으로 보고 있으며<sup>11)</sup>, 이에 대하여 Langevin<sup>12)</sup>은 생체 조직에서 침시술시 침을 돌리는 捻轉法이나 침을 꽂았다 뺐다 하는 提插法 등의 手技法에 따라 피하 결합 조직이 침체 주위를 감싸면서 부착되는 기계적인 자극이 得氣 작용에 주요하게 관련되어 있음을 관찰하여 침자의 작용이 시술 부위의 국소 작용이 중요함을 제시하고 있다.

Lee 등<sup>2)</sup>과 Shin 등<sup>13)</sup>은 수삼양경 및 수삼음경의 락혈에 시술된 침자의 NO, NOS, norepinephrine 및 epinephrine 변화는 해당 혈위 및 자침 깊이에 따라 차이를 보고한 바 있으나, 족삼음경과 족삼양경의 락혈에 대한 신경전달 물질 발현 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 본 연구에서는 족삼음경의 락혈에 침자를 표층, 중간층, 심층의 깊이별로 시술하여 해당 부위의 NO와 NOS 및 NE 발현을 관찰한 바, 다음과 같은 지견을 얻었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

1) 실험 동물: 실험 동물은 400~450 g 16주령의 Sprague-Dawley계 수컷 rats(Samtaco, Korea)을 사용하였으며, 동신대학교 동물실험윤리에 따라 사육 및 처치하였다(동물실험 승인번호: 2015-06-03). 사육되는 동물은 12시간 간격으로 명암조절이 되었고, 항온 항습(23±1°C, 50±10%)이 유지되는 사육 환경에서 사육하였고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 실험군: 각 실험군들은 군당 5마리씩 사육부터 실험 종료까지 실험기간의 전 과정을 동일하게 처치되었으나, 족경의 각 경락에 해당하는 絡穴인 족태음비경의 公孫(SP4), 족소음신경의 大鍾(KI4), 족궤음간경의 蠡溝(LR5)으로 3개의 군으로 구분한 후 각 혈위에서 superficial Layer, middle Layer, deep Layer 등 3개 깊이로 분리하여 실험하였다.

### 2. 실험 방법

1) 취혈 및 자침: 족삼음경의 絡穴에 해당하는 3개 혈위에 대하여 Koo 등<sup>14)</sup>과 WHO 표준경혈위치 등<sup>15)</sup>의 기준을 참고하여 인체와 상응한 부위로 취혈하였다.

족태음비경의 公孫은 엄지발가락의 metatarsal bone과 cuneiform의 관절부위에, 족소음신경의 大鍾은 medial process of calcaneus의 바로 위에, 족궤음간경의 蠡溝는 prominence of medial malleolus와 무릎관절사이로 발 아래에서 1/3되는 곳에 인체와 상응하는 부위로 취혈하였다.

실험동물을 침자전에 80% 산소와 20% 질소가 혼합되어 있는 가스에 5% isoflurane(Choongwae, Korea)을 사용하여 호흡마취를 유지시킨 후 숙련된 전문가 1인이 침자를 시행하였고, 이때 SP4 혈과, KI4혈의 superficial layer군의 침자 깊이는 지각층으로 피부에서 약 0.5 mm, middle layer군의 침자 깊이는 진피층으로 약 1 mm, deep layer군의 침자 깊이는 진피하층으로 약 2 mm로, LR5혈의 superficial layer군의 침자 깊이는 지각층으로 피부에서

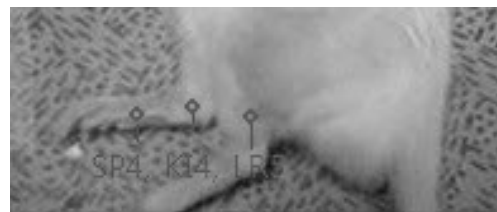


Fig. 1. SP4, KI4, SP5 position.

약 1 mm, middle layer군의 침자 깊이는 진피층으로 약 2 mm, deep layer군의 침자 깊이는 진피하층으로 약 3 mm로 수직으로 자침하고, 3분간 유침하였으며, 호침(0.25×15 mm, Dongbang, Korea)을 사용하였다. 정확한 깊이에 자침하기 위한 방법으로 버니어 캘리퍼스를 사용하여 사용되는 호침마다 깊이 표시를 하여 자침하였다(Fig. 1).

**2) 조직 준비:** NE production을 얻기 위한 피부조직은 자침 시와 동일하게 버니어 캘리퍼스를 사용하여 해당 락혈 부위를 포함하는 조직을 자침 위치에서 1 mm×1 mm×1 mm 크기로 적출하여 0.1 M perchloric acid 500  $\mu$ l와 homogenize(KIKA Works[Asia] Sdn. Malaysia)하고, 이를 10,000 g에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant를 분리하였다.

NO assay를 얻기 위한 조직 샘플은 NE와 동일하게 조직을 적출하여 1× 농도의 Protease Cocktail inhibitor(BD, USA)가 포함되어 있는 NP40 lysis buffer 500  $\mu$ l를 넣어 homogenization하고 sample을 20분 동안 ice상태에 놓아둔 후 12,000 rpm에서 4°C상태로 20분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 super-

natant를 분리하였다.

**3) NO 측정:** 락혈 부위의 조직 내 NO 함량을 측정하기 위해 Griess 시약을 이용하여  $\text{NO}_2^-$ 와  $\text{NO}_3^-$ 을 분석하였다.

조직의 단백질 시료 40  $\mu$ l와 MOPS buffer(pH 7.0, 50 mM MOPS/1 mM EDTA) 45  $\mu$ l를 혼합한 후 reconstituted E.coli nitrate reductase(500  $\mu$ l MOPS buffer에 1 unit nitrate reductase가 용해된 농도) 5  $\mu$ l를 더하고 2 mM NADH 10  $\mu$ l를 가하여 20분 동안 실온에서 반응시키고 50  $\mu$ l Griess reagent A와 반응시킨 다음, 50  $\mu$ l Griess reagent B와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후에, purple azo dye가 생성이 되면 Micro plate reader(Spectra max m2e, USA)로 540 nm에서 흡수율을 측정하였으며,  $\text{NaNO}_3$ 표준곡선을 기준으로 Nitrite 농도를 계산하였다.

**4) 조직학적 관찰:** 락혈 부위의 광학현미경 관찰을 위하여 채혈을 끝낸 실험동물의 락혈 부위 조직을 적출하여 bouin solution(Sigma, Germany) 용액에 24시간 동안 고정시킨 다음, 50% ethanol~100% ethanol II, ethanol/xylene(1:2)액에 각각 1시간 동안 통과시켜 탈수하고 60°C incubator에서 xylene/paraffin(1:1)과 xylene/paraffin(1:2), xylene/paraffin(1:3) 및 hard paraffin 용액으로 2시간

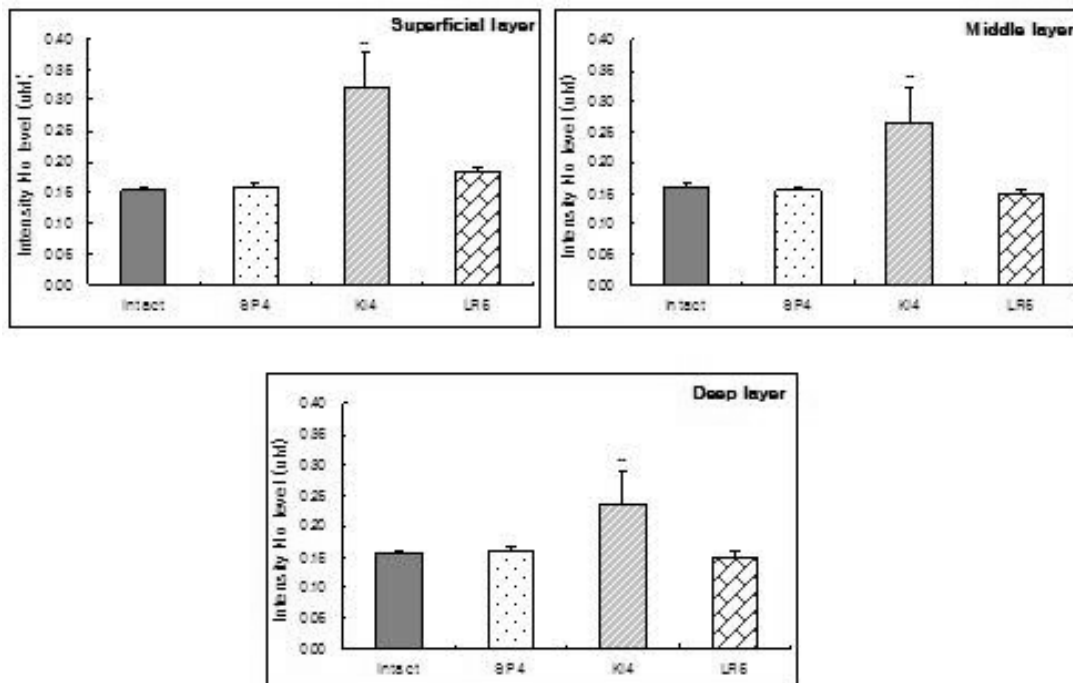


Fig. 2. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints SP4, KI4, LR5 on the nitrite/nitrate levels.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Intact, the mean value of the acupoints without acupuncture treatment was averaged; SP4, acupuncture treatment was applied to each layer of SP4; KI4, acupuncture treatment was applied to each layer of KI4; LR5, acupuncture treatment was applied to each layer of LR5; Values are expressed Mean±SE. \*\* $p$ <0.01 compared with intact.

씩 처리한 후 paraffin mold에 포매하였다.

Paraffin 처리된 조직은 Rotary microtome(RMC Product, USA)을 사용하여 6~7 μm 두께로 절편을 제작한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하고, 광학 현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 100배율로 관찰하였다. 염색된 각각의 NOS-positive cell은 육안으로 관찰하여 연구자 2인이 개수를 counting하였다.

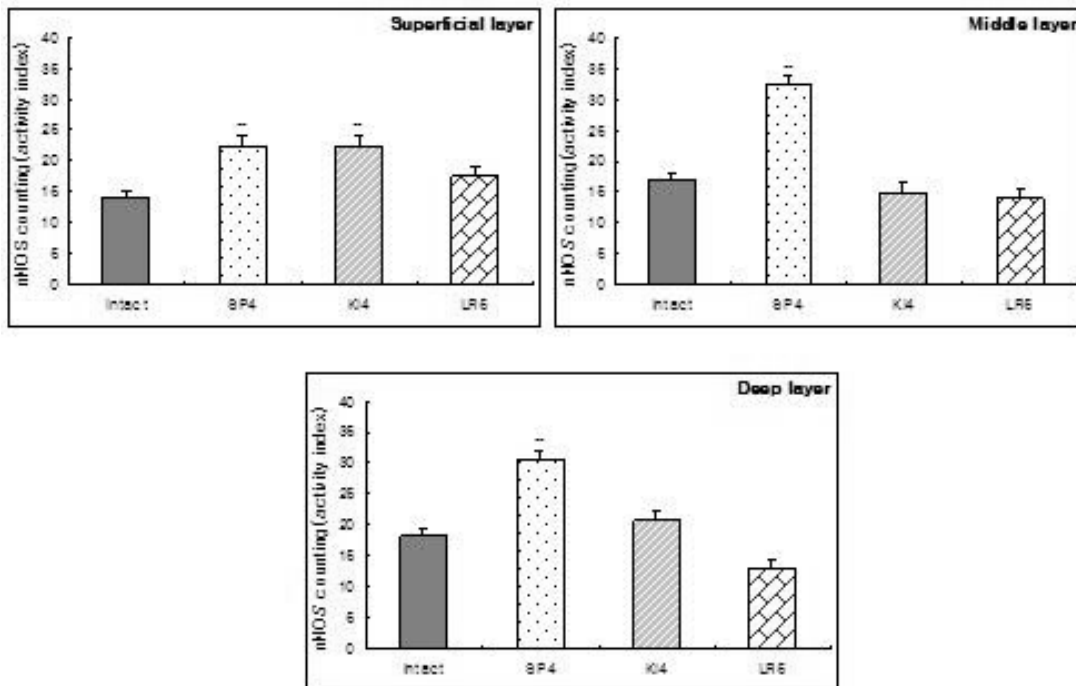
**5) 면역조직화학 측정:** 절편 제작한 조직을 0.1 M PBS에 3회 세척하였고, 2% rabbit 혈청으로 40분 blocking을 한 후, 각각 Rabbit anti-nNOS(Invitrogen, USA)와 anti-iNOS(Abcam, England)를 각각 1:100 배율로, anti-eNOS(Abcam, England)는 1:200배율로 antibody를 사용하였다. 1차 항체는 0.1 M PBS에(0.1% sodium azide(Sigma, USA)가 포함된) 희석하여 준비하였다. 조직 샘플은 1차 항혈청에 4°C를 유지하며 60시간 동안 배양하였다. 그 후 조직을 3번 이상 0.1 M PBS로 세척하고 2차 항체(Quick Kit: Vector Laboratories, USA)를 실온에서 40분 동안 반응시켰다.

그 후 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음 실온에서 40분간 Streptavidin peroxidasepreformed complex(Quick Kit : Vector Laboratories, USA)에 담구었다. 0.1 M PBS로 3회 정도 세척한

조직을 diaminobenzidine(DAB)을 사용하여 발색시키고, 0.1 M PB로 발색된 것을 정지 시킨 다음 Hematoxyline으로 대조 염색 과정을 거친 후 슬라이드를 dehydration한 후에 광학현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 200배율로 관찰하였다.

**6) Norepinephrine 분석:** LC-MS/MS를 활용한 norepinephrine 분석 : 1,200 series LC(Agilent, USA)와 연결된 6,410 MS(Agilent, USA)를 사용하며, positive electrospray ionization(ESI) mode로 분석을 실시하였고, Column은 YMC-Pack Pro C8을 사용하였으며, 이동상으로 5 mm 정도의 0.1% formic acid 및 ammonium acetate 가 혼합된 증류수(A)와 5 mm 정도의 0.1% formic acid 및 ammonium acetate가 혼합된 methanol(B)을 Table-0과 같은 조건으로 0.3 ml/min의 유속을 사용하였다.

Norepinephrine 검출을 위해 selected ion monitoring 조건으로 각각 166.0 m/z와 152.1 m/z를 사용하고, Nebulizer 압력은 20 psi, capillary voltage는 4kV로 설정하며, gas flow와 온도는 10 l/min과 320°C로 유지한다. 각 물질의 함량은 표준물질 2.5 ppm, 0.50 ppm, 0.125 ppm (μg/ml)을 standard로 하여 작성한 검량선을 사용함으로 시료 중 함량을 계산하였다.



**Fig. 3.** Effect of acupuncture at varying depths at acupoints SP4, KI4, LR5 on immunoreactivity for neuronal nitric oxide synthase(nNOS). Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Intact, the mean value of the acupoints without acupuncture treatment was averaged; SP4, acupuncture treatment was applied to each layer of SP4; KI4, acupuncture treatment was applied to each layer of KI4; LR5, acupuncture treatment was applied to each layer of LR5. Values are expressed Mean±SE. \*\**p*<0.01 compared with intact.

### 3. 통계 처리

본 연구에서 모든 측정값은 Excel program(Microsoft, USA)을 이용하였고 평균치와 표준 오차값(mean±standard error)을 표시하였다. 실험군들 간의 통계학적 분석은 SPSS 21 ver. for windows를 사용하여 하였고, 비모수적인 방법으로는 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 실험의 분석에서 각 실험군은 무처치군에 비하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. NO 함량 변화

NO발현에 대한 변화를 침자의 깊이별로 관찰한 결과, 무처치군에 비하여 KI4군은 깊이별로 모두 유의한( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으며, SP4군과 LR5군은 깊이별로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

### 2. nNOS 발현

nNOS 발현에 대한 변화를 침자의 깊이별로 관찰한 결과, 무처치군에 비하여 SP4군이 깊이별로 모두 유의한( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으며, KI4군은 superficial layer에서 유의한 ( $p < 0.01$ )이 증

가를 나타내었으며, LR5군은 깊이별로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figs. 3, 4).

### 3. eNOS 발현

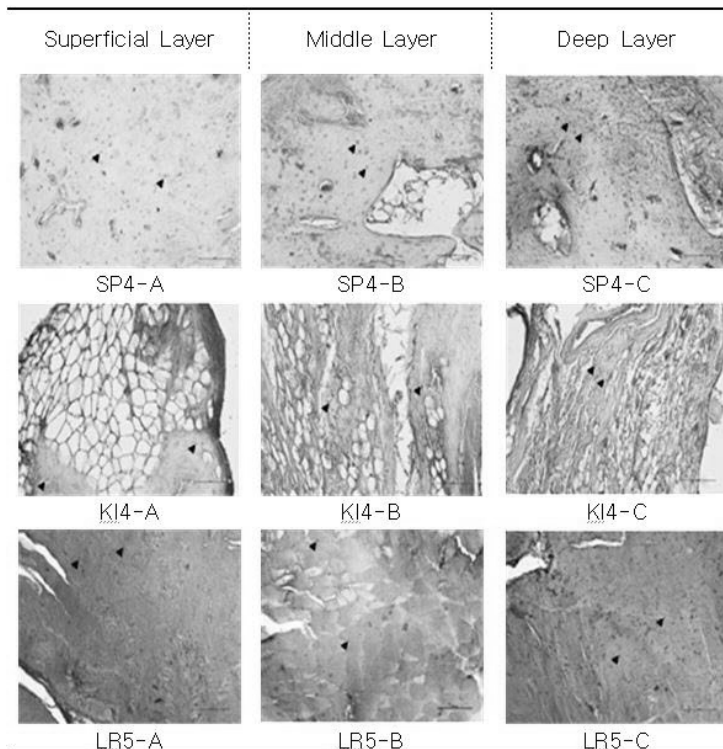
eNOS 발현에 대한 변화를 침자의 깊이별로 관찰한 결과, 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군은 깊이별로 모두 유의한( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었다(Figs. 5, 6).

### 4. iNOS 발현

iNOS 발현에 대한 변화를 침자의 깊이별로 관찰한 결과, 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군은 깊이별로 모두 유의한( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었다(Figs. 7, 8).

### 5. Norepinephrine 함량 변화

Norepinephrine 발현에 대한 변화를 침자의 깊이별로 관찰한 결과, 무처치군에 비하여 SP4군은 superficial layer에서 유의한( $p < 0.05$ )은 감소를 나타내었고, LR5군은 깊이별로 모두 유의한( $p < 0.01$ )이 증가를 나타내었으며, KI4군은 미량의 검출로 인하여 유의성을 평가할 수 없었다(Fig. 9).



**Fig. 4.** Microphotographs of immunoreactivity pattern for neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in rat. SP4, KI4, LR5 groups were treated acupuncture at each acupoint. A, B and C are each depths of acupuncture points. Scale bar=200  $\mu$ m.  $\times 100$ . A, superficial layer; B, middle layer; C, deep layer.

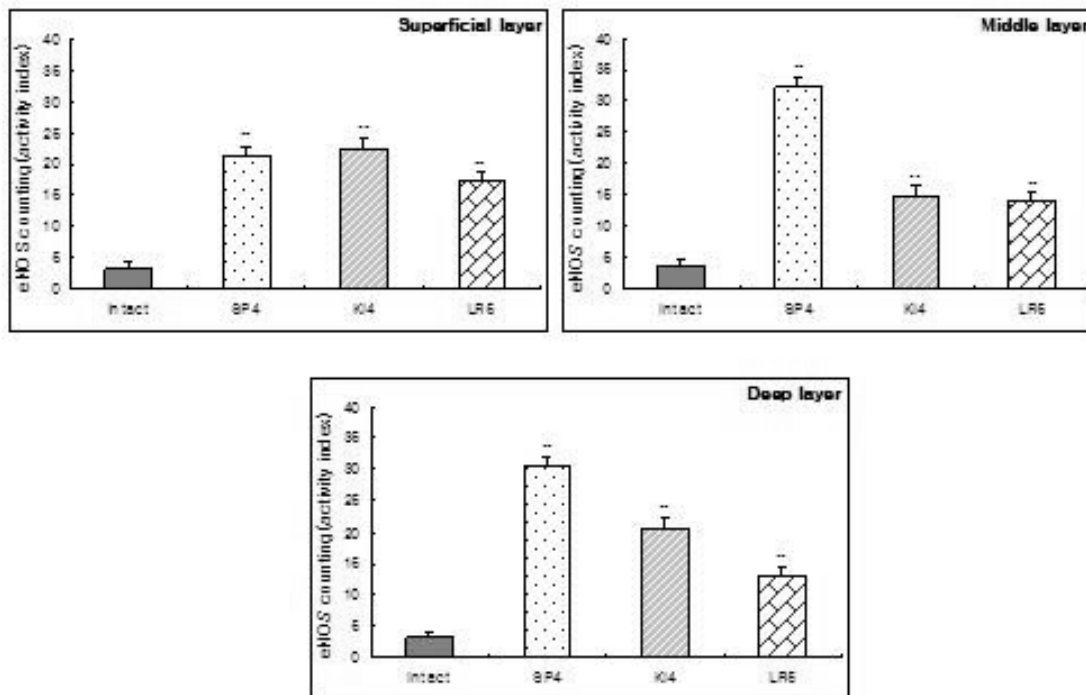


Fig. 5. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints SP4, KI4, LR5 on immunoreactivity for endothelial nitric oxide synthase(eNOS). Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Intact, the mean value of the acupoints without acupuncture treatment was averaged; SP4, acupuncture treatment was applied to each layer of SP4; KI4, acupuncture treatment was applied to each layer of KI4; LR5, acupuncture treatment was applied to each layer of LR5. Values are expressed Mean±SE. \*\* $p < 0.01$  compared with intact.

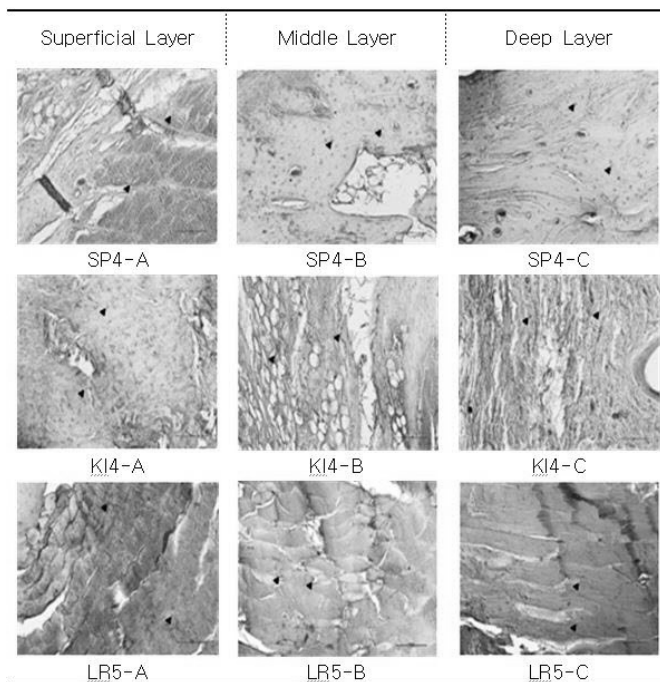
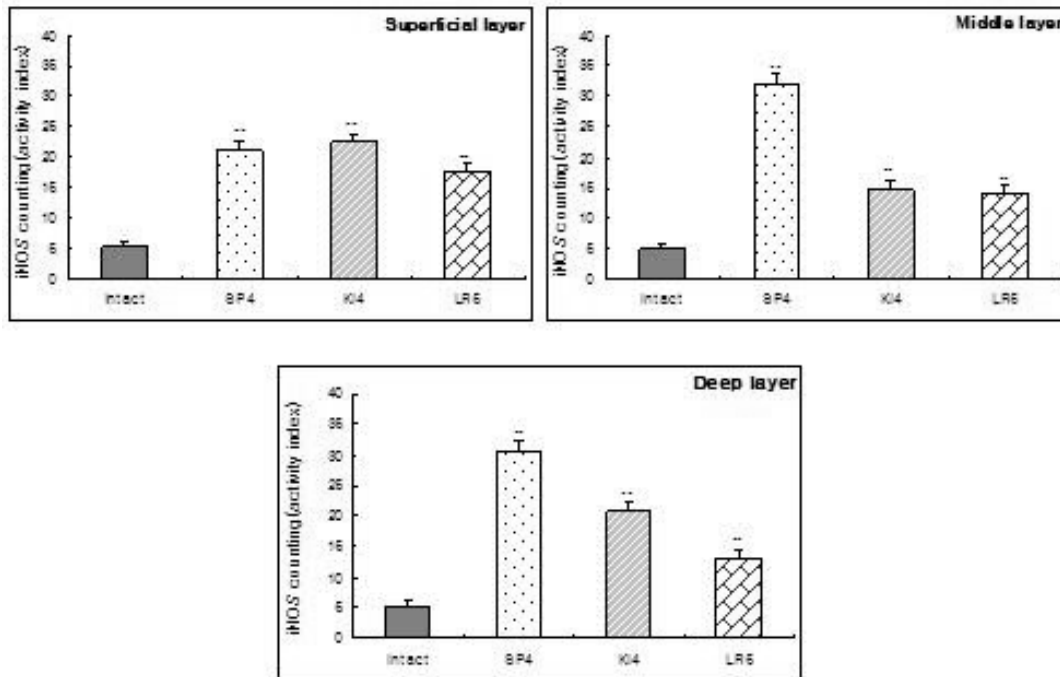
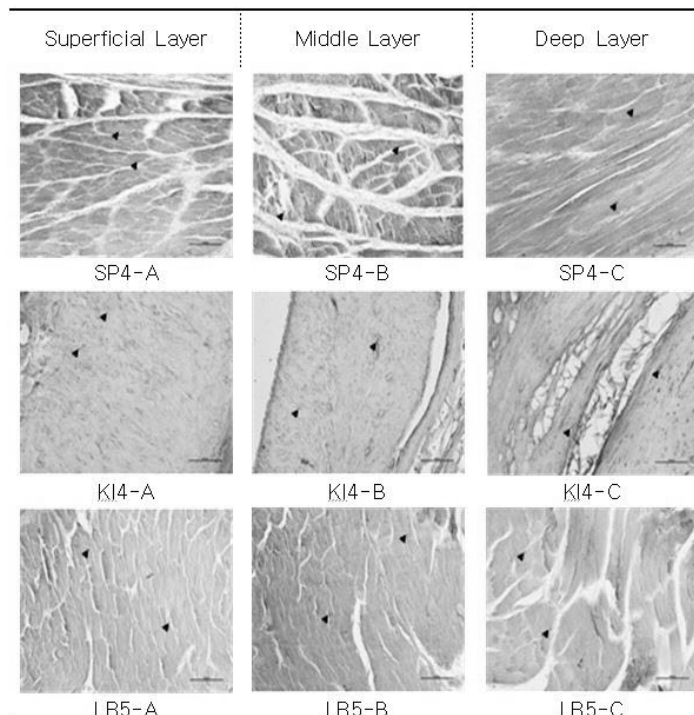


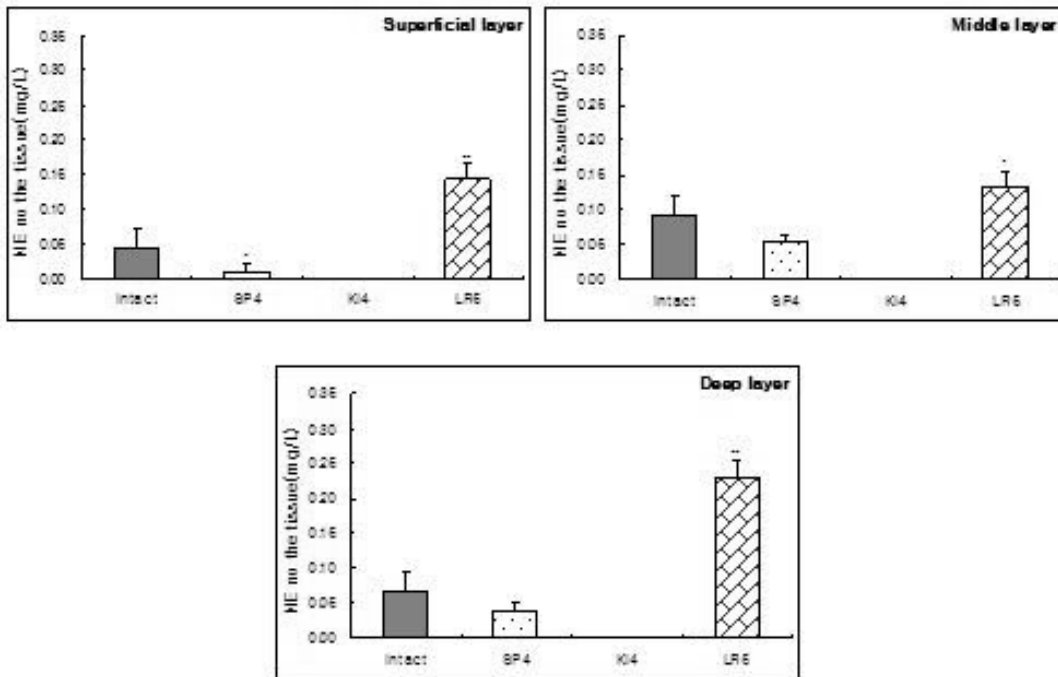
Fig. 6. Microphotographs of immunoreactivity pattern for neuronal nitric oxide synthase(eNOS) in rat. SP4, KI4, LR5 groups were treated acupuncture at each acupoint. A, B and C are each depths of acupuncture points. Scale bar=200  $\mu$  m.  $\times 100$ . A, superficial layer; B, middle layer; C, deep layer.



**Fig. 7.** Effect of acupuncture at varying depths at acupoints SP4, KI4, LR5 on immunoreactivity for inducible nitric oxide synthase(iNOS). Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Intact, the mean value of the acupoints without acupuncture treatment was averaged; SP4, acupuncture treatment was applied to each layer of SP4; KI4, acupuncture treatment was applied to each layer of KI4; LR5, acupuncture treatment was applied to each layer of LR5. Values are expressed Mean±SE. \*\* $p < 0.01$  compared with intact.



**Fig. 8.** Microphotographs of immunoreactivity pattern for neuronal nitric oxide synthase(iNOS) in rat. SP4, KI4, LR5 groups were treated acupuncture at each acupoint. A, B and C are each depths of acupuncture points. Scale bar=200  $\mu$ m.  $\times 100$ . A, superficial layer; B, middle layer; C, deep layer.



**Fig. 9. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints SP4, KI4, LR5 on the concentration of norepinephrine.** Each Acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Intact, the mean value of the acupoints without acupuncture treatment was averaged; SP4, acupuncture treatment was applied to each layer of SP4; KI4, acupuncture treatment was applied to each layer of KI4; LR5, acupuncture treatment was applied to each layer of LR5. Values are expressed Mean±SE. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  compared with intact.

## 고찰

經穴은 인체의 기가 출입하고 활동하는 문호로서 체표, 경락 및 장부가 서로 통하는 부위이며, 경혈에 시술된 침구치료는 경락과 장부의 기능 조절을 통하여 질병의 예방과 치료 작용을 발휘 한다<sup>16</sup>.

경혈의 작용은 국소에 발현되는 득기감이 중요하데, 기를 얻음을 기준으로 삼는 득기는 그 정도가 침 치료 효과의 속도와의 밀접한 관련이 있으며, 침 치료 과정에서 지표가 되는 가치를 갖고 있고, 성공적인 침 치료를 위해서 반드시 확보해야 하는 조건으로 가치를 갖는다<sup>11</sup>.

Langevin<sup>12</sup>의 연구에서는 침시술시 이루어지는 자극에 따라 피부 밑의 결합 조직이 침체 주위를 감싸면서 부착되는 기계적인 자극이 득기 작용에 주요하게 영향을 미침을 밝힘으로 경혈에 대한 침자의 작용은 해당 혈위의 국소 작용이 중요함을 제시한 바 있다.

경혈의 침자의 작용을 국소적으로 관찰하기 위하여 Ma 등<sup>17</sup>과 Ting 등<sup>18</sup>은 NO의 생성을 유도하였을 때 시간이 지날수록 비경혈점보다 경혈점에서 NO가 높게 생성됨이 관찰되어 경혈의 국소적인 연계작용이 신경전달계에 영향을 미침을 제시하였으며, Kim<sup>9</sup>과 Choi<sup>10</sup>는 오수혈에 침자하였을 때 NO, NOS, NE의 발현을 유

도하여 신경전달계에 영향을 끼칠 수 있음을 보고하였고, Lee 등<sup>2</sup>과 Shin 등<sup>13</sup>은 수경의 락혈에 침자를 깊이별로 시행했을 때 혈위마다 각 깊이별로 NO, NOS, NE의 발현 정도가 차이가 있어 경혈 자극시 적절한 깊이가 경혈의 국소적인 연계작용이 신경전달계에 영향을 미칠 것이라고 보고하였으나, 추후 연구가 필요하다고 하였다. 이에 본 연구에서는 족삼음경의 락혈에 깊이별로 침 자극을 시행하였을 때 NO, nNOS, eNOS, iNOS, NE의 발현을 통해 경혈의 국소 작용을 관찰하고자 하였다.

본 연구에서 조직 내 NO 함량 변화의 경우 무치치군에 비하여 KI4군이 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었으며 깊이가 깊어질수록 감소하였다. 침자를 시행하기 전과 후의 NO 함량 변화에 미치는 영향을 비교한 Kim<sup>9</sup>의 연구에서도 KI4 침자 시행 전과 후의 차이를 나타내었다.

조직 내 nNOS 발현의 경우 무치치군에 비하여 SP4군이 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었으며 superficial layer에 비해 middle layer와 deep layer에서 특히 높았으며, superficial layer에서는 KI4군이 증가를 나타내었다. 침자를 시행하기 전과 후의 혈위 조직 내 nNOS 함량 변화에 미치는 영향을 비교한 Kim<sup>9</sup>과 Choi<sup>10</sup>의 연구에서는 대부분의 혈위에서 감소를 나타내었으며, 깊



이별로 침자를 시행한 후 혈위 조직 내 nNOS 함량 변화를 관찰한 Lee 등<sup>2)</sup>과 Shin 등<sup>13)</sup>의 연구에서는 middle layer와 deep layer에서 유의함을 나타내었다. 수경에 비해 족경에서 침자 전과 후의 nNOS 함량 변화 차이가 뚜렷함을 나타내었고, nNOS 함량 변화는 수경의 경우 양경은 증가를, 음경은 감소를 나타내었으며 족경은 수경과 반대 경향을 나타내었다.

조직 내 eNOS 발현의 경우 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군이 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었으며, superficial layer에 비해 middle layer와 deep layer에서 특히 높았다.

조직 내 iNOS 발현의 경우 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었으며, superficial layer에 비해 middle layer와 deep layer에서 특히 높았다.

조직 내 norepinephrine 함량 변화의 경우 무처치군에 비하여 LR5군이 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었으며, SP4군은 superficial layer에서 감소를 나타내었고, KI4군에서는 매우 낮은 검출로 인하여 증감을 평가하기가 어려움이 있었다. Choi<sup>10)</sup>의 연구에서도 LC-MS/MS 검출 한계에 미치지 못할 정도로 tissue의 norepinephrine 양이 극소량으로 존재하여 변화가 관찰되지 않았다는 보고와 관련되는 것으로 사료된다. 수삼양 락혈, 수삼음 락혈에 대한 norepinephrine 변화 연구에서 LI6군은 middle layer에서, TE5군은 middle layer와 deep layer에서 유의하게 증가함을 보고하였으며<sup>2)</sup>, PC6군은 deep layer에서 유의하게 감소함을 보고하였다<sup>13)</sup>. 이러한 결과는 혈위가 위치하고 있는 해당 부위의 피부 조직 분포와 관련이 있는 것으로 사료된다.

각각의 조직 내 NO, nNOS, eNOS, iNOS, NE의 발현을 종합하였을 때, NO의 경우 근육, 건, 신경 등 여러 조직이 분포되어있는 KI4와 같은 혈위에서 높은 발현을 나타내었으며, NOS, eNOS, iNOS의 경우 깊은 부위에서 높은 발현을 나타내었고, NE의 발현의 경우 조직이 많은 혈위에서 높은 발현을 나타내었다.

경혈을 이용한 치료는 장부와 연결된 각 혈위를 자극함으로써 해당 환부의 치료 및 통증 감소의 효과를 준다. 본 연구를 통해 이 혈위에 대하여 위치와 깊이에 따른 자극을 조절함으로써 생체 내 변화를 줄 수 있다면 경혈 자극을 통해 일어나는 침 치료에 대한 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 iNOS의 발현은 염증과도 관련이 있어 염증 유발을 통한 경혈로서의 기능 향상에 대한 가설이나 유침 외 수기법 등에 의한 경혈의 국소반응의 관찰을 위한 NO, nNOS, eNOS, iNOS, NE와 같은 신경전달물질의 발현에 대해 다양한 혈위를 적용한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

족태음비경의 공손(SP4), 족소음신경의 대종(KI4), 족厥음간경의 여구(LR5)에 시술한 침자가 해당 혈위의 조직 내 NO, nNOS, eNOS, iNOS 발현과 NE 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NO 발현에서 무처치군에 비하여 KI4군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었다.
2. nNOS 발현에서 무처치군에 비하여 SP4군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었고, KI4군은 superficial layer에서 유의한 증가를 나타내었다.
3. eNOS 발현에서 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었다.
4. iNOS 발현에서 무처치군에 비하여 SP4군, KI4군, LR5군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었다.
5. Norepinephrine 발현에서 무처치군에 비하여 SP4군은 superficial layer에서 유의한 감소를 나타내었고, LR5군은 모든 깊이에서 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 얇은 깊이의 피부 표면보다는 조직이 많이 함유되어 있는 깊은 깊이에서 발현이 증가함을 나타내었고, 혈위 선택과 침자 깊이 조절을 통해 치료에 적합한 NO와 NOS 및 NE 분비를 조절이 가능할 것으로 사료된다.

## References

1. Ulrich F, William CS. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012 ; 33(7) : 829-37.
2. Lee YM, Shin W, Lee KI, Choi DH, Kim MR, Na CS, Kim SM, Pyo BS, Youn DH. Effects of Acupuncture at Varying Depths at the Connecting Point on the Changes of Levels of nNOS, No and Norepinephrine in Rats. *Korean Journal of Acupuncture*. 2015 ; 32(4) : 160-68.
3. Yang JH, Lee EO, Kim SE, Suh YH, Chong YH. Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid- $\beta$  peptide via action at  $\beta$ -adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. *Experimental neurology*. 2012 ; 236(2) : 199-206.
4. Kim JG. Neuroprotective effect of Rice Bran extracts fermented with *Lactobacillus plantarum* Hong on focal cerebral ischemic

- stroke model and depression/anxiety rat model. Injae University. 2014 : 72.
5. Kim JG. (The) Action mechanism of growth hormone on re-generation of nitric oxide synthase (NOS)-containing nerves after cavernous neurotomy in the rat. Donga university. 1988 : 33.
  6. Lim JH. A Study on Effect of Nitrooleate on Nitric Oxide Production and Endothelial Nitric Oxide Synthase Regulation in Human umbilical Vein Endothelial Cells. Department of Food and Nutrition. Graduate school of Myongji University. 2012 : 74.
  7. Cho YH. (The) Expression of neuronal Nitric Oxide Synthase in Rennervared Recurrent Laryngeal Nerve. Department of Medical Science. Graduate school of Ewha Womans University. 2001 : 29.
  8. Oh JS. Deficiency of Inducible Nitric Oxide Synthase Ameliorates High-Fat Diet Induced Adipose Tissue Dysfunction and Fibrosis in Mice. Graduate school of Ulsan university. 2016 : 47.
  9. Kim YS. The effect of needle insertion on river point of five transport points on the expression of nitric oxide and norepinephrine. Graduate school of Dongshin university. 2013 : 47.
  10. Choi TJ. Effects of Acupuncture at the stream points of the foot meridian on Nitric Oxide and Catecholamine levels in Rats. Graduate school of Dongshin university. 2016 : 37.
  11. Gang YH. (An) overview on the concept and application of De qi. Graduate school of Kyunghee university. 2012 : 100.
  12. Langevin. Effects of Acupuncture Needle Manipulation on Connective Tissue Matrix. Healthpoint Oriental Medicine. 2012.
  13. Shin W, Lee YM, Lee KI, Choi DH, Kim MR, Na CS, Kim SM, Pyo BS, Youn DH. The Changes of NO, nNOS, Norepinephrine by Acupuncture at LU7, HT5, PC6 Acupoints in Rats. Korean Journal of Acupuncture. 2016 ; 33(2) : 75-83.
  14. 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.
  15. WHO. WHO STANDARD ACUPUNCTURE POINT LOCATIONS IN THE WESTERN REGION. 2009 : 680-3.
  16. Park YW. A Literature Review on “Shin” and “Young” acupoint of Acupuncture Points. Graduate school of Sunmun university. 2015 : 174.
  17. Ma SX, Li XY, Sakurai T, Pandjaitan M. Evidence of enhanced non-enzymatic generation of nitric oxide on the skin surface of acupuncture points: An innovative approach in humans. Nitric Oxide. 2007 ; 17(2) : 60-8.
  18. Ting L, Yi G. Specificity Study on Concentration of Monoamine Transmitters at Acupoint and Effect of Acupuncture on Its Distribution. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014 ; 2014 : 704507.