



## 급성 알코올 투여 백서의 신문혈 자극이 소교세포 활성화에 미치는 영향

서수연<sup>1,2</sup> · 방세권<sup>1</sup> · 강석윤<sup>1</sup> · 조성진<sup>1</sup> · 최광호<sup>1</sup> · 류연희<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국한의학연구원 한의과학연구부, <sup>2</sup>과학기술연합대학원 한의융합과학

## Suppression of Microglial Activation by Acute Ethanol Administration through HT7 Stimulation

Su Yeon Seo<sup>1,2</sup>, Se Kyun Bang<sup>1</sup>, Suk Yun Kang<sup>1</sup>, Seong Jin Cho<sup>1</sup>, Kwang-Ho Choi<sup>1</sup>, Yeonhee Ryu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oriental Medicine Research Department, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM),  
<sup>2</sup>Department of Korean Convergence Medical Science, University of Science & Technology (UST)

**Objectives :** The sigma-1 receptor is implicated in stress, depression, psychostimulant sensitization, and addiction vulnerability. Prior studies have indicated that ethanol exposure modulates sigma-1 receptor activity within the Ventral Tegmental Area (VTA). Here, we explore the sub-mechanisms underlying sigma-1 receptor activity induced by HT7 (Shinmun) stimulation in behavioral alterations following acute ethanol (ETOH) administration. **Methods :** Male Wistar rats were investigated for pro- and anti-inflammatory markers after injection of ETOH (1 g/kg) using cytokine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)s. After confirming that HT7 stimulation changed the total distance traveled in the open field test (OFT), protein changes in the Ventral tegmental area (VTA) were measured by Western blotting. The expression level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) after administration of a sigma-1 receptor antagonist (dihydrobromide 1047; BD1047, 10 mg/kg i.p.) and Shenmen (HT7) stimulation was compared. **Results :** As a result, acute ETOH administration increased proinflammatory marker levels (TNF- $\alpha$  and IL-6). HT7 stimulation restored the total distance response after acute ethanol administration. In addition, in the VTA, the levels of a microglial marker (iNOS), sigma-1 receptor and protein kinase C, which are predicted to be involved in up- and downregulation, were restored by HT7 stimulation. In particular, HT7 stimulation modulates iNOS expression through effects similar to BD treatment. This study suggests that the stimulatory effect of HT7 may be driven by microglial activation. **Conclusions :** Microglial activity is regulated by sigma-1 receptor, and sigma-1 receptor activity is regulated by HT7 stimulation. Significantly, we demonstrate that HT7 stimulation ameliorates behavioral alterations induced by acute ETOH administration through microglial activation within the VTA.

**Key words :** acupuncture, ETOH, microglial activity, neuroinflammation, sigma-1 receptor

### 서론

정서장애에 작용하는 침치료의 효과는 뇌의 깨어진 항상성 체계

를 회복시키는 것을 목표로 한다. 이러한 이유로 불면증, 우울증, 불안, 강박 그리고 약물중독 등 뇌 내 신경전달물질의 항상성이 파괴된 여러 정서장애 관련 질환에서 침치료의 효과가 입증되고

Received April 19, 2024, Revised May 16, 2024, Accepted June 4, 2024

Corresponding author: **Yeonhee Ryu**

Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

Tel: +82-42-868-9484, Fax: +82-42-863-9464, E-mail: yhyu@kiom.re.kr

This work was supported a grant from the Korea Institute of Oriental Medicine, Korea (No. KSN2022210) and supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (No. 2021R1A2C1093712).

© 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.

있다<sup>1-4)</sup>.

다양한 정서장애 중 알코올 사용장애는 전 세계적으로 가장 흔한 중독 질환 중 하나이며, 대표적인 중독물질에 의한 사망의 원인이다. 하지만 알코올 사용장애로 인한 지속적인 건강부담과 기존 알코올 중독의 뇌 기전에 관한 이해에도 불구하고, 명확한 치료법이 밝혀지지 않았다. 중독 치료제로 사용되는 약물의 대부분은 또 다른 약물의 내성을 유발시키는 원인으로 작용하므로 그 치료 및 관리에 한계가 있다. 대표적인 알코올 금단 치료제인 벤조디아제핀(benzodiazepine) 계열 약물은 용량 의존적으로 불안해소, 진정 및 호흡 억제가 발생하며, 기억상실과 조화운동불능(incoordination) 등이 나타날 가능성이 크다<sup>5)</sup>. 또한, 알코올의 의존성을 줄이기 위한 치료제인 날트렉손(naltrexone) 계열의 약물은 오심, 두통, 불면, 초조함 등 부작용이 나타나며, 간 독성이 있으므로 간부전 환자에겐 투여가 금지된다<sup>6)</sup>. 이러한 이유로 알코올 사용장애를 치료하기 위한 비 약물치료법 및 대체요법이 주목받고 있다. 알코올 사용장애를 제어하는 침 치료의 효과기전은 뇌 내 신경전달물질과 면역계의 항상성제어로 설명이 가능하다<sup>7,8)</sup>. 침치료의 신경전달물질의 항상성 제어 기전을 규명하기 위하여 중뇌 변연계 시스템에서의 도파민 과활성 억제 및 오피오이드의 과역제 항진 효과에 대한 기전 연구들이 활발히 진행되고 있다<sup>9)</sup>. 한편, 비정상적인 Cytokine 수치는 면역 기능 장애를 유발하고 말초 Cytokine을 통해 뇌에 전달되어 음주 관련 행동을 유발한다<sup>10)</sup>. 다양한 원인에 의해 설치류 뇌의 증가된 Cytokine 수치는 음주 행동을 증가시키고, 알코올을 갈망하게 되는 원인이기도 하다<sup>11,12)</sup>. 대표적으로 알려진 IL-12, TNF- $\alpha$  및 인터페론(IFN)- $\gamma$ 와 같은 전 염증성 Cytokine과 IL-4 및 IL-10과 같은 항 염증성 Cytokine 사이의 균형은 알코올 노출에 의해 변경된다<sup>13-15)</sup>. 이렇듯 알코올 중독에서 신경전달물질, 면역 기능이상 등이 복합적으로 작용한다.

최근 그 연구가 활발히 진행되고 있는 신경 교세포는 뇌 내에서 전 염증성 Cytokine과 항 염증성 Cytokine의 분비를 조절하는 대표적인 세포이다<sup>16,17)</sup>. 알코올 사용장애는 뇌의 성상교세포와 희돌기 아교세포에 영향을 주어 신경전달, 미엘린의 유지 및 유전자 발현에 영향을 주어 알코올 관련 뇌 손상 및 연결장애를 유발한다<sup>18)</sup>. 특히, 성상세포는 신경전달 신진대사 및 글루타메이트의 항상성을 조절하여 알코올 보상 및 중독에 중요한 역할을 하므로 알코올 사용장애 치료의 잠재적 표적이 된다<sup>19)</sup>. 최근 소교세포의 면역 항상성 제어와 관련된 침 치료의 효과에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 뇌 허혈 동물 모델에서 대추혈(GV14), 백회혈(GV20), 수구혈(GV26), 족삼리(ST36)와 풍지혈(GB20)의 수기침 자극은 미세아교세포 분극화와 염증을 조절하여 신경기능향상에 역할을 한다<sup>20)</sup>.

GV20의 전침 자극은 소교세포 조절을 통해 항 염증 효과를 유도하고 Microglia type 2 (M2)의 분극화를 촉진하여서 알츠하이머병의 항 염증제로 작용한다<sup>21)</sup>. 또한 우울증 동물 모델에서 ST36의 전침 치료는 성상세포의 위축을 예방하여 면역계 항상성 유지를 통해 우울증을 완화한다<sup>22)</sup>. 뿐만 아니라 GV20, 인당혈(GV29)의 침 치료는 메스암페타민 금단 쥐에서 성상세포 매개 글루타메이트 제거율을 향상시켜 공간기억을 향상시켰다<sup>23)</sup>. 이러한 연구 성과에도 불구하고, 알코올 행동을 조절하는 침 치료의 신경 교세포 기반의 면역활성 제어 기전에 관한 연구는 부족한 실정이다.

심장 경락의 근원이며 약물중독, 불안, 우울증을 포함한 정신질환을 치료하는 데 주로 사용되어 온 신문혈(神門穴: HI7)의 경우 특히 알코올 사용장애에서 그 효과 기전 연구가 활발히 수행되었다<sup>24)</sup>. 지금까지 연구들을 살펴보면 HI7 자극은 신경 내분비 시스템과 편도체 신경 펩티드 Y 역전을 조절하여 에탄올 금단 중 불안과 같은 행동을 약화시켰다<sup>14,25)</sup>. 또한, 중뇌 변연계 도파민 방출의 HI7 매개 조절은 알코올 자가투여 모델에서 측좌핵의 엔도르핀 활성을 통해 조절될 수 있다<sup>24)</sup>. 또한, 본 연구자들은 이전 연구에서 HI7의 침술이 급성 알코올 노출 시 복측피개영역(VTA)의 Sigma-1 수용체를 통해 부동성과 22 kHz USV를 조절한다는 것을 보여주었다<sup>20)</sup>.

본 연구는 HI7 자극시 Sigma-1 수용체에 의해 영향을 받는 하위 신호전달 경로를 탐색하기 위한 후속 연구이다. 이 연구를 통해 알코올에 의해 활성이 조절되는 Cytokine의 종류를 확인하였고, Cytokine 분비를 조절하는 소교세포가 HI7 자극에 의해 조절되는지 여부를 조사하였으며, HI7 자극과 Sigma-1 수용체의 소교세포 활성을 조절하는 메커니즘을 분석하여 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중이 약 250~300 g인 Wistar 계의 7주령 백서(Samtako Bio Korea, Osan, Korea)를 사용하여 실험을 수행하였다. 쥐(우리당 2마리)를 12:12시간 명암 주기로 온도 21~23°C, 습도 45~60%로 조절되는 사육장의 플라스틱 우리에 보관했다(07:00에 조명 켜짐). 실험 기간 동안 충분한 물과 음식이 제공되었다. 모든 실험은 한국한의학연구원 동물보호이용위원회에 따라(동물실험 승인번호: 18-076) 수행되었다. 실험군의 경우, Sal (대조군; 생리식염수 복강주사), ETOH (알코올 복강주사)군, ETOH+HI7, ETOH+NA (non-acupuncture point), ETOH+BD1047군 그리고 ETOH+

BD104+HT7군으로 나누어 총 6개의 군에서 실험하였다.

## 2. 침 치료

침은 스프링형 스테인레스 재질의 0.25 mm × 15 mm의 일회용 호침(Dongbang, Korea)을 침 치료에 사용하였다. 침술 자극은 정확한 시간에 정확한 경혈점을 자극하기 위해 N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> 80% 혼합 가스에 2.5%, isoflurane (Hana Pharm, Hwaseong, Korea)로 최소한의 흡입마취를 유도하고 자침을 수행하였다. 침 치료는 ETOH+HT7, ETOH+BD+HT7 두개의 군에 시행되었으며 경혈 침 치료 혈위는 양 손목의 신문혈(HT7)을 선정하였으며, 인체에 상응하는 부위에 취혈하였다. WHO 표준안에 따르면, 신문혈은 손목 앞안쪽면, 자쪽손목굽힘근힘줄(flexor carpi ulnaris tendon)의 노쪽모서리 노쪽, 손바닥 쪽 손목주름(palmar wrist crease) 위에 위치하고, 손바닥을 위로 향했을 때, 콩알뼈(pisiform bone) 몸쪽 모서리의 노쪽 오목한 곳으로, 손바닥 쪽 손목주름 위에서 취혈한다. 이를 흰쥐의 앞발에 대입하여 앞발 요골 손목을 가로질러 척측 수근 굴근 근육의 힘줄 부위를 취혈하였다. 경혈도를 바탕으로 혈자리들의 분포가 가장적인 쥐의 왼쪽 엉덩이를 비경혈 지점으로 선택하였다. 침자는 피부 표면으로부터 3 mm 깊이의 경혈점에 양측 침(직경 0.18 mm, 길이 20 mm, 동방 메디칼)을 시행하고 유침(留鍼) 시간은 인체에서 영위(營衛)가 1회 순행하는 시간인 30분 시행되고 있음을 기준으로 백서에 대하여 이의 60/1에 해당하는 30초 동안 기계적 침술 장치(mechanical acupuncture instrument: MAI)로 침을 진동시켰다. MAI는 수동 침술 자극과 달리 경혈 부위에 지속적이고 정량적인 자극을 제공할 수 있다. MAI는 대구한의 대학교와 대한민국의 KIOM에 의해 개발된 장치를 사용하였다<sup>27)</sup>. 이 장치는 악어 클립이 달린 침에 부착된 휴대폰 진동기(MB-0412V 또는 MB-1203V, Motor Bank)로 구성되며 1.3 m/sec<sup>2</sup>의 강도와 85 Hz의 주파수로 바늘에 진동을 가하는 데 사용되었다.

## 3. 약물 투여

Sal (saline: 생리식염수), ETOH, BD 1047 그룹의 경우 각 약물을 복강 주사를 실시하였다. 쥐에게 주입한 ETOH는 (1 g/kg, 16 w/v, Merck Millipore), Sal 그룹의 생리 식염수(0.9% NaCl)를 사용하였다. 주입된 ETOH의 부피는 쥐당 2.38~2.61 ml였다. BD 1047의 경우(Tocris Bioscience, Bristol, UK, Cat. No. 0956/10)을 생리식염수에 녹여, 복강주사를 실시하였다. 지난 선행연구에서 BD 1047 (3, 10, or 30 mg/kg, intraperitoneal injection)에 대한 농도 별 보행량을 분석한 결과를 바탕으로 10 mg/kg을 복강 주사 하였다<sup>20)</sup>. ETOH 투여 후 혈중 알코올농도가 높아진 30분 뒤

BD 복강주사를 실시하였으며, BD+HT7군의 경우 복강주사 후 20분 뒤 침치료를 진행하였다.

## 4. 효소 면역 분석법

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4 및 IL-10 수준은 TNF- $\alpha$  (Cell Signaling, Catalog No. ab100785), IL-6 (Cell Signaling, Catalog No. ab234570) IL-4 (Cell Signaling, Catalog No. ab100771) 및 IL-10 (Cell Signaling, Catalog No. ab100765) 효소면역 분석 키트를 사용하였으며 분석은 제조업체가 권장하는 프로토콜에 따라 각각 수행되었다.

## 5. 개방장 운동 실험

총 거리는 격리된 방에 위치한 개방형 장치에서 측정하였으며 장치 위에 장착된 비디오 카메라를 사용하여 쥐 활동을 관찰했다. 총 거리 장치는 쥐를 개별적으로 배치하는 플라스틱 영역(60×60×40 cm) 내에서 수행되었으며, 쥐에게 MAI 자극 유무에 관계없이 ETOH (1 g/kg) 또는 Sal을 투여하고 실험을 시작하였다. 주입 후 20분부터 15분 동안 총 거리(cm)와 휴식 시간(sec)을 기록하고 Smart v3.0 소프트웨어(Panlab Harvard Apparatus)를 사용하여 자동 분석했다. 장치를 70% 에탄올로 세척하고 건조한 뒤 다음 쥐 실험에 사용하였다.

## 6. Western Blot 분석

쥐는 전처리와 주사 후 절차를 거친 후 20분 후에 조직을 채취하였다. 채취한 쥐의 뇌 기질에서 관상 축으로 절개하고, VTA 영역을 절개하여 얼음 위에 두었다. 샘플을 액체 질소에 담가서 즉시 냉동한 후 단백질 전기 영동 실험을 할 때까지 -80°C에서 보관했다. VTA 샘플을 용해 완충액에서 마이크로 초음파기로 균질화하고 4°C에서 20분 동안 12,000×g으로 원심분리했다. 상등액을 새 튜브에 옮기고 전기 영동할 때까지 -80°C에서 보관했다. 샘플의 단백질 농도는 소 혈청 알부민(BSA, Bio-Rad)을 표준품으로 하는 단백질 분석 키트를 사용하여 Bradford 기술로 측정했다. 단백질 정량 후, 20  $\mu$ g의 단백질을 동일한 부피의 2X Laemmli 샘플 완충액(Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA))에 희석하고 95°C에서 5분간 끓였다. 단백질은 Mini-Protein TGX precast gel (Bio-Rad)에서 전기 영동으로 분리했다. 분리된 단백질을 Nitrocellulose Blotting Membrane 옮겼고, membrane Blocking solution으로 실온에서 30분간 처리했다. 모든 막을 절단하여 막에 항체를 흡착하기 전에 절단하여 사용했다. 막을 sigma-1 receptor rabbit polyclonal antibody (1:500, Cat. # ab53852, Abcam) 또는 iNOS

mouse monoclonal antibody (1:1,000, Cat. Sc-7271, Santa Cruz), pPKC rabbit monoclonal antibody (1:1,000, Cat. #9376, Cell Signaling), PKC rabbit monoclonal antibody (1:1,000, Cat. #9616, Cell Signaling) 및 GAPDH rabbit monoclonal antibody (1:2,000, Cat. #2118, Cell Signaling). TBST에서 10분간 3회 세척한 후, 막을 각각의 2차 항체(1:2,000, Cat. # SC2004, SC2005, Santa Cruz)와 함께 실온에서 60분간 배양한 다음 TBST에서 10분간 3회 세척했다. 제조업체의 지침(Thermo Scientific)에 따라 West Pico 또는 Femto 감지 시스템을 사용하여 형광을 최종 발현시킨 후 ImageJ 소프트웨어로 분석했다.

### 7. 면역조직화학 염색

행동 실험 후, 쥐에게 인산 염 완충식염수(PBS)를 심장경으로 관류한 후, 0.1 M PBS (pH 7.0)에 4% 파라포름알데히드(PFA)가 포함된 고정액을 사용하여 조직을 고정시켰다. 쥐의 뇌를 적출하여 중성 완충 포르말린 10% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)로 고정한 후 파라핀에 포매한 후 10 mm 두께로 절단하여 절편을 얻었다. 절편을 차단 용액과 함께 1시간 동안 배양한 다음 mouse monoclonal iNOS antibody (1:500, Cat Sc-7271, Santa Cruz)의 1:500 희석액으로 밤새 배양했다. 그런 다음 뇌 절편을 비오틴닐화된 염소 goat anti-rabbit secondary antibody avidin-biotin-peroxidase complex (ABC, Vector; catalog No. PK-6101)와 함께 배양했다. ABC 복합체를 시각화하고, ImageJ 소프트웨어 (National Institutes of Health)를 이용하여 단면의 이미지를 분석하였다. 위에 언급된 모든 정량적 과정과 분석 절차는 실험 할당에 대한 지식 없이 연구자가 맹검 방식으로 수행했다.

### 8. 통계분석

모든 측정값(ELISA, OFT 및 Western blot 데이터)은 평균± SEM으로 표시하였다. OFT 및 USV 데이터는 양방향 분산 분석

(ANOVA)을 사용하여 분석되었으며, 사후 분석은 Student-Newman-Keuls (SNK) 및 Tukey 방법을 사용하여 수행되었다. ELISA 데이터는 paired t test로 분석되었다. 단백질 전기 영동 및 열린 장 운동실험 결과는 one-way ANOVA에 이어 Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Incorporation, San Diego, CA, USA)을 사용하여 Tukey의 정직 유의차 테스트로 분석되었다. 통계적 유의성에 대한 기준은  $p < 0.05$ 였다.

## 결 과

### 1. VTA 부위의 염증성 Cytokine 변화 및 행동 변화

ETOH 투여 30분 뒤 혈액을 채취하여 분석하였다(Fig. 1). 급성 ETOH 투여에 의해 변화하는 Cytokine을 확인하기 위해 복측피개 영역 (VTA)에서 2개의 전 염증 표지자(TNF- $\alpha$  및 IL-6)와 2개의 항 염증 표지자(IL-4 및 IL-10)의 발현 수준을 측정했다. ETOH 처리 20분 후 측정 결과에 따르면 Sal 처리에 비해 ETOH 처리 후 전 염증성 마커(TNF- $\alpha$  및 IL-6) 수치가 유의하게 증가했다 (Fig. 2A, B; TNF- $\alpha$ ,  $t=3.225$ ,  $df=10$ ,  $p=0.0091$ , unpaired t test, IL-6,  $t=3.319$ ,  $df=10$ ,  $p=0.0078$ , unpaired t test). 그러나 항 염증 마커(IL-4 및 IL-10)의 수준은 Sal 투여 그룹과 ETOH 그룹 간에 유의미한 차이는 없었다(Fig. 2C, D; IL-4 및 IL-10).

### 2. HT7 자극에 의한 개방 공간 내 활동도 변화

급성 ETOH 주입 후 15분 동안 OFT의 총 이동거리는 Sal군에 비해 감소하였고, ETOH+HT7군에서는 총 거리의 회복을 보였다. 그러나 ETOH+NA 그룹에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 3A, B;  $F(3, 12)=15.57$ ,  $p=0.0002$ ). 또한 우울증의 지표로 사용되는 Immobility 및 통증지표인 Stretching 시간의 경우 통계적으로 유의미한 차이는 없었다.

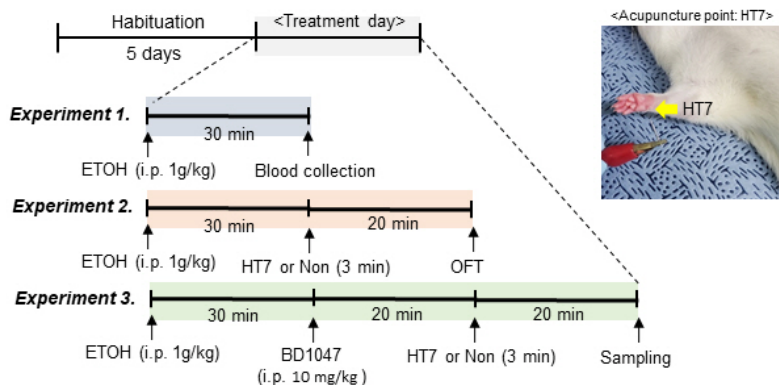


Fig. 1. Experiment schedule used in this study.

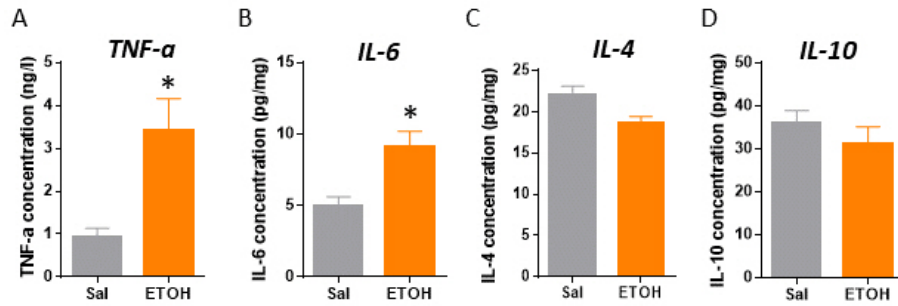


Fig. 2. Changes in the levels of proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines after acute ETOH administration in the VTA.

Concentration of TNF- $\alpha$  after acute ETOH administration (A). Concentration of IL-6 after acute ETOH administration (B). Concentration of IL-4 after acute ETOH administration (C). Concentration of IL-10 after acute ETOH administration (D). The Sal and ETOH groups consisted of the same number of animals (n=6). This data was analyzed using repeated-measures unpaired *t*-test. \**p*<0.05 vs. the Sal group. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

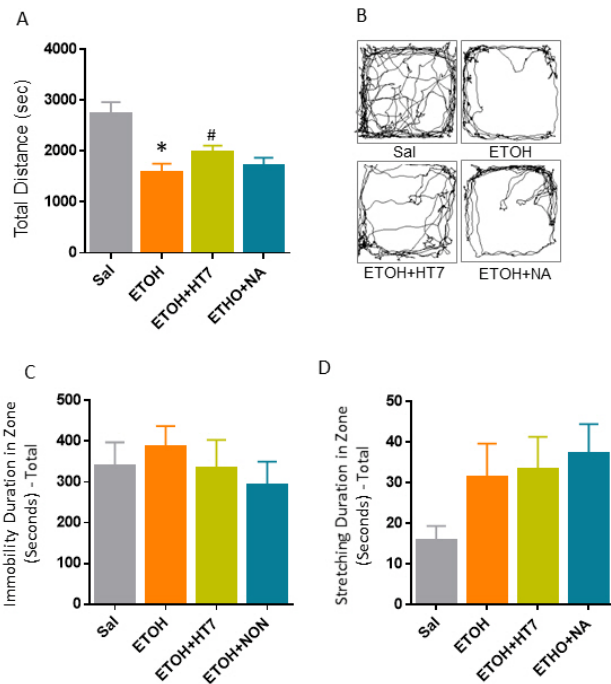


Fig. 3. The number of samples was 6 per group.

Effects of acupuncture stimulation on the OFT. Experimental schedules used in this work. Quantification of the total distance traveled in the OFT (A). Representative tracking images of each group in the OFT (B). Quantification of Immobility duration in zone (C). Quantification of Stretching duration in zone (D). The number of samples was 8 per group. The Fig. B data were analyzed using repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test. \**p*<0.05 vs. the Sal group. #*p*<0.05 vs. the ETOH group. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

### 3. HT7 침 치료 시 VTA 부위의 단백질 발현량 변화

ETOH 투여 후 VTA에서 Sigma-1 수용체의 발현 수준을 측정하였다. ETOH의 급성 주사는 Sal 그룹에 비해 Sigma-1 수용체의 단백질 수준을 유의하게 증가시켰으며, HT7에 대한 침술 자극은

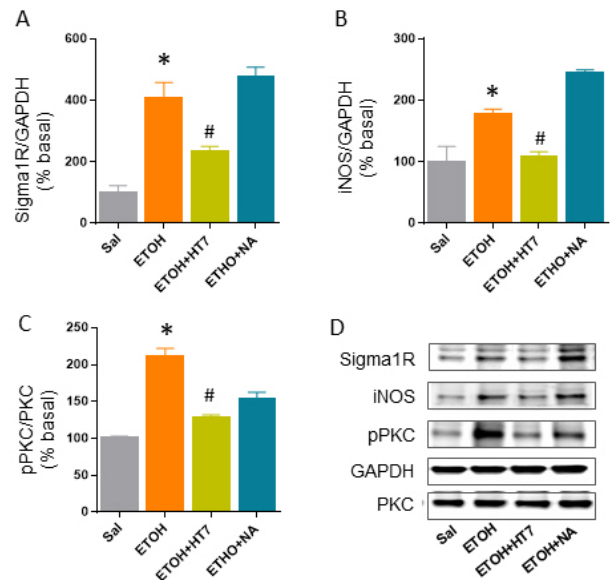


Fig. 4. Effects of acupuncture stimulation on protein expression in the VTA.

Protein levels of sigma-1 receptor in the VTA after acute administration of ETOH (A). Protein levels of iNOS in the VTA after acute administration of ETOH (B). Phosphorylation levels of pPKC in the VTA after acute administration of ETOH (C). Representative band plots for each protein expression (D). The number of samples was 3~4 per group. The data were analyzed using a repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test. \**p*<0.05 vs. the Sal group; #*p*<0.05 vs. the ETOH group. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

ETOH에 의한 Sigma-1 수용체의 단백질 수준의 증가를 감소시켰다(Fig. 4A; F(3, 10)=21.13, *p*=0.0001). 앞의 실험에서 전 염증성 마커 수준의 증가 결과를 바탕으로 전 염증성 Cytokine 분비를 제어하는 iNOS 발현수준을 측정하였다. 그 결과, ETOH 투여에 의해 유도된 iNOS 발현 증가가 HT7 자극에 의해 역전되는 것을 확인하였다. 그러나 NA 자극은 iNOS의 발현 수준을 변화시키지

않았다(Fig. 4B;  $F(3, 10)=26.76, p<0.0001$ ). iNOS 활성을 조절하는 상위 인자인 protein kinase C (PKC) 인산화 여부를 조사하였으며, ETOH 투여에 의해 유도된 인산화의 증가는 HT7 자극에 의해 완화된 반면 NA 자극은 유의미한 차이가 없었다(Fig. 4C;  $F(3, 10)=38.56, p<0.0001$ ).

#### 4. Sigma-1 수용체 억제제 투여 시 VTA에서의 iNOS 발현량 변화

HT7 자극에 의해 Sigma-1 수용체가 감소하고, iNOS 발현이 감소하는 데이터를 바탕으로, HT7 자극이 Sigma-1 수용체 길항제(BD)로 작용하여 iNOS 발현을 제어하는지 확인하기 위해 HT7 자극군과 BD군을 비교하였다. 그 결과, ETOH군에서는 Sal군에 비해 iNOS 발현량이 유의하게 증가하였으며, BD군 역시 iNOS 발현을 유의하게 감소시켰다. HT7 자극군 역시 ETOH군에 비해 iNOS 발현량이 회복되었다(Fig. 5A;  $F(3, 10)=6.678, p<0.0001$ ). 면역조직화학 실험에서도 역시 ETOH 군은 Sal 군에 비해 iNOS의 단백질 수준이 유의하게 증가한 것으로 나타났으며, ETOH+BD군과 ETOH+HT7군에서는 ETOH에 의한 iNOS 단백질 수준의 증가가 일정부분 회복되는 것으로 나타났다. 특히적으로, BD로 처리 후 HT7 자극을 주는 복합 처리군의 경우 iNOS 발현 수준이 단독 처리군에 비해 유의미하게 회복되었다(Fig. 5B;  $F(3, 16)=21.04, p<0.0001$ ).

## 고찰

본 연구는 급성 ETOH 투여 모델에서 HT7 자극에 의해 소교세포 활동이 제어되는 메커니즘을 확인하는 것을 목표로 하였다. 급성 ETOH 투여는 VTA에서 전 염증성 표지자(TNF- $\alpha$ , IL-6)의 수준을 증가시켰다. HT7 자극은 총 거리 반응의 급성 ETOH 투여로 인한 변화를 회복시켰다. VTA에서는 상향 및 하향 조절될 것으로 예측되는 소교세포 마커(iNOS), Sigma-1 수용체 및 PKC의 수준이 HT7 자극에 의해 회복되었다. 특히 HT7 자극은 BD1047 (10 mg/kg, i.p) 투여와 비슷한 수준으로 iNOS의 발현을 억제하였다. BD와 HT7 복합 처치는 HT7, BD의 단일 처치에 비해 통계적으로 유의미하게 iNOS의 발현을 감소시켰다. 즉, HT7의 자극은 Sigma-1 수용체 억제 작용을 포함한 다양한 기전을 통해 iNOS의 발현을 조절한다.

급성 ETOH 투여는 면역 활성화 및 전염증성 Cytokine 생산의 증가와 관련이 있다<sup>28</sup>. 최근 증거에 따르면 ETOH 투여가 소교세포와 신경면역체계를 활성화할 수 있음이 밝혀졌다<sup>29,30</sup>. 이러한 발견과 일치하여, 우리의 결과는 생리 식염수 투여와 비교하여 1 g/kg ETOH 투여가 VTA에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 전 염증성 Cytokine의 수준을 증가시키는 것으로 나타났다.

ETOH는 운동실조, 운동부조, 부동 등의 운동장애를 일으키는 진정제인 것으로 알려져 있다<sup>31</sup>. Chuck, et al.의 연구에 따르면 열린장 행동 실험에서 ETOH의 1 및 2 g/kg, 복강 주사 후 30분 동안 운동 억제 효과를 나타냈다<sup>32</sup>. 이러한 결과와 일관되게, 우리의 결과는 1 g/kg ETOH를 복강 주사하면 Sal 투여에 비해 총 이동

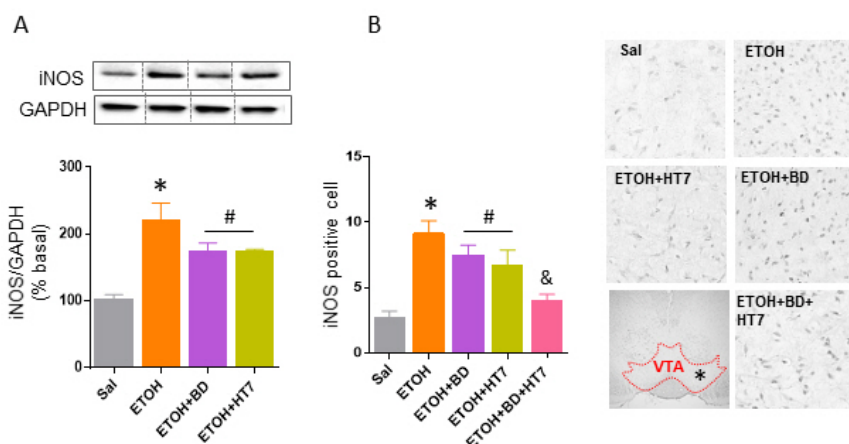


Fig. 5. Effects of acupuncture stimulation and BD treatment on iNOS expression levels.

Following i.p. injection of BD and HT7 stimulation, protein levels of iNOS were measured by Western blotting (A) and immunohistochemistry (B). The number of samples was 3~5 per group. The data were analyzed using a repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test. \* $p<0.05$  vs. the Sal group; # $p<0.05$  vs. the ETOH group; &  $p<0.05$  vs. the ETOH+HT7 group. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM.

거리가 감소했고, HI7 자극에 의해 회복되었다. 이는 ETOH 투여 후 부동 시간이 증가한 것으로 나타난 우리 연구팀의 이전 연구와 일치한다<sup>26)</sup>. 즉, HI7 자극은 1 g/kg ETOH 복강투여에 의한 알코올 행동을 조절할 수 있다. 다음으로, HI7 자극이 알코올 행동을 제어하는 세부 메커니즘에 전 염증성 Cytokine이 관여하는지 여부를 알아보기 위한 실험을 진행하였다.

본 연구팀의 지난 연구에서 급성 ETOH 투여가 VTA에서 Sigma-1 수용체의 발현을 증가시켰고, 증가된 Sigma-1 수용체의 수준이 HI7 경혈점 자극에 의해 감소되었음을 보여주었다<sup>26)</sup>. 알려진 연구에 따르면, ETOH 투여에 의해 수치가 증가된 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 제1형 미세아교세포(대표마커 iNOS)의 분극화 후에 발현되는 전 염증성 Cytokine이다. Sigma-1 수용체의 활성화와 관련된 정확한 신호 전달 메커니즘은 대부분 특성화되지 않았지만, iNOS 활성화와 관련된 조절 메커니즘은 Ca<sup>2+</sup> 의존적 신호 전달 및 PKC를 포함한 단백질의 인산화 조절과 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다<sup>33,34)</sup>. 이러한 이유로 본 연구에서는 VTA에서 iNOS, Sigma-1 수용체 발현 및 PKC의 인산화를 조사했다. 결과에 따르면, ETOH 투여에 의해 증가된 iNOS, Sigma-1 수용체 및 인산화된 PKC의 발현 수준은 HI7 자극에 의해 감소하였다. 즉, HI7 자극은 VTA에서 Sigma-1 수용체 억제제를 통해서 PKC의 인산화수준을 감소시켜 iNOS의 발현량을 감소시킨다. 결론적으로, iNOS의 발현량 감소는 ETOH에 의해 증가한 TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 전 염증성 Cytokine의 수준을 회복시킬 것이라 유추할 수 있다.

본 연구의 최종 실험에서는 침 치료가 VTA의 소교세포에서 Sigma-1 수용체의 억제제로 작용하는지 확인하고, HI7과 Sigma-1 수용체의 억제제의 복합투여가 소교세포 활성화에 어떤 영향을 미치는지 확인했다. Sigma-1 수용체의 억제제 BD 1047 처리는 소교세포 활성을 저해했고, HI7 자극도 유의미하게 소교세포 활성을 억제했다. 즉, 이를 통해 VTA에서 Cytokine 발현을 제어하는 침 치료의 효과는 Sigma-1 수용체의 억제를 통해 일어남을 예측할 수 있다. 또한, BD와 HI7의 복합처치는 iNOS의 발현 수준을 대조군 수준만큼 저하시켰다. 이는 소교세포 활성을 제어하는 데 있어서 Sigma-1 수용체의 억제제 역할과 더불어 신경전달물질의 생성 조절 및 다양한 면역반응 제어를 통해 BD 1047과 더불어 다양한 경로로 소교세포의 활성을 조절할 가능성이 있음을 시사한다. 예상되는 후보 기전으로는 RhoA/ROCK2 경로<sup>35)</sup>, TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로<sup>36)</sup> 및 P2X4<sup>37)</sup> 발현을 조절하여 소교세포 활동을 억제하는 경로 등이 있다.

본 연구에서는 Sigma-1 수용체의 억제제로 작용하는 HI7의 면

역제 제어 가능성에 관하여 보여줬지만, 구체적인 신호전달 기전은 추후에 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구는 알코올 복강주사 모델을 선택하여 뇌 내에서 시그마 수용체의 활성화와 소교세포의 역할에 대해 조사하였지만, 알코올 중독의 치료제로써 침 치료의 가능성을 보여주기 위해서는 향후 알코올 자가투여 모델에서의 실험이 추가적으로 필요할 것이라 생각된다. 그럼에도 불구하고, 본 연구를 통해 경혈 자극이 소교 세포 활동을 조절하는 하나의 경로가 추가적으로 규명되었다. HI7이 Sigma-1 수용체의 억제를 통해 소교세포의 활성을 조절하는 과정에서 이러한 하위 기전이 작동할 것이라 예측되며, 임상에서 알코올 중독 치료에 HI7을 활용하기 위한 하나의 과학적 기전 근거가 될 것이다.

## 결론

본 연구는 VTA의 소교세포에서 분비되는 전염증 인자의 발현량 조절에 관여하는 침 치료의 효과기전을 Sigma-1 수용체의 역할을 기반으로 규명하기 위해 ETOH 투여 동물모델을 사용한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ETOH 투여는 VTA에서 TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현량을 증가시켰다. 이는 ETOH가 복측피개영역의 전염증성 인자의 발현을 증가시키는 의미를 의미한다.
2. 열린장 행동실험 결과에서 ETOH 투여에 의해 감소된 활동량은 신문혈(HI7) 침치료에 의해 회복되었으며, 이는 침 치료가 ETOH 효과를 일정부분 완화함을 의미한다.
3. ETOH 투여 후 VTA의 Sigma-1 수용체, 소교세포의 활성이 증가하였고 PKC의 인산화가 증가하였다. 그리고 침 치료는 이러한 단백질의 발현량을 제어했다. 이는 VTA의 전염증성 인자를 제어하는 하위 기전의 요소임을 의미한다.
4. HI7 자극군과 BD 투여군에서 모두 iNOS 발현이 감소하였고, HI7과 BD 복합처치는 단독 처치에 비해 효과적으로 신경교세포 억제하였다. 즉, VTA에 존재하는 소교세포의 활성을 제어하는 HI7의 효과는 Sigma-1 수용체의 억제 효과를 비롯한 다양한 하위 기전이 작동하고 있음을 의미한다.

이상의 결과로, 침 치료의 전 염증 억제 반응은 소교세포에 Sigma-1 수용체억제제를 통해서 소교세포 활성 억제를 유도하여 일어난 결과로, 침 치료에 의한 효과 기전 중 하나로 Sigma-1 수용체의 활성 조절이 역할을 할 것이라 생각된다.

## Acknowledgement

None.

## Funding

This work was supported a grant from the Korea Institute of Oriental Medicine, Korea (No. KSN2022210) and supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (No. 2021R1A2C1093712).

## Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

## Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

## References

- Cheuk DK, Yeung WF, Chung K, Wong V. Acupuncture for insomnia. *CDSR*. 2012. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005472.pub3>
- Wu J, Yeung AS, Schnyer R, Wang Y, Mischoulon D. Acupuncture for depression: a review of clinical applications. *The Canadian Journal of Psychiatry*. 2012 ; 57 : 397-405. <https://doi.org/10.1177/07067437120570070>
- Wang S-M, Kain ZN. Auricular acupuncture: a potential treatment for anxiety. *Anesth Analg*. 2001 ; 92 : 548-53. <https://doi.org/10.1213/00000539-200102000-00049>
- Cui C-L, Wu L-Z, Li Y-j. Acupuncture for the treatment of drug addiction. *International Review of Neurobiology*. 2013 ; 111 : 235-56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411545-3.00012-2>
- Sheibani M, Mirfallah Nassiri AA, Abedtash A, McDonald R, Zamani N, Hassanian-Moghaddam H. Troponin, a predictor of mortality in methadone exposure: an observational prospective study. *J Am Heart Assoc*. 2021 ; 10 : e018899. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018899>
- Ayyala D, Bottyan T, Tien C, Pimienta M, Yoo J, Stager K, et al. Naltrexone for alcohol use disorder: Hepatic safety in patients with and without liver disease. *Hepatology Commun*. 2022 ; 6 : 3433-42. <https://doi.org/10.1002/hep4.2080>
- Cui J, Song W, Jin Y, Xu H, Fan K, Lin D, et al. Research progress on the mechanism of the acupuncture regulating neuro-endocrine-immune network system. *Vet Sci*. 2021 ; 8 : 149. <https://doi.org/10.3390/vetsci8080149>
- Liang F, Chen R, Cooper EL. Neuroendocrine mechanisms of acupuncture. *ECAM*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/792793>
- Liang J, Xia Y. Acupuncture modulation of neural transmitters/modulators. *Current Research in Acupuncture*. 2013 : 1-36. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3357-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3357-6_1)
- Lowe PP, Morel C, Ambade A, Iracheta-Vellve A, Kwiatkowski E, Satishchandran A, et al. Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations. *J Neuroinflammation*. 2020 ; 17 : 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01972-5>
- Blednov YA, Ponomarev I, Geil C, Bergeson S, Koob GF, Harris RA. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addic Biol*. 2012 ; 17 : 108-20. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x>
- Marshall SA, McKnight KH, Blose AK, Lysle DT, Thiele TE. Modulation of binge-like ethanol consumption by IL-10 signaling in the basolateral amygdala. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017 ; 12 : 249-59. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9709-2>
- Tiwari V, Chopra K. Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain. *Neurochem Int*. 2013 ; 62 : 861-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.012>
- Zhao ZL, Zhao GW, Li HZ, Yang XD, Wu YY, Lin F, et al. Acupuncture attenuates anxiety-like behavior by normalizing amygdaloid catecholamines during ethanol withdrawal in rats. *ECAM*. 2011 ; 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nej045>
- Johnson S, Duncan J, Hussain SA, Chen G, Luo J, McLaurin C, et al. The IFN  $\gamma$ -PKR Pathway in the Prefrontal Cortex Reactions to



- Chronic Excessive Alcohol Use. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 ; 39 : 476-84. <https://doi.org/10.1111/acer.12650>
16. Conti P, D'Ovidio C, Conti C, Gallenga CE, Lauritano D, Caraffa A, et al. Progression in migraine: Role of mast cells and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol.* 2019 ; 844 : 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.004>
  17. Obuchowicz E, Bielecka-Wajdman AM, Paul-Samojedny M, Nowacka M. Different influence of antipsychotics on the balance between pro-and anti-inflammatory cytokines depends on glia activation: an in vitro study. *Cytokine.* 2017 ; 94 : 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.004>
  18. Erickson EK, Blednov YA, Harris RA, Mayfield RD. Glial gene networks associated with alcohol dependence. *Scientific reports.* 2019 ; 9 : 10949. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47454-4>
  19. Adermark L. Astrocyte Function in Alcohol Reward and Addiction. *J Alcohol Drug Depend.* 2015 ; 3 : e123. <https://doi.org/10.4172/2329-6488.1000e123>
  20. Zhang H-Y, Zhao Y-J, Zhang P-J, Guo M-F, Yu J-W, Chai Z, et al. Acupuncture ameliorates neurological function by suppressing microglia polarization and inflammatory response after cerebral ischemia in rats. *Zhen ci yan jiu= Acupuncture Research.* 2022 ; 47 : 941-8. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20210988>
  21. Xie L, Liu Y, Zhang N, Li C, Sandhu AF, Williams III G, et al. Electroacupuncture improves M2 microglia polarization and glia anti-inflammation of hippocampus in Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2021 ; 15 : 689629. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.689629>
  22. Lin S-S, Zhou B, Chen B-J, Jiang R-T, Li B, Illes P, et al. Electroacupuncture prevents astrocyte atrophy to alleviate depression. *Cell Death & Disease.* 2023 ; 14 : 343. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05839-4>
  23. He T, Li N, Shi P, Xu X, Nie J, Lu X, et al. Electroacupuncture alleviates spatial memory deficits in METH withdrawal mice by enhancing astrocyte-mediated glutamate clearance in the dCA1. *Addict Biol.* 2022 ; 27 : e13068. <https://doi.org/10.1111/adb.13068>
  24. Chang S, Kim DH, Jang EY, Yoon SS, Gwak YS, Yi YJ, et al. Acupuncture attenuates alcohol dependence through activation of endorphinergic input to the nucleus accumbens from the arcuate nucleus. *Sci Adv.* 2019 ; 5 : eaax1342. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1342>
  25. Zhao Z, Kim SC, Wu Y, Zhang J, Xu Y, Cho IJ, et al. Involvement of amygdaloid neuropeptide Y in the anxiolytic effects of acupuncture during ethanol withdrawal in rats. *Neurosci Lett.* 2014 ; 567 : 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.018>
  26. Seo SY, Kim SP, Bang SK, Kang SY, Cho SJ, Choi K-H, et al. The effect of acupuncture stimulation on alleviating emotional changes due to acute alcohol administration and the possibility of sigma1 receptor involvement. *Integr Med Res.* 2021 ; 10 : 100497. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2020.100497>
  27. Kim SA, Lee BH, Bae JH, Kim KJ, Steffensen SC, Ryu Y-H, et al. Peripheral afferent mechanisms underlying acupuncture inhibition of cocaine behavioral effects in rats. *PloS one.* 2013 ; 8 : e81018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081018>
  28. Zisman DA, Strieter RM, Kunkel SL, Tsai WC, Wilkowski JM, Bucknell KA, et al. Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th1- and Th2-phenotype cytokines in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 ; 22 : 621-7. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb04303.x>
  29. Drew PD, Johnson JW, Douglas JC, Phelan KD, Kane CJ. Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 ; 39 : 445-54. <https://doi.org/10.1111/acer.12639>
  30. Terasaki LS, Schwarz JM. Effects of moderate prenatal alcohol exposure during early gestation in rats on inflammation across the maternal-fetal-immune interface and later-life immune function in the offspring. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2016 ; 11 : 680-92. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9691-8>
  31. White AM, Truesdale MC, Bae JG, Ahmad S, Wilson WA, Best PJ et al. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 ; 73 : 673-7. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00860-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00860-2)
  32. Chuck TL, McLaughlin PJ, Arizzi-LaFrance MN, Salamone JD, Correa M. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci.* 2006 ; 79 : 154-61. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.045>
  33. Morin-Surun M-P, Collin T, Denavit-Saubié M, Baulieu E-E,

- Monnet F. Intracellular  $\sigma 1$  receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 8196-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8196>
34. Monnet FP, Morin-Surun M-P, Leger J, Combettes L. Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by  $\sigma 1$  receptor agonists in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 ; 307 : 705-12. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.053447>
35. Zhu M-m, Lin J-h, Qing P, Pu L, Chen S-l, Lin S-j, et al. Manual acupuncture relieves microglia-mediated neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury by inhibiting the RhoA/ROCK2 pathway. *Acupunct Med.* 2020 ; 38 : 426-34. <https://doi.org/10.1177/0964528420912248>
36. Wang L, Yang J-W, Lin L-T, Huang J, Wang X-R, Su X-T, et al. Acupuncture attenuates inflammation in microglia of vascular dementia rats by inhibiting miR-93-mediated TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 ; 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8253904>
37. Tang H-y, Wang F-j, Ma J-l, Wang H, Shen G-m, Jiang A-j. Acupuncture attenuates the development of diabetic peripheral neuralgia by regulating P2X4 expression and inflammation in rat spinal microglia. *J Physiol Sci.* 2020 ; 70 : 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00769-8>