

Jaw Opening Reflex 및 RT-PCR을 이용한 봉독의 진통효과

趙廣鎬 · 李栽東 · 朴東錫 · 安秉哲

ABSTRACT

The Analgesic Effects of Apitoxin and its Mechanism via JOR and Measuring Expression of mRNA in Phospholipase and TPH using RT-PCR

Kwang-Ho Cho · Jae-Dong Lee · Dong-Suk Park
Byoung-Choul Ahn

Dept. of Acupuncture & Moxibustion
Oriental Medical College, KyungHee University

The purpose of this study is to prove the analgesic effects of apitoxin and its mechanism via jaw-opening reflex(JOR) and measuring expression of mRNA in Phospholipase and Tryptophan hydroxylase(TPH) using RT-PCR.

The experiments were carried out on Sprague-Dawley rats(300-400g) and mastocytoma (P-185 HTR) for JOR and RT-PCR, respectively. Rats anesthetized with thiopental sodium (80mg/kg) were used in the Tooth Pulp stimulation induced JOR. The amplitude of a digastric electromyogram (dEMG) was recorded during the stimulation at an intensity of 1.5 times the threshold for JOR. Apitoxin used in this experiment was diluted with normal saline by 1:1000. Apitoxin was injected intravenously into the test

group while normal saline to the control group. However, it was injected directly into the cell of mastocytoma. We referred to base sequence registered in Genbank in designing primers for RT-PCR.

The results were as follows; (1) Compared with control group, analgesic effect started to show right after Sprague-Dawely rats were treated with apitoxin(71.50 ± 8.08) and lasted for 50 minutes. (2) As a result of the experiment of RT-PCR, we witnessed significant changes in the degree of expression of phospholipase or rate-limiting enzyme in biosynthesis of prostaglandins with $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ apitoxin. ($31.74 \pm 18.98\%$, $P < 0.05$) (3) As a result of the experiment of RT-PCR, we witnessed significant changes in the degree of expression of TPH or rate-limiting enzyme in biosynthesis of serotonin with $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ apitoxin. ($131.37 \pm 16.87\%$, $P < 0.05$). These results suggest that $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ apitoxin have the most analgesic effects.

This study showed that apitoxin has analgesic effects and held good for 50 minutes. The injection of apitoxin has brought out changes in the degree of expression of phospholipase and TPH. These results strongly suggest that analgesic mechanism by apitoxin is closely related to prostaglandins and serotonin.

Keywords: apitoxin, pain, serotonin, TPH, phospholipase, prostaglandin, RT-PCR

I. 緒論

蜂毒요법은 꿀벌의 독낭에 들어있는蜂毒을 추출, 가공하여 질병과 유관한 부위 및穴位에 주입함으로써 刺針效果和蜂毒의 생화학적 특이물질이 인체에 미치는 약리작용을 동시에 이용한 신침요법의 일종이다.²⁰⁾

蜂毒요법은蜂毒의 구성성분과 생화학적 작용, 면역기능, 독성학 등의 분야에서 많은 연구가 보고되고 있다.¹⁸⁾³²⁾³³⁾ 특히 진통

효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 실험적으로는 高¹³⁾, 李¹⁴⁾, 金²⁰⁾ 등이 진통효과를 나타낸다고 보고하였고, 陳³⁴⁾은蜂毒 자체보다는蜂毒 peptide가 더 진통효과가 우수하다고 하였으며 李¹⁹⁾는 추간판 탈출증환자에 대한 임상효과를 보고하였다.蜂毒요법의 진통기전은 혈중 cortisol 수치를 정상보다 2-3배 높은 약 10일간 지속적으로 유지하게함으로써 진통 및 소염작용에 관여한다고 미국의 Walter reed 국방연구소에서 보고되고 있다.¹³⁾¹⁴⁾

통증의 연구에 있어서 屈曲退縮反射, tail flick reflex(TFR), writhing syndrome, jaw opening reflex(JOR) 등의 많은 reflex 모델들이 사용되고 있다. 그 중 tooth pulp stimulation(TPS)을 통한 JOR은 통증의 기전이나 여러 생리적 혹은 치료적 과정에 의하여 발생하는 진통 과정을 연구하는데 많이 응용되고 있다.⁶⁾⁴⁸⁾⁵¹⁾

그리고 침, 약침등의 진통효과에 대한 연구에서 serotonin(5-HT, 5-hydroxytryptamine)¹²⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁵⁾이 동통을 억제하는 신경전달물질로⁴⁴⁾ 관여하고 prostaglandins¹⁶⁾²⁰⁾이 감소한다는 보고가 계속되고 있다. 한편 serotonin을 생합성하는 과정중의 첫 반응을 촉매하는 효소인 tryptophan hydroxylase(TPH)와 prostaglandins를 생합성하는 과정 중의 첫 반응을 촉매하는 효소인 phospholipase의 염기서열이 알려지고 유전자적 구조가 밝혀져, 역전사중합효소연쇄반응(reverse transferase polymerase chain reaction; RT-PCR)을 통하여 분자생물학적 측면에서 TPH와 phospholipase의 변화를 연구함으로써 serotonin이나 prostaglandins의 변화를 측정할 수 있다.⁸⁾²⁷⁾

이에 저자는 JOR을 통증의 지표로 삼아 蜂毒의 진통효과를 관찰하고 그 진통기전을 알아보기 위하여 RT-PCR을 이용하여 phospholipase와 TPH의 발현정도를 보아 통증에 관계하는 prostaglandins과 serotonin의 변화를 실험하여 유의한결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료 및 방법

1) 재료

① 동물

체중 300-400g의 Sprague-dawley계 雌性 白鼠로서 白鼠用 固形 飼料(삼양유지, 小動物用)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 2주일간 적응시킨후 사용하였다. 실험은 특별히 명시하지 않는 한 26±2℃에서 실시하였다.

② 蜂毒

蜂毒(apitoxin)은 microchip을 이용한 전자파 발생장치로 벌을 자극하여 채집, 가공한 건조蜂毒(유밀산업, 한국)을 정선한 것을 구입한후 생리식염수에 1000:1로 희석하여 0.1%의 蜂毒을 만들어 실험에 사용하였다. 대조군으로는 생리식염수를 사용하였다.

2) 방법

① 일반적인 처치

동물은 Thiopental sodium(80mg/kg)을 복강내로 투여하여 마취시켰다. 기관내 분비물을 흡인하기 위하여 기관절개술을 시행하였으며, 일정한 마취수준을 유지하기 위하여 좌측 대퇴정맥에 폴리에틸렌관을 삽입한 후 thiopental sodium (10-15mg/kg/hr)을 주입펌프(infusion pump)를 이용하여 지속적으로 주입하였다.

체온은 자동으로 조절되는 전기장판

(electric heating pad)을 이용하여 37.5℃로 유지시키고, 약물(NS 또는 蜂毒)주입은 좌측대퇴정맥으로 주입하였다.

② 開口反射誘發

통증의 유발 및 객관적인 측정을 위하여 tooth-pulp stimulation을 통하여 開口反射를 유발시켰다. 下切齒의 脣側 齒齦緣(labial gingival margin)에 치과용 드릴로 깊이 1mm를 뚫은 후, 끝부분 0.2mm를 제외하고 절연된 에나멜선을 각각 양측 齒髓腔(dental pulp cavity)안으로 넣었다.

타액에 의해 합선이 되는 것을 막기 위하여 dental wax로 절연한 뒤 dental cement로 고정하였다.

齒髓腔에 고정된 에나멜선을 전자 자극기(electronic stimulator; Nihon Koden)에 연결하여 자극측(右側)에 음극을 연결하였으며, 자극조건은 단일자극, 矩形波, 지속 0.3 ms 및 빈도 0.5Hz로 하였다.

③ 근전도기록

開口筋인 顎二腹筋에서 筋電圖를 측정하여 근전도의 크기를 통증의 지표로 看做하였다. 근전도가 안정되도록 3-4시간의 회복기간을 둔후, 근전도가 안정되면 약물을 주입하여, 근전도의 크기 변화로 진통효과를 평가하였다.

근전도는 에나멜선을 치수자극이 가해지는 우측 顎二腹筋(digastric stimulator)의 前腹(anterior belly)에 삽입하여 기록하였

다.

반응은 증폭기(DAM 80; Filter 10-1kHz)를 거쳐 증폭된 다음, data acquisition system (MP100WSW, BIOPAC Systems, Inc.)을 통해 컴퓨터에 저장되었다.

Oscilloscope로 근전도를 관찰하면서, 최소 반응을 발생시키는 자극강도를 역치 자극강도로 결정하고 유해성 자극강도는 역치 자극강도의 1.5배로 하였다.

근전도 기록은 유해성 자극강도로 자극하면서 1분간(30회 반응)을 기록하였으며, 5분후 및 10분후 재측정하여 통계학적으로 유의한 차가 없는 경우에만 근전도의 크기가 안정된 것으로 간주하여 실험을 시행하였다.

顎二腹筋 근전도의 크기는 연속적인 10개의 근전도(11-20번째 반응) 면적을 적분하여 평균하였다. 대조반응은 개개의 실험전에 측정되었으며, 매 실험후에 얻은 근전도 반응은 대조반응 평균의 백분율(%)로 표시되었다.

④ 세포배양

Mastocytoma(P-185 HTR, 한국세포주은행)의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO BRL)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL) 용액에서 5% CO₂, 95% 습도, 37℃가 유지되는 세포배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다.

⑤ RNA추출

RNAzolB(Tel-Test, Inc.)를 사용하여 얻은 total RNA 5 μ g당 DNase I 1 unit를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨후 phenol/chloroform, 3M sodium acetate, 100% ethanol, 70% ethanol(in DEPC-treated water)를 차례로 사용하여 침전시켰다.

이 침전된 total RNA를 DEPC-treated water로 용해시킨다음 spectrophotometer로 260nm에서 정량하고 -70 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였다.

⑥ cDNA합성

역전사반응은 준비된 total RNA 2 μ g에 해당하는 양을 65 $^{\circ}$ C에서 10분동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 2 μ g에 5 μ l의 10mM dNTP mix, 1 μ ldml RNasin(20U/ μ l), 1 μ l의 AMV RTase (200U/ μ l), 10 μ l의 5 \times RT buffer (250mM Tris-Cl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 섞은 다음 DEPC-treated water를 가하여 최종부피가 50 μ l가 되도록 하였다.

이 30 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 42 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하고, -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였다.

⑦ cDNA의 PCR증폭

중합연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer

9600,USA)에서 template로 cDNA 5 μ l, Taq polymerase 2 unit, 2.5mM dNTP 1 μ l, sense primer 10 pmole 1 μ l, antisense primer 10pmole 1 μ l, 10x buffer 3 μ l 및 탈이온수를 첨가하여 총 30 μ l로 하였으며, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 1회, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 1회 시행한후 1.2%내외의 한천겔에서 전기영동하였다.

내인성 표준물질로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 Phospho- lipase, TPH 유전자 발현정도를 보정하였다.

각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였으며, Phospholipase 유전자의 크기는 360bp, TPH 유전자의 크기는 390bp로 하였고, Phospholipase의 sense primer는 5'-CAGCCTGCATGAAGTCTGTCA-3'(21mer)와 antisense primer는 5'-GGTATGCTTGCTGTGACTGGT-3'(21mer)로 합성하였고, TPH의 sense primer는 5'-CACGGAAGAAGAGATTAA GACCT-3'(23mer) 와 antisense primer는 5'-GCCAGGCCAATTTCTTGGGAGAA-3'(23mer)로 합성하였다.

House keeping 유전자인 GAPDH 유전자는 189bp로 하였으며, sense primer는 5'-GTCATCATCTCCGCCCTTC-3' (20mer) 와 antisense primer는 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'(20mer)로 하였다.

Genomic DNA나 spliced mRNA가 증폭되는 현상을 방지하기 위하여 적어도 1개의 intron이 포함하게 하였다.

⑧ 통계처리

실험결과는 SPSS를 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차(mean±standard error)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Student's t-test 검정을 실시하였다.

III. 實驗成績

1. Tooth-pulp stimulation에 의해 유발된 악이복근근전도에 대한 蜂毒의 효과

Tooth-pulp stimulation(단일자극, 矩形波, 지속 0.3ms 및 빈도 0.5Hz)에 의해 유도된 JOR에서 생리식염수 주입군의 악이복근근전도의 변화는 주입즉시 93.93±2.23, 10분 후 99.36±3.73, 20분 후 94.07±4.48, 30분 후 92.78±1.96, 40분 후 98.19±4.93, 50분 후 88.45±2.94, 60분 후 101.31±7.86로 나타났으며 蜂毒주입군에서 주입즉시 71.50±8.08, 10분 후 64.27±6.41, 20분 후 72.66±7.80, 30분 후 75.17±5.87, 40분 후 74.36±7.33, 50분 후 81.09±6.79로 나타나 대조군에 비하여 유의한(P<0.05) 진통효과가 인정되었다. (table 1)

Table 1 Effects of Bee venom injection on the Amplitude of a Digastric Electromyogram(dEMG) induced by Tooth Pulp Stimulation

	contr.	0	10	20	30	40	50	60 min
N S	99.83 ± 2.62 ^{a)}	93.93 ± 2.23	99.36 ± 3.73	94.07 ± 4.48	92.78 ± 1.96	98.19 ± 4.93	88.45 ± 2.94	101.3 ± 7.86
	101.8 3± 1.97	71.50 ± 8.08*	64.27 ± 6.41*	72.66 ± 7.80*	75.17 ± 5.87*	74.36 ± 7.33*	81.09 ± 6.79*	91.74 ± 7.68

a) : Mean ± Standard error

* : P <0.05

NS:normal saline(0.1ml/rat) was injected

2. RT-PCR을 이용한 Phospholipase mRNA 발현에 대한 蜂毒의 효과

Mastocytoma(P-185 HTR, 한국세포주은행)를 RT-PCR기법을 이용하여 Prostaglandins 생합성 율속제한효소인 Phospholipase의 mRNA 발현정도를 조사한결과 10 µl 생리식염수를 100%로 했을 때 100µg/ml 蜂毒처리군에서 93.75±0.42%, 10µg/ml 蜂毒처리군에서는 31.74±18.98%, 1µg/ml 蜂毒처리군에서는 120.98±24.46%로 나타나 10µg/ml 蜂毒처리군이 대조군에 비하여 유의한(P<0.05) 감소를 보였다. (table 2)

Table 2 The Effect of Bee Venom on the Representation of Phospholipase mRNA by RT-PCR in P-185 cell

Group	O.D(%)
Control	100
A	93.75 ± 0.42 ^{a)}
B	31.74 ± 18.98*
C	120.98 ± 24.46

a) : Mean ± Standard error

* : P < 0.05

Control : treated group with normal saline 10 μ l

A : treated group with Bee Venom 100 μ g/ml

B : treated group with Bee Venom 10 μ g/ml

C : treated group with Bee Venom 1 μ g/ml

3. RT-PCR을 이용한 TPH mRNA 발현에 대한 봉독의 효과

Mastocytoma(P-185 HTR, 한국세포주은행)를 RT-PCR기법을 이용하여 Serotonin 생합성 율속제한효소인 TPH의 mRNA 발현정도를 조사한결과 10 μ l생리식염수를 100%로 했을 때 100 μ g/ml봉독처리군에서 88.60 ± 4.71%, 10 μ g/ml봉독처리군에서 131.37 ± 16.87%, 1 μ g/ml봉독처리군에서 86.07 ± 8.55%로 나타나 10 μ g/ml봉독처리군이 대조군에 비하여 유의한(P<0.05) 증가를 보였다.(table 3)

Table 3 The Effect of Bee Venom on the Representation of TPH mRNA by RT-PCR in P-185 cell

Group	O.D(%)
Control	100
A	88.60 ± 4.71 ^{a)}
B	131.37 ± 16.87*
C	86.07 ± 8.55

a) : Mean ± Standard error

* : P < 0.05

Control : treated group with normal saline 10 μ l

A : treated group with Bee Venom 100 μ g/ml

B : treated group with Bee Venom 10 μ g/ml

C : treated group with Bee Venom 1 μ g/ml

IV. 考 察

봉독요법은 봉독을 穴位에 주사하여 刺鍼 효과 및 봉독의 특이물질에 의한 약리작용을 동시에 질병치료에 이용한 新針療法으로 그 성분은 peptides, enzymes, nonpeptide components등으로 구성되어 있는데 peptides에는 mellitin, apamin, MCD peptide, adolapin, enzymes에는 hyaluronidase, phospholipase A2, nonpeptide components에는 histamine, dopamine, noradrenaline¹⁶⁾²⁰⁾등이 있다.

봉독療法은 BC 2000년경 이집트 파피루

스 문서에 벌침이나 죽은 벌을 아픈 곳에 직접 비벼 치료했다는 기록이 남아있다.

한의학적인 최초의 기록은 기원전 168년에 매장된 중국 장사 마왕퇴. 3호한묘에서 1973년에 출토된 마왕퇴의서에 蜂毒요법 2례가 실려있는데 닭이나 개의 간 등을 이용하여 蜂毒을 채취하고 피부를 통해 투여하였으며, 정기를 보익하거나 발기부전을 치료하기 위한 용도로 사용되었다¹⁷⁾.

본격적인 연구는 17세기 네덜란드 학자인 Swanmerdam에 의해서 시작되었으며, 1858년 프랑스의 Desjardins가 류마티스성 질환에 응용하였고, 1870년대 영국의 Dr. Rucumkis의 “봉침의 RA 및 Gout에 대한 효과”, 1888년 Dr. Philp의 “봉침과 RA의 특이적 관계에 대한 보고” 및 1910년 Terc P.의 “봉침이 류마티즘 및 Gout에 미치는 효과” 등 주로 류마티스나 통풍 등 관절염에 대한 효과 위주로 연구가 활성화되며 1968년 Habermam E이 蜂毒의 성분을 발표하였다.¹⁶⁾

또한 Chen등은 蜂毒 자체보다는 bee venom peptide가 消炎, 鎮痛, 浮腫에 있어서 더 효과적이고³⁴⁾ Chang YH등은 관절염에 대한 효능을 제시하였다.³⁵⁾

통증의 연구에 있어서 屈曲退縮反射, TFR, writhing syndrome, 발성역치, JOR 등의 다양한 모델들이 사용되고 있으며⁷⁾⁴⁷⁾ 통증을 유발하는 구체적방법들로는 0.7% 초산생리식염액을 0.2ml/20g씩 복강내에 주입하는 법과 5% formalin액 0.1ml/rat를 右

側後肢足背部에 피하주사하는 법, micro-crystalline sodium urate를 足趾部位에 좌우 각각 0.2cc씩 2일간격으로 2회에 걸쳐 투여하는 법등이 있으며, 진통의 측정지표로는 초산법에 의한 writhing syndrome의 회수, randallsellito법, 열판을 이용하여 발빠는 시간(paw lick time)과 탈출시간(escape time)으로 진통을 측정하는 열판법과 尿, 血液 및 腦部の catecholamine, serotonin등의 성분분석을 하여 진통을 측정하는 방법등이 있다.⁹⁾

본 실험에서는 JOR을 통증의 지표로 사용하였는데, 고양이나 사람에게 있어서는 양극에 의해 전달되는 전류가 치수강에 한정될 수 있으나⁴⁸⁾ rat에서는 Enstrand등이⁴⁹⁾ 치수제거시에도 JOR은 존재하고 inferior alveolar nerve의 제거시에는 JOR이 유발되지 않은 점을 드는등 rat에서의 JOR 방법론에 부정적인 견해를 나타내었으며⁷⁾⁵⁰⁾ Pajot 등은 측정을 위한 외과적 손상에 대해서도 문제제기를 하였다.⁵²⁾ 하지만 Rajaona등은⁴⁸⁾ 비록 자극이 pulpal nerve에 한정되지 않지만 통증의 실험원으로서 유용하다고 피력하였다. 실제 진통에 관한 많은 실험이 JOR을 지표로 이루어지고 있다.⁶⁾¹⁵⁾⁵¹⁾

Serotonin은 장운동을 증가시켜주는 enteramin과 혈관수축작용이 있는 serotonin으로 불리다가 1951년에 5-hydroxytryptamine합성으로 serotonin과 enteramine이 5-hydroxytryptophan의 동일한 대사물질이

라고 알려졌다.

그 직후 포유류의 CNS에서도 발견되어 뇌의 부분마다 서로 다른 농도로 존재하는 것이 밝혀져 신경전달물질로 인식하게 되었다. Serotonin은 90%이상이 장점막의 enterochromaffin cell에 있고 그 이외에 뇌와 척수에서도 합성된다. 혈액에서는 혈소판에서 찾아볼수 있는데 합성능력은 없으며 교감신경계와 부교감신경계 신경말단부의 신경전달물질 소포체와 유사한 활성운반체 기전에 의하여 amine을 농축, 저장하고 있다. Serotonin은 serotonin을 신경전달물질로 합성, 저장, 분비하는 serotonin계 신경의 세포체를 찾을수 있는 뇌간의 raphe핵에서 찾을수 있다. Serotonin은 여러 가지 질병에서 역할을 하는 것으로 알려져 있고 아마도 더 많은 질병에 연관이 될 것이다. 뇌에서 serotonin계 신경은 기분, 수면, 식욕, 체온조절, 통감, 혈압조절 및 구토 등의 다양한 기능에 관여하며 위장관 평활근과 혈관을 수축시킨다. 또한 척수의 배측각에서의 하행성 세로토닌성 시스템은 통증의 전달을 억제한다는 증거가 있다.²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾²⁸⁾

TPH는 serotonin 생합성의 율속제한 효소이다. p-chlorphenyalanine이 TPH를 억제하여 serotonin level을 90%까지 감소시키는데 독성으로 인해 아직 실용화는 되지 못하였다. 그외 6-fluorotryptophan, p-chloropetamine등이 TPH억제를 통해 serotonin 생합성을 억제하는 약물로 연구되고 있다.

serotonin의 기능을 평가하는데에 TPH gene을 사용할 수 있다. 하지만 중추신경계내의 낮은 농도로 인해 TPH mRNA levels의 측정에 어려움이 많았다. 예를 들어 ribonuclease protection assay을 통한 측정에 있어서 pooling of 5-10 dissected brainstems이 필요하여 기술적 어려움이 있었다. 1988년 처음으로 TPH mRNA levels을 competitive RT-PCR을 이용하여 측정하기 시작한 이후로 여러 방면에서 그 효용이 높아지고 있다.¹⁾⁸⁾²⁷⁾²⁸⁾³⁶⁾

Arachidonic acid는 eicosanoid전구물질이다. Eicosanoid가 합성되기 위해서는 먼저 arachidonate가 phospholipase A2(PLA2)와 같은 1개 또는 그이상의 지방분해효소에 의해 막인지질로부터 유리 또는 이동되어야 한다. PLA2에는 심장형 PLA2(cardiac PLA2 : cPLA2), 세포질형 PLA2(cytosolic PLA2), 분비형 PLA2(secretory PLA2)등 적어도 세가지 종류가 존재한다. cPLA2는 그 활성발현에 칼슘을 필요로 하지 않는다. 세포질형 PLA2와 분비형 PLA2는 칼슘의 존재이며, arachidonate의 유리에 더 광범위하게 관여한다. cPLA2는 리포다당내독소(lipopolysaccharide endotoxin), 종양괴사인자(tumor necrosis factor) 및 분열촉진성 성장인자(mitogenic growth factor) 등과 같은 물질들에 의해 천천히 활성화된다. 이와 같은 인자들에 의해 먼저 phospholipase C의 효소활성이 증가하게 되면 칼슘의존성 세포막 활성화와 MAP kinase에 의한 인산

화가 일어나며 이에 의해 cPLA2의 활성화가 이루어진다고 생각된다. arachidonate는 이외에 phospholipase C와 diglyceride 지방 분해효소의 복합작용에 의해서도 유리될 수 있다. 이러한 lipase들의 작용경로는 corticosteroids와 같은 스테로이드성 항염 약물에 의해 억제된다.⁵⁾

이와같이 Phospholipase가 Prostaglandins의 합성에 관여하는데⁵³⁾ RT-PCR에 의해 변화를 관찰할 수 있다.²⁹⁾

그 종류로 PGE, F, A, B등이 있는데 염증반응시 나타나는 부종, 통증 등의 증상을 유발하고, PGF2a, PGA, PGB, PGE는 혈관을 확장시키며, PGFs는 기관지 평활근을 수축시키고 PGEs는 기관지 평활근을 이완시킨다. 또한 PGI는 혈소판 응집을 억제하며 PG E1, E2, A1은 위산3 분비와 pepsin 분비를 억제시켜 위점막을 보호하며 PGE2, PGF2는 강력한 자궁수축작용이 있어 유산 목적으로 이용된다.³⁾ 그의 prostaglandins은 시냅스의 전달물질로 작용한다기보다는 cAMP를 매개체로 하여 신경조절작용을 일으킨다고 알려져 있다.²⁾ 그리고 통증에 있어서는 pain endings에 민감도(sensitivity)를 증가시켜 줄 뿐 직접적으로 흥분시키지는 않는다.²⁶⁾

1983년 Kary Mullis는 PCR을 발견하여 1993년 노벨화학상을 받았다. 그 후 Saiki 등은 *Thermus aquaticus*라는 온천에 사는 미생물에서 추출한 polymerase를 DNA polymerase I 대신에 사용하였다. 이 미생

물은 섭씨 72도의 고온에서 생존하므로 그 polymerase역시 72도 이상의 고온에서 파괴되지 않고 활성을 잃지 않을 것이라는 예리한 자연현상의 관찰에서 나온 발견이었다. 이 Taq. polymerase의 사용으로 PCR은 sensitivity, specificity, yield, fidelity등 모든 면에서 월등한 향상을 가져올 수 있었고 그 응용범위를 무한대로 넓혀가기 시작하였다. 이 Taq. polymerase는 1993년 Science지에 의해 The Molecule of the Year로 선정되었다.³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾

유전자의 양을 정량하기 위한 방법으로는 써던, 노던 블로팅(Southern, Northern blotting)법이나 RNase 보호분석법이 주로 이용되고 있다. 이 방법들은 많은 양의 시료가 필요하고 소요시간이 길며 과정이 어려워 다량의 시료를 동시에 처리하기 어렵다. PCR법은 매우 적은 양의 특정유전자를 증폭시키기 때문에 PCR에 영향을 주는 요소들의 적은 변화에 의해서도 최종 증폭된 유전자의 양에 큰 차이를 주게 되어 정량적 방법으로 이용되기 어렵다. 그러므로 정량하고자 하는 목표유전자와 구별할 수 있는 내부표준자(internal standard)을 함께 사용하면 PCR법은 정량적 방법으로 이용할 수 있다. 즉 같은 PCR시발체(primer)로 일정한 농도의 목표 유전자와 일련의 농도로 희석된 내부 표준자를 같은 튜브에서 함께 PCR을 시행하면 양자는 동일한 영향을 받으면서 경쟁적으로 증폭하게 된다. 최종적으로 각각의 PCR산물 농도는 처음 농

도에 비례하여 생성하게 된다.¹⁾

RT-PCR을 이용한 mRNA의 정량에서 가장 문제가 되는 것은 RNA시료내의 genomic DNA 오염이다. 현재 사용되고 있는 전체 RNA분리법(guanidinium thiocyanate/acid phenol: chloroform 추출, CsCl 쿠션을 통한 초원심분리법 등)은 대개 어느 정도의 genomic DNA가 RNA시료에 오염되기 마련이다. PCR은 역전사반응에서 합성된 cDNA와 genomic DNA를 구별하여 증폭할 수 없기 때문에 cDNA를 정확히 정량하기 힘들어진다. 이러한 이유로 RNA시료에서의 DNA오염을 없애야 하는데 다음과 같은 3가지 방법이 있다.

첫째는 oligo d(T) 크로마토그래피를 통하여 전령 RNA만을 분리하여 이를 역전사 반응에 이용하는 것이다.

둘째는 RNA시료를 DNase I 으로 처리하는 것이다.

셋째는 PCR반응에 사용되는 primer를 디자인할 때 각각다른 엑손에서 고르거나 genomic DNA의 intron을 포함하도록 하는 것이다.¹⁾

본실험에서는 genomic DNA 오염을 방지하기 위하여 RNA시료를 DNase I 으로 처리하고 genomic DNA의 intron을 적어도 하나 포함되게 하였다.

분광광도계에서 O.D 260의 값의 환산으로 측정된 유전자의 양은 실제양과 차이가 있어 경쟁적 PCR법에 의해 정량된 유전자의 양은 실제 농도를 반영하지 못하는 경우가

있다. 그러므로 β -actin이나 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 같은 House keeping 유전자를 같은 방법으로 정량하여 보정해 주는데¹⁾ 본 실험에서는 GAPDH 유전자를 사용하여 보정하였다.

최근 蜂針이나 蜂毒의 진통효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 高¹³⁾는 writhing syndrome을 지표로 방풍수침군, 봉침수침군, 蜂毒주입군(0.1%; 0.005ml/10g)이 모두 유의한 진통효과가 있으나 蜂毒주입군이 가장 우수한 효과를 나타내었다고 하였으며 李¹⁴⁾는 writhing syndrome을 지표로 中脘, 足三里를 선정하여 0.1ml와 0.05 ml/mouse(0.1%) 蜂毒주입군에서 유의한 효과가 있으며 30분까지도 효과가 지속됨을 보고하였다. 金²⁰⁾은 writhing syndrome 및 熱板法을 지표로 腎俞를 선정하여 0.5mg/kg, 1.0mg/kg의 蜂毒을 주입한 결과 writhing syndrome에서는 모두 유의한 진통효과가 있었으며, 熱板法에서는 1.0mg/kg의 蜂毒주입시 1시간과 3시간에서 유의한 진통효과가 있고 5시간에는 유의성이 없다고 보고하였다. 金¹⁵⁾은 JOR을 지표로 合谷을 선정하여 0.1ml/rat(0.2%)의 蜂毒주입시 동측합곡혈인 경우 주입즉시, 10분후, 40분후에, 對側에서는 주입즉시, 10분후, 20분후 유의한 진통효과가 있다고 보고하였다. 또한 陳³⁴⁾은 蜂毒 자체보다는 蜂毒 peptide가 더 진통효과가 우수하였다고 보고하였다. Walter reed국방연구소의 동물에 대한 보

고서에 의하면 한 마리의 벌에 쏘이면 蜂毒이 혈중에 유입되어 혈액순환을 통해 뇌하수체를 자극하게 되고, 따라서 adrenal cortico trophic hormone(ACTH)이 분비되어 부신피질을 자극하므로 정상보다 2-3배 높은 혈중 cortisol 수치를 약 10일간 지속적으로 유지하여 진통 및 소염작용에 관여한다고 밝히고 있다.¹³⁾¹⁴⁾

Serotonin은 동통을 억제하는 신경전달물질로⁴⁴⁾ Yaskh T. L.은 中腦水道周邊 회백질에 morphine을 미량 주입하면 척수액에 serotonin이 증가하며, serotonin농도의 상승 정도와 통각소실정도사이에는 유의한 상관관계가 있다고 보고하였다.³¹⁾ 침과 관련되어 동통조절기전에 관여한다는 보고가 계속되고 있는데⁴⁶⁾, Cheng등⁴¹⁾에 의하면 serotonin의 생산을 억제하는 약물로 알려진 parachlorophenylalanine(PCPA)를 前置했을 경우 전침자극에 의해 나타나는 진통효과가 감소한다고 하였으며, Han등⁴²⁾⁴³⁾은 naloxone과 PCPA를 함께 사용하였을 경우 전침자극이 가지는 진통효과가 완전히 차단된다고 하였다.

또한 침자극후 뇌의 5부분(cortex, hippocampus, thalamus, midbrain and medulla)를 절개하여 신경전달물질의 양을 조사한 결과 5-HT는 증가하고 GABA는 감소하여 5-HT가 침진통에 일정한 역할을 하는 것으로 보여진다는 보고도 있었다.⁴⁵⁾

그 외 金²²⁾은 針, 灸, 紅花水針을 이용하여 전두피질에서는 針 및 紅花水針群이, 선

조체에서는 紅花水針群이, 편도에서는 灸, 紅花水針群이, 해마에서는 灸 및 紅花水針群이 함량의 유의한 증가를 보였다고 하였으며, 金²³⁾은 전두피질에서 電針, 乳香水針群이, 선조체에서 針, 電針, 乳香水針群이, 편도에서 電針 및 乳香水針群이, 해마에서 電針 및 乳香水針群이 유의한 증가를 보였다고 하였다. 또한 金²⁴⁾은 足三里 針刺, 鄭¹²⁾은 附子藥鍼이 혈장 serotonin함량을 증가시킴을 보고하였으며 孫²⁵⁾은 고빈도전침 자극이 serotonin성 신경세포를 활성화한다고 보고하였다.

이와같은 연구결과에 근거하여 본 실험에서는 蜂毒을 정맥주사하여 JOR에 미치는 영향을 관찰하였고 蜂毒처리한 mastocytoma(P-185 HTR, 한국세포주은행)로 prostaglandins 을속제한 효소인 phospholipase와 serotonin 을속제한 효소인 TPH의 유전자 발현정도를 RT-PCR을 통하여 조사하였다.

Tooth-pulp stimulation에 의한 JOR을 통한 실험에서는 蜂毒주입후 즉시부터 $71.50 \pm 8.08(P < 0.05)$ 로 효과가 나타나기 시작하여 50분후까지도 ($81.09 \pm 6.79, P < 0.05$) 그 효과가 지속되었다. 진통지속시간에 있어서 李¹⁴⁾는 蜂毒이 30분까지 지속효과가 있다고 하였으나 본 실험에서는 50분까지 지속되었다. 이는 30분이후에는 유의한 효과가 없었다는 當歸水針¹¹⁾과는 차이가 있으며 金²⁰⁾은 蜂毒이 3시간까지도 유의성이 있다고 한 보고와도 차이가 있었다. 金¹⁵⁾은 동

측합곡혈인 경우 주입즉시, 10분후, 40분후에, 對側에서는 주입즉시, 10분후, 20분후 유의한 진통효과가 있다고 보고하였다.

P-185에서의 phospholipase의 mRNA 발현은 용량에 비의존적으로 변화했는데 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 蜂毒(93.75 ± 0.42)과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 蜂毒(120.98 ± 24.46)으로 처리한 경우 유의성이 없게 변화가 있었고 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우(31.74 ± 18.98 , $P < 0.05$)는 유의하게 증가하였다. 이는 金등이¹⁶⁾²⁰⁾ 蜂毒peptide인 apamin과 MCD peptide가 prostaglandin E가 prostaglandins으로 합성되는 것을 억제한다는 것과 일치한다. 그러나 mouse skin에 蜂毒을 주사한 경우 prostaglandins이 증가한다는 보고³⁰⁾와는 차이가 있었다.

TPH mRNA의 발현은 용량에 비의존적으로 변화했는데 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 蜂毒(88.60 ± 4.71)과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 蜂毒(86.07 ± 8.55)으로 처리한 경우 유의성없게 감소했고 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (131.37 ± 16.86 , $P < 0.05$)의 경우는 유의성있게 증가하였다. 이는 침등에 의한 진통효과가 serotonin의 증가에 의한다는 기존의 보고¹²⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾³¹⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾와 일치했다. 그러나 병태생리학적으로 복측슬기핵(dorsal raphe nuclei)에서 세로토닌성 뉴론의 흥분은 편두통을 일으키며 편두통 치료에 쓰이는 약들은 복측슬기핵 뉴론의 흥분을 억제시킨다. 또한 serotonin은 histamine처럼 동통과 가려움, 감각신경 말단에 대한 강력한 자극물질이며, 곤충과 식물가시에 의하여 유발된 증상의 원인물질이기도 하다.²⁾⁵⁾²⁶⁾³⁶⁾

이로부터 蜂毒이 prostaglandins이나 serotonin의 합성에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 논란의 여지가 남아있으나 통증을 억제함에 있어서 prostaglandin이 감소하고²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾²⁶⁾ serotonin이 증가한다는¹²⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾³¹⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾ 가설에 입각해서 살펴보면 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.1%)에서 phospholipase가 감소하고 TPH가 증가하여 蜂毒의 진통효과는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.1%)에서 그 효과가 있다고 추정할 수 있다. 기존의 실험에서는 高¹³⁾는 0.005ml/10g(0.1%), 李¹⁴⁾는 0.1ml(0.1%)와 0.05ml/mouse(0.1%), 金²⁰⁾은 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 金³³⁾은 0.1ml/rat(0.2%)으로 실험하여 유의한 효과가 있었다고 보고하였는데 본 실험의 용량은 세포수준이라 비교가 어렵다.

이상의 결과는 tooth-pulp stimulation에 의해 유도된 JOR을 통하여 蜂毒이 진통효과가 있으며 그 효과는 주입즉시부터 나타나 50분간 지속됨을 알 수 있다.

더 나아가서 이러한 蜂毒의 진통효과의 기전으로 蜂毒이 phospholipase 및 TPH의 mRNA 발현에 영향을 미쳐 prostaglandins 및 serotonin의 합성에 변화가 생기며 그 용량은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.1%)가 적정할 것으로 보인다.

앞으로도 蜂毒의 진통효과에 대한 더 구체적인 기전연구가 필요할 것으로 사료되며 蜂毒의 적정용량에 대한 실험적, 임상적 연구가 지속되어야 할 것으로 보여진다. 더 나아가서 유전학적, 분자생물학의 한의학적 응용이 더욱 많아져야 할 것이다.

V. 結 論

蜂毒의 진통효과를 알아보기 위하여 tooth-pulp stimulation에 의해 유도된 JOR을 사용하여 관찰하고 그 기전을 알아보고자 통증에 관여하는 물질인 prostaglandins과 serotonin의 율속제한효소인 phospholipase와 TPH의 mRNA발현을 RT-PCR을 통하여 살펴본결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tooth-pulp stimulation에 의해 유발된 악이복근근전도에 대한 蜂毒의 효과는 대조군에 비해 蜂毒처리군에서 주입즉시부터 50분후까지 그 효과가 유의하게 지속되었다.

2. RT-PCR을 이용한 phospholipase mRNA 발현에 대한 蜂毒의 효과는 蜂毒10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 유의한 감소를 보였다.

3. RT-PCR을 이용한 TPH mRNA 발현에 대한 蜂毒의 효과는 蜂毒10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 유의한 증가를 보였다.

參 考 文 獻

1. 양인명, 최영길: 분자의학연구기법, 서울, 고려의학, 9-36, 121-136, 167-190, 1999

2. 30명의 의과대학교수편: 생리학, 서울, 한우리, 120 285 330 459, 1999
3. 유지수, 황애란: 임상약리학, 서울, 현문사, 76, 1994
4. 이우주: 약리학강의, 서울, 선일문화사, 146 347 417 420, 1984
5. 49명의 의과대학교수편: 임상약리학, 서울, 한우리, 309-325 345-361, 1998
6. 尹相協, 曹眞榮, 閔炳一 : 上丘刺戟이 흰쥐의 開口反射에 미치는 영향, 경희의학, 8(3), 254-258, 1992
7. 김지훈: 捻轉法이 병행된 침자극 및 전침자극이 진통효과에 미치는 영향, 서울, 경희한의대 석사학위논문, 1998
8. 박순희: RT-PCR을 이용한 흰쥐 송과선 tryptophan hydroxylase유전자 발현의 정량적 분석, 경희의과대학 석사논문, 1997
9. 손관영, 박영배, 강성길: 침구학에서의 진통·소염에 대한 소고, 서울, 대한침구학회지 75-101, 1993
10. 고흥균, 최용태: 金絲注入 자극이 抗炎鎮痛 및 항피로작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 서울, 경희한의대논문집, 7:73-86, 1984
11. 朴快煥: 當歸水針刺戟이 鎮痛效果에 미치는 영향에 대한 연구, 경희한의대논문집, 7:261-271, 1984
12. 鄭善喜: 附子藥鍼이 鎮痛 및 消炎作用에 미치는 영향, 서울, 경희한의대 석사학위논문, 1996

13. 고희균: 봉침독요법이 항염, 진통 및 해열에 미치는 효능에 관한 연구, 서울, 대한한의학회지, 13(1):283-291, 1992
14. 이종석: 증완 및 족삼리의 蜂毒요법이 진통효과에 미치는 영향, 서울, 경희한의대논문집, 15(1):485-495, 1992
15. 김이화, 노식, 이재동, 민병일: 흰쥐에서 합곡혈 蜂毒약침자극에 의한 개구반사의 반응, 서울, 대한한의학회지, 20 (1) : 106-112, 1999
16. 권기록, 고희균, 김창환: 蜂針에 대한 고찰, 서울, 대한침구학회지, 11 (1) : 159-171, 1994
17. 인창식, 고희균: 蜂毒요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 蜂毒요법 2례, 서울, 대한침구학회지 15 (1) : 143-147, 1998
18. 김지영, 고희균, 김용석 외: 蜂毒요법의 최신 연구동향에 대한 고찰, 서울, 대한침구학회지, 14(2):47-71, 1997
19. 이병철: Extrusion type의 요추 추간판 탈출증 환자의 蜂毒요법을 병행한 한의학적 치료의 임상보고, 서울, 대한침구학회지, 16(2):285-294, 1999
20. 김지영, 고희균, 김용석 외: 蜂毒약침요법의 항염증작용에 관한 실험적 연구, 서울, 대한침구학회지, 15(1):317-331, 1998
21. 권기록, 고희균: 蜂毒약침요법이 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 97-103, 1998
22. 김영진 : 침, 구 및 홍화수침자극이 흰쥐 뇌부위별 Serotonin 및 Catecholamine함량에 미치는 영향, 서울, 경희한의대 박사학위논문, 1991
23. 김정곤: 침, 전침, 자락 및 유향수침자극의 진통작용 및 흰쥐 뇌부위별 serotonin 및 Catecholamine함량에 미치는 영향, 서울, 경희대학교 박사학위논문, 1992
24. 김이화: 침자가 동통유발된 흰쥐의 TFL, Glucose 및 내분비대사에 미치는 영향, 서울, 경희대학교 석사학위논문, 1995
25. 손성세: 고빈도전침자극의 파형 및 자극시간에 따른 중추신경계 신경세포 및 뇌간의 Serotonin성 신경세포의 활성변화에 미치는 영향, 서울, 경희대학교 박사학위논문, 1998
26. Arthur C. Guyton: Textbook of Medical Physiology, W.B. Saunders Company, 8:520-521, 1991
27. Clark MS, Russo AF: Measurement of tryptophan hydroxylase mRNA levels by competitive RT-PCR., Brain Res Brain Res Protoc 1998 Jun; 2(4) :273-85
28. B.L. Jacobs, E.C. Azmitia: Structure and function of the brain serotonin system, Physiol. Rev. 72:165-229, 1992
29. Fonteh AN, Reed W, Samet JM: Determination of phospholipase A2s expression in mast cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction, Methods Mol Biol, 120:91-105,

1999

30. Schmidt DK, Destephano DB, Brady UE: Effect of honey bee venom on prostaglandin levels in mouse skin, *Prostaglandins*, Aug;16(2):233-8, 1978
31. Yaksh T. L., Tyce G.M.: Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord, *Brain Res.*, 171:176-181, 1979
32. Muller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, Blaser K: Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *Allergy Clin Immunol* 1998 Jun;101(6 Pt 1):747-54
33. Blaser K, Carballido J, Faith A, Cramer R, Akdis C.: Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2, *Int Arch Allergy Immunol* Sep;117(1):1-10 1998
34. Chen CY, Chen WX, Sun X: Comparison of anti-inflammatory, analgesic activities, anaphylactogenicity and acute toxicity between bee venom and its peptides, *중국중서의결합잡지*, 13(4):226-7, 1993
35. Chang YH, Bliven ML: Anti-arthritis effect of bee venom, *Agents Actions*, Jun;9(2):205-11 1979
36. Ronald F. Borne, Ph.D.: Serotonin: The Neurotransmitter for the '90s, *Drug Topics*, October 10, 108. 1994
37. Saiki R, K.; Scharf S; Faloona F; Mullis K. B; Horn G. T; Erlich H. A.; Arnheim N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985 Dec 20, 230(4732):1350-4.
38. Scharf S. J; Horn G. T; Erlich H. A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 1986 Sep 5, 233(4768):1076-8.
39. Saiki R. K; Gelfand D. H; Stoffel S; Scharf S. J; Higuchi R; Horn G. T; Mullis K. B; Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988 Jan 29, 239(4839):487-91.
40. Lawyer F. C; Stoffel S; Saiki R. K; Myambo K; Drummond R; Gelfand D. H. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1989 Apr 15, 264 (11) : 6427-37.
41. Cheng Rss and Pomeranz B: Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain

- relieving mechanisms: Endorphin and non endorphin systems, *Life Sci.* 25:1957-1962, 1979
42. Han JS, Chou PH, Lu ZC, Yang TH, et al: the role of central 5-hydroxytryptamine in acupuncture analgesia, *Sci. Sin*, 22:91-104, 1979
43. Han JS, Xuan YT: A mesolimbic loop of analgesia. I. Activation by morphine of a serotonergic pathway from periaqueductal gray to nucleus accumbens. *International Journal of neuroscience*, 29:109-118, 1986
44. McGeer P.L, Eccles J.C., McGeer E.G.: *Molecular Neurobiology of the mammalian Brain*, New York, Plenum press, 265-317, 319-343, 406-408, 603-605, 1987
45. Acupuncture Anaesthesia Research group. Human medical college: The relation between Acupuncture, Analgesia and neurotransmitters in Rabbit brain, *Am.J. Chinese Med*, 2 : 223, 1974
46. Tsai H. Y., Lin J.G., Inoki R. Further evidence for possible analgesic mechanism of electroacupuncture: Effects on neuropeptides and serotonergic neurons in rat spinal cord, *JAP. J. Pharmacol.*, 49(2)181-185, 1989
47. P. Mason, A. strassman, R. Maciewicz: Is the Jaw-Opening Reflex a Valid Model of Pain? *Brain Res. Rev.* 10, 137-146, 1985
48. J. Rajaona, R. Dallel, A. Woda: Is Electrical stimulation of the Rat Incisor an Appropriate Experimental Nociceptive Stimulus?, *Experimental neurology* 93,291-299, 1986
49. P. Engstrand, B. C. Shyu, S. A. Andersson: Is a selective stimulation of the rat incisor tooth pulppossible? , *Pain*, 15, 27-34, 1983
50. Hayashi, H: A problem in electrical stimulation of incisor tooth pulp in rats. *Exp Neurol*, 67:438-441, 1980
51. Kazuo Toda: Effects of electroacupuncture on rat jaw opening reflex elicited by tooth pulp stimulation, *Jap. J. Physiol.*, 28:485-497, 1978
52. J. Pajot, A. Vassel, L. Aigouy, J. Rajaona, A. Woda: Variations of the Jaw Opening Reflex Observed in Awake, Freely Moving Rats, *Arch.unt.Pharmacodyn*, 270, 309-317, 1984
53. Munns MJ, King RG, Rice GE: Contribution of type II PLA2 to prostaglandin formation: a study using a type II PLA2 specific inhibitor SB 203347, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, Jul ; 57 (5-6) : 361-70, 1999