대 한 약 침 학 회 지
J of korean Institute of Herbal-Acupuncture
Vol 3(1) 통권 제3호 2000

足三里 蜂毒藥鍼刺戟이 脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞의 活性에 미치는 影響

任允卿 · 姜成吉 · 崔道永

ABSTRACT

The Effect of Bee Venom Acupuncture into Chok-samni (ST36) on Neuronal Activity in the Spinal Cord

Yun-Kyoung Yim · Sung-Keel Kang · Do-Young Choi

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

This study was designed to evaluate the analgesic effect of bee venom (BV) Acupuncture into different treatment points, Chok-samni (ST36) and blank loci of the gluteal muscle and back. We investigated neuronal activity in the spinal cord using the Fos immunohistochemical technique according to the pretreatment with different concentrations of BV, thirty minutes before the formalin injection. The results were summarized as follows:

1. The number of Fos-like immunoreactive (Fos-LI) neurons in L2 segment of the saline-formalin treated group was significantly increased in NECK and VENT of the spinal cord as compared with that of the room control group. However, there was no

significant change in the number of the Fos-LI neurons in L2 segment of the BV-formalin treated group as compared with that of the room control group.

2. The number of Fos-LI neurons in L3-5 segment of the saline-formalin group was significantly increased in all the regions of142the spinal cord as compared with that of the room control group. However, the Fos-LI neurons in L3-5 segment of the BV-formalin treated group was dramatically decreased in all the regions of the spinal cord as compared with that of the saline-formalin group. Therefore, these results indicated that the BV acupuncture suppressed the nociceptive neuronal activities in L3-5 of the spinal cord induced by formalin injection.

3. There was a strong positive correlation between the formalin-induced pain behavior and the number of the Fos-LI neurons in L3-5 segment.

Keywords : bee venom (BV) acupuncture, Chok-samni (ST36), Fos-like immunoreactive (Fos-LI) neuron.

Ⅰ. 緖 論

蜂毒藥鍼療法은 꿀벌의 鍼을 直接 刺入하거나, 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出, 加工한 蜂毒藥鍼液을 一定한 穴位上에 注入함으로써 刺鍼效果와 蜂毒의 藥理作用을 同時에 活用한 鍼療法이다[3,16].

現在 蜂毒藥鍼療法의 鎭痛[13], 消炎[12], 解熱[8], 抗痙攣[9], 腫瘍抑制 및 免疫增强效果[10], 毒性[14] 等에 對하여 많은 實驗的 硏究들이 報告되어 있다.

鎭痛效果의 實驗的 檢證을 위한 痛症 model로서 最近 formalin test가 많이 利用되고 있는데, 이는 損傷된 組織으로부터 誘發되는 緩慢하고 持續的인 痛症에 대한 神經系의 反應을 觀察할 수 있다는 점에서, 臨床的으로 慢性痛症 model과 類似하며[21,28], 鎭痛效果를 觀察하는 것뿐만 아니라, 痛症誘發機轉 및 鎭痛機轉을 밝히는 데에도 活用되고 있다[43].

Fos 蛋白質은 刺戟에 對하여 빠르게 反應하여 神經細胞內에서 生産되는데, 이러한 Fos 蛋白質의 特性을 利用하여, 神經細胞의 活性이 增加됨으로써 神經細胞核內에 蓄積되는 정도를 Fos 蛋白質에 對한 免疫組織染色法으로 測定하여 神經細胞의 活性變化를 間接的으로 檢證할 수 있다[34,35,36].

이에 著者는 formalin test와 Fos 免疫組織染色法을 利用하여, 足三里 蜂毒藥鍼刺戟에 따른 formalin-induced pain behavior및

脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞의 活性變化를 觀察하였던 바, 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 動物

體重 200-250g인 Sprague Dawley種 雄性 rat(大韓實驗動物, n=80)를 選別하여 stress 및 環境의 變化에 따른 影響을 最小化함으로써 實驗外的 要因들이 神經細胞의 活性에 影響을 미치지 않도록 實驗動物을 管理하였다. 또한 實驗前後에 實驗動物의 狀態를 검사하여 外傷의 與否와 疾病狀態를 조사하였고, 이를 바탕으로 正常的인 實驗動物만을 選別하여 實驗에 使用하였다. 모든 實驗은 神經活性의 diurnal variation을 排除시키기 위해 午前 8時에서 午後 5時 사이에 實施하였다.

2. 取穴

實驗動物의 蜂毒藥鍼刺戟은 足三里 藥鍼刺戟群과 任意穴 藥鍼刺戟群으로 나누어 實施하였다. 足三里 藥鍼刺戟群은 formalin 投與 30分 前에 實驗動物의 後肢에 있는 tibia anterior tubercle의 外側 5mm에, tibia와 fibula 사이에 位置하고 있는 兩側 足三里(Chok-samni, ST36)에 各其 다른 濃度의 蜂毒藥鍼液 20㎕씩을 藥鍼刺戟하였으며, 任意穴 藥鍼刺戟群은 實驗動物의 臀部 任意穴 및 背部 任意穴에 足三里 藥鍼刺戟群과 同一한 量으로 藥鍼刺戟하였다.

3. 蜂毒藥鍼刺戟

實驗에 使用된 蜂毒藥鍼液은, 蜂毒抽出物(Sigma, Cat.# : V-3125)을 0.08mg/kg, 0.016mg/kg, 0.008mg/kg 및 0.0016mg/kg의 各其 다른 濃度로 稀釋하여, 足三里 및 任意穴에 藥鍼刺戟하였으며, 藥鍼刺戟 30分 後에 발바닥으로 formalin을 注入하여 痛症을 誘發하였다.

4. 組織의 處理

Formalin 注入 後 60分 동안 觀察한 後, 實驗動物을 전신 마취하고, 心臟을 통해 固定液을 注入하여, 固定한 腦와 脊髓(lumbosacral enlargement를 中心으로)를 實驗動物에서 신속하게 分離하고, sliding microtome이나 cryotome을 사용하여 두께가 40㎛인 組織切片을 製作하여 신속하게 PBS(pH 7.4)에 넣어 免疫組織染色法에 利用하였다.

5. Fos 免疫組織染色法

實驗에 使用된 Fos 蛋白質에 대한 一次抗體는 Human Fos 蛋白質의 4-17번 amino acid에 特異性을 가지는 epitope를 抗原으로 白兎에서 製作한 다크론 抗體(rabbit polyclonal antibody, Sigma)를 1 : 20,000으로 稀釋하여 使用하였다. 一次抗體는 4℃에서 12시간 이상 反應을 誘導한 후 二次抗體(goat anti rabbit IgG)를 1 : 200

으로稀釋하여 室溫에서 1시간 反應시켰다. 二次抗體의 反應이 모두 끝난 組織은 avidin-biotin complex(Elite kit, Vector, 1 : 250)를 使用하여 發色을 誘導하여 神經細胞內 Fos 蛋白質의 蓄積程度를 可視化하였다. 可視化가 終了된 組織은 gelatin으로 表面處理된 slide에 옮긴 다음 乾燥와 脫水의 過程을 거친 후 coverslip을 덮어, 分析할 때까지 室溫에서 保管하였다.

腰脊髓 2번(L2) 및 腰脊髓 3-5번(L3-5)의 脊髓灰色質을 SDH(superficial laminae), NP(nucleus proprius), NECK(dorsal horn의 neck, laminae X 포함) 및 VENT(ventral horn)의 4部分으로 나누어 Fos 陽性反應 神經細胞數의 變化를 觀察하였다. 實驗動物別로 가장 많은 數의 Fos 陽性反應 神經細胞를 나타내는 L2와 L3-5의 組織切片中 5개의 切片을 選擇하여 computerized image analysis system (Metamorph, Universal Imaging Co.)을 利用하여 分析하였다.

6. 結果分析 및 統計處理

免疫反應이 完了된 組織은 Zeiss Axiophort 2 현미경을 利用하여 各各 400倍 및 1000倍의 倍率로 觀察하였다. 또한, 核內에 Fos 蛋白質을 蓄積하고 있는 神經細胞數의 變化를 觀察하기 위해 digital image analysis system (Metamorph, Universal Imaging Co.)을 利用하여 平均 gray level이 130 unit 以下 되는 神經細胞만을 選擇的으로 選別하여 測定하였다. Fos 陽性反應 神經細胞數의 變化는 연결된 computer에 自動的으로 貯藏되어, 測定이 끝난 후 一括的으로 統計處理하였다. 實驗結果는 1-way ANOVA(Statview512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)를 利用하여 統計處理하였으며, probability values를 測定하기 위해 Scheffe F test를 實施하였고, 實驗動物間의 variance도 考慮하였다.

III. 實驗成績

1. Formalin 및 蜂毒藥鍼刺戟에 따른 L2 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數의 變化

Formalin-induced pain behavior를 가장 效果的으로 抑制한 0.08mg/kg의 蜂毒藥鍼液을 利用하여, 腰脊髓內 Fos 蛋白質에 對한 免疫染色性을 比較한 結果, L2 腰脊髓의 dorsal part 중 superficial dorsal horn(laminae I-II, SDH) 및 nucleus proprius(laminae III-IV, NP)에서는 對照群에 比하여 Fos 蛋白質 陽性反應 神經細胞數의 有意한 變化를 觀察할 수 없었다 (Table I, Figure 1).

한편, L2 腰脊髓의 neck part(laminae V-VI, NECK) 및 ventral horn(laminae VII-X, VENT)에서의 Fos 蛋白質 陽性反應 神經細胞數는 生理食鹽水를 前處置한

後 formalin을 注入한 群에서 對照群에 比하여 有意한 增加를 나타내었다(Table Ⅰ, Figure 1).

蜂毒藥鍼刺戟 後 formalin을 注入한 群에서도 NECK과 VENT 領域에서 Fos 蛋白質에 對한 免疫染色 陽性反應 神經細胞數의 增加가 있기는 하였으나, 對照群에 比하여 有意性은 없었다(Table Ⅰ, Figure 1).

Table Ⅰ. The number of Fos like immunoreactive (Fos-LI) neurons in spinal L2 segment of the animals pretreated with 0.08mg/kg of bee venom.

Treatment group	Number of Fos-LI neurons			
	SDH	NP	NECK	VENT
Room control	3.0±0.1	7.3±2.3	8.3±1.3	8.6±1.2
Bee venom-saline	2.6±0.9	7.3±0.9	13.1±2.4	8.8±0.8
Saline-formailn	2.8±0.5	7.9±1.1	14.8±0.4*	16.4±1.3*
Bee venom-formalin	3.6±0.7	7.3±1.5	13.6±2.0	13.8±2.2

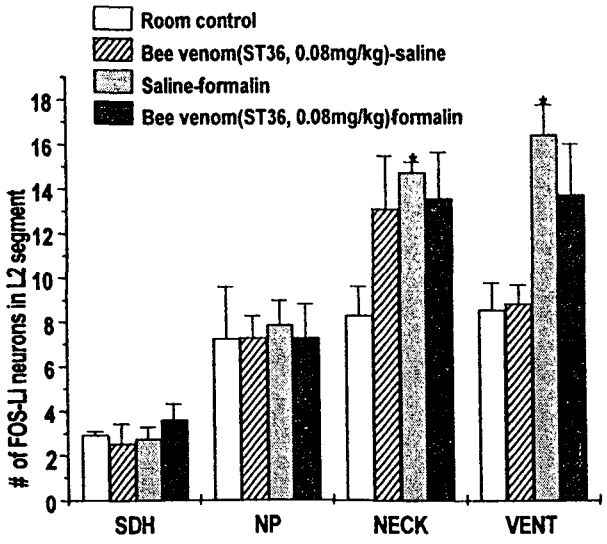


Figure 1. Graphs represent the effect of bee venom on the number of Fos like immunoreactive (Fos-LI) neurons in spinal L2 segment. Each value represents mean with SEM (n=5). * $p<0.05$ as compared with room control group.

Abbreviation

SDH : superficial dorsal horn, NP : nucleus proprius
NECK : neck of dorsal horn VENT : ventral horn

2. Formalin 및 蜂毒藥鍼刺戟에 따른 L3-5 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數의 變化

Formalin-induced pain behavior를 가장 效果的으로 抑制한 0.08mg/kg 蜂毒藥鍼液을 利用하여, L3-5 腰脊髓內에서 觀察되는 Fos 蛋白質에 對한 免疫染色性을 比較하였다. 對照群에서 觀察되는 Fos 蛋白質 陽性反應 神經細胞數는 L2 腰脊髓에서와 큰 차이를 나타내지 않았으나(Table Ⅱ, Figure 2, Figure 4A), 生理食鹽水를 前處置하고 formalin을 注入한 群에서는 Fos 蛋白質 陽性反應 神經細胞數가 對照群에 比하여 급격히 增加되었다. 이는 觀察한 脊髓內 모든 領域에서 對照群에 比하여 有意한 차이를 나타내었다(Table Ⅱ, Figure 2, Figure 4C).

蜂毒藥鍼刺戟 後 formalin을 注入한 群에서의 Fos 蛋白質 陽性反應 神經細胞數는, VENT를 除外한 脊髓의 나머지 모든 領域에서 對照群에 比하여 有意한 增加를 나타내었으나, 生理食鹽水를 前處置한 後

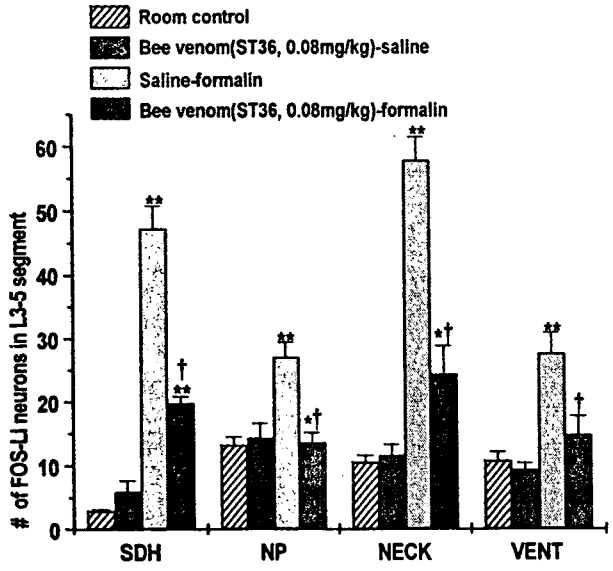
formalin을 注入한 群과 比較하였을 때는, 觀察한 모든 領域에서 有意한 減少를 나타내었다(Table Ⅱ, Figure 2, Figure 4D).

반면, 蜂毒藥鍼刺戟 後 生理食鹽水를 注入한 群에서는 對照群에 比하여 어떠한 統計的인 차이도 觀察되지 않았다(Table Ⅱ, Figure 2, Figure 4B).

Table Ⅱ. The number of Fos like immunoreactive (Fos-LI) neurons in spinal L3-5 segment of the animals pretreated with 0.08mg/kg of bee venom.

Treatment group	Number of Fos-LI neurons			
	SDH	NP	NECK	VENT
Room control	2.9±0.2	13.3±1.2	10.6±0.9	10.8±1.3
Bee venom-saline	6.0±1.7	14.4±2.2	11.6±1.7	9.4±1.0
Saline-formailn	47.3±3.4**	27.2±2.3**	57.8±3.6**	27.6±3.3**
Bee venom-formalin	19.8±1.0**†	13.7±1.5*†	24.4±4.4*†	14.9±2.8†

Figure 2. Graphs showing the suppressive effect of bee venom pretreatment on number of Fos-like immunoreactive (Fos-LI) neurons in spinal L3-5 segment.



Each value represents mean±SEM (n=5). * $p<0.05$ and ** $P<0.01$ as compared with room control group. †$P<0.01$ as compared with saline-formalin group.

Abbreviation

SDH : superficial dorsal horn, NP : nucleus proprius

NECK : neck of dorsal horn, VENT : ventral horn

3. Formalin-induced pain behavior와 脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數의 相關關係

Formalin-induced pain behavior와 脊髓內 神經細胞活性과의 相關關係를 알아보기 위하여, formalin-induced pain behavior를 보이는 總時間과, L3-5 腰脊髓에서 觀察되는, Fos 蛋白質에 對하여 陽性免疫反應을 나타내는 神經細胞數를 比較해 본 바, bee venom-formalin 群(○)은 그래프의 左側 下段에만 分布하는 것으로 觀察되었으며, saline-formalin 群(■)은 그래프의 右側 上段에만 分布하였다. 이러한 結果로 볼때, formalin-induced pain behavior와 Fos 陽性反應 神經細胞數 사이에 有意한 相互比例關係가 있음을 알 수 있었다(Figure 3).

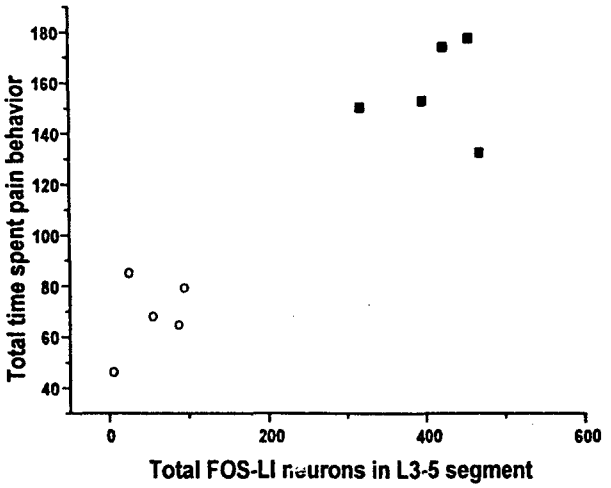


Figure 3. Correlation plot representing the relationship between total time spent in formalin-induced pain behavior and the number of Fos-like immunoreactive (Fos-LI) neurons in the spinal L3-5 segments. Note that there was strong positive correlation between formalin-induced pain behavior and the number of Fos-LI neurons in saline-formalin group (■) and bee venom-formalin group (○) (R=0.93326, $p<0.0001$).

Each value represents mean±SEM (n=5).

Ⅳ.考察

蜂毒藥鍼療法은 疾病有關部位나 經穴上에, 蜂鍼을 直接 刺入하거나, 또는 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出, 加工한 蜂毒藥鍼液을 注入함으로써, 刺鍼效果와 蜂毒의 藥理作用을 同時에 利用하여 疾病을 豫防, 治療하는 藥鍼療法의 一種이다[7,16].

이는 約 2000年 前부터 民間療法의 하나로[1] 關節炎, 痛風 等의 諸疾患에 應用되어 왔으며[22], 그 性味가 苦, 辛, 平하고[17], 强壯, 鎭靜, 平喘, 祛風濕, 鎭痛, 抗炎, 免疫, 抗癌, Adrenalin 分泌促進 및 淋巴細胞와 赤血球再生增加 等의 作用이 있어 筋肉痛, 急·慢性關節炎, 神經痛, 痛風, 化膿性疾患, 高血壓, 류머티즘, 류머티스성 關節炎, 皮膚病, 頭痛, 腰痛, 打撲傷 等에 適用한다고 하였다[15,18,21].

1973년 Billingham 等[23]에 의해 처음으로 蜂毒의 抗炎症作用이 報告된 以後, 蜂毒에 대한 關心이 높아지면서, 蜂毒藥鍼療法의 鎭痛[13], 消炎[12], 解熱[8], 抗痙攣[9], 腫瘍抑制 및 免疫增强效果[10], 毒性[14] 等에 對하여 많은 實驗的 硏究가 이루어 졌으며, 近來에는 특히 蜂毒의 構成成分의 作用에 대한 硏究[31,38]가 활발히 진행되고 있다[11].

蜂毒은 約 40종류의 構成要素로 되어 있는데, 이 중 11개의 peptides (melittin, apamin, mast cell degranulating peptide, adolapin 等)가 全身的인 作用 즉, 抗炎症, 抗眞菌, 抗박테리아, 抗發熱, ACTH刺戟, 血管透過性增加를 誘發하며, 5개의 enzymes은 心血管系에 作用하며, 蜂毒 注入部位에 局所的으로 作用하게 된다. 이외에 carbohydrates, lipids, amino-acids 등 3개의 生理的 活性 amines로 構成되어 있다[1,,21,42].

蜂毒의 構成成分인 mast cell degranulating peptide는 carageenin을 利用하여 誘發된 急性關節炎 및, adjuvant를 利用하여 誘發된 慢性關節炎 model에서 edema test

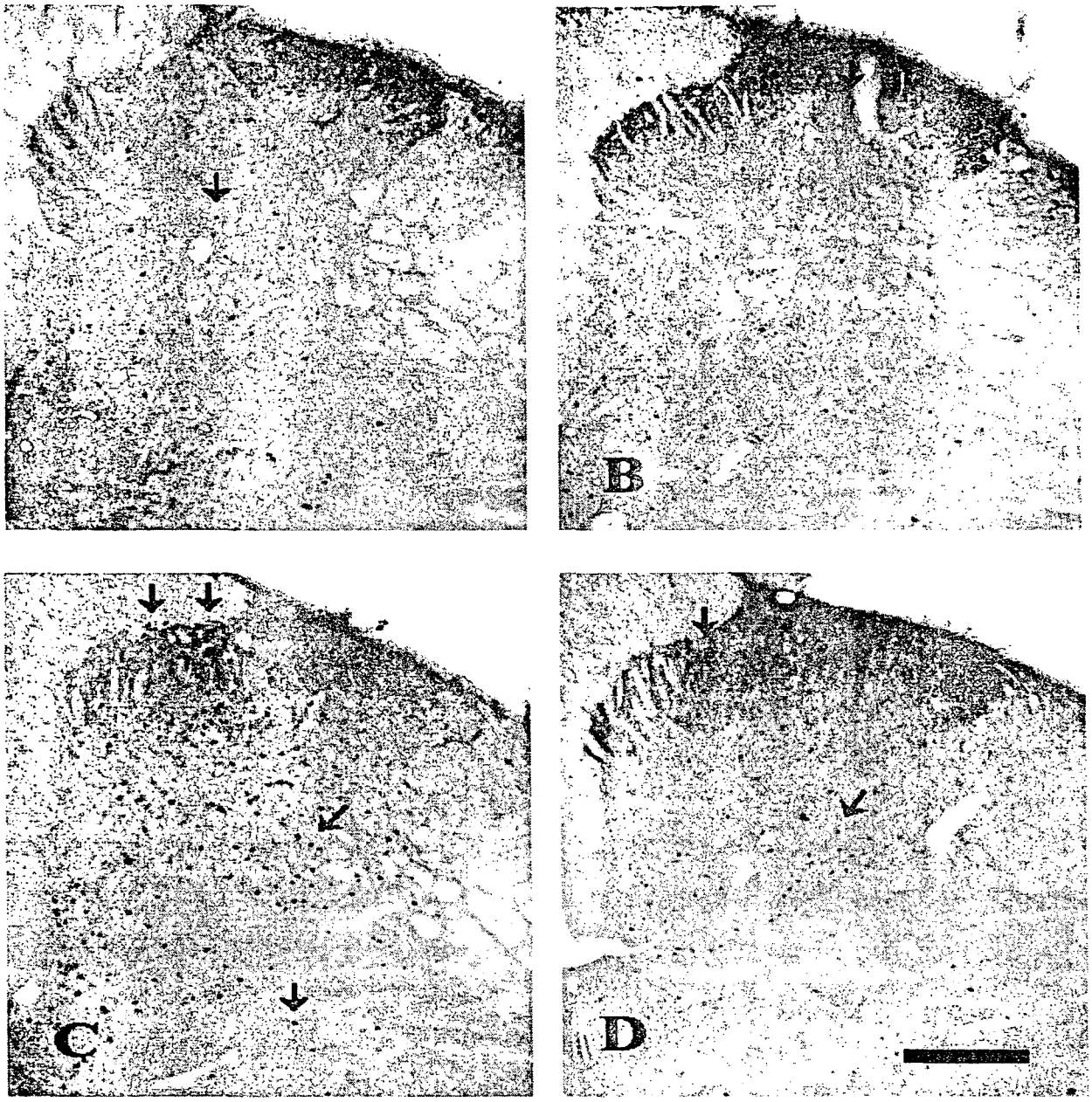


Figure 4. Microphotograghs showing the suppressive effect of bee venom acupuncture on the number of Fos-like immunoreactive (Fos-LI) neurons in the spinal L3-5 segment. There are few number of Fos-LI neurons in both room control group (A) and bee venom-saline group (B). Maximal number of Fos-LI neurons are observed in saline-formalin group (C). When bee venom is pretreated at 30min before formalin injection(D), the number of formalin -induced Fos-LI neurons is dramatically decreased as compared with that of saline-formalin group. Arrows indicate Fos-LI neurons, scale bar = 300μm.

를 통하여 抗炎症作用이 입증되었으며[31], melittin은 分泌性 phospholipase A2에 結合하여 酵素 活性을 抑制시킴으로써 炎症에 의해 誘發된 edema를 효과적으로 減少시킨다고 알려져 있다[38].

이와 같이, 蜂毒의 抗炎症作用에 대한 機轉硏究는 많이 進行되고 있지만, 蜂毒의 鎭痛作用이나 그 作用機轉에 관한 硏究는 아직 不足한 實情이다.

疼痛은 生命을 保全하려는 生體機轉의 하나로, 疼痛에 반응하는 痛覺受容器는 皮膚表面, 腸管壁, 血管壁 等에 분포되어 있는 神經末端에 존재하여, 有害한 刺戟에 대하여 잘 順應하지 않는 特性을 가짐으로써 人體를 保護하게 된다[2,6]. 疼痛의 認識에는 痛覺受容器와 神經纖維, 脊髓, 視床, 大腦皮質 等이 關與하며, 知覺神經의 末梢가 物理的, 或은 化學的 刺戟因子에 의해 刺戟되면, 그 刺戟이 脊髓, 延髓, 視床 등의 痛覺傳導路를 따라 大腦皮質에 있는 痛覺中樞에 傳達되어 일어난다[2].

그러므로 疼痛을 除去하려면 疼痛의 發生으로부터 傳導路, 中樞神經에 이르기까지의 어느 한 部分을 遮斷해야만 한다. 그러기 위해서는 첫째, 疼痛의 發生原을 除去하거나, 둘째, 一次 neuron에서 疼痛의 傳導를 遮斷하거나, 셋째, 中樞神經 특히 視床 및 大腦의 疼痛感受易値를 上升시키거나, 넷째, 大腦皮質에 作用하여 疼痛感受易値를 上升시키거나, 다섯째, 痛覺中樞를 麻痺시켜야 한다[2,6].

本 實驗에서 사용된 足三里(ST36)는 足陽明胃經의 合土穴로서 "調和氣血, 通調經絡"[5]한다고 하였으며, 各種 胃腸疾患 및 全身疾患 外에도, 脚氣, 下肢神經痛, 半身不隨等 下肢病에 應用한다고 하였다[4,5].

鎭痛效果의 實驗的 檢證을 위해서는 臨床的 痛症과 類似한 痛症 model을 利用하는 것이 좋은데, formalin test는 損傷된 組織으로부터 發生하는 緩慢하고 持續的인 痛症에 對한 生體의 反應을 觀察할 수 있다는 점에서, 機械的 刺戟이나 熱刺戟을 利用한 方法보다 臨床的인 慢性痛症에 더 類似한 實驗 model로 認定되고 있다[28,43].

Formalin test는 formalin 稀釋液을 動物의 皮下에 注入하여 痛症을 誘發하는 방법으로[25], formalin은 formaldehyde의 37%수용액이며, 注射部位로는 主로 動物의 後肢를 많이 利用한다[43].

Formalin-induced pain behavior는 early phase와 late phase의 biphasic 樣相을 나타낸다. 즉, formalin 注入 後 3-5分間 pain behavior를 보이다가 以後 痛症으로 인한 듯한 行動을 거의 나타나지 않으며, formalin 注入 後 15-20分 쯤 다시 나타나기 시작하여, 20-40分間 持續된다[28].

Dickenson[26,27]은 電氣生理學的 硏究에서, formalin 注入 後 spinal dorsal horn cell의 活性變化 역시 biphasic pattern을 나타내는데, 이는 時間經過에 따른 formalin-induced pain behavior와 그 樣相이 매우 類似하다고 하였다.

Formalin-induced pain behavior의 두 phases는 그 誘發機轉이 서로 다르다고 알려져 있는데, early phase는 神經末端에 對한 formalin의 直接的인 化學的 刺戟으로 인한 C-fiber의 活性에 의해 일어나며,[32] late phase는 末梢組織에서의 formalin으로 인한 炎症反應과 spinal dorsal horn에서의 機能的 變化의 複合作用에 의해 일어난다고 한다[32].

痛症傳達物質로는 early phase에서 substance P와 bradykinin이 관여하며, late phase에서는 histamin, serotonin, prostaglandins 및 bradykinin 等이 作用하는데[39], late phase에서의 spinal cord內의 機能的 變化는 early phase 동안의 C-fiber의 活性에 의해서 誘發된다고 알려져 있으며[41], 또한, late phase의 發顯에 있어 局所炎症反應보다 中樞神經의 機能的 變化가 더 重要한 役割을 한다는 것이 이미 證明된 바 있다[41]. 따라서 炎症을 抑制하거나 炎症으로 인한 痛症을 抑制하는 藥物을 處置할 경우 late phase의 反應이 抑制될 수는 있으나, late phase의 反應을 抑制하는 藥物이 곧 炎症을 抑制하거나, 炎症으로 인한 痛症을 抑制한다고 볼 수는 없다[43].

Manabu Shibata 等[39]에 의하면, 鎭痛效果는 그 作用部位에 따라 中樞性과 末梢性으로 나누어 질 수 있는데, morphine 等 中樞性 痲醉制는 formalin test에서 first phase와 second phase의 response를 똑같이 抑制하는 반면, aspirin 等과 같이 末梢에 作用하는 藥物은 단지 second phase만을 抑制한다고 한다. 또한, 末梢와 中樞에 모두 作用하는 aminopyrine이나 mefenamic acid 等의 藥物은 두 phases 모두에 對하여 抑制效果가 있지만, first phase보다 second phase에 對한 抑制效果가 더 强力하며, 이와 같은 方法으로 鎭痛藥物의 作用部位를 類推할 수 있다고 하였다.

이와 같이, formalin test는 전혀 다른 屬性의 two phases를 나타냄으로써, 鎭痛效果의 硏究 뿐만 아니라 疼痛誘發機轉이나 鎭痛機轉을 밝히는 데에도 有用한 方法으로 認定되고 있다[43].

哺乳類에서 發見되는 原腫瘍遺傳子(proto-oncogene)의 一種인 c-fos는 傳寫調節者(transcriptional regulator)로서, 細胞表面에 傳達된 刺戟을 長期間 持續되는 細胞反應과 連結시켜 주는 '3次傳達者' 役割을 하며, 腦와 脊髓의 神經細胞에서 生理的 또는 藥理的 刺戟 等이 加해질 때 活性化된다[20].

c-fos는 특히 早期遺傳子(immediate early gene)로서, 外部 및 內部에서 傳達되는 刺戟에 대하여 빠르게 反應하여 發顯하기 때문에 primary response gene 또는 early response gene이라고도 불리운다.[19,24] c-fos 유전자의 活性에 의해 生産되는 Fos 蛋白質은 빠른 時間內에 核內로 移動하여, 最初刺戟이 있은 後 20-90分에는 Fos 단백질에 대한 免疫組織染色法을 이용하여 神經細胞內 蓄積有無를 感知하여, 神經細胞의

活性度를 間接的으로 測定하는데 利用되고 있다[33,34].

Hunt[33] 等은 처음으로 多樣한 有害刺戟이 脊髓後角의 Fos 蛋白質을 增加시킴을 證明하였으며, 以後 많은 硏究에서 有害刺戟을 傳達하는 脊髓神經細胞의 活性에 대한 marker로서 Fos 蛋白質이 利用되고 있다[29,36,37].

蜂毒藥鍼刺戟이 formalin으로 誘導되는 脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞의 活性變化에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 蜂毒藥鍼刺戟部位인 足三里가 所屬된 dermatome의 脊髓 연계 부위인 L2 level[40]과, formalin 注入部位인 발바닥이 所屬된 dermatome의 脊髓 연계 부위인 L3-5 level[40]에서, spinal cord의 組織切片을 만들어 Fos 蛋白質에 對한 免疫組織染色法을 施行하였다.

L2 腰脊髓內의 Fos 陽性反應 神經細胞數는, saline-formalin 群의 NECK과 VENT에서 對照群에 比하여 有意性 있게 增加하였고($P<0.05$), bee venom-saline 群이나 bee venom-formalin 群에서는 脊髓 全領域에 걸쳐 對照群에 比하여 有意한 變化가 觀察되지 않았다.

Gogas 等[30]의 報告에 따르면, spinal cord의 VENT와 NECK領域에서의 Fos 蛋白質 增加는 pain behavior와 直接的인 關聯이 있다고 한다. 즉, 本 實驗에서 나타난 saline-formalin 群의 L2 腰脊髓內 NECK과 VENT에서의 Fos 陽性反應 神經細胞數 增加는 實驗動物이 보여준 formalin-induced pain behavior와 關聯이 있다고 할 수 있다. 따라서, L3-5 level로 誘入된 有害刺戟이 L2 level의 感覺領域에는 아무런 變化도 일으키지 못했지만, L2 level의 運動領域 및 dorsal horn의 neck에는 有意한 活性增加를 일으켰다고 볼 수 있으며, 이러한 結果로 볼 때, 實驗動物의 痛症感覺은 formalin 注入 部位인 L3-5 level로만 傳達되지만, 實驗動物이 보여준 pain behavior는 formalin 注入部位인 L3-5 支配領域 뿐만 아니라 L2 level을 비롯한 주변 脊髓神經들도 關聯되어 있는 것으로 推測된다.

또한, 足三里에 對한 蜂毒藥鍼刺戟에 의해, L3-5 level로 誘入된 formalin 刺戟으로 因한 L2 腰脊髓內 NECK과 VENT에서의 Fos 陽性反應 神經細胞數가 有意하게 減少되지는 못하였으나, 對照群과 比較하여 볼 때 有意한 增加도 나타나지 않았다.

한편, L3-5 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數는 saline-formalin 群에서 脊髓 全領域에 걸쳐 對照群에 比하여 크게 增加하였다($P<0.01$). Bee venom- formalin 群에서도 VENT를 除外한 SDH, NP, NECK 領域에서 對照群에 比하여 有意한 增加를 나타내었으나, saline-formalin 群과 比較하였을 때는 脊髓의 全領域에 걸쳐 Fos 陽性反應 神經細胞의 數가 有意하게 減少하였다($P<0.01$). 즉, 足三里에 對한 蜂毒藥鍼刺戟이 발바닥에 注入된 formalin으로 因한 L3-5 腰脊髓內 神經細胞의 活性을 抑制하였다고 할 수 있다.

물론, 蜂毒藥鍼療法의 鎭痛機轉이 아직 完全히 밝혀지지는 않았으나, 韓醫學的으로는 蜂毒의 祛風濕, 止痛作用이 足三里로부터 經絡을 通하여 發揮되어 下肢部의 痛症을 抑制한 것으로 解釋할 수 있으며, 여기에서 足三里에 對한 蜂毒藥鍼刺戟은 實驗動物의 L2 神經 支配領域 뿐만 아니라, L3-5 支配領域을 包含한 下肢部 全般에 대하여 影響을 미친 것으로 推測된다.

本 實驗에서, L3-5 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數와 formalin-induced pain behavior 사이에는 强한 相互比例關係를 觀察할 수 있었다. 이러한 結果로부터, Fos 蛋白質이 formalin이라는 有害刺戟에 의한 脊髓神經細胞活性의 marker로서 妥當性이 있음을 再次 確認할 수 있으며, 蜂毒藥鍼刺戟이 formalin에 의한 脊髓神經細胞의 活性을 抑制한 것은 formalin으로 인한 痛症에 대하여 抑制效果가 있음을 나타낸다고 할 수 있다.

以上의 結果로부터 蜂毒藥鍼療法이 formalin에 依한 化學的 刺戟 및 그에 따른 局所炎症으로 因한 痛症에 對하여 鎭痛效果가 있음을 觀察할 수 있었으며, 앞으로 蜂毒藥鍼療法의 鎭痛機轉에 對하여 더 깊은 硏究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結 論

蜂毒藥鍼刺戟이 formalin-induced pain behavior와 脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞의 活性에 미치는 影響을 觀察하고자 蜂毒藥鍼液을 0.0016㎎/kg, 0.008㎎/kg, 0.016㎎/kg 및 0.08㎎/kg의 濃度로 足三里(ST36), 臀部 및 背部任意穴에 藥鍼刺戟한 後 formalin test와 Fos 免疫組織染色法을 施行하여, 아래와 같은 結論를 얻었다.

1. L2 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數는, saline-formalin 群의 NECK과 VENT에서 對照群에 比하여 有意하게 增加되었고, bee venom-formalin 群에서는 脊髓의 全領域에 걸쳐 對照群에 比하여 有意한 變化가 觀察되지 않았다.

2. L3-5 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數는, saline-formalin 群에서 脊髓 全領域에 걸쳐 對照群에 比하여 현격한 增加를 나타내었으며, bee venom-formalin 群에서도 VENT를 除外한 SDH, NP, NECK 領域에서 對照群에 比하여 有意한 增加를 나타내었으나, saline-formalin 群과 比較하였을 때에는 脊髓 全領域에 걸쳐 有意性 있게 減少하였다.

3. Formalin-induced pain behavior와 L3-5 腰脊髓內 Fos 陽性反應 神經細胞數는 相互比例關係를 나타내었다.

參 考 文 獻

1. 金文昊 : 蜂毒療法과 蜂鍼療法, 서울, 한국교육기획, pp 20-37, 41-42, 67-74, 104-112, 134-149, 171-176, 1992.
2. 金祐謙 : 人體生理學, 서울대학교출판부, 서울, p168, 1979.
3. 金廷彦 : 奇蹟의 藥鍼療法, 서울, 금강출판사, p25, pp 99-104, 1987.
4. 安榮基 : 經穴學叢書, 成輔社, 서울, p197, 1990.
5. 崔容泰 外 : 鍼灸學, 서울, 集文堂, p1457, 1988.
6. 카톨릭대학대학원 : 痛症, 서울, 수문사, pp 87-94, 1982.
7. 한국약학대학협의회 : 大韓藥典 제5개정 1,2부 해설, 서울, 문성사, pp 1211-1212, 1987.
8. 高炯均 : 蜂鍼毒療法이 抗炎, 鎭痛 및 解熱에 미치는 效能에 關한 實驗的 硏究, 大韓韓醫學會誌, 13(1): 283-292, 1992.
9. 孔賢淑 : 蜂鍼毒 療法이 抗痙攣에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 10(1): 159-165, 1993.
10. 權奇祿, 高炯均, 金容奭, 朴英培, 金昌煥, 姜成吉 : 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 14(2): 151-172, 1997.
11. 金祉榮, 高炯均, 金容奭, 朴英培, 金昌煥, 姜成吉: 蜂毒療法의 最新 硏究動向에 對한 考察, 大韓鍼灸學會誌, 14(2): 47-71, 1997.
12. 金祉榮, 高炯均, 金容奭, 朴英培, 金昌煥, 姜成吉 : 蜂毒藥鍼療法의 抗炎症作用에 關한 實驗的 硏究, 大韓鍼灸學會誌, 15(1): 317-331, 1998.
13. 李宗錫, 權奇祿, 高炯均 : 中脘 및 足三里의 蜂毒療法이 鎭痛效果에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 15: 483-495, 1998.
14. 李宗錫, 高炯均, 金昌煥 : 藥鍼用 蜂毒液의 局所毒性試驗에 關한 硏究, 大韓韓醫學會誌, 16(1): 227-249, 1995.
15. 麻仲學 : 中國醫學療法大全, 山東, 山東科學技術出版社, pp 216-218, 1991.
16. 莊育民 : 中國鍼灸學發展史, 臺北, 裕臺公司, pp 9-10, 1978.
17. 朱文鋒 : 實用中醫辭典, 陝西, 陝西科學技術出版社, p402, 1992.
18. 張震 : 雲南中醫雜誌, 上海, 雲南新華印刷社, pp 39-41, 1990.
19. Doucet S.P., Squinto S.P. and Bazan N.G. : Fos-Jun and primary genomic response in the nervous system; Possible physiological role and pathophysiological significance. N.G. Bazan(Eds.), Molecular Neurobiology, The Humana Press Inc, Clifton NJ, pp27-55, 1990.
20. Nicholas J.J. & Rush P.J. :

Rehabilitation of patients with rheumatic disorders. In Physical Medicine and Rehabilitation edited by Braddom R.L.W.B., Saunders Co., pp 711-727, 1996.

21. Piek T. : Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, pp107-120, 1986.
22. Assen E.S.K. : A pepride from the venom of the honey Bee, Brit. J. Pharmacol, 337-338, 1973.
23. Billingham M.E. : An anti-inflam mantory peptide from bee venom, Nature, 245: 163-4, 1973.
24. Bullitt E. : Expression of c-fos like protein as a maker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat, J. Comp. Neurol. 296: 517-530, 1990.
25. Clavelou P., Pajot J., Dallel R. and Raboisson P. : Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat, Neurosci. Lett., 103: 349-353, 1989.
26. Dickenson A.H. and Sullivan A.F. : Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat dorsal horn neurons, Neurotic Lett., 83: 207-211, 1987a.
27. Dickenson A.H. and Sullivan A.F. : Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin, Pain, 30: 349-360, 1987b.
28. Dubuisson D. and Dennis S.G. : The formalin test ; a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimula tion in rats and cats, Pain, 4: 161-174, 1977.
29. Elliott K.J., Brodsky M., Hynansky A.D., Foley K.M. and Inturrisi C.E. : Dextromethorphan suppresses both formalin-induced nociceptive behavior and the formalin-induced increase in spinal cord c-fos mRNA, Pain, 61: 401-409, 1995.
30. Gogas K.R., Presley R.W., Levine J.D. and Basbaum A.I. : The Antinocicep tive Action of Surpraspinal Opioids Results from an Increase in Descen-ding Inhibitory Control: Correlation of Nociceptive Behavior and c-fos Expression, Neuroscience, 42(3): 617-628, 1991.
31. Hanson J.M. : Anti-inflammantory property of 401(MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee Apis mellifera, Br. J. pharmacol., 50: 383-392, 1974.
32. Heapy C.G., Jamieson A. and Russell

N.J.W. : After C-fibre and A-delta activity in models of inflammation, Br. J. Phamacol., 90: 164, 1987.

33. Hunt S.P., Pini A. and Evan G. : Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, Nature, 328: 632-634, 1987.
34. Lee J.H. and Beitz A.J. : Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation, Brain Res., 577: 89-91, 1992.
35. Lee J-H., Wilcox G.L., and Beitz A.J. : Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation, NeuroReport, 3: 841-844, 1992.
36. Menetrey D., Gannon A., Levine J.D., and Basbaum A.I. : Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. J. Comp. Neurol., 285: 177-195. 1989.
37. Morgan J.I., and Curran T. : Role of ion flux in the control of c-fos expression, Nature, 322: 552-555, 1992.
38. Shamsher S.S., Peterson J.W. and Chopra A.K. : Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activety, Biochem. Biophys. Res. Comm., 238: 436-442, 1997.
39. Shibata M., Ohkubo T., Takahashi H. and Inoki R. : Modified formalin test ; characteristic biphasic pain response, Pain, 38: 347-352, 1989b.
40. Takahashi Y., Takahashi K., Moriya H. : Mapping of dermatomes of the lower extremities based on an animal model, J. Neurosurg., 82(6): 1030-1134, 1995.
41. Terence J., Anthony C., Vaccarino L. and Melzack R. : Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection, Brain Res., 535: 155-158, 1990.
42. Thorbecke G.J. : The affinity of reticuloendotherial systim for various serum proteins, Brit. J. Exp. Path, 41(2): 190,1960
43. Tjolsen A., Berge O-G., Hunskaar S., Rosland J.H. and Hole K. : The formalin test ; an evaluation of the method, Pain, 51, pp 5-17, 1992.