

蜂毒藥鍼이 脊髓內 痛症關聯 神經細胞의 活性에 미치는 影響

鄭善喜* · 李裁東* · 高炯均* · 安秉哲* · 崔道永* · 朴東錫*

ABSTRACT

A Study on the Effects of Bee Venom Aqua-Acupuncture on Pain related Neuronal activity in the Spinal Cord

Sun-Hee, Jeong* · Jae-Dong, Lee* · Hyung-Kyun, Koh* · Byoung-Choul, Ahn*
Do-Young, Choi* · Dong-Suk, Park*

Dept. of Acupuncture & Moxibustion
Oriental Medical College, Kyung Hee University

Introduction : In spite of the use of Bee Venom aqua-acupuncture in the clinics, the scientific evaluation on effects is not enough. Bee Venom aqua-acupuncture is used according to the stimulation of acupuncture point and the chemical effects of Bee Venom. The aims of this study is to investigate the analgesic effects of the Bee Venom aqua-acupuncture, through the change of writhing reflex and the change of c-fos in secondary neurons in the spinal cord.

Materials and Methods : Pain animal model was used acetic acid method. The changes of writhing reflex of the mice which were derived pain by injecting acetic acid into the abdomen, after stimulating Bee Venom aqua-acupuncture on Chungwan(CV12) were measured. We used Fos immunohistochemical technique to study the neuronal activity in the spinal cord.

Results : 1. Expression of c-fos in superficial dorsal horn(SDH), nucleus proprius(NP) and neck of dorsal horn(N) on 6~9th thoracic spine decreased significantly at 2.5×10^{-4} g/kg Bee Venom aqua-acupuncture, compared with saline-acetic acid group.

2. The numeral change of Fos-LI neurons on the NP, N, and ventral gray(V) on 6~9th thoracic spine, SDH on 9~11th thoracic spine, and SDH and V on 11~13th thoracic spine decreased significantly at Chungwan(CV12) Bee Venom aqua-acupuncture, compared with saline-acetic acid group.

Key Words : Bee Venom aqua-acupuncture, Chungwan(CV12), Fos-LI neurons

* 경희대학교 한의과대학 침구학교실

3. The correlation between the numbers of writhing reflex and Fos-LI neurons in T6-13 segment was statistically statistically significant at Chungwan(CV12) Bee Venom aqua-acupuncture.

Conclusion : This study shows that the Bee Venom aqua-acupuncture on Chungwan(CV12) decreases the numbers of Fos-LI neurons. As the analgesic effects of Bee Venom aqua-acupuncture is recognized. Bee Venom aqua-acupuncture treatment is expected for pain modulation. In order to use it in many ways, more researches are needed for the dose and stability of Bee Venom aqua-acupuncture.

I. 緒論

蜂毒藥鍼療法은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을抽出, 加工하여 經穴에 刺入함으로서 刺鍼 및 蜂毒의 化學的效果를 通하여 人體의 機能을 調整하고 疾病狀態를 改善하여 疾病을 治療하고 豫防하는 新鍼療法의 一種^{4,16,28)}이다.

痛症은 組織損傷을 비롯한 各種 有害性 環境에서 身體를 保護할 目的으로 느끼는 感覺^{1,36)}으로 知覺神經의 末梢가 物理的, 溫度의 및 化學的因素에 의하여 刺戟되면 痛症信號는 痛覺受容器를 通해 痛覺傳導路(脊髓→延髓→視床)를 따라 大腦皮質에 있는 痛覺中樞에 傳達된다.^{1,8,40)} 痛症治療는 疼痛의 原因이 되는 刺戟을 輕減시키거나 刺戟을 傳導하는 神經을 遮斷시키거나 혹은 痛覺中樞를 鎮靜, 麻痺시키는 方法으로 藥物, 神經遮斷, 電氣 刺戟 等²⁾이 活用된다.

韓醫學에서 痛症의 原因은 寒³³⁾, 瘦飲³²⁾, 勝血³¹⁾等으로 把握하고 있으며, 病理機轉은 “氣傷痛” “氣不通則痛”^{14,32)}이라 하여 氣血運行의 不暢을, “不營則痛”^{14,35)}이라 하여 營養의 失調를 提示하였다. 痛症의 治療는 痛症의 原因을 除去하고 氣血의 調和를 이루어 痛症을 除去시키는 鍼灸療法이나 藥物療法이 活用된다.^{31,32)}

痛症의 治療에 대한 研究는 鍼灸學 全分野, 즉 體鍼²⁰⁾, 電鍼²²⁾, 藥鍼¹⁵⁾, 灸療法^{20,21)}等에 걸쳐 多樣한 實驗을 通하여 이루어졌으며, 鍼灸治療의 鎮痛機轉에 대한 研究^{24,63)}도 紹行되고 있다. 이 중 蜂毒藥鍼療法의 研究는 高等¹⁶⁾의 蜂鍼療法과 蜂毒藥鍼療法에 대한 鎮痛, 消炎, 解熱, 鎮痙과 安定性 檢查 等^{17,18,19,23,26,28)}이 있으며, 蜂毒의 成分

分析과 藥理作用^{41,42,52,67)}, 免疫과 allergy 反應^{47,48,55)}, 毒性^{49,67)}等의 多樣한 報告가 있었다.

中院(CV12)은 足陽明胃經의 募穴이며 府의 會穴로서 和胃氣, 化濕滯의 穴性^{11,13)}을 가지고 있으며, 臨床上 急慢性 胃炎, 胃痙攣, 胃脘痛 等과 高血壓, 心痛, 腹痛, 背與心相引而痛, 脇下堅痛, 腹脹痛 等을 主治^{11,13)}한다.

現在 臨床에서 使用되고 있는 蜂毒藥鍼은 刺戟部位에 따라 效果가 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으나, 經穴의 使用과 治療效果에 대한 體系的이고 科學的인 檢證이 不足한 狀態에서 多用되고 있는 實情이다.

이에 著者は 蜂毒藥鍼의 鎮痛效果를 檢證하기 위하여 中院(CV12)과 背部 任意穴에 蜂毒藥鍼을 刺戟한 後 腹腔內에 acetic acid를 注入하여 腹痛을 誘發시킨 생쥐 脊髓의 二次 神經細胞內 c-fos 變化를 觀察하여 본 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 實驗動物 및 實驗條件

體重은 33-40g인 ICR(International Cancer Research)系 雄性 mouse(한림실험동물, n=200)로 實驗 前後에 動物의 狀態를 點檢하여 外傷의 與否와 疾病狀態를 分析한 후, 正常的인 實驗動物을 選別하여 使用하였다. 神經細胞의 活性에 影響을 미칠 수 있는 不必要한 要因을 排除하기 위해 實驗은 午前 10時에서 午後 4時사이에 實施하였으며, 實驗動物의 體溫은 一定하게 維持시키고

實驗 30分 前에 外部環境을 21-23°C로 維持할 수 있는 observation chamber로 옮겨 實驗하였다.

2. 蜂毒 및 蜂毒藥鍼 刺戟部位

蜂毒은 Apis mellifera(Honey bee)로부터 얻어진 蜂毒(V 3125, dry whole venom, Sigma, USA)을 生理食鹽水에 稀釋해서 使用하였다.

蜂毒藥鍼刺戟은 蜂毒藥鍼注入器(26gauge, 녹십자)를 利用하여 人體의 中脘(CV₁₂)에 相應하는 部位와 背部 任意穴에 蜂毒藥鍼液을 10μl씩 皮下로 注入하였다.

3. 蜂毒藥鍼群 및 對照群 設定

Mouse를 1群에 5마리씩 配定하여 다음과 같이 生理食鹽水-生理食鹽水群, 蜂毒-生理食鹽水群, 生理食鹽水-acetic acid群 및 蜂毒-acetic acid群으로 區分하였다. 生理食鹽水-生理食鹽水群은 生理食鹽水를 中脘(CV₁₂)에 皮下로 注入하고 30分 後에 生理食鹽水를 腹腔內로 注入하였으며, 生理食鹽水-acetic acid群(SA Group)은 生理食鹽水를 中脘(CV₁₂)에 皮下로 注入하고 30分 後에 acetic acid를 腹腔內로 注入하였으며, 蜂毒-生理食鹽水群(BS Group)은 蜂毒을 中脘(CV₁₂)에 皮下로 注入하고 30分 後에 acetic acid를 腹腔內로 注入한 群으로 하였으며, 蜂毒-acetic acid群(BA Group)은 蜂毒を 中脘(CV₁₂)에 皮下로 注入하고 30分 後에 acetic acid를 腹腔內로 注入한 群으로 區分하였다.

4. 組織의 處理

Writhing reflex를 測定한 후, isoflurane으로 心癱醉시킨 후 大動脈을 통해 固定液을 注入하였다. 固定液을 注入하기 前 calcium free tyrode溶液 100mL를 注入하여 組織으로부터 血液을 완전히 除去한 後 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 包含한 0.4M phosphate buffer(Lana's fixative)를 灌流시켜 組織을 固定하였다. 固定이 끝난 후 lumbosacral enlargement部位까지

의 脊髓를 迅速하게 分離하여 同一한 固定液에서 4時間 동안 後固定을 하였으며, 10%, 20%, 30%의 sucrose溶液에 차례로沈澱시켜 組織이凍結時 損傷되지 않도록 하였다. 室溫에서 24時間 동안 sucrose處理가 끝난 組織은 -20°C의 溫度에서 迅速히 얼려 cryotome을 使用하여 두께가 40μm인 組織切片으로 製作한 후, 迅速하게 PBS(pH 7.4)에 넣어 免疫組織染色法을 實施하였다.

5. 脊髓內의 Fos 蛋白質活性 測定에 必要한 Fos 免疫組織染色法

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 한 다크론 抗體(rabbit polyclonal antibody, Sigma)를 1: 20,000으로 稀釋하여 使用하였다. 一次抗體를 4°C에서 12時間以上 反應을 誘導한 後 二次抗體(sheep anti rabbit IgG, Vector)를 1:200으로 稀釋하여 室溫에서 1時間 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의 Fos蛋白質의 蓄積程度를 可視化한 후 gelatin으로 表面處理된 slide에 옮긴 다음 乾燥와 脫水의 過程을 거친 後 coverslip을 덮어 觀察할 때까지 4°C에서 保管하였다.

脊髓內의 Fos activity를 測定하기 위해서 6-13번 胸髓의 區分은 Paxinos 및 Watson³⁸이 製作한 Rat Brain Atlas를 參照하여 6-9번 胸髓, 9-11번 胸髓 및 11-13번 胸髓로 區分하였다. 각각의 胸髓을 左, 右로 나누고, 각각의 胸髓別로 다시 superficial dorsal horn(SDH), nucleus proprius(NP), neck of dorsal horn(N), 및 ventral gray(V)로 細分하여 Fos蛋白質을 發現한 神經細胞의 數를 分析하였다.

6. 映像分析 및 統計處理

免疫反應이 完了된 組織은 Zeiss Axiophort 2顯微鏡을 利用하여 각각 400倍 및 1000倍의 倍率로 觀察하였다. 또한 核內의 Fos蛋白質을 蓄

積하고 있는 神經細胞의 數的인 變化量 觀察하기 위해 digital image analysis system (Meta-Morph, Universal Imaging Co.)을 利用하여 平均 grey level이 130 unit 以下 되는 神經細胞만을 選擇的으로 測定하였다. 神經細胞의 數的 變化는 連結된 computer에 自動的으로 贯藏되며, 測定이 끝난 후 一括으로 統計處理하였다. 實驗에 使用한 組織은 實驗動物別로 가장 鮮明한 免疫性을 가진 組織中 4개를 選別하여 胸髓內의 神經細胞活性 變化量 觀察하였다.

實驗結果는 1-way ANOVA (Statview512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)을 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. 中腕蜂毒藥鍼으로 나타나는 Fos 免疫染色性의 變化

蜂毒을 皮下로 前處置하고 生理食鹽水를 腹腔內 注入한 群(Figure 5B)에서 觀察되는 Fos 發現 神經細胞의 免疫染色性 程度는, 生理食鹽水를 皮下로 前處置하고 生理食鹽水를 腹腔內로 注入한 群(Figure 5A)에 比하여 6~9번째 胸髓部位의 superficial dorsal horn(以下 SDH), nucleus proprius(以下 NP), neck of dorsal horn(以下 N)에서 더욱 增加되어 觀察되었지만 生理食鹽水로 前處置하고 acetic acid를 腹腔內 注入한 群(Fig. 5C)에 比하여서는 免疫染色性이 매우 減少되었다. $2.5 \times 10^{-4} \text{ g/kg}$ 濃度의 蜂毒을 中腕(CV₁₂)에 注入한 實驗群(Figure 5D)의 胸髓部位에서 觀察되는 Fos 發現 神經細胞의 免疫染色性은 生理食鹽水로 前處置하고 acetic acid를 腹腔內 注入한 群(Figure 5C)과 比較했을 때 SDH, NP 및 N에서 급격히 減少되는 樣相을 觀察할 수 있었다.

2. 中腕蜂毒藥鍼으로 6~9번째 脊髓部位에 나타나는 Fos 發現神經細胞의 數的 變化

6~9번째 胸髓의 SDH部位에서 生理食鹽水를 前處置하고 生理食鹽水를 腹腔內 注入한 群(以下 SS群)은 8.8 ± 1.2 個의 Fos 發現 神經細胞가 觀察이 되었고, 蜂毒을 前處置하고 生理食鹽水를 腹腔內 注入한 群(以下 BS群)은 14.2 ± 2.4 個가 觀察이 되어, 生理食鹽水를 前處置하고 acetic acid를 腹腔內 注入한 群(以下 SA群)의 22.2 ± 2.1 個와 比較하면 有意한 差異($p < 0.05$)를 나타내었다. $2.5 \times 10^{-4} \text{ g/kg}$ 濃度의 中腕蜂毒藥鍼을 前處置하고 acetic acid를 腹腔內 注入한 群(以下 BA群)은 15.9 ± 2.3 個로 나타나 SA群에 比하여서 有意性은 나타나지 않았지만 Fos 發現 神經細胞의 減少傾向을 보여 주었다.

NP部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 각각 7.8 ± 0.3 個, 10.0 ± 0.9 個 및 8.7 ± 2.3 個로 나타나 SA群의 25.3 ± 5.3 個에 比하여 有意한 減少效果($p < 0.05$)를 나타내었다.

N部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 각각 7.6 ± 0.8 個, 9.2 ± 2.8 個 및 5.7 ± 2.0 個로 나타나 SA群의 17.0 ± 3.3 個에 比하여 有意한 減少($p < 0.05$)를 나타내었다.

V部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 16.8 ± 0.7 個, 15.0 ± 6.2 個 및 13.6 ± 3.6 個로 나타나 SA群의 32.3 ± 5.4 個에 比하여 有意한 減少($p < 0.05$)를 보였다(Table 5, Figure 6).

3. 中腕蜂毒藥鍼으로 9~11번째 脊髓部位에 나타나는 Fos 發現神經細胞의 數的 變化

9~11번째 胸髓의 SDH部位에서 SS群은 12.7 ± 1.2 個의 Fos 發現 神經細胞가 觀察이 되었고, BS群 14.5 ± 1.1 個가 觀察되어 SA群의 44.5 ± 4.9 個와 比하여 有意한 差異($p < 0.01$)를 나타내었다. BA群은 31.4 ± 5.6 個로 나타나 SA群에 比하여서 有意性은 보이지를 않았지만 Fos 發現 神經細胞의 減少傾向을 보여 주었다.

NP部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 각각 9.4 ± 2.5 , 11.5 ± 2.5 및 13.6 ± 2.8 個로 SA群의 21.3 ± 5.8 個에 比하여 減少하는 傾向을 보였지만 有意性은 認定되지 않았다.

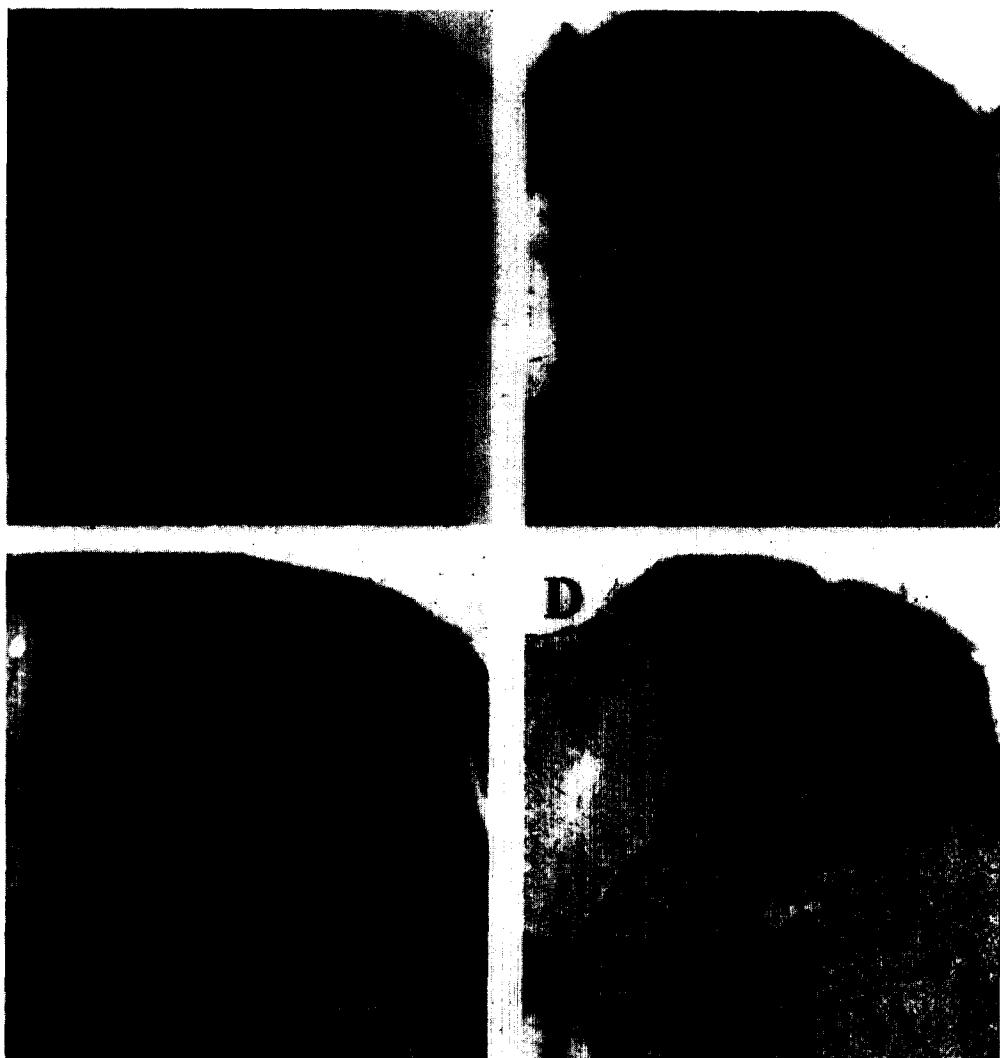


Figure 1. Distribution of Fos-like immunoreactive(FLI) neurons in the 6-9th thoracic spinal cord following i.p. injection of saline in a rat previously treated with saline(A), bee venom administration(2.5×10^{-4} g/kg, s.c.) plus saline injected group(B), saline injection(s.c.) plus acetic acid administrated group(C), and bee venom(2.5×10^{-4} g/kg, s.c.) injection plus acetic acid administrated group(D). In the saline-treated group(A), few FLI neurons is observed in the superficial dorsal horn(SDH) and nucleus proprius(NP), and the neck of dorsal horn(N). Only bee venom injection(B) also produces several FLI neurons in SDH, NP and N. In saline pretreatment(s.c.) plus i.p. injection of acetic acid(C), the number of FLI neurons is dramatically increased in SDH and NP, N. Pretreatment with bee venom suppresses FLI neurons induced by acetic acid administration in these regions(D). Scale bars = 200 μ m.

Table 1. The effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 6-9th thoracic spinal cord.

Treatment	Dose (g/kg s.c.)	n	no. of FLI			
			SDH	NP	N	V
SA group	-	5	22.2±2.1	25.3±5.3	17.0±3.3	32.2±5.4
BA group	2.5×10^{-4}	5	15.9±2.3	8.7±2.3*	5.7±2.0*	13.6±3.6*
BS group	2.5×10^{-4}	5	14.2±2.4*	10.0±0.9*	9.2±2.8*	15.0±6.2*
SS group	-	4	8.8±1.2**	7.8±0.3*	7.6±0.8*	16.8±0.7*

Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. (*P, *P<0.05; **P<0.01)

SA group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BA group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BS group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SS group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SDH : superficial dorsal horn

NP : nucleus proprius

N : neck of dorsal horn

V : ventral horn.

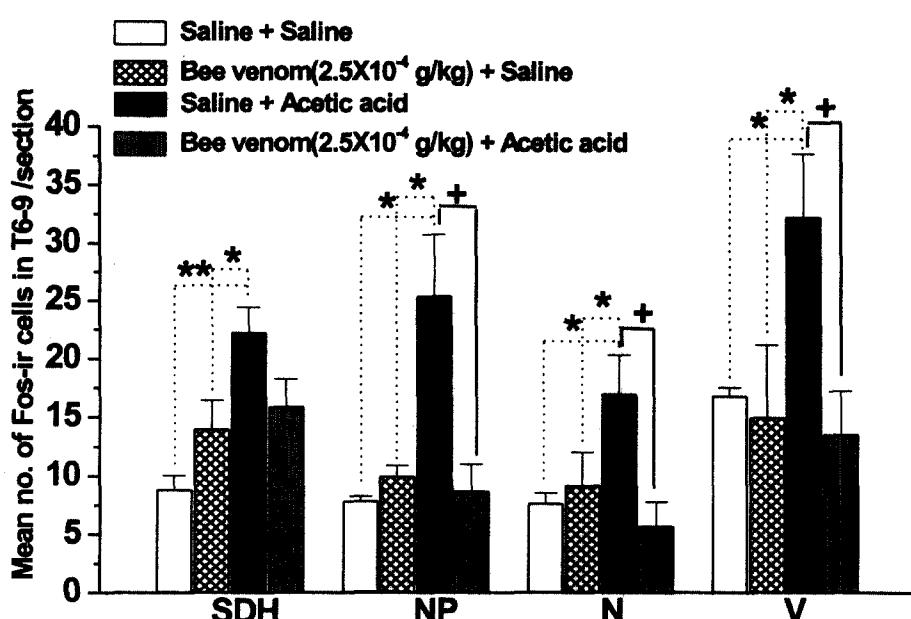


Figure 2. A graph summarizing the effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 6-9th thoracic spinal cord. Each bar represent the mean of FLI neurons per section occurred by intraperitoneal injection of acetic acid(10mg/kg). Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. SDH, superficial dorsal horn; NP, nucleus proprius; N, neck of dorsal horn; V, ventral horn. *P, *P<0.05; **P<0.01.

Table 2. The effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 9-11th thoracic spinal cord.

Treatment	Dose (g/kg s.c.)	n	no. of FLI			
			SDH	NP	N	V
SA group	-	5	44.5±4.9	21.3±5.8	23.7±7.0	55.7±16.2
BA group	2.5×10^{-4}	5	31.4±5.6	13.6±2.8	8.8±2.2	21.9±3.6
BS group	2.5×10^{-4}	5	14.5±1.1**	11.5±2.5	12.2±2.3	24.2±3.5
SS group	-	4	12.7±1.2**	9.4±2.5	10.9±2.2	25.6±1.7

Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. (**P<0.01)

SA group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BA group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BS group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SS group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SDH : superficial dorsal horn

NP : nucleus proprius

N : neck of dorsal horn

V : ventral horn

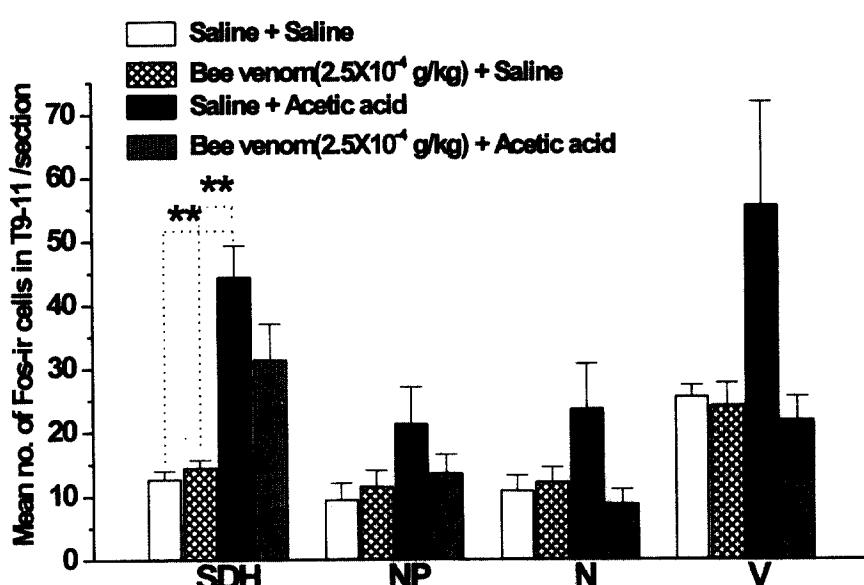


Figure 3. A graph summarizing the effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 9-11th thoracic spinal cord. Each bar represent the mean of FLI neurons per section occurred by intraperitoneal injection of acetic acid(10mg/kg). Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. SDH, superficial dorsal horn; NP, nucleus proprius; N, neck of dorsal horn; V, ventral horn. *P<0.05; **P<0.01.

N部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 각각 10.9 ± 2.2 個, 12.2 ± 2.3 個 및 8.8 ± 2.2 個로 나타나 SA群의 23.7 ± 7.0 個에比하여 減少하는 傾向을 보였으나 有意性은 없었다.

V部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群에서 각각 25.6 ± 1.7 個, 24.2 ± 3.5 個 및 21.9 ± 3.6 個로 나타나 SA群의 55.7 ± 16.2 個에比하여 減少하는 傾向을 보였으나 有意性은 없었다(Table 6, Figure 7).

4. 中腕蜂毒藥鍼으로 11~13번재 脊髓部位에 나타나는 Fos 發現神經細胞의 數的 變化

11~13번재 胸髓의 SDH部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群은 각각 11.5 ± 2.8 個, 21.5 ± 3.3 個 및 23.7 ± 0.2 個가 觀察되어

SA群의 44.1 ± 4.4 個에 比하여 有意한 Fos 發現 神經細胞의 減少($p < 0.01$)를 보여 주었다.

NP部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群은 각각 21.7 ± 4.4 , 18.3 ± 3.1 및 14.4 ± 0.9 個로 나타나 SA群의 31.3 ± 12.0 個에比하여 減少하는 傾向을 보였으나 有意性은 없었다.

N部位에서 SS群, BS群 및 BA群은 각각 24.8 ± 3.2 , 20.4 ± 2.9 및 17.6 ± 3.3 個로 17.0 ± 1.8 個의 Fos 發現 神經細胞를 나타낸 SA群과 비슷한 發現 程度를 보였다.

V部位에서의 Fos 發現 神經細胞數는 SS群, BS群 및 BA群은 각각 33.4 ± 7.1 個, 30.6 ± 2.7 個 및 23.9 ± 4.0 個로 나타나 SA群의 72.5 ± 14.8 個에比하여 각각 有意性($p < 0.05$) 있는 減少를 나타내었다(Table 7, Figure 8).

Table 3. The effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 11-13th thoracic spinal cord.

Treatment	Dose (g/kg s.c.)	n	no. of FLI			
			SDH	NP	N	V
SA group	-	5	44.1 ± 4.4	31.3 ± 12.0	17.0 ± 1.8	72.5 ± 14.8
BA group	2.5×10^{-4}	5	$23.7 \pm 0.2^{**}$	14.4 ± 0.9	17.6 ± 3.3	$23.9 \pm 4.0^*$
BS group	2.5×10^{-4}	5	$21.5 \pm 3.3^{**}$	18.3 ± 3.1	20.4 ± 2.9	$30.6 \pm 2.7^*$
SS group	-	4	$11.5 \pm 2.8^{**}$	21.7 ± 4.4	24.8 ± 3.2	$33.4 \pm 7.1^*$

Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. (*P, *P<0.05; **P, **P<0.01)

SA group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BA group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of acetic acid

BS group : Sample of bee venom pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SS group : Sample of saline pretreatment with intraperitoneal injection of saline

SDH : superficial dorsal horn

NP : nucleus proprius

N : neck of dorsal horn

V : ventral horn

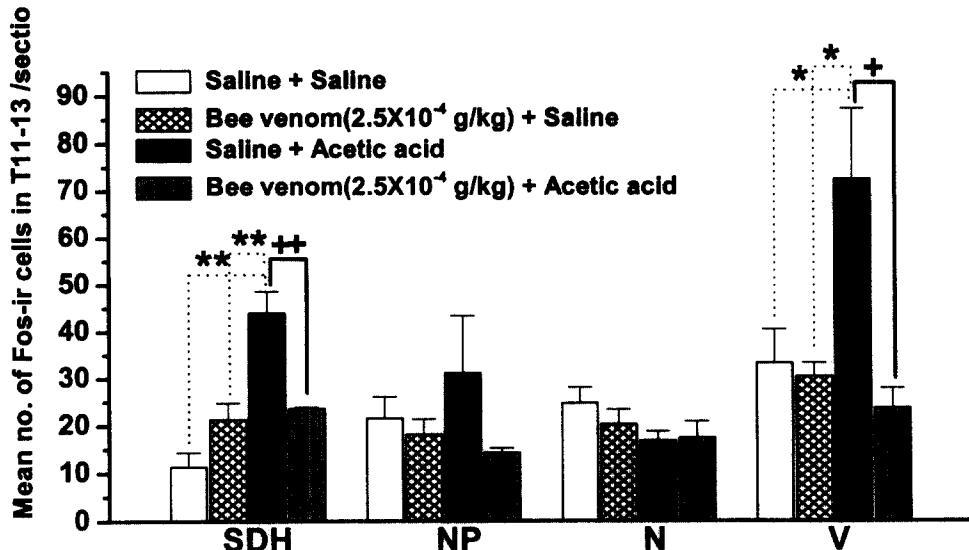


Figure 4. A graph summarizing the effect of bee venom pretreatment(2.5×10^{-4} g/kg) on the number of FLI neurons in the 11-13th thoracic spinal cord. Each bar represent the mean of FLI neurons per section occurred by intraperitoneal injection of acetic acid(10mg/kg). Asterisks refer to probability levels for significant differences from saline-acetic acid treated animals. SDH, superficial dorsal horn; NP, nucleus proprius; N, neck of dorsal horn; V, ventral horn. *P, $^+P < 0.05$; **P, $^{++}P < 0.01$.

IV. 考察

蜂鍼療法은 2000年 前부터 民間療法으로 使用되었으며, 韓醫學에서 使用된 最初의 記錄은 紀元前 168년 埋葬된 馬王堆醫書 中 <養生方>과 <雜療方>²⁷⁾이다. 蜂毒의 利用方法으로 舌을 直接穴位 等에 놓아 刺入하는 方法과 舌의 針을 뽑아서 刺戟하는 方法이 使用되었으나, 最近에는 電氣抽出法이나 電磁波 刺戟法으로 蜂毒을 抽出 加工하여 使用한다.

蜂毒^{4,9,10,12)}은 獨特한 藥理學的 作用을 하는 酶素(Enzyme)와 peptide로 構成된 蛋白質複合體이다. 蜂毒의 主된 酶素는 hyaluronidase와 phospholipase A₂이다. Hyaluronidase은 細胞膜의

가장 表層에 位置한 mucopolysaccharide의 構成成分인 hyaluronic acid를 加水分解하여 蜂毒의擴散을 도와주는 觸媒로 作用한다. Phospholipase A₂는 細胞膜의 主된 構成成分인 phospholipid를 分解시켜 窮極의으로 細胞를 死滅시키는 作用을 한다. 이러한 酶素들은 一部 사람들에게서 經驗되는 甚한 allergy反應을 誘導시킨다.

蜂毒에 存在하는 主된 peptide는 melittin과 apathia 및 peptide 401(BCD)이다. Mediation과 Apathia은 身體의 副腎과 腦下垂體系를 刺戟하여 cortisol과 天然steroid를 生成하는데 天然steroid는 合成steroid에서 發生되는 合併症이 發生되지 않는다. Peptide 401(MCD)은 強力한 消炎作用이 있어 同一量의 cortisone보다 100倍 以上 效果가 있는 것으로 알려져 있다.

蜂毒의 性味³³⁾는 苦, 辛, 平하며 主要作用은 強壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 抗炎, 抗癌, 아드레날린分泌 促進과 淋巴細胞, 赤血球 再生·增加作用 等이 있다. 適應症은 化膿性疾患, 류마티스 關節炎, 急慢性關節炎, 椎間板脫出症과 그 後遺症, 痛風, 神經痛, 筋肉痛, 偏頭痛, 氣管支喘息 等이다.⁴⁾ 또한 有毒하므로 allergy反應, 瘙痒症, 嘴吐, 惡寒, 呼吸困難, 低血壓, 失神 等의 過敏反應과 毒性에 의한 副作用이 있다.^{4,5)}

蜂毒에 관한 研究는 Billingham 等⁴¹⁾에 의해 처음으로 蜂毒의 構成要素 中 抗炎症作用이 報告된 以後, 美國에서는 美國蜂毒療法學會(1978年)가 設立되어 活潑히 臨床에 利用되고 있다. この蜂毒은 關節炎 外에 現代醫學에서 難治病으로 알려진 多發性硬化症 및 原因을 알 수 없는 慢性痛症에 卓越한 效果가 있는 것으로 알려져 있다. 現在까지 蜂毒의 構成成分分析과 藥理作用^{39,40,41,43,59,64)}, 免疫과 allergy 反應^{46,47,54)}, 毒性^{35,48,51,56)}, 角膜損傷과 肝損傷 等⁶⁶⁾의 多樣한 報告가 있으며, 高¹⁶⁾의 蜂毒藥鍼療法이 鎮痛, 解熱 및 消炎作用이 優秀한 것으로 報告한 것을 始作으로 権等¹⁹⁾의 蜂毒藥鍼療法이 患者의 急慢性 炎症實驗에서 消炎效果와 活血作用의 研究 外에 毒性, 安定性 檢查, 免疫研究 等^{17,23)}의 蜂毒藥鍼療法에 대한 多樣한 研究가 이루어지고 있다.

中脘(CV12)은 足陽明胃經의 募穴이며 府의 會穴로서 手太陽, 手少陽, 足陽明 및 足厥陰 等의 經絡과 交會하며 和胃氣, 化濕滯의 穴性^{11,13)}을 가지고 있으며, 急慢性 胃炎, 胃痙攣, 胃脘痛 等과 高血壓, 心痛, 腹痛, 背與心相引而痛, 脇下堅痛, 腹脹痛 等을 主治한다. 募穴은 五臟六腑의 氣가 胸腹部에 모이는 곳으로 藥鍼療法에서 治療點 4,2⁸⁾으로 用되고 있다.

身體組織이 損傷될 때마다 發生되는 痛症은 身體의 異常을 알리는 警告信號로서 身體를 保護하기 위한 防禦機轉이다.^{1,2,3,7,8,37)} 痛覺은 多樣한 種類의 刺戟에 의하여 誘發되는데 이러한 刺戟들은 機械的(mechanical), 溫度的(thermal), 化學的(chemical) 刺戟으로 分類된다. 一般的으로 急性痛症은 機械的, 溫度的 刺戟에 의하여 誘發되고

慢性痛症은 세가지 刺戟에 의하여 誘發된다. 痛症을 일으키는 化學物質에는 bradykinin, serotonin, histamine, prostaglandins, substance P, K⁺, acid, acetylcholine 및 proteolytic enzyme 等이 있다.^{1,2,25,36,37)}

모든 痛覺受容體가 自由神經終末이지만 中樞로 痛症을 傳達하는 徑路는 두 가지가 있다. 急性痛症信號는 A_δ 神經纖維에 의해 脊髓에 傳導되고 慢性痛症信號는 C神經纖維에 의하여 傳導된다.

脊髓로 痛覺信號가 들어오면 두 徑路로 나뉘어서 腦로 傳導되는데 A_δ 神經纖維는 주로 後角의 lamina I에 멈추고, 新脊髓視床路의 2次命令뉴런을 與蓄시킨다. 이들이 낸 긴 纖維는 前交聯을 通하여 脊髓의 反對側으로 交叉하고 前側柱를 通하여 腦로 올라간다. 一部의 新脊髓視床路의 纖維는 腦幹의 網狀領域에서 멈추지만 대부분은 視床으로 올라가서 腹側基底核群에 멈추게 된다.

舊脊髓視床路는 主로 C神經纖維에 의하여 전해지는 痛覺을 傳導하는데 거의 모든 末梢纖維가 後角의 膠樣質이라고 불리는 lamina II와 III에 終末한다. 대부분의 信號는 後角內에서 하나 또는 그 이상의 短은 纖維의 뉴런을 거쳐 lamina V-VIII에 到達하여 마지막 뉴런의 긴 축삭이 前交聯을 通하여 交叉해서 反對側 前側路를 通해 腦로 올라간다. 舊脊髓視床路는 腦幹에 廣範圍하게 終止하는데 1/10 ~ 1/4의 神經纖維만 視床으로 직접 가고 나머지는 腦幹의 網狀核, 上구와 하구의 深部에 있는 中腦蓋領域, 水道周圍의 灰白質領域中 한 곳으로 간다. 腦幹痛覺領域으로부터 多樣한 短은 纖維 뉴런이 痛覺信號를 視床의 板內核과 中央 外側核과 視床下部 等 上位部位로 中繼한다.

痛症을 制馴하는 機轉은 痛覺受容體 레벨에서의 痛症制馴, 末梢痛覺纖維에서의 痛症信號의 遮斷, 脊髓에서의 痛症制馴 및 腦와 脊髓에서의 痛症制馴(下行性 抑制系)機轉으로 區分할 수 있다. 痛覺受容體 레벨에서의 痛症制馴은 痛覺誘發物質의 生成함으로 痛覺受容體 電位가 形成되지 못하게 하는 것이다. 末梢痛覺纖維에서의 痛症信號의 遮斷은 神經細胞膜을 통한 K⁺, Ca²⁺, Na⁺의 移動

을變化시키는 것으로 칼슘調定說, 細胞膜膨脹說, 表面蓄積說 및 特殊受容體의 假說이 提起되고 있다. 脊髓에서의 痛症制馭는 gate control theory에 의해 說明되고 있다. 直徑이 가는 纖維가 活性化되면 痛覺이 固有中樞로 傳達되고, 直徑이 큰 纖維가 活性化되면 固有中樞로 傳達되는 痛覺이 遮斷되는 等의 末梢에서 들어오는 神經의 活性을 脊髓에서 通過내지 遮斷시키는 關門이 있다는 것이다. 腦와 脊髓에서의 痛症制馭機轉은 癲癇性 鎮痛劑와 鍼灸刺戟에 의하여 活性化된다고 알려졌다. 下行性 抑制系는 水道周圍灰白質, 中腦의 腦室周圍領域, 下部橋와 上部延髓에 位置하는 象은 中間核인 大縫線核과 延髓의 側部에 存在하는 方巨大性 網狀核과 脊髓의 後角에 있는 痛覺抑制群으로 構成되며 脊髓의 後角에서 痛症抑制 信號가 痛症信號로 되기전에 遮斷할 수 있다. 痛症抑制系와 關聯된 物質들은 endogenous opiate-like substance, serotonin 및 acetylcholine 等이 있다. 腦室周圍核과 水道周圍灰白質 모두에서 由來된 많은 神經纖維는 終末에서 enkephaline을 分泌하므로 縫線核에 있는 多數의 神經纖維終末은 enkephaline을 遊離한다. 縫線核에서 由來하나 後角에 終末하는 纖維는 終末에서 serotonin을 分泌하고 局所脊髓뉴런이 enkephaline을 分泌하게 되므로 enkephaline은 脊髓後角에서 시냅스하는 C와 A_δ 痛覺纖維를 시냅스前抑制와 시냅스後抑制를 시키는 것으로 알려져 있다.^{8,25)}

韓醫學에서 痛症의 原因은 寒³²⁾, 熱³¹⁾, 飲食所傷³⁰⁾, 蟲, 痰飲³¹⁾, 血虛²⁹⁾, 痰血^{29,30)}等으로 多樣하게 나타나고 있으며, 그 중 内經에서는 “痛者寒氣多也有寒故痛”, “寒氣客於經脈之中 與炅氣相搏則脈滿 滿則痛而不可按也” “寒氣客於脈外則脈寒 脉寒則縮踡 縮踡則脈細急 細急則外引小絡 故卒然而痛”¹⁴⁾이라 하여 寒이 疼痛을 일으키는 가장 많은 原因으로 보고 있다. 病理機轉은 “不通則痛”과 “不營則痛”으로 區分되는데 “不通則痛”은 内經에서 “氣傷痛”, “經脈流行不止 環周不休 寒氣入經而稽遲 泣而不行 客于脈外則血少 客于脈中則氣不通 故卒然而痛”¹⁴⁾, 李³⁰⁾와 張³²⁾은 “痛則不通 不通則痛”이라 하여 經脈中の 氣血運行이 失調되어 痛

症이 發生한다고 하였다. “不營則痛”은 内經에서 “寒氣客於背俞之脈 則血脈澁 澤澁則血虛 血虛則痛”¹⁴⁾, 陳³⁴⁾은 不營, 不充, 失養 等이 虛痛을 發生시킨다고 하였다. 痛症의 治療는 痛症의 原因을 除去하고 氣血의 調和를 이루어 痛症을 除去시키는 鍼灸療法이나 藥物療法이 活用된다.^{31,32)}

痛症에 따른 神經細胞의 活性變化를 觀察하는 方法으로는 神經細胞의 活性을 間接的으로 測定할 수 있는 Fos 蛋白質의 免疫組織化學法을 使用하고 있다. Fos 蛋白質은 哺乳類에 存在하는 proto-oncogene의 一種인 c-fos 遺傳子의 活性增加로 生產되는 것으로 알려져 있다. c-fos는 2 murineosteogenic sarcoma virus에서 發見되는 v-fos와 同一한 것으로서 神經細胞內에서 nerve growth factor, cholinergic neurotransmitter, 및 calcium과 cAMP와 같은 second messenger들의 活性에 의해 發現되는 것으로 알려져 있다. c-fos는 細胞膜에 存在하는 NMDA 受容體나 L-type calcium channel 等의 活性增加에 의해서도 發現되며 특히 神經細胞가 外部 및 內部의 刺戟에 의해 脫分極되는 初期에 發現함으로 ‘early response gene’ 또는 ‘primary response gene’라고 命名하기도 한다. 따라서 初期 刺戟에 의해 神經細胞가 脫分極됨으로써 c-fos proto-oncogene이 發現되며, 그 結果 生產되는 Fos 蛋白質과 또다른 primary response gene의 一種인 c-jun proto-oncogene의 發現으로 生產되는 Jun 蛋白質이 同時に 神經細胞 DNA內의 AP-1 regulatory site에 結合함으로써 다른 target gene들의 活性과 發現을 調節하는데 關與하는 것으로 알려져 있다. c-fos gene의 活性에 의해 生產되는 Fos 蛋白質은 最初 刺戟이 있은 지 約 30分 後부터 細胞質內에 나타나기始作하며, 最初刺戟이 있은 後 20-90分에는 免疫組織染色法에 의해 Fos 蛋白質의 神經細胞內蓄積有無를 쉽게 感知할 수 있다. 神經細胞의 活性增加로 生產된 Fos 蛋白質의 核內蓄積程度는 神經細胞의 活性變化를 間接的으로 測定할 수 있는 有用的 marker로 使用되고 있다.^{42,44,50,60)}

免疫組織染色法을 利用한 Fos 蛋白質의 測

定은 여러 가지 刺戟에 대한 *in vivo* 狀態에서 神經細胞들의 短期反應(short term response)을 測定, 分析하는데 有用한 方法으로 알려져 있다. Fos protein에 대해 生產된 antibody를 利用하여 免疫組織化學法을 實施하면 spinal cord內에서 나타나는 pain sensation, visual sensation, auditory recognition 및 hypergravity 等에 대한 神經細胞의 活性變化를 測定할 수 있다.^{45,50,53,57,58,59,61,62,68)}

蜂毒과 免疫에 대한 研究는 이미 報告되었고, 蜂毒의 抗炎症作用에 대한 機轉研究는 進行中이지만, 蜂毒의 前處置가 나타내는 鎮痛作用에 대한 研究가 微弱한 實定이다. 이에 著者는 中院(CV₁₂)에 蜂毒을 注入하여 鎮痛作用에 미치는 影響을 알아보고자 fos 免疫 蛋白質의變化를 觀察하였다.

Fos 發現 神經細胞의 免疫染色性 程度를 살펴보면, 蜂毒을 前處置하고 生理食鹽水를 注入한 群(Fig. 5B)은 生理食鹽水를 皮下로 前處置하고 生理食鹽水를 腹腔內로 注入한 群(Fig. 5A)에 比하여 6~9번 째 胸髓部位의 SDH, NP, N에서 더 옥 增加되어 觀察되었지만, 生理食鹽水를 前處置하고 腹腔內로 acetic acid를 注入한 群(Fig. 5C)에 比하여서는 免疫染色性이 매우 減少되었다. Ceng 等⁴³⁾은 痛症모델로 蜂毒을 利用하기 위한 實驗에서 腰薦椎部位에서 蜂毒 注入後 Fos 發現 神經細胞가 增加되어 2時間 後가 最高로 增加한 後 서서히 減少하였다고 報告하고 있다. 2.5×10^{-4} g/kg 濃度의 蜂毒을 中院(CV₁₂)에 注入한 實驗群(Fig. 5D)의 Fos 發現 神經細胞의 免疫染色性은 生理食鹽水를 前處置하고 腹腔內로 acetic acid를 注入한 群(Fig. 5C)에 比하여 SDH, NP, N에서 급격히 減少되는 樣相을 觀察할 수 있었다.

中院蜂毒藥鍼으로 脊髓部位에 나타나는 Fos 發現 神經細胞의 數的 變化를 살펴보면, 6~9번 째 胸髓의 SDH部位에서 生理食鹽水를 前處置하고 腹腔內 生理食鹽水를 注入한 SS群과 蜂毒을 前處置하고 生理食鹽水를 注入한 BS群은 生理食鹽水를 注入하고 腹腔內 acetic acid를 注入한 SA

群과 比較時 有意한 差異를 나타내었다. 2.5×10^{-4} g/kg 濃度의 蜂毒을 中院(CV₁₂)에 處置한 BA群은 SA群에 比하여 統計的 有意性은 認定되지 않았지만 Fos 發現 神經細胞의 減少傾向을 보여 주었다. NP, N 및 V部位에서는 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 비해 有意한 減少를 보였다.

9~11번 째 胸髓에서 Fos 發現 神經細胞는 SDH部位에서 SS群과 BS群이 각각 SA群에 比하여 有意한 差異를 나타내었으나, BA群은 有意性이 認定되지 않았다. NP, N 및 V部位에서는 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 比하여 減少를 보였으나 有意性은 認定되지 않았다.

11~13번 째 胸髓에서 Fos 發現 神經細胞는 SDH部位에서 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 比하여 有意한 減少를 보였으나 NP部位에서는 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 比하여 減少되는 경향을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다. N部位에서는 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 比하여 오히려 增加하는 傾向을 보였다. V部位에서는 SS群, BS群과 BA群이 각각 SA群에 比하여 有意한 減少를 보였다.

以上의 結果로 보아 中院(CV₁₂)의 蜂毒藥鍼에 대한 鎮痛效果가 認定되었으므로 痛症의 治療와 豫防의 側面에서 蜂毒藥鍼療法을 活用할 수 있을 것으로 期待되나, 臨床의 으로 多樣하게 活用하기 위해서는 蜂毒藥鍼療法에 대한 安定性 및 用量等에 대한 多角的인 研究가 行해져야 할 것으로 思慮된다.

V. 結論

蜂毒藥鍼의 鎮痛效果를 檢證하기 위하여 中院(CV₁₂)과 背部 任意穴에 蜂毒藥鍼을 刺戟한 後 腹腔內에 acetic acid를 注入하여 腹痛을 誘發시킨 생쥐 脊髓의 二次 神經細胞內 c-fos變化를 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 中院蜂毒藥鍼에 대한 Fos免疫染色性의 變化

는 6번~9번째 胸髓部位의 superficial dorsal horn(SDH), nucleus proprius(NP) 및 neck of dorsal horn(N)에서 有意하게 減少하였다.

2. 中院蜂毒藥鍼으로 脊髓部位에 나타나는 Fos 發現 神經細胞의 數的 變化는 6~9번째 胸髓部位의 NP, N 및 V部位, 9~11번째 胸髓部位의 SDH 部位, 11~13번째 胸髓部位의 SDH와 ventral gray(V)部位에서 有意한 減少를 보였다.

3. 中院蜂毒藥鍼으로 나타나는 writhing reflex 的 數와 Fos 發現 神經細胞 數의 相關關係는 有意하였다.

VI. 參考文獻

1. 姜斗熙 : 生理學, 서울, 신광출판사, pp.15-5, 15-7, 15-18, 15-21, 1984
2. 고려의학출판부 역 : 痛症의 治療, 서울, 고려 의학, pp.1-13, 1991
3. 김광진 : 人體生理學, 서울, 정문각, pp.357-370, 1998
4. 金文昊 : 蜂毒療法과 蜂鍼療法, 서울, 한국교 육기획, pp.20-37, 41-42, 67-74, 104-112, 139-149, 1992
5. 金廷彥 : 기적의 藥鍼療法, 서울, 금강출판사, pp.18, 1990
6. 金正鎮 : 生理學, 서울, 高文社, pp.315-320, 1993
7. 閔炳一 : 東洋醫學의 科學的 接近과 臨床. 서울, 書苑堂, pp.44-54, 68-69, 111-116, 1993
8. 박찬웅, 김승업 : 신경과학 대우학술총서 자연과학, 서울, 민음사, pp.97-101, 1990
9. 성은찬 : 난치병의 蜂鍼療法, 전국농업기술자 회 출판부, 서울, pp.48, 59, 166, 228, 1985
10. 성은찬 : 알기위운 蜂鍼療法, 전국농업기술자 회 출판부, 서울, pp.35, 1990
11. 全國韓醫科大學校鍼灸經穴學教室 : 鍼灸學, 서울, 集文堂, pp.730-732, 1988
12. 최승윤 : 양봉 새기술, 농축산물 기술자원연구원, 서울, pp.117, 118, 1987
13. 崔容泰 外 : 精解鍼灸學, 서울, 杏林書院, pp.279-282, 1974
14. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, pp.11, 102-104, 145, 183, 276, 1991
15. 姜成吉 : 大載水鍼이 鎮痛 및 水銀 中毒에 미치는 影響에 관한 研究, 서울, 慶熙韓醫大論文集, 5:1-18, 1982
16. 高炯均 : 蜂鍼毒療法이 抗炎, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效果에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 13(1):293-292, 1992
17. 孔賢淑 : 蜂毒療法이 생쥐의 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, 12(1):331-339, 1995
18. 權奇祿 外 : 蜂鍼에 대한 考察, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):159-171, 1994
19. 權奇祿 外 : 蜂毒藥鍼療法이 消炎, 鎮痛作用에 미치는 效能에 관한 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, 15(2):97-103, 1998
20. 金敬東, 金甲成 外 : 鍼灸 및 Laser光線鍼刺戟이 白鼠의 鎮痛에 미치는 影響, 서울, 大韓鍼灸學會誌, 4(1):39-48, 1987
21. 金文坤 : 艾灸가 膝關節炎의 消炎 및 鎮痛에 미치는 影響, 이리, 圓光大學校 大學院 學位論文集, 10:159-169, 1983
22. 金文芳 : 繆刺 및 巨刺法에 의한 電鍼刺戟이 消炎, 鎮痛 및 血清 cholinesterase活性에 미치는 影響, 서울, 慶熙韓醫大論文, 1989
23. 金祉榮, 高炯均, 金容奭 外 : 蜂毒藥鍼療法의 抗炎症 作用에 關한 實驗的 研究, 서울, 大韓鍼灸學會誌, 15(1):317-331, 1998
24. 盧植, 崔容泰 : 患者の 鎮痛機轉에 있어서 視床下部 弓狀核의 役割에 對한 研究, 서울, 慶熙韓醫大論文集, 21(1):319-33, 1998

25. 민병일 : 통증과 통증제어 기전, 대한내과학회지, 57(4):622-626, 1999
26. 李宗錫, 高炯均 : 中脘 및 足三里의 蜂毒療法의 鎮痛作用에 미치는 影響, 서울, 慶熙韓醫大論文, 15:485-495, 1992
27. 인창식, 고형규 : 蜂毒療法에 대한 韓醫學 最初의 文獻 : 馬王堆醫書의 蜂毒療法 2例, 大韓鍼灸學會誌, 15(1):143-147, 1998
28. 鄭同經, 穴位注射療法, 香港, 商務印書館, pp.1, 1979
29. 葉天士 : 臨證指南醫案, 臺北, 旋風出版社, 卷 5, pp.41-43, 中華67年
30. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大成文化社, pp.303-304, 1983
31. 張景岳 : 景岳全書, 臺北, 臺聯國風出版社, pp. 436-442, 中華69年
32. 張子和 : 儒門事親, 臺北, 旋風出版社, 卷 2, pp. 18, 19, 中華67年
33. 朱文鋒 : 實用中醫辭典, 挾西, 挾西科學技術出版社, pp.402, 1992
34. 陳言 : 陳無擇三因方, 臺北, 臺聯國風出版社, 13:1-2, 1978
35. 陳維辛 外 : 蜂毒, 蜂peptide抗炎, 鎮痛, 變應原性 및 急性毒性의 比較, 中西醫結合雜誌 4:45-48, 1993
36. Barbara, Rudolf ; Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom, Academic Press, pp.337-338, 1986
37. Guyton : Text book of medical physiology (7th), W.B.Saunders, Philadelphia, pp.592-598, 1981
38. Paxinos G and Watson C : The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd. ed. Academic Press, Australia, 1986
39. Tom piek : Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, pp. 107-120, 1986
40. Annand RR : A high efficiency method for purification and assay od bee venom phospholipase A2, Pathology, 27(2):157-160, 1995
41. Billingham ME : An anti-inflammatory peptide from bee venom: Nature, 245:163-4, 1973
42. 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
43. Ceng L, Jun C, Hui L.L and Ji-Shuo L : Spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord of anesthetized rat induced by subcutaneous bee venom injection, Brain Res., 806:175-185, 1998
44. Craner SL, Lund JS, Hoffman GE, and Lund RD : Moving visual stimuli induce c-fos expression in the visual cortices of the rat. Soc. Neurosci. Abst., 17:487, 1990
45. D.L. Hammond, Presley, R., Gogas, K. R. and Basbaum, A. I. : Morphine or U-50,488 suppresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat. J. Comp. Neurol., 315:244-53, 1992.
46. Donohoe PJ, et al : IgE+ cells in the peripheral blood of atopic, nonatopic, and bee venom-hypersensitive individuals exhibit the phenotype of highly differentiated B cells, J. Allergy clin Immunol., 95(2):587-596, 1995
47. Dudler T, et al : A link between catalytic activity, IgE-independent mast cell activation, and allergenicity of bee venom phospholipase A2, J. Immunol., 155(5):2605-2613, 1995
48. Ferrira DB, et al : An infarct-like

- myocardial lesion experimentally induced in Wister rats with Africanized bee venom, *J. Pathol.*, 177(1):950-1002, 1995
49. Han JS, Chou PH, Lu ZC, Yang TH, Lu LH and Ren MF : The role of central 5-hydroxytryptamine in acupuncture analgesia, *Sci. Sin.*, 22:91-104, 1979
50. Julian Taylor, et al : Metamizol potentiates morphine effects on Visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord, *European J. Pharmacol.*, 351:39-47, 1998
51. Hanson JM : Anti-inflammatory property of 401(MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee *Apis mellifera*: *Br. J. pharmacol.*, 50:383-92, 1974
52. Kaufman GD, Anderson JH, and Beitz AJ: Activation of a specific vestibulo-olivary pathway following centripetal acceleration in the rat. *Brain Res.*, 562:311-317, 1991
53. Kehl LJ, Gogas KR, Lichtblau L, Pollock CH, Mayer M, Basbaum AI, and Wilcox GL: The NMDA antagonist MK 801 reduces noxious stimulus-evoked FOS expression in the spinal cord dorsal horn In: Bond MR., Charlton JE and Woolf CJ, eds. *Proc. 6th World Congress on Pain*. Elsevier. Amsterdam, 307-311, 1991
54. K.M. Von, S.Dworrkin, R.L.Le : Graded chronic pain status, an epidemiologic evalution, *Pain*, 40:279-291, 1990
55. Kusuhara, H., Fukunari, A., Matsuyuki, H. and Okumoto, T. : Principal involvement of cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the c-fos expression of the rat hind brain following visceral stimulation with acetic acid. *Brain Res Mol Brain Res.*, 52:151-6, 1997.
56. Lariviere WR : The bee venom test: a new tonic - pain test, *Pain*, 66(2):271-272, 1996
57. Lee J-H, Wilcox GL, and Beitz AJ : Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation, *NeuroReport*, 3:841-844, 1992
58. 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: 80-91, 1992
59. Lee J.H. and Beitz, A.J.: Distribution fo brain stem and spinal cordnuclei associated with different frequencies of electroacupunture analgesia, *Pain*, 52:11-28, 1993
60. M. Dragunow and R. Faull : The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing, *J. Neuroscience Methods*, 29:261-265. 1989.
61. Morgan JI, Curran T: Role of ion flux in the control of c-fos expression, *Nature*, 322:552-555, 1992
62. Naranjo JR, Bellstrom B, Achaval M, Sassone-Corsi P: Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a non canonical AP-1 site in the prodynorphin gene, *Neuron*, 6:607-617, 1991
63. S.A. Anderson, E. Holmgeren ; On acupuncture analgesia and the Mechanism of pain, *Am. j. chin. Med.*, 3:311-334, 1975.
64. Shamsher SS, Peterson JW, and Chopra AK: Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 238:436-442, 1997
65. Sheng M, Greenberg ME : The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron*, 4:477-485, 1990

66. Tsvetkov VI : Eyeball injury caused by bee sting, Oftal. zh, 20:389-391, 1965
67. Wong-Reley M.T.T., G.H.Kageyama : Localization of cytochrome oxidase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia with quantitative analysis of ventral horn cells in monkeys, J. Comp. Neurol., 245:41-61, 1986
68. Wu MF, Fahringer HM, Kilduff TS, and Siegel JM : Neuroal mechanisms of acoustic startle reflex: anatomical analysis using c-fos. Soc. Neurosci. Abst., 17:187-194, 1992