

원저

전침자극이 Spontaneously Hypertensive Rat의 대뇌겉질, 뇌줄기, 소뇌 부위의 Nitric Oxide Synthase 신경세포에 미치는 영향

김종인 · 김용석 · 김창환

경희대학교 부속 한방병원 침구과

Abstract

Difference in NOS between 2 Hz and 100 Hz EA in cerebral cortex, brain stem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats

Jong-In, Kim · Yong-Suk, kim · Chang-Hwan, Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine
in Kyung-Hee University

Background and Objective : The aim of this study was to investigate the effect of various electroacupuncture stimulation on NADPH-diaphorase in cerebral cortex, brain stem, cerebellum of spontaneously hypertensive rats.

Materials and Methods : We evaluated the changes of NADPH-d-positive neurons using a histochemical method. The staining intensity of NADPH-d-positive neurons was assessed in a quantitative fashion using a microdensitometrical method based on optical density by means of an image analyzer.

Results and Conclusion : The average optical density of NADPH-d-positive neurons of 100 Hz (bipolar square wave 0.2 ms duration and 100 Hz frequency) electroacupuncture treatment group significantly increased in most cortical areas comparison between the manual acupuncture and 2 Hz (bipolar square wave 0.2 ms duration and 2 Hz frequency) electroacupuncture groups.

In the brain stem, the optical density of NADPH-d-positive neuron at only superficial gray layer of the superior colliculus area was same as cerebral cortex.

We conclude that the morphological evidence for NADPH-d-positive neurons may be have regional change in cerebral cortex brain stem and cerebellum according to various electroacupuncture stimulations

Key words : Electroacupuncture stimulations, NADPH-diaphorase, Cerebral cortex, Brain stem, Cerebellum.

· 접수 : 6월 28일 · 수정 : 7월 12일 · 채택 : 7월 21일

· 교신저자 : 김창환, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 부속 한방병원 침구과(Tel : 02-958-9198)
E-mail : kchacu@khmc.or.kr

I. 서론

鍼療法の 効果는 經穴의 選擇(經穴의 特異性)과 選擇된 經穴에 適切한 刺戟(電氣的인 刺戟이나 機械的인 刺戟: 刺戟의 特異性)에 依存된다¹⁻³⁾.

鍼療法은 經穴에 대한 刺戟이 該當 經絡 및 臟腑에 直接 反應하여 效果를 發揮하는 것으로 認識되어 왔으나 西洋醫學에서 많은 疾患이 腦에 의해 統制를 받는다고 알려지고 PET, functional MRI을 비롯한 映像技法을 이용하여 뇌결질의 대사활성변화를 확인함으로써 鍼療法이 뇌의 統制 過程을 통해서 效果를 發揮한다는 假說이 提示되고 있다⁴⁻⁷⁾.

鍼刺戟이 中樞神經系에 미치는 影響에 관한 研究는 神經傳達 物質 中 細胞 사이의 作用을 媒介하는 메신저 물질로 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO)의 活性 變化에 대한 研究와 기타 神經傳達物質과 鍼療法과의 關係에 관한 研究가 있다⁸⁻¹⁴⁾.

중추신경계에서 NO는 neural transmission, long term potentiation과 대뇌 혈류의 조절에 관여하는데 정상상태에서는 국소적인 신경활성 동안 대뇌 혈류의 변화에도 중요한 역할을 하고 병적 상황에서는 neurotoxic substance로 알려져 있다^{9,15)}. L-arginine에서 NO를 만드는 효소인 nitric oxide synthase (NOS)는 Ca^{2+} 의존성인 constitutive NOS (cNOS)와 Ca^{2+} 비의존성인 inducible NOS (iNOS)의 두 가지 형태로 존재한다⁶⁻¹⁸⁾. NO는 신경계에서 synaptic plasticity에 관여하거나 long-term potentiation이나 depression 등의 기억과 연관된 신경생리화학적 현상에 관여하며 국소적인 뇌 혈류량의 조절 및 주위의 synapse 들로부터 neurotransmitter의 분비를 촉진하는 역할 등을 수행하지만 뇌의 저산소증, 허혈증이나 뇌

졸중 등의 질병상태에서는 glutamate의 농도가 증가되며 세포 내로 칼슘이온이 유입되어 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경 세포에 손상을 유발하기도 한다¹⁹⁻²⁰⁾. 이와 같은 NO의 뇌세포 보호효과와 뇌세포 손상효과에 대한 작용기전을 이해함으로써 뇌질환에서 뇌세포 손상을 완화할 수 있는 새로운 치료법의 개발이 가능하리라 기대되고 있다.

이에 저자는 電鍼療法의 效果와 腦内の 神經傳達物質인 NO와의 相關關係를 糾明하여 鍼療法과 腦와의 聯關性을 把握하기 위하여 spontaneously hypertensive rats (SHR) 흰쥐에게 빈도수 및 강도를 다르게 電鍼刺戟을 시행한 후 흰쥐의 대뇌결질, 뇌줄기 및 소뇌 영역에서 신경전달물질인 NO를 합성하는 효소인 NOS의 변화를 확인하였다. NOS의 효소 활성은 주로 NADPH-d를 조직화학으로 염색한 후 microdensitometry를 이용하여 NADPH-d의 염색성 변화를 측정된 결과³⁰⁾ 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 動物 및 材料

1) 實驗動物

체중 $300g \pm 30g$, 9주령 ± 1 주령의 SHR 흰쥐를 2주간 실험환경에 적응시킨 후 각군 당 13마리를 배당하였다.

2) 실험재료

침은 길이 0.8 mm, 직경 0.15 mm의 stainless steel(정화침구사, 한국)호침을 사용하였고, 전침기는 일본 Ito사 PG-7형 전침기를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 혈위의 선정

實驗動物의 체표 상에 고²¹⁾의 방법에 따라 人體에 相應하는 部位의 足三里(ST36)를 骨度 分寸法에 의거하여 取穴하였다.

2) 실험군 설정

- ① 대조군(Control) : SHR의 족삼리(ST36)에 침자극만 가한 군
- ② 실험군 I: SHR의 족삼리(ST36)에 저빈도 고강도(2 Hz)의 전침자극을 가한 군
- ③ 실험군 II: SHR의 족삼리(ST36)에 고빈도 저강도(100 Hz)의 전침자극을 가한 군

3) 전침자극

- ① 전침자극은 연속파, 직각파, 0.2 ms duration으로 설정하였고 저빈도 고강도군(실험군 I)은 2 Hz에 근육수축이 현저히 보이는 강도로 자극을 가하였고, 고빈도 저강도군(실험군 II)은 100 Hz에 근육수축이 보일 정도의 강도로 하였으며 단순 침자극군(대조군)은 단순 침자극만 실행하였다.
- ② 전침자극은 주 3회 오전 10~11시에 시행하고 약간의 마취제를 사용하였다.
- ③ 10분씩 총 10회 전침자극을 하였다.
- ④ 전침자극 중 침이 빠지는 경우는 가능한 바로 다시 연결하고 시간도 보상하였다.

3. 조직처리

실험동물은 pentobarbital sodium(60 mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 원심실을 통하여 0.05M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde용액(4℃)을 10분간 관류시켰다. 이때 관류속도는 50~60ml/min이 되도록 하였다.

관류고정 후 각각 대뇌겉질, 소뇌, 뇌줄기부를 적출하여 4~6mm두께로 관상절개하여 동일한 고정액에 담가서 4℃에서 16시간 후 고정하였다. 후고정 다음에는 0.1 M PBS에 탄 20% sucrose 용액에서 2~5일간 보관하였다.

Cryocut (Leica, Germany)을 이용하여 40 μm 두께의 연속횡단절편을 제작하였고, 자른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하여 염색을 시행하였다.

4. NADPH-d 조직화학²²⁾

NADPH-d 조직화학을 위하여 조직절편을 0.1% β-NADPH, 0.01% nitroblue tetrazolium (NBT) 0.3% Triton X-100을 0.1 M PB에 녹인 반응혼합액에 넣어 37℃ 수조에서 60분간 반응시켰다. 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직을 PBS로 씻어서 더이상의 발색을 정지시켰다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다.

5. 조직관찰 및 영상분석

대뇌겉질과 뇌줄기 및 소뇌 부위에 분포하는 NADPH-d 신경세포의 위치 및 형태를 광학현미경 하에서 관찰하였으며 염색강도는 영상분석기(Multiscan, USA)의 densitometry를 이용하여 gray scale로 측정하였다. Average optical density (AOD)는 흰색을 0, 검은색을 255로 정하여 염색된 조직은 그 사이의 값을 갖고, 이때는 광원의 밝기에 따라 AOD의 값이 달라지므로 광원을 고정시킨 후 측정하였다. 측정된 광원의 밝기는 광원의 밝기에 따라 염색된 전체조직과 조직이 없는 부위를 각각 영상분석기로 측정하여 광원과 AOD 사이의 상관관계 standard curve를 얻은 후 가장 차이가 많이 나는 영역을 측정 광원으로 정하였다. 이때 각 실험군 당 적어도 15개 영역이상을 CCD camera를

통해 200X의 광학현미경에서 온 영상을 받아 영상 분석기로 측정하였다. 각 부위에서 세부구조의 위치와 명칭은 Paxinos와 Watson(1997)의 부도를 참고하였다.

6. 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 7.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차(Mean±standard error)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Duncan test 검정을 실시하였다.

III. 실험결과

NADPH-d는 NOS의 표지물질로 이용되고 있으며, NADPH-d의 효소활성은 NOS의 효소활성과 일치한다는 보고¹⁸⁾가 있어, 대뇌결질, 뇌줄기 및 소뇌 부위에서의 NADPH-d를 조직화학을 이용하여 염색하였으며 NBT의 formazan에 의해서 푸른색으로 염색된 변화량은 영상분석기의 microdensitometry법을 이용하여 측정하였다.

1. 대뇌결질 영역에서의 NADPH-d 염색성의 변화

대뇌결질 영역에서의 NADPH-d 염색성은 대조군과 2 Hz군에 비해서 100 Hz로 자극을 준 실험군에서 유의성있는 염색성의 증가 (p<0.05)를 나타내었다. 그러나, 대조군과 2 Hz군 간에는 통계적으로 유의성있는 차이를 보이는 대뇌결질 영역은 관찰되지 않았다. 이러한 변화는 대뇌결질 중 동종결질(isocortex)과 이종결질(allocortex)에 속하는 모든 영역에서 유의성있는 차이를 보였다(Table 1).

Table 1. Staining intensity of NADPH-d-positive neurons in the cerebral cortex of rats

	Acup	2 Hz	100Hz
M1	166.8±3.6 ^a	162.3±1.5 ^a	187.5±0.9 ^b
S1	163.9±2.7 ^a	156.4±2.6 ^a	191.7±1.3 ^b
Vi	165.3±4.3 ^a	160.5±3.1 ^a	184.9±1.9 ^b
Au	159.7±3.6 ^a	163.9±3.6 ^a	185.2±2.0 ^b
Cg	164.9±2.6 ^a	164.1±2.5 ^a	174.7±3.0 ^b
PRh	173.9±2.9 ^a	177.0±3.9 ^a	188.6±3.2 ^b
Ins	154.4±1.9 ^a	148.2±5.1 ^a	186.7±4.2 ^b

Data are mean ± SEM of average optical density. The means with same letter is not significantly different (Duncan's multiple range test, a=0.05) M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; Vi, visual cortex; Au, auditory cortex; Cg, cingulate cortex; PRh, perirhinal cortex; Ins, insular cortex.

2. 뇌줄기와 소뇌 영역에서 NADPH-d 염색성의 변화

뇌줄기 영역에서의 NADPH-d는 대조군과 2 Hz 및 100 Hz로 자극을 준 실험군에서 대뇌결질 결과와는 다른 변화를 보였다. 각 부위에 따라서 NADPH-d의 염색성의 결과가 다르게 나타났는데 관찰부위 중 위둔덕층(superficial gray layer of the superior colliculus)에서만 대뇌결질의 관찰 결과

Table 2. Staining intensity of NADPH-d-positive neurons in the brain stem and cerebellar of rats

	Acup	2 Hz	100Hz
SuG	118.8±3.13 ^a	109.4±2.9 ^a	162.3±3.14 ^b
DLPAG	134.6±2.16 ^a	111.7±2.17 ^a	103.2±2.14 ^b
PPTg	166.9±2.39 ^a	166.3±1.59 ^a	150.6±2.33 ^b
Pr	124.2±3.3 ^a	102.1±3.7 ^a	126.3±4.2 ^b
Gi	86.1±2.2 ^a	75.1±3.14 ^a	82.2±4.9 ^a
PL	139.1±2.0 ^a	175.4±2.03 ^b	139.5±2.5 ^a
CBLL	93.5±0.9 ^a	89.5±1.1 ^a	115.0±3.1 ^b

Data are mean ± SEM of average optical density. The means with same letter is not significantly different (Duncan's multiple range test, a=0.05) SuG, superficial gray layer of the superior colliculus; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; PPTg, pedunculopontine tegmental nucleus; Pr, prepositus nucleus; Gi, gigantocellular reticular nucleus; PL, paralemniscal nucleus; CBLL, granular layer of cerebellum.

와 같았고 단순침자극이 뒤가쪽 수도관주위 회색질 (dorsolateral periaqueductal gray)에서 가장 많은 염색성의 변화를 보였고 이 2 Hz가 paralemniscal nucleus에서 가장 많은 염색성의 변화를 보였다. 소뇌의 과립층(granular layer of cerebellum) 영역에서는 대뇌겉질의 결과와 같이 100 Hz에서 가장 많은 염색성의 증가를 보였고 대조군과 2 Hz 간의 유의성있는 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2).

IV. 고찰

電鍼療法은 1800年代와 1900年代 初 Louis Berlioz, Sarlandiere, Goulden 등에 의해 발표됨으로써 電鍼治療의 기초를 이루었다²³⁾. 그후 중국, 일본 및 독일 등에서 電鍼을 이용하였고, 中國에서는 電鍼研究가 1953년부터 시작되었다. 電鍼療法은 수술 후, 분만시, 급만성 통증에 疼痛緩和를 위해 應用되고 있으며 이외에도 鍼術麻醉 등에도 이용되고 있다. 電鍼療法이 麻痺와 疼痛疾患에 多樣하게 利用되고 있으나 作用機轉은 神經과 筋肉에 대한 電氣 刺戟의 결과로 근 위축이 지연되고, 근 섬유형이 변화되며 근육의 대사에 관여하는 효소 활성이 변화하고 모세혈관 분포가 증가하여 혈류량이 증가하는 기전으로 설명하여 왔다^{1,23)}. 이러한 解釋은 傳統의인 韓醫學의 理論에 의한 것으로 鍼療法의 效果가 刺戟이 該當臟器 및 經絡에 直接的인 效果를 나타낸다고 把握한 것으로 鍼作用의 機轉을 나타나는 現象에 대한 證據를 提示하는데 主眼點을 둔 것이다.

經絡에 관한 研究는 西洋醫學에서 많은 疾患이 腦에 의해 統制를 받는다고 알려지고 PET, functional MRI을 비롯한 映像技法을 이용하여 뇌 겉질의 변화를 확인함으로써 뇌의 統制 過程을 통

해서 效果를 發揮한다는 假說을 提示하기에 이르렀다^{4-7,24)}. 이러한 연구는 침요법의 효과를 나타내는 기전을 설명함에 있어 중간단계로 뇌의 역할을 규명하여 침요법이 뇌의 특정기능을 활성화시키고 이에 의해서 해당장기에 영향을 미쳐 효과를 나타내는 기전을 설명하는 것으로 평가할 수 있다.

鍼刺戟이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 신경전달 물질과 관련지어서도 진행되고 있다^{10,14,25)}. 손⁴⁾ 등은 鍼刺戟을 가한 실험군의 대뇌 활성도를 컴퓨터 영상분석기를 사용하여 동위원소 standard와 비교 분석한 결과 실험군 뇌세포의 여러 구역에서 활성이 증가된 것을 관찰하였고, 특히 진통효과에 있어서 鍼刺戟의 전달 통로가 된다고 추측하고 있는 arcuate nucleus와 median eminence 부위에서 유의한 optical density의 차이를 관찰하였다. 김²⁾ 등은 電鍼刺戟이 대뇌 피질의 신경전달물질에 미치는 영향에 대해 電鍼刺戟 후 NADPH-d 신경세포와 NPY 신경세포의 염색성을 관찰한 결과, NOS와 NPY가 電鍼刺戟 부위에 따라 각각 다른 신경세포의 변화를 보여, 신경전달물질에 따라서 電鍼刺戟에 의한 영향을 받는 기전이 다를 것이라는 결론을 지으면서 電鍼療法이 중추신경계의 수많은 peptideic system를 활성화시킨다는 가설을 제시하였다. 또한 김⁸⁾ 등은 耳鍼刺戟의 신경전달물질에 대한 영향을 연구, 특히 음식섭취와 관련된 인자인 cholestokinin (CCK)의 변화를 관찰하였는데 耳鍼刺戟 후 대뇌겉질 대부분의 영역에서 유의한 증가를 나타내어 CCK가 耳鍼刺戟에 의해 신경세포의 변화를 가져올 수 있으며, 신경전달물질이 鍼刺戟에 의해서 활성화될 수 있다는 가능성을 보여주었다.

NO는 작고 비교적 불안정한 두개의 원자로 이루어진 물질로 사람을 포함한 고등동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 생성된다. NO는 L-arginine이 NOS에 의해 L-citrulline으로 변환되는 과정에 의

해 생성된다²⁶⁻²⁸⁾.

현재까지 3개의 NOS 유전자가 발견되었는데, 쥐의 뇌에서 처음 확인된 Type I NOS는 neuronal NOS (nNOS)로 명명되었고, 대식세포에서 처음 확인된 Type II NOS는 immunologic NOS (iNOS)로 명명되었으며, Type III NOS는 endothelial NOS (eNOS)로 명명되었다. 또한 이들 효소들은 활성화의 기전에 따라서 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 구분된다^{9,17-18,27)}.

NO는 지용성의 무기질이므로 세포막을 자유롭게 통과하여 쉽게 세포주위로 확산될 수 있으며 인체 내 여러 정상 생리반응의 신호전달 물질로 작용한다²⁶⁾. NO는 다른 신호 전달 물질과는 달리 생체 내에 저장되지 않으며 특이한 운반체나 채널이 필요하지 않고 구조 또한 간단하며 지용성이고 전기적으로도 중성이기 때문에 주위세포로 쉽게 확산되어 작용할 수 있다.

NO의 작용은 산화 환원 상태에 따라서 달라지는데 iNOS에 의해 지속적으로 생성된 많은 양의 NO는 주위의 산소 유리 라디칼과 반응하여 nitrogen dioxide나 peroxyxynitrite (ONOO-)라는 강력한 산화력을 갖는 물질을 형성하여 세포막의 지질 성분을 과산화시키거나 세포내 단백질의 구조와 기능을 변화시켜서 세포손상을 유발한다²⁹⁾.

중추신경계에서 NO는 신경계에서 synaptic plasticity에 관여하거나 long-term potentiation이나 depression 등의 기억과 연관된 신경생리학적 현상에 관여하며 국소적인 뇌혈류량의 조절 및 주위의 synapse들로부터 neurotransmitter의 분비를 촉진하는 역할 등을 수행한다^{27,30)}. 신경계에 작용하는 nNOS는 특정 신경세포에 항상 존재하여 신경세포가 자극되어 세포내의 칼슘 이온이 증가하게 되면 효소가 활성화되어서 소량의 NO를 합성하며, 이렇게 합성된 NO는 주위 조직에 확산되어 신경전달

물질로의 역할을 수행하지만 뇌의 저산소증, 허혈증이나 뇌졸중 등의 질병상태에서 glutamate의 농도가 증가되면 세포내로 칼슘이온이 유입되어 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 유발하기도 한다^{18,27)}.

NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로는 NADPH-d 조직화학을 사용하는 데, 이 방법은 NOS가 NBT을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-d 활성화작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다²²⁾. 이 작용에는 꼭 NADPH-d가 필요하며, NOS는 NADPH-d를 전자 공여자로 필요로 한다. NADPH-d 활성화는 NOS 없이도 부신겉질과 콩팥에서 나타날 수 있지만, 대뇌겉질과 줄무늬체에 분포하는 NADPH-d 양성 신경세포는 NOS와 일치하는 것으로 알려졌다. NO를 만드는 효소인 NOS를 함유한 신경세포는 NADPH-d 활성화도와 비례한다는 보고^{9,31)}가 있어서 본 실험에서는 NADPH-d의 염색성을 영상분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다.

본 연구결과 관찰한 대뇌겉질의 일차운동겉질(primary motor cortex), 일차몸통감각겉질(primary somatosensory cortex), 시각겉질(visual cortex), 청각겉질(auditory cortex), 띠겉질(cingulate cortex), 후각뇌주위겉질(perirhinal cortex), 뇌섬겉질(insula cortex)의 전 영역에서 NADPH-d의 염색성은 침자극만 시행한 대조군 및 2 Hz에 비해 100 Hz로 자극을 준 실험군에서 유의성있는 증가($p < 0.05$)를 보였다. 그러나, 대조군과 2 Hz군간에는 통계적으로 유의성있는 차이를 보이는 대뇌겉질 영역은 관찰되지 않았다. 이러한 변화는 대뇌겉질 중 동종겉질과 이종겉질에 속하는 모든 영역에서 동일하였다.

뇌줄기부에서의 NADPH-d의 염색성의 변화는 대뇌겉질과는 달랐다. 즉 각 부위에 따라서 NADPH-d의 염색성의 결과가 달랐는데 관찰부위

중 위둔덕층에서만 대뇌겉질의 관찰 결과와 같이 100 Hz의 전침자극군이 염색성이 가장 높았고 2 Hz와 단순침 간의 유의성있는 차이는 없었다. 단순침자극군이 뒤가쪽 수도관주위회색질에서 염색성의 증가가 가장 많았으며 이 부위에서 2 Hz의 자극군과 100 Hz 자극군 간의 유의성있는 차이는 없었다. 2 Hz가 paralemniscal nucleus 영역에서 가장 많은 염색성의 증가를 보였으며 이 부위에서 단순침 자극군과 100 Hz 자극군 간의 유의성있는 차이는 없었다.

관찰한 부위 중 다리다리뇌뒤관 그물핵(pedunculopontine tegmental nucleus)에서는 단순침 자극군과 2 Hz의 자극군이, prepositus nucleus에서는 단순침군과 100 Hz군이 염색성의 증가가 있었으며 거대세포 중간 그물핵(gigantocellular nucleus)에서는 세 군 간의 염색성의 차이는 없었다. 소뇌의 과립층에서는 100 Hz 군의 염색성이 가장 증가했으며 대조군과 2 Hz군 간의 염색성의 차이는 없었다. 또한 뇌줄기의 염색성은 대뇌겉질보다는 전반적으로 염색성이 떨어지는 것도 관찰되었다.

Morris²⁸⁾ 등에 의하면 NADPH-d의 효소활성은 NOS의 효소활성을 나타내는 지표이므로 본 연구의 증가된 NADPH-d 염색성은 더 많은 NO의 생성을 반영한다. 실험 결과와 같이 대뇌겉질 영역에서 100 Hz군에서의 NADPH-d 염색성 증가는 신경세포에서 nNOS의 효소활성이 증가하는 것을 나타낸다. 따라서 대뇌겉질 영역에 대한 전침자극은 주로 NOS의 효소활성에 영향을 주고 또 이러한 변화는 전침자극 중 특정 빈도수의 자극이 더 유의성있는 변화를 초래함을 알 수 있었다.

뇌줄기 부위에서 관찰한 각 부위에 따른 자극군 간의 차이는 전침자극에 의해 영향을 받는 것이 뇌줄기부의 영역과 자극의 방식에 따라서 각각 NADPH-d-positive neuron의 활성도가 다른 것

을 의미하고 이는 대뇌겉질 영역에서의 변화와는 다른 부위적 변화를 보이고 있는 것으로 사료된다. 특히 자극방법에 따른 뇌의 활성화 영역의 차이는 향후 뇌의 각 부위의 기능이 규명되고 NOS역할이 확인된다면 그 부위에 특이적인 침자극을 사용하는 것도 가능하리라 사료된다.

V. 결론

전침자극이 SHR 흰쥐의 뇌의 NO에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 단순침, 2 Hz 및 100 Hz의 서로 다른 자극을 가한 후 NADPH-d 조직화학을 통해 대뇌겉질과 뇌줄기부 및 소뇌 영역의 염색성을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대뇌겉질 중 일차운동겉질, 일차몸통감각겉질, 시각겉질, 청각겉질, 띠겉질, 후각뇌주위겉질, 뇌섬겉질 전 영역에서 NADPH-d의 염색성은 100 Hz군이 단순침자극군과 2 Hz의 자극군보다 유의한 증가를 나타내었다.

2. 뇌줄기 영역의 위둔덕층, 뒤가쪽 수도관주위회색질, 다리다리뇌뒤관 그물핵, prepositus nucleus, 거대세포 중간 그물핵, paralemniscal nucleus 영역 중 위둔덕층에서 NADPH-d 염색성은 100 Hz 전침자극군이 유의하게 증가하였고 뒤가쪽 수도관주위 회색질 영역에서는 단순침자극군이, paralemniscal nucleus 영역에서 2 Hz 자극이 유의하게 염색성을 증가시켰다.

3. 소뇌 영역에서 NADPH-d 염색성은 100 Hz군이 단순침자극군과 2 Hz 군 보다 유의한 증가를 나타내었다.

4. 뇌줄기와 소뇌영역의 염색성은 대뇌겉질의 염색성보다는 전반적으로 감소되어있는 결과로 나타났다.

VI. 참고문헌

1. 전국한의과대학교 침구 경혈학교실. 침구학 (下). 서울:집문당. 1988:382-3.
2. 김창환, 김용석, 허영범, 유진화. 電鍼刺戟이 SHR 흰쥐 大腦의 NADPH-diaphorase와 Neuropeptide Y 神經細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999;16(4):283-91.
3. Lundeberg T. Does acupuncture work?. IASP. 1996;4(3):1-4.
4. 손낙원, 원란, 손영주, 김용석, 박영배. 鍼刺戟이 中樞神經系에 미치는 影響에 대한 映像化 研究. 全國韓醫學學術大會. 2000;75-6.
5. 최민섭, 고희균, 김창환. 경혈 및 경락의 객관화에 대한 소고. 대한침구학회지. 1991;8(1):71-83.
6. Andersson, S. and Lunderberg, T. Acupuncture—from empiricism to science: functional background to acupuncture effects in pain and disease. Med. 1996;45:271-81.
7. Cho, Z.H., Chung, S.C., Jones, J.P., Park, J.B., Park, H.J., Lee, H.J., Wong, E.K. and Min, B.I. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:2670-3.
8. 김이화, 김연정, 임백빈, 장미현, 정주호, 김창주. 耳鍼이 絶食시킨 흰쥐의 大腦皮質에서 CCK 活性變化에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(3):168-75.
9. Bredt, D.S. and Snyder, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron. 1992;8:3-11.
10. Bucinskaite, V., Lunderberg, T., Stenfors, C., Ekblom, A., Dahlin, L. and Theodorsson, E.. Effects of electroacupuncture and physical exercise on regional concentration of neuropeptide in rat brain. Brain Res. 1994;666: 128-32.
11. Debreceni, L.. Chemical releases associated with acupuncture and electric stimulation. Cri. Per. Phys. Rehabil. Med. 1993;5:247-75.
12. Monda M., Viggiano A., Sullo A., De Luca V.. Nitric Oxide reduces hypophagia induced by threonine free diet in the rat. Brain Res. 1998;808 (2):129-33.
13. Morley J.E., Michel B.. Nitric Oxide Synthase levels in obese Zucker rats. Neurosci Lett. 1996;209:137-9.
14. Yang R., Huang Z.N., Cheng J.S.. Anticonvulsion effect of acupuncture might be related to the decrease of neuronal and inducible nitric oxide synthases. Acupunct Electrother Res. 2000;25(3-4):137-43.
15. Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Ann Rev Biochem. 1994;63:175-95.
16. Feldman P.L., Griffith O.W., Sheuhr D.J. The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News. 1993:26-38.

17. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;89:6348-52.
18. Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Trosco T., Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256:225-8.
19. Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M. and Snyder, S.H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 1991;7:615-24.
20. Brobeck Jr., Tepperman J., Long C.N.H.: Experimental hypothalamic hyperphagia in albino rat. *Yale J Biol Med*. 1943; 15:831-53.
21. 고희균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈위. *대한침구학회지*. 1999;16(3):115-22.
22. Vincent, S.R. and Kimura, H.: Histohemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46:755-84.
23. 김재규 외. 전침치료의 이론과 임상. 서울. 서원당. 1993;14-7.
24. Andersson S. The functional background in acupuncture effects. *Scand J Rehab Med. Suppl* 1993;29:31-60.
25. Bucinskaite, V., Theodorsson, E., Crumpton, K., Stenfors, C., Ekblom A., and Lunderberg, T. Effects of repeated sensory stimulation (electroacupuncture) and physical exercise (running) on open field behavior and concentrations of neuropeptides in the hippocampus in WKY and SHR rats. *Eur. J. Neurosci*. 1996;8: 382-7.
26. Giatgen A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -Cell. *New Physiol Sci*. 1999;14:49-53.
27. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric Oxide: Physiology, Pathology and Pharmacology. *Rev*. 1991;43:109-42.
28. Morris, B.J., Simpson, C.S., Mundell, S., Maceachern, K., Johnston, H.M. and Nolan, A.M. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology*. 1997 ;36:1589-99.
29. Koh J.Y., Choi D.W. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins, Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci*. 1993;8:2153-63.
30. Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H.: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:7797-801.
31. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:2811-4.