

원저

전침자극이 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase와 NPY에 미치는 영향

조성규 · 김창환 · 김용석

경희대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effects of Electroacupuncture by Different Frequencies and Treatment-times on NADPH-diaphorase and Neuropeptide Y in Sprague-Dawley Rat Cerebral Cortex

Seong-Gyu, Cho · Chang-Whan, Kim · Yong-Suk, Kim

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

The present study was designed to investigate the effects of various electroacupuncture(EA) stimulation on NADPH-diaphorase and Neuropeptide Y(NPY) in the cerebral cortex of Sprague-Dawley Rats.

We evaluated the changes of NADPH-d-positive neurons using a histochemical method and the changes of NPY-positive neurons using a double labeling immunohistochemical method. The staining intensities of NADPH-d-positive neuron and NPY-positive neurons were assessed in a quantitative fashion using a microdensitometrical method based on optical density by means of an image analyzer.

As to frequency, the optical density of NADPH-d-positive neurons of 2Hz-1 time EA group was significantly higher than that of 100Hz-1 time EA group in M1, Cg. and that of 100Hz-3 times EA group was significantly higher than that of 2Hz-3 times EA group in Vi, Au, Cg and Ins. As to treatment-time, the optical density of NADPH-d-positive neurons of 2Hz-1 time EA group was higher

- 접수 : 2002년 5월 9일 · 수정 : 5월 12일 · 채택 : 2002년 5월 18일
- 교신저자 : 김용석, 서울시 강남구 대치2동 994-5 경희대학교 강남한방병원 뇌신경마비센터
(Tel. 02-3457-9013) E-mail : ackys@hosanna.net

than 2Hz-3 times EA group in Vi, Au, Cg and Ins. And in Vi 100Hz-1 time EA group and in M1 100Hz-3 times EA group was more efficient.

As to frequency, the optical density of NPY-positive neurons of 2Hz-1 time was significantly higher in Vi, and that of 100Hz-1 EA group was higher in M1. And that of 2Hz-3 times EA group was higher than 100Hz-3 times EA group in Cg. As to treatment-time, the optical density of NPY-positive neurons of 2Hz-1 time EA group was significantly higher than 2Hz-3 times EA in S1, Vi, Au. And that of 100Hz-1 time EA group was significantly higher than that of 100Hz-3 time EA in Cg.

The present results demonstrated that EA changes the activity in NO and NPY system in the cerebral cortex of SHR and EA stimulation, like frequency and treatment-time, is of importance for this effect.

Key words : Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate-diaphorase, Nitric Oxide, Neuropeptide Y, Cerebral cortex, Electroacupuncture, Frequency

I. 서론

침요법의 효과는 정확한 경혈의 선택(경혈의 특이성)과 선택된 경혈에 적절한 자극(전기적인 자극이나 기계적인 자극; 자극의 특이성)에 의존된다¹⁾. 침요법은 한의학에서 직접 질병이 있는 장기나 연락과 조화의 체내 전달 통로인 경락을 통해 작용된다고 생각하고 있다. 그러나 서양의학에서는 많은 질환이 뇌에 의해서 통제를 받고 영향을 받는다고 알려져 있다. 최근에는 양전자방출단층촬영(PET), fMRI나 [¹⁴C]2-DG 자가방사능기록법 등의 영상기법을 이용하여 침자극에 의한 뇌 혈류변화나 대뇌피질 활성변화가 확인되고 있는데^{2, 3)}, 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.

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)라는 효소에 의해 생성되며 중추신경계와 말초신경계에서 신경전달물질로 작용하며 대뇌혈류순환에 관여한다^{4, 5)}. 신경계에서 NO의 분비는 신경전달물질의 분비를 증가시킬뿐만 아니라 synaptic plasticity, 유전자 발현의 조절, 신경보호와 신경독소효과 등을 포함한 다양한 작용을 한다고 알려져 있다^{6, 7)}.

NOS를 함유한 신경세포에서는 NADPH-diaphorase를 조직화학적으로 관찰할 수 있으며 NADPH-diaphorase와 공존하는 신경펩타이드 중 neuropeptide Y(NPY)는 혈관수축작용을 하며, 증가된 음식섭취, 황체호르몬 조정, 심호흡 인자의 조절, 일주기 리듬의 변화와 인지기능의 강화를 포함한 생리적인 반응과 비만, 우울증 및 간질 등의 병리적 상태와도 관련을 가지고 있는 것으로 알려졌다^{8, 9, 10)}.

김 등¹¹⁾은 전침자극에 따른 중추신경계의 NADPH-diaphorase와 NPY 신경세포의 염색성 변화를 관찰한 결과, 경혈과 자극방법에 따라 각각 다른 신경세포의 변화를 나타내므로 전침요법이 중추

신경계의 수많은 peptidegic system을 활성화시킨다는 가설을 제시하였다.

전침요법과 중추신경계의 신경세포의 변화를 관찰한 연구들은 병적 모델을 대상으로 경혈의 특이성이나 빈도수의 차이같은 자극의 특이성에 따른 변화를 보고하였으나 이러한 변화가 정상 모델에서도 동일하게 나타나는가에 대한 연구는 부족하였다.

이에 저자는 전침요법과 뇌와의 상관관계를 알아보고자 정상 흰쥐를 대상으로 2Hz와 100Hz라는 빈도수 변화 그리고 1회와 3회의 자극횟수 변화에 따른 대뇌피질의 변화를 NADPH-diaphorase는 조직화학방법으로, NPY는 면역조직화학방법으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 실험동물

체중 325g±25g인 9주령±1주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 2주간 실험환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 실험재료

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

2. 실험방법

1) 실험군 설정

전침의 빈도수에 대한 차이와 자극횟수에 따른 차이를 관찰하기 위하여 실험군은 2Hz 전침자극을 1회와 3회한 군과 100Hz 전침자극을 1회와 3회한 군으로 각각 설정하였다. 대조군은 어떠한 자극도 가하지 않고 다른 군과 같이 스트레스만을 가한 군

으로 하였다.

2) 혈위의 선정

흰쥐의 체표 상에 人體에 相應하는 部位의 足三里(ST36)를 고의 방법¹²⁾에 의거하여 取穴하였다.

3) 전침자극

① 전침자극은 연속파, 직각파, 0.2ms duration으로 10분간 시행하였고 자극의 강도는 2Hz군은 근육수축이 현저히 보일 정도의 고강도 자극(1mA)을 하였고 100Hz군은 약간의 근육수축이 나타날 정도의 저강도 자극(0.2mA)을 하였다.

② 3회 전침자극군은 격일로 일정한 시간에 자극하였고, zoletil 50(1vial: zolazepam 125mg tiletamin 125mg, Virbac, France) 2cc를 근육주사로 약하게 마취하였다.

3. 조직처리

실험동물은 pentobarbital sodium(60mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 0.05 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde용액(4℃)을 10분간 관류시켰다. 이때 관류속도는 50~60 ml/min이 되도록 하였다. 관류고정 후 각각 대뇌피질, 소뇌, 뇌간을 적출하여 4~6mm 두께로 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 40µm 두께의 연속횡단절편을 제작하였고, 자른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하여 염색을 시행하였다.

4. NADPH-d 조직화학법

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°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직을 PBS로 씻어서 더 이상의 발색을 정지시켰다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 poly-mount로 봉입하였다¹³⁾.

5. NPY의 면역조직화학법

조직절편은 내재성페록시다제(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H₂O₂에서 15분간 반응시킨 다음 5분씩 3회 PBS로 세척한 후 rabbit anti-NPY(Incstar)를 1:4,000으로 희석한 항체를 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 및 0.3% Triton X-100이 들어있는 1차 항체용액에 넣고 4°C에서 overnight하였다. 1차 항체용액에서의 반응이 끝나면 조직을 PBS로 5분씩 3번 씻은 후, 2차 항체용액(Vectastain-Elite kit의 biotinylated anti-IgG를 1:200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간동안 실온에서 반응시켰다.

2차 항체용액에서 반응이 끝난 후 PBS로 5분씩 3차례 씻은 후 avidin-biotin-peroxidase complex 용액(Vectastain-Elite kit의 A용액 1:100, B용액 1:100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간동안 실온에 반응시켰다. 발색제로는 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma)을 0.05M Tris 완충액에 0.02%, H₂O₂는 0.003%로 사용하였다. 발색반응은 상온에서 3~5분간 시켰으며, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 his-tomount로 봉입하였다.

6. 조직관찰 및 영상분석

대뇌피질과 뇌간 및 소뇌 부위에 분포하는 NADPH-d 신경세포와 NPY 신경세포의 위치 및 형태를 광학현미경하에서 관찰하였으며 염색강도는 영상분석기(Multiscan, USA)의 densitometry를 이용하여 gray scale로 측정하였다¹⁴⁾. 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 영역 이상을 CCD camera를 통해 200×의 광학현미경에서 온 영상을 받아 영상분석기로 측정하였다. 각 부위에서 세부구조의 위치와 명칭은 Paxinos와 Watson의 부도¹⁵⁾를 참고하였다.

7. 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver 8.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준편차(Mean±standard deviation)로 나타내었고, 유의성은 p<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Duncan test 검정을 실시하였다.

III. 실험결과

1. NADPH-d 염색강도의 변화

1) 빈도수에 따른 변화

1회 전침자극군에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군 모두 대뇌피질 영역의 NADPH-d 염색성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 운동피질

(motor cortex1, M1)과 띠피질(cingulate cortex, Cg)에서는 2Hz 전침자극군의 NADPH-d 염색성이 100Hz 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었다.

3회 전침자극군에서는 청각피질(auditory cortex, Au)과 Cg의 NADPH-d 염색성이 2Hz 전침자극군에서만 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았고 그외 모든 대뇌피질 영역에서는 대조군에 비하여 각각 유의한 증가를 나타내었다. 100Hz 전침자극군이 2Hz전침자극군보다 전 영역에서 증가된 염색성을 나타내었고, 특히 시각피질(visual cortex, Vi), Au, Cg, 뇌섬피질(Insular, Ins)에서는 유의한 차이를 나타내었다(Table 1).

2) 치료횟수에 따른 변화

2Hz 전침자극군에서는 Au, Cg의 NADPH-d 염색성이 3회 전침자극군에서만 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았을 뿐 그외 모든 대뇌피질 영역에서는 1회와 3회 전침자극군 모두 유의한 증가를 나타내었다. 감각피질(sensory cortex1, S1)을 제외한 다른 모든 영역에서 3회 전침자극군이 1회 전침자극군에 비하여 NADPH-d 염색성의 유의한 감소를 나타내었다.

100Hz 전침자극군에서는 1회와 3회 전침자극군 모두 대뇌피질 영역의 NADPH-d 염색성이 대조군

에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. M1에서는 3회 전침자극군이 1회자극군보다, Vi에서는 1회 전침자극군이 3회 전침자극군보다 유의한 NADPH-d 염색성의 증가를 나타내었다(Table 1).

2. NPY 염색강도의 변화

1) 빈도수에 따른 변화

1회 전침자극군의 M1영역에서는 100Hz 전침자극군, S1과 Au영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군, Vi영역에서는 2Hz 전침자극군에서 NPY의 염색성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, Ins영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. Vi와 Au영역에서는 2Hz 전침자극군이 100Hz 전침군보다, M1영역에서는 100Hz 전침자극군이 2Hz군보다 유의한 증가를 나타내었다.

3회 전침자극군의 S1과 Au영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군에서 NPY의 염색성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, Cg영역에서는 100Hz 전침자극군, Ins영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. Cg영역에서는 2Hz 전침자극군이 100Hz 전침군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 (Table 2).

Table 1. Optical densities of NADPH-d-positive neurons in the cerebral cortex of SD

	control	2Hz-1	2Hz-3	100Hz-1	100Hz-3
M1	94.4±16.9 ^a	151.0±17.7 ^c	143.7±20.0 ^{bc}	134.9±27.9 ^b	154.9±15.9 ^c
S1	109.8±21.3 ^a	150.6±13.6 ^b	153.0±15.3 ^b	151.5±16.5 ^b	156.3±13.9 ^b
Vi	122.0±10.3 ^a	163.3±19.6 ^d	134.0±19.3 ^b	165.7±14.5 ^d	147.2±15.9 ^c
Au	111.0±9.8 ^a	142.4±18.1 ^c	111.5±15.4 ^a	134.8±18.9 ^{bc}	128.1±19.1 ^b
Cg	115.1±15.0 ^a	149.3±21.0 ^c	115.7±21.9 ^a	132.6±25.7 ^b	131.3±19.4 ^b
Ins	144.7±16.6 ^a	176.9±19.4 ^d	155.2±18.9 ^b	171.7±11.1 ^{cd}	166.1±9.2 ^c

1) Data are mean ± S.D of the average optical density on ten cerebral cortex sections. 2) The means with same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, $\alpha=0.05$). M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; Vi, visual cortex; Au, auditory cortex; Cg, cingulate cortex; Ins, insular cortex

2) 치료횟수에 따른 변화

2Hz 전침자극군의 S1과 Au영역에서는 1회와 3회 전침자극군, Vi영역에서는 1회자극군에서 NPY의 염색성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, Ins영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. S1, Vi와 Au영역에서는 1회 전침자극군이 3회 자극군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

100Hz 전침자극군의 M1영역에서는 1회 전침자극군, S1과 Au영역에서는 1회와 3회 전침자극군에서 NPY의 염색성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, Cg 영역에서는 3회 전침자극군, Ins영역에서는 2Hz와 100Hz 전침자극군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. Cg영역에서는 3회 전침자극군이 1회 자극군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Table 2).

IV. 고찰

경락과 신경계에 대한 연구는 경락의 분포와 경혈의 치료효과에 근거하여 주위 신경계통과의 관계를 탐구한 결과 경락 경혈의 작용이 주위 신경과

유관한 것으로 보여지며, 형태학적 관찰에서도 경락 경혈과 주위 신경과의 관계가 가장 밀접하다고 하였다¹⁶⁾.

현대 생리학적인 인식에 의하면 인체 내의 각종 생리기능의 상호 연계, 상호제약으로 인체가 항상성을 가진 통일체를 이루는 것은 신경계와 내분비계의 조절로 보고 있고, 그 고위중추에 뇌가 존재한다고 하였다. 한의학에서는 이러한 연락과 조화 및 장부간의 상호억제와 상호협조가 經絡이라고 하는 체내 전달 통로를 통하여 이루어진다고 인식하였다.

NO는 작고 비교적 불안정한 두개의 원자로 이루어진 물질로 사람을 포함한 고등동물뿐만 아니라 하등동물에서도 생성된다. NO는 L-arginine이 NOS에 의해 L-citrulline으로 변화되는 과정에 의해 생성된다. NO는 다른 신호전달 물질과는 달리 생체내에 저장되지 않으며 특이한 운반체나 채널이 필요하지 않고 구조 또한 간단하며 지용성이고 전기적으로도 중성이기 때문에 주위세포로 쉽게 확산되어 작용할 수 있다^{4, 17)}.

NOS 효소는 3개의 주요 isoforms으로 구성되었다. Ca²⁺ 의존성의 neuronal NOS(nNOS, type I)은 중추와 말초 신경계에 주로 분포하는데 골격근, 치밀반(macula densa), 태반 등의 다른 조직에도 분포한다. 뇌에서는 glutamate 수용체인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) subtype을 통해

Table 2. Optical densities of NPY-positive neurons in the cerebral cortex of SD

	control	2Hz-1	2Hz-3	100Hz-1	100Hz-3
M1	129.8±15.9 ^a	132.5±19.3 ^a	129.0±17.8 ^a	142.9±12.4 ^b	137.4±11.4 ^{ab}
S1	113.4±8.8 ^a	133.3±11.3 ^c	121.6±17.0 ^b	130.0±14.3 ^c	127.3±9.6 ^{bc}
Vi	120.0±11.1 ^a	135.5±17.2 ^b	120.3±15.4 ^a	118.9±11.1 ^a	125.1±14.4 ^a
Au	114.7±9.2 ^a	133.8±10.2 ^c	125.0±9.5 ^b	122.0±13.9 ^b	122.7±11.0 ^b
Cg	134.6±13.6 ^b	139.0±15.0 ^b	133.1±14.2 ^b	132.3±12.5 ^b	122.8±11.9 ^a
Ins	142.2±13.6 ^b	126.2±14.5 ^a	126.2±15.7 ^a	131.8±11.8 ^a	126.3±12.4 ^a

1) Data are mean ± S.D of optical density. 2) The means with same letter is not significantly different(Duncan's multiple range test, $\alpha=0.05$). M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; Vi, visual cortex; Au, auditory cortex; Cg, cingulate cortex; Ins, insular cortex

Ca²⁺이 유입되고, 이로 인해 nNOS가 활성화되는 흥분성 신경전달의 과정을 통해 NO가 형성된다.

Hippocampus에서의 NO는 학습과 기억형성에 관련되어 있고, knockout 마우스를 통해 nNOS가 발현되지 않은 경우 성행위와 행동유형이 과격해진다고 알려졌으며 말초신경계에서도 신경세포의 신경전달물질임이 보고되었다¹⁸⁾. NO의 분비는 신경전달물질의 분비를 증가시킬 뿐 아니라 synaptic plasticity, 유전자 발현의 조절, 신경보호 및 신경독소효과를 포함한 다양한 반응과도 관련되어 있다고 보고되었다^{6, 7)}.

Ca²⁺ 의존성인 endothelial NOS(eNOS, type III)는 주로 혈관내피세포에서 발견되고, 혈관내피세포에서 eNOS는 hormone 혹은 혈류나 전단력 같은 물리적 자극에 의해 활성화된다. 내피세포에서 형성된 NO는 혈관을 확장하고 혈소판 부착이나 응집을 억제한다. inducible NOS(iNOS, type II)는 염증상태하에서 대식세포, 평활근, 심근세포, 미세아교세포를 포함한 많은 종류의 세포에서 생성된다. iNOS는 Ca²⁺ 비의존성이기 때문에 활동성이 지속되므로 박테리아, 바이러스 및 다른 pathogen을 죽이는데 필요한 NO의 충분한 양을 생산하는 high-output계로서 작용할 수 있다. 염증상태에서의 iNOS의 과도한 분비는 조직 손상과 심한 저혈압을 유발할 수 있다¹⁹⁾.

NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로는 NADPH-d 조직화학을 사용하는 데, 이 방법은 NOS가 NBT를 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-d 활성화작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다. 이 작용에는 꼭 NADPH-d가 필요하며, NOS는 NADPH-d를 전자 공여자로 필요로 한다. NADPH-d 활성화는 NOS 없이도 부신피질과 신장에서 나타날 수 있지만, 대뇌피질과 줄무늬체에 분포하는 NADPH-d 양성 신경세포는 NOS와 일치하는 것으로 알려졌다. NO를 만드는 효소인 NOS를 함유한 신경세포는

NADPH-d 활성화도와 비례한다는 보고가 있어서 본 실험에서는 NADPH-d의 염색성을 영상분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다.

NPY는 기본 생리 작용의 조절에 중요한 역할을 한다. 그래서 NPY의 뇌실내 주입은 증가된 음식섭취, 황체호르몬과 corticotropin-releasing factor 분비의 조절, 심호흡 인자의 조절, 일주기 리듬(circadian rhythms)의 변화와 학습과 기억에 관련된 인지기능의 강화를 포함한 생리적인 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 NPY는 비만, 우울증·신경불안증 관련 질환 그리고 간질·발작 등의 병리적 상태와도 직접적인 관련을 가지고 있는 것으로 알려졌다^{8, 9)}.

NPY와 유사체의 다양한 생리적 기능은 Y1, Y2, Y4, Y5와 y6의 subtype 수용체의 활성화에 의해서 중재되고 NPY-like 면역반응은 뇌에 전반적으로 존재하나 hypothalamus에, 일정부분은 hippocampus에 집중되어있다^{10, 20)}.

인체의 많은 경혈들은 각각 特異적이고 相補적인 穴性을 가지고 있어 인체에 대한 다양한 치료적 효과를 나타낸다. 足三里(ST36)는 가장 많이 연구된 경혈중에 하나로 調脾胃, 扶正培元, 祛邪防病하는 등의 혈성을 가지고 있으며²¹⁾, 위장기능, 호흡기능, 혈액순환, 내분비계통, 뇌하수체-부신 기능, 면역기능, 미량원소 대한 조절작용을 가지고 있다고 하였다²²⁾.

족삼리는 afferent fiber를 분포 특성상 비경혈보다 더 수초화되고, 더 크고, 더 많은 Aβ섬유를 가지고 있으며²³⁾, 손 등²⁴⁾은 족삼리 전침자극시 특이적으로 뇌대사활성을 보인 곳은 serotonergic neuron이 풍부한 내측솔기핵(median raphe nucleus), 강력한 진통효과를 가진 수도관주위백질(periaqueductal gray), 중재소뇌핵(interposed cerebellar nucleus), 외측상올리브핵(lateral superior olive) 및 배측와우신경핵(dorsal cochlear nucleus)이라고 하였다.

전침으로 인한 진통효과는 naloxone으로 완전히 차단될 수 있으나 고빈도 전침에 의한 진통효과는 완전히 차단되지 않아 빈도수에 따라 진통에 관여하는 기전이 다르다는 보고²⁵⁾ 이후, 전침의 빈도수가 치료효과를 결정하는 중요한 인자가 될 수 있으며 고빈도와 저빈도 전침은 서로 구별되는 작용기전을 가지고 있을 것으로 사료되어 이에 대한 연구가 시도되었다. 특히 opioid peptide를 필두로 한 진통기전에 대한 연구가 활발하였다. Han, Wang 등^{26, 27)}은 빈도수 변화에 따른 전침의 진통효과에 대한 연구를 통해 저빈도 전침자극은 중추신경계에서 naloxone에 의하여 억제될 수 있는 δ 와 μ 수용체에 반응하는 endomorphins, enkephalin과 β -endorphin을 분비하고, 고빈도 전침자극은 척수에서 κ 수용체에 반응하는 dynorphin을 분비한다고 하였다. Guo 등²⁸⁾은 전침자극후 preproenkephalin (PPE), preprodynorphin (PPD) 및 proopiomelanocortin (POMC)의 opioid peptide를 coding하는 mRNA 발현을 관찰하여 PPE는 2Hz와 100Hz 전침자극군 모두에서 상승하였으나 2Hz 전침자극군이 더 효과적이었고, PPD는 100Hz 전침자극군에서만 현저히 증가하였고 POMC는 전침자극에 반응하지 않았다고 하였다.

Lee 등²⁹⁾은 4Hz와 100Hz 전침자극군이 모두 유해자극으로 유발된 척수 dorsal horn에서의 c-fos 발현을 유의하게 억제하였는데, 4Hz 전침군에서의 억제기능은 naloxone으로 차단된다고 하였다. Guo³⁰⁾는 2Hz와 100Hz 전침자극이 뇌에서 현저히 구분되는 fos의 발현양상을 가져 서로 다른 신경학적 경로를 가지다고 하였고, 또한 전침자극으로 인한 fos와 jun 단백질은 PPE보다는 PPD의 유전자 전사(transcription)와 관련이 있다고 하였다.

Cheng³¹⁾과 Kwon 등³²⁾은 고빈도 전침의 진통기전은 Dorsal Raphe로부터의 serotonin이 중요한 역할을 한다고 하였다. Shen 등³³⁾은 spinal cord에서의 substance P를 관찰하여 저빈도 전침

자극에서는 감소, 중빈도(15Hz)·고빈도(100Hz) 전침에서는 증가를 나타내었으며 저빈도 전침을 포함한 모든 substance P의 변화는 naloxone에 의해 억제되었다고 보고하였다.

Tian 등³⁴⁾은 2Hz 전침자극은 척수에서 somatostatin의 분비를 39% 증가시켰으나 calcitonin gene-related peptide(CGRP)는 47% 감소시켰다. 반대로 15Hz 전침에서는 somatostatin은 37%감소시키고, CGRP는 92% 증가시켰고, 100Hz 전침에서는 CGRP에 대한 반응없이 somatostatin만 감소시켰다고 보고하였다.

Lin³⁵⁾은 저빈도 전침자극에 의해서 혈압과 신장 교감신경 활성 증가에 관련된 율동적 배뇨수축(rhythmic micturition contraction)의 주기연장파 배뇨량 증가가 유발되었는데, 저빈도 전침에서는 tonic effect가 고빈도 전침에서는 phasic effect가 유발되어 빈도수에 따라 유발된 승압반응이 다르므로 서로 다른 교감신경계 활성기전을 가진 것으로 보고하였다. 또한 Hsieh³⁶⁾는 건강한 사람에 대한 족삼리 전침자극이 2Hz와 100Hz 모두 맥박과 피부온도를 감소시켰는데 2Hz 전침자극군이 100Hz 전침군보다 맥박감소에 대한 지속적인 효과를 가진다고 보고하였다.

전침에 의한 NADPH-d와 NPY에 대한 기존연구에서는 Bucinskaite 등³⁷⁾은 1회 치료에서와는 달리 지속된 전침치료에서는 쥐의 hippocampus에서는 neuropeptide Y, neurokinin A 및 substance-P를, 후두엽에서는 neuropeptide Y를 증가시켰으나 단순침과 운동요법에서는 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. 김^{11, 38)}은 족삼리와 신수의 10회 전침군이 고혈압 흰쥐의 대부분의 대뇌피질과 뇌간에서 임의혈군과 정상군에 비해 NADPH-d의 염색성을 유의하게 하강시켰고, NPY 염색성은 Cg, M2에서만 족삼리 전침군이 임의혈군에 비해 하강하였다고 보고하였다. 김³⁹⁾은 고혈압 흰쥐에 대한 10회 전침자극에서 NADPH-d의 염색성은

100Hz군이 단순침자극군과 2Hz의 자극군보다 유의한 증가를 나타내었다고 보고하였다.

본 실험에서 NADPH-d의 염색성은 전침자극군이 대조군에 비해서 유의하게 상승하였고, 전침자극군 중에서는 2Hz-1회 자극군이 측정된 대뇌피질 모든 영역에서 다른 전침군에 비해 유의하게 증가되었는데 이 결과는 SHR에서 10회 족삼리 전침자극군의 NADPH-d 염색성이 정상군에 비해 감소했다는 연구와는 상반된 결과이다. 이 결과는 고혈압 모델과 정상 모델이라는 대상의 차이점과 치료횟수의 차이점이 두 연구간에 존재하는데, 질병 모델과 정상 모델에서의 침에 대한 반응의 차이 즉 침의 조절능력 작용이 아닌가 사료된다.

자극횟수에 따른 빈도수 비교에서 1회 전침자극군에서는 2Hz 전침자극군의 NADPH-d 염색성이 100Hz 전침군에 비해 유의하게 증가하였는데 3회 전침자극에서는 100Hz 전침군이 2Hz에 비해 유의하게 증가하여, NADPH-d의 염색성은 1회 전침에서는 2Hz가 더 유의한 증가를 나타내나, 장기적이고 지속적인 자극에서는 2Hz 자극보다 100Hz 자극이 더 유의한 NADPH-d의 상승을 나타내는 것으로 보이므로 이 결과는 김³³⁾의 보고와도 일치한다. 이 결과는 지속적인 전침자극에서 NADPH-d의 염색성이 1회 전침자극보다 감소한 것은 정상 생체에 있어 장기적 자극이 지속적 NADPH-d의 상승을 초래할 경우 NO 과잉으로 인한 독소효과를 유발할 수 있으므로 일종의 항상성 유지 기능이 아닌가 사료된다.

전침자극군의 NPY 염색성은 대조군에 비해 M1, S1, Vi, Au에서는 차이가 없거나 유의하게 증가하였고, Cg, Ins에서는 차이가 없거나 감소한 것으로 미루어 전침자극에 의한 NPY 발현에는 부위별 특이성이 존재하는 것으로 사료된다.

항후 침자극과 중추신경계의 부위에 따른 NO와 NPY 및 다른 neuropeptide와의 상관관계를 지속적으로 심도있게 연구한다면 난치성 뇌질환에 침요

법을 활용할 수 있는 기초 이론을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

빈도수와 자극횟수에 따른 전침자극이 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-d와 NPY 신경세포의 변화에 미치는 영향을 알아보고자 NADPH-d에 대한 조직화학법과 NPY에 대한 면역조직화학법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 빈도수에 따른 NADPH-d 염색강도의 변화를 관찰한 결과 2Hz-1회 전침자극군이 전침자극군이 M1과 Cg영역에서 100Hz-1회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었고, 100Hz-3회 전침자극군이 Vi, Au, Cg 및 Ins영역에서 2Hz-3회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었다.
2. 치료횟수에 따른 NADPH-d 염색강도의 변화를 관찰한 결과 2Hz-1회 전침자극군이 Vi, Au, Cg와 Ins영역에서 2Hz-3회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었고, 100Hz-1회 전침자극군은 Vi영역에서, 100Hz-3회 전침자극군은 M1영역에서 보다 유의한 증가를 나타내었다.
3. 빈도수에 따른 NPY 염색강도의 변화를 관찰한 결과 2Hz-1회 전침자극군이 Vi와 Au영역에서, 100Hz-1회 전침자극군은 M1영역에서 보다 유의한 증가를 나타내었고, 2Hz-3회 전침자극군은 Cg영역에서 100Hz-3회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었다.
4. 치료횟수에 따른 NPY 염색강도의 변화를 관찰한 결과 2Hz-1회 전침자극군이 S1, Vi와 Au영역에서 2Hz-3회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내었고, 100Hz-1회 전침자극군이 Cg영역에서 100Hz-3회 전침자극군보다 유의한 증가를 나타내

었다.

VI. 참고 문헌

1. Lundeberg T. Does acupuncture work?. IASP. 1996;4(3):1-4.
2. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, Wong EK, Min BI. New findings of the correlation between acupuncture points and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:2670-3.
3. 손영주, 원란, 정혁상, 김용석, 박영배, 손낙원. 전침자극에 의한 중추신경계내 대사활성 변화의 영상화 연구. 대한침구학회지. 2001;18(3):56-68.
4. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest a role as intercellular messenger in the brain. Nature. 1988;336:385-8.
5. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86:5159-62.
6. Meffert MK, Premack BA, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. Neuron. 1994;12:1235-44.
7. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitro-compound. Nature. 1993;364:626-31.
8. Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. Prog. Neurobiol. 1992;38:125-67.
9. Wahlestedt C, Reis DJ. Neuropeptide Y-related peptides and their receptors—are the receptors potential therapeutic drug targets?. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993;33:309-352.
10. JB Redrobe, Y Dumont, JA St-Pierre, R Quirion. Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizure and cognition. Brain Res. 1999;848:153-66.
11. 김창환, 김용석, 허영범, 유진화. 전침자극이 SHR 흰쥐 대뇌의 NADPH-diaphorase와 Neuropeptide Y 신경세포에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(4):283-91.
12. 고희균. 흰쥐에서의 골도분층에 의한 상응혈위. 대한침구학회. 1999;16(3):115-22.
13. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience. 1992;46:755-84.
14. Agnati LF et al. Morphometrical and microdensitometrical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rostral medulla oblongata of the adult and old male rat. Neuroscience. 1988;26:461-78.
15. Paxinos G, Watson C. The rat brain in

- stereotaxic coordinates. 3rd ed. San Diego:Academic Press. 1997.
16. 석학민. 경락 수혈연구의 발전과 현황. *동양의학*. 1995;21(1):63-74.
 17. Spinas GA. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet β -cell. *News Physiol Sci*. 1999;14:49-53.
 18. Kriegsfeld LJ, Dawson TM, Dawson VL, Nelson RJ, Snyder SH. Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone. *Brain Res*. 1997;769(1):66-70.
 19. Bernd Mayer. Structure and Function of Nitric Oxide Synthases. *Nitric Oxide*. 1998:390-2.
 20. Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid and sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982;79:5485-9.
 21. 전국한외과대학 침구경혈학교실. *침구학(상)*. 서울:집문당. 1994:382-4.
 22. 郭長青. 針灸學現代研究與應用. 北京:學苑出版社. 1998:247-52.
 23. Guo WL. Characteristics of afferent fiber innervation on acupuncture points zusanli. *Am. J. Physiol*. 1983;245:606-12.
 24. 손영주, 정혁상, 구자승, 원관, 김용석, 박영배, 손낙원. 흰쥐의 족삼리 및 태충 전침자극에 따른 뇌대사활성의 변화. *대한침구학회지*. 2002;19(1):159-74.
 25. He LF, WQ Dong, MZ Wang. Effects of iontophoretic etorphine and naloxone, and electroacupuncture on nociceptive responses from thalamic neurons in rabbits. *Pain*. 1991;44:89-95.
 26. Han Z, Jiang YH, Wan Y, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin-1 mediates 2Hz but not 100Hz electroacupuncture analgesia in the rat. *Neurosci Lett*. 1999;274(2):75-8.
 27. Han JS, Sun SL. Differential release of enkephalin and dynorphin by low and high frequency electroacupuncture in the central nervous system. *Acupunct Sci Int*. 1990;1:19-27.
 28. Guo HF, Tian J, Wang X, Fang Y, Hou Y, Han J. Brain substrates activated by electroacupuncture of different frequencies(I): Comparative study on the expression of oncogene c-fos and genes coding for three opioid peptides. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;43(1-2):157-166.
 29. Lee JH, Beitz AJ. Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation. *Brain Res*. 1992;577(1):80-91.
 30. Guo HF. Comparative study on the expression and interaction of oncogene c-fos/c-jun and three opioid genes induced by low and high frequency electroacupuncture. *Sheng Li Ke Xue Zhan*. 1996;27(2):135-8.
 31. RS Cheng, B Pomeranz. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. *Brain Res*. 1981;215:77-92.
 32. Kwon YB, Kang MS, Son SS, Kim JT, Lee YH, Han HJ, Lee JH. Different frequencies of electroacupuncture modified the cellular activity of serotonergic neu-

- rons in brainstem. *Am J Chin Med.* 2000; 28(3-4):435-41.
33. Shen S, Bian JT, Tian JB, Han JS. Frequency dependence of substance P release by electroacupuncture in rat spinal cord. *Sheng Li Xue Bao.* 1996;48(1):89-93.
34. Tian JB, Shen S, Han JS. Frequency dependence of somatostatin and calcitonin gene related peptide release induced by electroacupuncture in rat spinal cord. *Sheng Li Xue Bao.* 1998;50(1):101-5.
35. Lin TB, Fu TC, Chen CF, Lin YJ, Chien CT. Low and high frequency electroacupuncture at Hoku elicits a distinct mechanism to activate sympathetic nervous system in anesthetized rats. *Neurosci Lett.* 1998;247(2-3):155-8.
36. Hsieh CL, Lin JG, Li TC, Chang QY. Changes of pulse rate and skin temperature evoked by electroacupuncture stimulation with different frequency on both Zusanli acupoints in humans. *Am J Chin Med.* 1999;27(1):11-8.
37. Bucinskaite V, Lundeberg T, Stenfors C, Ekblom A, Dahlin L, Theodorsson E. Effects of electroacupuncture and physical exercise on regional concentration of neuropeptide in rat brain. *Brain Res.* 1994;666:128-32.
38. Yong-Suk Kim, Changhwan Kim, Minjeong Kang, Jinhwa Yoo, Youngbuhm Huh. Electroacupuncture-related changes of NADPH-diaphorase and neuronal nitric oxide synthase in the brainstem of spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters.* 2001;312:63-6.
39. 김종인, 김용석, 김창환. 전침자극이 Spontaneously Hypertensive Rat의 대뇌 결질, 뇌줄기, 소뇌 부위의 Nitric Oxide Synthase 신경세포에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2001;18(4):116-24.