

침전극 저주파 자극이 흰쥐 중뇌수도주위 회색질의 nNOS 면역반응세포 변화에 미치는 영향

가야대학교 작업치료학과 · 효자병원¹⁾ · 국립독성학연구소 신경독성과²⁾

김수한 · 김지성¹⁾ · 송치원²⁾

The Effect of Needle Electrode Electrical Stimulation on the Change of neuronal Nitric Oxide Synthase Immunoreactive Cells in the periaqueductal area of the Rat

Kim, Su Han, Ph.D., R.P.T · Kim, Ji Sung, M.S., R.P.T¹⁾ · Song, Chi Won, Ph.D., DVM²⁾

*Dept. of Physical Therapy, Ka-Ya Univ., Hyo-Ja Hospital¹⁾, Division of neurotoxicology, National Institute
Toxicological Research²⁾*

- ABSTRACT -

Acupuncture has been used as a clinical treatment in Oriental medicine for various diseases. In the present study was carried out to investigate the effects of acupuncture and electrical stimulation on the change neuronal nitric oxide synthase(nNOS) immunoreactive cells in the periaqueductal gray(PAG) area of the male SD rats. Enhanced expression of nNOS was detected in the dorsolateral-PAG(DL-PAG) area of rat with stress by fixed body, and acupuncture and needle electrode electrical stimulation groups at Hapgok like acupoint decreased the stress-induced enhancement in the expression of nNOS. The present results demonstrate that acupuncture and needle electrode electrical stimulation is effective in the modulation of expression of nNOS in the DL-PAG area under stress conditions.

key words : Acupuncture, Needle Electrode Electrical Stimulation, Stress, DL-PAG, nNOS
Corresponding Author : Song, Chi Won <E-mail ; songcw@kfda.go.kr>

I. 서론

통증이란 인간이 공통적으로 겪는 고통스러운 경험으로 그 질과 정도가 다양하며 생리적인 요인에 의해 큰 영향을 받는 하나의 주관적인 개념이다. Merskey(1975)는 아프다는 말은 실제적으로 느낄 수 있는 통증뿐 아니라 불쾌한 정서상태의 의미도 함께 포함되는 것으로 통증과 정서상태는 상호 밀접한 관계가 있다고 하였다. Noling 등(1986)은 통각을 느끼게 하는 자극은 기계적자극, 화학적자극 또는 온열 자극 등으로 그 범위가 광범위하며 이들 자극이 조직세포의 파괴 또는 그 전 단계에 이르는 변화를 일으킴으로써 통각이 발생한다고 하였다. 이러한 통증이 갖는 의미에 대해 학자마다 주장하는 바가 약간씩 다르긴 하지만 유해한 자극으로부터 인간을 보호하려고 하는 가장 원시적인 보호 반응의 하나라는데 대체로 의견을 같이하고 있다. Longobardi 등(1989)은 과거 한 때 여러 약품들이나 수술과 같은 방법에 의해 통증이 완전히 제거될 것으로 믿어졌었지만 오히려 해가되는 침해적인 수술이나 중독 등 다른 부작용으로 인한 문제가 대두되었다고 하였다. 이러한 이유로 통증 치료를 위한 다른 치료법에 대한 연구를 거듭하던 중 동양에서는 침술(acupuncture)을 서양에서는 전기자극을 이용한 통증관리법이 연구되어져 왔다.

급성 혹은 만성염증과정 중에서 염증을 매개하는 인자의 하나로서 매우 중요한 역할을 하는 산화질소(nitric oxide, NO)는 중추신경계에서 신호전달기능을 하는 유리기(free radical)중의 하나이며, Nitric Oxide Synthase(NOS)에 의해 칼슘의존적 경로를 통해 아미노산 L-arginine으로부터 합성이 된다. 또한 NO는 자율적 기능들의 조절에 관여하며 신경과 혈관 그리고 면역관계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. (Dawson et al 1992).

NOS에는 자연형(constitutive isoform, cNOS)과 유발형(inducible isoform, iNOS, NOS2)이 있다. cNOS에는 nNOS(neuronal isoform, NOS1)와 eNOS

(endothelial isoform, NOS3)가 있으며, 이들은 칼슘의 농도에 따라 NO를 생산하는 능력이 매우 제한되어 있다. (Ohshima, H. and Bartsch, H., 1994 ; Wiseman, H. and Halliwell, B., 1996). 반면 iNOS(NOS2)는 세균이나 바이러스, 기생충 등의 감염시에 많은 양의 NO를 생산하며 이때 생산된 NO는 병원체, 숙주세포, 종양세포 등의 탐식에 매우 중요한 역할을 한다. (Szabo, C. et al, 1997 ; Tozer, G.M. et al., 1997 ; Garcia-Cardena, G. and Folkman, J., 1998). 또한 nNOS는 주로 중추신경에서만 발현되며 신경전달에 관여하는 것으로 알려져 있다. (Dawson et al, 1992 ; Hope et al, 1991).

중뇌수도관주위회색질의 신경원들에는 엔케팔린(enkephalin), 섭스탄스 P (substance P), 콜레시스토키닌(cholecystokinin), 소마토스타틴(somatostatin), 세로토닌(serotonin)등 많은 종류의 신경전달물질이 함유되어 있으며, 한 신경원에 여러 종류의 신경전달물질이 함유되어 있는 경우도 있다. Basbaum 와 Fields(1984)는 중뇌의 등외측 중뇌수도관 회색질(dorsolateral periaqueductal gray, 이하 DL-PAG)영역의 신경세포들은 내재성 통증조절에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 통증 및 stress와 관련해서 고정을 통한 stress에 의한 nNOS 반응세포의 변화와 고정 후 수컷 Sprague Dawley rat(SD rat)의 사람의 합곡 부위에 해당하는 앞발에 일반침과 침전극 저주파 자극기를 이용하여 자극함으로써 DL-PAG 부위의 nNOS 반응세포 수가 어떻게 변화하는가를 면역조직화학적 방법으로 관찰하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험대상

본 연구에는 온도, 습도, 공기청정 상태를 일정하게 유지할 수 있는 실험실에서 사육된 임상적으로 건강하다고 판단되는 수컷 SD rat을 대조군, stress

자극군, 1시간 30분의 일반침군 및 침전극 저주파 자극군으로 나누어 각각 5마리씩 총 20마리를 사용하였다.

실험에 사용된 SD rat의 체중은 약 200~250g으로 8주정도 성장한 것을 선택하였으며, 실험실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 45~55% 정도를 유지하였다.

2. 실험방법 및 절차

1) 전기자극

대조군, stress 자극군, 일반침 자극군, 침전극 저주파 자극군으로 분류하였고, stress 자극군은 수술용 테이블을 이용하여 몸을 묶어 활동을 1시간 30분간 제한하였고, 침 자극군들은 사람의 합곡 부위에 해당하는 SD rat의 앞발 부위를 동일하게 선정하여 일반침 및 침전극 저주파 자극기(PG6, ITO, JAPAN, 9V, 교류)를 이용하여 주파수는 2Hz, 설정하여 1시간 30분씩 자극을 주었다. 전기자극 강도는 자극에 의해 SD rat의 자극지점 주위 근육의 움직임이 나타나면 곧바로 강도를 약간 감소시켜 근육의 움직임이 사라진 상태에서 자극을 시행하였다.

2) 조직처리

각 군에 처치를 마친 즉시 thiopental sodium (1mg/kg)을 복강 주사하여 마취시키고 흉강을 열고 좌심실로 canular를 삽입한 후 peristaltic pump를 이용하여 30ml/min의 속도로 0.1M Phosphate Buffer Saline solution(PBS)를 사용하여 20분간 관류 수세하여 혈액을 제거하였으며, 4% para-formaldehyde를 이용하여 30ml/min의 속도로 30분간 전 고정을 실시하였다.

이후 두개골을 절개하여 뇌를 조심스럽게 꺼낸 후 전 고정과정과 동일한 용액에 24시간 후 고정을 실시하였으며, 냉동절편기 사용시 빙결을 방지하기 위하여 30% sucrose에 침지될 때까지 방치시켰다. 완전히 가라앉은 뇌를 냉동절편기를 사용하여 -200°C 에서 $40\mu\text{m}$ 두께로 박절하여 $400\mu\text{m}$ 마다 1매씩 취하여

부유법(free floating method)으로 면역염색을 실시하였다.

3) 면역염색

냉동절편된 뇌조직의 endogenous peroxidase를 제거하기 위하여 1% H₂O₂를 1차 증류수(Distilled Water, DW)에 5분간 처치하였고, 비특이적 반응을 제거하기 위하여 1% Normal Goat Serum(Sigma사)에 30분간 처치하였다.

1차 항체로 Rabbit anti rat nNOS(santacruz사)을 1:100의 비율로 DW에 희석한 후 72시간동안 방치하였으며, 0.1M PBS로 5분간 3회 수세하였다. 2차 항체로 Biotinylated Anti Rabbit IgG(Vecta사)를 1:200의 비율로 DW에 희석하여 24시간동안 방치하였으며 역시 0.1M PBS로 5분간 3회 수세하였다. 그 후 Avidin과 Peroxidase 혼합액을 1:100의 비율로 DW에 희석하여 12시간동안 방치하였으며 0.1M PBS에 5분간 3회 수세한 후 3,3-Diaminobenzidine(Sigma사)에 0.0045%가 되게 H₂O₂를 첨가하여 5분간 반응정도를 살펴면서 발색시켰다. 그 후 gelatin이 처리된 slide에 부착시켜 탈수과정과 봉입 과정을 거쳤다. nNOS 항체에 양성 반응을 나타낸 DL-PAG 영역을 광학현미경으로 관찰하여 면역염색반응을 보인 세포수를 계수하여 각 군별로 비교하였다.

3. 자료처리

측정된 nNOS 반응세포 수를 SPSS/PC+를 이용하여 통계처리 하였다. 침전극 저주파 자극기를 이용하여 중뇌수도주위 회색질에서 나타나는 nNOS 반응세포의 변화를 다중회귀분석법으로 처리하였다.

4. 연구의 제한점

본 연구는 실험대상을 모두 수컷 SD rat으로 한정하였기 때문에 이 결과를 암컷에 그대로 적용할 수 없다.

Ⅲ. 결 과

본 실험은 전기자극이 SD rat DL-PAG의 nNOS 분비세포에 미치는 영향을 규명하고자 전기자극군과 대조군간의 DL-PAG내 nNOS 반응세포 부위를 육안적 관찰 및 각 부위별 nNOS 반응세포 수의 변화를 자극 시간대별로 나누어 측정 결과를 처리하였다.

1. DL-PAG의 nNOS 반응세포 관찰

대조군에서의 nNOS 면역반응을 보인 세포는 DL-PAG에서 소수 관찰되었고, stress 자극군에서 그 수가 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있다(Fig 1. A,B).

일반침 자극군에서의 nNOS 면역반응을 보인 세포 수는stress 자극군에서 보다 그 수가 급격히 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig 1. C).

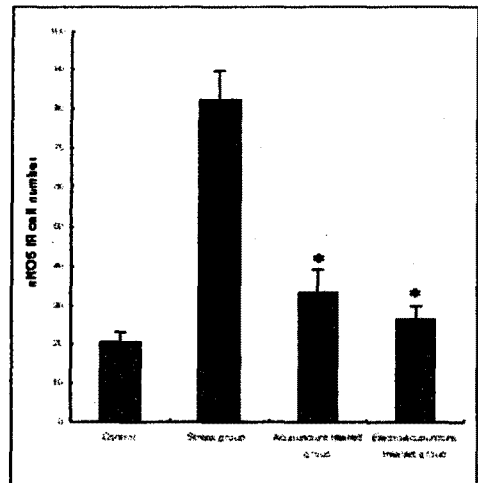
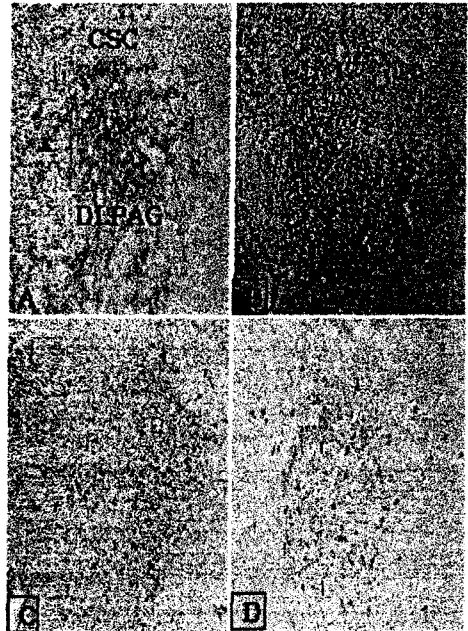
침전극 저주파 자극군에서의 nNOS 면역반응을 보인 세포 수는stress 자극군에서 보다 그 수가 급격히 감소하는 것을 관찰하였고, 일반침 자극군보다 면역반응을 나타내는 세포의 수가 적게 관찰되었지만 유의성은 나타나지 않았다(Fig 1. D).

2. DL-PAG의 각 부위별 nNOS 반응세포 수의 변화

nNOS가 관찰된 DL-PAG 구역을 대조군, stress 자극군, 일반침 자극군 및 침전극 저주파 자극군으로 나누어 통계 처리하였다.

Ⅳ. 결론 및 고찰

스트레스는 주로 미토콘드리아에 의한 reactive oxygen species(ROS)와 관련이 있으며 세포사의 원인이므로 작용한다고 알려져 있다. 또한 스트레스는 ROS뿐만 아니라 NO의 생성에도 관여하는 것으로



(Fig. 1) The nNOS immunoreactive cell numbers decreased stress group then acupuncture and needle electrode electrical stimulation treated group. A : Control, B : Stress group, C : Acupuncture treated group, D : Needle electrode electrical stimulation(NEES) treated group. CSC : Commissure of the superior colliculus, DLPAG : Dorsolateral periaqueductal gray. $\times 100, p < 0.05$.

알려져 있어 현재 이들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Nitric oxide (NO)는 생리적으로 신호전달과정에 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 염증 과정을 매개하는 인자로 잘 알려져 있다(Lala, P.K., and Orucevic, A., 1998 ; Dubois, R.N. et al., 1998). 저농도의 NO는 심혈관계, 면역계, 신경계에서 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하지만 고농도로 만성적으로 세포에 노출이 되면 DNA의 손상이나 세포의 죽음을 초래한다(Ambs, S et al., 1998).

DL-PAG는 중추신경에서 내재성 통증조절에 대한 역할을 하는 곳으로 알려져 있다. 이러한 신경세포 손상과 관련하여 NO를 조절할 수 있는 역할 중에 침의 역할이 알려진 것은 최근의 일이다(Jang et al, 2003). Jang 등(2003)은 족삼리에 적용한 침이 당뇨병에 의한 통증과 관련하여 DL-PAG영역에서의 NO발현을 억제시키는 역할이 있다는 보고를 하였다. Huang Z.N.(1999) 등은 7-nitroindazole (7-NI)와 전기침 자극이 발작과 NO 생성에 미치는 영향에 대해 연구하였는데 7-NI와 전기침 자극이 쥐의 해마부위에서 NO의 생성을 감소시켰고 발작도 감소시켰다고 보고하였다.

본 연구에서는 역시 고정에 의한 스트레스가 NO의 생성을 증가시키고 이런 상태가 또한 일반침과 침전극 저주파 자극에 의해 NO의 생성이 억제되는 결과를 관찰할 수 있었다. 즉 무처치군인 control 군에서 나타난 nNOS IR 세포의 수는 20개 정도였지만 수술용 테이프로 고정시킨 군에서는 급격하게 증가하여 nNOS IR 세포의 수가 80개 이상 늘어났다. 이는 고정이나 활동억제가 쥐에게 스트레스로 작용하였고, 이러한 스트레스가 통증이나 염증반응 등 다른 유해자극과 동일하게 NO의 증가를 가져온다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 고정시킨 SD rat의 앞발(사람의 합곡에 해당하는 부위)에 적용한 일반침과 침전극 저주파 자극은 고정에 의해 급격하게 증가한 nNOS IR 세포의 수를 각각 35, 30개 정도로 감소시키는 결과를 보여주었다. 이는 Huang Z.N.(1999)등이 보고한 내용과 같은 결과로 일반침

이나 전기자극이 스트레스로 인한 NO의 생성을 줄여줄 수 있다는 것을 입증한다.

일반적으로 침의 효능과 관련하여서는 염증의 억제에 초점을 맞추어 연구되어 지고 있는데, son 등(2002)이 보고한 lipopolysaccharide에 의해 유발되는 염증에서 interleukin-6 그리고 interleukin-1 beta와 같은 pre-inflammation cytokine의 억제효과가 대표적이며 그러나 Jang 등(2003)과 본 연구의 결과는 침이 염증뿐만 아니라 세포사와 관련이 있는 NO의 발현 억제에도 관계가 있어 세포사의 억제에도 크게 관여할 것으로 사료되었다.

아직 NO의 역할과 기능에 대해 완전히 밝혀지지는 않았지만 다양한 방법으로 연구가 진행되고 있다. 또한 침과 관련해 어떤 몇몇 경혈이 염증억제와 NO생성을 억제한다고 보고 되었지만 전기 자극과 관련한 보고는 찾아보기가 어렵다. 따라서 염증반응이나 유해 자극과 관련해 가장 효과적으로 NO의 생성을 억제하는 경혈과 전기 자극의 조건이 무엇이지를 밝히는 것은 앞으로 전기치료분야와 의학계에 큰 과제일 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

- Ambs, S., Merriam, W.G., Bennett, W.P., Felley-Bosco, E., Ogunfusika, M.O., Oser S.M., Klein, S., Shields, P.G., Billiar, T.R., and Harris C.C. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas : implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res.*, 58: 334-341, 1998.
- Basbaum A.I., and Fields H.L. Endogenous pain control system : brain stem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 309-338, 1984.
- Dawson T.M., Dawson V.L. and Snyder S.H. A novel neuronal messenger molecule in brain : the free radical nitric oxide. *Ann. Neurol.*, 32: 297-311,

- 1992.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease[see comments. *FASEB J.*, 12: 1063-1073, 1998.
- Garcia-Cardena, G. and Folkman, J. Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 560-561, 1998.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M. et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2811-2814, 1991.
- Jang M.H., Shin M.C. and Koo G.S et al. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett.*, 337 : 155-158, 2003.
- Lala, P.K., and Orucevic, A. Role of nitric oxide in tumor progression : lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, 17: 91-106, 1998.
- Longobardi A.G., Clelland J.A. and Knowles C.J. et al. Effects of auricular transcutaneous electrical nerve stimulation on distal extremity pain. A pilot study, *Phys Ther.*, 69(1): 10-17, 1989.
- Lovick T.A. and Key B.J. (1996) Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. *Exp. Brain Res.* 108: 382-388, 1996.
- Noling L.B., Clelland J.A. and Jackson J.R. et al. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation at auricular points on experimental cutaneous pain threshold. *Phys Ther*, 68(9): 1367-1374, 1986.
- Ohshima, H. and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 305: 253-264, 1994.
- Son Y.S., Park H.J. and Kwon O.B et al. Antipyretic effects of acupuncture on the lipopolysaccharide-induced fever and expression of interleukin-6 and interleukin-1 beta mRNAs in the hypothalamus of rats. *Neurosci Lett.* 319(1): 45-8, 2002.
- Szabo, C. et al., Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J. Biol. Chem.*, 272: 9030-9036, 1997.
- Tozer, G.M. et al., Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Res.*, 57 : 948-955, 1997.
- Wiseman, H. and Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313: 17-29, 1996.
- Yang R., Chen G., Cheng, Sheng Li Xue Bao. Effect of electroacupuncture and 7-NI on penicillin-induced epilepsy and their relation with intrahippocampal NO changes. *Oct* : 51(5): 508-14, 1999.