

원 개

## Carrageenan 유발염증에 대한 15Hz 전침의 효과에 대한 연구

한유진 · 이용태\* · 장경전

동의대학교 한의과대학 \*침구경혈학교실 · 생리학교실

### Abstract

## Anti-Inflammatory Effects of 15Hz Electroacupuncture on the Carrageenan-Injected Rat

Han You-jin, Lee Yong-tae\* and Jang Kyung-jeon

Department of \*Acupuncture & Moxibustion and of Physiology,  
College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

**Objective** : The aim of this study is to investigate the anti-inflammatory effects of 15 Hz electroacupuncture (EA) on carrageenan-injected rats. Inflammation was induced by an intraplantar injection of 1% carrageenan into the right hind paw.

**Methods** : Bilateral EA stimulation with 15 Hz were delivered at those acupoints corresponding to Zusanli and Sanyinjiao in man via the needles for a total of 30 min duration in carrageenan-injected rats.

**Results** : The developing edema was measured 30 minutes interval after carrageenan injection and 15 Hz EA stimulation presented significant edema inhibition. Three hours after carrageenan injection, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) and nitric oxide(NO) levels were measured. The 15 Hz EA stimulation significantly inhibited PGE<sub>2</sub> and NO production in the right paw. The pro-inflammatory mRNA expression such as cyclooxygenases(COX)-2 and interleukin(IL)-1 $\beta$  were slightly down-regulated by EA stimulation. The number of COX-2, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  immunoreactive cells were abundantly observed in paw edema. But these cells were decreased in number according to anti-edema effect of 15 Hz EA.

- 접수 : 2003년 5월 10일 · 수정 : 2003년 5월 15일 · 채택 : 2003년 5월 17일  
· 교신저자 : 장경전, 부산광역시 진구 양정2동 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실  
Tel. 051-850-8612 E-mail : kjjang@dongeui.ac.kr

**Conclusions:** These results indicate that 15Hz EA stimulation have an alleviating action against carrageenan-induced edema and local inflammation.

**Key words:** anti-inflammatory, carrageenan-injected, Inflammation, PGE<sub>2</sub>, NO

## I. 서론

필수적인 숙주방어 체계로서 염증반응은 그람 음성 세균산물이나 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-1 같은 cytokines 등 다양한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다<sup>1)</sup>. Carrageenan을 주사하여 부종율을 측정함으로써 항염증 효과와 통각과민(hyperalgesia)과의 상관관계를 분석하는 연구는 전침(electroacupuncture)의 항부종 효과는 물론 opioid antagonist과 같은 다양한 약품에 대한 약리작용과 함께 이루어지고 있는 잘 알려진 고전적인 방법의 하나이다<sup>2),3)</sup>.

염증형성 과정에는 proinflammatory cytokines, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 인자가 관여하며 생체내에서 호중구(neutrophil) 같은 염증관련 세포와 inflammatory cytokines, superoxide anion 등은 서로 복잡한 관계를 띠고 있다<sup>4)</sup>. Proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 에 의해 호중구는 활성화되어 염증부위로 이동하며<sup>5)</sup>, 또한 IL-1 $\beta$ 는 PGE<sub>2</sub> 생성 유도에 의해 발열을 유발하여 TNF- $\alpha$ 와 함께 염증반응의 주된 매개자로 작용하는 nitric oxide(NO)를 비롯한 superoxide anion 등의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>5),6)</sup>.

NO는 생체내 면역체계에서 활성산소종(reactive oxygen species) 또는 활성산소중간매개물(reactive

oxygen intermediates)로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성되는 물질이다. 그러나 NO는 superoxide anion와 함께 높은 세포손상 활성을 가진 peroxynitrite를 형성한다<sup>7)</sup>. cyclooxygenases(COX)-2는 arachidonic acid 대사에서 중요한 역할을 수행하는 효소로 COX-1이 구조적 성분임에 비해 염증성 자극 등에 의해 유도되며 prostaglandin 형성에 관여하며<sup>8)</sup>, arachidonic acid는 혈소판(platelet)에 의한 NO합성을 촉진시킨다<sup>9),10)</sup>.

국소적 염증반응 형성과정에서 증가되는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 cytokine과 COX 같은 효소는 염증과정에 관련될 뿐 아니라 염증성 통각과민에도 관여하고 있다<sup>11)</sup>. 따라서 본 연구는 국소적 염증과 통각과민 연구에 널리 쓰이고 있는 carrageenan을 주사한 국소적 염증반응 과정에 대한 15Hz 전침 효과를 부종율 측정과 더불어 염증조직에 대한 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성량으로 판정한 후 이에 관여하는 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  및 COX-2 효소의 mRNA 발현과 염증세포 이동 및 축적에 대해 면역조직화학적 방법으로 검색하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

8주된 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 Taconic & SamYuk Co.로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 국소적 염증유발을 위해 1% carrageenan (Sigma, USA) 50 $\mu$ l을 오른쪽 발바닥에 주사한 대조군과 carrageenan 주사 후 전침처리한 전침군, 그리고 동일 양의 saline 용액을 주사한 정상군으로 나누어 사용하였으며 각 군당 8 내지 10마리를 사용하였다.

## 2. 전침자극

Carrageenan 주입과 동시에 전침자극을 시작하였다. 스테인레스 0.25mm 침을 전침기(세창메디칼, SM-600)에 연결하여 15Hz 빈도로 삼음교(Sp6, 경골후연의 내과에 대해 근위 3mm 지점)와 족삼리(S36, 경골 앞결절에 대해 외측 5mm 지점)에 해당하는 양측 혈위에 자침한 후 30분간 자극하였다. 강도는 10분 간격으로 순차적으로 1, 2, 3mA로 조절하였다.

## 3. 발의 직경 및 부종을 측정

염증에 따른 부종을 전침자극 후 3시간까지 30분 간격으로 주사부위에 대한 발의 두께와 plethysmometer(Ugo-Basile, Italy)를 이용하여 부종을 측정하였다. 부종율은  $V\% = (V_{TBAS+n} - V_{TBAS}) / V_{TBAS} \times 100$ 의 공식에 의해 도출하였다( $V_{TBAS+n}$ , 각 시간별 측정값,  $V_{TBAS}$ , 주사전 측정값).

## 4. 조직절취

Carrageenan 주사 후 3시간에 10% chloral hydrate(350mg/Kg i.p.)로 마취하여 발바닥 염증유발 부위를 적출하여 실험에 사용하였다.

## 5. NO의 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위한 griess 시약은 용액

A(0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 용액 B(2% sulfonamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 제조하여 냉암소에 보관하며, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 발바닥 조직 1g당 2ml의 lysis buffer를 이용하여 homogenize한 후 원심분리하여 얻은 상층액 100 $\mu$ l을 96 well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 $\mu$ l을 분주한 뒤 ELISA leader(VERSA max, U.S.A.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 미리 작성한 NaNO<sub>3</sub>의 표준 검량곡선에 의해 NO의 양을 산정하였다.

## 6. PGE<sub>2</sub> 측정

PGE<sub>2</sub> 분석은 PGE<sub>2</sub> immunoassay kit(R & D systems, Minneapolis, USA)를 사용하였다. Carrageenan 주입 부위를 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 마쇄한 후 5,000 rpm에 5분 동안 원심분리하였으며 그 상층액을 manufacturers assay buffer ED<sub>1</sub>로 희석시켰다. 희석한 용액을 PGE<sub>2</sub> conjugate, PGE<sub>2</sub> antibody and pNPP substrate로 순차적으로 반응시키고 VERSAmax tunable microplate reader(Molecular devices, CA)를 사용하여 405nm에서 측정하였으며 PGE<sub>2</sub> 수준은 SOFTmax PRO(Molecular devices)를 사용해 계산하였다.

## 7. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 을 이용한 RNA 발현 분석

조직을 절취하여 homogenize시킨 후 TRIzol을 이용하여 조직에서 RNA를 추출하였다. 1ml의 TRIzol에 200 $\mu$ l chloroform을 넣은 후 10초간 vortex하고, 냉하에 10분간 방치하였다. Microcentrifuge로 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합한 후 천

천히 흔들어 주었다. 그리고 microcentrifuge를 이용하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet에 70% ethanol을 넣고 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-DW 20 $\mu$ l에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

역전사반응은 준비된 total RNA를 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시키고, 10mM dNTPs, random sequence primer, RNase inhibitor, 100mM DTT, 10 $\times$ RT buffer를 가한 후, 0.5 $\mu$ l의 M-MLV RT를 다시 가하고, DEPC-water로 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 mixture를 잘 혼합한 뒤 낮은 원심분리를 이용하여 spin down시킨 후 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다.

유전자 증폭을 위한 PCR machine을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 2 $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 Table 1과 같으며 sense primer와 antisense primer를 혼합하여 1 $\mu$ l를 가하고, master mixture에 최종부피가 20 $\mu$ l 되도록 멸균 증류수를 가하였다. Predenaturation 95 $^{\circ}$ C, 10min, denaturation 95 $^{\circ}$ C 1분, annealing 50 $^{\circ}$ C 1분, elongation 72 $^{\circ}$ C 1분을 38 cycles한 뒤 postelonga-

tion을 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 수행하였다. 각 PCR products는 10 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 15분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

### 8. 조직학적 및 면역조직화학적 관찰

4% paraformaldehyde에 4 $^{\circ}$ C 12시간 고정하였다. 순차적인 탈수 및 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 $\mu$ m 연속절편을 제작하여 염색에 사용하였다. 조직학적 검색을 위하여 연속절편을 탈파라핀한 후 hematoxylin-eosin(H-E)와 wright 염색을 실시하였다. 면역조직화학적 관찰을 위해 10mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에서 95 $^{\circ}$ C 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다.

PBS로 세척한 후 goat normal serum(Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 IL-1, TNF- $\alpha$ , COX-2 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200 : 1로 희석하여 4 $^{\circ}$ C 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit(Vector Lab., PK-6101)에

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
IL-1 $\beta$	Sense	GTCTTTCATCACACAGGA
	Antisense	TCCTGTGTGATGAAAGAC
IL-6	Sense	CTGTTCTGCTTCTCATATG
	Antisense	CTGTTCTGCTTCTCATATG
TNF- $\alpha$	Sense	CTCCTCTCCGCATCAAGAG
	Antisense	TGGGCTCATAACCAGGGCTT
COX-2	Sense	CACTCAGGATGCTCCTGTTTG
	Antisense	TCTTTGCCAGCACTTCACTCA
GAPDH	Sense	GAACATCATCCCTGCATCCA
	Antisense	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA

실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색 시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체 대신 10% BSA/PBS을 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

### 9. 통계처리

통계처리는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 6.0(SPSS, Chicago, IL)로 Student's *t*-test로 유의차를 검사하였다.

## III. 결 과

### 1. 발의 직경 및 부종율

Carrageenan 주사와 동시에 전침자극을 가한 후 3시간까지 30분 간격으로 발의 두께와 plethysmometer를 이용한 부종율을 측정한 결과는 Fig. 1과 2에서 보는 바와 같다. 발의 두께는 carrageenan을 주사한 대조군과 전침군은 saline을 주사한 정상군에 비해 현저한 증가( $P < 0.005$ )을 보였으나 대조군과 전침군 사이에는 유의성을 보여주지 않았다 <Fig. 1>. Plethysmometer를 이용한 부종율 측정도 정상군에 비해 대조군과 전침군은 현저히 증가하나 대조군과 전침군을 비교해 볼 때 전침자극 후 초기에는 유의성을 보이지 않았으나 전침자극 후 120분에는  $P < 0.01$ , 150분 후부터  $P < 0.005$ 의 유의성 있게 낮은 부종율을 보였다 <Fig. 2>.

### 2. NO의 생성량

Carrageenan을 주사한 발바닥 조직의 NO생성량을 비교한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 정상군에서  $0.35 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 이었으나 대조군에서는  $1.82 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$ 로 유의성( $P < 0.005$ ) 있게 증가하

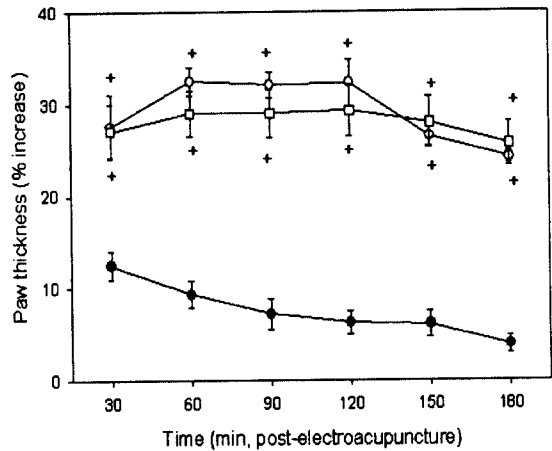


Fig. 1. Comparisons of paw thickness in rats.

\* $P < 0.005$  indicate significant differences from saline-injected groups. Saline-injected groups(●); Carrageenan-injected group(○); 15Hz EA stimulation after termination of the carrageenan injectio(□).

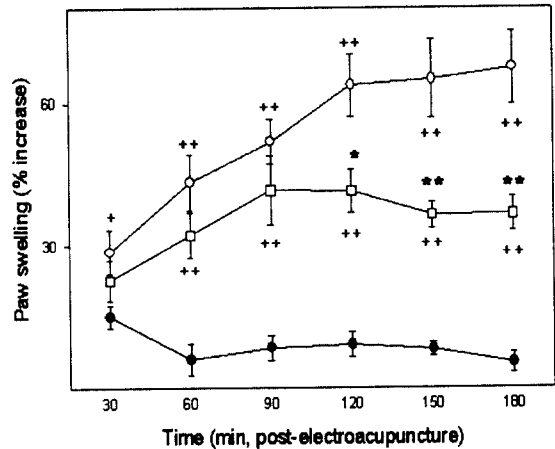


Fig. 2. Comparisons of paw volume measured by plethysmometer.

\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.005$  indicate significant differences from saline-injected group. \* $P < 0.01$  and \*\* $P < 0.005$  indicate significant differences from carrageenan-injected groups. Saline-injected groups(●); Carrageenan-injected group(○); 15Hz EA stimulation after termination of the carrageenan injection(□).

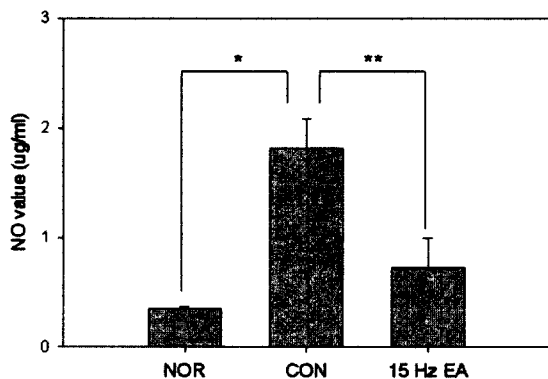


Fig. 3. Comparisons of means of NO production in the paw of rats.

The NO production were significantly increased by carrageenan injection compared with saline-injected groups, but these were markedly inhibited by the 15Hz EA stimulation. \*  $P < 0.005$  and \*\*  $P < 0.01$  when compared with carrageenan-injected group. All bars indicate means  $\pm$  S.D. of 8 rats. NOR, saline-injected groups; CON, carrageenan-injected group; 15Hz EA, 15Hz EA stimulation after termination of the carrageenan injection.

였다. 그러나 전침군에서는  $0.73 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 유의성( $P < 0.01$ ) 있게 감소하여 전침 자극에 의한 NO생성 저해를 보여주었다.

### 3. PGE<sub>2</sub> 생성 양

발바닥 조직에서 염증에 있어 주요한 역할을 담당하는 PGE<sub>2</sub> 수준을 측정한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. PGE<sub>2</sub> 수준을 비교해 보면 정상군은 조직 0.1g당  $449.7 \pm 93.6\text{pg}$ 이나 대조군은  $908.0 \pm 71.3\text{pg}$ 으로 유의성( $P < 0.005$ ) 있게 증가하였다. 15Hz 전침자극을 가한 전침군은  $591.3 \pm 97.8\text{pg}$ 으로 대조군에 비해 유의성( $P < 0.05$ ) 있게 감소하였다.

### 4. RT-PCR

염증과 관련한 COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF

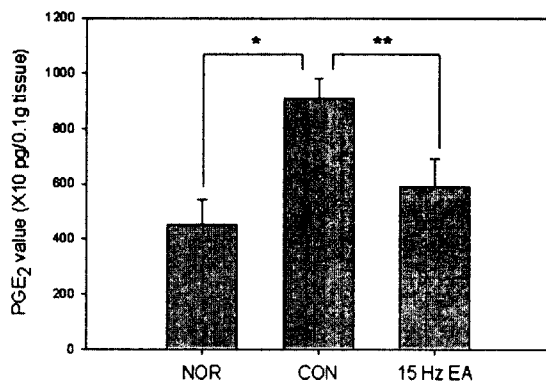


Fig. 4. Mean PGE<sub>2</sub> contents in the paw expressed as pg per 0.2g of tissues.

Note significant increases in carrageenan-injected groups compared with saline-injected ones. \*  $P < 0.005$  and \*\*  $P < 0.05$  when compared with carrageenan-injected group. All bars indicate means  $\pm$  S.D. of 8 rats. NOR, saline-injected groups; CON, carrageenan-injected group; 15Hz EA, 15Hz EA stimulation after termination of the carrageenan injection.

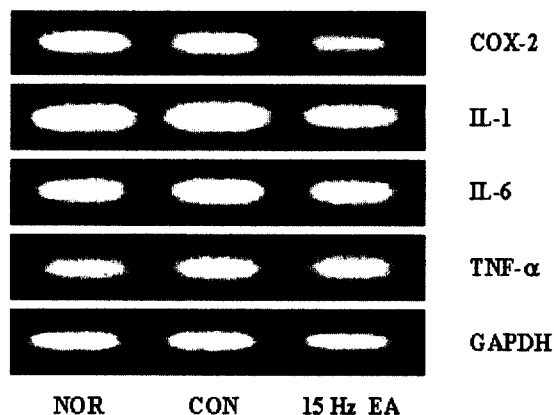


Fig. 5. Gel depicting RT-PCR products for COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  from rat paw.

Note that COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression of 15Hz EA was slightly depressed compared with carrageenan-injected groups. NOR, saline-injected groups; CON, carrageenan-injected group; 15Hz EA, 15Hz EA stimulation after termination of the carrageenan injection.

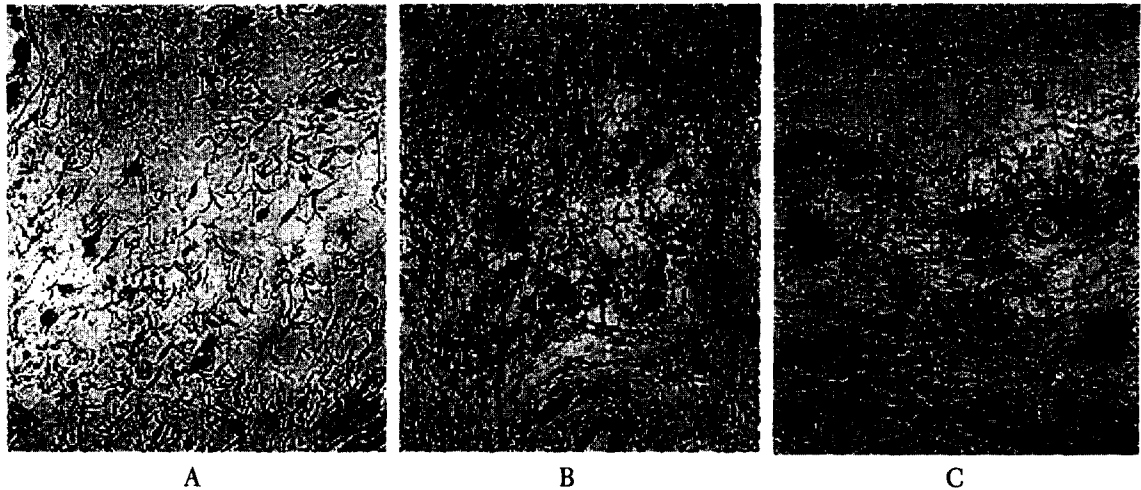


Fig. 6. TNF- $\alpha$  immunoreaction in the paw of saline-injected(A), carrageenan-injected(B) and 15Hz EA stimulated groups after termination of the carrageenan injection(C).

The intensive immunoreaction for TNF- $\alpha$  were mainly observed on the inflammatory cells of carrageenan-injected tissue, but smaller immunoreactive cells were detected in 15Hz EA stimulated groups than observed in carrageenan-injected groups. X 400.

- $\alpha$ 에 대한 RT-PCR 결과는 Fig. 5와 같다. 정상군에 비해 대조군에서 이들 mRNA 발현이 다소 증가하나 현저하지 않았으며 TNF- $\alpha$ 가 다소 현저하였다. 대조군에 비해 전침군의 COX-2와 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현이 다소 감소하였으나 현저하지 않았다.

#### 5. 조직학적 및 면역조직화학적 관찰

정상군은 상피조직에서 근육에 이르기까지 정형화된 구조를 보여주고 있으나 대조군에서는 부종에 의해 상피조직과 근육 사이의 결합조직이 확장되어 넓혀진 공간이 관찰되며 이곳에 출혈을 동반한 많은 염증세포를 관찰할 수 있었다. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 COX-2 면역반응을 살펴보면 표면상피와 땀샘 등 상피유래성 조직에도 반응이 관찰되나 부종형성에 따라 결합조직에 축적된 염증세포에서 강한 반응을 보였으며 이러한 반응세포수는 부종 정도에 비례하여 관찰되었다(Fig. 6).

## IV. 고찰

전침무통각(analgesia)은 4mg/Kg morphine 효과를 나타내며 naloxone, opioid antagonist 등에 의해 저해되는 것으로 보아 endogenous opioid system이 관여하고 특정 빈도(frequency)에 따라 중추신경계내 상이한 opioid system이 활성화됨은 잘 알려져 있다<sup>12),13)</sup>. 2Hz 전침은 뇌와 척수 enkephalin과  $\beta$ -endorphin 분비하며  $\mu$ -와  $\delta$ -opioid receptor가 관계하며 100Hz 전침은 척수에서 dynorphin을 분비하며 척수배각(dorsal horn)의  $\kappa$ -opioid receptor가 관여한다<sup>14)</sup>.

Capsaicin을 이용한 신경성 염증모델에 naloxone과 parachlorophenylalanine를 투여하더라도 전침이 항부종 효과를 나타내나 이들을 조합하여 사용

하면 이 효과가 저해됨을 보아 신경성 염증에 대한 전침의 항부종 효과에 opioid와 serotonergic inhibitory system가 함께 관여함을 알 수 있다<sup>3)</sup>. 그리고 carrageenan을 이용한 급성염증과 열적 통각과민에 대한 전침의 작용에도 opioid system이 관여하고 있다<sup>2),15)</sup>.

Carrageenan을 주사함과 동시에 15Hz 전침자극을 가했을 때 전침에 의한 유의성 있는 부종율의 감소를 관찰할 수 있었다. 이는 15Hz 전침자극이 opioid system과 연계된 진통 효과와 함께 carrageenan에 의해 유도되는 일련의 염증반응을 저해함을 알 수 있다. 이러한 염증반응 과정에서 주요한 매개체의 하나인 NO는 superoxide anion와 결합하여 높은 세포손상 활성을 가진 peroxynitrite를 형성하므로 NO생성 저해는 세포손상을 방지한다<sup>7)</sup>. 자유유리기 포착제인 superoxide dismutase(SOD)는 항염증 기능을 가지고 있어 이들의 투여는 carrageenan 유발 부종 또한 저해한다<sup>16)</sup>.

본 연구에서 carrageenan을 주사한 발바닥 조직에 대한 NO 생성량을 조사한 결과 정상군에 비해 carrageenan에 의해 유도되는 NO 생성량이 현저히 증가하였다. 그러나 15Hz 전침자극은 이러한 NO생성을 저하시킴을 볼 때 carrageenan에 의한 조직손상을 저해함으로써 나타나는 항부종 효과로 볼 수 있다.

대부분 포유동물에 COX 효소를 가지며 arachidonic acid에서 prostanoids 등을 변환시키는데 관여하는데 이중 COX-1이 구조적 성분임에 비해 COX-2는 염증과 관련한 유도성 효소로 과도한 prostaglandin형성에 관여한다<sup>8)</sup>. Kaolin 또는 carrageenan에 의한 염증유발군에서 COX-2의 증가는 PGE<sub>2</sub>의 증가로 이어지며 이는 조직염증에서 통각과민반응을 계속적으로 나타내는데 COX-2에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성이 주된 요인이다<sup>2),17)</sup>. 기능적으로 PGE<sub>2</sub>는 염증과 관련된 증상과 함께 A $\delta$ 와 C-fiber 같은

침해수용기에 작용하여 신경세포막 감작을 유도한다<sup>18),19)</sup>.

본 실험에서 carrageenan을 주사한 염증조직의 PGE<sub>2</sub> 양을 비교해 보면 carrageenan에 의해 PGE<sub>2</sub> 생성 양은 현저히 증가하며 이러한 증가는 15Hz 전침자극에 의해 억제되었다. 이러한 결과는 실험연구로 볼 때 염증반응 과정에 관계된 항염증 작용을 나타낼 뿐 아니라 침해수용기에 의한 동통의 centralization에도 작용함을 미침을 알 수 있다. 이를 바탕으로 15Hz 전침의 항염증 효과를 알아보기 위해 이에 관여하는 COX 효소와 proinflammatory의 mRNA 발현을 살펴보았다.

Proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 는 PGE<sub>2</sub> 생성유도에 의해 발열을 유발하여 골수에서 호중구 유도를 촉진하며 염증부위로 이동케 하여 lysosomal enzyme를 분비한다(Storck et al., 1994). 또한 IL-1 $\beta$ 는 호산구와 호중구를 자극하여 inflammation mediator를 분비하며 NO와 superoxide anion 형성을 유도한다<sup>6)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 낮은 농도로 IL-1 $\beta$ 를 유도할 수 있으며 호중구의 축적과 활성을 촉진하며 superoxide anion 형성에 관여한다<sup>5)</sup>.

또한 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 같은 inflammatory cytokine은 prostaglandin과 교감신경계가 독립적으로 통각과민에 관여하며<sup>20)</sup>, 내독소 같은 항원을 발바닥에 주입하면 국소적으로 증가한다<sup>21)</sup>. 특히 TNF- $\alpha$ 는 내독소 유발 통각과민에 중심적 기능을 한다<sup>22)</sup>.

Carrageenan 주사 부위에 대한 이들의 mRNA 발현 정도를 살펴보면 전침자극에 의해 COX-2와 IL-1 $\beta$  발현이 다소 저해됨을 알 수 있었다. 이는 carrageenan 투여 3시간 후 형태학적으로 관찰했을 때 규칙성을 잃은 결합조직과 이에 침적되어 있는 많은 염증세포에 강한 COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  면역반응을 보여주고 있음을 보여주며 부종의 정도에 따라 이들 세포수가 감소하는 것으로 보아 전침



자극에 의한 항염증, 항부종 효과를 알 수 있다.

이상의 결과로 보아 15Hz 전침자극은 carrageenan으로 유도된 proinflammatory cytokine의 발현을 억제하며 이는 주사부위로의 염증세포의 축적을 억제하고 나아가 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해함으로써 항염증 작용을 나타냄을 알 수 있다. 이러한 염증관련 인자들은 염증성 동통과도 관련이 있어 이들의 생성저해는 전침의 진통 효과와도 연관성을 가지고 있어 이에 대한 연구도 요구된다.

## V. 結 論

흰쥐 발바닥에 1% carrageenan을 주사하여 국소적 염증을 유발함과 동시에 15Hz 전침자극을 가하였을 때 보여주는 항염증 효과를 부종을 측정 및 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성량을 통해 판정하고 이를 염증관련 인자의 mRNA 발현과 면역조직화학적 검사를 통해 알아보았다.

1. Plethysmometer에 의한 부종을 변화를 보면 15Hz 전침자극은 carrageenan에 의한 부종을 저하시켰으며 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성도 저해시켰다.

2. 전침자극에 의해 염증관련인 IL-1 $\beta$ 와 COX-2 mRNA 발현이 다소 억제시켰으며 부종과 비례하여 증가하는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 COX-2 면역반응세포 침적도 억제되었다.

이로 보아 15Hz 전침은 carrageenan에 의해 유도되는 염증반응 과정에서 proinflammatory cytokine 조절을 통해 염증세포 축적을 저해하고 나아가 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해함으로써 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있다.

## VI. 참고문헌

1. Rastogi D, Ratner AJ, Prince A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatr. Respir. Rev.* 2001 ; 2 : 245-52.
2. Zhang L, Peoples RW, Oz M, Harvey-White J, Weight FF, Brauneis U. Potentiation of NMDA receptor-mediated responses by dynorphin at low extracellular glycine concentrations. *J. Neurophysiol.* 1997 ; 78 : 582-90.
3. Ceccherelli F, Gagliardi G, Ruzzante L, Giron G. Acupuncture modulation of capsaicin-induced inflammation : Effect of intraperitoneal and local administration of naloxone in rats. A blinded controlled study. *J. Altern. Complement Med.* 2002 ; 8 : 341-9.
4. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl. Int.* 1994 ; 1 : S647-9.
5. Niwa M, Kozawa O, Matsuno H, Kanamori Y, Hara A, Uematsu T. Tumor necrosis factor-alpha-mediated signal transduction in human neutrophils : involvement of sphingomyelin metabolites in the priming effect of TNF-alpha on the fMLP-stimulated superoxide production. *Life Sci.* 2000 ; 66 : 245-56.
6. Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, Takato T,

- Susami T, Koizumi Y, Okai-Matsuo Y, Toyo-Oka T. Peroxynitrite production by T NF-alpha and IL-1beta : implication for suppression of osteoblastic differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000 ; 278 : E1031-7.
7. Rodenas J, Carbonell T, Mitjavila MT. Different roles for nitrogen monoxide and peroxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 2000 ; 28 : 374-80.
  8. Peleg II, Wilcox CM. The role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002 ; 34 : 117-25.
  9. Sermon BA, Eccleston JF, Skinner RH, Lowe PN. Mechanism of inhibition by arachidonic acid of the catalytic activity of Ras GTPase-activating proteins. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271 : 1566-72.
  10. Signorello MG, Pascale R, Leoncini G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002 ; 32 : 279-84.
  11. Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 1999 ; 128 : 853-9.
  12. Wang JQ, Mao L, Han JS. Comparison of the antinociceptive effects induced by electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation in the rat. *Int. J. Neurosci.* 1992 ; 65 : 117-29.
  13. Guo HF, Cui X, Hou Y, Tian J, Wang X, Han JS. C-fos proteins are not involved in the activation of preproenkephalin gene expression in rat brain by peripheral electric stimulation. *Neurosci. Lett.* 1996 ; 207 : 163-6.
  14. Huang C, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2Hz but not 100Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci. Lett.* 2000 ; 294 : 159-62.
  15. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994 ; 91 : 12013-7.
  16. Oyanagui Y, Sato S, Inoue M. Inhibition of carrageenan-induced paw edema by superoxide dismutase that binds to heparan sulfates on vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 1991 ; 42 : 991-5.
  17. Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG. The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclooxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience*, 1999 ; 93 : 775-81.
  18. Khasar SG, Ouseph AK, Chou B, Ho T, Green PG, Levine JD. Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? *Neuroscience*, 1995 ; 64 : 1161-5.

19. Sann H, Pierau FK. Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Z. Rheumatol.* 1998 ; 57 : 8-13.
20. Kanaan SA, Saade NE, Haddad JJ, Abdelnoor AM, Atweh SF, Jabbur SJ, Safieh-Garabedian B. Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice : A new model for inflammatory pain. *Pain.* 1996 ; 66 : 373-9.
21. Kanaan SA, Poole S, Saade NE, Jabbur S, Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *J. Neuroimmunol.* 1998 ; 86 : 142-50.
22. Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 1994 ; 654 : 15-26.