

원저

Cold-Restraint 스트레스 유발 위점막손상에 미치는 고빈도 120Hz 전침의 효과

조미형 · 최병태* · 장경전

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실 · 해부학교실*

Abstract

The Effects of 120Hz High Frequency Electroacupuncture on the Cold-Restraint- Induced Gastric Mucosal Damages

Jo Mee-hyeong, Choi Byung-tae* and Jang Kyung-jeon

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

Objective : The present studies investigated the effects of 120 Hz high frequency electroacupuncture(EA) on the stress-induced stomach dysfunction in relation to its effect on the level of stress hormone and gastric mucosal damages. The gastric mucosal injury was induced by cold-restraint stress and two acupoints corresponding to Zusanli and Sanyinjiao in man were used.

Methods : Cold-restraint stress produced typical gastric lesions in all rats of the stressed groups, but the number of ulcers as well as the mean ulcer diameter were reduced by 120 Hz EA pre-treatment. The cold-restraint stress also induced an increase in catecholamine response involving epinephrine, norepinephrine and dopamine, but a slight decline were observed in EA pre-treated rats compared with cold-restrained rats.

Results : The degranulation value of gastric mast cell was significantly higher in cold-restrained rats than in control ones. However, with the significant reduction of degranulation values of gastric mast cells in EA pre-treated rats compared with cold-restrained ones, PGE₂ content in the gastric mucosa of EA pre-treated rats was also different from that observed in cold-restrained rats.

* 이 논문은 2003년도 동의대학교 교내 일반연구비 지원에 의하여 연구되었음(과제번호 2003AA000).

· 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

Cold-restraint stress induced an elevated mRNA expression of pro-inflammatory gene such as cyclooxygenases-2 and tumor necrosis factor(TNF)- α , but these expression were down-regulated in EA pre-treated rats. Immunohistochemical analysis showed that while the inhibitory- α B α and TNF- α immunorection in the surface epithelium of the stomach tended to increase, both reactions in the EA pre-treated rats showed similar pattern as observed in controls.

Conclusions : These results suggest that 120 Hz EA may act as a therapeutical means for gastric mucosal damages through a activation of pituitary adrenal system. It could be concluded that 120 Hz high frequency electroacupuncture affords a good protective potential against stress-induced gastrointestinal dysfunction.

Key words : electroacupuncture, cold-restraint stress, gastric mucosal damages, activation of pituitary adrenal system

I. 緒 論

스트레스는 내외적 자극에 의해 체내 항상성과 조화가 깨어지는 상태를 말하며 자가면역성, 감염성 및 신경퇴화성 질환(neurodegenerative disease), 암 등 다양한 질병과 연관되어 있다^{1)~3)}. 스트레스에 의한 위궤양은 산성의 위액작용에 의해 야기되는 소화성 궤양(peptic ulcer)의 일반적인 형태일 뿐 아니라 빈발하는 질환형태로 일반 생활에 지대한 영향을 준다⁴⁾.

흰쥐를 이용한 cold-restraint 스트레스는 저온과 구속이라는 두가지 스트레스 원을 혼합한 모델로서 스트레스 연관 질환 특히 육안으로 관찰 가능한 위궤양 형성 연구에 매우 널리 쓰인다^{5)~6)}. 이 실험 모델은 스트레스의 고전적인 신경내분비 반응(neuroendocrine response)을 유발할 수 있을 뿐 아니라 다양한 스트레스 원 인체에 미치는 영향에 응용할 수 있다.

현재까지 cold-restraint 위궤양의 형성과정에 대해 충분히 설명되어 있지 않으나 위근육 수축, 위점막 미세순환 저해, 비만세포 탈과립, 여러 biogenicamine과 활성 산소생성이 급성 위손상과 연관되어

있는 것으로 알려져 있다^{7)~9)}. 또한 이같은 급성 스트레스에 대한 반응은 시상하부-뇌하수체-부신을 연결하는 축과 교감신경계 활성이 관여하며¹⁾, 대부분 질환에 있어 매우 중요한 요인인 심리적 요인에 의한 혈압, catecholamine, cortisol 분비 증가 등과 함께 면역기능에도 영향을 미친다^{10)~12)}.

위궤양 형성과정에서 점액세포에서 분비되며 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질 및 proteoglycan에서 구성된 물질인 점액질은 매우 중요한 인자로 위장관내 물리·화학적 보호, 윤�활작용, 세포막 근접 영역의 환경조성에 관여한다^{13)~14)}. Prostaglandin은 염증과 관련된 cyclooxygenases(COX)-2에 의해 형성되는데 COX-2는 위장관에서 보통 관찰되지 않으나 *Helicobacter pylori* 감염, 위궤양, 암형성(carcinogenesis), 위점막 스트레스 ischemia/reperfusion 노출될 때 증가한다^{15)~16)}.

염증반응은 필수적인 숙주방어체계(host-defense mechanism)로 lipopolysaccharide, tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1과 같은 사이토카인, H₂O₂(hydrogen peroxide), 고산소/저산소(hyperoxia/hypoxia), 여러 화학요법 약물 등의 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다¹⁷⁾. 염증 유발 물질에 노출되면 세포는 세포막 연접에 관여하

는 단백질과 COX, lipoygenases 등과 같은 아라키돈산(arachidonic acid) 대사과정의 중요 효소, 그리고 염증성 사이토카인과 그 수용체 등을 암호화하고 있는 유전자들이 활성화 된다^{18),19)}. 이들 유전자의 대부분은 프로모터 영역에 nuclear factor(NF)- κ B가 결합할 수 있는 자리가 존재하며 이의 활성화는 거의 모든 염증유발 물질에 의해 유도된다²⁰⁾.

침은 오랫동안 위장관장애에 임상적으로 사용되어져 왔으며 현재도 위궤양, 십이지장궤양, 및 기능적 소화관장애에 대한 치료 및 연구가 이루어지고 있다^{21),22)}. 위장관장애에 대한 침자극점은 대체로 하지에 위치하고 있으며 이러한 자극은 중추신경계를 통한 교감신경 활성화와 corticosterone 생성을 저하시킬 가능성을 가지고 있으나 위장관장애에 침침을 적용한 연구는 많지 않다²³⁾.

따라서 본 연구는 스트레스에 의한 급성 위궤양 형성 모델로 널리 쓰이고 있는 cold-restraint 유발 위손상 모델에 고빈도 120Hz 전침(electroacupuncture)을 적용했을 때 나타나는 실제적 효과를 판정한 후, 혈장 catecholamine 분석, 위조직 자체의 prostaglandin E₂(PGE₂) 생성, 비만세포 탈과립 정도, 점액장벽 차이와 더불어 NF κ -B를 중심으로한 염증관련 인자에 대한 전사수준과 단백질 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 면역조직화학적 검사를 통해 연구하였다.

II. 材料 및 方法

1. 실험동물 및 Cold-Restraint 스트레스

8주된 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 Taconic & SamYuk Co.로부터 구입하여 2주간 자유식이 법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였

다. 48시간 물은 공급한 채 절식시킨 후 대조군, 120 Hz 전침처치한 전침군, cold-restraint 스트레스만 가한 CRS군, 전침처치한 후 cold-restraint 스트레스를 가한 EA+CRS군으로 나누어 각 군당 8마리씩 배정하였다. Cold-restraint 스트레스는 Senay와 Levine²⁴⁾의 방법에 따라 특별히 제작된 케이스에 꼬리를 노출시키고 고정한 후 4±1°C 저온실에 3시간 방치하였다.

2. 전침 자극

스테인레스 0.25mm 침을 전침기(세창메디칼, SM-600)에 연결하여 120 Hz 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. 위궤양 관찰

10% chloral hydrate(350mg/Kg i.p.)로 마취한 후 위를 절취하여 대만부위를 따라 절개하고 찬 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 세척한 위를 cold plate에 놓고 핀으로 고정한 후 해부 현미경하에서 위점막에 나타나는 손상부위를 관찰하고 계수하였으며 병변의 긴 직경을 측정하였다. 궤양지수(ulcer index)는 0, 무증상; 1, 점막부종과 점상출혈; 2, 1~5개의 작은 궤양(1~2mm); 3, 5개 이하의 작은 궤양과 개의 중간크기 궤양(3~4mm); 4, 2개 이하의 중간크기 궤양과 1개의 큰 궤양(4mm 이상); 5, 위천공 등으로 나누어 그 평균치를 궤양지수로 삼았다.

4. 혈액채취 및 혈장 Catecholamine 측정

심장천자를 통해 혈액을 채취하였다. 혈액을 EDTA-2Na 용기에 주입하여 잘 섞고 4°C 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. Ca-

tecolamine 측정을 위해 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Bio-Rad, USA), Waters 712 Wisp autosampler, 460 electrochemical detector를 사용하였다.

5. RT-PCR 을 이용한 RNA 발현 분석

위체부를 절취하여 homogenize시킨 후 TRIzol을 이용하여 조직에서 RNA를 추출하였다. 1ml의 TRIzol에 200 μ l chloroform을 넣은 후 10초간 vortex하고, 냉하에 10분간 방치하였다. Microcentrifuge로 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합한 후 천천히 흔들어 주었다. 그리고 microcentrifuge를 이용하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet에 70% EtOH를 넣고 vortex한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC(diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μ 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 μ l의 M-MLV RT를 다시 가하고, DEPC-water로 부피가 20 μ l가 되도록 하였

다. 이 20 μ 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 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 Table 1과 같으며 sense primer와 antisense primer를 혼합하여 1 μ l를 가하고, master mixture에 최종부피가 20 μ l 되도록 멸균 증류수를 가하였다. Predenaturation 95 $^{\circ}$ C, 10 min, denaturation 95 $^{\circ}$ C 1분, annealing 50 $^{\circ}$ C 1분, elongation 72 $^{\circ}$ C 1분을 38 cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 수행하였다. 각 PCR products는 10 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 100V 조건에서 15분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

6. PGE₂ 측정

PGE₂분석은 PGE₂ immunoassay kit (R&D systems, Minneapolis)를 사용하였다. 위체부를 PBS로 homogenize시킨 후 5,000 rpm에 5min 동안 원심분리하였으며 그 상층액을 manufacturers assay buffer ED₁로 희석시켰다. 희석한 용액을 PGE₂ conjugate, PGE₂ antibody and pNPP sub-

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
IL-1 β	Sense	GTCTTTCATCACACAGGA
	Antisense	TCCTGTGTGATGAAAGAC
IL-6	Sense	CTGTTCTGCTTTCTCATATG
	Antisense	CTGTTCTGCTTTCTCATATG
TNF- α	Sense	CTCCTCTCCGCATCAAGAG
	Antisense	TGGGCTCATACCAGGGCTT
COX-2	Sense	CACTCAGGATGCTCCTGTTTG
	Antisense	TCTTTGCCAGCACTTCACTCA
GAPDH	Sense	GAACATCATCCCTGCATCCA
	Antisense	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA

strate로 순차적으로 반응시키고 VERSAmax tunable microplate reader(Molecular devices, CA)를 사용하여 405nm에서 측정하였으며 PGE₂ 수준은 SOFTmax PRO(Molecular devices)를 사용해 계산하였다.

7. 동결절편제작 및 조직병리학적 관찰

위를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 30% sucrose 용액에 3일간 둔 후 cryostat로 10 μ m 동결절편을 제작하였다. 위의 조직병리학적 관찰을 위하여 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff's(PAS)염색을 실시하였다.

8. 비만세포 탈과립에 대한 조직화학적 관찰

0.25% toluidine blue(pH 4.0)로 염색하고 현미경 X400 시야에서 검경하여 다음과 같이 탈과립지수를 산출하였다. 탈과립지수(%)=[(정상 \times 0)+(경도 \times 50)+(강도 \times 100)]/비만세포의 총수]

9. 위표면상피세포의 점액벽 측정

위표면상피세포의 산성점액질과 중성점액질을 모두 염색하는 alcian blue(AB) pH 2.5-PAS 염색법을 한 후 현미경하에서 micrometer로 점액벽 두께를 측정하였다.

10. 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해 10 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum(Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 NF- κ Bp65, inhibitory (I)- κ B α , inducible nitric oxide synthase(iNOS), IL-1, TNF- α , COX-2 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200 : 1로 희석하여 4℃ 습실에 16시

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

11. 통계처리

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

III. 結 果

1. 위점막 손상 관찰

대조군과 전침군의 위점막에서 점상출혈만이 일부 관찰되는데 비해 CRS군과 EA+CRS군 모두 심한 위점막 손상과 더불어 출혈을 관찰되었다. 각 군의 위점막에 관찰되는 평균 궤양수를 살펴보면 대조군과 전침군이 각각 0.75 \pm 0.41개, 0.88 \pm 0.23개로 통계적 유의성을 나타내지 않았으나 CRS과 EA+CRS군은 각각 5.0 \pm 0.53개, 4.0 \pm 0.37개로 대조군에 대해 유의성(P<0.005)을 보여주었다(Fig. 1). 위점막 궤양의 평균 직경을 비교해 보면 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 0.93 \pm 0.64mm, 0.96 \pm 0.22mm, 3.15 \pm 0.30mm, 2.77 \pm 0.25mm로 대조군에 비해 CRS군과 EA+CRS군은 각각 P<0.005, P<0.01 유의성을 보여주었다(Fig. 2).

관찰된 위점막 손상을 바탕으로한 궤양지수를 살펴보면 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 1.63 \pm 0.38, 1.75 \pm 0.63, 3.63 \pm 0.18, 3.63 \pm 0.26

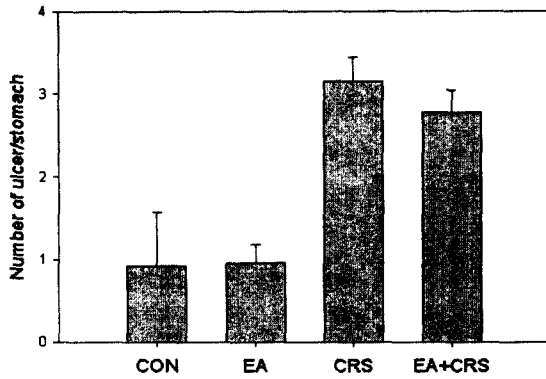


Fig. 1. Comparisons of number of ulcer in control(CON), electroacupuncture(EA), cold-restraint stress(CRS) and CRS after EA treatment groups(EA+CRS).

The significant increase of gastric lesion formation were observed in CRS and EA+CRS compared with control ones, but slight decline in EA+CRS with CRS were detected. *, P<0.005 when compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats.

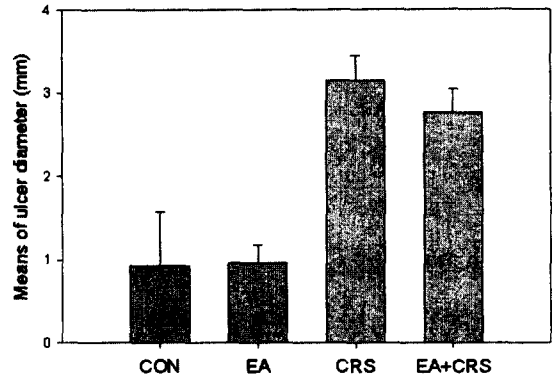


Fig. 2. Comparisons of means of ulcer diameter.

Cold-restraint stress induced much longer gastric mucosal lesions than observed in controls, but these were reduced in EA+CRS. *P<0.005 and **P<0.01 when compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

을 나타내어 대조군에 비해 CRS군과 EA+CRS군은 유의성(P<0.005)를 보여주었다(Fig. 3). CRS군과 EA+CRS군을 비교해 볼 때 현저한 유의성을 보여주지 않았으나 CRS군에 비해 EA+CRS군은 위점막에 관찰되는 평균 궤양수와 궤양직경이 줄었다.

2. 조직병리학적 관찰

대조군과 전침군에서 심한 위점막 손상은 관찰되지 않았으나 일부 자유표면상피세포의 탈락이 관찰되었으며 CRS군과 EA+CRS군에서 더 현저한 탈락이 관찰되었다. 특히 CRS군과 EA+CRS군에서 관찰되는 위궤양 부위에서 점막하층에 많은 염증세포침윤, 심한 상피세포의 탈락과 더불어 위점막의 정형화된 구조가 상실된 부위도 관찰되었다.

3. 혈장 Catecholamine 분석

교감신경 흥분 작용을 나타내는 혈장 catechola-

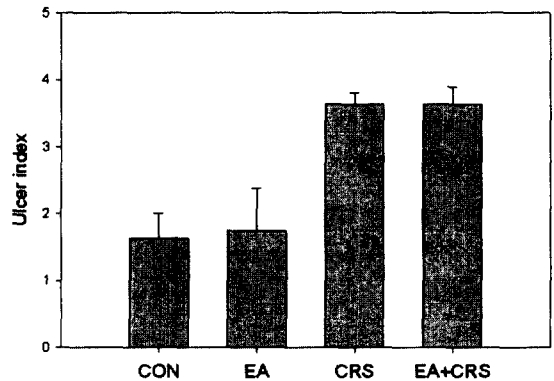


Fig. 3. Comparisons of means of ulcer index.

The ulcer index were significantly increased in CRS and EA+CRS. *P<0.005 when compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control; EA, electroacupuncture; CRS, cold-restraint stress; EA+CRS, CRS after EA treatment.

mine 3분획 분석에 의한 epinephrine의 변화를 비교해 보면 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군은 각각 1,049.5±298.8pg/ml, 166.3±46.4pg/ml, 1,561.7

$\pm 178.1\text{pg/ml}$, $1,281.5 \pm 172.8\text{pg/ml}$ 로서 대조군에 비해 전침군은 유의성($P < 0.01$) 있게 감소하고 CRS군은 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 4). 그러나 EA+CRS군은 대조군에 대해 유의성을 나타내지 않았다.

Norepinephrine의 양을 비교해 보면 대조군은 $387.0 \pm 94.8\text{pg/ml}$ 인데 비해 전침군은 $103.8 \pm 51.0\text{pg/ml}$ 로 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였으나 CRS군 및 EA+CRS군은 $634.5 \pm 114.9\text{pg/ml}$, $438.7 \pm 84.03\text{pg/ml}$ 로 증가하였으나 유의성은 없었다. Norepinephrine 양도 CRS군에 비해 EA+CRS군이 다소 감소하였다(Fig. 5). Dopamine 양은 대조군이 $93.2 \pm 2.6\text{pg/ml}$ 인데 비해 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 $172.6 \pm 19.4\text{pg/ml}$, $243.0 \pm 22.6\text{pg/ml}$, $205.8 \pm 10.5\text{pg/ml}$ 로서 모두 유의성($P < 0.005$) 있게 증가하였으며 CRS군에 비해 EA+CRS군이 다소 감소하였다(Fig. 6).

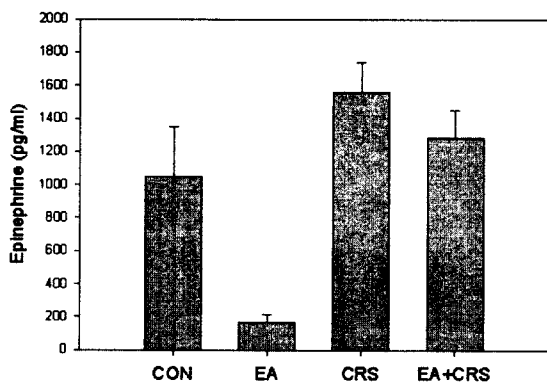


Fig. 4. The changes in plasma epinephrine level of EA and CRS were statically significant compared to the controls, but there was no significant changes with EA+CRS.

* $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$ when compared with controls. All bars indicate means \pm SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

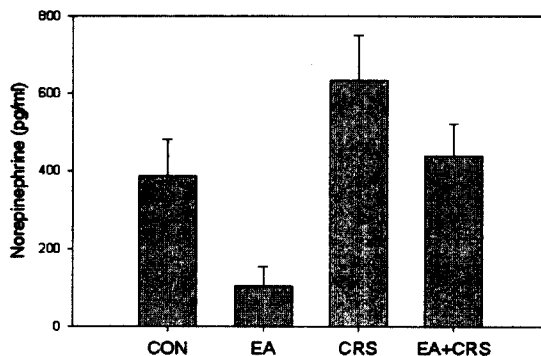


Fig. 5. Only the plasma norepinephrine levels of EA were significantly reduced when compared with controls.

* $P < 0.05$ when compared with controls. All bars indicate means \pm SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

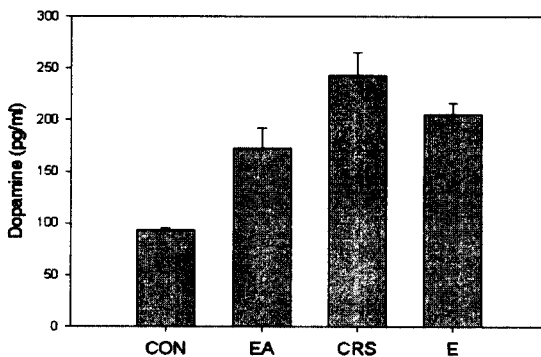


Fig. 6. The changes in plasma dopamine level of EA, CRS and EA+CRS groups were statically significant compared with controls.

These levels of EA+CRS were slightly reduced compared with CRS. * $P < 0.005$ when compared with controls. All bars indicate means \pm SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

4. 위조직의 PGE₂ 양 분석

염증조직과 위점막의 점액형성에 주요한 역할을

담당하는 PGE₂의 양을 비교해 보면 위조직 0.2g당 대조군에서 44,890±3,508pg이며 전침군은 42,500±1,713pg, CRS군은 59,236±4,494pg, EA+CRS군이 53,480±4,443pg으로 대조군에 대해 CRS만 유의성(P<0.05)을 보여주었으며 CRS군에 비해 EA+CRS군의 PGE₂ 농도는 감소하였으나 유의성은 보여주지 않았다(Fig. 7).

5. 염증관련 유전자에 대한 위조직의 RT-PCR 위조직에 염증반응 유무를 알아보기 위해 염증관련 인자로 주요한 TNF- α , IL-1 β , IL-6을 비롯하여 염증 뿐 아니라 PGE₂ 형성에도 관련되어 있는 COX-2에 대한 mRNA 수준에서 발현을 관찰하였다. 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군의 mRNA 발현을 비교해 보면 COX-2와 TNF- α 의 mRNA 발현이 대조군에 비해 CRS군에 다소 증가하였으며 EA+CRS군에 다시 감소하였다. IL-1 β 와 IL-6는 모든 군에서 유사한 mRNA 발현을 보였다(Fig. 8).

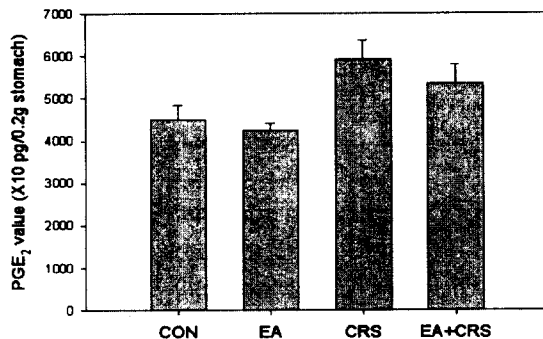


Fig. 7. Mean PGE₂ contents in gastric mucosa expressed as pg per 0.2g of tissues. Note significant increases only in CRS compared with controls.

* P<0.05 when compared with control groups. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

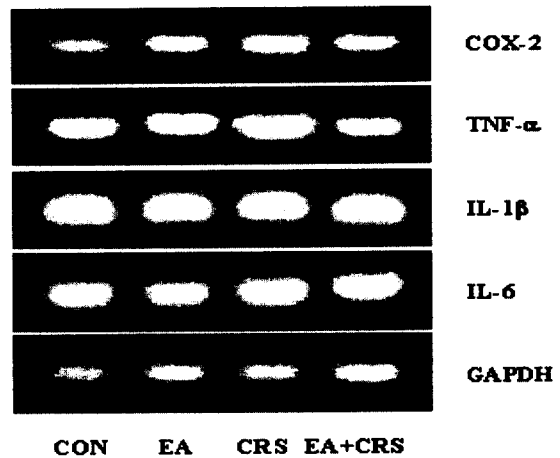


Fig. 8. Gel depicting RT-PCR products for COX-2, TNF- α , IL-1 β and IL-6 from rats stomach. Note that COX-2 and TNF- α mRNA expression of CRS was slightly elevated compared with controls, but reduced in EA+CRS.

There were no significant changes of IL-1 β and IL-6 expression in all groups. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

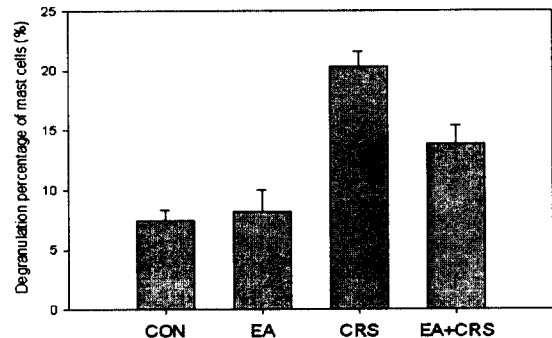


Fig. 9. Comparisons of degranulation value of gastric mast cells.

CRS and EA+CRS groups were statically significant compared with controls, but EA+CRS were significantly reduced compared with CRS. * P<0.005 when compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment.

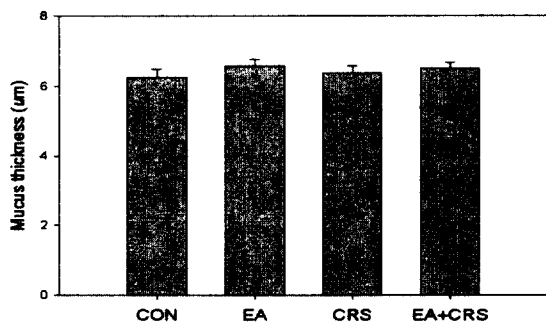


Fig. 10. The mucus thickness of the free surface epithelium in the stomach.

There were no significant changes in all groups compared with controls. All bars indicate means±SE of 8 rats. CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, CRS after EA treatment. Cold-restrained rats than observed in controls. X 400.

6. 비만세포 탈과립 관찰

위체부의 점막하층에서 관찰되는 대부분의 비만세포는 0.25% toluidine blue에 강하게 염색되었으나

일부 경도의 탈과립을 나타내는 비만세포가 관찰되었다. 모든 군에서 강도의 탈과립을 나타내는 비만세포는 관찰되지 않았다. 비만세포 탈과립지수를 비교해 보면 대조군이 $7.47 \pm 0.82\%$ 로서 전침군의 $8.17 \pm 1.82\%$ 와 유의성을 보이지 않았으나 CRS군과 EA+CRS군이 각각 $20.33 \pm 1.26\%$, $13.88 \pm 1.49\%$ 로 유의성($P < 0.005$)을 보였다. CRS군에 비해 EA+CRS도 유의성($P < 0.005$)있게 탈과립지수가 감소하였다(Fig. 9).

7. 위표면상피세포의 점액두꺼 관찰

AB pH 2.5-PAS 복합염색에 의한 위상피세포 점액질 양을 살펴보면 대조군에 비해 표면상피세포에서 점액양이 줄어들었으나 위소와상피세포에서 증가하였다. 각 군에 대한 점액두께를 측정해 본 결과 대조군, 전침군, CRS군, EA+CRS군이 각각 $6.25 \pm 0.23 \mu\text{m}$, $6.58 \pm 0.18 \mu\text{m}$, $6.38 \pm 0.20 \mu\text{m}$, $6.50 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 으로 나타나 유사하였다(Fig. 10).

Table 2. Immunohistochemical Reactions of Inflammation-Related Protein in the Stomach

Antibody	Region	CON	EA	CRS	EA+CRS
NF-κBp65	FSE	++	++	++	++
	GPE	0+	0+	0+	0+
I-κBα	FSE	++-+++	++-+++	++	++-+++
	GPE	+	+	0+	0+
COX-2	FSE	0	0+	0	0+
	GPE	0	0	0	0
TNF-α	FSE	0+	0+	0-,+++	0-,+++
	GPE	0	0	0	0
IL-1α	FSE	0	0	0,+++	0,+++
	GPE	0	0	0	0
iNOS	FSE	+++	+++	++	+++
	GPE	0+	0+	0+	0+

0-+++ indicate the relative intensity of the reaction : +++, intense ; ++, moderate ; +, weak ; 0, absent.

Abbreviations : FSE, free surface epithelium of the stomach ; GPE, gastric pit epithelium of the stomach; CON, control ; EA, electroacupuncture ; CRS, cold-restraint stress ; EA+CRS, cold-restraint stress after electroacupuncture treatment ; NF, nuclear factor ; I, inhibitory ; COX, cyclooxygenases ; TNF, tumor necrosis factor ; IL, interleukin ; iNOS, inducible nitric oxide synthase ; ', mainly observed in the ulcer region.

8. 염증관련 인자에 대한 면역조직화학적 분석

소화성 궤양에서 주요한 보호작용을 하는 위상피 세포의 염증관련 인자에 대한 면역조직화학적 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 대조군의 NF- κ Bp65와 I- κ B α 는 표면상피세포에서 중등도 또는 이상의 반응으로 보이며 위소와상피세포에서는 흔적적 내지 약한 반응을 보였다. 대조군에 비해 CRS군의 I- κ B α 가 다소 감소하며 EA+CRS군에서 회복되었다. COX-2는 대조군에서 반응을 나타내지 않았으나 특이하게 전침군과 EA+CRS군의 표면상피세포에서 약한 반응을 보였다.

TNF- α 와 IL-1 α 의 면역반응은 대조군의 표면상피세포에서 약한 TNF- α 를 보였으며 CRS군과 EA+CRS군에서도 유사한 반응을 보이거나 궤양형성 부위에서 중등도의 반응을 나타내는 세포가 관찰되었다. iNOS는 표면상피세포에서 강한 반응을, 위소와에서 흔적적 내지 약한 반응을 보였으나 CRS군의 표면상피세포 면역반응이 감소한 반면 EA+CRS군에서 다시 증가하였다<Table 2>.

IV. 考 察

전통적으로 소화성 궤양은 점액장벽과 위내강내 acid peptic attack 사이의 불균형으로 알려져 있다. 즉 위산과 pepsin 복합체는 공격인자(offensive factor)로 mucin-bicarbonate 분비의 점액층, 지질층, 세포증식, prostaglandins, urogastrone/epidermal healing factor가 방어인자(defensive factors)로 보고있다^{25),26)}. 소화성 궤양 모델로서 잘 알려진 cold-restraint 유발 궤양형성 과정에 대한 기작은 명확히 밝혀져 있지 않으나 미주신경의 외과적이나 약리적 차단이 궤양형성을 저해하는 것으

로 보아 위산분비보다 자율신경계의 관여 가능성이 높다²⁷⁾.

전침의 자율신경계 조절에 의한 위장관 질환에 대한 적용 연구는 이루어지고 있으나 이에 대한 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 해부생리학적으로 위교감원심성신경은 척수의 중하부흉수분절에서 나와 내장신경을 거쳐 복강신경절에 도달하는데 7~12번째 늑간신경 자극은 내장신경내 분절반사(segmental reflex)를 형성함으로 복부에 침과 유사한 자극을 주었을 때 위교감원심성신경을 통해 위반사(gastric reflex)를 저해한다^{28),29)}. 하지에 동일한 자극을 주었을 때 대퇴신경과 좌골신경구심성신경 흥분에 따른 반사반응으로 위미주신경원심성신경 활성을 증가시켜 위활성 증가를 유도한다²⁹⁾.

침자극의 위장관에 미치는 영향에 대한 연구를 보면 중산리에 대한 전침자극은 위연동 운동을 촉진 또는 저하시키는데 위산분비 감소에 대한 효과는 내장원심성신경에 의한다^{23),30)}. 위산분비에 대한 여러 자극의 영향을 살펴보면 여타 자극보다 전침과 transcutaneous electrical nerve stimulation가 현저한 위산분비 저해작용을 나타내고 전통적인 침자극이나 laser acupuncture와 같은 미약한 자극에서는 작용하지 않으며 특히 자극 부위가 침구학에서 지정된 지점에 자극할 때만 위산감소가 나타났다³¹⁾.

전침에 대한 질환 치유 메커니즘은 동통을 중심으로 한 척수와 시상내 opioid 함유 신경원의 활성화에 대한 보고가 주를 이루고 있다. 전침이 naloxone, opioid antagonist 등에 의해 저해되는 것으로 보아 endogenous opioid system이 관여하며 특정 빈도에 따라 중추신경계내 상이한 opioid system이 활성화되는 것으로 알려져 있다^{32),33)}. 그러나 전침이 위산분비 같은 내장운동성에 미치는 영향을 신경성, 호르몬, 방분비메커니즘 등 다양한 원인에 의한 복합적인 효과로 볼 뿐 질환과 연관시킨

연구는 드물다³¹⁾.

본 연구에서 소화성 궤양에 고빈도 120 Hz 전침을 하지의 족삼리과 삼음교에 해당하는 혈위에 30분간 적용시켰을 때 육안적으로 cold-restraint에 의한 위궤양형성 과정에 영향을 미침을 알았다. 대조군에 비해 전침처치만을 했을 때 궤양형성이 미비하나 CRS 자극에 의한 궤양이 형성이 유의성 있게 증가하였다. CRS군과 EA+CRS군과 비교해 보았을 때 관찰되는 평균 궤양수와 궤양당 직경이 CRS군에 비해 전침처치 후 CRS자극을 가한 EA+CRS군에서 감소하였었다. 이는 cold-restraint 유발 위궤양에 대한 전침의 완화작용을 육안적으로 관찰한 것이다.

스트레스에 대한 반응에 작용하는 두가지 주된 작용계는 sympathetic adrenal-medullary system과 epinephrine, norepinephrine 및 corticosteroids 분비에 관여하는 pituitary adrenocortical system이다^{12),34)}. 즉 외부의 극심한 변화 즉 급성스트레스에 대한 항상성조절 반응 중 하나가 스트레스 호르몬으로 알려진 endogenous catecholamine 분비이다³⁵⁾.

부신수질에서 분비되는 이들 호르몬합성은 부신에 분포는 교감신경과 부교감신경에 의하여 조절되는 잘 알려져 있다. Cold-restraint에 의한 위궤양형성을 저해하는 약물이 중추신경계에 의한 norepinephrine과 dopamine 자극저해와 gamma-aminobutyric acid 저해작용을 증가시킴으로서 효과를 나타내는 것으로 보아 자율신경계가 관여하고 있다³⁶⁾⁻³⁷⁾.

설치류를 이용한 cold-restraint 스트레스 연구도 순환 catecholamine 수준 증가, 특히 norepinephrine 증가를 보고하고 있으나 serum norepinephrine 농도 증가와 더불어 hepatic glutathione가 감소하는 것으로 보아 catecholamine과 더불어 다른 요인 즉 다인성 내분비인자에 의함을 보고하고

있다^{6),12)}. Tooth-pulp 자극 또한 norepinephrine, epinephrine, dopamine의 농도를 증가시킨다³⁸⁾. 스트레스에 의한 이들 호르몬은 면역반응 조절에 관여하여 다양한 질환의 원인이 되고 있다^{12),39)}.

본 실험에서도 cold-restraint 스트레스를 가하였을 때 epinephrine, norepinephrine, dopamine 모두 현저히 증가하였다. 특히 대조군에 비해 CRS군의 epinephrine과 dopamine이 유의성을 보여주었다. 이로 보아 Cao 등¹²⁾의 보고와 같이 cold-restraint 모델의 위궤양 형성에 스트레스 호르몬이 주요한 역할을 담당함을 알 수 있다. 그러나 CRS군에 비해 EA+CRS군이 이들 호르몬이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 대조군에 비해 전침군에서 epinephrine과 norepinephrine이 현저히 감소하는 것으로 보아 전침의 효과는 중추신경계를 통하여 자율신경계에 영향을 미치는 pituitary adrenocortical system가 관여함을 유추할 수 있다.

중추신경계에서 opioid 형성은 다양한 자극에 의해 유도되기도하나 전침에 의한 분비기전에 대해 잘 알려져 있다. 2 Hz 같은 저빈도 전침은 뇌와 척수 enkephalin과 β -endorphin 분비하며 μ -와 δ -opioid receptor가 관계하며 100 Hz 같은 고빈도 전침은 척수에서 dynorphin을 분비하며 척수배각(dorsal horn)의 κ -opioid receptor가 관여한다^{40),41)}. Tooth-pulp 자극시 증가한 plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine 수준이 전침 자극에 의하여 저하되나 opioid antagonist인 naloxone을 처리하면 효과가 저하하는 것으로 보아 endogenous opioid를 통해 스트레스 반응을 저하시킨다³⁸⁾. 이는 위장관내 opioid peptide와 이들 수용체가 위장관 생리에 관여하며 스트레스성 위궤양의 병리과정에 관여할 가능성이 있음을 시사한다⁴²⁾.

대부분 포유동물에 COX를 가지며 arachidonic acid에서 prostanoids(PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGJ₂) 등을 변환시키는데 관여한다. 이중 COX-1이 구조

적 성분임에 비해 COX-2는 염증과 관련한 과도한 prostaglandin 형성에 관여한다⁴³⁾. 그러나 생리적으로 PGE₂는 위에서 혈류량을 증가시키고 위산분비를 저해하여 위보호 기능을 한다^{15),16)}. Cold-restraint 유발 위궤양 형성에 met-enkephalin 유사체 또는 enkephalin을 복강 투여하였을 때 궤양에 대한 보호작용을 나타내며 이 과정에 prostaglandin이 작용한다⁴⁴⁾.

본 실험에서 위조직의 PGE₂ 수준을 비교해 보면 대조군에 비해 CRS군이 유의성 있게 증가하였으나 EA+CRS군은 유의성을 나타내지 않았다. 이로 보아 위조직에 관찰된 PGE₂는 점액 형성과 관련된 생리적인 위보호 작용에 의한 PGE₂ 증가라기보다 위궤양 형성에 따른 일련의 염증반응에 의한 증가로 보인다. 따라서 전침처치가 cold-restraint 스트레스에 의한 PGE₂ 증가 저해함을 알 수 있다.

위궤양 형성과정의 염증관련 유전자(proinflammatory gene) 발현을 관찰하기 위하여 COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 검정하였다. IL-1 β 와 IL-6에 대한 mRNA 발현은 그 차이가 현저하지 않았으나 COX-2와 TNF- α 의 mRNA 발현은 CRS군에 증가하였으며 이는 EA+CRS군에서 다소 감소하였다. 이로 보아 전침처치가 위궤양 형성과정에서 증가되는 COX-2와 TNF- α mRNA 발현을 저해됨을 알 수 있다.

중추신경계가 매개된 cholinergic system을 통한 비만세포 자극은 스트레스 유발 위궤양에 주요한 병리적 요인이다⁴⁵⁾. Cold-restraint 스트레스를 주면 위점막 비만세포의 탈과립에 의해 평균 비만세포 관찰 수가 감소하는데 비해 위장관의 주된 prostaglandin이라고 알려져 PGD₂는 변화가 없으며 매우 높은 PGE₂가 관찰된다⁴⁶⁾. 이로 보아 장관점막 비만세포가 prostaglandin 형성에 관여하는 것은 잘 알려져 있으나 비만세포 외 prostaglandin을 변화

시키는 요인이 있음을 알 수 있다^{47),48)}. 본 실험에서 비만세포의 탈과립 정도가 대조군에 비해 CRS군에서 증가하며 전침처치는 이러한 증가를 저해하였다. 이는 측정된 PGE₂의 변화와도 일치하고 있다.

점액질은 점액세포에서 분비되는 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질 및 proteoglycan으로 구성된 물질로 기능에 대해 불분명한 점이 많으나 장관내 물리·화학적 보호, 운환작용 등 관여한다^{13),14)}. Cold-restraint 스트레스 모델 뿐 아니라 스트레스성 위궤양에 있어 점액생성능 감소는 매우 중요한 요인으로 알려져 있다^{49),50)}. 본 실험에서 이러한 점액의 양의 현저한 변화는 관찰되지 않았으나 병리조직학적으로 CRS군에서 많은 탈락된 위상피세포를 관찰할 수 있으며 궤양형성 부위에는 많은 염증세포침윤과 더불어 부정형화된 위점막 구조를 관찰할 수 있었다.

염증반응에 있어 정상적인 환경에서 NF- κ B는 모든 유핵세포의 세포질에서 p50/p65 subunits의 heterodimer로 존재하며, inhibitory subunit인 I- κ B와 결합하고 있다. 염증성 자극이 주어지면 수분내에 I- κ B 인산화 효소의 활성화로 인해 I- κ B로부터 자유로워진 NF- κ B는 세포핵 속으로 이동하고, NF- κ B 결합영역이 있는 염증 유전자의 프로모터에 결합하여 그 유전자의 전사를 일으킨다. NF- κ B에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 iNOS, COX-2 및 TNF- α 등이며, 이들이 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

면역조직화학적 결과로 대조군에 비해 위표면상피세포의 I- κ B α 와 iNOS 면역반응이 cold-restraint 스트레스시 감소하며 TNF- α 와 IL-1 α 는 위궤양 형성 부위에 강한 반응을 나타내었다. I- κ B α 와 iNOS 면역반응은 전침처치시 대조군과 유사한 반응을 나타내었다. I- κ B α 의 분해가 NF- κ B를 통한 염증관련 유전자를 발현한다는 점으로 보

아 염증반응이 저해됨을 알 수 있다. Nitric oxide 생성은 위장관상피 장벽기능과 밀접한 연관성을 가지는데 외인성 위출혈이나 손상을 저해시킨다^{9),51)}. CRS군의 nitric oxide 생성에 관여하는 iNOS 면역반응은 감소는 위보호 기능의 결여를 의미한다.

이상의 결과로 보아 하지의 족삼리와 삼음교에 해당하는 혈위에 자침하여 고빈도 120 Hz 전침처치를 하였을 때 육안적 위궤양 형성에 대한 완화효과를 관찰 할 수 있었다. 이를 혈장 catecholamine 분석으로 보아 중추신경계를 매개로 한 자율신경계를 통한 pituitary adrenal system의 작용이 관여되며 결과적으로 위조직의 PGE₂ 변화, 비만세포 탈과립을 조절할 뿐 아니라 염증인자의 mRNA 및 단백질 수준 발현이 지체시킴으로서 위궤양이 억제됨을 알 수 있다. 따라서 고빈도 120 Hz 전침은 급성 스트레스에 의한 다양한 위장관장애 및 질환에 임상적으로 적용 가능하며 이에 대한 보다 정확한 메커니즘 규명을 위해서는 전침에 의한 자율신경계 전달물질을 포함한 보다 심화된 연구가 요구된다.

V. 結 論

고빈도 120 Hz 전침을 족삼리와 삼음교에 처치하였을 때 cold-restraint 스트레스 유발 위궤양에 미치는 영향을 육안적으로 살펴보고 혈장 catecholamine 변화와 더불어 위조직의 PGE₂ 변화, 염증인자에 대한 mRNA 및 단백질 발현을 살펴보았다.

1. 전침에 의해 cold-restraint 스트레스에 의해 유도되는 평균 궤양수와 궤양직경이 줄었다.

2. 혈청 catecholamine은 대조군에 비해 CRS군에서 증가하는데 비해 전침처치는 이들 증가를 저

해하였다.

3. 전침처치는 cold-restraint 스트레스에 의한 위점막 비만세포의 탈과립을 저해하는 것과 같이 PGE₂ 양 증가도 저해하였다.

4. 위조직의 염증유전자 발현을 살펴보면 IL-1 β 와 IL-6 mRNA 발현 변화가 미약한 반면 COX-2와 TNF- α mRNA 발현은 대조군에 비해 CRS군에서 다소 증가하였으며 전침처치는 이를 저해시켰다.

5. 면역조직화학적 반응으로 보아 I- κ B α 와 iNOS는 cold-restraint 스트레스시 위표면상피세포에서 감소하며 TNF- α 와 IL-1 α 는 일부 궤양부위에서 강한 면역반응을 보였고, 전침처치시 I- κ B α 와 iNOS 면역반응은 대조군과 유사하였다.

이상의 결과로 보아 족삼리와 삼음교에 처치한 고빈도 120 Hz 전침은 pituitary adrenal system을 통해 위체부 손상을 억제함으로써 위궤양 저해 작용을 나타냄으로서 임상적으로 위장관장애 뿐 아니라 급성 스트레스에 연관된 질환에 적용 가능할 것으로 보여진다.

VI. 參考文獻

1. Fricchione GL, Stefano GB. The stress response and autoimmunoregulation. Adv. Neuroimmunol. 1994 ; 4 : 13-27.
2. Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. Social isolation stress enhanced liver

- metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci.* 2000 ; 31 : 1827-38.
3. Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J. Endocrinol.* 2001 ; 169 : 429-35.
 4. Soll AH. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 1990 ; 322 : 909-16
 5. Pare WP, Glavin GB. Restraint stress in biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 1986 ; 10 : 339-70.
 6. Henry D, Chertok F, Keys C, Jegerski J. Organizational and family systems factors in stress among ministers. *Am. J. Community Psychol.* 1991 ; 19 : 931-52.
 7. Garrick T, Leung FW, Buack S, Hirabayashi K, Guth PH. Gastric motility is stimulated but overall blood flow is unaffected during cold restraint in the rat. *Gastroenterology.* 1986 ; 91 : 141-8.
 8. Garg GP, Cho CH, Ogle CW. Ethacrynic acid and sulphasalazine inhibit the generation of leukotriene C4 in rat stomachs : a possible gastric anti-ulcer mechanism in cold-restraint-stressed rats. *Pharmacology.* 1992 ; 44 : 177-89.
 9. Coskun T, Yegen BC, Alican I, Peker O, Kurtel H. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction. Role of nitric oxide. *Dig. Dis. Sci.* 1996 ; 41 : 956-63.
 10. Ader R. Animal models in the study of brain, behavior and bodily disease. *Res. Publ Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 1981 ; 59 : 11-26.
 11. Simmons HF, James RC, Harbison RD, Patel DG, Roberts SM. Examination of the role of catecholamines in hepatic glutathione suppression by cold-restraint in mice. *Toxicology.* 1991 ; 67 : 29-40.
 12. Cao L, Filipov NM, Lawrence DA. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Neuroimmunol.* 2002 ; 125 : 94- 102.
 13. 小野謙三. 大腸の正常粘膜および上皮性腫瘍における粘膜の組織化學的 研究. *信州醫誌.* 1982 ; 30 : 110-39.
 14. Neutra MR, Forstner JF. Gastrointestinal mucus, synthesis, secretion and function. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, ed. Johnson LR, Raven Press, New York. 1987 ; 975-1009.
 15. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Schuppan D, Drozdowicz D, Kwiecien S, Majka J, Nakamura T, Hahn E. Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and-2. *Digestion.* 2001 ; 64 : 15-29.
 16. Konturek PC, Brzozowski T, Kwiecien S, Drozdowicz D, Harsch IA, Meixner H, Stachura J, Hahn EG, Konturek SJ. Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002 ; 451 : 191-202.
 17. Rastogi D, Ratner AJ, Prince A. Host-bacterial interactions in the initiation of

- inflammation. *Paediatr. Respir. Rev.* 2001 ; 2 : 245-52.
18. Sano H. A new mechanism of COX-2 in inflammation. *Ryumachi.* 2002 ; 42 : 560-72.
 19. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci.* 2002 ; 7 : 1899-914.
 20. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins : new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996 ; 14 : 649-81.
 21. Li SR, You SZ, Zhang SL. The research of a new way to apply laser acupuncture. *Zhen Ci Yan Jiu.* 1988 ; 13 : 179-83.
 22. Liu ZC, Sun FM, Shen DZ. Effect of acupuncture and moxibustion on antiobesity in the variation of plasma cyclic nucleotide and the function of vegetative nervous system. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1991 ; 11 : 83-6.
 23. Li Y, Tougas G, Chiverton SG, Hunt RH. The effect of acupuncture on gastrointestinal function and disorders. *Am. J. Gastroenterol.* 1992 ; 87 : 1372-81.
 24. Senay EC, Levine RJ. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967 ; 124 : 1221-3.
 25. Sanyal AK, Mitra PK, Goel RK. A modified method to estimate dissolved mucosubstances in gastric juice. *Indian J. Exp. Biol.* 1983 ; 21 : 78-80.
 26. Goel RK, Bhattacharya SK. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. *Indian J. Exp. Biol.* 1991 ; 29 : 701-14.
 27. Innes DL, Tansy MF. Gastric mucosal ulceration associated with electrochemical stimulation of the limbic brain. *Brain Res. Bull.* 1980 ; 5 : 33-6.
 28. Nosaka S, Sato A, Shimada F. Somatosplanchnic reflex discharges in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1980 ; 2 : 95-104.
 29. Sato A, Sato Y, Suzuki A, Uchida S. Neural mechanisms of the reflex inhibition and excitation of gastric motility elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Neurosci. Res.* 1993 ; 18 : 53-62.
 30. Zhou L, Chey WY. Electric acupuncture stimulates non-parietal cell secretion of the stomach in dog. *Life Sci.* 1984 ; 34 : 2233-8.
 31. Lux G, Hagel J, Backer P, Backer G, Vogl R, Ruppin H, Domschke S, Domschke W. Acupuncture inhibits vagal gastric acid secretion stimulated by sham feeding in healthy subjects. *Gut.* 1994 ; 35 : 1026-9.
 32. 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 : 117-129.
 33. 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.

34. Kunchandy J, Kulkarni SK. Involvement of central type benzodiazepine and GABAA receptor in the protective effect of benzodiazepines in stress-induced gastric ulcers in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1987 ; 285 : 129-36.
35. Stellpflug H, Wickings EJ, Nieschlag E. Operative stress during electroacupuncture and enflurane anaesthesia assessed by serum cortisol. *Prakt. Anaesth.* 1978 ; 13 : 483-8.
36. Yajima T, Ohno T, Nakamura K, Nakamura K. Effects of bromazepam on responses of mucosal blood flow of the gastrointestinal tract and the gastric motility to stimulation of the amygdala and hypothalamus in conscious cats. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1984 ; 83 : 237-48.
37. Saad SF, Agha AM, Amrin Ael-N. Effect of bromazepam on stress-induced gastric ulcer in rats and its relation to brain neurotransmitters. *Pharmacol. Res.* 2001 ; 44 : 495-501.
38. Han SH, Yoon SH, Cho YW, Kim CJ, Min BI. Inhibitory effects of electroacupuncture on stress responses evoked by tooth-pulp stimulation in rats. *Physiol. Behav.* 1999 ; 66 : 217-22
39. Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function : unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today.* 1997 ; 18 : 418-24.
40. Chen XH, Han JS, Huang LT. CCK receptor antagonist L-365, 260 potentiated electroacupuncture analgesia in Wistar rats but not in audiogenic epileptic rats. *Chin. Med. J.* 1994 ; 107 : 113-8.
41. Huang C, Wang Y, Chang JK, Han JS. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci. Lett.* 2000 ; 294 : 159-62.
42. Ray A, Henke P, Sullivan R. Opiate mechanisms in the central amygdala and gastric stress pathology in rats. *Brain Res.* 1988 ; 442 : 195-8.
43. Peleg II, Wilcox CM. Role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002 ; 34 : 117-25.
44. Scoto GM, Parenti C, Scoto E, Spadaro C, Arrigo-Reina R. Effect of indomethacin on opioid-induced gastric protection in cold-restrained stress. *Life Sci.* 1991 ; 48 : 867-71.
45. Ogle CW, Qiu BS. Nitric oxide inhibition intensifies cold-restraint induced gastric ulcers in rats. *Experientia.* 1993 ; 49 : 304-7.
46. Bulbena O, Masana N, Ramis I, Abdalla S, Perez R, Pique JM. Mast cells in the rat gastric mucosa are not primarily responsible for PGD₂ generation. *Prostaglandins.* 1991 ; 41 : 383-93.
47. Kinoshita T, Nimura Y, Shionoya S, Goto H, Ozawa T. Predominance of prostaglandin D₂ and I₂ in the rat gastric mucosa. Analysis by high-performance liquid chro-

- matography. *Biochem. Int.* 1987 ; 14 : 303-9.
48. Heavey DJ, Ernst P, Stevens RL. Immunological mediated formation of LTC₄, PGD₂ and LTB₄ by mucosal mast cells from *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *J. Immunol.* 1988 ; 140 : 1953-7.
49. Cho CH, Ogle CW. Does increased gastric mucus play a role in the ulcer-protecting effects of zinc sulphate? *Experientia.* 1977 ; 34 : 90-1.
50. Celebi N, Turkyilmaz A, Gonul B, Ozogul C. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats. *J Control. Release.* 2002 ; 83 : 197-210.
51. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig. Dis. Sci.* 1994 ; 39 : 366-73.