

침전극 저주파자극이 흰쥐의 Caspase-3, 9와 Neuronal Nitric Oxide Synthase 면역반응세포 변화에 미치는 영향

김수한

가야대학교 작업치료학과

최홍식, 김택훈, 신현석

한서대학교 물리치료학과

김지성

용인대학교 물리치료학과

송치원

국립독성학연구소 신경독성과

Abstract

The Effect of Needle Electrode Electrical Stimulation on the Change of Caspase-3, 9 and Neuronal Nitric Oxide Synthase Immunoreactive Cells in the Sprague Dawley Rats

Kim Soo-han, Ph.D., P.T.

Dept. of Occupational Therapy, Kaya University

Choi Houn-sik, Ph.D., P.T.

Kim Tack-hoon, Ph.D., P.T.

Cynn Heon-seock, M.A., P.T.

Dept. of Physical Therapy, Hanseo University

Kim Ji-sung, M.Sc., P.T.

Dept. of Physical Therapy, Yongin University

Song Chi-won, Ph.D., DVM.

Division of neurotoxicology, National Institute Toxicological Research

In most tissues, apoptosis plays a pivotal role in normal development and in regulation of cell number. Therefore inappropriate apoptosis is revealed in a variety of diseases. This study was carried out to investigate the effects of acupuncture and needle electrode electrical stimulation on the change of caspase-3, 9 and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive cells in the sprague dawley rats (SD rat). In immobilized SD rats (n=5), enhanced caspase-3 and caspase-9 expression were detected in the reticular part of substantia nigra, and enhanced nNOS was detected in the dorsolateral periaqueductal gray (DL-PAG) of midbrain and the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus using immunohistochemistry. Following the immobilization, acupuncture (n=5) and needle electrode electrical stimulation (n=5, 2 Hz) was applied at Hégǔ (LI4) acupoint of SD rats, respectively. The stress-induced

enhancement in the expression of caspase-3, 9 and nNOS were The present results demonstrate that and needle electrode electrical stimulation are effective in the modulation of expression of caspase-3, 9 and nNOS induced by immobilization.

Key Words: Acupuncture; Caspase-3, 9; Immobilization; Needle electrode electrical stimulation; nNOS.

I. 서론

세포사는 여러 가지 다양한 기전에 의해 이루어지며, 넓게 괴사와 세포사멸(apoptosis)에 의해 발생한다(Wyllie와 Duvall, 1992). 세포사멸이란 능동적이고 유전적으로 프로그래밍된 세포의 죽음으로(Kerr와 Harmon, 1991) 장점막상피나 선조직세포, 림프기관의 일부 부위와 같이 정상조직에서 발견되며 또한 배아형성, 세포의 분화, 노화, 변태(metamorphosis), 내분비 호르몬 결핍에 의한 특정 세포의 위축 및 비대가 일어나는 조직이나 종양조직에서 관찰할 수 있다. 이는 생리적 또는 화학적 자극에 의해 일어나는 괴사와 구별되며 형태학적으로 세포질과 핵의 농축, 세포벽의 공포화 등 여러 가지 생화학적 변화가 나타난다(Compton과 Cidlowski, 1994; Hale 등 1996; Warner, 1999).

Caspase군은 1993년에 인간의 인터루킨-1 β 전환효소(ICE: interleukin-1 β converting enzyme)가 선충의 Ced-3(Celegans cell death protein gene)과 유사한 유전자로 알려진 이후 많은 ICE/Ced-3 상유 유전자들이 밝혀졌다. 이들 유전자는 연구기관별로 다른 이름으로 불리어지다가 1996년 caspase (cystein aspartase)라는 이름으로 통일되었다(Alnemri 등, 1996).

세포사멸이 진행되면 caspase-3을 활성화시키는 사립체와 관련된 내인성 경로(intrinsic pathway)와 외인성 경로(extrinsic pathway) 그리고 caspase-independent apoptosis inducing factor (AIF) 경로로 세포사가 진행된다. 먼저 내인성경로는 사립체에서 세포질로 cytochrome C가 방출되어 Apaf-1 (apoptosis activation factor-1)과 복합체를 이루어 caspase-9를 활성화시키고, 활성화된 caspase-9는 결국 caspase-3을 활성화시켜 세포사멸을 유발한다(Graham과 Chen, 2001; Morishima 등, 2002; Saleh 등, 1999). 외인성 경로는 Fas 또는 Tumor necrosis factor (TNF)-membrane

receptor system에 의해 활성화된 caspase-8이 caspase-3을 활성화시켜 세포사멸이 일어나는 것이다(Graham과 Chen, 2001; Rao 등, 2002). AIF는 사립체에서 방출되며 apoptogenic effect를 보이고(Graham과 Chen, 2001; Susin 등, 2000), 이는 caspase-independent 양상으로 염색질 농축(chromatin condensation)과 핵축축(nuclear shrinkage)을 유발하여 세포사멸을 일으킨다(Daugas 등, 2000; Susin 등, 2000).

Caspase는 protease군으로 세포사멸에 관련된 역할에 따라 세 가지로 분류할 수 있다. Caspase 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14(제1군)는 주로 cytokine processor의 역할을 한다. Caspase 2, 8, 9, 10(제3군)은 initiator caspases로 대체적으로 death signal에 의해 처음으로 활성화되어 effector caspases로 신호전달계를 거치게 한다. Effector caspases(제2군)는 caspases 3, 6, 7이 있으며 이는 세포내 기질에 중대한 역할을 한다(Graham과 Chen, 2001; Saleh 등, 1999). Caspase 활성화는 세포사멸 진행의 중심이 되는 기전이며(Rao 등, 2002), 다른 caspase를 직접적으로 분할시켜 세포사멸을 일으키게 한다. 특히 caspase-3은 다양한 기질을 파괴하는 주된 effector caspase로 알려져 있다.

또한 최근 들어 산화질소(Nitric oxide, NO)는 세포사멸과 관련해 과도하게 생성되거나 활성산소종(reactive oxygen species)과 동시에 생성되면 신경독성 물질이나 세포의 세포사멸 요인으로 작용한다고 보고되고 있다(Heales 등, 1999; Hirsch와 Hunot, 2000). NO는 내피세포, 신경세포, 혈관 평활근 및 간세포에 이르기까지 다양한 종류의 세포들에 의하여 합성되는 것으로 알려져 있다(Busse와 Mulsch, 1990; Curran 등, 1989; Garthwaite 등, 1988; Ignaro 등, 1987; Palmer 등, 1987; Nakayama 등, 1992). 급성 혹은 만성염증과정 중에서 염증을 매개하는 인자의 하나로서 매우 중요한 역할을 하는 NO는 중추신경계에서 신호전달기능을

하는 유리기(free radical) 중의 하나이며, Nitric Oxide Synthase(NOS)에 의해 칼슘 의존적 경로를 통해 아미노산 L-arginine으로부터 합성이 된다. 또한 NO는 자율적 기능들의 조절에 관여하며 신경과 혈관 그리고 면역관계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고(Dawson 등, 1991), 허혈, 뇌조직 손상 및 탈수(demyelination)시 퇴행성 뇌질환과 뇌졸중의 원인이 된다(Dawson 등 1991; Jaffrey와 Snyder, 1995).

NOS에는 자연형(cNOS: constitutive isoform)과 유발형(inducible isoform, NOS2: iNOS)이 있다. cNOS에는 nNOS(neuronal isoform, NOS1)와 eNOS(endothelial isoform, NOS3)가 있으며, 이들은 칼슘의 농도에 따라 NO를 생산하는 능력이 매우 제한되어 있다(Ohshima와 Bartsch, 1994; Wiseman과 Halliwell, 1996). 반면 iNOS는 세균이나 바이러스, 기생충 등의 감염 시에 많은 양의 NO를 생산하며 이때 생산된 NO는 병원체, 숙주세포, 종양세포 등의 탐식에 매우 중요한 역할을 한다(Garcia와 Folkman, 1998; Szabo 등, 1997; Tozer 등, 1997). 또한 nNOS는 주로 중추신경에서만 발현되며 신경전달에 관여하는 것으로 알려져 있다(Dawson 등, 1991; Hope 등, 1991).

세포사멸은 외부에서 주어지는 약물이나 여러 가지 스트레스성 자극에 의해서도 유발되는데 즉 당질콜티코스테로이드, 이온운반체약물, tetra-chlorodibenzo-p-dioxin, CD3-T 세포 수용체에 대한 항체, 적은 양의 감마선, lymphotoxin, tumor necrosis factor, 그 외 cytotoxin에 의한 면역세포의 세포사 및 암세포의 퇴축과 항암작용 등 다양한 것들이 세포사멸과 관련되어 있다(최동희 등, 1997; Garcia와 Folkman, 1998).

또한 caspase-3과 caspase-9 그리고 nNOS가 일정 시간이상 고정이나 움직임의 제한 상태에서도 발현된다고 보고 되어져 있으며(Kishimoto 등, 1996; Tsuchiya 등, 1996; Yun 등, 2003), 다양한 형태의 전자과나 전기적인 자극도 정상적인 세포에 스트레스로 작용하거나 세포내 이온의 변화를 일으켜 세포사멸이나 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. Villasenor 등(2000)은 전기자극(60 Hz, 40 mA) 후 혈장 내에서 당질콜티코스테로이드의 한 종류인 콜티코스테론이 증가하였는데 이는 세포사멸과 관련되어 있다고 하였으며, Marinelli 등(2004)은 장시간 전자과에 노출될 경우 DNA 손상이 발생하며 이는 세포사멸로 이어진다고 보고하였다.

Krauthamer와 Jones (1997)는 지속적인 전기자극(56

volts/cm, 5 ms)이 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키고 이러한 상태가 지속되면 세포 손상이 발생할 것이라고 하였고, Vernhes 등(1999)은 전기자극의 시간, 강도, 횟수에 따라 세포손상이나 세포사에 영향을 미친다고 하였다. 그러나 비정상적인 상태에서 치료적으로 이용되는 침이나 전기자극은 오히려 세포사멸과 관련된 물질들을 감소시킨다고 알려져 있다(Jang 등, 2003(a); Wang 등, 2002; Zhou 등, 2001).

전기자극은 세포사멸과 관련된 효과 이외에도 통증 치료(Hollinger, 1986; Keenan 등, 1985; Lewers 등, 1989; Millea, 1983)와 관절 부종 감소(Taylor 등, 1992), 손상된 조직의 치유(Carley와 Wainapel, 1985; Houghton 등, 2003), 근재교육(Lake, 1992; Lieber 등, 1996), 혈류량의 증진(Clemente 등, 1991), 자세교정(Eckerson과 Axelgaard, 1984) 등 다양한 효과를 가지고 있다. 또한 이런 전기자극의 효과와 침의 장점을 결합시킨 전침(electroacupuncture)이 여러 나라에서 사용되고 있다. 전침은 1825년 프랑스의 Sarlandiere가 처음으로 침과 갈바닉 전류를 결합시켜 통풍과 신경계통의 질병을 치료한 이후 여러 치료에 이용되고 있다(Stillings, 1975). 전침도 일반 침자극과 동일하게 통증 치료, 우울증 등 신경계, 뇌졸중 등의 질환에 이용되고 있다(Chen과 Fang, 1990; Luo 등, 1998; Ulett 등, 1998; Wong 등, 1999).

그러나 전기치료가 물리치료 분야에서 이용되는 주된 치료 방법 중 하나임에도 불구하고 세포와 관련된 연구가 부족한 실정이다. 또한 치료 시 고정된 자세가 많이 요구되는 물리치료에서 이런 자세가 세포사멸과 관련이 있는지 전기자극이 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 등에 관한 연구는 상당히 부족한 실정이다.

물리치료 시 환자는 특정한 자세에서 일정한 시간 동안 치료를 받게 된다. 그러나 이러한 자세가 세포에 미치는 영향에 대해 그리 많은 연구가 이루어진 것이 없으며, 또한 물리치료에서 일반적으로 가장 많이 사용하는 치료방법 중 하나가 전기치료임에도 불구하고 이와 관련된 연구가 물리치료계에서 부족한 실정이다. 특히 자세나 전기자극이 세포사멸에 미치는 영향에 대한 연구는 소수에 불과하다.

따라서 본 연구의 목적은 첫째, 고정에 의해 수컷(Sprague Dawley rat: SD rat)의 뇌에서 세포사멸과 관련된 nNOS 및 caspase-3과 9의 분비세포에 변화를 가져오는지, 둘째, 고정에 의해 nNOS 및 caspase-3, 9

의 분비세포에 변화가 있다면 사람의 합곡(合谷, L14) 부위에 해당하는 SD rat의 앞발에 침과 침전극 저주파 자극에 의해 이들 물질의 분비세포가 영향을 받는지를 알아보기 위해 nNOS와 caspase-3, 9의 반응세포 수의 변화를 면역조직 화학적 방법으로 관찰하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 근골격계에 고정 목적으로 적용되는 치료와 물리치료 시에 환자에게 요구하는 자세에 대해 다시 한번 더 생각할 수 있는 기회를 제공할 것이라 사료되며, 다양한 원인으로 발생된 세포사멸을 효과적으로 차단하거나 억제시키기 위한 방법으로 침전극 저주파자극을 활용할 수 있는 기초 자료로 이용하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

본 연구에는 온도, 습도, 공기청정 상태를 일정하게 유지할 수 있는 실험실에서 사육된 임상적으로 건강하다고 판단되는 수컷 SD rats를 제1군(무처리), 제2군(고정 스트레스), 제3군(고정 상태에서 침자극) 및 제4군(고정 상태에서 침전극 저주파자극)으로 나누어 각각 5마리씩 총 20마리를 사용하였다. 실험에 사용된 SD rats의 체중은 약 200~250 g이며 8주 정도 성장한 것을 선택하였고, 실험실의 온도는 22±2°C, 습도는 45~55% 정도를 유지하였다.

2. 실험방법 및 절차

가. 스트레스자극 및 전기자극

실험 대상의 SD rats는 제1군, 제2군, 제3군과 제4군으로 분류하였고, 제1군은 무처리 상태의 SD rats이고, 제2군은 고정 스트레스를 가한 SD rats로 수술용 테이프를 이용하여 몸을 묶어 활동을 90분간 제한하였고, 제3군과 제4군들은 제2군과 같은 상태에서 사람의 합곡 부위에 해당하는 SD rats의 앞발 부위를 동일하게 선정하여 침 또는 침전극 저주파자극기²⁾를 이용하여 각각 90분씩 자극 하였다. 전기자극 강도는 자극에 의해 SD rats의 자극지점 주위 근육의 움직임이 나타나면 곧바로 강도를 약간 감소시켜 근육의 움직임이 사라진 상태에서 자극을 시행하였다.

나. 조직처리

각 군에 처치를 마친 즉시 thiopental sodium (1 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시키고 흉강을 열고 좌심실로 canular를 삽입한 후 peristaltic pump를 이용하여 30 ml/min의 속도로 .1 M phosphate buffer saline solution(PBS)을 사용하여 20분간 관류 수세하여 혈액을 제거하였으며, 4% paraformaldehyde를 이용하여 30 ml/min의 속도로 30분간 전 고정을 실시하였다.

이 후 두개골을 절개하여 뇌를 조심스럽게 꺼낸 후 전 고정과정과 동일한 용액에 24시간 후 고정을 실시하였으며, 냉동절편기 사용 시 빙결을 방지하기 위하여 30% sucrose에 침지될 때까지 방치시켰다. 완전히 가라앉은 뇌를 냉동절편기를 사용하여 -20°C에서 40 µm 두께로 박절하여 400 µm 마다 1매씩 취하여 부유법(free floating method)으로 면역염색을 실시하였다.

다. 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), caspase-9 (santacruz사), caspase-3 (santacruz사)을 1:100의 비율로 DW에 희석한 후 72시간 동안 방치하였으며, .1 M PBS로 5분간 3회 수세하였다. 2차 항체로 biotinylated anti rabbit IgG (Vecta사)를 1:200의 비율로 DW에 희석하여 24시간 동안 방치하였으며 역시 .1 M PBS로 5분간 3회 수세하였다.

그 후 avidin과 peroxidase 혼합액을 1:100의 비율로 DW에 희석하여 12시간 동안 방치하였으며 .1 M PBS에 5분간 3회 수세한 후 3,3-Diaminobenzidine (Sigma사)에 .0045%가 되게 H₂O₂를 첨가하여 5분간 반응정도를 살피면서 발색시켰다. 그 후 gelatin이 처리된 slide에 부착시켜 탈수과정과 봉입과정을 거쳤다.

마지막으로 caspase-3, 9 및 nNOS의 항체에 양성 반응을 나타낸 흑색질 부위와 중뇌수도관 주위 회색질(dorsolateral periaqueductal gray, DL-PAG), 뇌실결핵(paraventricular nucleus, PVN) 부위를 광학현미경으로 관찰하여 면역염색반응을 보인 세포수를 계수하여 각 군별로 비교하였다.

2) PG6. ITO. JAPAN.

3. 자료처리

측정된 caspase-3, 9 및 nNOS 반응세포 수를 SPSS 10.0 version을 이용하여 통계처리 하였다. DL-PAG 부위와 PVN 부위의 nNOS 반응세포를 각각 제1군, 제2군, 제3군과 제4군으로 나누어 일원분산분석으로 처리하였고 중뇌 흑색질(substantia nigra) 주위에서 나타난 caspase-3과 9의 반응세포도 nNOS와 동일한 방법으로 나누어 일원분산분석 방법으로 통계처리 하였다. 또한 물질별로 각 군 간의 유의성은 t-검정을 실시하였다.

III. 결과

본 실험은 SD rats를 대상으로 세포사멸 관련물질인 caspase-3, 9 및 nNOS가 고정에 의해(제2군) 발현하는지 또한 고정 상태에서 침(제3군)과 침전극 저주파자극(제4군)이 단순 고정 상태의 제2군과 비교하여 caspase-3과 9 및 nNOS의 반응세포에 어떤 영향을 미치는지를 규명하고자 면역조직 화학적 방법으로 관찰하였다. 제2군, 제3군과 제4군에서 각각 90분간 자극 후 caspase-3과 9 및 nNOS 반응세포를 현미경 하에서 육안적으로 관찰하였고 또한 caspase-3과 9 및 nNOS가 발현한 부위를 중심으로 각 물질의 반응세포 수의 변화를 각 군 별로 나누어 측정 결과를 처리하였다.

1. 반응세포의 육안적 관찰

가. Caspase-9와 3의 반응세포 관찰

caspase-9와 관련해 제1군에서 면역반응을 보인 세포는 없었고, 고정에 의해 움직임을 제한한 제2군에서 중뇌의 흑색질 부위 중 배쪽 피개핵(ventral tegmentum area: VTA)과 연결되는 그물부분(reticular part)에서 다수의 caspase-9의 면역반응세포가 관찰되었다. 제3군은 고정 스트레스가 주어지는 상태에서 사람의 합곡에 해당하는 부위를 침으로 자극한 침자극군으로서 caspase-9의 면역반응세포가 제2군 보다 감소하였고, 제4군 또한 제3군과 동일한 상태와 시간으로 저주파를 적용한 침전극 저주파자극군으로서 제3군과 비슷하게 caspase-9의 면역반응세포가 감소하였다(그림 1).

그러나 caspase-9는 세포사멸 초기과정에 증가하는 물질로 세포사멸과정이 멈추거나 외부요인이 제거되면 비록 caspase-9가 발현하였다 하더라도 다시 세포가 회복되기 때문에 caspase-9만의 증가로 세포사멸이 완

전히 진행되었다고 볼 수 없다. 그러므로 고정 스트레스에 의한 caspase-9의 증가는 caspase-3을 확인하지 않으면 그 하나로서 세포사멸이 완전히 유발되었다고 단정할 수는 없다(Graham과 Chen, 2001; Morishima 등, 2002; Saleh 등, 1999). 따라서 caspase-3의 발현 유무를 확인하는 것이 중요하며, 이와 관련해 제1군에서는 caspase-9와 동일하게 면역반응을 보인 세포는 없었고, 고정 상태에서 스트레스를 가한 제2군에서는 다수의 caspase-3 면역반응세포가 관찰되었다. 이는 고정 스트레스가 세포사멸을 유발하는 중요한 요인 중 하나라는 사실을 뒷받침하는 것이라고 생각한다. 제3군과 제4군에서는 caspase-3의 면역반응세포 수가 제2군보다 감소하였다(그림 2).

나. nNOS의 반응세포 관찰

nNOS 반응세포가 관찰된 부위는 DL-PAG와 PVN 부위로 각 부위별로 나누어 관찰하였다. DL-PAG 부위의 경우 제1군에서 소수의 nNOS 면역반응세포가 관찰되었고, 제2군에서는 nNOS 면역반응세포 수가 제1군보다 더 많이 관찰되었다. 제3군에서는 nNOS 면역반응세포 수가 제2군보다 감소하였고, 제4군에서도 nNOS 면역반응을 보인 세포 수가 제2군보다 감소하였다(그림 3).

PVN 부위의 경우 제1군에서 nNOS 면역반응을 보인 세포는 소수였고, 제2군에서는 DL-PAG 부위와 비슷하게 발현한 nNOS 면역반응세포 수가 제1군보다 더 많이 관찰되었고, 제3군과 제4군에서는 nNOS 면역반응을 보인 세포 수가 제2군보다 현저하게 감소된 것을 관찰하였다(그림 4).

2. 각 부위별 caspase-3, 9와 nNOS 반응세포 수

Caspase-3, 9가 관찰된 흑색질과 nNOS가 관찰된 DL-PAG와 PVN 부위를 각각 제1군, 제2군, 제3군 및 제4군으로 나누어 통계처리 하였다.

가. 흑색질의 caspase-9 면역반응세포

흑색질에서 발현한 caspase-9의 평균 면역반응세포 수는 제1군에서는 발현 반응세포가 없었고, 제2군에서는 96.2개, 제3군에서는 65.2개, 제4군에서는 47.4개였다. Caspase-9의 면역반응세포는 제2군인 고정 스트레스 후 가장 많이 발현하였고, 고정 상태에서 침과 침전극 저주파로 자극한 제3군과 제4군에서 감소하였다(표 1).

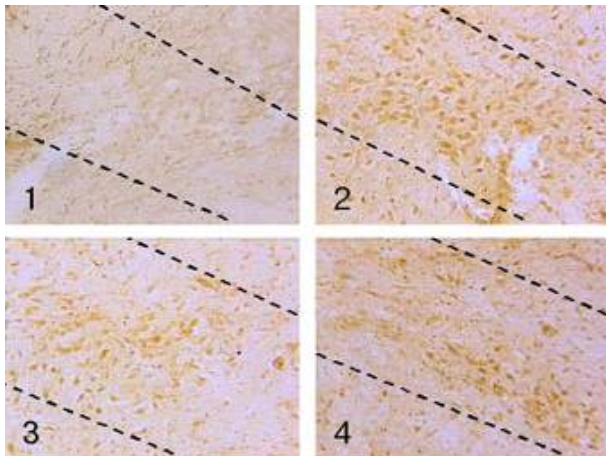


그림 1. 중뇌 흑색질의 caspase-9 면역반응세포. 흑색질의 caspase-9 면역반응세포는 1에서는 나타나지 않았고, 2에서 증가하였으나 3, 4에서 감소하였다. 1: 무자극군(제1군), 2: 고정군(제2군), 3: 침자극군(제3군), 4: 침전극 저주파자극군(제4군)

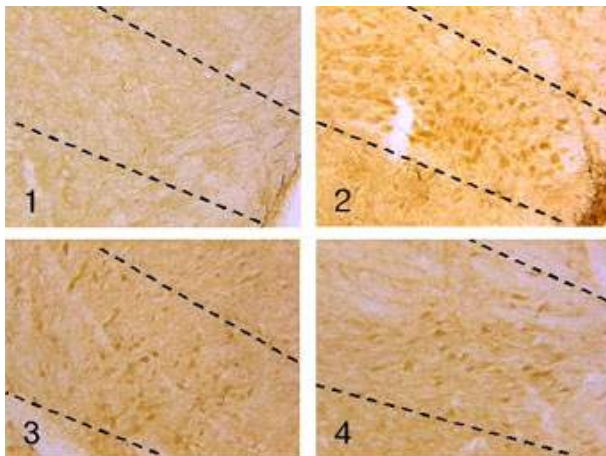


그림 2. 중뇌 흑색질의 caspase-3 면역반응세포. 흑색질의 caspase-3 면역반응세포는 1에서는 나타나지 않았고, 2에서 증가하였으나 3, 4에서 감소하였다. 1: 무자극군(제1군), 2: 고정군(제2군), 3: 침자극군(제3군), 4: 침전극 저주파자극군(제4군)

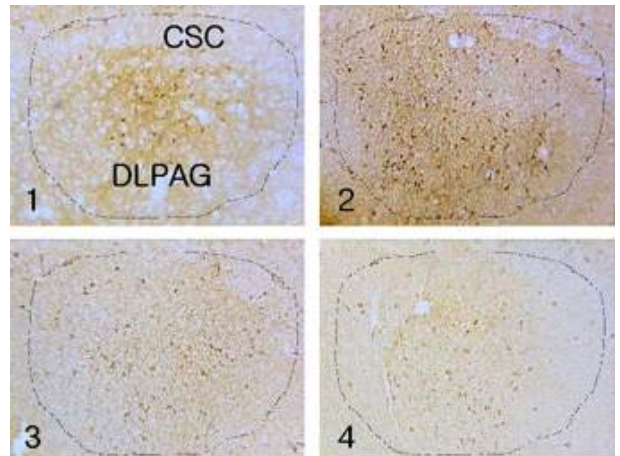


그림 3. 중뇌수도관 주위 회색질의 nNOS 면역반응세포. 중뇌수도관 주위 회색질의 nNOS 면역반응세포는 1에서 소수 관찰되었고 2에서 증가하였으나 3, 4에서 감소하였다. 1: 무자극군(제1군), 2: 고정군(제2군), 3: 침자극군(제3군), 4: 침전극 저주파자극군(제4군)

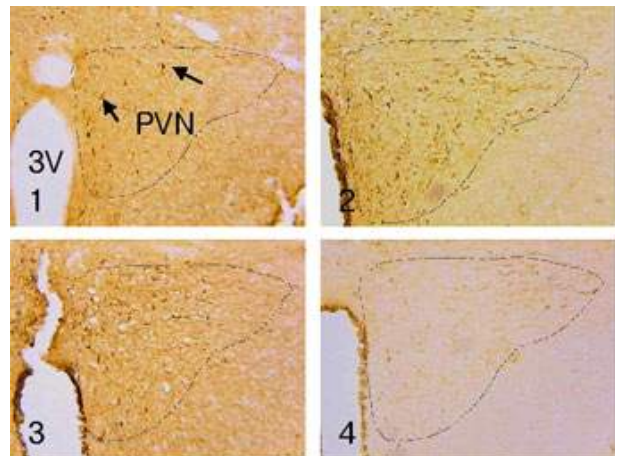


그림 4. 뇌실결핵 부위의 nNOS 면역반응세포. 시상하부의 뇌실결핵 부위의 nNOS 면역반응세포는 1에서 소수 관찰되었고, 2에서 증가하였으나 3, 4에서 감소하였다. 1: 무자극군(제1군), 2: 고정군(제2군), 3: 침자극군(제3군), 4: 침전극 저주파자극군(제4군), 3V: 제3 뇌실, PVN: 뇌실결핵(paraventricular nucleus)

표 1. 각 군별 흑색질의 caspase-9의 면역반응세포 수

(N=20)

제1군	제2군	제3군	제4군	F
0	96.20±7.46	65.20±5.40	47.40±4.61	86.141*

*p<.05

제1군: 무치극군, 제2군: 고정군, 제3군: 침자극군, 제4군: 침전극 저주파자극군

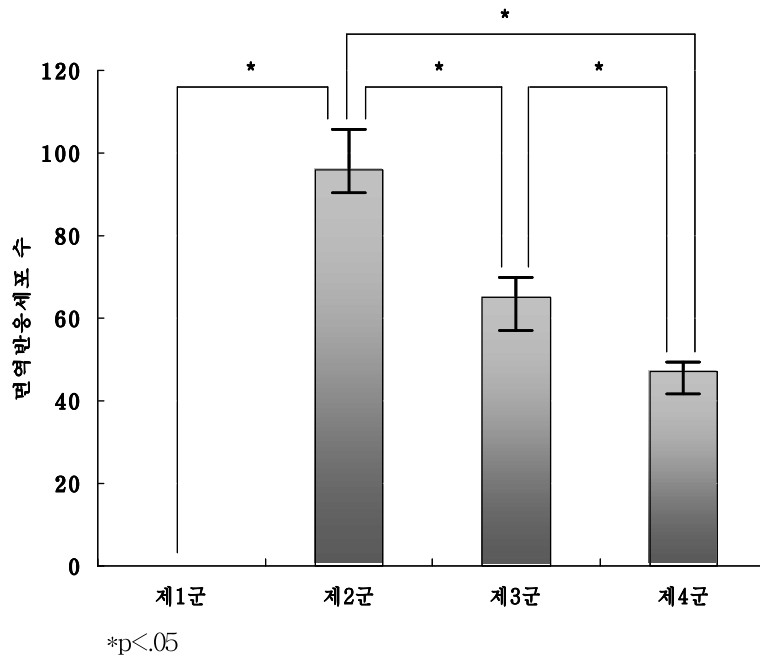


그림 5. 각 군간 흑색질의 caspase-9 면역반응세포 수의 비교

각 군 간의 비교에서는 제2군에 비해 제3군에서 caspase-9의 면역반응세포 수가 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었고($p < .05$), 제2군과 제4군 간의 비교에서는 제4군에서 caspase-9의 면역반응세포 수가 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다($p < .05$). 또한 제3군과 제4군 간에도 제4군에서 보다 더 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다($p < .05$)(그림 5).

나. 흑색질의 caspase-3 면역반응세포

흑색질에서 발현한 caspase-3의 평균 면역반응세포 수는 제1군에서는 발현 반응세포가 없었고, 제2군에서는 80.4개, 제3군에서는 45.0개, 제4군에서는 34.6개로 나타났다. caspase-3의 면역반응세포는 제2군인 고정 스트레스 후 가장 많이 발현하였고 제3군과 제4군에서는 제2군보다 감소하였다(표 2).

각 군 간의 비교에서는 제2군에 비해 제3군에서 caspase-3의 면역반응세포 수가 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었고($p < .05$), 제2군과 제4군 사이에서는 제4군에서 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다($p < .05$). 제3군과 제4군 사이에는 caspase-3의 면역반응세포 수가 제4군에서 보다 더 감소한 것으로 나타나 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다($p < .05$)(그림 6).

다. 뇌실결핵에서의 nNOS의 면역반응세포

뇌실결핵에서 발현한 nNOS의 평균 면역반응세포 수는 제1군에서 20.6개였고 제2군 69.6개, 제3군 34.8개, 제4군 28.6개였다. nNOS의 면역반응세포는 제2군에서 많은 수가 발현하였고 제3군과 제4군에서는 제2군에 비해 감소하였다(표 3).

각 군 간의 비교에서는 제1군에 비해 제2군에서

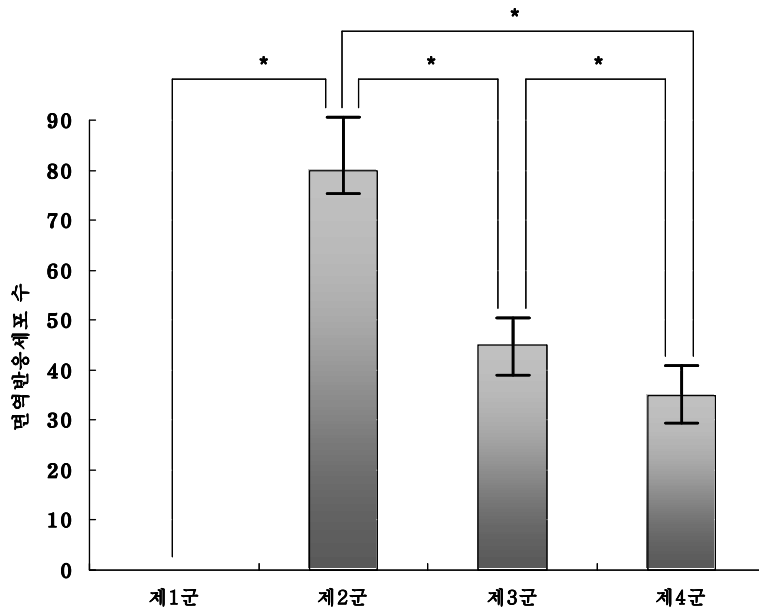
표 2. 각 군별 흑색질의 caspase-3 면역반응세포 수

(N=20)

제1군	제2군	제3군	제4군	F
0	80.40±8.44	45.00±4.47	34.60±5.12	88.022*

* $p < .05$

제1군: 무처치군, 제2군: 고정군, 제3군: 침자극군, 제4군: 침전극 저주파자극군



*p<.05

그림 6. 각 군간 흑색질의 caspase-3 면역반응세포 수의 비교

nNOS의 면역반응세포 수가 증가하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었고(p<.05), 제2군과 제3군 간에 nNOS의 면역반응세포 수는 제3군에서 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다(p<.05). 제2군과 제4군 사이에서는 제4군에서 면역반응세포 수가 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다(p<.05). 제3군과 제4군 사이에서는 제4군에서 감소하였으나 두 군 간에 유의한 통계적 차이는 없었다(p>.05)(그림 7).

라. 중뇌수도관 주위 회색질에서의 nNOS의 면역반응세포

중뇌수도관 주위 회색질에서 발현한 nNOS의 평균 면역반응세포 수는 제1군에서 25.8개였고, 제2군 110.4개, 제3군 53.0개, 제4군 49.0개였다. 중뇌수도관 주위 회색질에서 nNOS의 면역반응세포는 제2군에서 가장 많이 발현하였고, 제3군과 제4군에서 그 수가 감소하였다(표 4).

각 군 간의 비교에서는 제1군에 비해 제2군에서 nNOS의 면역반응세포 수가 증가하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었고(p<.05), 제2군과 제3군 사이에서는 제3군에서 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다(p<.05). 제2군과 제4군 사이에서는 제4군에서 감소하여 두 군 간에 유의한 통계적 차이가 있었다(p<.05). 제3군과 제4군 사이에는 제4군에서 nNOS의 면역반응세포 수가 감소하였으나 두 군 간에 유의한 통계적 차이는 없었다(p>.05)(그림 8).

IV. 고찰

정상적으로 계획된 세포사멸이 일어난 세포는 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거되므로 생명체에게 세포의 죽음으로 인한 피해를 주지 않는다. 이러한 세포사멸이 일어나는 세포의 형태학적,

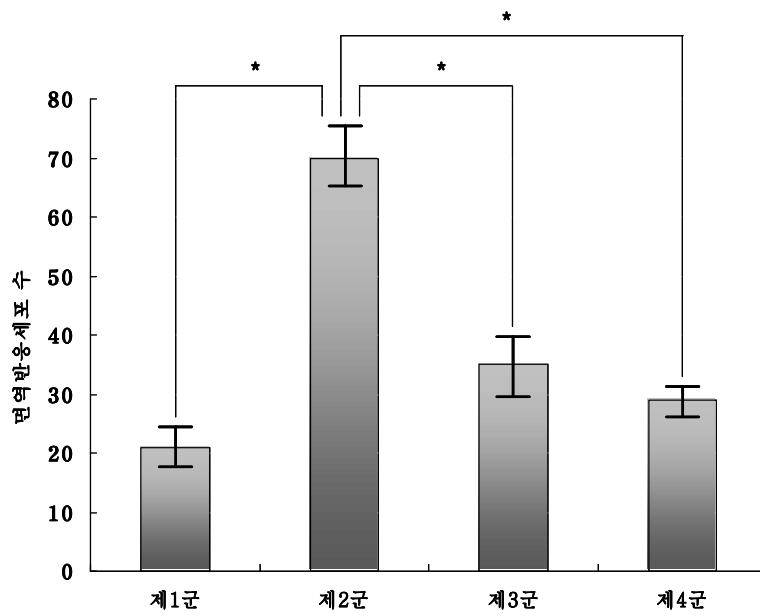
표 3. 각 군별 뇌실결핵의 nNOS 면역반응세포 수

(N=20)

제1군	제2군	제3군	제4군	F
20.60±2.70	69.60±5.12	34.80±3.96	28.60±2.07	174.040*

*p<.05

제1군: 무처치군, 제2군: 고정군, 제3군: 침자극군, 제4군: 침전극 저주파자극군



*p<.05

그림 7. 각 군간 뇌실결핵의 nNOS 면역반응세포 수의 비교

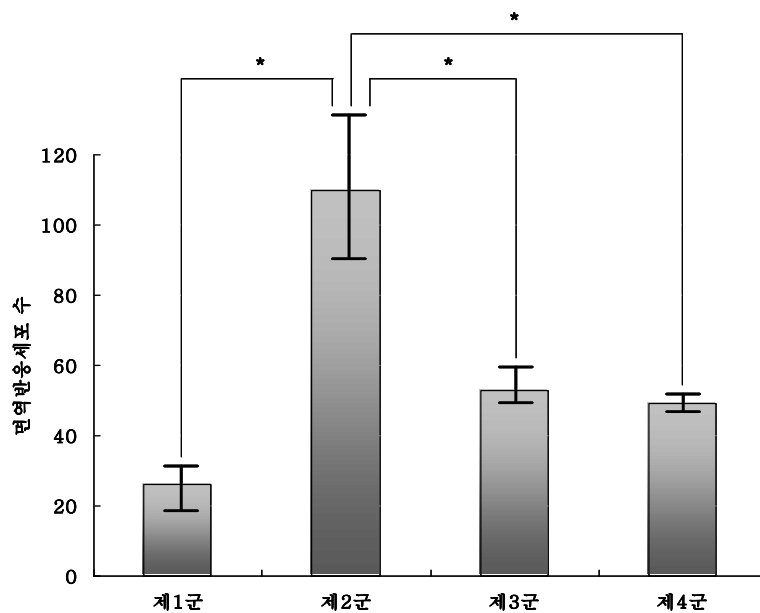
표 4. 각 군별 중뇌수도관 주위 회색질의 면역반응세포 수

(N=20)

제1군	제2군	제3군	제4군	F
25.8±4.65	110.40±19.46	53.00±4.18	49.00±2.23	61.135*

*p<.05

제1군: 무처치군, 제2군: 고정군, 제3군: 침자극군, 제4군: 침전극 저주파자극군



*p<.05

그림 8. 각 군간 중뇌수도관 주위 회색질의 nNOS 면역반응세포 수의 비교

생리적 특징으로는 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 분절, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출, 세포내 칼슘이 증가된다(Orth 등, 1996; Wang 등, 1996).

스트레스는 주로 미토콘드리아에 의한 활성산소종과 관련이 있으며 세포사의 원인으로 작용한다고 알려져 있다. 세포사와 관련한 스트레스로는 방사선(Inouye 등, 1992; Potten 등, 1982), 열(Boreham 등, 2002; Stolzenberg 등, 1980), 초음파(Barnet와 Williams, 1990; Brent 등, 1991), 약물(최동희 등, 1997), 산화적 스트레스(Wei 등, 2000) 등 다양하다. 이러한 스트레스는 활성산소종 뿐만 아니라 NO 및 caspase군과도 밀접한 관계가 있는 것으로 보고 되고 있어 현재 이들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 움직임을 제한한 고정 스트레스(제2군)가 세포사멸 관련 물질인 caspase-3과 caspase-9 및 nNOS 분비세포에 어떤 영향을 미치며, 고정 스트레스에 의해 발생된 caspase-3, 9 및 nNOS가 침(제3군)과 침전극 저주파자극(제4군)에 의해 변화가 있는지를 알아보고자 실시하였다.

움직임을 제한하여 고정 스트레스를 가한 제2군에서 caspase-3, 9의 반응세포가 가장 뚜렷하게 관찰된 부위로는 SD rats의 중뇌 흑색질의 그물부분이었다. 중뇌의 흑색질은 해부학적으로 그물부분, 치밀부분, 내측부분 그리고 외측부분으로 나누어진다. 이들 부위의 대부분은 도파민성신경원으로 구성되어 있고, 이들의 돌기는 꼬리핵, 조가비핵과 투명핵으로 투사되며, 이들 신경원 수가 세포사에 의해 감소되면 파킨슨병을 유발한다(Heales 등, 1999; Hirsch와 Hunot, 2000; Horowitz 등, 2003).

Caspase군은 ICE/Ced-3 유전자군으로 불리던 물질로(Alnemri 등, 1996) 세포사멸이 진행되면 내인성 경로에서 몇 단계를 거쳐 caspase-9가 활성화되고, 활성화된 caspase-9는 다시 caspase-3을 활성화시켜 세포사멸을 유발한다(Graham과 Chen, 2001; Saleh 등, 1999). 이런 이유로 본 실험에서는 caspase-3, 9 둘 다 제2군과 제3군 및 제4군 모두에서 관찰하였다.

Caspase-3, 9의 면역반응세포가 아무런 처치도 하지 않은 제1군에서는 관찰되지 않았다. 실험에 이용한 SD rats의 연령이 8주 정도로 비교적 건강하고 어린 쥐에 해당되므로 노화과정(Zhang과 Kerman, 2002)에서 오는 세포사멸이 관찰되지 않은 것으로 생각된다. 반면 제2

군인 고정 스트레스 상태의 SD rats에서는 많은 수의 반응세포가 흑색질 그물부분에서 발현되었다.

Posevitz 등(2003)은 움직임을 제한하거나 심리적인 스트레스가 세포사멸과 관련된 물질을 증가시킨다고 보고하였고, Yun 등(2003)은 움직임을 제한한 쥐의 해마 부위에서 세포손상이 나타났다고 하였다. Skutek 등(2003)은 6명의 사람을 대상으로 각각 15분과 60분 동안 지속적인 스트레칭을 시킨 후 세포사멸과 관련된 물질인 Jun N-terminal kinase (JNK)와 stress-activated protein kinase (SAPK)를 슬개건에서 관찰한 결과 이들 물질들이 증가하였는데, 이는 일정한 자세가 지속적으로 유지될 때 이것이 인체에 스트레스로 작용하고 이로 인해 세포사멸과 관련된 물질의 분비가 촉진되었기 때문이라고 주장하였다. 이상의 연구들은 본 연구와 유사한 결과를 나타낸 것으로 고정이나 움직임의 제한도 스트레스의 한 종류로 세포사멸을 유발할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 고정 스트레스로 인해 발현한 caspase-3, 9의 발현 부위가 흑색질 부위로 다양한 스트레스 자극이 파킨슨병에도 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

고정 스트레스 상태에서 실시한 침자극(제3군)과 침전극 저주파자극(제4군)에서 흑색질의 caspase-3, 9의 반응세포 수가 제2군과 비교해 감소하였는데, 제3군과 제4군 둘 다 제2군과 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < .05$). Jang 등(2003)은 gerbils의 해마 부위에 허혈상태를 유발해 c-Fos와 세포사멸을 유발시킨 뒤 족삼리 부위에 침자극을 가해 c-Fos와 세포사멸 부위가 감소되었다고 보고하였고, Wang 등(2002)은 쥐의 중대뇌동맥을 허혈 상태로 만들어 뇌를 손상시킨 뒤 증가한 caspase-9가 전침자극에 의해 감소하였다고 보고하였다.

Zhou 등(2001)은 뇌 손상을 가진 SD rat의 모델을 이용해 소뇌 꼭지핵에 구멍을 뚫고 전극을 심어 매일 15분씩 30일간 전기자극(5 ms, 50 Hz)을 가해 caspase-3, 9의 반응세포를 관찰하였는데 전기자극 후 즉시 희생시킨 쥐와 1일 후 희생시킨 쥐에서는 caspase-3의 반응세포 수가 대조군과 차이가 없었으나 3일째 관찰한 군에서는 caspase-3의 반응세포 수가 감소하였고, caspase-9의 활성화를 유발하는 cytochrome C의 발현도 줄어들어 전기자극이 세포사멸을 억제한다고 주장하였다.

이상의 연구 결과와 같이 본 실험에서도 caspase-3,

9의 평균 반응세포 수가 각각 제2군에서는 80.4개와 96.2개로 나타났고, 제3군에서는 45.0개와 65.2개, 제4군에서는 34.6개와 47.4개로 발현되어 고정 스트레스 상태에서 증가한 caspase-3, 9의 면역반응세포가 침이나 침전극 저주파자극에 의해 감소하였다. 이러한 결과는 앞서 여러 학자들이 주장한 바와 같이 전기자극에 의해 세포사멸과 관련한 물질의 생성을 차단하거나 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다.

산화질소(NO)는 생리적으로 신호전달과정에 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 염증과정을 매개하는 인자로 잘 알려져 있다(Dubois 등, 1998; Lala와 Orucevic, 1998). 저농도의 NO는 심혈관계, 면역계, 신경계에서 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하지만 고농도에 지속적으로 세포에 노출이 되면 DNA의 손상이나 세포의 죽음을 유발한다(Ambis 등, 1998).

본 연구에서 nNOS 반응세포가 관찰된 부위는 중뇌수도관 주위 회색질 부위와 시상하부의 뇌실결핵 부위이다. 중뇌수도관 주위 회색질 부위의 신경원들에는 엔케팔린(enkephalin), 섭스탄스 P(substance P), 콜레시스토키닌(cholecystokinin), 소마토스타틴(somatostatin) 그리고 세로토닌(serotonin) 등 많은 종류의 신경전달물질이 함유되어 있으며, 한 신경원에 여러 종류의 신경전달물질이 함유되어 있는 경우도 있다. 또한 중뇌의 등외측 중뇌수도관 회색질 부위의 신경세포들은 내재성 통증조절과도 관련이 있다(Basbaum과 Fields, 1984).

각종 호르몬과 관련되어 있는 시상하부의 PVN과 시각위로핵에서는 내분비계통(hypothalamo-hypophyseal neuroendocrine system)에서 분비되는 펩티드호르몬인 바소프레신(vasopressin)과 옥시토신(oxytocin)이 합성되는 부위로(Antunes와 Zimmerman, 1978; Rhodes 등, 1981) 이들 물질은 혈관운동, 외부비샘 분비, 체액의 균형유지, 체중의 조절 및 유지, 위장관 연동운동조절, 항상성유지에 관여하며 스트레스에 대한 반응, 생식, 사지운동 등에도 역할을 한다(Rossor 등, 1981; Sawchenko와 Swanson, 1982). 또한 시상하부와 뇌하수체에서 베타 엔돌핀이 생성되는 것으로 알려져 있고 해마 부위도 통증과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다(Holden과 Pizzi, 2003; Leone 등, 2003; Williams 등, 2003).

Kishimoto 등(1996)은 6시간 동안 움직임을 제한한 쥐의 nNOS의 분비 부위를 면역조직 화학적 방법으로 관찰하였는데 시상하부, 뇌하수체, adrenal gland 등에서 발견되었고 뇌실결핵에서 nNOS 반응세포가 유의하

게 증가하였다고 보고하였고, Tsuchiya 등(1996)은 6시간 동안 철사로 묶어 쥐의 움직임을 제한한 뒤 nNOS의 분비세포를 관찰한 결과 유의하게 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 이들 보고서와 유사하게 움직임을 제한한 제2군에 해당하는 SD rats의 뇌실결핵에서 nNOS가 발현하는 것을 관찰하였는데 이런 결과는 caspase-3과 9의 실험 결과와 동일하게 nNOS도 외부에서 가해지는 자극이나 움직임을 제한과 같은 스트레스에 의해 증가하고 nNOS의 증가는 세포손상이나 세포사에 영향을 줄 것이라고 사료된다.

신경세포 손상과 관련하여 NO를 조절할 수 있는 방법 중에 침의 역할이 알려진 것은 최근의 일이다. Jang 등(2003)은 족삼리에 적용한 침이 당뇨병에 의한 통증과 관련하여 DL-PAG 부위에서의 NO발현을 억제시키는 작용이 있다고 보고하였다. Huang 등(1999)은 7-mitroindazole (7-NI)와 전침자극이 발작과 NO 생성에 미치는 영향에 대해 연구하였는데 전침 자극이 쥐의 해마 부위에서 NO의 생성을 감소시켰고 발작도 감소시켰다고 보고하였다.

본 연구에서도 침과 침전극 저주파자극에 의해 NO의 생성이 억제되는 결과를 관찰할 수 있었다. 즉 뇌실결핵과 중뇌수도관 주위 회색질에서 발현된 nNOS 면역반응세포 수는 제1군에서 20.6개와 25.8개였으나 제2군에서는 69.6개와 110.4개로 많은 수가 증가하였다. 그러나 제3군에서는 34.8개와 53.0개, 제4군에서는 28.6개와 49.0개로 제2군에 비해 감소하였고, 통계적으로도 제2군에 비해 제3군과 제4군에서 유의하게 감소하였다. 그러나 제3군과 제4군 간에는 유의한 통계적 차이가 없었다.

Huang 등(1999)이 보고한 내용도 본 연구와 같은 결과로 침이나 전기자극이 스트레스로 인한 NO의 생성을 줄여줄 수 있다는 것을 입증한다. 또한 Yang 등(2000)은 페니실린을 해마 부위에 주입해 발작상태를 만든 쥐를 대상으로 발작이 시작될 때 풍부와 근축 부위에 전침자극을 주어 nNOS, iNOS와 eNOS를 관찰한 결과 nNOS와 iNOS는 감소하였고 eNOS는 변화가 없었다고 보고하였고, Kim 등(2000)은 고혈압을 유발시킨 쥐를 대상으로 전침자극 후 뇌간에서 nNOS의 농도와 면역조직 화학적 방법으로 조직을 관찰한 결과 농도와 면역반응세포 모두가 감소하였는데 이는 전침이 고혈압이 있는 쥐의 뇌간에서 NO 전반에 영향을 미친 때문이라고 주장하였다.

이상의 연구와 본 연구에서 나타난 바와 같이 침이

나 침전극 저주파자극에 의해 세포사멸 관련물질이 감소하였는데 이러한 효과는 LI4 지점에 가해진 전기자극에 의해 시상하부와 중뇌를 잇는 연결로에서 통증을 완화시키는 엔돌핀이나 엔케팔린 등 내재성 진통과 관련된 물질의 분비로(Andersson과 Lundeberg, 1995; Hui 등, 2000; Hsieh 등, 2001; Wu 등, 1999) 스트레스가 감소하였고 이 것이 caspase-3과 9 그리고 nNOS의 발현을 줄이는 효과를 가져왔을 것이라고 사료된다.

가장 잘 알려져 있는 침의 효과로는 진통, 항상성의 증가, 뇌순환의 향상 등이며(Cho 등, 1998; Kim 등, 2000; Lee와 Beitz, 1993), 또한 관절염, 류마티스성 관절염 등 염증과 관련된 효과이다(Berman 등 2000; Ezzo 등, 2001). 그러나 Jang 등(2003)과 여러 학자들의 보고와 본 연구에서 나타난 결과는 침이 염증뿐만 아니라 세포사와 관련이 있는 caspase-3, 9 그리고 NO의 발현 억제에도 관계가 있어 세포사의 억제에도 크게 관여할 것으로 사료된다.

아직 caspase-3, 9 그리고 NO의 역할과 기능에 대해 완전히 밝혀지지는 않았지만 다양한 방법으로 연구가 진행되고 있다. 또한 침과 관련해 몇몇 경혈이 염증억제나 세포사의 지연, caspase-3, 9 그리고 NO생성을 억제한다고 보고 되어있지만 전기자극과 관련한 보고는 찾아보기가 어렵다. 또한 치료 시 행해지는 다양한 종류의 자극이나 고정을 필요로 하는 치료와 환자에게 요구하는 동일한 자세 등이 환자의 심리 상태에 영향을 미쳐 이로 인해 앞에서 살펴 본 물질들의 분비를 증가시킬 수도 있으며, 뇌세포에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 치료 시 환자가 편안한 마음으로 긍정적이고 적극적인 자세로 치료에 임할 수 있도록 충분한 설명이 필요하고 가급적이면 경직되거나 고정된 자세로 장시간 실시되는 치료를 피하는 것이 환자의 회복에 보다 도움이 될 것으로 사료된다. 이와 함께 앞으로 세포사멸과 염증반응이나 유해 자극과 관련해 가장 효과적으로 caspase-3, 9 그리고 NO 및 기타 관련물질의 생성을 억제하는 경혈과 전기자극의 조건이 무엇이며, 어떤 스트레스 하에서 이들 물질이 더욱 활성화 되는지에 대해 보다 많은 연구가 필요할 것이라 사료된다.

V. 결론

본 실험은 SD rat을 이용해 고정 스트레스가 세포사

멸과 관련이 있는 nNOS 및 caspase-3과 caspase-9의 면역반응세포에 변화를 가져오는지를 관찰하고 변화가 있다면, 고정 상태에서 사람의 합곡(合谷, LI4) 부위에 해당하는 SD rats의 앞발에 침과 침전극 저주파를 이용해 자극할 경우 nNOS 및 caspase-3과 9의 면역반응세포가 영향을 받는지를 알아보기 위해 nNOS와 caspase-3과 9의 면역반응세포 수의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, nNOS 면역반응세포가 고정 스트레스에 의해 SD rats의 중뇌수도관 주위 회색질부위와 뇌실결핵 부위에서 발현되었다.

둘째, 고정상태에서 침 또는 침전극 저주파로 자극한 결과 중뇌수도관 주위 회색질부위와 뇌실결핵 부위의 nNOS 면역반응세포 수가 고정 스트레스 상태 보다 감소하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < .05$). 그러나 두 부위에서 침자극과 침전극 저주파자극 간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

셋째, caspase-3과 9의 면역반응세포가 고정 스트레스에 의해 SD rats의 후색질 부위에서 발현되었다.

넷째, 고정상태에서 침 또는 침전극 저주파로 자극한 결과 caspase-3과 9의 면역반응세포 수가 감소하였는데, 고정 스트레스와 비교해 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < .05$).

다섯째, 침자극과 침전극 저주파자극 간의 caspase-3과 9의 면역반응세포 수는 침전극 저주파자극에서 감소하였는데 두 자극 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < .05$).

이상과 같은 결과로서 신체의 움직임에 제한하거나 일정 시간 이상 고정상태가 지속되면 이것이 원인이 되어 세포사멸 관련물질인 nNOS 및 caspase-3과 9의 면역반응세포 수를 증가시키는 것으로 생각된다. 그러나 고정 스트레스 상태에서 침과 전기자극이 세포사멸 관련물질의 분비를 효과적으로 감소시키는 작용이 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

- 최동희, 최상현, 김철한 등. Dexamethasone에 의한 흥선 Apoptosis에 대한 홍삼과 백삼 조 Saponin 분획들의 억제작용. 고려인삼학회지. 1997;21(3): 160-168.
- Alnemri ES, Licington DJ, Nocholson DW, et al.

- Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996;87:171.
- Ambis S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: Implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*. 1998;58:334-341.
- Andersson S, Lundeberg T. Acupuncture from empiricism to science: Functional background to acupuncture effects in pain and disease. *Med Hypotheses*. 1995;45(3):271-81.
- Antunes JL, Zimmerman EA. The hypothalamic magnocellular system of the Rhesus Monkey. An Immunocytochemical Study. *J Comp Neuro*. 1978;181:538.
- Barnet SB, Williams AR. Identification of mechanisms responsible for fetal weight reduction in mice following ultrasound exposure. *Ultrasonics*. 1990;28:159-188.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control system: Brain stem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 1984;7:309-338.
- Berman BM, Swyers JP, Ezzo J. The evidence for acupuncture as a treatment for rheumatologic conditions. *Rheum Dis Clin. North Am*. 2000;26:103-115.
- Boreham DR, Dolling JA, Misonoh J, et al. Radiation-induced teratogenic effects in fetal mice with varying Trp53 function: Influence of prior heat stress. *Radiat Res*. 2002;158(4):449-457.
- Brent RL, Jensch RP, Beckman DA. Medical sonography: Reproductive effects and risks. *Teratology*. 1991;4(2):123-146.
- Busse R, Mulsch A. Introduction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1990;265:133-136.
- Carley PJ, Wainapel SF. Electrotherapy for acceleration of wound healing: Low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil*. 1985;66(7):443-446.
- Chen YM, Fang YA. 108 cases of hemiplegia caused by stroke: the relationship between CT scan results, clinical findings and the effect of acupuncture treatment. *Acupunct Electrother Res*. 1990;15(1):9-17.
- Cho ZH, Chung SC, Jones JP, et al. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:2670-2673.
- Clemente FR, Matulionis DH, Barron KW, et al. Effect of motor neuromuscular electrical stimulation on microvascular perfusion of stimulated rat skeletal muscle. *Phys Ther*. 1991;71(5):397-404.
- Compton MM, Cidlowski JA. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic DNA. *Endocrinology*. 1994;118:38-45.
- Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, et al. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. *J Exp Med*. 1989;170:1769-1774.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, et al. Mitochondrionuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 2000;14:729-739.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:6368-6371.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998;12(12):1063-1073.
- Ezzo J, Hadhazy V, Birch S, et al. Acupuncture for osteoarthritis of the knee: A systematic review. *Arthritis Rheum*. 2001;44:819-825.
- Garcia CG, Folkman J. Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis. *J Natl. Cancer Inst*. 1998;15:90(8):560-561.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Withams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*.

- 1988;336:385-388.
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:99-109.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, et al. Apoptosis: Molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.* 1996;236:1-26.
- Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, et al. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410:215-228.
- Hirsch EC, Hunot S. Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(5):163-165.
- Holden JE, Pizzi JA. The challenge of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;28:55(8):935-948.
- Hollinger JL. Transcutaneous electrical nerve stimulation after cesarean birth. *Phys Ther.* 1986;66:36-38.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Natl Acad Sci.* 1991;88:2811-2814.
- Horowitz JM, Pastor DM, Goyal A, et al. BAX protein-immunoreactivity in midbrain neurons of Parkinson's disease patients. *Brain Res Bull.* 2003;15:62(1):55-61.
- Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys Ther.* 2003;83(1):17-28.
- Huang ZN, Yang R, Chen G, et al. Effect of electro-acupuncture and 7-NI on penicillin-induced epilepsy and their relation with intrahippocampal NO changes. *Sheng Li Xue Bao.* 1999;51(5):508-514.
- Hui KK, Liu J, Makris N, et al. Acupuncture modulates the limbic system and subcortical gray structures of the human brain: Evidence from fMRI studies in normal subjects. *Hum Brain Mapp.* 2000;9(1):13-25.
- Ignaro LJ, Buga GM, Wood KS, et al. Endothelial-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Natl Acad Sci.* 1987;84:385-388.
- Inouye M, Tamaru M, Kameyama Y. Effects of cycloheximide and actinomycin D on radiation induced apoptotic cell death in the developing mouse cerebellum. *Int J Radiat Biol.* 1992;61:669-874.
- Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: A neural messenger. *Annu Rev Cell. Dev Biol.* 1995;11:417-440.
- Jang MH, Shin MC, Koo GS, et al. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett.* 2003(a)337:155-158.
- Jang MH, Shin MC, Lee TH, et al. Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region in gerbils. *Neurosci Lett.* 2003(b);347(1):5-8.
- Keenan DL, Simonsen L, McCrann DJ. Transcutaneous electrical nerve stimulation for pain control during labor and delivery. A case report. *Phys Ther.* 1985;65(9):1363-1364.
- Kerr JFR, Harmon. Definition and incidence of apoptosis; An historical perspectives. In: Tomei LD, Cope FO. *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.* CSHL press, 1991:5-29.
- Kim JH, Min BI, Schmidt D, et al. The difference between electroacupuncture only and electro-acupuncture with manipulation on analgesia in rats. *Neurosci Lett.* 2000;279:149-152.
- Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, et al. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res.* 1996;720(1-2):159-171.
- Krauthamer V, Jones JL. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. *Life Sci.* 1997;60(22):1977-1985.
- Lake DA. Neuromuscular electrical stimulation. An overview and its application in the treatment of sports injuries. *Sports Med.* 1992;13(5):320-336.
- Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor

- progression: Lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):91-106.
- Lee JH, Beitz AJ. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain.* 1993;52:11-28.
- Leone M, Franzini A, Broggi G, et al. Hypothalamic deep brain stimulation for intractable chronic cluster headache: A 3-year follow-up. *Neurol Sci.* 24 Suppl 2003;2:S143-145.
- Lewers D, Clelland JA, Jackson JR, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation in relief of primary dysmenorrhage. *Phys Ther.* 1989;69:3-9.
- Lieber RL, Silva PD, Daniel DM. Equal effectiveness of electrical and volitional strength training for quadriceps femoris muscles after anterior cruciate ligament surgery. *J Orthop Res.* 1996;4(1):31-38.
- Luo H, Meng F, Jia Y, et al. Clinical research on the therapeutic effect of the electroacupuncture treatment in patients with depression. *Psychiatry Clin Neurosci.* 1998:S338-40.
- Marinelli F, La Sala D, Ciccio G, et al. Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between proapoptotic and prosurvival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *J Cell Physiol.* 2004;198(2):324-332.
- Millea TP. Transcutaneous electrical nerve stimulation in the management of non-operative intra-abdominal pain. *Phys Ther.* 1983;63:1280-1282.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277:34287-34294.
- Nakayama DK, Geller DA, Lowenstein CJ. Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;7:471-476.
- Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994;305:253-264.
- Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS, et al. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED/ICE-like protease. *J Biol Chem.* 1996;271:20977-20980.
- Palmer RMJ, Fernge AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
- Posevitz V, Vizler C, Benyhe S, et al. Restraint stress and antitumor immune response in mice. *Acta Biol Hung.* 2003;54(2):167-176.
- Potten CS, Chwalinski S, Swindell R, et al. The spatial organization of the hierarchical proliferative cells of the crypts of the small intestine into clusters of 'synchronized' cells. *Cell Tissue Kinet.* 1982;15:351-370.
- Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Role of the ER chaperone GRP78. *FEBS letters.* 2002;514:122-128.
- Rhodes CH, Morrell JI, Pfaff DW. Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus, distribution and numbers of cell containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J Comp Neurol.* 1981;198:45.
- Rossor MM, Iversen LL, Hawthorn J, et al. Extrahypothalamic vasopressin in human brain. *Brain Res.* 1981;214:349-355.
- Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999;274:17941-17945.
- Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1982;205:260.
- Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, et al. Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: Activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2003;11(2):122-129.
- Stillings D. A survey of the history of electrical

- stimulation for pain to 1900. *Med Instrum.* 1975;9(6):255-259.
- Stolzenberg SJ, Torbit CA, Edmonds PD, et al. Effect of ultrasound on the mouse exposed at different stages of gestation, acute studies. *Radiat Environ Biophys.* 1980;18:245-270.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192:571-580.
- Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem.* 1997;272:9030-9036.
- Taylor K, Fish DR, Mendel FC, et al. Effect of electrically induced muscle contractions on post traumatic edema formation in frog hind limbs. *Phys Ther.* 1992;72(2):127-132.
- Tozer GM, Prise VE, Chaplin DJ. Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Res.* 1997;57:948-955.
- Tsuchiya T, Kishimoto J, Nakayama Y. Marked increases in neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and NADPH-diaphorase histo-staining in adrenal cortex after immobilization stress in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1996; 21(3):287-293.
- Ulett GA, Han S, Han JS. Electroacupuncture: Mechanisms and clinical application. *Biol Psychiatry.* 1998;15;44(2):129-138.
- Vernhes MC, Cabanes PA, Teissie J. Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses. *Bioelectrochem Bioenerg.* 1999;48(1): 17-25.
- Villasenor MM, Puebla-Perez AM, Sandoval-Ramirez L, et al. Phenytoin and electric shock-induced apoptosis in rat peripheral blood lymphocytes. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(2):143-50.
- Wang S, Miura M, Y-K Hong Z, et al. Identification and characterization of Ich-3, a member of the ICE/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J Biol Chem.* 1996;271:20580-20587.
- Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Lett.* 2002;11;331(2):115-118.
- Warner HR. Apoptosis: A two-edged sword in aging. *Acad Sci.* 1999;88:1-11.
- Wei T, Chen C, Hou J, et al. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000;1498:72-79.
- Williams KL, Ko MC, Rice KC, et al. Effect of opioid receptor antagonists on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology.* 2003;28(4): 513-528.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313:17-29.
- Wong AM, Su TY, Tang FT, et al. Clinical trial of electrical acupuncture on hemiplegic stroke patients. *Am J Phys Med Rehabil.* 1999; 78(2):117-122.
- Wu MT, Hsieh JC, Xiong J, et al. Central nervous pathway for acupuncture stimulation: Localization of processing with functional MR imaging of the brain-preliminary experience. *Radiology.* 1999;212(1):133-141.
- Yang R, Huang ZN, Cheng JS. Anticonvulsion effect of acupuncture might be related to the decrease of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Acupunct Electrother Res.* 2000;25(3-4):137-143.
- Yun SJ, Lee DJ, Kim MO, et al. Reduction but not cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase during stress-mediated cell death in the rat hippocampus. *Neuroreport.* 2003;23;14(7):935-9.
- Zhang Y, Kerman B. Ageing and apoptosis, mechanism of ageing and development. 2002; 123:245-260.
- Zhou P, Qian L, Glickstein SB, et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus protects rat

brain, in vitro, from staurosporine-induced
apoptosis. J Neurochem. 2001;79(2):328-338.