

전침에 의한 CFA유발 통증모델의 NMDA 수용체 의존적 ERK MAPK 발현 변화

김하늬 · 김유리 · 장지연 · 최영현¹ · 이용태² · 최병태*

부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, 1: 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 2: 동의대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Electroacupuncture on NMDA Receptor-dependent Spinal ERK MAPK Expression in CFA-induced Pain Model

Ha Neui Kim, Yu Ri Kim, Ji Yeon Jang, Yung Hyun Choi¹, Yong Tae Lee², Byung Tae Choi*

Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 1: Department of Biochemistry, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Donggeui University

The present study aims to investigate a possible mechanism of electroacupuncture (EA) in the spinal dorsal horn that may underlie N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-associated extracellular signal-regulated kinase (ERK) mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. The hot plate latency of the ipsilateral hindpaw of EA-treated rats was significantly decreased compared with complete Freund's adjuvant (CFA)-injected ones. The expressions of NR1 and NR2B subunit mRNA of NMDA receptor in the whole L4-5 segments are decreased by CFA treatment, but NR2B subunit was significantly recovered by EA treatment. When we detected the expression of ERK, there were no significant difference between normal and CFA-treated rats with EA or NMDA receptor antagonist MK801. But phosphorylated ERK expressions were markedly induced by CFA, but these inductions were significantly modulated by EA treatment. Although phosphorylation of ERK was also arrested by MK801, these inductions of CFA-injected rats was markedly inhibited only by co-treatment with EA and MK801. Phosphorylated cAMP response element-binding protein (CREB), ERK-related transcriptional factor, showed a significant increase in CFA-treated rats and this increase was slightly inhibited by EA and MK801 treatments. But immunoreaction for phosphorylated CREB were significantly increased by CFA treatment in the superficial laminae of the dorsal horn and these inductions were significantly arrested by co-treatment of EA and MK801. Consequently, the hyperalgesia induced by CFA are associated NMDA receptor and EA and MK801 may showed anti-hyperalgesia via same mechanism for inhibition of ERK and CREB phosphorylation in the dorsal horn.

Key words : NMDA receptor, ERK, MK801, CREB

서 론

전침은 한의학의 대표적인 치료수단인 침의 변형으로 전통적인 수기를 전기 자극으로 대체하여 다양한 임상적 효과를 나타내고 있다. 전침은 통증제어에 뛰어난 효과를 나타내며 이의 기전에 대한 연구도 널리 행하여지고 있다. 특히 뇌의 학습과 기억형성과정과 유사한 신경가소성에 관여하는 ionotropic

glutamate 수용체는 전침의 통증제어 기전에도 관여한다¹⁾. 이들 수용체는 세포내 다양한 signaling pathway를 포함한 생화학적 루트를 통하여 장시간의 신경가소성 형성에 관여하고 있어 통증 조절기전에서 집중적으로 연구되고 있다^{2,3)}. 그러나 척수 배각 신경세포의 장시간 신경가소성 변화는 학습과 기억형성과 달리 유효자극수용에 관여하며 ionotropic 또는 metabotropic receptor는 장기간의 통증 유발에 관여한다^{4,6)}.

일반적으로 extracellular signal-regulated kinase (ERK) mitogen-activated protein kinase (MAPK)은 세포증식, 분화, 신경가소성 등 세포내 신호 변환에 관여하는 것으로 알려져 있

* 교신저자 : 최병태, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교한의학전문대학원

· E-mail : choibt@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8475

· 접수 : 2010/10/14 · 수정 : 2010/10/28 · 채택 : 2010/11/02

며, 유해자극 수용시에도 ERK 활성화가 진행되는 것이 보고되고 있어 이에 대한 연구가 증가하고 있다^{7,8)}. 통증모델에 있어 척수 배각내 흥분성 amino acid 분비를 포함한 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 및 NK-1 수용체의 활성화를 포함한 central sensitization에서 ERK활성은 주요한 기능을 하며, 특히 Ca^{2+} 의 세포내 유입은 장기간의 신경세포 가소성에 영향을 준다^{7,9)}. 활성화된 ERK는 핵내로 이동하여 ribosomal S6 kinase (RSK)와 mitogen- 및 stress-activated protein kinase (MSK)를 통해 Elk-1, cAMP response element-binding protein (CREB) 등 전사인자를 활성화하여 다양한 NMDA 수용체/ERK MAPK 의존적인 유전자 발현을 통해 신경가소성에 관여한다^{8,9)}.

따라서 본 연구에서 전침 진통기전에 대한 메커니즘 규명의 일환으로 complete Freund's adjuvant (CFA) 유발 통증모델을 이용하여 염증성 통증과 전침자극에 의한 NMDA 수용체의 신경세포내 Ca^{2+} 유입으로 야기될 가능성이 있는 signaling pathway 중 ERK MAPK을 포함한 일련의 인산화/탈인산화를 통해 그 효능을 나타내는 지를 살펴보고자 한다. 궁극적으로 NMDA 수용체 NR1, NR2B subunit에 대한 mRNA 발현, NMDA 수용체 antagonist MK801을 이용한 ERK 및 CREB활성 분석 등을 통해 NMDA 수용체/ERK MAPK 의존적 유전자 발현에 전침이 작용할 가능성을 밝히는데 목표를 두고 있다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

8 주된 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 듀얼바이오(주)로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 사용하였다. 국소적 염증유발을 위해 calibrated vaporizer (Midmark VIP 3000, Orchard Park, OH, USA)를 이용하여 isoflurane (Choongwae, Seoul, Korea)으로 마취한 후 100 μ l의 CFA (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 오른쪽 발바닥 피하에 주사한 CFA군, 동일 양의 saline 용액을 주사한 정상군, 전침자극만을 가한 전침군, CFA 주사 후 전침 자극을 준 CFA+전침군 그리고 CFA 주사 후 전침과 MK801을 동시에 처리한 CFA+전침+MK801군으로 나누어 각 군당 5마리를 사용하였다. 실험은 부산대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 시행하였다.

2. 전침자극

Isoflurane으로 마취를 하고 전침 자극은 0.25 mm stainless needle을 사용하여 하지 중 전경골근, 슬와근을 중심으로 한 족삼리(ST36)와 삼음교(SP6)를 이용하여 양쪽 혈위에 저빈도(2 Hz)와 낮은 강도(0.1 mA)의 세기로 20 분간 electrical stimulator (PulseMaster Multi-channel Stimulator SYS-A300, World Precision Instruments Inc., Berlin, Germany)를 이용하여 처리하였다.

3. NMDA 수용체 antagonist MK801 처치

전침의 진통효과에 대한 NMDA 수용체의 영향을 알아보기 위하여 isoflurane 마취하에 허리부분 등쪽 피부를 정중선으로 절개하고 L4-5 척추뼈 사이를 통해 지주막하강으로 PE-10 tube를 3 cm 정도 삽입하여 끝부분이 척수의 요팽대부에 이르도록 하였다. 피부를 봉합한 후 목 뒷부분에 PE-10 tube를 고정하였으며 수술 후 적정량의 항생제 투여하며 3일간 보행관찰을 통해 정상적인 동물만을 실험에 사용하였다. MK801 (Dizocilpine hydrogen maleate, Sigma)은 5 μ g을 멸균 식염수에 녹여 주입하였으며 약물의 정확히 요팽대부에 주입 여부는 vital staining을 통해 확인하였다.

4. Thermal hyperalgesia 측정

전침의 진통효과는 planatar test (Ugo-Basile 37370, Comerio, Italy)를 이용하여 thermal withdrawal latency를 동물 행동학적으로 측정하였다. 반응 측정시간은 조직의 손상을 방지하기 위하여 15초 이내로 제한하였으며 3회를 측정하여 평균값을 이용하였다.

5. Real time PCR을 이용한 NMDA 수용체 subunit mRNA 분석

L4-5 척수 분절을 절취하여 TRIzol을 이용하여 조직에서 total RNA를 추출하였으며, real-time quantitative PCR은 ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 SYBR green receptor dye를 이용하여 실시하였다. PCR primers의 nucleotide sequences의 forward (F)와 reverse (R)는 NR1 F: CAAGTGGGCATCTACAATGG, R: ATCACTCATTGTGGGCTTGA, NR2B F: ATGGCGGATAAGGATGAGTC, R: CGAAGCTGTTCTCGATGGTA, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) F: GTCTCCTGTGACTTCAACAG, R: AGTTGT CATTGAGAGCAATGC를 사용하였다.

6. Western blot

전침자극 후 CFA주사 부위와 같은 오른쪽 L4-5 척수분절의 배각부분을 취하여 HEPES buffer로 세척 한 후 lysis buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mg/ml leupeptin, Protease Inhibitor Cocktail, 10 mM NaF, 1 mM PMSF and 1 mM Na_3VO_4)로 분쇄하여 용해하고 원심 분리하였다. 수획한 상층액 중 동일 양(30 μ g)을 8%-12% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 polyvinylidene difluoride membrane으로 이전시켰다. 이것을 ERK (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-CREB (Cell Signaling Technology) 항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit나 anti-mouse를 가하여 chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, USA)으로 발색시켜 확인하였다. 면역반응의 정도는 Multi Gauge Version 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 densitometric analysis를 실시하였다.

7. 면역조직화학적 관찰

척수 L4-5 분절을 절취하여 4% paraformaldehyde 고정액에 4°C 12시간 고정 하였다. 30% sucrose에 48시간 둔 후 tissue-tek compound에 포매하여 30 μm 동결절편을 얻었으며 free-floating method를 통해 면역조직화학적으로 관찰을 하였다. 동결절편을 0.3% hydrogen peroxidase에 15분간 실온에서 처리하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척한 후 3% normal goat serum과 0.3% triton X-100의 PBS에 30분간 실온에서 처리하였으며 항체를 4°C에 24시간 반응시켰다. PBS로 세척하고 2차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG 혹은 mouse IgG를 실온에서 30분간 반응시켰으며 PBS로 세척 후 avidin-biotin-peroxidase complex kit에 실온에서 60분간 반응시키고, DAB substrate kit로 실온에서 5분간 발색시켰다. 관정을 실체현미경하에서 척수패각을 천층판(SDH, 층판 I 및 II), 고유핵(NP, 층판 III 및 IV), 경부(NECK, 층판 V 및 VI)으로 나누어 Visus Image Analysis software (Foresthill Products, Foresthill, CA, USA)를 이용하여 integrated optical density (IOD)를 측정 하였다.

8. 통계처리

통계처리는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 11.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA)으로 Student's t-test로 유의차를 검사하였다. P값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. CFA유발 통증모델에서 전침효과

CFA유발 통증모델에게 isoflurane으로 마취를 하고 2 Hz, 0.1 mA의 자극을 20분간 가하고 전침 자극 30분 후, 마취효과가 완전히 사라진 뒤 plantar test를 통하여 thermal threshold를 측정하였다. 정상군은 전침군과 동일한 마취하여 두었으며 동일 시간대에 측정하였다. 정상군에 비해 CFA를 처리한 대조군에서 현저히 낮은 열적 민감도를 보였으며 이는 실험을 진행한 3일 동안 지속되었다. 그러나 전침은 CFA에 의해 유도된 열적 민감도를 감소시켰으며 특히 실험 2일째부터 현저하였다(Fig. 1).

2. NMDA 수용체 subunit에 대한 mRNA 발현 분석

실험 3일 째 L4-5 척수분절의 NMDA 수용체 NR1과 NR2B subunit mRNA발현을 ABI Prism 7900 sequence detection system을 이용하여 real-time quantitative PCR로 살펴보았다. CFA처리에 의해 NR1과 NR2B subunit mRNA 모두 감소하였으나 현저하지 않았으며, 전침에 의해 발현이 회복되었으나 NR1은 현저하지 않았으며 NR2B만이 현저한 회복을 보였다(Fig. 2).

3. CFA 유발 통증모델에서 ERK 발현 및 NMDA 수용체 antagonist MK801 영향

정상군, 전침군, CFA군 및 CFA+전침군으로 나누어 척수

L4-5의 ERK발현을 살펴 본 결과 각 군간이 현저한 변화는 관찰 되지 않았으며 NMDA수용체 antagonist MK801을 주사한 군에서도 유사한 발현을 보여 주었다(Fig. 3). 그러나 인산화형 ERK에 미치는 영향을 살펴보면 정상군에 비해 CFA군에서 현저한 증가를 보여 주었으며 CFA+전침군에서 현저히 감소하였다. MK801에 대한 영향을 알아보기 위하여 지주막하강 주입 후 인산화형 ERK 발현을 살펴 본 결과 CFA에 의해 ERK인산화형의 발현이 다소 증가하나 현저하지 않았으며 다만 CFA에 의해 증가된 발현은 전침과 MK801을 함께 처리할 때 현저히 감소하였다(Fig. 4).

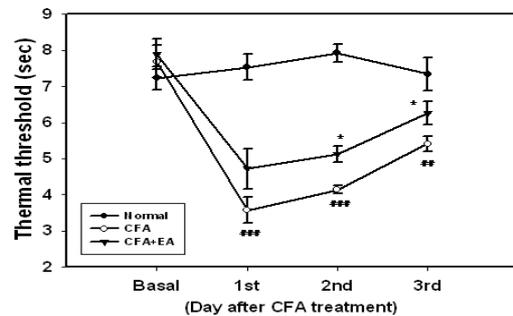


Fig. 1. Analgesic effects of EA in CFA-injected rats. Each point indicates the mean±SEM (n=5). EA treatment induced significant inhibition of CFA-induced hyperalgesia from day 2 post-injection. ## P<0.01 and ### P<0.001 compared to the normal rats. * P<0.05 compared to the CFA-injected rats.

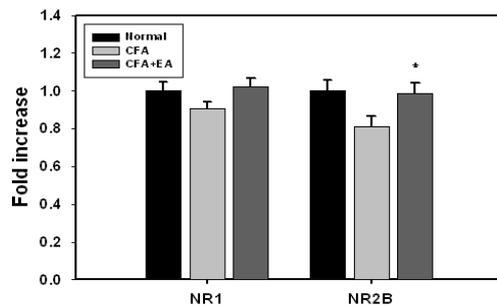


Fig. 2. Effects of EA stimulation on expression of NR1 and NR2B mRNA in the L4-5 segment of the spinal cord (n=5). A significant increase of NR2B mRNA compared to CFA-injected rats was evident. * P<0.05.

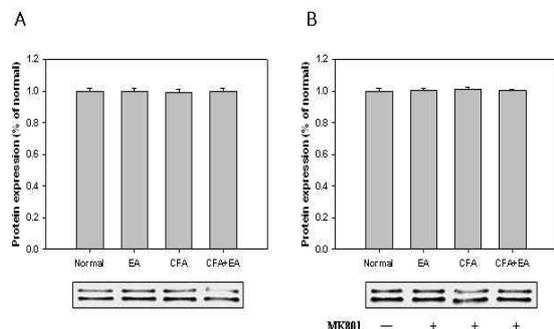


Fig. 3. Western blot and its densitometric analysis for ERK in the ipsilateral dorsal portion of the L4-5 segment of the spinal cord. The panel represents a typical result from three independent experiments. There were no significant changes by EA alone (A) and EA and MK801 co-treatment (B).

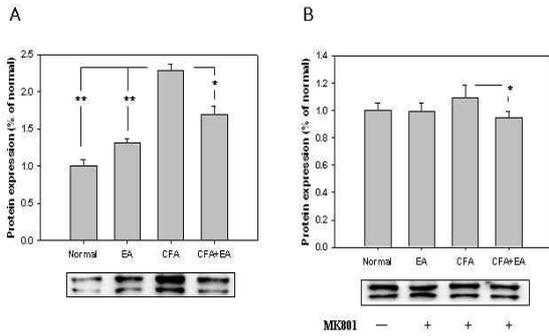


Fig. 4. Western blot and its densitometric analysis for ERK phosphorylation in the ipsilateral dorsal portion of the L4-5 segment of the spinal cord. The panel represents a typical result from three independent experiments. ERK phosphorylation was significantly increased in CFA-injected rats compared to normal ones and these inductions was significantly inhibited by EA stimulation (A). CFA-induced ERK phosphorylation was also inhibited by EA and MK801 co-treatment (B). * P<0.05, ** P<0.01.

4. CFA유발 통증모델의 인산화형 CREB 발현과 NMDA 수용체 antagonist MK801 영향

CFA처리에 의해 증가된 ERK활성은 전사인자인 CREB를 통하여 궁극적으로 통증관여 단백질 발현에 관여하는 것으로 알려져 있어 CREB활성에 대하여 조사하였다^{7,8)}. 인산화형 CREB는 정상군에 의해 CFA군에서 현저히 증가하였으며, CFA에 의해 유도된 인산화형 CREB는 전침에 의해 다소 감소하였으나 현저하지 않았다. MK801을 처리 했을 때 CFA에 의한 인산화형 CREB 발현 등 현저한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

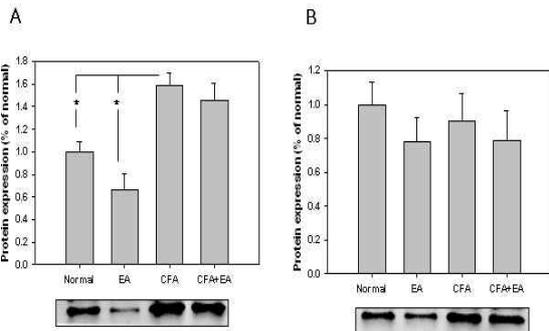


Fig. 5. Western blot and its densitometric analysis for CREB phosphorylation in the ipsilateral dorsal portion of the L4-5 segment of the spinal cord. The panel represents a typical result from three independent experiments. Phosphorylated CREB was significantly increased in CFA-injected rats compared to normal ones and these inductions was significantly inhibited by EA stimulation (A). CFA-induced marked ERK phosphorylation was not observed in MK801 treated rats. * P<0.05.

5. CFA 통증모델에서의 CREB활성에 대한 면역조직화학적 분석

앞선 결과에서 CFA는 ERK활성을 유도하며 나아가 CREB활성을 통한 유전자 발현으로 장기 통증을 나타냄을 시사하며 전침은 이러한 활성을 억제시키는 것을 보여 주었다. 이와 함께 NMDA antagonist MK801도 CFA에 의한 ERK활성을 줄여 주는 것으로 보여 전침과 MK801의 유사한 경로를 통해 CREB활성에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이에 정상군, CFA군, CFA+전침군, CFA+전침+MK801군의 척수배각내 인산화형 CREB에 대한 면역

조직화학적 분석을 행하였다. 척수배각을 천층판, 고유핵, 경부로 나누어 분석한 결과 천층판에서 정상군에 비해 CFA군에서 현저히 증가하며 이러한 발현은 전침과 MK801을 함께 처리할 경우 현저히 감소하였다(Fig. 6).

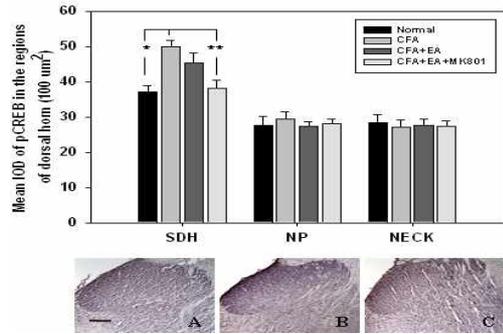


Fig. 6. Immunohistochemical analysis for CREB phosphorylation in the dorsal horn of the L4-5 segment (n=5). Data are expressed as the mean±SEM. The mean IOD of the dorsal horn in EA and MK801 co-treated rats showed a significant decrease compared to CFA-injected rats. * P<0.05 and ** P<0.01. Bar=200 um. A, normal; B, CFA; C, CFA+EA+MK801.

고찰

전침은 임상적으로 통증조절에 널리 사용되고 있으며 침의 진통기전을 알아보는 많은 한의학적 연구에서 질병의 원인에 따라 치료효과가 있는 경혈점이 각각 다르다는 것도 알려져 있다. 그중에서도 침의 효과가 대개 분절 신경분포에 근거하여 신경생리학으로 설명될 수 있듯이, 척수(spinal cord) L4-5번이 지배하고 있는 무릎아래 경혈점 중 가장 대표적으로 염증성 질환을 치료하고 통증을 제거하기 위해 사용되고 있는 족삼리(ST36)와 삼음교(SP6)를 이용하여 전침의 통증조절 기전에 대한 연구를 시행하였다.

전침의 통증조절 기전에 대한 연구는 주로 spinal endogenous opioid-mediated signaling pathway를 중심으로 이루어지고 있다¹⁰⁾. 저주파 전침은 뇌와 척수의 enkephalin과 β-endorphin을 분비하여 μ-opioid receptor가 관계한다. 본 실험은 이러한 opioid 중심의 진통 기전과 더불어 NMDA 수용체가 연관된 ERK MAPK활성 조절을 통해 조절이 이루어질 가능성에 대하여 살펴보았다. 우선 CFA유발 염증모델을 이용하여 전침 자극을 준 결과 CFA군에 비해 CFA+전침군에서 현저히 낮은 열적 민감도를 보여 주며 실험을 진행하는 3일 동안 지속되어 전침에 의한 통증조절이 가능함을 을 확인하였다(Fig. 1).

NMDA 수용체를 구성하는 subunit는 크기와 상동성에 따라 NR1과 NR2로 분류하며 NR1과 서로 다른 4가지 NR2 (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D)와 함께 NMDA 수용체의 성격을 결정하는 것으로 알려져 있다^{11,12)}. NMDA 수용체의 다양한 기능은 여러 subunit의 발생학적, 부위별 발현 및 조절에 의해서 궁극적으로 결정된다¹³⁾. 따라서 통증조절에 주요한 기능을 하는 것으로 알려진 NR1과 NR2B subunit mRNA가 CFA유발 통증모델에서 전침에 의한 변화를 살펴보았다. NR1과 NR2B subunit 모두 CFA군

에서 감소하였으며 전침처리에 의해 회복이 되었으나 NR1은 현저하지 않으며 NR2B가 현저한 회복을 보였다(Fig. 2).

염증에 따른 ionotropic glutamate receptor의 mRNA 발현은 통각과민도의 형성정도에 따라 상이하게 발현하는 것으로 알려져 있어 염증유발 후 표본 추출시간에 따라 상이한 결과를 보여 주고 있다^{14,15}. 본 실험에서 NMDA 수용체의 NR1과 NR2B subunit 감소는 CFA주사 후 3일째 결과로서 이는 CFA에 의한 NMDA 수용체 과발현 후에 따른 현상으로 보여지며, 전침에 의한 NR2B회복은 전침 진통작용에 따른 결과로 보여진다. 따라서 CFA유발 통증에 NMDA 수용체가 관여하며 전침에 의해 조절 가능함을 시사하고 있다.

뇌의 ionotropic glutamate receptor는 학습과 기억형성에 관여하는 것과 달리, 척수에서는 nociception에 관여하여 세포내 다양한 signaling pathway를 포함한 생화학적 루트를 통한 장시간의 신경 가소성에 관여한다⁴⁶. 특히 통증모델에 있어 척수 배각내 연결이전 신경세포의 glutamate분비는 연결이후 신경세포의 ionotropic glutamate receptor활성을 포함한 central sensitization에 관여하며 특히 칼슘 채널인 NMDA 수용체는 신경가소성에 있어 주요한 기능을 한다. 세포내 칼슘 유입은 다양한 세포신호전달을 통해 단기적 또는 장기적인 신경세포 기능변화를 유발하며 특히 ERK MAPK는 통증에 있어 주요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다⁷⁻⁹.

특히 glutamate 수용체 차단 시 척수내 인산화형 ERK의 감소를 보여 줄 뿐 아니라 역동적인 흥분성 amino acid분비에 의존적 이므로, NMDA 수용체와 ERK MAPK를 축으로 하는 신호전달이 다양한 통증 치료에 대한 신경화학적 목표가 될 가능성이 크다^{9,10}. 따라서 본 연구에서 전침 무통각에 관여할 가능성 높은 NMDA 수용체와 ERK와의 관련성을 알아보기 위하여 전침 자극에 의한 ERK와 인산화형 ERK 발현을 western blot으로 살펴 보았다.

ERK 발현은 CFA, 전침 그리고 MK801처리에 의해 현저한 변화가 관찰되지 않았으나 인산화형 ERK는 CFA에 의해 현저히 증가하였으며 이러한 증가는 전침에 의해 현저히 감소하였다. 그리고 NMDA 수용체 antagonist인 MK801을 처리하였을 때 CFA에 의한 인산화형 ERK 발현은 현저하지 않았으며 전침과 MK801을 함께 처리 하였을 때 현저한 감소를 보였다(Fig. 3, 4). 이는 CFA에 의한 ERK활성을 전침 및 MK801에 의해 각각 조절 가능하며 전침과 MK801은 유사한 경로를 통해 이를 함께 사용하면 보다 나은 효과를 나타낼 가능성이 있다.

활성화된 ERK는 핵내로 이동하여 RSK와 MSK를 통해 Elk-1, CREB 등 전사인자를 활성화하여 ERK의존형 유전자를 발현한다^{3,7,9}. 인산화형 CREB에 대해 조사한 결과 CFA에 의해 현저히 증가하였으며 전침에 의해 다소 감소하나 현저하지는 않았다. MK801을 처리 하였을 때 CFA에 의한 인산화형 CREB 증가도 관찰되지 않았다(Fig. 5). 그러나 면역조직화화적으로 CREB활성에 대해 살펴보면 천충판에서 CFA에 의해 증가하며 이러한 발현이 현저히 감소하는 것은 전침과 NMDA 수용체 antagonist MK801을 함께 처리한 경우이다(Fig. 6).

이상의 결과는 CFA주입이 NMDA 수용체를 통한 신경세포내 Ca²⁺유입이 유발시킴에 이는 ERK MAPK활성을 통해 전사인자 CREB활성을 유발하여 통증을 유발하는 것으로 보여진다. 이에 전침과 MK801은 ERK MAPK활성을 조절 가능하며, 또한 함께 처리했을 때 보다 나은 효과를 나타내어 서로 유사한 NMDA 수용체/ERK의존형 유전자 발현을 통해 통증을 조절할 가능성이 높다. 따라서 전침은 NMDA 수용체와 ERK MAPK를 축으로 하는 유해성 자극수용 신호전달에 작용할 가능성을 높이며 이는 다양한 통증 조절 치료에 대한 연구의 기초자료로 유용할 것이다.

결론

CFA유발 통증모델에 2 Hz 빈도, 0.1 mA 세기의 전침을 즉삼리, 삼음교에 해당하는 부위에 20분간 처리하여 동물행동학적으로 측정된 결과 전침은 현저한 열적 민감도의 감소를 보여 주었다. NMDA 수용체 NR1과 NR2B subunit mRNA 발현을 살펴 보면 CFA에 의해 감소하나, 전침에 의해 NR2B subunit는 회복되었다. 이는 NMDA 수용체가 전침 무통각에 관여할 가능성이 있어 intrathecal injection모델을 이용하여 전침과 NMDA antagonist인 MK801에 대한 ERK 관련 단백질 발현을 살펴 보았다. ERK 발현은 각 군 사이에 현저한 변화를 보여 주지 않았으나 인산화형 ERK는 CFA에 의해 현저히 증가하며 전침에 의해 감소하였다. 또한 인산화형 ERK는 MK801을 처리했을 때 CFA에 의한 현저한 증가도 관찰되지 않았으며 전침과 MK801을 함께 처리 했을 경우만이 CFA군에 비해 현저한 감소를 보였다. ERK활성과 연관된 전사인자 CREB의 인산화형은 CFA에 의해 현저히 증가하며 전침에 의해 감소하나 현저하지는 않았으며, MK801을 처리 했을 때는 CFA에 의한 현저한 발현도 관찰되지 않았다. 이를 면역조직화화적으로 살펴보면 척수배각의 천충판에서 CFA에 의해 인산화형 CREB가 현저히 증가하며 전침과 MK801을 함께 처리하면 현저히 감소하였다. 이상의 결과로 보아 CFA는 NMDA 수용체를 통해 ERK활성을 유도하며 나아가 전사인자인 CREB활성을 통해 통증을 유발하는 것으로 볼 수 있으며 이 과정에 전침이 NMDA 수용체의 활성 조절에 관여하여 무통각을 나타낼 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2008-313-E00711).

참고문헌

1. Choi, B.T., Lee, J.H., Wan, Y., Han, J.S. Involvement of ionotropic glutamate receptors in low frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Neurosci. Lett.* 377:

- 185-188, 2005.
2. Sandkühler, J. Learning and memory in pain pathways. *Pain* 8: 113-118, 2000.
 3. Sandkühler, J., Treier, A.C., Liu, X.G., Ohnimus, M. The massive expression of c-fos protein in spinal dorsal horn neurons is not followed by long-term changes in spinal nociception. *Neuroscience* 73: 657-666, 1996.
 4. Bliss, T.V., Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.
 5. Randić, M., Jiang, M.C., Cerne, R. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 13: 5228-5241, 1993.
 6. Sandkühler, J. Neurobiology of spinal nociception: new concepts. *Prog. Brain Res.* 110: 207-224, 1996.
 7. Daulhac, L., Mallet, C., Courteix, C., Etienne, M., Duroux, E., Privat, A.M., Eschaliier, A., Fialip, J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 70: 1246-1254, 2006.
 8. Wang, J.Q., Fibuch, E.E., Mao, L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J. Neurochem.* 100: 1-11, 2007.
 9. Kawasaki, Y., Kohno, T., Zhuang, Z.Y., Brenner, G.J., Wang, H., Van Der Meer, C., Befort, K., Woolf, C.J., Ji, R.R. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J. Neurosci.* 24: 8310-8321, 2004.
 10. Han, J.S. Acupuncture and endorphins. *Neurosci. Lett.* 361: 258-261, 2004.
 11. Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37, 1991.
 12. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221, 1992.
 13. Jin, D.H., Jung, Y.W., Ko, B.H., Moon, I.S. Immunoblot analyses on the differential distribution of NR2A and NR2B subunits in the adult rat brain. *Mol. Cells* 31: 749-754, 1997.
 14. Guan, Y., Guo, W., Zou, S.P., Dubner, R., Ren, K. Inflammation-induced upregulation of AMPA receptor subunit expression in brain stem pain modulatory circuitry. *Pain* 104: 401-413, 2003.
 15. Lu, J., Cui, Y., Cai, R., Mao, Y., Zhang, J., Sun, X. Early auditory deprivation alters expression of NMDA receptor subunit NR1 mRNA in the rat auditory cortex. *J. Neurosci. Res.* 86: 1290-1296, 2008.
 16. Isenoumi, K., Kumai, T., Kitaoka, Y., Motoki, M., Kitaoka, Y., Kuribayashi, K., Munemasa, Y., Kogo, J., Kobayashi, S., Ueno, S. N-Methyl-D-aspartate Induces Phosphorylation of cAMP Response Element (CRE)-Binding Protein and Increases DNA-Binding Activity of CRE in Rat Retina. *J. Pharmacol. Sci.* 95: 108-114, 2004.