

腎俞(BL₂₃) 杜仲藥鍼이 흰쥐의 신경병리성 동통모델에 미치는 영향

이동근, 이옥재, 이주희, 이상현, 이정훈, 신정철, 김재홍*

동신대학교 한의과대학 침구의학교실



[Abstract]

The Effects of *Eucommiae Cortex* Pharmacopuncture Injected at *Sinsu*(BL₂₃) on Neuropathic Pain in Rats

Dong Geun Lee, Ook Jae Lee, Ju Hee Lee, Sang Hyun Lee, Jung Hun Lee, Jeong Cheol Shin and Jae Hong Kim*

Department of Acupuncture and Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives : The purpose of this study is to examine whether *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture may affect to the neuropathic pain in a rat model.

Methods : To produce the model of neuropathic pain, under isoflurane 2.5 % anesthesia, underwent tight ligation by 6.0 silk thread and transection of the tibial and sural nerves, leaving the common peroneal nerve intact. After neuropathic surgery, the author examined if the exhibited the behavioral sign of allodynia. The allodynia was assessed by stimulating the plantar with Dynamic Plantar Aesthesiometer. Three days after the neuropathic surgery, *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture was injected at *Sinsu*(BL₂₃) once every week for 6 weeks. After that, the author examined the withdrawal response of neuropathic rats' leg by Dynamic Plantar Aesthesiometer.

And also the author examined Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2 ratio in the spinal cord of neuropathic rats and the change of WBC, RBC, HGB, HCT count in the blood of neuropathic rats.

Results : 1. The *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture decreased the withdrawal response of mechanical allodynia that assessed with Dynamic Plantar Aesthesiometer in EC2-BL₂₃ group as compared with control group.

2. The *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture decreased Bax/Bcl-2 ratio in EC1-BL₂₃, EC2-BL₂₃ group. But The *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture injected at *Sinsu*(BL₂₃) didn't change Bax, Bcl-2 expression level in the all group.

3. The *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture decreased WBC count in EC1-BL₂₃, EC2-BL₂₃ group.

Conclusions : We have noticed that *Eucommiae Cortex* pharmacopuncture decreased mechanical allodynia in the model of neuropathic pain compared with the control group. Bax/Bcl-2 ratio in spinal cord of that group was also decreased compared with the control group. This study can be used as a basic resource on a study and a treatment of neuropathic pain.

Key words :

Neuropathic pain;
Eucommiae Cortex
 pharmacopuncture;
Sinsu(BL₂₃)

Received : 2013. 08. 06.

Revised : 2013. 08. 15.

Accepted : 2013. 08. 26.

On-line : 2013. 09. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Gwangju Oriental Medicine Hospital of Dongshin University, 377-12, Wolsan-dong, Nam-gu, Gwangju, 503-850, Republic of Korea

Tel : +82-62-350-7209 E-mail : nahonga@hanmail.net

I. 서 론

신경병리성 동통(neuropathic pain)은 말초신경이나 조직의 손상으로 인해 발생하는 과통증(hyperalgesia), 이질통(allodynia), 자발적인 통증(spontaneous pain) 등을 수반하는 만성 통증의 하나로¹⁾, 1872년 Mitchell이 처음으로 외상으로 인한 작열통을 보고한 이래²⁾ 많은 환자에서 발견되었으며, 현재 우리나라에서도 이와 유사한 통증을 호소하는 환자가 많다.

한의학에서 신경병리성 통증은 痺證의 범주로 인식되어 왔는데, 《黃帝內經·素問·痺論》에서 “痺者閉也, 氣血凝滯不行也, 有風寒濕三氣之痺, 有皮氣脈筋骨五臟外合之痺”라 하여 風寒 혹은 風濕의 邪氣에 의해 氣血의 흐름이 막혀 격렬한 통증이 발생하는 것으로 보았다³⁾.

약침요법은 다양한 방법에 의해 제조된 약침액을 질환과 연관된 양성 반응점(압통점, 아시혈) 및 혈관에 약침주입용주사기를 사용하여 시술하는 방법으로서 혈위의 치료작용과 약물의 약리작용을 이용하여 생리적인 기능을 조정하고 병리적인 상태를 개선시켜 질병을 치료하는 신침요법이다^{3,4)}.

杜仲은 杜仲科에 속한 낙엽교목인 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)의 樹皮를 건조한 것으로 味는 甘微辛하고 性은 溫하며, 補肝腎 強筋骨의 효능으로 腰膝酸痛과 足膝痿弱에 사용된다고 하였으며, 肝腎不足으로 인한 腰膝酸痛과 筋骨無力를 치료하는 要藥이라고 하였다⁵⁾.

두충에 대한 실험적 연구로 Hong et al⁶⁾은 혈압강하 효과를, Kim⁷⁾은 소염, 진통 작용을, Kim et al⁸⁾은 면역증강 작용을, Han⁹⁾은 지질대사 작용을 보고한 바 있으나 아직 杜仲藥鍼이 신경병리성 통증에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 실정이다.

이에 저자는 소염, 진통 작용이 있으며 補肝腎, 強筋骨 효능이 있는 杜仲藥鍼이 신경병리성 동통에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 흰 쥐의 tibial nerve와 sural nerve 절제 모델의 腎俞(BL₂₃)에 杜仲藥鍼을 주입한 후 dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 이질통에 대한 회피반응시간 및 자극 강도의 변화, bax, bcl-2 발현과 혈액 내 WBC, RBC, HGB, HCT 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중이 약 180~200 g의 Sprague Dawley계의 白鼠를 사육장 (실내온도, 24~26 °C)내에서 물과 사료를 충분히 섭취하게 하면서 적응 사육 후 실험에 사용하였다.

실험동물을 관리하거나 실험할 때 인도적이고 윤리적인 관점을 견지하였으며, 동신대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다.

2) 약침 조제

한국산 杜仲(*Eucommiae Cortex*) 200 g을 증류수 1,000 ml와 함께 3시간 동안 끓인 다음 원심분리기 (Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary evaporator (Buchi, Netheland)로 수분을 증발시켜 100 ml로 감압 농축하였으며, 농축된 약침액을 동결건조기(삼원주식회사)로 -70 °C에서 동결 건조시켜 최종적으로 얻어진 약침액의 양은 15.87 g이었다. 이를 소분하여 생리식염수로 희석하였으며, pH meter(Orion, USA)로 각각 pH 7 산도를 조절하여 조제한 후 냉장 보관하였다가 시술에 사용하였다.

2. 방법

1) 신경병리성 동통 유발¹⁰⁾

백서를 isoflurane 2.5 %로 도입, 유지 마취 후 고관절 후측의 피부를 절개한 후 실체 줍 현미경을 사용하여 biceps femoris muscle 사이의 sciatic nerve를 찾아 tibial nerve와 common peroneal nerve 및 sural nerve를 확인한 후 microforcep으로 주변조직 및 혈관으로부터 분리시킨 다음, common peroneal nerve는 남겨두고, tibial nerve와 sural nerve는 현미경 하에서 6.0 silk thread로 결찰한 후 미세 수술가위로 절단하였다. 절개된 부위는 kanamycin을 점적하고 피부를 봉합하였다.

2) 군 분리

실험군은 동통을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(control, n=5), saline를 시술한 saline군(saline, n=5),

9.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ 두층약침을 처치한 약침1군(EC-1, n=5), 45.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ 두층 약침을 처치한 약침2군(EC-2, n=5)으로 총 4개 군으로 분류하였다.

3) 취혈 및 약침시술¹¹⁾

약침시술은 足太陽膀胱經의 腎俞(BL₂₃)에 시행하였으며, 위치는 뒤 정중선의 第2腰椎下에서 兩旁 1.5寸에서 인체와 상응하게 정하였다.

약침시술은 insulin syringe(31 G \times 8 mm, BD, USA)를 이용하여 1주일에 1회씩 총 6회를 양측 腎俞(BL₂₃) 부위에 20 μl 씩 각각 시행하였다.

4) Dynamic plantar aesthesiometer 측정

수술 후 3일째부터 6주간 1주에 1회씩 dynamic plantar aesthesiometer(UGO Basile 37450, Italy)를 이용하여, 각각 이에 대한 철회반응(withdrawal response)을 망으로 된 cage에 옮겨 5분간 안정시킨 후 관찰하였다.

Stimulator 자극에 의한 이질통 측정 방법은 0 g에서부터 50 g 강도까지 환측 발바닥 부위에 자극하여 발의 철회 반응의 react time(stimulator가 발바닥에 contact하여 다시 떨어질 때까지의 시간: second)과, force intensity(실 험체가 stimulator를 피한 순간의 힘: gram)를 얻었다.

5) 혈액 검사

채혈에 의하여 얻은 혈액 중 약 100 μl 를 EDTA-bottle에 넣은 후 곧바로 multispecies hematology analyser(950, Hemavet, USA)에 주입하여 WBC, RBC, HGB, HCT를 측정하였다.

6) 혈청 검사

분리된 혈청은 측정하기 전까지는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. GOT는 GOT/AST -PIII slide(Fujifilm Corporation, Japan)로, GPT는 GPT/ALT-PIII slide(Fuji film Corporation, Japan)로 Fuji dri-chem clinical chemistry analyzer (DRI-Chem 4000ie, Fuji film Corporation, Japan)를 이용하여 측정하였다.

7) Total RNA 분리 및 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

① Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 spinal cord 부위의 조직(20 mg)을 500 μl TRIZOL reagent(Gibco-BRL, USA)로 균질화

하고 균질액에 대해 200 μl 의 chloroform(Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들어서 잘 혼합한 후, 실온상태에서 5분 방치하고 난 다음 세포 유전물을 제거하기 위하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻은 상층액과 500 μl 의 isopropanol(Sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 Spectrophotometer(Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다. 이들 spinal cord 조직의 total RNA는 사용 시까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

② RT-PCR

분리된 total RNA 3 μg 과 2.5 μl oligo(dT), DEPC-treated water를 RT premix(Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)를 이용하여 20 μl cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) (sense primer: 5'-ACTCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTTCACCACTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 denature 그리고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Bax, bcl2, mGluR5 유전자에 대한 白鼠의 특이 primer는 PCR-premix kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Polymerase chain reaction은 cDNA 2 μl , sense primer 1 μl , antisense primer 1 μl , DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣었다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 동안 pre-denaturation, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 동안 melting, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 동안 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 bax 유전자증폭을 primer(sense primer: 5'-CATCTTCTTCCA GATGGTGA-3', antisense primer: 5'-GTTTCATCCAG GATCGAGCAG-3'), bcl2 유전자증폭을 primer(sense primer: 5'-CGGTTTCAGGTACTCAGTCAT-3', antisense primer: 5'-ACTTTGCACAGATGTCCAGT-3'), mGluR5 유전자증

폭을 primer(sense primer: 5'-TCCAATCTGCTCCTCC TACC-3', antisense primer: 5'-CAACGATGAAGAACTCT GCG-3')를 이용하여 mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

이렇게 증폭된 bax, bcl2, mGluR5의 DNA를 ethidium bromide(EtBr, 10 mg/ml)를 포함한 1.5 % agarose gel상에서 0.5x TBE buffer(80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 70 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 image station (Kodak, USA)을 이용하여 촬영하였으며, Kodak MI software(Kodak, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 통계처리

실험 성적은 평균값과 표준오차(mean±SE)로 표시하였으며, Window용 SPSS(version 10.05, SPSS)를 이용하여, 비모수적 방법 중 Mann-Whitney U test를 시행하여 실험군 사이의 통계적 유의성을 관찰하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

III. 결 과

1. Plantar 철회반응의 react time 변화

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두충 약침이 철회반응의 react time에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 1주째 100.0±0.00 %, 2주째 122.6±21.20 %, 3주째 128.3±24.81 %, 4주째 102.1±10.94 %, 5주째 173.7±21.46 %, 6주째 176.3±47.93 %를 나타내었다.

이에 비하여, EC-2군은 2주째 66.3±15.47 % ($p < 0.05$), 3주째 54.8±9.05 % ($p < 0.05$), 4주째 34.8±7.00 % ($p < 0.001$), 5주째 64.9±13.68 % ($p < 0.05$), 6주째 65.5±10.02 % ($p < 0.05$)로 2주째부터 6주째까지 모두 유의한 감소를 보였다(Table 1, Fig. 1).

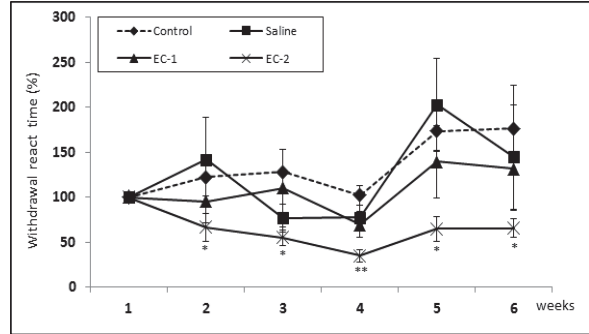


Fig. 1. Effects of Pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ Acupoint on the Withdrawal React Time in Neuropathic Pain Rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment, Saline : neuropathic pain induced and saline injection, EC-1 : neuropathic pain induced and 9.1 µg/kg/µl pharmacopuncture, EC-2 : neuropathic pain induced and 45.5 µg/kg/µl pharmacopuncture. Results are shown as mean±SE. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$, as compared with the corresponding data of control group.

2. Plantar 철회반응의 force intensity 변화

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두충약침이 철회반응의 force intensity에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 1주째 100.0±0.00 %, 2주째 122.0±20.69 %, 3주째 127.5±24.27 %, 4주째 102.0±10.83 %, 5주째 173.7±21.46 %, 6주째 176.3±47.93 %를 나타내었다.

Table 1. Effects of Pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ Acupoint on the Withdrawal React Time in Neuropathic Pain Rats (%)

Weeks \ Group	1	2	3	4	5	6
Control	100.0±0.00	122.6±21.20	128.3±24.81	102.1±10.94	173.7±21.46	176.3±47.93
Saline	100.0±0.00	141.9±47.06	76.6±15.33	77.4±13.91	202.7±51.36	144.7±58.31
EC-1	100.0±0.00	95.6±24.42	110.2±42.84	69.5±14.32	139.6±40.45	131.4±45.71
EC-2	100.0±0.00	66.3±15.47	54.8±9.05*	34.8±7.00**	64.9±13.68*	65.5±10.02*

Pharmacopuncture was treated on the rats for 6 weeks.

Results are shown as means±SE.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$, as compared with the corresponding data of control group.

Table 2. Effects of Pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ Acupoint on the Withdrawal Force Intensity in Neuropathic Pain Rats (%)

Group \ Weeks	1	2	3	4	5	6
Control	100.0±0.00	122.0±20.69	127.5±24.27	102.0±10.83	160.0±22.94	169.6±43.80
Saline	100.0±0.00	130.9±36.52	77.1±15.08	77.8±13.69	169.8±29.53	122.5±34.39
EC-1	100.0±0.00	95.5±23.87	109.5±41.67	70.0±14.21	138.4±39.51	130.3±44.53
EC-2	100.0±0.00	66.9±15.14*	55.5±8.93*	35.9±6.86**	65.5±13.34*	66.1±9.80*

Pharmacopuncture was treated on the rats for 6 weeks.

Results are shown as mean±SE.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$ as compared with the corresponding data of control group.

5주째 160.0±22.94 %, 6주째 169.6±43.80 %를 나타내었다. 이에 비하여, EC-2군은 2주째 66.9±15.14 %($p < 0.05$), 3주째 55.5±8.93 %($p < 0.05$), 4주째 35.9±6.86 %($p < 0.001$), 5주째 65.5±13.34 %($p < 0.05$), 6주째 66.1±9.80 %($p < 0.05$)로 2주째부터 6주째까지 모두 유의한 감소를 보였다(Table 2, Fig. 2).

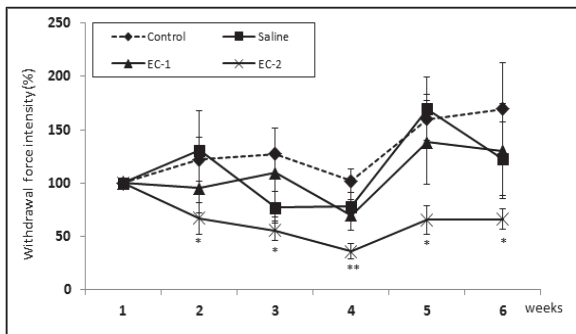


Fig. 2. Effects of pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ acupoint on the withdrawal force intensity in neuropathic pain rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment,

Saline : neuropathic pain induced and saline injection,

EC-1 : neuropathic pain induced and 9.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ pharmacopuncture,

EC-2 : neuropathic pain induced and 45.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ pharmacopuncture.

Results are shown as mean±SE.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$, as compared with the corresponding data of control group.

3. Bax 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두층 약침이 bax 발현 정도에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 113.2±3.20($\times 1,000$ OD), saline군은 115.4±4.20($\times 1,000$ OD), EC-1군은 110.1±2.34($\times 1,000$ OD), EC-2군은 108.1±1.66($\times 1,000$ OD)을 나타내었다.

Control군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

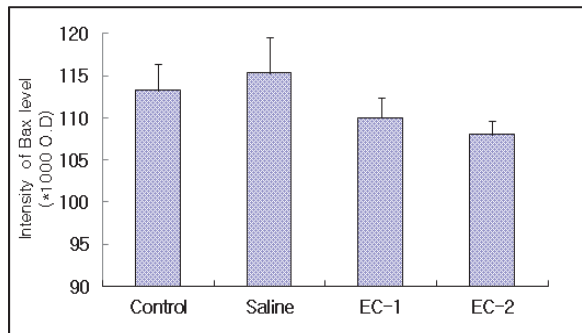


Fig. 3. Effects of pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ acupoint on the intensity of bax mRNA in neuropathic pain rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment,

Saline : neuropathic pain induced and saline injection,

EC-1 : neuropathic pain induced and 9.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ pharmacopuncture,

EC-2 : neuropathic pain induced and 45.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\mu\text{l}$ pharmacopuncture.

Results are shown as mean±SE.

4. Bcl-2 발현 변화

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두층 약침이 bcl-2 발현 정도에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 106.1±2.66($\times 1,000$ OD), saline군은 109.8±3.14($\times 1,000$ OD), EC-1군은 111.9±3.33($\times 1,000$ OD), EC-2군은 113.0±5.09($\times 1,000$ OD)를 나타내었다.

Control군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 4).

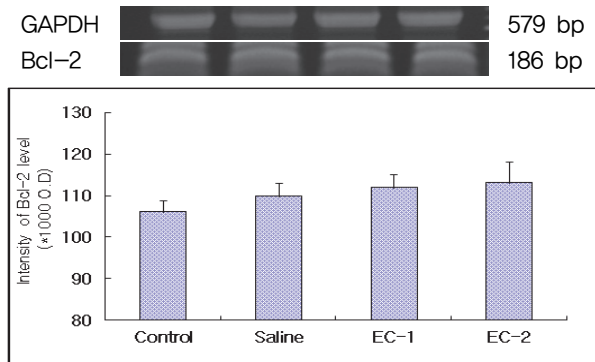


Fig. 4. Effects of pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ acupoint on the intensity of bcl-2 mRNA in neuropathic pain rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment,
 Saline : neuropathic pain induced and saline injection,
 EC-1 : neuropathic pain induced and 9,1 µg/kg/µl pharmacopuncture,
 EC-2 : neuropathic pain induced and 45,5 µg/kg/µl pharmacopuncture.
 Results are shown as mean±SE.

5. Bax/Bcl-2 ratio 변화

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두충약침이 Bax/Bcl-2 ratio 변화에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군은 1,07±0,005, saline군은 1,05±0,056, EC-1군은 0,98±0,010, EC-2군은 0,96±0,039를 나타내었다.

Control군에 비하여 EC-1군($p < 0,001$)과 EC-2군($p < 0,05$)에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 5).

6. WBC, RBC, HGB, HCT 변화에 미치는 영향

신경병리성 동통을 유발한 백서에 대한 두충약침이 WBC, RBC, HGB, HCT의 변화에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, control군에 비하여 RBC, HGB, HCT는 유의

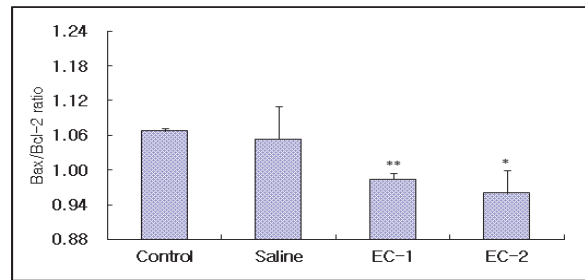


Fig. 5. Effects of pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ acupoint on the bax/bcl-2 ratio in neuropathic pain rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment,
 Saline : neuropathic pain induced and saline injection,
 EC-1 : neuropathic pain induced and 9,1 µg/kg/µl pharmacopuncture,
 EC-2 : neuropathic pain induced and 45,5 µg/kg/µl pharmacopuncture.
 Results are shown as mean±SE.
 * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,001$, as compared with the corresponding data of control group.

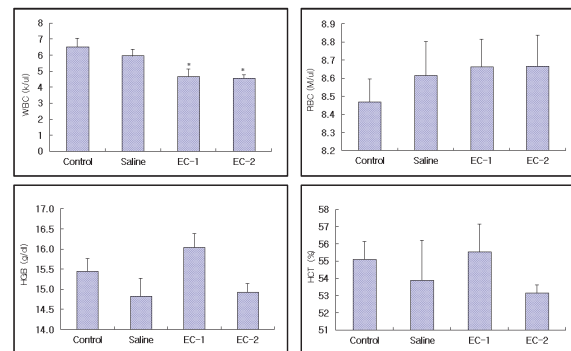


Fig. 6. Effects of pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ acupoint on the WBC, RBC, HGB, HCT in hematology of neuropathic pain rats

Control : neuropathic pain induced and no treatment,
 Saline : neuropathic pain induced and saline injection,
 EC-1 : neuropathic pain induced and 9,1 µg/kg/µl pharmacopuncture,
 EC-2 : neuropathic pain induced and 45,5 µg/kg/µl pharmacopuncture.
 Results are shown as mean±SE.
 * : $p < 0,05$, as compared with the corresponding data of control group.

Table 3. Effects of Pharmacopuncture(*Eucommiae Cortex*) at BL₂₃ Acupoint on the WBC, RBC, HGB, HCT in Hematology of Neuropathic Pain Rats

Group	Control	Saline	EC-1	EC-2
WBC(K/uI)	6,5±0,52	5,9±0,41	4,7±0,48*	4,6±0,22*
RBC(M/uI)	8,5±0,13	8,6±0,19	8,7±0,15	8,7±0,17
HGB(g/dl)	15,4±0,33	14,8±0,45	16,0±0,35	14,9±0,22
HCT(%)	55,1±1,04	53,9±2,31	55,5±1,62	53,2±0,46

Control : neuropathic pain induced and no treatment, Saline : neuropathic pain induced and saline injection,
 EC-1 : neuropathic pain induced and 9,1 µg/kg/µl pharmacopuncture,
 EC-2 : neuropathic pain induced and 45,5 µg/kg/µl pharmacopuncture.
 Results are shown as mean±SE.

* : $p < 0,05$ as compared with the corresponding data of control group.

한 변화가 없었으나, WBC의 경우 control군이 6.5±0.52 K/ul, saline군이 5.9±0.41 K/ul, EC-1군이 4.7±0.48 K/ul, EC-2군이 4.6±0.22 K/ul로 EC-1군과 EC-2군에서 유의한 감소를 보였다($p<0.05$)(Table 3, Fig. 6).

IV. 고 찰

통증이란 실질적인 또는 잠재적인 조직 손상이나, 이러한 손상과 관련하여 표현되는 감각적이고 정서적인 불쾌한 경험으로, 크게 침해성 통증(nociceptive pain), 염증성 통증(inflammatory pain) 및 신경병리성 통증(neuropathic pain)으로 분류된다. 이러한 통증은 감각적인 면과 정서적인 면을 포함하고 있으며, 같은 자극에 대해서도 개개인에 따라 그 반응이 다르게 나타난다²⁰.

일반적으로 손상 부위가 치유되면서 통증은 자연히 소실되지만 신경계 손상에 의한 통증은 손상 부위가 치유된 후에도 수개월 또는 수년 이상 지속되기도 한다. 이러한 신경계 손상의 결과 발생한 통증을 신경병리성 통증이라고 한다¹³. 신경병리성 통증은 신경계의 일차적 병변이나 기능 이상에 의해 시작되거나 발생한 통증으로 정의되는데, 신경병리성 통증은 손상 부위에 따라 중추성과 말초성으로 나눌 수 있고 유발자극의 유무에 따라 자발통증(spontaneous pain)과 유발통증(evoked pain)으로 나눌 수 있다. 자발통증은 지속성 통증과 발작성 통증으로 나타나며, 유발통증은 역치 이하의 비유해 자극에 의한 통증인 이질통(allodynia)과 유해 자극에 의한 통증인 통각과민(hyperalgesia)으로 분류할 수 있다^{14,15}.

사람이나 동물에서의 신경병리성 동통의 유발기전에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으나 정확한 유발기전이나 조절기전은 아직 밝혀지지 않고 있으며, 약물 및 비약물에 의한 치료가 있지만 만족할 만한 통증제어방법이 없어 새로운 치료법이 절대적으로 요구된다¹⁶.

신경병리성 통증은 사람에서는 주관적인 호소에 의존해야 하고, 통증양상 및 통증범위도 불분명하며, 정서적 원인에 의해 다양하고 복합적인 양상으로 나타나기에 효과적인 치료방법 모색에 많은 어려움이 있다¹⁵.

이러한 어려움 때문에 신경병리성 통증의 발생 기전을 연구하기 위한 동물모델의 필요성으로 신경절제 모델¹⁷ 개발을 통한 연구가 오래전부터 이루어지고 있는데, 이번 연구에 사용한 Lee et al¹⁰의 좌골신경절제모델은 총비골신경(common peroneal nerve)은 남겨두고, 경골신경(tibial nerve)과 비복신경(sural nerve)만 손상시켜 기존 신경절

제모델에 비해 만들기 쉽고, 손상시킨 신경섬유의 재생 가능성이 없다¹.

좌골신경절제모델에서의 신경병리성 통증은 좌골신경통과 근접한데, 좌골신경통은 한의학적으로 腰脚痛, 腰脚痺, 股幹痛, 脚筋痛 등의 범주에 속하며, 風寒濕邪, 肝腎兩虛, 氣血瘀滯로 변증되는데¹⁸, 《諸病源候論·腰背痛諸候》 腰脚疼痛候에서는 “腎氣不足, 受風邪之所爲也, 勞傷則腎虛, 虛則受于風冷, 風冷與眞氣交爭, 故腰脚疼痛”이라 하여 腰脚疼痛이 腎虛한 뒤에 風邪가 침범하여 발생하는 것으로 보았다¹⁹.

腎俞는 족태양방광경의 경혈로 滋補腎陰, 振氣化, 祛水濕, 強腰脊, 益水壯火의 穴性²⁰으로 비뇨생식기 질환, 소화기질환, 부인과질환, 전신성 만성 소모성 질환에 다용되며, 耳聾, 遺精, 腰痛, 月經不調, 身腫如水 등의 主治症을 갖는다²¹.

약침요법은 침구요법과 약물요법이 결합된 新鍼療法의 일종으로 경혈과 약물의 효과를 동시에 얻는 장점이 있다. 임상에서 진정, 소염, 해열, 구급 효과가 뛰어나 동통질환에서 속효성을 보이며, 약을 복용할 수 없는 환자에게도 사용할 수 있다는 장점이 있다²².

杜仲은 補肝腎, 強筋骨의 효능으로 腰膝酸痛과 足膝痿弱을 치료하는 要藥으로 최근의 연구에 따르면 Hong et al⁶은 혈압강하 효과를, Kim⁷은 소염, 진통 작용을, Kim et al⁸은 면역증강 작용을, Han⁹은 지질대사 작용을 보고하였고, Oh et al²³과 Lee et al²⁴은 골흡수 및 골무기질의 손실을 방지하고 골신생에 유의한 효과가 있으므로 골다공증 유발 억제에 응용이 가능하다고 보고하였다. 또한 Cho et al²⁵은 동물실험을 통해 경구투여 시 신경지배 차단에 따른 골격근 위축에 대해 근세포의 apoptosis억제효과가 있음을 밝힌 바 있다.

이와 같이 杜仲에 대한 활발한 연구가 진행되고 있으나 신경병리성 동통에 대한 진통효과를 다룬 실험 보고는 없는 상태로 두층의 補肝腎, 強筋骨의 효능으로 主治하는 腰膝酸痛과 足膝痿弱이 허리와 다리의 통증과 함께 화끈거리거나 저린 느낌이 나거나 감각이 둔해지고 다리에 힘이 빠지는 등의 좌골신경통 증상과 같음에 착안하여 신경병리성 동통모델 白鼠의 신수(BL₂₃)에 杜仲약침을 시술한 후 dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 이질통에 대한 회피 반응시간 및 자극 강도의 변화, bax, bcl-2 발현과 혈액 내 WBC, RBC, HGB, HCT 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었다.

본 실험에서 시행한 행동학적 검사 중 물리적 자극에 의한 회피반응에 사용한 dynamic plantar aesthesiometer는 0 g에서 50 g 강도까지 20초 동안 2.5 g/s로 일정하게 증가하는 자극을 가할 수 있는데 이때 물리적 이질통이 발

현된다. 이러한 물리적 이질통은 회피반응으로 나타나고 회피반응 시 자극은 자동적으로 멈추는데 이때의 자극량 (force intensity)은 0.1 g단위까지 나타낼 수 있다²⁶⁾.

Dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 물리적으로 이질통을 발생시킨 후 회피반응의 react time과 force intensity를 관찰한 결과 react time의 변화는 대조군에 비해 EC-2군은 2주째($p<0.05$)부터, 3주째($p<0.05$), 4주째($p<0.001$), 5주째($p<0.05$), 6주째($p<0.05$)까지 모두 유의한 감소를 보였다.

Force intensity의 변화에서도 EC-2군은 대조군에 비해 2주째($p<0.05$)부터, 3주째($p<0.05$), 4주째($p<0.001$), 5주째($p<0.05$), 6주째($p<0.05$)까지 모두 유의한 감소를 보였다. 이는 杜仲藥鍼이 신경절제로 손상된 흰 쥐의 낮은 역치를 높여줌으로써 회피반응의 감소를 보여주는 것으로 말초신경 손상에 의한 통증을 억제시킬 수 있는 가능성을 제시한다. 또한 고농도에서만 회피반응의 감소가 나타남을 통해 치료 시 농도에 따른 효과의 차이는 앞으로 더 많은 실험적 연구가 필요하리라 사료된다.

Bax는 주로 세포질에 존재하는데 DNA손상 등 스트레스가 전해지면 사립체 외막으로 이동하여 이의 투과를 유발하여 cytochrome-c를 유리시켜 apoptosis를 유도한다. Bax가 이러한 현상을 초래하는 정확한 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않았으나 사립체 외막에서 bax 단백질들의 소중합체형성(oligomerization)에 의해 초래되는 것으로 알려져 있다. Bcl-2는 bax의 작용을 억제하는 대표적인 인자로 사립체 막에서 bax의 소중합체형성을 억제하여 bax의 작용을 방해하고 궁극적으로 apoptosis를 억제하여 세포생존을 촉진하게 한다. 따라서 apoptosis를 유도할 때 bcl-2는 감소하고, bax는 증가하므로 bax/bcl-2 ratio는 apoptosis에 있어 중요한 의의가 있다고 알려졌다²⁷⁾.

Bcl-2는 신경손상 후 발생한 신경병리성 통증상태에서 증가하는데, 이는 신경손상에 따른 신경퇴행과정의 지속을 막기 위한 생체의 적응변화로 가정된다^{28, 29)}.

본 연구에서 bax, bcl-2, bax/bcl-2 ratio 발현 정도에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과 bax, bcl-2는 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았으나 bax/bcl-2 ratio는 EC-1군($p<0.001$)과 EC-2군($p<0.05$)에서 모두 유의한 감소를 보였다. 이는 두충약침이 신경병리성 동통에서 신경손상에 따른 신경퇴행과정에서 apoptosis를 막아 neuron의 손실을 줄일 수 있음을 보여주는 것으로 농도에 따른 효과 차이와 bax, bcl-2 각각의 발현 정도에 대한 연구는 추후 필요할 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서 두충약침이 실험과정 중 WBC, RBC, HGB, HCT수치의 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조

군에 비하여 WBC의 경우만 EC-1군과 EC-2군에서 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). Kim⁷⁾은 두충 추출물이 bradykinin과 prostaglandin의 합성을 억제하여 염증작용을 억제한다고 보고했는데 이를 볼 때 신경병리성 통증이 염증으로 인한 신경손상과 동반하였을 경우 두충약침이 소염효과를 나타내어 동통억제에 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 신경병리성 동통 흰쥐모델에 있어 腎俞(BL₂₃) 杜仲藥鍼은 EC-1군은 bax/bcl-2 ratio와 WBC감소에서만 유의한 효과를 보였고, 5배 약침 처치한 EC-2군은 물리적 이질통, bax/bcl-2 ratio, WBC감소에서 유의한 효과를 보였다. 이를 통해 두충약침이 신경병리성 동통 억제에 유의성이 있었으며, 향후 동통억제기전 및 농도와 투여기간에 대한 상세한 연구의 필요와 함께 실험적 모델에 대한 임상적 연관성에 대해서도 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

신경병리성 동통이 유발된 흰쥐에 대하여 腎俞(BL₂₃) 杜仲藥鍼 시술이 물리적 이질통, bax와 bcl-2 발현, 혈액학적 변화에 미치는 영향을 측정할 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 물리적 이질통에 대한 반응은 EC-2군은 2주부터, 3주, 4주, 5주째까지 모두 유의하게 감소하였다.
2. Bax와 bcl-2 발현은 모든 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았다.
3. Bax/bcl-2 ratio변화는 EC-1군과 EC-2군에서 모두 유의한 감소를 보였다.
4. WBC에 대한 변화는 EC-1군과 EC-2군에서 유의한 감소를 보였다.

VI. References

1. Lee BH, Sohn JH, Park YG. Effectiveness of Opioids in the Management of Neuropathic Pain, The Journal of Korean Brain Society. 2001 ; 1(1) : 53-64.
2. Mitchell SW. Injuries of Nerve and Their Consequences, Philadelphia : JB Lippincott, 1872 : 252.

3. Committee of Korean Acupuncture & Moxibustion Textbook Publisher, The Acupuncture and Moxibustion Medicine, Jipmoondang, 2012 : 16, 230-54, 617.
4. Korea institute of herbal acupuncture, Herbal Acupuncture treatment guidelines, Korea institute of herbal acupuncture, 2000 : 13-62.
5. Committee of Korean Textbook Publisher, Herbology, Seoul : Yeonglimsa, 2006 : 605-6.
6. Hong ND, Rho YS, Kim JW, Won DH, Kim NJ, Cho BS. Studies on the General Pharmacological Activities of *Eucommia ulmoides* Oliver, Kor J Pharmacogn, 1988 ; 19(2) : 102-10.
7. Kim BJ. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects by eucommiae cortex extract[dissertation], Seoul : Kyung Hee Univ, 2007, Korean.
8. Kim YJ, Kim SH, The effects of *Eucommiae Cortex & Eucommia ulmoides Oliv* on immune system, Journal of Herbology, 1994 ; 9(1) : 99-113.
9. Han SH, Effects of Cortex *Eucommiae* drink water from cholesterol-induced on lipid metabolism in rats, Korean J Orient Int Med, 2000 ; 21(3): 461-5.
10. Lee BH, Baik EJ, Lee SH, Moon CH, Injuries of different distal sciatic nerve branches differentially produce neuropathic pain in rats, Abstracts- 8th world congress on pain, 1996 : 27.
11. Koh HK, Transpositional acupoints of the rat, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 1999 ; 16(3) : 115-22.
12. Merskey H, Bogduk N, Classification of chronic pain, Seattle : IASP Press, 1994.
13. Yoon DM, Neuropathic Pain, J Korean Pain Soc, 1995 ; 8(2) : 219-24.
14. Moon DE, The Mechanism of Neuropathic Pain, J Korean Pain Soc, 2002 ; 12 (1) : 32-7.
15. Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML et al, Differential activities of intrathecal MK-801 of morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats, Pain, 1997 ; 71(1) : 57-64.
16. Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE, Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury, Pain, 1996 ; 68(1) : 97-107.
17. Wall PD, Devor M, Inbal R et al, Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa, Pain, 1979 ; 7(2) : 103-13.
18. Byun BH, Lim Sabina, Lee SW, Acupuncture treatment of Sciatica, The Journal of Jeahan Oriental Medical Academy, 1999 ; 4(1) : 558-65.
19. An MS, Jeong HY, Study on the Yo Bae Byoung Hoo of the Je Bung Won Hu Ron, Korean J Oriental Physiology & Pathology, 2003 ; 17(3) : 624-8.
20. Committee of Korean Acupuncture & Moxibustion Textbook Publisher, Acupuncture & Moxibustion(Sang) . Paju : Jipmoondang, 2008 : 136-7.
21. Jang SJ, Yook TH, The literature study on *Sinsu* (BL₂₃), The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 1998 ; 15(1) : 160.
22. Korean Pharmacopuncture Institute, Pharmacopuncturology, Elsevier Korea, 2008 : 3, 6-8.
23. Oh HS, Kim HC, Lee SI, Ahn DK, Effects of *Eucommiae Cortex* and *Folium* on the Ovariectomized Rat as the Model of Postmenopausal Osteoporosis, Kor J of Herbology, 1995 ; 10(1) : 59-68.
24. Lee JA, Noh SH, Ann DK, Choi HY, Effects of the *Eucommiae Cortex* and *Chanenomelis Fructus* on the Aged Ovariectomized Rat of Postmenopausal Osteoporosis, Kor J of Herbology, 2001 ; 16(1) : 201-6.
25. Cho JH, Kim KS, Cha JD et al, Effect of *Eucommiae Cortex* on Hind Limb Muscle Atrophy of Sciatic Nerve Transected Rats, Korean J Oriental Physiology & Pathology, 2008 ; 22(6) : 1454-61.
26. Ramakrishna Nirogi, Venkatesh Goura, Dhanalakshmi Shanmuganathan, Pradeep Jayarajan, Renny Abraham, Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2012 ; 66(1) : 8-13.
27. Condorelli G, Morisco C, Stassi G et al, Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes Bax and Bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure

- overload in the rat. *Circulation*. 1999 ; 99(23) : 3071-8.
28. De Novellis V, Siniscalco D, Galderisi U et al. Blockade of glutamate mGlu5 receptors in a rat model of neuropathic pain prevents early over-expression of pro-apoptic genes and morphological change in dorsal horn lamina II. *Neuropharmacology*. 2004 ; 46(4) : 468-79.
29. Kim YY. Differential expression of Bcl-2, Bax and heat shock proteins in the spinal cord of rat with neuropathic pain [dissertation]. Seoul : Seoul National Univ, 2003, English.