

전기자극이 Sprague-Dawley rat 중뇌의 Tyrosine Hydroxylase 함유  
세포에 미치는 영향에 관한 면역조직화학적연구  
(중뇌회백질 및 적색핵뒤영역)

극동정보대학 물리치료과, 용인대학교 물리치료학과<sup>1)</sup>, 충남대학교 수의과대학<sup>2)</sup>

김 동 대 · 김 수 한<sup>1)</sup> · 송 치 원<sup>2)</sup>

The immunohistochemical study of effects to tyrosine hydroxylase  
containing cells of Sprague-Dawley rat midbrain by electroacupuncture  
stimulus (Central gray and Retrorubral field)

Kim, Dong-Dae, Kim, Su-Han<sup>1)</sup>, Song, Chi-Won<sup>2)</sup>

*Dept. of Physical Therapy of Kukdong College*

*Dept. of Physical Therapy of Yongin University<sup>1)</sup>*

*Dept. of Veterinary Medicin of Chungnam National University<sup>2)</sup>*

- ABSTRACT -

This study was carried out to investigate the effects of electrical stimulation on the change Tyrosine-Hydroxylase immunoreactive(TH-IR) cells in the Central gray and retrorubral field of the male SD rats.

9 healthy and normal rats were divided into three groups, 3 SD rat in each group. The one group has been stimulated by electroacupuncture(EA, 2Hz) for 30min and the other group by EA for 1hr 30min and control group has been stimulated.

TH-IR cells were found in the Central gray(CG) and Retrorubral field(RF). The numbers of TH-IR cells of CG and RF were significantly increased after 30 min (CG  $6.2 \pm 0.83$ , RF  $1.4 \pm 0.55$ ) as compared with control group (CG  $24 \pm 3.16$ , RF  $6.4 \pm 0.55$ ) and were also significantly increased after 1hr 30min (CG  $75.6 \pm 4.51$ , RF  $18.8 \pm 0.89$ ) than 30min. These results show that TH is related into CG and RF in response to electrical stimulation.

---

Key Words : Electrical stress, midbrain, tyrosine hydroxylase

## 서론

통증이란 인간이 공통적으로 겪는 고통스러운 경험으로 그 질과 정도가 다양하며 생리적인 요인에 의해 큰 영향을 받는 하나의 주관적인 개념이다.

Merskey(1979)는 통증이란 실제적, 잠재적 조직 손상과 관련된 불쾌한 감각적, 정서적 경험으로 신체적, 사회적, 심리적 여러 요인들이 서로 조화를 이루어 만들어 내는 대단히 복잡한 현상이라고 하였으며, Bonica(1990)는 근육 경축, 근육 약화, 관절가동범위의 감소, 피로, 불면증, 불안, 우울증, 성적장애, 정서장애 등과 같은 증상으로 인해 통증이 발생할 수 있다고 하였다. Noling et all (1986)은 통각을 느끼게 하는 자극은 기계적자극, 화학적자극 또는 온열자극 등으로 그 범위가 광범위하며 이들 자극이 조직세포의 파괴 또는 그 전 단계에 이르는 변화를 일으킴으로써 통각이 발생한다고 하였다. 이러한 통증이 갖는 의미에 대해 학자마다 주장하는 바가 약간씩 다르긴 하지만 유해한 자극으로부터 인간을 보호하려고 하는 가장 원시적인 보호 반응의 하나라는데 대체로 의견을 같이하고 있다. Longobardi et all (1989)은 과거 한 때 여러 약품들이나 수술과 같은 방법에 의해 통증이 완전히 제거될 것으로 믿어졌었지만 오히려 해가되는 침해적인 수술이나 중독 등 다른 부작용으로 인한 문제가 대두되었다고 하였다. 이러한 이유로 통증 치료를 위한 다른 치료법에 대한 연구를 거듭하던 중 동양에서는 침술(acupuncture)을 서양에서는 전기자극을 이용한 통증관리법이 연구되어 왔다.

통증 치료와 관련해 김해규 등(1991)은 최근 통증 치료는 질환과 증상에 따라 그 치료방법이

다양하나 단계별로 통증 유발 원인을 제거하거나, 통증의 전달 경로를 차단하거나, 통증의 역치를 상승시키거나, 통증에 대한 반응을 변화시키는 것 등의 방법을 이용한 다양한 치료법이 개발되어 있다고 하였다. 그러나 Krause et all 등(1987)은 과거 수세기 동안 많은 학자들이 통증 기전을 밝히고자 노력해 왔음에도 불구하고 아직 정확한 기전과 완벽한 치료방법에 대한 결론을 내리지 못하고 있다고 하였다. 그럼에도 불구하고 지난 30여 년간 통증 생리학에 대한 이해는 놀랄만한 발전을 보여왔으며 이러한 발전은 관문 조절설(gate control theory), 자극유발 진통작용의 발견, 유해자극 감수기 및 유해자극에만 반응하는 중추신경 세포의 발견, 내재성 opioid 감수체 및 enkephalins의 발견 등에 기초한 내재 진통계(endogenous analgesic system)의 가설 등에 의한 것이다.

Tyrosine hydroxylase(이하TH)는 중추신경계통내에 존재하는 여러종류의 신경전달물질중의 하나인 catecholamine 합성효소중의 하나로서 catecholamine은 TH, aromatic amino acid decarboxylase(AADC), Dopamine  $\beta$  Hydroxylase (DBH) 및 Phenylalanine N Methyltransferase (PNMT)와 같은 catecholamine 합성효소를 이용하는 일련의 생합성 경로를 통해 tyrosine으로부터 차례로 합성되는 L-3,4-dehydroxyphenylalanine(L-DOPA), dopamine, noradrenaline 및 adrenaline을 총칭하는 용어로 정의될 수 있다. Catecholamine이 뇌, 교감신경, 교감신경절 및 크롬친화성세포에서 전구체 아미노산인 tyrosine으로부터 효소촉매작용에 의해서 형성된다는 사실이 밝혀진 이후, Vogt(1954)가 noradrenaline의 함량을 측정하여 중뇌와 시상하부에 높은 농

도로 존재한다고 보고하였고, 이어 Carlsson(1959)은 dopamine이 줄무늬체(corpus striatum)내에 대단히 높은 농도로 존재함을 밝히고 catecholamine 길항제인 reserpine을 투여하면 dopamine이 고갈되어 parkinson 씨병과 유사한 부작용이 나타남을 관찰 보고한 바 있다. 그 후 Nagatsu et al(1964)은 tyrosine이 DOPA로 전환될 때 TH가 관여하고 있음을 밝히므로써 생합성과정의 많은 부분이 밝혀지게 되었다. 또한 침에 의해 증가된 monoamine이 locomotor activity에 영향을 준다는 보고가 있다. 그러므로 본 연구자들은 통증을 유발할 수 있는 전기자극이 TH함유세포에 어떠한 변화를 주는지를 밝혀내기 위하여 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 성숙한 10주령 이상의 SD rat 수컷을 이용하였다. 각 군은 정상군, 전기자극 30분군, 전기자극 1시간 30분군으로 구별하여 각각 3마리씩을 사용하였고 전기자극은 2 HZ를 합곡유사부위(Habkok-like area)에 전기침을 이용하였다.

### 2. 면역조직화학적 연구방법

#### 1) 실험동물 처리

각 군은 전기자극을 마친 후 바로 thiopental sodium을 이용하여 체중 kg당 40mg씩을 복강내 주사하여 전신마취 시킨 후 흉강을 열고 오른 심방귀를 절개한후 왼쪽심실을 통해 0.1M

PBS(phosphate buffer saline, 0.9% NaCl, pH 7.4)를 주입하여 관류수세하였다. 이어 머리뼈를 절개한후 뇌를 적출하여 동일 고정액에 담구어 6-8시간 후고정하였다. 후고정이 끝나면 냉동절편시 빙결방지를 위하여 10% sucrose(in 0.1M PBS)에 24시간 침적시키고 다시 30% sucrose(in 0.1M PBS)에 가라앉을 때까지 담가놓았으며 가라앉은 조직은 냉동절편을 하기 전까지 -70℃에 냉동보관하였다. 각 뇌를 냉동절편기를 이용하여 관상면으로 40μm 두께로 절편하여 부유법(24 well plate를 이용한 floating method)으로 면역염색을 시행하였다.

#### 2) 항체 및 시약

본 실험에 이용하는 1차 항체는 토끼에서 추출한 TH(Instar)를 1% Triton X-100이 함유된 0.1M PBS용액으로 1:1000 희석하여 사용하였고, 2차 항체로는 biotinylated swine anti-rabbit immunoglobulins(Vector 제품)를 이용하였으며, 이 항체를 1% BSA(bovine serum albumin), 0.3% Triton X-100이 함유된 0.1M PBS로 1:200 희석하였다.

발색을 위한 항체로는 peroxidase-conjugated avidin (Vector 제품)을 같은 기질용액으로 1:100으로 희석하여 사용하였고 peroxidase와 반응하여 발색을 일으키게 하기 위하여 0.1M PBS 100ml당 3.3'-diaminobenzidine-4HCL (Sigma 제품) 40mg을 용해한 후, 기질액의 침전물이 없도록 하기 위하여 여과지로 2회 여과한 이 용액에 과산화수소수를 0.0045% 되도록 첨가시켰다(이하 DAB용액이라 함).

#### 3) 면역염색

TH 및 NGF의 면역염색에 앞서 조직절편에

남아 있는 sucrose를 제거하기 위하여 0.1 M PBS로 수세한 후 조직 내에 존재하는 peroxidase를 제거하기 위하여 0.5% 과산화수소수 용액(in 0.1M PBS)에서 30분-1시간 반응시켰다. 이어 비 특이성 항원에 대한 면역반응을 방지하기 위하여 0.1M PBS에 1% NGS(normal swine serum), 1% BSA 및 0.3% Triton X-100를 넣어 만든 preincubation용액에서 1-2시간 반응시켰으며, 그 후 1차 항체를 4℃에서 72시간 반응시킨 후 반응이 되지 않고 남아 있는 1차항체를 제거하기 위해 0.1 M PBS로 10분간 3회 수세하였다. 이어 2차 항체인 biotinylated swine anti-immunoglobulin을 4℃에서 12-16시간 반응시키며 다시 조직에 남아있는 여분의 2차 항체를 제거하기 위하여 0.1 M PBS로 10분간 3회 수세하고 peroxidase-conjugated avidin을 4℃에서 3-6시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 역시 결합이 안되고 남아 있는 항체를 제거하기 위해 0.1M PBS로 수세하고 DAB용액으로 5-20분간 발색시킨다. 발색이 끝난 슬라이드용 절편은 실온 또는 37℃ incubator에서 건조시키고 절편은 3% gelatin용액 내에서 슬라이드에 부착시켜 역시 실온 또는 37℃ incubator에서 건조시켰다. 24-48 시간 후 알코올 탈수 및 xylene 투명과정을 거쳐 canadian balsam을 이용하여 봉입하고 현미경으로 관찰하였다.

## 실험성적

정상군보다 전기자극 30분 군에서 다수의 면역반응세포를 관찰할 수 있었고 1시간 30분 군에서

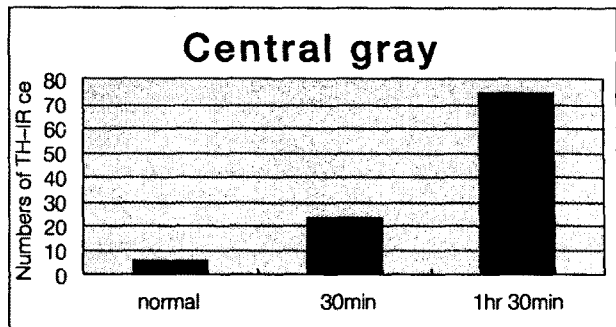


Table 1. The numbers of TH-IR cell in the Central gray

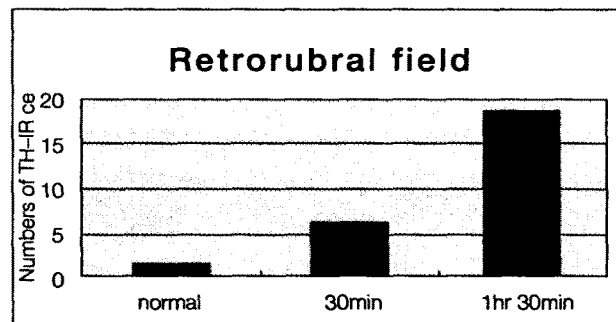


Table 2. The numbers of TH-IR cell in the retrorubral field

는 30분 군보다 더 많은 면역반응세포를 관찰할 수 있었다.

**정상군** : 정상군에서는 약간의 면역반응세포가 중뇌수도관의 중심회백질에서 관찰되었고 적색핵뒤영역에서는 면역반응을 나타낸 신경섬유만이 소수( $6.2 \pm 0.83$ ) 관찰되었다. 면역반응세포의 형태는 중심회백질에서는 소형의 핵을 가진 타원형의 홀극형 및 두극형의 세포가 관찰되었고, 적색핵뒤영역에서는 소수( $1.4 \pm 0.55$ )의 큰 핵을 가진 못극형 세포와 약한 면역반응을 나타내는 신경섬유가 관찰되었다 (Fig 1, 2).

**30분 군** : 정상군보다 증가( $24 \pm 3.16$ )된 면역반응세포가 중뇌수도관의 중심회백질에서 관찰되었으며 적색핵뒤영역에서도 소수( $6.4 \pm 0.55$ )의 면역반응세포와 신경섬유들이 관찰되었다. 면역반응세포의 형태는 중심회백질에서는 소형의

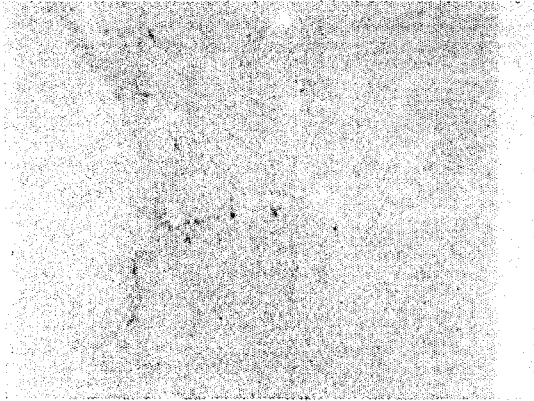


Fig 1. TH-IR cells on the Central gray of normal ( $\times 200$ )

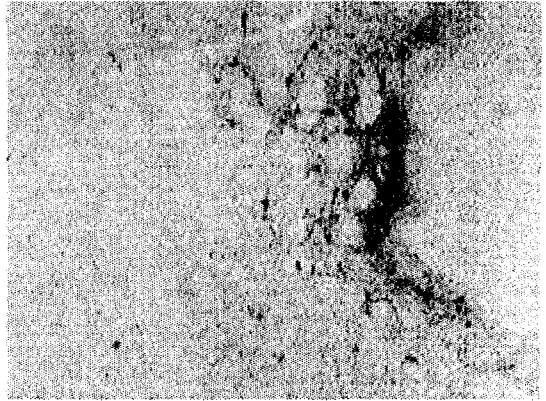


Fig 2. TH-IR cells on the Central gray of 30min treated EA ( $\times 200$ )

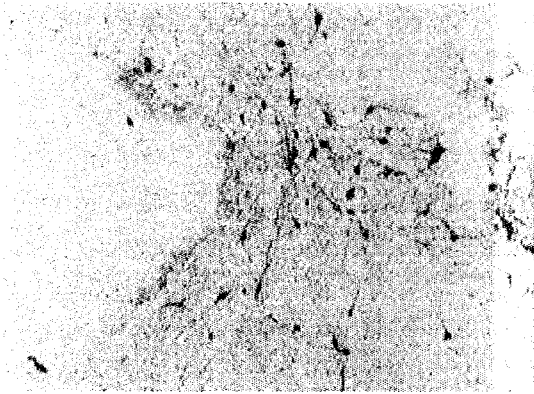


Fig 3. TH-IR cells on the Central gray of 1hr 30min treated EA ( $\times 200$ )

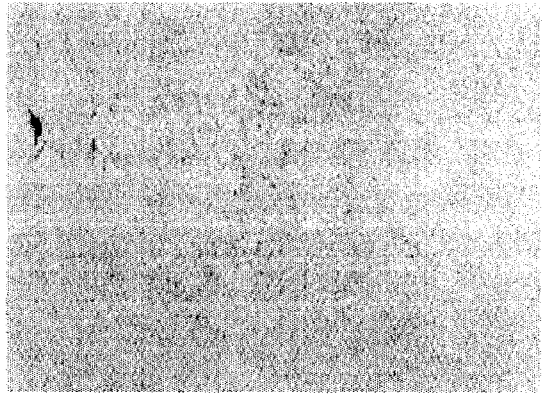


Fig 4. TH-IR cell on the Retrorubral field of normal ( $\times 200$ )



Fig 5. TH-IR cells on the retrorubral field of the 30min treated EA ( $\times 200$ )

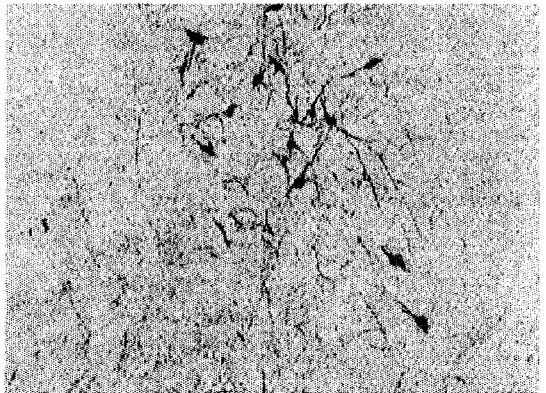


Fig 6. TH-IR cells on the retrorubral field of the 1hr 30min treated EA ( $\times 200$ )

핵을 가진 타원형의 두극형과 못극형의 세포가 관찰되었으며 적색핵뒤영역에서는 핵의 크기가 큰 타원형의 못극형 세포와 약한 면역반응을 나타내는 신경섬유들이 관찰되었다(Fig 1, 2).

**1시간 30분 군 :** 30분 군보다 증가( $75.6 \pm 4.51$ )된 면역반응세포와 신경섬유가 중뇌수도관의 중심회백질에서 관찰되었으며 적색핵뒤영역에서도 다수( $18.8 \pm 0.89$ )의 면역반응세포와 신경섬유들이 관찰되었다. 면역반응세포의 형태는 중심회백질에서 소형의 핵을 가진 타원형의 못극형의 세포와 다수의 신경섬유가 강한 면역반응을 나타내며 관찰되었고, 적색핵뒤영역에서도 다수의 큰 타원형의 못극형세포와 강한 면역반응을 나타내는 신경섬유들이 관찰되었다(Fig 1, 2).

## 고 찰

중뇌의 dopamine 신경세포는 운동습성(locomotor behavior), 섭식습성(ingestive behavior), 뇌내 자가자극습성(intracranial self-stimulation behavior), 약물남용(drug abuse), 파킨슨씨병(Parkinson's disease) 및 schizophrenia와 같은 여러 가지 행위, 신경학적 및 정신학적 질환(neurological and psychiatric diseases)과 관련이 있기 때문에 밀도 있게 연구되어 왔다. 중뇌 dopamine 신경계는 흑색질-줄무늬체계통(nigrostriatal system)과 중간변연-중간줄무늬체계통(mesolimbic-mesostriatal system)으로 대별된다. 흑색질-줄무늬체계통은 행동학적 반응과 운동의 시작을 조절하는데 중요한 역할을 하며 이 계통의 손상 시에는 수의적 운동의 시작에 장애가 있는 것이 특징인 파킨슨씨 병이 유발되는 것으로 알려져 있다. 배쪽피개영역 세포는 중간변연-중간피질

계통(mesolimbic-mesocortical system)에 포함되는데 이 계통의 기능은 아직 많은 부분이 밝혀지지 않았으나 사고, 감정 및 인식에 관한 요소를 포함하고 있을 것으로 추측되며 자가 자극(self stimulation), 먹고 마시는 것과 같은 소비성행동을 포함하는 다수의 행위와 관련이 있는 것으로 보인다. 흰쥐 중뇌의 dopamine성 신경세포의 분포를 보면 적색핵뒤영역, 흑색질 및 배쪽피개영역에서 관찰된다. 이러한 신경세포들은 국소적인 형태로(topographic fashion) 줄무늬체, 변연계(limbic system) 및 대뇌피질영역으로 투사되고 있다. 줄무늬체로 투사되는 A8, A9 및 A10군의 신경세포는 중간줄무늬체(mesostriatal) dopamine성 신경세포이며, 변연계 및 대뇌피질영역으로 투사되는 A8, A9 및 A10군 신경세포는 중간변연(mesolimbic) 및 중간피질(mesocortical) dopamine성 신경세포이다.

Chang et al (1996)은 침으로 흰쥐의 Bui-Hui point에 60분간 자극하였을 때 monoamine성의 신경전달물질에 의해 locomotor activity가 증가하였다고 하였는데, 본 연구에서도 시간의 경과에 따라 중심회백질과 적색핵뒤영역에서 TH-IR 세포가 증가하고 있음을 알 수 있었다.

Wang et al (1999)은 전기침에 의한 마취에서 중뇌 흑색질과 시상하부에서 TH의 mRNA가 증가되었다고 보고 하였다. 본 연구에서는 중심회백질과 적색핵뒤영역에서 그 수가 증가됨을 알 수 있었다. 이런 연구 결과는 전기침이 마취가 아닌 통각과 관련되어 있는 합곡부위에 자극을 주었을 때도 역시 TH를 함유한 세포가 자극하고 있음을 알 수 있었다. 또한 흑색질과 시상하부 뿐만이 아니라 중심회백질과 적색핵뒤영역에서도 크게 영향을 받음으로써 전기침이 통각에 의

한 TH분비를 증가시킨다는 것도 관찰하였다.

## 결론

전기자극이 중뇌의 중뇌회백질과 적색핵뒤영역내의 TH 면역반응세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 수컷 9마리를 각각 정상군, 전기자극 30분군, 전기자극 1시간 30분군으로 구분하여 합곡부위에 2HZ로서 실험을 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

TH 면역반응세포는 중뇌회백질과 적색핵뒤영역에서 관찰이 되었으며, 정상군보다 전기자극 30분 군에서 다수의 면역반응세포를 관찰할 수 있었고 1시간 30분 군에서는 30분 군보다 더 많은 면역반응세포를 관찰할 수 있었다. 정상군에서는 약간의 면역반응세포가 중뇌수도관의 중심회백질에서 소수( $6.2 \pm 0.83$ ) 관찰되었고, 적색핵뒤영역에서는 소수( $1.4 \pm 0.55$ )의 면역반응세포가 관찰되었다. 30분군에서는 정상군보다 증가된( $24 \pm 3.16$ ) 면역반응세포가 중뇌수도관의 중심회백질에서 관찰되었으며 적색핵뒤영역에서도 정상군보다 증가된 ( $6.4 \pm 0.55$ ) 면역반응세포가 관찰되었다. 1시간 30분군에서 다수의 ( $75.6 \pm 4.51$ ) 면역반응세포가 중뇌수도관의 중심회백질에서 관찰되었으며 적색핵뒤영역에서도 다수의 ( $18.8 \pm 0.89$ ) 면역반응세포가 관찰되어 30분군보다 증가된 양상을 나타내고 있었다. 이 결과는 통증에 관련된 부위의 자극에 따른 전기자극이 TH의 변화를 주고 있음을 알수 있었다.

## 참고문헌

- 김해규 외 3인 .저출력 레이저의 임상적 응용, 대한통증학회지, 제4권 제2호, 106-110,
- Bjorklund A, Lindvall O : Dopamine-containing system in the CNS. In Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 2. Classical transmitters in the CNS (Part I), eds. Bjorklund A, Hokfelt T, Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 55-122, 1984
- Bonica JJ. The management of Pain. 2nd ed, Lea & Febiger, Malvern, 1990.
- Chang YH, Hsieh MT, Cheng JT : Increase of locomotor activity by acupuncture on Bai-Hui point in rats. Neurosci Lett 211(2):121-4, 1996.
- Cheng RS, Pomeranz B : Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. Brain Res 215(1-2):77-92, 1981.
- Choy VJ, Watkins WB : Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. Cell Tissue Res 180(4):467-90, 1977
- Dahlstrom A, K Fuxe: Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brainstem neurons. Acta. Physiol. Scand. 62(suppl232):1-55, 1964.
- Hokfelt T, Marternsson R, Bjorklund A et al : Distributional maps of tyrosine-

- hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 2. Classical transmitters in the CNS (Part I), eds. Bjorklund A, Hokfelt T, Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, pp. 277-379, 1984.
- Hokfelt T, O Johansson, K Fuxe: Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain: I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. *Med. Biol.* 54:427-453, 1976.
  - Krause, Clelland JA, and Knowles CJ et al. Effect of unilateral and bilateral auricular transcutaneous electrical nerve stimulation on cutaneous pain threshold. *Phys Ther*, 67 : 507-511, 1987
  - Lidbrink P, G Jonsson, K Fuxe : Selective reserpine-resistant accumulation of catecholamines in central dopamine neurons after DOPA administration. *Brain Res.* 67:439-456, 1974.
  - Lindvall O, A Bjorklund : The organization of the ascending catecholamine neuronsystems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta. Physiol Scand.* 412:1-48, 1974.
  - Longobardi AG., Clelland JA, and Knowles CJ. Effects of auricular transcutaneous electrical nerve stimulation on distal extremity pain. *Apilot study, Phys Ther*, 69(1) : 10-17, 1989.
  - Marsden CD : The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 32:514-539, 1982.
  - McGeer DL, Eccleio JC, McGeer EG : Molecular neurobiology of the mammalian brain. 2nd ed. New York, Plenum Press, 337-338, 1987.
  - Merskey H. Pain terms, A list with definition and notes on usage. *pain*, 6 : 249, 1979.
  - Nagatsu I, S. Inagaki Y, Kondo N, Karasawa T. : Immunofluorescent studies on the localization of tyrosine hydroxylase and dopamine- $\beta$ -hydroxylase in the mes-, di- and telencephalon of the rat using unperfused fresh frozen section. *Acta Histochem Cytochem.* 12 : 20-30, 1964.
  - Noling LB., Clelland JA, and Jackson JR. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation at auricular points on experimental cutaneous pain threshold. *Phys Ther*, 68(9) : 1367-1374, 1989.
  - Ungerstedt U: Aphagia and adipsia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta. Physiol. Scand.* 367:95-121, 1971.
  - Wang YQ, Cao XD, Wu GC: Role of dopamine receptors and the changes of



the tyrosine hydroxylase mRNA in  
acupuncture analgesia in rats.  
Acupunct Electrother Res 24(2):81-8,  
1999.

- YG Jung, KS Kim, CH Lee, WK Yoon,  
BH Hyun, YS Oh, MH Won, MK Kim.  
dopaminergic neurons of the substantia  
nigra and ventral tegmentum in the  
stripped field mouse(*apodemus agrarius*  
*coreae*). Korean J. Vet Res. 37(3):499-  
508, 1997.