

GaAsAl 레이저가 물리적 통증반응과 관련된 척수내 신경세포의 활성화에 미치는 영향

동남보건대학 물리치료과, 경기대학교 대학원 물리학과¹⁾

송영화 · 이영구¹⁾ · 임종수

Effects of GaAsAl laser on the spinal neuronal activity induced by noxious mechanical stimulation

Song, Young-Wha, Lee, Young-Gu¹⁾, Lim, Jong-Soo

Dept. of physical Therapy, Dongnam Health College

Dept. of Physics, Graduate School of Kyonggi University¹⁾

- ABSTRACT -

The present study was designed to investigate the effect of low power GaAsAl laser on Fos expression in the spinal cord induced by noxious mechanical stimulation. Noxious mechanical stimulation was applied to the right hindpaw following 30min of low power laser treatment using different intensity and treatment point and the resulting Fos expression in the spinal cord dorsal horn was compared to that obtained in rats exposed only to the noxious mechanical stimulation. The results were summarized as follows:

1. In intact control rats, only a few Fos like immunoreactive(Fos-IR) neurons were evident in the lumbar spinal cord dorsal horn. Similarly, following prolonged inhalation anesthesia, Fos-IR neurons were absent in the dorsal horn of the lumbar spinal cord. In animals treated with noxious mechanical stimulation, neurons with nuclei exhibiting Fos immunostaining were distributed mainly in the medial half of ipsilateral laminae I-V at lumbar segments L3-5. These findings directly indicated that prolonged anesthesia used in this study did not affect the Fos expression in the spinal cord dorsal horn of intact animals and noxious mechanical stimulation treated animals.

2. In acupoint treated animals, 10mW of laser stimulation, not 3mW intensity, signif-

icantly reduced the number of Fos immunoreactive neurons in the spinal dorsal horn induced by noxious mechanical stimulation($P < .01$). However, the suppressive effect of low power laser stimulation was not observed in 3mW and 10mW of laser stimulation into non-acupoint.

These data indicate that 10mW of low power laser stimulation into acupoint is capable of inhibiting the expression of Fos in the dorsal horn induced by noxious mechanical stimulation. In conclusion, these findings raise the possibility that low power laser stimulation into acupoint may be a promising alternative medicine therapy for the mechanical stimulation induced pain in the clinical field.

Key Words : low power laser, acupoint, non-acupoint, noxious mechanical stimulation-induced pain

I. 서론

저출력 레이저란 레이저광의 조직내 흡수에 의해 직접적인 조직의 손상을 유발하지 않는 범위 내의 출력을 사용하는 방법을 말하며, 현재 임상에서 물리치료사들에 의해 많이 사용이 되어지고 있다. 저출력 레이저의 임상적용은 동통의 완화, 창상치유의 촉진, 기도감염의 치유, 신경세포의 재생 촉진 등에 널리 이용이 되고 있다. 뿐만 아니라 레이저 처치후 골관절염등으로 인한 염증성 통증에 더욱 효과적인 것으로 알려져 있다(Gussetti et al, 1986 ; Synder-Mackler et al, 1988). 근래에 들어 주목할 만한 점은 레이저 치료기술을 동양의학과 접목시켜 경락에 레이저 광을 조사하여 생체자극을 유도함으로써 치료의 효과를 증진시키려는 노력이 대두되고 있다는 점이다(김웅 등, 1995).

그러나 다양한 환자들의 요구에 맞추어 흔히 선택되고 사용되어지는 저출력 레이저는 실제로 통증을 제거할 수 있는 장비인지에 대한 과학적이고도 의학적인 지식을 바탕으로한 근거는 턱없이 부족한 실정이다. 이러한 저출력 레이저가 가지는 통증완화 효과를 규명해 보기 위해 국내에서도 몇가지 연구가 선행이 되었으나 사람을 대

상으로한 임상실험 결과의 경우도 통증을 느끼는 정도 및 표현방식이 다르고 주변의 여러상황(가정교육, 문화 등)에 따라 쉽게 영향을 받기 때문에 객관적인 평가가 어려운 실정이다. 뿐만 아니라 실험동물을 대상으로 한 실험의 경우 통증을 객관성 있게 평가할 수 있는 방법이 지극히 제한되어 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 저출력 레이저가 가지는 통증 억제효과를 최대한 객관적으로 평가를 하고자 척수내 신경세포내에 축적되는 Fos단백질에 대한 면역조직화학법 및 컴퓨터를 이용한 영상분석기법을 이용하여 신경활성을 검정 하고자 하였다.

포유류에서 발견되는 proto-oncogene의 일종인 c-fos는 외부 및 내부에서 전달되는 자극에 대해 빠르게 반응하여 발현하기 때문에 primary response gene 또는 early response gene으로 불리우기도 한다. 이러한 c-fos gene은 세포막에 존재하는 NMDA 수용체나 L-type calcium channel 등의 활성화증가에 의해서도 발현이 증가하며, 특히 신경세포가 외부 및 내부 자극에 의해 탈분극되는 초기에 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 c-fos oncogene의 발현에 의해 세포질내에서 Fos 단백질이 빠른 시간내에 합성되기 시작하는데 특히 초기자극이 있을 후

20-90분에는 많은 양의 Fos 단백질이 생산되어 종래에 이용되고 있는 면역조직화학법에 의해 이 단백질이 신경세포내에 축적되었는지의 유무를 쉽게 감지할 수 있다. 이렇게 세포질내에서 합성된 Fos 단백질은 빠른 시간내에 핵(nucleus)내로 이동하는 것으로 알려져 있다. 따라서 신경세포의 활성증가로 생산된 Fos 단백질의 핵내축적 정도는 신경세포의 활성변화를 간접적으로 검정할 수 있는 유용한 marker로 사용될 수 있다(손성세, 1998).

한편 여러 가지 통증자극에 의해서도 척수내 신경세포의 핵내에 Fos 단백질이 발현되어 축적되는 것으로 알려져 있으며, Hunt et al(1987)이 척수후각내에서 이루어 지는 통증에 관한 정보의 전달경로를 측정하기 위해 c-fos mRNA의 산물인 Fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학방법을 최초로 이용한 이래 말초신경에 여러 가지 체성 및 내장성 동통침해자극을 가했을 경우 척수 및 뇌에서 Fos 단백질 발현 신경세포의 분포 및 수적변화에 대한 많은 연구가 보고되었다(Abbadie & Besson, 1993; Abbadie & Besson, 1994; Lanteri-Minet et al, 1994; Traub et al, 1996; Laudanna et al, 1998). 뿐만 아니라 현재 신경세포내 축적되는 Fos 단백질에 대한 면역조직화학법 및 영상분석기법은 통증효과를 검증하는 최상의 형태학적 방법으로 평가되고 있다(Munglani & Hunt, 1995).

이에 본 연구에서는 물리적인 통증이 척수내 신경세포의 활성변화에 미치는 영향을 연구하고, 나아가 저출력 레이저가 이러한 척수 신경세포의 Fos 단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 면역조직화학적 기법 및 컴퓨터를 사용한 영상분석법으로 규명하고자 본 연구를 시도하였다.

II. 실험

1. 실험동물

체중 200-250g인 Sprague Dawley종 웅성 rat(한림실험동물, n=8)를 선별하여 스트레스 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화함으로써 실험외적인 요인들이 물리적 자극에 대한 신경세포의 통증반응에 영향을 미치지 않도록 실험동물을 관리하였다. 또한 실험전후에 실험동물의 건강상태를 검사하여 외상의 유무와 질병상태를 조사하였고, 이를 바탕으로 정상적인 실험동물만을 선택하여 실험에 사용하였다. 모든 실험은 실험동물이 가지는 diurnal variation을 배제시키기 위해 오전 8시에서 오후 3시 사이에 실시하였으며, 마취로 인한 체온하강을 방지하기 위해 실험전과정에 거쳐 실험동물의 직장체온을 측정, 관찰하고 체온이 일정한 수준으로 유지하도록 하였다.

2. 레이저 조사방법 및 물리적 자극방법

본 실험에는 Gs-As-Al type 의 Endolaser 476 레이저 조사기(최대파장 780nm, Asah Medico, Denmark)를 사용하였으며, 각각 최소 3mW 및 최대 10mW(6J/10min)의 강도로 1시간동안 조사하였다. 레이저 자극시 마취 후 실험동물을 플라스틱으로 제작한 고정틀(Ugo Basile)을 사용하여 고정된 후 조사할 부위의 털을 깨끗이 제거한 후 실시하였다. 레이저 조사기간을 포함한 전 실험기간동안 isoflurane을 이용하여 실험동물에 흡입마취를 유도하여 실험기간동안 보정 및 레이저 조사 등에서 실험동물이 느끼는 스트레스를 최소화하였으며, 흡입마취의 정도는 실험동물의 호흡수와 체온을 측정함으로써 일정한 진정상태가 유지되도록 하였다.

실험에 사용한 물리적 자극은 isoflurane으로 마취한 상태에서 실험동물 오른쪽 후지의 발가락 사이를 수술용 지혈갑자를 이용하여 각각 10초간 10회에 걸쳐 적용하였으며, 물리적 자극에 소요된 시간은 총 10분간 소요되었다. 물리적 자극을 가한 실험동물은 자극이 종료된 후 110분만에 희생하여 고정액으로 척수를 고정하여 분석에 사용하였다.

3. 흡입마취가 물리적 자극에 대한 척수내 신경세포의 활성화에 미치는 영향

실험대조군으로 아무런 자극이나 마취를 하지 않은 정상 실험동물의 척수내에서 발현되는 Fos 단백질의 정도를 측정하기 위해 정상적인 실험동물을 대상으로 면역조직화학법을 실시하였다. 뿐만 아니라 마취로 인해 유발될 수 있는 척수내 Fos 단백질의 발현을 검정하기 위해 물리적 자극이나 레이저 조사를 하지 않고 본 실험에 사용한 마취만을 2시간동안 처치한 후 실험동물 희생하여 위에서 설명한 동일한 방법으로 면역조직화학법으로 척수내 Fos 단백질의 발현정도를 검정하였다

뿐만 아니라 본 실험에 사용한 흡입마취가 물리적인 자극에 대한 실험동물(n=10)의 척수내 신경활성에 미치는 영향을 검정해 보기 위해 실험에 사용한 동일한 강도의 흡입마취를 실시한 실험군과 흡입마취를 하지 않은 실험군을 상대로 물리적 자극을 가한 후, 레이저자극을 가하지 않고 2시간후 실험동물을 희생하여 고정된 척수로부터 분리한 조직을 사용하여 Fos 단백질에 대한 조직면역염색법을 실시한 후 Fos 단백질의 핵내 축적 정도를 영상분석기법으로 검정하였다.

4. 레이저의 경혈 및 임의혈 자극에 따른

물리적 통증에 대한 척수내 신경세포의 활성화 변화 측정

레이저의 조사부위에 따른 물리적 자극에 대한 척수내 신경세포의 활성화에 미치는 영향을 검증하기 위해 레이저 조사기를 이용하여 각각 3mW 및 10mW의 강도로 실험동물의 레이저 조사부위에 따라 족삼리 자극군(n.=10) 및 임의혈 자극군(n.=10)으로 나누어 실시하였다. 족삼리 자극군은 마취가 정상적으로 유도된 10분후부터 1시간동안 실험동물의 우측 후지에 위치한 tibia anterior tubercle의 외측 5mm 및 tibia와 fibula 사이에 위치하고 있는 족삼리 (Zusanli, ST36)에 처치하였으며, 임의혈 자극군의 경우 실험동물의 배부 임의혈에 족삼리 자극군에서와 동일한 방법으로 레이저를 조사하였다. 레이저 조사가 끝난 후 1시간이 경과한 시점에서 각각의 실험동물을 심마취한 후 고정액으로 고정한 후 척수를 분리하여 면역조직화학법에 이용하였다.

5. 조직의 처리

레이저 조사가 끝난 1시간 후에 실험동물을 isoflurane으로 심마취시킨 후 대동맥을 통해 고정액을 관류시켜 고정하였다. 고정액을 주입하기 전 calcium free tyrode용액 100ml를 주입하여 조직으로부터 혈액을 완전히 제거한 후 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 포함한 0.4M phosphate buffer(Lana's fixative)를 관류시켜 조직을 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 동일한 고정액에서 4시간동안 처리하여 후고정하였으며, 10%, 20%, 30% sucrose 용액에 차례로 침전시켜 조직이 동결시 손상되지 않도록 하였다. 실온에서 24시간동안 sucrose 처리가 끝난 조직은 20℃의 온도로 freezing stage에서 신속히 얼리고 sliding microtome

을 사용하여 두께 40 μ m로 연속절편을 제작하여 면역조직화학법에 사용하였다.

6. Fos 단백질의 면역조직화학적 검정

본 실험에서 사용한 면역조직화학법은 Avidin-Biotin peroxidase method를 사용하여 실시하였으며 항체의 비특이적 반응을 줄이고 단백질 검출의 민감도를 높이기 위해 biotin amplification 방법[23]을 사용하였다.

레이저 조사가 끝난 다음 고정액으로 뇌를 고정하고 적출하여 척수내 신경세포의 활성 변화를 검정하고자 하였다. 면역조직화학법에 사용한 Fos 단백질에 대한 일차 항혈청은 anti-Fos rabbit IgG (Calbiochem) 및 anti-Fos sheep IgG (Cambridge)를 각각 1: 100,000 및 1: 1,000으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 조직에 처리하여 반응시켰다. anti-Fos rabbit IgG (Calbiochem)을 사용한 경우 일차 항혈청 처리가 끝난 조직은 산양에서 생산한 이차항체 (goat anti rabbit IgG, vector 1:200)를 이용하여 실온에서 1시간 처리하였다. 항체반응이 끝난 조직은 avidin-biotin complex (Elite kit, Vector, 1:250)을 실온에서 30분간 반응시켰으며 반응이 끝난 조직은 Biotinylated tyramine (BT: 1 μ l BT/ml PBS + 0.005% H₂O₂)과 20분 동안 실온에서 반응시킨 후 다시 avidin-biotin complex (1:500)과 실온에서 1시간동안 반응시켰다. ABC와 반응이 끝난 조직은 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, Sigma)를 녹인 Tris-buffer에서 반응시켜 실온에서 발색시켰다. 각 단계마다 반응이 끝난 조직은 TPBS를 사용하여 잔류 항혈청을 씻어낸 후 다음 단계로 진행하였다. 항체반응이 끝난 조직은 avidin-biotin complex (Elite kit,

Vector, 1:250)을 실온에서 30분간 반응시켰으며 반응이 끝난 조직은 Biotinylated tyramine(BT: 1 μ l BT/ml PBS + 0.005% H₂O₂)과 20분동안 실온에서 반응시킨 후 FITC-conjugated streptavidin(Jackson, 1:200)과 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide glass위에 올리고 완전히 건조시킨 후 alcohol의 농도를 높이면서 탈수시키고 cover glass를 씌워 봉입하였다.

7. 결과분석 및 통계처리

실험에서 분석하고자 하는 척수의 부분명칭과 경계는 Paxinos 및 Watson(1986)이 제작한 Rat Brain Atlas를 참조하여 결정하였다. 면역반응이 완료된 조직은 Zeiss Axiophort 2 현미경을 이용하여 각각 400배 및 1000배의 배율로 관찰하였다. 핵내에 Fos 단백질을 축적하고 있는 신경세포의 숫적인 변화를 관찰하기 위해 digital image analysis system(Meta-Morph, Universal Imaging Co.)를 이용하여 평균 grey level이 130 unit이하 되는 신경세포만을 선택적으로 선별하여 측정하였다. 신경세포의 숫적변화는 연결된 computer에 자동적으로 저장되며, 측정이 끝난 후 일괄적으로 통계처리하였다. 실험에 사용한 조직은 실험동물별로 가장 선명한 면역성을 가진 조직 중 5개를 선별하여 뇌와 척수내의 신경핵별로 숫적인 변화를 관찰하였다.

실험결과는 1-way ANOVA(Statview512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)를 이용하여 통계 처리하였으며, probability values를 측정하기 위해 Scheffe F test를 실시하였다. 분석시 유의수준은 $\alpha=0.01$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 정상적인 실험동물의 척수내 Fos 단백질 발현 양상 및 마취가 이에 미치는 영향

정상적인 실험동물의 척수내에 발현되는 Fos 단백질의 발현양상은 척수 조직절편당 평균 33 ± 2개의 Fos 단백질에 대해 양성반응을 나타내는 신경세포가 관찰되었다(Table 1). 이들 Fos 단백질에 대한 양성반응을 나타내는 신경세포는 척수내 전범위에 걸쳐 낮은 밀도로 관찰되었으

Table 1. Effect of inhalation anesthesia on spinal Fos expression in intact animals and mechanical noxious stimulation treated animals.

Treatment	Cell number/section
Room control	33±2
Anesthesia only	31±4
Mechanical stimulation without anesthesia	148±7*
Mechanical stimulation with anesthesia	146±8*

Each value represents mean ± SEM of number of Fos positive neurons per section

*P<.01 as compared with room control

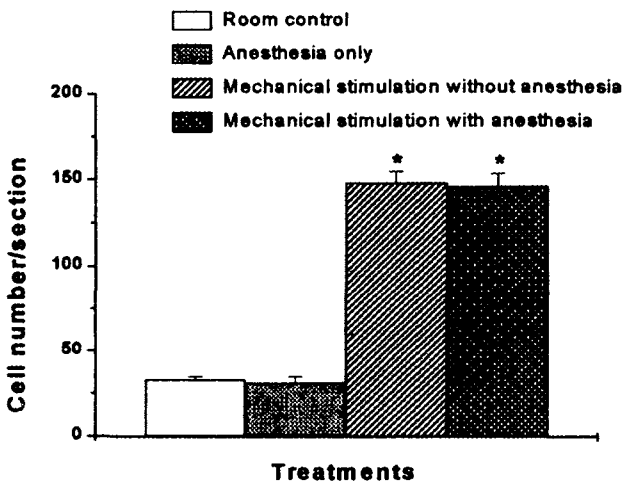


Fig 1. Effect of inhalation anesthesia on spinal Fos expression in intact animals and mechanical noxious stimulation treated animals.

*P<.01 as compared with room control

며, 형태학적으로는 크기가 작고, 원형 또는 타원형의 점상구조를 나타내었다(Fig. 3A).

마취만을 처치한 대조군의 척수내에서 발현되는 Fos 단백질의 발현은 정상적인 실험동물에서 관찰되는 Fos 단백질에 대한 양성반응 신경세포의 수에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았으며 (Fig. 1), 형태학적으로도 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 3B).

2. 물리적 자극에 의한 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 발현 양상 및 마취가 이에 미치는 영향

마취를 하지 않은 상태의 실험동물에 본 실험에 사용한 물리적 자극방법을 이용하여 자극을 가한 후 고정액으로 고정하고, 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 발현양상을 정상실험동물 대조군의 발현양상과 비교한 결과, 척수조직당 평균 148 ± 7개로 관찰되어 물리적 자극에 의해 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 수가 급격히 증가한 것으로 관찰되었다(Table 1 and Fig. 1, P<.01). 물리적인 자극에 의해 발현된 Fos 단백질의 발현양상은 주로 자극을 가한 쪽과 동일한 쪽 척수의 medial half부위에서 관찰되었으며, 3-5번 요추의 laminae I에서 V에 걸쳐 고밀도로 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 3C, arrows).

물리적인 자극에 의해 발현되는 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 발현양상에 흡입마취가 미치는 영향을 검정하기 위해 isoflurane을 이용한 흡입마취를 실험 전 기간에 걸쳐 실시하고 동일한 방법으로 물리적 자극을 가한 후 척수내 Fos 단백질 함유 신경세포의 발현양상을 분석하였다.

Table 2. Effect of laser stimulation with different intensity on spinal Fos expression induced by mechanical stimulation using acupoint (Zusanli) treated group and non-acupoint(Back) treated group.

Treatment Acupoint / non-acupoint	Intensity	Cell number/section
Control	-	146±8
Zusanli	3 mW	144±5
	10 mW	98±7*
Back	3 mW	148±3
	10 mW	137±6

Each value represents mean±SEM of number of Fos positive neurons per section
*P<.01 as compared with control

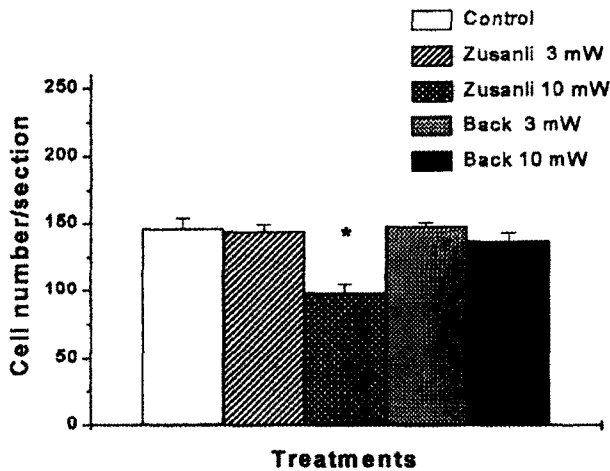


Fig 2. Effect of laser stimulation with different intensity on spinal Fos expression induced by mechanical stimulation using acupoint (Zusanli) treated group and non-acupoint (Back) treated group.
*p<.01 as compared with control

마취를 한 상태에서 물리적 자극을 가한 실험동물군에서 관찰되는 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 수는 척수 조직당 평균 146±8개로 관찰되어(Table 1), 마취를 가하지 않은 정상실험동물에서 관찰할 수 있었던 물리적 자극에 의한 Fos 단백질 양성 신경세포의 수에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 뿐만 아니라 척수내 Fos 단백질 함유 신경세포의 분포양상도 마취를 하지 않은 실험동물에서 관찰

되었던 분포양상과 차이를 관찰할 수 없었다.

3. 레이저의 경혈 및 임의혈 자극에 따른 물리적 통증에 대한 척수내 신경세포의 활성변화에 미치는 영향

경혈인 족삼리에 10mW의 강도인 레이저를 조사한 실험군의 경우 물리적 자극에

의해 증가되었던 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 수가 척수 조직당 평균 98±7개로 관찰되어 물리적인 자극만을 준 실험대조군의 척수조직당 관찰되는 평균 146±8개에 비해 현저히 감소되는 양상을 나타내었다(Table 2 and Fig. 2, P<0.01). 레이저 조사 후 감소되는 Fos 단백질 양성 신경세포의 분포양상은 실험대조군에 비해 레이저 자극 후, medial half내에서 관찰되던 Fos 단백질 양성 신경세포의 수가 현저히 감소되어 관찰되었으며, 전체 척수내에서 관찰되는 Fos 단백질 양성 신경세포의 수도 현저히 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3D, arrow).

한편 경혈인 족삼리에 3mW의 강도로 레이저를 조사한 실험군에서는 조직 절편당 평균 144±5개의 물리적 자극에 반응한 Fos 단백질 양성 신경세포가 관찰되어 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며(Table 2 and Fig. 2), 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 분포양상도 실험대조군과 비교할 때 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 3E).

임의혈 자극군의 경우 본 실험에 적용한 최소

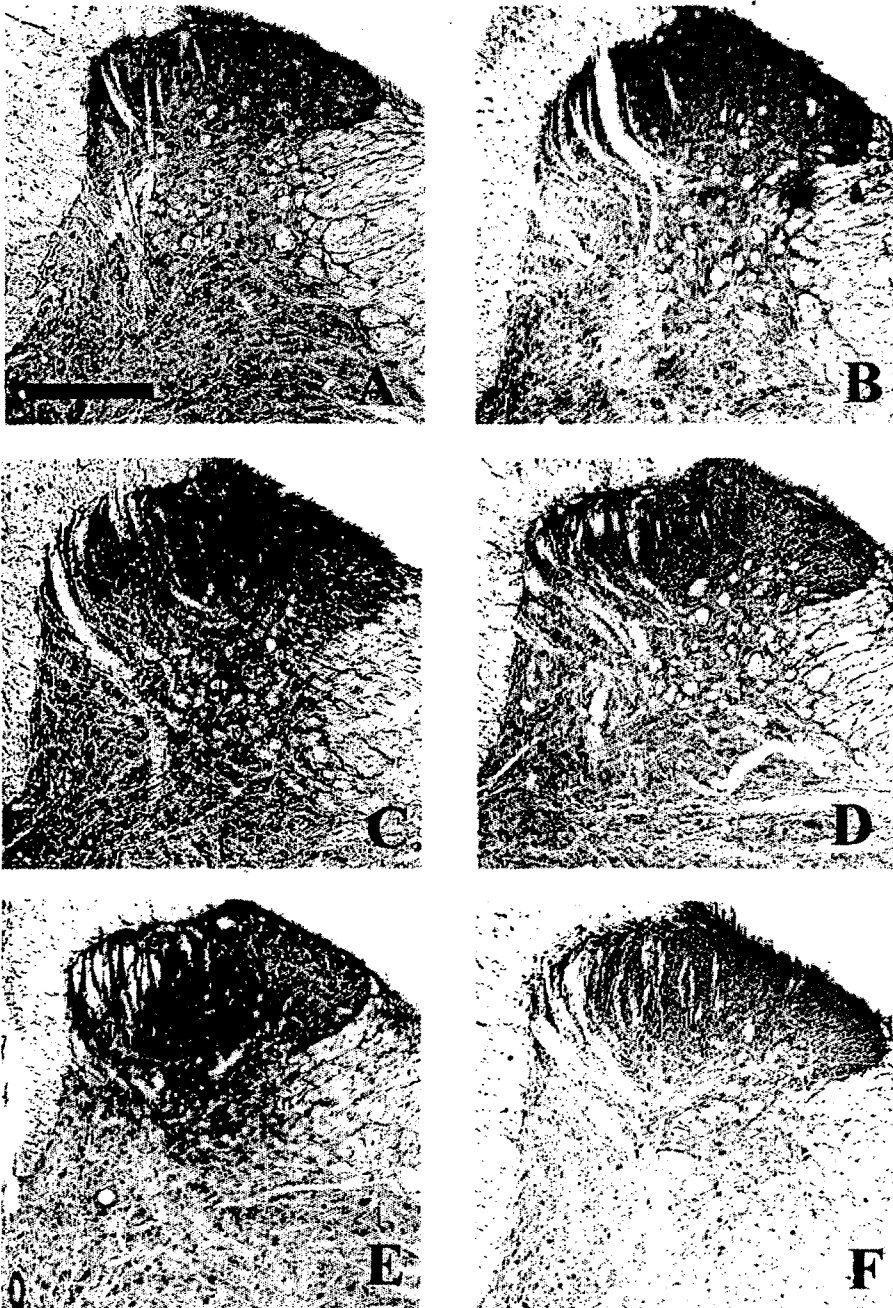


Figure 3. Photomicrographs of Fos-like immunoreactive neurons in the dorsal horn of the lumbar spinal cord at the 4th segment. Fos expression in the intact control animals (A) and in the anesthetic control group (B). Fos expression in the ipsilateral dorsal horn induced by mechanical noxious stimulation (C). The majority of immunoreactive neurons in the ipsilateral dorsal horn displayed strong immunostaining (arrows). Fos expression in the ipsilateral dorsal horn following acupoint with 10mW intensity (D), acupoint with 3mW intensity (E) or non acupoint with 10mW intensity (F). Bar=100 μ m.

출력인 3mW 및 최대출력인 10mW로 레이저를 조사한 군에서 모두 실험 대조군에 비해 물리적인 자극에 반응하는 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 수적 감소를 관찰할 수 없었다(Table 2 and Fig. 2). 분포양상에 있어서도 (Fig. 3F)에서 나타난 바와 같이 대조군의 분포양상 (Fig. 3C)와 비교할 때 분포도와 형태학적으로 차이점을 관찰할 수 없었다.

IV. 고 찰

국제통증학회(International Association for the Study of pain)에서 “통증이란 잠재적이거나 실제적인 조직손상시 수반되는 불쾌한 감각 및 정서경험”(Bowsher, 1988)이라고 정의했듯이 통증은 단일 차원에서 느껴지는 특정감각이 아니라 복잡한 경험의 카테고리로 설명되어지며 이 카테고리는 끝없이 삶의 질을 변화시킨다고 하였다(McCane et al, 1994). 이러한 통증의 관리는 물리치료영역에 있어서 매우 중요하며 특히 신체장애나 질병의 결과로 인해 발생할 수 있는 이차 통증에 초점이 맞추어져 있다. 현재 임상에서 이러한 통증관리를 위해 저출력 레이저를 하나의 치료방법으로 많이 이용하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 Sprague Dawley 종 웅성 rat를 실험에 이용하여 물리적인 통증이 척수내 신경세포의 활성변화에 미치는 영향을 연구하고, 나아가 저출력 레이저가 이러한 척수 신경세포의 Fos 단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 면역조직화학적 기법 및 컴퓨터를 사용한 영상분석법으로 규명하고자 본 연구를 시도하였다.

우선 외부 및 내부에서 전달되는 여러 가지 유형의 자극에 대한 신경세포의 활성증가에 의해

생산되는 Fos 단백질은 마취제의 사용이나 실험 계획상 의도되지 않은 많은 외부자극에 의해 쉽게 영향을 받는 것으로 알려져 있어 실험설계와 실험의 진행에 주의를 기울여야 하는 것으로 알려져 있다(손성세, 1998). 따라서 마취가 척수내 Fos 단백질 발현에 어떤 영향을 주는지 확인하기 위해 정상동물과 마취동물을 비교했을 때 Fos 단백질에 대한 양성반응 신경세포의 수는 유의한 차이를 관찰할 수 없어 본 실험에 사용한 isoflurane 흡입마취가 척수내 신경세포의 활성을 증가시키지 않음을 확인 할 수 있었다. 또한 물리적 자극에 의한 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 발현양상을 보기 위해 정상동물과 흡입마취를 시킨 동물을 비교했을 때도 Fos 단백질에 대한 양성반응 신경세포의 수 및 형태학적인 분포도에서 유의한 차이가 나타나지 않는 것으로 관찰되어 물리적 통증 후 발현되는 척수내 신경세포의 활성에 마취가 영향을 미치지 않음을 확인 할 수 있었다. 그러나 Fos 단백질의 발현이 여러 가지 마취제에 의해 영향을 받기 때문에 실험자는 실험방법상 마취제를 사용하여야 할 경우 마취제의 선택 및 마취강도에 대해 세심한 신경을 기울여야 한다. 뿐만 아니라 일반적으로 마취제를 사용할 경우 마취제를 사용하지 않은 경우의 Fos 단백질 생산량에 비해 현저한 감소를 나타내기 때문에 일반적으로는 자극의 강도와 지속시간을 증가시켜야 한다. 만약 마취제를 사용하지 않고 실험을 진행할 수 있다면 마취제의 사용은 최소한으로 자제를 해야하지만 실험방법상 실험동물이 지나치게 스트레스를 받는다면 불필요한 자극을 배제하기 어려울 경우 최소한의 마취제를 사용하는 것이 좋은 것으로 알려져 있다(Lee & Beitz, 1992). 뿐만 아니라 마취제중 ketamine이나 barbiturate와 같은 약물

은 Fos 단백질의 합성을 현저히 감소시키는 것으로 밝혀져 있으므로 사용하지 않는 것이 좋으며, 일반적으로 chloral hydrate나 halothane 및 isoflurane과 같은 흡입마취제가 Fos 단백질의 생산에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있다. 또한 흡입마취제를 이용하여 마취를 할 경우 마취의 지속시간 및 마취의 강도를 실험자가 임의로 조절할 수 있으므로 가장 좋은 방법으로 알려져 있다.

위에서와 같이 마취가 Fos 단백질 양성반응 신경세포 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 바탕으로 해서 저출력 레이저가 경혈 및 임의혈 자극에 따른 물리적 통증에 대한 척수내 신경세포의 활성변화에 미치는 영향을 검증하기 위해 경혈인 족삼리에 각각 3mW와 10mW의 강도로 레이저를 조사한 결과 10mW의 강도로 조사한 실험군에서 물리적 자극에 의해 증가되었던 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 수가 척수 조직당 평균 98 ± 7 (대조군 146 ± 8 개)개로 현저히 감소되었으나($P < 0.01$), 3mW의 강도로 레이저를 조사한 실험군에서는 조직절편당 평균 144 ± 5 (대조군 146 ± 8)개의 물리적 자극에 반응한 Fos 단백질 양성 신경세포가 관찰되어 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 임의혈 자극군의 경우 3mW 및 10mW의 강도로 레이저를 조사한 군에서는 모두 대조군에 비해 물리적 자극에 반응하는 Fos 단백질 양성 신경세포의 수적 감소를 관찰할 수 없었다.

여러 가지 통증 유형에 따라 통증전달과 관련된 척수 및 그 상위 신경계내의 신경세포들은 활성이 증가하게 된다. 무수히 많은 신경전달 물질에 의해 이 통각정보들은 중추 신경계로 전달되게 되는데 전달경로를 각각의 신경전달 물질로 추적하는 실험적 방법보다는 신경세포내에서 통

증에 대해 공통적으로 반응하는 인자를 이용하면 편리하다. 이러한 추적자로 사용되어 지는 것이 조기발현 유전자의 부산물인 Fos 단백질과 같은 인자들인 것으로 알려져 있다(Delander et al, 1997 ; Harris, 1998 ; Redburn & Leah, 1997). 조기발현 유전자는 매우 짧은 반감기를 갖는 mRNA를 생산하기 때문에 순식간에 발현되는 특성이 있다. 그러므로 낮은 강도의 자극에 의해서도 신경세포내에서 쉽게 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Sheng & Greenberg, 1990 ; Sheng et al, 1990). 약물이나 화학물질로 인한 화학적 자극 및 관절염과 관련된 만성통증 자극이 유발되었을때에도 척수 후각에서 C-fos gene의 발현이 일어나는 것으로 보고되어 있다(Buritova et al, 1996 ; Naranjo et al, 1997 ; Lju et al, 1998 ; Luo et al, 1998). 신명동(1998)의 연구에서도 뇌 조직절편에 다클론 C-Fos 항체(polyclonal C-Fos antibody)를 이용한 면역조직 화학반응을 시켜 본 결과 체성 동통군 및 내장성 동통군 뿐만 아니라 정상군에서도 C-Fos가 발현되는 것이 관찰되었음을 보고하였으며, 정상 대조군, 동통유발 후 경과한 시기 및 뇌의 부위별로 C-Fos에 면역양성 반응을 보인 신경세포를 측정해 본 결과 통계학적으로 유의한 차이가 있다고 보고하였다.

자극에 대한 신경세포의 활성변화를 측정하는 다른 실험적 방법중 신경세포가 자극에 반응함으로써 초래되는 대사율의 증가를 간접적으로 측정할 수 있는 2-deoxyglucose법(Schoppman & Stryker, 1981)이 널리 사용되어 왔다. 신경세포가 활성이 증가함으로 인해 신경세포가 사용할 수 있는 유일한 energy인 glucose와 경쟁적으로 작용하여 신경세포의 glucose의 사용량이 증가하는 것과 비례하여 2-deoxyglucose의 사용

양도 증가하게 된다. 2-deoxyglucose법은 이러한 2-deoxyglucose에 방사능 동위원소를 표시시켜 신경세포내에 축적되는 동위원소의 양을 autoradiography 법으로 정량 분석함으로써 신경세포의 활성을 간접적으로 분석하는 방법이다.

그러나 이 방법에 의해 2-deoxyglucose의 양을 정량해 보면 신경세포의 활성이 증가했을 때는 물론 신경세포의 기능이 정상에 비해 억압받을 때도 신경세포내에 축적되는 2-deoxyglucose의 양이 증가하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 자극에 대한 신경세포의 활성변화가 시간의 경과에 따라 큰 폭으로 변화하기 때문에 실험자가 계획한 자극에 대한 신경세포의 활성변화를 특이적으로 검정하는데는 어려움이 있다. 또한 일측성으로 가해진 자극에 대하여 실험동물의 척수에서 관찰되는 신경세포의 변화 또한 양측성으로 관찰되어 자극에 대한 신경세포의 특이적인 반응을 검정하기는 어려운 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 2-deoxyglucose법은 Fos 단백질을 이용한 면역조직화학법에 비해 자극에 의해 국소에서 일어나는 신경세포의 활성변화를 관찰하는데는 민감도와 특이성이 낮은 것으로 알려져 있다.

2-deoxyglucose법외에 신경세포의 활성변화를 측정할 수 있는 방법으로는 신경세포의 활성 증가로 인해 활성이 증가하는 것으로 알려진 cytochrome oxidase의 신경세포내 축적정도를 평가하는 것이다(Wong-Riley & Kageyama, 1986). 하지만 자극을 가하지 않은 정상적인 실험동물의 중추신경계에 cytochrome oxidase가 높은 수준으로 존재하기 때문에 실험적으로 가해진 자극에 의한 신경세포의 활성을 측정하는데는 상당한 어려움이 있는 것으로 보고되고 있다

(Menetrey et al, 1989).

결론적으로 외부 및 내부에서 가해진 자극에 대한 신경세포의 활성변화를 측정하는 방법으로 Fos 단백질을 이용한 면역조직화학법이 민감도 및 특이성에서 다른 방법에 비해 우수하다는 것이 일반적인 견해이다.

V. 결 론

체중이 200-250g인 Sprague Dawley종 양성 rat(한림실험동물, n=8)을 이용하여 물리적 자극에 대한 진통효과를 검증하기 위한 다른 방법으로 Fos 면역조직 화학법 및 컴퓨터를 이용한 영상분석장치를 이용하여 척수내 Fos 단백질의 발현 신경세포의 수적 변동을 검증한 실험의 결과는 다음과 같다.

첫째, 본 실험에 사용한 흡입마취가 척수내 Fos 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 정상동물과 마취동물을 비교했을 때 Fos 단백질에 대한 양성반응 신경세포의 수는 유의한 차이를 관찰할 수 없었고, 물리적 자극에 의한 척수내 Fos 단백질 양성 신경세포의 발현 양상을 보기위해 정상동물과 흡입마취를 시킨 동물을 비교했을때도 Fos 단백질에 대한 양성반응 신경세포의 수 또한 유의한 차이를 나타 내지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 물리적 자극과 레이저 조사시 사용한 흡입마취는 척수내 신경세포의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

둘째, 저출력 레이저의 경혈 및 임의혈 자극에 따른 물리적 통증에 대한 척수내 신경세포의 활성 변화에 미치는 영향을 평가하기 위해 경혈인 족삼리에 10mW의 강도로 레이저를 조사한 실험군에서만 물리적 자극에 의해 증가되었던 척수

내 Fos단백질 양성 신경세포의 수가 척수조직당 평균 98 ± 7 (대조군 146 ± 8 개)개로 대조군에 비해 현저히 감소되었다($P < .01$). 그러나, 3mW의 강도로 레이저를 조사한 실험군과 3mW와 10mW의 강도로 임의혈에 레이저 조사를 한 실험군에서는 모두 대조군에 비해 물리적 자극에 반응하는 Fos 단백질 양성 신경세포의 수적 감소를 관찰할 수 없었다.

위의 실험 결과를 볼 때 물리적 자극으로 인한 통증은 척수내 신경세포의 활성변화를 일으켜 Fos단백질 양성 신경세포의 수를 급격히 증가시켰으며, 통증 완화의 목적으로 사용된 저출력 레이저는 물리적 자극에 의해 척수내 증가되었던 Fos단백질 양성 신경세포 수를 현저히 감소시키는 것으로 관찰되어 통증 완화에 저출력 레이저는 유효하게 쓰일 수 있다는 과학적 근거를 얻을 수 있었다. 따라서 앞으로는 이러한 저출력 레이저가 나타내는 통증완화의 기전을 밝히는데 주력해야 하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

- 김 응, 박승한, 윤길원. 레이저의 생체와의 상호작용 및 의학적 응용. 물리학과 첨단기술, 23-29, 1995.
- 손성세, Fos 면역조직 화학법을 이용한 신경활성 검정에 관한 고찰. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
- 신명동. 포르말린에 의한 동통자극이 흰쥐 뇌 신경세포의 c-fos 단백질 발현에 미치는 영향, 동아대학교 대학원 박사 학위논문, 1998.
- Abbadie, C, Besson, J,M,. C-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant-induced arthritic and normal rats. Brain Res, 607; 195-204, 1993.
- Abbadie, C, Besson, J,M. Chronic treatments with aspirin or acetaminophen reduce both the development of polyarthrititis and Fos-like immunoreactivity in rat lumbar spinal cord, Pain, 57; 45-54, 1994.
- Abbadie, C, Besson, J,M, Calvino, B, c-fos expression in the spinal cord and pain-related symptoms induced by chronic arthritis in the rat are prevented by pretreatment with Freund adjuvant, J. Neurosci., 14; 5865-5871, 1994.
- Bowsher D. Acute and Chronic pain and assessment. In : Wells DExet al, eds. pain Management in Physical Therpy. East Norwalk, Appleton & Lange,; 11-17, 1988.
- Buritova J, Fletcher D, Honore P, Bessom JM. Effects of local anaesthetics on carrangeenan-evoked inflammatory nociceptive processing in the rat. Br. J. Anaesth, 77; 645-652, 1996.
- Delander GE, Schott E, Brodin E, Fredholm BB. Spinal expression of mRNA for immediate early genes in a model of chronic pain. Acta physiol. Scand, 161; 517-525, 1997.
- Gussetti P, Moroso P, Palazzo C. Calcified periarthrititis; Disappearance of periarticular calcification after laser therapy, Radiol Med(Torino), 72; 934-

- 936, 1986.
- Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res. Bull.*, 45; 1-8, 1998.
 - Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328; 632-634, 1987.
 - Lanteri-Minet M, Weil-Fugazza J, de Pommery J, Menetrey D. Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins, *Neuroscience*. 58; 287-298, 1994.
 - Laudanna, A., Nogueira, M. I., Mariano, M. ; Expression of Fos protein in the rat central nervous system in response to noxious stimulation : effects of chronic inflammation of the superior cervical ganglion, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32; 847-50. (1998).
 - Lee JH, Beitz AJ. Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation. *Brain Res*. 577 ; 80-91, 1992.
 - Liu RJ, Qiang M, Qiao JT. Nociceptive c-fos expression in supraspinal area in avoidance of descending suppression at the spinal relay station, *Neuroscience*, 85; 1073-1087, 1998.
 - Luo C, Chen J, Li HL, Li JS ; Spatial and temporal expression of c-fos protein in the spinal cord of anesthetized rat induced by subcutaneous bee venom injection, *Brain Res*. 806; 175-185, 1998.
 - McCane KL, Huether SE. *Pathophysiology*, st. Louis : C V Mosby co, 1994.
 - Menetrey D, A Gannon, JD Levine, AI, Basbaum. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation, *J. comp. Neurol*, 285; 177-195, 1989.
 - Munglani R, Hunt SP. Molecular biology of pain, *Br, J, Anaesth*, 75; 186-192, 1995
 - Naranjo JR, Mellstrom B, Carrion AM, Lucas JJ, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Peripheral noxious stimulation induces CREM expression in dorsal horn ; involvement fo glutamate, *Eur. J. Neurosci* 9; 2778-2783, 1997.
 - Redburn JL, Leah, JD. Accelerated breakdown and enhanced expression of c-fos in the rat brain after noxious stimulation, *Neurosci, Lett.*, 237; 97-100, 1997.
 - Schoppman, A., and M.P.Stryker. Physiological evidence that the 2-deoxyglucose method reveals orientation in the cat visual cortex, *Nature* 293; 574-578, 1981.
 - Sheng M, Greenberg Me. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron*, 4; 477-485, 1990.

- Sheng M, McFadden G, Greenberg Me. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB, *Neuron*, 4; 571-582, 1990.
- Synder-Mackler L, Bork CE. Effect of helium-neon laser irradiation of peripheral sensory nerve latency, *Phys Ther*, 68; 223-225, 1988.
- Wong-Riley MTT, GH Kageyama. Localization of cytochrome oxidase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia with quantitative analysis of ventral horn cells in monkeys, *J. Comp. Neurol*, 245; 41-61, 1986.