

TENS가 capsaicin으로 통증을 유발시킨 흰쥐 척수내 c-fos 발현에 미치는 영향

대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공
백수정 · 김동현 · 권영실 · 송주영 · 남기원 · 송주민
영동전문대학 물리치료과
최진호
대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김진상

Effects of TENS on c-fos Expression in Spinal Cord of Rats Induced by Capsaicin.

Baek, Su-Jeong, P.T., M.S., Kim, Dong-Hyun, P.T., Kwon, Young-Shil, P.T., Ph.D
Song, Ju-Young, P.T., M.S., Nam, Ki-Won, P.T., M.S., Song, Ju-Min, P.T., M.S.
Major in Physical Therapy, Department of Rehabilitation Science, Graduate School, Taegu University

Choi, Jin-Ho, P.T., Ph.D.
Department of Physical Therapy, Yeongdong Junior College

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.
Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

<Abstract>

This study was performed, using c-fos, to investigate the effect of TENS on pain model induced by capsaicin in spinal level. Twelve rats with 200-250g body weight were randomly divided into three groups: One group which induced by capsaicin, another group which applied TENS with low frequency(4Hz, 200 μ s, 20min) and the other group which applied TENS with high frequency(100Hz, 50 μ s, 20 min).

The results of this study were as follows:

1. The number of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn was increased markedly 2 hours after capsaicin injection, and decreased gradually from 4 hours to 16 hours after injection.
 2. At 2 hours after capsaicin injection, both low frequency and high frequency TENS decrease the number of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn.
 3. In acute pain model, low frequency TENS greatly decrease c-fos expression than high frequency TENS.
- Therefore, decreasing the number of c-fos immunoreactive neurons which increased after capsaicin injection with application of TENS indicate that both of the TENS have inhibitory effect. In addition, low frequency TENS greatly decreased the number of neurons explains low frequency TENS is more effective than high frequency TENS in acute pain.

This study also can become a part of scientific evidence on electrotherapy through measuring quantitatively effects of TENS in pain model.

I. 서론

통증은 환자가 가장 흔히 호소하는 증상 중 하나로, 통증을 느끼게 하는 통증의 전달경로에 대해서는 신경해부학적으로 비교적 잘 알려져 있으나, 기전이나 증상의 경감 및 진통 기전에 대해서는 아직도 잘 알려져 있지 않은 점이 많다(Besson & Chaouch, 1987). 그러나 최근에 와서는 여러 가지 손상으로 인한 통증의 동물모델이 개발되어 이에 대한 여러 가지 연구가 활발히 진행되고 있다(이기훈 등, 2000; 이상수, 1998; Palecek 등, 1992; Kim과 Chung, 1992; Seltzer 등, 1990).

통증은 매우 복잡한 현상이고 인간의 통증감지 정도는 환경, 교육정도 등에 따라 개인차가 심하므로 통증을 측정하는 것이 쉽지 않다(이재형, 1995). 그러나 최근에 와서는 종양유전자인 *c-fos*의 생산물질인 *c-fos* 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 검정방법이 개발되어 현재 널리 사용되고 있다(이재성 등, 1997; 이원택 등, 1997; Abbadie와 Besson, 1992; Chang 등, 1998).

Hunt 등(1987)은 *c-fos* mRNA의 산물인 *c-fos* 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학방법을 이용하여 쥐의 뒷다리에 겨자기름(mustard oil)과 40℃ 혹은 52℃의 열 등을 적용시 척수 등쪽뿔(dorsal horn)에서 *c-fos* 단백질이 발현됨을 보고하였다. 이후 포르말린(formalin), 카라진(carrageenin) 등의 화학물질로 인한 유해자극, 기계적 유해자극, 말초신경손상, 관절염, 방광에 유해자극 등 지속적인 통증이 유발되었을 때 척수 등쪽뿔에서 *c-fos*의 발현이 일어난다고 보고되어왔다(이원택 등, 1997; 이원택 등, 1999; Abbadie & Besson, 1992; Bullitt, 1990; Chang 등, 1998; Chapman 등, 1995; Honore 등, 1995; Lee & Beitz, 1992; Tokunaga 등, 1999).

*C-fos*는 원종양유전자(proto-oncogene)인 *v-fos*의 세포동족체로서 성장인자(growth factor)나 신경전달물질에 의해 수분 내에 다양한 형태의 세포에서 활성화된다(Greenberg 등, 1985). 활성화된 *c-fos*는 단백질을 encode하여 전사를 조절하고(transcription regulate) 장기적인 적응반응(long-term adaptive responses)과 가소성 반응(plastic responses)과 관계한다(Goelet, 1986).

척수에서 유해자극으로 촉발된 *c-fos* 발현은 몰핀(morphine), 케토프로펜(ketoprofen)에 의해서 뿐만아

니라 척수레벨에서 유해성 진행을 방해하는 약물인 노아드레날린(noradrenalin), NMDA 수용체 길항제, NOS 억제제에 의해 감소된다(Abbadie 등, 1994; Buritova, 1996; Gogas 등, 1991; Honore, 1995; Jones, 1992, Mitsikostas, 1998). 또한 외인성 항유해성 시스템(antinociceptive systems)인 전기침 활성화에 의해서도 감소된다(Chang, 1998; Hu 등, 1993; Lee & Beitz, 1992). 따라서 이러한 설명으로 *c-fos* 발현과 유해성 자극간의 관계를 확실하게 되었다.

인체에 대한 전기의 이용은 현대에 들어서면서 급격히 증가하고 있다. 특히 신경계 질환의 연구 및 진단이 전기를 이용하여 많이 시행되고 있으며, 의학의 발달과 더불어 최근에 활발히 연구되는 신경공학의 분야에서 인체의 전도성 조직에 전기를 가하여 치료효과를 얻으려는 시도가 증가하고 있다(이청기 등, 1993). 그 중 대표적인 것으로 경피신경전기자극(TENS, transcutaneous electrical nerve stimulation)이 통증을 완화하는 비약물적(non-pharmacological)방법으로 임상적 중요성이 증가하고 있다(Golding 등, 1987). 경피신경전기자극은 전류를 이용하여 피부의 말초감각신경을 자극하여 다양한 원인으로 초래되는 통증을 치료하는 방법이다(이재형, 1995). 경피신경전기자극의 효과에 대해서는 많이 연구되고 있으나 생리학적 기전에 대해서 확실히 알려진 바 없다(정한영과 권희규, 1993; 한태륜 등, 1995; Thorsteinsson, 1987; Walsh, 1998).

본 연구에서는 capsaicin으로 통증을 유발시킨 후 통각신경활성의 지표로 이용되는 원종양유전자인 *c-fos*의 변화로 경피신경전기자극의 효과를 척수 천층에서 형태학적으로 관찰, 분석하고자 한다. 이를 위해서 흰쥐를 실험동물로 사용하여 capsaicin으로 통증모델을 만든 후 (1)척수 등쪽뿔에서 통증에 대한 반응을 나타내는 *c-fos* 단백질의 변화를 면역조직화학적 방법으로 염색한 후 그 변화를 정량화하였고, (2)저빈도 경피신경전기자극과 고빈도 경피신경전기자극을 각각 적용한 후 *c-fos* 단백질의 변화를 정량화하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

생후 6주된 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐(체중

200-250g) 12마리를 무작위로 사용하였다. 대조군 8마리, 1차 실험군인 고빈도 경피신경전기자극 (100Hz, 50 μ s)군 2마리, 2차 실험군인 저빈도 경피신경전기자극 (4Hz, 200 μ s)군 2마리로 나누어 사용하였다. 물은 수돗물을 사용하였으며 사료는 삼양유지사료주식회사에서 생산한 실험동물(쥐)용 사료를 물과 함께 자유급식하였다. 사육실 온도는 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 50 \pm 2%로 최적의 상태를 유지하였고, 사육장의 광주기를 오전 8시부터 오후 10까지로 조절하였으며 그 나머지 10시간은 암주기로 조절하였다.

2. 실험방법

1) 실험전처리

Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide :sigma)을 용매(10% ethanol, 10% Tween-80, 80% 생리식염수)에 용해시켜 50mg/kg 농도로 좌팔신경이 지나가는 슬립근에 1회 피하주사(피하조직)하였다. 경피신경전기자극은 사지와 몸통을 자체 제작한 실험대에 고정하여 적용하였다.

2) 경피신경전기자극 적용

경피신경전기자극 (TENS 120Z, ITO CO.LTD, Japan)은 고빈도(100Hz, 50 μ s, 20분)와 저빈도(4Hz, 200 μ s, 20분)를 최소강도 1mA로 적용하였다. 전극 패드중 하나를 대퇴 슬립근의 중앙부에 접지하고, 다른 하나는 요추부에 적용하였다. 패드는 적용부위를 삭모한 후 밴드로 고정시켜 적용하였다. 조직은 경피신경전기자극 적용 20분 경과후 1시간이 지난 다음 진신 마취제인 롬퐀(Rompun, 바이엘코리아)을 복강주사(0.4ml)하여 흰쥐를 마취하여 심장관류(0.9% NaCl)와 조직 전고정(8% paraformaldehyde, pH 7.2-7.4)을 실시하고 척수 중 요수 부분을 채취하여 면역조직화학검사를 위해 두시간 동안 후고정(8% paraformaldehyde)하여 수크로스 (25% sucrose)에 하루 동안 보관하였다. 대조군은 위와 같은 실험 방법을 적용하였으나 경피신경전기자극의 직접적인 적용은 하지 않았다. 마취제로 흔히 사용되는 케타민(ketamine)은 c-fos를 억제시키므로(Huang and Simpson, 1999) 본 실험에는 적용하지 않았다.

3) 조직절편 제작

후고정이 끝난 조직은 극저온 냉동기를 이용하여 영하

35 $^{\circ}$ C 이하로 냉동하였고 이 냉동된 척수의 요수부위를 미세절단기(microtome, BRIGHT 5040)를 사용하여 25 μ m 두께로 잘라 0.01M phosphate buffer(PB)에 처리하고 그 조직을 1차 항체(rabbit) c-fos (희석률 200% Anti-c-Fos :sigma) 500 μ 에 처리하여 24시간 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장보관하였다.

4) 면역조직화학법

24시간 동안 보관된 1차 항체 속 조직을 0.01M PB(phosphate buffer)로 10분씩 3회 수세한 후 다시 2차로 streptavidine과 0.03% Triton X-100, 0.2% normal goat serum에 조직을 담구어 실온에서 90분 동안 처리하였다. 이 조직을 다시 0.01M phosphate buffer(10분, 3회)로 수세, 이후 실온에서 60분간 ABC(avidine-biotin peroxidase complex)를 처리하였으며 0.01M phosphate buffer(10분, 3회)로 또 다시 수세하였다. 다음 증류수 200ml에 소량의 DAB(3'-5'-diaminobenzidine)를 5분간 완전 용해시켜 다시 여과하여 이 용액에 조직을 10분간 처리하였고 이후 Wasserstoffperoxid 30% H₂O₂(Perhydrol)를 0.03% (60 μ l/200ml)로 처리하였다. 0.01M phosphate buffer(10분, 3회)에 수세하고 증류수 (10분, 3회)에 수세하였다. 그리고 곧바로 샤알레에 0.01M phosphate buffer를 넣고 조직을 퍼서 슬라이드에 올렸다. 이후 cresyl violet acetate와 toluidin blue를 이용하여 3분간 대조염색(counterstaining)을 실시하였으며, 흐르는 물에 5분간 수세하고 탈수과정(50%-70%-80%-90%-95%-100% ethanol-100% xylene I-100% xylene II)을 각각 10분씩 거친 다음 광학현미경적 관찰을 위한 영구 보존 방법으로 PMM(permanent mounting media)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

5) 형태학적 및 면역조직화학적 관찰

형태학적 관찰에는 광학현미경(Olympus Bx 50, Japan)을 이용하였고, 현미경에 장착된 CCD 카메라(Toshiba, Japan)와 개인용 컴퓨터를 연결시켜 자료전송을 실시하였으며, 디지털 영상화된 자료는 Image-pro plus ver 4.0 for windows(Media cybernetics, USA)를 이용하여 촬영 및 영상분석(image analysis)을 시행하였다.

면역조직화학 처리과정을 거친 절편들은 반응을 나타

낸 세포 수를 검사하기 위해 영상 분석을 실시하여 c-fos 를 x40 자료로 분석하였으며, 척수 천층(Laminae I and II)에 반응을 나타낸 수를 세었다.

6) 검사결과처리

첫째, 형태학적 소견에서 육안적 소견은 광학현미경 하에서 단위 면적 당 반응성을 기준으로 매우 높음을 + + +, 높음을 ++, 보통을 +, 거의 없음을 -, 전혀 없음을 -로 나타내었다.

둘째, 면역조직화학적 소견의 통계처리는 요수부위의 절편 조직에 발현된 c-fos의 수를 통계 프로그램인 MS office 2000 Excel을 이용하여 일원배치분산분석으로 처리하였다. 유의수준은 $p < .05$ 로 하였다.

III. 연구결과

Table 1. Changes of c-fos expression after capsaicin injection

	2h	4h	8h	16h
Control	+++	+	+	-

Control=Group of capsaicin injection which is not with TENS

Table 2. Effect of TENS on c-fos expression induced at 2 hours after capsaicin injection

	Control	4Hz	100Hz
2 hours	+++	+	++

Control=2 hours after capsaicin injection

2. 면역조직화학적 소견

1) Capsaicin 투여후 대조군의 시간대별 c-fos 발현

척수 등쪽뿔 천층(Laminae I and II)에서 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학적 방법으로 염색한 표본에서 c-fos 면역반응 세포들은 작고 어두운 둥근 모양으로 나타났다. capsaicin 투여 2시간 후 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포의 수는 평균 89.33개로 나타났으며, 4시간 후의 면역반응 양성 신경원의 수는 평균 24.33개로 감소했으며, 8시간 후의 양성 신경원의 수는 14.67개로 나타났고, 16시간 후의 신경원 수는 3.17개

1. 육안적소견

1) Capsaicin 투여후 대조군의 시간대별 c-fos 발현

척수 등쪽뿔 천층(Laminae I and II)에서 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학적 방법으로 염색한 표본에서 캡사이신 투여 2시간 후 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포의 수가 최고로 나타났고, 4시간 후에는 감소하는 경향을 보이다가 8시간과 16시간 후에는 거의 나타나지 않았다(Table. 1).

2) Capsaicin 투여 2시간 후의 대조군과 두 실험군의 c-fos 발현 비교

Capsaicin 투여 2시간 후 최고로 발현된 c-fos에 경피신경전기자극 적용 결과 저빈도군과 고빈도군 둘다 유의하게 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포수의 감소를 보였다. 더욱이 저빈도군에서 c-fos 발현의 감소가 현저하였다(Table. 2).

로 소수만 나타났다(Fig 1, Fig 4, Table 3). 이들 각 집단들의 평균에는 유의한 차이가 있었다($p < .05$).

2) Capsaicin 투여 2시간 후의 대조군과 두 실험군의 c-fos 발현 비교

Capsaicin 투여후 c-fos 단백질에 양성을 나타내는 세포의 수가 최고로 발현된 2시간에 저빈도(4Hz, 200 μ s) 경피신경전기자극 적용후 세포의 수는 26.5개로 감소되었고, 고빈도(100Hz, 50 μ s) 경피신경전기자극 적용후 세포 수도 33.33개로 감소되었다(Fig 2, Fig 5, Table 4). 이들 각 집단들의 평균에도 유의한 차이가 있었다($p < .05$).

Table 3. One way ANOVA of the average numbers of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn after capsaicin injection

	SS	df	MS	F	P-value
treatment	26847.79	3	8949.264	24.85619	5.95E-07*
residual	7200.833	20	360.0417		
total	34048.63	23			

df : degree of freedom MS : mean square * $p < .05$

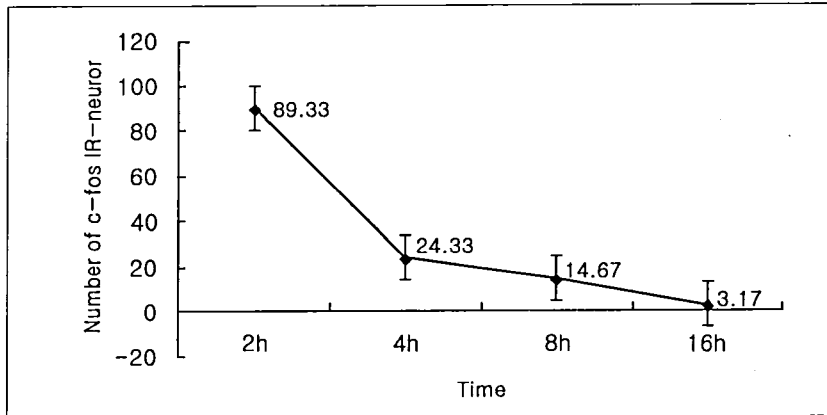


Fig 1. The changes of the average numbers of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn after capsaicin injection.

Table 4. One way ANOVA of the average numbers of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn after capsaicin injection with TENS application

	SS	df	MS	F	P-value
treatment	14261.44	2	7130.722	13.25386	0.000484*
residual	8070.167	15	538.0111		
total	22331.61	17			

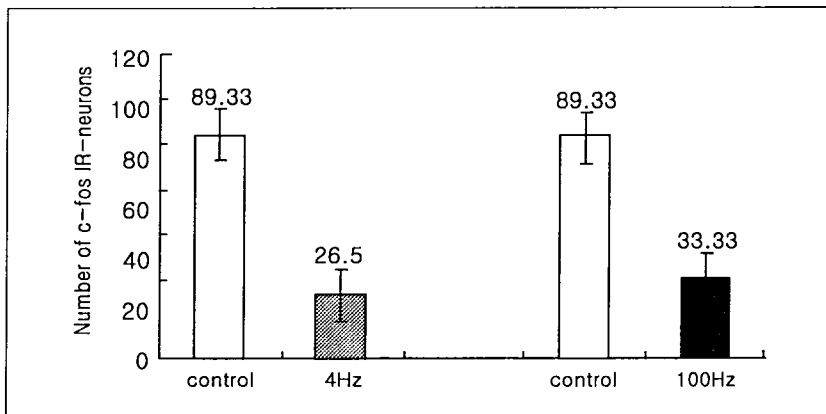


Fig 1. The changes of the average numbers of c-fos immunoreactive neurons in superficial dorsal horn after capsaicin injection.

IV. 고 찰

통증은 병적 상태에서 가장 잘 나타나는 징후이며, 많은 사람들이 자신들에게 병이 있다고 판단하는 모든 감각 경험 중에서 가장 현저한 경험이다(Adams 등, 1998).

과거에는 염증반응시 염증세포나 주위 조직 세포에서 만들어진 화학물질들이 유해감수기를 활성화시켜 통증을 유발한다고 생각되었으나, 최근에는 급성 통증이 신경계 내부의 변형을 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 생각되고 있다(Dray 등, 1994). 신경계 내부의 변형은 주로 분자와 유전자와 관계있다. 그중 중앙유전자인 *c-fos*의 생산물질인 *c-fos* 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 점검방법이 널리 사용되고 있다(이재성 등, 1997; 이원택 등, 1997; Abbadie & Besson, 1992; Chang 등, 1998).

*c-fos*는 원종양 유전자로 시냅스후 뉴런에서 빠르게 발현되고 종종 감각자극 혹은 신경손상 후 척수의 신경세포 활성화에 대한 지표로 사용된다(Hunt 등, 1987; Bullitt, 1990; Molander 등, 1992). 일단 발현되면, *c-fos* 단백질은 세포핵으로 들어가고 단백질 복합체를 형성하여 AP-1 결합부위라고 하는 DNA 조절단위에 결합하여 다른 유전자들과 상호작용한다(Sambycetti와 Curran, 1986). 따라서, *fos* 단백질은 스트레스와 통증 과정의 신호전달기전에서 세포활동을 조절하는 3차 전령으로 활동한다(Chang 등, 1998; Naranjo 등, 1991). *c-fos* 발현은 막전위 정도와 리간드 혹은 전압 의존성 통로(voltage-gated channels)를 통한 Ca^{++} 유입과 관계있다(Morgan과 Curran, 1986; Williams 등, 1990). 따라서 Ca^{++} 는 흥분세포에서 초기발현유전자 발현을 조절하는데 중요한 2차 전령임을 나타낸다(Harp & Sagar, 1994; Sheng & Greenberg, 1990).

Hunt 등(1987)의 연구이래로 여러 연구자들은 다양한 유해자극후 척수 등쪽뿌리의 시냅스후 신경원에서 *c-fos*가 발현됨을 보고하였다(이원택 등, 1997; 이원택 등, 1999; Abbadie & Besson, 1992; Bullitt, 1990; Chang 등, 1998; Chapman 등, 1995; Honore 등, 1995; Lee & Beitz, 1992; Tokunaga 등, 1999). 유해자극 정보는 척수 혹은 삼차(caudal trigeminal)핵에 있는 유해성 신경원으로 A δ 와 C 일차 구심섬유에 의해 전달된다. 척수의 유해성 신경원은 원칙적으로 라미나 I, II의 바깥쪽, V와 VI, X에 위치한다. 척수와 삼차핵

의 유해성 신경원은 여러 뇌부위로 투사하는 축삭을 보낸다(Harris, 1998). 흥미로운 것으로 *fos*는 또한 A δ 섬유와 C섬유 활성화에 의해서만 촉발된다는 것이다(Herdegen 등, 1991). 여러 연구들은 유해자극을 가한 후 *c-fos*가 라미나 I, II와 V, X에서 발현한다고 하였다(Besson & Chaouch, 1987; Bullitt, 1990; Harris, 1998; Gogas, 1991). 본 논문에서도 capsaicin으로 통증을 유발시킨 후 천층인 라미나 I, II에서 *c-fos* 단백질 양성 신경원의 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 척수 천층은 특히 A δ 와 C섬유가 주로 종지하고, 물핀이 활성화하는 주요부위이기 때문에(Abbadie 등, 1994) 본 연구에서 선택하여 집중적으로 관찰하였다. *c-fos*는 주로 척수의 통증전달 신경원에서 발현되고 일차신경원인 척수신경절 신경원에서는 나타나지 않으며 기타 뇌에서 통증에 관계된 부위에도 발현된다(박경아 등, 1997; Hu 등, 1993; Jones & Light, 1990; Tavares 등, 1993).

유해자극으로 유발된 *fos* 단백질은 물핀과 같은 오피오이드와 MK-801같은 NMDA 수용체 길항제와 NOS 억제제로 억제되는 것으로 나타났다(Abbadie 등, 1994; Buritova, 1996; Gogas 등, 1991; Honore, 1995; Jones, 1992; Mitsikostas; 1998). 또한 외인성 항유해성 시스템(antinociceptive systems)인 전기침 활성화와 저출력 레이저에 의해서도 감소된다(송영화, 2000; Chang, 1998; Hu 등, 1993; Lee & Beitz, 1992). 물핀은 심층 보다 라미나 I, II의 *c-fos*를 더욱 억제시킨다(Presley 등, 1990). 그것은 엔케팔린(enkephalin)을 포함하는 뉴런과 다이놀핀(dynorphin)을 포함하는 뉴런이 교양질에 집중되어 있기 때문이다(Aronin 등, 1981). 척수 등쪽뿌리 뉴런의 일부는 프리프로다이놀핀(preprodynorphin)과 프리프로엔케팔린(prepro-enkephalin)과 공존(colocalization)한다(Naranjo 등, 1991; Noguchi 등, 1991). 다시 말해, 유해자극에 반응시 *c-fos*를 발현하는 많은 뉴런들은 프리프로다이놀핀 유전자와 프리프로엔케팔린 유전자를 발현한다.

유해자극으로 촉발된 *c-fos*는 오피오이드 조절하에 있는 것으로 보인다(Lee & Beitz, 1992; Hunter 등, 1995). 예를 들어, 유해자극으로 증가된 *c-fos*는 물핀에 의해 크게 그 수가 감소되고, 이것은 길항제인 나록손(naloxone)에 의해 반전되기 때문이다(Abbadie & Besson, 1993). 글루타메이트와 substance P와 같은

유해성 정보과정과 연관된 일반적인 신경전달물질들은 시냅스후 신경원에 Ca^{++} 를 증가시켜 c-fos 활성을 초래한다고 하였다(Williams 등, 1990; Yao 등, 1992). 신경원의 세포내 Ca^{++} 의 증가는 c-fos 발현에 중요하고 등쪽뿔내 통증 전달에 영향을 미친다(Yao 등, 1992). Grudt와 Williams(1993, 1994)는 오피오이드가 Ca^{++} 전도를 감소시키고, K^{+} 전도를 증가시킨다고 하였다. 손상후 A-섬유에서 촉발되는 신경펩티드 substance P는 c-fos의 강력한 촉발제로 알려져있다(Leah 등, 1992). 물핀의 전처치는 등쪽뿔의 substance P 유리를 감소시키고 결과적으로 fos 단백질 발현을 억제한다(Lan 등, 1992). 하지만, 이원택 등(1997)은 substance P와 c-fos 발현의 상관관계를 밝히지 못해 이에 대한 더 자세한 연구가 필요하다. Chang과 Harlan(1990)은 전기침이 척수에 엔케팔린 수용체와 물핀 수용체가 있어 엔돌핀의 유리가 침으로 유발된 마취를 조정하는 것으로 보이고, 순환하는(circulating) 엔케팔린이 척수에 있는 이 수용체와 결합하여 유해자극을 조절하고 c-fos 발현을 감소한다고 하였다.

여러 가지 통증 제어법들중 경피신경전기자극은 부작용이 없는 것으로 매우 유용하게 사용할 수 있는 기구이다(민경옥, 1993). 1970년대 초에 개발된 경피신경전기자극은 부드러운 촉각을 주어 선택적으로 굵은 섬유의 입력을 증가시킴으로서 통증전달세포(T-cells)의 연결전 억제제를 촉진시켜 의식적인 통증의 지각을 감소시켰다(김중만과 안덕현, 1998).

경피신경전기자극의 진통효과는 1965년 Melzack과 Wall이 발표한 관문조절이론 또는 내인성 오피움계와 연관된 중추신경내의 통각전달조절계의 활성화(김선호 등, 1991; McGeer, 1987; Takeda 등, 1979) 등이 가능한 진통기전으로 거론되고 있으나 자세한 내용은 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 내인성 동통조절계란 외부에서 투여하는 외인성 진통제와 같은 약물의 작용없이 중추신경계에 존재하는 특정한 신경핵들의 상호작용에 의해 일어나는 진통효과를 말한다. 최근에는 LTD(long-term depression)기전이 거론되고 있다(Sandkuhler 등, 1997). LTD는 LTP(long-term potentiation)와 함께 다양한 종류의 말초 시냅스와 중추 시냅스에서 일어나는 현상으로 주로 해마에서 세포의 학습과 기억(learning and memory)에서 설명되었으나(Levitan과 Kaczmarek, 1997), 일차적인 유해 자극 이후 척수에 나타나는 감각(sensitization)이 LTP와 비

슷하여(Harman, 2000) 통증을 설명하는데 이 용어를 사용하게 되었다. LTD는 단시간의 고빈도(3초 동안 100Hz)와 장시간의 저빈도(15분 동안 1Hz)가 척수 등쪽뿔의 천층에 있는 신경원의 일차구심성 A δ 섬유의 입력을 자극하여 흥분성 시냅스후전위(EPSP, excitatory postsynaptic potentials)를 감소시켜 장기간의 억제(long-lasting depression)를 초래한다고 하였다(Randic, 1996). 또한 LTD는 나록손, 비선택적 오피오이드 수용체 길항제에 의해 반전되므로 일차구심성 시냅스에서 LTD 생성에 오피오이드 수용체의 활동이 중요함을 나타낸다(Chen 등, 1995). 또한 Ca^{++} 의 기능을 강조하기도 했다(Levitan & Kaczmarck, 1997).

많은 연구들이 고빈도 전기자극과 저빈도 전기자극의 기전이 다를 것을 나타낸다. 저빈도 전기자극은 μ 수용체를 활성화시키는 프로엔케팔린에서 유래된 펩티드를 경유하여 조절되고(Weber 등, 1983), 고빈도 전기자극은 나록손에 대해 상대적으로 저항인 κ 수용체를 경유하여 조절된다. 이와 관련된 오피움계는 다이놀핀성(dynorphinergic)이다(Han 등, 1986). Cheng과 Pomeranz(1979)는 4Hz 전기침의 효과가 나록손에 의해 차단되는 것으로 '엔돌핀' 기전이라 하고, 200Hz 전기침의 효과는 나록손에 대해 저항하므로 '비엔돌핀(non-endorphinergic)'으로 분류하였다. Lee와 Beitz(1992)은 전기침의 다양한 빈도가 유해성 자극으로 활성화된 척수 등쪽뿔의 c-fos 발현을 감소시키고, 이것은 전기침의 효과가 척수 등쪽뿔 수준에서 유해성 감각전달을 부분적으로 억제함을 의미한다고 하였다. 통증은 척수, 뇌간, 시상 등의 중추신경계 내에서 내인적으로 엔돌핀계와 같은 과정을 통해서 혹은 외인적인 경피신경전기자극을 통해 조절될 수 있다(Thorsteinsson, 1987). 본 실험에서 관찰된 척수 등쪽뿔에서 c-fos 발현의 억제는 경피신경전기자극이 척수레벨에서 통증전달 억제의 효과를 나타내는 직접적인 증거이다. 유해자극은 그 자체가 내인성 오피오이드계를 활성화시켜 척수 등쪽뿔의 c-fos 발현을 부분적으로 차단시키지만, 경피신경전기자극 또한 다이놀핀과 엔케팔린을 활성화시켜 c-fos 발현을 감소시키는 것으로 보인다.

본 연구에서도 다른 빈도의 경피신경전기자극이 capsaicin으로 유발된 c-fos의 발현을 등쪽뿔 내에서 감소시켜, 경피신경전기자극이 척수 수준에서 부분적으로 유해자극 전달을 억제시키는 효과가 있음을 증명하였다. 더욱이 저빈도 경피신경자극이 크게 c-fos 발현을 감소

시킨 것은 Lee와 Beitz(1992)의 연구와 일치하였다. 이것은 급성기 통증에 저빈도 경피신경전기자극이 더 효과적임을 의미한다. 이는 Walsh 등(1995)이 급성통증모델에서 저빈도 경피신경전기자극이 효과적이라는 연구 결과와도 일치하였다.

위에서 언급한 여러 연구들에 의해 c-fos의 발현과 Ca⁺⁺ 관계는 필수적인 것으로 생각되고, 경피신경전기 자극에 의한 c-fos 발현의 감소에 Ca⁺⁺와 오피움계가 관여하는 것으로 사료된다. 오피움계에 대한 연구들은 많이 밝혀져있는데 비해 Ca⁺⁺에 대해서는 앞으로 더 자세한 연구가 필요하다.

V. 결 론

Capsaicin으로 12마리의 웅성 흰쥐에게 통증을 유발시킨 모델에서 저빈도(4Hz, 200 μ s, 20분) 경피신경전기 자극과 고빈도(100Hz, 50 μ s, 20분) 경피신경전기 자극의 효과를 정량적으로 알아보기 위하여 c-fos를 이용하여 면역조직화학을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Capsaicin 투여 2시간 후 척수 등쪽뿌내 천층에서 c-fos의 발현이 최고였으며, 4시간 후에는 2시간에 비해 그 수가 감소되었고 8시간 후에는 현저하게 감소되었고, 16시간 후에는 극소수의 c-fos 발현만 관찰할 수 있었다.

2. Capsaicin 투여 2시간 후 저빈도(4Hz, 200 μ s, 20분), 고빈도(100Hz, 50 μ s, 20분)의 경피신경전기 자극을 적용하여 척수 등쪽뿌내 천층에서 c-fos 양성 신경원의 수가 유의하게 감소하였다.

3. Capsaicin 투여 2시간 후의 급성 통증모델에서 저빈도와 고빈도 경피신경전기 자극을 적용한 결과 저빈도의 경피신경전기 자극이 고빈도에 비해 c-fos 세포수를 더욱 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때, Capsaicin으로 통증을 유발후 급격한 c-fos 발현의 증가에 경피신경전기 자극의 적용이 c-fos 발현을 감소시켜 경피신경전기 자극이 통증 억제에 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 저빈도 경피신경전기 자극이 훨씬 c-fos 발현을 감소시킨 것은 급성통증모델에서 고빈도에 비해 저빈도의 경피신경전기 자극이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 또한 본 연구를 통해 경피신경전기 자극이 통증모델에서 미치는 효과를 정량적으로 관찰할 수 있어, 전기치료에 대한 과학적인 근거를 마련할 수 있었다.

< 참고 문헌 >

- 김종만, 안덕현 : 통증생리와 물리치료 원리, 한국전문물리치료학회지, 5, 106-117, 1998.
- 김신호, 남택상, 이영호, 김연희, 백광세 : 고양이에서 D-phenylalanine이 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향, 대한신경과학회지, 9, 171-185, 1991.
- 민경옥 : 초음파, EST 연구간좌집, pp115-128, 1993.
- 송영화, 이영구, 임중수 : GaAsAl 레이저가 물리적 통증반응과 관련된 척수내 신경세포의 활성화에 미치는 영향, 대한물리치료사학회지, 7, 149-162, 2000.
- 이기훈, 이지인, 김영은, 이양수, 김풍택, 김명삼 : 흰쥐의 좌골신경에 1% 페놀용액을 주입한 실험용 신경병변성 동통모델의 개발, 대한재활의학회지, 24, 185-192, 2000.
- 이상수 : Capsaicin으로 유발된 말초신경병증에서 methylcobalamin 투여에 의한 형태학적 변화, 대한신경과학회지, 16, 678-681, 1998.
- 이원택 : Capsaicin이 신경계통에 미치는 영향, 대한의학회지, 38(2), 233-240, 1995.
- 이원택, 손민균, 정경승, 이홍석, 박경아 : 말초신경손상이 실험적으로 유발된 흰쥐의 척수신경절 및 척수 등쪽뿌내 신경세포의 형태학적 변화에 관한 연구, 대한해부학회지, 30, 495-510, 1997.
- 이원택, 이주강, 강은정, 이종은, 박경아 : 흰쥐의 실험적 관절염 모델에서 capsaicin이 척수의 c-fos 단백질 및 척수신경절의 substance P, CGRP에 미치는 영향, 대한해부학회지, 32, 761-773, 1999.
- 이재성, 이문영, 김민선, 박동식, 최석준, 박병림 : 흰쥐에서 척수손상후 기능회복에 관여하는 전기자극의 작용기전, 대한재활의학회지, 21, 281-289, 1997.
- 이재형 : 전기치료학, 대학서림, pp355-405, 1995.
- 이청기, 강안기, 박현, 김종철, 이상철 : 전기자극치료가 인체에 미치는 영향(I) : 전기생리학적 평가, 대한재활의학회지, 17, 235-243, 1993.
- 정한영, 권희규 : 경피전기 자극이 체성감각유발전위에 미치는 영향, 대한재활의학회지, 17(3), 348-353, 1993.
- 한태륜, 전민호, 장원철 : 고주파 경피적 전기신경자극치료가 H-반사에 미치는 효과에 대한 연구, 대한재활학회지, 19, 601-606, 1995.
- Abbadie C., Besson J.M. : C-fos expression in rat

- lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis, *Neuroscience*, 48, 985-993, 1992.
- Abbadie C., Besson J.M. : Effects of morphine and naloxone on basal and evoked fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats. *Pain*, 52: 29-39.(1993).
- Abbadie C., Honore P., Fournie-Zaluski M.C., et al. : Effects of opioids and non-opioids on c-fos-like immunoreactivity induced in rat lumbar spinal cord neurons by noxious heat stimulation, *Euro J Pharma*, 258, 215-227, 1994.
- Adams R.K., Victor M., Ropper A.H. : Principles of neurology, 아담스신경과학 편찬위원회, 정담, pp121-133, 1998.
- Aronin N., DiFiglia M., Liotta M.S., et al. : Ultrastructural localization and biochemical features of immunoreactive leu-enkephalin in monkey dorsal horn, *J Neurosci*, 1, 561-577, 1981.
- Besson J.M., Chaouch A. : Peripheral and spinal mechanism of nociception, *Physiol Rev*, 67, 67-186, 1987.
- Bullitt E. : Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat, *J Comp Neurol*, 296, 517-530, 1990.
- Buritova J., Honore P., Besson J.M. : Ketoprofen produces profound inhibition of spinal c-fos protein expression resulting from an inflammatory stimulus but not from noxious heat, *Pain*, 67, 379-389, 1996.
- Chang S.L., Harlan R.E. : The fos proto-oncogene protein: regulation by morphine in the rat hypothalamus, *Life Sci*, 46, 1825, 1990.
- Chang C.J., Huang S.T., HSU K., et al. : Electroacupuncture decreases c-fos expression in the spinal cord induced by noxious stimulation of the rat bladder, *J urology*, 160, 2274-2279, 1998.
- Chapman V., Buritova J., Honore P., et al. : 7-nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, reduces formalin evoked c-fos expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord, *Brain Res*, 697, 258-261, 1995.
- Chen G.D., Cheng G., Randic M. : A role for κ -opioid receptors in the activity-dependent synaptic plasticity in the spinal dorsal horn, *Neurosci Abstr*, 21, 604, 1995.
- Cheng R.R.S., Pomeranz B. : Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain relieving mechanisms: endorphin and non-endorphin system, *Life Sci*, 25, 1957-1962, 1979.
- Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L., et al. : Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence, *Pain*, 52, 259-285, 1993.
- Curran T., Morgan J.I. : Fos: an immediate early transcription factor in neurons, *J Neurobiol*, 26, 403, 1994.
- Dray A., Urban L., Dickenson A. : Pharmacology of pain, *Trends in Pharmacol Sci*, 15, 190-197, 1994.
- Goelet P., Castellucci V.F., Schacher S., et al. : The long and the short of long-term memory - a molecular framework, *Nature*, 322, 419-422, 1986.
- Gogas K.R., Presley R.W., Levine J.D., et al. : The antinociceptive action of supraspinal opioids result from an increase in descending inhibitory control: Correlation of nociceptive behavior and c-fos expression, *Neuroscience*, 42, 617-628, 1991.
- Golding J.F., Ashton H., Marsh R., et al. : TENS produces variable change in somatosensory evoked potentials, sensory perception and pain threshold: Clinical implications for pain relief, *J Neuro Neurosur Psy*, 49, 1397-1406, 1986.
- Greenberg M.E., Greene L.A., Ziff E.B. : Nerve

- growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient change in proto-oncogene transcription in PC12 cells, *J Biol Chem*, 260, 14101-14110, 1985.
- Grudt T.J., Williams J.T. : κ -opioid receptors also increase potassium conductance, *Proc Natl Acad Sci*, 90, 11429-11432, 1993.
- Grudt T.J., Williams J.T. : μ -opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea-pig and rat, *J Neurosci*, 14, 1646-1654, 1994.
- Han J.S., Ding X.Z., Fan S.G. : The frequency as the cardinal determinant for electroacupuncture analgesia to be reversed by opioid antagonists, *Acta Physiol Sin*, 38, 475-482, 1986.
- Harman K. : Neuroplasticity and the development of persistent pain, *Physiotherapy Canada*, winter, 64-71, 2000.
- Harp F.R., & Sagar S.M. : Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response, *Neurotoxicology*, 15, 51-59, 1994.
- Harris J.A. : Using c-fos as a neural marker of pain, *Brain Res Bull*, 45, 1-8, 1998.
- Herdegen T., Kovary K., Leah J., et al. : Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation, *J Comp Neurol*, 313, 178-191, 1991.
- Honore P., Chapman V., Buritova J., et al. : Reduction of carrageenin oedema and the associated c-fos expression in the rat lumbar spinal cord by nitric oxide synthase inhibitor, *Bri J Pharma*, 114, 77-84, 1995.
- Hu Z., Chen B., Tong J. : The change of c-fos expression in ovariectomized rats following electroacupuncture treatment - an immunohistochemistry study, *Accp & Electro-Ther*, 18, 117-124, 1993.
- Huang W., Simpson R.K. : Ketamine suppresses c-fos expression in dorsal horn neurons after acute constrictive sciatic nerve injury in the rat, *Neurosci Lett*, 269, 165-168, 1999.
- Hunt S.P., Pini A., Evan G. : Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, 328, 632-634, 1987.
- Hunter J.C., Woodburn V.L., Durieux C., et al. : Cofos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression, *Neurosci*, 65(20), 485-492, 1995.
- Jones S.L. : Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked Fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat spinal cord, *J Comp Neurol*, 325, 435-445, 1992.
- Kim S.H., Chung J.M. : An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain*, 50, 355-363, 1992.
- Lan Yao G., Tohyama M., Senba E. : Histamine-caused itch induces fos-like immunoreactivity in dorsal horn neurons: effect of morphine pretreatment, *Brain Res*, 599, 333-337, 1992.
- Leah J.D., Sandkuhler J., Herdegen T., et al. : Potentiated expression of FOS protein in the rat spinal cord following bilateral noxious cutaneous stimulation, *Neuroscience*, 48, 525-532, 1992.
- Lee J.H., Beitz A.J. : Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation, *Brain Res*, 577, 80-91, 1992.
- Levitan I.B., Kaczmarek L.K. : The neuron, 2nd ed, Oxford university press, p496-507, 1997.
- McGeer P.L., Feeles I.C., McGeer E.G. : Molecular neurobiology of the mammalian brain. New York, Plenum press: pp265-317, 319-343, 406-408, 603-605, 1987.
- Mitsikostas D.D., Rio M.S., Waeber C., et al. : The NMDA receptor antagonist MK-801 reduces capsaicin-induced c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis, *Pain*, 76, 239-248, 1998.
- Molander C., Hongpaisan J., Grant G. : Changing

- pattern of c-fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat. *Neuroscience*, 50, 223-236, 1992.
- Morgan J.I., Curran T. : Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322, 552-555, 1986.
- Munglani R., Hunt S.P. : Molecular biology of pain. *Br J Anaes*, 75, 186-192, 1995.
- Naranjo J.R., Mellstrom B., Achaval M., et al. : Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron*, 6, 607-617, 1991.
- Noguchi K., Kowalski K., Traub R., et al. : Dynorphin expression and fos-like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are colocalized in spinal cord neurons. *Molec Brain Res*, 10, 227-233, 1991.
- Palecek J., Paleckova V., Dougherty D.M., et al. : Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol*, 67, 1562-1573, 1992.
- Presley R.W., Menetrey D., Levine J.D., et al. : Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 10, 323-335, 1990.
- Randic M. : Plasticity of excitatory synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn. In: The polymodal receptor - A gateway to pathological pain. Kumazawa T, Kruger L, Mizumura K eds. *Progress in Brain Res* 113, Elsevier Science, p463-506, 1996.
- Sambycetti L.C., Curran T. : The fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science*, 234, 1417-1419, 1986.
- Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. : A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43, 205-218, 1990.
- Sheng M., Greenberg M.E. : The regulation and function of c-fos and other Immediate Early Genes in the neurons system. *Neuron*, 4, 477-485, 1990.
- Sandkuhler J., Chen J.G., Cheng G., et al. : Low-frequency stimulation of afferent A δ -fibers induces long-term depression at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat. *J Neurosci*, 17, 6483-6491, 1997.
- Takeda K., Taniguchi N., Kuriyama H., et al. : Experimental study on the mechanism of acupuncture analgesia. *Adv Pain Res The*, 3, 623-628, 1979.
- Thorsteinsson G. : Chronic pain: Use of TENS in the elderly. *Geriatrics*, 42, 75-82, 1987.
- Tokunaga A., Kondo E., Fukuoka T., et al. : Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res*, 847, 321-331, 1999.
- Walsh D.M., Liggett C., Baxter D., et al. : A double-blind investigation of the hypoalgesic effects of transcutaneous electrical nerve stimulation upon experimentally induced ischaemic pain. *Pain*, 61, 39-45, 1995.
- Weber E., Esch F.S., Bohlen S., et al. : Metorphamide, isolation, structure, and biological activity of an amidated opioid octapeptide from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 7362-7366, 1983.
- Williams S., Evan G.I., Hunt S.P. : Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. *Neurosci.*, 36, 73-81, 1990.
- Yao G.L., Tohyama M., Senba E. : Histamine-caused itch induces Fos-like immunoreactivity in dorsal horn neurons: effect of morphine pretreatment. *Brain Res.*, 599, 333-337, 1992.

Legends for figures

Fig 4. Photograph of the changes of c-fos immunoreactive neurons(arrow) in superficial dorsal horn after capsaicin injection. bar=200 μ m

C-fos immunoreactive neurons were gradually decreased as time passed.

2h=2 hours after capsaicin injection

4h=4 hours after capsaicin injection

8h=8 hours after capsaicin injection

16h=16 hours after capsaicin injection

Fig 5. Photograph of effects of TENS on c-fos immunoreactivity neurons(arrow) induced by apsaicin. bar=200 μ m

TENS decrease c-fos immunoreactivity neurons at 2 hours after capsaicin injection.

2h=2 hours after capsaicin injection

4Hz =application of TENS(4Hz , 200 μ s) after capsaicin injection,

100Hz =application of TENS(100Hz , 50 μ s) after capsaicin injection.

Fig. 6. Section of lumbar spinal cord of rat.Fig.5

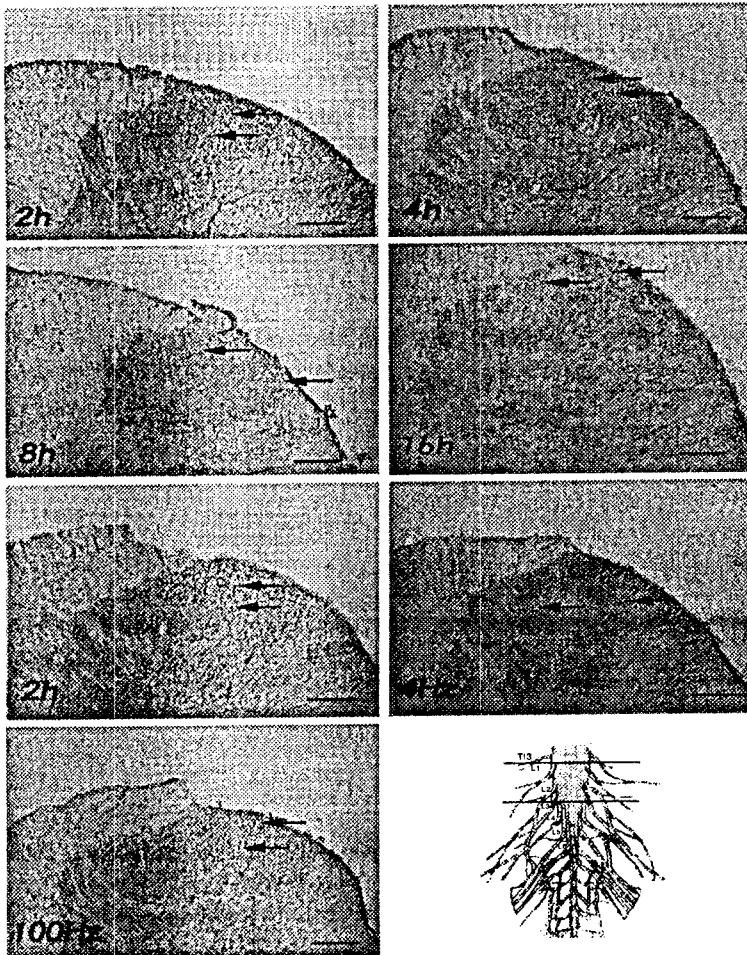


Fig 4.	Fig 4.
Fig 4.	Fig 4.
Fig 5.	Fig 5.
Fig 5.	Fig 5.