

원 저

흰쥐 足底에 formalin 주입으로 유발된 痛症反應에 대한 電鍼 效果

김재효, 최동옥, 김민선¹⁾, 박병림¹⁾, 손인철

원광대학교 한의과대학 경혈학교실, 원광대학교 의과대학 생리학교실¹⁾

Effects of Electroacupuncture on the Modulation of Formalin-induced Pain in the Rat

Jae-Hyo Kim, Dong-Ok Choi, Min-Sun Kim¹⁾, Byung-Rim Park¹⁾, In-Cheul Son

Department of Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Department of Physiology, School of Medicine, Wonkwang University¹⁾

Objective : Acupuncture is a method used to treat many kinds of pain in oriental cultural medicine. Especially when hetero-segmental area acu-points are stimulated, the therapeutic effects of pain control have more critical properties than other methods of acupuncture. However, the mechanism of pain control by acupuncture is contradictory so far. The present study examined the effects of electroacupuncture (EA) applied to the acu-point of the hetero-segmental area on modulation of formalin-induced pain in Sprague-Dawley rats.

Methods : In order to apply EA to acu-points in the plantar area of right forepaws, a pair of Teflon-coated stainless steel wires were implanted in HT 7 (Shin-Moon) and PC 7 (Dae-Reung) 7 days before the behavioral test. A behavioral test was performed by means of video camera after injection of 5% formalin (50 μ l) into the lateral plantar region of the left hind paw. EA was delivered by a constant DC current stimulator at 4~5 mA, 2 ms, and 10 Hz for 30 min. c-Fos protein expression was measured in the lumbar spinal cord at 2 hr and 4 hr after formalin injection.

Results : Behavioral responses including favoring, flinching and biting occurred in the biphasic pattern, such as the 1st phase (0~5 min) and the 2nd phase (20~45 min) after formalin injection. However, EA (4~5 mA, 2 ms, 10 Hz) significantly inhibited the behavioral responses. Injection of formalin expressed c-Fos protein on the ipsilateral dorsal horn neurons in L3 - L5 and the expression was sustained more than 4 hrs after formalin injection. However, EA decreased c-Fos protein expression at dorsal horn neurons in the lumbar spinal cord till 4hrs after formalin injection.

Conclusions : These results suggest that EA modulates formalin-induced pain and this inhibitory action may be elicited by the descending inhibitory system. (*J Korean Oriental Med 2002;23(2):97-107*)

Key Words: electroacupuncture, formalin induced pain, c-Fos, pain modulation.

서 론

· 접수 : 2001년 12월 24일 · 채택 : 2002년 4월 4일
· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경혈학교실
(Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458, E-mail: ichsohn@wonkwang.ac.kr)
· 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R02-2001-00452) 지원으로 수행되었음.

대개의 질병에서 임상적으로 표현되는 “痛”은 <<素問 陰陽應象大論>>¹⁾에서 “寒傷形 熱傷氣 氣傷痛 形傷腫 故先痛而後腫者 氣傷形也, 先腫而後痛者 形

傷氣也.”이라 하여, 痛症이 발생하기 위한 단계를 언급하고 있으며, 經絡을 통한 氣血運行이 장애를 받으므로써 痛症이 생겨난다는 “寒氣入經而稽遲 泣而不行, …客於脈中則氣不通 故卒然而痛”¹⁾이란 원칙을 세워 痛症發生 原因에 대해서도 인식하였다. 또한 韓醫學에서는 痛症을 조절하기 위한 방법으로 鍼灸를爲始한 많은 처방 및 치료법들이 개발되어 사용되어져 氣血 및 經絡理論을 바탕으로 循經取穴法, 接經取穴法, 根結論, 通經取穴法 등을 이용하고 있으며, 이러한 取穴法은 經絡體系를 기초로 痛症을 치료하는 방법으로 제시되어 실제 임상에서 많은 치료효과를 거두고 있다.

急性 痛症에 대한 실험적 연구모델이 되고 있는 formalin test는 희석된 formalin 용액을 발바닥의 피하에 주입하여 통증을 유발하는 방법이다. 피하에 주입된 formalin은 피하조직과 화학반응하여 염증을 유발함으로써 통증을 초래한다고 한다^{2,3)}. 전기생리학적 연구에 의하면 formalin에 의한 통증반응은 말초 감각신경들 중에서 탈수초신경인 c-fiber의 흥분성을 증가시키며 척수 후근에 존재하는 감각 신경세포들의 자발활동성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 이에 formalin 피하주입에 의하여 척수에서 glutamate, substance P와 NO 등의 신경전달물질이 증가될 뿐 아니라 prostaglandin, interleukin-6, bradykinin 등의 염증성 화학물질 증가도 동반되는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

c-Fos 단백질은 일정한 자극에 의해 신경세포에서 발현되는 초기발현 유전인자 중의 하나로 신경세포의 활동성을 관찰하는 표식자로 사용되어 왔다. Hunt 등⁷⁾은 마취된 흰쥐의 말초부위에 유해성 자극을 가하여 척수에 존재하는 신경세포에서 c-Fos 단백질의 관찰을 시작하였고, 그 뒤 척수부위에서 통증 정도를 확인하는 표식자로서 활용되어 왔다¹¹⁻¹³⁾. 유해성 자극은 30분내에 c-Fos mRNA를 발현시키며, c-Fos 면역단백 반응 세포의 관찰은 1-3시간 사이에 가장 많이 관찰되는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 특히 여러 연구자들에 의하여 무마취 흰쥐에서 下肢의 피하에 formalin 주입시 척수 및 후근 신경절에서 시간경과에 따른 c-

Fos 단백질 등의 발현양상 및 척수 부위별 분포양상에 대한 실험들이 이루어져왔다¹⁵⁾.

本 研究은 흰쥐에게 formalin을 주입하여 통증을 유발시킨 뒤, 巨刺論¹⁶⁾을 근거로 한 電鍼刺戟이 통증반응에 미치는 영향을 관찰하여 통증에 대한 鍼灸治療의 효과를 관찰하고자 행동검사와 c-Fos 면역조직화학검사를 이용하여 電鍼刺戟에 따른 변화를 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 實驗動物

실험동물은 체중 250~300 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 사용하였으며, 對照群, formalin 注入群, formalin 주입 후 電鍼刺戟을 가한 電鍼刺戟群의 3개 實驗群으로 분류하였다.

2. 痛證誘發

痛症 誘發은 足太陽脾經과 足少陰腎經이 流注하는 左側 足底部位의 皮下에 5% formalin 용액 50 μ l를 25 gauge 주사기를 사용하여 주입하였으며, 신경 해부학적으로는 비복신경 (sural nerve)이 지배하는 영역에 해당하였다.

3. 電鍼刺戟方法

1) 電鍼 插入 : 痛症유발에 의한 행동반응 및 c-Fos 단백질 발현을 측정하기 위하여 formalin 주입 1주일 전에 電鍼刺戟用 전극을 右側 上肢의 神門(HT 7) 部位 및 大陵(PC 7) 部位에 해당하는 內側 皮下에 삽입하였다. 전극삽입을 위하여 chloralhydrate 300 mg/kg를 흰쥐의 복강에 주입하여 마취한 후 clipper를 사용하여 전극을 삽입하고자 하는 上肢部位의 털을 제거하였으며, povidone iodine 용액과 isopropyl alcohol로 수술부위의 피부를 소독하여 수술에 따른 2차감염을 예방하고자 하였다. 전극삽입 부위의 피부를 절개하여 피하에 한쌍의 teflen으로 피복된 stainless steel wire를 자극하고자 하는 부위의 피복을 제거한후 神門 (HT 7)과 大陵 (PC 7) 부위에 삽입하여 고정하고,

電鍼刺戟을 용이하게 하기 위하여 피하부위로 전선을 통과시켜 흰쥐의 項背部位로 전극의 다른 끝을 노출시켜 고정하였다. 전극삽입 후 수술부위의 염증발생을 막기 위하여 ampicilin 0.5 mg/kg/day를 3일간 근육주사하였고, 수술후 청결한 cage에서 사육하였다.

2) 電鍼刺戟 : Formalin주입 직후부터 電鍼刺戟을 神門과 大陵 부위에 가하였다. 電氣刺戟은 전기자극기 (pulemaster A300, WPI, U.S.A.)를 이용하여 주파수와 자극시간을 조절하였으며, stimulus isolator (A385, WPI, U.S.A.)를 통해 자극 강도는 4-5 mA로, 자극 펄스는 2 ms의 정전류를 30분간 자극하였다.

4. 行動檢査

Formalin을 주입한 직후 투명한 아크릴 상자 (25x25x25 cm)에 실험동물을 위치시키고 외부 잡음이 없는 실험실에서 1시간 동안, video camera를 이용하여 formalin 주입으로 유발된 痛症반응을 기록하였다. Formalin에 의한 痛症반응을 객관화하기 위하여 痛症수치를 산출하는 방식은 Watson 等¹⁷⁾이 산출한 방법을 기초로, 먼저 formalin으로 유도된 통증반응을 두가지로 세분하였다. 즉 formalin이 주입된 발바닥을 擧床하는 행동과 발을 할거나, 물어뜯고 흔들어대는 행동으로 분류하고 있다. 그리고 두 단계 각각에 대하여 소비한 시간의 양을 적용하고 또한 그 산물을 합산함으로써 유도하였다. 이러한 계산방법을 Weighted scores technique (WST)라고 부르며, "WST = {(2 X time in category 1) + (3 X time in category 2)} / 300" 식을 사용하여 痛症에 따른 행동검사와 자침에 따른 痛症조절문제를 확인하고자 하였다. 본 실험에서는 formalin 주입직후부터 각 5분 간격으로 그 횟수와 시간을 측정하였으며, 전체 관찰시간은 formalin 주입후 60분까지로 설정하였다.

5. c-Fos 면역조직화학검사

척수에서 c-Fos 단백질 발현을 측정하기 위하여 실험동물을 chloralhydrate 250 mg/kg로 마취한 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장

관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% paraformaldehyde + 0.1 M PBS로 관류시킨 후 척수를 박리하였다. 박리된 척수는 4% paraformaldehyde + 0.1 M PBS에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후 30% sucrose에서 2일 이상 방치하였다. Cryostat (Leica, Germany)를 이용하여 40 um 두께로 조직절편을 만들어서 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회이상 세척하고 0.3% Triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척하였다. 그후 blocking agent (normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 다음 일차항체 (c-Fos, Oncoene Sci. 1:150)를 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간 동안 세척한 후 광학현미경하에서 진갈색으로 보이는 c-Fos 양성세포를 관찰하였다.

6. 統計

컴퓨터 통계프로그램인 Statview 4.0(Abacus Concepts Inc.)을 이용하였으며, 실험결과는 Mean ± S.E. 로 나타내었고, 통계검정은 one way ANOVA test와 t-test로 실시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험 결과

1. Formalin 주입후 痛症行動 反應에 대한 電鍼刺戟의 效果

5% formalin을 정상 흰쥐의 하지 족저부위 외측 피하에 주입하였을 때 모든 실험동물에서 flinching, licking, biting 등과 같은 痛症행동이 관찰되었다. Formalin 주입 직후부터 5분 사이에 痛症행동을 정량화한 痛症수치가 1.56±0.11인 제 1차 痛症반응이 출현하였으며, 이후 formalin 주입후 15분까지 각각 0.4

±0.07, 0.47±0.06으로 감소하였다. 제 2차 통증반응은 formalin 주입후 20분(0.88±0.11)부터 나타나기 시작하여, 30분에 1.21±0.15, 35분에 1.22±0.14, 40분에 1.32±0.1로 크게 증가하였으며, 이후 점차 통증수치가 감소하였다. Formalin 주입으로 유발된 통증반응에 대한 電鍼刺戟의 효과를 관찰하기 위하여 formalin주입 직후부터 健側 上肢의 經穴部位에 30분간 電鍼刺戟(10 Hz, 2 ms, 4~5 mA)을 시술하면서, 통증행동을 formalin 주입직후부터 관찰한 결과에서는 formalin주입군과 같은 통증행동인 제 1차 통증반응과 제 2차 통증반응이 나타났다. 그러나, 제 1차 통증반응은 formalin주입군에 비하여 0.92±0.17 (P<0.001)로 유의하게 억제되었으며, 제 2차 통증반응 역시 formalin 주입군에 비하여 formalin 주입후 20분에 0.58±0.12 (P<0.001), 25분에 0.72±0.13 (P<0.001), 30분에 0.93±0.15 (P<0.01), 35분에 0.82±0.1 (P<0.001), 40분에 0.91±0.15 (P<0.001)로 유의하게 억제되었다 (Fig. 1).

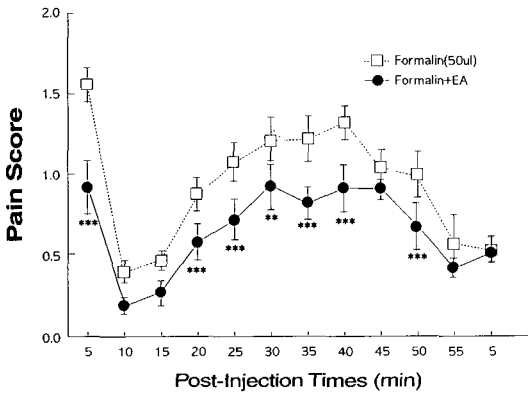


Fig. 1 Effects of electroacupuncture on temporal changes of pain score. Electroacupuncture was applied to the contralateral extra segmental area of acu-points for 30 min after formalin injection. Horizontal bar, EA stimulation time. Number of each group was 10. Values are mean±SE. ** P<0.01; *** P<0.001.

2. Formalin 주입후 c-Fos 면역 단백질 발현에 대한 電鍼刺戟의 效果

Formalin 주입후 시간의 경과에 따른 요척수 후근

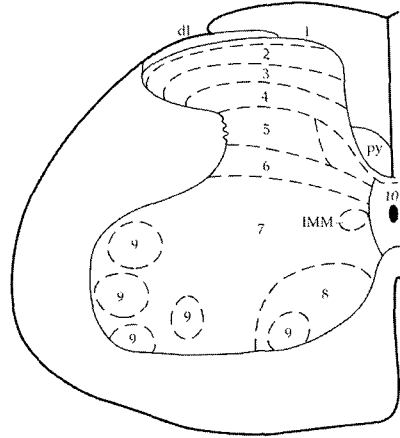


Fig. 2 Schematic drawing of cytoarchitectonic subdivisions in segment L4. dl, dorsolateral fasciculus; py, pyramidal track; IMM, intermedial column.

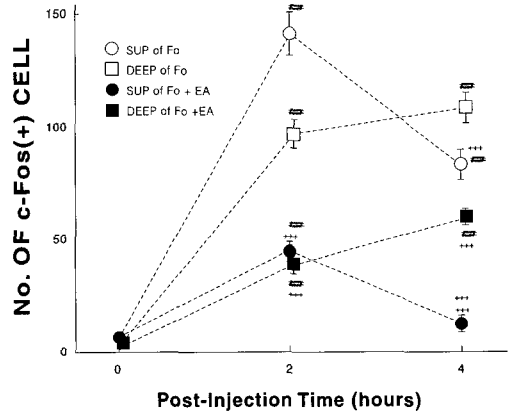


Fig. 3 Effects of electroacupuncture on modulation of number of c-Fos protein in the lumbar spinal cord following injection of formalin. Horizontal bar represents a period of electro-acupuncture in the contralateral extrasegmental area acu-points. #, compared with pre-injection of formalin; †, compared with injection of formalin; *, compared with 2 hr after injection of formalin.

회백질에서 c-Fos 단백질의 발현양상과 電鍼刺戟에 따른 효과를 관찰하기 위하여 formalin 주입전, 주입 후 2시간과 4시간에 제 3 - 5번 요척수에서 c-Fos 양성세포를 화상분석프로그램을 이용하여 측정하였다. 요척수 회백질은 laminae I ~ X 까지로 구분되어지며, 이중 laminae I - II 를 superficial layer, III - IV 를 nucleus proprius, V, VI, X 을 deep layer의 dorsal horn 으로 구성되어 있으며 VII, VIII, IX 를 ventral horn으로 구분되고 있다. 본 실험에서는 lamina I - IV 을 표층으로, lamina V, VI, VII, X 을 심층으로 구분하여 cFos 단백질 분포를 분석하였다(Fig 2). 표층에서의 c-Fos 양성세포는 formalin 주입 전에는 6.2 ± 2 개 였으나 formalin 주입 2시간후에는 141.4 ± 9.48 개로 증가하였고, 4시간후에는 83 ± 6.88 개로 감소하였으나 주입

전에 비하여 크게 증가하여 formalin 주입에 따른 痛症양상을 나타내주고 있었다. 심층에서는 formalin 주입전에는 3.9 ± 1.14 개로 거의 c-Fos 양성세포가 나타나지 않았으나, formalin 주입 2시간후에는 97.2 ± 6.09 개로 크게 증가하였고, 4시간 후에는 108.4 ± 6.6 개로 계속적인 증가를 보였다 (Fig. 3, 4, 5).

Formalin 주입 직후부터 30분간 健側 上肢 部位의 神門과 大陵에 대한 電鍼刺戟을 가한 후 c-Fos 양성세포의 발현양상을 관찰한 결과, 腰脊髓 後角 표층에서는 formalin 주입 2시간후 44.7 ± 4.32 개 였으며, 4시간후 12.5 ± 1.66 개로 formalin 주입군에 비하여 유의한 수준에서의 c-Fos 발현을 억제하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 腰脊髓 後角 심층에서의 c-Fos 양성세포의 발현은 2시간 후에는 39 ± 4.07 개 였

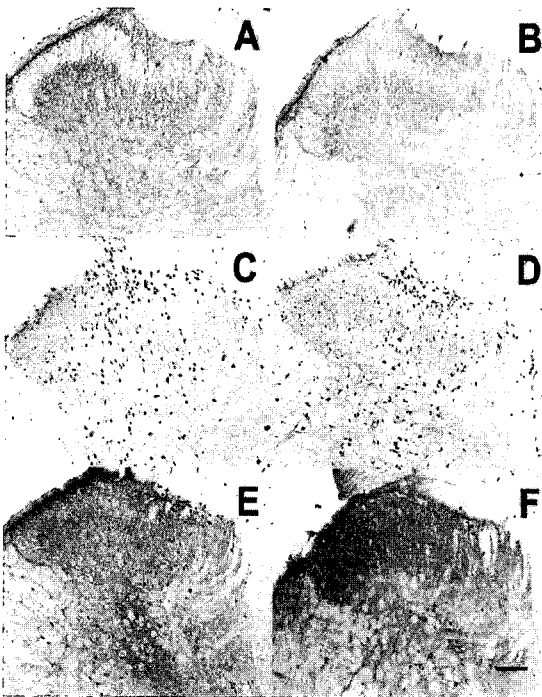


Fig. 4 Photomicrographs showing c-Fos protein expression in the superficial dorsal horn neurons of the lumbar spinal cord in normal rat (A), 2 hrs after electro-acupuncture treatment in normal rat (B), 2 hrs after formalin injection (C), 4 hrs after formalin injection (D), 2 hrs after formalin injection followed by EA (E), 4 hrs after formalin injection followed by EA (F). Calibration bar = 100 μ m.

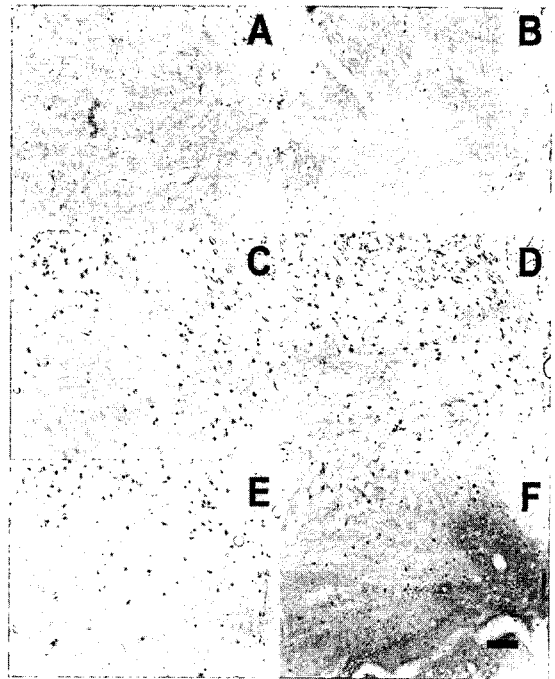


Fig. 5 Photomicrographs showing c-Fos protein expression in the deep dorsal horn neurons of the lumbar spinal cord in normal rat (A), 2 hrs after electro-acupuncture treatment in normal rat (B), 2 hrs after formalin injection (C), 4 hrs after formalin injection (D), 2 hrs after formalin injection followed by EA (E), 4 hrs after formalin injection followed by EA (F). Calibration bar = 100 μ m.

고, 4시간 후에는 59.8 ± 3.13 개로 formalin 주입군처럼, 발현양상이 증가하는 경향을 보였으나 발현된 세포수는 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3, 4, 5). 이상의 관찰결과에서 電鍼刺戟이 척수수준에서의 통증반응에 관련하고 있는 c-Fos 단백질 발현을 억제하고 있음을 확인할 수 있으며, 이는 formalin 주입에 의하여 유발된 통증반응 현상을 電鍼刺戟으로 억제한다는 것을 뒷받침하는 것이라 볼 수 있다

고 찰

韓醫學의 基盤인 經絡은 <<靈樞 本臟篇>>¹⁸⁾에서 “經脈者 所以行血氣而榮陰陽 濡筋骨 利關節也”라 하여 氣血運行的 통로로, <<難經 二十二難>>¹⁹⁾에서 “氣主煦之 血主濡之”라 하여 生理的으로 身體를 滋養하는 作用을 가지고 있다. 또한 經絡은 人體異常이 나타날 경우 이를 反映하는데, 人體에 만약 어떤 發病因子가 침범하여 臟腑의 정상기능이 손상되어 질병이 발생한 경우, 經絡은 생체의 각부분과 특별한 관계를 맺고 있는 經絡으로 通連된 체표 관련부위에서 각종의 이상변화를 나타내게 된다. 이러한 반응을 현대적인 명칭으로 壓痛點 혹은 過敏點이라 하는데, <<千金要方>>²⁰⁾에는 “摩癆肉之表 肋間空處 按之自覺牽引胸中”이라 하였고, <<靈樞 九鍼十二原論篇>>¹⁸⁾에서는 “五臟有疾也 應出于十二原 十二原絡有所出 明知其原 睹其應 而知五臟之害矣”라고 하여, 取穴해서 按壓할 경우 내부에 반응하여 疼痛이나 痠軟의 감각이 일어나는 것을 가리킨다.

痛症은 유해감수기를 통해 Aδ fiber와 C fiber로 전달되며, Aδ fiber 감수기는 기계적인 유해자극에 반응하여 반복되는 자극에 대하여 감각되고, C fiber 유해감수기는 유해한 열자극, K⁺, bradykinin, histamine, serotonin 등의 화학적 자극에 대하여 감각된다. 특히 C-polymodal nociceptor는 축삭반사를 일으킴으로써 말단에서 substance P와 calmodulin gene related peptide (CGRP), vasoactive intestinal peptide (VIP) 등을 유리시키고, 또는 대식세포를 자극하여 遊離된 물질들이 주변 모세 혈관의 투과성을 증가시켜 주위에

부종을 만들고, 또 주위의 유해감수기를 감각시켜 痛症을 유발한다. 조직손상으로 염증성 반응이 유발된 곳에서는 serotonin, prostaglandin, bradykinin과 tachykinin 등을 통해 유해감수기가 감각되어 무해성 자극에도 쉽게 반응한다. 특히 bradykinin에 의해 arachidonic acid가 prostaglandins로 변화하는데, 이 산물은 염증성 반응을 더욱 가중시킨다. 또한 수용체의 감각과 불활성 수용체의 활성화로 인하여 척수후각의 wide dynamic range (WDR) 세포와 nociceptive specific (NS) 세포들의 흥분성이 증가하는 변화를 보이기도 한다^{21,24)}. 말초에서 올라온 흥분은 척수 후근 신경전세포 (DRG)를 통과하는데, DRG에는 glutamate와 같은 excitatory amino acid (EAA), ATP, substance P, CGRP, VIP, CCK, somastostatin, neuropeptide Y 등 많은 신경흥분 전달물질 및 조절 물질들이 함유되어 있어, 척추에서의 synapse과정에 관여할 뿐 아니라 특히 substance P 나 CGRP의 경우 말초가지를 따라 이동하여 말초에서 nociceptor의 감각이나 통각과민, 신경성 부종 등을 일으킨다고 보고되고 있다. 척수 후근을 통하여 올라가는 구심성섬유는 척수에 가까이 가면서 통각섬유는 척수 후각의 lamina I, II 및 reticular area에 분포한다. 이때 Aδ fiber는 주로 lamina I에, 척수 후근 신경전세포에서 일부 C fiber는 척수후근을 통해 lamina II의 바깥층에 분포하여 synapse를 이루며, 척수 후근 신경전세포에 있는 나머지 C fiber는 전근을 통해 척수로 들어가 척수 회백질을 거쳐 올라간 다음, 후근의 외측분지를 통해 들어온 C fiber와 같은 층에 분포하게 된다. 유해자극에 대해서만 반응하는 nociceptive specific 신경세포는 척수후각에서 존재하는데, 그 종류로는 말초수용영역에 가한 기계적 자극에 대한 역치가 높은 high threshold (HT) 세포로 감수영역이 좁아 자극부위에 대한 정보를 주며, 감수영역에 가한 기계적 자극에 대한 역치가 낮거나 강도가 커짐에 따라 흥분빈도가 증가하고 마침내는 유해한 정도의 자극에 대하여 가장 강한 반응을 나타내는 WDR 신경세포로 자극의 강도에 대한 정보를 전달하고, 낮은 강도의 기계적 자극에만 반응하는 low threshold (LT)

세포가 있다. 척수후각에서 처리된 정보들은 척수반사의 형태로 운동신경에 전달되거나 혹은 투사세포에 전달되어 상부중추로 상행한다. 그 대표적인 것이 척수시상로 (spinothalamic track, STT)와 척수망상체로 (spinoreticular track, SRT)로서 STT는 lamina I, II 및 IV,VI에 주로 분포하며, STT 세포의 축삭은 반대편 전외측속을 통하여 視床과 nucleus ventralis posterolateralis로 상행한다. 뇌간은 각종 구심성 정보 및 원심성 정보가 경유하는 통로일 뿐 아니라 의식수준을 결정하고 감정-정서활동의 중개역이자 여러 자율신경활동의 중추부위로 periaqueductal grey와 intralaminar nuclei이 중요한 역할을 하고 있다. periaqueductal grey는 STT의 일부가 결가지와 연결되어 고속핵 (nucleus raphe magnus)을 통해 척수로 연결되는 내재진통계에 있어서 핵심역할을 담당하는 곳이다. 또한 intralaminar nuclei은 SRT로부터 중계된 신호를 받아 대뇌피질에 고르게 투사하게 된다.

본 실험에서 사용된 formalin 주입을 통한 痛症 유발 모델은 이미 광범위하게 연구되어져 왔다. Formalin을 피하에 주입하면, 1차 통증반응과 2차 통증반응이 formalin 주입후 1시간내에서 나타나며^{2,25)}, 이러한 통증반응은 전기생리학적 세포의 단일기록법을 이용한 실험에서 척수 후근에 존재하는 WDR 신경세포들의 자발활동성을 관찰한 경우에서도 같은 양상으로 변화가 관찰되면서 통증반응들이 이들 신경세포의 흥분성의 변화에 기인하는 것으로 사료되고 있다²⁶⁾. 특히 1차 통증반응은 formalin이 皮下에 위치한 통증감각 수용체들의 직접적인 자극에 의하여 Aδ와 C 감각신경섬유들이 흥분되고 이러한 흥분이 단일 및 다차원 신경연접을 경유하여 척수 회백질의 표층부에 존재하는 WDR 신경세포들의 자발활동성을 직접적으로 증가시킴으로써 나타난다고 제시하고 있다²⁾. 그리고 2차 지연성 통증은 1차 통증반응과 관련된 감각신경의 흥분에 의해 척수 및 뇌의 중추신경계 신경세포들에서 흥분성의 민감도가 변화함으로써 자발활동성의 증가가 20분에서 2시간까지 지속되는 신경가소성에 의하여 이루어진다고 보고되었다²⁷⁾. 중추신경계 신경세포들의 축진과정은 척수 후

근 신경세포들에서 통각 수용영역의 확장, 흥분 역치의 감소에 따른 흥분성의 증가로 사료되고 있다. 한편 2차 지속성 痛症반응은 피하조직의 염증반응의 결과로 간주되었으며, 이러한 염증반응의 소견으로 대식세포의 탈과립, 조직부종, 과립백혈구 침투 등이 formalin주입 후 관찰되었다²⁸⁾.

鍼刺鎮痛에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 다양한 연구내용이 보고되고 있다. 2-4 Hz의 주파수로 자극할 경우 나타나는 진통효과가 자극개시후 20-30분이 경과하고서 발현된다든지, 자극이 종료된 후에도 장시간에 걸쳐서 효과가 지속하는 사실을 통한 中樞를 중개로 하는 체액성인자의 관점이다. 저주파와 고주파 電鍼에 의해 유도된 진통효과에 대한 차이를 연구한 결과에서 2 Hz에 의한 電鍼은 prepro-enkephalin mRNA의 활성을 유도하였고, 100 Hz에 의한 電鍼은 preprodynorphin mRNA의 활성을 선택적으로 유도하였다고 보고되었다²⁹⁾. 특히 Mayer 등³⁰⁾은 습곡 (L14)에 電鍼을 할 경우 疼痛域値가 상승하지만, 이러한 진통작용이 naloxone을 주입하면 길항된다는 것을 보고한 이래로 鍼鎮痛에 endorphin이 관여한다는 사실이 인정되었다. 그 뒤 침자극에 의해 뇌척수액중의 endorphin이 증가한다는 연구결과들이 보고되어 왔다³¹⁾. 최근의 연구 결과들을 살펴보면, 鍼鎮痛이 하행성 억제체계에도 관여하고 있음을 밝히고 있다. 특히 침진통을 발생시키는 經穴의 특징을 조사한 결과에서 經穴下 근육을 저주파로 자극한 진통효과가 hypophysectomy와 제3뇌실에 대한 β-endorphin의 antiserum 주입을 통해 진통효과를 억제할 수 있는 것을 발견하였고, 經穴에서 뇌하수체로 가는 전도로 속에 D-PAG로부터 anterior hypothalamus로의 전도도가 존재한다고 보고하였다. 그리고, raphe-spinal 신경세포가 nucleus raphe magnus에 존재함이 확인되었는데, raphe-spinal 신경세포의 가장 큰 특징은 비유해성 자극 (brush hair, lightly pressing the skin)에는 명확하게 반응하지 않는 반면, 유해성자극 (pricking or clamping)에는 흥분성이 증가하거나 감소하는 반응을 한다는 것이다. 유해성자극에 반응하는 raphe-spinal 신경세포의 말초수

용야는 몸 전체에 거의 넓게 분포하고 있어, 電鍼刺戟에 의하여 흥분성 raphe-spinal 신경세포의 활동성이 증가되기 때문에 그들의 유해성반응을 억제한다는 것이다. 또한 배외측축을 절제한 후, raphe-spinal 신경세포는 電鍼刺戟에 의해 흥분되나, 유해성 반응에 대한 EA의 post-inhibitory 효과는 객관적으로 감소되었다. 이러한 점은 電鍼刺戟이 痛症을 조절하는 되먹임회로를 중계하며 하행성 억제를 통해 진통을 유도하는 고속핵을 흥분시킬 수 있다는 것을 가정할 수 있는 것이다³²⁾. 그밖의 연구결과에서도, Takeshige 等³³⁾은 經穴에 가한 저주파자극이 serotonin 중계로와 noradrenergic 중계로로 나누어지는 하행성 억제계에 작용하여 진통작용을 형성함을 밝혔으며, 經穴과 중추성 기전을 연구하여 시상하부가 관련되어 있음을 제시하였다. Jiang³⁴⁾은 somatosensory area II가 NRM의 痛症에 대한 하행성 억제작용에 관련되어 있어, 이 부위를 자극하면 진통효과를 얻을 수 있고, 足三里(ST36)에 가한 전침자극 역시 somatosensory area II와 같은 작용을 하고 있음이 보고되었다. 이러한 유사한 효과는 足三里에 가한 전침자극이 하행성 통증억제기전에 작용하고 있는 somatosensory area II의 활성을 촉진한다라는 가능성을 보여주고 있는 것이다. 또한 전침자극에 의한 진통효과가 naloxone에 의하여 차단된다는 Mayer의 주장과는 상반되는 의견으로 Watkins 등과 Polmeranz 등은 EA를 시술하기 전에 opiate 길항제인 naloxone을 주입하면 진통효과가 억제되는 반면 EA를 시술한 후에 naltrexone을 주입하면 진통효과가 차단되지 않는다는 연구결과를 발표하였다³⁵⁻³⁶⁾. 그리하여 침진통의 효과가 일부에서만 내재진통계를 이용하고 다른 나머지는 아직 밝혀지 못한 진통계에 의해 발휘된다는 것이다³⁷⁾.

本實驗에서 痛症調節을 위하여 應用한 刺鍼方法으로 巨刺法은 健側에 자침하는 방법으로 “素問. 調經論”과 “素問. 繆刺論”에서 언급되기 시작하였으며, “鍼灸大成”¹⁶⁾에서 “巨刺者經脈, 繆刺者絡脈, 所以別也. 岐伯曰 痛在於左而右脈病者 則巨刺之. 邪客於經左盛則右病 右盛則左病 亦有移易者 左痛未已 以右脈先病 如此者 必巨刺之 必中其經 非絡脈也.”라고 설

명하였다. 이는 痛症이나 表部에 존재하는 질병치료에 있어 患部를 기준으로 人體를 左右로 나누어 健側에 대하여 刺鍼하는 것이다. 이러한 刺鍼方法과 함께 接經取穴法 역시 疾病處와 遠位部位를 刺鍼治療하는 방법으로 鍼灸經緯에서 詳述하고 있는 取穴方法이며, 繆刺法과 巨刺法이 내포된 자침방법이다.

本實驗에서는 5% formalin을 정상 흰쥐의 下肢 足底部位 皮下에 주입하였을 때 나타나는 行動反應, c-Fos 蛋白質의 變化를 관찰하고 電鍼刺戟을 遠位部位에 시술하였을 때 鎮痛效果를 확인하고자 하였다. 그 결과 formalin 주입 직후부터 5분 사이에 1차 痛症반응이 출현하였으며, 이후 formalin 주입후 15분까지 감소한 후, 2차 痛症반응은 formalin 주입후 20분부터 나타나기 시작하여, 30 - 40분에 크게 증가하였으며, 이후 점차 痛症수치가 감소하였다. Formalin 주입으로 유발된 痛症반응에 대한 電鍼刺戟을 시술하면서, 痛症행동을 formalin 주입 직후부터 관찰한 결과에서는 제 1차 痛症반응과 제 2차 痛症반응이 formalin 주입군에 비하여 유의하게 억제되었다.

Formalin 주입후 시간의 경과에 따른 요척수 후근 회백질에서 c-Fos 단백질의 발현양상과 電鍼刺戟에 따른 효과를 관찰하기 위하여 formalin 주입전, 주입후 2시간과 4시간에 제 3 - 5번 요척수에서 c-Fos 양성세포를 분석한 결과 표층에서의 c-Fos 양성세포는 formalin 주입 전에 비하여 formalin 주입 2시간후에 크게 증가하였고, 4시간후에는 점차 감소하였으나 주입전에 비하여 크게 증가하였다. 심층에서는 formalin 주입전에는 거의 c-Fos 양성세포가 나타나지 않았으나, formalin 주입 2시간후에 크게 증가하였고, 4시간 후에는 108.4 ± 6.6 개로 지속적인 증가를 보였다. Formalin 주입 직후부터 30분간 健側上肢 部位의 神門과 大陵에 대한 電鍼刺戟을 시행한 후 c-Fos 양성세포의 발현양상을 관찰한 결과, 표층에서는 formalin 주입 4시간후 까지 formalin 주입군에 비하여 유의한 수준에서의 c-Fos 발현을 억제하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 심층부위에서의 cFos 양성세포의 발현은 2시간과 4시간 후에 발현양상이 증가하는 경향을 보였으나 발현된 세포수는 유의

하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

이상의 연구결과에서 遠位部位에 가한 電鍼刺戟이 척수수준에서의 통증반응에 관련하고 있는 c-Fos 단백질 발현을 억제하고 있음을 확인할 수 있으며, 이는 formalin 주입에 의하여 유발된 통증반응 현상을 電鍼刺戟으로 억제한다는 것을 뒷받침하는 것이라 볼 수 있다.

결론

本 研究에서는 繆刺論에 근거한 電鍼刺戟이 formalin 皮下投與에 의한 행동학적 痛症반응과 척수의 c-Fos 단백질의 발현양상에 미치는 效果를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 5% formalin을 정상 흰쥐의 하지 족저부위 피하에 주입하였을 때, 주입직후부터 5분 사이에 제 1차 痛症반응이 출현하였으며, 이후 formalin 주입 15분까지 감소하고, 제 2차 痛症반응은 formalin 주입 20분부터 나타나기 시작하여 30 - 40분에 크게 증가한 후 점차 감소하였다.

2. 電鍼刺戟은 formalin 주입으로 유발된 제 1차 痛症반응과 제 2차 痛症반응에서 formalin 주입군에 비하여 유의하게 억제하였다.

3. c-Fos 양성세포는 척수 표층에서 formalin 주입 전 6.2 ± 2 개 였으나 formalin 주입 2시간후 141.4 ± 9.48 개로 증가하였고, 4시간후에는 83 ± 6.88 개로 감소하였다. 심층에서 formalin 주입전 3.9 ± 1.14 개였으나, formalin 주입 2시간후 97.2 ± 6.09 개, 4시간 후에 108.4 ± 6.6 개로 유의한 증가를 보였다

以上の 研究結果를 종합하면 末梢 求心性 感覺神經纖維의 刺戟에 의하여 유발된 痛症반응이 電鍼刺戟에 의하여 억제되었으며, 특히 巨刺法에 根據한 遠位部位의 刺戟이 鎮痛作用에 有效한 效果를 가지고 있으며, 電鍼刺戟에 의한 痛症調節에 있어서 척수수준에서의 억제가 관련되어 있음을 확인하였다.

Acknowledgments : 본 연구는 한국과학재단 목적 기초연구(R02-2001-00452)지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. 郭靄春 編著. 黃帝內經 素問校注語譯. 서울·醫聖堂. 1993:29-43.
2. Dubuisson D, Dennis SD. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphins, meperidine and brain stem stimulation in rats and cat. Pain. 1977;4:161-174.
3. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain. 1987;30:103-114.
4. Heapy CC, Jamieson A, Russell NJW. Afferent c-fiber and A delta activity in models of inflammation. Br. J. Pharmacol. 1987;90:164-171.
5. McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in c-fibers in the rat. Neuroscience Letters. 1996;208:45-48.
- 6) Skilling SR, Smullin DH, Beitz AJ, Larson AA. Extracellular amino acid concentration in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. J. Neurochem. 1988;51:127-132.
7. Kuraishi D, Hirota N, Sato Y, Hanashima N, Takagi H, Satoh M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. Neuroscience. 1989;30:241-250.
8. Haley JE, Kickenson AH, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. Neuropharmacology. 1992;33:251-258.
9. Aloisi AM, Albonetti ME, Muscettola M, Facchinetti F, Tanganeli C, Carli G. Effect of formalin-induced pain on ACTH beta-endorphin, corticosterone and interleukin-6 plasma levels in rat. Neuroendocrinology. 1995;62:13-18.

10. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-Fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. 1987;328:632-634.
11. Abbadie C, Besson JM. c-Fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience*. 1992;48:985-993.
12. Bullitt E. Expression of c-Fos like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J.comp. Neurol*. 1990;296:517-530.
13. Herdegen T., Kovary K., Leah J. and Bravo R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J. comp. Neurol*. 1991;313:178-191.
14. Naranjo JR, Mellström B, Achaval M, Sassone-Corsi P. Molecular pathways of pain; fos / jun-mediated activation of a non-canonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron*. 1991;6:607-617.
15. Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory controls: correlation of nociceptive behaviour and c-fos expression. *Neuroscience*. 1991;42:617-628.
16. 楊繼洲著. 鍼灸大成校釋. 서울:醫聖堂. 1993:90.
17. Watson GS, Sufka KJ,Coderre TJ. Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain*. 1997;70(1):53-58.
18. 郭靄春 編著. 黃帝內經 靈樞校注語譯. 서울:醫聖堂. 1993:1-13,330-343.
19. 唐湘清 編著. 難經今釋. 國立編譯館出版, 正中書局. 1983: 105.
20. 備急千金要方. 欽定四庫全書. 서울:大星文化社. 子部五 醫家類 (3) : 1939.
21. 민병일, 김덕곤 역. 동양의학의 과학적접근과 임상. 서울:서원당. 1993:17,163-205.
22. Thomas Lundberg. Pain physiology and principles of treatment. *Scand J Rehab. Suppl*. 1995;32:13-42.
23. 대한통증학회 저. 통증의학 2판. 서울: 군자출판사. 2000:1-662.
24. 성호경, 김기환. 생리학 6판. 서울: 의학문화사. 1996:553-558.
25. Coderre TJ, Melzack R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci*. 1992;12:3671-3575.
26. Dickenson AH, Sullivan AF. Evidence for role of the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. *Neurosci Lett*. 1991;121:263-266.
27. Yu XM, Sessle BJ, Hu JW. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. *J. Neurophysio*. 1993;70:1704-1707.
28. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*. 1990;42:235-242.
29. Guo HF, Tian JH, Wang XM, Fang Y, Hou YP, Han JS. Brain substrates activated by electroacupuncture of different frequencies (|): Comparative study on the expression of oncogene c-fos and genes coding for three opioid peptides. *Molecular Brain Research*. 1996;43: 157-166.
30. Mayer DJ, Liebeskind JC. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: An anatomical and behavioral analysis. *Brain Research*. 1974;68:73-93.
31. He LF, Lu RL, Zhuang SY, et al. Possible involvement of opioid peptides of caudate nucleus in acupuncture analgesia. *Pain*. 1985;23:83-93.
32. Liu X, Zhu Bing, Zhang SX. Relationship between Electroacupuncture Analgesia and Descending Pain inhibitory mechanism of Nucleus Raphe Magnus. *Pain*. 1986;24:383-396.
33. Takeshige C, Oka K, Mizuno T, et al. The acupuncture point and its connecting central pathway for producing acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull*. 1993;30(1-2):53-67.

34. Jiang M, Liu X. The control of somatosensory area II on the descending inhibitory pain activity of nucleus raphe magnus. *Chen Tzu Yen Chiu.* 1993;18(1):33-6.
35. Watkins LR, Mayer DJ. Organization of endogenous opiate and non-opiate pain control system. *Science.* 1982;216:1185-1192.
36. Bruce Pomeranz, Lazo Bibic. Electroacupuncture suppresses a nociceptive reflex: naltrexone prevents but dose not reverse this effect. *Brain Research.* 1988;452:227-231.
37. Chapman CR, Benedetti C, Colpitts YH, Gerlach R. Naloxone fails to reverse pain thresholds elevated by acupuncture: acupuncture analgesia reconsidered. *Pain.* 1983;16:13-31.