

근타박상시 치료용 초음파가 Substance-P 발현에 미치는 효과에 대한 면역조직화학적 연구

An Immunohistochemical Study of Effects of Therapeutic Ultrasound on the Expression of Substance-P in Muscle Contusion Injury

신성대학 물리치료과
김용수
대구대학교대학원 재활과학과 물리치료전공
김석범
대구대학교 물리치료학과
김진상, 박래준

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of therapeutic ultrasound after muscle contusion injury by observed immunoreactivity of substance-P that plays an important role in pain transmission. Ultrasound irradiation(1MHz, 1W/cm², continuous mode, treatment time 5 min) was applied through water submersion technique to 1 limb daily by kept off 5cm from muscle belly of gastrocnemius.

The result of this study were as follows.

1. The substance-P was expressed in lamina I and II of dorsal horn of spinal cord, also in lamina IV and around of central canal of spinal cord. Experimental group was lower expressed than control group with the exception of 1 days.

2. The substance-P immunoreactivity was decreased for 5 days together in lumbar and sacral region of all groups, expecially experimental group was rapidly.

These data suggest therapeutic ultrasound may stimulate pain relief by diminish of substance-P in dorsal horn of spinal cord.

I. 서 론

초음파는 진동 주파수가 17kHz~20kHz 이상으로 높아서 인간의 귀로는 들을 수 없는 불가청 진동음파(unacoustic vibration)를 말한다(Gam과 Johannsen, 1995; Starkey, 1999). 임상에서 사용되어지고 있는 초음파는 진단용과 치료용으로 나눌 수 있다. 진단용 초음파(diagnostic ultrasound)는 3~5 MHz 범위의 주파수로 매우 낮은 강도(1~50mW/cm²)를 사용하기 때문에 조직내에서 열이 발생하지 않는다. 치료용 초음파에는 매우 낮은 주파수(20~60 kHz)와 매우 높은 강도(8 W/cm² 이상)(Reher 등, 1998; cf - 문헌에 따라 ter Haar(1999)는 5 w/cm² 이상이라고 하였음)를 사용하여 중앙조직의 파괴와 같이 주로 조직을 파괴하여 치료효과를 얻는 파괴용 초음파(disruptive ultrasound) 또는 고강도 초음파(high intensity ultrasound)와 주로 물리치료 분야에서 널리 사용되어지고 있는 것으로 주파수가 0.75~3 MHz이고 적용 강도가 0.125~3 W/cm²인 저강도 초음파(low intensity

ultrasound)로 나눌 수 있다(이재형, 1995; 최민주, 2000; Starkey, 1999; ter Haar, 1999). 이러한 초음파의 치료적용시 탈개스물(boiled degassed water), 미네랄 오일 및 특수하게 고안된 매개물질(coupling media)을 이용하여 음파가 조직내로 충분히 전달될 수 있도록 한다(Scully와 Barnes, 1989). 저강도 초음파는 손상 후 정상적인 생리화학적 반응들을 촉진시키거나, 또는 음파영동(phonophoresis) 즉, 약물이 조직내로 도입되는 과정을 가속화시킨다(이재형, 1995; ter Haar, 1999).

지금까지 연구되어져 온 저강도 초음파의 효과에는 조직의 재생 촉진(Dyson, 1997), 다양한 레이의 치유 촉진(Nussbaum 등, 1994), 관절연골세포의 분화와 증식 향상(성진형 등, 1999), 골성장 촉진(Harle 등, 2001; Tanzer 등, 2001), 아킬레스 건의 치유 촉진(Cunha 등, 2001), 말초신경의 회복촉진(Paik 등, 2002), 석회성 건염의 치유촉진(Ebenbichler 등, 1999) 관절염 치유촉진(Huang 등, 1999), 만성 허혈성 근육내의 혈류 증진(Fabrizio 등, 1996), 혈관신생 촉진(Young과 Dyson, 1990), 통증 감소(Esenyel 등, 2000; Hasson 등, 1990; Uhlemann, 1993) 등이 있다.

본 연구에서는 지금까지 연구되어진 다양한 초음파의 치료효과 중 저강도 초음파 적용이 골격근 손상 후 통증에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 연구하고자 한다.

골격근 손상에는 근열상, 근타박상, 근좌상 등 여러 가지가 있는데(Kami 등, 1999), 이 중 근타박상은 사지에 직접적으로 타격이 가해졌을 때 보여지는 근육손상 중 가장 빈번하게 발생하는 형태이다. 근타박상의 증상은 종창, 구축, 압통(tenderness), 통증, 기능적·구조적 손실 등 비특이적으로 나타나고, 현미경적 수준에서는 근섬유와 모세혈관 파열, 혈액 침착, 혈종 형성, 손상받은 근섬유 주변에 공간형성, 부종 등이 관찰된다(Beiner와 Jokl, 2001).

이전 연구에서 골격근 손상부위에 저강도 초음파 적용은 통증과 부종감소, 관절가동범위 증진에 효과가 있다고 하였고(Bryant와 Milne, 1998; Falconer 등, 1990; Windt, 1999),

특히, 초음파에 의한 통증감소 효과에 대한 연구들에 있어서는 초음파 치료가 통증감소에 효과가 없거나(Brosseau 등, 2001; Craig 등, 1999; Crawford와 Snaith, 1996) 또는 관련이 없다는 연구들(Crawford 등, 2001) 및 통증을 증가시킨다는 연구들도 보고되고 있다(Gnatz, 1989). 그리고 지금까지 실시되어 온 통증감소효과에 대한 측정방법에 있어 대부분 visual analogue scale(Craig 등, 1999), linear analogue scale(Crawford와 Snaith, 1996), McGill pain question(Craig 등, 1999)과 같은 환자의 느낌변화를 평가하는 주관적 측정 방법 및 통증장애지표(pain disability index), 행동평가법(behavioral assessment)과 같이 통증으로 인한 기능의 제한을 평가하는 방법이 이용되었다(이청기와 한수정, 1998). 동물실험에서 통증을 측정하는 방법은 일반적으로 꼬리회피반사, 핫 플레이트(hot plate) 검사와 같은 행동학적 방법과(방문석 등, 1996; 이원택 등, 1999), 신경전도속도를 측정하는 전기생리화학적 방법이 많이 이용되어 왔다(Walsh 등, 1998). 그러나 최근에 와서는 종양유전자인 c-fos, substance-P, calcitonin gene-related peptide(CGRP), brain-derived neurotrophic factor(BDNF) 등을 면역조직화학법으로 관찰하는 방법이 개발되어 현재 널리 사용되고 있다(백수정, 2001; 이미애, 2001; 이원택 등, 1999, Millan, 1999; Pezet 등, 2002; Yajima 등, 2002).

이 중 substance-P는 척수내에 통각을 조절하는 것으로 추측되는 구조인 아교질(substantia gelatinosa)에 많이 분포하고(de Lanerolle과 LaMotte, 1983), 생리화적으로 통각 전달에 관여하는 가장 강력한 물질로 보고되고 있다(Besson과 Chaouch, 1987).

이에 본 연구에서는 골격근 손상 유발 후 치료용 초음파가 골격근 재생과정을 촉진시키는

지에 대하여 근섬유의 형태학적인 변화를 광학현미경하에서 살펴보고, 또한 치료용 초음파에 의해서 혈관내피성장인자와 substance-P가 시간의 경과에 따라 어떻게 변화하는지에 대하여 면역조직화학법을 이용하여 연구하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서 사용한 실험동물은 동일한 조건하에서 사육된 생후 8-10주, 체중 250-300g의 성숙한 Spague-Dawley계 흰쥐를 성별 구분없이 25마리를 사용했다. 실험동물은 초음파를 적용하는 실험군과 초음파를 적용하지 않는 대조군으로 나누어 실시하였으며, 요수분질 내 Substance-P의 발현을 관찰하기 위한 실험군과 대조군은 손상 후 1일, 2일, 3일, 5일군으로 나누어 실험하였다. 실험기간 중 물과 먹이는 무제한 공급하였고, 사육실의 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 2\%$ 로 최적의 상태를 유지하였으며, 사육장의 광주기와 암주기는 각각 12시간으로 조절하였다.

2. 근타박상 유발

장딴지근에 근타박상을 유발하기 위하여, 염산케타민(Ketamine HCL, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(바이엘 코리아)를 1:1 비율로 섞은 후 복강내 주사하여(2ml/kg) 전신마취를 시킨상태에서 오른쪽 하지의 후면부를 삭모하였다. 그리고 나서 슬관절 신전, 족관절 90도 굴곡상태로 유지시킨 상태에서, 장딴지근의 근건부에서 무릎방향으로 1~1.2cm 윗부분을 표시한 후, 표시한 지점이 중앙에 오도록 조절하면서 100cm 높이의 원통형 관을 위치시켰다. 이 상태에서 31.4g의 쇠구슬을 낙하시켜서 장딴지근에 근타박상을 유발시켰다.

3. 초음파 적용

초음파(SONOTENS 501, DAEYANG MEDICAL, Korea) 조사는 실험군에서 손상 1일 후부터 실시하였는데, 연속 모드(continuous mode)로 파장 1 MHz, 강도 1 W/cm^2 를 이용하여 도자(지름: 3cm)의 헤드를 장딴지근의 근복에서부터 0.5cm 이격하여, 수온을 25°C 로 일정하게 유지시키면서 5분동안 1일 1회 적용하였다. 이때 실험동물은 전신마취를 실시하였고, 최소한의 부분만 수중에 담게 하면서 일정한 자세를 유지시키기 위하여 실험실에서 직접 제작한 플라스틱 고정틀을 사용하였다. 초음파를 적용하는 동안 대조군 또한 마취를 시켜줌으로써 실험군과 최대한 동일한 조건을 주었다. 초음파 조사 후에는 체온이 하강되는 것을 방지하기 위하여 마른 수건을 이용하여 수분을 제거하였다. 초음파의 수중치료시 사용한 물은 삼차증류수를 이용하여 탈가스수(boiled degassed water)를 만들어 사용하였다.

조직채취를 위하여 초음파 조사 후 1시간 경과 후에 전신마취를 시켜 0.9% NaCl을 이용하여 심장관류를 하였고, 조직의 전고정을 위하여 4% paraformaldehyde 또한 심장관류시켰다. 골격자를 이용하여 척수의 요수부와 천수부를 적출하였다. 적출된 조직들은 다시 고정액(4% paraformaldehyde)에 넣어 24시간동안 후고정을 실시하였다.

4. 조직절편 제작

후고정된 척수의 요수 및 천수분절 조직은 극저온 냉동기(Frigiomobil, Leica, Germany)를 이용하여 영하 40℃로 냉동한 상태에서 미세절단기(LEICA SM2000R, Leica, Germany)를 이용하여 25 μ m로 잘라 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 처리하였다.

5. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

Substance-P의 면역조직화학반응을 관찰하기 위하여 0.1M PBS(pH 7.4)에 처리된 조직을 1:500으로 희석된(희석용액: 0.1M PBS, 0.003% Triton X-100, 0.02% Normal donkey serum) rabbit anti-Substance P antibody(Peninsular Lab., California, USA) 500 μ l에 담귀 24시간 동안 4℃에서 냉장보관하였다. 2차 항체는 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Lab., USA)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 3차 항체는 Vectastatin Elite ABC Regent(Vector Lab., USA)로 2차 항체와 마찬가지로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 각각의 과정 사이에 0.1M PBS로 10분씩 3회 수세하였으며, 3차 항체까지 처리된 조직들은 DAB 용액(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in Tris-HCl buffer)으로 발색시켰으며, 발색정도를 광학현미경으로 관찰하면서 적당한 반응시간을 선택하였다. 발색된 조직은 0.1M PBS와 3차 증류수로 세척한 후 슬라이드에 올렸고, 슬라이드에 올려진 조직들은 실온에서 말린 후 탈수과정과 청명과정을 거친 후 커버슬라이드를 이용하여 영구봉입하였다.

7. 자료처리

시간경과에 따른 근육의 형태학적인 관찰은 광학현미경(OLYMPUS BX50, Japan)을 사용하여 관찰하였고, 면역반응을 보인 Substance-P의 면적측정은 Image-Pro Plus win 4.0 β 프로그램을 이용하여 측정하였으며, 측정된 자료는 실험군과 대조군 사이의 차이를 비교하기 위하여 SPSS for win 10.0을 이용하여 일원배치분산분석을 실시하였으며, 유의수준 α 는 95%로 하였다.

III. 결 과

1. 시간경과에 따른 substance-P의 면역반응

면역반응을 보인 Substance-P의 요수 및 천수분절내 분포는 실험군과 대조군에 공통적으로 척수후각의 lamina I, II에서 강한 면역반응을 관찰할 수 있었고, 실험군과 대조군의 경우 요수분절과 천수분절 모두에서 시간경과에 따라 계속적으로 척수후각에서의 면역반응이 약화되어져 가는 것을 알 수 있었다(Tabel 1, Fig. 1). 실험군의 경우는 대조군과 비교하였을 때 시간경과에 따른 substance-P의 감소가 더 빨리 이루어졌다(Fig. 1). 특히 일부에서는 lamina IV와 중심관 주변에서도 substance-P의 면역반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 4, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12, Fig. 14, Fig. 18, Fig. 19). 그리고 손상 후 5일째에서는 실험군과 대조군의 요수분절과 천수분절에서의 substance-P의 발현이 거의 사라짐을 관찰

할 수 있었다(Fig. 16, Fig. 17).

substance-P도 시간경과에 따른 면역반응 변화를 비교하기 위하여 Image-Pro Plus win 4.0β 프로그램을 이용하여 면역반응을 보인 혈관내피성장인자의 발현면적을 계산하여 비교하였는데, 실험군과 대조군 각각의 일원배치분산분석에서는 모두 유의한 변화를 보였으며 ($p < 0.05$)(Fig. 2, Fig. 3), 사후검정 결과 요수분절의 경우 실험군에서는 1일과 2일, 3일과 5일 사이에서 유의한 변화가 관찰되었고($p < 0.05$)(Fig. 2), 대조군에서는 모든 시간대에서 유의한 변화를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 3). 또한 천수분절의 경우 실험군에서는 1일과 2일사이에서 유의한 변화를 보였고($p < 0.05$)(Fig. 2), 대조군의 경우는 3일과 5일사이에서만 유의한 변화를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 3).

실험군과 대조군의 비교를 위한 각 시간대별 독립표본 T-검정 결과 요수분절의 경우 모든 시간대에서 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$)(Fig. 1, left), 천수분절의 경우는 2일, 3일, 5일에서 유의한 차이를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 1, right). 특히 요수분절과 천수분절의 1일군에서는 모두 실험군에서 substance-P의 발현이 더 높게 나타났다(Table 1, Fig. 1, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7).

Table 1. The change of substance-P expression area at 1, 2, 3, and 5 days.

unit : pixels

		1 day	2 days	3 days	5 days
Lumbar region	Exp.	660.2±27.32	87.4±3.50	79.4±2.40	51.4±6.18
	Cont.	517.6±3.36	460.2±11.75	306.6±5.31	137.2±9.39
Sacral region	Exp.	401.0±138.39	277.4±11.54	71.8±17.86	26.2±12.39
	Cont.	347.0±14.54	328.6±12.36	304.6±28.82	67.4±15.05

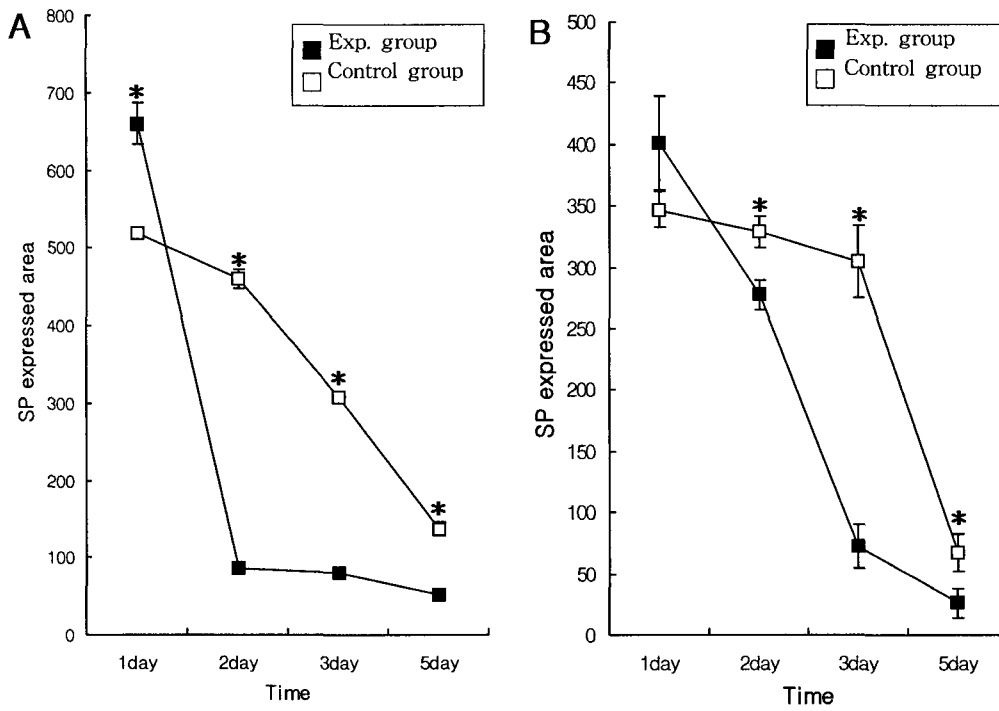


Fig. 1. The comparison with substance-P expression area between groups.
 A : lumbar region, B : sacral region, * : $p < 0.05$

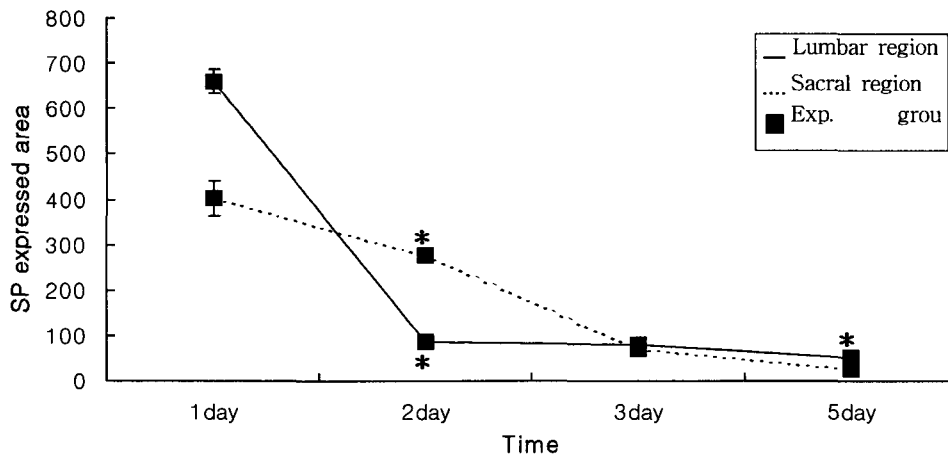


Fig. 2. The change of substance-P expression area in lumbar and sacral region of the experimental group. * : $p < 0.05$

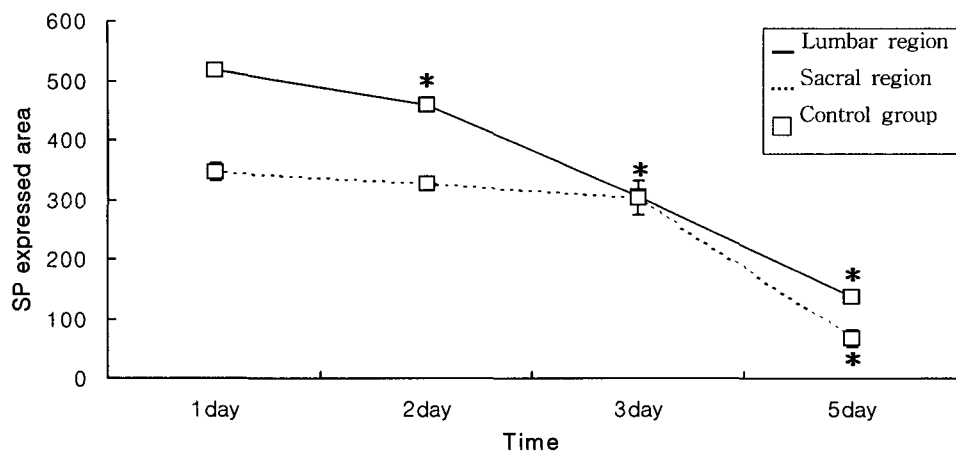
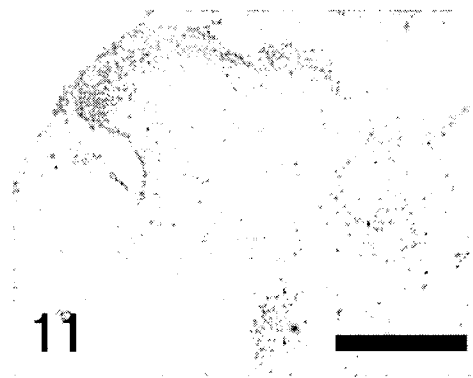
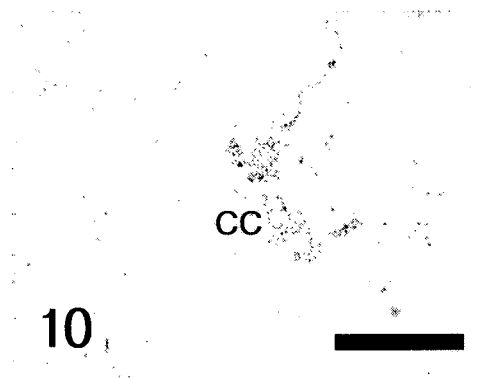
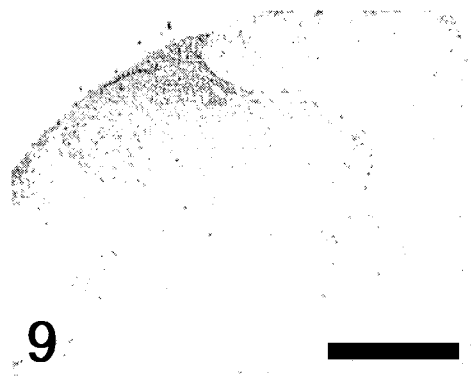
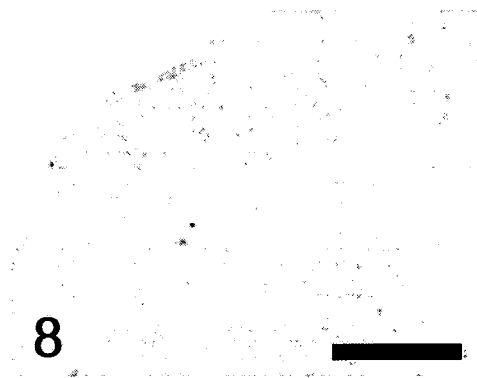
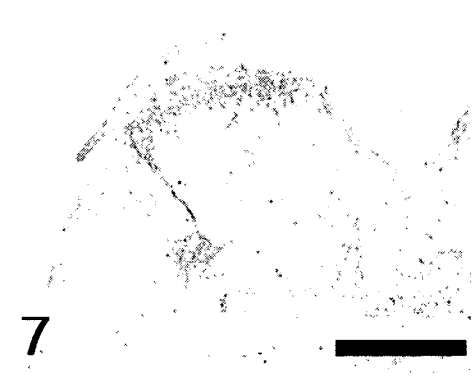
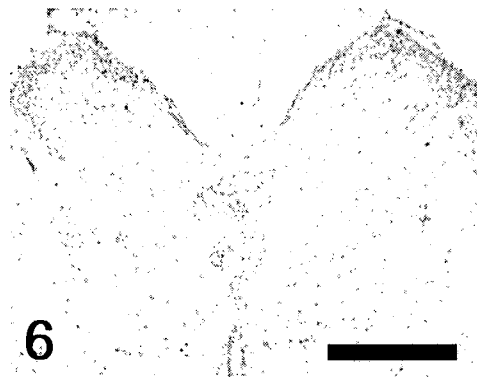
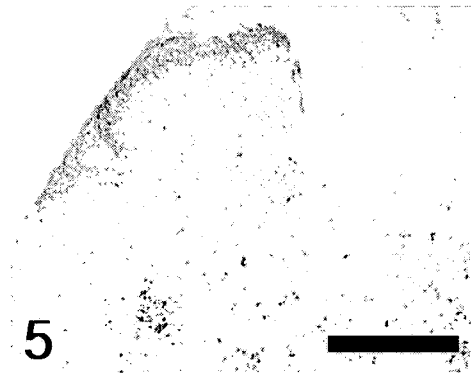
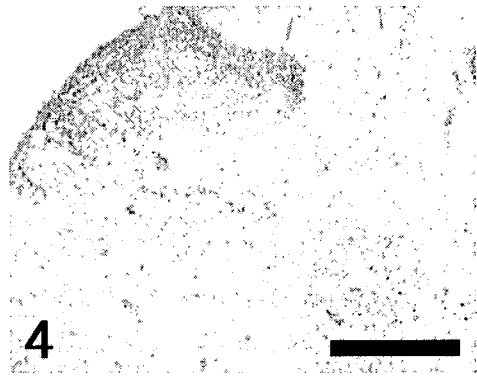


Fig. 3. The change of substance-P expression area in lumbar and sacral region of the control group. * : $p < 0.05$



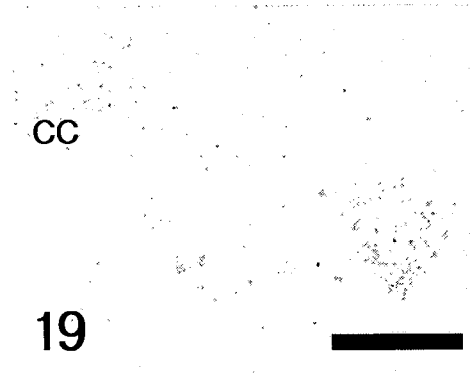
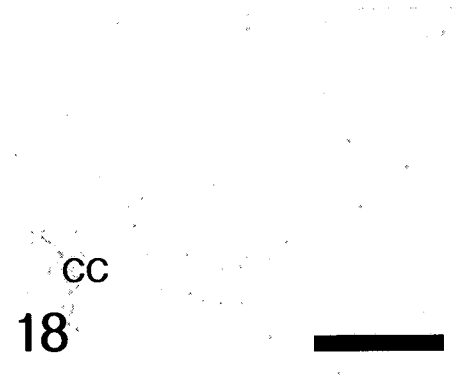
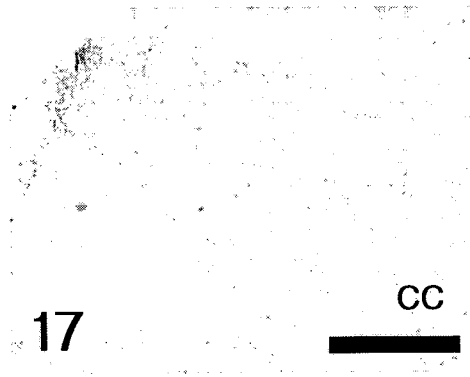
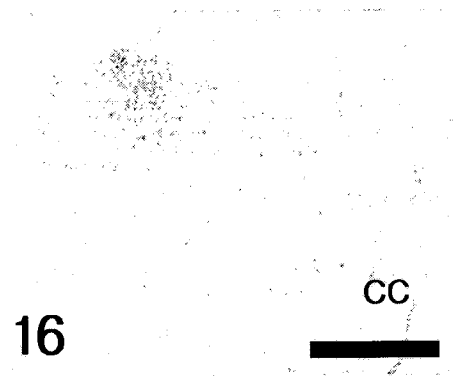
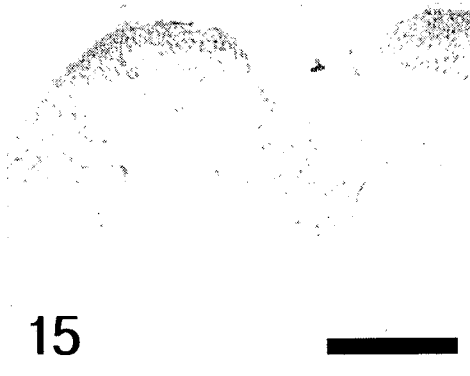
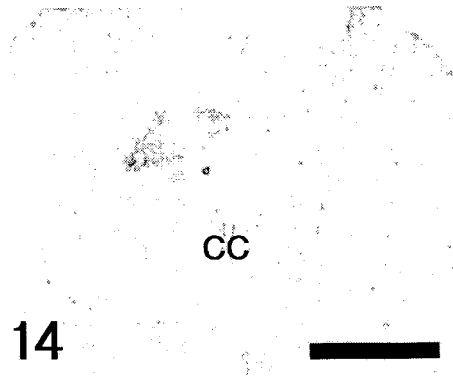
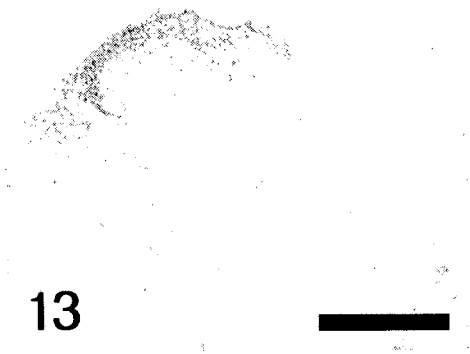
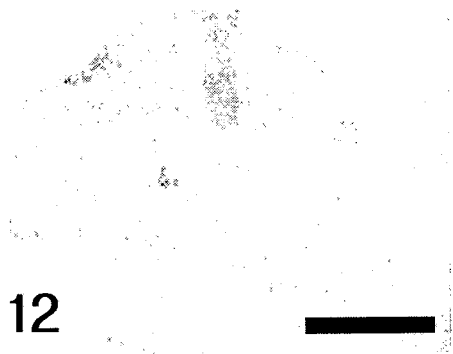


Fig. 4. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at days in lumbar region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 5. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 1 days in lumbar region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 6. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 1 days in sacral region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 7. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 1 days in sacral region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 8. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 2 days in lumbar region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 9. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 2 days in lumbar region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 10. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 2 days in sacral region of experimental group ($\times 40$ bar = $400\mu\text{m}$). CC = central canal of spinal cord

Fig. 11. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 2 days in sacral region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 12. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 3 days in lumbar region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 13. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 3 days in lumbar region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 14. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 3 days in sacral region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). CC = central canal of spinal cord

Fig. 15. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 3 days in sacral region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 16. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 5 days in lumbar region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 17. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 5 days in lumbar region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 18. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 1 days in lumbar region of experimental group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$).

Fig. 19. Immunoreactivity(dark brown color) with substance-P antibody at 5 days in lumbar region of control group ($\times 40$; bar = $400\mu\text{m}$). CC = central canal of spinal cord

IV. 고 찰

초음파는 사용방법이 간단하고 인체의 원하는 부위에 비교적 안전하게 적용시킬 수 있다는 장점 때문에 가장 많이 사용되고 있는 심부열치료 방법으로(김진호와 이청기, 1990), 비록 지금까지는 진단용 기구로서의 초음파의 임상적 가치가 상대적으로 매우 중요하게 인식되어져 오고 있지만, 최근에는 초음파에 의해서 유도되어지는 생리학적인 효과 즉, 조직의 파괴와 조직의 치유촉진 모두의 가능성을 지니고 있는 성질에 대한 관심 또한 증가하고 있다(Harle 등, 2001).

초음파에 의해서 유도되어지는 효과들은 초음파의 적용방법(연속모드 또는 맥동모드), 강도 및 주파수 등에 따라 다르게 나타난다. 본 실험에서는 둥근 모양의 헤드를 이용하여 연속모드로 1 MHz의 주파수와 $1W/cm^2$ 의 강도로 실시하였는데, Reher 등(1999)은 초음파 조사에 있어 연속모드의 사용이 맥동모드(pulsed mode)에 비하여 치료시간을 단축시킬 수 있다는 장점이 있고, 둥근 모양의 초음파 헤드는 더 크고 효과적인 치료부위를 제공해 준다고 하였다. 또한 수중치료에 있어 삼차증류수를 이용하여 탈게스수를 만들어 사용하였는데, Griffin(1980)은 증류수, 글리세린, 미네랄유의 3가지 매질의 초음파 전달능력에 대한 실험에서 초음파의 강도나 치료거리에 상관없이 증류수를 이용한 치료가 초음파의 전달능력이 가장 좋다고 하였다. 한테를과 신희석(1990)은 토기를 이용하여 $1.0W/cm^2$, $1.5W/cm^2$, $2.0W/cm^2$, $3.0W/cm^2$ 의 강도로 15분간 대퇴부위에 초음파(1 MHz)를 적용하면서 시간경과에 따른 피부, 피하조직, 1cm 깊이의 근육, 2~3cm의 근육에서의 온도변화를 thermister needle 을 이용하여 측정한 결과 $3W/cm^2$ 의 강도를 제외하고는 적용전과 적용후 15분까지 근육에서의 온도변화가 유의하게 일어나지 않음을 보고하였다. 그러므로, 본 실험에서 초기 3일 동안 대조군에 비하여 실험군에서 혈관내피성장인자의 발현이 더 높게 나타난 것은 단순한 온도상승에 의한 효과뿐만 아니라 초음파의 비열효과 또한 배제할 수 없는 원인임을 알 수 있다.

본 연구에서 관찰한 substance-P는 말의 뇌와 장에서 일시적 혈압강하 및 장수축인자로서 처음 발견되었는데(신재원 등, 1997), Gaddum과 Schild(1934)는 추출과정에서 얻어지는 것이 분말(powder)이라는 것에 착안하여 이 새로운 물질을 'substance-P'라고 명명하였다. Substance-P는 후근 신경절에서 생합성되는 11개의 아미노산으로 구성된 가장 널리 알려진 신경펩타이드로, 주로 중추 및 말초신경계에 분포하고(손인범과 이원수, 2001), 이외에도 여러 기관(타액선, 기관지, 이자, 신장, 방광, 전립선)에 널리 분포한다(김민경 등, 2000). Substance-P는 리보솜에서 합성된 후 과립에 저장되어 축삭이동에 의해서 일차감각신경원의 중추말단과 말초말단부위로 이동된다(Harmar와 Keen, 1982). 이러한 substance-P는 유해자극 또는 전기자극에 의해 일차 구심성 섬유인 C 섬유의 활성화가 일어난 후 C 섬유의 말단부위에서 발현된다(Carlton과 Coggeshall, 2002). 생체 내에서 substance-P의 면역반응은 중뇌(telencephalon), 대뇌기저핵, 해마, 편도핵, 간뇌(diencephalon), 시상하부, 중뇌(mesencephalon), 후뇌(metencephalon), 교뇌, 수뇌(myelencephalon) 및 척수, 후근신경절(dorsal root ganglia)에서 보여진다(Harrison과 Geppetti, 2001).

지금까지 밝혀진 substance-P의 생체내 기능에는 타액의 분비와 장의 운동 조절, 근육과 지방조직에서의 혈관 이완작용(김민경 등, 2000), 인슐린 분비의 억제(Adeghate 등, 2001) 역할 뿐만아니라, 비만세포의 탈과립(Columbo 등, 1996; Ebertz 등, 1987), 염증세포의 동원(Carlton과 Coggeshall, 2002), 신경성 염증(neurogenic inflammation)과 통증의 매개체

(Harrison과 Geppetti, 2001) 역할을 한다고 알려지고 있다. 이 중 염증반응 및 통증과 관련하여 이전 연구들을 살펴보면, Truab(1996)는 척수내로 substance-P를 주입하면 통증과 연관되는 것으로 알려진 자극에 대한 회피반응이 증가한다고 보고하였고, Neugebauer 등 (1994, 1995)은 염증을 유도한 후 substance-P 길항제를 척수 내로 주입하면 회피반응이 감소된다는 보고하였는데, 이러한 선행연구들은 substance-P와 이를 포함하는 신경섬유들이 통증 또는 염증에 수반되는 과통각반응(hyperalgesic response)과 이질통(allodynia)에 관여한다는 것을 추측할 수 있게 해 준다. 따라서 본 연구에서 초음파 적용 후 손상부위와 관련된 척수분절인 요수분절과 천수분절에서의 substance-P의 면역반응을 관찰함으로써 초음파가 통증의 변화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 과학적 증거가 가능하다고 사료된다.

본 연구에서의 substance-P에 대한 면역반응은 실험군과 대조군 모두에서 시간경과에 따라 계속적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 1일군에서는 나머지군과는 달리 실험군이 대조군에 비해서 substance-P의 발현이 더 많이 나타났는데, 이러한 현상은 손상 후 초음파의 적용시기와 관련 있다고 사료되어진다. 일반적으로 급성기에는 휴식, 얼음, 압박, 그리고 거상과 같은 치료가 일반적으로 이루어지고(Worrell, 1994), 이후에 물리치료가 적용되어 지는데, 본 실험의 결과에서 1일군에서만 초음파를 조사한 군이 더 많이 발현되는 것으로 보아 손상 1일 후에 초음파를 바로 적용하는 것은 일시적으로 초음파를 신체 내에서 통증감각으로 받아들이기 때문인 것으로 사료되어진다.

1일 후부터는 초음파를 조사한 실험군이 계속적으로 대조군에 비하여 낮은 발현을 보이고, 또한 발현부위가 대부분 척수후각의 Lamina I, II에 집중적으로 나타났는데, 이러한 발현부위는 substance-P의 면역양성반응을 나타내는 신경원이 일반적으로 척수의 Lamina I, II에 위치하기 때문이다(Aanonsen 등, 1992). 또한 일부에서는 중심관 주변과 laminal IV에서도 substance-P의 발현이 미약하게 관찰되었는데, 이러한 분포는 비유해성 일차구심성 섬유를 통해 척수후각으로 들어온 경우 Lamina II와 IV에 중지하는데, Lamina IV의 큰 세포들은 투사섬유(projection fiber, mediolateral band)를 내어 배쪽백색교차를 지나 시상에도달하게 되고(Carpenter, 1998; Partata 등, 2002)), 또한 배쪽백색교차를 지나기 전에는 여러 사이신경원에 의해서 통증정보가 전달된다. 이때 통증의 전달에 관여하는 것으로 알려진 사이신경원이 lamina IV~VI에 위치하는데(Bishop, 1980), 사이신경원에서의 주요한 통증전달물질인 GABA와 함께(Zou 등, 2002) substance-P 또한 사이신경원에서의 통증전달에 관여하는 것으로 사료되어진다. 또한 천수분절에서의 발현을 관찰하였는데, 이는 척수후각으로 들어온 통증정보가 Lissauer 구역을 통해 몇 분절을 상행 또는 하행하여 전달되기 때문에(Carpenter, 1998) 천수분절에서의 발현 또한 요수분절에서의 발현과 비슷한 양상을 보인다고 사료되어진다.

비록 치료용 초음파 적용 후 척수내에서의 substance-P의 발현을 관찰한 논문은 거의 없지만, 인체에 초음파 적용 후 통증완화 효과를 연구한 논문들이 발표되고 있다. Esenyel 등 (2000)은 상부 승모근의 근막 통증 치료에 있어 경부 신장운동과 함께 근막 동통점(myofascial trigger point)에 초음파 조사를 실시하여 visual analogue scale(VAS)를 통한 통증강도(pain intensity)와 algometry를 이용한 통증역치(pain threshold) 및 goniometer를 이용한 관절가동범위를 측정된 결과 경부 신장운동만 실시한 그룹에 비하여 초음파 조사를 실시한 그룹에서 유의한 통증감소와 통증역치 상승, 관절가동범위 증가를 보고하였다. Hasson 등(1990)은 지연성 근통증(delayed onset of muscle soreness; DOMS) 유발시킨 후 맥동 초음파를 조사한 후 통증 인지(soreness perception), knee extension work, maximum

knee extension torque, insometric knee extension contraction을 측정된 결과 가짜로 (placebo) 초음파를 적용한 그룹과 적용하지 않은 그룹에 비해서 유의한 차이가 나타남을 보고하면서, 맥동 초음파가 통증감소와 더불어 근육의 기능적 회복을 가속화시킴으로써 DOMS의 회복을 촉진시킨다고 하였다. Hashish 등(1986)은 지치(third molars)를 제거한 후 초음파를 적용한 후 얼굴의 부종, 경직성 개구불능(trismus), 통증, serum C-reactive protein을 측정된 결과 가짜로 초음파를 적용한 그룹과 적용하지 않은 그룹에 비해 유의한 감소를 보였고, 고강도($1.5W/cm^2$)보다는 저강도($0.1W/cm^2$ 와 $0.5cm^2$)에서 통증감소 효과가 더 탁월함을 보고하였다.

치료용 초음파가 통증을 감소시키는 기전에 대해서는 밝혀지지 않았지만, 일부 연구자들은 치료용 초음파에 의해서 염증단계의 단축과 통증에 민감한 구조물이 혈종과 부종에 의해서 압박되는 힘을 저하시킴으로써 통증을 감소시킨다는 기전이 제시되어지고 있다(Hasson 등, 1990; Hay-Smith, 2000).

그러나 치료용 초음파가 통증감소에 효과가 없다는 연구들 또한 계속적으로 발표되고 있는데, 본 연구에서 비록 substance-P의 발현 감소를 관찰하기는 했지만, “급성 혹은 잠재적인 조직 손상과 관련된 정서적 경험과 불쾌한 감각”이라는 국제통증학회가 내린 통증의 정의에서도 알 수 있듯이(Merskey와 Bogduk, 1994) 통증이란 매우 주관적인 느낌으로 substance-P의 감소 자체만을 가지고 통증의 감소를 논하기에는 부족한 점이 없지는 않다. 그러므로 치료용 초음파에 의한 통증감소 효과의 검증을 위해서는 주관적인 방법에 의한 평가와 더불어 통증을 전달하는 신경전달물질에 대한 지속적인 연구가 이루어져야한다.

V. 결 론

골격근 손상 후 발생하는 통증에 대한 치료용 초음파의 효과를 알아보기 위하여 본 실험에서는 Spague-Dawley계 흰쥐의 장딴지근에 쇠구슬을 낙하시켜 근타박상을 유발시킨 후, 통증전달에 있어 중요한 역할을 하는 substance-P를 면역조직화학법으로 연구하였다. 실험 동물은 초음파를 조사한 실험군과 조사하지 않은 대조군으로 나누었고, 시간경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 다시 1일, 2일, 3일, 7일군으로 나누어 관찰한 바 실험결과는 다음과 같았다.

1. Substance-P의 면역반응은 척수 후각의 lamina I, II에서 관찰되었고, 이외에도 lamina IV와 중심관 주변부에서 관찰할 수 있었다. 1일군을 제외하고, 초음파를 실시한 실험군은 대조군에 비하여 낮은 면역반응을 보였다.

2. 각 그룹간 substance-P의 발현정도는 모두 시간경과에 따라 감소하는 경향을 보였는데, 실험군이 대조군에 비하여 더 빠른 감소를 보였다.

이상의 결과에서 근타박상으로 유도된 골격근의 손상 후 재생과정에 있어 치료용 초음파의 조사가 척수후각 내 substance-P의 발현을 빨리 감소시킴으로써 통증완화에도 효과가 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 이재형 : 전기치료학, 대학서림, 서울, 1995.
- Carpenter MB : *Core text of neuroanatomy*, 배춘상, 백선용, 조희중 등(역), 3판, 고문사, 서울, 1998.
- Merskey H, Bogduk N : *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*, 2nd ed., IASP press, 1994.
- Scully RM, Barnes MR : *Physical therapy*, J. B. Lippincott Company, USA, 1989.
- Starkey C : *Therapeutic Modalities*, 2nd Ed., FA Davis Company, Philadelphia, 1999.
- 김민경, 최 윤, 공현석 등 : Substance P antagonist, [D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]-Substance P가 백서의 FCA 주입 후 유발된 기계적 통각과민에 미치는 영향, *대한마취과학회지*, 38, 158-163, 2000.
- 남기원 : 초음파가 흰쥐 관절연골내 열충격 단백질70의 발현에 미치는 영향, *미간행 석사학위 논문*, 대구대학교 재활과학대학원, 2000.
- 방문석, 한태륜, 김진호 등 : 경피적 전기신경자극과 간섭파 및 레이저 치료의 동통 완화효과에 대한 연구, *대한재활의학회지*, 20, 825-832, 1996.
- 백수정 : 경피신경전기자극이 capsaicine으로 통증을 유발시킨 흰쥐 척수내 c-랜 발현에 미치는 영향, *미간행 석사학위 논문*, 대구대학교 재활과학대학원, 2001.
- 성진형, 류재덕, 김원유 등 : 치료용 저에너지 초음파가 배양중인 관절 연골세포에 미치는 영향, *대한정형외과학회지*, 34(3), 617-624, 1999.
- 손인범, 이원수 : 인체 모낭기관배양에서 Substance P가 모발성장에 미치는 영향, *대한피부과학회지*, 39(2), 190-198, 2001.
- 신재원, 윤여성, 원무호 등 : WKY 랫드 요수부분 척수신경절 내에서 calcitonin gene-related peptide와 substance P 면역반응세포의 분포, *대한수의학회지*, 37(4), 719-726, 1997.
- 이미애 : 경피신경전기자극이 관절염으로 유발된 흰쥐 척수내 substance P 발현에 미치는 영향, *미간행 석사학위 논문* : 대구대학교 재활과학대학원, 2001.
- 이원택, 이주강, 강은정 등 : 흰쥐의 실험적 관절염 모델에서 capsaicine이 척수의 c-랜 단백질 및 척수신경절의 substance P, CGRP에 미치는 영향, *대한해부학회지*, 32, 761-773, 1999.
- 이청기, 한수정. 전기자극에 대한 신경생리학적 반응: 척수주변 말초신경 자극, *대한재활의학회지*, 22(2), 399-405, 1998.
- 최민주 : 초음파의 의학적 활용 : 치료용 초음파 및 초음파 조영제, *한국소음진동공학회지*, 10(5), 743-759, 2000.
- 한태륜, 신희석 : 초음파 치료의 온열효과에 관한 실험적 연구, *대한재활의학회지*, 14(1), 145-151, 1990.
- Aanonsen LM, Kajander KC, Bennett GJ, et al. : Autoradiographic analysis of ¹²⁵I-substance P binding in rat spinal cord following chronic constriction injury to the sciatic nerve, *Brain Research*, 596(1), 259-268, 1992.
- Adeghate E, Ponery AS, Pallot DJ, et al. : Distribution of vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y and substance P and their effects on insulin secretion

- from the *in vitro* pancreas of normal and diabetic rats, *Peptides*, 22, 99-107, 2001.
- Beiner JM, Jokl P : Muscle contusion injuries: current treatment options, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9(4), 227-237, 2001.
- Brosseau L, Casimiro L, Robinson V, et al. : Therapeutic ultrasound for treating patellofemoral pain syndrome, *Cochrane Database of Systematic Reviews(Online: Update Software)*, (4), CD003375, 2001.
- Bryant J, Milne R : Therapeutic ultrasound in physiotherapy, *Report to the Development and Evaluation Committee*, 90, 1-21, 1998.
- Columbo M, Horowitz EM, Kagey-Sobotka A, et al. : Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 81(1), 68-73, 1996.
- Craig JA, Bradley J, Walsh DM, et al. : Delayed onset muscle soreness: lack of effect of therapeutic ultrasound in humans, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80(3), 318-323, 1999.
- Crawford F, Atkins D, Edwards J : Interventions for treating plantar heel pain, *The Foot*, 11(4), 228-250, 2001.
- Crawford F, Snaith M : How effective is therapeutic ultrasound in the treatment of heel pain?, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55(4), 265-267, 1996.
- Cunha AD, Parizotto NA, Vidal BDC : The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 27(12), 1691-1696, 2001.
- de Lanerolle NC, LaMotte CC : Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. I. Substance P immunoreactivity, *Brain Research*, 274(1), 31-49, 1983.
- Dyson M : Advances in wound healing physiology: The comparative perspective, *Veterinary Dermatology*, 8, 227-233, 1997.
- Ebenbichler GR, Erdogmus CB, Resch KL, et al. Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder, *The New England Journal of Medicine*, 340(20), 1533-1538, 1999.
- Ebertz JM, Hirshman CA, Kettelkamp NS, et al. : Substance P-induced histamine release in human cutaneous mast cells, *The Journal of Investigative Dermatology*, 88(6), 682-685, 1987.
- Esenyel M, Caglar N, Aldemir T : Treatment of myofascial pain, *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 79(1), 48-52, 2000.
- Fabrizio PA, Schmidt JA, Clemente FR, et al. : Acute effects of therapeutic ultrasound delivered at varying parameters on the blood flow velocity in a muscular distribution artery, *Journal of Orthopedic Sports Physical Therapy*, 24(5), 294-302, 1996.
- Falconer J, Hayes KW, Chang RW : Therapeutic ultrasound in the treatment of musculoskeletal conditions, *Arthritis Care Research*, 3, 85-91, 1990.

- Gaddum JH, Schild HO : Depressor substances in extracts of intestine, *Journal of Physiology (London)*, 83, 1-14, 1934 : In Harrison S, Geppetti P : Substance P, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 555-576, 2001.
- Gam AN, Johannsen F : Ultrasound therapy in musculoskeletal disorders: meta-analysis, *Pain*, 63, 85-91, 1995.
- Gnatz SM : Increased radicular pain due to therapeutic ultrasound applied to the back, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 70(6), 493-494, 1989.
- Griffin GE : Transmissiveness of ultrasound through tap water, glycerin, and mineral oil, *Physical Therapy*, 60, 1010-1016, 1980.
- Hashish I, Harvey W, Harris M : Anti-inflammatory effects of ultrasound therapy: evidence for a major placebo effect, *British Journal of Rheumatology*, 25(1), 77-81, 1986.
- Harle J, Salih V, Mayia F, et al. : Effects of ultrasound on the growth of bone and periodontal ligament cells in vitro, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 27(4), 579-586, 2001.
- Harmar A, Keen P : Synthesis, and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation in vitro, *Brain Research*, 231, 379-385, 1982.
- Harrison S, Geppetti P : Substance P, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 555-576, 2001.
- Huang MH, Yang RC, Ding HJ, et al. : Ultrasound effect on level of stress proteins and arthritic histology in experimental arthritis, *Archives Physical Medicine and Rehabilitation*, 80, 1999.
- Kami K, Morikawa Y, Kawai Y, et al : Leukemia inhibitory factor, glial cell line-derived neurotrophic factor, and their receptor expressions following muscle crush injury, *Muscle & Nerve*, 22, 1576-1589, 1999.
- Millan MJ : The induction of pain: an integrative review, *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164, 1999.
- Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B : Comparison of ultrasound/ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury, *Physical Therapy*, 74(9), 812-823, 1994.
- Paik NJ, Cho SH, Han TR : Ultrasound therapy facilitates the recovery of acute pressure-induced conduction block of the median nerve in rabbits, *Muscle & Nerve*, 26(3), 356-361, 2002.
- Partata WA, Cerveira JF, Xavier LL, et al. : Sciatic nerve transection decrease substance P immunoreactivity in the lumbosacral spinal cord of the frog (*Rana catesbeiana*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 807-814, 2002.
- Pezet S, Malcangio M, McMahan SB : BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathway?, *Brain Research Reviews*, 1, in press, 2002.
- Reher P, Doan N, Bradnock B, et al : Effect of ultrasound on the production of IL-8,

- basic FGF and VEGF, Cytokine, 11(6), 416-423, 1999.*
- Carlton SM, Cogeshall RE : Inflammation-induced up-regulation of neurokinin 1 receptors in rat glabrous skin, Neuroscience Letters, 326, 29-32, 2002.*
- Tanzer M, Kantor S, Bobynd JD : Enhancement of bone growth into porous intramedullary implants using non-invasive low intensity ultrasound, Journal of Orthopaedic Research, 19, 195-199, 2001.*
- ter Haar G : Therapeutic ultrasound, European Journal of Ultrasound, (91), 3-9, 1999.*
- Truab RJ : The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat, Pain, 67(1), 151-161, 1996.*
- Walsh DM, Lowe AS, McCormack K, et al. : Transcutaneous electrical nerve stimulation: Effect on peripheral nerve conduction, mechanical pain threshold, and tactile threshold in humans, Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 79(9), 1051-1058, 1998.*
- Windt DAWM, Heijden GJMG, Berg SGM, et al. : Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review, Pain, 81(3), 257-271, 1999.*
- Worrell TW : Factor associated with hamstring injuries. An approach to treatment and preventative measures. Sports Medicine(Auckland, N.Z.), 17(5), 338-345, 1994.*
- Yajima Y, Narita M, Narita M, et al. : Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice, Brain Research, 958, 338-346, 2002.*
- Young SR, Dyson M : The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis, Ultrasound in Medicine and Biology, 16(3), 261-269, 1990.*
- Zou X, Lin Q, Willis WD : The effects of sympathectomy on capsaicin-evoked fos expression of spinal dorsal horn GABAergic neurons, Brain Research, 958(2), 322-329, 2002.*