

TENS가 관절염으로 유발된 흰쥐 척수내 Substance-P 발현에 미치는 영향

부산 메리놀병원 물리치료실
이 미 애
대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김 진 상
대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공
백 수 정

The Effect of TENS on Substance P Expression in Arthritis-Induced Rat Spinal Cord

Lee, Mi-Ae, P.T.

Department of physical Therapy, Maryknoll general hospital

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

Baek, Su-Jeong, P.T.

Major in Physical Therapy, Dept. of Rehabilitation Science, Graduate School, Taegu University

<Abstract>

The purpose of this study is to investigate and analysis effect of TENS with immunohistochemistry methode through changes of substance P in spinal using arthritis model after inducing inflammation.

The changes of substance P induced at that time are compared with control which is not induced arthritis by means of counting.

The effect of TENS (4Hz, 200 μ s, 20minutes) is also tested by observing changes of substance P in spinal dorsal horn after application on knee joint of rats which is arthritis model induced by kaolin and carrageenan.

The results of this study were as follows:

1. Substance P immunoreactive positive neurons are increased in dorsal horn after inducing arthritis.
2. In arthritis group, Substance P immunoreactive positive neurons are progressively increased from the first to the third days.
3. Substance P immunoreactive positive neurons after applicating TENS on arthritis group are more decreased than only arthritis-induced group.

4. Substance P immunoreactive positive neurons were significantly decreased on the second days resulting from TENS application from the first to the third days.

Therefore, TENS application is decrease Substance P immunoreactive positive neurons in spinal dorsal horn of rats induced arthritis. This decrease is considered as analgesic effect of TENS.

I. 서론

잠재적이거나 실제적인 조직손상시 수반되는 불쾌한 감각 및 정서경험(Browsher, 1988)으로 정의되는 통증은 인체에서 일어나는 방어 반사기전으로 매우 복잡하고 주관적인 경험이다(George, 1982). 통증을 정도는 생리적, 정신적 현상으로 심리적 요인이 대단히 중요하므로 통증에 대한 감수성, 주의력 정도, 감정상태, 인격, 과거의 경험과 같은 측정할 수 없는 요인 등에 의해 좌우된다(구재림 등, 1986). 통증을 측정하는 시각적 유사척도(visual analog scale), 통증질문서와 같은 주관적 방법, 통증장애표(pain disability index), 행동평가법(behavioral assessment)과 통증으로 인한 기능제한을 평가하는 방법이 이용되어왔다(Lanerolle, 1983, 조정선과 박래준, 1993). 동물에서 통증을 측정하는 방법은 대체적으로 유해자극을 회피하려는 행동을 계량화하는 방법으로 꼬리회피반사(tail-flick reflex), 핫플레이트법(hot plate method), 발성법(vocalization) 등과 전기생리학적으로 신경전도 속도를 측정하는 방법이 많이 사용되어져 왔다(김진호 등, 1984). 최근에 와서는 신경전달 물질을 면역조직화학적으로 염색할 수 있게 되었으며(Hokfelt 등, 1975), 통증전달에 관여하는 흥분성 신경전달 물질인 Substance P의 척수 뒤뿌내 농도를 면역조직화학적으로 염색하여 그 변화를 관찰하는 방법이 통증의 정도와 진통효과를 검정하는 방법으로 많이 사용되고 있다(Marlier 등, 1991; Zhang 등, 1994).

관절염은 임상에서 흔히 접하는 질환중의 하나로 심한 통증과 장애를 초래한다.

관절염의 치료로 경피신경전기자극(transcutaneous electrical nerve stimulation, 이하 TENS)은 비침습적이며, 사용이 간편하고, 진통효과가 지속적이며, 마약성 약물 등의 사용으로 인한 부작용을 감소 시킬 수 있다(Melzack과 Wall, 1989). TENS의 효과에 관하여는 계속적으로 연구되어지고 있으나 생리학적으로 명확하게 밝혀진 기전은 아직 없는 실정이다(정한영과 권희규, 1993; 한태륜 등, 1995). 특히 염증성 질환시 통증에 미치는 효과에 관해 Substance P와 같은 통증물질과 연관시켜 연구한 결과는 아직 발표되지 않았다.

이에 본 실험에서는 쥐의 관절염 모델(이원택 등, 1999)을 이용하여 염증상태를 만든 후 통증 상태의 척수에서 나타나는 Substance P의 변화를 통해 통증치료로 많이 이용되는 TENS의 효과를 면역조직화학적으로 관찰, 분석하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

본 연구에서는 동일한 조건하에서 사육한 흰쥐 수컷 성체(Sprague-Dawley계, 150~200g) 12마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 50~60%를 유지시켰으며, 명암은 12시간을 주기로 조절하였고, 식이와 물은 자유급식 하도록 하였다.

실험동물은 1)실험적 관절염 유발군(실험적 대조군) 6마리, 2)실험적 관절염 유발후 TENS 적용군 6마리로 하였다. 실험적 관절염 유발군은 관절염 유발 1일, 2일, 3일에 각각 희생하

였고, 실험적 관절염 유발후 TENS 자극군은 TENS 적용 1일, 2일, 3일에 희생하여 각각 표본 제작하였다.

2. 실험방법

1) 급성 관절염 유발

실험적 관절염을 유발시키기 위해 염산 케타민(Ketamine HCL, 유한양행)과 럽폰(Rompun, 마이엘코리아)을 1:1 비율로 섞어 제조한 전신 마취제 0.3~0.4cc를 복강 주사하여 마취하였다. 흰 쥐 오른쪽 슬관절의 털을 제거한 후 카오린(Kaolin)을 4% 용액이 되도록 증류수에 녹여 흰쥐의 오른쪽 슬관절강 내에 0.15ml 주입하고, 15분간 굴곡, 신전 운동을 시켰다. 그리고 난 후, 2% 카라지난(Carrageenan) 용액 0.3ml를 슬관절강으로 주입한 후 다시 5분간 슬관절 굴신 운동을 시켰다. 처치 이틀후 슬관절에 열이 있고, 부종이 생겼으며, 압통반응을 보이면 관절염이 유발된 것으로 판정하였다.

2) 경피신경전기자극(TENS) 적용

TENS 적용을 위해 관절염이 유발된 흰 쥐 슬관절에 털을 제거한 후 매일 같은 시간대에 하루 1회 20분씩 3일간 TENS 자극을 적용하였다. 전기자극 기기는 Dual channel TENS Model 120Z(ITO Co. LTD)를 사용하였으며, TENS 자극은 빈도 4Hz, 지속기간 200 μ s로 자극강도는 최소강도(1mA)로 적용하였다. TENS의 도자는 1 \times 1cm의 고무 전극에 치료용 겔을 사용하여 관절염이 유발된 흰쥐 오른쪽 슬관절에 부착하여 고정하였다.

3) 조직절편 제작

실험적 관절염유발 후 TENS 자극군은 1일, 2일, 3일간 TENS를 적용하였으며, 적용한 후 1시간 후에 희생하였다.

실험동물은 마취한 후, 0.9% 염화나트륨(NaCl)을 심장을 통해 관류하고, 8% 파라포르말데하이드(paraformaldehyde) 용액으로 전고정을 실시하였다. 그 이후 골절단기를 이용해 척추를 제거하고 전체 척수를 적출하였다.

적출된 척수는 절편을 자르기 전까지 파라포르말데하이드(paraformaldehyde) 용액에 24시간 후고정한 후 영하 35 $^{\circ}$ C 냉동상태에서 동결(freezing)시켜서 미세절단기(microtomy, BRIGHT 5040)를 사용하여 30 μ m두께로 조직절편을 제작하였다.

4) 면역조직화학법

박절한 조직절편은 anti-rat rabbit substance P 항체(Peninsular Lab.,Belmont, California, USA.)를 사용하여 면역조직화학 염색을 하였다.

1:500으로 희석한 antirat rabbit substance P항체(Peninsular Lab.,Belmont, California, USA.) 500 μ l에 1.5 μ l tritonX-100과 10 μ l NGS(normal good serum, Chemion International INC., Temecula, CA, USA.)를 혼합하여 4. C에서 24시간 처리한 후 0.01M PB(Phosphate buffer)에 10분씩 3회 세척하였다.

그리고, ABC-Kit(Avidine-biotin peroxidase Complex)(vector, USA) II에 1.5 μ l tritonX-100과 10 μ l NGS을 혼합하여 실온에서 90분간 처리하고, 0.01M PB에 10분씩 3회 세척하였으며, 이 조직을 ABC-Kit III에 넣어 실온에서 60분간 처리후 다시 세척하였다.

위의 과정을 마친 조직은 발색을 위해 DAB(3,3'-diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.)에 10분간 적용후 H₂O₂를 몇방울 떨어뜨려 갈색을 띠면 세척하여 젤라틴(gelatin)으로 처리한 슬라이드에 얹었다. 슬라이드 표본을 건조시킨후 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II 에탄올, 100% Xylen I, 100% Xylen II의 과정을 10분씩 거치는 통상의 탈수과정을 거쳐 보존적 조직검사를 위해 PMM(permanent mounting media)

을 이용하여 cover glass를 씌워 조직표본을 봉입하였다.

5) 관찰 및 분석

면역조직화학적 관찰을 위해 광학 현미경(Olympus BX 50, Japan)을 이용하여 척수뒤뿔에서 Substance P 면역양성반응 세포를 관찰하였으며, 현미경에 장착된 CCD 카메라(Toshiba, Japan)와 컴퓨터로 연결시켜 자료를 전송하였다. 이러한 디지털화된 자료는 Image-pro plus ver 4.0 for windows(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 촬영과 영상분석(image analysis)을 시행하였다. 반응을 나타내는 세포수를 조사하기 위해 영상분석을 실시하여 단위 면적당 반응을 나타낸 세포의 수를 세었다.

영상분석으로 얻어진 자료는 MS office 2000 Excel을 사용하여 처리하였다.

III. 실험결과

1. 광학현미경적 소견

Substance P를 항원으로 하는 면역조직화학적 방법으로 염색한 면역양성 신경원 세포체는 작은 갈색의 과립상 구조로 나타났으며, 척수 뒤뿔에서 주로 Rexed I, II 층판에서 관찰되었다.

2. 면역조직화학적 소견

1)관절염 유발군에서 Substance P 면역양성 신경원의 변화

관절염을 유발한 대조군에서 Substance P 면역양성 신경원을 3일간 관찰한 결과, Substance P 면역양성 신경원 수가 점차적으로 증가되는 양상을 보였다.

2)TENS 적용군에서 Substance P 면역양성 신경원의 변화

관절염 유발 후 TENS를 적용한 군은 관절염만을 유발한 대조군에 비해 Substance P 면역양성 신경원 세포의 현저한 감소를 보였다.

이들 Substance P 면역양성 신경원의 수는 TENS 적용 2일째에 유의한 감소를 보였으며, 치료일수에 비례하여 점진적인 감소를 보였다.

	1day	2day	3day
arthritis control group	1061	1173	1422
TENS group	1034	*861	824

Table 1. Number of substance P immunoreactive positive neurons in arthritis-induced group and after TENS application on arthritis group *p<.05

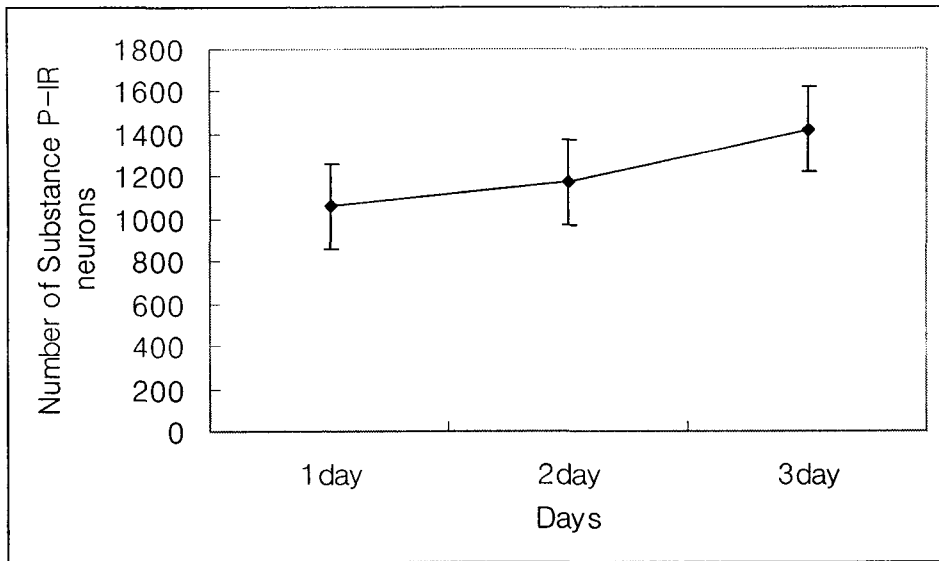


Fig. 1. The change of substance P immunoreactive positive neurons in arthritis-induced rat spinal dorsal horn from the first to the third days

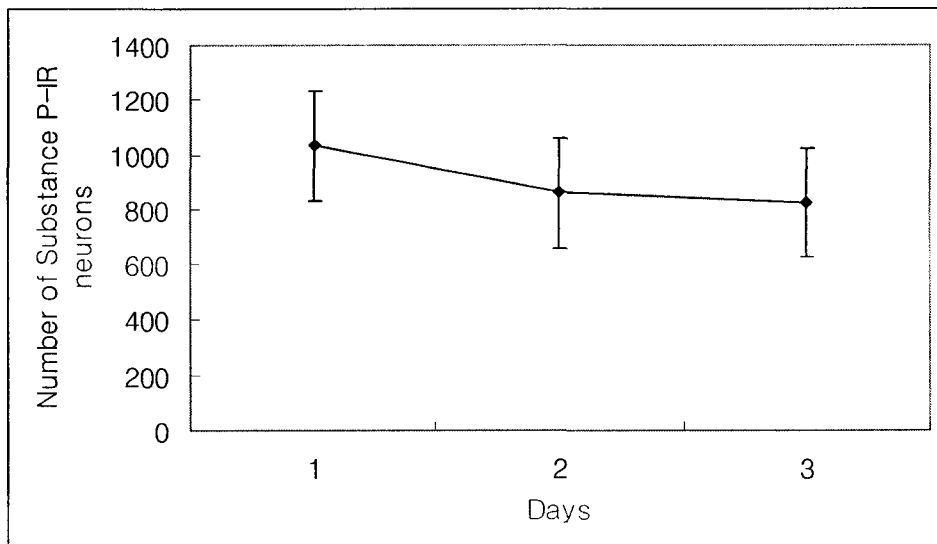


Fig. 2. The change of substance P immunoreactive positive neurons after TENS application on arthritis group from the first to the third days

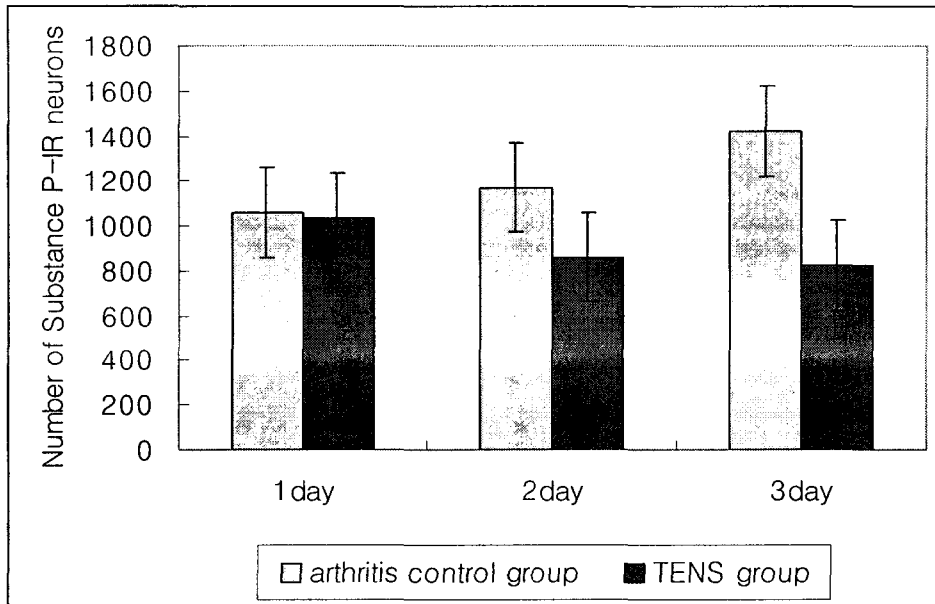


Fig. 3. compare arthritis control group with TENS application group from the first to the third days

IV. 고찰

관절염은 임상에서 흔히 접하는 질환중의 하나로 심한 통증과 장애를 초래한다. 그 병태생리를 규명하고, 효과적인 치료방법을 알아내기 위하여 많은 연구가 되어왔으나 아직까지 원인이 분명하게 밝혀지지 않았다. 관절염은 지속적인 통증을 동반하여, 일상생활 수행에 불편함을 초래하고, 사고에 대한 가능성을 증가시킨다(Bradley 등, 1989). 또한 관절염 환자들이 경험하는 가장 고통스러운 증상인 통증은 관절염 환자의 일상생활 및 삶의 질에 미치는 가장 중요한 증상으로 보고되고 있다(Burkhardt, 1985).

과거 수세기 동안 많은 의학자들이 이러한 통증에 대한 기전을 밝히고자 하였으나, 정확한 통증기전과 그 치료방법에 대한 결론을 내리지 못하고 있다(Krause 등, 1987). 최근 통증을 일으키는 물질들이 통증 연구에 있어서 중요시 되어왔다. 특히 신경전달물질을 면역조직화학적으로 염색할 수 있게 되어(Hokfelt 등, 1975) 통증전달에 관여하는 흥분성 물질의 척수 뒤뿌내 변화를 관찰함으로써 통증의 정도와 진통효과를 검정하는 방법이 많이 사용되어지고 있다(Marlier 등, 1991; Zhang 등, 1994). 척수 뒤뿌 및 척수신경절의 신경원과 신경종말을 면역조직화학적 방법으로 염색하여 substance P의 변화를 관찰하는 방법은 흔히 통증의 검정에 사용되고 있다(Skofitsch와 Jacobowitz, 1985b; Marlier 등, 1991; Lee 등, 1992; Zang 등, 1994; Lee 등, 1996).

통각의 전달에 관련된 신경전달물질로 substance P는 가장 유력하다고 알려져 있다(Hokfelt 등, 1975; Jessell 등, 1979; De Lanerolle 및 LaMotte, 1983; Pernow, 1983; Salt 및 Hill, 1983; Besson 및 Chaouch, 1987).

발통물질이라고 알려진 화학적 매개물들은 손상된 조직에서 분비되거나 합성되어 적당한 양이 축적되면 침해수용체 부위를 활성화시킨다. substance P는 이들 펩타이드 중 가장 많이 연구된 것으로서, 통증을 전달하는 신경섬유의 흥분전달에서 큰 역할을

담당하고 있으며(Hokfelt, 1980; hunt, 1981), substance P의 증가와 감소에 의해 통증 조절에 의한 치료효과를 검정할 수 있다(Hokfelt, 1980; Wiesenfeld-Hallin 등, 1984). 특히 Substance P는 염증성 반응의 주된 유도물질로 알려져 있으며(이원택 등, 1999), 염증이나 말초신경손상으로 인한 통증상황하에서 Substance P의 방출이 증가되고, 그 결과 척수뒤뿌내 세포의 감수성이 항진된다는 보고가 있다(Sher와 Mitchell, 1990; Thomson 및 Woolf 1991; Kawamata 와 Omote, 1996).

Battaglia 등(1988)은 면역조직화학적 방법을 사용하여 Substance P가 척수신경절의 작은 신경원과 감각신경섬유 말단 I, II층과 척수뒤뿌의 심층에서 발현된다고 보고하였다. 또한 쥐의 염증모델에서 요추뒤뿌와 척수신경절에서 Substance P가 증가되어진다는 보고가 있으며(Noguchi 등, 1988), Substance P수용체는 척수뒤뿌에서 증가된다고 하였다(McCarson 등 1994).

본 실험에서도 카오닌(Kaolin)과 카라지난(Carrageenan)을 무릎관절에 주입하여 급성 염증을 일으킨 경우 염증유발 2일째에 척수뒤뿌에서 현저하게 Substance P가 증가하는 것을 관찰할 수 있었는데 이것은 관절염으로 인한 통증자극이 척수뒤뿌로 전달되었기 때문으로 해석된다. 특히 척수 뒤뿌의 천층, Rexed 층판 I, II에서 Substance P 면역양성 신경원의 수가 증가한 것은 말초 침해수용체 신경섬유가 대부분 I, II층에서 종말하기 때문으로 보인다.

통증을 치료하기 위하여 임상적으로 이용되는 방법에는 수술, 물리치료, 약물치료가 있다. 이러한 여러 치료방법 중 물리치료로서 전기자극 방법이 자주 사용되어져 왔으며, TENS는 임상적으로 진통효과가 있다고 알려져 있음에도 불구하고, 그 진통 효과의 실험적 입증, 특히 동물실험에 의한 그 효과의 증명과 기전의 설명이 아직까지 부족한 실정이다.

생체에 전기자극을 하면 생리학적, 병리학적으로 변화를 초래시킨다는 것은 이미 오래 전부터 알려져왔다. TENS는 통증질환에 다양하게 사용되어 왔는데, 급·만성 통증의 감소효과가 있으며(Gersh 등, 1980), 그 효과는 치료군과 대조군을 비교할 때 차이가 있다고 하였다(Melzack 등, 1983).

Wall(1967)은 동물실험에서 뇌간 수준에서의 하행성억제효과의 가능성을 제시하였으며, Reynolds(1983), Mayer와 Liebeskind(1974)는 SPA(phenomenon of stimulation produced analgesia)을 발견하여 하행성억제체계의 존재를 강력하게 뒷받침하였다. 통증조절계에 대한 연구는 내재성 아편물질을 발견하는데 중요한 계기가 되었다. 내재성 아편물질인 endorphin은 침(Liao 와 Wan, 1976), 저빈도 고강도 TENS 자극(Sjolund 등, 1977)에 의해 분비가 증가될 수 있다고 보고되었다.

급성통증에 전기적 진통(electrical analgesia) 방식에 의한 통증조절에 대하여 그동안 많은 연구가 진행되어 왔으며, TENS의 적용은 사용이 간편하고, 진통효과가 지속적이며, 마약성 약물등의 사용으로 인한 부작용의 감소 시킬 수 있다(Melzack과 Wall, 1989). Simmonds 등(1992)은 TENS가 구심성 섬유에 신경전달 속도에 영향을 미쳐 통증역치를 증가시킨다고 하였다.

TENS의 자극주파수는 전통적인 방법인 고빈도 저강도형 TENS(40-150Hz, 50-100 μ s), 최근에 많이 연구되어지고 있는 침술과 비슷한 효과를 나타내는(Moore 와 Blacker, 1983) 저빈도 고강도형 TENS(1-4Hz, 100-400 μ s)으로 구분할 수 있다. 고빈도 자극은 진통효과가 빨리 나타나나 효과 지속시간이 짧으며, 저빈도 자극은 진통효

과가 약 20-30분정도 지연되어 나타나나 그 효과 지속시간은 더 길다고 알려져 있다. 고빈도 저강도형은 Melzack과 Wall(1965)의 척수관문조절설에 기초를 두고 있으며, 주로 직경이 큰 감각신경섬유들을 선택적으로 자극할 수 있다. 저빈도 고강도형은 내분비설에 의해 많이 설명되고 있으며, 직경이 작은 감각신경과 운동신경을 모두 자극할 수 있다.

본 실험에서는 최근에 많이 연구되어지고 있으며, 진통효과가 보다 지속적이고, 그 효과가 침술과 비슷하다고 알려진 저빈도 고강도의 TENS를 적용하여 그 효과를 관찰하였다.

본 실험에서 관절염을 유발한 후 척수뒤뿌내 Substance P의 면역양성 신경원은 정상군에 비해 현저한 증가를 보였으며, 염증유발 2일째에 보다 많이 증가하여 3일째까지 계속 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 관절염유발 후 TENS 자극을 실시한 경우 Substance P 면역양성 신경원은 처음에는 대조군에 비해 큰 변화가 없었으나 자극 2일째에 현저한 감소를 보이는 것을 관찰할 수 있었다.

이와같이 관절염 유발후 증가된 Substance P 면역양성 신경원 세포수가 TENS 자극 후 감소되는 현상은 TENS의 통증억제 효과와 밀접한 관계가 있는 것으로 추측되어진다.

V. 결 론

실험적으로 관절염을 유발한 흰쥐의 척수내에서 통증에 관여하는 신경전달 물질인 Substance P의 변화를 면역조직화학적으로 관찰·분석하여 TENS의 효과에 관하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 관절염을 유발한 통증상태의 척수 뒤뿌에서 Substance P 면역양성 신경원의 수가 증가하였다.
2. 관절염을 유발한 실험적 대조군의 경우, 3일 동안 매일의 변화를 관찰한 결과, Substance P 면역양성신경원 세포수가 3일 동안 점차적으로 증가하였다.
3. 관절염을 유발한 후 TENS 자극을 실시한 군은 관절염만을 유발한 군에 비해 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 구재림, 강원규, 정진상, 김세주, 오정희. (1986). 만성 동통환자에 실시한 다면적 인성검사의 임상적 고찰. 대한 재활의학회지, 10(2), 184-188.
- 김진호, 한태룡, 오세윤. (1984). 신경근병변과 후경근 근전도 소견의 관계에 대한 연구. 대한재활의학회지, 8(1), 63-67.
- 박래준. (1995). 전기자극이 개구리 뒷다리 부종형성에 미치는 영향. 대한물리치료학회지, 7(1), 1-8.
- 조정선, 박래준. (1993). 통증평가를 위한 시치검사 예비연구. 대한물리치료사학회지, 14(3), 53-58.
- 이원택, 이주강, 강은정, 이종은, 박경아. (1999). 흰쥐의 실험적 관절염 모델에서 capsaicin이 척수의 c-fos 단백질 및 척수신경질의 substance P, CGRP에 미치는 영향. 대한해부학회지, 32, 761-772.
- Battaglia, G., & Rustion, A. (1988). Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J. comp. neurol*, 277,

302-312.

- Besson, J.M., & Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Res*, 67-186.
- Bowsher, D., & Wells, P.E. (1988). Acute and chronic pain and assessment. *Pain Management in Physical Therapy. East norwalk, Appleton & Lange*, 11-17.
- Bradley, E.M., & Papageorgiou, A.C.(1989). Visual analogue scales as a measure of pain in arthritis: A study of overall pain and pain in individual joints at rest and on movement. *Journal of Rheumatology*, 16(1), 102-105.
- Buadley, L.A., young, L.D., Anderson, K.O., Turner, R.A., Agudelo, C.A., Mcdaniel, L.K., Pisko, E.J., Semble, E.L., & Margan, T.M. (1987). Effects of psychological therapy on pain behavior of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 30(10), 1105-1114.
- Burckhardt, C.S. (1985). The impact of arthritis on quality of life. *Nersing Res*, 34(1), 1-9.
- Dray, A., Urban, L., & Dickenson A. (1994). Pharmacology of pain. *Trends in Pharmacol Sci*, 15, 190-197.
- Ericksson, M.B., Sjolund, B.H., & Nielzen, S.(1979). Lon term results of peripherral conditioning stimulation as an analgesic measure in chronic pain. *Pain*, 6. 335-347.
- Felson, D.T., Anderson, T.J., Boers, M., Bombardier, C., Chernoff, M., & Fried, B. (1993). The American college of rheumatology measures for rheumatoid arthritis of clinical trials. *Arthritis Rheum*, 36, 729-740.
- Jenkner, F.L., & Schuhfried, F. (1981). Transdermal ranscutaneous Electric Nerve Stimulation for pain: The search for an optimal waveform, *Appl. Neurophysiol*, 44, 330-337.
- Fisher, M.A. (1991). Inhibition motor neuron discharge by peripheral nerve stimulation: an Fresponse analysis. *Muscle Nerve*, 14, 120-133.
- George, A. (1982). *Principles and practice of Physiological acupuncture*. Warren H. Green, Inc.
- Gersh, M.R., Wolf, S.L., & Rao, V.R. (1980). Evaluation of transcutaneous electrical nerve stimulation for pain relief in peripheral neuropathy. *Phy Ther*, 60, 131-135.
- Hokfelt, T., Johannsson, O., & Ljungdahl, A. (1980). Peptidergic neurones. *Nature*, 284, 515-521.
- Hunt, S.P., Kelly, J.S., & Emoson, P.C. (1981). An immunohisthchemical study of neuronal populations containing neuropeptides or gamma-aminobutyrate within superficial layers of the rat dorsalthorn. *Neuroscience*. 6, 1883-1898.
- Jessell, T.M., Tsungo, A., Kanazawa, I., & Otsuka, M. (1979). Substance P depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res*, 168, 247-295.
- Kawamata, M., & Omote, K.(1996). Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain*, 68, 85-96.

- Krause, A.W., Clelland, J.A., Knowles, G., & Jackson, J.R. (1987). Effects of unilateral and bilateral auricular transcutaneous electrical nerve stimulation on cutaneous pain threshold. *Physical Therapy, 67*, 507-511.
- LeBars, D., Dickenson, A.H., & Besson, J.M. (1979). Diffuse noxious inhibitory control(DNIC): I effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. *Pain, 6*, 283-304.
- Lee, W.T., Yoon, H., Kim, H.D., & Park, K.A.(1996). Capsaicin induced changes on the substance P and CGRP immunoreactive nerve cell numbers and sizes in the dorsal root ganglion of the rat. *Exp. Neurobiol, 5*, 115-126.
- Liao, S.J., & Wan, K.K. (1976). Patient hypnotizability and response to acupuncture treatments for pain relief. *Am J Acupunct., 4*, 263-268.
- Mayer, D.J., Price, D.D., & Rafii, A. (1977). Antagonism of acupuncture analgesia in man by narcotic antagonistic naloxone. *Brain Res, 121*, 368-372.
- Marlier, L., Poula, P., Rajaofetra, N., & Privat, A. (1991). Modifications of serotonin-, substance P- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in the dorsal horn of the spinal cord of arthritic rats: a quantitative immunocytochemical study. *Exp Brain Res, 85*, 482-490.
- McCarthy, P.W., & Lawson, S.W.(1990). Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Neuroscience, 34*, 623-632.
- Melzack, R., Vetere, P., & Finch, L. (1983). Transcutaneous electrical nerve stimulation for low back pain: A comparison of TENS and massage for pain range of motion. *Phys Ther., 63(4)*, 489-493.
- Melzack, R., & Wall, P.D. (1989). *Textbook of pain*. Churchill Livingstone. New York.
- Moore, D.E., & Blacker, H.M. (1983). How effective is TENS for chronic pain?. *Am J Nursing, 83*, 1175-1177.
- Newburger, P.E., & Sallan, S.E. (1981). Chronic pain;principles of management. *Pediat., 98*, 180-189.
- Noguchi, K., Morita, Y., Kiyama, H., Ona, K., & Tohyama, M. (1988). A noxious stimulus induces the preprotachykinin-A gene expression in the rat dorsal root ganglion: a quantitative study using in situ hybridization histochemistry. *Brain Res, 464*, 31-35.
- Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol Rev., 35*. 86-49.
- Reynolds, A.C., Abram, S.E., & Anderson, R.A.(1983). Chronic pain therapy with TENS. *Arch Phys Med Rehabil, 64(7)*, 183-193.
- Salt, T.E., Hill, R.G. (1983). Neurotransmitter candidates of somatosensory primary afferent fibers. *Neuroscience, 10*, 1083-1103.
- Sher, G.D., & Mitchell, D.(1990). N-Methyl-D-aspartate receptors mediate responses of rat dorsal horn neurons to hind limb ischemia. *Brain Research, 522*, 55-62.
- Simmonds, M., Wessel, J., & Scudds R.(1992). The effect of pain quality on the

- efficacy of conventional TENS. *Physiotherapy Canada*, 44(3), 35-40.
- Ohhtori, S., Chiba, T., Takahashi, K., Ino, H., Yamagata, M., Sameda, H., Murata, Y., & Moriya, H. (2000). Neonatal capsaicin treatment decreased substance P receptor immunoreactivity in lamina III neurons of dorsal horn. *Neuroscience Res.*, 38, 147-154.
- Smburg, F.L., & Carter-Baker, S.N. (1983). Transcutaneous electrical nerve stimulation for post-laparotomy pain. *Phys Ther.*, 63(2), 188-193.
- Skofitsch, G., & Jacobowitz, D.M. (1985b). Calcitonin gene-related peptide coexist with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptide.*, 6, 747-754.
- Thomson, S.W.N., & Woolf, C.J.(1991). *Primary efferent-evoked prolonged potentials in the spinal cord and their central summation: role of the NMDA receptor*. In: MR bond, JE Charlton, CJ Woolf(Eds), Proc. Vith World congress on pain, Elsevier, Amsterdam, 291-298.
- Wells, WE. (1993). A review of the chronic pain syndromes: etiology transmission and treatment. *Crna.*, 4, 187-198.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Lunderg, T.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A., & Fisher, J.A. (1984). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neuroscience Letters.*, 52, 199-204.
- Zhang, R.X., Mi, Z.P., & Qiao, J.T. (1994). Changes of spinal substance P, Calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regul pept.*, 51, 25-32

Legends for figures

Fig. 4. The picture of substance P immunoreactive positive neurons in arthritis-induced rat spinal dorsal horn.(×40)

Substance P immunoreactive positive neurons are progressively increased from the first to third days. especially, substance P immunoreactive positive neurons was increased in laminae I,II of the spinal dorsal horn.

A: 1day after arthritis-induced

B: 2days after arthritis-induced

C: 3days after arthritis-induced

Fig. 5. The substance P immunoreactive positive neurons after TENS was applied on arthritis-induced rat knee.(×40)

Substance P immunoreactive positive neurons were considerably decreased on the second days.

A: 1day after appliction TENS on arthritis group

B: 2days after appliction TENS on arthritis group

C: 3days after appliction TENS on arthritis group

