

원저

## 침자극이 흰쥐 뇌줄기 및 소뇌의 NADPH-diaphorase와 nNOS 신경세포에 미치는 영향

김종덕 · 강성길 · 김창환

경희대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### The effects of acupuncture on NADPH-diaphorase and nNOS in the brain stem and cerebellum of SHR

Kim Jong-deog, Kang Sung-keel and Kim Chang-whan

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

**Objective** : This study was to investigate the effect of acupuncture on NADPH-diaphorase and nNOS in the brain stem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats.

**Methods** : The experimental groups were divided into four groups : Normal, Choksamni(ST36), Kokchi(LI11), arbitrary group. Thereafter we evaluated changes in NADPH-diaphorase positive neurons histochemically and changes in nNOS neurons immunohistochemically.

- 
- 접수 : 2004년 6월 7일 · 수정 : 2004년 9월 18일 · 채택 : 2004년 9월 18일
  - 교신저자 : 김창환, 서울시 동대문구 회기동 경희의료원 한방병원 침구과  
Tel. 02-958-9240 E-mail : omdkj7@hitel.net

**Results** : 1. The optical densities of NADPH-diaphorase positive neurons of all the Choksamni & Kokchi groups were significantly different in SuG, DLPAG, IP, Pr, Gi areas of brain stem and cerebellum as compared to normal & arbitrary groups. In PPTg only Choksamni group was significantly different as compared to normal and arbitrary groups.

2. The optical densities of nNOS-positive neurons of Choksamni & Kokchi groups were significantly different in SuG, DLPAG areas of brain stem as compared to normal group. In IP, Pr only Kokchi group was significantly different as compared to normal group. The optical densities of nNOS-positive neurons of Choksamni & Kokchi groups were significantly different in SuG, DLPAG, PPTg, Pr, Gi areas of brain stem as compared to arbitrary group. In IP, Pr only Kokchi group was significantly different as compared to arbitrary group.

3. The optical densities of nNOS-positive neurons of all the Choksamni & Kokchi groups were not significantly different in cerebellum as compared to normal & arbitrary groups.

**Conclusions** : We found out that acupuncture have effects on NADPH-diaphorase and nNOS in the brain stem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats.

**Key words** : acupuncture, NADPH-diaphorase, nNOS, brain stem, cerebellum

## I. 서 론

침요법은 한의학에서 중요한 치료기술의 하나로, 일종의 刺戟療法으로 통증을 비롯한 여러 증상을 완화시키며 인체의 항상성을 유지시키고, 질병을 예방하며 치료하는데 활용되어 왔다. 침치료의 효과는 경혈의 선택(穴性과 배합)과 선택된 경혈에 대한 자극(자극의 종류와 양 : 자극의 특이성)에 의존된다<sup>1-2)</sup>.

침요법의 중추신경계에 대한 영향은 최근 양전자방출단층촬영(PET), functional MRI나 [<sup>14</sup>C]-2-DG 자가방사능기록법 등의 영상기법을 이용하여 확인함으로써, 침요법은 뇌에 의해서 통제를 받는 많은 질환에 대한 효과를 발현한다는 가설을 제

시하기에 이르렀다<sup>20-23)</sup>.

침자극이 중추신경계에 미치는 영향에 관한 연구는 신경전달 물질 중 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO)의 활성 변화에 대한 연구와 기타 신경전달물질과 침요법과의 관계에 관한 연구가 있다<sup>3-11)</sup>. Nitric oxide synthase (NOS)는 NO를 만드는 효소로써, NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-diaphorase) 조직화학술을 사용하는데 이 방법은 NOS가 nitroblue tetrazolium (NBT)을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-diaphorase 활성작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다<sup>12-13)</sup>.

김 등<sup>25)</sup>은 전침요법의 효과와 뇌내의 신경전달 물질인 neuronal nitric oxide synthase (nNOS)와

의 상관관계를 연구한 결과 經穴의 특이성에 따라 중추신경계에 유의한 변화가 생긴다고 보고하였으며, 손 등<sup>15,20)</sup>은 足三里와 太衝에 전침자극을 시행하여 자가방사능기록법을 이용하여 뇌대사활성도를 측정함으로써 經穴의 특이성에 따라 뇌대사활성도가 변화함을 보고하였다. 또한, 김 등<sup>16)</sup>은 2 Hz와 100 Hz의 전침자극과 뇌내의 신경전달물질인 nNOS와의 상관관계를 연구한 결과 자극의 특이성에 따라 중추신경계에 유의한 변화가 생긴다고 보고하였으나, 위의 연구들은 모두 전침에 의해서 시행되어 졌으며 단순 침자극이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 經穴의 침자극이 뇌줄기와 소뇌의 NO system 및 신경전달물질에 미치는 영향을 검토하고자 흰쥐의 足三里(ST36), 曲池(LI11) 및 任意穴에 단순 침자극을 시행한 후 뇌줄기와 소뇌에서 NADPH-diaphorase는 조직화학법으로 nNOS는 면역조직화학법으로 각각 염색성의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 동물

2주간 실험 환경에 적응시킨 체중 300±30 g, 11±1주령의 SHR 흰쥐를 각 군 당 13마리씩 배당하였다.

#### 2) 침

침은 길이 0.8 cm, 직경 0.15 mm의 stainless steel(정화침구사, 한국)毫鍼을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 穴位의 선정

실험동물의 체표상에 任意穴과 인체의 足三里(ST36), 曲池(LI11)에 상응하는 부위를 고<sup>17)</sup>의 방법에 따라 取穴하였다.

### 2) 실험군 설정

- ① 정상군 : 침자극을 하지 않은 군
- ② 足三里군 : 左右를 교대로 편측의 足三里에 침자극을 준 군
- ③ 曲池군 : 左右를 교대로 편측의 曲池에 침자극을 준 군
- ④ 任意穴군 : 꼬리의 시작부위에서 끝쪽으로 3분의 1지점에 0.5 cm 깊이로 침자극을 준 군

### 3) 침자극

침자극은 2일에 1회, 오전 10시에 10분간 유침하였고, 총 자극횟수는 10회로 하였다.

## 3. 조직처리<sup>18)</sup>

실험동물은 pentobarbital sodium(60 mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 0.05 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde용액(4℃)을 10분간 관류시켰다. 이때 관류속도는 50~60 ml/min이 되도록 하였다. 관류고정 후 각각 대뇌를 적출하여 4~6 mm 두께로 관상절개하여 동일한 고정액에 담가서 4℃에서 16시간 후에 고정된 후 0.1 M PBS에 탄 20% sucrose 용액에서 2~5일간 보관하였다. 뇌 조직의 절단은 cryocut (Leica, Germany)을 이용하여 40 μm 두께의 연속횡단절편을 제작하였고, 자른 조직은 매 5장마다 1장씩을 취하여 염색을

시행하였다.

#### 4. NADPH-diaphorase의 조직화학법<sup>18)</sup>

NADPH-diaphorase의 조직화학을 위하여 조직절편을 0.1%  $\beta$ -NADPH, 0.01% NBT, 0.3% Triton X-100을 0.1M PB에 녹인 반응혼합액에 넣어 37°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직을 PBS로 씻어서 더 이상의 발색을 정지시켰다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다.

#### 5. nNOS의 면역조직화학법<sup>18)</sup>

nNOS의 면역조직화학을 위하여 조직절편은 내재성 페록시다제(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1%  $H_2O_2$ 에서 15분간 반응시킨 다음 5분씩 3회 PBS로 세척한 후 rabbit anti-nNOS(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1:4,000으로 희석한 항체를 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 및 0.3% Triton X-100이 들어있는 1차 항체용액에 넣고 4도에서 overnight하였다. 1차 항체용액에서의 반응이 끝나면 조직을 PBS로 5분씩 3번 씻은 후, Vectastain-Elite kit(Vector Labs., Burlingame, CA, USA)의 2차 항체용액(Biotinylated anti-IgG를 1:200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켜 항체 용액에서 반응이 끝난 후 PBS로 5분씩 3차례 씻은 후 avidin-biotin-peroxidase complex 용액(Vectastain-Elite kit의 A 용액 1:100, B 용액 1:100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰으며 발색제로는 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma, ST.Louis, MO, USA)를

0.05 M Tris 완충액에 0.02%,  $H_2O_2$  는 0.003으로 사용하였다. 발색반응은 상온에서 3분간 시켰으며, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후 xylene으로 투명화시켜 histomount로 봉입하였다.

#### 6. 조직관찰 및 영상분석<sup>18)</sup>

대뇌 피질 영역에 분포하는 NADPH-diaphorase 및 nNOS 신경세포의 위치 및 형태를 광학현미경으로 관찰하였으며 염색강도는 영상분석기(Multiscan, USA)의 densitometry를 이용하여 gray scale로 측정하였다. Average optical density (AOD)는 흰색을 0, 검은색을 255로 정하여 염색된 조직은 그 사이의 값을 갖고, 이때는 광원의 밝기에 따라 AOD의 값이 달라지므로 광원을 고정시킨 후 측정하였다. 측정된 광원의 밝기는 광원의 밝기에 따라 염색된 전체조직과 조직이 없는 부위를 각각 영상분석기로 측정하여 광원과 AOD 사이의 상관관계 standard curve를 얻은 후 가장 차이가 많이 나는 영역을 측정 광원으로 정하였다. 이때 각 실험군 당 적어도 15개 영역이상을 CCD camera를 통해 200 $\times$ 의 광학현미경에서 온 영상을 받아 영상분석기로 측정하였다. 각 부위에서 세부구조의 위치와 명칭은 Paxinos와 Watson의 부도<sup>19)</sup>를 참고하였다.

#### 7. 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 7.0)을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값 $\pm$ 표준오차(Mean $\pm$ SEM)로 나타내었고, 유의성 판정은  $\alpha=0.05$ 로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Duncan test 검정을 실시하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 뇌줄기 및 소뇌 영역에서 NADPH-diaphorase 염색성의 변화

뇌줄기 영역중 Superficial gray of superior colliculus(SuG), Dorsomedial periqueductal gray (DLPAG), Prepositus nucleus(Pr)의 NADPH-

diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군은 曲池군보다 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었고, PPTg에서는 족삼리군만 유의한 감소가 있었다. Interpeduncular nucleus(IP)와 Gigantocellular reticular nucleus(Gi)에서는 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 PPTg(pedunculo pontine tegmental nucleus)를 제외한 모든 영역에서 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다.

Table 1. Optical Densities of NADPH-diaphorase Positive Neurons after Acupuncture in the Brain stem and Cerebellum of SHR

	Normal	Arbitrary	Choksamni	Kokchi
SuG	164.2±1.0 <sup>a</sup>	171.9±1.0 <sup>b</sup>	124.1±1.2 <sup>c</sup>	137.0±1.5 <sup>d</sup>
DLPAG	170.8±1.5 <sup>a</sup>	174.9±2.0 <sup>a</sup>	126.9±1.8 <sup>b</sup>	145.9±0.9 <sup>c</sup>
PPTg	179.1±2.4 <sup>a</sup>	180.3±1.3 <sup>a</sup>	166.7±2.5 <sup>b</sup>	175.8±1.3 <sup>a</sup>
IP	158.1±0.9 <sup>a</sup>	160.0±1.2 <sup>a</sup>	135.1±1.0 <sup>b</sup>	137.1±1.0 <sup>b</sup>
Pr	142.5±0.9 <sup>a</sup>	156.9±1.2 <sup>b</sup>	108.3±1.8 <sup>c</sup>	114.8±0.7 <sup>d</sup>
Gi	138.5±2.3 <sup>a</sup>	134.1±1.1 <sup>a</sup>	123.1±0.8 <sup>b</sup>	122.6±0.8 <sup>b</sup>
Cbll	108.4±1.0 <sup>a</sup>	123.5±1.4 <sup>b</sup>	94.3±1.0 <sup>c</sup>	93.7±1.0 <sup>c</sup>

The data are mean±SEM(n) of average optical density on the brain stem and cerebellum. The means with same letter in row is not significantly different (Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ).

Sug, superficial gray of superior colliculus; DLPAG, dorsomedial periqueductal gray; PPTg, pedunculo pontine tegmental nucleus; IP, interpeduncular nucleus; Pr, prepositus nucleus; Gi, gigantocellular reticular nucleus; Cbll, cerebellum.

Normal : Nontreated group

Arbitrary : Group given acupuncture to one third point of full tail from the coccyx

Choksamni(ST36) : Group given acupuncture to Choksamni

Kokchi(LI11) : Group given acupuncture to Kokchi

소뇌 영역의 NADPH-diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었으며, 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가

있었다.

足三里군과 曲池군 사이에는 SuG, DLPAG, PPTg, Pr 영역에서 유의한( $\alpha=0.05$ ) 차이가 있었다(Table 1).

2. 뇌줄기 및 소뇌 영역에서 nNOS 염색성의 변화

뇌줄기 영역중 SuG와 DLPAG의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 曲池군은 足三里군보다 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었고, IP와 Pr의 nNOS 염색성에서는 曲池군만 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 IP를 제외한 모든 영역에서 유의한( $\alpha$

$=0.05$ ) 감소가 있었다.

소뇌 영역의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 차이는 없었고, 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 차이는 없었다.

足三里군과 曲池군 사이에는 SuG, DLPAG, IP, Pr영역에서 유의한( $\alpha=0.05$ ) 차이가 있었다 (Table 2).

Table 2. Optical Densities of nNOS-positive Neurons after Acupuncture in the Brain Stem and Cerebellum of SHR

	Normal	Arbitrary	Choksamni	Kokchi
SuG	122.1±1.2 <sup>a</sup>	124.6±1.1 <sup>a</sup>	193.3±1.3 <sup>b</sup>	96.8±0.8 <sup>c</sup>
DLPAG	113.4±1.2 <sup>a</sup>	117.2±0.8 <sup>a</sup>	103.2±1.1 <sup>b</sup>	94.4±0.7 <sup>c</sup>
PPTg	98.3±0.8 <sup>a</sup>	114.9±1.3 <sup>b</sup>	98.5±1.5 <sup>a</sup>	99.7±0.9 <sup>a</sup>
IP	129.3±1.1 <sup>a</sup>	126.1±0.9 <sup>ac</sup>	128.6±1.3 <sup>a</sup>	122.1±1.0 <sup>bc</sup>
Pr	104.7±0.9 <sup>a</sup>	114.8±1.3 <sup>b</sup>	103.8±1.0 <sup>a</sup>	90.7±1.1 <sup>c</sup>
Gi	84.7±0.7 <sup>a</sup>	93.2±1.4 <sup>b</sup>	82.7±1.4 <sup>a</sup>	86.3±1.4 <sup>a</sup>
CBll	94.7±0.7 <sup>a</sup>	95.2±1.0 <sup>a</sup>	95.8±0.6 <sup>a</sup>	94.8±1.0 <sup>a</sup>

The data are mean±SEM(n) of average optical density on the brain stem and cerebellum. The means with same letter in row is not significantly different (Duncan's multiple range test,  $\alpha=0.05$ ).

Normal : Nontreated group

Arbitrary : Group given acupuncture to one third point of full tail from the coccyx

Choksamni(ST36) : Group given acupuncture to Choksamni

Kokchi(LI11) : Group given acupuncture to Kokchi

IV. 고 찰

경락과 중추신경계와의 관계에 관한 연구는 침자극의 동통 억제 기전을 중심으로 이루어져 왔으나 PET, functional MRI을 비롯한 영상기법을 이용하여 침자극에 대한 시각 및 운동영역에의 생리 변화를 확인함으로써 침요법이 뇌의 통제과

정을 통해서 효과를 발현한다는 가설을 제시하기에 이르렀으며<sup>20-23)</sup> 침자극이 중추신경계의 특정 부위로 전달되는 경로를 시각화함으로써 경혈의 치료작용에 대한 중추신경계의 기전을 연구하고 있다<sup>24)</sup>. 이러한 연구는 침요법의 효과를 나타내는 기전을 설명함에 있어 중간단계로 뇌의 역할을 규명하여 침요법이 뇌의 특정기능을 활성화시키고 이에 의해서 해당장기에 영향을 미쳐 효과를 나타내는 기전을 설명하는 것으로 평가할 수 있다.

침자극이 중추신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 신경전달 물질과 관련지어서도 진행되고 있다<sup>3-11,25)</sup>. 손 등<sup>15,20)</sup>은 전침자극을 가한 실험군의 대뇌 활성도를 컴퓨터 영상분석기를 사용하여 동위원소 standard와 비교 분석한 결과 실험군 뇌세포의 여러 구역에서 활성이 증가된 것을 관찰하였고, 특히 진통효과에 있어서 침자극의 전달 통로가 된다고 추측하고 있는 arcuate nucleus와 median eminence 부위에서 유의한 optical density의 차이를 관찰하였다. 김 등<sup>25)</sup>은 SHR에서 정상군과 任意穴, 足三里, 腎俞에 각각 동일한 전침자극을 준 후 NADPH-diaphorase 신경세포와 neuropeptide Y (NPY) 신경세포의 염색성을 관찰한 결과, NOS와 NPY가 전침자극 부위에 따라 각각 다른 신경세포의 변화를 보여 신경전달 물질에 따라서 전침자극에 의한 영향을 받는 기전이 다를 것이라고 생각하며 전침요법이 중추신경계의 수많은 peptidic system를 활성화시킨다는 가설을 제시하였다. 김 등<sup>16)</sup>은 전침의 자극의 차이가 중추신경계에 미치는 영향에 대해서 침군, 2 Hz 전침군, 100 Hz 전침군으로 나누어 대뇌결절, 뇌줄기, 소뇌의 신경세포를 관찰한 결과 100 Hz에서 염색성이 증가하였음을 보고하였으며 자극방식에 따라 중추신경계에 서로 다른 영향을 준다고 하였다. 조 등<sup>14)</sup>은 고빈도와 저빈도 전침자극을 횡수를 다르게 해서 자극하여 SHR 대뇌피질의 NADPH-diaphorase 와 NPY에 미치는 영향에 대한 연구를 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 이<sup>10)</sup>는 足三里 경혈배합을 다르게 해서 전침자극을 준 후 SHR의 뇌줄기, 소뇌영역에서 NADPH-diaphorase와 nNOS신경세포에 대한 연구를 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 이<sup>45)</sup>는 단순 침자극을 준 후 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase, nNOS, NPY, VIP 신경세포에 대한 연구를 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 정 등<sup>41)</sup>은 족삼리 배합을 다르게 해서 전침자극을 준 후 SHR의 대뇌피질에서

NADPH-diaphorase, nNOS, NPY, VIP 신경세포에 대한 연구를 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었다.

NO는 자유롭게 확산하는 가스로서 신경계, 혈관계 및 면역계에서 세포사이의 작용을 매개하는 메신저물질로 중요한 역할을 한다<sup>8,27)</sup>.

NO는 작고 비교적 불안정한 두개의 원자로 이루어진 물질로 사람을 포함한 고등동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 생성된다. NO는 L-arginine이 NOS에 의해 L-citrulline으로 변환되는 과정에 의해 생성된다<sup>26-27)</sup>. NO는 지용성의 무기질이므로 세포막을 자유롭게 통과하여 쉽게 세포주위로 확산될 수 있으며 인체내 여러 정상 생리반응의 신호전달 물질로 작용한다<sup>27)</sup>. NO는 다른 신호 전달 물질과는 달리 생체내에 저장되지 않으며 특이한 운반체나 채널이 필요하지 않고 구조 또한 간단하며 지용성이고 전기적으로도 중성이기 때문에 주위세포로 쉽게 확산되어 작용할 수 있다. NO의 작용은 산화 환원 상태에 따라서 달라지는데 iNOS에 의해 지속적으로 생성된 많은 양의 NO는 주위의 산소 유리 라디칼과 반응하여 nitrogen dioxide나 peroxynitrite(ONOO-)라는 강력한 산화력을 갖는 물질을 형성하여 세포막의 지질 성분을 과산화시키거나 세포내 단백질의 구조와 기능을 변화시켜서 세포손상을 유발한다<sup>28)</sup>.

현재까지 3개의 NOS 유전자가 발견되었는데, 쥐의 소뇌에서 처음 확인된 Type I NOS는 neuronal NOS (nNOS)로 명명되었고, 대식세포에서 처음 확인된 Type II NOS는 immunologic NOS (iNOS)로 명명되었으며, Type III NOS는 endothelial NOS (eNOS)로 명명되었다. 또한 이들 효소들은 활성화의 기전에 따라서 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 구분된다<sup>6,29-30)</sup>.

중추신경계에서 NO는 신경계에서 synaptic plasticity에 관여하거나 long-term potentiation이

나 depression 등의 기억과 연관된 신경생리학적 현상에 관여하며 국소적인 뇌혈류량의 조절 및 주위의 synapse들로부터 neurotransmitter의 분비를 촉진하는 역할 등을 수행한다<sup>31)</sup>. 중추신경계의 nNOS는 특정 신경세포에 항상 존재하여 신경세포가 자극되어 세포내의 칼슘 이온이 증가하게 되면 효소가 활성화되어서 소량의 NO를 합성하며, 이렇게 합성된 NO는 주위 조직에 확산되어 신경전달 물질로의 역할을 수행하지만 뇌의 저산소증, 허혈증이나 뇌졸중 등의 질병상태에서 glutamate의 농도가 증가되면 세포내로 칼슘이온이 유입되어 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 유발하기도 한다<sup>28,32)</sup>. 신경독성물질인 kainic acid에 의하여 흰쥐의 대뇌 피질에서 nNOS 신경세포가 새로 유도 되는 등 nNOS 신경세포는 외부 자극에 대하여 적극적으로 반응하는 신경전달 물질이다<sup>33)</sup>.

NOS를 갖고 있는 신경세포를 관찰하는 방법으로 NADPH-diaphorase 조직화학법과 nNOS 면역조직화학법을 사용한다<sup>5,18,31,34)</sup>. NADPH-diaphorase 조직화학법은 NOS가 NBT을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-diaphorase 활성작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다. 이 작용에는 꼭 NADPH-diaphorase가 필요하며, NOS는 NADPH-diaphorase를 전자 공여자로 필요로 한다. NADPH-diaphorase 활성은 NOS 없어도 부신겉질과 콩팥에서 나타날 수 있지만, 대뇌겉질과 줄무늬체에 분포하는 NADPH-diaphorase 양성 신경세포는 NOS와 일치하는 것을 알려졌다. NO를 만드는 효소인 NOS를 함유한 신경세포는 NADPH-diaphorase 활성도와 비례한다는 보고가 있어서 본 실험에서는 NADPH-diaphorase의 염색성을 이용하였다<sup>44)</sup>.

腧穴은 체표와 經絡, 臟腑 相通의 점이며 脈氣 所發의 孔隙이다. 이러한 腧穴이 발전하여 일정한 經絡과 연계를 갖고 있는 것을 '經穴'이라고

칭하게 되었다. 經穴은 침구치료의 자극점이면서 동시에 질병의 반응점으로서의 의의가 있다. 침구치료는 經穴을 통하여 이루어지며 穴位의 선택과 配伍는 치료상 중요한 비중을 차지한다<sup>1)</sup>. 임상에서 穴位를 선택할 때에는 단면적으로 질병을 보지 말고 환자의 상황을 전반적으로 고려하여 辨證施治하여 적합한 穴位를 선택하여 鍼灸處方을 구성하여야 한다.

足三里(ST36)는 足陽明胃經의 經穴로서 理脾胃 調中氣 通調經絡 扶正培元 하는<sup>1,36)</sup> 작용이 있다. Xiong K 등<sup>37)</sup>은 足三里에서의 NOS 양성 신경섬유의 몇몇 말초성돌기들은 L4-S1의 ganglia로부터 분포되며 몇몇은 spinal cord의 L4-S1의 lamina IX로부터 분사되었다고 밝혀 足三里 침치료 효과의 형태학적인 기초를 제시하였으며, 이 등<sup>38)</sup>이 足三里를 이용하여 경혈의 특이성이 존재한다고 하였다. 김 등<sup>25)</sup>은 전침과 NOS, NPY 상관관계를 연구하여 NPY의 활성변화는 足三里에서만 보인다고 보고하였다.

曲池(LI11)는 手陽明大腸經의 經穴로서 疏邪熱 祛風濕, 調氣血하는<sup>1,36)</sup> 작용이 있다. Yu Y 등<sup>39)</sup>은 曲池의 전침자극이 prostaglandin E2(PGE2)의 억제를 일으켜 열을 내리는 작용을 한다고 하였고, Zhou RX 등<sup>40)</sup>은 曲池를 자극하여 암환자들의 세포면역기능을 활성화시킨다고 하였다. 또한 정 등<sup>41)</sup>은 足三里에 曲池를 配穴하여 중추신경계의 NO, NPY, VIP에 미치는 영향을 연구하였다.

이에 저자는 SHR의 足三里(ST36), 曲池(LI11)와 任意穴에 침자극을 시행하여 뇌졸중 및 소뇌 영역에서 NADPH-diaphorase와 nNOS의 염색성을 영상분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다.

뇌졸중 영역중 SuG, DLPAG, Pr의 NADPH-diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군은 曲池군보다 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었고, PPTg에서는 족삼리군만 유의한 감소가 있었다. IP와 Gi에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池

군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었으나, 足三里군과 曲池군 사이에는 유의한 차이는 없었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 PPTg를 제외한 모든 영역에서 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다.

소뇌 영역의 NADPH-diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 감소( $\alpha=0.05$ )가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다. 足三里군과 曲池군 사이에는 유의한 차이는 없었다.

뇌줄기 영역중 SuG와 DLPAG의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 曲池군은 足三里군보다 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었고, IP와 Pr의 nNOS 염색성에서는 曲池군만 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다. PPTG와 GI의 nNOS 염색성에서 曲池군과 足三里군은 모두 유의한( $\alpha=0.05$ ) 차이는 없었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 IP를 제외한 모든 영역에서 유의한( $\alpha=0.05$ ) 감소가 있었다.

소뇌 영역의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한( $\alpha=0.05$ ) 차이는 없었고, 任意穴군 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 차이는 없었다.

nNOS의 유도나 up regulation은 peripheral axotomy한 후에 흰쥐의 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion)에서 관찰되었고<sup>42)</sup>, 또한 rhizotomy나 기계적인 손상을 가한 후에 척수신경세포에서도 확인되었다<sup>43)</sup>. 그러나 본 연구에서는 침자극후에 뇌줄기 및 소뇌의 신경세포에서 NOS 효소활성의 감소를 확인하였다. 이러한 결과는 침자극을 특정한 '穴' 자리에 가하면 NOS의 down regulation이 일어날 가능성을 보여주었다.

위의 결과를 통해 경혈의 침자극이 뇌줄기 및 소뇌의 NO system에 영향을 미친다는 것을 관찰할 수 있었고, 경혈의 선택에 따라 NOS의 효소활성이 다르게 나타나는 것을 보여주고 있다.

향후 침자극과 중추신경계의 NO system과의 상관관계를 심도있게 연구한다면 난치성 뇌질환에 침요법을 활용할 수 있는 기초 이론을 제시할수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

경혈의 침자극이 중추신경계의 NO system에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 SHR의 足三里(ST36), 曲池(LI11)와 任意穴에 침자극을 시행한 후 흰쥐 뇌줄기(SuG, DLPAG, PPTg, IP, Pr, Gi) 및 소뇌영역에서 NADPH-diaphorase는 조직화학법으로 nNOS는 면역조직화학법으로 염색성을 측정한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뇌줄기 영역중 SuG, DLPAG, Pr, IP, Gi의 NADPH-diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 감소가 있었고, PPTg에서는 足三里군만 유의한 감소가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 PPTg를 제외한 모든 영역에서 유의한 감소가 있었다.
2. 소뇌 영역의 NADPH-diaphorase 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 감소가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 감소가 있었다.
3. 뇌줄기 영역중 Sug와 DLPAG의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 曲池군과 足三里군은 유의한 감소가 있었고, IP와 Pr의 nNOS 염색성에서는 曲池군만 유의한 감소가 있었다. 任意穴군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 IP를 제외한 모든 영역에서 유의한 감소가 있었다.

4. 소뇌 영역의 nNOS 염색성에서 정상군과 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 차이는 없었다. 任意穴군 비교하여 足三里군과 曲池군은 유의한 차이는 없었다.

## VI. 참고문헌

1. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編著. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 1988 ; 382-4, 407-9, 330-2, 1169-74.
2. Lunderberg T. Does acupuncture work?. IASP. 1996 ; 4(3) : 1-4.
3. 정희철, 한미정, 박상균, 안성훈, 김정식, 손인철. 鍼刺戟에 의해 誘導되는 norepinephrine과 serotonin의 增加가 NO의 생성에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(3) : 367-78.
4. 이정현, 김이화, 이은용. 耳鍼刺戟이 絶食 Stress로 인한 흰쥐 大腦皮質의 NADPH-diaphorase 神經細胞에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(2) : 79-90.
5. Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M. and Snyder S.H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. Neuron. 1991 ; 7 : 615-24.
6. Bredt D.S. and Snyder S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron. 1992 ; 8 : 3-11.
7. Monda M., Viggiano A., Sullo A. and De Luca V.. Nitric Oxide reduces hypophagia induced by threonine free diet in the rat. Brain Res. 1998 ; 808(2) : 129-33.
8. Bredt, D.S., Snyder, S.H. Nitric oxide : a physiologic messenger molecule. Ann Rev Biochem. 1994 ; 63 : 175-95.
9. Brobeck Jr., Tepperman J., Long CNH. Experimental hypothalamic hyperphagia in albino rat. Yale J Biol Med. 1943 ; 15 : 831-53.
10. 이홍민. 足三里 經穴配合에 따른 SHR의 뇌졸중, 小腦 領域에서 NADPH-diaphorase와 nNOS 神經細胞의 變化研究. 서울 : 경희대학교 박사학위논문. 2002.
11. Bucinskaite, V., Theodorsson, E., Crumpton, K., Stenfors, C., Ekblom A., and Lunderberg, T.. Effects of repeated sensory stimulation (electroacupuncture) and physical exercise (running) on open field behavior and concentrations of neuropeptides in the hippocampus in WKY and SHR rats. Eur. J. Neurosci. 1996 ; 8 : 382-7.
12. Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, USA : Proc. Natl. Acad. Sci. 1991 ; 88 : 7797-801.
13. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci. 1991 ; 88 : 2811-4.
14. 조성규, 김창환, 김용석. 전침자극이 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase 와 NPY에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2002 ; 19(3) : 159-74.
15. 손영주, 정혁상, 구자승, 원란, 김용석, 박영배, 손낙원. 흰쥐의 足三里 및 太衝 電鍼刺戟에 따른 腦代謝活性의 變化. 大韓鍼灸學會誌. 2002 ; 19(1) : 159-74.

16. 김종인, 김용석, 김창환 電鍼刺戟이 Spontaneously Hypertensive Rat의 大腦겉질, 뇌줄기, 小腦部位의 Nitric Oxide Synthase 神經細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(4) : 116-24.
17. 고흥균. 흰쥐에서의 骨度分寸에 의한 相應穴位. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(3) : 115-22.
18. Vincent, S.R. and Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience. 1992 ; 46 : 755-84.
19. Paxinos G. and Watson C.. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 3rd edit. SanDiego CA : Academic Press. 1997.
20. 손영주, 원란, 정희상, 김용석, 박영배, 손낙원. 電鍼刺戟에 의한 흰쥐 中樞神經系內 代謝活性 變化의 映像化 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(3) : 56-68.
21. Kenneth K., Kwong J.W., Belliveau D.A., Inna E., Goldberg R.M., Weisskoff B.P., Poncelet D.N., Kennedy B.E., Hoffel M.S., Hong M.J., Thomas J. and Bruce L.R. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. USA : Proc. Natl. Acad. Sci. 1992 ; 89 : 5675-79.
22. Cho Z.H., Chung S.C., Jones J.P., Park J.B., Park H.J., Lee H.J., Wong E.K. and Min B.I. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. USA : Proc Natl Acad Sci. 1998 ; 95(5) : 2670-3.
23. Lee D.S., Lee J.S., Kim K.M., Chung J.K. and Lee M.C.. Functional brain mapping using H215O positron emission tomography (I) : Statistical Parametric Mapping Method. Korean J Nucl Med. 1998 ; 32 : 225-37.
24. Wu M.T., Hsieh J.C., Xiong J., Yang C.F., Pan H.B., Chen Y.C.I., Tsai G.C., Bruce R. Rosen, Kenneth K. Kwong. Central Nervous Pathway for Acupuncture Stimulation : Localization of Processing with Functional MR Imaging of the Brain-Preliminary Experience, Radiology. 1999 ; 212 : 133-41.
25. 김창환, 김용석, 허영범, 유진화. 電鍼刺戟이 SHR 흰쥐 大腦의 NADPH-diaphorase와 Neuropeptide Y 神經細胞에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(4) : 283-91.
26. Giatgen A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet  $\beta$ -Cell. New Physiol Sci. 1999 ; 14 : 49-53.
27. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.. Nitric Oxide : Physiology, Pathology and Pharmacology. Rev. 1991 ; 43 : 109-42.
28. Koh J.Y., Choi D.W.. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by endotoxins, Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J Neurosci. 1993 ; 8 : 2153-63.
29. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. Endothelial nitric oxide synthase : molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. USA : Proc Natl Acad Sci. 1996 ; 89 : 6348-52.
30. Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swidereck K.M., Lee T.D., Ding A., Troscio T., Nathan C.. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science. 1992 ; 256 : 225-8.
31. Morris, B.J., Simpson, C.S., Mundell, S., Maceachern, K., Johnston, H.M. and Nolan, A.M. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase : evidence for a dopaminergic regulation of

- striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology*. 1997 ; 36 : 1589-99.
32. Feldman P.L., Griffith O.W., Sheuhr D.J. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*. 1993 : 26-38.
  33. Huh Y, Heo K, Park C, Ahn H. Transient induction of neuronal nitric oxide synthase in neurons of rat cerebral cortex after status epilepticus. *Neurosci. Lett*. 2000 ; 281 : 49-52.
  34. Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M. and Vincent, S.R.. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. USA : *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1991 ; 88 : 2811-4.
  35. 최용태, 이혜정, 임사비나. 經典鍼灸學. 一中社. 2000 ; 399-400, 430, 485, 561, 1169-74.
  36. 임종국. 鍼灸治療學. 서울 : 集文堂. 1986 ; 278-9, 304-5, 319-20.
  37. Xiong K, Li H, Wang T. Origin of NOS positive nerve fibers at zusanli area in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1998 Apr ; 18(4) : 230-2.
  38. 이혜정, 신형철, 진수희, 손양선, 윤동학, 임사비나. 족삼리의 전침자극이 흰쥐의 중추신경계에서 Interleukin-6의 활성화에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2000 ; 17(4) : 41-50.
  39. Yu Y, Fang JQ, Guo SY, Asano K, Kasahara T, Hisamitsu T. Antipyretic action of peripheral stimulation with electroacupuncture in rats. *In Vivo*. 1998 Sep-Oct ; 12(5) : 503-10.
  40. Zhou RX, Wu B, Zhou MS. Effect of acupuncture on interleukin-2 level and NK cell immunoactivity of peripheral blood of malignant tumor patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1994 ; 14(9) : 537-9.
  41. 정인기, 이재동, 김창환. 足三里 配穴에 따른 電鍼이 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase와 nNOS, NPY, VIP 神經細胞에 미치는 影響. *대한침구학회지*. 2003 ; 20(5) : 118-32.
  42. Verge VMK, Xu Z, Xu XJ, Wisenfield-Hallin Z, Hokfelt T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy : in situ hybridization and functional studies. USA : *Proc Natl Acad Sci*. 1992 ; 89 : 11617-21.
  43. Vizzard MA, Erdman SL, deGroat WC. The effect of rhizotomy on NADPH-diaphorase staining in the lumbar spinal cord of the rat, *Brain Res*. 1993 ; 607 : 349-53.
  44. Bicker G. NO news from insect brains, *Trends Neurosci*. 1998 ; 21 : 349-55.
  45. 이현수. 단순 鍼자극이 흰쥐 대뇌피질의 NADPH-diaphorase와 nNOS, NPY, VIP 신경세포에 미치는 영향. 서울 : 경희대학교 박사학위논문. 2003.