

Original Article

## Kainic acid 유발 간질 생쥐모델에서 少府穴 침치료의 해마 신경세포 보호효과연구

김윤영<sup>1</sup>, 민상연<sup>1</sup>, 김지용<sup>2</sup>, 김장현<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동국대학교 한의과대학 소아과학교실,

<sup>2</sup>강북삼성병원 서초부속의원

### The Neuroprotective Effect of Acupuncture Treatment at *Shaofu* (HT8) on Kainic Acid-induced Epilepsy Mouse Model.

Yoon-Young Kim<sup>1</sup>, Sang-Yeon Min<sup>1</sup>, Ji-Yong Kim<sup>2</sup>, Jang-Hyun Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Dongguk Univ-Seoul, Graduate School of Oriental Medicine

<sup>2</sup>Secho Medical Clinic, Kangbuk Samsung Hospital

**Objectives:** The present study investigated the effects of acupuncture treatment and their mechanism by using the kainic acid (KA)-induced epilepsy mouse model.

**Materials and Methods:** The seizure was induced by an intraperitoneal (i.p.) injection of 30 mg/kg KA, and the acupuncture treatment was subsequently administered to acupoint *Shaofu*(HT8) bilaterally with two pretreatment sessions before injection (total 3 times over 3 days). Twenty four hours after injection, we observed the survival of neuronal cells in the CA3 region of the hippocampus. In addition, the activation of microglia and astrocytes was observed by using CD11b and GFAP immunohistochemistry in the same region.

**Results:** The results indicate that acupuncture treatment reduced the rate of neural cell death in the CA3 region of the hippocampus and decreased the activations of microglia and astrocytes in this region.

**Conclusion:** These results demonstrate that acupuncture treatment protects hippocampal neuronal cell death from KA-induced epileptic seizure by inhibiting the activations of microglia and astrocytes.

*Key Words* : Acupuncture, epilepsy, kainic acid, microglia, astrocyte

### 서론

간질은 뇌신경세포의 과도한 전기 방전에 의해 간질발작이 반복하여 발생하는 질환으로, 간질발작의 임상 양상은 이상운동, 감각장애, 자율신경장애 및 의식장애 등 다양한 형태로 나타난다<sup>1)</sup>. 특히 소아의 뇌는 성장 및 성숙하는 과정에 있어 아직 미숙

한 상태이므로 여러 가지 원인에 의해 간질발작이 쉽게 나타난다<sup>2)</sup>.

소아 간질의 약 75%는 원인을 알 수 없는 특발성이고 나머지 25% 정도에서 출생시 뇌 손상, 저산소증, 뇌 감염증, 선천성 뇌 기형, 뇌 외상 등이 원인으로 알려져 있으며, 치료는 약물 치료가 가장 널리 이용되는데 수 년 간의 장기 복용이 필요하고 이로

• Received : 4 August 2010

• Revised : 3 September 2010

• Accepted : 6 September 2010

• Correspondence to : 김장현(Jang-Hyun Kim)

경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당한방병원 소아과

Tel : +82-31-710-3724, Fax : +82-31-710-3780, E-mail : kjh@dongguk.ac.kr

인한 약물의 독성과 부작용 등의 문제가 발생할 수 있다<sup>3)</sup>.

한의학에서 간질은 癲症, 癲癇의 범주에 속하며 長沙 馬王堆 漢代 古墳(B.C 168)에서 출토된 醫籍중 하나인《五十二病方》에서 “癲者 身熱而數驚 頸脊強而腹大”라 하여 최초로 간질의 증상을 표현하였다. 癲症의 病因으로는 胎驚의 선천적 인자와 驚, 風, 痰, 熱, 食, 癆, 蟲, 虛 등의 후천적 인자가 있으며, 肝火痰熱, 肝風痰濁, 肝腎陰虛, 脾胃虛弱, 氣虛血瘀로 辨證하고 祛痰 順氣 和中 清火를 치료의 원칙으로 한다<sup>1,3)</sup>.

少府穴은 火經인 手少陰心經의 榮穴로 寧神志, 調心氣, 清熱瀉火, 清心除煩하는 효능이 있어 心悸, 煩滿, 神經症, 胸痛 등 心氣의 過不足으로 인한 증상과 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 四肢痙攣, 轉筋 등 火氣의 過盛으로 인한 증상 치료에 사용되는데<sup>4,5)</sup>, 少府穴 침치료에 대한 실험적 연구로 少府穴에 行間, 大敦, 少衝을 配穴한 補瀉鍼法이 뇌혈류역학 및 혈압에 미치는 영향에 관한 연구와<sup>5,7)</sup> 少府 刺鍼이 자율신경계 조절에 미치는 영향에 관한 연구가<sup>8)</sup> 보고되었으나, 少府穴 침치료가 유발 간질 모델에서 뇌신경세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 간질발작으로 인한 해마 신경세포 손상 과정에서 少府穴 침치료의 신경세포 보호 효과를 관찰하기 위하여, Kainic acid(KA) 투여로 간질 발작을 유도하기 전 48, 24시간 및 KA 투여 직후 少府穴에 침치료를 한 다음, 해마에 cresyl violet staining을 실시하여 신경세포를 관찰하고, 면역조직 염색화학법으로 CD11b와 glial fibrillary acidic protein(GFAP)의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 동물

체중 23~25g의 8주령 C57BL/6계 수컷 검정 생쥐 (오리엔트바이오, 한국)를 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 한국 실험 동물 관리 수칙(Guidelines of the

Korean Academy of Medical Sciences)에 따라 실온 (22 ± 3℃)에서 12시간씩 낮과 밤이 바뀌는 환경에서 물과 음식(실험 동물용 쥐사료, 에그리브랜드퓨리나코리아, 한국)을 무제한으로 공급해주어 실험기간 동안 스트레스 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하였다.

#### 2. 실험군 분류

실험군은 무작위로 정상군(SAL군, n=8), 대조군(KA군, n=8), 침치료군(KA+Acup군, n=8)의 3가지 군으로 나누었다. SAL군은 생리식염수 0.1ml를 복부에 주입하였고, 다른 두 군은 간질발작을 유발하기 위하여 KA를 30mg/kg의 용량으로 복부에 주입하였다. KA+Acup군은 KA 주입 전후로 양측 少府穴에 침치료를 하였다.

#### 3. KA 주입

KA(Sigma, St. Louis, MO)를 30mg/kg의 용량으로 마리 당 0.1ml의 생리식염수에 녹이고, BD Ultra-Fine II 0.5ml insulin syringe를 이용하여 복부에 주입하였다. SAL군은 같은 부위에 같은 양의 생리식염수를 주입하였다.

#### 4. 침치료

침치료는 KA 주입 48, 24시간 전, 그리고 주입 직후 총 세 번을 3일 동안 오전 10시에서 10시 30분 사이에 실시하였다. 쥐가 움직이지 않도록 고정시킨 후 少府穴에 0.18 × 8 mm 규격의 침(동방침구사, 한국)을 1mm 깊이로 자침하였으며, 2Hz의 속도로 30초 동안 60회 염전하였다. 少府穴은 upper limb의 4, 5 metacarpal bone 사이를 取穴하였고, 좌측을 먼저 刺鍼한 후 우측을 刺鍼하였다. SAL군과 KA군은 KA+Acup군과 동일한 스트레스를 받게 하기 위하여 1분 동안 움직이지 않도록 고정시킨 후 풀어주었다.

#### 5. 뇌조직의 고정 및 절편

KA 주입 24시간 후, 모든 군의 생쥐의 뇌를 적출

하였다. 생쥐를 ethylether로 마취시키고, 50mM phosphate buffer saline(PBS)으로 관류하여 체내의 혈액을 제거한 후 0.1M phosphate buffer에 4% paraformaldehyde(PFA)를 녹인 용액을 관류하여 조직을 고정시켰다. 그 후 생쥐의 뇌를 적출하여 하루 동안 PFA에 담가 조직을 완전히 고정시키고, 30%의 sucrose 용액에 담근 후 조직을 절편 할 때 까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

뇌 조직은 40 $\mu$ m의 두께로 Cryotome을 사용하여 절편하였으며, 조직 중 해마 부분(-1.82~2.06mm from the bregma)을 선정하여 이 부위를 주로 사용하였다.

## 6. 해마 신경세포의 손상 정도 관찰

신경세포의 손상 정도를 알아보기 위하여 cresyl violet staining을 실시하였다. 조직들을 silane-coated slide에 올려놓은 후 공기 중에서 건조시키고 1% cresyl violet 용액에 1분간 담갔다. 그리고 cold tap water에 담근 후 1% acetic acid 용액에서 10초간 세척하였다. 그 후 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 95%, 100%, 100% 알코올에 순차적으로 담가 탈수시키고, 자일렌에 넣고 mounting fluid를 이용하여 커버글래스를 붙였다.

## 7. 면역조직염색화학법 (Immunohistochemistry)

CD11b와 GFAP의 발현을 관찰하기 위하여 면역조직염색화학법을 실시하였다. CD11b(AbD Serotec, Oxford, UK)와 GFAP(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 일차 항체를 50mM PBS에 희석시킨 용액에 1:1000의 비율로 희석시키고, 조직과 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. 그리고 0.05M PBS로 5분간 세 번씩 세척한 후, 이차 항체인 biotinylated anti-rat 또는 goat IgG(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)를 조직과 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 Avidin Biotin Complex(ABC, Vector Lab., Burlingame, USA)를 만들어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이것을 diaminobenzidine을 이용하여 5분간 발색시키고, 조직을 슬라이드에 부

착한 후 알코올을 이용하여 탈수시키고 mounting fluid를 이용하여 커버글래스를 붙였다. 현미경(Olympus BX51, Japan)과 카메라(Olympus DP70, Japan)를 이용하여 해마의 Cornu Ammonis(CA)3 부위를 촬영하였고, CD11b와 GFAP 양성 세포체들의 발현을 Image-pro plus 5.1(Media cybernetics, MD, USA) 프로그램을 이용하여 평가하였다.

## 8. 자료분석

모든 자료는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다. 그룹 간의 CD11b 및 GFAP의 optical density는 일원분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)과 Scheffe post-hoc test를 사용해 비교하였고, 유의수준은 p 값이 0.05보다 적은 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 해마 CA3 부위에서 少府穴 침치료의 신경세포 보호 효과

SAL군은 해마 전체 부위에서 신경세포의 손상이 관찰되지 않았으나, KA군에서는 해마 전체적으로 신경세포의 손상이 관찰되었으며 특히 CA3 부위에서 뚜렷한 신경세포의 소실과 손상이 관찰되었다. KA+Acup군에서는 신경세포 손상과 소실 정도가 KA군에 비하여 감소하였다(Fig. 1).

### 2. 해마 CA3 부위에서 少府穴 침치료의 미세아교세포 활성화 조절 효과

SAL군의 해마 CA3 부위에서는 CD11b 양성 세포체가 관찰되지 않았으나 KA군에서는 해마 전체에서 CD11b 양성 세포체와 가지를 낸 모양의 활성화된 미세아교세포가 관찰되었으며 특히 CA3 부위에 밀집되어 있었다. KA+Acup군에서 관찰되는 CD11b 양성 세포체는 KA군에 비하여 감소하였다(Fig. 2).

SAL군은 CD11b의 optical density가  $59.15 \pm 3.50$  이었고 KA군은  $80.98 \pm 5.80$ 이었으며 KA+Acup군의

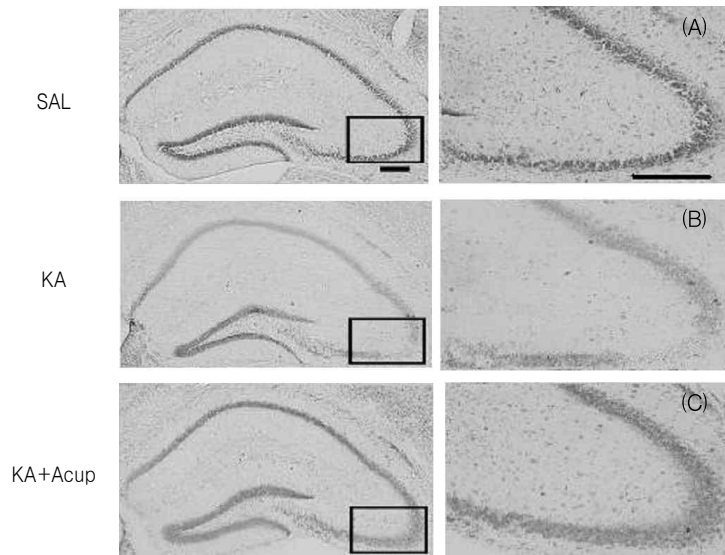


Fig. 1. Photomicrographs showing the cresyl violet stained hippocampus of mice.

No neuronal injury in hippocampus of mice treated with saline (A). Severe neuronal injury and loss in CA3 region of hippocampus of mice treated with KA (B). Marked reduction of neuronal loss and injury in CA3 region of hippocampus of mice treated with KA+Acupuncture (C). The acupuncture treatment was performed at both sides of acupoint *Shaofu* (HT8). The black box represents high magnification photograph about CA3 region of hippocampus. Scale bars mean 100 $\mu$ m.

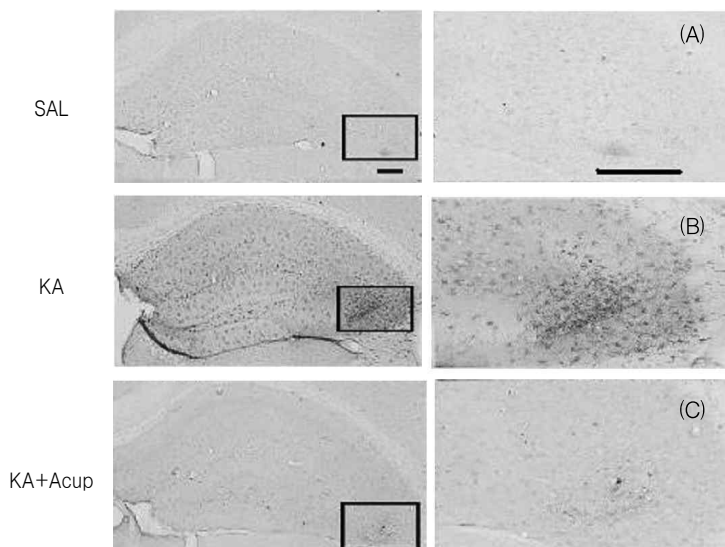


Fig. 2. Photomicrographs showing CD11b-positive cells in CA3 region of hippocampus.

There was no CD11b-positive cell in hippocampus of mice treated with saline (A). CD11b-positive cells evidently increased in hippocampus, especially in CA3 region, of mice treated with KA (B). CD11b-positive cells significantly decreased in hippocampus of mice treated with KA+Acupuncture (C). The acupuncture treatment was performed at both sides of acupoint *Shaofu* (HT8). The black box represents high magnification photograph about CA3 region of hippocampus. Scale bars mean 100 $\mu$ m.

경우  $61.42 \pm 2.80$ 로 KA군에 비하여 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3).

### 3. 해마 CA3 부위에서 少府穴 침치료의 별아교세포 활성화 조절 효과

SAL군의 해마 CA3 부위에서는 GFAP 양성 세포

체가 관찰되지 않았으나 KA군에서는 해마 CA3 부위에 뚜렷한 GFAP 양성 세포체가 관찰되었고, KA+Acup군에서는 GFAP 양성 세포체가 KA군에 비하여 감소하였다(Fig. 4).

SAL군은 GFAP의 optical density가  $39.97 \pm 0.87$ 이었고 KA군은  $51.01 \pm 1.43$ 이었으며 KA+Acup군의

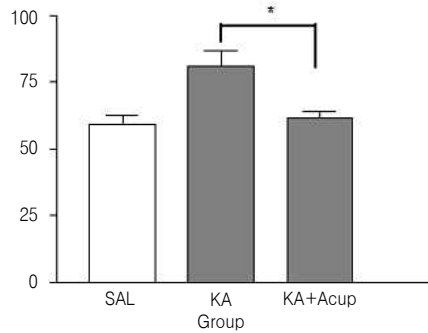


Fig. 3. The analysis of CD11b in CA3 region of hippocampus in mice.

Data are expressed as optical density values (mean ± SEM) of CD11b. Mice were treated with saline (SAL); mice were treated with KA (KA); mice were treated with KA+Acupuncture (KA+Acup). The acupuncture treatment was performed at both sides of acupoint *Shaofu* (HT8). (\* $p < 0.05$ )

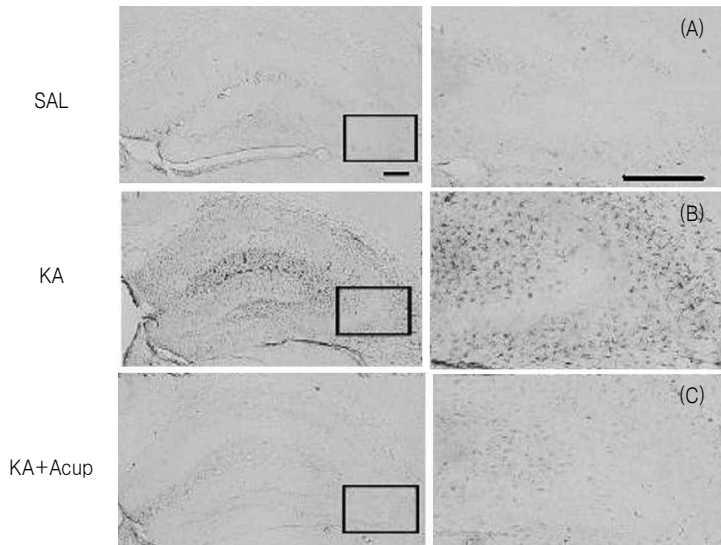


Fig. 4. Photomicrographs showing GFAP-positive cells in CA3 region of hippocampus.

There was no GFAP-positive cell in CA3 region of hippocampus of mice treated with saline (A). GFAP-positive cells strongly increased in hippocampus, especially in CA3 region, of mice treated with KA (B). GFAP-positive cells significantly decreased in hippocampus of mice treated with KA+Acupuncture (C). The acupuncture treatment was performed at both sides of acupoint *Shaofu* (HT8). The black box represents high magnification photograph about CA3 region of hippocampus. Scale bars mean 100  $\mu\text{m}$ .

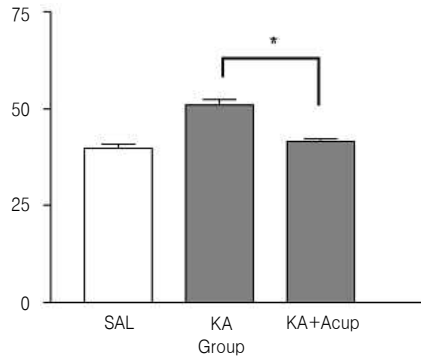


Fig. 5. The analysis of GFAP in CA3 region of hippocampus in mice.

Data are expressed as optical density values (mean ± SEM) of GFAP. Mice were treated with saline (SAL); mice were treated with KA (KA); mice were treated with KA+Acupuncture (KA+Acup). The acupuncture treatment was performed at both sides of acupoint *Shaolu* (HT8). (\*p<0.05)

경우  $41.51 \pm 0.68$ 로 KA군에 비하여 유의하게(p<0.05) 감소하였다(Fig. 5).

### 고찰

간질은 간질발작 증상이 만성적으로 반복해서 일어나는 것으로, 간질발작이란 대뇌 피질 신경원의 자발적이고 과도한 방전에 의해 일어나는 대뇌 기능의 일시적이고 발작적인 병리생리학적 장애를 말한다. 간질발작의 임상 양상은 방전이 일어나는 뇌의 해부학적 부위와 인근 뇌조직으로 확산되는 형태에 따라 다양하게 일어나며, 운동의 일시적인 중단이나 이상운동, 감각 또는 지각장애, 행동장애, 자율신경장애 및 의식장애 등의 형태로 나타난다<sup>1)</sup>.

간질의 발생률은 20세 이전에 발생하는 경우가 전체 환자의 75%를 차지하며 특히 출생 후부터 4세까지가 약 30%로 가장 높고, 우리나라의 경우 매년 약 2만 명 정도의 새로운 환자가 발생하고 있어 현재 25만~50만 명 이상이 어떤 형태로든 간질을 앓고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 소아의 뇌는 발달해 가는 과정에 있어서 형태학적으로나 생리학적으로 조절 기능이 미숙한 상태이므로 사소한 유발 원인에 의하여 발작이 쉽게 발생하며, 간질을 유발하는 뚜렷한 원인 없이 유전적, 체질적인 원인으로 발

생하는 특발성 간질이 약 75% 정도이고 외상, 뇌염, 출생시 손상, 뇌종양, 주산기 저산소증 등 원인이 밝혀진 증후성 간질이 25% 정도를 차지한다<sup>3)</sup>.

치료 방법은 약물 치료, 수술 치료, 식이 요법이 있는데, 가장 널리 이용되는 약물 치료는 병소로부터 비정상적인 방전이 주위로 확산되는 것을 억제하며 최종적으로는 약물을 복용하지 않고도 확산되지 않게 하는 것이 목적으로 환자의 약 80%가 약물 치료로써 간질발작 없이 정상 생활이 가능하지만, 발작이 멈춘 후에도 최소 2~3년은 약물 치료를 계속 해야 하므로 장기간 약물 복용으로 인한 약물의 독성과 부작용 및 약물간의 상호 작용으로 원하지 않는 반응이 나타날 수 있다. 한편 약물 치료로 호전이 없는 난치성 간질 환자에게는 수술 치료와 케톤 생성 식이 요법을 이용하기도 하는데 수술 치료는 시술을 받을 수 있는 환자가 한정되어 있으며 많은 위험 부담이 따르고, 식이 요법은 병원에서 철저한 관리 하에 이루어져야 하며 먹기가 힘들어 구토를 유발하고 비싸다는 단점이 있다<sup>3)</sup>.

한의학에서 간질은 癇症, 癲癇의 범주로, 長沙 馬王堆 漢代 古墳(B.C 168)에서 출토된 醫籍중 하나인 《五十二病方》에서 “癇者 身熱而數驚 頸脊強而腹大” 《靈樞·癲狂病》에서 “癲疾始作 先反僵 因而脊痛”이라 하여 간질의 증상을 표현하였고, 人事不省,

短叫聲, 口中涎沫, 手足搖擗, 目睛上搖, 竄視, 醒後一如常人이 일반적인 증상으로 나타난다<sup>1)</sup>.

소아는 神志가 未定하고 形氣가 健全하지 못하므로 驚怖에 感觸되거나 風邪에 外感되고, 痰熱, 食積所傷 등의 邪氣가 心竅를 阻塞케하고, 神氣紊亂하게 하여 일시적인 발작으로 癇症이 발생하는데<sup>9)</sup>, 巢元方은 風, 食, 驚을, 朱震亨은 痰을 주요 病因으로 언급하였고 李梴은 驚風三發則爲癇이라는 說로 경련의 반복과 소아 간질과의 연관성을 인식하였다. 또한 <素問·奇病論>에서 “病名爲胎病 此得之在母腹中時 其母有所大驚 氣上而不下 精氣并居 故令子發爲癲疾也”라 하여 간질의 발생에 선천적인 요인이 관여한다는 것과 巢元方 <諸病源候論>에서 “癇者小兒病也 十歲以上爲癲 十歲以下爲癇”이라 하여 간질이 소아에 다발하는 질환임을 인식하였고<sup>3)</sup>, 錢乙 <小兒藥證直訣>에서는 “肝主風 本病 哭叫 目直 鈍悶 項急”, “心主驚 本病多哭叫 驚悸 手足動搖 發熱飲水”라 하여 心과 肝이 가장 밀접한 관련이 있다고 보았다<sup>9)</sup>.

癇症治療의 총체적인 원칙은 病因을 제거하고 逆氣를 고르게 하며 발작을 억제하고 臟腑, 經絡, 氣血의 기능을 강화시켜 재발을 방지하는 것이다. 肝火痰熱, 肝風痰濁, 肝腎陰虛, 脾胃虛弱, 氣虛血瘀로 辨證하여 肝火痰熱에는 清熱瀉火, 化痰開竅의 治法을 사용하고 肝風痰濁에는 滌痰熄風, 開竅定癇의 治法을 사용하며 肝腎陰虛에는 滋陰補腎, 潛陽安神的 治法을, 脾胃虛弱에는 健脾益氣, 和胃降濁의 治法을 사용하여 치료한다<sup>1)</sup>.

침치료는 한의학에서 사용되는 중요한 치료 방법의 하나로 통증을 비롯한 여러 증상 완화와 항상성 유지, 질병 예방 및 치료에 활용되는데<sup>10)</sup>, 少府穴은 火經인 手少陰心經의 榮穴로 自經의 성질을 대표하여 清熱瀉火 清心除煩하고 寧神志, 調心氣하는 효능이 있으므로<sup>6)</sup> 萬全 <幼科發揮>의 “心熱爲火 有補有瀉 心爲神舍 易生驚 色見紅潤 脈來大數 此心氣有餘之象 爲實 …… 心惡熱 與肝風相搏則發搐 心屬火 火盛則津液乾而病渴 心藏神 受熱則神亂而不安”을<sup>9)</sup> 근거로 癇症의 치료에 少府穴을 적용해 볼 수 있다.

癇症의 치료에 사용된 少府穴 침치료는 舍岩鍼法에서 肝實로 辨證하여 肝勝格을 사용한 것과 角弓反張의 증상을 肺傷으로 보고 肺正格을 사용한 것에서 볼 수 있는데<sup>1)</sup>, 모두 少府穴을 瀉法으로 刺鍼하여 過盛된 心火를 조절함으로써 癇症을 치료하고자 하였다.

經絡은 氣血이 운행하는 통로이며 五臟六腑와 體表肌肉, 四肢, 五官九竅 등을 상호 연계시키는 통로로써 全身을 滋養하는 작용과 人體의 異常을 反映하는 작용, 外襲病邪나 鍼灸刺戟을 傳導하는 작용을 가진다. 침치료의 효과 기전은 體表의 일정 穴位를 자극하면 經絡이 그 자극을 유관한 部位와 內臟으로 傳導하고, 인체의 氣機가 조절 기능을 발휘하여 氣血의 運行을 원활하게 하고 營衛를 調和시켜 질병이 치료되도록 하는 것이므로<sup>11)</sup>, 少府穴 침치료는 心經의 過不及을 조절하여 心의 有餘, 不足으로 발생하는 제반 증상에 치료 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

침치료의 효과 기전에 관한 실험적 연구에서 양전자방출단층촬영과 fMRI를 비롯한 영상기법을 이용하여 침치료에 의한 시각 및 운동 영역에서의 생리 변화를 확인함으로써 침치료가 뇌의 통제 과정을 통해서 효과를 발현한다는 가설이 제시되었고<sup>12-14)</sup>, 이를 바탕으로 침자극이 NADPH -diaphorase, neuropeptide Y, nitric oxide synthase 신경세포에 미치는 영향에 관한 연구가 이루어지면서 침치료와 중추신경계의 관계가 보고되고 있다<sup>15-20)</sup>.

최근에는 침치료와 신경 조직의 발생에 관한 연구로 해마 영역에서 침치료로 인한 신경세포의 증식에 대한 연구가 있었고<sup>10,21-23)</sup>, 침치료의 신경세포 보호효과에 관한 연구로 파킨슨 병 모델에서 신경세포 사의 억제효과<sup>24)</sup>, 미세아교세포의 활성억제와 염증억제효과<sup>25)</sup>, 신경변성의 예방효과<sup>26)</sup>에 관한 것과 뇌허혈상태에서 침치료가 신경세포의 apoptosis에 미치는 효과<sup>27)</sup>에 관한 연구가 보고되어, 신경세포 손상을 유발하는 뇌 질환에 침치료 적용의 이론적 근거와 치료 가능성이 제시되었다.

한편, Liu 등<sup>28)</sup>과 Jin 등<sup>29)</sup>은 KA 투여로 유발된

간질 모델에서 전침자극의 신경세포사 억제효과에 관한 연구를 보고하였는데, 이는 전침자극이 **gamma amino butyric acid(GABA)**와 유사한 아미노산인 **taurine** 및 **taurine transporter**의 분비와 발현을 증가 시킴으로써 간질발작을 억제하고 신경세포사를 감소시키는 효과가 있음을 밝힌 것으로, 이를 근거로 하여 간질발작으로 유발되는 신경세포의 손상을 억제하고 신경세포를 보호할 수 있는 치료 방법으로써 침치료의 유효성을 기대할 수 있다.

뇌의 변연계 특히 해마의 특정 부위에 있는 신경세포는 열성 경련 또는 허혈성 뇌손상을 받아 쉽게 손상되는 곳으로, 2시간 이상 지속되는 간질발작은 해마 CA3, CA1 부위의 피라밋 세포와 편도핵 등의 특정 신경세포를 사멸시킬 수 있다<sup>30)</sup>. 간질발작은 **glutamate**, **aspartate** 등과 같은 **excitatory amino acid(EAA)**가 EAA 수용체를 통하여 흥분성 신경 전달을 일으키는 과정에서 비정상적으로 과다하게 흥분 전달이 일어난 경우 발생하는데, 간질발작에서 관찰된 뇌손상은 EAA에 의한 뇌손상과 유사하고 **glutamate** 수용체가 분포하는 부위에 현저하게 일어나는 것으로 보아 발작과 연관된 뇌손상에 EAA가 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다<sup>31)</sup>.

KA는 EAA인 **glutamate**의 유사체로서 뇌실뿐만 아니라 복강에 주사하여도 간질발작을 일으키는 특성이 있고, **glutamate**가 빠르게 흡수되어 연구하기에 쉽지 않은데 비해 KA는 세포내로 흡수되는 속도가 느릴 뿐 아니라 **glutamate**보다 50배 강한 활성을 보이며 신경세포만을 선택적으로 파괴하여 뇌의 변연계 특히 해마와 편도체의 신경세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있어 간질발작 연구를 위한 동물 실험에 많이 이용되고 있다<sup>30-35)</sup>.

또한 KA의 투여는 간질발작을 유발하여 해마 신경세포의 선택적인 세포사를 유도할 뿐만 아니라 신경아교세포의 활성화를 유발시키고, 이 과정에서 뇌 조직에 염증 반응이 일어나 신경세포의 손상을 가속화하므로 간질발작과 신경세포의 손상 및 신경아교세포의 상호 역할을 연구하기에 좋은 실험모델이 되어 다양한 연구가 이루어지고 있다<sup>36-48)</sup>.

본 실험에서는 간질발작으로 인한 신경세포 손상 과정에서 少府穴 침치료의 신경세포 보호 효과를 알아보기 위하여, KA 30mg/kg의 용량을 복강내에 투여한 모델과 KA 대신 생리식염수 0.1 ml를 투여한 모델, KA 투여 48, 24시간 전과 KA투여 직후 양측 少府穴에 침치료를 시행한 모델을 만들고, 각 모델의 해마 CA3 부위에 나타난 신경세포의 손상 정도와 미세아교세포 및 별아교세포의 활성 정도를 관찰하였다.

신경세포의 손상 정도를 관찰하기 위해 KA 및 생리식염수 투여 24시간 후 뇌 조직에 **resyl violet staining**을 실시하였다. 생리식염수를 투여한 군에서는 해마 전체에 신경세포의 손상이 일어나지 않은 반면 KA를 투여한 군에서는 해마 전체적으로 신경세포가 손상된 모습이 관찰되었으며 특히 CA3 부위에서의 손상이 심하였고 부분적인 신경세포의 소실이 관찰되었다. 그러나 KA투여 전후에 침치료를 시행한 군에서는 신경세포의 소실은 나타나지 않았으며 손상 정도가 KA만 투여한 군에 비하여 감소하였고 생리식염수를 투여한 군과 유사한 상태를 나타냈다. 이는 KA 투여로 유발된 간질발작 상태에서 少府穴 침치료가 해마 신경세포의 손상을 억제하였음을 의미하며, 침치료로 신경세포 보호 효과를 얻을 수 있음을 보여주는 것이다.

KA 투여로 활성화된 미세아교세포와 별아교세포는 염증 반응을 일으키는 **cytokine**을 분비하여 신경세포의 손상을 가속화시킨다. 미세아교세포는 뇌에 상주하는 대식세포로 정상 뇌에서는 면역 감시 기능을 수행하지만, 신경 손상이나 면역 반응시에 즉시 활성화되어 활성 아메타양 미세아교세포로 형태학적 변화를 일으키고 다양한 전염증성 신경독성 인자들을 생성하며 주요 조직적합성 복합체와 보체 수용체 같은 다양한 표면 수용체를 상수 조절시키므로<sup>49)</sup> 활성화된 미세아교세포는 표면 항원인 **CD11b**에 대한 항체를 사용하여 관찰할 수 있다<sup>41-44)</sup>.

또한 신경세포의 괴사는 반응성 별아교세포증을 유발하여 활성화된 별아교세포에서 **GFAP**를 증가시키는데, **GFAP**는 정상적인 성숙 별아교세포의 세포



질과 돌기에 존재하는 신경교 특이 단백질의 일종으로 독성에 대한 반응 부위에 국한되어 증가하며 영구적이지 않은 특징을 지니고 있어 신경독성의 대표적인 지표 물질로 인식되므로 GFAP의 항체를 사용하여 활성화된 별아교세포를 관찰할 수 있다<sup>37-43</sup>.

면역조직염색화학법을 이용하여 CD11b 양성 세포체와 GFAP 양성 세포체를 관찰하여 少府穴 침치료가 미세아교세포와 별아교세포의 활성화에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다. 생리식염수를 투여한 군에서는 해마 전체적으로 CD11b 양성 세포체와 GFAP 양성 세포체가 관찰되지 않았으나 KA를 투여한 군에서는 해마 전체에서 CD11b 양성 세포체와 가지를 낸 모양의 활성화된 미세아교세포가 관찰되었으며 특히 CA3 부위에서 뚜렷한 CD11b 양성 세포체와 GFAP 양성 세포체가 관찰되었다. 그러나 KA 투여 전후에 침치료를 시행한 군에서는 CD11b 양성 세포체와 GFAP 양성 세포체가 KA만 투여한 군에 비하여 감소하였다. 이는 간질발작으로 신경세포의 손상이 유발되는 과정에서 少府穴 침치료가 미세아교세포와 별아교세포의 활성을 차단시키고, 이들 세포의 활성화 결과로 유발되는 염증 반응을 억제함으로써 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 보여주는 것이다.

이상의 결과들은 KA 유발 간질 생쥐모델에서 少府穴 침치료가 해마 신경세포의 손상을 감소시키고 보호하는 효과가 있음을 보여주었으며, 이러한 효과는 미세아교세포와 별아교세포 활성의 억제와 관련이 있음을 시사하고 있다. 이러한 少府穴 침치료의 신경세포 보호 효과 결과는 간질의 치료 방법으로써 침치료의 가능성을 뒷받침하며, 간질 치료에 침치료의 활용도를 높일 수 있는 근거가 될 것으로 기대된다.

## 결론

간질발작으로 인한 신경세포 손상 과정에서 少府穴 침치료의 신경세포 보호 효과를 알아보기 위하여, KA 투여로 간질발작을 유발하기 전 48, 24시간 및 KA 투여 직후 少府穴에 침치료를 시행한 후, 해

마 신경세포에 cresyl violet staining을 실시하여 신경세포의 손상 정도를 관찰하고, 면역조직염색화학법으로 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 지표로 사용되는 CD11b와 GFAP의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 少府穴 침치료는 해마의 신경세포 손상을 감소시켰다.
2. 少府穴 침치료는 해마 CA3 부위에서 CD11b 양성 세포체 발현을 유의하게 감소시켰다.
3. 少府穴 침치료는 해마 CA3 부위에서 GFAP 양성 세포체의 발현을 유의하게 감소시켰다.

## 참고문헌

1. 김택곤 편저. 동의간질학. 서울:서원당. 1998:23-8, 77-91, 107-116, 291-309.
2. 안효섭. 소아과학 제8판. 서울:대한교과서(주). 2005:1060-75.
3. Na WK, Han KH, Lee HJ, Park EJ. A case report of epileptic children. The journal of Korean Oriental Pediatrics. 2004;18(1):131-8.
4. 임종국. 침구치료학. 서울:집문당. 2001:333.
5. Sin DH, Jo ML. Experimental Study of Dadun (LR1), *Shaofu*(HT8) Reduction in Acupuncture on the Improvement of Cerebral Hemodynamics. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2004;21(1):33-50.
6. Sin JC, Yu CL, Jo ML. Effects of Xingjian(LR2), *Shaofu*(HT8) by Reinforcing and Reducing on the Regional Cerebral Blood Flow and Mean Arterial Blood Pressure in Normal Rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2003;20(6):190-200.
7. Park EJ, Cho MR. Experimental Study of Dadun(LR1), Shaochung(HT9), *Shaofu* (HT8) Reinforcement in Acupuncture on the Improvement of Cerebral Hemodynamics. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2007;24(1):111-25.

8. Kim JS, Hwang K, Bae KT, Nam SS, Kim YS. Effect of Acupuncture for Mental Stress on Short-term Analysis of Heart Rate Variability (HRV). The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2004;21(5):227-39.
9. 김덕곤, 김윤희, 김장현, 박은정, 백정환, 이승연 외. 동의소아과학. 서울:도서출판 정담. 2002:365-405.
10. Woo HS, Lee JD, Kim CH. The Effects of electroacupuncture stimuli to the Doublecortin and PSA-NCAM positive cells in the Dentate Gyrus of spontaneously hypertensive rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2003;20(2):123-34.
11. 전국한의과대학 침구, 경혈학교실 편저. 침구학. 서울:집문당. 1994:53-8.
12. Sohn YJ, Won R, Jung HS, Kim YS, Park YB, Sohn NW. 2 - DG Autoradiographic Imaging of Brain Activity Patterns by Electroacupuncture Stimulation in Awake Rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2001;18(3):56-68.
13. Park JB, Park HJ, Lee HJ. The methodological study of the change of Brain activity with acupoint stimulation using functional MHI -- focusing on visual areas. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 1997;14(1): 266-72.
14. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, et al. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc, Natl, Acad, Sci, USA. 1998;95(5):2670-3.
15. Kim CH, Kim YS, Huh YB, Yoo JH. Effect of electroacupuncture on NADPH - diaphorase and neuropeptide Y neurons in cerebral cortex of SHR rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 1999;16(4):283-91.
16. Kim JI, Kim YS, Kim CH. Difference in NOS between 2Hz and 100Hz EA in cerebral cortex , brain stem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2001;18(4): 116-24.
17. Jeong IG, Lee JD, Kim CH. Effect of Joksamni combination on NADPH- diaphorase, neuronal Nitric Oxide Synthase, Neuropeptide Y and Vasoactive Intestinal Peptide in the cerebral cortex of Spontaneously Hypertensive Rat. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2003;20(5):118-32.
18. Lee HM, Kim CH, Kim YS. Acupoint combination-related changes of NADPH-d diaphorase and neuronal nitric oxide synthase in the brainstem and cerebellum of spontaneously hypertensive rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2003;20(6):148-59.
19. Kim JD, Kang SK, Kim CH. The effects of acupuncture on NADPH- diaphorase and nNOS in the brain stem and cerebellum of SHR. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2004;21(5):1-12.
20. Kim DH, Nam SS, Kim CH. Effect of Electroacupuncture Stimulation on Activity of Neuronal NOS in Rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2006;23(5): 199-206.
21. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh YB, Chung JH, Seo JC, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. Neuroscience Letters. 2001;297(1):21-4.
22. Park JH, Lee JD, Kim CH. Effects of Acupuncture and Electroacupuncture on the Doublecortin, PSA-NCAM and pCREB Expression in the Brain of Spontaneously Hypertensive Rats. The journal of Korean acupuncture & moxibustion society. 2004;21(3):61-81.
23. Park HJ, Lim S, Lee HS, Lee HJ, Yoo YM, Lee HJ, et al. Acupuncture enhances cell proliferation

- in dentate gyrus of maternally-separated rats. *Neuroscience Letters*. 2002;319:153-6.
24. Park HJ, Lim S, Joo WS, Yin CS, Lee HS, Lee HJ, et al. Acupuncture events 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. *Experimental Neurology*. 2003; 180:92-7.
  25. Kang JM, Park HJ, Choi YG, Choe IH, Park JH, Kim YS, et al. Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *BRIAN RESEARCH*. 2007;1131:211-9.
  26. Liang XB, Liu XY, Li FQ, Luo Y, Lu J, Zhang WM, et al. Long-term high-frequency electroacupuncture stimulation prevents neuronal degeneration and up-regulates BDNF mRNA in the substantia nigra and ventral tegmental area following medial forebrain bundle axotomy. *Molecular Brain Research*. 2002;108:51-9.
  27. Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Shin MS, Min BI, et al. Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region in gerbils. *Neuroscience Letters*. 2003;347:72-5.
  28. Liu J, Cheng J. Changes of amino acids release in rat's hippocampus during kainic acid induced epilepsy and acupuncture. *Acupuncture Research*. 1995;20(3):50-4.
  29. Jin HB, Li B, Gu J, Cheng JS, Yang R. Electro-acupuncture improves epileptic seizures induced by kainic acid in taurine-depletion rats. *Acupuncture Electrotherapy Research*. 2005;30 (3-4):207-17.
  30. Lee EJ, Kim JW, Kwak MJ, Han SM, Lee JH, Hong HN, et al. Protective Effect of Etomidate on Kainic Acid-induced Neurotoxicity in Rat Hippocampus. *The Journal of the Korean of anesthesiologists*. 2001;40:794-801.
  31. Oh YC, Lee MK, Kim JY. Convulsion and Neurodegeneration by Kainin Acid are Related to N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *The Kyungpook university medical journal*. 1993;34(2):107-15.
  32. Lee SH, Seo JB, Lee HS. The effect of nimodipine in preventing the hippocampal neuronal death caused by kainic acid-induced seizures. *Chungbuk medical journal*. 2000;10(1):13-9.
  33. Jessica PM, Oswald S. Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains. *European Journal of Neuroscience*. 2006;24:2191-2202.
  34. Krisztina M, Federico M, Michaela E, Matthias E, Heike B, Ruth W, et al. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*. 2006;51:455-66.
  35. Massimo R, Silvio C, Giovanni G, Cristina R, Jan AG, Eleonora A, et al. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain : functional implications for pharmacoresistance. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(14):5833-9.
  36. 조계선. 생쥐 해마에서 kainic acid에 의한 세포사 유발 후 interleukin-18,  $-1\beta$  및 caspase-1의 발현에 대한 연구[박사학위논문]. 서울: 서울대학교 대학원. 2004.
  37. 이계훈. 편도핵내로 투여한 kainic acid에 의한 해마의 손상에서 R-PIA의 전치치가 vimentin 및 GFAP의 면역조직반응변화에 미치는 영향에 관한 연구[박사학위논문]. 서울: 한양대학교 대학원. 1998.
  38. Sola C, Tusell JM, Serratos J. Calmodulin is expressed by reactive microglia in the hippocampus of kainic acid-treated mice. *Neuroscience*. 1997;81(3):699-705.
  39. Caterina B, Filippo G, Massimo T, Rosario S, Warren DH. Differential expression of S100 $\beta$  and glial fibrillary acid protein in the hippocampus after kainic acid-induced lesions and mossy fiber sprouting in adult rat. *Experimental Neurology*. 2000;161:317-29.

40. Shin HJ, Lee JY, Son EY, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, et al. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice. *Neuroscience Letters*. 2007;416:49-54.
41. Massimo R, Carlo P, Marisa A, Cristina R, Teresa R, Daniele C, et al. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiology of Disease*. 2003; 14:494-503.
42. Teresa R, Massimo R, Carlo P, Cristina R, Jana V, Solomon LM, et al. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*. 2005;46(5): 113-7.
43. Lee HK, Choi SS, Han EJ, Lee JY, Kwon MS, Shim EJ, et al. Role of nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of kainic acid-induced hippocampal cell death in mice. *Brain Research Bulletin*. 2004;64:309-17.
44. Duan RS, Chen Z, Dou YC, Hernan CQ, Inger N, Abdu A, et al. Apolipoprotein E deficiency increased microglial activation/CCR3 expression and hippocampal damage in kainic acid exposed mice. *Experimental Neurology*. 2006;202:373-80.
45. Eun SY, Hong YH, Kim EH, Jeon HJ, Suh YH, Lee JE, et al. Glutamate receptor-mediated regulation of c-fos expression in cultured microglia. *BBRC*. 2004;325:320-7.
46. Sanae H, Masahiro Y, Hiroshi N, Masayoshi M, Kensaku M. Enhanced cell-to-cell contacts between activated microglia and pyramidal cell dendrites following kainic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus. *Journal of Neuroimmunology*. 2007;186:75-85.
47. Tamiwaki Y, Kato M, Araki T, Kobayoshi T. Microglial activation by epileptic activation through the propagation pathway of kainic acid-induced hippocampal seizures in the rat. *Neuroscience Letters*. 1996;217:29-32.
48. Hiroyuki M, Katsuaki S, Norio M, Osamu Y. Occurrence of complement protein C3 in dying pyramidal neurons in rat hippocampus after systemic administration of kainic acid. *Neuroscience Letters*. 2006;409:35-40.
49. Ryu SY, Kim JS, Choi YB, Han SR, Park JW, Park SK, et al. The Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Dopaminergic Neurons and Microglial Activation in Parkinsonian Rat Model Induced by 6-Hydroxydopamine. *Journal of the Korean neurological association*. 2005;23(3):368-73.