



- 조미숙
- 나사렛대학교 물리치료학과

The Effect of Electroacupuncture on NeuN Expression in Spinal Cord in Sciatic Nerve Injured Rat

Mi-Suk Cho, PT, PhD

Department of Physical Therapy, Korea Nazarene University

Purpose: The purpose of this study was to investigate the effect of electroacupuncture on NeuN expression in ventral horn motor neurons of spinal cord, changes in pain threshold changes in motor function in rats with partially dissected sciatic nerves.

Method: A total of 120 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups, a control group and a group administered electroacupuncture at ST36, LI11 and SP9 with 120 Hz and 0.5 mA. Animals were sacrificed on days 1, 3, 7, 14 and 28 after nerve injury (the sciatic nerve was partially dissected). The pain threshold was recorded by an Analgesia? meter and a BBB? score was calculated for motor function. After preparing lumbar spinal cord slide sections, they were immunostained with NeuN antisera (1:2,500).

Results: The numbers of NeuN immunoreactive neurons in the electroacupuncture group was increased compared to the control group. The numbers of NeuN immunoreactive neurons on days 14 and 28 day were different ($p < 0.05$), as were the numbers on days 3 and 7 ($p < 0.01$). The pain threshold BBB score for the electroacupuncture group was higher than for controls.

Conclusion: The increase in pain threshold, BBB-score and number of NeuN immunoreactive neurons in ventral horn motor neurons of spinal cord in rats with nerve dissection showed that electroacupuncture can attenuate pain transduction and increase motor function. Also, NeuN was a good marker for identifying the degree of nerve cell loss after nervous system injury.

Key words: Electroacupuncture, Pain, NeuN, Ventral horn, Spinal cord, BBB score

논문접수일: 2010년 11월 15일

수정접수일: 2011년 1월 28일

게재승인일: 2011년 2월 11일

교신저자: 조미숙, mscho@kornu.ac.kr

1. 서론

중추신경계에서 신경세포의 소실은 매우 복잡하고 다양한 메커니즘이 관여하는 과정을 통해 발생한다.^{1,2} 입체적인 신경세포 수의 계수는 신경세포의 양적 평가에서 표준적 지표로 활용되고 있으며, 이를 통해 소실된 신경세포의 특정유형을 결정하는데 바람직한 결과를 산출할 수 있다.³ 전형적으로 선택적 특정 신경세포의 소실의 관찰은 전체 신경세포의 소실 중 다른 유형의 신경세

포 소실과의 비교를 통해 특정 질환에서 특정물질의 발현에 따른 기능변화에 영향을 미치는 주요 요인으로 추정할 수 있으므로, 중추신경계 변성의 연구의 일환으로 특정 신경세포 수의 양적 변화 및 그 발현물질인 표식자의 변화 추이를 추적하는 것은 관련 연구에서 매우 유용한 도구로서 활용되고 있다.⁴ 중추신경계에서 신경세포와 신경아교세포를 구별하기 위해서 neuron specific enolase, GFAP 등의 neurofilament protein, microtubule associated protein-2 (MAP-2) 및 calbindin 등의 표식자를 이용한

면역조직화학적 동정이 유용한 수단이나 이들 표식자 대부분이 신경세포 뿐만 아니라 신경아교세포에서도 일부 관찰되어 신경세포의 소실을 관찰하는 데는 한계가 있다.⁵ 이 한계점을 극복하기 위해 neuron specific nuclear protein (NeuN)에 대한 단클론 항체가 개발되었는데, NeuN은 사람, 설치류 및 조류 등의 대부분의 신경세포의 핵과 세포질에서 발현되지만, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 별아교세포(astrocyte) 및 작은아교세포(microglia) 등의 신경아교세포에서는 발현되지 않아 신경세포 손상 시 신경세포의 소실을 조직병리의 양태에 따라 정량적으로 검증할 수 있는 매우 유용한 표식자로 활용되고 있다.^{6,7}

즉 그 예로 뇌허혈, 저산소증 및 신경계창상(neurotrauma) 등의 병적 상태에서 NeuN에 의해 많은 신경세포의 소실이 관찰, 보고된 바 있다.⁸ 그러나 이에 반해 일부의 신경세포는 NeuN 면역반응성의 소실을 보이나 통상적인 H&E 염색에 의해 병변을 보이지 않는 양상을 띠는 신경세포도 다수 발견되고, 노화에 따른 척수내 신경세포에서 NeuN의 발현이 소실되지만 다른 신경세포를 동정할 수 있는 표식자들은 여전히 존재한다는 보고⁹ 등과 비교해 볼 때 NeuN를 신경세포 소실의 표식자로 활용하는 데는 아직 명확히 규명되고 있지 않다고 사료되어 이를 해결하기 위한 연구의 진행이 시급한 실정이었다.

한편, 전침은 다양한 질병의 치료 및 예방과 및 통증조절을 위해 널리 통용되고 있는데 진통작용, 항상성 촉진, 뇌순환 혈류 개선뿐만 아니라 미세순환망의 변화 유발 등의 다양한 효과를 지니고 있으며 중추신경계에서 신경전달물질의 조절에도 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 전침자극의 효과는 전기자극의 강도, 빈도 및 기간의 복합작용에 의해 결정되며 자극강도와 기간 사이에는 반비례 관계, 즉 강도가 강할수록 기간이 짧아져도 자극으로 유효하다⁸. 또한 빈도가 증가될수록 가중현상(summation)이 쉽게 일어나므로 고빈도 자극시에는 자극강도가 낮아져도 유효자극이 될 수 있다.¹² 그 예로 고빈도(100 Hz) 자극시에는 짧은 기간(0.5 msec)과 저강도(0.1mA, 0.5 mA) 자극을, 저빈도(2 Hz) 자극시에는 긴 기간 (1 msec)과 고강도(1 mA, 3 mA)의 전침자극을 시행하여 유해반응이 억제되어 자극기간과 강도 혹은 자극빈도와 강도는 서로 반비례한다.¹³

통증이란 조직손상의 결과이며, 손상부위와 그 주위는 통증 유발의 근원지가 된다.¹⁴ 통증의 발생기전을 연구하기 위해 압박 손상 모델, 부분적 신경 결찰 모델, 척수신경 결찰 모델 및 공동신경 동결 모델 등 여러가지 통증 연구 모델이 개발되었지만 본 연구에서는 공동신경을 부분 절제하는 모델을 사용함으로써 임상에서 공동신경통(sciatica)에 보다 근접한 조건을 마련하였다. 전침에 의한 진통효과에 대한 연구로는 complete Freund' adjuvant를 주입하여 관절염을 유발시킨 뒤 환도혈에 저빈도,

0.5 mA로 자극하였을 경우의 진통효과¹⁵, Substance P와 trk A가 0.5. mA 전침자극군에서 감소, complete Freund's adjuvant를 피하주입하여 통증을 유발시킨 뒤 족삼리에 저빈도(2 Hz)-고강도(3 mA)와 고빈도(100 Hz)-저강도(0.5 mA)로 전침자극하여 유해자극반응의 억제 및 자극강도가 강할수록 억제효과의 증가 등이 보고되고 있으나¹⁶ 공동신경 부분 절제 후 신경세포 회복의 표식자로 NeuN의 발현변화와 통증억제 효과를 관찰한 연구는 전무한 실정이었다. 따라서, 본 연구는 말초신경 절단의 국소적 손상이 중추신경계에 역행성 손상을 야기시키므로, 공동신경의 부분 절제 후 전침자극에 의한 신경가소성을 관찰하기 위해 말초 손상 후 척수 요수부 앞뿔 내 운동신경세포의 정량적 변화를 NeuN를 표식자로 이용하여 관찰하고, 이에 관련하여 동물의 뒷다리의 기능 회복을 측정하는 도구인 BBB-test(Basso, Bearti, Bresnahan test)를 이용한 운동학적 평가 및 통증의 변화를 관찰하여 전침이 중추신경계의 손상 후 회복에 미치는 영향을 규명하고, 신경손상 후 회복의 지표로 통상적으로 활용되는 신경세포의 소실을 정량적으로 산출하는데 NeuN가 유용한 표식자로 활용될 수 있는지를 규명하기 위해 수행되었다.

II. 연구방법

1. 연구대상

본 실험에서는 동일한 조건에서 사육된 생후 8주 된, 체중 250~300 g의 건강하고, 신경학적으로 이상이 없는 성숙한 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐 120마리를 사용하였다. 실험동물은 전침자극군과 대조군으로 구분하였고, 전침자극군은 다시 1 일군, 3 일군, 7 일군, 14 일군 및 28 일군으로 나누어 각기 20마리씩 무작위 배분하여 밤낮주기(12 시간 light/12 시간 night)가 조절되는 실험동물실에서 사육하였다. 실험기간 중 먹이와 물은 무제한 공급하였고, 실내온도는 22~25°C, 평균습도는 50%, 표준편차 2%로 최적의 상태를 유지하였다.

2. 실험방법

1) 통증 유발 방법

국소적 신경손상 유발을 위해 실험동물을 마취 후 엉덩관절의 2 cm 원위뒷부분에서 4 cm의 부절개선을 생성한 뒤 피하조직과 근육을 둔성 분리하여 공동신경을 노출시킨 뒤 부분 절제를 시행하였다.

2) 전침자극 방법

전침은 PG-7형(Ito사, 일본)을 사용하였고, disposable acupuncture needle(0.35 mm gauge, 40 mm length, 7 mm depth, 서

원, 한국)를 사용하여 경혈점 좌우측에 전기선을 연결하고 자극을 주었다. 실험동물의 체표상에 인체의 족삼리(ST36), 곡지(LI11), 음릉선(SP9)에 상응하는 부위에 배혈하였다. 실험은 대조군(전침을 사용하지 않은 군), 전침자극군(족삼리+곡지+음릉선에 전침을 시행한 군)으로 구분하여 설정하여 시행하였다. 전침시술은 뒷다리의 경골조면과 비골두를 기준으로 하여 인체와 상응한 곳에서 취하였다. 전침자극을 3% isoflurane 흡입마취하(Royal Multi-Plus, Medical Co, 미국)에서 30분간 좌우를 교대로 편측의 족삼리와 족삼리 하 0.5 cm 부위, 음릉선과 음릉선 하 0.5 cm 부위, 곡지와 곡지 하 0.5 cm에 자침하고 고빈도(120 Hz), 저강도(0.5 mA)로 자극하였다. 전침자극은 궁둥신경 부분 절제 후 매일 10분씩 5회(각 자극마다 2분간 단락) 시행하였고, 전침자극이 진행된 1일, 3일, 7일, 14일 및 28일은 자극 기간을 의미하며 해당 시기에 각기 척수의 조직표본을 제작하였다.

3) 진통효과 측정

전침자극에 따른 진통효과는 Randall-Sellitto 법에 따라 Analgesy-meter(Uro Basile, 이탈리아)로 궁둥신경이 부분 절제된 부위 피부에 가압하여 통증을 느끼는 반응에 해당하는 무게를 측정하였다.

4) 운동기능 검사

궁둥신경 부분 절제에 의한 신경손상 유발 후 전침자극이 운동기능 회복에 미치는 효과를 검증하기 위해 BBB-test(Basso, Breatti, Bresnahan test)를 시행하였다. BBB-test는 실험동물 뒷다리의 운동기능 회복의 추이를 검증하는 도구로서 회복 정도의 단계에 따라 총 21 점으로 평가되어지는데, 점수가 높을수록 운동기능이 원활히 수행되고 있음을 의미한다.

(5) 조직처리

실험동물들은 각 해당시간에 ketamine hydrochloride(케타라, 50 mg/ml, 바이엘, 한국)와 xylazine(롬폰, 20 mg/ml, 바이엘, 한국)을 체중 100 gm 당 0.15 ml 및 0.05 ml씩 섞어 복강 내 주사하여 마취시킨 뒤 심장을 통해 0.1M phosphate buffer에 희석시킨 4% paraformaldehyde lysine eriodate (PLP)로 관류고정을 시행하고, 동일 고정액에 적출된 척수 요수부를 담가 4일간 후고정(4°C, overnight)을 시행하였다. 이어 동결보호 Cryoprotection, 20% sucrose, 4°C, overnight)를 거친 후 Reichert-Jung cryostat(Reichert-Jung, 독일)와 vibratome slice machine(Reichert-Jung, 독일)을 이용해 30 μ m의 관상연속동결절편을 제작하여 -70°C에 보관하였다. 제작된 조직절편은 chrom-alum이 코팅된 현미경용 조직 슬라이드 위에 올려 통상적인 탈수와 투명화 과정을 거쳐 cresyl violet 염색을 통해 Olympus 광학현미경

하(Olympus, 일본)에서 척수 요수부 앞뿔의 신경세포의 형태학적 특징을 관찰하였다.

6) 면역조직화학염색

NeuN에 대한 대한 일차항체인 mouse anti-NeuN(1:2500, Sigma, 미국)를 이용하여 아래와 같은 방법으로 면역조직화학염색을 수행하였다. 일차항체에 조직절편을 담가 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰는데 일차항체의 희석은 0.1M PB에 1% normal goat serum과 0.3% TritonX-100이 혼합된 것을 사용하였다. 조직절편을 실온에서 10분간 3회 0.1 M PB로 세척한 후 2차항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector, 미국)에 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 0.1M PB로 15분간 3회 세척한 뒤 ABC 용액에 실온에서 1시간 반응시키고, DAB에 과산화수소수를 0.005% 되게 첨가하여 갈색반응을 실시하였다. 면역조직화학염색이 끝난 조직들은 통상적으로 탈수, 투명화과정을 거친 뒤 슬라이드 위에 올려 Permount로 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 갈색반응을 보인 신경세포들을 Image-Pro analyzer (Image-Pro, 미국)를 이용해 pixel 단위로 계수하였다.

3. 자료분석

실험결과 자료의 통계처리는 SPSS-PC ver17.0 for windows 프로그램을 이용하여 NeuN 면역양성세포의 변화 및 통증역치의 변화는 독립표본 t-검정을, BBB 점수는 대응표본 t-검정을 실시하였다. 또한, 통증 역치의 변화와 BBB 점수는 반복측정분산(repeated measure ANOVA)을, NeuN의 면역양성 반응의 변화는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 각 군 간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 본 연구 결과의 의 통계학적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결과

1. 진통 효과

Analgesy-meter를 이용하여 통증역치를 측정된 결과, 전침자극을 시행한 실험군이 시행하지 않은 대조군이 보다 높은 통증에 대한 역치를 보여 주었다. 즉, 1일군에서 대조군의 통증역치는 7.7 ± 3.3 였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 33.2 ± 5.5 이었다. 3일군에서 대조군의 통증역치는 16.2 ± 3.4 였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 31.6 ± 4.7 였고, 7일군에서 대조군의 통증역치는 14.6 ± 4.7 였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 29.8 ± 3.9 이었다. 또한 14일군에서 대조군의 통증역치는 15.6 ± 3.1 였으나, 전

침자극을 시행한 실험군은 25.0±6.이었고, 28일군에서 대조군의 통증역치는 13.8±3.6였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 12.3±9.8이었다. 즉, 전침자극 후 대조군에 비해 3일군에서 통증역치가 현저히 높게 나타났으며, 이후 대조군이 신경손상에 적응하여 통증역치가 다소 증가하게 되어 통증 감소 비율은 시간 경과에 따라 다소 감소하였다. 전침자극군의 각 시간대 별 통증역치의 통계학적 유의성을 검증하기 위해 독립표본 t-검정을 실시한 결과 유해자극에 의한 통증 유발 7일군, 14일군 및 28일군에서(p<0.05), 1일군과 3일군(p<0.01)에서 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었다. 전침자극군에 대한 반복측정분산 분석을 실시한 바(F=175.92, p<0.01) 시간대별 변화 사이에서 통계학적 유의성 또한 관찰되었다(Figure 1).

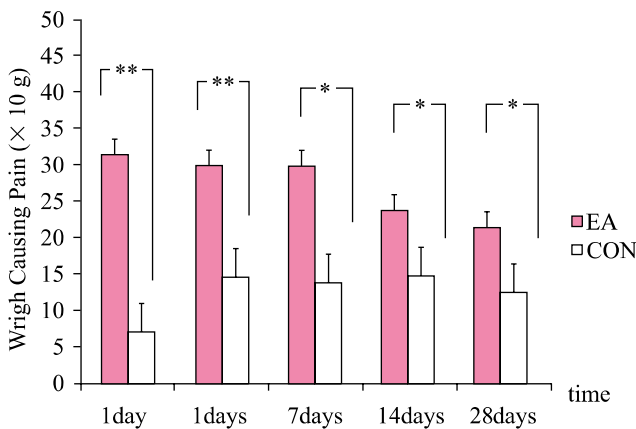


Figure 1. The comparison of pain threshold between control group and electroacupuncture stimulating group on ST36, LI11, SP9 with sciatic neuve partially dissected rat.

EA: Electroacupuncture group, Conl: Control group
**p<0.01, *p<0.05

2. 운동기능 검사

BBB-test를 이용하여 운동기능 회복정도를 측정된 결과, 전침자극을 시행한 실험군이 시행하지 않은 대조군 보다 높은 점수를 나타냈는데 실험동물의 뒷다리 기능은 실험의 초기 보다 14일군 이후에 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 즉, 1일군에서 대조군의 점수는 7.4±2.3였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 7.6±2.5이었다. 3일군에서 대조군은 8.3±2.9였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 9.2±3.2였고, 7일군에서 대조군은 9.2±3.0였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 11.2±3.0이었다. 또한 14일군에서 대조군은 11.7±3.2였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 14.7±4.5이었고, 28일군에서 대조군은 13.4±3.5였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 18.2±4.2이었다. 각 시간대 별 BBB 점수의 통계학적 유의성을 검증하기 위해 전침자극군과 대조군의 대응표본 t-검정을 실시한 결과 유해자극에 의한 통증 유발

3일군과 7일군 사이에서(p<0.05), 14일군과 28일군 사이에서(p<0.01) 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었다. 반복측정분산 분석을 실시한 바(F=123.62, p<0.01) 시간대별 변화 사이에서 통계학적 유의성 또한 관찰되었다(Figure 2).

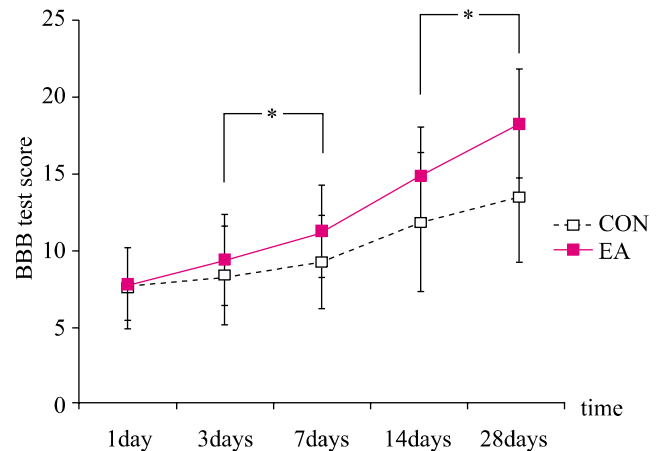


Figure 2. The comparison of BBB score between control group and electroacupuncture stimulating group on ST 36, LI11, SP9 with sciatic nerve partially dissected rat.

EA: Electroacupuncture group, Con: Control group
**p<0.01, *p<0.05

3. NeuN에 대한 면역조직화학 반응

척수 요수부 앞뿔의 신경세포 중 면역조직화학적으로 NeuN에 갈색의 면역양성반응을 보인 신경세포들을 광학현미경하에서 pixel 단위로 계수한 바 전침자극군을 수행한 실험군 신경세포들의 수가 전침자극을 시행하지 않은 대조군에 비해 월등히 많이 관찰되었다. 즉, 1일군에서 대조군의 NeuN 면역양성반응 세포 수는 76.2±4.9개였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 81.4±7.6개로 관찰되었다. 3일군에서 대조군의 NeuN 면역양성반응 세포 수는 27.7±3.8개였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 48.9±6.3개였고, 7일군에서 대조군은 35.9±4.2개였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 53.4±6.5개이었다. 또한, 14일군에서 대조군은 41.5±5.7개였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 59.6±7.2개이었다, 28일군에서는 대조군은 54.7±6.7개였으나, 전침자극을 시행한 실험군은 68.8±7.6개였다. 궁둥신경 부분 절제 손상으로 궁둥신경이 역행성 변성을 초래하여 척수(L5)에서 관련 신경세포가 영향을 받아 NeuN을 분비하는 신경세포가 감소한 것으로 나타났다. 그러나 전침자극군과 대조군 모두 시간경과에 따라 회복되는 추세를 나타냈다. 전침자극군의 경우 3일군에서 대조군에 비해 NeuN 면역양성세포 수가 월등히 많았으나 시간경과에 따라 그 비율은 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 전침자극군에서 각 시간대별 NeuN 발현 신경세포 수에 대한 통계학적 유

의성을 검증하기 위해 독립표본 t-검정을 실시한 결과 유해자극에 의한 통증 유발 14일군과 28일군에서($p < 0.05$), 3일군과 7일군($p < 0.01$)에서 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었다. 또한 일원배치분산분석을 실시한 바($F=195.72, p < 0.01$) 시간대별 변화 사이에서 통계학적 유의성 또한 관찰되었다(Figure 3,4).

환 관련 신경세포수의 비율을 입체적으로 산출할 수 있어, 신경세포의 소실을 결정할 수 있는 특정 표식자는 치료전략을 세울 때 매우 의미있게 이용될 수 있다.¹⁸ NeuN은 대부분의 포유류 중추신경계의 신경세포에서 관찰, 보고되고 있어 신경세포 소실을 규명할 수 있는 유용한 표식자이다. Sarin, soman, tabun

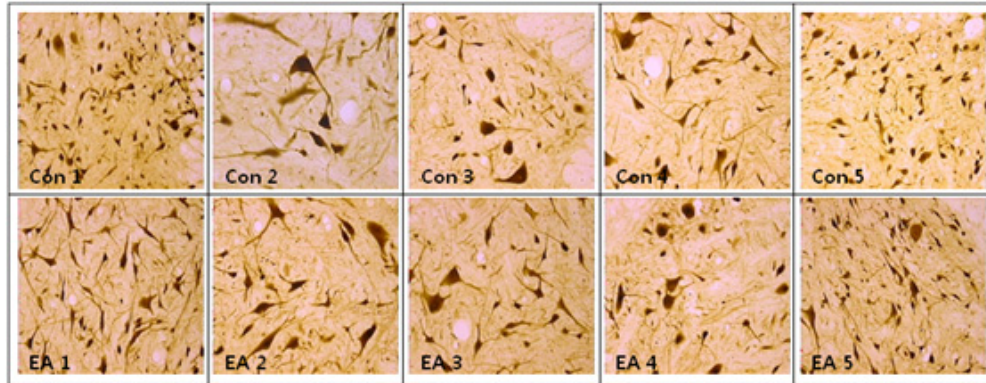


Figure 3. The photographs of NeuN immunoreactive neurons in ventral horn of lumbar segment between control group and electroacupuncture stimulating group on ST 36, LI11, SP9 with sciatic nerve partially dissected rat.

EA1: Electroacupuncture group at 1day(x200), EA2: Electroacupuncture group at 3 day(x200), EA3: Electroacupuncture group at 7 day(x200), EA4: Electroacupuncture group at 14 day(x200), EA5: Electroacupuncture group at 28 day(x200), Con1: Control group at 1 day(x200), Con2: Control group at 3 day(x200), Con3: Control group at 7 day(x200), Con4: Control group at 14 day(x200), Con5: Control group at 28 day(x200).

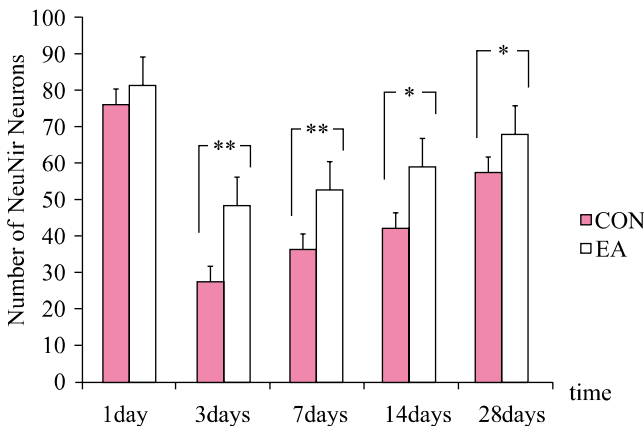


Figure 4. The change of NeuN immunoreactive neurons in ventral horn of lumbar segment of spinal cord in sciatic nerve partially dissected rat between control group and electroacupuncture stimulating group on ST 36, LI11, SP9.

EA: Electroacupuncture group, Con: Control group
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

IV. 고찰

신경세포 수의 정량적 평가는 신경변성질환 모델의 특성과 신경보호 또는 치료전략의 수립에 필수불가결한 핵심적 요소이다.¹⁷ 특정물질 발현의 면역조직화학적 발현의 변화는 특정 질

등의 신경독성물질들은 유기인제화합물질들로서 비가역성의 cholinesterase 억제제들인데 생체에 주입되었을 경우 해마내 신경세포의 손상을 유발하며 NeuN의 면역반응성을 감소시킨다.¹⁹ 해마 내 신경세포에서 NeuN의 면역반응성의 소실은 NeuN 단백질 발현의 감소 또는 NeuN 항원성의 감소에 의해 기인하는데, soman (pinacoryl methylphosphorofluoridate) 중독의 경우 해마 CA1, CA2 및 CA3 영역의 추체세포(pyramidal neuron)내 NeuN 면역반응성이 중독 1일에 $51.3 \pm 4.9\%$ 의 감소, 8일에 $58.2 \pm 3.2\%$ 의 감소를 나타내어 NeuN이 신경손상 후 신경세포 소실의 평가에 유용한 표식자임이 보고된 바 있다.²⁰ 그러나 노화된 흰쥐의 해마에서는 NeuN의 소실이 관찰되지 않아 노화가 진행되는 동안 NeuN의 소실은 척수와 같은 중추신경계의 특정부위에서 제한되어 관찰되는 현상이라는 보고 등을 비교 관찰한 바 아직 NeuN이 신경계 손상의 정량적 분석의 표식자임을 명확히 규명하고, 신경계 손상 후 전침에 의한 신경계 회복을 관찰하는데 NeuN을 표식자로 활용한 연구는 전무하여, 궁둥신경 부분손상 후 척수 우수부 앞뿔의 운동신경세포에서 전침자극에 의한 NeuN의 발현 변화를 관찰하여 NeuN의 신경손상 후 중추신경계에서 신경세포 소실 정도를 추정하는 표식자로서 활용 여부에 관한 규명도 매우 의미 있는 것으로 판단되어 본 연구는 수행되었다.

신경손상 후 말초신경계에서 NeuN의 발현은 현저하게 감

소하고, 신경절제와 압좌 등의 손상방법에 따라 운동 신경세포 내에서 NeuN에 대한 면역반응성의 차이가 있다.^{7,8} 즉, 흰쥐와 생쥐의 안면신경을 절제하였을 경우 NeuN 발현의 완전 차단 또는 장기간 발현 저하를 나타냈지만, 압좌손상의 경우 일시적으로 NeuN의 발현감소는 야기시켰지만 손상 후 1 주일 이내에 초기 수준으로 회복되었다는 주장이 있다.²¹ 손상방법의 차이에 의한 NeuN 발현 양상의 차이는 절제 또는 압좌손상 후 표적기관과 재결합하는 신경세포의 능력에 기인한 것으로, 축삭돌기 절제 모델에서 축삭돌기와 표적기관과의 재결합은 신경의 일부분을 제거함으로써 차단되지만, 압좌손상 모델에서는 생쥐의 경우 1주일 이내에, 흰쥐의 경우 12~14일 이내에 표적기관에 이르는 축삭돌기의 재생이 이루어진다.⁸ 압좌손상 모델에서 NeuN의 일시적 감소와 재발현은 표적기관 유래 인자들이 NeuN 발현을 조절하는 것으로 제시되어지나, 절제 모델에서 연결의 실패는 지속적인 NeuN 발현의 저하를 나타내는 것으로 제시되고 있다.²² 중추신경계와 말초신경계에서 NeuN 소실의 차이와 손상방법의 차이에 의한 NeuN 발현의 차이는 단지 표적기관과 재결합의 결과의 차이에 기인한 것이 아니라 손상된 신경세포의 재생될 수 있는 상태와 연관되어 NeuN 발현에 차이가 발생하는 것으로 추론할 수 있다.⁹ 본 연구에서는 공동신경을 부분 절제시켜 신경손상에 의한 통증을 유발시키는 방법을 사용하였는데 이는 압좌손상 보다 재생기간이 길지만 신경의 역행성 변성으로 인한 척수 내 신경세포의 변화를 보다 직접적으로 관찰할 수 있고, 완전절제보다는 재생기간을 단축시킬 수 있어 신경손상 후 신경가소성 관찰에 유용한 모델이라고 판단할 수가 있었다. 결과적으로 본 실험을 통해 나타난 결과로 공동신경 부분절제로 신경손상을 유발시킨 후 고빈도(120 Hz), 저강도(0.5 mA)의 전침자극은 통증 역치를 높혀 진통작용을 효과적으로 나타냈을 뿐만 아니라, 척수 요수부 앞뿔에서 NeuN을 발현하는 신경세포의 수를 증가시켜 손상 후 회복을 더 빠르게 하였고, 운동기능의 향상을 야기시킨 것으로 NeuN은 신경손상 후 신경세포 소실의 정량적 평가에 활용되는 매우 유용한 표식자라 판단될 수 있다고 생각되지만 향후 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

신경계 손상후 신경세포소실의 정도를 정량적으로 관찰하기 위해 NeuN을 표식자로 활용한 연구들 중 30분간 중간대뇌동맥(middle cerebral artery)을 폐쇄시켜 뇌허혈이 유발된 생쥐에서 뇌허혈 유발 6시간 후 NeuN로 표지되는 신경세포의 수가 감소되었으며 caspase-3-p20에 대한 항체처리 후, NeuN의 양성반응이 소실되어 NeuN이 신경세포의 소실의 정량적 평가를 위한 표식자로서 유용하게 활용될 수 있다는 보고⁹, 뇌허혈 유발 6시간 후 뇌허혈의 중앙부에서는 62 %의 소실이 발생하지만 뇌허혈 주위에서는 27%의 신경세포의 소실이 보였으며, 24

시간 후에는 NeuN에 대한 면역반응성의 감소가 지속적으로 이루어져 뇌허혈 병변의 주변부에서 31%의 소실을 보였다는 보고²³, 일부에서 뇌허혈 유발 후 병변 전체에서 NeuN에 면역반응성을 보인 세포의 수가 뇌허혈 유발 후 24시간 이내에 46%가 소실되었다는 보고⁷ 및 뇌허혈 5~10분 후 해마의 CA1 내 추체세포열에서 신경세포의 현저한 소실을 NeuN을 통해 관찰한 보고²¹ 등이 신경손상 후 신경세포 소실의 정량적 평가를 위해 NeuN이 유용한 표식자라는 측면에서 의미있는 결과를 산출하였다.

또한, 안면신경 절제 후 1 일에 척수에서 NeuN의 면역반응성은 거의 감소하지 아니하였으나, 3일 후에는 NeuN에 대한 면역반응성이 완전히 소실되었고 손상 후 7 일, 24일 및 28 일에는 NeuN에 대한 면역 반응성이 일부 남아 있었다는 보고, 즉, 손상 후 1일에는 NeuN에 면역 반응성을 보인 신경세포가 45.1%였고, 3일에는 1.6%, 7일에는 2.1%, 14일에는 3.5%, 28일에는 2.0 %였으며, 안면신경 압좌손상을 일으킨 모델에서 손상 후 1일에는 NeuN의 면역반응성에는 변화가 없었으나, 3 일에는 6.9%로 감소하였으며, 7일에는 24.6%로 회복되는 추세를 보였으며, 14일에는 27.6 %, 28일에는 35.5 %로 정상군과 거의 유사한 양상을 띄었다는 주장⁸과 비교하여 본 연구에서도 유사한 의미있는 결과가 도출되었다. 본 연구에서는 공동신경을 부분 절제 손상으로 공동신경이 역행성 변성을 초래하여 척수 요수부(L5)에서 관련 신경세포가 영향을 받아 NeuN을 분비하는 신경세포가 감소한 것으로 나타났다. 그러나 전침 자극군과 대조군 모두 시간경과에 따라 회복되는 추세를 나타냈고, 전침자극군의 경우 3일군에서 대조군에 비해 NeuN 면역양성세포 수가 월등히 많았으나 시간경과에 따라 그 비율은 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 전침자극의 효과가 단기 일내에 보다 효과적이라고 판단될 수 있다고 생각되지만 향후 NeuN mRNA 발현 양상 측정 등의 좀 더 심층적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. 많은 실험에서 사용한 자극빈도는 2~5 Hz의 저빈도와 100 Hz의 고빈도자극으로 나누어지나 특히 사용한 자극 강도에는 매우 큰 차이가 있다.²⁴ 저빈도 자극 시 1~2V 혹은 2 mA 미만의 약한 강도로 자극하여도 유의한 통증억제 효과가 유발된다는 보고²⁵가 있는가 하면, 20~30 mA(2 msec) 혹은 40~50V의 매우 강한 강도로 자극해야 유해자극반응이 억제되어 진통효과가 유발된다는 주장도 있다.²⁶ 일반적으로 구심성 신경 중 Aδ 및 C 신경섬유를 활성화할 수 있는 정도의 강한 자극에 의해 보다 속적이고 강한 억제효과가 유발된다고 알려져 있으며 대부분의 실험에서는 5 mA 이하의 강도로 전침자극을 시행하였으나 20~30mA 혹은 40~50V의 강도는 생리적 범위를 벗어난 과도한 자극강도가 아닌지 의문 시된다고 하였다. 또한, 고빈도-저강도 혹은 저빈도-고강도의

전침자극 중 어느 것이 보다 효과적인 자극 매개변수인지는 단정지을 수 없으나 전침자극의 빈도에 따라 활성화되는 아편양 물질 수용체의 종류가 다른데, 고빈도 전침자극에 의한 효과는 κ -수용체 길항제 투여에 의해 억제되는 반면에 15~30 Hz 전침자극의 효과에는 β -, κ -, μ -, δ - opioid 수용체가 모두 관여한다. 전침에 의한 진통효과에 대한 연구를 살펴보면 전침의 빈도별 자극에 따라 중추신경계의 상이한 반응을 보이는데 2 Hz 같은 저빈도 전침은 뇌와 척수에서 enkephalin과 β -endorphin을 분비시키며, μ -와 δ -opioid 수용체가 관여하고, 100 Hz 같은 고빈도 전침은 척수에서 dynorphin을 분비하여 척수 뒷뿌의 κ -opioid 수용체가 관여한다.^{27,28} 본 연구에서 도출된 결과는 전침이 진통효과를 유발시킨다는 효과적 측면에서 선행연구의 결과와 일치한다. NeuN은 신경손상 후 신경세포 수의 감소 정도를 정량적으로 산출하는데 매우 유용한 표식자로 여겨진다. 본 연구에서는 전침자극 후 대조군에 비해 3일군에서 통증역치가 현저히 높게 나타났으며 이후 대조군이 신경손상에 적응하여 통증역치가 다소 증가하게 되어 통증 감소 비율은 시간 경과에 따라 다소 감소하였다. 이는 전침자극으로 인한 통증감소 효과는 3일 이내가 가장 효과적인 것으로 판단할 수 있다. 그러나 고빈도 전침자극에 의한 통증 억제가 κ -수용체 활성화에 의한 기전임을 확인할 수 없었다는 것이 본 연구의 제한점이었다. 향후 전침자극에 의한 통증억제 기전을 재확립하기 위해 특정 수용체의 길항제에 의한 통증억제 효과를 추적하는 분자생물학적 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서 BBB-test를 이용하여 운동기능 회복 정도를 측정된 결과, 전침자극을 시행한 실험군이 시행하지 않은 대조군 보다 높은 점수를 나타냈는데 실험동물의 뒷다리 기능은 실험의 초기 보다 14일군 이후에 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 이는 궁둥신경 부분 절제 후 신경재생이 이루어지는 동안 BBB 점수가 전침자극군과 대조군 모두에서 증가한 것은 시간 경과에 따라 자연 치유에 의해 뒷다리 기능의 회복이 어느 정도 발생된 것이라 생각해 볼 수 있다. 그러나 전침자극이 대조군에 비해 BBB 점수를 월등히 증가시킨 것으로 나타나 전침은 신경부분절제로 인한 신경 손상 시 운동기능 회복에 효과적이라 판단될 수 있지만 향후 더 많은 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

궁둥신경을 부분 절제하여 신경손상을 유발시킨 뒤고빈도(120 Hz), 저강도(0.5 mA) 전침자극을 시행하여 신경세포의 소실의 정량적 평가의 표식자로 이용되고 있는 NeuN의 면역조직화학 반응 양상, 통증역치 변화 및 BBB 점수를 측정하였다. 고빈도

(120 Hz), 저강도(0.5 mA) 전침자극은 통증역치를 높여 진통작용을 효과적으로 나타냈을 뿐만 아니라, 척수 요수부 앞뿌에서 NeuN을 발현하는 신경세포의 수를 증가시켜 손상 후 회복을 더 빠르게 하였고, 운동기능의 향상을 야기시킨 것으로 미루어 NeuN은 신경손상 후 신경세포 소실의 정량적 평가에 활용되는 매우 유용한 표식자라 판단된다.

Author Contributions

Research design: Cho MS

Acquisition of data: Cho MS

Analysis and interpretation of data: Cho MS

Drafting of the manuscript: Cho MS

Research supervision: Cho MS

Acknowledgement

1. 본 논문은 2011년도 나사렛대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC et al. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2002; 137:37-47.
2. Bowenkamp KE, David D, Lapchak PL et al. 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Brain Res.* 1996; 111(1):1-7.
3. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):605-12.
4. Mori F, Himes BT, Kowada M et al. Fetal spinal cord transplants rescue some axotomized rubrospinal neurons from retrograde cell death in adult rats. *Exp Neurol.* 1997;143(1): 45-60.
5. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(10):1167-71.
6. Unal-Cevik I, Kilinç M, Gürsoy-Ozdemir Y et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 2004;1015(1-2):169-74.
7. Schmidt-Kastner R, Robertson GS, Hakim A et al. Monoclo-

- nal antibody to NeuN as specific marker for neurons in immunohistochemical evaluation of global ischemic damage in rat. *J Cerebr Blood Flow Metab.* 1995;15(Suppl 1):S230.
8. Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 3):463-74.
 9. McPhail LT, McBride CB, McGraw J et al. Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Exp Neurol.* 2004;185(1):182-90.
 10. Lind D, Franken S, Kappler J et al. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res.* 2005;79(3):295-302.
 11. Kim YI, Kim YH, Lim YK et al. A fMRI study on the cerebral activity induced by electro-acupuncture on Zusanli(St36). *J Kor Acup Moxi Soci.* 2003;20(5):133-50.
 12. Son IS, Choi BT, Jang KJ. The effects of 120Hz electroacupuncture on the prostaglandin E2 and spinal N-Methyl-D-Aspartate receptor expression in the carrageenan-injected rat. *J Kor Acup Moxi Soci.* 2002;19(1):159-74.
 13. Kim JT, Lee JD, Lee YH. Effect of different patterns of low frequency electroacupuncture on the neuronal activities in the spinal cord and brainstem using fos immunohistochemical technique. *J Kor Acup Moxi Soci.* 1999(2):402-22.
 14. Ryu. SR, Baek YH, Park DS. The analgesic effect and its mechanism of electroacupuncture in the type II collagen-induced arthritis rat: mediation by serotonergic receptors. *J Kor Acup Moxi Soci.* 2006;23(3):77-90.
 15. Kim GY, Woo KH. The effects of alphabet exercise with SSP electrotherapy on lateral ankle sprain. *J Kor Soc Phys Ther.* 2004;16(2):323-31.
 16. Lee KM, Kim KS, Cheon MN et al. Long term effects of electrical acupuncture treatment on rat's spinal cord and allodynia. *J Kor Acup Moxi Soci.* 1997;14(1):287-302.
 17. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
 18. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):77-98.
 19. Ryu. SR, Baek YH, Park DS. The analgesic effect and its mechanism of electroacupuncture in the type II collagen-induced arthritis rat: mediation by serotonergic receptors. *J Kor Acup Moxi Soci.* 2006;23(3):77-90.
 20. Kwon BK, Liu J, Oschipok L et al. Reaxotomy of chronically injured rubrospinal neurons results in only modest cell loss. *Exp Neurol.* 2002;177(1):332-7.
 21. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):77-98.
 22. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
 23. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem.* 2009;284(45):31052-61.
 24. Salehi-Ashtiani K, Farbman AI. Expression of neu and Neu differentiation factor in the olfactory mucosa of rat. *Int J Dev Neurosci.* 1996;14(7-8):801-11.
 25. Chuang CM, Hsieh CL, Li TC et al. Acupuncture stimulation at Baihui acupoint reduced cerebral infarct and increased dopamine levels in chronic cerebral hypoperfusion and ischemia-reperfusion injured sprague-dawley rats. *Am J Chin Med.* 2007;35(5):779-91.
 26. Gan P, Cheng JS, Ng YK et al. Role of GABA in electro-acupuncture therapy on cerebral ischemia induced by occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neurosci Lett.* 2005;383(3):317-21.
 27. Uchida S, Kagitani F, Suzuki A et al. Effect of acupuncture-like stimulation on cortical cerebral blood flow in anesthetized rats. *Jpn J Physiol.* 2000;50(5):495-507.
 28. Hjorth S. Serotonin 5-HT1A autoreceptor blockade potentiates the ability of the 5-HT reuptake inhibitor citalopram to increase nerve terminal output of 5-HT in vivo: a microdialysis study. *J Neurochem.* 1993;60(2):776-9.