

環跳(GB30) 秦艽藥鍼이 신경병리성 통증 유발 흰쥐에 미치는 영향

이옥재¹, 김선욱², 신정철^{2,*}

¹참조은요양병원

²동신대학교 한의과대학 침구의학교실



[Abstract]

Effect of *Gentiana Macrophyllae Radix* Pharmacopuncture at Hwando (GB30) on Neuropathic Pain in Tibial and Sural Nerve Transected Rats

Ook Jae Lee¹, Seon Wook Kim² and Jeong Cheol Shin^{2*}

¹Cham Joeun Hospital

²Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives : The objective of this study was to investigate the effects of *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture (GP) at Hwando (GB30) in neuropathic pain induced rats.

Methods : Neuropathic pain in rats was induced by tibial and sural nerve transection. The rat subjects were divided into 6 groups : normal (Nor, n = 5), control (Con, n = 5), neuropathic pain-induced injected at GB30 with 1 mg/kg GP (GP-A, n = 5), 5 mg/kg GP (GP-B, n = 5) and 20 mg/kg GP (GP-C, n = 5), and neuropathic pain-induced injected with 1mg/kg Tramadol (Tramadol, n=5). Injections were administered 2 times a week for a total of 5 treatments. After each treatment plantar withdrawal response was measured and after all 5 treatments were completed c-fos, Bax, Bcl-2, mGlu5 and leukocytes in the blood were analyzed.

Results :

1. Groups GP-A, GP-B and GP-C showed a meaningful decrease in the withdrawal response of mechanical allodynia compared to the control group.
2. Groups GP-A, GP-B and GP-C showed a meaningful decrease in the expression of c-fos compared to the control group.
3. Groups GP-A and GP-C showed a meaningful increase in the expression of mGluR5 compared to the control group.
4. Groups GP-A, GP-B and GP-C showed a meaningful decrease in Bax/Bcl-2 ratio compared to the control group.

Conclusion : These results suggest that *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture at Hwando (GB30) could decrease mechanical allodynia and could have analgesic and neuro-protective effects on the model of neuropathic pain.

Key words :

Neuropathic pain;
Gentiana Macrophyllae Radix;
 Pharmacopuncture;
 Hwando (GB30)

Received : 2016. 05. 18.

Revised : 2016. 08. 23.

Accepted : 2016. 08. 26.

On-line : 2016. 09. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Mokpo Oriental Hospital of Dongshin University, 313, Baengnyeong-daero, Mokpo-si, Jeollanam-do, 530-822, Republic of Korea
 Tel : +82-61-280-7903 E-mail : fire-sjc@hanmail.net

I. 서론

신경병리성 통증(neuropathic pain)은 체성감각신경계(somatosensory system)의 병변이나 질병에 의해 발생하는 통증으로 다양한 질환이나 병변에 의해 발생하는 증후군이다¹⁾. 임상적으로 다양한 증상들이 나타날 수 있는데, 특히 자발통(spontaneous pain), 이질통(allodynia), 과통증(hyperalgesia)이 특징적으로 관찰된다²⁾. 신경병리성 통증은 만성적으로 지속되는 난치성 통증으로 통증 자체뿐만 아니라 우울증, 수면장애 등을 야기하게 되어 환자의 삶 전반에 걸쳐 질 저하를 초래할 수가 있다³⁾. 정확한 유병률은 알려져 있지 않으나 신경병리성 통증의 특징을 갖는 환자는 인구의 6.9~10% 정도로 예상된다⁴⁾.

한의학에서痺證은 風寒濕의 邪氣가 血氣의 운행을 막아 발생하며⁵⁾, 疼痛, 麻木, 重着, 發熱, 屈伸不利, 關節腫脹 등의 증상을 포괄하는 증후군으로 신경병리성 통증은痺證의 범주로 볼 수 있다⁶⁾.

藥鍼療法은 약침액을 經穴 또는 陽性反應點(壓痛點, 阿是穴)에 약침주입용 주사기를 사용하여 시술하는 新鍼療法이다⁷⁾. 신경병리성 통증에 대한 약침 연구로는 김 등⁸⁾의 威靈仙 藥鍼, 이 등⁹⁾의 杜仲 藥鍼, 방 등¹⁰⁾의 草烏 藥鍼, 이 등¹¹⁾의 蜂毒 藥鍼, 김 등¹²⁾의 蜈蚣 藥鍼, 김 등¹³⁾의 白屈菜 藥鍼에 대한 연구 등이 있으며, 모두 신경병리성 통증이 유발된 흰쥐에 유의한 통증 억제 효과를 보고하고 있다.

秦艽(*Gentianae Macrophyllae Radix*)는 용담과(龍膽科: *Gentianaceae*)에 속한 多年生 本草인 秦艽와 麻花秦艽, 粗莖秦艽 혹은 小秦艽의 뿌리로 風濕痺痛을 치료하는 要藥이다¹⁴⁾. 秦艽에 관한 연구로는 조 등¹⁵⁾의 秦艽가 항염 효과에 미치는 영향, 박 등¹⁶⁾의 秦艽약침이 collagen induced arthritis에 미치는 영향 등이 보고된 바 있다.

環跳(GB30)는 足少陽膽經의 經穴로 通經活絡, 疏散經絡風濕, 宣利腰髀氣滯하는 효능이 있어, 下肢의 痺證을 치료하는데 가장 多用되는 穴 중의 하나이다^{17,18)}.

이에 저자는 風濕痺痛의 要藥인 秦艽를 이용한 약침치료가 신경병리성 통증에 유의한 효과가 있을 것으로 생각되어, 신경병리성 통증이 유발된 흰쥐의 環跳穴에 秦艽약침을 주입하여 이질통에 대한 회피반응시간 및 자극 강도의 변화, 중뇌에서 c-fos 발현, 척수에서 mGluR5, Bax 및 Bcl-2의 발현, Bax/Bcl-2 ratio의 변화, 혈액에서 Leukocyte 등 혈구의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험은 실험 전 동신대학교 실험동물윤리위원회(승인 번호: 2014-05-08-02)의 승인을 거쳤다. 체중이 약 230~250 g의 Sprague Dawley계의 수컷 흰쥐를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 24 ± 1 °C, 습도 60 ± 5%) 내에서 고흥사료(동아원, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안에도 물과 고흥사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약침 조제

동신대학교 부속 목포한방병원에서 구입한 秦艽(*Gentianae Macrophyllae Radix*, 이하 G) 300 g을 증류수 1,200 ml과 함께 3시간 동안 끓인 다음 원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary evaporator (Buchi, Netheland)로 수분을 증발시켜 100 ml로 감압 농축하였으며, 농축된 약침액을 동결건조기(삼원주식회사)로 -70 °C에서 동결건조시켜 최종 28.4 g을 얻었다. 이를 소분하여 생리식염수로 희석하였으며, pH meter (ORION, U.S.A)로 각각 pH 7 산도를 조절하여 약침액으로 조제한 후 냉장 보관하였다가 시술에 사용하였다.

2. 방법

1) Tibial nerve와 sural nerve의 transection (이하 TST)에 의한 통증 유발

흰쥐를 isoflurane 2.5%로 도입, 마취 후 고관절 후측의 피부를 절개한 후 실체 증 현미경을 사용하여 biceps femoris muscle 사이의 sciatic nerve을 찾아 tibial nerve와 common peroneal nerve 및 sural nerve를 확인한 후 microforcep으로 주변조직 및 혈관으로부터 분리시켰다.

이후 common peroneal nerve는 남겨두고, tibial nerve와 sural nerve는 현미경하에서 6.0 silk thread로 결찰한 후 transection하였다. 절개된 부위는 kanamycin을 점적하고 피부를 봉합하였다.

2) 군 분리

모두 30마리의 흰쥐는 정상군(Nor, n = 5), TST로 통증을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Con, n = 5), 양측 環跳(GB30) 부위에 Tramadol 1mg/kg을 주입한 시술군(Tramadol, n = 5), 環跳(GB30)에 秦艽藥鍼을 농도별로 1 mg/kg을 시행한 秦艽藥鍼A군(GP-A, n = 5), 5 mg/kg을 시행한 秦艽藥鍼B군(GP-B, n = 5), 20 mg/kg을 시행한 秦艽藥鍼C군(GP-C, n = 5)으로 나누었다.

3) 取穴 및 약침 시술

環跳(GB30)의 취혈은 hindlimb에서 femur의 greater trochanter와 superior anterior iliac spine 사이 중간으로 취하였으며, 모두 인체에 상응하는 부위로 취하였다. 약침 시술은 통증 유발 3주 후부터 insulin syringe(31 G × 8 mm, BD, U.S.A)를 사용하여 시작하였으며, 1주일에 각각 2회씩 총 5회 시행되었다.

4) Dynamic plantar aesthesiometer 측정

수술 후 3주부터 1주에 2회씩 dynamic plantar aesthesiometer(UGO BASILE 37450, Italy)를 이용하여, 각각 이에 대한 withdrawal response를 망으로 된 cage에 옮겨 5분간 안정시킨 후 관찰하였다.

Stimulator 자극에 의한 이질통 측정 방법은 0 g에서부터 50 g 강도까지 환측 발바닥 부위에 자극하여 발의 withdrawal response의 reaction time과 force intensity를 얻었다.

5) 혈액 검사

채혈에 의하여 얻어진 혈액 중 약 100 μ l를 EDTA-bottle에 넣은 후 곧바로 Multispecies hematology analyser(950, Hemavet, U.S.A)에 주입하여 WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes를 자동혈구측정기(HEMAVET 950, U.S.A)로 측정하였다.

6) Immunohistochemistry

모든 실험이 끝난 직후 흰쥐를 urethane(Sigma, U.S.A)으로 마취시킨 후 0.9 % saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4 % formalin 용액(fixative) 800 ml로 심장을 통해 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 24시간 경과 후 고정시키고, 30 % sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μ m의 두께로 잘랐다.

뇌 조직을 초기에 0.1 M PBS에 3회 세척하였고, 2 % 토

끼 혈청으로 30분 blocking한 후 각각 primary mouse monoclonal c-fos anti-body(1 : 40, Novocastra, United Kingdom)를 사용하였다. 1차 항체는 0.1 M PBS에 2 % 토끼 혈청과 0.1 % sodium acid(Sigma, U.S.A) buffer로 100배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4 $^{\circ}$ C에서 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 조직을 0.1 M PBS로 3회 세척한 다음 biotinylated universal secondary antibody(Quick Kit : Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1 M PBS로 3회 세척한 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 streptavidin peroxidase preformed complex(Quick Kit : Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A)에 담갔다. 0.1 M PBS로 3회 세척한 다음 조직을 착색제로서 diaminobenzidine(DAB)을 사용하여 발현시키고, 0.1 M PBS로 발색을 정지시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 cover glass를 덮은 후 광학 현미경(Nikon, Japan)을 200배 확대하여 central gray에서 c-Fos에 대한 immunoreactive 신경세포를 counting하였다.

7) Total RNA 분리 및 reverse transcription polymerase chain reaction(이하 RT-PCR)

(1) Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 spinal cord 부위의 조직(20 mg)을 500 μ l TRIZOL reagent(Gibco-BRL, U.S.A)로 균질화하고 균질액에 대해 200 μ l의 chloroform(Sigma, U.S.A)을 가하여 15초 동안 흔들어서 잘 혼합한 후 실온상태에서 5분간 둔 후 세포 잔유물을 제거하기 위하여 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액과 500 μ l의 isopropanol(Sigma, U.S.A)을 첨가하여 실온상태에서 5분간 둔 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 분리된 pellet에 냉장 보관된 70 % ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4 $^{\circ}$ C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음, DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer(Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다. 이들 spinal cord의 total RNA는 사용 시까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

(2) RT-PCR

분리된 total RNA 3 μ g과 2.5 μ l Oligo(dT), DEPC-

treated water를 RT premix(Bioneer, Korea)에 넣어 mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)를 이용하여 20 μ l cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) (sense primer : 5'-ACTCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer : 5'-CCTGCTTTCACCACTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 denature 그리고 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Bax, Bcl-2, mGluR5 유전자에 대한 흰쥐의 특이 primer는 PCR-pre-mix kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Polymerase chain reaction은 cDNA 2 μ l, sense primer 1 μ l, antisense primer 1 μ l, DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣었다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 pre-denaturation, 94 $^{\circ}$ C에서 40초 동안 melting, 55 $^{\circ}$ C에서 40초 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72 $^{\circ}$ C에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 Bax 유전자 증폭을 primer(senseprimer : 5'-CATCTTCTTCCAGATGGTGA-3', antisense primer : 5'-GT-TTCATCCAGGATCGAGCAG-3'), Bcl-2 유전자 증폭을 primer(senseprimer : 5'-CGGTTTCAGGTAC-TCAGTCAT-3', antisense primer : 5'-ACTTTGCACAGATGTCCAGT-3'), mGluR5 유전자 증폭을 primer (senseprimer : 5'-TCCAATCTGCTCCTCC TACC-3', antisense primer : 5'-CAACGATGAAGAACTCTCG-3')를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

이렇게 증폭된 Bax, Bcl2, mGluR5의 DNA를 ethidium bromide(EtBr, 10 mg/ml)를 포함한 1.5 % agarose gel상에서 0.5x TBE buffer(80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 70 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 Image Station(Kodak, U.S.A)을 이용하여 촬영하였으며, Kodak MI Software(Kodak, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

3. 통계 처리

실험 성적은 평균값과 표준오차 (mean \pm S.E.)로 표시하였으며, Window용 SPSS(version 21, SPSS)를 이용

하여, 비모수적 방법 중 Mann-Whitney U test를 시행하여 실험군 간의 통계적 유의성을 관찰하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

III. 실험 결과

1. Plantar withdrawal response로 측정된 analgesia 효과

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 통증억제 미치는 영향을 plantar withdrawal response의 reaction time, force intensity에 대하여 시술 횟수 및 군 간으로 비교 관찰하였다.

1) 시술 횟수별 Reaction time 변화

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 reaction time 변화에서 1회에서 5회까지 시술 횟수별 변화는 다음과 같다.

(1) 1회 시술

1회 시술 후 reaction time 변화에서 정상군은 6.3 \pm 0.36 Sec, 대조군은 3.3 \pm 0.33 Sec, Tramadol군은 3.5 \pm 0.42 Sec, 秦艽약침A군은 4.1 \pm 0.36 Sec, 秦艽약침B군은 4.2 \pm 0.32 Sec, 秦艽약침C군은 4.0 \pm 0.42 Sec를 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침B군이 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침B군은 유의한 증가를 나타내었다.

(2) 2회 시술

2회 시술 후 reaction time 변화에서 정상군은 6.9 \pm 0.58 Sec, 대조군은 3.0 \pm 0.30 Sec, Tramadol군은 3.7 \pm 0.16 Sec, 秦艽약침A군은 4.0 \pm 0.25 Sec, 秦艽약침B군은 4.2 \pm 0.15 Sec, 秦艽약침C군은 4.6 \pm 0.23 Sec를 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침B군과 秦艽약침C군이 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(3) 3회 시술

3회 시술 후 reaction time 변화에서 정상군은 7.4 \pm 0.71 Sec, 대조군은 3.2 \pm 0.23 Sec, Tramadol군은 3.4

± 0.32 Sec, 秦艽약침A군은 4.4 ± 0.45 Sec, 秦艽약침 B군은 4.2 ± 0.31 Sec, 秦艽약침C군은 4.6 ± 0.57 Sec 를 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침 B군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(4) 4회 시술

4회 시술 후 reaction time 변화에서 정상군은 6.2 ± 0.54 Sec, 대조군은 3.1 ± 0.17 Sec, Tramadol군은 3.8 ± 0.47 Sec, 秦艽약침A군은 4.7 ± 0.22 Sec, 秦艽약침 B군은 4.5 ± 0.15 Sec, 秦艽약침C군은 4.9 ± 0.38 Sec 를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침 A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다.

(5) 5회 시술

5회 시술 후 reaction time 변화에서 정상군은 6.2 ± 0.13 Sec, 대조군은 3.0 ± 0.15 Sec, Tramadol군은 4.0 ± 0.27 Sec, 秦艽약침A군은 4.5 ± 0.20 Sec, 秦艽약침

B군은 5.0 ± 0.35 Sec, 秦艽약침C군은 5.2 ± 0.32 Sec 를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침 A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군 모두는 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침B군, 秦艽약침 C군은 유의한 증가를 나타내었다.

2) Reaction time에 대한 시술 횟수 및 혈위 군 간 비교

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 reaction time 변화를 시술 횟수에 따라 비교한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 1회째~5회째까지 모두 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 Tramadol군은 4회째와 5회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침A군은 3회째~5회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침B군은 1회째~5회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침C군은 2회째~5회째에 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군은 4회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침B군은 1회째와 5회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침C군은 4회째와 5회째에 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 1).

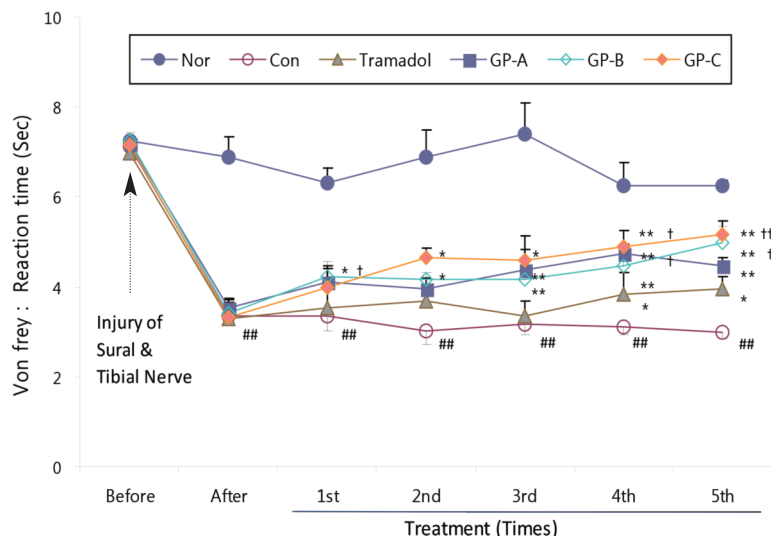


Fig. 1. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the reaction time of plantar withdrawal response at all groups in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean ± SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with control group.

†: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$ compared with Tramadol group.

3) 시술 횟수별 Force intensity 변화

환도에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 force intensity 변화에서 1회에서 5회까지 시술 횟수별 변화는 다음과 같다.

(1) 1회 시술

1회 시술 후 force intensity 변화에서 정상군은 35.7 ± 1.21 g, 대조군은 19.3 ± 1.36 g, Tramadol군은 21.3 ± 1.54 g, 秦艽약침A군은 23.1 ± 1.36 g, 秦艽약침B군은 23.1 ± 0.99 g, 秦艽약침C군은 22.5 ± 1.26 g을 나타내었다. 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이를 나타내지 않았다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(2) 2회 시술

2회 시술 후 force intensity 변화에서 정상군은 38.2 ± 1.85 g, 대조군은 18.9 ± 1.20 g, Tramadol군은 22.2 ± 1.28 g, 秦艽약침A군은 22.3 ± 2.49 g, 秦艽약침B군은 23.3 ± 1.71 g, 秦艽약침C군은 24.3 ± 2.12 g을 나타내었다. 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이를 나타내지 않았다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(3) 3회 시술

3회 시술 후 force intensity 변화에서 정상군은 39.3 ± 2.20 g, 대조군은 20.1 ± 0.79 g, Tramadol군은 22.9 ± 1.64 g, 秦艽약침A군은 24.7 ± 1.67 g, 秦艽약침B군은 23.3 ± 0.80 g, 秦艽약침C군은 25.7 ± 2.10 g을 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(4) 4회 시술

4회 시술 후 force intensity 변화에서 정상군은 34.8 ± 1.16 g, 대조군은 19.7 ± 1.66 g, Tramadol군은 23.5 ± 1.35 g, 秦艽약침A군은 25.2 ± 0.47 g, 秦艽약침B군은 25.4 ± 2.07 g, 秦艽약침C군은 27.3 ± 1.78 g을 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

(5) 5회 시술

5회 시술 후 force intensity 변화에서 정상군은 35.7 ± 0.78 g, 대조군은 20.6 ± 0.98 g, Tramadol군은 24.6

± 1.60 g, 秦艽약침A군은 25.8 ± 2.01 g, 秦艽약침B군은 28.0 ± 1.55 g, 秦艽약침C군은 28.8 ± 0.95 g을 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침B군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4) Force intensity에 대한 시술 횟수 및 군간 비교

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 Force intensity 변화를 시술 횟수에 따라 비교한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 1회째~5회째까지 모두 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 秦艽약침A군은 3회째와 4회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침B군은 3회째, 5회째에 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침C군은 3회째~5회째에 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 2).

2. c-fos 발현에 미치는 효과

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 c-fos 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 10.8 ± 2.6 (activity index), 대조군은 37.2 ± 3.9 (activity index), Tramadol군은 13.6 ± 0.9 (activity index), 秦艽약침A군은 13.6 ± 0.9 (activity index), 秦艽약침B군은 15.4 ± 3.4 (activity index), 秦艽약침C군은 14.4 ± 1.8 (activity index)를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침A군, 秦艽약침B군은, 秦艽약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침군은 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3, 4).

3. Bax, Bcl-2, mGlu5 발현에 미치는 효과

1) Bax 변화

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 Bax 변화를 관찰한 결과, 정상군은 108.0 ± 1.9 (*1000 OD), 대조군은 137.4 ± 1.8 (*1000 OD), Tramadol군은 113.8 ± 1.8 (*1000 OD), 秦艽약침A군은 136.2 ± 2.1 (*1000 OD), 秦艽약침B군은 112.6 ± 2.1 (*1000 OD), 秦艽약침C군은 124.0 ± 1.0 (*1000 OD)를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침B군과 秦艽약침C군은 유의한 감소를 나타내었다.

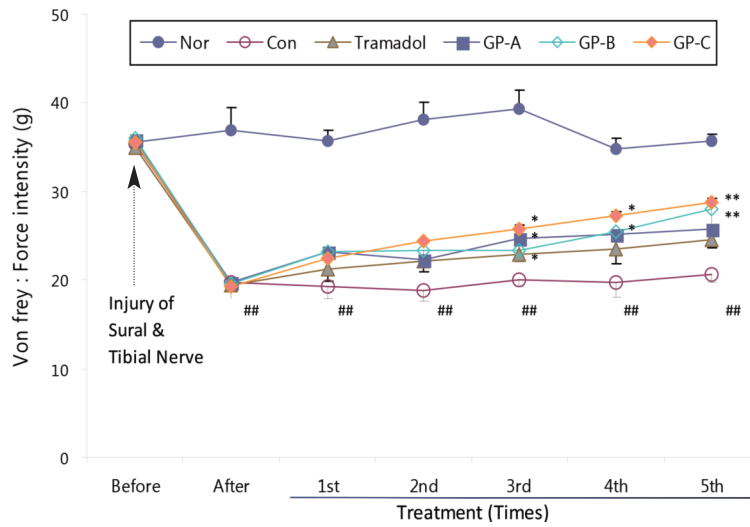


Fig. 2. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the force intensity of plantar withdrawal response at all groups in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with control group.

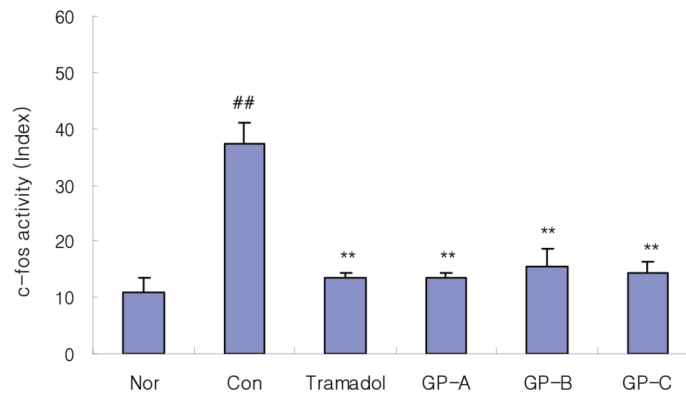


Fig. 3. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the c-fos activity at all groups in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. **: $p < 0.01$ compared with control group.

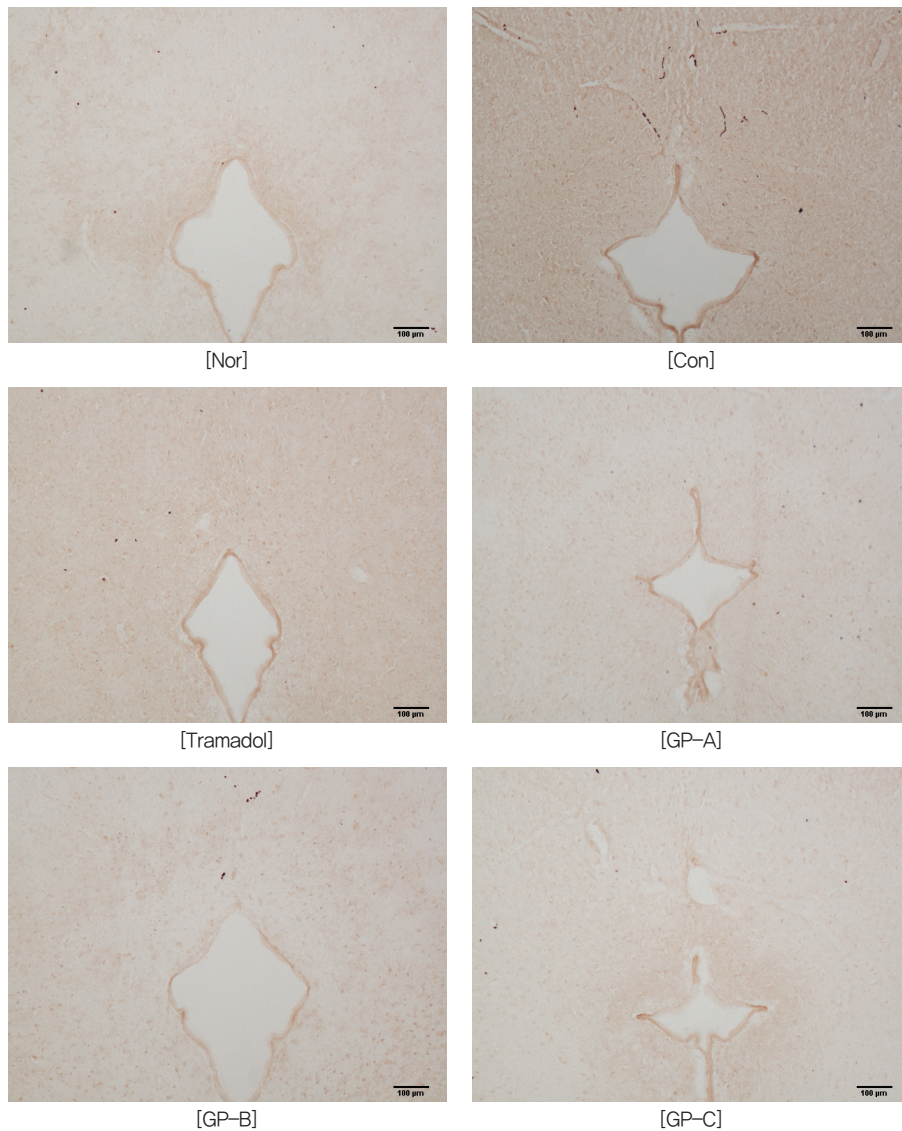


Fig. 4. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the c-fos activity at all groups in neuro-pathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5).

2) Bcl-2 변화

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 Bcl-2 변화를 관찰한 결과, 정상군은 118.4 ± 1.7 (*1000 OD), 대조군은 109.8 ± 0.6 (*1000

OD), Tramadol군은 123.8 ± 1.0 (*1000 OD), 秦艽약침 A군은 116.2 ± 1.1 (*1000 OD), 秦艽약침B군은 115.6 ± 2.0 (*1000 OD), 秦艽약침C군은 122.1 ± 0.5 (*1000 OD)를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침A군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침B군은 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 6).

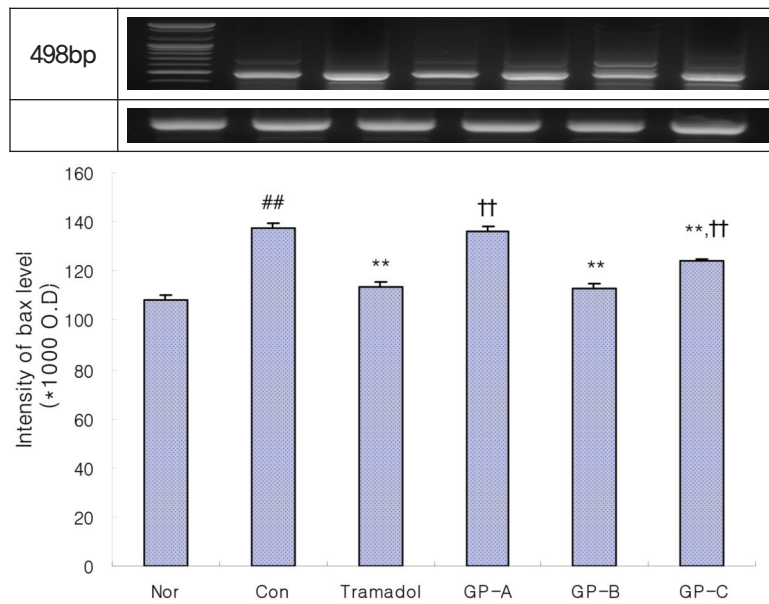


Fig. 5. Effects of *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the Bax level in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. **: $p < 0.01$ compared with control group. † †: $p < 0.01$ compared with Tramadol group.

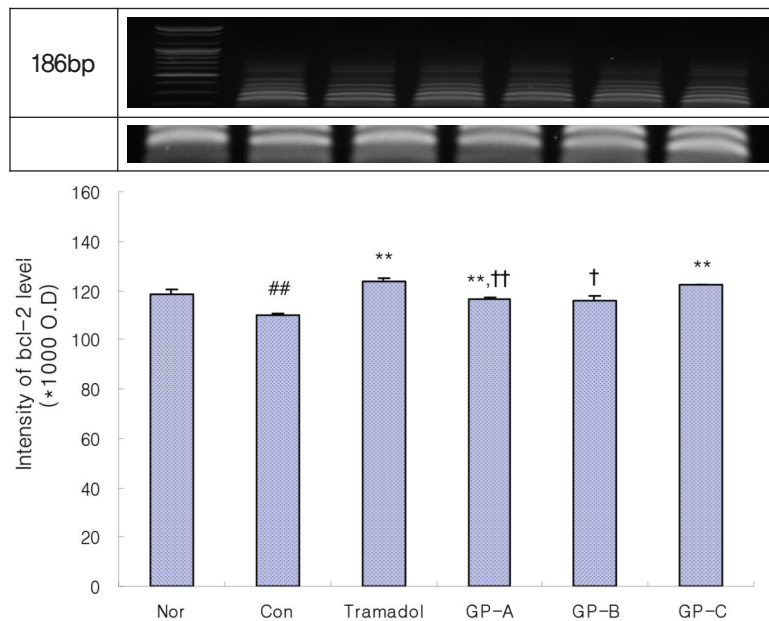


Fig. 6. Effects of *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the Bcl-2 level in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentiana Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. **: $p < 0.01$ compared with control group. † : $p < 0.05$, † †: $p < 0.01$ compared with Tramadol group.

3) Bax/Bcl-2 ratio 변화

環跳(GB30)에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 Bax/Bcl-2 변화를 관찰한 결과, 정상군은 0.91 ± 0.03 (Index), 대조군은 1.25 ± 0.01 (Index), Tramadol군은 0.92 ± 0.02 (Index), 秦艽약침A군은 1.17 ± 0.02 (Index), 秦艽약침B군은 0.97 ± 0.02 (Index), 秦艽약침C군은 1.02 ± 0.01 (Index)를 나타내었다. 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 7).

4) mGluR5 변화

환도에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 mGluR5 변화를 관찰한 결과, 정상군은 127.4 ± 2.1 (*1000 OD), 대조군은 118.3 ± 1.9 (*1000 OD), Tramadol군은 124.6 ± 2.0 (*1000 OD), 秦艽약침A군은 132.1 ± 2.1 (*1000 OD), 秦艽약침B군은 110.1 ± 1.6 (*1000 OD), 秦艽약침C군은 134.3 ± 2.4 (*1000 OD)를 나타내었다. 대조군에 비하여 秦艽약침A군과 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었고, 秦艽약침B군은 유의한 감소를 나타내었다. Tramadol군에 비하여 秦艽약침B군은 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 8).

4. 혈액 leukocytes에 미치는 효과

환도에 시술된 秦艽약침이 TST로 유발된 neuropathic pain 흰쥐의 혈액 CBC 중 leukocytes 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 Tramadol군, 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군은 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 각 지표별로 상승의 경향을 나타내었다(Table 1).

IV. 고찰

침해성 통증(nociceptive pain)은 조직 손상의 위협이나 실질적인 조직 손상에 대한 경고성 감각으로 우리 몸을 보호하는 말초신경계와 중추신경계의 기본적인 생리 기능이다. 진통제 치료에 잘 반응하며 유해 자극이 제거되거나 조직 손상이 치유되면 자연히 감소하게 된다^{19,20}. 반면 신경병리성 통증(neuropathic pain)은 체성감각신경계의 병변이나 질병에 의해 감각정보 입력이 비정상적으로 진행되어 발생된다. 대체로 본래 손상된 신경 부위가 치유된 이후에도 오랜 기간 지속되며, 현재 약물치료로는 치료가 힘

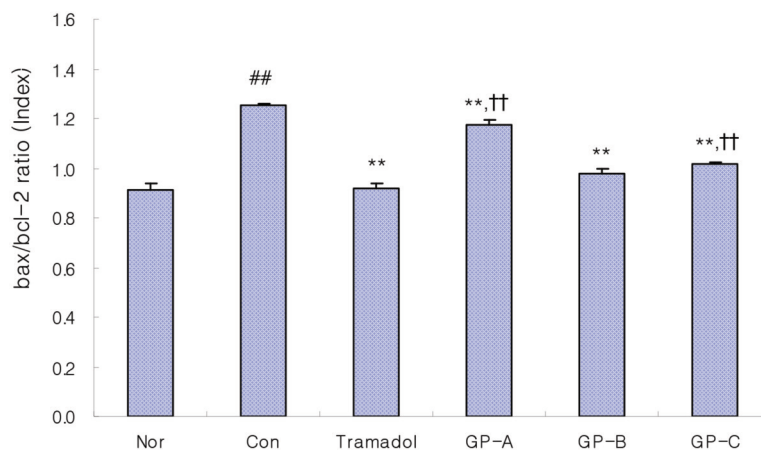


Fig. 7. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the Bax/Bcl-2 ratio in neuropathic pain-induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. ##: $p < 0.01$ compared with normal group. **: $p < 0.01$ compared with control group. †: $p < 0.01$ compared with Tramadol group.

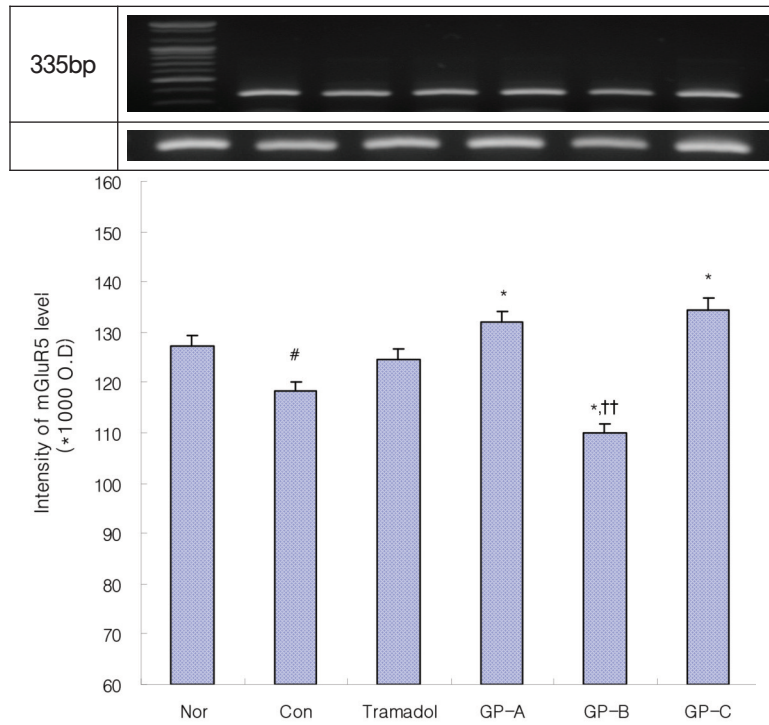


Fig. 8. Effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture on the mGluR5 level in neuropathic pain induced rats

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE. #: $p < 0.05$ compared with normal group. *: $p < 0.05$ compared with control group. † †: $p < 0.01$ compared with Tramadol group.

Table 1. Changes on the blood WBC, Neutrophils, Lymphocytes and Monocytes contents after *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture in neuropathic pain induced rats

Group	WBC (K/uL)	Neutrophils (K/uL)	Lymphocytes (K/uL)	Monocytes (K/uL)
Nor	3.41 \pm 0.22	0.97 \pm 0.05	2.27 \pm 0.18	0.16 \pm 0.02
Con	3.66 \pm 0.78	0.95 \pm 0.23	2.61 \pm 0.53	0.15 \pm 0.03
Tramadol	4.27 \pm 0.74	0.85 \pm 0.16	3.22 \pm 0.56	0.19 \pm 0.03
GP-A	4.20 \pm 0.81	1.18 \pm 0.17	2.78 \pm 0.61	0.23 \pm 0.06
GP-B	4.91 \pm 0.86	1.62 \pm 0.26	3.09 \pm 0.57	0.18 \pm 0.04
GP-C	5.00 \pm 0.37	1.42 \pm 0.14	3.38 \pm 0.31	0.17 \pm 0.04

Nor : no treatment without tibial nerve an sural nerve transection (TST).

Con : no treatment with TST.

Tramadol : TST and Tramadol 1 mg/kg at GB30.

GP-A : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 1 mg/kg at GB30.

GP-B : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 5 mg/kg at GB30.

GP-C : TST and *Gentianae Macrophyllae Radix* pharmacopuncture 20 mg/kg at GB30.

Values are expressed mean \pm SE.

들어 환자의 삶의 질 저하를 초래하고 있다¹⁹⁾.

신경병리성 통증은 당뇨병성 다발성 신경병증, 알코올성 다발성 신경병증, 후천성 면역결핍증, 방사선 손상, 삼차신경통, 대상포진 후 신경통, 종양, 다발성신경근염, 뇌졸중 후 중추성 통증, 척수 손상, 다발성경화증, 외상이나 수술 후 통증 등의 다양한 원인에 의해 발생할 수 있다²⁰⁾.

임상적 증상은 유발 자극에 의해 나타나는 증상들과 유발 자극 없이 나타나는 증상들로 나눌 수 있다. 유발 자극에 의한 증상은 보통의 통증 자극에 대해 낮아진 역치나 과도한 통증을 보이는 통각과민(hyperalgesia)과 보통 통증을 느껴야 하지 않는 자극에 의해 통증이 유발되는 이질통(allodynia)이 대표적이다. 유발 자극 없이 나타나는 증상은 쑤시는 듯한 통증, 전격통, 화끈거리는 통증 등으로 표현되는 자발통증(spontaneous pain)과 감각저하(hypoesthesia), 무감각(anesthesia) 등이 대표적이다. 또한 이상감각(dysesthesia)은 불유쾌한 비정상적인 감각으로 유발 자극의 유무 상태 모두에서 나타날 수 있는 흔한 증상이다²¹⁾.

현재 서양의학에서는 약물치료 위주로 아편유사제(opioids), 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants), 항경련제(anticonvulsants), 비스테로이드 항염증약(NSAIDs) 등이 사용되고 있으나, 그 효과는 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있어 새로운 치료 방법에 대한 연구들이 이루어지고 있다¹⁹⁾.

신경병리성 통증의 기전을 연구하기 위해 여러 동물 모델들이 개발되어 왔는데, 기계적인 말초신경 손상을 이용한 동물 모델로는 Bennett 등²²⁾의 chronic constriction injury(CCI) 모델, Seltzer 등²⁴⁾의 Partial sciatic nerve ligation(PSL) 모델, Kim 등²⁵⁾의 Spinal nerve ligation(SNL) 모델, Lee 등²⁶⁾의 TST 모델이 있다. 본 실험에서는 신경병리성 통증의 증상을 비교적 쉽고 일정하게 재현할 수 있는 장점이 있는 TST 모델을 사용하였다²⁷⁾.

한의학적으로 통증은 《素問·舉痛論》⁵⁾에서 “經脈流行不止, 環周不休, 寒氣入經而稽遲, 泣而不行, 客於脈外則血少, 客於脈中則氣不通, 故卒然而痛”이라 하여 통증의 원인을 경맥의 운행이 원활하지 못하여 발생하는 것으로 인식하였다. 신경병리성 통증은痺證의 범주로 인식할 수 있는데, 痺證에 대하여《素問·痺論》⁵⁾에서는 “風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也. 其風氣勝者爲行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲著痺也.”라 하여 風寒濕의 邪氣에 의해 痺證이 발생한다고 말하였고, 김 등⁶⁾은 痺證을 疼痛, 麻木, 重着, 發熱, 屈伸不利, 關節腫脹 등의 증상을 포괄하는 증후군으로 서양의학적으로는 뇌와 척수의 감각신경의 영역과 신경전달로의 장애, 말초신경의 손상이나 맥관계의 병변, 근

육병변으로 기인하는 지각장애와 유사하다고 말하였다.

藥鍼療法은 약침액을 經穴 또는 陽性反應點(壓痛點, 阿是穴)에 약침주입용 주사기를 사용하여 시술하는 방법으로 침구요법과 약물요법을 결합한 新鍼療法이다⁷⁾. 침구요법은 經絡論을 바탕으로 하고 약물요법은 氣味論을 바탕으로 하는데 약침요법의 경우 이 둘을 동시에 사용하게 되어 둘의 효과를 동시에 얻을 수 있는 치료요법이다. 약침요법은 그 적응증이 광범위하며, 시술 방법이 비교적 간편하고, 약을 복용하기 힘든 환자에게도 사용할 수 있는 장점이 있어 현재 임상에서 많이 활용되고 있고 연구도 활발히 이루어지고 있다²⁸⁾.

環跳(GB30)는 通經活絡, 疏散經絡風濕, 宣利腰髀氣滯하는 효능이 있는 足少陽膽經의 穴이다¹⁷⁾. 痺證을 치료하는데 多用되는 穴로 특히 좌골신경통 및 하지부 질환에 중요하게 사용된다^{18,29)}. 足太陽膀胱經과의 交會穴로 두 經絡의 尤주 부위를 모두 치료할 수 있는 장점이 있어, 坐骨神經痛, 腰股疼痛, 腰脚痛, 脚氣, 膝痛, 風濕關節痛, 半身不遂, 下肢癱瘓, 麻木偏癱, 偏身癱瘓, 小兒麻痺 등에 활용된다^{17,29)}.

秦艽(*Gentiana Macrophyllae Radix*)의 性은 微寒하고, 味는 苦辛하며, 胃·肝·膽經에 귀경한다. 秦艽는 祛風濕, 止痺痛, 清虛熱, 清濕熱하는 효능이 있어 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 骨節痠痛, 日晡潮熱 등을 치료하고, 성질이 燥하지 않아 風藥 중의 潤劑이며 發散藥 중의 補劑가 된다. 특히 風濕을 제거하고 經絡을 宣通하게 하여 止痛하게 하며, 蒸熱을 退하게 하는 효능이 있어 風濕痺痛과 骨蒸潮熱을 치료하는 要藥이 된다⁴⁾.

서양의학에서 tramadol은 신경병리성 통증치료에 일차 혹은 이차 약제로 사용될 수 있는 약물로²¹⁾ 아편제로서 약한 μ -opioid 수용체의 작용제이며, serotonin과 norepinephrine의 재흡수를 억제하는 작용이 있어, 진통제이면서 또한 항우울제로서 고려되기도 한다³⁰⁾. 본 실험에서는 tramadol(1 mg/kg)을 투여한 Tramadol군을 추가로 관찰하여 秦艽약침군과의 효과를 비교해 보고자 하였다.

이에 본 연구는 環跳(GB30)에 秦艽약침이 신경병리성 통증 유발 흰쥐 모델에 미치는 영향을 알아보기 위해 정상군(Nor)과 tibial & sural nerve transection으로 통증을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Con), 양측 環跳(GB30) 부위에 tramadol 1 mg/kg 시술군(Tramadol), 秦艽약침을 농도별로 1 mg/kg을 시행한 秦艽약침A군(GP-A), 5 mg/kg을 시행한 秦艽약침B군(GP-B), 20 mg/kg을 시행한 秦艽약침C군(GP-C)으로 나누어 dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 이질통에 대한 회피반응 시간 및 자극 강도의 변화, 중뇌에서 c-fos 발현, 척수에서

mGluR5, Bax 및 Bcl-2의 발현, Bax/Bcl-2 ratio의 변화, 혈액에서 leukocyte 등 혈구의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Dynamic plantar aesthesiometer는 시간에 따라 일정하게 증가하는 자극을 가할 수 있는 자동화된 기계로 von frey filament와 함께 신경병리성 통증의 기계적 이질통을 측정하는 데 이용되고 있다³⁰. 본 실험에서 dynamic plantar aesthesiometer를 이용하여 물리적인 이질통을 유발시켜 그 회피반응의 reaction time과 force intensity를 관찰한 결과, 회피반응의 reaction time에 있어서 대조군에 비하여 秦芫약침A군은 3회째~5회째, 秦芫약침B군은 1회째~5회째, 秦芫약침C군은 2회째~5회째에 유의한 증가를 각각 나타내었으며, force intensity에 있어서 대조군에 비하여 秦芫약침A군은 3회째와 4회째, 秦芫약침B군은 3회째와 5회째, 秦芫약침C군은 3회째~5회째에 유의한 증가를 각각 나타내었다. 결과를 보면 물리적 이질통을 감소시키는 효과는 저농도군인 秦芫약침A군에서도 나타났으며, 대체로 고농도에서 더 큰 효과를 나타내는 경향을 보였다. 이는 秦芫약침이 신경병리성 통증이 유발된 흰쥐의 낮아진 역치를 높여줌으로써 회피반응의 감소를 나타낸 것으로, 秦芫약침이 신경병리성 통증 모델의 유발된 이질통을 감소시키는 효과가 있으며, 그 효과는 용량의존적(dose-dependent)인 경향이 있음을 나타낸 것으로 사료된다.

c-Fos는 다양한 자극에 의해 신경세포에서 빠르고 일시적으로 발현되어 c-Fos 단백질의 생성을 코딩하게 되는 조기발현유전자로 Hunt³²의 발표 이후로 물리적·화학적·열 자극 등의 다양한 유해 자극에 의해 뇌와 척수에 c-Fos 발현이 일어난다는 많은 연구들이 있어 왔다³³. 현재 c-Fos 발현은 통증에 대한 신경세포의 반응을 파악하는 유용한 척도 중 하나로 여겨지고 있다³⁴. 본 실험에서는 뇌 중심 회백질 부위에서의 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였는데, 그 결과 대조군에 비하여 秦芫약침A군, 秦芫약침B군, 秦芫약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다. 秦芫약침군 중 秦芫약침A군이 c-fos 단백질 발현 감소에 가장 좋은 효과를 보여 용량의존적인 경향을 보이지 않았으나, 모든 秦芫약침군에서 c-fos 단백질 발현이 현저한 감소를 보였다는 점에서 秦芫약침이 신경병리성 통증 감소에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

Bax 단백질은 발생 과정 중 신경세포의 사멸, 림프계 및 생식기관의 항상성 유지, 종양 억제, DNA 손상에 이은 세포사, 허혈-재관류 손상 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. Bax 단백질은 주로 세포질에 존재하지만 DNA 손상 등 스트레스가 전해지면 사립체 외막으로 이동하여 세포

자멸사를 유도한다. Bcl-2는 Bax 단백질의 작용을 억제하는 대표적인 단백질로서 사립체 막에서의 Bax 단백질의 소중합체형성을 억제하여 Bax 단백질의 작용을 방해하고 궁극적으로 세포 자멸사를 억제하여 세포생존을 촉진하게 된다³⁵. 본 실험에서는 Bax 발현에 있어서 대조군에 비하여 秦芫약침B군과 秦芫약침C군이 유의한 감소를 나타내었다. Bcl-2의 발현 변화에 있어서 대조군에 비하여 秦芫약침A군과 秦芫약침C군은 유의한 증가를 나타내었으며, Bax/Bcl-2 ratio에 있어서 대조군에 비하여 秦芫약침A군, 秦芫약침B군, 秦芫약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다. Bax/Bcl-2 ratio 감소에 있어서 秦芫약침B군이 가장 큰 효과를 보여 용량의존적인 경향은 없었으나, 모든 秦芫약침군에서 Bax/Bcl-2 ratio 감소를 보였고, 이는 秦芫약침이 신경병리성 통증 모델에서 신경 손상 부위의 세포자멸사를 억제하여 신경세포 손상 부위의 손실을 줄이고, 세포 생존을 촉진하는 효과를 가져 올 수 있다는 가능성을 나타낸 것으로 사료된다.

Glutamate는 중추신경계에 분포하는 주요한 흥분성 신경전달 물질로 inotropic glutamate receptors(iGluR)와 metabotropic glutamate receptors(mGluR) 두 개의 수용체와 결합을 한다³⁶. 이 중 mGluR 수용체의 하나인 mGluR5는 신경전구세포의 증식, 생존, 분화와 밀접한 관계로 신경세포의 생성에 영향을 미치며³⁷, 산소 결핍이나 nitricoxide 독성에 대한 신경보호 작용이 있는 것으로 알려져 있다³⁸. 본 실험에서 mGluR5의 발현 변화를 관찰한 결과 대조군에 비하여 秦芫약침A군과 秦芫약침C에서 유의한 증가를 나타내었다. 이는 秦芫약침A군과 C군에서는 秦芫약침이 신경병리성 통증 모델에서 신경보호 및 신경 손상 부위의 신경조직형성 효과를 가질 수 있다는 가능성을 나타낸 것으로 생각할 수 있다.

혈액 CBC 중 WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes를 관찰한 결과 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 모든 秦芫약침군에서 상승하는 경향이 나타나 秦芫약침의 효과가 면역반응의 항진과 어떤 관련이 있었을 것으로 해석해 볼 수 있다. 이는 강 등³⁹의 연구와 비슷한 결과를 보인 것이나, WBC의 감소로 소염 효과를 가져온 기존의 신경병리성 통증 관련 약침 연구^{9,11,12}와는 다른 결과로 이에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 秦芫약침군과 tramadol을 투여한 군의 치료 효과를 비교해 보았다. tramadol은 보통 성인에게 1회에 50~100 mg 정맥 주사 혹은 근육 주사하게 된다⁴⁰. 본 연구에서는 60 kg 성인의 1회 투여량을 60 mg으로 계산하여 秦芫약침A군과 같은 1 mg/kg의 용량을 투여하여 관찰

하였다. 그 결과 물리적 회피반응의 reaction time에 있어서 Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군은 4회째, 秦艽약침B군은 1회째와 5회째, 秦艽약침C군은 4회째와 5회째에 유의한 증가를 보였다. 회피반응의 force intensity 변화에 있어서 Tramadol군에 비하여 秦艽약침군이 유의한 차이를 보이지 않았으나, 秦艽약침군은 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 보인 반면 Tramadol군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 Bax/Bcl-2 ratio 변화를 관찰한 결과 Tramadol군에 비하여 秦艽약침A군과 C군이 유의한 증가를 보였다. c-fos 단백질 발현에 있어서 Tramadol군과 秦艽약침군은 유의한 차이를 보이지 않았고, mGluR5 발현은 Tramadol군에 비하여 秦艽약침B군이 유의한 감소를 보였으나, 대조군에 비하여 Tramadol군은 유의한 차이를 보이지 않은 반면, 秦艽약침A군과 C군은 대조군에 비하여 유의한 증가를 보여 Tramadol군과 秦艽약침군 간의 효과 비교가 어려웠다. 위의 결과로 볼 때 秦艽약침군이 Tramadol군보다 물리적 이질통 감소에 더 효과적일 수 있고, Bax/Bcl-2 ratio 변화에 있어서 Tramadol군이 秦艽약침군보다 효과적일 것이라는 추측을 해볼 수는 있으나, 본 연구에서 Tramadol군은 秦艽약침A군과 같은 저용량(1 mg/kg)만이 투여되어서 秦艽약침과 tramadol의 투여 용량, 간격, 횟수 등에 따른 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 신경병리성 통증 흰쥐 모델에 環跳(GB30) 秦艽약침이 물리적 이질통에 의한 회피반응과 c-Fos 단백질 발현, Bax/Bcl-2 ratio에 있어 모든 秦艽약침군이 유의한 효과를 보였고, mGluR5 발현에 秦艽약침A군과 C군이 유의한 효과를 보인 것을 확인하였다. 이를 통해 秦艽약침이 신경병리성 통증 억제에 효과가 있으며, 더 나아가 신경보호 및 형성 작용에도 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다. 향후 秦艽약침의 신경보호 및 형성 작용, 면역반응, 통증억제기전에 미치는 영향, 농도와 투여 횟수 및 기간에 따른 효과 차이, 부작용 등에 대한 연구가 필요하며 임상적 적용을 위해 실험적 모델에 대한 임상적 연관성에 대한 상세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

1. Plantar withdrawal response의 reaction time 과 force intensity 있어서 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군 모두 대조군에 비하여 유의한 증

가를 나타내었다.

2. c-Fos 단백질 발현 변화에 있어서 대조군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다.
3. Bax 발현에 있어서 대조군에 비하여 秦艽약침B군과 秦艽약침C군이 유의한 감소를 나타내었다.
4. Bcl-2의 발현 변화에 있어서 대조군에 비하여 秦艽약침A군과 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다.
5. Bax/Bcl-2 ratio에 있어서 대조군에 비하여 秦艽약침A군, 秦艽약침B군, 秦艽약침C군 모두 유의한 감소를 나타내었다.
6. mGluR5의 발현 변화에 있어서 대조군에 비하여 秦艽약침A군과 秦艽약침C군은 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합해 봤을 때 環跳(GB30) 秦艽약침이 신경병리성 통증이 유발된 흰쥐 모델에 대해 통증 억제의 효과가 있다고 사료되며, 신경보호 및 형성 작용에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

VI. References

1. Jensen TS, Baron R, Haanpaa M et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011 ; 152 : 2204-5.
2. Maag R, Baron R. Neuropathic pain : translational research and impact for patient care. *Curr Pain Headache Rep*. 2006 ; 10(3) : 191-8.
3. Minn YK, Kim SM. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. *J Korean Med Assoc*. 2008 ; 51(12) : 1139-48.
4. van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population : a systematic review of epidemiological studies. *Pain*. 2014 ; 155(4) : 654-62.

5. Lee KW. Huangdi Neijing Suwen 1. Seoul : Yeogang Press. 2007 : 581-2, 644-5.
6. Kim SS, Ko SG, Cho KH et al. East-West Medical Study on Bi syndrome-Focusing on Causes and Symptoms. Korean J.Orient.Int. Med. 1994 ; 15(1) : 116-27.
7. The Compilation Committee of the Korean Acupuncture and Moxibustion Society. The Acupuncture and Moxibustion (2). Gyeonggi : Jipmoondang. 2008 : 408.
8. Kim SP, Choi SM, Kim JE, Kim JH, Shin KM, Kim JH. Effects of Clematidis Radix Pharmacopuncture Injected at Sinsu(BL23) on Neuropathic Pain in Rats. The Acupunct. 2014 ; 31(4) : 57-70.
9. Lee DG, Lee OJ, Lee JH et al. The Effects of Eucommiae Cortex Pharmacopuncture Injected at Sinsu(BL23) on Neuropathic Pain in Rats. The Acupunct. 2013 ; 30(4) : 69-78.
10. Bang SP, Ryu MS, Kim JH et al. Effects of Radix Aconiti Herbal Acupuncture Injected at Hwando(GB30) on Neuropathic Pain in Rats. The Acupunct. 2009 ; 26(6) : 67-76.
11. Lee DH, Youn DH, Na CS, Yoon YC. Effects of Bee Venom Acupuncture Injected at Hwando (GB30) on Neuropathic Pain in Rats. The Acupunct. 2005 ; 22(5) : 67-77.
12. Kim SN, Kim SC, Choi HK et al. Inhibitory Effect of Scolopendird Aqua-Acupuncture Injected at Hwando(GB30) on Neuropathic Pain in Rats. The Acupunct. 2004 ; 21(3) : 145-67.
13. Kim SJ, Jung MJ, Park SH et al. Analgesic Effects of Herba Chelidonii Pharmacopuncture in the Rat Models of Peripheral Neuropathic Pain. J Oriental Rehab Med. 2007 ; 17(2) : 1-16.
14. Korean Medicine Univ Herbalogy Compilation Committee. Herbalogy. Seoul : Younglimsa. 2004 : 310-1.
15. Cho HC, Jung HJ, Lee JG, Jo MG, Jee SY. Anti-inflammatory effects of the MeOH extract of Gentianae Macrophyllae Radix in vivo. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2009 ; 22(3) : 63-70.
16. Park JH, Yim YK, Lee H. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with Gentianae macrophyllase Radix Solution at Joksamni(ST36) on Collagen-induced Arthritis DBA/1J mice. Korean Journal of Acupuncture. 2007 ; 24(3) : 117-37.
17. Korean Medicine Univ Acupuncture & Moxibustion and Acupoint Department. The Acupuncture and Moxibustion 1. Seoul : Jipmoondang. 1998 : 643-5.
18. Je BS, Lim LC, Oh MS. The Literatural Study on Acupuncture and Moxibustion Therapy of Arthralgia Syndrome. Research Institute of Korean Medicine Thesis Collection. 2004 ; 13(1) : 61-9.
19. Butera JA. Current and emerging targets to treat neuropathic pain. J Med Chem. 2007 ; 50(11) : 2543-6.
20. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. Eur Neuropsychopharmacology. 2012 ; 22 : 81-91.
21. Jongen JL, Hans G, Benzon HT, Huygen F, Hartrick CT. Neuropathic pain and pharmacological treatment. Pain Pract. 2014 ; 14(3) : 283-95.
22. Honoré PH, Basnet A, Laila Eljaja L et al. Neuropathic pain models in the development of analgesic drugs. Scandinavian Journal of Pain. 2011 ; 2(4) : 172-7.
23. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 1988 ; 33 : 87-107.
24. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 1990 ; 43 : 205-18.
25. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain. 1992 ; 50 : 355-63.
26. Lee BH, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. Neuroreport. 2000 ; 11(4) : 657-61.

27. Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 ; 80(1) : 93–108.
28. Scientific Committee of Korean Pharmacopuncture Institute. *Pharmacopunctureology.* Seoul : Elsevier Korea, 2008 : 3, 6–8.
29. Deadman P, Al-Khafaji M, Baker K. *A Manual of Acupuncture.* China : Journal of Chinese Medicine Publications, 2007 : 446–7.
30. Barber J. Examining the use of tramadol hydrochloride as an antidepressant. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2011 ; 19(2) : 123–30.
31. Nirogi R, Goura V, Shanmuganathan D, Jayarajan P, Abraham R. Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2012 ; 66 : 8–13.
32. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987 ; 328 : 632–4.
33. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull.* 1998 ; 45(1) : 1–8.
34. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 2005 ; 77(5) : 299–352.
35. Choi JH. Bax protein in cancer treatment. *J Korean Med Assoc.* 2007 ; 50(11) : 1016–22.
36. Kim HK, Kim PJ, Baik SW, Kim IS, Chung KS. Molecular Biologic Study on the Changes of Glutamate Receptor (mGluR5) in Rat Hippocampus after Brain Ischemia. *Korean J Crit Care Med.* 2000 ; 15(2) : 75–81.
37. Zhaoa L, Jiaoa Q, Yanga P et al. Metabotropic glutamate receptor 5 promotes proliferation of human neural stem/progenitor cells with activation of mitogen-activated protein kinases signaling pathway in vitro. *Neuroscience.* 2011 ; 192 : 185–94.
38. Maiese K, Swiriduk M, TenBroeke M. Cellular Mechanisms of Protection by Metabotropic Glutamate Receptors During Anoxia and Nitric Oxide Toxicity. *J Neurochem.* 1996 ; 66(6) : 2419–28.
39. Chiang SY, Bang SP, Kim JH, Wei TS, Yun YC. Effects of Bee Venom Acupuncture at Sinsu(BL23) and Daejangsu(BL25) in Different Concentration on Neuropathic Pain Induced by Tibial and Sural Nerve Injury in Rats. *The Acupunct.* 2010 ; 27(5) : 13–24.
40. Lee CR, McTavish D, Sorkin EM. Tramadol. *Drugs.* 1993 ; 46(2) : 313–40.