

니코틴중독에 대한 족삼리 전침자극 및 황련의 작용기전

채윤병 · 이봄비 · 권영규^{1*} · 함대현 · 심인섭 · 이혜정

경희대학교 동서의학대학원 침구경락학교실, 1: 경산대학교 한의과대학 생리학교실

Effect of Acupuncture and *Coptidis Rhizoma* on Repeated Nicotine-induced Behavioral Sensitization in the rats

Yun Byung Chae, Bom Bi Lee, Young Kyu Kwon^{1*}, Dae Hyun Hahm, In Sub Shim, Hye Jung Lee

Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,
1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyungsan University

We have previously demonstrated that repeated injections of nicotine produced an increase in locomotor activity, dopamine(DA), release and c-Fos expression in the nucleus accumbens, one of the major projection areas of the central DA system. Acupuncture as a therapeutic intervention is widely used for the treatment of many functional disorders such as substance abuse and mental dysfunction. And many studies have shown that *Coptidis Rhizoma* has a suppressive effect on the central nervous system (CNS) and can affect the neurotransmitter systems in the CNS. In order to investigate whether acupuncture and *Coptidis Rhizoma* have an influence on nicotine-induced reinforcing and behavioral effects, we examined the effect of zusanli(ST36) and *Coptidis Rhizoma* on repeated nicotine-induced locomotor activity, and zusanli(ST36) on c-Fos expression as an important maker of postsynaptic neuronal activity in nucleus accumbens. Male SD rats received *Coptidis Rhizoma* (100mg/kg, p.o.) 30 min before injections of nicotine (0.4 mg/kg, s.c.) for 7 days. Rats were followed withdrawal for 3 days and one challenge for 1 day. Systemic challenge with nicotine produced a much larger increase in locomotor activity. Pretreatment with acupuncture at zusanli(ST36, 100Hz) and *Coptidis Rhizoma* decreased in nicotine-induced locomotor activity. These results demonstrated that reduction in locomotor activity by acupuncture at zusanli(ST36, 100Hz) and *Coptidis Rhizoma* may be mediated by reduction of dopamine release. Our results suggest that acupuncture at zusanli(ST36, 100Hz) and *Coptidis Rhizoma* may have therapeutic effect on nicotine addiction.

Key words : Acupuncture, Nicotine, Behavioral sensitization, C-Fos, Addiction, *Coptidis Rhizoma*, zusanli(ST36)

서 론

흡연은 건강에 매우 해로우며, 이러한 담배에 포함되어 있는 수많은 복합물질 중에서 담배의 중독성을 일으키는 물질로 알려진 것은 니코틴이다. 니코틴의 강력한 중독성 때문에 많은 문제들이 발생하고 있다. 니코틴 중독을 치료하기 위해서 Nicotine gum, transdermal nicotine patches, nasal sprays, nicotine inhalers, bupropion 등의 약물학적 접근이 이뤄지고 있다. 니코틴은 니코틴 아세틸콜린 수용체(nAChRs)의 효능제로서 코카인, 암페타민등과 같은 다른 중독성 약물과 신경화학적 및 행동

학적 특성을 공유한다.^{1,2)} 니코틴을 반복적으로 주사하면 보행성 활동의 증가로 나타나는 '행동적 민감화' 현상이 나타난다. '행동적 민감화'란 적은 양의 중독성 약물을 반복적, 간헐적으로 처치하면 설치류의 보행성 활동(locomotor activity)과 상동적 행동(stereotypy activity)이 점진적으로 증가하는 현상으로, 이것은 활동량의 점진적인 증가가 유도되는 상태인 발달(development)과 일단 유도된 높은 활동량이 비교적 장기간 유지되는 상태인 발현(expression)으로 구성되어 있다. 행동적 민감화 현상은 약물중독의 발달과 약물로 유도된 정신신경증의 지표로 이용되고 있다.³⁻⁵⁾ 일반적으로, 중독성 약물에 의한 행동적 민감화를 담당하는 신경적 근거(neural substrate)는 중추 도파민신경세포와 그 표적 영역인 측핵(nucleus accumbens)과 선조체(striatum)인 것으로 알려져 있으며 니코틴에 의한 행동적 민감화도 이 두

* 교신저자 : 권영규, 대구광역시 수성구 상동 165, 경산대학교 한의과대학

E-mail : ykkwon@kyungsan.ac.kr Tel : 053-770-2242

· 접수: 2002/06/08 · 수정: 2001/07/20 · 채택 : 2002/08/05

시스템, 특히 복측 피개야(ventral tegmental area, VTA)에서 기시하여 측핵과 후관(olfactory tubercle)내의 목표물에 종지하는 중뇌연도파민계(mesolimbic dopamine system)에 의해 주로 매개된다.^{6,7)}

鍼灸治療는 예로부터 약물중독과 정신 신경계통 등의 다양한 질환을 치료하는데 널리 이용되어져 왔다. 최근 보고된 바에 의하면 전침 자극과 경피신경 자극이 각각 몰핀과 헤로인 중독의 금단증상을 완화하는 효과와 전침 자극이 알콜 섭취행동 증가를 억제하는 작용이 증명되었다.^{8,9)} 이는 침 자극이 다양한 중독성 약물에 의한 중독현상을 조절하는 효과를 보여주어 니코틴 중독에 있어서도 유효한 치료작용이 기대되고 있다. 한편, 생약 제재 및 천연물은 오래 전부터 중국에서 쓰여 졌으며, 그 대부분이 식물성이다. 이러한 생약제재는 여러 방면에서 치료제로 사용되고 있으며, 효과가 복잡적이며, 부작용이 적다. 이는 부성분이 공존하기 때문에 유효성분의 흡수가 완화하며 따라서 작용이 지속적인 장점을 가지고 있다. 한약제재중의 하나인 황련은 건위·소염·항균 등의 효능이 있어 소화불량, 위염, 장염, 복통, 구토, 이질, 심계(心悸), 번열(煩熱), 인후종통(咽喉腫痛), 토혈, 코피, 하혈, 화상 등의 치료에 처방한다. 또한 황련은 진정작용을 가지고 있어서 정신불안증의 치료에도 사용되고 있는 약제이다. 따라서 황련이 진정작용과 정신불안에 효과가 있음을 비추어 약물 중독으로 인한 행동적 변동과 중추신경계에 영향을 미칠 것으로 기대된다. 최근 면역조직화학적 방법을 이용하여 proto-oncogene인 c-Fos의 발현의 강도와 기간을 통하여 신경의 활성도를 측정할 수 있어, c-Fos 단백질의 발현을 측정하여 다양한 행동학적, 약물학적 처치에 의한 신경의 회로를 관찰하고 있다. 여러 연구결과들을 보면, 니코틴의 주입이 nucleus accumbens, striatum, prefrontal cortex 등의 도파민성 신경세포의 투사부위에 c-Fos의 발현의 증가를 야기시켰다.^{10,11)}

따라서 본 연구에서는 니코틴의 반복적 투여로 유도된 니코틴 약물중독모델에서 행동학적으로 보행성 활동량을 측정하고, 신경화학적으로는 측핵부위에서 면역조직화분석법을 이용하여 c-Fos 발현을 관찰하여, 족삼리(ST36) 전침의 빈도별 자극과 황련이 니코틴 중독에 의한 행동적 민감화 현상에 어떤 작용을 하는지 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague Dawley 종 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 실험동물들은 (주) 샘타코에서 공급을 받아 동서의학대학원 부설 동물 사육실에서 사육되었다. 실험 시작 전에 사육실에서 1주일 정도 적응시켰으며 실험 시작 시 몸무게는 250~270g이었으며 4 마리씩 개별장에 수용되었다. 주야 주기는 12시간 (조명 상태: 08:00 - 20:00, 소등 상태: 20:00 - 08:00)으로 적당한 온도 상태(22°C ± 2°C)에서 충분한 먹이와 물을 공급받았으며 모든 약물처치(AM 11:00)와 행동측정(AM 9:00~12:00)은 조명주기 중에 일정한 시간대에 실행되었다.

2. 행동검사

1) 보행성 활동량 측정장치

실험동물의 활동량을 정량화하기 위하여, 본 연구에서는 S-MART프로그램(Pan Lab, Spain)을 이용하여 보행성 활동량을 측정하였다. 크기가 가로, 세로, 높이가 각각 26×30×45 cm인 검은 색 무광택 아크릴 상자에서 실험동물의 움직임을 추적하였다. 8 개의 상자 약 2.5 meter 위에 설치된 디지털 카메라에서 얻어진 화상을 컴퓨터에 전달하여, 검은 배경에 흰색 피사체의 대조의 원리를 이용하여 흰색 실험동물 상(image)의 중심점을 초당 수 번을 인식하는 방식으로 실험동물의 움직임을 따라 추적하였다. 실험동물의 움직임의 궤적을 데이터화하여 움직인 거리를 정량화 하였다.

2) 실험절차

실험은 하루에 두 번씩 7 일 동안 연속적으로 nicotine hydrogen tartrate (0.4mg/kg, s.c.; Sigma, St. Louis, MO)을 처치하는 민감화 발달단계(sensitization phase)와 3일 동안 니코틴을 철회하는 약물철회단계(withdrawal phase), 그리고 약물철회기간이 끝난 다음날 다시 동일 용량의 니코틴을 한 번 처치하는 검사단계(testing phase)로 구성되었다. 한편, 니코틴의 반복적인 처치에 의한 활동량의 점진적인 증가로 표현되는 행동적 민감화 현상이 일어나는 지 확인하기 위하여 통제군은 생리식염수(1ml/kg, s.c.)만을 반복적으로 투여하였다.

(1) 발달단계

동물은 사육장에서 외부 소음이 차단된 실험실로 옮겨 각각 무게를 잰 후 8개의 활동량 측정상자에 개별적으로 넣어졌다. 상자 내에서 60분간의 적응시간(adaptation)을 거친 후, 다시 60분간의 기저활동량(baseline)을 측정하였다. 기저활동량 측정기간이 끝난 후 니코틴(0.4mg/kg, s.c.)을 투여하고 60분동안 처치후 활동량(after treatment ;ATM)을 7일 동안 측정하였다. 약물처치 후 약 6시간 후에 사육장내에서 한번 더 약물을 주입하였다. 한편, 황련효과를 검사하는 실험동물에게는 니코틴(0.4 mg/kg, s.c.)을 투여하기 30 분전에 황련(100 mg/kg, p.o.)을 투여하여 몸 안에서 충분히 한약이 흡수되도록 처치하였다

(2) 약물철회단계

발달 단계가 끝난 후 3일간의 약물철회단계에 니코틴 투여를 철회하고, 실험군을 나누어 전침자극을 실시하였다. 동물을 스트레스를 최대한 받지 않도록 특수 제작된 장치를 이용하여, 이 장치에 30분간 넣어두고 어떤 처치도 하지 않는 대조군(Holder; n=8)과 족삼리(ST36)와 삼음교(SP6) 경혈에 해부학적으로 상응하는 부위에 양측으로 30분간 전침자극하는 실험군으로 구분하여 처치하였다. 각 실험군은 고빈도 주파수 100Hz, 저빈도 주파수 2Hz를 선정하여 100Hz 전침자극군(n=8), 2Hz 전침자극군(n=8)으로 분류하여 전침자극을 실시하였고, 또한 꼬리 자극군(n=8)은 비경혈점으로 꼬리부위(꼬리의 중간부위)를 고빈도 주파수 100Hz로 전침자극을 실시하였다. 모든 전침자극은 10분 간격으로 1mA, 2mA, 3mA 로 점진적으로 증가시키는 방식을 택하였다. 한편, 황련효과를 실험하는 동물은 각 군마다 6~8마리씩 배정하여 ① SAL(n=6) 군: 흰쥐에게 생리식염수(1cc/1kg, p.o.)를

11일 동안 투여한 후, 3일 동안의 철회 기간을 거친 다음, 11일째 다시 생리식염수에 재 노출시킨 군 ② NIC(n=8) 군: 흰쥐에게 니코틴(0.4mg/kg, s.c.) 투여 30분전에 생리식염수(1 cc/1kg, p.o.)를 위와 동일한 방법으로 투여한 군 ③ NIC+CR (n=8) 군: 흰쥐에 니코틴(0.4mg/kg, s.c.) 투여 30분 전에 황련(100mg/kg, p.o.)을 위와 동일한 방법으로 투여한 군으로 구분하였다.

(3) 검사단계

약물철회단계가 끝난 다음 즉, 마지막 니코틴 투여한지 96 시간 경과 후에 대조군은 Holder에 30분간 두고, 실험군은 각각 해당하는 전침 자극을 한 후, 동일용량의 니코틴을 투여하는 1회의 검사단계가 실시되었다.

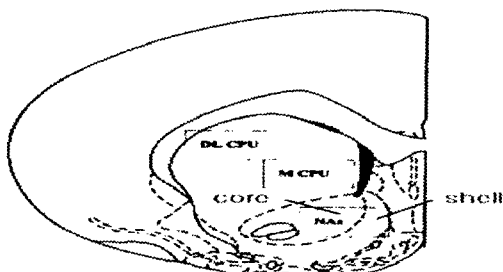
3. 시료제조

황련은 시중건재상에서 구입, 엄선하여 사용하였으며, 니코틴(cocaine, Sigma)은 표준품을 사용하였다. 황련 500g을 정확히 평량한 후, 수욕상에서 85% 메탄올을 사용하여 3회 추출하였으며, 추출물을 감압 농축한 후, 그 추출물을 동결건조(-66℃, 10mmHg)시켜 분말 건조하였다. 건조시켜 얻은 황련은 123g으로써, 수율은 26.47%였다.

4. 면역조직화학분석법

제 11일 째 검사단계에서 니코틴을 투여하고, 1시간의 행동 검사를 마친 후, pentobarbital (100mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후에 심장을 통해 100ml의 생리식염수로 혈액을 관류시키고, 1000ml의 4% paraformaldehyde(PFA)로 조직을 고정시켰다. 뇌 조직을 꺼낸 후에 2시간 동안 고정액에 후고정을 한 다음, 20% sucrose 용액에 담귀 4℃ 냉장 상태로 overnight하였다. -20℃상태에서 30μm두께로 뇌 조직을 절편하여 축삭 부위를 취한다(Fig.1).

조직절편은 Phosphates Buffer Solution (PBS)에 3회 세척하여 0.3% Triton X, 0.1% Sodium+ azide, 1:2000 희석된 primary rabbit anti-Fos antibody (Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE)를 이용하였으며 발색제로는 DAB을 사용하여 Fos protein을 발현시켰다.



1. Schematic drawing of showing the approximate field lined in the nucleus accumbens (NAs).

처리

실험에서는 SPSS 프로그램을 이용하여 통계분석을 하였기에 관련된 행동 데이터는 약물처치 후 60 분 동안의 총

활동량 혹은 10 분 회기간의 활동량에서 얻어진 값으로 평가하였으며, 반복측정법을 이용한 이원변량분석으로 분석하였고, 각 집단간 차이는 LSD test로 사후검증을 실시하였고, 황련에 관련된 행동데이터의 사후 검증은 Tukey test를 실시하였다. 면역조직화학분석법의 데이터는 Fos 양성반응을 보인 신경세포의 평균치를 계산하여, 일원변량분석법으로 분석하였고, 각 집단간 차이는 LSD test로 사후검증을 실시하였다. p 값이 0.05이하인 경우에 유의한 차이가 있는 것으로 인정하였다.

실험결과

1. 행동검사

1) 니코틴 반복 처치에 의한 민감화 현상

니코틴 반복처치로 유도된 행동적 민감화 현상의 발달단계에서의 각 집단의 활동량을 관찰한 결과, 통제군(생리식염수 처치군), 대조군(Holder집단), 100Hz전침자극군, 2Hz전침자극군, 꼬리 자극군은 각각 제 1일째 니코틴 급성 처치시에 1997±318, 3820±379, 3985±365, 3911±467, 3974±477을 나타내었고, 제 7일째 니코틴 반복 처치시에 1628±191, 5673±383, 5910±530, 5627±394, 5486±367을 나타내었다. 니코틴에 반복 처치됨에 따라 같은 농도의 니코틴 노출시, 보행성 활동량이 증대되는 행동적 민감화 현상이 유도되었다. 니코틴 반복처치에 대한 효과를 분석한 결과, 통제군(생리식염수 처치군)과 실험군 간에 유의미한 차이를 보여주었다 [F(4,35)=11.206, p<0.001]. 행동 측정일에 따른 집단별 사후분석(LSD) 결과, 니코틴 처치군은 통제군에 비해 통계적인 유의미한 차이를 보이며 높은 활동량을 나타냈다. 전침 자극하기 전인 제 7일째 행동검사에서, 행동 측정일에 따른 집단별 사후분석(LSD) 결과, 니코틴을 7일 동안 반복적으로 처치하여 행동적 민감화 현상을 유도하는 발달단계에서 대조군과 실험군 간에 활동량의 차이는 나타나지 않았다(대조군과 비교에서, 각각 p>0.683, p>0.935, p>0.746)(Fig.2).

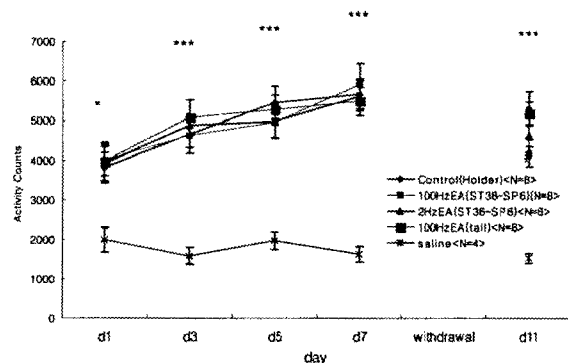


Fig. 2. Rats were pretreated with nicotine twice daily for 7 consecutive days and were treated with Electroacupuncture at ST36(n=7) respectively during withdrawal period and tested with a nicotine challenge on day 11. The control group was not given any treatment except a slight grasp during 3min and challenge with nicotine(holding). * Significant difference from control(holding) value *P<0.001

2) 니코틴 반복 처치에 의한 민감화 현상에 대한 전침 자극 효과
니코틴 철회기간동안 전침자극을 받은 후, 통제군(생리식염

수 처치군), 대조군(Holder집단), 100Hz전침자극군, 2Hz전침자극군, 꼬리 자극군은 각각 제 11일 제 니코틴 검사단계에서 활동량은 1536±121, 5306±438, 4172±343, 4608±274, 5180±297을 나타내어 대조군에 비하여 100Hz 전침자극군은 행동적 민감화 현상의 발현을 유의하게 감소시켰다. 니코틴 반복처치에 대한 효과를 분석한 결과, 실험군 간에 유의한 차이를 보여주어 니코틴으로 행동적 민감화 현상을 유도하였다 [F(4,35)=13.045, p<0.001]. 제 11일제 행동검사에서, 행동 측정일에 따른 집단별 사후분석(LSD) 결과, 대조군(Holder집단)은 통제군에 대해서 니코틴에 의한 행동적 민감화의 발현이 성공적으로 나타났다(5306±438, p<0.001). 2Hz전침자극군, 꼬리자극군은 대조군에 비해서 행동적 민감화 발현의 유의한 억제가 나타나지 않았다(4608±274, 5180±297, p>0.143, p>0.789). 그러나, 100Hz전침자극군은 대조군에 비해서 전침 자극으로 인한 행동적 민감화 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다(4172±343, p<0.05)(Fig.3).

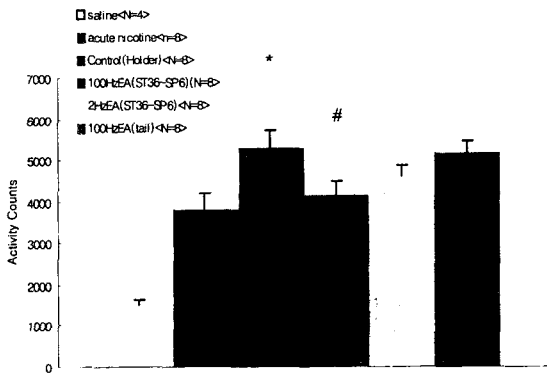


Fig.3. Rats were pretreated with nicotine twice daily for 7 consecutive days and they were treated with Electroacupuncture at ST36(n=7) respectively during withdrawal periods and tested with a nicotine challenge on day 11. * Significant difference from control(Holding) value *P<0.001, #P<0.05

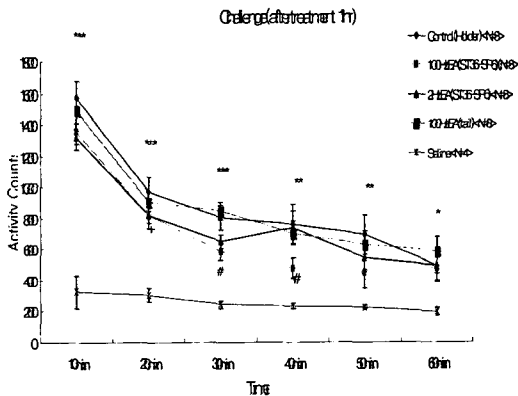


Fig.4. The effects of Electroacupuncture on locomotor activity tested with a nicotine challenge on day 11. Means±S.E.M.) Locomotor activity are shown for 6 consecutive 10 min periods, consisting of 6 successive 10 min after treatment periods. *P<0.05, **P<0.01, P<0.001, #P<0.05

3) 검사단계에서 보행성 활동량 비교 (10분 회기별 분석)

검사단계에서 니코틴 약물 투여 후 60분 동안 활동량의 변화를 10분 단위별로 관찰하였을 경우, 통제군에 비하여, 니코틴 반

복처치군이 모든 회기에서 증가된 활동량을 보여주었다. 니코틴 반복처치에 대한 효과를 분석한 결과, 실험군 간의 차이를 보여주었다 [F(4,35)=18.965, p<0.001]. 니코틴 투여 후 10분 회기별로 집단별 사후분석(LSD) 결과, 대조군은 통제군에 비해, 약물 처치 후 모든 회기에서 유의한 증가를 보여주었다(각각 p<0.001, 0.001, 0.001, 0.01, 0.01, 0.05). 100Hz전침자극군은 대조군에 비하여, 니코틴 투여 후 60분 동안의 모든 회기에서 보행성 활동량이 감소하였으며, 처치후 30분, 40분에 유의한 감소를 나타냈다(각각 p<0.05, p<0.05). 2Hz 전침자극군은 대조군에 비하여 니코틴 투여 후 10분에 유의한 감소를 나타냈다(p<0.05). 꼬리자극군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내지 못하였다(p<0.05)(Fig.4).

2. 니코틴 반복 처치에 의한 민감화 현상에 대한 황련의 효과

생리식염수 처치군은 처음 생리식염수를 투여한 1일째의 보행성 활동량이 1927.0±427.5였으며, 생리식염수를 반복 처치한 후, 7일째의 활동량은 1719.5±84.3였다. 또한 3일간의 철회기간을 거친 다음, 11일째의 생리식염수 재투여시 활동량이 1737.4±371.3으로 보행성 활동량에 별 차이를 보이지 않았다 (F(2,8)=2.568, P>0.05). 니코틴 처치군은 처음 코카인을 투여한 1일째의 보행성 활동량이 3321±228.5였다. 10일 동안 반복되는 코카인 투여에 의한 보행성 활동량을 측정된 결과, 활동량이 3873.0±209.3였다. 3일간의 철회 기간을 거친 다음, 11일째 코카인에 재노출했을 때 보행성 활동량은 4496.8±431.9으로 행동적 민감화 현상을 보였다(F(2,14)=2.258, P<0.05). 그러나 니코틴 투여 30분전에 황련을 투여한 집단의 경우, 1일째의 보행성 활동량이 2441.8±358.6였으며, 반복적인 황련의 투여 후, 7일째의 활동량은 2973.9±295.7였으며, 3일간 철회기간을 거친 다음 11일째의 보행성 활동량은 3539.2±417.2으로 반복적인 니코틴 투여에 대한 보행성 활동량에 별 차이를 보이지 않았다(F(2,23)=0.061, P>0.05). 그러므로 7일 동안 황련을 투여한 군의 경우 니코틴 군에 대해 보행성 활동량이 유의한 감소를 보여 주었으며 (F(2,13)=5.262, P<0.05), 3일 동안의 철회기간을 거친 다음, 11일째의 니코틴에 재노출된 행동적 민감화 현상에서도 유의적인 감소를 보였다(F(2,13)=4.78, P<0.05)(Fig. 5).

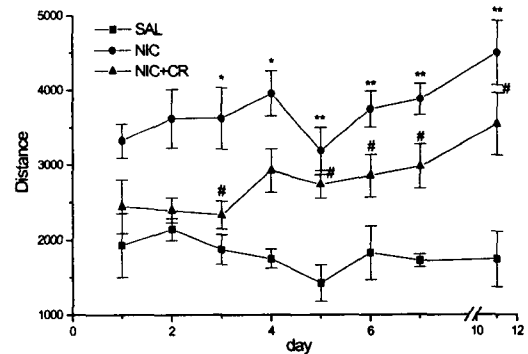


Fig. 5. Effect of CR on acute nicotine-induced locomotor activity. Results are mean±S.E. of the distance. Data were analyzed by repeated-way ANOVA and followed by Tukey test. * P<0.05, ** P<0.01 as compared with the corresponding data of SAL group. #, P<0.05 as compared with the corresponding data of NIC+CR group.

3. 면역조직화학분석법

1) 니코틴 반복 처치에 의한 측핵의 core 부위에서 c-Fos의 발현에 미치는 전침효과

측핵 core 부위에서 FLI의 발현은 통제군은 15.11±1.42, 니코틴 급성 처치군은 15.78±0.97, 니코틴 반복 처치군인 대조군 (Holder)은 22.5±1.61, 100Hz전침 자극군은 14.15±1.01, 2Hz전침 자극군은 15.53±1.04, 꼬리 자극군은 19.15±2.60으로 각각 나타났다. 니코틴 반복처치에 대한 효과를 분석한 결과, 실험군 간에 유의한 차이를 보여 주었다 [F(5,74)=4.470, p<0.001]. 집단별 사후분석(LSD)한 결과, 니코틴 반복 처치군인 대조군은 통제군과 니코틴 급성처치군에 비해서 유의하게 증가하였다(각각 p<0.01, p<0.01). 100Hz전침 자극군과 2Hz전침 자극군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(각각 p<0.001, p<0.01). 꼬리 자극군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내지 않았다(p>0.246)(Fig.6)

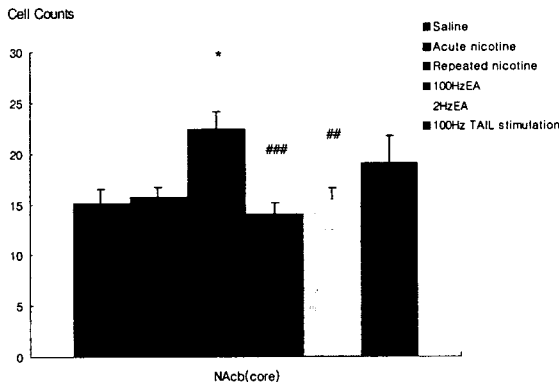


Fig. 6. Expression of c-Fos in the nucleus accumbens(core) after systemic injections of nicotine in saline or nicotine pretreated rat S. Data are presented as the mean (±S.E.M) of Fos-like immunoreactivity neurons within the rectangular grid over the nucleus accumbens at a 100× magnification (n=3~4 for all groups). *P<0.01, ##P<0.01, ###P<0.001.

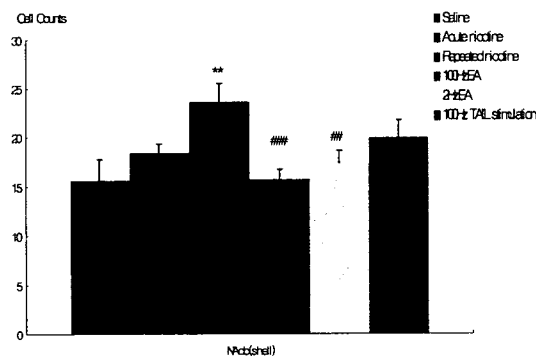


Fig. 7. Expression of c-Fos in the nucleus accumbens(shell) after systemic injections of nicotine in saline or nicotine pretreated rat S. Data are presented as the mean (±S.E.M) of Fos-like immunoreactivity neurons within the rectangular grid over the nucleus accumbens at a 100× magnification (n=3~4 for all groups). *P<0.01, ##P<0.01, ###P<0.001.

2) 니코틴 반복 처치에 의한 측핵의 shell 부위에서 c-Fos의 발현에 미치는 전침효과

측핵 shell 부위에서 FLI의 발현은 통제군은 15.66±2.01 니코

틴 급성 처치군은 18.35±0.91 니코틴 반복 처치군인 대조군 (Holder)은 23.66±1.90, 100Hz전침 자극군은 15.76±0.98, 2Hz전침 자극군은 17.4±1.19, 꼬리 자극군은 20.00±1.71로 각각 나타났다. 니코틴 반복처치에 대한 효과를 분석한 결과, 실험군 간에 유의한 차이를 보여 주었다 [F(5,74)=4.209, p<0.01]. 집단별 사후분석(LSD)한 결과, 니코틴 반복 처치군인 대조군은 통제군과 니코틴 급성처치군에 비해서 유의하게 증가하였다(각각 p<0.01, p<0.05). 100Hz전침 자극군과 2Hz전침 자극군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(각각 p<0.001, p<0.01). 꼬리 자극군은 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내지 않았다(p>0.125)(Fig.7).

고찰

흡연이 건강에 해롭다는 사실은 잘 알려져 있다. 담배에 포함되어 있는 수많은 복합물질 중에서 담배의 중독성을 일으키는 물질로 알려진 것은 니코틴이며, 니코틴의 강력한 중독성 때문에 금연의 성공률이 높지 못한 실정이다.¹²⁻¹⁶⁾ 세계보건기구의 정의에 의하면 습관성 중독은 "심리적 의존에 있어 계속 약물을 찾는 행동을 하고 신체적 의존에 있어 복용을 중단하지 못하고 신체적, 정신적 건강을 해치는 상태"를 말한다. 약물중독이란 것은 충동적인 약물의 사용, 약물의 향정신성 효과, 약물에 의해 유발되는 비정상적인 행동이 보일 때라고 정의된다. 흡연에 대한 충동으로 담배를 피우고, 흡연시에 담배 고유의 쾌감을 느낄 수 있고, 습관적으로 담배를 찾게 되고 담배를 피운다는 면에서 흡연은 하나의 약물중독이라고 할 수 있다. 흡연은 내성과 육체의 의존성을 일으켜 지속적인 흡연은 내성과 육체의 의존성을 일으켜 지속적인 흡연을 일으키고, 吸煙者들로 하여금 쾌락을 느끼고 각성 상태를 유지하며 금단 증상을 피할 수 있을 정도로 니코틴 양을 유지하도록 요구한다.¹⁷⁾ 吸煙으로 유발된 니코틴 중독에 대한 기존의 韓醫學에서의 주요 치료방법 중에 하나로 耳鍼療法을 들 수 있다. 禁煙鍼은 귀의 혈(耳鍼穴)을 이용하여 耳鍼穴 위의 일정부분을 자극 대뇌피질의 흥분 및 억제를 조절하여 니코틴 등으로 인한 자율신경 실조를 회복시킴으로써 습관적인 흡연욕구를 감소시킨다.¹⁸⁾ 최근의 禁煙鍼에 대한 연구 결과를 살펴보면 금연치료성적에 있어 완전금연이 33.11%, 평소 흡연량의 75%이상 감소가 10.37%, 50%이상 감소가 26.66%, 25%이상 감소가 19.25%, 25%미만 감소가 2.22%, 무변화가 10.37%으로 나타났다. 치료회수별 평균흡연량에서는 치료전 평균흡연량 23.77개가 5회 치료시 9.17개로 61.42%의 감소를 보여 통계학적인 유의성(P<0.0001)이 인정되어었다. 종합적인 효과판정은 우수(50.0%), 저효(10.0%), 실패(11.1%)의 순으로 나타나 禁煙鍼은 담배맛의 저하와 담배를 끊는데 대해 효과가 있을 것으로 보였다. 禁煙鍼의 작용은 담배를 기호품에서 비기호품, 혐오품으로까지 만드는 작용을 하였다.¹⁹⁻²³⁾

니코틴을 포함하여 코카인, 암페타민 등의 신경자극성 약물을 반복적으로 주사하면, 약물의 처치에 따른 보행성 활동의 점진적인 증가로 표현되는 '행동적 민감화 현상'이 나타나는데, '행동적 민감화'란 적은 양의 중독성 약물을 반복적, 간헐적으로 처치하면 보행성 활동(locomotor activity)과 상동적 행동

(stereotypy activity)이 점진적으로 증가하는 현상으로, 신경계의 비교적 지속적이고 영구적인 변화를 수반한다. 이것은 또 약리적인 구분 가능한 2개의 성분 즉, 점진적으로 활동량의 증가가 유도되는 상태인 민감화 반응의 발달(development)과 일단 유도된 높은 활동량이 비교적 장기간 유지되는 상태인 민감화 반응의 발현(expression)으로 구성되어 있다. 따라서 본 실험에서는 반복적인 니코틴 처치로 행동적 민감화 현상을 유도한 후에, 3일간의 약물 철회기간 동안에 침 자극이 행동적 민감화 현상의 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 조건화된 환경적인 단서와 무관한 약물 자체로서의 비연합적 요소(nonassociative neural adaptation)와 조건화된 환경적인 단서와 관련된 연합적 요소(associative neural adaptation)의 두 가지 요소의 복합적인 작용에 의해 니코틴의 행동적 민감화 현상이 나타나게 된다.^{24,25)} 본 실험에서는 약물과 약물 처치 받는 환경적인 요소의 연합에 의한 작용에 대한 각 집단간의 편차를 배제하기 위해 모든 집단은 동일한 환경에서 매일 일정하게 약물 처치를 받았다. 또한 니코틴 중독을 유발하기 위해 7일간 하루에 2회 씩 0.4mg/kg의 니코틴을 피하 주사하였다. 통제군인 생리식염수 처치군은 한 시간 동안의 보행성 활동량을 측정했을 때, 활동량의 증가는 나타나지 않았다. 니코틴 반복 처치군은 처음 니코틴에 급성으로 노출되었을 때에는 통제군보다 약간의 활동량의 증가를 나타내었고, 반복적으로 니코틴에 노출됨에 따라 통제군 및 니코틴 급성 처치군에 비하여 보행성 활동량이 점진적으로 증가하여 행동적 민감화 현상의 발달이 성공적으로 유도되었다. 또한, 7일 동안 반복적인 니코틴 처치 후에 3일 동안의 약물철회기간을 거친 후 제 11일째 같은 용량의 니코틴으로 검사하였을 경우, 높은 보행성 활동량이 유지되는 현상인 행동적 민감화 현상의 발현이 나타났다. 니코틴은 0.078~0.3mM의 농도로 nicotine cue에 대한 ED50가 나타나며, 동물실험에서 0.1~0.4mg/kg의 농도로 처치하여 니코틴 중독모델에 이루어지고 있고, 5번 정도의 약물주입으로 도파민 반응의 민감화가 형성되고, 7일간의 지속적인 처치 후 약물철회를 통하여 니코틴의 금단현상이 나타난다고 보고되고 있으며 본 실험에서 이상의 결과와 일치하였다.²⁶⁻²⁸⁾

한편, 7일 동안 반복적인 니코틴 처치 후에 3일 동안 약물철회기간에 족삼리 부위에 전침 자극을 거친 후, 제 11일째 같은 용량의 니코틴으로 검사하였을 경우, 보행성 활동량이 유의하게 감소하여 행동적 민감화 현상의 발현을 억제하는 현상을 보여주었다. 이것은 전침 자극이 니코틴 약물 중독의 치료에 유의한 작용이 있음을 나타낸다. 니코틴 중독 치료요법으로서 침 치료는 통증이 없고, 비침습적이며, 경제적이고, 간편하게 금단증상을 완화할 수 있는 장점이 있으므로 니코틴 중독에 대한 치료방법으로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 7일 동안 반복적으로 니코틴에 노출된 후, 3일 동안의 약물 철회 기간을 거친 후, 11일째 같은 용량의 니코틴에 재노출 되었을 경우, 발달단계보다 더 높은 수치를 보임으로써, 행동적 민감화 현상의 발현단계가 성공적으로 유도됨을 보였다. 이에 대해 7일 동안 니코틴을 반복 처치하기 30분전에 황련을 처치한 군은 11일째 같은 용량의 니코틴을 재투여 하였을 경우, 보행성 활동량이 유의하게 감소하였다. 이

로써 행동적 민감화 현상의 발현을 억제하는 현상을 보여줌으로써 한약제재인 황련이 니코틴의 약물 중독 치료에 효과가 있음을 제시하였다. 일반적으로, 중독성 약물에 의한 행동적 민감화 현상을 담당하는 신경학적 근거(neural substrate)는 중추 도파민 신경세포와 그 표적 영역인 측핵과 선조체로 알려져 있으며 니코틴에 의한 행동적 민감화 현상도 이 두 시스템, 특히 복측피개야(ventral tegmental area)에서 기시하여 측핵과 후관(olfactory tubercle)내의 표적부위에 종지하는 중뇌변연도파민계에 의해 주로 매개된다.^{29,30)} 니코틴 반복처치로 유도된 행동적 민감화 현상을 매개하는 신경학적 기전을 살펴보기 위해 최근 면역조직화학적 방법을 이용하여 proto-oncogene인 c-Fos의 발현의 강도와 기간을 통하여 신경의 활성도를 측정할 수 있어, Fos 단백질의 발현을 측정하여 다양한 행동학적, 약물학적 처치에 의한 신경의 회로를 관찰하고 있다. 여러 연구결과들을 보면, 니코틴의 주입이 측핵, 선조체, 전전두엽 등의 도파민성 신경세포의 투사부위에서 c-Fos 발현의 증가를 야기시켰다.^{31,32)} 이에 니코틴의 반복처치로 유발된 행동적 민감화로 인한 실험동물의 뇌에 있어서 c-Fos의 변화를 관찰하고자 도파민의 방출부위인 측핵에서 면역조직화학적 분석법을 이용한 c-Fos 염색을 통하여 신경학적 활성도를 확인하여 전침 자극이 도파민의 방출과 관련된 기전에 의하여 니코틴의 행동적 민감화 현상을 억제시키는지 살펴보았다. 측핵에서 c-Fos는 통제군 및 니코틴 급성 처치군에 비해서 니코틴 반복 처치군의 core와 shell 부위에서 모두 유의한 증가를 보였다. 이는 측핵에서 도파민성 신경세포의 활성을 나타내어 니코틴 반복 처치에 의한 중뇌변연도파민계의 활성화를 통해 행동적 민감화 현상이 일어남을 의미한다. 도파민성 신경세포발달부위에서의 니코틴활성을 평가하기 위해 면역조직화학적 방법은 시냅스후 신경학적 활성도의 지표로 사용된다. 기존의 연구에서 니코틴에 의한 불안 유발은 藥物 투여후 7분내에 많았고, 15분후는 반응이 있지만 미미했고, 30분 후는 아무런 효과도 없었다고 보고되며 그것은 니코틴은 발현이 빠른 반면 지속시간이 짧음을 말해준다.³³⁾ 니코틴에 대한 반응정도가 실험 동물의 종류마다 다른 것으로 나타났는데 이것은 다른 품종들 사이에서 뇌내의 니코틴 수용체가 다르기 때문일 것으로 생각되어졌다.³⁴⁾ 항무스카린 수용체의 길항약인 아트로핀은 니코틴의 불안유발을 막을 수 없다고 보고되었다. 오히려 그 자체가 불안 유발을 일으켰다. 반면 중추니코틴수용체의 길항약인 mecamylamine은 니코틴에 의한 불안 유발을 감소시켰다. 또한 말초 니코틴 수용체 길항약인 hexamethionin도 니코틴의 효과를 감소시켰다. 니코틴 길항약에 대한 연구에서 수용체에서 일어나는 니코틴에 대한 반응이 blood-brain-barrier에 의하여 잘 보호되지 못한 것을 나타냈었다. 니코틴을 주입하면 noradrenaline, serotonin, 도파민이 방출되는 것으로 보아 모든 monoamine들도 불안에 관련됨을 보여왔다.^{35,36)} 도파민 D1과 D2 수용체들이 혈관성 효과를 유발하고 기능성 도파민 D3 수용체가 없는 mice에서는 불안반응이 적다는 보고가 있다.³⁷⁾ 욕구 회로(motive circuit)와 관련된 신경핵은 변연계 핵(limbic nuclei)에서 추체내·추체의 운동체계에 정보의 흐름으로 형성되어, 편도체는 복측피개야(VTA)와 측핵의 shell부위와 ventral pallidum

(VP)의 복내측(ventromedial) 부위에 연결을 하고, 운동성 기능을 조절하는 신경세포는 복측피개아에서 측핵 core부위와 VP의 배외측(dorsolateral) 부위에 연결되어 있다.³⁸⁾ 측핵은 각각 다른 기능을 수행하는 두 개의 주요 부분인 core부위와 shell부위로 나눌 수 있다.³⁹⁾ 해부학적으로 측핵 core부위는 운동성 기능을 조절하는 뇌의 영역에 주로 투사하고, 배외측 선조체와 밀접한 관련을 갖으며, 측핵 shell 부위는 편도체 등의 변연계의 주요 기능을 담당하여 복내측 선조체와 관련되어 정서와 관련된 약물탐닉에 대한 motive와 더욱 밀접한 관련을 지닌다.⁴⁰⁾

본 실험에서 足三리 전침 자극은 행동학적 검사에서 보행성 활동량의 감소를 유도하고 면역조직화학분석법에서는 뇌의 측핵에서 c-Fos 감소로 나타나듯이 중독성 약물에 의한 운동성 기능 및 약물의 정신적인 탐닉의 감소에 모두 관련되어 있는 것으로 생각되며, 신경학적 기전을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 또한, 황련이 니코틴으로 유도된 행동적 민감화 현상을 억제하는데 유의한 결과를 보여주어, 니코틴 약물중독에 대한 약물치료법의 응용에 있어서 실험적 근거를 제시한다고 보여진다. 예를 들어 니코틴은 약리학적으로 심박출량을 증가시키고, 혈압을 상승시키며, 말초혈관을 수축시키는 등의 심혈관계 질환을 주로 야기하며, 또한 중추신경계에서 신경전달 물질 중의 하나인 도파민의 방출을 증가시키므로 약물 중독의 발병 인자를 제공한다. 이러한 약물 중독은 하나의 정신적인 문제로써, 신경화학적으로 측핵과 선조체 부위에서 도파민의 과도한 방출에 기인한다는 사실이 보고 된 바 있다. 이러한 약물중독을 한의학적인 관점에서 볼 때 한의학에서 말하는 “火”의 개념과 비슷하므로 앞으로 약물중독의 침구형 선정 및 약물선택에 있어서 이와 같은 관점으로 접근할 수 있는 근거가 될 것으로 보여진다.

결 론

니코틴의 반복적 투여로 유도된 니코틴 약물중독모델에서 足三리(ST36) 전침 자극과 황련이 행동적 민감화 현상 발현 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 실험 동물의 보행성 활동량을 측정하고, 면역조직화학분석법으로 뇌의 측핵에서 신경세포의 활성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

소량의 니코틴 (0.4mg/kg s.c.)을 7일 동안 반복적으로 처치함으로써, 니코틴에 의한 행동적 민감화를 성공적으로 유도시켰으며, 니코틴 처치를 철회한 3일 후에 다시 한번 니코틴에 노출되었을 때 행동적 민감화 현상이 발현되었다. 행동학적 검사에서 족삼리(ST36-SP6) 100Hz 전침자극은 니코틴에 의한 행동적 민감화 현상의 발현을 유의하게 억제하였다. 행동학적 검사에서 황련은 니코틴에 의한 행동적 민감화 현상의 발현을 유의하게 억제하였다. 면역조직화학분석에서 니코틴 반복 처치군이 측핵 core와 shell부위에서 c-Fos 발현이 생리식염수 처치군과 니코틴 급성 처치군에 비해 유의하게 증가하였다. 면역조직화학분석에서 족삼리 100Hz 전침자극과 2Hz 전침자극은 니코틴의 반복적인 처치에 의한 측핵 core부위와 shell부위에서 c-Fos 발현을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과에서, 황련 및 교빈도(100Hz) 전침자극은 니코틴 반복처치로 유도된 실험 동물의 보행성 활동량을 감소시키므로 약물 중독치료의 과학적 근거를 제공하며, 전침자극은 면역조직화학적으로 뇌의 측핵에서 신경활성을 감소시킴을 보여주어 침 자극이 약물중독을 치료하는 기전을 이해하는 근거를 제공할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 한국대학교육협의회 대학교수 국내교류 연구지원과 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(HMP-99-O-01-0005)에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. Byrne G. Nicotine likened to cocaine, heroin, Science 27, 240(4856), 1143, 1988.
2. Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G, Effect of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs, Nature 382, 255-8, 1996.
3. Robinson TE, and Becker TB, Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal model of amphetamine psychosis, Brain Res. Rev. 11:157-98, 1986.
4. Panagis G, Nisell M, Nomikos GG, Chergui K, Svensson TH, Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rats, Brain Res. 730(1-2):133-42, 1996.
5. Segal DS, Greyer MA, Schuckit MA, Stimulant-induced psychosis: an evaluation of animal methods, Essays Neurochem. Neuropharmacol. 5, 95-129, 1981.
6. Clarke PBS, Fu DS, Jakubovic A, Fibiger HC, Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats, J. Pharmacol. Exp. Ther. 246, 701-8, 1988.
7. Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB. The mesolimbic dopamine system is implicated in the reinforcing effects of nicotine, Psychopharmacology 107, 285-9, 1992.
8. Han JS, Zhang RL, Suppression of morphine abstinence syndrome by body electroacupuncture of different frequencies in rats, Drug Alcohol Depend. 31, 169-75, 1993.
9. Yoshimoto K, Kato B, Sakai K, Shibata M, Yano T, Yasuhara M., Electroacupuncture stimulation suppresses the increase in alcohol-drinking behavior in restricted rats. Alcohol Clin. Exp. Res. 25(6Suppl): 63S-8S, 2001.
10. Dragunow M, Faulk R, The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing, J. Neurosci. Methods

- 29, 261-5, 1989.
11. Sagar SM, Sharp FR, Curran T, Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level, *Science* 240, 1328-30, 1988.
 12. Pollin W, The role of the addictive process as a key step in causation of all tobacco-related disease, *J. Am. Med. Assoc.* 252, 20, 1984.
 13. Ravenholt RT, Addition mortality in the United States, 1980: tobacco, alcohol and other substances, *Pop. Dev.* 10, 697-724, 1980.
 14. Fiore MD, Trends in cigarette smoking in the United States: the epidemiology of tobacco use, *Med. Clin. North. Am.* 76, 289-303, 1992.
 15. Henningfield JE, Nicotine medications for smoking cessation, *New Engl. J. Med.* 333, 1196-203, 1995.
 16. Hurt RD, Sachs DP, Glover ED, Offord KP, Johnston JA, Dale LC, et al, A comparison of sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation, *N. Engl. J. Med.* 23, 337(17):1195-202, 1997.
 17. 黄義完: 동의정신의학, 현대의학서적사, p415-425, 505-529, 1987.
 18. Dichiaro G, Imperato A, Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 85, 5274-8, 1988.
 19. 안경순: 禁煙鍼에 대한 임상적 고찰, 대전대학교 부속 한방병원 1(1):127-136, 1992.
 20. 안동순: 禁煙鍼에 대한 임상적 고찰, 대전대학교 韓醫學 연구소 1(1):151-165, 1992.
 21. 최도영: 직장 吸煙 남성에게 있어서 禁煙鍼 치료에 대한 임상적 관찰, 대한鍼灸학회지 13(2):202-211, 1996.
 22. 남상수: 四象체질에 따른 禁煙鍼 효과의 비교 분석, 대한침구학회지 13(2):104-116, 1996.
 23. 안수기 : 禁煙鍼 치료에 대한 임상적 고찰, 대한침구학회지 10(1):175-190, 1993.
 24. Badiani A, Browman KE, Robinson TE, Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine, *Brain Res.* 674, 291-8, 1995.
 25. Fontana DJ, Post RM, Pert A, Conditioned increases in mesolimbic dopamine overflow by stimuli associated with cocaine, *Brain Res.* 629, 31-9, 1993.
 26. Panagis G, Nisell M, Nomikos GG, Chergui K, Svensson TH, Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rats, *Brain Res.* 730(1-2):133-42, 1996.
 27. Dai Y, Kondo E, Fukuoka T, Tokunaga A, Miki K, Noguchi K, The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain, *The journal of pain: official journal of the American Pain Society* 2(3), 151-9, 2001.
 28. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, et al, Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses, *Pain* 15;90(3), 271-80, 2001.
 29. Reavill C, Stolerman IP, Locomotor activity in rats after administration of nicotine agonists intracerebrally, *Br. J. Pharmacol.* 99, 273-8, 1990.
 30. Vale AL, Balfour DJK, Studies on the role of brain dopamine system in the psychostimulant response to nicotine, *Br. J. Pharmacol.* 94, 373, 1988.
 31. Kiba H, Jayaraman A, Nicotine induced c-fos expression in the striatum is mediated mostly by dopamine D1 receptor and is dependent on NMDA stimulation, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23(1-2), 1-13, 1994.
 32. Mathieu-Kia AM, Pages C, Besson MJ, Inducibility of c-Fos protein in visuo-motor system and limbic structures after acute and repeated administration of nicotine in the rat, *Synapse* 29(4):343-54, 1998.
 33. Manser and Mattila M. J, Pharmacokinetics of nicotine in adult and infant mice, *Med. Biol.* 55, 317-324, 1977.
 34. Marks M.J Campbell. S. M. Romm E. Collins. A. C, Genotype influences the development of tolerance to nicotine in the mouse, *J. Pharmacol Exp.* 259, 392-402, 1991.
 35. Balfour.D.J.K. The neurochemical mechanisms underlying nicotine tolerance and dependence In: Pratt J.A(ED) *The Biological Bases of Tolerance and Dependence.* Academic Press New York. 121-151, 1991.
 36. Balfour. P.J.K. The effects of nicotine on brain neurotransmitter systems *Pharmacol* 16, 269-282, 1982.
 37. Charney D.S Woods S.W. Goodman. W.K. Heninger, G.R. Serotonin function in anxiety Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology (Berlin)* 92, 14-24, 1987.
 38. Pierce RC, Kalivas PW, A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants, *Brain Res Brain Res. Rev* 25(2), 192-216, 1997
 39. Zahm DS, Borg JS, On the significance of subterritories in the 'accumbens' part of the rat ventral striatum, *Neuroscience* 50, 751-67, 1992.
 40. Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltman C, Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat, *Neuroscience* 41, 89-125, 1991.