수삼음경의 락혈 침자가 백서의 혈위 조직내 nNOS, NO와 조직 및 혈장 Norepinephrine의 변화에 미치는 영향

신 욱¹ · 이유미¹ · 이경인² · 최동희¹ · 김미래¹ · 나창수¹ · 김선민² · 표병식² · 윤대환¹

¹동신대학교 한의과대학, ²동신대학교 생물자원산업화지원센터

The Changes of NO, nNOS, Norepinephrine by Acupuncture at LU7, HT5, PC6 Acupoints in Rats

Wook Shin¹, Yumi Lee¹, Kyoungin Lee², Donghee Choi¹, Mirae Kim¹, Changsu Na¹, Sunmin Kim², Byongsik Pyo², Daehwan Youn¹

¹College of Korean Medicine, Dongshin University,

²Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University

Objectives : A previous study demonstrated that the connecting points of three yang meridians attenuated changes of nNOS, and Norepinephrine(NE) in rats. The current study investigated the changes in nNOS, NO and NE upon the needle insertion at varying depths at the connecting point of three yin meridians of the hand. **Methods :** Needles were inserted into rats, on both left and right sides of the connecting point, including the LU7, HT5 and PC6 acupoints which are three yin meridians of the hand. After insertion, needles were retained for five minutes. Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. After the retention, blood was drawn via cardiac puncture, and tissues of each point near meridian vessel was extracted to examine the changes in the expression of nNOS, NO and NE. **Results :** Compared with the superficial layer group, nNOS production significantly decreased in the middle and deep layer at LU7 acupoint group and in the deep layer at HT5, PC6 acupoint group. The tissue NE decreased in the deep layer on PC6 acupoint and the plasma NE increased at the middle layer at LU7 acupoint group but decreased at the deep layer on at LU7 acupoint group. **Conclusions :** Acupuncture at connecting points of three yin meridians of the hand can regulate the activities of nNOS, and NE.

Key words : acupuncture, connecting point, NO, nNOS, norepinephrine, depth

서론

경혈은 “氣血所發, 各有處名”으로 經絡의 氣가 體表에 통하는 곳이며¹⁾, 인체 내부와 관련된 개념이다. 이러한 경혈은 체내의 五臟 六腑와 外部의 皮膚와 肢節을 連結하는 기혈운행의 통로인 경락상에

위치하여, 맥기와 인체 경기가 출입, 활동하는 문호의 역할을 하여, 질병의 반응점, 치료 자극점으로 진단과 치료에 이용되고 있다^{2,3)}.

經穴의 종류 중 經穴의 作用과 穴性이 특이한 혈자리의 경우를 特殊穴이라고 명칭하고 있으며, 예를 들면 五輸穴, 原穴, 絡穴, 八脈 交會穴, 募穴, 背俞穴, 八會穴 등으로 나눌 수 있다. 特殊穴 중 하나

Received June 7, 2016, Revised June 15, 2016, Accepted June 18, 2016

Corresponding author: Daehwan Youn

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Dongshin University, 185 Gunjae-ro, Naju 58245, Korea

Tel: +82-61-330-3527, Fax: +82-61-330-3519, E-mail: human22@dsu.ac.kr

This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute(KHIDI, H14C0919).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

인 “絡穴”은 『靈樞·經脈篇』에 의하면 十二正經에 하나씩의 絡穴이 존재하며 그 이외에 督脈, 任脈, 脾之大絡에 각각 하나씩의 絡穴이 존재 한다고 하였다⁴⁾.

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성되며, NOS는 neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS), endothelial NOS(eNOS) 3가지로 알려져 있으며, 특히 nNOS는 신경 조직에서 NO를 생성하며 신경전달을 주로 담당하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 이러한 NO는 원형질막간(plasma membrane)을 이동하여 중추신경계와 말초신경계 및 혈관계에 작용하며, 이는 평활근에 작용하여 피부, 피하근육 등의 말초혈관의 긴장을 증가시키는 norepinephrine과 관련성을 가진다⁶⁾.

락혈에 관한 최신 연구로는 수삼양경 락혈의 깊이별 침자가 혈위 및 자침 깊이에 따른 신경전달 물질 기전이 다를 것을 나타내었고⁷⁾, 光明配太衝에 刺鍼이 腦神經의 抗細胞枯死 및 保護效果에 영향을 주고 中風初期治療에 效果가 있으며⁸⁾, 열결, 여구에 대한 용량별 He-Ne 레이저 침 조사가 고지혈증에서 레이저 파장대별로 체중, 식이섭취량, 식이효율, 혈중 지질 함량, 간기능에 효과를 보이기도 하였다⁹⁾. 또한 외관 전침이 뇌 부위에서 측정된 뇌파의 네가지 영역 중 δ , θ , β 파의 전력스펙트럼 평균에 유의성이 있는 변화와 외관에 기반 전침자극이 사람의 뇌 활동에 영향을 주며¹⁰⁾, 공손-내관 자침은 스트레스 상태의 정상적인 자율신경계에서 미주신경을 활성화시키고 교감신경활동을 억제함으로써 스트레스로 인해 무너진 자율신경계의 균형을 회복시키고¹¹⁾, 풍릉 전침이 생체 내 산화억제에 유효한 것 등 여러 보고가 되었다¹²⁾. 또한, nNOS에 대한 기존연구에서는 Choi¹³⁾는 침자가 교감신경의 흥분을 억제하는 효과를 보고하였으며, Lee 등¹⁴⁾은 족삼리 침자가 대뇌피질에서 저하된 NOS의 활성도를 조절함을 보고하였다. 현재 신경계와 침자의 상호관계에 대한 연구로는 Yeom 등¹⁵⁾은 금연치료 요법으로의 침 자극에 대한 신경학적 기전을 보고하였으며, 족궤음간경의 火穴과 水穴에 대한 침자의 보사에 따른 신경 활성¹⁶⁾이 연구되었으나, 침자의 중요 요건중의 하나인 자침깊이에 대한 체계적인 연구보고는 미흡한 실정이다. 이에 수삼음경의 락혈을 대상으로 락혈의 깊이별 침자시행이 신경전달 관여물질중의 하나인 nNOS, NO 및 NE의 생성 및 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 동물

실험동물은 Sprague-dawley계 16주령의 수컷 흰 쥐들(400~

450 g, Samtaco, Korea)을 준비하여, 동신대학교 실험윤리위원회 승인을 받았고 이에 따라 사육하고 처치하였다. 사육되는 동안 조명을 통해 낮과 밤이 12시간 간격으로 교대되도록 하였고, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$ 의 항온 항습이 유지되는 사육실에서 사육하며 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 실험군

각 군들은 총 45마리의 흰 쥐를 대상으로 무작위로 배정하였으며, 수태음폐경의 絡穴인 列缺에 superficial layer에 침자한 군(LU7-A, n=5), middle layer에 침자한 군(LU7-B, n=5), deep layer에 침자한 군(LU7-C, n=5), 수소음심경의 絡穴인 通里에 superficial layer에 침자한 군(HT5-A, n=5), middle layer에 침자한 군(HT5-B, n=5), deep layer에 침자한 군(HT5-C, n=5), 수궤음심포경의 絡穴인 內關에 superficial layer에 침자한 군(PC6-A, n=5), middle layer에 침자한 군(PC6-B, n=5), deep layer에 침자한 군(PC6-C, n=5) 등 총 9개 군으로 분리하였으며, 사육단계부터 호흡 마취까지의 모든 과정을 모두 동일하게 처치되었다.

3. 취혈 및 침자극

手三陰經의 絡穴에 해당하는 3개 혈위에 대한 흰 쥐의 침자는 구 등¹⁷⁾의 기준을 참고하여 인체에 상응하게 취혈하였다. 수태음폐경의 絡穴인 列缺은 LU7은 elbow joint와 wrist joint사이를 10등분하여 wrist joint위 1.5/10되는 부위로 radius의 styloid process 내측에 인체와 상응되는 곳으로 취혈하였다. 수소음심경의 絡穴인 通里는 신문혈 위 1촌으로 경지와 평행한 부위에, 수궤음심포경의 絡穴인 內關는 대릉혈 위 2촌으로 flexor carpi radialis와 palmaris longus 사이에 각각 취혈하였다. 침자전에 실험동물을 80% O₂와 20% N₂가 혼합된 가스에 5% isoflurane(Choongwae, Korea)을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후 2% isoflurane으로 마취를 계속 유지시켰다. 마취를 유지시킨 후 superficial layer군은 피하 1 mm, middle layer군은 피하 3 mm, deep layer군은 피하 5 mm로 각 락혈 좌우 모두에 수직으로 자침하고, 보사법을 시행하지 않은 상태에서 3분간 유침하였다. 침자에 사용된 침은 호침(0.25×15 mm, Dongbang, Korea)이었으며, 13년 침자를 시행한 경험이 있는 전문가 1인이 시술하였다.

4. 혈장준비

3분간의 유침 과정이 끝난 후 심장 천자하여 6 ml의 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 K3 EDTA(Green VAC-tube EDTA K3 liquid 3.0 mm 13×75, Greencross, Korea)를 사용하였고 15,000

rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Vision Scientific, Korea)하여 혈장을 얻었으며, NE content의 분석을 위해 액화질소를 사용하여 급속냉동 시킨 후 -70°C에 보관하였다.

5. 조직준비

심장 천자를 통하여 채혈한 후 각 군들에 해당하는 手三陰經의 경혈 부위에서 deep layer에 해당하는 두께로 조직을 적출한 후 superficial layer, middle layer 및 deep layer의 3개 부분으로 나누었다. NO assay를 얻기 위한 조직은 1X Protease Cocktail inhibitor(BD, USA)가 포함된 NP40 lysis buffer 500 μ l를 넣어 homogenization(NEXT Advance, USA)하였다. 이 sample을 20분간 ice상태에 놓아둔 후 12,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Eppendorf, Centrifuge 5415R, Germany)한 후 supernatants를 분리하였다. 이 중 50 ml sample을 NO assay에 이용하고 남은 sample은 nNOS assay에 사용하였다. NE production을 얻기 위한 조직은 해당 경혈부위를 포함하는 조직을 분리하여 0.1 M perchloric acid 0.5 ml와 함께 homogenization하였고, 이를 10,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리(Eppendorf, Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatants만 분리하였다.

6. Assay of nNOS

해당 경혈 부위에서 조직절편을 적출하여 bouin용액에 6시간 동안 고정한 후, 2.5% nitric acid 용액(Duksan, Korea)에서 10일 동안 질산액을 교환하면서 조직절편 내의 bone 등에 대한 탈회(decalcification)과정을 진행하였다. 파라핀 고정을 위해 탈회된 조직은 tissu processor(Tissue-TextII, Japan)을 사용하여 조직 탈수과정을 거친 후, microtome(PIKA, Japan)을 사용하여 자침방향과 수직으로 10 μ m 두께로 절편하였다. 조직 절편을 2% BSA와 15%의 Goat Serum으로 3시간 동안 반응시킨 후 Rabbit anti-nNOS(Invitrogen, USA), anti-iNOS(1:100, Abcam, England), anti-eNOS(1:200, Abcam, England) antibody를 0.05% Sodium azide와 2% BSA가 함유된 PBS로 희석시켜 조직을 3시간 동안 4°C에서 반응을 시킨 후 50 mM PBS에 세척하였고, Biotinylated universal Secondary Antibody(Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 50 mM PBS에 세척하고 Streptavidin peroxidase preformed complex (Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 10분 동안 반응시킨 후 다시 50 mM PBS에 세척하고 조직을 3,3'-diaminobenzidine 발색용액(Vector Laboratories, Burlingame, USA)으로 반응시킨 후, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 세척하

여 hematoxyline으로 대조 염색 후 슬라이드를 dehydration한 후에 100배의 광학현미경(Eclipse 80i, Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 염색된 각각의 NOS-positive cell은 육안으로 관찰하여 연구자 2인이 개수를 counting 하였다.

7. Assay of NO

경혈 부위의 조직 내 NO 생성량을 측정하기 위하여 Griess 시약(Sigma, USA)을 이용하여 안정된 마지막 산물인 NO₂⁻와 NO₃⁻에 대해서 분석하였다. 조직의 단백질시료 40 μ l와 MOPS buffer(50 mM MOPS/1mM EDTA, pH 7.0) 45 μ l를 혼합하고 reconstituted E.coli nitrate reductase 5 μ l를 가한 후 2 mM NADH 10 μ l를 가하여 20분 동안 실온에서 반응시킨 후 50 μ l Griess reagent A(1% sulfanilamide in 3N HCl)와 반응시키고, 50 μ l Griess reagent B(0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine, 2HCl)와 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 purple azo dye가 생성되면 20분 이내에 Micro plate reader (Spectra max m2e, Moleculardevices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡수율을 측정하였다.

8. Assay of NE production

Norepinephrine분석은 LC-MS/MS를 활용하였다. 1200 series LC(Agilent, USA)와 연결된 6410 MS(Agilent, USA)를 사용하며, positive electrospray ionization(ESI) mode로 분석을 실시하고, column은 YMC-Pack Pro C8(150×4.6 mm, 3 μ m)을 사용하며, 이동상으로 5 mM ammonium acetate 및 0.1% formic acid가 혼합된 증류수(A)와 5 mM ammonium acetate 및 0.1% formic acid가 혼합된 methanol(B)을 0.3 ml/min의 유속으로 사용하였다. Norepinephrine과 epinephrine을 검출하기 위해 selected ion monitoring 조건으로 각각 152.1 m/z와 166.0 m/z를 사용하고 nebulizer 압력과 capillary voltage는 각각 20 psi와 4 kV로 설정하였으며, gas flow와 온도는 10 l/min과 320°C로 유지하였다. 각 물질의 함량은 표준물질 0.125, 0.50, 2.5 ppm(μ g/ml)을 각각

Table 1. Gradients

Time(min)	Mobile phase	
	A(%)	B(%)
0.0	100	0
8.0	100	0
10.0	0	100
16.0	0	100
17.0	100	0
25.0	100	0

standard로 하여 작성한 검량선을 사용하여 시료 중의 함량을 계산하였다(Table 1).

9. 통계처리

모든 측정값은 excel statistic program(Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준 오차(mean $\pm$ standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS (SPSS, USA)를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 군들의 비교에서 $\alpha=0.05$ 와 $\alpha=0.01$ ($p<0.05$, $p<0.01$) 수준으로 유의성을 검정하였다.

결 과

1. nNOS 발현에 미치는 영향

手三陰經 絡穴의 깊이별 침자가 nNOS발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LU7군의 superficial layer는 110.8 ± 14.72 개, middle layer는 75.8 ± 7.64 개, deep layer는 49.0 ± 12.57 개를, HT5군의 superficial layer는 136.2 ± 32.93 개, middle layer는 143.8 ± 20.31 개, deep layer는 75.4 ± 14.92 개를, PC6군의 superficial layer는 100.2 ± 14.59 개, middle layer는 127.4 ± 12.98 개, deep layer는 78.6 ± 18.45 개를 나타내었다. 각 군들 간의 비교에서 superficial

Fig. 1. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints LU7, HT5 and PC6 on immunoreactivity for neuronal nitric oxide synthase(nNOS).

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.(n=5). * $p<0.05$ as compared with the superficial layer group.

Fig. 2. Microphotographs of immunoreactivity pattern for neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in rat.

LU7, HT5, PC6 groups were treated acupuncture at each acupoint. A, B, C are each depths of acupuncture points. Scale bar=200 μ m $\times$ 100.

layer군에 비해, LU7군에서는 middle layer군, deep layer군이, HT5에서는 deep layer군이, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 1, 2).

2. NO 생성에 미치는 영향

手三經 絡穴의 깊이별 침자가 NO발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, LU7군의 superficial layer는 $0.14 \pm 0.018 \mu\text{M}$, middle layer는 $0.13 \pm 0.007 \mu\text{M}$, deep layer는 $0.12 \pm 0.016 \mu\text{M}$ 를, HT5군의 superficial layer는 $0.15 \pm 0.009 \mu\text{M}$, middle layer는 $0.19 \pm 0.025 \mu\text{M}$, deep layer는 $0.16 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 를, PC6군의 superficial layer는 $0.15 \pm 0.003 \mu\text{M}$, middle layer는 $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$, deep layer는 $0.14 \pm 0.028 \mu\text{M}$ 를 나타내었다. 각 군들 간의 비교에서 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

3. Tissue의 norepinephrine에 미치는 영향

手三陰經 絡穴의 깊이별 침자가 혈위의 tissue 내의 nore-

pinephrine 농도 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, LU7군의 superficial layer는 $0.86 \pm 0.15 \text{ mg/L}$, middle layer는 $0.74 \pm 0.14 \text{ mg/L}$, deep layer는 $0.72 \pm 0.13 \text{ mg/L}$ 을, HT5군의 superficial layer는 $0.5 \pm 0.06 \text{ mg/L}$, middle layer는 $0.57 \pm 0.13 \text{ mg/L}$, deep layer는 $0.33 \pm 0.08 \text{ mg/L}$ 을, PC6군의 superficial layer는 $1.12 \pm 0.08 \text{ mg/L}$, middle layer는 $0.93 \pm 0.1 \text{ mg/L}$, deep layer는 $0.47 \pm 0.05 \text{ mg/L}$ 을 나타내었다. 각 군들 간의 비교에서 superficial layer군에 비해, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 4, 6).

4. Plasma의 norepinephrine에 미치는 영향

手三陰經 絡穴의 깊이별 침자가 plasma의 norepinephrine 농도 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, LU7군의 superficial layer는 $0.057 \pm 0.002 \text{ mg/L}$, middle layer는 $0.066 \pm 0.001 \text{ mg/L}$, deep layer는 $0.056 \pm 0.002 \text{ mg/L}$ 을, HT5군의 superficial layer는 $0.046 \pm 0.001 \text{ mg/L}$, middle layer는 $0.048 \pm 0.002 \text{ mg/L}$,

Fig. 3. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints LU7, HT5 and PC6 on the nitrite/nitrate levels.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.(n=5).

Fig. 4. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints LU7, HT5 and PC6 on the concentration of tissue norepinephrine.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.(n=5). * $p < 0.05$ as compared with the superficial layer group.

deep layer는 0.043 ± 0.002 mg/L을, PC6군의 superficial layer는 0.056 ± 0.001 mg/L, middle layer는 0.051 ± 0.002 mg/L, deep layer는 0.057 ± 0.002 mg/L을 나타내었다. 각 군들 간의 비교에서 superficial layer군에 비해, LU7군에서는 middle layer군이 유의하게 증가함을 나타내었고, deep layer군이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 5, 6).

고 찰

經穴은 經絡의 氣가 體表에 통하는 곳이며, 인체 내부와 관련되며, 十二經脈, 任脈 및 督脈에 존재하는 穴을 “十四經穴”로 “經穴”이라 불린다²⁾. 經脈과 관계를 가지고 있어 本經의 病證을 主治하는 作用과 經脈과 소속된 臟腑의 病證에도 반영된다. 혈위는 질병과 치료 자극점으로 진단과 치료에 중요한 내용이다¹⁸⁾.

현재 經穴에 대한 연구는 피부전기특성, X-ray, CT, PET, 생체 전기저항법, 발광자극과 가시화, 생리신호, 온도유발에 의한 등온 분포, 방사선 동위원소 추적, 뇌파연구, 저저항 양도성 연구, 血壓과 心搏動의 관계, 주파수 측정, MF-BIA Analyze, 신경물질, 광학적 특성 등의 다양한 각도에서 연구가 활발하게 진행 중이며, 소리, 빛, 전기, 열, 자기 등의 다양한 방법을 이용하여 증명하려고 노력하였으며 갖가지 다양한 가설들을 제시하였으나, 오로지 경맥의 형상적 면에서 경락을 연구하고 있어서 구체적인 성과를 나타내지 못하고 있는 실정이다¹⁹⁾.

Fig. 5. Effect of acupuncture at varying depths at acupoints LU7, HT5 and PC6 on the concentration of tissue norepinephrine.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint and at the depths of superficial, middle and deep layer. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=5). * $p < 0.05$, as compared with the each superficial layer group.

Fig. 6. Chromatograms of tissue (upper) and plasma (lower) norepinephrine release using fluorimetric detector.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at each acupoint (LU7, HT5 and PC6) and at the depths of superficial, middle and deep layer.

NO와 NOS, NE의 최신연구로는 NO와 NO를 생성하는 각 NOS의 특징과 작용에 대한 기전을 다양하게 연구되고 있으며 뇌 손상을 통한 연구도 활발한 추세이다²⁰⁾. NE는 뇌 손상 후 행동 복구 프로세스에 중요한 역할을 가지고 있으며 중추 신경계 기능 회복에 중요한 분자이며 신경 전달 물질로 연구되고 있다²¹⁾.

침자가 NOS, NO, NE 발현에 미치는 영향에 관한 연구로 Kim²²⁾은 五輸穴중에서 陽經의 經火穴의 특성을 통하여 혈위의 작용을 신경 전달과 관련된 지표를 통하여 해당 혈위 국소 작용과 전신적인 작용을 통하여 관찰한 결과, 신경 전달계에 미치는 국소적인 작용 발현이 발휘됨을 보여주었고, 이의 작용은 전신적인 작용과 일정하게 연관될 수 있음을 제시하였으며, 또 Kim^{23,24)} 각각의 혈위 마다의 특성이 신경전달물질 생성에 다른 결과를 가져온다고 유추해 볼 수 있으며, 모든 혈위에서 NOS의 증가와 감소율이 NO의 생성에 일정한 영향을 미치는 것은 아니라는 것을 관찰하였다.

이는 기존 연구에서는 침자가 신경전달물질의 생성과 관련된 nNOS에 일정한 영향을 주는 것으로 나타났으며 침자가 nNOS에 미치는 영향으로는 nNOS를 증가 시키는 것으로 나타났다.

NO에 대한 기존연구에서 Choi¹⁴⁾는 자침을 통한 각각의 nNOS, eNOS, iNOS의 감소는 NO 생성의 억제의 결과를 가져와 교감신경의 흥분을 안정화시켜 자율신경실조를 완화시키는 작용이 있다고 하였으며, Kim²²⁾은 혈위 자극이 주요하게 NO의 기능 발현을 촉진하는 작용이 발휘됨을 보았으며, NO의 생성에 관여하는 nNOS, eNOS, iNOS에 일정한 영향을 미침을 보았다.

이는 기존 연구에서는 침자가 신경전달물질의 생성과 관련된 NO에 일정한 영향을 주는 것으로 나타났으며 침자가 NO에 미치는 영향으로는 NO를 감소시키거나 아무 변화를 주지 않는 것으로 사료 된다.

NE에 대한 기존연구에서 Choi¹⁴⁾와 Kim²²⁾은 자침 후 혈액에서의 norepinephrine 및 epinephrine의 변화가 경혈의 위치 및 자침 시행과 관련이 있다고 하였고, 혈위 침자가 국소적인 NO와 전신적인 NE에 미치는 영향이 혈위별로 다르게 발현될 수 있음을 제시하였으며, 신경전달계에 미치는 국소적인 작용 발현이 전신적인 작용과 일정하게 연관될 수 있음을 제시하였다.

이는 기존 연구에서는 침자가 신경전달물질의 생성과 관련된 NE에 일정한 영향을 주는 것으로 나타났으며 침자가 NE에 미치는 영향으로는 조직내 NE 증가, Plasma내 NE를 감소시키는 것으로 사료 된다.

絡穴에 대한 깊이별 침자가 NOS, NO, NE 발현에 미치는 영향에 관한 연구로 Lee²⁵⁾의 수삼양경과 본 연구의 수삼음경 연구를 보았을 때, nNOS발현 변화는 수삼양경혈이 superficial layer군에

비해, SI7군에서는 middle layer군, deep layer군이 유의하게 증가한 반면, 수삼음경혈은 superficial layer군에 비해, LU7군에서는 middle layer군, deep layer군이, HT5에서는 deep layer군이, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였으며, NO 발현 변화는 수삼양경과 수삼음경 모두 실험군들간의 유의한 변화를 보이지 않았다. 혈위 조직 내의 norepinephrine 농도 변화는 수삼양경혈이 superficial layer군에 비해, LI6군에서는 middle layer군이, TE5군에서는 middle layer군, deep layer군이 유의하게 증가한 반면, 수삼음경혈은 각 군의 superficial layer에 비해, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였고, 혈장의 norepinephrine 농도 변화는 수삼양경혈이 각 군들 간의 비교에서 superficial layer군에 비해, LI6군에서는 middle layer군, deep layer군이, SI7군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였으며, 수삼음경혈은 각 군의 superficial layer에 비해, LU7군에서는 middle layer군이 유의하게 증가함을 나타내었고, deep layer군이 유의하게 감소하였다.

絡穴에 대한 깊이별 침자가 nNOS, NO, NE에 미치는 영향을 관찰한 결과 수삼양경과 수삼음경 침자의 깊이가 심층면에서 변화하는 것과 일치하였다.

NOS발현 변화는 수삼양경과 수삼음경이 중간 및 심층 부위에서 대조적인 결과를 나타냄으로 양경과 음경의 특징적인 차이인지, 족경에서도 같은 양상을 보이는지 다른 기전이 있는지 차후 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

NO발현 변화는 手三陽經, 手三陰經 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다. 이는 手經 絡穴에서는 NO에 유의한 변화를 주지 않는 것으로 사료 된다.

혈위 조직 내의 norepinephrine 변화에선 NOS와 같이 대조적인 결과를 나타내었으며, NE의 농도변화에 대해서는 심도 있고 꾸준한 연구가 필요하다고 사료 된다.

혈장의 norepinephrine 변화에선 이는 수삼양경과 수삼음경이 심층면에서 감소한 것과 대체적으로 일치하였다.

본 연구를 통해 자침 깊이와 경혈의 위치에 따른 NO, nNOS, NE 관련성에 대해 이론을 제시하기에 부족함을 느꼈으나 혈위 및 자침 깊이에 따른 신경전달물질 변화가 다름을 확인함으로 차후 연구를 통해 경혈 조직의 위치 및 깊이에 따른 NO, nNOS, NE의 변화, 그리고 자침 후 혈액에서의 NE의 변화가 경혈의 위치 및 자침 깊이와 어떠한 관련성이 있으며, 경혈학적으로 어떠한 의미가 있을 것인지 밝히며 신경 전달 관여물질에 및 신경활성기전 대한 영향에 대해 정확한 이론을 제시할 수 있을 것으로 본다.

결 론

手三經 絡穴의 깊이별 침자가 nNOS, NO, Norepinephrine 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. nNOS 발현 변화를 관찰한 결과, 각 군의 superficial layer에 비해, LU7군에서는 middle layer군, deep layer군이, HT5에서는 deep layer군이, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였다.

2. NO 발현 변화를 관찰한 결과, 각 군의 superficial layer에 비해, 모든 실험군들에서 유의한 변화를 보이지 않았다.

3. 혈위 조직내의 norepinephrine 농도 변화를 관찰한 결과, 각 군의 superficial layer에 비해, PC6군에서는 deep layer군이 유의하게 감소하였다.

4. 혈장의 norepinephrine 농도 변화를 관찰한 결과, 각 군의 superficial layer에 비해, LU7군에서는 middle layer군이 유의하게 증가함을 나타내었고, deep layer군이 유의하게 감소하였다.

감사의 글

This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute(KHIDI, HI14C0919).

References

1. Choi ML, Chae YS. A study of the fourteen meridians that include name of "fung" points Dept. of Korean Medicine, Daejeon University 1995 ; 3(2) : 207-29.
2. Meridians & acupoints compilation committee of Korean Oriental Medical colleges. Principles of meridians & acupoints: a guidebook for college students. Daejeon : JongRyeoNaMu Publishing. 2012 : 20, 36, 274, 307-8, 312.
3. Meridians & Acupoints compilation committee of Korean Oriental Medical colleges. Principles of Meridians & Acupoints: A Guidebook for College Students. 4th ed. Gangwon : Yibang. 2009 : 20, 246, 280, 286.
4. Kim YW. Review of External Factors based on the Connecting Point dept. of Oriental Medicine, Dong-guk university. 1994 ; 3(26) : 125-50.
5. Kim KS. The effect of nitric oxide on neural conduction in spinal cord injured rat. 2000. Yonsei University. Thesis for a doctorate.
6. Dale P, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, Mcnamara JO, Williams SM. Neuroscience. 3rd ed. Seoul : World Science. 2007 : 150.
7. Youn DH. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Acupuncture at LR3 and GB37 on focal brain ischemic injury induced by Intraluminal Filament insertion in Rats. 2006. Dongsin University. Thesis for a doctorate.
8. Bang SH. Effects of Invasive Low Level Laser Acupuncture Therapy(LLAT) depending on capacity at LU7+LR5 on the Hyperlipemia Rats Induced by High Fat Diet. 2005. Dongsin University. Thesis for a doctorate.
9. Lee BH, Park JH, Kim HY, Kim SR, Park YB, On YJ, Lee SS, Lee CW, Han SY, Lim SC, Kim JS, Lee YK, Lee HJ, Jung TY, Lee SN. Influence of Bioelectric Current on the Acupuncture: A Pilot Study -Focusing on the Effect of PC6 Against Heart Rate. Korean Journal of Acupuncture. 2013 ; 30(3) : 185-92.
10. Jeong DG, Ko DY. The Effect of Electroacupuncture at Waegwan on Brain Activity. Industry electronics(Journal of the Institute of Electronics Engineers of Korea. 2003 ; 40(4) : 64-73.
11. Park SU, Jung WS, Moon SK, Park JM, Ko CN, Cho KH, Kim YS, Bae HS. Effects of Acupuncture on Autonomic Nervous System in Normal Subjects under Mental Stress. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2008 ; 29(2) : 107-15.
12. Ahn YS, Hong KE, Yim YK. A Study on Anti-oxidative Effect of Electroacupuncture at Pungnyung(ST40) in Rats. Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society. 2008 ; 25(1) : 73-87.
13. Choi TJ. Effects of acupuncture at the stream points of the foot meridian on Nitric Oxide and Catecholamine levels in Rats. 2016. Dongsin University. Thesis for a doctorate.
14. Lee KY, Lee YE, Jang MH, Kim YJ, Chung JH, Seo JC, Kim CJ, Kim EH. Effects of Acupuncture on NADPH-d-positive Neurons in Cerebrocortex of Streptozotocin-induced Diabetic Rats. 2001 ; 18(2) : 133-140.
15. Yeom MJ, Lee HJ, Shim IS, Park HJ, Hahm DH. Neural mechanism of acupuncture therapy for aiding in smoking cessation

- The Korean journal of maridian & acupoint. 2007 ; 24(1) : 13-25.
16. Kang HC. The effects of Fire point(LR2) · Water point(LR8) through Reinforcement-Reduction acupuncture stimulation on ANS & EEG. 2009. Sangji University. Thesis for a doctorate.
 17. Koo ST, Kim SK, Kim EH, Kim JH, Youn DH, Lee BH, et al. Acupuncture point locations for experimental animal studies in rats and mice. The Korean Journal of Meridian & Acupoint. 2010 ; 27(3) : 67-78.
 18. Im JH. A Study on Effect of Nitrooleate on Nitric Oxide Production and Endothelial Nitric Oxide Synthase Regulation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. 2012. Thesis for a master.
 19. Kim SS. Study on the Modernization of Oriental Medicine Theory. 2009. Daejeon University. Thesis for a doctorate.
 20. Seo WG. Role of AMP-activated protein kinase in activation of endothelial nitric oxide synthase after hypoxic injury in human brain microvascular endothelial cells. 2009. Gorye University. Thesis for a doctorate.
 21. Ramos-Languren LE, González-Piña R, Montes S, Chávez-García N, Ávila-Luna A, Barón-Flores V, Ríos C. Sensorimotor recovery from cortical injury is accompanied by changes on norepinephrine and serotonin levels in the dentate gyrus and pons. 2016 ; 297 : 297-306.
 22. Kim YS. The effect of needle insertion on river point of five transport points on the expression of nitric oxide and norepinephrine. 2013. Dongsin University. Thesis for a doctorates.
 23. Kim YS, Choi DH, Jang HS, Na CS, Choi TJ, Hwang MH, Cho JH, Lee KI, Kim SM, Pyo BS, Youn DH. Effects of Acupuncture at LI5, SI5, TE6 on Changes of NO and NOSs in Rats. Korean Journal of Acupuncture. 2008 ; 30(4) : 264-71.
 24. Kim YS, Choi DH, Jang HS, Na CS, Hwang MH, Cho JH, Lee KI, Kim SM, Pyo BS, Youn DH. Effects of Acupuncture at ST41, BL60, GB38 on Changes of Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase in Rats. Korean Journal of Acupuncture. 2013 ; 30(2) : 97-103.
 25. Lee YM, Shin W, Lee KI, Choi DH, Kim MR, Na CS, Kim SM, Pyo BS, Youn DH. Effects of Acupuncture at Varying Depths at the Connecting Point on the Changes of Levels of nNOS, No and Norepinephrine in Rats. Korean Journal of Acupuncture. 2015 ; 32(4) : 160-8.