파장별 레이저 자극과 전침 결합 시술이 신경병리성 동통에 미치는 영향

조명래^{1*} · 김명훈^{2*} · 문영민³ · 정성호⁴ · 나창수²

¹동신대학교 한의과대학 침구의학교실, ²동신대학교 한의과대학 경혈학교실, ³포항산업과학연구원, ⁴광주과학기술원

Combined Effects of Different Wavelength Laser Stimulations and Electroacupuncture on Neuropathic Pain

Myoung-rae Cho^{1*}, Myeong-hun Kim^{2*}, Youngmin Moon³, Sungho Jeong⁴, Chang-su Na²

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Dong-shin University,

²Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-shin University,

³Smart Solution Research Group, Research Institute of Industrial Science and Technology,

⁴Department of Mechatronics, Gwangju Institute of Science Technology

Objectives : The effects of a combined stimulation of 658 nm, 830 nm, 904 nm, and 1064 nm laser acupuncture treatment (LAT) and electroacupuncture treatment (EAT) on GB39 and GB34 on neuropathic pain in rats induced by tibial and sural nerve transection were studied in this paper. **Methods :** To express a neuropathic pain model, surgery was performed to transect rats' tibial and sural nerves. The rats were divided into normal group, control group, and experimental groups. In addition, the experimental groups were divided into 658 nm laser and electroacupuncture (LAT658+EAT), 830 nm laser and electroacupuncture (LAT830+EAT), 904 nm laser and electroacupuncture (LAT904+EAT), and 1064 nm laser and electroacupuncture (LAT1064+EAT). For the treatment of the experimental groups, electroacupuncture and different laser wavelengths were alternately applied to GB34 and GB39 twice a week for 3 weeks for 1 minute 30 seconds. The withdrawal response of neuropathic rats' legs by acetone stimulation was observed, as well as the c-Fos in the central gray region in the midbrain of neuropathic rats together with Bax, Bcl2, and mGluR5 expressions associated with apoptosis. **Results :** Compared with the control group, a significant decrease in the frequency of paw withdrawal in response to acetone allodynia was observed in LAT658+EAT and LAT830+EAT groups in 6th times, LAT904+EAT group in 2nd, 3rd, and 6th times, and LAT1064+EAT group in 2nd and 6th times, respectively. For c-fos positive cells in the central gray region, a significant decrease was observed in LAT830+EAT, LAT904+EAT, and LAT1064+EAT groups in comparison with the control group. In Bax expression, LAT1064+EAT group showed a significant decrease compared to the control group. In Bcl-2 expression, the LAT658+EAT, the LAT904+EAT, and the LAT1064+EAT groups increased significantly compared to the control group. LAT830+EAT, LAT904+EAT, and LAT1064+EAT groups showed significantly increased mGlu5 expression compared to the control group. **Conclusions :** The combination of laser for each wavelength and electroacupuncture alternately performed in this study is thought to be effective in improving neuropathic pain and apoptosis.

Key words : neuropathic pain, 658 nm · 830 nm · 904 nm · 1064 nm laser, electroacupuncture, acetone allodynia, c-Fos, apoptosis

Received September 1, 2021, Revised September 14, 2021, Accepted September 14, 2021

Corresponding author: **Chang-su Na**

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Dong-shin University, 120-9 Dongshindae-gil, Naju 58245, Korea

Tel: +82-61-330-3522, Fax: +82-61-330-3519, E-mail: nakugi@hanmail.net

*These authors have contributed equally to this work.

This research was supported by the Dongshin University research grants. This research was supported by a grant from the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (grant No. HI09C1647, HI18C1915).

© 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.

서론

신경 손상은 신경병증성 통증(neuropathic pain)을 유발하는데, 손상 부위에 따라 말초 또는 중추 신경병증성 통증으로 구분되고, 말초신경이나 신경근의 손상은 말초 신경병증성 통증을, 척수를 포함하는 중추신경계의 손상은 중추 신경병증성 통증을 유발하게 된다. 신경병증성 통증은 직접적인 신경손상 외에 신경의 외상이나 압박으로 인한 허혈성 손상, 염증, 독성 대사산물 등 다양한 원인에 의해 발생할 수 있는 만성 통증증후군의 하나이며, 정상에서는 통증을 유발하지 않는 약한 자극으로도 큰 강도의 통증을 유발하는 통각과민, 그리고 외부의 자극 없이 생성되는 자발통, 이질통 등이 포함된다¹⁻³⁾. 이러한 증상들은 소염진통제 등 전통적인 통증 치료약물에 잘 반응하지 않으며, 정확한 기전이 밝혀지지 않아 치료에 어려움을 겪고 있다⁴⁾.

한의학에서는 통증의 원인에 대해 《素問·舉痛論》⁵⁾에 “經脈流行不止，環周不休，寒氣入經而稽遲，泣而不行，客於脈中則氣不通，故卒然而痛”이라 하고, 張⁶⁾은 “痛則不通，不通則痛” 등으로 인식하였고, 《素問·至真要大論》⁵⁾에서는 “諸痛癢瘍皆屬於心，心藏神”이라 하여 일질 통증은 반드시 神의 작용에 의해 감각되어진다고 하였다.

이러한 통증을 조절하는데, 한의학에서는 침치료가 적용되어 활용되고 있으며, 근래 전통적인 침차요법 외에 다양한 신침요법이 개발되어 적용되고 있는데, 저주파 전기 자극을 적용한 전침요법이 다양한 질환 치료법으로 활용되고 있으며, 또한 레이저 자극과 침치료를 결합한 기술도 시도되고 있다⁷⁾.

레이저침은 경혈에 대해서 레이저를 조사하는 것으로 경락이론에 따른 경혈을 자극하는 방식으로 경락의 허실을 조절하여 치료 목적을 이루며, 이는 광선요법의 생체자극 효과를 지닌 레이저를 하나의 자극 수단으로 사용하여 한의학의 중요한 이론 체계인 경락 치료를 위한 수단으로 사용하는 의미가 있다⁸⁾. 이와 같이 한의학 분야에 사용된 레이저 치료법에 관한 연구는 레이저 생물자극요법으로 시작되었으며⁹⁾, 레이저광의 파장대별로 위 등¹⁰⁾은 633 nm 영역의 He-Ne 레이저가 신경병증성 동통 억제효과를, 임 등¹¹⁾과 방 등¹²⁾은 633 nm 영역의 He-Ne 레이저가 고혈압에 대한 개선효과가 있음을 보고하였다.

한편, 레이저와 전침을 결합한 기술에 대한 보고에서 김 등¹⁴⁾은 신경병리성 통증 모델에 레이저 830 nm, 904 nm와 전침을 결합한 기술은 신경병증성 동통의 물리적 이질통, c-fos, nociceptin 지표에서 유의한 변화가 나타난 것을 확인할 수 있었고, 레이저요

법과 전침요법을 배합한 기술은 동통 억제를 위한 상합작용이 발휘될 수 있음을 제시하였다.

또한 레이저 파장대별 기술의 효과를 비교 관찰한 보고에서 윤 등¹⁵⁾은 레이저 532 nm, 650 nm, 830 nm, 904 nm, 1064 nm 5개 파장대의 레이저 기술이 동통 억제에 미치는 효과를 비교 관찰한 결과, 지표별로 파장대별 레이저 기술은 동통 억제에 유효성을 보였고, 이 중 650 nm, 830 nm, 904 nm 레이저 기술은 중등도의 통증 억제를, 532 nm, 1064 nm 레이저 기술이 좀 더 효과적으로 동통을 억제함을 제시하였다.

본 연구에서는 전침과 결합하여 활용할 수 있는 파장대별 레이저 658 nm, 830 nm, 904 nm, 1064 nm를 전침 자극을 결합한 기술이 동통억제 미치는 영향을 비교 관찰하기 위하여 tibial nerve와 sural nerve 손상으로 유발된 신경병리성 동통 모델에 대하여 화학적 냉각이질통, c-fos 단백 발현, 그리고 세포사멸 관련 Bax, Bcl-2 지표를 관찰하고, glutamate 수용체인 mGluR5 변화를 관찰한 바, 다음과 같은 지견을 얻었다.

재료 및 방법

1. 동물

체중이 약 230~250 g의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 항온 습습 환경의 사육장(실내온도 24±1℃, 습도 60±5%)내에서 고형 사료(pellet, GMO, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간동안에 물과 고형사료를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 실험은 동신대학교 실험동물윤리위원회 동물실험계획 승인(#14090302)을 받아 시행하였다.

2. 파장대별 레이저 및 저주파 자극 기술 기기

본 연구를 위하여 prototype으로 제작된 Laser and Electrical Stimulator System을 사용하였으며, 이는 광주과학기술원 레이저 나노가공 연구실에서 제작하였다. 주요한 제원과 시스템 사양은 다음과 같다(Table 1).

3. 신경병리성 동통 유발

흰쥐는 isoflurane (회사명, 한국) 2.5%로 마취를 유도하였고, 마취 유지 후 고관절 후측의 피부를 절개한 후 실제 중현미경(Syemi 305, Zeiss, Germany)을 사용하여 biceps femoris muscle 사이의 sciatic nerve를 찾아 tibial nerve와 common peroneal

Table 1. The specifications of laser for each wavelength and electroacupuncture system

Specifications	Laser wavelength				Electroacupuncture (Electrical stimulator)
	658 nm	830 nm	904 nm	1064 nm	
Output power	80 mW	80 mW	60 mW	60 mW	23 V (58 mA)
Operating mode	CW/Pulse	CW/Pulse	CW/Pulse	CW/Pulse	Pulse
Pulse repetition rate	1~300 Hz	1~300 Hz	1~300 Hz	1~300 Hz	1~300 Hz
Pulse waveform	Sine	Sine	Sine	Sine	Square

Fig. 1. The procedure of experimental processing for the researching laser for each wavelength band and electroacupuncture treatment.

nerve 및 sural nerve를 확인한 후 microforcep으로 주변조직 및 혈관으로부터 분리시킨 다음, common peroneal nerve는 남겨두고, tibial nerve와 sural nerve는 현미경 하에서 6.0 silk thread (SK617, Ailee, 한국)로 결찰한 후 미세 수술가위로 절단하였고, 절개된 부위는 kanamycin을 점적하고 피부를 봉합하였다.

4. 화학적 동통 반응 평가

수술 후 3주째부터 냉자극에 대한 통증반응을 확인하기 위하여 아세톤(acetone)을 사용하였다. 철망으로 되어있는 바닥 위에 아크릴로 제작한 투명한 상자를 놓고 그 안에 흰쥐를 넣고 주위 환경에 적응할 수 있도록 안정을 시킨 후 아세톤을 담은 주사기를 폴리 에틸렌 튜브와 연결하여 튜브 끝의 아세톤이 뒷발바닥에 살짝 접촉하도록 하였으며, 각각 5분 간격으로 2 ml씩 10회 자극하였으며, 아세톤 자극 후 회피반응의 빈도를 측정하였다. 철회반응의 횟수를 얻어 백분율로 표시하였다.

5. 군 분류, 취혈 및 자극 방법

실험군의 분류는 처치를 하지 않은 정상군(Normal ; NOR), 신경병리성 동통을 유발한 후 처치하지 않은 대조군(Control ; CON), 레이저 658 nm+전침 자극군(LAT658+EAT), 레이저 830 nm+전침 자극군(LAT830+EAT), 레이저 904 nm+전침 자극군(LAT904+EAT), 레이저 1064 nm+전침 자극군(LAT1064+EAT)으로 하였다.

취혈 부위는 현충(GB39)과 양릉천(GB34)으로 모두 인체에 상응하는 부위로 취하였다. 정상군과 대조군은 아무런 처치를 하지 않았고, 레이저 658 nm+전침 자극군(LAT658+EAT), 레이저 830 nm+전침 자극군(LAT830+EAT), 레이저 904 nm+전침 자극군(LAT904+EAT), 레이저 1064 nm+전침 자극군(LAT1064+EAT)은 주 2회씩 3주간 시술하였으며, 좌측과 우측을 1회씩 교대로 시행하였다(Fig. 1).

파장대별 레이저와 전침 자극을 결합한 시술은, 먼저 광섬유가 삽입된 침(레이저 자극용 침)을 자침한 후에 집게 형태로 된 전침 단자를 레이저침에 연결후 집게형 전기 자극 단자를 연결하여 시술하였다. 전침 자극은 빈도수를 20 Hz로 맞추고, 강도 설정은 1 Volt부터 시작하여 서서히 높여 흰쥐의 다리 근육과 뒷발의 떨림이 발생하는 것을 기준으로 삼았으며, 또한 적응하여 떨림이 현저히 줄어들면 다시 Volt의 강도를 높이는 방법으로 강도를 조정하였으며, 최대 3.0 Volt 이하로 설정하여 시행하였다. 파장대별로 설정된 레이저 자극은 펄스모드로 하여 빈도수를 20 Hz로 맞추었고, 강도는 20 mW로 설정하여 자극하였다. 파장대별 레이저 자극과 전침 자극은 각각 1분 30초씩 순차적으로 시행하였다.

6. Immunohistochemistry

모든 실험이 끝난 직후 흰쥐를 Urethane (Sigma, USA)으로 마취시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin (Sigma, USA)용액 800 ml로 심장을 통해 관류하

였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 24시간 경과 후 고정시키고, 30% sucrose (Sigma, USA)가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직 30 μ m의 두께로 잘랐다.

뇌 조직을 초기에 0.1M PBS에 3회 정도 세척하였고, 2% 토끼 혈청으로 30분 blocking한 후, 각각 primary mouse monoclonal c-fos anti-body (1:40, Novocastra, United Kingdom)를 사용하였다. 1차 항체는 0.1 M PBS와 0.1% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO, USA) buffer로 100배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72시간 동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 0.1 M PBS로 세척한 다음 biotinylated universal Secondary Antibody (Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Streptavidin peroxidase preformed complex (Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시키고, 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음 조직을 착색제로서 diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 발현시키고, 0.1 M PB로 발색을 정지시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 cover glass를 덮은 후 광학현미경 200배로 조정하여 central gray에서 c-fos의 immunoreactive 신경세포 관찰하였고, counting은 전체 상에서 측정하였다.

7. Total RNA 분리 및 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA의 분리는 Spinal Cord 부위의 조직(20 mg)을 500 μ l TRIZOL reagent (Gibco-BRL, USA)로 균질화하고 균질액에 대해 1 ml의 chloroform (Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들어 잘 혼합한 후, 실온상태에서 15분 방치하고 난 다음 세포 유잔 물을 제거하기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액과 1 ml의 isopropanol (sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4°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 뇌조직의 total RNA는 사용 시까지 -70°C에서 보관하였다.

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 house-keeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer: 5'-TGCATCCTGCACCACCAACT-3', antisense primer: 5'-CGCCTGCTTACCACCTTC-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42°C에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94°C에서 5분 동안 denature 그리고 4°C에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 시행한다. Bax, Bcl-2, mGluR5 유전자에 대한 흰쥐의 특이 primer는 PCR-premix 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°C에서 30초 동안 pre-denaturation, 94°C에서 40초 동안 melting, 55°C에서 40초 동안 annealing, 72°C에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72°C에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 Bax 유전자증폭을 primer (senseprimer: 5'-CATCTTCTTCCAGATGGTGA-3', antisense primer: 5'-GTTTCATCCAGGATCGAGCAG-3'), Bcl-2 유전자증폭을 primer (senseprimer: 5'-CGGTTTCAGGTACTCAGT CAT-3', antisense primer: 5'-ACTTTGCACAGATGTCCAGT-3'), mGluR5 유전자증폭을 primer (senseprimer: 5'-TCCAATCTGCTCCTCC TACC-3', antisense primer: 5'-CAACGATGAAGAAC TCT GCG-3')를 이용하여 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

이렇게 증폭된 Bax, Bcl-2, 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, USA)을 이용하여 촬영하였으며, Kodak MI Software (Kodak, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

본 연구의 통계 분석은 Graph Pad Prism (Ver. 6.01 for Window, USA)을 사용하여 평균오차와 표준오차(mean $\pm$ standard error)로 표시하였다. 각 측정치의 비교는 Mann-Whitney U test와 student t-test를 시행하였으며, 통계적 유의수준은 $\alpha=0.05$ 수준($p<0.05$)과 $\alpha=0.01$ 수준($p<0.01$)에서 유의성을 확인하였다.

결 과

1. Acetone에 의한 냉각 이질통에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침 자극, 레이저 830 nm+전침 자극, 레이저 904 nm+전침 자극, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 환쥐의 냉각 이질통에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군과 대조군간의 비교에서 정상군에 비하여 대조군은 2회~6회째에 유의한 증가를 나타내었으며, 대조군과 실험군간의 비교에서 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군과 830 nm+전침 자극군은 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 904 nm+전침 자극군은 2회, 3회, 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 2회, 6회째에 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

2. c-Fos 단백 발현에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침, 레이저 830 nm+전침, 레이저 904 nm+전침, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 환쥐의 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 6.1±1.9 number, 대조군이 26.6±4.7 number, 레이저 658 nm+전침 자극군이 14.4±

2.1 number, 레이저 830 nm+전침 자극군이 9.0±0.8 number, 레이저 904 nm+전침 자극군이 11.5±2.5 number, 레이저 1064 nm+전침 자극군이 11.1±2.1 number를 각각 나타내었다.

정상군에 비하여 대조군은 유의한 증가를 나타내었고, 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군, 레이저 830 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3, 4).

Fig. 3. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the number of c-Fos positive cells in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. For groups, refer to Fig. 2. ## $p<0.01$ as compared with the normal group. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ as compared with the control group.

Fig. 2. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on withdrawal response to cold allodynia of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. LAT658+EAT : laser acupuncture therapy (658 nm) and electro-acupuncture therapy group alternately at GB34-GB37 after neuropathic pain induced by tibial and sural nerve transection. LAT830+EAT : laser acupuncture therapy (830 nm) and electro-acupuncture therapy group alternately at GB34-GB37 after neuropathic pain induced by tibial and sural nerve transection. LAT904+EAT : laser acupuncture therapy (904 nm) and electro-acupuncture therapy group alternately at GB34-GB39 after neuropathic pain induced by tibial and sural nerve transection. LAT1064+EAT : laser acupuncture therapy (1064 nm) and electro-acupuncture therapy group alternately at GB34-GB39 after neuropathic pain induced by tibial and sural nerve transection. # $p<0.05$ as compared with the normal group. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ as compared with the control group.

Fig. 4. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the c-Fos-positive cells in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

For groups, refer to Fig. 2.

3. Bax에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침 자극, 레이저 830 nm+전침 자극, 레이저 904 nm+전침 자극, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 흰쥐의 Bax에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 37.9 ± 6.7 (10^3 OD), 대조군이 12.6 ± 1.4 (10^3 OD), 레이저 658 nm+전침 자극군이 32.8 ± 10.3 (10^3 OD), 레이저 830 nm+전침 자극군이 29.9 ± 9.8 (10^3 OD), 레이저 904 nm+전침 자극군이 39.9 ± 11.6 (10^3 OD), 레이저 1064 nm+전침 자극군이 39.9 ± 11.6 (10^3 OD)를 각각 나타내었다.

정상군에 비하여 대조군은 유의하게 증가를 나타내었고, 대조

군에 비하여 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 5).

4. Bcl-2에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침 자극, 레이저 830 nm+전침 자극, 레이저 904 nm+전침 자극, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 흰쥐의 Bcl-2에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 123.0 ± 1.3 (10^3 OD), 대조군이 113.3 ± 0.7 (10^3 OD), 레이저 658 nm+전침 자극군이 119.1 ± 1.1 (10^3 OD), 레이저 830 nm+전침 자극군이 115.7 ± 1.6 (10^3 OD), 레이저 904 nm+전침 자극군이 122.4 ± 2.1

Fig. 5. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the intensity of Bax in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. For groups, refer to Fig. 2. [#]*p*<0.05 as compared with the normal group. ^{*}*p*<0.05 as compared with the control group.

(10³ OD), 레이저 1064 nm+전침 자극군이 117.9±1.4 (10³ OD)를 각각 나타내었다.

정상군에 비하여 대조군은 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 6).

5. Bax/Bcl-2 ratio에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침 자극, 레이저 830 nm+전침 자극, 레이저 904 nm+전침 자극, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 흰쥐의 Bax/Bcl-2 ratio에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 0.83±0.02, 대조군이 0.97±0.02, 레이저 658 nm+전침 자극군이 0.90±0.01, 레이저 830 nm+전침 자극군이 0.92±0.03, 레이저 904 nm+전침 자극군이 0.86±0.01, 레이저 1064 nm+전침 자극군이 0.88±0.02를 각각 나타내었다.

정상군에 비하여 대조군은 유의한 증가를 나타내었고, 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

Fig. 6. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the intensity of Bcl-2 in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. For groups, refer to Fig. 2. ^{##}*p*<0.01 as compared with the normal group. ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 as compared with the control group.

Fig. 7. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the Bax/Bcl-2 ratio in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. For groups, refer to Fig. 2. ^{##}*p*<0.01 as compared with the normal group. ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 as compared with the control group.

6. mGlu5에 미치는 효과

파장대별 레이저와 전침 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침 자극, 레이저 830 nm+전침 자극, 레이저 904 nm+전침 자극, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 흰쥐의 mGlu5에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 119.7±2.2 (10³ OD), 대조군이 106.6±1.0 (10³ OD), 레이저 658+전침 자극군이 113.3±2.4 (10³ OD), 레이저 830+전침 자극군이 114.2±1.7 (10³ OD), 레이저 904+전침 자극군이 113.8±2.4 (10³ OD), 레이저 1064+전침 자극군이 111.5±1.3 (10³ OD)를 각각 나타내었다.

Fig. 8. Effects of laser for each wavelength and electroacupuncture at acupoint GB34-GB39 on the intensity of mGlu5 in the central gray of brain of neuropathic pain rats induced by tibial and sural nerve transection.

The data are expressed as mean±SE. For groups, refer to Fig. 2. ^{##} $p<0.01$ as compared with the normal group. ^{*} $p<0.05$ as compared with the control group.

정상군에 비하여 대조군은 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 레이저 830 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 8).

고 찰

신경병증성 통증 질병에 대한 병태 생리적 과정을 이해하고자 최근까지 많은 연구가 이루어져 왔으나^{16,17)} 아직까지 이 질병의 병태 생리적 기전이나 만족할 만한 치료방법이 밝혀지지 않고 있으며 진통제, 아편양제제, 신경블록치료, 신경 외과적 치료로도 효과가 만족스럽지 못한 실정이다¹⁸⁾.

본 연구에서는 한의학의 침치료법에 새로운 침침요법⁷⁾이 접목되고 있는데, 저주파 전기자극을 적용한 전침요법과 레이저자극을 적용한 레이저침요법이 대표적이다. 즉 전통적인 침치료법의 효과를 증대하기 위하여 전기 자극과 레이저 자극을 침요법과 결합하는 연구들이 시행되고 있는데, 이들 연구에서 경혈 침자에 대하여 전통적인 치료법과 더불어 전기적 자극을 결합하거나, 레이저 자극을 결합한 치료는 좀더 유리함을 보고하고¹⁰⁻¹³⁾ 있다.

본 연구에서는 양릉천(GB34) 및 현중(GB39)에 대한 전침과 파장대별 레이저침 배합 시술이 tibial nerve와 sural nerve 절단으로 유발된 신경병리성 동통에 미치는 영향을 알아보고자, 흰쥐에

서 화학적 이질통 자극, c-fos 및 apoptosis 인자 발현 등에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구에서 적용한 양릉천(GB34)은 담경 혈위로 八會穴 가운데 筋會이고, 疎泄肝膽, 清利濕熱, 舒筋活絡, 緩急止痛의 효능이 있으며, 현중(GB39)은 담경의 혈위로 八會穴 가운데 髓會이고 通京洛, 祛風濕, 利關節, 止疼痛, 泄膽火, 壯筋骨의 효능이 있어서, 두 혈위를 配伍하면 通經接氣의 활용이 되어, 疎泄肝膽, 清利濕熱, 益精添髓, 強壯健骨, 緩急止痛의 효능이 발휘된다¹⁹⁾.

본 연구에서 냉각이질통에 미치는 영향을 관찰하였다. 냉각 자극에 대한 회피반응은 이질통 측정을 위한 방법으로 비특이적이지만 acetone을 환부에 뿌렸을 때 증발에 의한 표면온도의 감소를 이용해서 통증의 정도를 측정하는데 신경병리성 통증에서 민감도가 큰 척도로서²⁰⁾, 동통 제어하는 정도의 지표로 활용되고 있다. 본 연구에서 파장대별 레이저와 전침을 결합한 결합 자극의 통증 제어 효과를 관찰하기 위하여 레이저 658 nm+전침, 레이저 830 nm+전침, 레이저 904 nm+전침, 레이저 1064 nm+전침 자극이 tibial & sural nerve transection으로 유발된 신경병리성 동통 흰쥐의 냉각 이질통에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군과 830 nm+전침 자극군은 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 904 nm+전침 자극군은 2회, 3회, 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 2회, 6회째에 유의한 감소를 나타내어 시술의 횟수가 증가함에 따라 유의한 결과를 나타내었고, 파장대별로는 904 nm 레이저를 결합한 시술과 1064 nm 레이저를 결합한 시술에서 유효성 빈도가 높아서 파장이 긴 영역대에서 효과적임을 시사한다고 사료된다.

c-Fos 단백질은 일반적으로 표적 유전자의 촉매부위에 있는 DNA-결합 단백질이나 DNA에 결합함으로써 신경계의 장기적, 기능적 변화를 유도하는 초기 유전자 발현을 조절하는 transcription factor로 알려져 있으며²¹⁾, 시냅스 후 뉴런에서 빠르게 발현되고 중추 감각자극 혹은 신경손상 후 신경세포 활성화에 대한 지표로 사용되고 있으며, 특히 기계적 유해자극과 열성 유해자극에 의해 시상, 시상하부 등에서 c-Fos 발현이 증가한다고 알려져 있다^{22,23)}. 따라서 본 연구에서는 통증 제어를 확인하는 방법으로 c-Fos 단백을 면역조직화학적으로 관찰하는 방법을 사용하였다. 본 연구에서 central gray 부위 c-fos 단백질 발현은 정상군에 비해 tibial nerve와 sural nerve를 손상시킨 대조군에서 유의하게 증가된 것으로 나타났고, tibial nerve와 sural nerve 손상 후 파장대별 레이저와 전침 자극을 결합하여 시술한 모든 실험군에서 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 tibial nerve와 sural nerve 손상 후 파장대별 레이저와 전침 자극을 결합한 시술은 모두 c-fos

단백 발현 증가를 억제시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이것으로 보아 본 연구의 658 nm, 830 nm, 904 nm, 1064 nm 레이저 자극과 전침 자극을 결합한 시술은 모두 통증 전달을 억제하는 작용이 공통적으로 발휘됨을 나타내고 있으며, 이러한 시술은 통증 제어에 효과적으로 작용할 수 있음을 시사하고 있다. 이의 결과는 냉각 이질통에 있어서 6회째에 모두 유의한 결과를 보인 것과도 부합한다고 볼 수 있다.

세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로 apoptosis가 발현된다. apoptosis는 일반적인 생리학적 변화이기도 하며, 세포 증식과 세포 발달을 겪는 중 조직에서 일정한 세포 수를 유지하기 위한 반응이다. apoptosis 조절은 어떤 경로는 세포를 사멸시키고 어떤 경로는 세포의 생존을 촉진하기도 하는 다양한 신호전달에서 통합된 활성도에 의해 중재된다^{24,25}. 즉 Bax와 Bcl-2는 apoptosis 기전을 조절하는 인자로서 Bax는 apoptosis를 촉진하는 유발인자, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 인자로 알려져 있다²⁶. Bax 발현이 증가하고 Bcl-2 발현이 감소되는 상태에서는 apoptosis가 유발되고, Bax 발현이 억제되고 Bcl-2 발현이 증가하는 상태에서는 apoptosis가 억제된다고 하였다²⁷. 본 연구의 tibial nerve와 sural nerve를 손상시킨 것과 같이 신경의 염증 반응이 발현될 시 말초신경-척수중추신경계에 세포 증식과 억제의 조절작용을 발현됨을 보고하고 있는데²⁸, 이에 본연구에서 중추신경계 central gray 부위의 세포 증식과 억제 조절 상태를 관찰하기 위하여 Bax와 Bcl-2를 관찰하였다.

Bax 및 Bcl-2의 활성도를 관찰한 결과, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 Bax의 경우 유의한 감소를 나타내었고, Bcl-2의 경우 유의한 증가를 나타내어 apoptosis를 촉진하는 인자는 감소를, 억제하는 인자는 증가를 나타내어 1064 nm 파장의 레이저와 전침 자극을 결합 시술은 효과적으로 apoptosis를 감소, 지연시킬 수 있는 것으로 사료된다. 한편, 레이저 658 nm+전침 자극군과 레이저 904 nm+전침 자극군은 Bcl-2의 경우 유의한 증가를 나타내었고, Bax의 경우에는 감소의 경향을 보인 반면 유의성은 인정되지 않은 것으로 볼 때, 발현된 apoptosis를 억제하는 작용이 위주인 것으로 사료된다. 다만, 레이저 830 nm+전침 자극군은 Bax와 Bcl-2에 모두 유의한 변화를 나타내지 않은 것으로 볼 때, apoptosis 작용은 뚜렷하지 않은 것으로 사료된다. 이는 레이저 830 nm+전침 결합 자극이 c-Fos 단백 발현을 감소시키고 냉각이질통에서 6회째에 유의한 감소를 보인 것과는 대비되는 결과로서 레이저 830 nm+전침 결합 자극은 apoptosis 작용보다는 동통 전달을 억제하는 작용이 위주일 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

Glutamate는 중추신경계에서 가장 많이 분포하는 주요한 흥분

성 신경전달 물질로서 비가역적인 세포손상을 일으키는 것으로 알려져 있으며, inotropic glutamate receptors (iGluR)와 metabotropic glutamate receptors (mGluR) 두 개의 수용체와 결합하며, 그 중 mGluR5는 산소결핍이나 NO 독성에 대한 신경보호 및 신경조직형성에 유효한 작용을 발휘하는 glutamate receptor의 하나이고²⁹, 신경전구세포의 증식, 생존, 분화와 밀접한 관계로 신경세포의 생성에 영향을 미친다³⁰. 본 연구에서 mGluR5의 발현 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 레이저 830 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군에서 유의한 증가를 나타내고, 레이저 658 nm+전침 자극군은 증가의 경향성을 나타내어, 각 파장대별 레이저와 전침 자극을 결합한 시술은 tibial nerve와 sural nerve 절단으로 유발된 손상된 신경병리성 병변에 대하여 신경조직 형성에 효과적일 수 있는 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

이는 본 연구에서 설정한 동통억제 관련 냉각이질통 및 c-Fos 단백 발현 지표에 있어서는 레이저 658 nm+전침, 레이저 830 nm+전침, 레이저 904 nm+전침, 레이저 1064 nm+전침 자극이 모두 유의한 작용이 발휘됨을 알 수 있었고, apoptosis를 촉진 혹은 억제에 미치는 효과를 관찰한 결과에 있어서 apoptosis를 촉진하는 인자를 감소하는 효과는 1064 nm+전침 결합 자극이 가장 두드러졌고, apoptosis를 억제하는 인자를 증가하는 효과는 658 nm+전침, 904 nm+전침, 1064 nm+전침 결합 자극이 유효함을 제시하고 있다. 또한 손상된 신경세포를 보호하는 효과는 830 nm+전침, 904 nm+전침, 1064 nm+전침 결합 자극이 유효함을 제시하고 있다.

이상의 결과로 보아 이전 연구에서 레이저와 전침을 결합한 시술은 동통 억제를 위한 상합작용이 있음을 보고했던 연구¹⁴, 그리고 파장대별로 레이저의 유효성을 관찰했던 연구 보고¹⁵와 함께 본 연구의 결과는 레이저 및 전침 결합 자극이 동통억제에 효과적이고, apoptosis 지연에도 효과적일 수 있음을 관찰할 수 있었다. 향후 레이저와 전침 자극을 결합한 후속 연구가 심도있게 진행된다면 임상 활용 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

결론

파장대별 658 nm, 830 nm, 904 nm, 1064 nm 레이저와 전침 결합 시술이 tibial nerve와 sural nerve 절단으로 유발된 신경병리성 동통에 미치는 영향을 알아보고자, 흰쥐에서 화학적 이질통 반응, c-fos 단백 발현과 Bax, Bcl-2 및 mGlu5 지표 변화 등을

관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Acetone 측정 화학적 냉각 이질통 변화에서 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군과 830 nm+전침 자극군은 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 904 nm+전침 자극군은 2회, 3회, 6회째에 유의한 감소를 보였고, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 2회, 6회째에 유의한 감소를 나타내었다.

2. c-fos 발현에서 대조군에 비하여 레이저 830 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 감소를 나타내었다.

3. Bax 발현에서 대조군에 비하여 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 감소를 나타내었다.

4. Bcl-2 발현에서 대조군에 비하여 레이저 658 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 증가를 나타내었다.

5. mGlu5 발현에서 대조군에 비하여 레이저 830 nm+전침 자극군, 레이저 904 nm+전침 자극군, 레이저 1064 nm+전침 자극군은 유의한 증가를 나타내었다.

본 연구의 신경병리성 동통 모델에 대하여 파장대별 레이저와 전침 자극을 결합한 시술은 지표별로 차이는 있었지만 동통 억제 효과와 apoptosis를 감소시킬 수 있음을 확인하였고, 이의 결과는 레이저와 전침을 결합한 시술법의 근거로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

This research was supported by the Dongshin University research grants.

Funding

This research was supported by a grant from the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (grant No. HI09C1647, HI18C1915).

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

- McMahon SB. Mechanism of sympathetic pain. *Br Med Bull.* 1991 ; 47(3) : 584-600. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072494>
- Sato J, Perl ER. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science.* 1991 ; 251(5001) : 1608-10. <https://doi.org/10.1126/science.2011742>
- Seltzer Z, Shir Y. Sympathetically-maintained causalgiform disorders in a model for neuropathic pain: a review. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1991 ; 2(1-2) : 17-61. <https://doi.org/10.1515/jbcpp.1991.2.1-2.17>
- Jang Y, Moon DE, Yoo JH, Lee HJ, Lee JY, Kwon OK. Effects of Oxcarbazepine on Mechanical and Cold Allodynia in a Neuropathic Rat Model. *Korean J Anesthesiol.* 2003 ; 45(3) : 385-92. <http://doi.org/10.4097/kjae.2003.45.3.385>
- Nanjing University of Chinese Medicine. The annotation of The Huang Di Nei Jing-So Moon. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1997 : 278, 361, 305-12, 652.
- Zhang JY. Lei Jing (shang). Seoul : Daesung Publisher. 1982 : 372-5.
- Textbook Compilation Committee of the Korean Society of Acupuncture and Medicine. *Acupuncture Medicine.* Seoul. Hanmi Publishing. 2020 : 142-50, 199-202.
- Jan T, Lars H (Jang IS, Shin GB). *Laser Therapy.* Seoul : Jeong-Dam Publishing. 2006 ; 107.
- Tuner J, Hode L. *Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background.* Grangesberg Sweden : Prima Books. 1999 : 1-9.
- Wei TS, Youn DH, Youn YC, Na CS. Comparative study of acu-

- puncture and invasive laser acupuncture therapy at SI3 · BL40 on the tibial, sural nerve injury and L5 spinal nerve ligation model in rats. *Korean J Acupunct.* 2005 ; 22(2) : 9-24.
11. Ihm SJ, Youn DH, Na CS. Effects of Invasive Low Level Laser Acupuncture Therapy (LLLAT) at LU7, LR5, LU7+LR5 on the Hyperlipemia Rats Induced by High Fat Diet. *Korean J Acupunct.* 2005 ; 22(3) : 1-16.
12. Bang SH, You DH, Cho MR, Yim HJ, Na CS. Effects of Invasive Low Level Laser Acupuncture Therapy (LLLAT) depending on capacity at LU7+LR5 on the Hyperlipemia Rats Induced by High Fat Diet. *Korean J Acupunct.* 2006 ; 23(1) : 1-14.
13. Na CS, Youn DH, Choi CH, Lee SH, Oh KH, Jeong SH. The effects of traditional acupuncture techniques and green laser acupuncture on the blood pressure in hypertensive rat induced by two kidney one clip. *Korean J Acupunct.* 2008 ; 25(2) : 199-210.
14. Kim YS, Lee JH, Lee SH, Na CS, Cho MR. Effects of Electro and Laser Acupuncture Treatment with GB39 and GB34 on Neuropathic Pain in Rats Induced by Tibial and Sural Nerve Ligation. *J Acupunct Res.* 2013 ; 30(3) : 125-34. <https://doi.org/10.13045/acupunct.2013012>
15. Youn D, Youn P, Kim W, Kim M, Choi D, Na C. Effects of Laser Acupuncture Therapy According to the Wavelength at GB34 · GB39 on Neuropathic Pain Rat Induced by Tibial and Sural Nerve Transection. *Korean J Acupunct.* 2014 ; 31(4) : 195-207. <https://doi.org/10.14406/acu.2014.038>
16. Hayashida K, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology.* 2008 ; 109(6) : 1077-84. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31818dac9c>
17. Okazaki R, Namba H, Yoshida H, Okai H, Miura T, Kawamura M. The antiallodynic effect of Neurotrophin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. *Anesth Analg.* 2008 ; 107(3) : 1064-9. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31817e7a59>
18. Lee BH, Sohn JH, Park YG. Effectiveness of Opioids in the Management of Neuropathic Pain. *The Journal of Korean Brain Society.* 2001 ; 1(1) : 53-64.
19. The Meridian & Acupuncture Points Textbook Compilation Committee. *Acupuncture Points.* Seoul : Jeongdam Publishing. 2020 : 346-50, 364-8.
20. Heavner JE, Calvillo O, Racz GB. Thermal grill illusion and complex regional pain syndrome type I (reflex sympathetic dystrophy). *Reg Anesth.* 1997 ; 22(3) : 257-9. [https://doi.org/10.1016/S1098-7339\(06\)80011-8](https://doi.org/10.1016/S1098-7339(06)80011-8)
21. Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 1992 ; 15(3) : 96-103. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90019-5)
22. Bullitt E. Expression of c-fos like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990 ; 296(4) : 517-30. <https://doi.org/10.1002/cne.902960402>
23. Min JH, Park CM, Moon DE, Kim SN, Chung CW, Kim KH. Fos expression in the brain of neuropathic pain rats. *Korean J Anesthesiol.* 2001 ; 41(2) : 229-38. <http://doi.org/10.4097/kjae.2001.41.2.229>
24. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med.* 1997 ; 3 : 73-6.
25. Johnson Jr EM, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J Neurotrauma.* 1995 ; 12 : 843-52. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.843>
26. Gibson ME, Han BH, Choi J, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Parsadanian M, Holtzman DM. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. *Mol Med.* 2001 ; 7 : 644-55.
27. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop.* 1999 ; 13 : 1899-911.
28. Song IS, Yang JY, Lee JK, Joo YB, Cha SM. Variations of Neurotrophic Factors and Its Importances in Spinal Cord Injured Rats and Beagle Dogs. *J Korean Soc Spine Surg.* 2011 ; 18(1) : 1-12. <https://doi.org/10.4184/jkss.2011.18.1.1>
29. 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.
30. Zhao L, Jiao Q, Yang P, Chen X, Zhang J, Zhao B, 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.044>