大 韓 神 經 科 學 會 誌
Vol. 9, No. 2, June, 1991

고양이에서 D-phenylalanine이 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 신경외과학교실

김 선 호

연세대학교 의과대학 생리학교실

남택상 · 이영호 · 김연희 · 백광세

—Abstract—

The Effect of D-phenylalanine on the Analgesia Produced by Peripheral Nerve Conditioning Stimulation in the Cat

Sun Ho Kim, M.D.

Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine

Taick Sang Nam, M.D., Young Ho Lee, Youn Hi Kim, Kwang Se Paik, M.D.

Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine

An effect of D-phenylalanine on the pain inhibitory mechanism of prolonged electrical stimulation of the peripheral nerve was studied in decerebrate cats and spinal cats. The response of spinal neurons was elicited either by electrical stimulation of the ipsilateral common peroneal nerve and tibial nerve. The single-unit activity of motor neurons which represent the flexion reflex was recorded from a filament of ventral rootlet divided from either the L_7, S_1 or S_2 ventral root, and activity of dorsal horns cells was recorded with a microelectrode at the lumbosacral cord.

The conditioning stimuli which provocate the pain inhibitory mechanism of the common peroneal or tibial nerve was applied with repetitive, low frequency (2Hz), at a suprathreshold intensity for C fiber, for 30-45 minutes.

The results of the experiment are summarized as follows:

1. Applying conditioning stimuli produced a powerful inhibition of the responses which was provocated by noxious stimuli in either the decerebrate or the spinal cat without any statistical difference, and this effect can be observed for 15 minutes after the cessation of the conditioning stimuli.

2. This response was reversed completely by systemic injection of a specific opiate antagon-

ist, naloxone. It suggests that the conditioning stimulus of the peripheral nerve can produce the endogenous opiate related pain inhibitory effect as the spinal mechanism.

3. The conditioning stimuli can produce the analgesic effect by means of supression of the activity of the dorsal horn cell which was related to the pain response in the decerebrate cat. The same result could be observed in flexion reflex.

4. D-phenylalanine, a putative inhibitor of carboxypeptidase which degradates the endogenous opiate-enkephalin, was studied in this experiment under the hypothesis that D-phenylalanine will emphasize or prolongate the action of enkephalin. But, intravenously injected D-phenylalanine did not potentiate the inhibitory effect of the conditioning stimuli of the peripheral nerve.

From the above result, it is speculated that the electrical stimulation of the peripheral nerve is directly mediated by an endogenous opiate related analgesia, and the site of the analgesic action resides mainly in spinal cord level. But these data could not support the hypothesis that antinociceptive effect of D-phenylalanine results from the potentiation of endogenously released enkephalin.

I. 서 론

사람 및 여러 동물의 중추신경계에서 opiate-like peptide인 enkephalin과 β-endorphin등 소위 endogenous opiate system이 발견된 이래 (Hughes등, 1975 ; Simantov등, 1976) 이들의 약리학적, 생리학적 작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 peptide들은 말초로부터 대뇌피질까지의 통각전달을 척수의 dorsal horn 부위에서 억제시키는 descending pain inhibitory system (Fields등, 1977)의 주요 중추로 알려진 중뇌의 periaqueductal gray (PAG)와 연수의 nucleus raphe magnus (NRM) 및 척수의 후각 부위에 opiate receptor와 함께 상당량 존재함이 알려졌다(Hökfelt등, 1977). 또 신경해부학적 연구에 의해 PAG와 NRM 사이에는 하행성 신경로가 존재하고 NRM에서 척수의 dorsolateral fasciculus를 통해 동통의 전달을 억제하는 기능을 가진 하행성 신경로가 존재하여 이들 부위의 활성화에 의해 말초로부터 들어오는 동통자극의 전달을 척수후각에서 억제하므로써 중추로의 통각전달을 차단, 진통효과를 일으킴이 확인되고 있다 (Liebeskind등, 1973; Chan과 Fung, 1975).

한방의학에서 오랫동안 사용해 오고 있는 침술(acupuncture)이 진통효과가 있음은 사람과 실험동물을 통하여 잘 알려지고 있다 (Vierck등, 1971; Andersson등, 1973; Croze등, 1976; Mayer등, 1977; Pomeranz등, 1977; Chang, 1979). 침술은 자극한 부위의 말초구심성 섬유가 활성화되어 진통효과를 나타냄이 밝혀진 이래 (Chiang등, 1973; Fleck, 1975; Levy와 Matsumoto, 1975; Toda와 Ichioka, 1978; 백광세등, 1981), 그 시행방법이 좀더 서양의학적으로 개선된 electroacupuncture로써 transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS)과 더불어 동통치료를 목적으로 한 말초신경 자극법으로 널리 이용되고 있다.

이들 두방법 간에는 자극방법 (특히 자극강도 및 빈도)과 나타나는 진통효과의 질적인 면에서 큰 차이를 보여 진통기전이 상이할 것으로 생각되며 진통기전을 밝히려는 일련의 연구들이 보고되고 있다. 특히 중요한 것은 electroacupuncture의 진통효과가 specific opiate antagonist인 naloxone에 의해 억제되므로써 morphine과 유사한 물질을 매개로 진통효과를 나타냄이 알려졌는데 (Pomeranz와 Chiu, 1976; Mayer등, 1977; 백광세등, 1981 : Chung등, 1983) 이는 아마도 상술한 중추신경계에 존재하는 endogenous opiate system을 활성화시키므로써 이들 peptide를 유리시켜 그 작용을 나타낼 것으로 추측되는 바 이에 대한 실험적 증거가 제시되고 있다(Pomeranz와 Chiu, 1976; Pomeranz등, 1977; Sjolund등, 1977; Zhang등, 1980; Yaksh와 Elde, 1981; 백광세등, 1983).

이상의 몇가지 사실에 근거하여 볼 때 electroacupuncture는 구심성 섬유를 자극하여 중추신경내의

endogenous opiate system을 활성화시켜 raphespinal 하행성 신경로를 거쳐 척수에 전달되면서 동통의 진통효과를 나타내거나 척수후각에 직접 작용하여 진통효과를 나타내는 것으로 생각된다. 한편 분비된 peptide들은 체내에 존재하는 carboxypeptidase나 aminopeptidase등에 의하여 즉시 분해됨이 알려졌다 (Marks등, 1977; Meek등, 1977). 따라서 carboxypeptidase의 억제제를 투여할 경우 이 peptide의 작용을 오래 지속시켜 진통효과를 나타냄은 물론 electroacupuncture의 진통효과도 강화시킬 수 있을 것으로 가정할 수 있다. 그 근거로써 Ehrenpreis등 (1979, 1980)은 쥐와 인체에서 carboxypeptidase의 억제제인 D-phenylalanine과 hydrocinnamic acid가 naloxone에 의해 반전되는 진통작용 (naloxone reversible analgesia)을 일으킨다고 보고하였으며 Hyodo등 (1983)은 인체에서 electroacupuncture와 D-phenylalanine을 동시에 사용하였을 때의 진통효과가 electroacupuncture만을 단독으로 사용하였을 때보다 오래 지속됨을 보고하였다.

그러나 D-phenylalanine의 작용기전에 대해 반론이 없는 것은 아니다. 그예로 D'Alessandro (1983)는 인체에서의 실험에서 D-phenylalanine이 endogenous opiate system의 활성화를 증가시킴을 증명할 수 없다고 주장하는등 이론이 분분하다.

그렇지만 현재까지의 연구자료들에서는 동물실험을 통한 carboxypeptidase의 억제제와 electroacupuncture를 병용하였을 경우의 진통효과에 대한 체계적인 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 고양이에서 동통의 지표로 확인된 굴근반사 (flexion reflex)를 이용하여 opiate-like peptide의 분해효소로 알려진 carboxypeptidase의 억제제인 D-phenylalanine을 사용하여 진통효과가 증대 내지는 오래 지속되는지를 관찰함과 동시에 electroacupuncture의 endogenous opiate system과의 연관성을 확인하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 동물조작

실험동물로는 체중 2.0-3.0kg내외의 성숙한 한국산 고양이를 암수 구별없이 사용하였다. Ketamine hydrochloride (25mg/kg)를 근육주사하여 진정시킨 후 약물 주입을 위하여 외경정맥을 삽관하였고 인공호흡을 위해 기관지 절개술를 시행하였다. 모든 실험동물은 전 실험기간중 비마취상태를 유지하기 위하여 뇌저동맥과 양측 총경동맥을 결찰하여 제뇌동물 (anemic decerebrate animal)로 만들었다.

하지에는 굴근반사유발 및 말초신경을 자극하기 위하여 총비골신경 (common peroneal nerve)과 경골신경 (tibial nerve)을 주위 조직으로부터 분리하였다.

배측 정중선을 따라 피부를 절개한 후 제1요추 (L_1)에서 제2천추 (S_2)까지 후궁절제술을 시행하였으며 굴근 반사를 기록하기 위해 L_7, S_1 및 S_2 척수전근을 수술현미경 하에서 분리하였다. 실험동물중 일부는 L_1위치에서 forcep으로 30초간 척수를 pinching하여 척수동물(spinal animal)을 만들었으며 이때에는 척수 shock 기간이 충분히 지난후 실험하였다.

실험 조작이 준비된 고양이는 특수 고정대 (stereotaxic instrument with spinal cord fixer, Narishige사 제품)에 복와위로 고정시켰으며 하지와 척수부위에 액체 파라핀 pool (35±1℃)을 만들어 노출된 신경과 조직의 건조를 방지하였다. 전 실험기간중 신경의 전기자극에 의해 하지의 근육이 수축하는 것을 방지하기 위하여 gallamine triethiodide (Flaxedil)를 정맥주사하여 근마비시키고 end-tidal CO_2 농도가 3.5~4.5%로 유지되게 인공호흡기로 호흡시켰다. 이때 end-tidal CO_2의 농도는 capnometer (model 2200, Traverse medical monitor사 제품)을 이용하여 기록하였다. 한편 더운물이 순환되는 heating pad를 이용하여 정상체온을 유지시켰다.

2. 동통반응의 유발 및 기록

굴근반사는 대표적인 동통반응의 지표로 알려져 있다. 본 실험에서는 굴근반사 및 동통에 반응하는 척수후각세포의 활성도를 동통의 지표로 삼아 말초신경자극의 진통효과를 관찰하였다.

굴근반사는 하지의 총비골신경 혹은 경골신경을 bipolar electrode를 사용하여 C 섬유까지 충분히 자극되는 10mA의 강도로 500 μsec의 기간을 가진 3개의 square-wave electrical pulse를 20msec간격으로 stimulus isolator를 통해 주었는데 이는 굴근반사의 누성분 중 특히 동통과 관계가 있는 느린성분 (late component)을 가장 효과적으로 유발시키기 위해서

였다(한용표등, 1980; Chung등, 1983). 굴근반사의 기록은 유발자극을 가한 동측의 L_7, S_1 혹은 S_2 척수전근중 굴근 반사가 가장 잘 기록되는 부위를 선택하였으며 단일신경섬유의 활동전압 (single unit activity)을 얻을 때까지 수술현미경 하에서 미세 forcep으로 척수전근을 가늘게 분리한 후 bipolar silver electrode로 기록하였다.

한편 척수후각세포에서의 활성도 기록은 다음과 같이 시행하였다. 먼저 총비골신경 혹은 경골신경 전기자극시 발생되는 cord dorsum potential을 ball electrode로 동측 척수 배면에서 기록하여 이들 신경의 입력을 가장 많이 받는 척수부위를 확인하였다. 그 후 이 부위에 pulse motor microdrive manipulator (Narishige사 제품)를 이용하여 carbon filament-filled glass microelectrode (2~4Mohm)를 서서히 삽입하면서 동시에 총비골신경 혹은 경골신경을 계속 자극하여 활성화되는 단일 척수후각 세포를 찾았다. 일단 단일 척수후각세포의 활성도가 확인되면 이 세포의 말초수용야 (peripheral receptive field)에 brush, pressure, squeeze등 기계적 자극을 가하여 반응의 특성을 관찰한 다음 통각과 관련되는 척수후각 세포만을 선택하여 실험하였다. 이들 세포의 동통반응에 대한 활성도는 총비골신경 혹은 경골신경을 전기자극함으로써 유발시켰으며 이때 전기자극의 parameter는 굴근반사의 경우와 동일하였다.

3. 말초신경자극

본 실험에서는 electroacupuncture대신 말초신경을 직접 전기자극하였다. 말초신경의 자극은 굴근반사 및 척수후각세포의 활성도를 기록하는 동측하지의 경골신경 혹은 총비골신경에 10mA의 강도 (가장 큰 $A\alpha$ 섬유가 활성화 될 수 있는 역치자극강도의 200~300배), 500 μsec기간의 square-wave electrical pulse를 매초 2회의 빈도로 30~45분간 하였다.

4. 약물의 투여

D-phenylalanine이 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 D-phenylalanine (Sigma사 제품) 250mg/kg를 정맥으로 투여하고 1시간 후 말초신경자극을 시행하였다.

한편 말초신경자극의 진통작용과 endogenous opiate system과의 연관성을 알아보기 위해 specific opiate antagonist인 naloxone hydrochloride (삼진제약 제품) 0.05mg/kg를 말초신경자극 기간중 끝나기 5분전에 정맥으로 투여하고 말초신경자극의 진통효과를 관찰하였다.

5. 자료분석 및 통계처리

굴근반사 및 척수후각세포에서의 single unit activity는 window discriminator (model 121, WPI회사제)를 거친 후 interface (CED 1401)를 통해 computer로 입력시켜 poststimulus time histogram (PSTH)으로 나타내었다. PSTH는 총비골신경 혹은 경골신경을 10초 간격으로 10번 연속자극하여 집계함으로써 작성하였다.

굴근반사 및 척수후각세포의 활성도는 말초신경자극전, 자극직 후, 그리고 자극 후 5, 15, 30 및 60분의 회복과정을 기록하였으며 말초신경자극 전의 값을 대조치로 하여 이에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

대조군과 D-phenylalanine투여군간에 말초신경자극 효과의 차이는 unpaired t-test로, 각군에 있어서 말초신경자극효과 및 시간에 따른 회복과정은 paired t-text로 유의성을 검정하였고 two-tailed p value가 0.05미만시 유의한 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 실험결과

모든 동물에서 기록한 굴근반사 및 척수 후각세포의 활성도는 이미 알려진대로 (한용표 등, 1980; 정진모등, 1981; 백광세등, 1981; Chung등, 1983) latency가 다른 2개의 성분 즉 빠른 성분 (A-fiber response)과 느린 성분 (C-fiber response)으로 나타남을 볼 수 있었으며 대표적인 굴근반사 기록의 한 예를 그림1에 도시하였다. 본 실험에서는 이미 알려진대로 통각과 관계가 있는 느린성분만을 선택하여 결과를 분석하였다.

1. 말초신경자극이 굴근반사에 미치는 효과

제뇌 및 척수고양이에서 굴근반사의 기록에 사용된 척수전근의 운동신경의 축삭은 각각 8 및 9 unit였으며 그중 일례를 그림 2에 도시하였다. 그림 3에 도시한 바와 같이 제뇌 및 척수고양이에서 말초신경자극 후 굴근반사의 평균치 (±표준오차)는 자극전 값(대조치)의 각각 45.0±10.4 및 32.3±6.0%로서 현저한 감소 ($p<0.05$)를 보여 진통효과를 나타내었

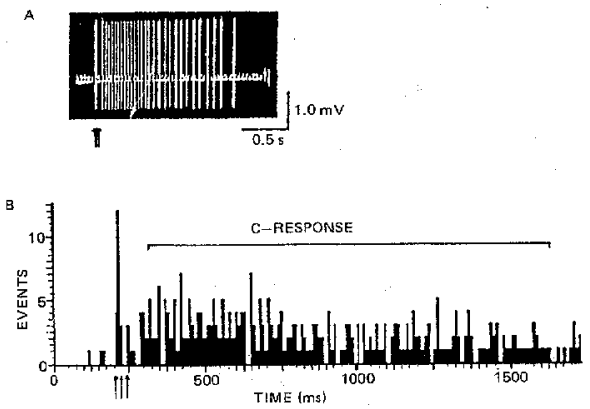

Fig. 1. The flexion reflex elicited by electrical nerve stimulation. Recordings were made from filaments of ventral roots containing a single active motor axon while applying electrical stimuli to the ipsilateral common peroneal nerve. Three consecutive electrical pulses (10mA, 500 μsec duration) were applied at the times indicated by arrows. A; Spikes were photographed on the oscilloscope face. B; Poststimulus time histogram shows C-response of flexion reflex. C-response was elicited by stimulation of common peroneal nerve at suprathreshold intensity for C fibers. The histoprogram was compiled from responses to 10 succesive stimuli, and bin widths are 10 msec.

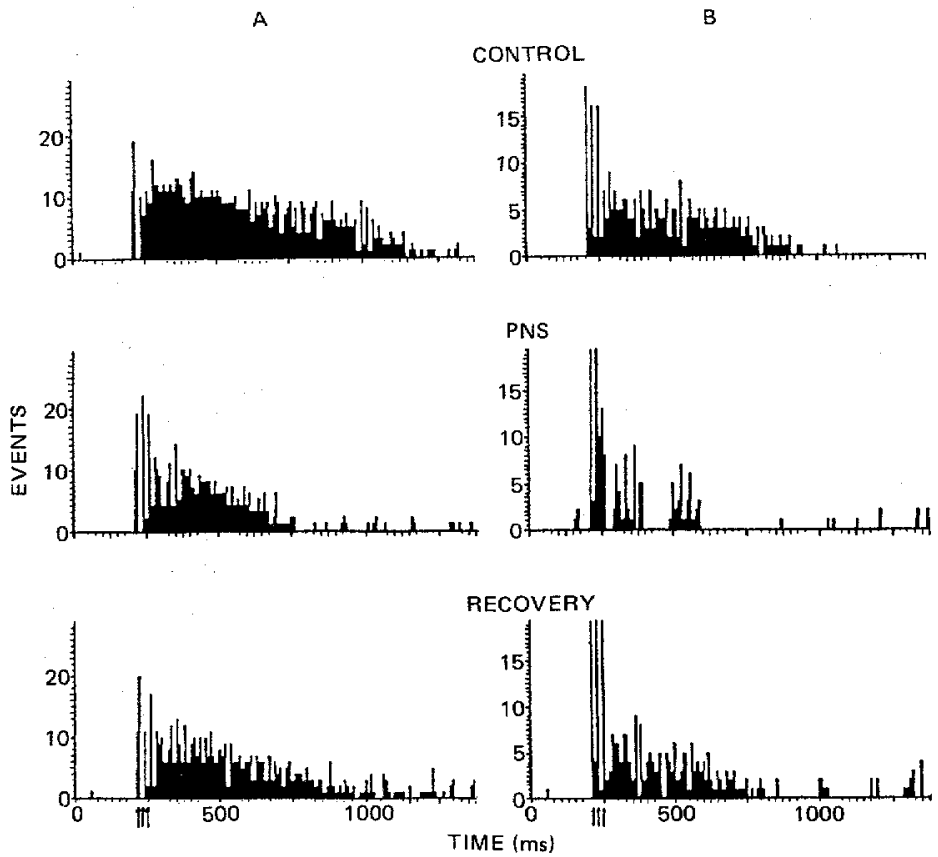

Fig. 2. Effects of peripheral nerve stimulation on flexion reflex. A is poststimulus time histogram obtained from the decerebrate cat, and B is from the spinal cat. Inhibition of the flexion reflex was shown by tibial nerve stimulation with 10 mA intensity, 500 μsec duration at 2Hz for 30 min. The upper histogram represents control before peripheral nerve stimulation, middle histogram immediately after peripheral nerve stimulation and lower histogram 15 min after stimulation.

으며 양군간의 차이는 없었다. 말초신경자극의 진통효과는 시간이 경과함에 따라 감소되어 자극전 값으로 회복되는 경향을 보였는데 회복 5분경에는 양군에서 각각 69.7±4.6 및 63.5±6.3%로서 의의있는 진통효과를 보였고 15분경에는 약 80%정도까지 회복되었으며 30분경에는 각각 95.8±8.3 및 94.5±5.6%로 자극전 값으로 회복됨을 알 수 있었다. 즉 말초신경자극의 진통효과는 양군에서 공히 15분까지는

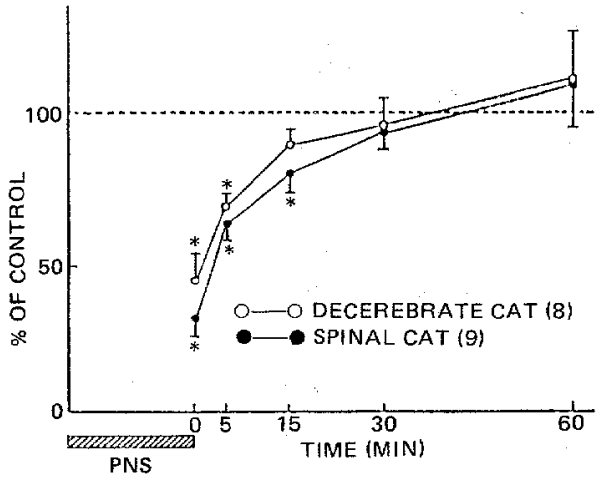

Fig. 3. Time course of inhibition of flexion reflex by peripheral nerve stimulation in decerebrate and spinal cats. The flexion reflex was recorded at 0, 5, 15, 30 and 60 min after peripheral nerve stimulation.
( ) represents numbers of measured single units.
PNS; peripheral nerve stimulation
*; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value before PNS)

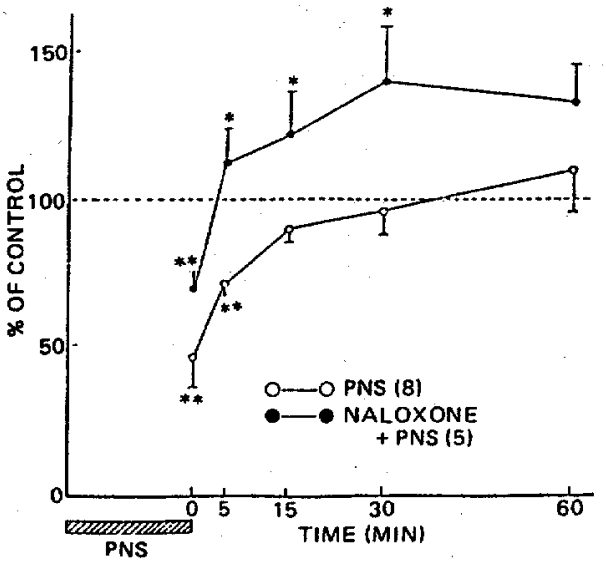

Fig. 4. Effect of naloxone on inhibition of the flexion reflex by peripheral nerve stimulation in the decerebrate cats. Naloxone was administrated intravenously (0.05 mg/kg) 5 min before the end of peripheral nerve stimulation. Less inhibition of flexion reflex was observed by naloxone administration.
( ) represents numbers of measured single units.
PNS; peripheral nerve stimulation
*; $P<0.05$ (compared with groups with naloxone)
**; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value)

지속됨을 볼 수 있었으며 제뇌고양이나 척수고양이에서 동일한 양상을 보인것으로 보아 말초신경자극의 진통작용은 척수 수준에서 이루어짐을 알 수 있었다.

과거 본 교실에서 행한 실험이나 문헌상에 보고된 사실로 보아 말초신경자극의 진통효과는 중추신경내의 morphine-like substance를 매개로 나타냄이 알려지고 있다. 따라서 이를 확인코져 제뇌고양이에서 specific opiate antagonist인 naloxone을 말초신경 자극 기간중 끝나기 5분전에 정맥내에 투여하여 말초신경자극 효과를 관찰하였다. 그림 4에 도시한 바와 같이 naloxone 투여 (5unit)는 말초신경자극 직후 진통효과 (대조치의 68.8±6.3%, $p<0.05$)를 보였지만 회복 5분경에는 자극전 값의 112.6±12.8%로써 완전회복은 물론 오히려 overshoot되는 현상을 보였다. 이와같은 현상은 30분이상 지속되었으며 naloxone 비투여군과 비교하였을 경우 의의있는 차이 ($p<0.05$)를 보였다. 즉 말초신경자극의 진통작용은 morphine-like substance를 매개로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

2. 말초신경자극이 척수후각세포의 활성도에 미치는 영향

이미 기술한대로 굴근반사가 동통반응의 대표적인 지표로 이용되고 있지만 말초로부터 직접 구심성섬유를 받고 있는 척수후각에서 동통자극에 반응을 보이는 척수세포의 활성도를 기록함은 동통연구의 한 방편이 될 수 있다. 따라서 본 실험에서도 말초신경의 자극효과를 기록하고 이를 척수운동 신경세포의 축삭에서 기록한 굴근반사의 성적과 비교하여 보았다. 척수후각세포의 활성도는 굴근반사의 경우와 마찬가지로 이미 실험방법에서 기술한대로 전기자극으로 유발시켰으며 그중 한예를 그림 5에 도시하였다.

제뇌고양이에서 기록한 척수후각세포는 전부 8개였으며 이들 세포의 말초수용야 (peripheral receptive field)에 가해진 기계적자극 (brush, pressure 및 squeeze)에 대한 반응에 따라 세포의 유형 (cell type)을 결정하였는데 전부 wide dynamic range (WDR)에 속하는 신경세포들로서 동통전달에 관여하는 세포들이었다.

그림 6에 표시한 바와 같이 척수후각세포의 말초신경자극직 후 및 5분경에 활성도는 대조치의 32.0±7.4 및 65.4%로써 의의있는 진통효과 ($p<0.05$)를

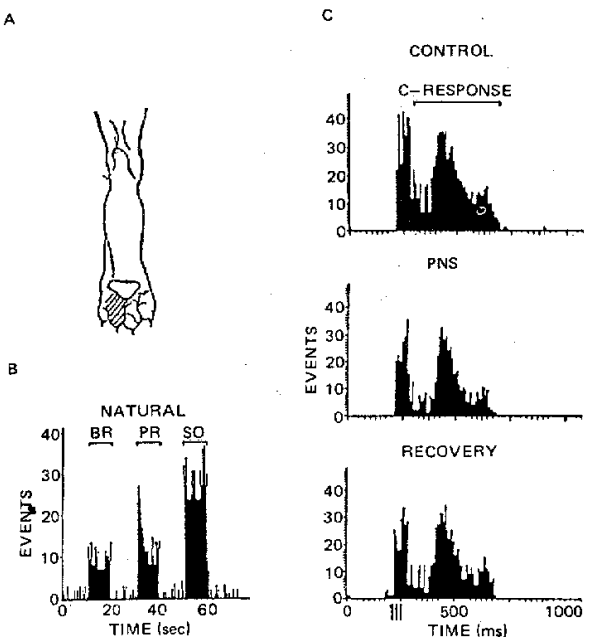

Fig. 5. Effect of peripheral nerve stimulation on the activity of dorsal horn cell in the decerebrate cat. The site of recording was left L_7 dorsal horn and the depth from dorsal surface was 1750 μm. A; Peripheral receptive field was indicated by the shaded area. B; Single pass peristimulus time histogram from the responses of the cell to graded mechanical stimuli is shown. This cell responded to both innocuous (brush and pressure) and noxious (squeeze) mechanical stimuli applied to the receptive field. The bin widths were 200 msec. C; Post-stimulus time histogram represents the effect of tibial nerve stimulation on the activity of dorsal horn cell evoked by electrical stimulation of common peroneal nerve. The upper histogram represents the activity of dorsal horn cell before peripheral nerve stimulation. The bracket indicated represents the activity evoked by C-fibers (C-response). Immediately after peripheral nerve stimulation C-response show 63.0% of pre-stimulus value (middle histogram), 78% at 15 min after peripheral nerve stimulation (lower histogram).

보였고 자극후 15분경부터는 자극전의 값으로 회복됨을 볼 수 있었으며 굴근반사의 성적과 유사함을 알 수 있었다. 즉 말초신경자극의 진통효과는 척수의 운동신경세포 및 동통에 반응을 보이는 척수후각세포에서 모두 동일하게 나타남을 볼 수 있었다.

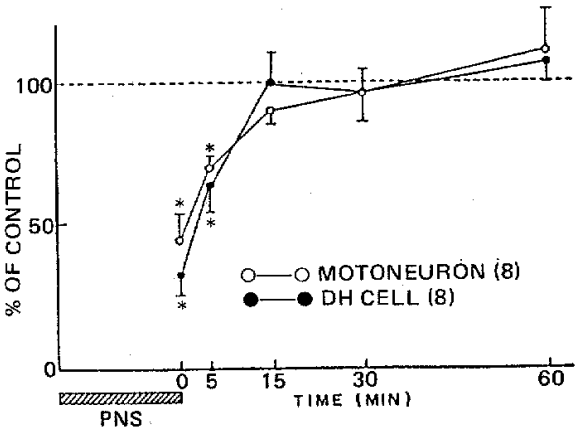

Fig. 6. Time course of inhibition of activity of the dorsal horn cell and motoneuron in the decerebrate cats. These dorsal horn cells belonged to wide dynamic range cell and the values of motoneuron represent the activity of the flexion reflex.
( ) represents numbers of measured single units.
DH cell; dorsal horn cell
*; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value before PNS)

3. D-phenylalanine투여가 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향

실험고양이에서 carboxypeptidase 억제제인 D-phenylalanine투여가 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향을 굴근반사와 척수후각세포의 활성도를 기록함으로써 관찰한 결과를 그림 7, 8, 9에 도시하였다.

제뇌 (그림 7) 및 척수고양이 (그림 8)에서 D-phenylalanine투여 후 말초 신경자극이 굴근반사에 미치는 효과는 자극전 값의 51.0±14.8 및 35.6±7.8%로써 의의있게 감소되어 진통효과 ($p<0.05$)를 보였지만 D-phenylalanine 비투여군과는 차이가 없었다. 말초신경자극 후 회복 5분경에 굴근반사의 값은 제뇌 및 척수고양이에서 각각 대조치의 84.8±11.7 및 79:2±12.8%로써 자극전 값과 비교하였을 경우 낮았지만 통계학적으로 의의있는 차이는 보이지 않았으며 오히려 D-phenylalanine 비투여군보다도 빨리 회복되어 진통효과가 소실되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 양상은 제뇌동물의 척수후각세포에서 기록한 결과 (그림 9)에서도 동일하게 나타났다. 즉 D-phenylalanine 투여가 말초신경자극의 진통효과를 증대시키거나 오래 지속시키지 못함을 알 수 있었다.

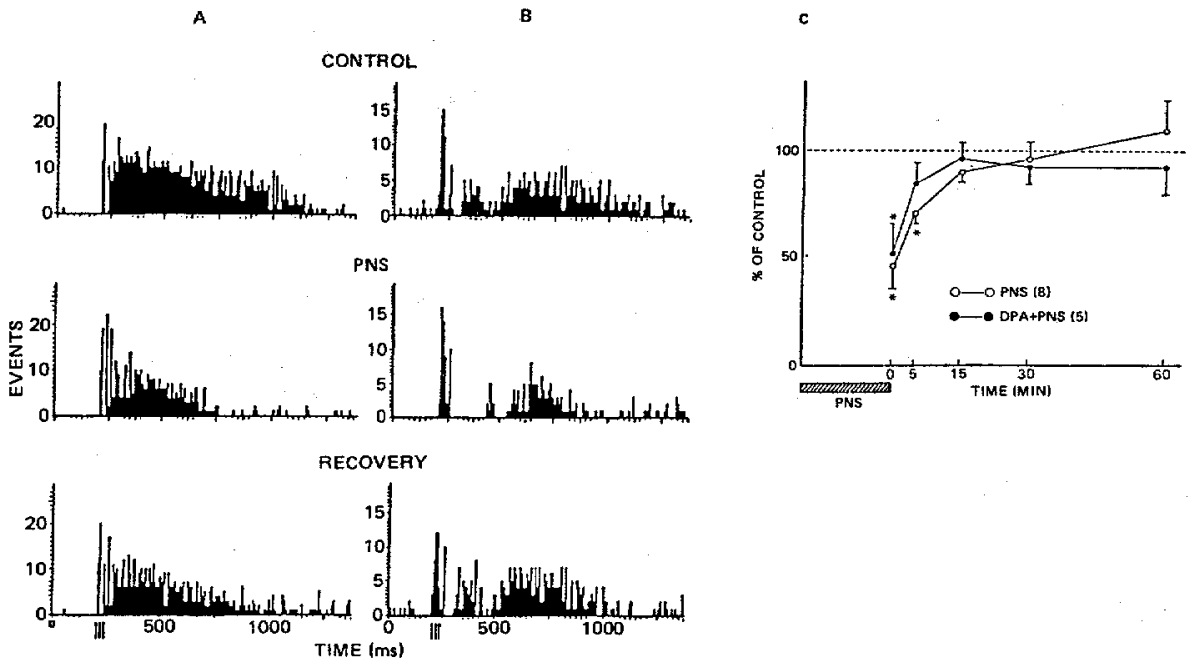

Fig. 7. Effect of D-phenylalanine on the inhibition of flexion reflex by peripheral nerve stimulation in the decerebrate cats. A ; The effect of peripheral nerve stimulation without DPA was shown. B ; The effect of peripheral nerve stimulation with DPA was shown. D-phenylalanine (250 mg/kg) was administrated intravenously 1 Hr before peripheral nerve stimulation. In A and B, the C-response of flexion reflex was 42.9% and 46.0% of pre-stimulus (control) value immediately after peripheral nerve stimulation for 30 min (middle histogram), and 65.6% and 95.6% at 15 min after peripheral nerve stimulation. C ; Time course of inhibition of flexion reflex by peripheral nerve stimulation shows no statistically significant differences between two groups.
( ) represents numbers of measured single units.
PNS ; peripheral nerve stimulation
DPA : D-phenylalanine
* ; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value before PNS)

Ⅳ. 고 찰

1910년 Sherrington이 굴근반사는 동통자극에 대하여 자신을 보호하려는 도피반사로 나타나는 중추반사임을 보고한 이래, 이에 대한 많은 신경생리학적 연구가 수행되어 왔다. 특히 한용표등 (1980)과 Chung등 (1983)은 실험 고양이에서 굴근반사의 반사궁 및 특성을 전기생리학적인 방법으로 자세히 분석하여 동통반사임을 증명하고 실험동물에서 진통효과를 관찰하는데 굴근반사가 객관적인 동통의 지표로 이용될 수 있음을 확인하였다. 고양이 하지에서 굴근반사를 유발, 기록할 경우 한용표등 (1980)과 Chung등 (1983)의 방법간에는 약간의 차이가 있다. 즉 한용표등 (1980)은 하지의 sural nerve를 전기자극할 때 유발되는 굴근반사를 동측의 굴근인 posterior biceps femoris근에 분포하는 운동신경에서 복합활동전압 (compound action potential)을 기록하였으나 Chung등 (1983)은 이 방법을 좀 더 개선하여 하지의 총비골신경 또는 경골신경을 전기자극할 때 동측의 L_7 혹은 S_1 척수전근의 운동신경축삭에서 단일신경섬유의 활동전압 (single unit activity)을 기록하였는데 이 방법은 단일신경섬유 활동전압이라는 점과 동일 실험동물에서 몇개의 unit를 쉽게 선택 기록할 수 있는 이점이 있기 때문에 본 실험에서도 후자의 방법을 택하였다. 굴근반사는 latency가 다른 두성분 즉 $A\beta$와 $A\delta$ 구심섬유에 의해 전도되는 빠른 성분 (early component)과 C 구심섬유에 의해 전도되며 비교적 오래 지속되는 느린 성분 (late component)으로 나타나는데 (한용표등, 1980 ; Chung 등, 1983), 두성분중 느린성분이 통각에 민감하므로 본실험에서도 느린 성분만을 선택, 분석하여 동통의 지표로 삼았다. 실험동물에서 또 다른 통각

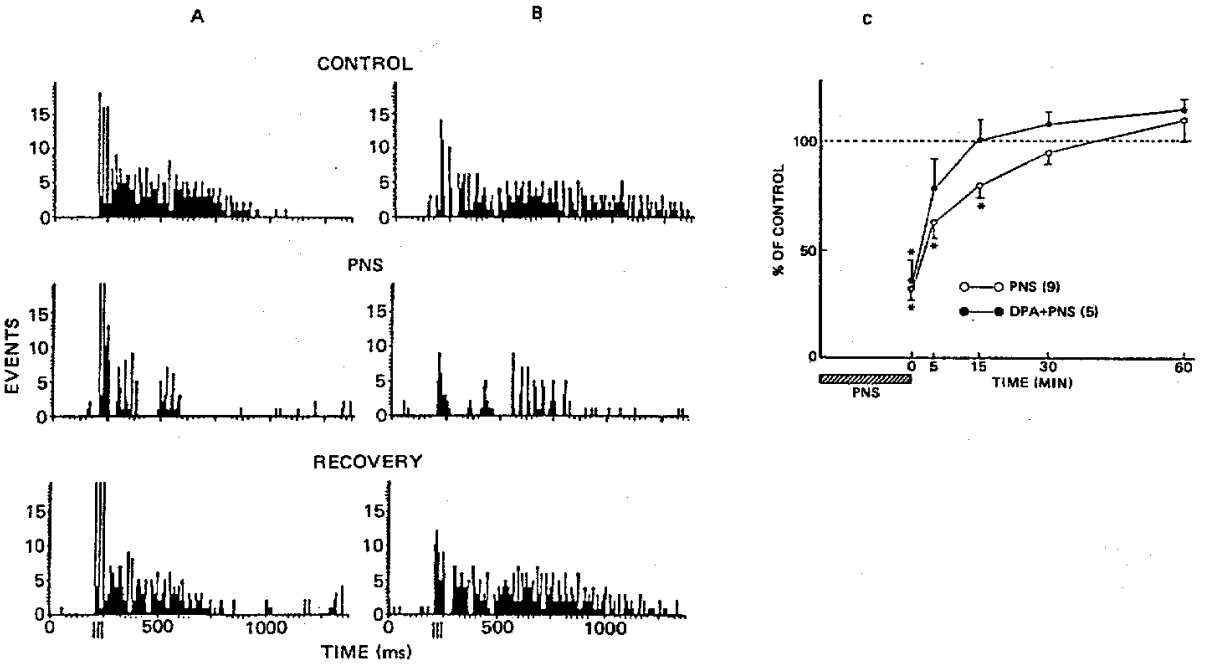

Fig. 8. Effect of D-phenylalanine on the inhibition of flexion reflex by peripheral nerve stimulation in the spinal cats. A; The effect of peripheral nerve stimulation without DPA was shown. B; The effect of peripheral nerve stimulation with DPA was shown. D-phenylalanine (250 mg/kg) was administrated intravenously 1 Hr before peripheral nerve stimulation. In A and B, the C-response of flexion reflex is 33.5% and 38.1% of pre-stimulus (control) value immediately after peripheral nerve stimulation for 30 min (middle histogram), and 73.5% and 108.3% at 15 min after peripheral nerve stimulation. C; Time course of inhibition of flexion reflex by peripheral nerve stimulation shows no statistically significant differences between two groups.
( ) represents numbers of measured single units.
PNS; peripheral nerve stimulation
DPA; D-phenylalanine
*; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value before PNS)

의 지표로는 척수후각에서 통각에 반응을 보이는 신경세포의 활성도를 기록함으로써 이에 미치는 영향을 관찰하는 방법이 있으며, 가장 좋은 방법은 통각의 대표적인 중추전달 신경로인 척수시상로 (spinothalamic tract)나 척수망상로 (spinoreticular tract)의 신경세포의 활성도를 기록하는 것이다. 실제로 Chung등 (1984)은 원숭이에서 척수시상로의 신경세포활성도를 기록하고 이에 미치는 말초신경자극의 효과를 관찰하므로써 동통연구의 실험모델을 제시한 바 있다. 본 실험에서도 척수후각에서 통각에 반응을 보이는 세포들을 찾아 그 활성도를 기록하여 굴근반사의 성적과 상호 비교하여 보았는데 제뇌 및 척수고양이를 사용하였기 때문에 이들 세포들이 통각의 중추전달 신경로의 기시세포 (tract cell)인지는 확인할 수 없었다.

동물을 대상으로 한 진통효과에 대한 연구에 있어서 가장 큰 문제는 마취제의 사용인데 최근 Paik등 (1989)은 실험고양이에 있어서 흔히 사용되는 sodium pentobarbital은 특히 굴근반사의 경우 느린 성분을 예민하게 억제시킴으로써 이 약물 사용시 굴근반사의 기록을 불가능케 한다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 약물 마취시 마취약물이 굴근반사에 미치는 영향을 배제하고 비마취 상태를 유지하기 위하여 제뇌동물을 사용하였다. 제뇌는 양측 총경동맥과 뇌저동맥을 결찰하므로써 유발시켰는데 이 경우 뇌교의 하부 1/3 이상의 중추신경계에 혈액순환이 차단되는 것으로 알려졌다 (Frantzen과 de Fine Olivarius, 1957).

본 실험에서는 침술 대신 electroacupuncture의 변형된 형태로 직접 말초신경을 전기자극하였으며 자극의 parameter는 높은 자극강도 (C 구심섬유의 역치자극 이상의 강도)와 저빈도 (2Hz)로 30~45분간

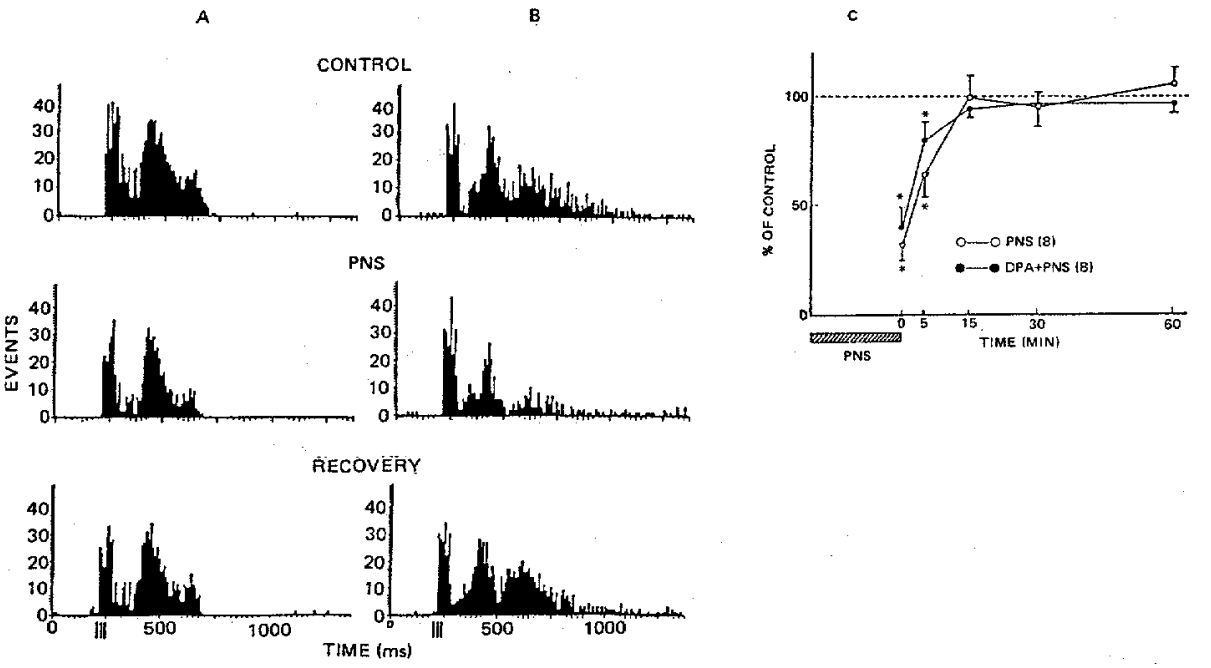

Fig. 9. Effect of D-phenylalanine on the inhibition of activity of the dorsal horn cell by conditioning peripheral nerve stimulation in the decerebrate cats. A ; The effect of peripheral nerve stimulation without DPA was shown. B ; The effect of peripheral nerve stimulation with DPA was shown. D-phenylalanine (250 mg/kg) was administrated intravenously 1 Hr before peripheral nerve stimulation. In A and B, the C-response of dorsal horn cell is 63.0% and 50.4% of pre-stimulus (control) value immediately after peripheral nerve stimulation for 30 min (middle histogram), and 78.0% and 110.0% at 15 min after peripheral nerve stimulation. C ; Time course of inhibition of dorsal horn cell activity by peripheral nerve stimulation shows no statistically of dorsal horn cell activity by peripheral nerve stimulation shows no statistically significant differences between two groups.
( ) represents numbers of measured single units.
PNS ; peripheral nerve stimulation
DPA : D-phenylalanine
*; $P<0.05$ (compared with pre-stimulus value before PNS)

자극하였는데 이는 가장 효과적으로 진통효과를 유발하기 위함이었다 (백광세등, 1981 ; Chung등, 1983 ; Paik등, 1988). 본실험에서 말초신경의 전기자극은 굴근반사를 현저히 감소시켜 진통효과를 나타냈으며 이 효과는 15분 이상 지속되었고 (그림 3), 또한 naloxone에 의해 진통효과가 소실됨 (그림 4)을 볼 수 있었는데 이는 백광세등 (1981)과 Chung등 (1983)의 실험결과와 일치한다. 즉 높은 강도나 저빈도의 말초신경자극은 비교적 오래 지속되며 naloxone에 의해 소실되는 진통작용 (naloxone reversible analgesia)이 있음을 확인할 수 있었다. 이는 말초신경자극이 이미 서론에서 기술한 대로 중추신경계에 존재하는 endogenous opiate system을 활성화시켜 그 작용을 나타낼 것으로 생각되는 바 사람에서 electroacupuncture 시행 후 뇌척수액 내의 endorphin함량이 증가한다는 사실 (Sjölund등, 1977)이나 척수고양이에서 말초신경자극시 척수에서 methionine-enkephalin의 immunoreativity를 갖고 있는 물질이 유리됨을 관찰한 보고 (Yaksh와 Elde, 1981)는 이를 증명하는 것이라 하겠다.

말초신경자극의 진통효과에 대한 naloxone 실험에서 백광세등 (1981)과 Chung등 (1983)은 말초신경자극 후 naloxone을 투여하고 5분 후부터의 효과를 관찰하였으나 본 실험에서는 말초신경자극 기간 중 끝나기 5분전에 naloxone을 투여하였다. 이는 그림 3에서 보는 바와 같이 말초신경자극의 굴근반사 억제효과가 자극이 끝난 후 5분 경에는 상당히 회복되기 때문에 이러한 효과를 배제하기 위함이었다. Naloxone을 말초신경자극 중에 미리 투여했음에도 불구하고 굴근반사는 말초신경자극직 후 그 정도는 nalox-

one 비투여군에 비해 적었으나 의의있는 감소를 보여 진통효과를 나타내었다. 이는 말초신경 자극에 의한 진통효과에 non-opiate related analgesia가 일부 관여할 가능성을 나타내는 것으로 추후 연구되어야 할 문제로 생각된다. Naloxone 투여시 말초신경 자극 후 5분경 부터는 굴근반사가 대조치보다 높게 overshoot되는 현상을 볼 수 있었다. 이는 spontaneous하게 분비되어진 opiate peptide와 말초신경 자극에 의해 분비되어진 opiate peptide 모두에 대해서 naloxone이 작용하여 나타난 결과 (Chung등 1983)이거나 또는 non-opiate related analgesia의 회복효과와 naloxone에 의한 opiate related analgesia의 억제효과가 동시에 복합되어 나타난 결과라고 추측된다.

제뇌 및 척수고양이에서 말초신경자극이 굴근반사를 동일한 정도로 억제시켜 진통효과를 보인것 (그림 3)은 말초신경자극의 진통작용부위가 척수 수준이었음을 의미하는 것이다. 말초신경자극의 진통작용부위에 대해서는 여러가지 주장이 있는데 Pomeranz와 Chiu (1976)는 뇌하수체가, 그리고 Du와 Chao (1976), Kerr등 (1978)과 Takeda등 (1979)은 중뇌등 뇌간이 존재해야만 진통효과가 있다고 하였으나 Woolf등 (1980)과 Yaksh와 Elde (1981)는 척수동물에서도 말초신경자극시 진통효과를 관찰할 수 있었다. 이들 연구자들의 공통점은 상기 부위들이 endogenous opiate system과 연관된 부위란 점이며 말초신경자극이 naloxone reversible analgesia임을 감안할 때 이들의 연구결과에 이론이 있을 수 없으나 상이한 연구결과가 나타난 것은 아마도 말초신경자극시의 자극 강도에 차이가 있기 때문으로 생각된다. Takeda등 (1979)은 중뇌동물에서 자극강도를 굵은 A 섬유가 활성화될 정도의 낮은 강도로 자극하였지만 Yaksh와 Elde (1981)는 척수동물에서 높은 강도로 자극해야만 opiate peptide가 유리되는 것을 관찰할 수 있었다. Chung등 (1983)도 제뇌 및 척수고양이에서 가는 섬유인 Aδ 및 C 섬유가 활성화되는 높은 강도로 자극하여 본 실험 결과와 동일한 성적을 얻은 바 있다. 한편 백광세등 (1983)은 제뇌고양이에서 항serotonin약물 (5, 6-dihydroxy-tryptamine)로 raphe-spinal serotonergic descending pain inhibitory system (Ruda와 Gobel, 1977; Messing과 Loy, 1977; Fields등, 1977; Fields와 Basbaum, 1978)을 파괴시킨 다음 본 실험에서와 같은 자극의 parameter로 말초신경자극을 시행하여 굴근반사에 미치는 영향을 관찰한 결과 naloxone에 의해 억제되는 진통효과를 볼 수 있었으나 그 정도는 대조군에 비해 의의있게 적게 나타남으로써 말초신경자극이 진통효과를 나타내기 위해서는 척수이상의 뇌간의 중요성을 강조하였다. 따라서 본 실험에서의 결과와 백광세등 (1983)의 차이점에 대해서는 추후 더 연구되어야 할 문제라고 생각된다.

본 실험에서는 말초신경자극이 통각에 반응을 보이는 척수후각세포의 활성도에 미치는 영향을 관찰하여 굴근반사의 성적과 비교하여 보았는데 그 결과는 서로 유사하였다 (그림 6). 최근 Paik등(1988)은 말초신경자극이 유해한 기계적 자극과 열 자극으로 유발되는 척수신경세포(척수운동세포와 통각에 반응을 보이는 척수후각세포)의 활성도에 미치는 영향을 관찰한 바 말초신경자극의 진통효과는 유해한 열자극에 대해서 가장 크게 나타났으며, 척수운동세포 즉 굴근반사의 경우가 척수후각세포의 경우 보다도 크게 나타났다. 따라서 실험고양이에서 말초신경자극의 진통효과를 관찰할 경우 유해한 열자극으로 유발시킨 굴근반사를 기록함이 가장 좋은 방법임을 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 굴근반사를 전기적으로 유발시켰기 때문에 이와 비교할 목적으로 척수후각세포의 활성도도 전기적으로 유발시켰으며 그 결과는 전술한 대로 양세포들 간에는 차이가 없었다.

이상의 결과에서 볼때 말초신경자극은 중추신경내의 endogenous opiate system을 활성화시켜 진통작용을 일으킴을 알 수 있다. 여기서 한가지 가설로써 endogenous opiate인 endorphin 및 enkephalin의 분해를 억제하므로써 이 peptide의 작용을 오래 지속시키거나 증대시켜 진통효과의 지속을 초래할 수 있을 것이라는 가정을 할 수 있다. Enkephalin은 체내에서 즉시 carboxypeptidase나 aminopeptidase에 의해 분해되어 비활성화 되는데 (Marks등, 1977) carboxypeptidase의 억제제로는 D-phenylalanine, hydrocinnamic acid, leucylvaline 등을 들 수 있다.

Ehrenpreis등 (1979)은 mice에서 hot plate test를 이용한 통각의 역치를 측정한 실험에서 D-phenylalanine투여가 naloxone에 의해 억제되는 진통효과가 있음을 관찰하고 D-phenylalanine은 enkephalin의 분해를 억제함으로써 진통작용을 나타낼 것이라는 상기의 가설을 처음으로 주장하였다. 그 후

Ehrenpreis등 (1980)은 만성통증환자에서 D-phenylalanine의 진통효과를 보고하였고 Hyodo등 (1983)은 인체에서 electroacupuncture와 D-phenylalanine을 동시에 병용하였을 때 진통효과가 electroacupuncture만을 단독으로 사용하였을 때 보다도 오래 지속됨을 보고하였다. 그 외에도 여러 연구자들에 의해 D-phenylalanine이 enkephalin의 분해를 억제하여 중추신경 내의 enkephalin 함량을 증가시켜 진통효과를 나타낼 것이라는 실험적 증거들을 제시하고 있다 (Cheng과 Pomeranz, 1980 ; Kitade등, 1981 ; Balagot등, 1983 ; Takeshige등, 1983 ; Xuan등, 1986). 그러나 D-phenylalanine의 진통효과에 대해서는 상기의 주장과 상반되는 보고들도 있다. 그 예로 D'Alessandro (1983)는 정상인을 대상으로, Walsh등 (1986)은 만성통증환자를 대상으로, 그리고 Halpern과 Dong (1986)은 원숭이를 대상으로 한 연구에서 D-phenylalanine은 진통효과가 없음을 관찰하고 D-phenylalanine이 중추신경 내에서 endogenous opiate 함량을 증가시켜 진통효과를 나타낼 가능성은 희박하다고 하였다.

이상과 같이 D-phenylalanine의 진통효과에 미치는 영향에 대해서는 서로 상반된 주장을 보이고 있는데, 특히 본 실험에서 말초신경자극의 진통작용부위가 척수수준이고 척수 내의 opiate system이 주로 enkephalin이 관여한다는 점 (Duggan등, 1976 ; Hökfelt등, 1977)을 생각할 때 enkephalin의 분해효소 억제제인 D-phenylalanine이 말초신경자극의 진통효과를 증대시키거나 오래 지속시킬 수 있는 지를 동물실험을 통해 객관적인 방법을 이용 확인하고자 본 실험을 시도하였다. 그 결과는 그림 7, 8, 9에서 보는 바와 같이 D-phenylalanine을 투여한 군에서 진통효과의 지속이나 증대를 확인할 수는 없었고 통계학적 의의는 없으나 D-phenylalanine을 투여한 군에서 오히려 진통효과가 빨리 소실되는 양상을 굴근반사 및 통각에 반응을 보이는 척수 후각세포 모두에서 발견할 수 있었다. D-phenylalanine의 투여량에 대해서는 아직 확실한 정설은 없으나 Ehrenpreis등 (1979) 및 Ehrenpreis (1985), Hyodo등 (1983)이 사용한 양에 비해 충분한 양을 투여하였음에도 불구하고 이상과 같은 결과를 얻은 것으로 보아 D-phenylalanine은 말초신경자극의 진통효과에는 아무런 영향도 미치지 못함을 알 수 있었다.

이와 같은 결과에 대해서 몇가지 가능성을 생각하여 볼 수 있다. 첫째, 본 실험에서 말초신경자극의 진통작용에 non-opiate related analgesia기전이 일부 관여할 가능성을 제시한 바 있는데 이 경우 D-phenylalanine의 진통효과는 없을 것이다. 둘째, 말초신경자극의 진통작용이 주로 중추신경내의 endogenous opiate system을 활성화시켜 나타난다고 하더라도 이 경우 D-phenylalanine의 작용기전이 문제가 될 수 있다. D-phenylalanine은 in vitro에서 carboxypeptidase의 억제제로 작용함이 확인되었지만 (Hartsuck 및 Lipscomb, 1971 ; Giusti등, 1985) in vivo에서의 작용여부는 아직도 논란이 많다. Zhao등 (1984)은 iontophoresis 방법으로 고양이의 척수후각에서 통각에 관여하는 WDR 세포에 enkephalin을 직접 투여한 결과 자발적 흥분 (spontaneous firing)과 아미노산으로 유발된 흥분이 억제되었지만 동시에 D-phenylalanine을 투여해도 enkephalin의 효과에는 아무런 영향도 미치지 못함을 관찰하고 D-phenylalanine은 in vivo에서 enkephalin의 분해를 억제하는 효과는 없다고 하였다. 이 경우 D-phenylalanine의 진통효과는 없을 것이다. 또한 D-phenylalanine이 in vivo에서 작용한다고 하더라도 D-phenylalanine의 작용강도 (potency)가 문제될 수 있는데 D-phenylalanine은 약한 carboxypeptidase의 억제제로 알려지고 있어 (Sullivan등, 1980) 그 효과는 적게 나타날 가능성이 있다. 한편 enkephalin의 분해과정에는 2가지 이상의 서로 다른 peptidase 효소들이 독립적으로 관여하는데 D-phenylalanine이 carboxypeptidase 이외의 다른 효소들의 작용을 억제하는지는 아직도 불분명하며 (Baume등, 1983), D-phenylalanine과 무관한 다른 효소들이 enkephalin의 분해에 관여할 가능성도 있다. 이상의 모든 경우 D-phenylalanine의 진통효과는 극히 적거나 안나타날 것으로 추측된다.

본 실험을 통해서 말초신경자극이 endogenous opiate system을 활성화시켜 진통효과를 나타냄을 확인할 수 있었지만 D-phenylalanine이 endogenous enkephalin의 분해를 억제하므로써 enkephalin의 함량을 증가시켜 말초신경자극의 진통효과를 더욱 증대시키거나 오래 지속시킬 수 있다는 가정은 증명할 수 없었다. 그러나 일부 연구자들의 성적과 상이한 것으로 보아 D-phenylalanine의 작용기전은 좀 더 추구해야 될 문제라 생각된다.

V. 결 론

제뇌 및 척수고양이에서 굴근반사 및 통각과 관련된 척수후각세포의 활성도를 동통의 지표로 삼아 D-phenylalanine투여가 말초신경자극의 진통효과에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제뇌 및 척수고양이에서 말초신경자극은 굴근반사를 의의있게 감소시켜 진통효과를 보였으며 그 효과는 평균 15분정도 지속되었고 양군간의 차이는 없었다.

2. Naloxone을 투여한 제뇌고양이에서 말초신경자극은 굴근반사를 감소시켜 진통효과를 보였으나 그 효과는 곧 소실되어 말초신경자극의 진통작용이 naloxone reversible analgesia임을 확인할 수 있었다.

3. 제뇌고양이에서 말초신경자극은 통각과 관련된 척수후각세포의 활성도를 억제시킴으로써 진통효과를 보였으며 그 효과는 굴근반사에서의 결과와 유사하였다.

4. D-phenylalanine을 투여한 실험고양이에서 말초신경자극은 진통효과를 보였으나 대조군에 비해 오히려 빠른 회복을 보였다. 즉 D-phenylalanine 투여는 말초신경자극의 진통효과를 증대시키거나 오래 지속시키지는 못하였다.

이상의 결과로 보아 말초신경자극의 진통작용은 척수수준에서 나타남을 알 수 있었으며 naloxone-reversible analgesia임을 확인할 수 있었다. 그러나 carboxypeptidase의 억제제인 D-phenylalanine이 endogenous opiate의 분해를 억제함으로써 말초신경자극의 진통효과를 증대시킬 수 있을 가능성은 증명할 수 없었으며 D-phenylalanine의 작용기전은 좀 더 추구해야 될 과제라 생각된다.

REFERENCES

백광세, 정진모, 남택상, 강두희(1981) : 말초신경자극이 동통반응에 미치는 영향. 대한생리학회지 15 : 73－81

백광세, 남택상, 박경숙, 강두희(1983) : 항serotonin 약물이 electroacupuncture의 진통효과에 미치는 영향. 연세의대논문집 16 : 55－69

정진모, 백광세, 남택상, 김인교, 강두희(1981) : Morphine이 굴근반사(Flexion Reflex)에 미치는 영향. 대한생리학회지 15 : 67－71

한용표, 이헌재, 정진모, 백광세, 남택상(1980) : 굴근반사의 증추반사궁에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집 13 : 231－242

Andersson SA, Eriksson T, Holmgren E, Lindquist G(1973) : *Electroacupuncture : effect on pain threshold measured with electrical stimulation of teeth. Brain Res 63 : 393–396*

Balagot R, Ehrenpreis S, Kubota K, Greenberg J(1983) : *Analgesia in mice and humans by D-phenylalanine : relation to inhibition of enkephalin degradation and enkephalin levels. Advances in pain research and therapy, vol. 5, pp 289–293, edited by Bronica JJ et. al. Raven Press, New York*

Baume S, Yi CC, Schwartz JC, Chaillet P, Marcais Collado H, Costentin J(1983) : *Participation of both enkephalinase and aminopeptidase activities in metabolism of endogenous enkephalins. Neurosci 8 : 143–151*

Chan SHH, Fung SJ(1975) : *Supression of polysynaptic reflex by electroacupuncture and a possible underlying presynaptic mechanism in the spinal cord of the cat. Exp Neurol 48 : 336–342*

Chang H(1979) : *Acupuncture analgesia today. Chin Med J 92 : 7–16*

Cheng RSS, Pomeranz B(1980) : *A combined treatment with D-aminoacids and electroacupuncture produces a greater analgesia than either treatment alone ; naloxone reverses these effects. Pain 8 : 231–236*

Chiang CY, Chang CT, Chu HZ, Yang LF(1973) : *Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. Scientia Sinica 16 : 210–217*

Chung JM, Fang ZR, Cargill CL, Willis WD(1983) : *Prolonged, naloxone-reversible inhibition of the flexion reflex in the cat. Pain 15 : 35–53*

Chang JM, Fang ZR, Hori Y, Lee KH, Willis WD (1984) : *Prolonged inhibition of primate spinothalamic tract cells by peripheral nerve stimulation. Pain 19 : 259–275*

Croze S, Antonietti C, Duclaux R(1976) : *Changes in burning pain threshold induced by acupuncture in man. Brain Res 104 : 335–341*

D'Alessandro R(1983) : *D-phenylalanine does not affect nociceptive, flexion reflex thresholds in normal human. Anesth Analg 62 : 857–858*

Du H, Chao Y(1976) : *Localization of central structures involved in descending inhibitory effect of acupuncture on viscero-somatic reflex discharges. Scientia Sinica 19 : 137–148*

Duggan AW, Hall JG, Headley PM(1976) : *Morphine, enkephalin and substantia gelatinosa. Nature 264 : 456–464*

Ehrenpreis S, Balagot RC, Comaty JE, Myles SB(1979) : *Naloxone reversible analgesia in mice produced by D-phenylalanine and hydrocinnamic acid inhibitors of carboxypeptidase A. In : Advances in pain research and therapy vol. 3, pp 479–488, edited by Bronica JJ et. al. Raven Press, New York*

Ehrenpreis S, Balagot RC, Myles SB, Advocate C, Comaty JE(1980) : *Further studies on the analgesic activity of D-phenylalanine in mice and humans. In : Endogenous and exogenous opiate agonist and antagonists. edited by Way EL, pp 379–382, Pergamon Press, Elmsford, New York*

Ehrenpreis S(1985) : *Analgesic properties of enkephalinase inhibitors : animal and human studies. Prog Clin Biol Res 192 : 363–370*

Fields HL, Basbaum AI(1978) : *Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. Ann Rev Physiol 40 : 217–223*

Fields HL, Basbaum AI, Clanton CH, Andersson SD(1977) : *Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. Brain Res 126 : 441–449*

Fleck H(1975) : *Acupuncture and neurophysiology. Bull N Y Acad Med 51 : 903–913*

Frantzen E, de Fine Olivarius B(1957) : *On thrombosis of the basilar artery. Acta Psychial Neurol Scand 32 : 431–442*

Giusti P, Carrara M, Cima L, Borin G(1985) : *Antinociceptive effect of some carboxypeptidase A inhibitors in comparison with D-phenylalanine. European J Pharmacol 116 : 287–292*

Halpern LM, Dong WK(1986) : *D-phenylalanine : a putative enkephalinase inhibitor studied in a primate acute pain model. Pain 24 : 223–237*

Hartsuck JA, Lipscomb WN(1971) : *Carboxypeptidase A. In : The enzymes, edited by Boyer PD. pp 10–18, Academic Press, New York*

Hokfelt T, Jung L, Terenius L, Elde R, Nilsson G(1977) : *Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia : enkephalin and substance P. Proc Natl Acad Sci 74 : 3081–3085*

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Forthergill LA, Morgan BA, Morris HR(1975) : *Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258 : 577–579*

Hyodo M, Kitade T, Hosoka E(1983) : *Study on the enhanced analgesic effect induced by phenylalanine during acupuncture analgesia in humans. Advances in pain research and therapy, Vol. 5, edited by Bronica JJ et. al. pp 577–582, Raven Press, New York*

Kerr FWL, Wilson PR, Nijensohn DE(1978) : *Acupuncture reduces the trigeminal evoked response in decerebrate cats. Exp Neurol 61 : 45–84*

Kitade T, Minamikawa M, Nawata T, Shinohara S, Hyodo M, Hosoya E(1981) : *An experimental study on the enhancing effects of phenylalanine on acupuncture analgesia. Am J Chin Med 9 : 243–248*

Levy B, Matsumoto T(1975) : *Pathophysiology of acupuncture : nervous system transmission. Am Surg 4 : 378–384*

Liebeskind JC, Guilbaud G, Besson JM, Oliveras JL(1973) : *Analgesia from electrical stimuli of the periaquenductal gray matter in the cat : behavioral observations and inhibitory effect on spinal cord interneurons. Brain Res 50 : 441–446*

Marks N, Grynbaum A, Neidle A(1977) : *On the degradation of enkephalins and endorphin by rat and mouse brain extracts. Biochem biophys Res Commun 74 : 1552–1559*

Mayer DJ, Price DD, Rafil A(1977) : *Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. Brain Res 121 : 368–372*

Meek, JL, Yang HYT, Costa E(1977) : *Enkephalin catabolism in vitro and in vivo. Neuropharmacology 16 : 151–154*

Messing RB, Loy LD(1977) : *Serotonin-containing neurons : Their possible role in pain and analgesia. Pain 4 : 1–17*

Paik KS, Nam SC, Chung JM(1988) : *Differential inhibition produced by peripheral conditioning stimulation on noxious mechanical and thermal responses of different classes of spinal neurons in the cat. Exp. Neurology 99 : 498–511*

Paik KS, Nam SC, Chung JM (1989) : *Different classes of cat spinal neurons display differential sensitivity to*

sodium pentobarbital. J Neurosci Res 23 : 107–115

Pomeranz B, Cheng R, Law P(1977) : *Acupuncture reduces electrophysiological and behavioral responses to noxious stimuli : pituitary is implicated. Exp Neurol 54 : 172–178*

Pomeranz B, Chiu D(1976) : *Naloxone blokade of acupuncture analgesia : endorphin implicated. Life Sci 19 : 1757–1762*

Ruda MA, Gobel S(1977) : *EM autoradiographic localization of indoleaminergic axonal endings in trigeminal nucleus caudalis. Neurosic Abstr 3 : 491–502*

Sherrington CS(1910) : *Flexion reflex of the limb, crossed extension reflex, and reflex stepping and standing. J Physiol 40 : 28–121*

Simantov R, Goodman R, Aposhian D, Snyder SH(1976) : *Phylogenetic distribution of a morphine-like peptide 'enkephalin'. Brain Res 111 : 204–211*

Sjolund B, Terenius L, Eriksson M(1977) : *Increased cerebrospinal fluid levels of endorphins after electroacupuncture. Acta Physiol Scand 100 : 382–384*

Sullivan S, Akil H, Blacker D, Barchas JD(1980) : *Enkephalin selective inhibitors and partial characterization. Peptidase 1 : 31–35*

Takeda K, Taniguchi N, Kuriyama H, Matsushita A(1979) : *Experimental study on the mechanism of acupuncture anesthesia. In : Advances in pain research and therapy, vol. 3. edited by Bronica JJ et. al. pp 623–628, Raven Press, New York*

Takeshige C, Murai M, Tanaka M, Hachisu M(1983) : *Parallel individual variations in effectiveness of acupuncture, morphine analgesia, and dorsal PAG-SPA and their abolition by D-phenylalanine. Advances in pain research and therapy, vol. 5, pp 563–569, edited by Bronica JJ et. al. Raven Press, New York*

Toda K, Ichioka M(1978) : *Electroacupuncture : relations between forelimb afferent impulses and suppression of jaw-opening reflex in the rat. Exp Neurol 61 : 465–470*

Vierck CJ, Hamilton DM, Thornby JJ (1971) : *Pain reactivity of monkeys after lesions to the dorsal and lateral columns of the spinal cord. Exp Brain Res 13 : 140–148*

Walsh NE, Ramamurthy S, Schoenfield L, Hoffman J(1986) : *Analgesic effectiveness of D-phenylalanine in chronic pain patients. Arch Phys Med Rehabil 67 : 436–439*

Woolf CJ, Mitchell D, Barrett GD(1980) : *Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. Pain 8 : 237–252*

Xuan YT, Shi YS, Zhou ZF, Han JS(1986) : *Studies on the mesolimbic loop of antinociception-II. A serotonin-enkephalin interaction in the nucleus accumbens. Neuroscience 19 : 403–409*

Yaksh TL, Elde RP(1981) : *Factors governing release of methionine-enkephalin like immunoreactivity from mesencephalon and spinal cord of the cat in vivo. J Neurophysiol 46 : 1056–1075*

Zhang A, Pan X, Xu S, Cheng Y, Wanying M(1980) : *Endorphins and acupuncture analgesia. Chin Med J 93 : 673–680*

Zhao ZQ, Foong FW, Duggan AW(1984) : *Lack of interaction between methionine enkephalin and D-phenylalanine on nociceptive and non-nociceptive responses of dorsal horn neurons of the cat. European J Pharmacol 104 : 205–210*