Complete Freund Adjuvant에 의한 피부염증에서 통각과민현상의 기전

연세대학교 의과대학 생리학교실, *신경과학교실, †마취과학교실

정 용* · 임중우 · 정승수 · 김윤숙
윤덕미† · 남택상 · 백광세

= Abstract =

Mechanism of Hyperalgesia Following Cutaneous Inflammation by Complete Freund Adjuvant

Yong Jeong, M.D.*, **Joong Woo Leem**, Ph.D., **Seung Soo Chung**, M.D.
Yun Suk Kim, M.D., **Duck Mi Yoon**, M.D.†, **Taick Sang Nam**, M.D.
and **Kwang Se Paik**, M.D.

Departments of Physiology, *Neurology and †Anesthesiology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: After an injury to tissue such as the skin, hyperalgesia develops. Hyperalgesia is characterized by an increase in the magnitude of pain evoked by noxious stimuli. It has been postulated that in the mechanism of hyperalgesia (especially secondary hyperalgesia) and allodynia, a sensitization of central nervous system such as spinal dorsal horn may contribute to development of hyperalgesia. However, the precise mechanism is still unclear. In the present study, we investigated the roles of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor and nitric oxide (NO) system in the mechanism of hyperalgesia, and their relations with c-fos expression

Methods: Inflammation was induced by injection of complete Freund adjuvant (CFA) into unilateral hindpaw of Sprague-Dawley rat. Behavioral studies measuring paw withdrawal responses by von Frey filaments and paw withdrawal latencies by radiant heat stimuli and stainings of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase and c-fos immunoreactivity were performed. The effects of MK-801, an NMDA receptor blocker and N^{ω}-nitro-*L*-arginine (L-NNA), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor were evaluated.

Results: 1) Injection of CFA induced mechanical allodynia, mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia. And it increased the number of NADPH-diaphorase positive neurons and c-fos expression neurons. 2) MK-801 inhibited mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia induced by CFA and reduced the number of NADPH-diaphorase positive neurons and c-fos expression neurons. 3) L-NNA inhibited the thermal hyperalgesia and reduced the number of NADPH-diaphorase positive neurons, but did not affect the number of c-fos expression neurons.

Conclusions: These results suggest that in the mechanism of mechanical hyperalgesia, NMDA receptor but not NO-system is involved and in the case of thermal hyperalgesia both NMDA receptor and NO system are involved. NO system did not affect the expression of c-fos, but c-fos expression and NOS activity were dependent on the activity of NMDA receptor.

Key Words: Complete freund adjuvant. NMDA receptor. Nitric oxide. c-fos.

책임저자 : 남택상, 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 생리학교실, 우편번호: 120-752
Tel: 02-361-5202, Fax: 02-393-0203

서 론

피부 등의 말초조직 손상은 염증을 유발하고 이에 따라 통증이 유발된다. 이러한 경우를 염증성 통증이라 하며 염증성 통증의 경우 정상적인 상태에서의 통증과 달리 통각과민현상이 나타난다. 통각과민현상은 정상적인 통증자극에 대해 보다 강하게 통증을 느끼는 hyperalgesia와 무해성 자극이 통각으로 인식되는 allodynia (이질통)로 구분하기도 한다. 또한 이와 함께 자발적인 통증이 흔히 동반되며, 손상 부위 주위로 통각 부위가 확대되기도 한다.

통각과민은 통증이 전달되는 경로의 여러 부위에서 변화가 일어나 나타난다고 알려져 있다. 통각과민 현상이 손상 부위에 나타나는 경우를 1차 통각과민(primary hyperalgesia)이라 하는데 손상된 말초 조직에서 bradykinin, prostaglandin, K^+ 이온 같은 염증유발 물질의 유리나 부종 등에 의한 말초 통각수용체의 감작으로 설명이 가능하다. 그러나 이질통을 포함하여 통증이 손상 부위 주위에 나타나는 2차 통각과민(secondary hyperalgesia)의 경우 중추신경계의 변화가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉 지속적 통증에 의해 통증을 전달하는 Aδ나 C 일차 구심성 섬유의 말단에서 흥분성 아미노산(excitatory amino acid)과 신경펩타이드가 유리되고 이들의 작용에 의해 척수후각세포의 흥분성이 증가되는 가소성 변화(plastic change)가 나타나게 되어 통각과민이나 만성 통증으로 이행되게 된다[1].

통각과민현상을 일으키기 위해 실험적으로 화학물질을 이용한 방법들이 사용되고 있는데 complete Freund adjuvant (CFA), carrageenan, capsaicin, formalin 등을 랫드의 발바닥에 주사하면 홍반, 부종, 통각과민의 특징적인 염증반응이 유발되어 행동학적으로 통각과민이 나타나고 염증이 유발된 부위로부터 입력을 받는 척수후각세포의 흥분성이 증가된다.

지속적인 통증자극에 대한 반응의 증가현상을 'wind-up'이라 표현했는데 통각과민도 일종의 wind-up 현상이라 할 수 있으며 중추신경 내에서 이 기전에 관여하리라 생각되는 것이 흥분성 아미노산 수용체 중의 하나인 *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) 수용체로 생각하고 있다[2-5].

한편 NMDA 수용체 활성화에 의한 2차적 반응 중의 하나는 nitric oxide (NO)의 증가이며 이는 중추신경계에서 세포 사이의 신호전달에 중요한 역할을 한다[6-8]. NO는 불안정한 기체 형태의 물질로서 NMDA 수용체의 활성에 의해 증가된 calcium에 의해 활성화된 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 다른 보조 인자들을 이용하여 *L*-arginine으로부터 형성된다.

NOS가 존재하는 여러 조직중 신경계에 존재하는 NOS (neuronal NOS)가 분리되고 특성이 구명되었는데[8], 이의 항체를 이용한 척수 내의 분포를 확인한 결과 척수전각에는 존재하지 않고 척수후각과 중심관(central canal)주위에 주로 존재하여 감각전달과정 특히 통증 전달에 관여하리라 생각하고 있다[9,10]. NOS 억제제 투여 시 신경병성 통증[11]과 화학물질로 유도된 통증[12,13]에서 진통작용을 나타낸다고 알려졌다.

한편 지속적인 통증이나 통각과민 시 immediate early gene인 c-fos가 발현된다고 알려져 있다. 여러 가지 통증자극 즉 온도, 화학, 그리고 기계적 피부자극에 의해 통각을 전달하는 1차 섬유가 주로 시냅스하는 척수후각의 lamina I, II와 V 지역 신경세포에 c-fos가 발현됨이 보고된 바 있는데 실험적으로 adjuvant에 의한 관절염의 유발이나 formalin에 의한 통증에 의해 척수 내에 그 발현이 증가되고 c-fos의 발현은 정상적인 통증에서는 나타나지 않고 특히 병적 지속적 통증에 의한 중추내의 감작 시 나타나는 것으로 알려져 있다[14,15]. c-fos 유전자에 의해 합성되는 Fos 단백질이 어떠한 역할을 하는지 명확하게 밝혀지지는 않았으나 지속적 통증에 의한 신경세포 활성의 지표로 사용된다[16]. c-fos는 Fos 단백질을 형성한 후, *c-jun*으로부터 유래한 Jun 단백질과 더불어 Fos-Jun 이중복합체를 형성하여 전사인자로서 다른 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[17].

상기한 바와 같이 지속적 만성통증 시 동반되는 현상 혹은 그에 대한 기전으로 NMDA 수용체 활성도, NOS 활성도, c-fos의 발현 등에 대해 여러 서로 다른 통증모델에서 단편적으로 보고된 바 있다. 그러나 이들간의 상호 연관성에 대한 연구 그리고 기계적 및 열적 자극에 대한 통각과민 기전의 차이점에 대한 보고는 매우 미미한 상태이다.

본 연구에서는 CFA 투여에 의한 통각과민 모델에서 NMDA 수용체와 NO system 그리고 c-fos 발현 등이 상호 어떤 연관성이 있는지 그리고 기계적 자극과 열적 자극에 대한 통각과민현상의 기전에 어떤 차이

점이 있는지를 동일한 모델에서 체계적으로 비교 조사하는데 초점을 맞추고자 한다.

대상 및 방법

1) 실험동물, 실험군, 염증성 통증의 유발과 약물의 처치

본 실험에서는 체중 200~300 gm의 수컷 Sprague-Dawley계 랫드를 사용하였다.

염증성 통증의 유발은 Hylden등의 방법을 변형하여 사용하였다. 에테르로 가볍게 마취시킨 후 26 G 주사기를 이용하여 랫드의 왼쪽 발바닥에 oil/saline (1 : 1)의 유제(emulsion) complete Freund adjuvant (CFA, 불활성화된 Mycobacterium tuberculosis, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.15~0.20 ml (75~100 μg Mycobacterium)를 피내로 주사하였다.

NMDA 수용체의 차단제로는 수용체의 phencyclidine (PCP) 결합부위에 비경쟁적으로 결합하여 NMDA 수용체의 작용을 차단하는 것으로 알려진 MK-801 hydrogen maleate (RBI, Natick, MA, USA)를 사용하였으며 3.5 mg/kg의 용량으로 식염수에 녹여 하루 3회로 1일간과 CFA 주사 1시간 전에 복강 내로 투여하였다. NOS의 억제제로는 N^{ω}-nitro-*L*-arginine (L-NNA; Sigma, MO, St. Louis, USA)을 사용하였으며 25 mg/kg의 용량으로 식염수에 녹여 하루 3회로 1일간과 CFA 주사 1시간 전에 복강 내로 투여하였다. 약물 비투여군은 같은 때에 식염수를 복강 내 투여하였다. 투여 용적은 식염수와 약물 모두 10 ml/kg로 하였다.

실험군은 정상군(Control군)과 염증 유발군(CFA군), MK-801 전 처치 후 염증 유발군(MK-801군), L-NNA 전 처치 후 염증 유발군(L-NNA군)으로 구분하였다.

2) 행동학적 검사

(1) 기계적 자극에 의한 반응의 검사: 통증에 관한 행동학적 검사는 각 군에서 염증 유발 전, 유발 후 3일까지 여러 차례에 걸쳐 시행하였다. 염증을 유발한 발바닥에 기계적 자극을 가할 때 발의 회피 반응(withdrawal response)을 보기 위해 실험동물을 망으로 된 cage에 옮겨 안정시킨 후 실험을 진행하였다. 자극은 von Frey filament를 이용하여 시행하였으며 염증을 유발시키지 않은 반대쪽 발에서 검사 시 회피반응이 거의 일어나지 않는 강도(1.2 gm)와 어느 정도 회피 반응이 일어나는 강도(4.8 gm)를 이용하였다. 수 초 간격으로 발바닥을 20회 자극하여 그 발의 회피반응의 횟수를 세어 백분율로 표시하였다. 측정된 자료는 Kruscal-Wallis test를 시행하여 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 미만 시 유의한 것으로 판정하였다.

(2) 열 자극에 의한 반응의 검사: 실험동물을 두께 0.7 mm의 유리판 위에 올려 고정대에 넣고 10분간 적응시켰다. Projection lamp를 이용하여 유리판을 통하여 염증을 유발한 발바닥에 열 자극을 가하여 회피반응이 일어나는 잠복기를 측정하였다. 약 3분 간격으로 3회씩 실시하였으며 조직 손상을 방지하기 위해 15초 이상의 열 자극은 가하지 않았다. 측정된 자료는 Kruscal-Wallis test를 시행하여 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 미만 시 유의한 것으로 판정하였다.

3) 염증 부위의 조직 염색, c-fos의 면역조직화학 및 NADPH-diaphorase 조직 염색

실험동물의 고정은 염증을 유발한 후 3시간 후에 시행하였다. 실험동물에게 sodium pentobarbital (50 mg/kg)을 복강 주사하여 심마취시킨 후 흉강을 열고 심장의 첨부를 통해 좌심실로 삽관하여 peristaltic pump를 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4, 4°C) 100 ml를 관류시켜 혈액을 제거하고, 4% paraformaldehyde/0.1% glutaraldehyde (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 40°C) 고정액 400 ml를 관류시켰으며, 관류 개시 직후 우심방을 절개하여 방혈을 유도하였다. 고정 후 척추후궁절제술을 시행하여 제 4, 5요수를 노출시켜 적출해내고 고정액에 12~16시간 동안 후고정한 후 20% sucrose (in 0.1 M phosphate buffer) 용액에 넣어 4°C에서 2~5일간 침적시켜 보관하였다. 또한 염증을 유발한 발바닥 부위를 취하여 H&E 염색을 시행하였다. 침적된 표본은 냉동박절기(cryostat, Reichert-Jung, Germany)로 −23°C에서 30 μm 두께의 연속관상절편을 제작하였고 자른 조직은 매 20장마다 한 장을 취하여 PBS 내에서 free floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

면역조직화학염색은 c-fos에 대한 항체를 사용한 ABC (avidin-biotin peroxidase complex) 방법으로 시

행하였다. 조직절편은 먼저 조직 내에 존재하는 내재성 peroxidase를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H_2O_2에서 15분간 반응시킨 다음 10분씩 3회 PBS로 세척한 후 rabbit anti c-fos 항체(Oncogene Science, Uniondale, NY, USA)를 1 : 1,000으로 희석한 항체와 0.05% bovine serum albumin, 1.5% goat serum 그리고 0.3% Triton X-100이 들어 있는 1차 항체 용액에서 48시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 1차 항체에 대한 반응이 끝나면 조직을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 2차 항체용액(Vectastatin-Elite kit의 biotinylated anti-rabbit IgG를 1 : 200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다.

2차 항체 용액과 반응 후에 PBS로 10분씩 3차례 세척한 후 avidin-peroxidase complex 용액(Vectastatin-Elite kit의 A 용액 1 : 100, B 용액 1 : 100 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Aldrich, Milwaukee, WI, USA)를 0.05 M Tris 완충액에 녹여 사용하였으며 nickel chloride를 첨가하여 발색을 강화하고 0.02% H_2O_2는 0.003%로 사용하였다. 발색반응은 상온에서 3~5분간 시행하였으며, 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 10분씩 3회 세척하였다.

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase 조직화학 염색을 위해 조직절편을 0.1% β-NAD, 0.01% nitroblue tetrazolium, 0.3% Triton X-100을 0.1 M phosphate buffer에 녹인 반응 혼합액에 넣어 37°C 항온 오븐에서 45~60분간 반응시켰다. 적절한 정도의 발색 반응이 나타나면 조직을 PBS로 세척하여 더 이상의 발색을 정지시켰다. 발색이 끝난 조직절편을 gelatin-chrominium으로 coating된 유리슬라이드에 옮긴 후 2시간 동안 실온에서 건조시키고 xylene으로 청명과정을 거친 후 polymount로 봉입시켰다.

염색된 신경세포는 반응을 나타낸 세포체의 형태, 신경섬유 등을 광학현미경에서 관찰하였다. 광학현미경하에서 NADPH-diaphorase 양성 및 c-fos 발현 신경세포의 수를 세었으며 측정된 자료는 ANOVA test를 시행하여 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 미만 시 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) 염증성 통증의 유발과 행동학적 검사

(1) CFA 주사에 의한 염증의 확인: 실험동물에 CFA를 주사하고 3시간 후 관류 고정하였으며 발바닥 부위의 조직을 취해 H&E 염색을 시행하였다. 조직 소견상 부종으로 인하여 조직간격이 넓어지고 혈관주위에 염증세포인 중성구(neutrophil)가 모여 있어

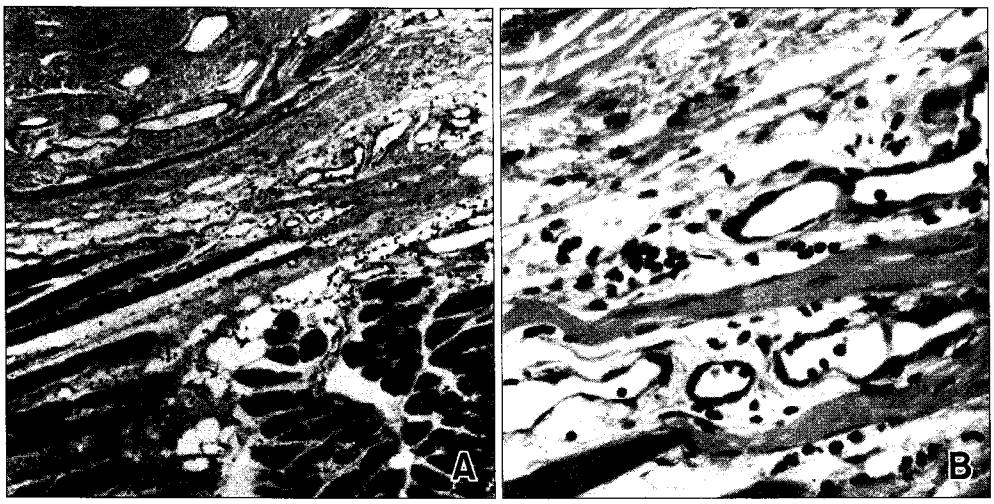

Fig. 1. Histologic changes following intraplantar injection of complete Freund adjuvant (CFA). Plantar skin tissue showed the early inflmmatory phase in which interstitial space was widened and neutrophils were infiltrated around blood vessels (H&E stain, A: ×100, B: ×400).

염증반응의 초기 소견을 보였다(Fig. 1). 따라서 CFA를 주사한 부위에 염증이 유발됨을 확인할 수 있었다.

(2) 기계적 자극에 대한 반응: 발바닥에 von Frey filament로 기계적 자극을 가하여 발의 회피반응을 측정하였다. 정상조직에서는 거의 통증을 일으키지 않는 강도의 자극인 1.2 gm의 von Frey filament를 사용해 mechanical allodynia의 유발 여부와 약물이 이에 미치는 영향을 관찰하였다. 염증을 유발하지 않은 경우에는 여러 약물 전처치에 의해 반응의 차이를 보이지 않았다. 염증을 유발한 경우에는 CFA 군에서 보듯이 주사 전 평균 3.2%의 회피반응빈도에서 주사 6시간 후에 22.3%까지 반응이 증가함을 보여 발바닥에서 기계적 이질통이 나타남을 확인할 수 있었다. MK-801을 처치한 경우 일부구간(CFA 주사 후 24시간)에서만 CFA군과 유의한 차이를 보였으며, L-NNA군은 전 구간에 걸쳐 CFA군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 기계적 이질통의 경우 NMDA 수용체의 활성도는 거의 역할을 하지 않음을 알 수 있었으며 NO system과도 무관함을 알 수 있었다(Fig. 2).

4.8 gm von Frey filament 자극(정상조직에서도 어느 정도 통증을 일으키는 정도의 자극)에 대한 반응을 이용하여 mechanical hyperalgesia의 유발 여부와 약물이 이에 미치는 영향을 관찰하였다. 염증을 유발한 경우에 CFA 주사 전 41.9%에서 주사 후 4시간 후에 78.2%까지 회피반응이 증가함을 보여 발바닥

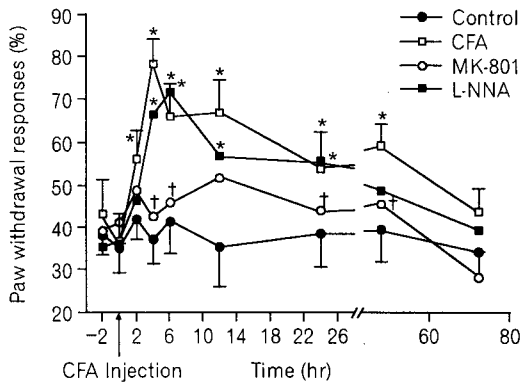

Fig. 3. Effects of MK-801 and L-NNA on mechanical hyperalgesia. Y axis shows the percentage of withdrawal responses induced by 20 repetitive mechanical stimulations using 4.8 gm von Frey filament (n=16). X axis shows the time course before and after the injection of CFA (arrow) into the plantar surface of the hindpaw. *: $p<0.05$; compaired to Control group, †: $p<0.05$; compaired to CFA treated group.

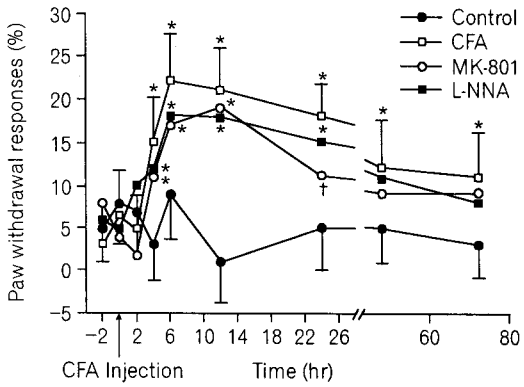

Fig. 2. Effects of MK-801 and L-NNA on mechanical allodynia. Y axis shows the percentage of withdrawal responses induced by 20 repetitive mechanical stimulations using 1.2 gm von Frey filament (n=16). X axis shows the time course before and after the injection of CFA (arrow) into the plantar surface of the hindpaw. *: $p<0.05$; compaired to Control group, †: $p<0.05$; compaired to CFA treated group.

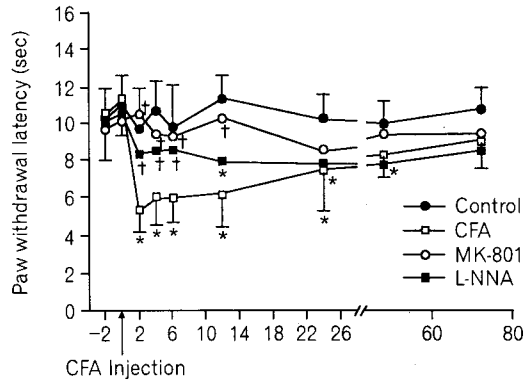

Fig. 4. Effects of MK-801 and L-NNA on thermal hyperalgesia. Y axis shows the latency of withdrawal responses induced by thermal stimuli using projection lamp. X axis shows the time course before and after the injection of CFA (arrow) into the plantar surface of the hindpaw. *: $p<0.05$; compaired to Control group, †: $p<0.05$; compaired to CFA treated group.

에서 mechanical hyperalgesia가 나타남을 확인할 수 있었다. 한편 약물의 영향을 보면 L-NNA군은 CFA군과 별 차이를 보이지 않으나 MK-801군은 CFA군에 비해 유의하게 감소하였다. 따라서 mechanical hyperalgesia기전에 NMDA 수용체는 관여하나 NO system은 무관함을 알 수 있었다(Fig. 3).

(3) 열 자극에 대한 반응: 발바닥에 열 자극을 가하여 이에 대한 회피반응의 잠복기를 측정하여 thermal hyperalgesia의 유발여부와 약물이 이에 미치는 영향을 관찰하였다. 염증 유발 후 CFA군에서 Control군에 비해 잠복기가 짧아져 thermal hyperalgesia가 나타남을 확인할 수 있었다. MK-801 혹은 L-NNA 투여는 모두 염증에 의한 잠복기 감소를 억제하여으며 따라서 thermal hyperalgesia기전에 NMDA 수용체와 NO system이 공히 관여함을 알 수 있었다(Fig. 4).

2) c-fos 발현 신경세포와 NADPH-diaphorase 양성 신경세포의 변화

(1) NADPH-diaphorase 양성 신경세포의 분포와 변화: NOS가 가지는 NADPH-diaphorase 활성을 이용하여 염색을 시행한 결과 염증 유발 후 NADPH-diaphorase 양성 신경세포의 수가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5, 6). NADPH-diaphorase 양성 신경세포는 주로 lamina I, II와 X에 분포하였는데 염증 유발 후 Lamina X 부위는 변화가 적고 lamina I, II 부위에 주로 증가하였다(Fig. 5). MK-801군과 L-NNA군 모두 CFA군에 비해 유의하게 NADPH-diaphorase 양성 신경세포의 수가 감소되었다(Fig. 5, 6).

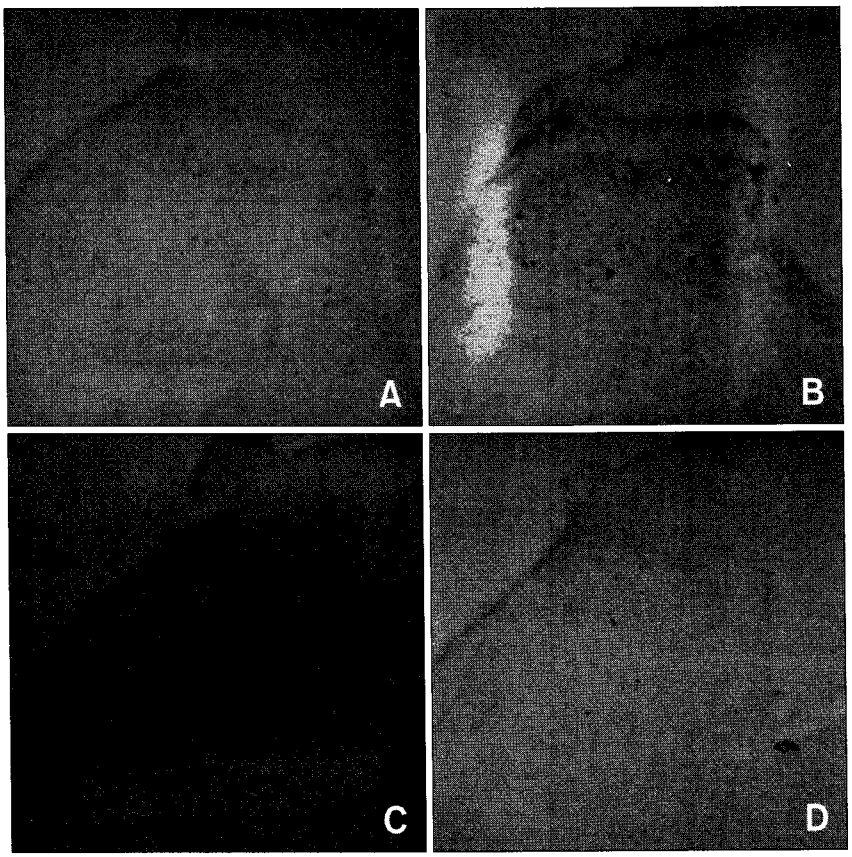

Fig. 5. An example of the distribution of NADPH-diaphorase positive neuronal cell in the dorsal horn of lumbar spinal cord. A: Control group, B: CFA group, C: MK-801 group, D: L-NNA group. In CFA group, NADPH-diaphorase positive cell was identified in the superficial layer of spinal cord. This NADPH-diaphorase positivity was decreased by treatment of MK-801 and L-NNA.

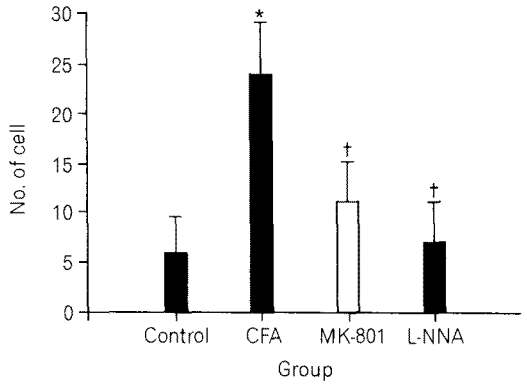

Fig. 6. Comparision of the number of NADPH-diaphorase positive neuronal cell in the lamina I, II of lumbar dorsal horn. *: $p<0.05$; compaired to control group, †: $p<0.05$; compaired to CFA treated group.

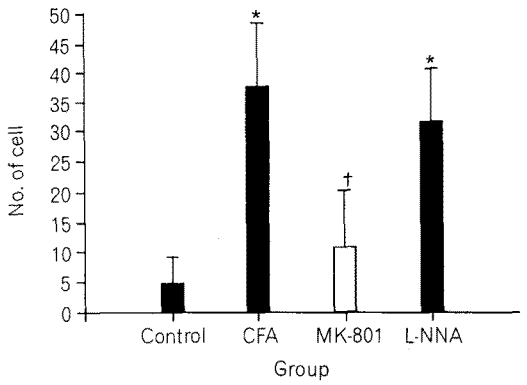

Fig. 8. Comparision of the number of c-fos expressed neuronal cell in the lamina I, II of lumbar dorsal horn (n=24). *: $p<0.05$; compaired to control group, †: $p<0.05$; compaired to CFA treated group.

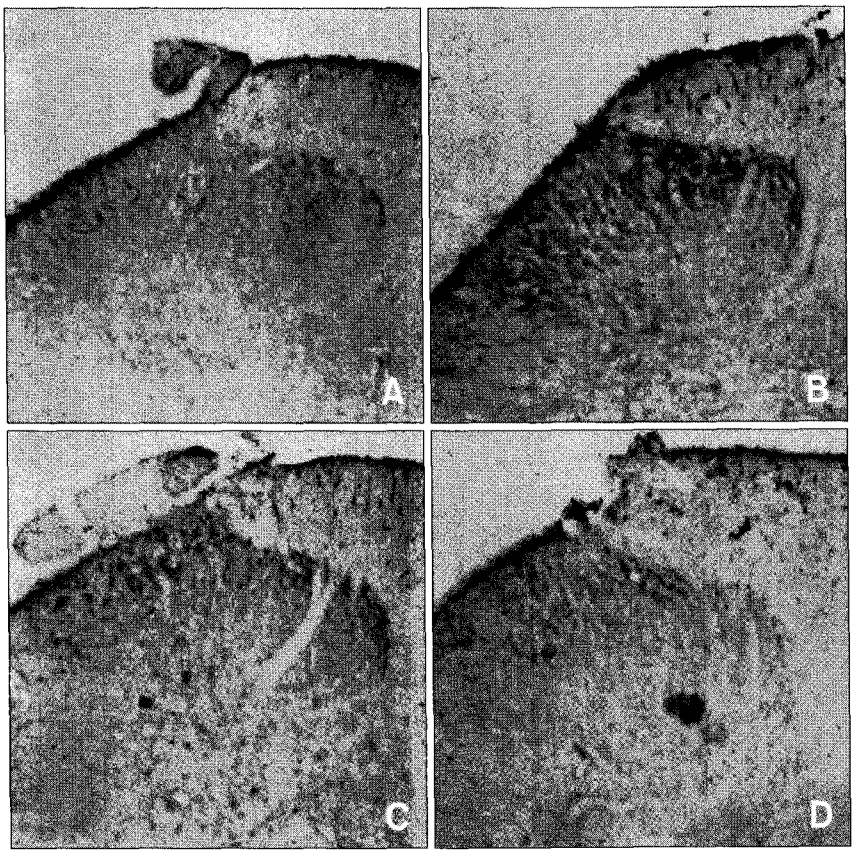

Fig. 7. An example of the distribution of c-fos expressed neuronal cells in the dorsal horn of lumbar spinal cord. A: control group, B: CFA group, C: MK-801 group, D: L-NNA group. In CFA group, c-fos positive cell was identified in the superficial layer of spinal cord. This c-fos expressed cell was decreased by treatment of MK-801 but not by treatment of L-NNA.

(2) c-fos 발현 신경세포의 분포와 변화: 지속적인 통증시 신경세포에서 발현되는 c-fos에 대한 면역 염색을 시행한 결과 염증 후 c-fos 발현 신경세포의 수가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 7, 8). c-fos 발현 신경세포는 lamina I, II와 V에서 주로 발견되며 척수 전각에서도 일부 관찰되었다. MK-801군은 CFA군에 비해 c-fos 발현 신경세포의 수가 유의하게 적었으며 L-NNA군은 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 7, 8).

고 찰

외상이나 감염 또는 수술 등으로 말초 조직이 손상되게 되면 손상 부위와 주위에 통각과민이 나타나게 된다. 통각과민의 조절을 위하여 여러 치료 방법이 사용되고 있으나 이의 기전과 병태생리에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다.

이전에는 통각과민의 기전을 조직 손상과 염증으로 인한 말초 통각수용체의 감작으로만 생각하였으나 일련의 연구 결과 중추신경계 내에서의 변화가 주요 기전으로 관여한다는 것이 알려지게 되었다. 즉, 통각수용체의 감작에 의한 지속적인 흥분으로 일차구심성 신경섬유가 지속적으로 활성화되고 이는 시냅스하는 척수 내와 다른 부위의 기능적, 구조적 변화를 유발하여 통각과민이 나타나게 된다고 알려졌다[18,19].

통각과민의 이해를 위해 여러 가지 실험적인 모델들이 제시되었다. 통각과민은 크게 말초조직의 손상에 의한 경우와 말초신경의 손상에 의한 경우로 구분할 수 있다. 말초조직 손상에 의한 통각과민의 모델로는 formalin이나 염증 유발물질, 예를 들어 본 연구에서 사용한 CFA나 carrageenan을 말초조직에 투여하는 것이 사용된다. CFA는 통증 유발이 다른 물질에 비해 지속적이며 다른 전신적인 영향 없이 국소적인 염증을 유발할 수 있는 장점이 있다[20]. 본 실험에서도 CFA 주사 시 주사한 발쪽에만 부종이 나타났고 조직에 염증 소견이 나타났으며 통각과민이 유발되었다. CFA에 의한 염증의 유발은 주로 prostaglandin의 합성이나 arachidonic acid 대사에 따른 leukotrien에 의한 것으로 알려져 있다[21].

본 실험에서 CFA에 의한 염증 유발에 의해 mechanical allodynia, mechanical hyperalgesia 그리고 thermal hyperalgesia가 유발됨을 관찰할 수 있었다. Formalin에 의한 모델의 경우는 통증이 약 1~2시간 정도면 소실되고[22], 통증반응이 formalin 투여 직후에 나타났다 감소하는 1단계와 20~45분 후 나타나는 2단계로 구분되며[23] 1단계는 말초 통각수용체에 활성에 의한 반응이며 2단계는 중추신경계가 관여한다고 알려졌다[23-26]. 그러나 CFA에 의한 본 연구에서는 염증이 1, 2시간 이내에 유발되어 통각과민이 나타나 4~6시간 이내에 정점에 이르렀으며 관찰기간동안 계속 유지되었고 단계의 구분은 어려웠다.

조직손상으로 인한 통증자극의 지속적인 전달은 중추신경계내의 변화를 초래하게 되는데 이때 관여하리라 생각되어지는 것 중 중요한 것이 NMDA 수용체이다. NMDA 수용체는 통증전달의 신경전달물질로 알려진 glutamate의 수용체의 한 유형으로 voltage gated channel과 ligand gated channel의 성질을 같이 가지고 있으며 Ca^{2+} 이온을 투과시킬 수 있는 특징을 가지고 있다. 본 연구에서는 NMDA 수용체의 차단을 위해 MK-801을 사용하였다. MK-801을 전처치하여 염증을 유발한 결과 mechanical allodynia는 거의 영향이 없었으나 mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia는 의의 있게 억제하였다. 조직손상으로 인한 hyperalgesia를 억제하기 위해서는 말초로부터의 지속적인 흥분이 중추신경계로 입력되는 것을 사전에 막기 위한 조치가 중요함이 보고되었는데[27-29] 본 실험 결과는 이에 부합되는 것으로 생각한다.

NMDA 수용체의 활성화가 어떠한 기전으로 통각과민을 유발하는지에 대한 여러 가설들이 제시되고 있다. 위에서 언급한 바와 같이 NMDA 수용체 활성화에 따른 세포 내 Ca^{2+} 이온 농도의 증가가 일차적인 요인이 된다. 증가된 Ca^{2+} 이온은 세포 내 2차 전달계를 활성화시켜 세포 내 여러 효소 및 세포막에 존재하는 수용체, 이온통로에 영향을 미치며 또한 단백질 합성에도 영향을 미치게 된다[30]. 이중 통각과민과 관련하여 중요한 것이 NO이다[31,32]. NO는 NOS에 의해 세포 내 *L*-arginine으로부터 합성되며 포유류의 신경계[8]의 여러 부위에 존재한다. 특히 척수후각에 NOS가 존재함이 알려졌으며[33] 척수 내 NMDA 투여에 의한 통각과민이 NO 합성 억제제의 투여 시 감소된다[13,34]. NOS의 억제제인 L-NNA를 전 처치하였을 때는 mechanical allodynia, mechanical hyperalgesia에는 별 영향을 미치지 않았으나 thermal hyper-

algesia는 억제되었다. 보고에 의하면 Carrageenan에 의한 모델에서 척수 내로 투여한 NO 억제제가 thermal hyperalgesia는 억제하나 mechanical hyperalgesia는 억제하지 못한다고 하며[35] 조직손상이 아닌 신경병증 통증(neuropathic pain)에 의한 thermal hyperalgesia에서도 NO가 관여하며[11], thermal hyperalgesia 유발 시 NOS 발현이 증가한다고 한다[36]. 따라서 thermal hyperalgesia 기전에는 NO가 관여하나 mechanical hyperalgesia기전에는 다른 기전, 즉 NO가 아닌 carbon monoxide (CO)가 작용할 가능성이 제시되었다[32]. 이러한 보고들은 본 실험 결과들과 부합되는 것으로 생각된다. 한편 NO는 뇌내 해마부위에서 long-term potentiation에서 시냅스 전달을 강화하는 것으로 알려져 있는데[37-39] 척수에도 이러한 기전이 존재한다고 알려져 있으며[40] 통각과민 기전에도 이러한 기전이 관여하리라 추측된다.

NOS의 활성 지표로 NADPH-diaphorase 조직염색을 사용하였다. NADPH-diaphorase는 NADPH 존재 하에 nitroblue tetrazolium salt를 광학현미경상 푸른 결정을 띠는 nitroblue tetrazolium formazan으로 환원시킨다[41]. NADPH-diaphorase 활성은 뼈조직을 제외하고는 신경 및 그 외 조직에서 NOS 면역성과 일치성이 높은 것으로 알려져 있어 적절한 지표로 사용 가능하지만 특이적인 지표는 아닌 것으로 알려져 있다[41-44].

NADPH-diaphorase 양성세포는 MK-801과 L-NNA의 전 처치에 의해 감소되었는데 MK-801은 NMDA 수용체의 차단으로 Ca^{2+} 이온 증가가 억제되어 NOS의 활성을 낮추게 된 것으로 생각되며, L-NNA는 직접 NOS를 억제해서 나타난 것으로 생각된다.

한편 MK-801에 의해 c-fos의 발현도 억제되어 이의 발현도 NMDA 수용체의 활성에 의해 나타나는 것으로 생각된다. 다른 연구자의 경우에서도 c-fos의 발현에 NMDA 수용체가 관여하는 것으로 알려졌다[45]. c-fos는 immediate early gene으로 보통 통증 유발 30분 이내에 발현이 되어 2시간이면 Fos 단백질이 현저히 증가하게 된다[46]. c-fos의 역할에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나 3차 전달물질로 작용하여 통증과 관련된 여러 유전자의 발현을 조절할 것으로 생각된다.

본 실험에서 CFA 주사에 의한 c-fos의 발현은 L-NNA의 전 처치에 의해 영향을 받지 않았다. 따라서 NO 합성의 경로와 c-fos의 발현이 독자적인 경로로 작용하거나 순서적으로 c-fos의 발현이 NO 합성에 우선하여 일어나리라 생각된다. 그러나, 지속적인 기계적 통증 자극에 의한 Fos 발현이 다른 NOS 억제제인 L-NAME에 의해 억제되었다는 보고도 있는데[47] 이러한 차이는 아마도 통증 유발방법의 차이나 억제제의 특성에 기인하는 것으로 추측된다.

NMDA 수용체와 관련하여 통각과민의 기전 중 중요하게 관여하리라 생각되는 기전이 과도한 흥분에 의한 세포손상 특히 억제성 중간신경의 손상이다. NMDA 수용체의 지속적인 흥분으로 인한 세포내 Ca^{2+} 이온의 과도한 증가는 세포에 흥분성 독작용(excitotoxicity)을 나타내게 된다. 여기에는 NO도 관여하는데 과다한 NO는 peroxynitrite를 형성하여 세포독성을 나타낸다[48]. 억제성 중간신경의 손상에 의해 억제성 기전의 소실로 척수후각세포의 과흥분이 일어나 통각과민이 일어나게 된다는 가설[49]을 고려해 볼 때 본 실험결과가 상기한 기전에 의할 가능성도 배제할 수 없다.

한편 기계적 이질통는 MK-801과 L-NNA에 의해 억제되지 않아 다른 기전이 관여하리라 생각된다. hyperlgesia와 allodynia는 보통 임상적으로 같이 나타나기 때문에 같은 의미로 혼용되기도 하나 행동학적으로 다른 현상이다. 이질통은 무해한 자극을 통증으로 느끼는 것으로 무해한 자극이 감작된 통각수용체나 정상적인 Aβ 기계적 수용체를 활성화시켜 나타나며, hyperalgesia는 통증자극에 대한 반응의 증가로 통증수용체의 자극에 따라 나타나게 된다. 본 연구에서 기계적 이질통의 기전에 NMDA 수용체나 NO가 거의 작용하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이의 기전에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요하리라 생각된다.

요약하면 CFA로 염증성 통증 유발 시 나타나는 통각과민 기전에서 1) mechanical hyperalgesia는 NMDA 수용체가 그리고 thermal hyperalgesia은 NMDA 수용체와 NO system이 같이 관여하고, 2) NO system은 c-fos의 발현에 영향을 미치지 않으며, 3) NOS의 활성도 및 c-fos의 발현은 NMDA 수용체의 활성도에 의존적임을 알 수 있었다. 그러나 NMDA 수용체 활성도나 NOS 활성도 억제에 의해 통각과민이 완전히 소실되지 않는 것은 상기한 기전 외의 다른 기전이 관여할 가능성을 암시하며 이에 대해서는 추후 더 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1) Wilson P, Kitchener PD: Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. Prog Neurobiol 1996; 48: 105-29.
2) Dickenson AH: A cure for wind-up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 307-9.
3) Dickenson AH, Sullivan AF: NMDA receptors and central hyperalgesic states. Pain 1991; 46: 344-5.
4) Woolf CJ, Thomson SWN: The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of postoperative pain. Pain 1991; 44: 293-301.
5) Coderre TJ, Melzack R: The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. J Neurosci 1992; 12: 3665-70.
6) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-42.
7) Garthwaite J, Boulton CL: Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu Rev Physiol 1995; 57: 683-706.
8) Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Dawson TM, Snyder SH: Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely1 localized in neuronal population of mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. Neuron 1991; 7: 615-24.
9) Dun NJ, Dun SL, Forstermann U, Tseng LF: Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. Neurosci Lett 1992; 147: 217-20.
10) Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HHHW: Nitirc oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. Neurosci Lett 1992; 148: 6-10.
11) Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ: Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. Neuroscience 1992; 50: 7-10.
12) Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge P, Wallace P, Hart SL: L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. Br J Pharmacol 1991; 102: 198-202.
13) Haley JE, Dickenson AH, Schachter M: Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. Neuropharmacology 1992; 31: 251-8.
14) Abbadie C, Besson JM: c-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant-induced arthritic and normal rats. Brain Res 1993; 607: 195-204.
15) Zhang RX, Wang R, Chen JY, Qiao JT: Effects of descending inhibitory system on the c-fos expression in the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation. Neuroscience 1994; 58: 299-304.
16) 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: 517-30.
17) Dubner R, Ruda MA: Activity-dependent plasticity following tissue injury and inflammation. Trends Neurosci 1992; 15: 96-103.
18) Dubner R: Pain and hyperalgesia following tissue injury: new mechanism and new treatments. Pain 1991; 44: 213-4.
19) Carstens E: Neural mechanisms of hyperalgesia: peripheral or central sensitization? News Physiol Sci 1995; 10: 260-5.
20) Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR: Differential activation of spinal cord dynorphin and enephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. Brain Res 1998; 455: 205-12.
21) Levine F, Taiwa Y: Inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R, eds. Textbook of pain. 3rd ed. UK, Edinburgh, Churchill Livingstone. 1994, pp45-56.
22) Porro CA, Cavazzuti M: Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. Prog Neurobiol 1993; 41: 565-607.
23) Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH: Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. Brain Res 1990; 518: 218-26.
24) Davar G, Hama A, Deykin A, Vos B, Maciewicx R: MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. Brain Res 1991; 553 :327-30.
25) Dickenson AH, Aydar E: Antagonism at the glycine site on the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. Neurosci Lett 1991; 121: 263-6.
26) Vaccarino AL, Marek P, Kest B, Weber E, Keana JF W, et al: NMDA receptor antagonists, MK-801 and ACEA-1011, prevent the development of tonic pain following subcutaneous formalin. Brain Res 1993; 615: 331-4.
27) Wall PD: The prevention of postoperative pain. Pain 1998; 33: 289-90.

28) Tverskoy M, Cozacov C, Ayache M, Bradley EL, Kissin I: Postoperative pain after inguinal herniorrhaphy with different types of anesthesia. Anesth Analg 1990; 70: 29-35.
29) Ren K, Hylden JLK, Williams GM, Ruda MA, Dubner R: The effect of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. Pain 1992; 50: 331-44.
30) Coderre TJ: The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. Mol Neurobiol 1993; 7: 229-46.
31) Meller ST, Gebhart GF: Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. Pain 1993; 52: 127-136.
32) Meller ST, Gebhart GF: The role of nitric oxide in spinal nociceptive progressing. In: Takagi H, Toda N, Hawkins RD, eds. Nitric oxide, Role in neuronal communication and neurotoxocity. Tokyo, Japan Sientific Societies Press, 1994, pp103-14.
33) Anderson CR: NADPH-diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neuron. Neurosci Lett 1992; 139: 280-4.
34) Malmberg AB, Yaksh TL: Spinal nitric oxdie synthase inhibition block NMDA induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. Pain 1993; 54: 291-300.
35) Meller ST, Cummings CP, Traube RJ, Gebhart GF: The role of nitric oxide in the developement and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. Neuroscience 1994; 60: 367-74.
36) Gryzybicki D, Gebhart GF, Murphy S: Expression of nitric oxide synthase type II in the spinal under conditions producing thermal hyperalgesia. J Chem Neuroanat 1996; 10: 221-9.
37) O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O: Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11285-9.
38) Schuman EM, Madison DV: A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science 1991; 254: 1503-6.
39) Kiedrowski L, Costa E, Wroblewski JT: Sodium nitroprusside inhibits N-methyl-D-aspartate-evoked calcium influx via a nitric oxide- and cGMP-independent mechanism. Mol Pharmacol 1992; 41: 779-84.
40) Randic M, Jiang MC, Cerne R: Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. J Neurosci 1993; 12: 5228-41.
41) Schmidt HHHW, Gangne GD, Nakane MM, Polaaock J, Miller MF, Murad F: Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. J Histochem Cytochem 1992; 40: 1439-56.
42) Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7797-801.
43) Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR: Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 2811-4.
44) Beesley JE: Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. Histochem J 1995; 27: 757-69.
45) Chapman V, Honore P, Buritova J, Besson JM: The contribution of NMDA receptor activation to spinal c-Fos expression in a model of inflammatory pain. Br J Pharamacol 1995; 116: 1628-34.
46) Herdegen T, Tolle TR, Bravo R, Zieglgansberger W, Zimmermann M: Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. Neurosci Lett 1991; 129: 221-4.
47) Lee JH, Wilcox GL, Beitz AJ: Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation. Neuroreport 1992; 3: 841-4.
48) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Shucher NJ, et al: A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature 1993; 364: 626-32.
49) Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC: Strychnine-enhanced transsynaptic degeneration of dorsal horn neurons in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. Neurosci Lett 1989; 98: 139-43.