

내·외인성으로 유도된 Nitric Oxide가 흰쥐의 통각전달에 미치는 효과

방준석 · 류정수 · 신창열 · 양성준 · 송현주 · 박전희 · 제현동 · 손의동# · 허인회
중앙대학교 약학대학 약물학교실

(Received November 29, 2000; Revised January 4, 2001)

The Effects of Endogenously and Exogenously Induced Nitric Oxides on the Nociperception of Rats

Joon Seok Bang, Jung Su Ryu, Chang Yell Shin, Sung Jun Yang, Hyun Ju Song,
Cheon Hee Park, Hyun Dong Je, Uy Dong Sohn* and In Hoi Huh
Dept of Pharmacology, College of Pharmacy, Chung Ang University Seoul 156-756, Korea

Abstract — Nitric oxide is a labile, gaseous, broad spectrum second messenger that used in various tissues and cells. If it is induced by endogenously and exogenously in the neuronal cells, it is able to mediate analgesia or hyperalgesia at the periphery and in the spinal level respectively. This dual role of nitric oxide in the sensory system is very intriguing but has not been fully understood yet. In this experiment, acetylcholine (300 µg/paw), sodium nitroprusside (600 µg/paw), and L-arginine (300 µg/paw) represented antinociceptive effect to noxious topical stimulus, but pronociceptive responses followed by spinally application (20 µg/5 µl, 10 µg/3 µl, 500 µg/5 µl respectively). Calcium ion is critical element which activates nitric oxide synthase, therefore verapamil (300 µg/paw) and NOS inhibitor (20 mg/kg, L-NAME or L-NOArg) are injected into right hind paw (*i.pl.*). When verapamil is combined with NOS inhibitor, analgesic effects through NO-cGMP pathway are inhibited as compared with ACh alone. Diluted formalin (2.5%), when injected into rats' hind paw (0.05 ml), elicited a biphasic algesic responses and nitric oxide had an analgesic effect on both Aδ and C sensory nerve fibers which manipulate the phases respectively. Nitric oxides, which produced from constitutive nitric oxide synthase, activated cyclooxygenase-type I and then prostaglandins are produced from them. So, indomethacin and ibuprofen, inhibitors of COX₁ enzyme, when pre-treated intraperitoneally (100 mg/kg) could reduce the hyperalgesic state. From these results, it is possible to imagine that the intrathecally administered NO donors expressed hyperalgesia through both long-term potentiation mechanism and arachidonic acid-prostaglandin cascade.

Keywords □ Nitric oxide, acetylcholine, sodium nitroprusside, L-arginine, nitric oxide synthase, hyperalgesia

Nitric oxide(NO)는 생체내에서 기질인 L-Arginine 이 nitric oxide synthase(NOS)의 작용으로 citrulline 과 함께 생성된다. 지용성이므로 세포막을 통과하면 쉽게 확산되어 표적세포의 soluble guanylate cyclase (s-GC)를 활성화시켜 GTP를 cyclic GMP로 변환시킨다. 증가된 cGMP는 cGMP-dependent protein kinase

또는 phosphodiesterase를 활성화하고, 세포막에 있는 cation channel의 개폐를 조절하며, 유전자 변이를 유발한다.¹⁾ 이렇게 생성된 NO가 유도하는 생리반응으로는 macrophages의 면역증강작용이 있고, 혈소판의 응집을 저해하며, endothelium-derived relaxing factor (EDRF)의 본체로서 효과적인 혈관이완물질이 되고, 중추신경에서는 long-term potentiation(LTP)을 매개하여 기억과 학습기능에 기여하며, 자율신경 중에서 non-adrenergic, non-cholinergic(NANC) neuron의 신경전달

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5614 (팩스) 02-826-8752

물질로 사용된다.^{2,4)} 그리고 glutamate나 γ -amino butyric acid(GABA)를 사용하는 중추신경계에서는 retrograde messenger로 쓰여 LTP로 인한 excitotoxicity를 일으키고, reactive oxygen species(ROS)를 발생시켜서 신경세포를 파괴함으로써 뇌신경기능을 손상시켜서 Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease같은 퇴행성 신경질환의 원인이 되는 등 여러 가지 질병기전에 관련되어 있다.⁵⁾

NO는 세포내 cGMP농도 증가의 중요한 매개체가 되며, 특히 혈관이완물질로서의 기전이 상세히 연구되었다. 그리고 신경계의 곳곳에서 NOS의 분포가 확인되었고, 뇌와 척수에 분포한 opioid 수용체들을 연구한 결과, morphine같은 central narcotics는 진통작용 때 뇌 세포의 cGMP농도를 높여주고 cAMP농도는 낮추어 준다는 사실이 밝혀져서, 신경계에서 NO에 의한 cGMP농도 상승이 진통현상을 가져올 수 있으리라는 기대를 하게되었다. 실제로 중추신경계와 말초신경계에서 NO-cGMP pathway라는 경로를 통하여 진통현상이 나타난다는 사실을 입증하는 연구결과가 보고되고 있다.^{6,7)} 그러나, NO가 감각신경계에서 진통현상을 매개하는 것은 아니다. Duarte 등은 NO-cGMP경로가 차단되면 오히려 통각과민상태(hyperalgesia)가 진정된다는 사실을 발표하였고,⁸⁾ Przewlocki는 척수후각에 NOS 억제약물을 투여할 때 morphine의 진통효과가 증강되었음을 보고하였다.⁹⁾

Constitutive neuronal NOS로부터 만들어진 NO는 cyclooxygenase type I(COX1)을 자극하여 prostaglandin(PG)을 생산한 결과로¹⁰⁻¹¹⁾ hyperalgesia를 야기할 수 있다. 또한 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor agonist 등으로 유발한 hyperalgesia가 D-Arginine이나 N^o-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), methylene blue, hemoglobin을 처리할 때 경감되는 것을 밝힌 Haley와 Moore의 실험에서 NO가 통각전달에서 analgesia와 hyperalgesia라는 상이한 효과를 나타내는 전달체로 작용함을 시사하며,¹²⁻¹³⁾ hyperalgesia가 acetaminophen으로 차단되었다는 Henning의 실험결과를 통해 NO에 의한 prostaglandin이 생성되었을 가능성을 뒷받침한다.¹⁴⁾

이 연구의 목적은 NO-cGMP경로가 척수와 말초감각신경에서 통각전달상의 작용을 비교하고, 말초의 통각현상에 A δ , C 감각신경섬유중 어떤 신경섬유에 NO가 작용하는지, 그리고 hyperalgesia의 LTP관련설 외

에도 PG생성에 의한 가능성을 알아보코자 시행하였다.

실험방법

실험재료

Acetylcholine HCl 은 Merk사로부터 구입했으며, carrageenan은 Kasei사 제품을 사용하였다. Diltiazem, hemoglobin, ibuprofen, indomethacin, L-arginine HCl, methylene blue, N^o-nitro-L-arginine, N^o-nitro-L-arginine methyl ester, sodium nitroprusside, verapamil, nifedipine은 Sigma사 제품을 사용하였다.

실험 동물

Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 향온·항습(21±2°C, 40±2%) 조건하에서 인위적으로 12시간 명암주기(09:00~21:00)를 만들어주어 사료와 식수는 자유롭게 섭취시키면서 7일 이상 순화기간을 거쳐 사육하였고, 체중 180~240 g되는 동물을 실험 1일 전에 18시간 절식시켜서 사용하였다.

척수 지주막하강내 삽관 (Chronic Catheterization into Subarachnoid Space; i.t. Cannulation)

척수강 속으로 약물을 주입하는 방법으로는, 장기간 catheter를 꽂아두고 약물을 반복적으로 안전하게 투여하는 방법으로써 Yaksh와 Rudy가 1976년에 개발하고 이들이 LoPachin과 함께 1981년에 개선한 'Chronic Catheterization Method'를 참고하여,¹⁵⁻¹⁶⁾ 간편하고 신속한 수술이 되도록 변형하여 사용했다. Pentobarbital(50 mg/kg, i.p.)로 마취한 흰쥐를 stereotaxic apparatus(Narishige, Japan)에 올려놓고 ear bar를 흰쥐의 양쪽 고막 앞부분에 있는 acoustic meati에 끼운 뒤 위턱의 절치를 holder에 걸어서 조인다. 후두부의 털을 깎아내고 후두골과 제1번 경추 연결부(atlanto-occipital portion)를 절개하여 근육 층을 좌우로 젖힌 뒤, atlanto-occipital membrane(dura)이 나타나면 가볍게 절개하여 polyethylene tube(Natsume, Japan : PE-10 길이; 8 cm, 내경; 0.28 mm/PE-50 길이; 4 cm 내경; 0.58 mm)로 제작한 cannula를 subarachnoid space내로 밀어 넣어 제 1-5번 요추부분(L1-L5) 혹은 요추팽대부(lumbar enlargement)까지 이르도록 한다. 체중 230 g 전후 흰쥐의 요추까지는 절개지점에서 대략 7~8 cm이므로 PE-tube를 끝까지

밀어 넣고, catheter의 내부는 0.9% 생리식염수를 충전한다(catheter 내부용적 12 μ l). 삽관시 관내에 충만시킨 생리식염수가 척수강내로 빨리 들어가는 모세관 현상과 외부 이물질의 유입을 막기 위하여 catheter 바깥 끝은 가열 밀봉하고, 혈액응고로 인한 catheter 폐쇄를 피하기 위하여 heparin(400 unit/ml)을 catheter 끝에 묻혀서 삽관한다. 삽관이 성공하면, 관이 움직이지 않도록 plastic tube(길이; 1 cm 내경; 0.7 cm)를 취하여 한쪽 끝을 잘라 바깥으로 펼친 뒤 절개부위 양쪽 사이에 넣어 catheter를 감싸서 미리 준비한 cranioplast cement로 고정한다. Heating pad와 백열등으로 39°C내외의 온도조건하에서 2시간 방치하고 항온·항습 사육기(MJ-800ECS, Myung-Jin, Korea) 안에서 72시간 동안 cage당 한 마리씩 넣어 회복 시 수술후유증(large central dorsal vessel hemorrhage, motor problem) 여부 및 사료와 식수를 제대로 섭취하는지 면밀히 관찰한다.

실험이 끝나면 1% Evans Blue 10 μ l를 주입 후 해부하여 염색부위를 육안으로 확인하고, 삽관이 잘못된 것은 결과분석에서 제외했다.

약물 투여

말초투여는 우측 후지 족저부 중앙에 26 G 바늘로 매회 0.1 ml씩 피하주사(intraplantar; *i.pl.*)하였고, spinal injection을 위해서는 흰쥐를 고정시키고 약물은 1회 주입량이 5 μ l가 되도록 조절해서 microsyringe를 catheter에 삽입하여 20~30초 동안 천천히 주입함으로써 급격한 뇌압 상승을 피했다. 이어 catheter에 잔류하는 약물이 모두 척수강내로 들어가도록 7 μ l의 vehicle을 추가로 주입하였다.

Tail-Flick test 방법

척수강내로 투여한 약물의 효과를 검정하는데 사용했으며, 모든 약물의 투여 전에는 Tail-Flick Unit(DS-20, UGO Basile, Italy)의 voltage를 조절해서 회피반응이 4~5초(CRT: control reaction time, baseline tail flick latency)안에 일어나도록 빛의 강도를 조정한다. 조직상해를 예방하기 위하여 설정하는 cut off time은 12초로 하였다. 측정값은 매회 15초 간격으로 3회 반복 측정된 산술평균값을 취하였다. 측정값은 아래의 식으로부터 %MPE(percent maximum possible effect)를 계산하는데, 이것으로 진통여부는 알 수가 없

고 약물치치로 인한 효과여부를 판단한다.¹⁷⁻¹⁸⁾

$$\%MPE = (\text{test latency} - \text{control latency}) / (\text{cut off time} - \text{control latency}) \times 100$$

Paw Pressure test (Randall-Selitto) 방법

약물의 말초에서의 진통여부를 판단하는데 적용하였다. 생리식염수에 현탁시킨 carrageenan(1000 μ g/0.1 ml, 이하 cg)을 오른쪽 뒷발바닥 중앙에 피하 주사하여 염증성통증을 유발했다. 최대로 동통이 유발된 때를 측정하고, 이때로부터 30분전에 피검약물을 주사하여 기염물질에 의한 동통이 발생하기 전으로 완전히 회복되는 것을 100% 진통으로 정한 '% analgesia'를 구한다. 측정방법은 Analgesymeter(7200, UGO Basile, Italy)로 흰쥐 발등에 일정한(66 g/sec) 압력을 가할 때, 흰쥐가 소리를 지르거나 발을 빼내려는 순간의 추이동거리에 추 무게를 곱한 값을 통각 역치로 정하였다. 역치값은 10초 간격으로 3회 반복 측정하여 산술 평균값을 취하였다.

Formalin test 방법

포유동물은 acute pain을 유수신경인 A δ -fiber를 통해서 느끼고 chronic pain은 무수신경인 C-fiber를 통해서 알려져 있는데, formalin을 여러 농도로 희석해서 흰쥐의 뒷발바닥 혹은 입술(orofacial portion)에 주사하면 두 감각신경섬유가 시간차이를 두고 반응하는 독특한 biphasic response를 보인다.¹⁹⁻²⁰⁾ 본 실험에서는 이 방법으로 과연 NO가 말초적 급·만성 통각 중에서 어디를 조절하는지 검증하였다.

먼저 투명한 cage에 관찰이 용이하도록 반사거울을 한쪽 면에 설치하고 사육한 흰쥐를 cage안에 10분간 방치하여 환경에 적응시킨다. 시험약물을 0.1 ml씩 *i.pl.* 투여하고 30분 후에 2.5%로 희석한 formalin용액 0.05 ml를 같은 발바닥에 주사한 뒤, 생리식염수를 투여한 군을 기준으로 흰쥐가 BSL(biting, scratching, licking)반응과 Elevation(hind paw lifting)반응을 동시에 나타내는 시간을 3분씩 구간을 나누어 측정하였다.

통계 처리

실험결과는 mean \pm S.E.M.으로 표시하였고, 약물의 효과는 ANOVA test를 실시하여 유의성이 인정되면 Student's *t*-test와 Duncan's test를 실시하였으며, 통계해석시 유의수준으로는 P<0.05를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

말초신경에서 내·외인성으로 유도된 NO가 급·만성 통증모델 흰쥐의 통각전달에 미치는 효과

Randall-Selitto test를 시행하기 위한 염증성 동통의 유발 - 1000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ 의 carrageenan(cg) suspension으로 흰쥐 뒷발바닥에 일으킨 염증성 동통은 주사 후 3시간 경과하면 최고에 이르렀다 점차 회복되었고, 시간대별 통각역치값을 Table I에 나타내었다.⁶⁾

말초통증모델을 이용한 NO의 통각관련성 측정실험 - 기염물질을 투여하고 2.5시간이 지나서 부종이 생긴 발바닥에 acetylcholine(ACh, 300 μg)과 sodium nitroprusside(SNP, 600 μg), L-arginine(L-Arg, 300 μg)을 피하주사하고 30분이 지나서 Paw Pressure test를 실시하였다.⁶⁾ 약물은 ACh>SNP>L-Arg 순으로 진통효과를 나타냈으며, cg투여 이전으로 완전히 회복되는 것을 100% 진통으로 정했던 진통율은 각각 50.67 ± 2.75 , 38.00 ± 2.89 , $17.56 \pm 3.92\%$ 로서 ACh가 SNP보다 효력이 좋았다. 말초염증성동통에 유효한 NSAIDs 약물인 ibuprofen과 indomethacin을 ACh과 동량인 300 μg 씩 투여(*i.pl.*)했을 때의 진통율은 약 60%, 56%를 얻었다(Fig. 1). 진통의 유효성은 ACh, SNP에서는 나타났으나($p < 0.01$), L-Arg에서는 보이지 않았다.²¹⁾

위 말초진통효과에 대해서 ACh투여 1시간 전 N^w -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)과 N^G -nitro-L-arginine(L-NOArg)를 5, 10, 20 mg/kg씩 *i.p.*로 전처

Table I - Hyperalgesic effect of intraplantar administered carrageenan

Time (hour)	Δ Reaction time (sec)	Weight threshold (g)
0	6.68 ± 0.34	440.67 ± 22.16
0.5	4.21 ± 0.27	278.00 ± 17.96
1.5	$3.28 \pm 0.16^*$	$216.67 \pm 10.38^*$
2	$2.66 \pm 0.19^{**}$	$175.33 \pm 12.46^{**}$
3	$2.11 \pm 0.14^{**}$	$139.33 \pm 9.06^{**}$
4	$2.65 \pm 0.10^{**}$	$174.67 \pm 6.57^{**}$
5	$3.62 \pm 0.22^*$	$238.67 \pm 14.38^*$
6	4.03 ± 0.23	266.00 ± 15.01

The time and weight threshold values are presented as means \pm S.E.M. of 15 SD rats. Significant difference ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) indicate comparison to zero time. Analgesy meter pressure increase as 66 g/s. Dose : 10 mg/ml cg suspension at right hind paw and 0.1 ml per intraplantar injection. Measurement have done by Randall-Selitto Paw Pressure test. Δ Reaction time means the time of latency.

Vol. 45, No. 1, 2001

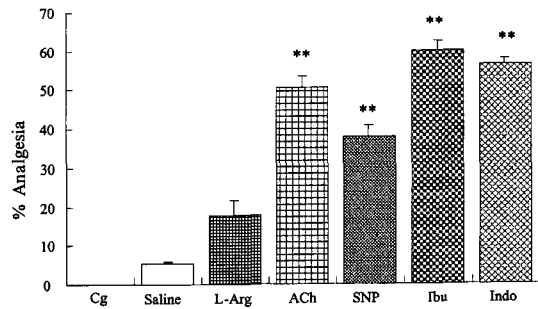


Fig. 1 - Peripheral antinociception by nitric oxide producing substances compared to carrageenan (cg) induced algisia. ACh (300 μg), L-Arg (300 μg), SNP (600 μg), ibuprofen (Ibu, 300 μg), and indomethacin (Indo, 300 μg) was injected at 2.5hr after cg (1000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$) injection. All drugs were administered at the right hind paw and Randall-Selitto test were made 30 min later. Data are means \pm S.E.M. of 6 rats ($**p < 0.01$ vs. cg).

치한 군들에서의 NOS 억제효과는 모두 용량의존성을 보였으며, 후자의 경우에 더 크게 나타났다.²²⁾ 그러나 ACh유발 말초진통에 대한 억제의 유효성은 L-NOArg 20 mg을 처치한 군에서만 보였다²³⁾(Fig. 2). 신경계에서는 endothelial NOS 선택성 억제제인 N^G -monomethyl-L-arginine(L-NMMA)와 nonspecific NOS 차단제인 L-NAME을 비교해보면 후자가 더 억제효과가 있음을 알 수 있었다⁶⁻⁷⁾(data not shown).

SNP 투여 30분전에 methylene blue(MB)와 hemoglobin(Hb)을 전처치한 결과 MB(500 $\mu\text{g}/\text{paw}$)는 NOS와 s-GC 두 효소를 모두 저해하므로 intracellular NO scavenger인 Hb(500 $\mu\text{g}/\text{paw}$)투여보다는 좋은 억

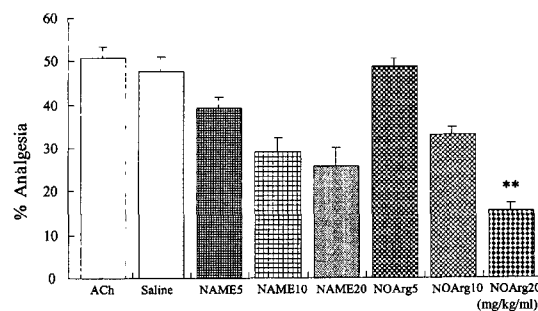


Fig. 2 - Inhibitory effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors at the periphery. L-NAME (5, 10, 20 mg/kg/ml) or L-NOArg (5, 10, 20 mg/kg/ml) was pretreated intraperitoneally 1hr before ACh (300 μg) or 1.5 hr after cg (1000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$). Data are means \pm S.E.M. for 48 rats ($**p < 0.01$ vs. ACh).

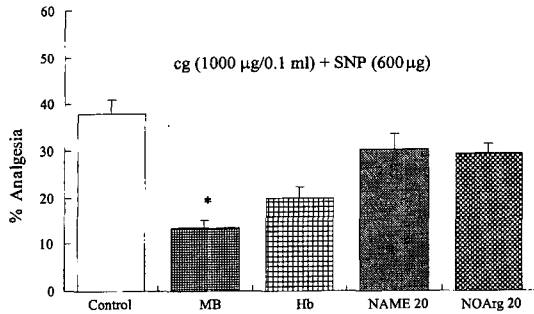


Fig. 3 - Suppression effect to SNP-antinociception by methylene blue and hemoglobin. Methylene blue (MB) and hemoglobin (Hb) applied i.p. (500 µg/paw) 1 hr before SNP (600 µg) or 1.5 hr after cg (1000 µg/0.1 ml). Data are means ± S.E.M. of 6 rats (*p<0.05 vs. SNP).

제 율을 나타냈다(p<0.05). 그러나 NOS inhibitor들은 ACh효과를 유의성있게 억제했던 20 mg/kg(i.p.)용량에서도 효과가 없는 것으로 나타나 SNP가 NOS를 필요로 하지 않는 NO donor임을 보여주었다(Fig. 3).^{6, 7)}

NO-매개성 진통현상에 opioid receptor가 연관되었는지 알아보기 위해 opioid receptor 차단제인 naloxone(2 mg/kg s.c.)을 cg투여 2시간 지난 뒤 즉, ACh 투여 30분전에 전처치해 주었다. ACh, SNP, L-Arg유발 진통효과에 각각 9, 6, 5%정도씩 naloxone의 억제 영향이 있었으나, 말초통각모델에서 이 용량으로는 전처치에 의한 억제효과의 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 4). 이것은 Kawabata가 보고했던 대로 대뇌의 LV로 투여한 NO가 morphine투여로 인한 진통현상을 더욱 상승시켜 주었다는 실험결과와는 일치하지 않았다.²¹⁾

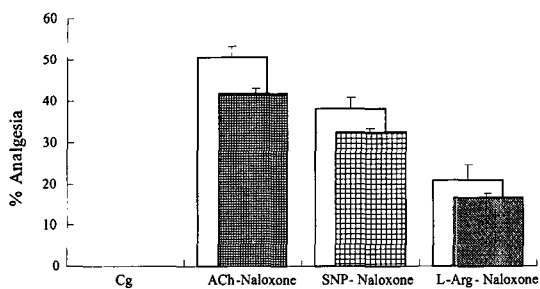


Fig. 4 - Uninvolvement of opioid receptors to nirtic oxide-mediated antinociception at the periphery. Naloxone (2 mg/kg s.c.) was injected to back skin of rats at 30 min prior to ACh (300 µg), SNP(600 µg), L-Arg (300 µg) application. No significant difference was obtained at any case. Data are means ± S.E.M. for 7 rats.

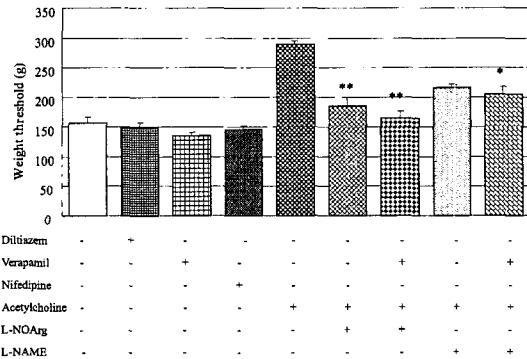


Fig. 5 - The effects of voltage-dependent calcium channel blockers on the NO-cGMP pathway. The calcium channel blockers (diltiazem, verapamil, nifedipine) are injected 300 µg at 30min before Randall-Selitto test. NOS inhibitors (L-NAME or L-NOArg) was injected (20 mg/kg i.p.) at 1.5hr after cg. and then 1hr later, ACh (300 µg) were applied concomitantly with calcium blockers. Data are means ± S.E.M. of 54 rats (*p<0.05, **p<0.01 vs. ACh alone).

혈관과 신경에는 Ca²⁺의존성 constitutive NOS (endothelial NOS, neuronal NOS)가 분포하고 이때 관여하는 Ca²⁺ channel은 voltage dependent ion channel이라고 보고되고 있으므로, 이 channel blocker인 diltiazem과 verapamil, nifedipine을 300 µg씩 (i.pl.)투여하여 channel봉쇄로 인한 ACh유도 진통현상의 감소여부와 20 mg/kg용량의 L-NAME또는 L-NOArg의 병용투여에 의한 영향을 보았다(Fig. 5). 그 결과 channel blocker의 단독 투여는 영향이 없었지만, (단독투여시 diltiazem; 4.5, verapamil; 14.1, nifedipine; 7.7%씩 억제), NOS inhibitor와의 병용투여시에는 ACh단독투여시보다 유의성있는 억제를 나타내었다.

Formalin test를 통한 NO의 말초감각신경섬유 흥분차단효과 실험 - 급·만성동통을 함께 일으켜서 물질의 진통효과를 손쉽게 screening할 수 있는 formalin test 결과를 Fig. 6에 보였다. 2.5%로 희석한 formalin은 투여 직후부터 3분 동안 격렬한 BSLE 반응(biting, scratching, licking and hind paw elevation response)을 보이고 진정되었다. 그리고 25분을 전후하여 다시 처음과 동일한 제2상 반응을 나타냈고, 제1상보다 정도는 약했지만 20분 이상 지속되었다. 처음 반응은 유수신경인 Aδ-fiber가 흥분했기 때문이고, 후기반응은 무수신경인 C-fiber의 흥분 때문인데, Meade와 Mitchell 등의 실험에서처럼 말초성 진통제

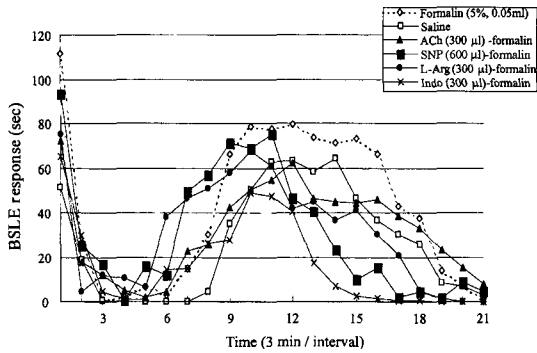


Fig. 6 – Time course of mean biting, scratching, licking and elevation behaviors after injection of 2.5% formalin (0.05 ml). Each block is composed of 3min and every drugs are administered by subcutaneously (0.05 ml) in one of the hind paws. Dosage of the drugs are the same as prior experiments. In the control, the first phase is block 1(3 min), and the second phase is 9-15 blocks (21 min) lasted. Indomethacin (Indo) drastically reduced the 2nd phase response and Arg, SNP accelerated the onset time of the 2nd phase, but ACh effects are more lasted. Data are means \pm S.E.M. of 6 rats.

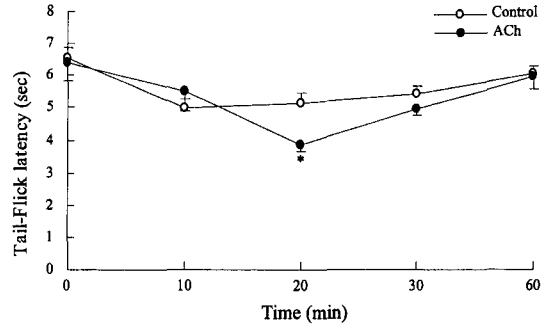


Fig. 7 – Induction of hyperalgesia by ACh in the spinal cord. ACh or vehicle was injected (i.t. 20 μ g/5 μ l) slowly for 20~30s through implanted cannula and then tested Tail-Flick latency. Cut-off time is 12s and measured three times at every case in 15s intervals. Data are means \pm S.E.M. of 5 rats (* p <0.05 vs. control).

인 indomethacin은 주로 제2상을 감소시켜 주는 것이 확인되었고,¹⁰⁾ NO는 1,2상 모두를 경감시켰으나 1상 보다는 2상에 더 작용한 것으로 여겨지며, Haley의 L-NAME을 전처리해서(500~1500 μ g/paw in 50 μ l) NO의 작용을 배제시키고 행했던 실험결과와도 일치하였다.¹²⁾ 그러나 Hart 등은 mouse에 L-NAME을 고용량(600 mg/kg i.p.) 먼저 투여한 실험에서 formalin (5%, 10 μ l/paw)을 적용했더니 오히려 antinociceptive effect를 얻었다는 결과를 보고한 바 있으므로, 이에 관하여는 앞으로 추가연구가 필요하다고 사료된다.¹³⁾ 그리고 이번 실험에서는 정도의 차이는 있었으나 NO가 sensory nerve중 A δ , C-fiber 모두에서 유효통각전도를 억제했다고 여겨진다.¹²⁾

척수주막하강내에서 내·외인성으로 유도된 NO가 흰쥐의 통각전달에 미치는 효과

Spinal cord의 subarachnoid space로 투여한 nitric oxide 생성약물의 Tail-Flick test에 의한 통각관련실험 - 척수강으로 NO유도약물을 투여하여 유도된 NO에 의한 중추적 통각전도는 Tail-Flick test로 검정하는데, 이는 척수의 dorsal horn에는 감각전도도가 존재하며 또 여기에 NOS가 분포하기 때

문이다.^{5,24)} ACh은 중추신경계로 투여시 cholinesterase의 작용으로 신속히 분해되기 때문에 투여하고 처음 30분 동안은 10분 간격으로 측정하였다.²⁴⁻²⁵⁾ 투여하고 20분이 경과했을 때에 가장 뚜렷한 변화를 보였다가(3.83 \pm 0.34 sec) 60분이 지나서 원상으로 회복되었다(Fig. 7).

SNP와 L-Arg을 투여한 후 120분 동안 30분 간격으로 측정하였다(Fig. 8). 두 약물 모두 투여하고 30분과 60분이 지났을 때 꼬리에 가한 열 자극에 더 예민한 상태가 되었다. 이 결과는 Pieper, Ferreira, Takagi가 보고한 실험결과들과는 일부 상충되는 면도 있었으나,²¹⁾ NO가 척수의 통각 전도로에서 통각과민

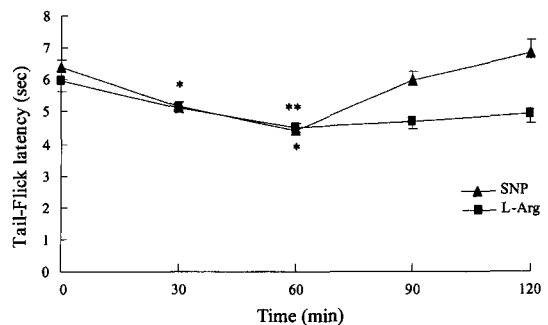


Fig. 8 – Pronociceptive responses by spinally introduced exogenous and endogenous NO producing substances. SNP (i.t. 10 μ g/3 μ l) or L-Arg (i.t. 500 μ g/5 μ l) was injected slowly for 20~30s through implanted cannula and then tested Tail-Flick latency. Data are means \pm S.E.M. of 6 rats (* p <0.05, ** p <0.01 vs. control).

Table II – Hyperalgesic effects of intrathecally administered NO inducers

Time (min)	%MPE			
	Vehicle	Acetylcholine	SNP	L-Arginine
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10	-24.95	-15.66		
20	-24.77	-45.02 [#]		
30	-21.47	-25.62	-21.49	-12.39
60	-9.54	-8.36	-34.81 [#]	-20.86 [#]
90			-7.28	-16.89
120			7.99	-14.07

Minus values are expression of recessed antinociceptive effect from i.t. administration. % MPE: percent maximal possible effect, which can not show analgesic rate but effect of substances to tested group. #: Indication of maximally induced TF nociception time in acetylcholine (20 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), sodium nitroprusside (10 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$) and L-Arginine (500 $\mu\text{g}/5 \text{ml}$).

을 야기하는 mechanism에 second messenger로 작용하였다는 다른 여러 연구결과와는 일치하였다.⁸⁻⁹⁾ 위 세 가지 약물을 척수강내로 투여했을 때의 경시적인 % MPE값의 변화를 Table II에 나타냈다.

ACh이 신경전달물질이며 또 작용지속시간도 짧으므로 SNP를 척수강내로 주사하여 hyperalgesia를 유도한 후 MB과 Hb를 처리하여 그 영향을 보았다(Fig. 9). 그 결과 NO scavenger인 Hb 만이 유의성있는 억제효과를 나타냈다.

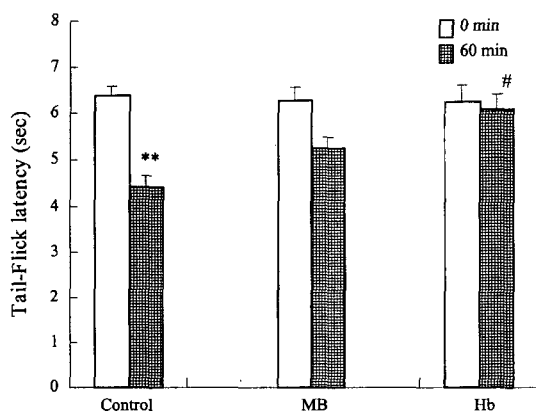


Fig. 9 – Inhibitory effects of pretreated hemoglobin or methylene blue on SNP-induced hyperalgesia. Hemoglobin (Hb, 15 nM/5 μl , i.t.) or methylene blue (MB, 400 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) was injected at 50 min later to spinally injected SNP (10 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$). Data are means \pm S.E.M. of 6 rats (** $p < 0.01$ vs. control at zero time, # $p < 0.05$ vs. control at 60 min).

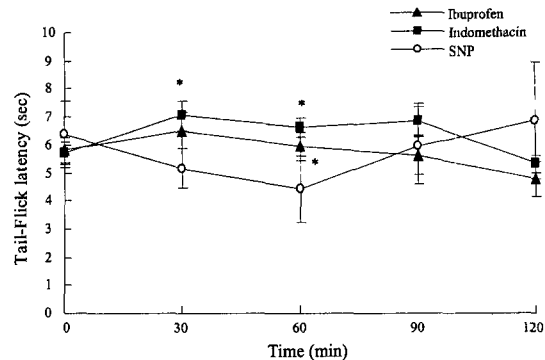


Fig. 10 – Tail-flick latency increased by ibuprofen and indomethacin in the SNP-induced pronociceptive state. Ibuprofen or indomethacin was injected (100 mg/kg i.p.) at 15min prior to SNP (i.t. 10 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$). Data are means \pm S.E.M. of 6 rats (* $p < 0.05$ vs. SNP alone).

Cyclooxygenase inhibitor인 NSAIDs를 이용한 SNP작용 억제실험 – Hyperalgesia현상이 ‘LTP mechanism’에 의한 것 외에도 NO가 arachidonic acid를 유리시켜 이것이 cyclooxygenase에 의해 생산되는 prostaglandin으로 초래된 것인지 알아보기 위해 COX₁ 억제약물들인 ibuprofen과 indomethacin을 SNP투여 15분전에 복강주사로 전처치하여 경시적으로 측정하였다(Fig. 10).²⁶⁾ 그 결과 SNP를 i.t.투여하여 유도한 hyperalgesia가 ibuprofen 전처치된 군에서는 60분 후, indomethacin 처리군에서는 30, 60분 후에 측정했을 때 경감하였음을 알 수 있었다. 이것은 Minani의 PGE₂와 PGF_{2 α} 를 i.t.투여하고 L-NAME과 MB 처리로 prostaglandin로 유발된 통증을 경감시켰던 실험결과와 연관지을 때,²⁷⁾ 척수에서의 hyperalgesia는 NO가 excitatory amino acid와 NMDA receptor를 통하여 생기게 한 LTP기전뿐만 아니라 prostaglandin생성을 매개해서 생기는 것도 포함되어 있으며, 따라서 NO의 척수통각전달로 상에서의 작용은 더 많은 연구가 필요하다.

결론

ACh(300 $\mu\text{g}/\text{paw}$, 20 $\mu\text{g}/5 \text{ml}$), L-Arg(300 $\mu\text{g}/\text{paw}$, 500 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), SNP(600 $\mu\text{g}/\text{paw}$, 10 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$)를 사용했을 때 내·외인성으로 유도된 nitric oxide는 말초감각 신경의 통각전도를 억제하여 analgesia를 야기하였고, 척수강내로 투여되면 hyperalgesia를 일으키는 상반된

두 개의 작용을 매개하였다. 말초에서 유발된 analgesia는 hemoglobin, NOS inhibitor인 L-NAME, L-NOArg, 그리고 methylene blue에 의해 감소되었고, 척수강내로 투여로 인한 hyperalgesia는 hemoglobin에 의해서 억제되었다. NO-cGMP pathway에서 ACh에 의한 NO의 생성과 반응에 Ca^{2+} antagonist(각 300 μ g/paw)들과 NOS inhibitors를 병용시에 이 pathway가 매개하는 말초진통효과가 더욱 감소하였다. NO의 말초진통효과에 대한 formalin test(2.5%, 0.05 ml/paw)결과 ACh, SNP, L-Arg는 제 1, 2상을 모두 억제하였으나, 제1상보다는 제2상을 억제하는 정도가 더 컸다. 척수강내로 SNP를 투여할 때 유도되는 hyperalgesia는 ibuprofen과 indomethacin을 전처리(각 100 mg/kg i.p.)하여 완화되었다.

문 헌

- 1) Ignarro, L. : Signal transduction mechanism involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* **41**(4), 485 (1991).
- 2) Stevens, C. : Is Nitric Oxide the Retrograde Messenger? *Science*, **254**, 1296 (1991).
- 3) Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maerke, Y. M. and Herman, A. G. : Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, **345**, 346 (1990).
- 4) Schuman, E. M. and Madison, D. V. : A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**, 1503 (1991).
- 5) Lundberg, J. M. : Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system; Integrative aspect on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acid and nitric oxide. *Pharmacol. Reviews*, **48**(1), 113 (1996).
- 6) Duarte, I. D. G., Lorenzetti, B. B. and Ferreira, S. H. : Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide- cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, **186**, 289 (1990).
- 7) Ferreira, S. H., Durate, I. D. G. and Lorenzetti, B. B. : The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia; stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, **201**, 121 (1991).
- 8) Duarte, I. D. G., Santos, I. R. d., Lorenzetti, B. B. and Ferreira, S. H. : Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, **217**, 225 (1992).
- 9) Przewlocki, R., Machelska, H., Przewlocka, B. : Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. *Life Science*, **53**, PL 1 (1993).
- 10) McCormack, K. : Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain*, **59**, 9 (1994).
- 11) SeanMurphy, Simmons, M. L. and Schwartz, J. P. : Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *TINS*, **16**, 323 (1993).
- 12) Haley, J. E., Dickenson, A. H. and Schachter, M. : Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology*, **31**(3), 251 (1992).
- 13) Moore, P. K., Oluyomi, A. O., Babbedge, R. C., Wallace, P. & Hart, S. L. : L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 198 (1991).
- 14) Bjeorkman, R., Hallman, K.M., Hedner, J., Hedner, T. and Henning, M. : Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain*, **57**, 259 (1994).
- 15) Lopachin, R. M. and Rudy, T. A. : An improved method for chronic catheterization of the rat spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.*, **27**, 559 (1981).
- 16) Yaksh, T. L. and Rudy, T. A. : Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.*, **17**, 1031 (1976).
- 17) Vocci, F. J., Petty, S. K. and Dewey, W. L. : Antinociceptive action of the butyl derivatives of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther*. **207**, 892 (1978).
- 18) Xu, J. Y., Pieper, G. M. and Tseng, L. F. : Activation of a NO-cyclic GMP system by NO donors potentiates -endorphin-induced antinociception in the mouse. *Pain*, **63**, 377 (1995).
- 19) Abbott, F. V., Franklin, K. B. J. and Westbrook, R. F. : The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain responses in rats. *Pain*, **60**, 91 (1995).
- 20) Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade M. and Woda, A. : Evidence for a peripheral origin of the

- tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain*, **61**, 11 (1995).
- 21) Kawabata, A., Fukuzumi, Y., Fukushima, Y. and Takagi, H. : Antinociceptive effects of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat : possible involvement of central opiodergic systems. *Eur. J. Pharmacol.*, **218**, 153 (1992).
- 22) Ialenti, A., Iannaro, A., Moncada, S. and Rosa, M. D. : Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 177 (1992).
- 23) Majeed, N. H., Przewloka, B., Machelska, H. and Przewloki, R. : Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology*, **33**, 189 (1994).
- 24) Yaksh, T. L., Dirksen, R. and Harty, G. J. : Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur. J. Pharmacol.*, **117**, 81 (1985).
- 25) Kitto, K. F., Haley, J. E. and Wilcox, G. L. : Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci. Lett.* **148**, 1 (1992).
- 26) Lauristen, K., Laursen, L. S., Kjelden, J., Bukhave, K. and Madsen, J. : Inhibition of eicosanoid synthesis and potential therapeutic benefits of dual pathway inhibition. *Pharmacol. Toxicol.* **75**, Suppl. 2, 9 (1994).
- 27) Minami, T., Nishihara, I., Ito, S., Sakamoto, K., Hyodo, M. and Hayaishi, O. : Nitric oxide mediates allodynia induced by intrathecal administration of prostaglandin E₂ or prostaglandin F₂ in conscious mice. *Pain*, **61**, 285 (1995).