

흰쥐의 발바닥 절개 통증모형에서 척수 후각의 c-fos 발현

전남대학교 의과대학 마취통증의학교실, *해부학교실

김학송 · 윤명하 · 최정일 · 배춘상*

= Abstract =

Spinal c-fos Expression in a Rat Model of Incisional Pain

Hak Song Kim, M.D., Myung Ha Yoon, M.D.
Jeong Il Choi, M.D. and Choong Sang Bae, M.D.*

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, *Department of Anatomy,
Medical School, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Background: The expression of the proto-oncogene c-fos in spinal cord neurons following various noxious stimuli has been demonstrated in numerous studies. However, the pattern of expression of c-fos after incisional stimulus has not been evaluated. This study was designed to examine c-fos expression in an incisional pain model of rats.

Methods: A 1 cm longitudinal incision was made through the skin, fascia and muscle of the plantar aspect of the hindpaw in enflurane-anesthetized rats. Withdrawal responses were measured using von Frey filaments at areas around the wound before surgery and for the next 48 hours. The expression of c-fos protein in the lumbar spinal cord was examined by immunohistochemistry.

Results: After incision, c-fos was strongly expressed within laminae I, II, III, IV, V and VI ipsilateral to the incision. C-fos positive neurons were detected in the contralateral site, as well.

Conclusions: These studies suggest that spinal c-fos protein may not be used as a specific marker for spinal nociceptive processing in an incisional pain model.

Key Words: C-fos, Incisional model, Spinal cord, Pain

서 론

수술 후 발생하는 통증은 급성 통증의 가장 대표

책임저자 : 윤명하, 광주광역시 동구 학동 8번지
전남대학교병원 마취과, 우편번호: 501-757
Tel: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294
E-mail: mhyoon@chonnam.ac.kr

이 논문은 2000년도 전남대학교병원 임상연구소 연구비
지원에 의해 연구되었음.

적인 형태로서 적절한 제통이 이루어지지 않을 경우
여러 신체 기관에 악영향을 미치게 된다. 따라서, 수
술 후 통증을 조절해주는 것이 환자의 결과를 개선
시키고 이병률을 감소시킬 수 있다.¹⁻³⁾ 특히, 수술 후
통증은 가만히 있을 때보다는 기침을 하거나 움직일
때 그리고 기계적 자극이 가해졌을 때 더 심해진
다.^{4,5)} 이러한 통증을 느끼게 하는 통각의 전달경로
에 대해서는 신경해부학적으로 비교적 잘 알려져 있
으나, 그 기전이나 증상의 경감 및 진통 기전에 대
해서는 아직도 알려져 있지 않는 점이 많다. 최근에

이르러 통증연구에 필요한 적절한 여러 가지 동물 실험모형이 개발됨으로써 수술적 조작에 의해 유발된 통증에 대한 많은 발전이 이루어졌다. 이중 수술 후 통증과 임상적으로 가장 비슷한 통증모형이 Brennan 등에⁶⁾ 의해 개발되었는데 이는 쥐의 발바닥을 절개함으로써 유발되며 기계적 자극에 대한 회피 역치 감소는 2일 이상 지속된다.

동물에서 통증을 측정하는 방법은 대체적으로 유해자극을 회피하려는 행동을 계량화하는 방법과 전기생리학적으로 신경전도속도를 측정하는 방법이 많이 사용되고 있으나, 최근에 와서는 종양유전자인 c-fos의 생산물질인 c-fos 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 검정방법이 개발되었고, 현재 널리 사용되고 있다.⁷⁾ 최근에는 급성 통증이 신경계 내부의 변형을 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 여겨지고 있으며 통증을 전달하는 신경로, 특히 1차 구심신경원인 척수신경절 신경원과 척수 후각에 어떤 변화가 나타나는지를 관찰하는 것이 주된 관심사가 되고 있다. 말초에 유해자극을 가하면 수분 내에 척수의 후각에서 c-fos mRNA가 급격히 발현되고 2시간에 최고조에 이르며 이러한 c-fos 양성 뉴론의 증가는 급성 유해자극을 전달하는 척수의 I, II층(laminae)에 국한된다고 알려져 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 반면 유해자극 8시간 후부터 시작되어서 16시간에 최고조에 이르는 또 다른 제 2의 c-fos 발현이 나타나게 되는데 이는 척수 후각 V-X층에서 일어나는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ Tsuda 등은¹²⁾ 발바닥 절개 2시간 후에 척수 후각의 I, II, V, VI층에서 c-fos 발현이 현저히 증가한다고 하였으나 지속적으로 통증을 보이는 절개 2일 후까지에 대해서는 알려진 바가 없다.

따라서 저자들은 흰쥐 발바닥 절개모형을 이용하여 통증을 유발시킨 후 척수 후각에서 시간 경과에 따른 c-fos 발현 정도를 관찰하여 통증에 대한 c-fos의 특이성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

체중 약 250–300 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐를 투명한 플라스틱 사각 상자에 넣고 엔플루란으로 마취를 유도한 후 안면마스크를 이용하여 마취를 유지하였다. 절개 통증모형 제작을 위해 흰쥐를 복와위 상태로 고정하고 절개할

발바닥 부위를 베타딘 용액으로 소독한 후 11번 메스를 이용하여 발뒤꿈치로부터 0.5 cm 상부에서 발가락 쪽으로 약 1 cm의 세로 절개를 가했다. 근막을 젖히고 나서 족저근(plantaris muscle)을 찾아 그 기시부와 정지부를 남기고 근 섬유 방향을 따라 세로로 절개하였으며, 가벼운 압력을 가하여 지혈을 시킨 후 5-0 나이론으로 피부와 근막을 봉합하고 봉합부위에 항생제 연고를 발라 주었다.

마취에서 각성시킨 후 신경학적 손상이 없는 쥐는 사육장에 넣어 물과 사료를 자유롭게 이용하게 하고 신경학적 손상을 보인 쥐는 사용하지 않았다.

수술 받은 쥐의 통증 정도는 기계적 자극에 의한 회피반응으로 평가하였다. 수술이 끝난 쥐는 투명한 철사 상자(21 × 27 × 15 cm)로 옮긴 후 약 20분 정도의 순응 기간을 보낸다. 기계적 자극은 von Frey filaments를 이용하였다. 철사 상자 바닥의 구멍을 통하여 von Frey filaments로 쥐의 발바닥에 자극을 가한 후 회피반응을 측정하였다. Filament 번호 3.22번부터 시작하여 filament가 약간 휘어질 정도로 6초씩 자극을 가했을 때 급작스런 발의 회피반응을 보이거나 발을 힘을 경우 양성반응으로 간주하였으며 이러한 자극을 5–10분 간격으로 실시하여 회피반응을 보이는 최하 filament 번호를 회피반응값으로 규정하였다. 측정순서는 먼저 수술 받은 발바닥에 자극을 가하여 회피반응값을 구하고, 이어서 수술을 받지 않은 발바닥에 자극을 가하여 회피반응값을 구하였다. 회피반응은 수술 후 1, 2, 6, 24 및 48시간에 측정하였으며, 수술 전 미리 측정하여 얻은 회피반응값을 대조값으로 하였다.

면역조직화학실험을 위한 표본제작은 회피반응 측정 때와 동일한 시각에 하였다. 먼저 조직의 고정 및 절편의 제작을 위해서 ketamine을 실험동물의 복강내로 주입하여 마취시킨 후 0.1 M phosphate buffer (PB)에 4% paraformaldehyde와 3% glutaraldehyde를 녹인 고정액으로 심장관류 고정을 시행하였다. 척수 분절을 확인한 다음 척수 전부를 분리하고 0.1 M PB에 4% paraformaldehyde를 함유한 고정액으로 4°C에서 12–16시간 후 고정한 다음 제 5요부 척수 분절을 적출하여 30% sucrose를 함유한 0.1 M PB에서 척수가 가라앉을 때까지 두었다가 드라이아이스를 이용한 동결슬라이딩 절편기(Reichert-Jung, Histoslide 2000)로 횡단면으로 20 μm의 연속절편을 얻어

c-fos 단백의 면역세포화학염색에 사용하였다. c-fos 단백의 검색을 위한 면역세포화학염색은 20 μm free floating 절편을 well에서 다음과 같이 실시하였다. (1) 0.01% triton X-100을 함유한 0.1 M PB에 20분간 세척한다. (2) 3% 정상혈청과 0.01% triton X-100을 함유한 0.1 M PB에 2시간 부치한다. 정상혈청은 이 차향체를 생산한 동물종의 혈청을 사용한다. (3) 0.01% triton X-100을 함유한 0.1 M PB에 60분간 세척한다. (4) 1 : 100 – 1 : 5,000으로 희석한 c-fos 단백에 대한 일차항체에 실온에서 2시간 혹은 4°C에서 18~24시간 반응시킨다. (5) 0.01% triton X-100을 함유한 0.1 M PB에 20분씩 세 차례 세척한다. (6) 1 : 400으로 희석한 biotinylated 혹은 peroxidase labelled goat anti-mouse IgG을 2시간 반응시킨다. (7) (5)번을 반복시킨다. (8) 1 : 1,000으로 희석한 ABC (Vector 사)나 PAP (Sigma 사) complex를 30분간 반응시킨다. ABC는 (6)에서 biotinylated IgG를 사용한 절편에, PAP는 (6)에서 peroxidase-labelled IgG를 반응시킨 절편에 사용한다. (9) (5)번을 반복한다. (10) 100 ml 0.1 M PB에 50 mg diamotetrahydrochloride와 33 ml 0.3% H₂O₂를 함유한 용액에 반응 발색시킨다. (11) Triton X-100을 함유하지 않은 0.1 M PB에 20분간 세척한다. (12) Chrome alum 젤라틴 피막 슬라이드에 절편을 올려 실온에서 공기 전조시킨다. (13) 일부 절편은 0.1% 오스미움산에 1~3분간 처리하여 발색을 강화시킨다. (14) ethanol로 탈수과정을 거친 다음 덮개유리를 씌워 관찰 할 수 있는 표본을 제작한다.

표본제작을 한 후 제 5요부 척수 후각에서 c-fos에 염색된 신경원의 수를 천층(superficial layer, laminae I, II)과 심층(deep layer)으로 나누어 계수 하였으며 심층은 nucleus proprius (laminae III, IV)와 neck (laminae V, VI)으로 구분하여 계수 하였다.

모든 자료는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 군내 비교는 Dunnett-test를 이용하여 분석하였고 군간 비교는 unpaired t-test를 이용하였으며 P값이 0.05 미만일 경우 통계적 유의수준으로 간주하였다.

결 과

절개모형제작 전 von Frey filament에 의한 기계적 자극에 대한 통증반응 및 절개술 후 반응은 Table 1과 같다. 수술 전 회피반응 값은 절개측에서 5.26이었고 반대측에서는 5.27이었다. 수술 후 절개측 회피반응 값은 대조 값에 비해 감소하였다가 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 양상을 보였다. 절개측 회피반응 값은 반대측에 비해 모든 시간대에서 통계학적으로 유의한 감소를 보였다.

수술 전 척수 후각의 c-fos 단백질 면역반응은 드물게 관찰되었다. 반면 절개모형에서 척수 후각의 c-fos 단백질 양성 면역반응은 척수 후각 신경원의 핵에 짙은 갈색의 과립 형태로 나타났다(Fig. 1). 절개모형을 이용하여 급성통증을 유발시킨 쥐에서의 시간경과에 따른 면역반응은 더욱 진해지고 자주 관찰되었다.

척수 후각 천층, 즉 I, II 층판에서 c-fos 면역반응 양성 신경원의 수는 수술 전 절개측의 척수 후각에서 평균 11.26 ± 3.35개, 반대측 척수 후각에서 평균 16.0 ± 6.98개이었으며 양측간에 통계적 차이는 없었다. 수술 후 시간경과에 따른 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원의 수는 절개측 척수 후각 천층에서 뿐 아니라 반대측 척수 후각 천층에서도 모든 시간대에서 정상대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가되어 있었다. 수술 후 24시간을 제외하고 양측간에 양성 신경원의 수의 통계적 차이는 없었다. 절

Table 1. Change of Von Frey Filaments Number after Incision

Time (h)	BI	1	2	6	24	48
Incisional site	5.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2 [†]	4.0 ± 0.1 [†]	4.2 ± 0.1 [†]	4.6 ± 0.1 [*]	4.9 ± 0.0*
Controlateral site	5.3 ± 0.1	5.3 ± 0.1 [§]	5.2 ± 0.1 [§]	5.2 ± 0.1 [§]	5.2 ± 0.1 [†]	5.2 ± 0.1 [†]

Values are mean ± SD (n = 20).

BI: before incision.

*P < 0.01, [†]P < 0.001 compared to preoperative value. [‡]P < 0.01, [§]P < 0.001 compared to controlateral site.

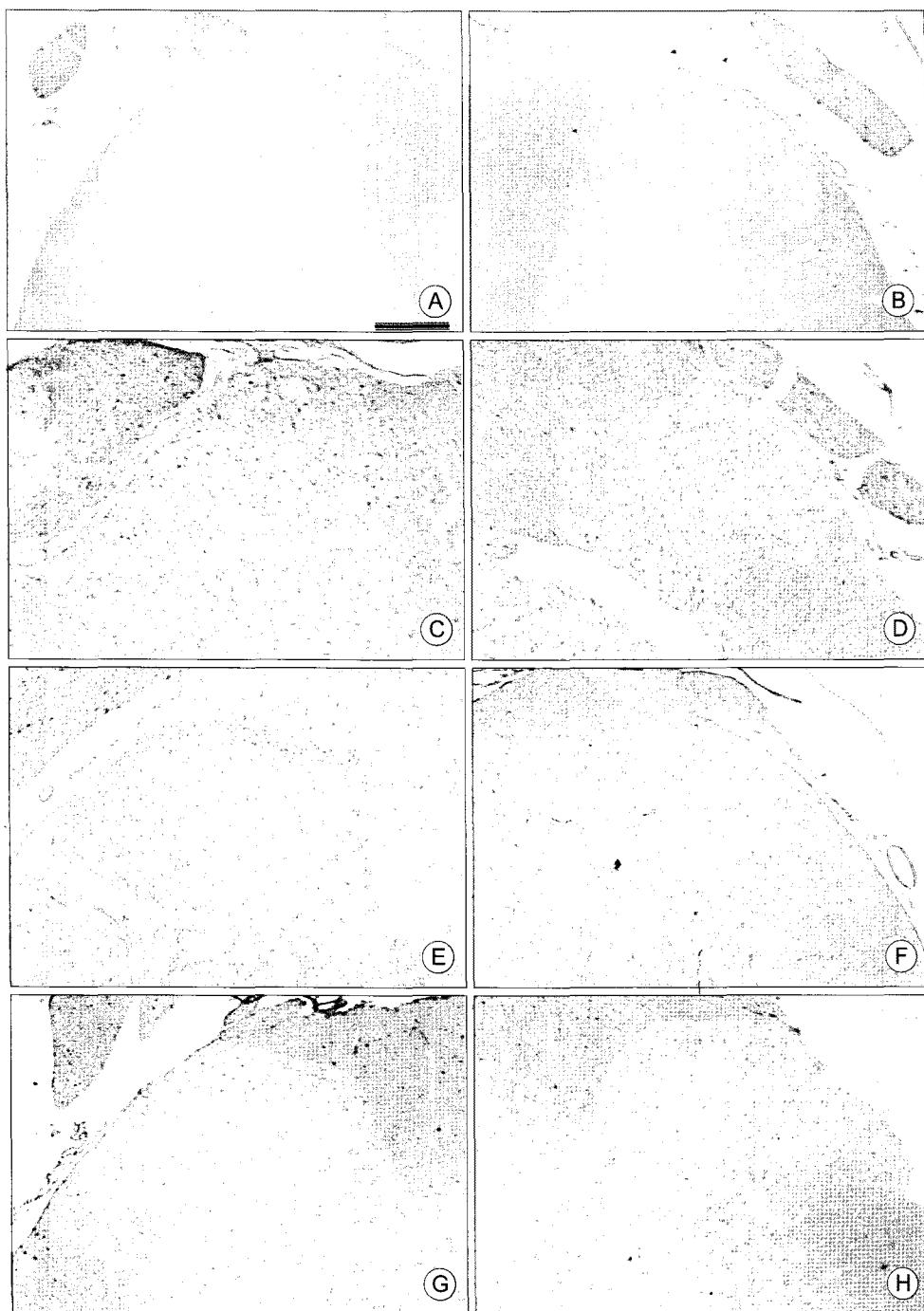


Fig. 1. Photomicrographs illustrating the c-fos expression following incision of plantar surface of rat hindpaw. C-fos expressed until 48 hours after surgery. C-fos positive neurons appeared not only in incisional site (figure A, C, E and G) but also in controlateral site (figure B, D, F and H). Figure A and B represent the control states (before incision). Figure C and D correspond to 1 hour after operation, figure E and F correspond to 24 hours after operation, figure G and H correspond to 48 hours after operation, respectively. Scale bar = 250 μ m

Table 2. Number of c-fos Positive Neurons in the L5 Superficial Dorsal Horn

Time (h)	BI	1	2	6	24	48	
Incisional site		11.26 ± 3.35	125.94 ± 4.19*	113.56 ± 5.42*	107.52 ± 4.64*	102.00 ± 2.55*†	93.00 ± 2.22*
Controlateral site		16.00 ± 6.98	112.10 ± 9.86*	102.25 ± 4.18*	98.50 ± 7.56*	87.00 ± 3.46*	81.89 ± 5.78*

Values are mean ± SD ($n = 5-8$ in each time).

BI: before incision.

* $P < 0.001$ compared to preoperative value. † $P < 0.05$ compared to controlateral site.

Table 3. Number of c-fos Positive Neurons in the L5 Deep Dorsal Horn

Time (h)	BI	1	2	6	24	48	
Incisional site	NP	1.47 ± 0.95	113.17 ± 6.80†	103.37 ± 3.27††	88.08 ± 4.37†	89.57 ± 2.92†	77.83 ± 5.50†
	N	6.21 ± 4.31	84.28 ± 5.08†	82.68 ± 4.58†	77.54 ± 5.29†	75.5 ± 2.29†	72.40 ± 2.42†
Controlateral site	NP	1.76 ± 1.31	98.76 ± 8.23†	90.25 ± 4.73†	87.00 ± 3.01†	89.33 ± 4.18*	74.75 ± 1.33†
	N	3.0 ± 2.07	74.68 ± 3.81†	78.87 ± 5.58†	74.50 ± 5.21†	72.17 ± 4.04†	70.13 ± 3.54†

Values are mean ± SD ($n = 5-8$ in each time).

BI: before incision, NP: nucleus propeius, N: neck.

* $P < 0.05$, † $P < 0.001$ compared to preoperative value. † $P < 0.05$ compared to controlateral site.

개모형군에서 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원 수는 절개 후 1시간에 최대로 증가하였다가, 그 이후에는 점차 감소하는 양상을 보였다(Table 2).

척수 후각 심층 중에서 III, IV (neucleus proprius-NP)와 V, VI (neck-N) 층판에서 c-fos 단백질 면역반응 양성 신경원의 수는 수술 전 절개측의 NP에서 평균 1.47 ± 0.95 개, N에서 평균 6.21 ± 4.31 개이었고 반대측의 NP에서 평균 1.76 ± 1.31 개, N에서 평균 3.0 ± 2.07 개로 나타났다. 절개 후 척수 후각 심층에서 절개측의 c-fos 단백질 양성 신경원의 수는 천층과 유사한 형태로 절개 후 1시간에 가장 크게 증가한 후 점차 감소하는 양상을 보였다. 반대측 c-fos 단백질 양성 신경원의 수도 정상대조군에 비해 모든 시간대에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였다. 시간경과에 따라 양측의 c-fos 단백질 양성 신경원의 수를 비교해보면 수술 후 2시간을 제외하고는 통계적 차이가 없었다(Table 3).

고 찰

본 실험결과 절개 통증모형 하에서 통증은 수술

후 2일까지 지속되었으며 척수 후각에서 c-fos 단백질 양성 신경원의 수도 수술 전에 비해 수술 후 2일 까지 증가되어 있었다. 또한, c-fos 양성 신경원 수는 절개측 뿐만 아니라 반대측에서도 증가하였다.

최근 c-fos 단백질을 면역조직화학적으로 관찰하는 형태학적 검정방법이 개발되어 사용중이나¹³⁾ c-fos 단백질을 통증 정도와 진통효과를 검정하는 방법으로 사용할 수 있는지에 대해서는 아직 명확하지 않다. c-fos는 원종유전자(proto-onco gene)인 v-fos의 세포동족체로서 성장인자나 신경전달물질에 의해 수분 내에 다양한 형태의 세포에서 활성화된다.¹⁴⁾ Williams 등은⁸⁾ 말초 침해자극이 가해진 쥐의 척수 후각 신경원에서 c-fos 유전자와 c-fos의 생산물질인 Fos 단백질이 발현되므로 척수 후각의 통각경로의 활성을 측정하기 위해 c-fos mRNA의 산물인 c-fos 단백질을 항원으로 하는 면역조직화학방법을 개발하였다. 이후 말초신경에 가한 여러 종류의 유해자극과 척수 후각에서의 c-fos 발현의 상관성에 대한 연구가 보고되었다.^{15,16)}

1987년 Hunt 등은¹⁷⁾ 침해자극이 척수 후각 신경원의 c-fos mRNA를 발현시키고 그 2시간 후에는 c-fos

단백질이 발현되며 이를 면역조직화학적 방법으로 염색할 수 있다고 보고하였다. 이와 같이 침해자극으로 인한 c-fos mRNA의 활성화는 자극이 가해진 수분 내 시작되어 대략 30~40분 정도 후에 c-fos mRNA의 생산이 최대가 되지만 c-fos 단백질은 약 2~3시간 후에 발현되는 양이 가장 많아지는데 이는 단백질 합성에 어느 정도의 시간이 소요되기 때문인 것으로 추측하였다.¹⁸⁾ 세포에서 발현된 c-fos mRNA는 매우 불안정하여 발현 후 수분 내에 adenine이 제거되어 불활성화된다.¹⁹⁾ Williams 등의⁸⁾ 연구에 의하면 침해고온자극 후 척수 후각의 천층에서는 2시간 후에 c-fos 단백질의 발현이 최고로 증가하였고 시간이 지남에 따라 점차 감소하여 8시간 후에는 거의 정상으로 돌아온 반면, 심층에서는 8시간 후부터 c-fos 단백질이 발현되기 시작하여 24시간 후까지도 발현이 지속되었다고 보고하였다. 이원택 등은²⁰⁾ 신경병증성 통증모델의 경우 c-fos 단백질이 천층 보다 늦게 발현되고 오래 지속되며, 손상 반대쪽에도 유의하게 c-fos 단백질의 발현이 증가되어 있다고 보고 하였는데 이는 통각자극이 있을 경우 처음에는 천층의 신경원에 분자생물학적 변화가 일어나며, 이러한 변화는 시간이 경과하면서 척수 후각의 심층으로 파급되기 때문인 것으로 추측하였다.

말초에 침해자극이 가해질 때 이에 대한 정보는 A_δ와 C 섬유에 의해 척수의 세포로 전송되게 된다. 침해자극이 가해진 후 c-fos가 발현되는 척수 후각의 신경원 분포는 일정한 형태를 보이게 되는데 전형적으로 이러한 척수 신경세포들은 주로 척수 후각의 laminae I과 IIo (II의 외측), 그리고 laminae V와 VI에 위치한다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 척수 후각의 Rexed laminae 중 I과 II는 뇌간 핵들로부터 밀집된 투사를 받으며, 작은 직경의 일차 구심성 신경들 또한 I과 II에서 끝난다. 유수 일차 구심성 신경들과 laminae I과 II에서 통증 인지의 중재에 관여하는 뇌간으로부터 온 신경들은 더 깊이 위치해 있는 lamina V와 같은 곳으로 투사된다. 화학적, 열 또는 기계적 자극 등 여러 가지 다른 종류의 침해자극에 의해 유도되어진 c-fos 발현의 충간 분포에서의 차이는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.²¹⁾ 왜냐하면 이러한 차이가 침해자극의 질(quality)에서의 차이와 연관되어 있는지 아니면 자극의 상대적 강도에서의 차이와 연관되어 있는지를 결정하기가 쉽지 않기 때문이다. 또한,

침해자극에 대한 반응으로 나타나는 c-fos의 척수 신경원 분포는 무해자극과는 다른 분포를 보이게 된다. 즉 무해성 자극(깃털로 피부를 쓸어 내리거나 판절 부분을 부드럽게 움직이는 것)은 lamina II (III)의 내측과 NP에서 주로 c-fos의 발현이 나타나게 된다.¹⁹⁾ 또한 걸어 다니는 것과 같은 촉각자극(tactile stimulation)에 대한 반응으로 c-fos 발현이 되는 곳은 laminae III에서 IV까지라고 보고되어 있다.²²⁾ 그러나 이러한 분류법이 항상 일치하는 것은 아니다. 예를 들어 히스타민을 피부에 국소 도포 함으로써 유발시킨 가려움증(itch)은 척수 후각의 laminae I과 II에서 c-fos 발현을 유도한다. 이러한 c-fos 발현은 morphine을 전처치 함으로써 감소시킬 수 있다.²³⁾ 그러나 통증을 일으키지 않는 감각자극에 의해서는 척수 후각에서 c-fos가 발현되지 않는다는 보고도 있다.¹⁷⁾

한편, c-fos에 대한 대부분의 연구에서 c-fos 발현은 침해자극에 대한 반응으로 나타나는 척수의 변화이며 그 발현정도를 평가함으로써 통증정도를 파악할 수 있는 방법이 되지 않을까 생각되고 있으며 지금도 침해자극과 c-fos 발현과의 관계를 규명하는데 많은 연구가 집중되어 있다. 척수에서 침해(nociception)와 c-fos 발현과의 사이에 상관관계가 있다는 사실은 c-fos 발현에 침해반사 및 통증과 연관된 여러 행동들이 변화를 줄 수 있다는 사실에 의해 뒷받침된다. 척수신경원에서 침해자극에 의해 유도된 c-fos 발현은 morphine, indomethacin과 ketoprofen을 포함한 진통제의 투여에 의해서 뿐 아니라 noradrenaline, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 길항제, nitric oxide의 합성 억제제처럼 척수 수준에서 침해 과정을 조절하는 약제의 투여에 의해서 억제된다.²⁴⁻²⁶⁾ 그러나, 다른 연구에 따르면 통증과 c-fos 발현과는 별개라는 보고도 있다. Presley 등은¹⁶⁾ 다량의 morphine을 투여 받은 쥐에서 회색된 포르말린을 쥐의 뒷발바닥에 주입했을 때 통증과 관련된 행동을 관찰하지 못하였지만 척수의 천층에서 상당량의 c-fos 발현을 관찰하였다고 보고하였다. 따라서 척수에서의 c-fos 발현은 통증과는 관계가 없고 침해 전달과정이 아닌 다른 과정에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 사료된다.

침해의 신경학적 기초에 대한 연구의 도구로서 c-fos 발현을 이용하는 것은 여러 가지 장점이 있다. 첫째, 다른 수기에 비해서 침해 자극에 대한 반응으로 나타나는 신경원들의 위치를 좀 더 정확하게 파

악할 수 있다. 둘째, c-fos 발현은 *in situ hybridization*에 의해 c-fos mRNA 또는 Fos를 염색하여 나타나는 신경원의 수를 기록함으로써 쉽게 알 수 있다.셋째, 척수에 대한 전기생리학적 기록과는 달리 c-fos 기법은 침해 자극이 가해지는 동안 마취를 필요로 하지 않으므로 각성상태에서 침해 과정을 측정할 수 있다. 이렇게 침해 과정에 대한 연구 도구로서 c-fos 발현 정도를 관찰하는 것은 여러 가지 장점이 있지만 여러 가지 문제점 역시 지니고 있다. 첫째, c-fos 발현 유도는 전기생리학적 기록에 의해 얻어지는 정보에 비하면 그렇게 극적이지는 않다. 둘째, c-fos를 검사하는데 있어서 또 다른 문제는 c-fos가 활성화될 때 모든 신경세포가 c-fos 단백질을 발현시키지 않는다는 것이다.²⁷⁾ 결론적으로 신경학적 활성도의 기능적 표지자로서 c-fos를 이용하게 될 때에는 위음성으로 잘못된 해석을 내릴 위험성이 있을 뿐 아니라 또한 위양성의 위험성도 존재하게 된다. 왜냐하면 c-fos 유전자를 발현시키는데 어떠한 사건이 직접 관계되었는지를 정확히 아는 것이 매우 어렵기 때문에 이러한 문제점이 발생하게 된다. 예를 들어 유해 자극의 결과로서 나타나는 c-fos 발현은 일반적으로 생각하듯이 침해 과정과 관계가 있을 것으로 생각하지만 또한 통증에 의해 유발된 스트레스 반응의 일부와 관련이 있을 수도 있으며 심지어 수면 방해와 같은 것에도 관계가 있을 수 있기 때문이다.²⁸⁾

많은 연구들에 따르면 침해자극이 가해진 측과 동측인 척수 후각을 실험군으로 삼고 침해 자극이 가해진 측과 반대측인 척수 후각을 대조군으로 사용하였다. 그러나 침해 자극이 오랜 시간동안 유지된 경우와 쥐가 충분히 마취되지 않은 상태에서 자극이 가해지는 실험 연구에서는 반대측 척수를 대조값으로 사용하는 것은 적절하지 않다. 왜냐하면 이와 같은 경우에는 침해자극이 가해지지 않은 반대측 척수 신경원에서도 c-fos 발현이 증가하기 때문이다.¹⁶⁾ 이렇게 반대측 척수 신경원에서도 어느 정도의 c-fos 발현이 일어나는 것은 쥐가 손상 받은 발바닥을 보호하기 위한 행동으로 반대측 발바닥에 더 많은 체중을 가하면서 반대쪽으로부터 직접적인 감각 자극이 들어오기 때문이라고 한다.¹⁶⁾ 따라서 본 실험에서처럼 반대측 척수에서 c-fos 발현이 나타나는 것은 절개하지 않은 발바닥에 오랜 시간 가해진 압력이 유해자극처럼 유입되기 때문인 것으로 사료된다. 본

실험결과 절개후 발의 통증이 2일 동안 계속되었으므로 반대측 발에 압력도 지속적으로 가해 졌을 것으로 생각된다. 그러므로 침해자극이 가해지지 않은 측 척수 신경원에서의 c-fos 발현이 증가했다고 해서 이런 현상을 원래의 침해자극과 관계가 있거나 원래의 침해자극이 반대측까지 확산되었다고 결론 내리는 것은 적절하지 못하다.

본 실험에서 절개 후 c-fos 단백질 양성 신경원의 수가 최고에 이른 시점은 천층과 심층 모두에서 절개 후 1시간짜리였으며 척수 후각심층에서 제 2의 c-fos 발현 증가 소견도 보이지 않아 다른 연구들과는 상이한 결과를 보였다.²⁹⁾ 그러나 이러한 차이에 대해서 본 실험으로는 그 이유를 알 수가 없었다. 절개 후 시간이 경과함에 따라 척수 후각에서 발현되는 c-fos 단백질 양성 신경원의 수가 감소하였는데 이는 절개 후 절개측 통증이 시간이 경과함에 따라 감소했기 때문으로 사료된다.

결론적으로 본 실험연구에 따르면 발바닥 절개 통증모형에 의한 침해자극 유발 시 통증 유발측 척수 후각뿐만 아니라 반대측에서도 c-fos 단백질이 발현되므로 c-fos 단백질을 통증 정도와 진통효과를 검정하는 특이적 표지자로 사용하기에는 적절하지 않을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Brodner G, Van Aken H, Hertle L, Fobker M, Von Eckardstein A, Goeters C, et al: Multimodal perioperative management-combining thoracic epidural analgesia, forced mobilization, and oral nutrition-reduces hormonal and metabolic stress and improves convalescence after major urologic surgery. *Anesth Analg* 2001; 92: 1594-600.
2. Litz RJ, Bleyl JU, Frank M, Albrecht DM: Combined anaesthesia procedures. *Anaesthetist* 1999; 48: 359-72.
3. Fung BK, Gislevoss AJ, Ho ES: Continuous epidural morphine and lidocaine for postoperative pain control in obstetric and gynecologic operation. *Acta Anesthesiol Sin* 1994; 32: 247-50.
4. Mogensen T, Eliasen K, Ejlersen E, Vegger P, Nielsen IK, Kehlet H: Epidural clonidine enhances postoperative analgesia from a combined low-dose epidural bupivacaine and morphine regimen. *Anesth Analg* 1992; 75: 607-10.
5. Johansson B, Glise H, Hallerback B, Dalman P, Kris-

- tofferson A: Preoperative local anesthetic infiltration with ropivacaine for postoperative pain relief after cholecystectomy. *Anesth Analg* 1994; 78: 210-4.
6. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF: Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996; 64: 493-501.
 7. Abbadie C, Besson JM, Calvino B: C-fos expression in the spinal cord and pain-related symptoms induced by chronic arthritis in the rat are prevented by pretreatment with Freund adjuvant. *J Neurosci* 1994; 14: 5865-71.
 8. Williams S, Evan G, Hunt SP: Spinal c-fos induction by sensory stimulation in neonatal rats. *Neurosci Lett* 1990; 109: 309-14.
 9. Williams S, Evan GI, Hunt SP: Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. *Neuroscience* 1990; 36: 73-81.
 10. Williams S, Pini A, Evan G, Hunt SP: Processing of sensory information in the superficial dorsal horn of the spinal cord. Molecular events in the spinal cord following sensory stimulation, Edited by Cervero F, Bennett GL, Headley PM. New York. Plenum Press. 1989, 273-84.
 11. Munglani R, Hunt SP: Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 186-92.
 12. Tsuda M, Koizumi S, Inoue K: Role of endogenous ATP at the incision area in a rat model of postoperative pain. *Neuroreport* 2001; 12: 1701-4.
 13. Abbadie C, Besson JM: Effect of morphine and naloxone on basal and evoked Fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats. *Pain* 1993; 52: 29-39.
 14. Greenberg ME, Greene LA, Ziff EB: Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 14101-10.
 15. Birder LA, de Groat WC: Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *J Neurosci* 1992; 12: 4878-89.
 16. Presley RW, Menetrey D, Levine JD, Basbaum AI: Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990; 10: 323-35.
 17. Hunt SP, Pini A, Evan G: Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-4.
 18. Sagar SM, Sharp FR, Curran T: Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; 240: 1328-31.
 19. Greenberg ME, Shyu AB, Belasco JG: Deadenylation: a mechanism controlling c-fos mRNA decay. *Enzyme* 1990; 44: 189-92.
 20. 이원택, 손민근, 정경승, 이홍석, 박경아: 말초신경 손상이 실험적으로 유발된 흰쥐의 척수신경절 및 척수 후각대 신경세포의 형태학적 변화에 관한 연구. 대한해부학회지 1997; 30: 495-510.
 21. Lima D, Avelino A, Coimbra A: Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 1993; 4: 747-50.
 22. Jasmin L, Gogas KR, Ahlgren SC, Levine JD, Basbaum AI: Walking evokes a distinct pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 1994; 58: 275-86.
 23. Yao GL, Tohyama M, Senba E: Histamine-caused itch induces Fos-like immunoreactivity in dorsal horn neurons: effect of morphine pretreatment. *Brain Res* 1992; 599: 333-7.
 24. Zahn PK, Brennan TJ: Intrathecal metabotropic glutamate receptor antagonists do not decrease mechanical hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Anesth Analg* 1998; 87: 1354-9.
 25. Zahn PK, Brennan TJ: Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiology* 1998; 88: 143-56.
 26. Zahn PK, Brennan TJ: Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiology* 1999; 90: 863-72.
 27. Dragunow M, Faull R: The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 1989; 29: 261-5.
 28. Grassi-Zucconi G, Menegazzi M, De Prati AC, Bassetti A, Montagnese P, Cosi C, et al: C-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1071-8.
 29. Honore P, Catheline G, Le Guen S, Besson JM: Chronic treatment with systemic morphine induced tolerance to the systemic and peripheral antinociceptive effects of morphine on both carrageenan induced mechanical hyperalgesia and spinal c-Fos expression in awake rats. *Pain* 1997; 71: 99-108.