

## Naloxone이 흰쥐 Formalin Test에서 Morphine의 진통효과와 척수 c-fos 유전자 발현에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 마취통증의학교실, \*생화학분자생물학교실, †외과학교실  
송선옥 · 석제홍 · 이덕희 · 박대팔 · 김성용\* · 임정숙\* · 송선교<sup>†</sup> · 이남혁<sup>†</sup>

= Abstract =

### Effects of Naloxone on Morphine Analgesia and Spinal c-fos Expression in Rat Formalin Test

Sun Ok Song, M.D., Je Hong Seok, M.D., Deok Hee Lee, M.D., Dae Pal Park, M.D.,  
Seong Yong Kim, M.D.\*, Jeong Sook Lim, B.S.\*, Sun Kyo Song, M.D.<sup>†</sup>, and Nam Hyuk Lee, M.D.<sup>†</sup>

Departments of Anesthesiology and Pain Medicine, \*Biochemistry & Molecular Biology  
and †Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

**Background:** This study was performed to evaluate the dose-related effects of naloxone on morphine analgesia in the rat formalin test, and observe the correlation of pain behavior and spinal c-fos expression induced by a formalin injection.

**Methods:** Fifty rats were divided into five groups; control, morphine (morphine pre-treated, intra-peritoneal injection of 0.1 mg of morphine 5 min prior to formalin injection), and three naloxone groups, which were divided according to the administered dose-ratio of naloxone to morphine; 20 : 1 (5  $\mu$ g), 10 : 1 (10  $\mu$ g), and 1 : 1 (100  $\mu$ g) representing the low-, medium-, and high-dose naloxone groups, respectively, were injected intra-peritoneally 16 min after a formalin. A fifty  $\mu$ l of 5% formalin was injected into the right hind paw. All rats were observed for their pain behavior according to the number of flinches during phases 1 (2-3, 5-6 min) and 2 (1 min per every 5 min from 10 to 61 min). The spinal c-fos expression was quantitatively analyzed at 1 and 2 hours after the formalin injection using a real-time PCR.

**Results:** The morphine pre-treated (morphine and three naloxone) groups during phase 1, and the morphine, low- and medium-dose naloxone groups during phase 2, showed significantly less flinches compared to those of the control ( $P < 0.05$ ). In the three naloxone groups, the numbers of flinches were transiently reduced following the naloxone injection in the low- and medium-dose groups compared to those of the morphine group ( $P < 0.05$ ). The duration of the reduced flinches was longer in the medium-dose group ( $P < 0.05$ ). The high-dose group revealed immediate increases in flinches immediately after the naloxone injection compared to those of the morphine, low- and medium-dose groups ( $P < 0.05$  for each). The spinal c-fos expression showed no significant patterns between the experimental groups.

**Conclusions:** Our data suggest that relatively low-dose naloxone (1/20 to 1/10 dose-ratio of morphine) transiently potentiates morphine analgesia; whereas, high-dose (equal dose-ratio of morphine) reverses the analgesia, and the spinal c-fos expression does not always correlate with pain behavior in the rat formalin test. (Korean J Pain 2005; 18: 124-132)

**Key Words:** analgesia, c-fos expression, formalin test, morphine, naloxone, pain behavior.

### 서 론

Naloxone (6-oxy-17-propenyl morphine)은  $\mu$ 형 오피오이드 수

용체의 길항제로서 임상에서 오피오이드 투여 후 초래될 수 있는 심한 진정과 호흡억제 등의 부작용을 치료하는데 흔히 사용되고 있다. Naloxone이  $\mu$ 형 오피오이드의 부작용은 신속하게 치료하지만 오피오이드의 진통효과에 미치는

접수일 : 2005년 11월 17일, 승인일 : 2005년 12월 9일

책임저자 : 송선옥, (705-717) 대구광역시 남구 대명동 317-1, 영남대학교병원 마취통증의학과

Tel: 053-620-3365, Fax: 053-626-5275, E-mail: sosong@med.yu.ac.kr

박사학위 논문임.

이 논문은 제11차 World Congress on Pain (IASP), 2005, Sydney, Australia에서 발표되었음.

Received November 17, 2005, Accepted December 9, 2005

Correspondence to: Sun Ok Song, Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Yeungnam University, 317-1 Daemyeong-dong,

Nam-gu, Daegu 705-717, Korea. Tel: +82-53-620-3365, Fax: +82-53-626-5275, E-mail: sosong@med.yu.ac.kr

This article is a doctoral dissertation.

This article was poster presented at 11th World Congress on Pain (IASP), 2005, Sydney, Australia.

영향에 대해서는 현재까지 논란이 많다. Morphine의 진통효과를 역전한다는 보고들과<sup>1-4)</sup> 진통효과에 영향을 미치지 않거나 오히려 진통효과를 증강시킨다는 보고들이<sup>5-7)</sup> 있다. 하지만 일반적으로는 임상에서 naloxone이 다량에서는  $\mu$ 형 오피오이드의 진통작용을 역전시키고 소량에서는 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 왔다. 뿐만 아니라 naloxone 자체가 통증에 미치는 영향에 대해서도 서로 상반된 결과들이 보고되어 있다. Buchsbaum 등은<sup>8)</sup> naloxone 자체가 통증 역치를 감소시킨다고 하였고, Grevert와 Goldstein이나<sup>9)</sup> Stacher 등은<sup>10)</sup> 통증 역치에는 영향이 없고 통증에 의한 불안을 가중시킨다고 하였으며 Ueda 등은<sup>11)</sup> naloxone 자체가 통증을 완화시키는 효과가 있다고 하였다.

Naloxone이 morphine 진통효과에 미치는 영향이 이처럼 중요하게 논의되는 이유는 크게 두 가지가 있다. 첫째는 임상적으로 오피오이드와 소량의 naloxone을 혼합하여 사용하면 오피오이드의 부작용 및 소모량을 줄일 수 있으므로 최대효과를 나타내는 적정 용량의 naloxone을 사용하여야 한다는 것이고, 둘째는 기초 연구에서 오피오이드의 작용을 역전시키기 위해서는 다량의 naloxone을 사용하여야 한다는 것이다. 따라서 목적에 맞게 naloxone의 용량을 적절하게 선택하는 것이 중요하다. 예를 들면, Gan 등은<sup>5)</sup> 자가통증조절장치를 이용한 수술 후 통증관리에서 morphine을 단독으로 사용한 경우보다 저용량의 naloxone과 혼합하여 사용한 경우에 환자들의 morphine 소모량이 적어 naloxone이 morphine의 진통효과를 증강시킨다고 하면서 morphine과 소량의 naloxone 병용이 임상적으로 이점이 있음을 보고하였다. 한편, 어떤 약제의 작용 기전을 규명하는 기초 연구에서는 naloxone 투여로 인해 진통작용이 역전되면 약제의 작용 기전이  $\mu$ 형 오피오이드 수용체에 작용하여 나타난 것으로,<sup>12)</sup> 역전되지 않으면 오피오이드 수용체에 작용하지 않는 것으로<sup>13)</sup> 해석하고 있다. 그러나 Song 등은<sup>6)</sup> 오피오이드의 말초성 진통효과를 규명하기 위해 formalin 통증 반응에서 morphine을 침윤한 후 naloxone을 투여한 결과, naloxone이 morphine의 진통효과를 역전시키기보다 오히려 증강시키는 경향이 있다고 보고하면서 증강된 이유를 투여된 morphine 양에 비해 naloxone의 용량이 적었기 때문이라고 하였다.

한편, 통증을 유발하는 말초 침해성 자극은 척수에서 자극 초기에 발현되는 immediate early gene 중의 하나인 c-fos 유전자 발현을 유발하는데, 이를 근거로 c-fos 유전자 발현 정도가 항침해 효과를 나타내는 약제를 연구하는데 많이 이용되고 있다.<sup>14)</sup> 그러나 c-fos 유전자 발현 정도가 통증 반응과 일치하느냐에 대한 논란이 최근 제기되고 있다.<sup>15-21)</sup> Tolle 등이<sup>22)</sup> morphine 투여가 척수 c-fos 발현을 억제하고 naloxone이 이를 역전한다고 보고한 반면, Abbadie 등은<sup>17)</sup> formalin test에서 통증 반응이 완전히 억제되어도 척수 c-fos 발현은 억제되지 않는다고 하여, 통증 반응과 c-fos 유전자 발현 정도와는 연관성이 없음을 보고하였다.

이에, 본 연구에서는 naloxone이 morphine의 진통효과에 미치는 영향을 규명하고자 수술 후 통증모델로서 많이 이용되고 있는 흰쥐 formalin test에서<sup>23,24)</sup> morphine 투여 후 naloxone을 투여한 morphine과 용량비가 다르게 투여하고 naloxone 용량에 따른 formalin 통증 반응의 변화를 관찰하였다. 아울러 척수에서의 c-fos 유전자 발현 정도가 침해성 자극의 간접적인 통증 지표로서 유의한가를 알아보기 위해 formalin 통증 반응을 관찰한 후 척수의 c-fos 유전자 발현 정도를 측정하였고 통증 반응과 척수 c-fos 유전자 발현의 연관성을 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

체중 250-300 gm의 흰쥐(Sprague-Dawley) 수컷 50마리를 대상으로 실험 모형에 따라 formalin test를 시행하여 통증 반응으로 통증 정도를 평가하였고, 통증 반응 관찰 후 실험동물의 요추부 척수에서 c-fos 유전자 발현 정도를 관찰하였다.

실험동물들은 실험 개시 하루 전에 실험실에 운반되어 먹이와 물을 자유롭게 먹으면서 12시간의 밤낮주기(light-dark cycle)를 지냈다. 일내변동(diurnal variation)과 온도가 통증 반응에 미치는 영향을 고려하여 실험 시간은 오후 1시에서 5시 사이에 하였고, 실험실 온도는 24°C 내지 25°C로 유지하였다. 실험동물을 실험 개시 1시간 전에 동물의 관찰을 위해 특수 제작한 투명유리 관찰 상자(30 × 40 × 30 cm)에 넣어 실험 환경에 익숙해지도록 하였다.

### 2. 실험 모형: 실험군 분류

흰쥐 50마리를 대조군과 morphine군 및 세 개의 naloxone 역전군(5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g)으로 각 군 10마리씩 분류하였다. 대조군은 전신마취 시작 10분 후 즉, formalin 주사 5분 전에 생리식염수 0.2 ml를 복강 내 주사하였고 formalin 주사 16분 후에 다시 생리식염수 0.2 ml를 복강 내 주사하였다. Morphine군은 formalin 주사 5분 전에 0.1 mg/0.2 ml의 morphine (염몰편주사<sup>®</sup>, 하나제약, 서울)을 복강 내 주사하였고 formalin 주사 16분 후에 생리식염수 0.2 ml를 복강 내 주사하였다. Naloxone 역전군은 용량비에 따라 저용량군, 중용량군, 고용량군으로 분류하였는데 세 군 모두 morphine군과 동일하게 formalin 주사 5분 전에 복강 내로 0.1 mg/0.2 ml의 morphine을 주사하였다. Formalin 주사 16분 후에 저용량군(low-dose naloxone group, Low N)은 투여한 morphine 용량과의 용량비가 20 : 1인 5  $\mu$ g/0.2 ml의 naloxone을, 중용량군(medium-dose naloxone group, Med. N)은 10 : 1인 10  $\mu$ g/0.2 ml을, 고용량군(high-dose naloxone group, High N)은 1 : 1인 100  $\mu$ g/0.2 ml의 naloxone (Naloxone Hydrochloride, 삼진제약, 서울)을 복강 내로 주사하였다(Fig. 1).

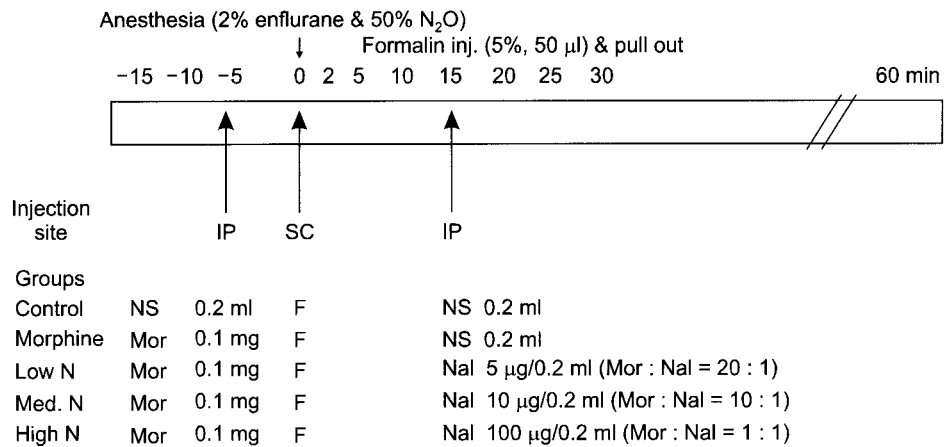


Fig. 1. The time schedule of procedures in experimental groups for formalin test animals. All animals received inhalation anesthesia for 15 min before the formalin injection. Experimental groups were divided into five; control (IP injection of 0.2 ml of normal saline 5 min prior to the formalin injection), morphine (IP injection of 0.1 mg/0.2 ml of morphine 5 min prior to the formalin injection) and three naloxone groups (IP injection of 5 µg, 10 µg, and 100 µg of naloxone for low-, medium-, and high-dose groups, respectively, 16 min after formalin injection in morphine pre-treated rats). Under enflurane anesthesia, all were injected with an agent according to their allocated groups followed by the SC injection of 50 µl of 5% formalin in the distal plantar area of the right hind paw. After recovery from anesthesia, all animals were observed for the number of flinches during phase 1 (2-3 min, 5-6 min) and 2 (every 1 min from 10 to 61 min) after the formalin injection. IP: intraperitoneal, SC: subcutaneous, NS: normal saline, F: formalin, Mor: morphine, Nal (N): naloxone.

### 3. Formalin test와 행동 관찰

본 연구에서는 전신마취하에서 시행되는 임상 수술과 같은 조건을 주기 위해 전신마취 하에서 formalin test를 시행하였다. 전신마취를 위해 투명한 플라스틱 마취 상자(30 × 18 × 22 cm)에 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>O (각각 분당 4 L) 및 enflurane (2%)을 유입하면서 10분 후에 실험동물을 마취상자 속에 넣었다. 흡입마취 시작 15분 후에 5% formalin 용액 50 µl를 투버클린 주사기에 30 G 바늘로 우측 족저 원위부에 피하주사하였다. Formalin 주사 후에 마취 상자에서 관찰 유리상자로 옮겼다(Fig. 1). 옮겨진 동물은 1분 내지 2분 내에 비틀거리며 일어났고 formalin이 주사된 발을 핥거나 물어뜯거나 혹은 flinching 등의 행동을 나타냈는데, 본 연구에서는 flinching 회수(flinch 수)로 통증 정도를 관찰하였다.

관찰 시기는 각 군에서 formalin 주사 후 관찰 유리상자로 옮긴 후, 즉 formalin 주사 후 2분에서 3분 사이(실험동물이 마취에서 깨어나 비틀거리지 않고 다닐 수 있는 시기)와 5분에서 6분, 그리고 이후는 10분에서 61분 사이를 5분 간격으로 1분간씩 flinch 수를 관찰하였다. 여기서 제1기 반응은 2분에서 3분 사이와 5분에서 6분사이의 평균 flinch 수로, 제2기 반응은 10분에서 61분 사이의 평균 flinch 수로 통증 정도를 비교하였다.

### 4. 척수신경 표본 획득 및 c-fos 유전자 발현 관찰

대조군과 morphine군 및 세 개의 naloxone 역전군은 formalin 주사 후 한 시간 동안 통증 반응을 관찰한 후, formalin 주사

1시간 및 2시간 후에 각 군에서 각각 5마리씩 formalin 주사를 시행한 동측(우측)의 하부 요추(제 4번과 제 5번) 척수신경의 배부를 얻어 액체 질소에 냉동하여 -80°C에서 보관하였다.

얻어진 척수신경 표본에서 RNA를 정제한 후 real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)을 이용하여 c-fos 유전자의 발현 정도를 측정하였고, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 생성물을 전기영동으로 확인하였다. 각 실험 방법은 다음과 같다.

**1) Total RNA 정제:** RNA는 Tri-reagent (MRC, Cincinnati, USA)를 이용하여 정제하였다. 적출한 척수 표본을 Tri-reagent 2,400 µl로 용해하였다. 실온에서 10분 동안 방치한 후 chloroform 4,800 µl를 첨가하여 30초간 진탕한 다음 실온에서 10분 동안 방치하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심하여 상부의 수용액 층을 새로운 원심관에 옮겼다. Iso-propanol 1,200 µl를 첨가하여 잘 섞은 다음 실온에 10분간 방치한 후 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 에탄올 1,000 µl로 세척한 후 RNase-free 증류수 20 µl에 녹였다. RNA는 UV-spectrophotometer (Shimazu, Japan)를 사용하여 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다.

**2) Real-time PCR:** Real-time PCR (Opticon™ System, MJ Research, Inc., Boston, USA)은 sequence detection system에 의해 SYBR Green I 형광을 실시간으로 볼 수 있다는 원리를 이용한 것이다. SYBR Green I dye는 double-stranded (ds) DNA와 결합했을 때 형광을 띠며, 특이적으로 확장된 PCR 산물의

양을 parameter로 확인할 수 있다.

PCR 조건은 다음과 같다. DyNAmo™ HS 2x master mix 용액(DyNAmo Hot Start DNA polymerase, SYBR Green I dye, optimized PCR buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP를 dUTP와 혼합한 용액; MJ Research, Inc., Boston, USA) 10 μl와 2 μM primer 2 μl, cDNA 1 μl를 증류수에 혼합하여 총 20 μl로 만들어 반응시켰다. c-fos의 증폭 반응 조건은 초기 반응으로 95°C에서 15분간 변성시키고, 95°C에서 15초, 60°C에서 30초를 40 cycle을 반응시키고, melting은 60°C에서 95°C까지 0.2°C씩 1 초간 실시하였다.

Internal standard로 사용한 β-2 microglobulin (β-2M)의 증폭 반응 조건은 초기 반응으로 95°C에서 15분간 변성시키고 95°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 40 cycle을 반응시키고, melting은 60°C에서 95°C까지 0.2°C씩 1초간 실시하였다. 시간에 따른 증폭된 DNA의 양은 log 단위로 나타나는 cycle threshold (CT)값으로 나타난다. 이 CT값의 기준 점을 0.01로 정하였으며 각 표본들에서 β-2M에 대한 c-fos의 상대적인 CT값은 Δ = CT (c-fos sample) - CT (β-2M sample)로 계산하였으며, 대조군에 대한 실험군은 상대적 CT값은 ΔΔ = Δ - Δ (control)로 계산하였다. 그러므로 대조군에 대한 실험군의 c-fos RNA의 양은 2<sup>-ΔΔ</sup>로 나타내었다.

**3) RT-PCR:** Complementary DNA (cDNA)는 total RNA로부터 oligo (dT) priming 방법으로 M-MLV reverse transcriptase (PROMEGA, Madison, USA)를 사용하여 합성하였다. Total RNA 1-2 μg을 100 μM oligo (dT)와 100 nM dNTPs를 총 5 μl가 되게 혼합해서 65°C에서 5분간 끓이고 바로 얼음 위에 잠깐 둔 후 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 unit RNase inhibitor, 100 unit M-MLV reverse transcriptase를 혼합하여 최종 10 μl가 되도록 42°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 72°C에서 10분간 끓인 후 물 90 μl를 더 첨가하였다. PCR은 10x buffer와 2.5 unit supertherm Taq, 25 mM dNTPs, cDNA 1 μl 및 2 μM primer를 총 10 μl로 만들어 반응시켰다. 이때, 반응조건은 초기 반응으로 95°C에서 5분간 변성시키고, 94°C에서 15초, 58°C에서 15초 그리고 72°C에서 30초를 30 cycle을 반응시킨 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. 이 PCR 산물은 Ethidium Bromide를 포함하는 2% agarose gel 상에 전기영동하여 UV상에서 87 bp 크기의 밴드를 확인하였다. 본 실험에서 사용한 흰쥐 c-fos primer sequence는 87 bp 크기의 sense; 5'-CCAAGCGGAGACAGATCAACTT-3'와 antisense; 5'-TCCAGTTTTTCCTTCTCTTCAGTAGAT-3'였다.

**5. 통계처리**

얻어진 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각 군에서 관찰한 각 시기별 평균 flinch 수는 repeated measured ANOVA test (Scheffe's test 검증)로 실험군간 차이를 비교하였

다. 또한 통증 반응을 제1기와 제2기 반응으로 분류하여 각 관찰 기간에 나타난 각 군의 평균 flinch 수는 one-way ANOVA test (Scheffe's test 검증)로 비교하였으며 유의성 검증은 P < 0.05로 하였다.

**결 과**

Naloxone이 morphine 진통효과에 미치는 영향을 규명하기 위해 morphine 투여 후 formalin을 주사하고 formalin 주사 16분 후에 naloxone을 5 μg, 10 μg, 100 μg으로 투여한 morphine과 naloxone 용량비를 20 : 1, 10 : 1 및 1 : 1로 각각 다르게 투여한 결과, 다음과 같은 성적을 얻었다.

**1. 통증 반응**

**1) 측정 시간별 flinch 수:** Formalin 주사 후 측정 시간별로 나타난 평균 flinch 수는 morphine군이 대조군에 비해 60분을 제외한 전 기간에 걸쳐 현저히 적었으며(P < 0.05, Fig. 2), naloxone 역전군들은 용량에 따라 차이를 보였다. Formalin 투여 16분 후에 naloxone 5 μg을 투여한 저용량군과 10 μg을 투여한 중용량군에서는 naloxone 투여 직후 평균 flinch 수가 감소하여 저용량군은 20분과 25분에서, 중용량군은 20분, 25

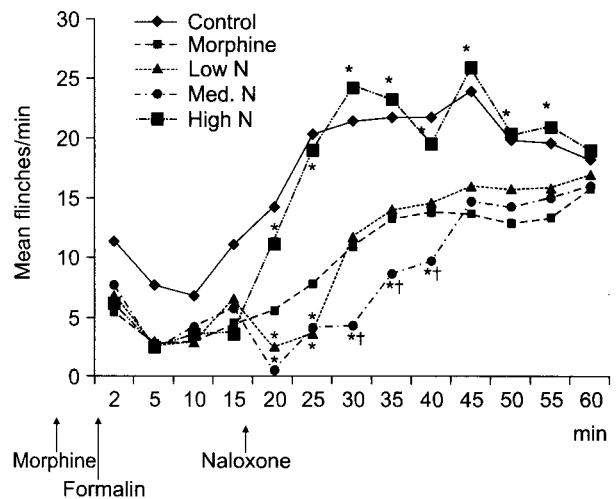


Fig. 2. Mean number of flinches per min (mean ± SD) plotted as a time after formalin injection. Experimental groups were same as Fig. 1. Morphine pre-treated (morphine and three naloxone) groups in phase 1, and morphine, low- and medium-dose naloxone groups in phase 2, were significantly less flinches compared with those of the control (P < 0.05). In three naloxone groups, the numbers of flinches were transiently reduced after intraperitoneal (IP) injection of naloxone in low- and medium-dose groups (P < 0.05). The duration of the reduced flinches were longer in medium-dose group. High-dose group revealed immediate increases of flinches just after IP injection of naloxone compared than those of morphine, low- and medium-dose naloxone groups (P < 0.05). \*P < 0.05: significantly different from the control (P < 0.05). †P < 0.05: significantly different from the high-dose naloxone group.

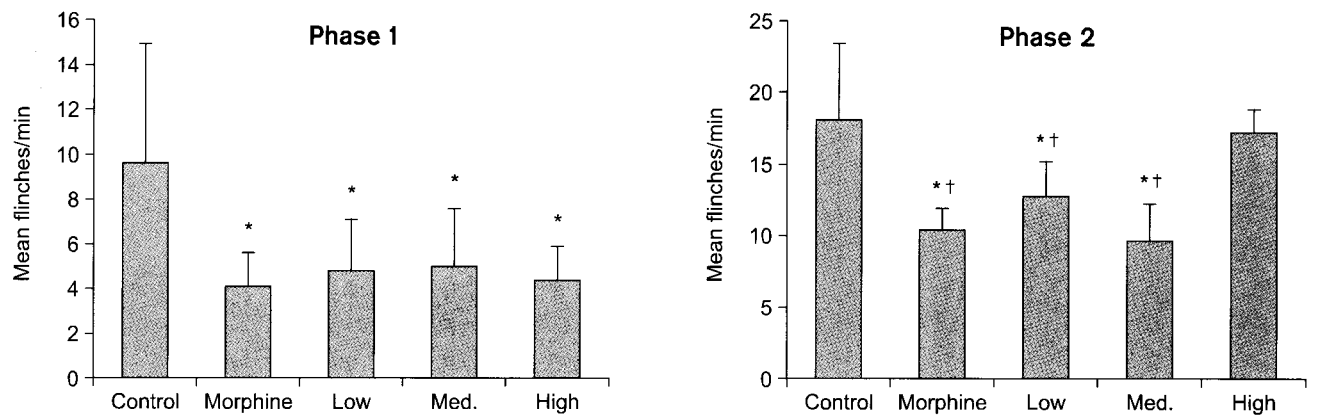


Fig. 3. The mean number (mean  $\pm$  SD) of flinches during phases 1 and 2. Experimental groups were same as Fig. 1. (Left) Morphine pre-treated (morphine and three naloxone) groups were significantly less flinches compared with those of the control in phase 1 ( $P < 0.05$ ). (Right) Morphine, low- and medium-dose naloxone groups were significantly less flinches compared with those of the high-dose naloxone group in phase 2 ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$ : significantly different from the control. † $P < 0.05$ : significantly different from the high-dose naloxone group.

분, 30분, 35분 및 40분까지 morphine군에 비해 뚜렷한 차이를 보였고( $P < 0.05$ , Fig. 2), 중용량군이 저용량군보다 30분, 35분 및 40분에 평균 flinch 수가 유의하게 낮아 더 지속적인 감소를 보였다( $P < 0.05$ ). 100  $\mu$ g을 투여한 고용량군에서는 naloxone 투여 직후부터 평균 flinch 수가 유의하게 증가하여 morphine군과 저용량 및 중용량 naloxone군들에 비해 유의하게 많았으며( $P < 0.05$ ), 대조군과는 유의한 차이 없이 심한 통증 반응을 보였다.

**2) 제1기 및 제2기 통증 반응:** 제1기와 제2기 반응으로 분류하여 평균 flinch 수를 비교한 결과, 제1기 반응에서는 평균 flinch 수가 morphine이 전 투여된 morphine군과 저용량군, 중용량군 및 고용량군의 naloxone 역전군들이 각각  $4.1 \pm 1.5$ ,  $4.8 \pm 2.3$ ,  $5.0 \pm 2.6$  및  $4.4 \pm 1.5$  회로 대조군의  $9.6 \pm 5.3$  회에 비해 유의하게 적었다( $P < 0.05$ , Fig. 3). 제2기 반응에서는 평균 flinch 수가 morphine군이  $10.4 \pm 1.5$  회로 대조군의  $18.1 \pm 5.3$  회에 비해 뚜렷하게 적었다( $P < 0.05$ ). Naloxone군들은 용량비에 따라 차이가 있었는데, 저용량군과 중용량군은 각각  $12.8 \pm 2.4$ ,  $9.6 \pm 1.5$  회로 대조군 및 고용량 naloxone군과는 뚜렷한 차이가 있었으나 morphine군과는 차이가 없었고 두 군 사이에 통계적 의미는 없었다(Fig. 3). 고용량군은 평균 flinch 수가  $17.3 \pm 1.5$  회로 morphine군과 저용량군 및 중용량군보다 유의하게 많았으며( $P < 0.05$ , Fig. 3) 대조군과는 차이가 없었다.

이상의 formalin 통증 반응을 종합해 보면, 제1기 반응은 morphine이 전 투여된 morphine군과 세 개의 naloxone 역전군들에서 모두 억제되어 morphine이 제1기 반응을 억제함을 알 수 있었다. 제2기 반응은 morphine군이 대조군에 비해 시간별뿐만 아니라 제2기 반응 평균 flinch 수도 억제되었다(Fig. 2, 3). Naloxone 역전군들은 저용량군과 중용량군들은 naloxone 투여 직후 morphine군보다 통증 반응이 일시적으로 유의하게 감소하였고 그 후 점차 증가하였으며 중용량군이

저용량군 보다 통증 행동 감소가 오래 지속되었다. 그러나 이들의 반응은 시간별로는 차이가 morphine군과 있었으나(Fig. 2) 제2기 반응의 평균 flinch 수는 차이가 없었다(Fig. 3). 고용량군에서는 naloxone 투여 직후부터 morphine에 의해 억제되었던 통증 반응이 역전되어 naloxone 투여 후 시간별 및 제2기 평균 flinch 수에서도 심한 통증 반응이 나타났다.

## 2. 척수 c-fos 유전자 발현

Formalin 주사 후 1시간 및 2시간에 각각 채취한 요추부 척수조직에서 real-time PCR로 대조군의 c-fos 유전자 발현 정도를 1로 각 군의 발현 정도를 비교 측정된 결과, 개체마다 c-fos 유전자의 발현 양상이 다양하였고 각 군사이의 뚜렷한 경향을 볼 수 없었다(Fig. 4, Left). RT-PCR 산물의 전기영동으로 척수 c-fos 유전자 발현을 확인한 결과, 일부 예는 1시간 후에 대조군과 저용량 및 고용량 naloxone군이 morphine군과 중용량 naloxone군에 비해 유전자 발현이 뚜렷하였고, 2시간 후에 중용량 naloxone군이 대조군과 저용량 및 고용량 naloxone군에 비해 c-fos 유전자 발현이 적음을 보여주고 있다(Fig. 4, Right). 그러나 RT-PCR로 확인한 유전자 발현에서도 개체사이의 차이가 많아서 각 군 간 뚜렷한 경향은 볼 수 없었다.

## 고 찰

본 연구에서 naloxone이 morphine 진통효과에 미치는 영향을 규명하기 위해 0.1 mg의 morphine을 투여한 후에 흰쥐 발바닥에 염증성 통증을 유발하는 formalin을 주사하고 formalin 주사 16분 후에 투여한 morphine과 naloxone의 용량비를 달리하여 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g의 naloxone을 각각 투여한 후 통증 반응과 척수 c-fos 유전자 발현을 관찰하였다. 그 결과, naloxone은 morphine의 진통효과를 비교적 낮은 용

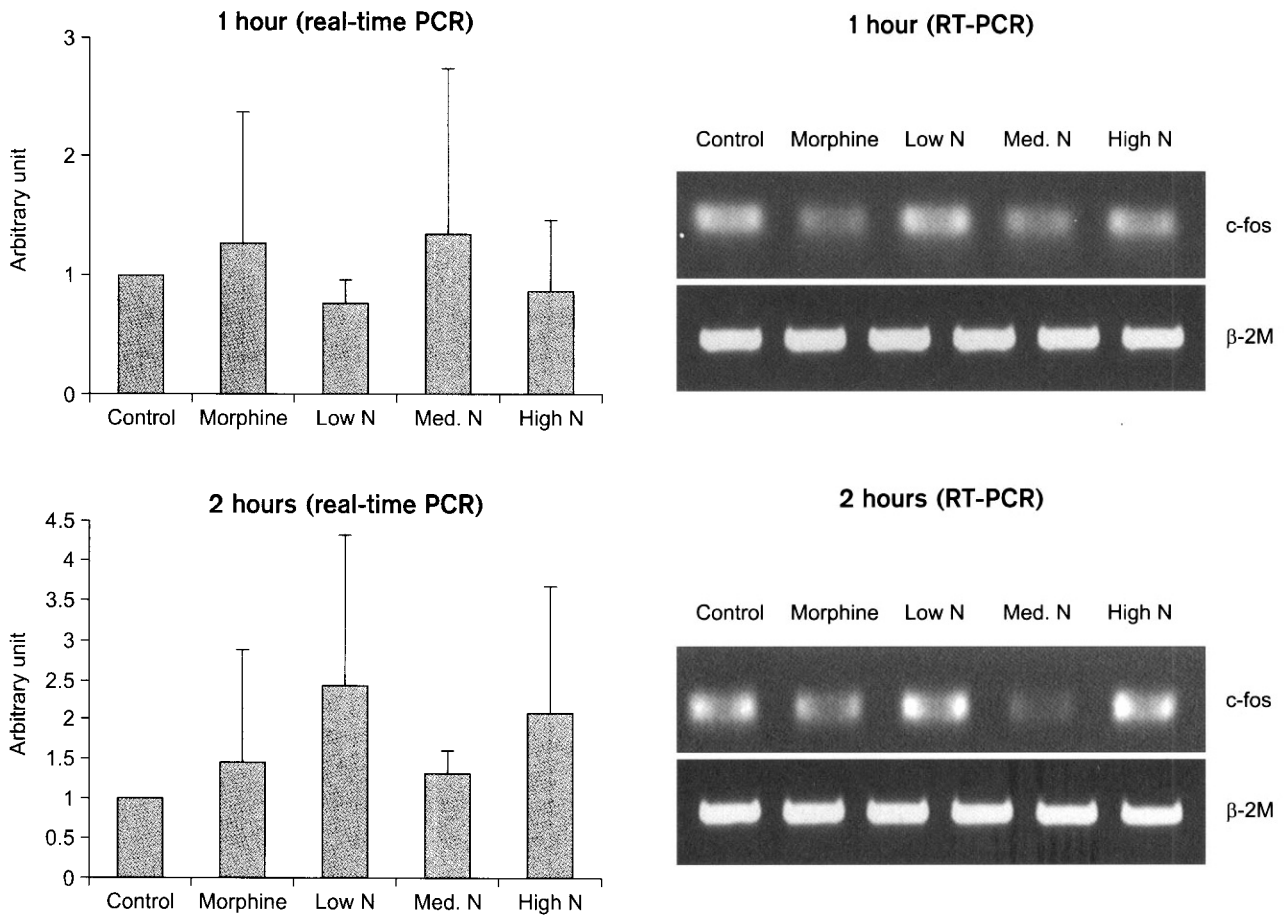


Fig. 4. Expression of spinal c-fos mRNA on 1 and 2 hours after formalin injection. Experimental groups were same as Fig. 1. (Left) Mean values (mean  $\pm$  SD) of c-fos expression compared to the value of control group on real-time PCR. There were no significant differences between the groups on 1 (upper) and 2 (lower) hours after formalin injection. (Right) Samples of c-fos expression on RT-PCR. They showed that spinal c-fos expression was less in morphine and medium-dose naloxone groups compared to those of control, low- and high-dose naloxone groups on 1 (upper), and 2 (lower) hours after formalin injection. However, there was much variability between individual rats.

량비인 5  $\mu$ g과 10  $\mu$ g에서는 투여 직후 일시적으로 증가하였고 고용량비인 100  $\mu$ g에서는 역전하였다. 아울러 formalin 주사 1시간 및 2시간 후에 관찰한 척수 c-fos 유전자 발현은 개체마다 다양하여 각 군사이의 뚜렷한 경향을 볼 수 없었고, 통증 반응과 척수 c-fos 유전자 발현의 정도사이에는 연관성이 없었다.

Naloxone이 통증에 미치는 영향에 대해서는 morphine의 진통효과를 역전한다는 보고와<sup>1,3,4)</sup> 영향을 미치지 않거나 증강한다는 보고가<sup>5-7,25)</sup> 있는데, 본 연구의 결과, naloxone이 morphine의 진통효과에 미치는 영향은 사용하는 naloxone의 용량과 관련이 있고 특히 사용한 morphine에 대한 naloxone의 용량비가 중요함을 알 수 있었다.

Rawal 등은<sup>1)</sup> 담낭절제술 후 경막의 morphine 4 mg으로 슬후 통증을 조절하면서 naloxone을 5  $\mu$ g/kg/h로 투여한 경우는 경막의 morphine의 진통효과에 영향이 없었으나 10  $\mu$ g/kg/h로 투여한 경우는 morphine의 진통기간이 짧았고 추가로 투여된 진통제 양도 많았다고 하였다. 이들의 보고와 같이 입

상에서는 morphine에 의한 부작용 치료 시 naloxone은 사용하는 용량이 많으면 진통효과를 역전시키고, 적으면 진통효과에 영향을 미치지 않는다는 용량의존성이 잘 알려져 있지만, 소량의 naloxone이 morphine의 진통효과를 증강시킨다는 사실은 최근에 주목받고 있다. Gan 등은<sup>5)</sup> naloxone을 0.25  $\mu$ g/kg/h로 투여하는 경우 오피오이드 관련 부작용이 줄었고 수술 후 24시간 동안 morphine 소모량이 약 30% 정도 감소했으나, 1  $\mu$ g/kg/h로 투여한 경우 오히려 진통효과가 약화되었다고 하면서 전신적으로 투여되는 naloxone이 소량에서는 morphine의 진통효과를 증강하고, 다량에서는 역전하여 naloxone이 용량에 따라 진통효과에 미치는 영향이 다름을 보고하였다. 한편, Choi 등은<sup>7)</sup> 경막의 morphine의 지속적 주입에 의한 슬후 통증관리 시 4  $\mu$ g/kg/d로 naloxone을 주입기에 추가하는 경우 부작용 감소뿐만 아니라 통증점수의 감소로 진통효과가 증강된다고 하여 경막의 naloxone도 소량에서 morphine의 진통효과를 증강시킴을 보고하였다. Song 등은<sup>6)</sup> 말초 오피오이드의 진통효과를 규명하는 연구에서 mor-

phine 0.1 mg과 naloxone 10  $\mu$ g을 formalin 주사 전에 formalin 주사 부위에 피하주사한 결과, 말초조직에 주사된 naloxone도 morphine의 진통효과를 증강하였다고 하였다. 그러나 Stein 등은<sup>12)</sup> 슬관절경시 관절강 내 1 mg의 morphine과 함께 주입한 1 mg의 naloxone이 morphine 1 mg을 단독 주입한 경우보다 통증점수가 높으므로 말초 naloxone이 말초 morphine의 진통효과를 역전시킨다고 하면서 관절강 내 주입된 morphine에 의한 진통효과는 naloxone에 의해 역전되므로 말초 오피오이드 수용체에 의한 작용이라 하였다. Russell 등도<sup>26)</sup> 고양이의 슬관절 염증시 발생하는 미세 구심성 섬유의 자발적 전위들(spontaneous discharges)이 관절강 내에 투여된 1-5 mg/kg의 morphine에 의해 유의하게 억제되었고 이러한 억제는 1 mg/kg의 naloxone 투여로 역전되었으므로 오피오이드의 말초 진통효과는 말초 오피오이드 수용체에 의한 것이라 보고하였다. 전술한 보고들의 결과에서 naloxone이 morphine 진통효과에 미치는 영향은 전신적인 투여뿐만 아니라 경막외나 국소 말초조직 투여에서도 나타나며 진통작용의 역전과 증강은 투여된 morphine과 naloxone의 용량비에 의존적이라고 볼 수 있다. Stein 등은<sup>12)</sup> 슬관절에서 morphine과 naloxone의 용량비를 1 : 1로, Russell 등은<sup>26)</sup> 1 : 1 내지 1 : 0.2로 사용하여 naloxone이 morphine의 진통효과를 역전시킨다고 하였고, Blaise는<sup>27)</sup> 경막외강에 12.5 : 1 (0.08)로, Song 등은<sup>6)</sup> 국소 말초조직에서 10 : 1로 사용하여 진통효과를 증강시킨다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 복강 내로 투여하는 morphine과 naloxone의 용량비에 따라 실험군을 분류하였다. 즉, morphine 0.1 mg을 복강 내로 투여하고 투여한 morphine과 naloxone의 용량비가 1 : 1인 100  $\mu$ g을 고용량군으로, 10 : 1인 10  $\mu$ g을 중용량군으로, 20 : 1인 5  $\mu$ g을 저용량군으로 설정하여 투여하였다. 그 결과, naloxone 100  $\mu$ g을 투여한 고용량군에서는 naloxone이 morphine의 진통효과를 즉각적으로 역전시켰으나 저용량군과 중용량군에서는 naloxone 주사 직후 평균 flinch 수가 일시적으로 감소되어 morphine의 진통효과를 증강시켰고, 증강시키는 기간은 5  $\mu$ g보다 10  $\mu$ g이 조금 길어 본 연구에서는 morphine과 naloxone의 용량비가 10 : 1인 경우가 진통효과의 증강이 더 효과적이었다. 향후 진통효과를 최대화할 수 있는 morphine과 naloxone의 용량비를 얻기 위해서는 용량비 10 : 1을 전후로 좀더 세분화된 용량 반응검사가 필요할 것으로 사료된다.

다량의 naloxone이 morphine의 진통작용을 역전시키는 기전은 시냅스후막(postsynaptic membrane)에서  $\mu$ 형 오피오이드 수용체에 길항제로 작용하여 morphine을 치환함으로써 진통작용이 역전된다고 설명할 수 있다. 그러나 소량의 naloxone이 morphine의 진통작용을 증강시키는 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않고 몇 가지 가능성들이 제시되고 있다. 우선 naloxone이 endorphin을 분비하거나 진통과 관련이 없는 수용체로부터 endorphin을 밀어내어 진통효과를 나타내거나<sup>28)</sup> 혹은 enkephalin 분비에 관여하는 시냅스전 자가조절(presy-

naptic auto-regulatory system) 즉, negative feedback 기전을 억제하여 enkephalin 분비를 증가시킴으로써 진통효과를 나타낸다는 가설을 들 수 있다.<sup>11)</sup> 또는 소량의 naloxone 투여로 오피오이드 수용체가 상향조절(upregulation) 되어서,<sup>25)</sup> 혹은 척수에서 하행성 세로토닌 억제계(descending serotonergic inhibitory system)의 신경종말에 있는 시냅스전 오피오이드 수용체에 작용해서<sup>29)</sup> 진통효과를 나타낼 수 있다고 한다. 최근 Borrás 등은<sup>30)</sup> naloxone 투여 후 뇌를 fMRI로 관찰한 결과, 뇌에서 오피오이드 수용체 분포가 밀집된 곳의 기능이 증가되었다고 하여 naloxone이 내인성 오피오이드와 관련하여 진통작용을 나타낼 가능성이 있다고 하였다. 그밖에 morphine 투여 시 초래되는 glutamate transporter의 하향조절(downregulation)을 naloxone이 차단하여 morphine에 의한 통각과민을 적게 한다는 Mao 등의<sup>31)</sup> 연구에서 추론해 보면 naloxone이 glutamate 이동을 원활히 하여 진통효과를 증강할 가능성도 배제할 수 없겠다. 그러나 다양한 기전들이 제시되고 있지만 아직 명확하지 않으므로 향후 기전을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Formalin 주사 후 나타나는 통증 반응과 c-fos 유전자 발현과의 연관성에 대해서는 최근 논란이 있다. c-fos 유전자 발현이 통증 정도를 반영한다는 결과들과<sup>15,20,21)</sup> 반영하지 못한다는 결과들이<sup>16-19)</sup> 보고되어 있다. 본 연구에서는 각 군 간 formalin 통증 반응이 뚜렷한 차이를 보였으므로 척수 c-fos 유전자 발현도 morphine군이 적고 대조군과 고용량 naloxone 역전군이 유전자 발현이 많을 것으로 기대했으나, 유전자 발현 정도는 개체마다 차이가 많았고 각 군 간 유전자 발현의 뚜렷한 경향을 관찰할 수 없었다. 즉, formalin 통증 반응과 척수 c-fos 유전자 발현 사이의 연관성은 볼 수 없었다. Sun 등은<sup>16)</sup> N<sub>2</sub>O와 halothane 전신마취가 formalin의 통증 반응은 억제하지만 척수의 c-fos 발현은 억제하지 못한다고 하였고, Gilron 등은<sup>18)</sup> formalin 주사 2시간 후에 척수신경(요부 제 4-5번 신경)을 Fos 단백질 염색으로 유전자 발현을 관찰한 결과, 동일한 방법에서 나타난 통증 반응과의 연관성이 없었다고 하였다. 또한 이들은 formalin 주사 전 투여한 propofol이 formalin 주사 후 나타나는 통증 반응은 억제하지 못했으나 Fos 유전자 발현을 대조군에 비해 63% 정도 억제하였다고 하였다.<sup>19)</sup> 이러한 결과는 통증 반응과 c-fos 발현이 연관성이 없는 면에서는 본 연구와 일치되지만, 다른 점은 본 연구에서는 morphine이 통증 반응은 뚜렷하게 감소시켰지만 c-fos 유전자 발현은 감소시키지 못했다는 것이다. 그러나 Labuz 등은<sup>20)</sup> 오피오이드가 formalin 통증 반응과 척수 c-fos 발현 정도를 모두 유의하게 감소시켰으며 상호간에 유의한 관련성이 있다고 하였다.

척수 c-fos 유전자 발현에 대해서는 통증 반응과의 연관성 뿐만 아니라 유전자 발현이 뚜렷하게 나타나는 시간 또한 논란이 많다. c-fos 유전자 발현은 손상 초기에 나타나는 반응으로 Nakamura는<sup>32)</sup> 통증 자극 후 30분 내지 1시간이 최고

로 발현되며 그 후는 곧 정상으로 감소한다고 하였고, Gilron 등과<sup>19)</sup> Yashpal 등은<sup>33)</sup> formalin 주사 2시간 후 c-fos 유전자 발현을 측정하였으며 Sun 등은<sup>34)</sup> 흰쥐 발바닥 창상 통증 모델에서 창상 후 120시간까지 관찰한 결과, 창상 전 국소마취제 침윤으로 통증 반응의 역제는 국소마취제 작용시간 동안 나타났지만 c-fos 발현은 수일간 억제되었으며 창상 후 1시간이 가장 많이 억제되었다고 하였다. 본 연구에서는 보고된 시간들을 감안하여 1시간과 2시간에 각각 관찰하였으나, 시간과 약제에 따른 차이보다는 개체에 따른 차이가 많았다.

통증 반응과 c-fos 유전자 발현 정도가 어느 정도 일치한다는 보고들도<sup>15,20,21)</sup> 있지만, 본 연구에서는 morphine 투여와 naloxone 용량에 따른 통증 반응의 차이가 뚜렷하였으나 척수 c-fos 유전자 발현의 차이는 뚜렷한 경향을 볼 수 없었다. 이러한 불일치된 결과, 특히 유전자 발현의 뚜렷한 경향을 볼 수 없었던 이유를 분석해 보면 다음과 같다. 우선, 개체 간 차이뿐만 아니라 c-fos 유전자가 단시간에 일어나는 immediate early gene 단백질이므로 Nakamura의<sup>32)</sup> 주장처럼 보다 초기에 발현되어 본 연구에서 척수를 채취한 1시간 및 2시간이 최고 발현 시간과 맞지 않았을 가능성이 있다. 또한 formalin이 지속적인 통증을 유발하므로 흰쥐 내에서 내인성 오피오이드 분비 등이 관여했을 가능성과 척수를 채취한 1시간과 2시간이 이미 naloxone의 효과가 없어진 상황이며 또한 각 군별 실험동물의 수가 적었던 점등이 복합적으로 작용하였을 가능성도 배제할 수 없다. Formalin test가 통증 연구에 흔히 이용되고 있으므로 향후 척수 c-fos 유전자 발현에 관한 연구에 있어서 적절한 시기 등의 방법과 관련된 문제점들에 대해 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구의 결과를 요약하면 naloxone이 morphine의 진통효과에 미치는 영향은 사용한 morphine과 naloxone의 용량비에 따라 달랐다. 즉, 용량비가 높은 다량의 naloxone은 morphine의 진통효과를 역전시키지만 용량비가 낮은 소량의 naloxone은 진통효과를 일시적으로 증강시켰다. Morphine의 진통효과를 증강시키는 naloxone의 용량은 투여한 morphine 용량의 1/10 용량이 1/20 용량보다 더 효과적이었다. 한편, formalin test에서 morphine 투여 및 naloxone 투여에 따른 척수 c-fos 유전자 발현은 뚜렷한 양상을 발견할 수 없었고, 통증 반응과 척수 c-fos 유전자 발현의 정도는 일치되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Rawal N, Schott U, Dahlstrom B, Inturrisi CE, Tandon B, Sjostrand U, et al: Influence of naloxone infusion on analgesia and respiratory depression following epidural morphine. *Anesthesiology* 1986; 64: 194-201.
2. Heishman SJ, Stitzer ML, Bigelow GE, Liebson IA: Acute opioid

- physical dependence in postaddict humans: naloxone dose effects after brief morphine exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248: 127-34.
3. Kendrick WD, Woods AM, Daly MY, Birch RF, DiFazio C: Naloxone versus nalbuphine infusion for prophylaxis of epidural morphine-induced pruritus. *Anesth Analg* 1996; 82: 641-7.
4. Wang J, Pennefather S, Russell G: Low-dose naloxone in the treatment of urinary retention during extradural fentanyl causes excessive reversal of analgesia. *Br J Anaesth* 1998; 80: 565-6.
5. Gan TJ, Ginsberg B, Glass PSA, Fortney J, Jhaveri R, Perno R: Opioid-sparing effects of a low-dose infusion of naloxone in patient-administered morphine sulfate. *Anesthesiology* 1997; 87: 1075-81.
6. Song SO, Park DP, Goo CH: Comparison of the peripheral analgesic effects of morphine, meperidine and fentanyl using the formalin test in rats. *Korean J Anesthesiol* 1998; 34: 499-509.
7. Choi JH, Lee JM, Kim TH: Does epidural naloxone reduce side effects of epidural morphine without reversing analgesia? *Korean J Pain* 1998; 11: 47-53.
8. Buchsbaum MS, Davis GC, Naber D, Pickar D: Pain enhances naloxone-induced hyperalgesia in humans as assessed by somatosensory evoked potentials. *Psychopharmacology (Berl)* 1983; 79: 99-103.
9. Grevert P, Goldstein A: Effects of naloxone on experimentally induced ischemic pain and on mood in human subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 1291-4.
10. Stacher G, Abatzi TA, Schulte F, Schneider C, Stacher-Janotta G, Gaupmann G, et al: Naloxone does not alter the perception of pain induced by electrical and thermal stimulation of the skin in healthy humans. *Pain* 1988; 34: 271-6.
11. Ueda H, Fukushima N, Kitao T, Ge M, Tagaki H: Low doses of naloxone produce analgesia in the mouse by blocking presynaptic autoinhibition of enkephalin release. *Neurosci Lett* 1986; 65: 247-52.
12. Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, et al: Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med* 1991; 325: 1123-6.
13. Pang WW, Mok MS, Huang S, Chung YT, Hwang MH: The peripheral analgesic effect of meperidine in reducing propofol injection pain is not naloxone-reversible. *Reg Anesth Pain Med* 1998; 23: 197-200.
14. Chapman V, Besson JM: Pharmacological studies of nociceptive systems using the c-Fos immunohistochemical technique: an indicator of noxiously activated spinal neurons. In: *The pharmacology of pain*. Edited by Dickenson A, Besson JM: New York, Springer. 1997, pp 235-79.
15. Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI: The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 1991; 42: 617-28.
16. Sun WZ, Shyu BC, Shieh JY: Nitrous oxide or halothane, or both, fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurons after subcutaneous formalin. *Br J Anaesth* 1996; 76: 99-105.
17. Abbadie C, Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI: Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanyl and lidocaine. *Pain* 1997; 69: 101-10.
18. Gilron I, Quirion R, Coderre TJ: Pre- versus postformalin effects of ketamine or large-dose alfentanil in the rat: discordance between pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. *Anesth Analg* 1999; 89: 128-35.
19. Gilron I, Quirion R, Coderre TJ: Pre- versus postinjury effects of



- intravenous GABAergic anesthetics on formalin-induced Fos immunoreactivity in the rat spinal cord. *Anesth Analg* 1999; 88: 414-20.
20. Labuz D, Chocyk A, Wedzony K, Toth G, Przewlocka B: Endomorphin-2, deltorphin II and their analogs suppress formalin-induced nociception and c-Fos expression in the rat spinal cord. *Life Sci* 2003; 73: 403-12.
  21. Mannelli P, Gortheil E, Peoples JF, Oropeza VC, Van Bockstaele EJ: Chronic very low dose naltrexone administration attenuates opioid withdrawal expression. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 261-8.
  22. Tolle TR, Castro-Lopes JM, Coimbra A, Zieglansberger W: Opiates modify induction of c-fos proto-oncogene in the spinal cord of the rat following noxious stimulation. *Neurosci Lett* 1990; 111: 46-51. Erratum in: *Neurosci Lett* 1990; 114: 239.
  23. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
  24. Song SO, Park DP, Kim HD, Koo BU, Suh IS, Kim SY, et al: Pre-emptive infiltration of lidocaine reduces formalin pain behavior in rat. *Korean J Anesthesiol* 1995; 29: 790-7.
  25. Paronis CA, Holtzman SG: Increased analgesic potency of mu agonists after continuous naloxone infusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 582-9.
  26. Russell NJ, Schaible HG, Schmidt RF: Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neurosci Lett* 1987; 76: 107-12.
  27. Blaise G: Should we use naloxone epidurally? *Can J Anaesth* 2003; 50: 875-8.
  28. Childers SR, Creese I, Snowman AM, Snyder SH: Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1979; 55: 11-8.
  29. Choi SS, Han KJ, Lee HK, Han EJ, Suh HW: Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 447-57.
  30. Borras MC, Becerra L, Ploghaus A, Gosric JM, DaSilva A, Gonzalez RG, et al: fMRI measurement of CNS responses to naloxone infusion and subsequent mild noxious thermal stimuli in healthy volunteers. *J Neurophysiol* 2004; 91: 2723-33.
  31. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G: Chronic morphine induces down-regulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 2002; 22: 8312-23.
  32. Nakamura F: Expression of preprodynorphin mRNA in the spinal cord after inflammatory abdominal stimulation in rats. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1994; 69: 95-103.
  33. Yashpal K, Mason P, McKenna JE, Sharma SK, Henry JL, Coderre TJ: Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and Fos expression in the spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology* 1998; 88: 157-64.
  34. Sun X, Yokoyama M, Mizobuchi S, Kaku R, Nakatsuka H, Takahashi T, et al: The effects of pretreatment with lidocaine or bupivacaine on the spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Anesth Analg* 2004; 98: 1093-8.
-