

## 흰쥐의 포르말린시험에서 복강 내로 투여한 비선택적 산화질소합성효소 억제제의 항통각효과

충남대학교 의과대학 마취통증의학교실

오민혜·이원형·고영권

= Abstract =

### The Antinociceptive Effect of Intraperitoneally Administered Nonselective Nitric Oxide Synthase Inhibitor on the Rat Formalin Test

Minhye Oh, M.D., Wonhyung Lee, M.D., and Youngkwon Go, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Deajeon, Korea

**Background:** Nitric oxide (NO) is involved in the transmission and modulation of nociceptive information at the peripheral, spinal cord and supraspinal levels. We conducted this experiment to assess the antinociceptive effects of a nonselective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on the modulation of pain in rats subjected to the formalin test.

**Methods:** Formalin 5% was injected in the right hind paw after intraperitoneal (IP) injection of various doses of L-NAME (0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg with and without L-arginine 100 mg/kg, 5.0 mg/kg). The number of flinches was measured.

**Results:** Formalin injected into the rat hind paw induced a biphasic nociceptive behavior. IP injected L-NAME diminished the nociceptive behaviors in a dose-dependent manner during phases 1 and 2. The concomitant injection of L-arginine reversed the antinociceptive effect of L-NAME.

**Conclusions:** The data demonstrates that a nonselective NOS inhibitor, L-NAME, possesses antinociceptive properties in rats subjected to the formalin test, and the antinociceptive effect of L-NAME is reversed by the concomitant administration of L-arginine. (Korean J Pain 2006; 19: 142-145)

**Key Words:** antinociceptive effect, nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester.

## 서 론

산화질소(nitric oxide, NO)는 혈관 내피세포가 생산하는 강력한 혈관이완제로 발견되었으며 신경전달과 같은 다양한 생리적 기능에 중요한 역할을 한다. NO는 L-arginine과 산소가 결합하여 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 중추 신경계를 비롯한 다양한 조직에서 생산되며 최근 연구에 의하면 soluble guanylate cyclase를 활성화시켜 c-GMP합성을 촉진하며, 말초와 척수, 척수상위에서 통각정보의 전달과 조절에도 관여한다고 밝혀지고 있다.<sup>1,2)</sup>

다양한 동물 통증모델이 개발되었는데 각성상태의 쥐에

서는 포르말린을 발바닥에 주입하여 통각반응을 관찰하는 통증모델이 사용되어 왔다.<sup>3)</sup> 쥐의 발바닥에 포르말린을 주사하면 통증이 유발되고 포르말린으로 유도된 행동을 관찰하여 통증의 정도를 평가할 수 있다.<sup>4)</sup> 포르말린시험은 통증 유발 시험모형 중 급성 통증 및 촉진성(facilitation) 통증상태를 보여주는 특징적인 실험모형으로 C섬유의 활성화와 연관 가능성이 있는 초기 통각반응과, 말초조직의 염증반응 및 척수전도촉진의 복합 작용에 의한 것으로 보이는 후기 통각반응을 나타내는 특징적인 이상(biphasic)반응을 보인다.<sup>5,6)</sup>

최근에는 NOS 억제제를 국소도포하거나<sup>7)</sup> 척수강,<sup>8,9)</sup> 복강,<sup>2)</sup> 뇌실 및 구강,<sup>2)</sup> 국소투여(intraplantar)하여<sup>1-8)</sup> 초조행동(agitation behavior)을 억제할 수 있다고 보고되고 있다. 이에

접수일 : 2006년 8월 4일, 승인일 : 2006년 10월 9일

책임저자 : 이원형, (301-721) 대전광역시 중구 대사동 640번지, 충남대학교병원 마취통증의학과

Tel: 042-280-7840, Fax: 042-280-7968, E-mail: whlee@cnu.ac.kr

석사학위 논문임.

Received August 4, 2006, Accepted October 9, 2006

Correspondence to: Wonhyung Lee, Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, 640, Deasa-dong, Jung-gu, Deajeon 301-721, Korea. Tel: +82-42-280-7840, Fax: +82-42-280-7968, E-mail: whlee@cnu.ac.kr

A thesis of a Mater Degree of Medicine.

본 연구는 비선택적 NOS 억제제의 복강 내 투여가 급성 및 촉진성 통증에 미치는 영향 및 용량상관성을 평가하기 위해 비선택적 NOS 억제제인 N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)를 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg, 5.0 mg/kg 복강 내로 투여하여 포르말린에 의하여 발생한 통각반응의 억제정도를 평가하였다. 또한 L-NAME의 투여효과가 NOS 억제에 의한 것인지를 확인하기 위해 L-arginine을 복강 내로 동시에 투여하고 통각반응의 변화를 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험대상

모든 실험계획은 의과학연구소의 동물위원회 승인을 받은 후 규정에 따라 시행하였다. 실험대상인 수컷 Sprague-Dawley 쥐(200-300 g)를 톱밥을 깔 깨끗한 플라스틱 우리에 3마리 이하씩 넣어 12시간 간격으로 명암이 조절되고 일정한 온도(23°C 내외)와 습도(50% 내외)가 유지되는 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

실험쥐는 다음과 같이 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다.

1) **대조군(n = 8)**: L-NAME을 투여하지 않고 포르말린시험을 시행한 군

#### 2) 실험군

(1) **L-NAME 투여군**; L-NAME을 0.5 mg/kg (n = 8), 1.5 mg/kg (n = 8), 5.0 mg/kg (n = 8) 복강 내로 투여하고 포르말린시험을 시행한 군

(2) **L-NAME과 L-arginine 투여군(n = 8)**; L-NAME 1.5 mg/kg과 동시에 L-arginine 100 mg/kg을 복강 내로 투여하고 포르말린시험을 시행한 군

### 2. 실험방법

L-NAME과 L-arginine (Sigma Aldrich Corporation, USA)은 각각 생리식염수에 2 mg/ml, 100 mg/ml로 용해시켜 사용하였다. NOS 억제제의 최대효과를 얻기 위하여<sup>10)</sup> L-NAME을 복강 내로 투여하고 40분 후에 포르말린시험을 시행하였다. 21 게이지 바늘이 부착된 주사기를 사용해 쥐의 복강 내로 L-NAME을 투여한 후 쥐의 크기보다 약간 큰 반원기둥모양의 투명한 우리 안에 넣어 L-NAME의 최대효과가 나타날 때까지 적응하도록 하였다. 반원모양 우리는 금속 망으로 된 스크린 위에 놓아 행동반응의 관찰을 용이하게 하였다.

포르말린시험은 5% 포르말린용액 50  $\mu$ l를 25게이지 바늘이 부착된 주사기를 이용하여 쥐의 오른쪽 뒷발바닥 피하조직에 주사하고 쥐가 보이는 통각반응을 측정하는 것으로 오른쪽 발을 자발적으로 움찔거리는 특징적인 행동(flinching) 반응의 횟수를 5분 간격으로 60분간 기록하였다.

### 3. 통계

통계분석은 SPSS를 이용하였으며 대조군과 실험군의 통각행동 관찰결과와 통계는 일원배치분산분석(one way ANOVA)을 시행하였고 사후검정은 Dunnett's test를 시행하였다. 통각행동 용량 반응자료의 통계는 Jonckheere-Terpstra test를 시행하였다. 또한, 실험군에서 L-arginine 100 mg/kg을 L-NAME 1.5 mg/kg과 동시에 투여한 경우와 투여하지 않은 경우를 비교하기 위해 독립표본 T 검정(independent samples t-test)을 시행하였다. 모든 값은 평균(mean)  $\pm$  평균의 표준오차(standard error of the mean, SEM)으로 표시하였으며 P값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

L-NAME을 투여하지 않은 대조군과 복강 내로 L-NAME을 투여한 실험군에서 모두 이상성으로 flinching반응을 보였다 (Fig. 1)

쥐의 복강 내로 투여된 L-NAME은 1상과 2상에서 모두 용량 의존적으로 통증행동을 감소시켰다(Fig. 2). L-NAME 1.5 mg/kg, 5.0 mg/kg을 복강 내로 투여한 실험군에서 대조군과 비교하여 1상과 2상에서 모두 통계적으로 유의하게 flinching 횟수의 합이 감소하였으나 L-NAME 0.5 mg/kg을 복강 내로 투여한 실험군에서 flinching반응의 감소는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하지는 않았다.

L-NAME 1.5 mg/kg과 L-arginine 100 mg/kg을 동시에 투여한 실험군은 시간 경과에 따라 이상성으로 flinching반응을 보였으며 L-arginine을 동시에 투여하지 않은 실험군과 비교하여

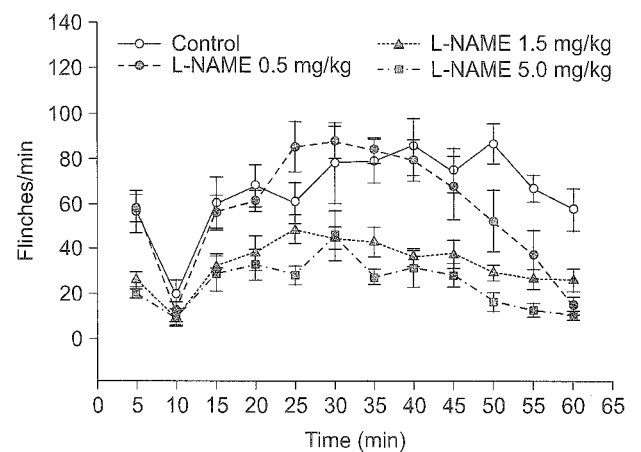


Fig. 1. Time response curve of intraperitoneal (IP) L-NAME for the flinching response in the formalin test. L-NAME was administered 40 minutes before formalin injection. Formalin was injected subcutaneously at time 0. Formalin injected into the rat hind paw induced a biphasic nociceptive behaviour in all group. Data are presented as the number of flinches in each time. Each point on the graph represents the mean  $\pm$  SEM.

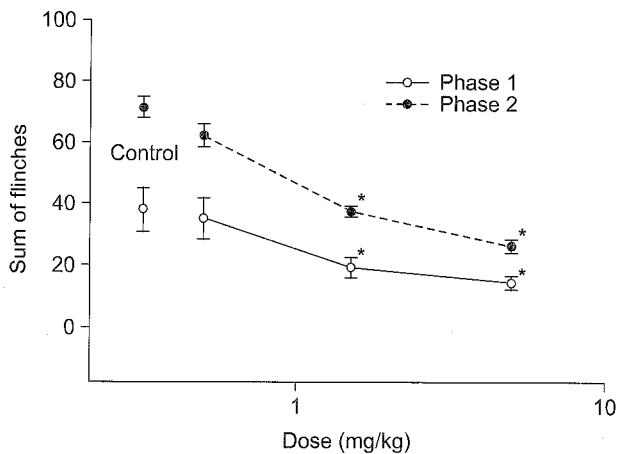


Fig. 2. Dose-response curve of intraperitoneal (IP) L-NAME for the flinching response during phase 1 and phase 2 in the formalin test. IP injected L-NAME diminished nociceptive behaviors dose-dependently during the phase 1 and 2 statistically significant. Data are presented as the sum of flinches in each phase. Each point on the graph represents mean  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$  compared with the control.

1상과 2상에서 모두 flinching 횟수의 합이 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

### 고찰

포르말린을 피하로 주입받은 실험쥐는 피하주사 직후 심한 통각반응이 나타난 후 점차 감소하다가 10분 이후에 지속적이고 강한 통각반응이 다시 나타나는 특징적인 이상성의 통각 행동반응을 보이는데 이는 포르말린시험에서 1상과 2상 반응의 기전이 근본적으로 다르다는 것을 의미한다. 1상 반응은 포르말린 주입에 의해 손상조직에 분포하는 1차 구심성 섬유(A $\delta$ 와 C섬유)가 짧은 시간 동안 직접적으로 활성화되어 나타나는 것으로 급성 통증을 반영한다. 반면 2상 반응은 말초조직의 염증반응으로 인한 반복적인 C섬유의 자극에서 오는 말초 및 중추감각에 의해 구심성 섬유의 활성화도가 매우 낮음에도 불구하고 통증이 강화되어 통증 행동반응이 지속적으로 강력하게 나타나는 것으로 이러한 상태를 촉진성 통증상태라 한다.<sup>11)</sup> 이러한 현상은 척수의 광동적 범위(wide dynamic range, WDR) 신경세포의 활성화를 반영하는 것으로 시험은 한 실험에서 급성 통증과 촉진성 통증상태를 모두 볼 수 있는 좋은 통증유발 시험모형이라 할 수 있다.

NO는 L-arginine과 산소가 결합하여 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는 자유기 기체(free radical gas)로서 체내의 전달물질로 작용하며, 통증의 전달이나 중추성 감각과 관련이 깊은 NMDA 수용체와도 연관이 있다고 알려져 있다.<sup>12)</sup> 통각성 자극에 의해 NMDA 수용체가 활성화되면 세포 내로 이온화된 칼슘이 유입되고 이로 인해 NOS가 활성화되어 NO가 생성된다.<sup>13)</sup> 생성된 NO는

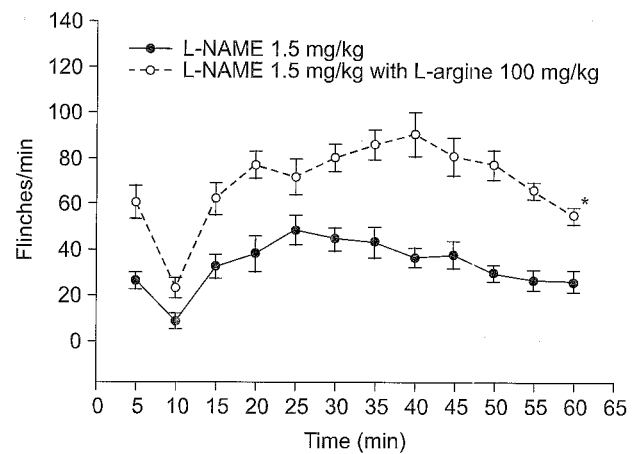


Fig. 3. Time-response curve of intraperitoneal (IP) L-NAME (1.5 mg/kg) with and without L-arginine for the flinching response in the formalin test. Drugs were administered 40 min before formalin injection. Formalin was injected subcutaneously at time 0. Concomitant injection of L-arginine reversed the antinociceptive effect of L-NAME. Sum of flinches during phase 1 and phase 2 diminished statistically significant. Data are presented as the number of flinches in each time. Each point on the graph represents the mean  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$  compared with the L-NAME 1.5 mg/kg group.

soluble guanylate cyclase를 활성화시켜 cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (c-GMP)를 형성하므로, 이러한 NO/c-GMP 경로는 NMDA 수용체와 관련된 중추감각에 관여한다고 할 수 있다.<sup>14,15)</sup>

본 연구에서 실험쥐는 주입 후 특징적인 이상성 통각반응을 보였다. Flinching반응의 이상성 형태에 따라 주입 후 10분까지를 1상, 10분 이후부터 60분까지를 2상으로 정의하였으며 L-NAME 투여군(0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg, 5.0 mg/kg)은 대조군과 비교하여 1상 및 2상에서 flinching반응이 용량 의존적으로 감소하여 NO가 포르말린으로 유발된 급성 통증 및 촉진성 통증의 기전에 관여함을 시사하였다. L-NAME 투여군은 용량 의존적으로 flinching 횟수가 감소하였지만 대조군과 비교했을 때 L-NAME 0.5 mg/kg 투여군의 flinching 횟수의 감소는 통계적으로 유의하지 않았으며 1.5 mg/kg, 5.0 mg/kg 투여군은 flinching 횟수가 대조군과 비교하여 의미 있게 감소하였다. 이는 Moore 등이<sup>2)</sup> 보고한 포르말린으로 유발된 핥는 행동(licking procedure)을 감소시키는 L-NAME의 복강 내 용량 1-75 mg/kg과도 연관이 있다.

Gardiner 등은<sup>16)</sup> 각성상태의 쥐에서 L-NAME에 의한 혈액 동맥 반응의 유효용량이 0.1-10 mg/kg이라 하였고, 이들은 L-arginine 100 mg/kg을 투여하여 L-NAME의 국지적 혈액동맥 반응을 가역할 수 있다고 하여 본 실험에서도 이에 근거하여 L-arginine 투여용량을 결정하였다. L-arginine 100 mg/kg을 L-NAME 1.5 mg/kg과 동시에 투여하고 시험을 실시하여 L-NAME의 항통각효과가 통계적으로 유의하게 반전되는 것을 관찰하였다. 이는 Moore 등의 실험에서 L-NAME의 항통각효과를 가역하기 위해 사용된 L-arginine의 용량 600 mg/kg보다

현저히 적은 것으로 L-NAME의 항통각효과가 NOS 억제에 의한 것임을 시사하였다.

결론적으로 비선택적 NOS 억제제 L-NAME은 포르말린으로 유발된 급성 및 촉진성 통증을 모두 용량 의존적으로 감소시켰다. 또한 L-NAME은 1.5 mg/kg 이상에서 유효한 효과를 보였으며 이러한 L-NAME의 항통각효과는 L-arginine을 동시에 투여했을 때 통계적으로 유의하게 감소되어 L-NAME의 효과가 NOS 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

### 참 고 문 헌

1. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in brain. *Nature* 1988; 336: 385-8.
2. Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL: L-N<sup>G</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 198-202.
3. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Roseland JH, Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
4. Dubuisson D, Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-74.
5. Hunskaar S, Hole K: The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-14.
6. Coderre TJ, Vaccarino AI, Melzack R: Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-8.
7. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M: Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. *Neuropharmacology* 1992; 31: 251-8.
8. Goettl VM, Larson AA: Nitric oxide mediates long term hyperalgesic and antinociceptive effects of the N-terminus of substance P in the formalin assay in mice. *Pain* 1996; 67: 435-41.
9. Malmberg AB, Yaksh TL: Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 1993; 54: 291-300.
10. Doursout MF, Liang Y, Chelly JE: NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. *Can J Anaesth* 2003; 50: 909-16.
11. Puig S, Sorkin LS: Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1996; 64: 345-55.
12. Lee YW: Spinal N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and pain modulation. *Korean J Anesthesiol* 1998; 34: 881-9.
13. Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF: Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol* 1992; 214: 93-6.
14. Lin Q, Peng YB, Wu J, Willis WD: Involvement of c-GMP in nociceptive processing by and sensitization of spinothalamic neurons in primates. *J Neurosci* 1997; 17: 3293-302.
15. McMahon SB, Lewin GR, Wall PD: Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 602-10.
16. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T: Regional and cardiac haemodynamic effect of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 625-31.