

취를 이용한 포르말린 및 열 유발 통증에서 척수강 Sildenafil의 효과에 관한 연구

전남대학교 의과대학 마취통증의학교실

윤명하 · 배홍범 · 신동진 · 김창모 · 정성태 · 김석재 · 최정일

= Abstract =

Evaluation for the Effects of Intrathecal Sildenafil on the Formalin- and Thermal-induced Nociception of Rats

Myung Ha Yoon, M.D., Hong Bueem Bae, M.D., Dong Jin Shin, M.D., Chang Mo Kim, M.D.,
Sung Tae Jeong, M.D., Seok Jai Kim, M.D., and Jeong Il Choi, M.D.

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

Background: Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) plays an important role in the modulation of nociception. Although local sildenafil produces antinociception, by increasing cGMP through the inhibition of phosphodiesterase 5, the effect of spinal sildenafil has not been determined. The authors evaluated the effects of intrathecal sildenafil on the nociceptive behavior evoked by formalin injection and thermal stimulation.

Methods: Lumbar intrathecal catheters were implanted into rats, with formalin and Hot-Box tests used as nociceptive models. The formalin-induced nociceptive behavior (flinching response) and withdrawal latency to radiant heat were measured, and the general behaviors also observed.

Results: The intrathecal administration of sildenafil produced dose-dependent suppression of the flinches in both phases in the formalin test, and increased the withdrawal latency in the Hot-Box test. No abnormal behaviors were noted.

Conclusions: Sildenafil, an inhibitor of phosphodiesterase 5, is active against the nociceptive state evoked in the spinal cord by formalin and thermal stimulations. Accordingly, spinal sildenafil may be useful in the management of pain. (Korean J Pain 2006; 19: 17-21)

Key Words: antinociception, cyclic guanosine monophosphate, phosphodiesterase, sildenafil, spinal cord.

서 론

Phosphodiesterase는 생명계(biological systems)에서 넓게 발생하여 적혈구를 제외한 조직에 존재하며¹⁾ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 분해에 관여하는 효소이다. Phosphodiesterase는 최소 9 종류의 아형이 동정되었다.²⁾ 이 중 5형이 세포내에서 cGMP 불활성화에 가장 관련이 있다고 한다.³⁾ cGMP는 혈관 이완 작용과 중추 및 말초 신경계에서 신호 전달 억제 등을 포함한 많은 과정에 작용한다고 한다.^{4,5)} 특히 cGMP가 침해 자극 억제효과와 관련이 있다는 연구결과

가 많이 보고되었다.⁶⁻¹⁰⁾ 따라서 phosphodiesterase 억제제는 세포내 cGMP 농도를 증가시켜 침해 자극에 대한 반응을 약화시킬 것으로 생각된다.

Sildenafil (Viagra[®])은 phosphodiesterase 5의 특이적인 억제제로 임상에서 발기부전 치료에 사용하는 약제이다.^{11,12)} 한편, 국소로 투여한 sildenafil은 염증성 통증 모형에서 항침해효과를 나타냈으나 열성 자극에는 효과가 없다고 한다.⁶⁻¹⁰⁾ 한편, 척수 수준에서 통증에 대한 sildenafil의 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

포르말린 시험과 열 시험은 급성 통증이나 촉진성(facilitation) 통증 상태를 보여주는 특징적인 통증 유발 시험 모형

접수일 : 2005년 3월 31일, 승인일 : 2005년 7월 7일

책임저자 : 윤명하, (501-757) 광주시 동구 학동 8번지, 전남대학교병원 마취통증의학과

Tel: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294, E-mail: mhyoon@chonnam.ac.kr

이 논문은 전남대학교병원 학술연구비(CUHRI-U-200431)에 의하여 연구되었음.

Received May 31, 2005, Accepted July 7, 2005

Correspondence to: Myung Ha Yoon, Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Medical School, Chonnam National University, 8 Hak-dong,

Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea. Tel: +82-62-220-6893, 1548, Fax: +82-62-232-6294, E-mail: mhyoon@chonnam.ac.kr

This paper was supported by Fund (CUHRI-U-200431) of Chonnam University Hospital Research Institute of Clinical Medicine, Chonnam National University.

이다.^{13,14)}

이 연구의 목적은 포르말린 주입 및 열성 자극에 의해 유발된 통증에 대한 척수강 내로 투여한 sildenafil의 효과를 관찰하여 척수 수준에서 진통제로서의 sildenafil의 효용성을 평가하고자 하는데 있었다.

대상 및 방법

의과학 연구소의 동물 위원회로부터 실험 계획에 대한 승인을 얻은 후 규정에 따라 모든 실험을 진행하였다. 실험 동물은 수컷 Sprague-Dawley (250-300 g) 쥐로 하였으며 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 척수강내 카테터는 Yaksh와 Rudy의 방법으로 거치 하였다.¹⁵⁾ 카테터 삽입 후 신경학적 손상을 보인 쥐는 실험에서 제외하고 흡입 마취제를 과다 투여하여 바로 사망 시켰고 정상 소견을 보이는 쥐는 각각의 케이지에 넣어 카테터 거치 수술 4-5일 후에 본 실험을 시행하였다.

이 연구를 위해 사용한 약물은 sildenafil이었고 Pfizer회사에서 기증받았다. 약물은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 10 μl로 만들어 수동식 기어 장치 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 투여하고 카테터 내의 사강 용적을 고려하여 실험 약물 투여 후 생리 식염수 10 μl를 추가로 투여하였다.

통증 유발 모형으로는 포르말린 시험과 Hot-Box 시험을 사용하였다.

포르말린 시험은 실험쥐의 뒷발바닥에 30 게이지 바늘을 이용하여 5% 포르말린 용액 50 μl를 피하조직 내로 주입하여 통증을 유발하는 방법이다.¹³⁾ 포르말린을 주입 받은 쥐는 주입 받은 발을 바닥에서 들었다 놔다 하는 특징적인 행동(flinching)을 보이는데 이를 통증 반응으로 간주하였다. 따라서 주입 받은 발을 자발적으로 떴었다 놔다 하는 횟수를 주기적으로 기록하여 정량화 하였다. 이를 위해 포르말린 주입 후 1, 5분에 1분 동안 그리고 주입 10분 후부터 60분까지는 매 5분 간격으로 1분 동안 flinching 횟수를 기록하였다. 통증 행동은 포르말린 주입 직후 증가하였다가 점차 감소하여 반응을 거의 보이지 않다가 약 10분 후부터 다시 증가하는 이상성(biphasic) 형태를 보이므로 포르말린 주입 후 9분까지를 제 1상으로 그리고 주입 후 10-60분까지를 제 2상으로 정의하였다.

Hot-Box 시험이란 Hargreaves형 열성 시험 기구를 변형시킨 것으로 쥐의 뒷발바닥에 방사성 열성 자극을 가한 후 그 발을 회피하는데 걸리는 시간을 측정하는 것이다.¹⁴⁾ 즉, 실험쥐를 30°C로 유지되는 유리판 위에 놓고 유리판을 통하여 쥐의 양쪽 발바닥에 방사성 열성 자극을 직접 가하였다. 자극과 동시에 시계가 작동하며 자극과 시계는 쥐가 발을 바닥에서 띄거나 20초(cut-off time)가 되면 자동적으로 멈추게 하였다. 대조치는 약물 투여 전에 두 뒷발에서 측정한

평균치로 하였다.

척수강 카테터 거치 4-5일 후 실험쥐를 10 × 10 × 30 cm 혹은 7 × 18 × 23 cm 크기의 실린더로 옮긴 후 약 20-30분 정도의 순응기간을 거쳐 실험을 진행하였다. 포르말린 시험에서는 실험쥐를 한번만 사용하였으나 Hot-Box 시험에서는 최소 3-4일 간격으로 같은 쥐를 이용하여 실험하였다. 실험자는 투여 약물의 종류와 용량에 대해서 알지 못하였다. 대조군은 DMSO를 투여한 쥐로 하였다.

포르말린 주입 10분전에 척수강 내로 sildenafil (1, 3, 10, 30 μg)을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 60분 동안 관찰하고 제 1상과 2상에서 각각 약물의 ED₅₀을 구하였다.

열성 자극에 대한 효과를 알아보기 위하여 척수강 내로 sildenafil 투여 후 15, 30, 60, 90 및 120분에 회피 반응을 측정하였다. 투여 용량은 이 실험에서 사용한 최대 용량(30 μg)으로 하였다.

다음으로 sildenafil 투여 후 운동 기능과 일반 행동을 관찰하였다. 운동 기능은 placing-stepping 반사(실험쥐를 책상의 모서리에 두면 발로 꼭잡고 올라서려는 반응)를 이용하여 관찰하였다. 일반 행동은 각막(corneal) 반사(PE-10 카테터로 각막을 자극하면 눈을 움직이는 반사)와 이개(pinna) 반사(PE-10 카테터로 외이도를 자극하면 귀를 움직이는 반사)를 이용하여 관찰하였다. 운동 기능과 일반 행동은 약물 투여 후 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 60분에 평가하였다. 운동기능 변화는 다음과 같이 점수화 하였다: 0, 정상; 1, 경미한 결손; 2, 경미한 결손; 3, 심한 결손. 각막 반사와 이개 반사는 반사기능 존재 유무로 판단하였다.

모든 측정값은 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 포르말린 시험에서 시간 반응 자료는 분당 통증 행동 횟수로 하였고 용량 반응 자료는 통증 행동 횟수의 총 합계로 하였다. 약물의 ED₅₀을 구하기 위해 통증 행동 횟수를 최대 가능 억제 효과(maximal possible inhibitory effect, MPIE) 백분율(%MPIE)로 바꾸었다.

$$\%MPIE = \frac{\text{약물 투여군에서 제 1상 (2상) 통증 행동 횟수 총합계}}{\text{대조군에서 제 1상 (2상) 통증 행동 횟수 총합계}} \times 100$$

Hot-Box 실험에서 시간 반응 자료는 자극에 대한 회피 반응 시간으로 하고 용량 반응 자료는 아래 공식에 따라 최대 가능 효과(maximal possible effect, MPE) 백분율(%MPE)로 하였다.

$$\%MPE = \frac{\text{약물 투여 후 회피 반응 시간} - \text{대조군 회피 반응 시간}}{\text{Cut-off time (20 s)} - \text{대조군 회피 반응 시간}} \times 100$$

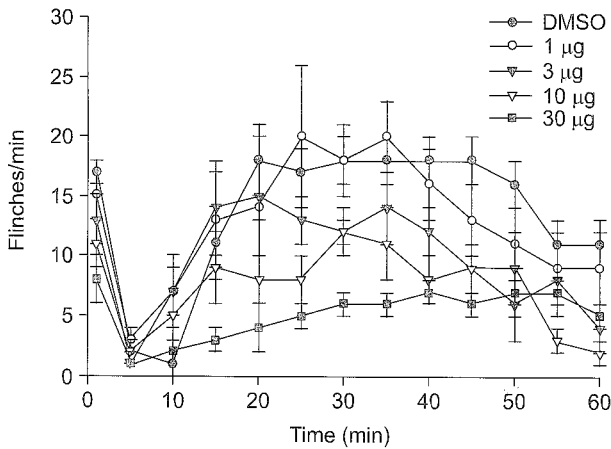


Fig. 1. Time effect curve of intrathecal sildenafil for the flinching in the formalin test. Sildenafil was administered 10 min before formalin injection. Formalin was injected subcutaneously at time 0. Data are presented as the number of flinches. Each line represents mean \pm SEM of 6-7 rats.

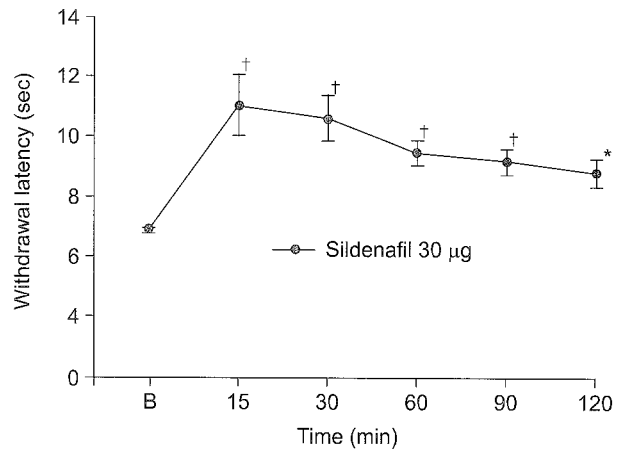


Fig. 3. Time effect curve of intrathecal sildenafil in the Hot-Box test. Sildenafil were administered immediately before the Hot-Box test. Data are presented as the latency of paw withdrawal. Each line represents mean \pm SEM of 7 rats. Compared with the control, *P < 0.01. †P < 0.001.

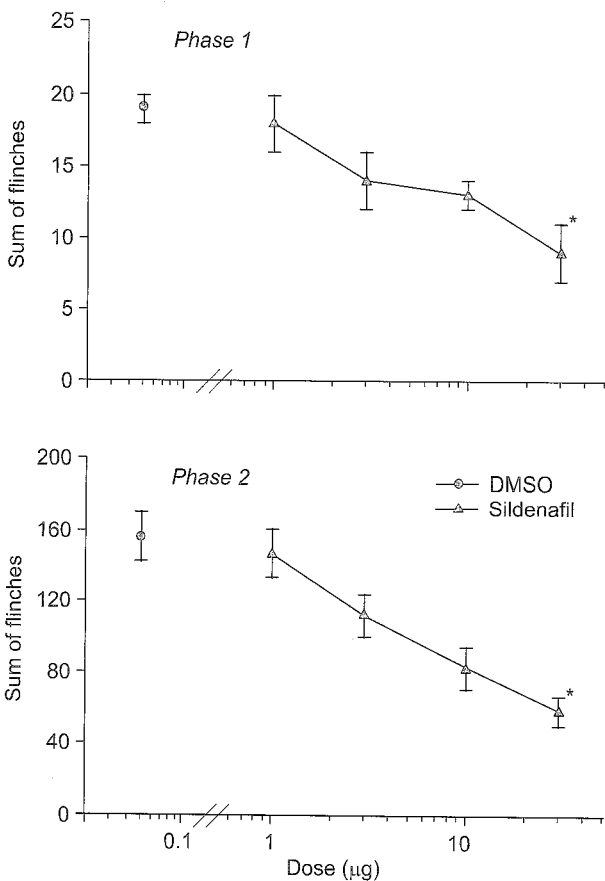


Fig. 2. Dose-response curve of intrathecal sildenafil for the flinching during phase 1 and phase 2 in the formalin test. Data are presented as the sum of flinches in each phase. Intrathecal sildenafil decreased flinches during both phases in a dose-dependent fashion. Each line represents mean \pm SEM of 6-7 rats. Compared with the control, *P < 0.05.

포르말린 시험에서 제 1상 및 2상의 ED50은 Tallarida와 Murray의 방법으로 구하였다.¹⁶⁾ 통계 분석은 Jonckheere test 나 반복 측정 분산분석법을 이용하였다. P값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

DMSO만을 투여 받은 대조군 쥐는 포르말린 주입에 의한 특징적인 통증 행동인 flinching 반응을 보였고 이 반응은 이상성으로 나타났다(Fig. 1). 대조군의 통증 행동 반응 횟수는 제 1상 및 2상에서 각각 19 ± 1 , 157 ± 14 회 이었다. 척수강 내로 투여한 sildenafil은 포르말린 시험 제 1상과 제 2상 모두에서 flinching 반응을 용량 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2). Sildenafil의 ED50은 제 1상과 제 2상에서 각각 27.8 및 $12.9 \mu\text{g}$ 이었다.

Hot-Box 시험에서 열성 자극에 대한 대조군의 회피 반응 시간은 6.9 ± 0.1 sec이었고 sildenafil 투여 후 15분에 11.1 ± 1 sec로 최고로 증가하였다가 점차 감소하였다(Fig. 3).

척수강 sildenafil 투여 후 placing-stepping 반사, 각막 반사 및 이개 반사는 모두 정상이었다.

고 찰

피하로 주입한 포르말린은 특징적인 이상성 형태의 통증 행동 반응을 보인다. 이는 포르말린 시험의 제 1상과 2상 반응의 발생 기전이 근본적으로 서로 다르다는 것을 시사한다. 즉 제 1상 반응은 포르말린 주입에 의해 1차 구심성 섬유에 의해 발생한다. 따라서 제 1상 반응은 1차 구심성 섬유의 자체 활성화도가 매우 높아져있는

상태로써 급성 통증을 반영한다. 반면 제 2상 반응은 낮은 정도의 구심성 섬유 활성화에도 불구하고 통증 행동 반응은 오히려 더 강화되어서 나타난다. 이를 촉진성 통증 상태라 한다. 즉 촉진성 통증 상태는 포르말린 자극에 의해 척수에서 분비된 흥분성 아미노산과 펩타이드 등의 유리에 의해 시작되고 이어서 세포내 Ca^{2+} 증가 및 kinase의 활성화¹⁷⁾ 증가 등을 통하여 이루어진다. 결과적으로 제 2상에서는 제 1상처럼 강력한 자극이 없음에도 척수의 wide dynamic range (WDR) 신경 세포의 활성화를 일으켜 통증 행동이 증가하게 된다. 본 연구에서도 포르말린 주입 후 특징적인 이상성 통증 행동 반응을 보였다.

이 실험 결과 척수강 내로 투여한 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil은 포르말린 시험의 제 1상과 제 2상 모두에서 통증 행동 반응을 모두 용량 의존적으로 감소하였다. 또한 열성 자극에 대해서도 회피 반응을 증가시켰다. 이는 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil이 척수 수준에서 급성 통증 및 촉진성 통증 상태를 효과적으로 억제한다는 것을 의미한다. 척수 수준에서 sildenafil의 이러한 항침해효과에 대한 보고는 처음이다.

Phosphodiesterase는 생명계에서 넓게 존재하며¹⁾ cGMP 분해에 관여하는 효소이다. Phosphodiesterase는 물질 특이성, 세포내 분포 및 억제제의 선택적 민감도 등과 같은 기능적 특성에 따라 1-9형까지 최소 9 종류의 아형이 동정되었다.²⁾ 이 중 5, 6 및 9형은 cGMP 분해 작용에 특이성을 갖고 있으며 특히 5형이 가장 세포내에서 cGMP 불활성화에 가장 관련이 있다고 한다.³⁾ 또한 5형은 방광, 대장, 폐, 췌장, 태반, 전립선, 소장 및 위 등 다양한 장기에서 발현되었다.¹⁸⁾

한편, cGMP는 혈소판 활성화도 억제, 호중성 백혈구 화학 끌림성(neutrophil chemotaxis) 그리고 중추 및 말초 신경계에서 신호 전달 억제 등을 포함한 많은 과정에 공통적으로 작용한다. Guanylyl cyclase는 GTP로부터 cGMP형성을 촉진하고 phosphodiesterase는 cGMP에서 GTP로의 가수 분해 작용을 촉진시킨다.¹⁹⁾ 따라서 세포내 cGMP 농도는 guanylyl cyclases의 활성도와 cGMP 특이적 phosphodiesterase 분해율에 의해 조절된다.^{19,20)} 이상을 종합하면 sildenafil은 phosphodiesterase 5의 분해를 억제하여 cGMP 농도를 증가시키게 되고 이를 통하여 항침해효과를 나타나게 되는 것으로 사료된다. 특히 본 실험 약물인 sildenafil은 phosphodiesterase 5에 특이성을 보이고 5형이 cGMP 불활성화에 가장 연관성이 있다는 점을 고려해 볼 때 5형의 phosphodiesterase는 척수 수준에서 침해 자극 조절에 관여하는 것으로 생각되며 이 효소를 억제하면 강력한 진통작용을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

한편, 국소 투여한 sildenafil은 acetic acid 유발 통증, carrageenan 유발 통각 과민 및 포르말린 시험에서 제 2상 통증 반응을 억제하였다. Sildenafil의 이러한 항침해작용 기전으로 nitric oxide-cGMP 회로가 제시되었다.^{7,9,10)} 반면, 국소 투여한 sildenafil은 tail-flick, hot-plate 자극 및 포르말린 시험에서 제

1상 통증 반응은 차단시키지 못했다.^{6,8)} 한편, 척수강 내로 투여한 이 실험에서는 sildenafil이 포르말린 시험 제 1상 통증 반응과 열성 자극에 의해 유발된 통증을 모두 약화시키 이전 보고들과 차이를 보였다. 이러한 항침해효과의 차이를 보이는 이유는 정확히 알 수는 없으나 사용한 실험 약물 종류, 투여경로, 통증 모형 및 실험동물 종류 등에 의한 것으로 사료된다.

이 연구결과 포르말린 시험에서 제 1상의 ED50은 제 2상의 약 2배였다. 이는 급성 통증에 대한 sildenafil의 효과가 더 약하다는 것을 시사한다. 또한 이 실험에서 사용한 최대 용량(30 μ g)에서 포르말린 시험 제 1상의 %MPIE와 Hot-Box 시험의 %MPE는 각각 46% 및 43%로 제한적인 효과를 보였다. 따라서 척수 수준에서 sildenafil이 급성 통증보다는 촉진성 통증에 대해 더 효과가 있다는 것을 시사한다.

한편 이 연구에서 사용한 용량보다 더 많은 용량에서 sildenafil은 하지에 힘이 약화된 소견(motor weakness)을 보여서 더 이상 실험을 진행하지 못했다. 부작용이 없는 phosphodiesterase 5 특이적 억제제가 미래에 개발된다면 통증 관리에 보다 더 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil은 척수 수준에서 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증과 촉진성 통증을 억제하였으며 열성 자극에 대한 통증 반응도 감소시켰다. 따라서 척수 sildenafil이 향후 통증 관리에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Beavo JA, Reifsnyder DH: Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 150-5.
2. Moreland RB, Goldstein II, Kim NN, Traish A: Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 97-104.
3. Pyne NJ, Arshavsky V, Lochhead A: cGMP signal termination. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1019-22.
4. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
5. Nathan C: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.
6. Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V: Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 81-7.
7. Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulkarni SK: Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res* 2001; 909: 170-8.
8. Asomoza-Espinosa R, Alonso-Lopez R, Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Banuelos P, Torres-Lopez JE, Granados-Soto V: Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2001; 418: 195-200.
9. Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulkarni SK: Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. *Pharmacology* 2003; 67: 150-6.

10. Patil CS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK: Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antinociception. *Pharmacology* 2003; 69: 183-9.
 11. Terrett NK, Bell AS, Brown D, Ellis P: Sildenafil (VigraTM) a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 1996; 6: 1819-24.
 12. Boolell M, Gepi-Artee S, Gingell JC, Allen MJ: Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* 1996; 78: 257-61.
 13. Yoon MH, Choi JI, Kwak SH: Characteristic of interactions between intrathecal gabapentin and either clonidine or neostigmine in the formalin test. *Anesth Analg* 2004; 98: 1374-9.
 14. Yoon MH, Yaksh TL: The effect of intrathecal gabapentin on pain behavior and hemodynamic on the formalin test in the rat. *Anesth Analg* 1999; 89: 434-9.
 15. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
 16. Tallarida RJ, Murray RB: *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. 2nd ed. New York, Springer-Verlag. 1987, pp 1-95.
 17. Wilcox GL, Seybold V: Pharmacology of spinal afferent processing. In: *Anesthesia: Biologic foundations*. Edited by Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ: Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1997, pp 557-76.
 18. Stacey P, Rulten S, Dapling A, Phillips SC: Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 249-54.
 19. Pyne NJ, Arshavsky V, Lochhead A: cGMP signal termination. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1019-22.
 20. Beavo JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-48.
-