

만성 신경병성 통증이 유발된 쥐의 뇌척수액에서 단백질체학을 이용한 Calcitonin Gene-related Peptides의 정량분석

단국대학교 의과대학 마취통증의학교실

김 동 희 · 홍 성 호

A Proteomic Approach for Quantitative Analysis of Calcitonin Gene-related Peptides in the Cerebrospinal Fluid Obtained from a Rat Model of Chronic Neuropathic Pain

Dong Hee Kim, M.D., and Sung Ho Hong, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea

Background: This study was conducted to quantitatively analyze proteins associated with the calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cerebrospinal fluid (CSF) that was obtained from a rat model of chronic neuropathic pain following administration of intrathecal CGRP₈₋₃₇.

Methods: Male Sprague-Dawley rats (100–150 g, 5–6 wks) were divided into two groups, sham controls and neuropathic pain models. At the time of operation for neuropathic pain model, an intrathecal catheter was threaded through the intrathecal space. At 1 or 2 wks after the operation (maximum pain state), a test dose of 1, 5, 10, or 50 nM of CGRP₈₋₃₇ was injected into the intrathecal catheter and the CSF was then aspirated. Conventional proteomics to evaluate the CSF were then performed using high resolution 2-D, gel electrophoresis followed by computational image analysis and protein identification by mass spectrometry.

Results: Treatment with CGRP₈₋₃₇ effectively alleviated mechanical allodynia in a dose dependent manner. The most effective response was obtained when a dose of 50 nM was administered, but significant differences were obtained following administration of only 5 nM CGRP₈₋₃₇. Furthermore, the results of the proteomic analysis were consistent with the experimental results. Specially we detected 30 differentially expressed spots in 7 images when 2-D gel electrophoresis was conducted. The intensity of 6 of these spots (spot number: 20 and 26–30) was found decrease the CGRP₈₋₃₇ dose increased; therefore, these spots were evaluated by mass spectrometry. This analysis identified 2 different proteins, CGRP (spot numbers: 26–30) and neurotensin-related peptide (spot number: 20).

Conclusions: The results of this study suggest that CGRP plays a role in chronic central neuropathic pain and is a major target of chronic neuropathic pain management. (Korean J Pain 2008; 21: 112–118)

Key Words: allodynia, CGRP, electrophoresis, neuropathic pain, NRP, proteomics.

서 론

이제까지는 단백질체학(proteomics)을 이용하여 화학요

법에 반응을 잘하는 환자군과 반응하지 않는 환자들의 혈청 내 단백질의 차이에 대한 연구가 있었고, 이러한 연구는 암환자나 만성통증 환자의 치료에 도움이 될 수 있으며¹⁾ 이를 바탕으로 유전자치료 및 단백질체의 개발

접수일 : 2008년 4월 18일, 승인일 : 2008년 7월 18일
 책임저자 : 김동희, (330-715) 충남 천안시 안서동 산 16-5
 단국대학교병원 마취통증의학과
 Tel: 041-550-6828, Fax: 041-551-9330
 E-mail: anedhkim@hanmail.net

본 연구는 2004년 학술진흥재단 지방대학 육성지원에 의하여 이루어졌음.

Received April 18, 2008, Accepted July 18, 2008
 Correspondence to: Dong Hee Kim
 Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine,
 Dankook University, San 16-5, Anseo-dong, Cheonan 330-715, Korea
 Tel: +82-41-550-6828, Fax: +82-41-551-9330
 E-mail: anedhkim@hanmail.net
 Supported by Korea Research Foundation (2004),

에 기초자료를 제공하는 데도 도움이 될 수 있었다. 신경병증 통증이 유발된 쥐에서의 뇌간 세포질 단백질에 대한 단백체학 분석으로 수개의 단백질에 대한 자료가 발표되었고,²⁾ 방광이 폐쇄된 쥐에서 증가되거나 감소된 단백질 물질들에 대한 단백체학적 분석도 이미 이루어졌다.³⁾ 그러나 만성 신경병증 통증이 유발된 쥐에서의 신경전달 물질들에 대한 단백체학적 분석은 아직 활발하게 이루어지지 않고 있다. 본 연구는 단백체학을 이용하여 통증발생에 관여하는 단백질을 확인하고 그 변화의 원인을 알아보고자, 환자의 통증에 관여하는 단백질 중의 하나로 생각되는 calcitonin gene-related peptide (CGRP)에 대하여 연구를 시행하였다. 단백체학은 일반적으로 고해상도의 이차원 전기영동법(2D electrophoresis, 2DE)과 전산화된 이미지 분석법, 질량분석기를 이용한 단백질의 확인으로 이루어져 있다.⁴⁾

CGRP는 37개의 아미노산으로 구성된 peptide로 2개의 type이 있다.⁵⁾ α -CGRP는 calcitonin gene의 tissue-specific alternative RNA spicing이며,⁶⁾ β -CGRP는 다른 gene으로 부호화(encoded)되어 있다.^{7,8)} α -CGRP는 일차구심성 감각 신경계의 일환으로 말초신경,⁹⁾ 후근신경절 세포,¹⁰⁾ 척수 후각세포의 laminae I, II, V 등에 존재하며,¹¹⁾ 척수후각의 CGRP는 정상 또는 만성 탈구심성 척수에서 기원한 일차구심성 기능이 있다.¹²⁾ 면역세포화학적 방법과 부합화(hybridization) 방법으로 CGRP가 비수초화 C 섬유나 미세수초화 A δ 섬유로 연결되는 후근신경절의 작은 신경세포에서 생성된다는 사실이 밝혀졌다. 또한 이 신경섬유는 통증, 온도감각을 비롯한 각종 유해 또는 무해한 기계적 자극의 전달에 관여한다.¹³⁾

CGRP가 침체수용성 반응에 관여하는 것을 밝힌 몇몇 논문들이 있는데, Oku 등은¹⁴⁾ CGRP의 척수강 내 주입으로 유해 온도 및 기계적 자극에 대한 hindpaw withdrawal 반응의 잠복기가 감소되는 것을 관찰하였으며, Christensen 등은¹⁵⁾ 쥐에서 척수 내로의 CGRP 분비가 온도에 대한 과감각과 침체수용성 반응을 유발한다고 하였다. 또한 정상 쥐에서 CGRP의 길항제인 CGRP₈₋₃₇을 척수강 내 투여 시 온도 및 기계적 자극에 대한 침체 수용성 반응이 억제되었으며,¹⁶⁾ 이로써 척수강 내 CGRP는 중추성 또는 말초성 침체 수용성 반응을 전달하는데 관여함을 알 수 있다. 즉, 이로써 척수후각에서 CGRP 발현의 변화양상이 뇌척수액에 반영됨을 시사한다. 또한 단백질 발현에 선행하는 유전자 즉 CGRP 합성에 관여하는 m-RNA 증감은 단백질 발현을 직접적으로 대변하는 지표로 적당하지 않기 때문에 단백질을 직접 측정하는 방법이 신경

병증 통증의 기전을 연구하는데 더 적합하다고 생각된다.

본 연구는 신경병증 통증이 유발된 쥐에서 척수강 내 CGRP 등 기타 단백질들의 정량분석을 단백체학을 이용하여 신경병증 통증 유발 전 정상수치와 비교 분석하고, 이들 수치의 변화와 이질통의 관계를 규명하기 위해서 실시하였다. 더불어 신경병증 통증과 CGRP 수치와의 연관관계를 비롯하여 기타 단백질들 수치변화와의 상관관계를 밝히고, CGRP의 길항제인 CGRP₈₋₃₇를 투여하여 CGRP의 항통각효과가 감소되는 것을 확인함으로써, 항이질통효과를 규명하였다.

대상 및 방법

태어난 지 5 내지 6주 된 Sprague-Dawley 백서(100–150 g)를 사용하여 각각의 몸통크기에 맞는 투명한 플라스틱 튜브에 넣어 2시간 동안 적응시킨 후 꼬리에서 von Frey filament (19.6 mN, 2.0 g)를 이용하여 신경병성 통증 증후의 하나인 기계적 이질통을 검사하였다. 꼬리에서 민감한 부위를 찾아 von Frey filament로 10회 자극 시 2회 이상 꼬리가 튀거나(tail-flick) 경련(tail twitching)을 보이는 쥐나, 육안 상 보행자세, 척추의 기형 등을 관찰하여 운동신경 손상의 증후가 보이는 쥐는 실험에서 제외시켰다. 본 연구는 본 대학 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻고, 제반 규정을 준수하였다.

대상 쥐 5마리는 isoflurane을 이용한 흡입마취를 실시하고 요추 5번과 6번 좌측 척추신경을 절찰하여 신경병증 모델을 만들었고,¹⁷⁾ 나머지 5마리는 sham군으로 하여 척추신경은 건드리지 않고 같은 수술을 실시하였다. 이질통검사는 von Frey filament를 이용하였고, 신경병증 쥐는 수술 6일 후, 수술 전이나 sham군에 비하여 3–4배 낮은 g수에서 반응을 보였다. von Frey filament (0.4, 0.7, 1.2, 2.0, 3.6, 5.5, 8.5, 15 g)로 백서의 발바닥에 자극을 가한 후 회피반응을 “up-down”법을 이용하여 측정하였다.¹⁸⁾ 신경병성 모델이 만들어진 후 CGRP₈₋₃₇ 투여 전 신경병증군과 sham군 10마리 모두 척수강 내 약물주입과 뇌척수액 채취를 위하여 척수강 내 카테터를 Yaksh와 Rudy의¹⁹⁾ 방법으로 거치하였는데, 후두경부 정중선에서 절개하고 근육을 분리한 후 경막을 주사침으로 뚫어 척수액이 나오는지 확인하고 길이 8.5 cm의 polyethylene-10 튜브를 요부확장 부위인 제12 흉추와 제1 요추부위에 카테터의 끝이 위치하도록 척수강 내 거치하였다. 또한 거치 직후 척수강 내 카테터를 통하여 뇌척수액 단백질 분석을 위하여 한두 방울 정도의 척수액을 채취한

후 1, 5, 10 또는 50 nM의 CGRP₈₋₃₇을 각각의 쥐에게 총 10 μ l 용량으로 투여하여 30분 후 다시 뇌척수액을 채취하였고, 기계적 이질통의 변화여부를 관찰하여 통증의 발생에 CGRP가 관여하는지 여부를 재증명하였다. 실험이 끝난 후 척수 절단하여 제5 요추 척수후근 근위부를 hematoxylin-eosin 염색하여 해부현미경으로 각 용량의 CGRP₈₋₃₇에 따른 신경독성 여부를 관찰하여 CGRP₈₋₃₇의 척수강 내 투여의 안전성을 규명하였다.

이차원 전기영동법을 통해 단백질을 분자량 및 등전점을 통해 분리하고, 상호 비교되는 단백질을 Melanie III (Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland)를 이용하여 양적 발현 차를 파악하여, 특히 포지 단백질을 규명하였다. 또한 2-D 상에서 보여지는 spot에 대한 다양한 시료 간의 비교분석을 통해 질병에 의하여 유발되는 단백질, 질병에 의하여 소멸되는 단백질, 질병에 의하여 변형(modification, fragmentation) 되는 단백질 등으로 분류하여 각각의 단백질들에 대한 동정을 하였다.

단백질 추출을 위하여 전처치는 뇌척수액이 들어있는 tube에 washing buffer [500 mM tris-HCl (pH7.1), 500 mM KCl, 0.5M EDTA, 50 mM PMSF]를 500 μ l씩 넣고 vortex 10초 이상씩 실시하였다. 이때 ice box를 이용하여 sample이 녹지 않도록 최대한 주의를 기울였다. 이후 냉동 건조하고 진공건조하였다. 얻어진 내용물은 -80°C의 냉동고에 보관하였다.

단백추출을 위하여 조직 건조 상태의 무게(sample dry weight)를 측정 후 미리 -20°C에서 차갑게 둔 막자사발을 이용하여 액체질소로 조직을 갈았다. 이후 가루상태로 튜브에 옮겨 넣었다. 용해 buffer (200 μ l/60 mg: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.2% ampholyte, 25 mM tris-HCl (pH7.1), 50 mM KCl, 100 mM DTT, DNase 210 unit)를 넣고, glass beads를 조금 넣고 휘저었다. 실온에서 30분간 둔 뒤에 원심분리(13,000 rpm, 20분, 4°C)를 시행하고 상등액을 새 튜브로 옮겨주었다. 여기에서 얻어진 1-2 μ l로 단백질 정량을 하였다. 단백질 농도는 상업적으로 판매되는 Bradford reagent (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

이차원 전기영동을 위하여 일차원적인 젤 분리는 17 cm pH 4-7 IPG (immobilized pH gradient gel) strip을 사용하였다. 조직 1 mg을 IPG strip에 놓고 등전하 초점화(isoelectric focusing, IEF)는 PROTEAN IEF cell을 가지고 시행한다(145 kVh, 20°C). IEF 후 IPG strip은 2% DTT를 포함하는 6 M urea, 2% SDS, 0.05 M tris-HCl (8.8)와 20% glycerol에서 15분 동안 평형화 시킨 뒤 2.5% io-

doacetamide를 포함하는 같은 용액에서 15분간 평형화시켰다. 평형화된 IPG strip은 15% uniform polyacrylamide gel로 옮기고 PROTEAN II Xi cell tank (30 mA)에서 실험을 계속하였다. 젤은 coomassie brilliant blue R250으로 염색하였다. 염색 후 2DE는 Powerlook 1100 (UMAX, Fremont, USA)을 사용하여 이미지화 시켰다. 이미지들은 Melanie III 소프트웨어를 사용하여 분석하고, 모든 실험은 재현성을 위하여 5회 이상 시행하였다.

대조군과 다르게 표현되는 실험군의 단백질 spot들은 질량분석기(matrix assisted laser desorption/ionization-the time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS, Micromass, USA)로 분석하였다.

결 과

각 대상군의 반응을 비교하기 위하여 수술 6일 후 von Frey filament를 이용한 이질통 검사에서 각 역치는 mean \pm SE로 하여 수술전군(12.03 \pm 1.47 g) 대비 신경병증군(2.81 \pm 0.81 g)($P < 0.05$, Wilcoxon paired test), sham군(13.02 \pm 0.48 g) 대비 신경병증군(2.81 \pm 0.81 g)($P < 0.05$, Mann-Whitney unpaired test)이었고, 모든 신경병증 쥐에서 역치가 4 이하로 감소되었다.

신경병증 통증이 발생된 수컷 백서에서 1, 5, 10, 50 nM CGRP₈₋₃₇의 척수강 내 투여 시 발바닥 회피반응을 보이는 von Frey filament의 g 수치를 mean \pm SE로 표시할 때 투여 전과 비교하여(2.81 \pm 0.81 g) 이질통의 감소가 투여용량에 비례하여 나타났으며(1 nM; 4.02 \pm 0.93 g, 5 nM; 7.84 \pm 1.20 g, 10 nM; 10.32 \pm 0.83 g, 50 nM; 13.52 \pm 0.38 g, Mann-Whitney unpaired test), 5 nM 투여 시부터 의미 있는 뚜렷한 감소를 보여($P < 0.05$) 50 nM에서 가장 뚜렷하였다. 또한 이 중 CGRP₈₋₃₇ 투여 전, 1 nM과 5 nM 투여 20분 후 척수강 내 카테터를 통하여 뇌척수액을 한두 방울 추출하여 단백질분석 시 그 결과 gel에서 차등발현을 보인 영상(image)은 총 7개였으며 (Fig. 1, 2) 이 차등발현을 보인 spot들의 %vol 값에 대한 수치를 계산하고 이를 table로 나타내었다(Table 1). 신경병증 통증이 유발된 백서와 sham 수술을 한 백서사이에 차이가 있는 총 30개의 차등발현 spot를 찾아내었고, 이 중 CGRP₈₋₃₇ 투여량에 비례하여 의미 있는 감소를 보인 6개의 spot (spot번호: 20, 26-30)을 분석하여 동정한 결과 20번은 neurotensin-related peptide (NRP), 26-30번은 동일 단백질로서 CGRP로 비교 분석되었다. 미세현미경을 통한 각 투여량의 척수절단 신경세포 관찰 결과 미세

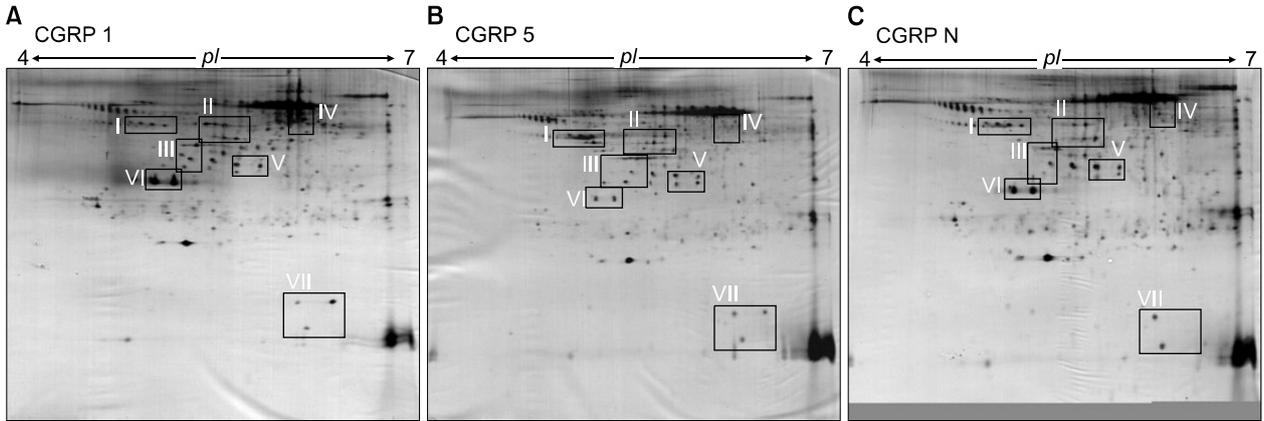


Fig. 1. Two-dimension electrophoresis patterns of neuropathic rat model CSF after CGRP₈₋₂₇ 1 nM (A), 5 nM (B) injection and before CGRP₈₋₂₇ injection (C). Typical 7 parts (images) are detected.

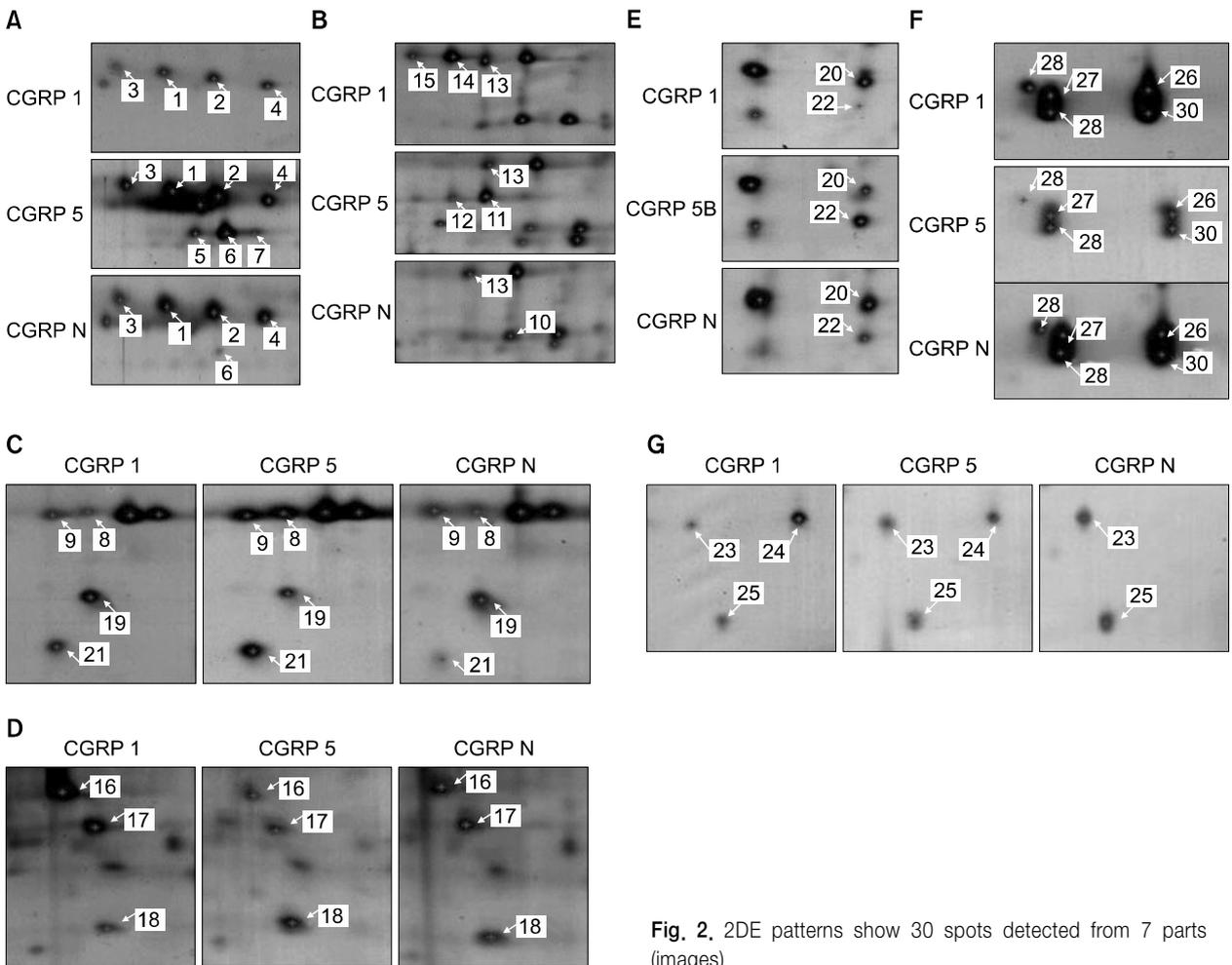


Fig. 2. 2DE patterns show 30 spots detected from 7 parts (images).

Table 1. Quantative Analysis (Vol%) of Each 30 Spot in Each Group

Spots	Gel name		
	CGRP 1	CGRP 5	CGRP N
# 1	0,461	3,019	1,666
# 2	0,734	3,456	2,043
# 3	0,248	1,294	0,172
# 4	0,512	1,397	1,195
# 5	0,000	0,654	0,000
# 6	0,000	2,515	0,166
# 7	0,000	0,209	0,000
# 8	0,437	2,381	0,848
# 9	0,527	1,751	0,572
# 10	1,609	0,400	0,710
# 11	0,000	1,550	0,000
# 12	0,000	0,033	0,000
# 13	1,442	0,699	0,607
# 14	2,760	0,000	0,000
# 15	0,416	0,000	0,000
# 16	3,091	0,350	0,962
# 17	1,739	0,354	0,825
# 18	0,151	0,796	0,226
# 19	1,142	0,335	0,589
# 20	1,660	0,379	1,648
# 21	0,405	1,168	0,291
# 22	0,000	1,157	0,153
# 23	0,328	0,879	1,752
# 24	1,937	0,608	0,000
# 25	0,797	0,886	2,539
# 26	5,786	0,519	3,973
# 27	3,417	0,368	2,923
# 28	0,988	0,034	0,705
# 29	3,048	0,474	3,208
# 30	3,488	0,474	3,643

한 신경주위 단핵세포응집(mild perineural mononuclear cell infiltration)이 투여여부와 관계없이 일부 보이고 아무런 신경독성 증거가 나타나지 않았다(Fig. 3).

고찰

CGRP는 정상 및 비정상적인 침해수용성 자극전달에 중요한 역할을 하며, CGRP의 척수강 내 투여는 유해한 온도 및 기계적인 자극에 대한 hindpaw withdrawal의 잠복기를 감소시킨다. CGRP의 작용기전은 아직 명확하지 않으나, substance P (SP)와 상호작용을 하여 SP의 작용 시간을 연장하고, 척수에서 glutamate와 aspartate의 분비를 증가시켜 척수시상회로를 직접 촉진시킴으로써 신경병증 통증의 주요 증상인 중추감작을 유도한다고 추측된다.

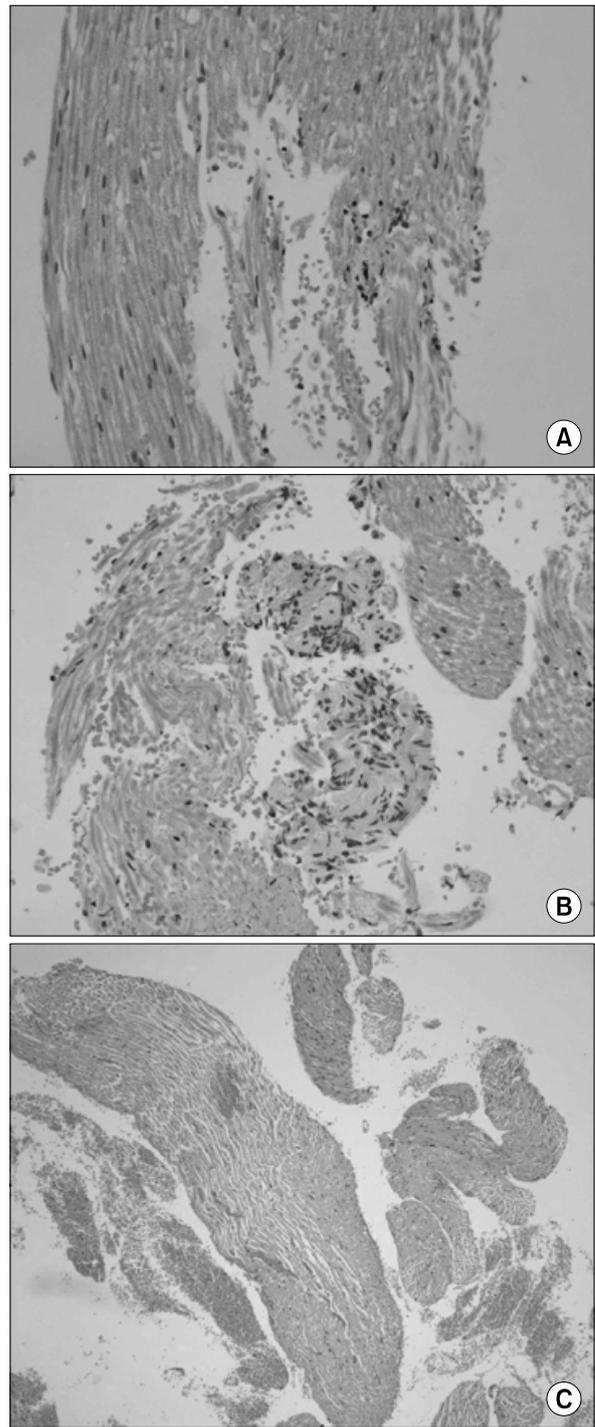


Fig. 3. Representative hemoxilin-eosin stained spinal cord dorsal root sections are showing mild perineural mononuclear cell infiltration after intrathecal injection of CGRP₈₋₂₇ 1 nM (A), CGRP₈₋₂₇ 5 nM (B) and saline (C)(×100).

Bennett 등은²⁰⁾ 척수 절단으로 기계적 및 온도 이질통을 가진 쥐의 척수강 내에 CGRP₈₋₃₇을 투여하여 이질통을 억제시켰으며, 이로써 CGRP 수용체가 만성 중심성

신경병증 통증에 중요한 역할을 한다고 밝혔다. 최근 Sun 등은²¹⁾ capsaicin 주사 1시간 후 CGRP₈₋₃₇를 투여하면 투여용량에 비례하여 capsaicin으로 인한 기계적 이질통과 과감각을 가역시킬 수 있다고 발표하여, 척수후각에 존재하는 CGRP 수용체가 피부염증반응과 연관된 침해수용성 반응의 발생과 유지에 관여한다고 하였다.

본 연구에서는 쥐에서 신경병증 통증이 발생하기 전의 정상상태에서와 척수신경결찰을 하여 신경병증 통증(이질통과 과감각증)이 유발된 경우에서의 장기간의 이질통, 과감각증, 운동기능 검사를 실시하고 더불어 척수강 내 카테터를 통한 뇌척수액 또는 척수후각에서의 CGRP, SP, glutamate, aspartate의 정량분석을 단백체학을 이용하여 실시하여 통증의 발생 시 CGRP가 증가 여부를 밝히고, 이와 더불어 CGRP 수치변화와 기타 단백질들의 수치변화의 연관성을 규명하고자 하였다.

최근 척수 내의 CGRP의 증가가 신경병증 통증 또는 중추성 통증에서 발생하는 이질통, 과감각, 중추감각을 유발한다는 연구들이 있었다.²²⁾ 그러나 모두 중추성 통증을 가진 쥐의 척수강 또는 척수 내로 CGRP₈₋₃₇를 투여하여 CGRP 효과를 길항시켜 상기 통증이 감소되는 결과를 얻어 유추한 결과였다. Sun 등은²¹⁾ 쥐에서 capsaicin에 의하여 유발된 2차적 기계적 이질통과 과감각에 대한 CGRP와 그 수용체의 역할을 알아보기 위하여, CGRP₈₋₃₇를 척수후각에 거치된 미세투석섬유(microdialysis fiber)로 투여하였으며, 그 결과 CGRP₈₋₃₇ 투여용량에 따라 기계적 이질통의 감소효과가 나타났다. Bennett 등은²⁰⁾ 쥐의 척수강 내 CGRP₈₋₃₇를 투여하여 신경병증 통증의 억제 효과를 유도하였다. 따라서 기존의 연구에서는 CGRP의 정량적 분석 특히 단백체학을 이용한 분석은 시도된 적이 없었다. 다만 CGRP₈₋₃₇ 투여로 가역되는 통증효과를 증명하였을 뿐이었다.

신경병증 통증의 병태생리학적 변화는 수많은 신경전달 물질, 신경조절물질, 성장요소, 말초신경과 중추신경에 있는 ion-channel 수용체들 간의 상호작용이다.²³⁾ 그러므로 이러한 물질들의 규명과 그 역할에 대한 분석이 필요하다고 본다.

본 연구에서는 대조군과 차등을 보인 30개의 차등발현 spot이 있어, 신경병증 통증과 연관된 많은 단백질이 존재함을 알 수 있었고, 이 중 길항제에 의해 감소되는 6개의 spot이 NRP와 CGRP로 분석되어, CGRP의 신경병증 통증에 대한 역할이 증명되었다. 또한 길항제가 CGRP 수용체를 차단하여 항침해 효과를 나타내는데, 길항제가 전시냅스 CGRP 수용체뿐 아니라 후시냅스

CGRP 수용체를 길항하여 substance P의 방출을 억제시킨다.¹⁶⁾

이제까지 신경병증 통증 유발 시의 CGRP 발현을 단백체학적으로 증명한 논문은 아직 발표된 적이 없었는데 본 연구는 단백체학을 이용하여 신경병증 통증 발생 전후의 척수강 또는 척수후각의 CGRP 정량적 분석을 실시하여 통증 정도와 CGRP와의 관계를 정량적으로 규명하고, 이를 다시 CGRP₈₋₃₇로 가역하여 신경병증 통증에 대한 CGRP₈₋₃₇의 임상적 유용성과 신경독성 유무를 관찰하여, 향후 만성 신경병증 통증 환자의 치료제로서의 활용 및 개발을 기대할 수도 있다. 다만 향후 발생하는 부작용과 CGRP의 작용시간의 연장문제가 중요한 관건이라 생각한다. 또한 유전자를 이용한 통증의 원인 규명 및 치료제의 개발로 만성 신경병증 통증에 시달리는 많은 환자들이 유전학적인 개발로 생산된 약물치료를 받을 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 CGRP 수용체는 만성신경병증 통증 발생에 중요한 역할을 하며 향후 만성통증치료제로서 중요한 목표가 될 수 있으리라고 생각한다. 더불어 유전공학을 이용한 만성통증 치료 기초를 이룰 수 있으며, 단백체학을 이용하여 유전자 치료 및 단백질 칩 개발에 기초가 되어 만성통증 치료에 도움이 될 것으로 기대한다.

본 연구는 단백체학을 이용하여 정상 상태와 신경병증 통증 상태의 척수강 내 CGRP 및 기타 단백질 등을 분석하여 통증 발생 시 증가되는 여러 단백질의 존재를 규명하였고, 이들의 상호 연관성과 통증의 정도에 따른 변화되는 양상을 관찰하면서, 단백체학을 이용한 정확한 유전학적 분석을 시행하였고, CGRP와 NRP가 분석되었다. 향후 나머지 단백질들에 대한 분석이 이루어진다면 유전자와 관련된 통증 연구로서, 통증 발생을 유발하거나 억제하는 단백질들의 규명으로, 유전자를 이용한 만성통증 치료법 개발에 도움을 줄 수 있다고 생각된다. 다만 본 연구에서 스펙트럼이 6개 발견되었으므로 동정된 단백질이 6개 이상 있는 것으로 보고 이에 대한 계속적인 연구 및 정보제공이 필요하다고 사료되며, 차후 각 단백질들의 기능에 대한 분석은 이루어져야 한다고 본다.

참 고 문 헌

1. Ryu JW, Kim HJ, Kim DH, Song IH, Park JY, Hwang CH, et al: The proteomics approaches to find bio-markers in serum of locally advanced breast cancer patients. *J Breast Cancer* 2006; 9: 25-30.

2. Alzate O, Hussain SR, Goettl VM, Tewari AK, Madiati F, Stephens RL Jr, et al: Proteomic identification of brainstem cytosolic proteins in a neuropathic pain model. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 128: 193-200.
3. Kim HJ, Sohng IH, Kim DH, Hwang CH, Park JY, Ryu JW: Proteomic approach for identifying biomarkers changed in the urinary bladder when bladder neck is obstructed partially. *Continence* 2005; 1: 36-41.
4. Landry J, Chrétien P, Laszlo A, Lambert H: Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells. *J Cell Physiol* 1991; 147: 93-101.
5. Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, et al: Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 1988; 25: 195-205.
6. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, et al: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 304: 129-35.
7. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982; 298: 240-4.
8. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG: Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 1985; 229: 1094-7.
9. Ishida-Yamamoto A, Tohyama M: Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue. *Prog Neurobiol* 1989; 33: 335-86.
10. Cameron AA, Leah JD, Snow PJ: The coexistence of neuropeptides in feline sensory neurons. *Neuroscience* 1988; 27: 969-79.
11. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, et al: Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 1984; 4: 3101-11.
12. Chung K, Lee WT, Carlton SM: The effects of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett* 1988; 90: 27-32.
13. Willis WD, Coggeshall RE: Sensory mechanisms of the spinal cord. New York, Plenum. 1991, p 575.
14. Oku R, Satoh M, Fujii N, Otaka A, Yajima H, Takagi H: Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res* 1987; 403: 350-4.
15. Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE: Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain* 1996; 68: 97-107.
16. Yu LC, Hansson P, Lundberg T: The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses in rats. *Brain Res* 1994; 653: 223-30.
17. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-63.
18. Chaplan SR, Bach Fw, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55-63.
19. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
20. Bennett AD, Chastain KM, Hulsebosch CE: Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP8-37 in a rodent model of chronic central pain. *Pain* 2000; 86: 163-75.
21. Sun RQ, Lawand NB, Willis WD: The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the generation and maintenance of mechanical allodynia and hyperalgesia in rats after intradermal injection of capsaicin. *Pain* 2003; 104: 201-8.
22. Ebersberger A, Charbel Issa P, Vanegas H, Schaible HG: Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R, S)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat. *Neuroscience* 2000; 99: 171-8.
23. Millan MJ: Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355-474.