

백서의 척수강 내로 투여한 Sildenafil의 진통효과에 대한 Opioid 수용체 역할에 관한 연구

¹전남대학교 의과대학 마취통증의학교실, ²두뇌한국21사업 전남대학교 의생명 인력사업단

이형곤¹ · 정창영¹ · 윤명하^{1,2} · 김응모¹ · 신승현¹ · 김여옥¹ · 황란희² · 최금화²

The Role of Opioid Receptor on the Analgesic Action of Intrathecal Sildenafil in Rats

Hyung Gon Lee, M.D.¹, Chang Young Jeong, M.D.¹, Myung Ha Yoon, M.D.^{1,2}, Woong Mo Kim, M.D.¹, Seung Heon Shin, M.D.¹, Yeo Ok Kim, M.S.¹, Lan Ji Huang, M.D.², and Jin Hua Cui, M.D.²

¹Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Medical School, Chonnam National University,

²Brain Korea 21 Project, Center for Biomedical Human Resources at Chonnam National University, Gwangju, Korea

Background: Intrathecal sildenafil has produced antinociception by increasing the cGMP through inhibition of phosphodiesterase 5. Spinal opioid receptor has been reported to be involved in the modulation of nociceptive transmission. The aim of this study was to examine the role of opioid receptor in the effect of sildenafil on the nociception evoked by formalin injection.

Methods: Rats were implanted with lumbar intrathecal catheters. Formalin testing was used as a nociceptive model. Formalin-induced nociceptive behavior (flinching response) was observed. To clarify the role of the opioid receptor for the analgesic action of sildenafil, naloxone was administered intrathecally 10 min before sildenafil delivery, and formalin was then injected 10 min later.

Results: Intrathecal sildenafil produced dose-dependent suppression of flinches in both phases during the formalin test. Intrathecal naloxone reversed the analgesic effect of sildenafil in both phases.

Conclusions: Sildenafil is active against the nociceptive state that's evoked by a formalin stimulus, and the opioid receptor is involved in the analgesic action of sildenafil at the spinal level. (Korean J Pain 2007; 20: 21-25)

Key Words: analgesia, cyclic guanosine monophosphate, opioid receptor, phosphodiesterase, sildenafil, spinal cord.

서 론

여러 연구에 의하면 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)는 혈관 이완 작용과 중추 및 말초 신경계에서

신호 전달 억제 등을 포함한 많은 과정에 작용한다고 한다.^{1,2)} 특히 cGMP가 침해 자극을 억제하여 진통 작용을 보인다는 보고도 많이 제시되었다.³⁻⁷⁾ 이러한 cGMP의 가수분해는 phosphodiesterase라는 효소에 의해 이루어진다. Phosphodiesterase는 생명계에서 넓게 발생하여 적혈

접수일 : 2007년 3월 27일, 승인일 : 2007년 6월 11일
책임저자 : 정창영, (501-757) 광주광역시 동구 학동 8번지
전남대학교병원 마취통증의학과
Tel: 062-220-6893, Fax: 062-232-6294
E-mail: cyjeong@jnu.ac.kr

이 논문은 2005년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Received March 27, 2007, Accepted June 11, 2007
Correspondence to: Chang Young Jeong
Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Chonnam National University Hospital, 8, Hak-dong, Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea.
Tel: +82-62-220-6893, Fax: +82-62-232-6294
E-mail: cyjeong@jnu.ac.kr
This study was financially supported by Chonnam National University.

구를 제외한 조직에 존재하며⁸⁾ 물질 특이성, 세포 내 분포 및 선택적 약물에 대한 감수성에 따라 최소 11종류의 아형이 동정되었다.⁹⁾ 이 중 5형이 세포 내에서 cGMP 불활성화에 가장 관련이 있다고 한다.¹⁰⁾ 이상의 소견은 phosphodiesterase 5 억제제가 세포내 cGMP 농도를 증가시켜 침해 자극에 대한 반응을 약화시켜 진통작용을 나타낼 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 증가된 cGMP가 어떤 경로를 통하여 진통효과를 나타내는지에 대해서는 명백히 밝혀진 바가 없다.

Sildenafil (Viagra[®])은 phosphodiesterase 5의 특이적인 억제제로 임상에서 발기부전 치료에 사용하는 약제이다.¹¹⁾ 한편, 국소로 투여한 sildenafil은 염증성 통증 모형에서 통증 억제 효과를 나타냈으나 열성 자극에는 효과가 없다고 한다.^{3,7)} 최근 보고에 의하면 척수강 내로 투여한 sildenafil은 포르말린 유발 통증을 억제하였다.^{12,13)}

한편, 척수 수준에서 opioid 수용체는 침해자극 전달 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{14,15)} 또한 delta opioid 수용체 작동제는 opioid 수용체뿐만 아니라 nitric oxide/cGMP 회로를 활성화시켜 효과를 나타낸다고 한다.¹⁶⁾ 이는 cGMP와 opioid 수용체 간의 상호작용 가능성을 시사한다. 따라서 저자들은 phosphodiesterase 5인 sildenafil이 cGMP를 증가시켜 진통효과를 나타낼 것이고 이러한 효과는 opioid 수용체 길항제에 의해 역전될 것으로 가설을 세웠다.

이 연구에서는 척수강 sildenafil의 효과에 대한 opioid 수용체의 역할을 알아봄으로써 이러한 가설을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

의과학연구소의 동물위원회로부터 실험 계획에 대한 승인을 취득한 후 규정에 따라 모든 실험을 진행하였다. 실험대상은 수컷 Sprague-Dawley (250-300 g) 쥐로 하였으며 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 척수강 내 카테터는 Yaksh와 Rudy의 방법으로 거치하였다.¹⁷⁾ 카테터 삽입 후 신경학적 손상을 보인 쥐는 실험에서 제외시키고 흡입마취제 과다 투여로 바로 사망시켰으며 정상 소견을 보이는 쥐는 각각의 케이지에 넣어 카테터 거치 5일 후에 본 실험을 시행하였다.

이 연구를 위해 사용한 약물인 sildenafil은 Pfizer회사에서 기증받았다. 약물은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 10 μ l로 만들어 수동식 기어 장치 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 투여하고 카테터 내의

사강 용적을 고려하여 실험 약물 투여 후 생리 식염수 10 μ l를 추가로 투여하였다.

통증 유발 모형으로는 이전연구와 동일한 포르말린 시험을 사용하였다.¹³⁾ 5% 포르말린 용액 50 μ l를 실험쥐의 뒷발바닥에 피하조직 내로 주입하면 포르말린을 주입 받은 발을 바닥에서 들었다 놔다 하는 행동(flinching)을 보이는데 이를 통증 반응으로 간주하였다. 포르말린 주입 후 1, 5분에 1분 동안 그리고 주입 10분 후부터 60분까지는 매 5분 간격으로 1분 동안 flinching 횟수를 측정하였다. 통증 행동은 이상성(biphasic) 형태를 보이므로 포르말린 주입 후 9분까지를 제1상으로, 그리고 주입 후 10-60분까지를 제2상으로 각각 정의하였다.

척수강 카테터 거치 5일 후 실험쥐를 7 × 18 × 23 cm 크기의 실린더로 옮긴 후 약 20-30분 정도의 순응기간을 거쳐 실험을 진행하였다. 포르말린 시험에서는 실험쥐를 한번만 사용하였다. 실험자는 투여 약물의 종류와 용량에 대해서 알지 못하였으며 대조군은 DMSO를 투여한 쥐로 하였다.

포르말린 주입 10분 전에 척수강 내로 sildenafil (1, 3, 10, 30 μ g)을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 60분 동안 관찰하였다.

다음으로 sildenafil 효과에 대한 opioid 수용체의 역할을 알아보하고자 opioid 수용체 길항제인 naloxone을 sildenafil 투여 10분 전에 척수강 내로 먼저 투여하였다. Sildenafil 투여 10분 후에 포르말린 시험을 시행하였다. Naloxone 용량은 예비실험을 시행하여 포르말린 자극에

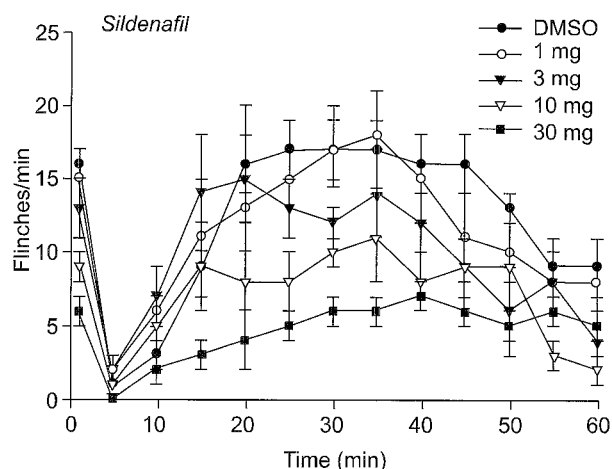


Fig. 1. Time effect curve of intrathecal sildenafil for the flinching in the formalin test. Sildenafil was administered 10 min before formalin injection. Formalin was injected subcutaneously at time 0. Data are presented as the number of flinches. Each line represents mean \pm SEM of 6-8 rats.

영향을 주지 않는 최대 용량으로 하였다.

모든 측정값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 포르말린 시험에서 시간 반응 자료는 분당 통증 행동 횟수로 하였고 용량 반응 자료는 통증 행동 횟수의 총 합계로 하였다. 통계 분석은 Jonckheere test나 unpaired t-test를 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 제1상 및 2상에서 각각 17 ± 1 , 143 ± 14 회였다. 척수강 내로 투여한 sildenafil은 포르말린 시험 제1상과 제2상 모두에서 flinching 반응을 용량 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2).

척수강 naloxone은 포르말린 시험 제1상과 제2상 모두에서 sildenafil의 진통효과를 길항시켰다(Fig. 3).

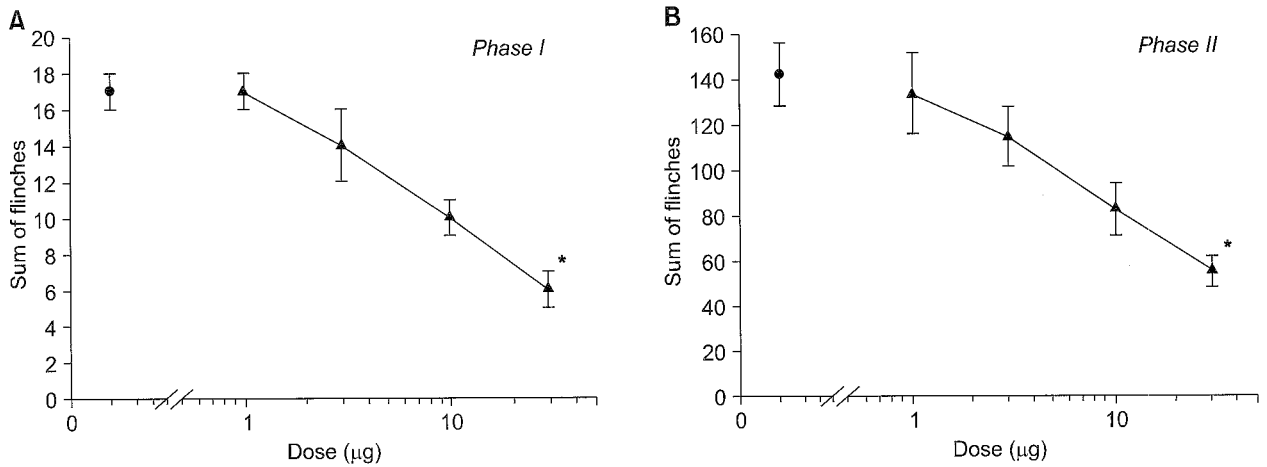


Fig. 2. Dose-response curve of intrathecal sildenafil for the flinching during phase 1 and phase 2 in the formalin test. Data are presented as the sum of flinches in each phase. Intrathecal sildenafil decreased flinches during both phases in a dose-dependent fashion. Each line represents mean \pm SEM of 6-8 rats. Compared with the control, *P < 0.05.

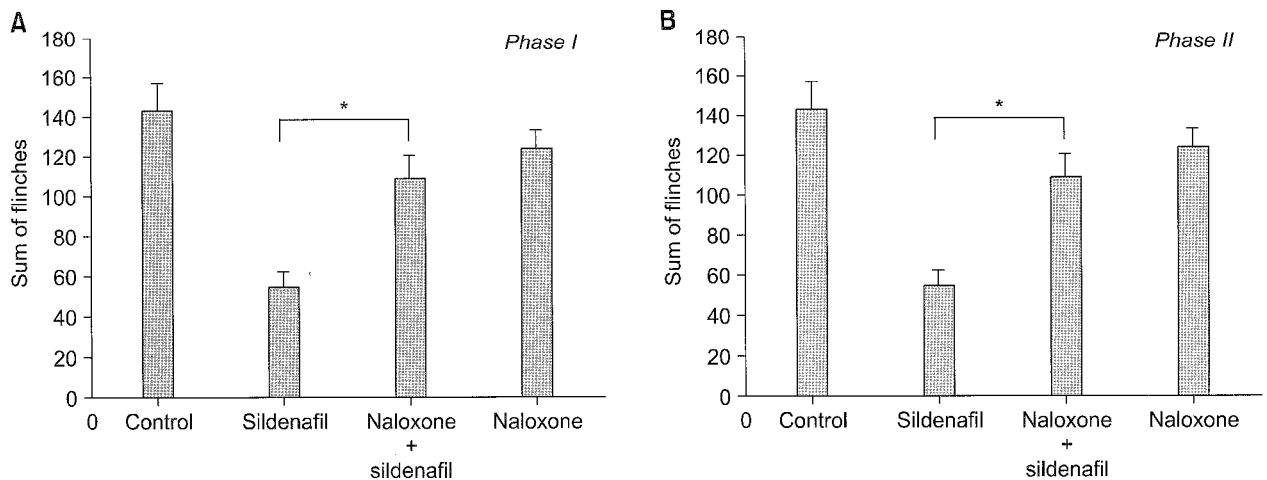


Fig. 3. The effect curve of intrathecal naloxone to intrathecal sildenafil during phase 1 and phase 2 in the formalin test. Naloxone and sildenafil were administered intrathecally 20 min and 10 min before the formalin injection. Naloxone antagonized the effect of sildenafil on flinching in both phases. Each bar represents mean \pm SEM of 6 or 8 rats. Compared with sildenafil, *P < 0.05.

고 찰

포르말린 시험의 가장 큰 특징은 이상성 형태의 반응이다. 즉 통증 행동이 포르말린 주입 직후 증가하였다가 점차 감소한 약 10분 후부터 다시 증가하는 이상성 형태로 나타난다는 것이다. 이와 같은 현상은 포르말린 시험의 제1상과 제2상 반응의 발생 기전이 기본적으로 서로 다르다는 것을 의미한다. 즉 제1상 반응은 포르말린 주입에 의해 1차 구심성 섬유의 침해 수용체에 대한 직접적인 자극에 의해 발생하는 것이다. 따라서 제1상 반응은 1차 구심성 섬유의 활성도가 매우 높아져 있는 상태로써 급성 통증을 반영한다. 반면 제2상 반응은 낮은 정도의 구심성 섬유 활성도에도 불구하고 통증 행동 반응은 오히려 더 증폭되어서 나타나는데 이를 촉진성 통증 상태라 한다. 이러한 상태는 포르말린 자극에 의해 척수에서 분비된 흥분성 아미노산과 펩타이드 등의 유리에 의해 시작되고 세포 내 Ca^{2+} 증가 등을 통하여 이루어진다고 한다.¹⁸⁾ 결과적으로 제2상에서는 제1상처럼 강력한 자극이 없음에도 척수의 wide dynamic range (WDR) 신경세포의 활성화를 일으켜 통증 행동이 증가하게 된다. 본 연구에서도 포르말린 주입 후 특징적인 이상성 통증 행동 반응을 보였다. 이처럼 급성 통증이나 촉진성 (facilitation) 통증 상태를 한 동물에서 보여주는 장점 때문에 포르말린 시험이 통증 유발 시험 중 널리 쓰이는 모형이다.

이 실험 결과 척수강 내로 투여한 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil은 포르말린 시험의 제1상과 제2상 모두에서 통증 행동 반응을 모두 용량 의존적으로 감소하였다. 이는 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil이 척수 수준에서 급성 통증 및 촉진성 통증 상태를 효과적으로 억제한다는 것을 의미한다.

Phosphodiesterase는 생명계에서 넓게 존재하며⁸⁾ cGMP 분해에 관여하는 효소이다. Phosphodiesterase는 물질 특이성, 세포내 분포 및 억제제의 선택적 민감도 등과 같은 기능적 특성에 따라 1-11형까지 최소 11종류의 아형이 동정되었다.⁹⁾ 이 중 5, 6 및 9형은 cGMP 분해 작용에 특이성을 갖고 있으며 특히 5형이 세포 내에서 cGMP 불활성화에 가장 관련이 있다고 한다.¹⁰⁾

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 cGMP

형성을 촉진하고 phosphodiesterase는 cGMP에서 GTP로의 가수 분해 작용을 촉진시킨다.¹⁰⁾ 따라서 세포 내 cGMP 농도는 guanylyl cyclases의 활성도와 cGMP 특이적 phosphodiesterase 분해율에 의해 조절된다.^{10,19)} 특히 본 실험 약물인 sildenafil은 phosphodiesterase 5에 특이성을 보이고 5형이 cGMP 불활성화에 가장 연관성이 있다는 점을 고려해 볼 때 5형의 phosphodiesterase는 척수 수준에서 침해자극 조절에 관여하는 것으로 생각되며 이 효소를 억제하면 강력한 진통작용을 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

한편, 국소 투여한 sildenafil은 acetic acid 유발 통증, carrageenan 유발 통각 과민 및 포르말린 시험에서 제2상 통증 반응을 억제하였다. Sildenafil의 이러한 통증 억제 기전으로 nitric oxide-cGMP 회로가 제시되었다.^{4,6,7)} 반면, 국소 투여한 포르말린 시험에서 제1상 통증 반응은 차단시키지 못했다.^{3,5)} 한편, 척수강 내로 투여한 이 실험에서는 sildenafil이 포르말린 시험 제1상 및 제2상 통증 반응을 모두 약화시켜 이전 보고와 일치됨^{12,13)} 보였으나 다른 보고와는 차이를^{3,5)} 보였다. 이러한 효과의 차이를 보이는 이유는 정확히 알 수는 없으나 사용한 실험 약물 종류, 투여경로, 통증 모형 및 실험동물 종류 등에 의한 것으로 생각한다.

한편, 이 실험결과 척수강 내로 투여한 naloxone은 척수강 sildenafil의 진통효과를 길항시켰다. 이는 척수 수준에서 sildenafil의 작용이 opioid 수용체를 통하여 일어난다는 것을 시사하며 이러한 보고는 처음이다. 그러나 sildenafil이 어떻게 opioid 수용체를 매개하는지에 대해서는 본 실험만으로는 정확히 알 수가 없었다. 하나의 가설로는 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil을 투여하면 cGMP가 증가되고 증가된 cGMP가 opioid 수용체를 활성화시켜서 진통작용을 일으킨다는 것이다. 그러나 이에 대한 보다 많은 연구가 필요 할 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합하면 phosphodiesterase 5 억제제인 sildenafil은 척수 수준에서 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증과 촉진성 통증을 억제하였으며 이러한 진통 효과는 opioid 수용체의 중재에 의한 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
2. Nathan C: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.

3. Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Bañuelos P, Granados-Soto V: Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 81-7.
4. 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.
5. Asomoza-Espinosa R, Alonso-López R, Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Bañuelos P, Torres-López JE, Granados-Soto V: Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2001; 418: 195-200.
6. Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulkarni SK: Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. *Pharmacology* 2003; 67: 150-6.
7. Patil CS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK: Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antinociception. *Pharmacology* 2003; 69: 183-9.
8. Beavo JA, Reifsnnyder DH: Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 150-5.
9. Uckert S, Hedlund P, Andersson KE, Truss MC, Jonas U, Stief CG: Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. *Eur Urol* 2006; 50: 1194-207.
10. Pyne NJ, Arshavsky V, Lochhead A: cGMP signal termination. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1019-22.
11. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ: Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* 1996; 78: 257-61.
12. Araiza-Saldaña CI, Reyes-García G, Bermúdez-Ocaña DY, Pérez-Severiano F, Granados-Soto V: Effect of diabetes on the mechanisms of intrathecal antinociception of sildenafil in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 527: 60-70.
13. Yoon MH, Bae HB, Shin DJ, Kim CM, Jeong ST, Kim SJ, et al: Evaluation for the effects of intrathecal sildenafil on the formalin- and thermal-induced nociception of rats. *Korean J Pain* 2006; 19: 17-21.
14. Przesmycki K, Dzieciuch JA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z: Isobolographic analysis of interaction between intrathecal morphine and clonidine in the formalin test in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 337: 11-7.
15. Yoon MH, Choi JI, Kim SJ, Kim CM, Bae HB, Chung ST: Synergistic antinociception between zaprinast and morphine in the spinal cord of rats on the formalin test. *Eur J Anaesthesiol* 2006; 23: 65-70.
16. Pacheco DF, Reis GM, Francischi JN, Castro MS, Perez AC, Duarte ID: delta-Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via delta(1) and delta(2) receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sci* 2005; 78: 54-60.
17. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
18. Wilcox GL, Seybold V: Pharmacology of spinal afferent processing. In: *Anesthesia: biologic foundations*. Edited by Yaksh TL, Lynch C III, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ: Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1997, pp 557-76.
19. Beavo JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-48.