

신경병증성 통증모델에서 신경영양인자 유도물질의 반복 투여가 척수 아드레날린계에 미치는 영향

부산대학교 의학전문대학원 마취통증의학교실, *부산대학교 치의학전문대학원 마취통증의학교실

정규연 · 신상욱 · 최봉수 · 김철홍* · 김경훈 · 김해규

Spinal α_2 Adrenoceptor and Antiallodynic Effect by Clonidine after Chronic Administration of 4-Methylcatechol in Neuropathic Rat Pain Model

Kyu Yeon Chung, M.D., Sang Wook Shin, M.D., Bong Soo Choi, M.D., Chul Hong Kim, M.D.*, Kyung Hoon Kim, M.D., and Hae Kyu Kim, M.D.

Department of Anesthesia and Pain Medicine, School of Medicine, *School of Dentistry, Pusan National University, Busan, Korea

Background: The adrenergic nervous system in the spinal cord contributes to the development of neuropathic pain after nerve injury. Brain derived neurotrophic factor may facilitate the sympathetic change in the spinal cord and influence the state of neuropathic pain. We probed the effect of chronic repetitive administration of systemic 4-methylcatechol, which is known to be a neurotrophic factor inducer, in a spinal nerve ligation model.

Methods: We made the rat neuropathic pain model by the ligation of the L5 spinal nerve. Intraperitoneal 4-methylcatechol (10 μ g/kg) or the same volume of saline was administered twice daily just after the operation for 7 days. The tactile allodynia was measured by using von Frey filaments and its change was followed up from 3 days after SNL. The lumbosacral enlargement of the spinal cord was taken out and the mRNA contents of the α_2 -adrenoceptor subtypes were measured by real time polymerase chain reaction and this was then compared with the control groups. The antiallodynic effect of intrathecal clonidine (3, 10, 30 μ g) was evaluated and compared in the 4-methylcatechol treated rats and the control rats.

Results: The expression of the α_{2A} and α_{2C} adrenoceptor subtypes did not change after 4-methylcatechol treatment. Intrathecal clonidine showed an earlier and better effect at the highest dose (30 μ g intrathecal), but not with any other doses.

Conclusions: Chronic intraperitoneal administration of 4-methylcatechol may improve the effect of intrathecal clonidine, but we could not prove the increase of α_{2A} and α_{2C} adrenoceptors in the spinal cord of 4-methylcatechol treated rats. (Korean J Pain 2008; 21: 179-186)

Key Words: adrenergic receptor, brain derived neurotrophic factor, neuropathic pain, spinal nerve ligation, 4-methylcatechol.

서 론

신경의 손상에 의하여 발생하는 만성 신경병증 통증에

자발통, 이질통 및 통각과민이 발생하는 이유는 여러 기전들이 작용한다.¹⁾ 손상 받은 감각 신경의 말초 침해 수용체는 통증 유발 물질에 의해 흥분 역치가 감소하거나 감각 신경의 나트륨 통로가 변화하며, 척수 수준에서는

접수일 : 2008년 8월 14일, 승인일 : 2008년 11월 3일
책임저자 : 신상욱, (602-739) 부산시 서구 구덕로 305
부산대학교 의학전문대학원 마취통증의학교실
Tel: 051-240-7399, Fax: 051-242-7466
E-mail: shinsw@pusan.ac.kr

이 논문은 2004년도 부산대학교병원 의학연구소 연구비(2004-06)에 의하여 연구되었음.

Received August 14, 2008, Accepted November 3, 2008
Correspondence to: Sang Wook Shin
Department of Anesthesia and Pain Medicine, School of Medicine, Pusan National University, 305, Guduk-ro, Seo-gu, Busan 602-739, Korea
Tel: +82-51-240-7399, Fax: +82-51-242-7466
E-mail: shinsw@pusan.ac.kr
This study was supported by Medical Research Institute Grant (2004-06), Pusan National University Hospital.

통증 전달 신경 세포나 그 주위 세포의 변화와 통증 제어계의 탈억제(disinhibition), 척수 상위의 중추 신경의 신경가소성(neuroplasticity)으로 통증 경로 중에서 통증을 전달하고 변조하는 역할을 하는 각종 신경 전달 물질이나 그 수용체들이 변화를 일으켜 신경병증 통증이 발생하는 것으로 생각한다. 신경 손상을 입은 쥐의 등뿌리 신경절로 교감신경이 발아하는 것은²⁾ 신경병증 통증의 발생에 교감신경계가 관여하는 것을 나타내며 교감신경계가 관련되는 만성 통증에는 교감신경차단이 진통 효과를 나타내므로 만성 통증환자에서 교감신경차단이 통증 치료의 한 방법으로 이용된다.^{3,4)} 신경병증 통증의 복잡한 통증 경로 중에는 교감신경계가 많은 영향을 미치며 교감신경계의 변조는 이러한 통증 전달에 영향을 미칠 것이다.

신경병증 통증의 원인으로 생각되는 신경 손상이 있을 때 신경영양인자들(neurotrophic factors)이 신경의 발달이나 재생, 그리고 신경병증 통증의 발생에 작용한다. Brain derived neurotrophic factor (BDNF)는 말초 신경 부위에서 뿐만 아니라 척수의 교감신경 수용체의 변화에 영향을 주는 것으로 보고되었으며,^{5,7)} 쥐의 척수 신경을 절찰하여 신경병증 통증을 발생시킨 모델에서 BDNF를 투여하면 등뿌리 신경절과 척수에서 교감신경의 발아가 증가하고 BDNF의 항혈청을 척수강 내로 투여하면 교감신경성 발아가 억제되어 α_2 아드레날린 효현제의 진통 효과가 감소됨이 보고된 바 있다.⁸⁾ 그러므로 척수의 BDNF는 신경병증 통증에서 교감신경계를 통한 통증의 발생 기전에 역할을 하고 있는 것이다. 신경성장인자(nerve growth factor, NGF) 합성을 자극하는 물질로 알려진 4-methylcatechol은 쥐의 뇌에서 BDNF의 합성을 촉진하는 것으로 보고되었으며⁹⁾ 쥐의 당뇨병성 신경병증이나 pyridoxine으로 유발된 신경병증에서 신경손상을 회복시키는 것이 관찰되었다.^{10,11)} 4-methylcatechol을 신경병증 통증이 발생한 쥐에 투여하면 NGF나 BDNF와 같은 신경영양인자를 증가시켜 척수에서의 교감신경의 발아를 촉진하여 α_2 아드레날린 효현제에 의한 진통 효과를 향진시킬 것이라고 가정하고 본 연구를 하게 되었다.

대상 및 방법

실험을 시작할 때의 몸무게가 175-185 g인 Sprague Dawley 수컷 흰쥐들을 대상으로 하였으며 연구소의 동물 실험 지침을 준수하였다. 사육실의 온도는 23-26°C로 유지하였고 오전 7시와 오후 7시를 기준으로 낮과 밤

을 구별하였으며 모든 행동학적 측정은 오후 1시경부터 진행하였다. 쥐들은 실험 전에 약 3일간의 적응 기간을 두었고, 실험 기간 동안 물과 먹이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험은 4-methylcatechol의 반복 투여가 촉각이질통의 발생에 미치는 영향과 척수 알파2 아드레날린 수용체 아형 mRNA의 발현에 미치는 효과를 보는 실험과, 4-methylcatechol의 반복 투여로 알파2 아드레날린 효현제인 clonidine을 척수강 내로 투여하였을 때의 항이질통 효과의 변동을 조사하는 실험으로 나누어 시행되었다.

척수 신경 절찰 모델의¹²⁾ 변형을 이용하여 신경병증 모델을 작성하였다. 우선 쥐를 플라스틱 통에 넣고 산소 4 L/min와 sevoflurane 5%를 주입하여 마취를 유도하여 꺼내어 복와위로 한 후, 쥐의 주둥이에 마스크를 씌워 산소 2 L/min와 sevoflurane 3%로 자발호흡으로 마취를 유지시켰다. 쥐의 장골능(iliac crest)의 양측을 이은 선과 정중선이 만나는 점을 중심으로 약 2.5 cm의 정중 피부 절개를 하고 정중앙의 약간 좌측에서 근막과 인대를 절개한 다음 근육과 인대를 뼈에서 깨끗이 박리하여 좌측의 요추와 장골을 노출시켰다. 좌측 6번 요추의 횡돌기 일부를 제거하고 좌측 5번 요추 신경을 6-0 흑색 실크로 묶었다. 이후, 3-0 실크로 조직을 층별로 봉합하고 수술 중의 실험과 수분소실을 보충할 목적으로 생리식염수 5 ml를 피하로 주사하고 실험군에 따라 약물(4-methylcatechol)이나 생리식염수를 복강으로 주사한 후 마취에서 회복시켰다.

촉각이질통은 von Frey hair를 사용하여 측정하였다. 바닥이 철망으로 되어있고 투명한 아크릴 상자에 쥐를 넣은 후 20분 이상 여기에 적응할 수 있도록 둔 후, 0.4 g, 0.6 g, 1 g, 1.4 g, 2 g, 4 g, 6 g, 8 g, 10 g, 및 15.1 g을 가할 수 있는 von Frey hair를 사용하여 척수신경을 절찰한 쪽과 반대쪽의 발바닥을 눌러 자극하였다. 발을 들거나 피하는 회피 반응을 나타내면 더 가느다란 hair로 자극하고, 회피 반응을 나타내지 않으면 더 굵은 hair로 자극하였다. 쥐가 회피 반응을 나타내기 시작하는 hair로부터 6번의 자극을 가하였다. 쥐들의 반응은 미리 입력되어 있던 프로그램을 이용하여 50% 회피 역치를 계산 하였으며 0.4 g과 15 g을 각각의 cut-off 수준으로 하였으며 촉각 이질통을 측정하는 실험자는 약물 치료에 대하여 모르도록 맹검법으로 시행하였다.

약물 투여에 의한 촉각이질통의 변화와 척수 내의 아드레날린 수용체 아형의 변화를 비교하기 위하여 4-methylcatechol 10 μ g/kg을 하루에 두 번(오전 9시, 오후

9시)⁹⁾ 7일간 복강 내로 주사하는 군(MC군, n = 12)과 동량의 생리식염수를 주사하는 군(saline군, n = 12)으로 나누었다. 7일간 4-methylcatechol을 투여하면서 술 후 3, 5, 7일 후의 축각이질통의 측정하여 두 군을 비교하였다. 7일째 이질통의 측정이 끝난 후, 산소와 5% sevoflurane으로 쥐를 깊게 마취한 후 머리를 절단하고 미측에 절개를 가하여 천추관으로 생리식염수를 강하게 주입하여 척수를 경추 쪽으로 밀어내어 적출하였다. 척수의 요추 팽대부를 중심으로 10 mm 길이로 절단 후 채취하여 액화질소에 급속 냉동하여 보관하였다. 보관한 척수들은 모아서 척수의 알파2 아드레날린 수용체 A, C아형 mRNA의 양을 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 측정하였으며 그 방법은 아래와 같다.

총 RNA를 얻기 위해 TRIzol[®] 시약(Cat. No. 15596-026, Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 ml를 채취한 쥐의 척수 조직에 넣고 균질화기(homogenizer)를 이용해 잘게 부수어 실온에 5분간 방치한 후, chloroform 100 μ l를 첨가하여 10-20초간 잘 혼합하고 얼음에서 15분간 반응시킨 다음 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 상층액 400 μ l를 취하여 새 튜브에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 다음 -20°C에서 24시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 뒤 RNA 침전물(pellet)을 얻었고, 이 RNA 침전물은 2회 연속 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 침전물에 Nuclease-Free Water (Cat. No. P1193, Promega, Madison, USA) 50 μ l에 잘 녹인 후 흡광기(Ultrospec2000 UV/Visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 260 nm 파장에서 측정된 흡광도를 기증하여 필요한 양의 RNA를 취하였다.

cDNA 합성에는 M-MLV 역전사 효소, RNase 억제제, M-MLV 5X reaction buffer로 master mixture를 제조하여 사용 전까지 얼음에 방치하였다. Total RNA, oligo-p(dt)18 primer, dNTP 혼합액(Promega, Madison, USA)과 Nuclease-Free Water를 혼합하여 65°C에서 15분간 반응시키고 얼음에 잠시 방치한 후, 총 부피가 20 μ l가 되도록 master mixture를 첨가하고 25°C에서 10분간, 42°C에서 1시간 동안 반응시키고 99°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화시켰다. 마지막으로 4°C에 방치한 다음, 사용 전까지 냉동고에 보관하였다.

RT-PCR은 다음과 같은 방법으로 하였다. 조직인자 유전자의 증폭을 위해 β -actin과 α_{2A} , α_{2C} 아드레날린 수용체 아형의 염기서열을 가지는 시발체를 (주)바이오닉

스(서울, 한국)에 주문 의뢰하였고 참조 유전자와 표준 그래프를 얻기 위한 반응에 β -actin을 이용하였다. 여러 조건의 조직 샘플들 중에서 total RNA가 가장 잘 분리된 샘플 하나를 선택하여 2 μ g을 얻어 cDNA를 합성한 다음 이것을 10배의 비율로 연속 희석하여 다양한 농도의 cDNA 주형을 준비하였다. β -actin을 시발체를 사용하여 RT-PCR 반응을 실시하고 그래프 모니터링 분석으로 표준 그래프를 얻었다. 다양한 농도의 cDNA 주형들 중에서 실험하고자 하는 β -actin이나 조직인자 반응 산물이 포함되는 범위를 정하여 1부터 10³까지 표기하고 두세 차례 반복 실험으로 재현성을 확인하였다.

PCR반응을 위하여 LightCycler-FastStart DNA master SYBER green 1 (Cat. No. 3003230, Roche, Mannheim, Germany) kit를 이용하였다. Reaction mix SYBR SYBER green 1과 효소를 혼합하고(2 μ l) 여기에 H₂O 11.6 μ l, 25 mM MgCl₂ 2.4 μ l, primer를 sense와 antisense 방향 각각 1 μ l를 첨가하여 master mixture를 제조하였다. 제조한 master mixture 18 μ l를 capillary에 주입하고 10배씩 연속 희석된 표준, 각기 다른 샘플의 cDNA 2 μ l씩 추가 주입하여 가볍게 혼합한 다음 수 초 동안 원침하였다. Capillary를 LightCycler기기(LightCycler Operator, version 3.5, Roche, Mannheim, Germany)에 장착시킨 다음 프로그램을 열어 여러 변수들을 기입하였다. 증폭 사이클 반응은 변성(denaturation) 95°C에서 10초간, annealing 54°C에서 5초간, 연장(elongation) 72°C 10초간 50회 실시하였고 용해곡선(melting curve) 분석이 가능하도록 실험과정을 추가하였다.

RT-PCR 반응은 시작과 동시에 기기와 연결된 컴퓨터 모니터를 통해 진행 중인 반응과정을 볼 수 있으므로 SYBR green 1 dye를 이용할 때는 매 사이클의 확대 직후에 형광 물질을 측정함으로써 사이클의 증가에 따른 반응 산물의 양을 감시할 수 있었다. 증폭 사이클이 진행함에 따라 형광 물질의 양이 갑자기 증가하기 시작하는 시점을 교차점이라 하고 반응이 완료되면 LightCycler기기는 각 반응물로부터 교차점 값을 읽어들이어 표준곡선의 양과 비교함으로써 각 반응물의 주형 cDNA의 양을 계산하였다. PCR 반응에 사용된 주형 cDNA의 값이 얻어지면, 이 값을 한 시료의 조직인자 값을 참조 유전자(reference gene)로 이용한 β -actin 값으로 나누어 최종적인 cDNA 값을 얻게 되고, 조직인자의 mRNA양과 동일하다고 간주하였다.

다른 쥐들을 이용하여 4-methylcatechol 처치가 척수강 내 투여 clonidine의 항이질통 효과에 미치는 영향을 보

기 위하여 실험하였다. 척수 신경 결찰 모델의 작성과 4-methylcatechol의 투여 방법은 앞의 실험방법과 동일하였으며 촉각 이질통의 측정 방법도 동일하였다. 좌측 5번 요추 신경을 묶은 후, 3일이 지나 3 g 이하의 촉각 이질통을 나타내는 쥐를 택하여 척수강 내로 카테터를 삽입하였다.¹³⁾ 쥐의 신경을 결찰할 때와 같은 방법으로 마취하고 쥐의 머리를 뇌정위 장치에 고정한 후, 두개골 위에서 중앙으로 약 2 cm 가량 절개하고 근육과 근막을 박리하여 견인하고 환추후두막을 찾았다. 경막을 절개하고 척수강 내에 거치되는 부분의 길이가 8 cm인 PE 30 카테터를 조심스럽게 삽입하여 카테터 끝이 척수의 요천추 팽대부 부근에 위치하도록 하였다. 쥐가 마취에서 회복되면 2% lidocaine 10 μ l를 카테터로 주입한 후 생리식염수 10 μ l를 주사하여 하지가 마비되는지 확인하였다. 카테터를 삽입하여 3일이 지난 후, 신경학적 손상이 없는 쥐들을 대상으로 척수강 내 clonidine 투여에 의한 효과를 조사하였다. Clonidine의 투여는 4-methylcatechol 투여군과 saline을 투여한 두 군으로 나누어 실시하였다. 실험에 사용되는 쥐의 개체 수를 줄이기 위하여 한 마리당 두 번 내지 세 번에 걸쳐 척수강 내로 clonidine (3 μ g, 10 μ g, 30 μ g)을 투여하였으며 clonidine의 용량은 이전에 발표된 연구들¹⁴⁾ 참고하여 예비실험을 한 후 결정하였다. Clonidine의 효과가 다음 용량 투여 시까지 남아있을 가능성을 배제하기 위하여 적어도 3일간격의 휴식 기간을 두었으며 실험 기간 동안 4-methyl-

catechol이나 생리식염수는 계속 복강 내로 투여하였다. Clonidine은 생리식염수에 10 μ l의 양이 되도록 용해시켜 척수강 내 카테터로 주입하고 이어서 생리식염수 10 μ l를 추가로 주입하였으며 약물 주입 후 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간 후에 촉각이질통의 역치를 측정하고 약물에 의한 항이질통 효과를 최대 가능 효과(maximal possible effect, %MPE = [처치 후 역치 - 처치 전 역치] / [15 g - 처치 전 역치] \times 100)로 계산하여 두 군을 비교하였다.

실험 결과의 모든 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 통계적 유의성은 Statview 5.0 program (SAS institute, USA)을 이용하여 unpaired 및 paired t-test로 비교하였으며, P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

촉각이질통은 신경 결찰 3일 후부터 양쪽 발에 모두 나타났다(Fig. 1). 하루 두 번 복강 내로 4-methylcatechol 10 μ g/kg을 7일간 주사한 MC군에서 생리식염수를 투여한 군에 비하여 촉각이질통의 역치는 높았으나(6.07 \pm 1.81 g vs 3.15 \pm 0.94 g) 통계적으로 유의한 차이는 없었으며(Fig. 1), 각 군의 12마리 중에서 일주일 후에도 15 g 이상의 cut-off를 유지하고 있는 것은 실험군이 3마리, 대조군에서는 11.98 g의 역치를 보이는 쥐가 한 마리 있었다.

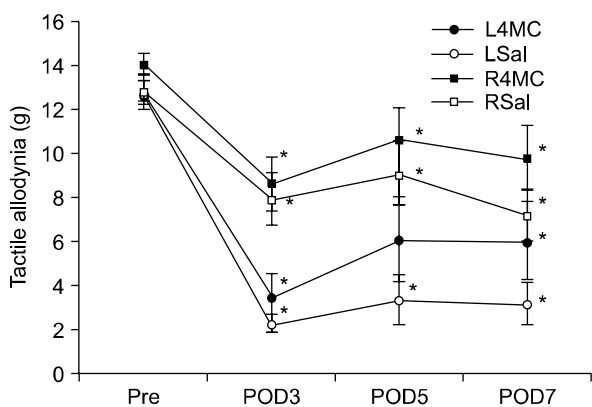


Fig. 1. The change of Tactile allodynia during 7 days after L5 spinal nerve ligation. Each point represents the mean \pm SEM for 12 rats. * P < 0.05 compared to Pre. Pre: preoperative, POD: postoperative day, L4MC: left (ligated paw) in 4-methylcatechol treated group, R4MC: right (contralateral paw) in 4-methylcatechol treated group, LSaI: left in control group, RSaI: right in control group.

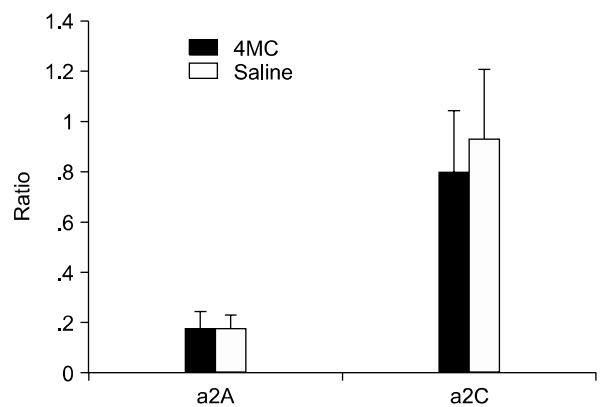


Fig. 2. The ratio of α_{2A} and α_{2C} mRNA in lumbo-sacral enlargement of spinal cord by RTPCR. The repeated intraperitoneal administration of 4-methylcatechol does not influence the expression α_{2A} and α_{2C} adrenoceptors in spinal cord. α_{2A} : α_{2A} adrenoceptor, α_{2C} : α_{2C} adrenoceptor, 4MC: 4-methylcatechol treated group, Saline: control group.

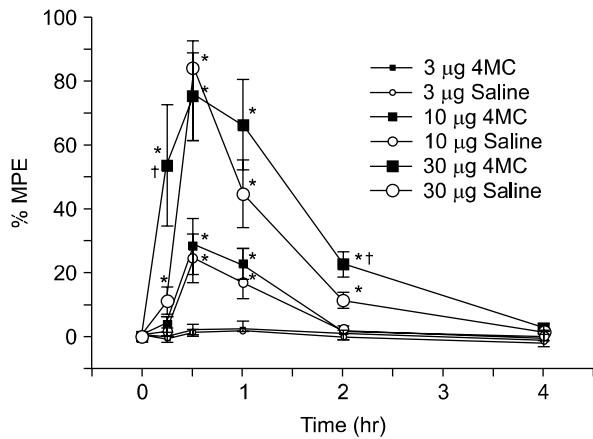


Fig. 3. Tactile allodynia after intrathecal injection of clonidine. * $P < 0.05$ compared to preinjection, † $P < 0.05$ compared to saline group. 3 µg 4MC: 3 µg clonidine intrathecal injection in 4-methylcatechol treated group ($n = 5$), 3 µg Saline: 3 µg clonidine intrathecal injection in control group ($n = 6$), 10 µg 4MC: 10 µg clonidine intrathecal injection in 4-methylcatechol treated group ($n = 7$), 10 µg Saline: 10 µg clonidine intrathecal injection in control group ($n = 9$), 30 µg 4MC: 30 µg clonidine intrathecal injection in 4-methylcatechol treated group ($n = 5$), 30 µg Saline: 30 µg clonidine intrathecal injection in control group ($n = 6$), %MPE = maximal possible effect = [postoperative threshold - preoperative threshold] / [15 g - preoperative threshold] × 100%.

채취한 척수에서 실시간 RTPCR로 측정된 α_{2A} 와 α_{2C} 아형 mRNA의 발현 정도에도 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2). 축각이질통이 발생한 쥐들에게 척수강 내로 투여한 clonidine은 용량이 증가함에 따라 그 항이질통 효과가 증가하고 지속시간도 연장되었다. 실험에 사용된 최대 용량(30 µg)에서는 약 4시간 동안의 진통효과를 나타내었으며 4-methylcatechol을 처치한 군에서 진통 효과가 빨리 발생하며 초기 두 시간까지의 진통 효과가 생리 식염수 투여군보다 좋았으나($P < 0.05$) 그 외에는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

이 연구는 신경병증 통증 모델에서 신경영양인자인 BDNF가 척수의 교감신경성 섬유의 발아를 유도하므로, 신경병증 통증에 신경영양인자 유도제인 4-methylcatechol을 반복 투여하면 아드레날린 수용체의 발현을 증가시키고, 척수강 내로 투여하는 α_2 아드레날린 효현제의 항이질통 효과를 향진시킬 것으로 가정하고 진행하였다. 그러나 α_2 아드레날린 효현제인 clonidine의 항이질통 효과가 약간 증가하였을 뿐, 척수에서의 아드레날린

수용체 아형의 변화를 볼 수는 없었다.

통증 발생과 전달 및 변조에 교감신경계가 작용하므로 급만성 통증을 치료하고 조절하는데 교감신경의 차단이나 α_2 아드레날린 작용제가 사용된다.^{3,4,15,16} 최근의 발표에 의하면 쥐의 척수신경 결찰에 의한 신경병증 통증 모델에서 α_2 아드레날린 작용제의 효과가 정상 쥐에서의 진통 작용보다 항진되는 것은 신경결찰 모델 쥐의 척수에서 BDNF가 노르아드레날린 섬유의 발아를 유도하기 때문이라고 하였다.⁸ 신경이 손상을 입은 후 발생하는 자발통, 이질통 및 통각과민 등의 신경병증 통증에 교감신경이 관여한다는 것은 일찍부터 알려져 왔다. 말초신경이 손상된 후, 국소마취제로도 차단되지 않는 일부 통증이 발생하는 것은 손상 받은 신경 근위부의 등뿌리신경절에서 교감신경이 발아되어 주변의 감각신경과 바스켓 모양의 구조를 형성하며, 교감신경의 자극으로 그 신경들이 반복 자극되어 신경의 비정상적인 방전에 의하며,² 교감신경차단으로 통증이 제어된 교감신경의 존성 신경병증 통증에서도 노르에피네프린을 다시 그 부위에 피하로 주사하여 역으로 다시 통증을 유발시키는 것은 α_2 아드레날린 수용체에 의한다.¹⁷ α_2 아드레날린 수용체는 α_{2A} , α_{2B} , 그리고 α_{2C} 의 세 종류가 있는데, 쥐의 등뿌리신경절에서 발견되는 α_2 아드레날린 수용체는 주로 α_{2A} 와 α_{2C} 아형이며 척수에서도 α_{2A} 아형은 척수 II, III층에, α_{2C} 아형은 큰 운동신경에 존재하는데 척수신경을 결찰하면 동측 등뿌리신경절의 수용체 중 α_{2A} 아형은 증가하는 반면 α_{2C} 아형은 감소하지만, 척수에서의 변화는 볼 수 없다는 보고와^{18,19} 신경절단 이후에 척수에서는 α_{2C} 아형이 약간 관계한다는 보고가²⁰ 있다. 그러나 좌골신경 만성 협착 손상 모델의 척수에서는 α_{2A} , α_{2C} 수용체아형이 감소하는 경우도 있어서²¹ 신경손상 모델이나 손상 후의 시간 경과에 따라 α_2 아드레날린 수용체 아형의 발현의 차이가 있을 수 있다고 생각하여야 할 것이다. α_{2B} 아형은 등뿌리신경절에 존재하지 않거나 일부 운동신경계에서만 존재한다고^{18,19} 하나, 전신마취 약제로 널리 사용되는 아산화질소의 진통 효과는 연수의 α_{2B} 아형을 매개하여 일어난다고 하는 보고도²² 있으므로 통증의 원인과 지속 기간, 통증 경로에 따라, 통증 수용에 작용하는 α_2 아드레날린 수용체 아형의 발현이나 변화가 다를 수도 있다는 것을 말해준다. 신경병증 통증에서는 등뿌리신경절에 존재하는 α_{2A} 및 α_{2C} 수용체아형이 더욱 중요한 역할을 하며 척수에서는 α_2 아드레날린 수용체가 관여하지 않을 것이라고¹⁸ 하지만 여러 형태의 통증 연구에서 척수로 투여된

α_2 아드레날린 효현제들은 훌륭한 진통 효과를 나타내고 있다.^{16,23-27} 척수로 투여되는 아드레날린 작동제들은 척수에서의 glutamate의 분비를 감소시켜 진통효과를 나타내며 이는 정상 상태에서는 α_{2A} 아형 수용체의 작용에 더욱 의존한다.²⁷ 그러나 염증성 통각과민이나 모르핀에 의한 진통 효과에는 α_{2A} 아드레날린 수용체가 관여하지 않으며²⁸ 척수신경 결찰에 의한 신경병증 통증이 발생하면 아드레날린 수용체의 아형에 관계없이 모든 아드레날린 수용체가 관여한다고²⁵ 하여 통증의 원인에 따라 발현하고 작용하는 아드레날린 수용체아형이 다를 수 있다는 것을 나타낸다. 본 연구에서는 이전의 이런 결과들을 참고로 하여 신경병증 통증의 발생에서 아드레날린 수용체의 발현에 영향을 미칠 수 있는 BDNF를 증가시켜 아드레날린 수용체아형의 변화를 좀 더 뚜렷하게 관찰할 수 있을 것으로 예상하고 시행하였다.

신경의 생성과 재생 등에는 NGF, BDNF, neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5) 등의 여러 신경영양인자가 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 하나인 BDNF는 신경의 발달이나 재생, 그리고 신경병증 통증의 발생에 관여한다. 쥐의 좌골신경을 절단시킨 후 손상 부위에 국소적으로 BDNF를 가하면 신경손상의 재생에는 미치는 영향은 미미하지만 통증 행동의 발생을 감소시키며,⁵ 좌골신경을 절찰한 신경병증 통증모델에 BDNF를 생산 분비하는 뇌간 신경세포를 이식하면 축삭 이질통, 냉각 이질통, 열 이질통의 개선을 나타낸다는 것은²⁹ 척수 내의 BDNF의 증가로 신경병증 통증이 감소할 수 있다는 것을 말해준다. 또한, 척수신경을 절단한 모델에서는 등뿌리신경절의 교감신경성 반응이 증가하는 반면, 신경영양인자들인 NGF, neurotrophin-3, BDNF의 항혈청을 투여하면 교감신경 발아와 바스켓의 형성을 감소시키지만 역설적으로 α_2 아드레날린 작동제의 진통효과를 억제한다.³⁰ BDNF가 척수 내에서 GABA 수용체를 자극하여 감각신경에서의 substance P 분비를 억제하여 진통효과를 나타내며⁷ BDNF를 가하면 신경병증 통증의 척수등뿔에서 분비가 감소된 GABA의 분비를 회복시켜 항진통효과를 나타낸다.⁶ 특히 최근에는 척수신경 결찰에 의한 신경병증 통증에서 BDNF는 척수의 GABA를 통한 탈억제를 회복시켜 항진통 효과를 나타내며, BDNF가 등뿌리신경절이나 척수등뿔의 교감신경 발아를 촉진하고 그러한 기전을 통하여 α_2 아드레날린 작동제가 정상적인 상태의 진통 작용보다 신경병증 통증에서 진통 작용이 증가하는 것이라 하였다.⁸ 그러므로 신경병증 통증에서 척수에서의 BDNF를 증가시키는 처

치는 실험 개체의 통증을 감소시키고 척수의 교감신경계의 발아를 통하여 α_2 아드레날린 효현제의 진통 효과에 영향을 미칠 것으로 생각하였다.

4-Methylcatechol은 신경성장인자의 합성을 자극하는 물질로 당뇨병성 신경병증이나 acrylamide 투여로 유발된 신경병증에 4-methylcatechol을 투여하면 운동신경의 신경전달속도를 회복시키거나 신경병증 징후를 개선시켜 신경 손상을 회복시킨다.^{10,31,32} 또한 복강 내로 투여하면 쥐의 대뇌피질에서 BDNF mRNA를 증가시키고 신생 쥐에 이 약물을 반복 투여하면 투여 용량에 비례적으로 BDNF 합성을 증가시킨다. 본 연구에서는 척수신경을 결찰한 3일 후부터 축삭 이질통이 나타났으나 생리식염수를 투여한 대조군과 유의한 차이를 나타내지 못하였으며 반대편의 다리에서도 마찬가지였다. 각 군의 12마리 중에서 일주일 후에도 15 g 이상의 cut-off를 유지하고 있는 것은 실험군이 3마리, 대조군에서는 11.98 g의 역치를 보이는 쥐가 한 마리 있었다는 점에서 4-methylcatechol이 축삭이질통의 발생을 억제할 가능성이 있을 것으로 사료된다. 그러나 수술 3일 후에 축삭 이질통을 나타내지 않은 개체들만으로 이질통의 역치를 비교하면 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 4-methylcatechol이 당뇨병이나 acrylamide에 의한 신경병증에서 운동신경이나 감각신경의 손상을 개선할 수 있을 것이라는 이전의 연구 결과들에^{10,11,31,32} 근거하여 척수신경 결찰 모델에서의 신경병증 통증의 회복과 기대한 본 연구 결과와 다르다. 이는 이전의 실험들이 대사성 신경 손상 모델이지만 본 실험에 사용된 것은 신경을 직접 묶어서 만든 모델이라는 차이를 고려해야 할 것이다.

신경병증 통증에서는 정상적인 개체와 달리 진통에 작용하는 α_2 아드레날린 수용체 아형이 변하며 α_2 아드레날린 효현제들도 정상 개체에서의 진통 효과보다 신경병증 통증에서 더 큰 효과를 나타내므로^{25,26,33} 본 연구에서는 BDNF를 유도한다는 4-methylcatechol을 2주간 투여하고 대표적인 α_2 아드레날린 작동제인 clonidine을 척수강 내로 투여하여 그 진통 효과를 대조군과 비교하였다. 그러나 실험 중 투여된 최대량(30 μ g)에서 항이질통 효과가 초기에 발현하였고 2시간 후에 유의한 차이를 나타냈을 뿐 그 이하의 용량에서는 실험군과 대조군 간에 차이를 나타내지 못하였다. 약물에 대한 반응과 척수의 아드레날린 수용체 아형 mRNA의 RTPCR 분석 결과로 추측할 때에 비록 약물의 효과의 차이는 미미하지만 신경병증 통증 모델에서는 척수의 아드레날린 수용체보다는 등뿌리신경절의 아드레날린 수용체가 더 중요한

역할을 하는 것이라¹⁸⁻²⁰⁾ 생각한다.

결론적으로, 신경영양인자 유도제로 알려진 4-methylcatechol로 치료한 쥐에서 척수의 아드레날린 수용체 아형의 발현과 α_2 아드레날린 효현제의 진통 효과의 향진을 조사할 목적으로 쥐의 척수신경 결찰 모델을 사용하여 연구하였으나 clonidine의 항이질통 효과가 약간 증가하였을 뿐, 통계적으로 유의한 4-methylcatechol의 반복 투여에 의한 이질통 개선 효과나 척수에서의 아드레날린 수용체 아형의 변동을 볼 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999; 353: 1959-64.
2. McLachlan EM, Jänig W, Devor M, Michaelis M: Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 1993; 363: 543-6.
3. Gill HJ, Yoon DM, Oh HK, Ree YC: The celiac plexus block and the lumbar sympathetic ganglion block for the upper and lower abdominal cancer pain: 7 cases. *Korean J Pain* 1988; 1: 171-6.
4. Song SO, Kim SK: Therapeutic effects of stellate ganglion block in management of upper extremity reflex sympathetic dystrophy (RSD, CRPS Type I). *Korean J Anesthesiol* 1997; 33: 1176-84.
5. Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Kowalik JL: BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg Rev* 2007; 30: 235-43.
6. Lever I, Cunningham J, Grist J, Yip PK, Malcangio M: Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1169-74.
7. Pezet S, Cunningham J, Patel J, Grist J, Gavazzi I, Lever IJ, et al: BDNF modulates sensory neuron synaptic activity by a facilitation of GABA transmission in the dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21: 51-62.
8. Hayashida K, Clayton BA, Johnson JE, Eisenach JC: Brain derived nerve growth factor induces spinal noradrenergic fiber sprouting and enhances clonidine analgesia following nerve injury in rats. *Pain* 2008; 136: 348-55.
9. Fukumitsu H, Sometani A, Ohmiya M, Nitta A, Nomoto H, Furukawa Y, et al: Induction of a physiologically active brain-derived neurotrophic factor in the infant rat brain by peripheral administration of 4-methylcatechol. *Neurosci Lett* 1999; 274: 115-8.
10. Hanaoka Y, Ohi T, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, Matsukura S: The therapeutic effects of 4-methylcatechol, a stimulator of endogenous nerve growth factor synthesis, on experimental diabetic neuropathy in rats. *J Neurol Sci* 1994; 122: 28-32.
11. Callizot N, Warter JM, Poindron P: Pyridoxine-induced neuropathy in rats: a sensory neuropathy that responds to 4-methylcatechol. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 626-35.
12. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-63.
13. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
14. Kim HB, Park TS, Lee SH: The analgesic effects of intrathecal clonidine on the rat postincisional model. *Korean J Anesthesiol* 2001; 41: 358-64.
15. Kim TH: Clonidine added to lidocaine prolongs the duration of anesthesia and analgesia during brachial plexus block. *Korean J Pain* 2001; 14: 41-5.
16. Park JY, Park JH, Hwang JH: The antinociceptive and antiallodynic effects by brimonidine, a selective α_2 adrenergic agonist. *Korean J Anesthesiol* 2001; 40: 397-405.
17. Moon DE: Norepinephrine-induced rekindling of mechanical allodynia in sympathectomized neuropathic rat. *Korean J Pain* 1996; 9: 318-25.
18. Lee NH, Kim DS, Kim JK, Kim KJ, Cho HJ: Changes in the α_2 -adrenergic receptor subtypes gene expression in rat dorsal root ganglion and spinal cord in an experimental model of neuropathic pain. *Korean J Anat* 1998; 31: 861-9.
19. Shi TS, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T: Distribution and regulation of α_2 -adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain* 2000; 84: 319-30.
20. Shi TJ, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T: Distribution of α_2 -adrenoceptor mRNAs in the rat lumbar spinal cord in normal and axotomized rats. *Neuroreport* 1999; 10: 2835-9.
21. Leiphart JW, Dills CV, Levy RM: Decreased spinal α_2 - and α_2c -adrenergic receptor subtype mRNA in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2003; 349: 5-8.
22. Sawamura S, Kingery WS, Davies MF, Agashe GS, Clark JD, Kobilka BK, et al: Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of $[\alpha]_2B$ adrenoceptors. *J Neurosci* 2000; 20: 9242-51.
23. Cheong MA, Kim HN, Jun JH, Kim KH, Suh JK, Hwang JH, et al: The effect of α_2 adrenergic agonists and norepinephrine on mechanical allodynia by Freund's complete adjuvant induced inflammation in rats. *Korean J Anesthesiol* 2003; 45: 123-32.
24. Dufflo F, Conklin D, Li X, Eisenach JC: Spinal adrenergic and cholinergic receptor interactions activated by clonidine in postincisional pain. *Anesthesiology* 2003; 98: 1237-42.
25. Dufflo F, Li X, Bantel C, Pancaro C, Vincler M, Eisenach JC: Peripheral nerve injury alters the α_2 adrenoceptor subtype activated by clonidine for analgesia. *Anesthesiology* 2002; 97: 636-41.
26. Puke MJ, Wiesenfeld-Hallin Z: The differential effects of morphine and the α_2 -adrenoceptor agonists clonidine

- and dexmedetomidine on the prevention and treatment of experimental neuropathic pain. *Anesth Analg* 1993; 77: 104-9.
27. Li X, Eisenach JC: Alpha2a-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 939-44.
28. Lähdesmäki J, Scheinin M, Pertovaara A, Mansikka H: The alpha2a-adrenoceptor subtype is not involved in inflammatory hyperalgesia or morphine-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 2003; 468: 183-9.
29. Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, McKillop M, McKillop J, Plunkett JA, et al: Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 2000; 86: 195-210.
30. Deng YS, Zhong JH, Zhou XF: Effects of endogenous neurotrophins on sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia and allodynia following spinal nerve injury. *Exp Neurol* 2000; 164: 344-50.
31. Saita K, Ohi T, Hanaoka Y, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, et al: A catechol derivative (4-methylcatechol) accelerates the recovery from experimental acrylamide-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 231-7.
32. Saita K, Ohi T, Hanaoka Y, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, et al: Effects of 4-methylcatechol, a stimulator of endogenous nerve growth factor synthesis, on experimental acrylamide-induced neuropathy in rats. *Neurotoxicology* 1995; 16: 403-12.
33. Obata H, Li X, Eisenach JC: Alpha2-adrenoceptor activation by clonidine enhances stimulation-evoked acetylcholine release from spinal cord tissue after nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 2005; 102: 657-62.
-