백서 신경장해성 통증시 Dynorphin, Enkephalin, c-Fos 유전자 발현에 관한 연구

충남대학교 의과대학 마취과학교실 및 생화학과학교실*

한능희 · 이원형 · 황원재 · 윤석화
신용섭 · 손수창 · 김혜자
최세진 · 임규* · 황병두*

= Abstract =

The Gene Expression of Dynorphin, Enkephalin, c-Fos in the Neuropathic Rat

Neung Hee Han, M.D., Won Hyung Lee, M.D., Won Jae Hwang, M.D., Sug Hwa Yoon, M.D.
Yong Sup Shin, M.D., Soo Chang Son, M.D., Hye Ja Kim, M.D., Sae Jin Choi, M.D.
Kyu Lim, M.D.* and Byung Doo Hwang, M.D.*

Department of Anesthesiology & Biochemistry*, School of Medicine,
Chungnam National University, Taejeon, Korea

Background: We studied the time course of gene expression of dynorphin, enkephalin, c-fos, and the changes of allodynia, and the effect of chemical sympathectomy on the gene expression and allodynia in neuropathic rat.

Methods: In two groups of rat (Sprague-Dawley), the left L5 and L6 spinal nerves were tight ligated. In gene expression group (N=25), behavioral tests for mechanical allodynia and cold allodynia were performed for the next two weeks. After the test of allodynia, the expression of dynorphin, enkephalin, c-fos were assessed by Northern blot hybridization. In chemical sympathectomy group (N=16), after chemical sympathectomy (guanethidine 70 mg/kg intraperitoneally, from postoperative 7 days to 9 days), the changes of allodynia and the gene expression of enkephalin, c-fos were tested.

Results: Mechanical allodynia and cold allodynia was developed on the postoperative 3, 5, 7, 14 days. Preprodynorphin mRNA expression was reached peak level at the postoperative 8 hrs, sustained increase by the postoperative 3 days, but preproenkephalin mRNA expression increased slightly after operation. c-Fos mRNA expression was increased immediately at the postoperative 30 min, 1 hr, returned to normal level thereafter, and increased again on the postoperative 3, 5, 7 days that neuropathic pain was developed. Mechanical allodynia and cold allodynia were decreased by chemical sympathectomy. The increased c-fos mRNA expression and pain at postoperative 7 days was reduced by chemical sympathectomy.

Conclusion: These results suggest that the transient gene expression of dynorphin and c-fos after tight ligation of L5 and L6 spinal nerves induces the development neuropathic pain, and late c-fos expression is related to neuropathic pain. (Korean J Anesthesiol 1996; 31: 293~303)

Key Words : neuropathic pain, c-fos, dynorphin, enkephalin

서 론

신경장해성 통증 (neuropathic pain)은 말초신경의 부분적 손상에 의하여 유발되는 것으로서 정상상태에서 통증을 유발하지 않는 자극에 의하여 통증을 느끼는 이질통(allodynia)과 정상상태에서 통증을 느낄 수 있는 자극에 대하여 더 증가된 통증반응을 보이는 통각과민(hyperalgesia) 등의 통증현상을 나타내며 이는 교감신경 차단에 의하여 통증이 완화되는 현상을 가지고 있으나 아직 그 명확한 병태생리학적 기전은 밝혀져 있지 않다¹⁾.

최근 제시된 신경장해성 통증의 동물실험 모델^{2~4)}을 이용하여 척수 후각에서 통증전달에 관여하는 신경전달물질인 dynorphin^{5,6)}, substance P^{7,8,10)}, calcitonin gene related peptide(CGRP)⁸⁾와 oncogene 중 c-fos⁹⁾ 등의 유전자 발현의 변화에 대하여 보고되고 있다. 즉 Draisci와 Iadarola⁹⁾은 말초 염증 유발시에 염증유발 후 2시간에 c-fos 유전자가 상승되며 24시간에 정상으로 환원됨을 보고하였고 Kajander등⁵⁾은 백서 좌골신경을 느슨하게 결찰하는 방법²⁾으로 신경장해성 통증을 유발하여 신경장해성 통증 유발시간과 dynorphin 발현시간이 밀접한 관계를 지니고 있음을 보고하였다. Naranjo등¹¹⁾과 Noguchi등²⁷⁾은 또한 c-fos 유전자 발현과 dynorphin 유전자 발현이 척수의 동일 신경원 (neuron)에서 동시에 일어나며 dynorphin의 전구물질인 preprodynorphin 유전자의 촉매부위 (promotor region)에 c-fos가 결합하여 preprodynorphin 유전자 발현을 유도한다고 하였다. 이러한 신경전달물질의 증가 혹은 감소와 c-fos, dynorphin 유전자 발현과 통증의 발현시간 상호간의 상관관계는 통증을 전달하는 전달통로 (특히 척수 후각)에서 전달정보의 감소 또는 증폭작동을 설명할 수 있으므로 신경성 장애 통증의 병태생리학적 기전연구에 매우 중요한 단서를 제공하고 있다고 생각된다.

한편 교감신경차단은 신경장해성 통증을 완화시켜 통증의 감소 및 발한이상, 혈관 운동이상 등의 증상을 호전시키며 신경장해성 통증의 악화를 방지할 수 있어 신경장해성 통증의 진단과 치료에 널리 사용되는 방법이다^{1~4)}. 그러나 교감신경차단이 신경장해성 통증에 대한 매우 현저한 치료효과에 비하

여 그 치료기전에 대한 연구는 아직 미흡하며 특히 최근에 발표되고 있는 신경장해성 통증시 증가되는 척수의 신경전달물질과 교감신경차단의 상호관계에 관련된 보고는 미미하다. 이에 저자는 백서의 제 5, 6번 요추신경을 결찰하는 방법⁴⁾으로 신경장해성 통증을 유발한 후 백서 요부 척수에서 dynorphin, enkephalin, c-fos 유전자의 시간에 따른 변화를 관찰하고 화학적 교감신경차단을 실시하여 상기 유전자 발현과 통증의 변화 및 교감신경차단 효과 등을 관찰하여 신경장해성 통증의 병태생리학적 기전을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험대상 및 실험내용

200~300 g의 백서 (Sprague-Dawley) 41마리를 이용하여 신경장해성 통증 유발 수술을 실시한 후 시간에 따른 통증 및 유전자 발현 변화를 관찰한 유전자 발현군과 통증 유발 수술후 7~9일에 guanethidine monosulfate로 화학적 교감신경 차단을 실시하고 통증 및 유전자 발현 변화를 관찰한 교감신경 차단군으로 나누어 실험을 실시하였다.

(1) 유전자 발현군(N=25): 통증 유발 수술후 30분, 1, 2, 4, 8시간, 1, 3, 5, 7, 14일에 통증변화를 관찰한 후 동일한 백서에서 요부 척수를 적출하여 유전자 발현 변화를 관찰하였으며 관찰한 내용은 다음과 같다.

① 신경장해성 통증의 시간에 따른 통증의 변화 측정
가. 기계적 이질통

나. 냉각 이질통

② 신경장해성 통증에서 통증관련 유전자 발현 측정

가. 신경장해성 통증 유발 수술후 시간 경과에 따른 preprodynorphin mRNA 변화

나. 신경장해성 통증 유발 수술후 시간 경과에 따른 preproenkephalin mRNA 변화

다. 신경장해성 통증 유발 수술후 시간 경과에 따른 c-fos mRNA 변화

(2) 교감신경 차단군(N=16): 통증유발 수술후 7~9일에 화학적 교감신경 차단을 실시하여 통증의 변화를 관찰한 후 동일한 백서에서 요부 척수를 적출하여 유전자 발현 변화를 관찰하였다.

① 화학적 교감신경 차단후 신경장해성 통증의 변화 측정

가. 기계적 이질통

나. 냉각 이질통

② 화학적 교감신경 차단후 통증관련 유전자 발현의 변화 측정

가. 화학적 교감신경 차단후 preproenkephalin mRNA 변화

나. 화학적 교감신경 차단후 c-fos mRNA 변화

2) 실험 방법

실험의 각 단계에 사용된 실험 방법은 다음과 같다.

(1) **신경장해성 통증 유발 수술:** 2.5% halothane과 50% N₂O 4 L/min을 투명한 plastic 상자에 투여하여 plastic상자 안의 백서에 마취를 도입한 후 백서를 정위 수술대 (stereotaxic frame)에 복와위로 고정하고 특별히 고안된 안면 마스크를 통하여 백서에서 측정된 최소 폐포농도¹²⁾의 1.5배인 1.5% halothane과 65% N₂O 1 L/min으로 지속적으로 마취시키면서 피부를 절개하고 양쪽 장골능을 연결한 가상선을 기준으로 하여 좌측 척추방 (paravertebral) 근육을 절개하고 좌측 제6번 요추 횡돌기와 장골을 노출시켰다. 미세수술기구를 사용하여 제6번 요추 횡돌기와 장골요추 인대 (iliolumbar ligament)를 제거하고 특별히 고안된 유리봉으로 만든 작은 갈고리를 사용하여 제5, 6번 좌측 요추신경을 3/0 비단실로 견고하게 결찰한 후 봉합하였다.

수술전과 직후에 20 mg cefamandol을 근육주사하고 발바닥에 대한 불필요한 자극을 줄이기 위하여 동물사육통에 부드러운 깔집을 깔아 사육하였다.

(2) **작열통성 통증 측정:** 기계적 자극에 대한 이질통 (mechanical allodynia)은 Von Frey hair로 측정하고 냉각이질통 (cold allodynia)은 acetone과 cold plate로 각각 측정하였다.

① **기계적 이질통 측정을 위한 Von Frey hair 검사:** 2×2 mm의 철사그물로 만든 실험대 위의 90×90×250 mm의 아크릴 상자 내에 백서를 5분간 안정시킨 후 구부러질 때 압력이 일정하게 2.35 g이 되도록 제작된 Von Frey hair (Semmes-Weinstein monofilament, USA)를 사용하여 그물망을 통하여 백

서 좌측 발바닥을 자극하였다. 자극방법은 제3, 4, 5번 중족지골 관절 (metatarsophalangeal joint)과 발바닥을 각각 2~3초에 5번씩 자극하여 자극에 대한 회피반응을 측정하였다. 자극을 가한 4개 부위 중에 반응성적이 우수한 2개 부위를 선택하여 2개 부위의 총 자극 횟수 10회에 대한 회피반응을 백분율로 나타내고 회피반응은 자극시 발바닥을 들거나, 핥거나, 털거나, 도망가는 현상¹³⁾을 양성반응으로 간주하였다. 정상상태에서는 2.35 g의 Von Frey hair가 회피반응을 나타내지 못하므로 요추신경 결찰 후 자극에 대한 회피반응이 증가되면 기계적 이질통 현상이 유발된 것으로 간주하였다.

② **냉각 이질통 측정을 위한 acetone 검사:** 상기 Von Frey hair검사와 동일한 실험대에서 5분간 안정시킨 후에 acetone을 백서 좌측 발바닥에 접촉시켜 acetone 증발에 따른 온도 감소에 의한 통증에 대한 회피반응을 측정하였다. 자극횟수는 좌측발을 10분 간격으로 5번 각각 자극하여 자극에 대한 회피반응을 백분율로 표시하였으며 자극에 대한 양성반응은 Von Frey hair검사와 동일한 기준을 적용하였다.

③ **냉각 이질통 측정을 위한 cold plate 검사:** plate의 표면온도가 5°C로 일정하게 유지되는 cold plate위에 백서를 5분간 안정시킨 후에 다시 5분 동안 통증으로 인하여 백서가 좌측 발바닥을 들고 있는 시간(초)의 총합을 측정한다.

요추신경 결찰 후 acetone에 의한 회피반응이 증가되거나 cold plate에서 정상상태보다 백서가 발바닥을 들고 있는 시간이 증가되면 냉각 이질통 현상이 유발되었다고 간주하였다.

(3) **화학적 교감신경 차단:** 70 mg/kg guanethidine monosulfate를 각각 하루에 2번, 3일간 복강내 주사하였다.

(4) **요부 척수의 척출:** Iadarola등¹⁴⁾의 방법에 의하여 백서를 단두 (decapitation)시킨 후 척추 천추부분을 덮고 있는 피부를 가위로 절제하고 천추의 중간부위를 절개하여 척추관을 노출시켰다. 척추관을 통하여 21-gauge 바늘을 삽입하고 냉각 식염수가 들어있는 주사기를 부착하여 힘주어 식염수를 주입하여 척수의 전부위가 경추의 개구부를 통하여 밖으로 나오도록 하여 요부 척수 부위만 적출하였다. 이 모든 수기는 단두 후 90초 이내에 실시하고 바로 total

Fig. 1. Restriction endonuclease analysis of pSP64D1.7. pSP64D1.7 was digested with Pst I and EcoR I. λ hind III; molecular weight marker.

Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of pYSEAI. pYSEAI was digested with Sma I and Sac I. λ hind III; molecular weight marker.

RNA를 조제하는 과정을 시작하였다.

(5) **Total RNA 조제:** Total RNA는 Karlinsey등¹⁵⁾의 방법으로 조제하였다. 조직을 4배 용량의 lysis buffer (5M guanidium thiocyanate, 10mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 8% mercaptoethanol)를 가하여 homogenization하였다. 용해된 조직 100 μ l를 endorf tube에 옮긴 후 7배 용량의 4 M LiCl를 가하여 진탕 후 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 이를 4°C에서 15분간 13000 rpm으로 원심분리하여 얻은 침전물에 다시 3M LiCl 5배 용량을 가하여 세척한 후 solubilization buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate))로 용해하고 phenol 2회 처리하여 ethanol로 total RNA를 침전시켰다. 이때 total RNA는 DEPC로 처리한 증류수에 녹여 260

nm 흡광도를 이용하여 농도를 측정한 후 사용할 때까지 50% ethanol 용액으로 만들어 -70°C에 보관하였다.

(6) **Northern blot hybridization:** 각각 50 μ g의 total RNA를 formaldehyde와 formamide 용액하에서 denaturation하여 formaldehyde/1.2% agarose gel로 전기영동하였다¹⁶⁾. RNA를 10X SSC(NaCl, sodium citrate)로 씻고 gel로부터 Nytran membrane에 transfer하여 UV cross linker를 이용하여 15초간 건조시켰다. 건조된 RNA blot membrane을 Hybridization 용액¹⁷⁾ (50 mM PIPES, 100 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA 및 5% SDS가 포함된 용액)으로 60°C에서 45분간 prehybridization 시킨 후 용액을 버리고,

probe이 포함된 새로운 hybridization 용액을 가하여 같은 온도에서 18시간 동안 hybridization을 시행하였다. 이때 사용한 probe은 백서 mRNA를 위하여 사용할 수 있는 cDNA가 포함된 plasmid를 제한효소로 처리하여 구하였다. 사용된 probe으로는 preprodynorphin (plasmid SP64D1.7, Jim Douglas¹⁸⁾가 제공, Fig. 1)은 EcoR I과 Pst I 제한효소로, preproenkephalin (plasmid pSEAYI, Sabol S19이 제공, Fig. 2)은 Sma I과 Sac I 제한효소로, c-fos (1.0 kb, Fig. 3)는 Pst I 제한효소로²⁰⁾ 절단한 후 electroelution한 다음 random primed DNA labeling kit로 ³²P를 labeling하여²¹⁾ 사용하였다. Hybridization에 사용한 probe는 평균 10⁶ cpm/ml으로 하여 60°C에서 하룻밤 hybridization하였다. Hybridization이 끝나면 5% SDS가 포함된 1X SSC로 60°C에서 10분간 세척하고, 다시 같은 용액으로 60°C에서 20분간 세척한 후 autoradiogram을 하였다.

또한 사용된 각 total RNA가 동량이 사용되었는지를 검증하기 위하여 조직 염증 동안에도 신경 조직에서 특별한 양적 변화를 보이지 않는 β -actin^{22,23)}을 이용하여 hybridization을 실시 검사하였다.

결 과

1) 유전자 발현군

(I) 신경장해성 통증의 변화:

① 기계적 이질통의 측정 (Fig. 4): 기계적 이질통은 수술을 시행한 후 좌측발에서 Von Frey hair로 검사하였다. 수술후 4시간에 일시적으로 20%의 회피반응을 보였고 수술후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일에 각각 40%, 100%, 90%, 80%, 80%의 회피반응을 보였으며 3일, 5일, 7일, 14일에는 Von Frey hair로 발바닥을 자극시 좌측발을 들고 있는 전형적인 이질통 현상을 나타냈다.

② 냉각 이질통의 측정을 위한 acetone 검사 (Fig. 4): Acetone으로 검사한 냉각 이질통은 수술을 시행한 후 4시간에 20%의 회피반응을 보이고 술후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일에 각각 40%, 100%, 60%, 100%, 60%의 회피반응을 보여 술후 3일 이후 전형적인 냉각 이질통 현상을 나타내었다.

③ 냉각 이질통 측정을 위한 cold plate 검사 (Fig.

Fig. 3. Restriction endonuclease analysis of pfos-1. pFos-1 was digested with Pst I. λ hind III; molecular weight marker.

Fig. 4. The changes of pain responses in neuropathic rats. Signs of abnormal pain sensations, mechanical allodynia (Von Frey), cold allodynia (acetone, cold plate) were produced in about 3 days after ligations of lumbar 5th and 6th spinal nerves. C; control, 1H; 1 hour after injury, 1D; 1 day after injury.

4): 5°C의 cold plate 위에서 통증으로 인하여 좌측발을 들고 있는 시간의 총합을 구한 냉각 이질통은 술후 4시간에 2.6초, 1일, 3일, 5일, 7일, 14일에 각각

Fig. 5. RNA blots probed for rat preprodynorphin mRNA and β -actin mRNA. Total cellular RNA (50ug) was prepared from whole-rat lumbar spinal cord at 0.5, 1, 2, 4, 8 h, 1, 3, 5, 7, 14 days after the tight ligations of 5th and 6th lumbar spinal nerves. Top panel: RNA blot probed for rat preprodynorphin mRNA. Bottom panel: Same blot stripped and re-probed for rat β -actin mRNA.

Fig. 6. RNA blot probed for rat preproenkephalin mRNA. Total cellular RNA was prepared from whole-rat lumbar spinal cord at 0.5, 1, 2, 4, 8 h, 1, 3, 5, 7, 14 days after the tight ligations of 5th and 6th lumbar spinal nerves.

2.2초, 8.5초, 4.3초, 15.6초, 1.8초이었다.

상기 Von Frey hair, acetone, cold plate 검사 등을 종합하여 볼 때 술후 3일이후에 무통성 자극에 대한 회피반응이 의미있게 증가하여 술후 3일이후에 신경장해성 통증이 유발된 것으로 판단된다.

(2) 유전자 발현의 변화:

① **Preprodynorphin mRNA 발현 변화:** 시간에 따른 preprodynorphin mRNA 발현 변화는 신경장해성 통증이 유발되기 전인 수술후 4시간부터 증가하는 경향을 보여 술후 8시간에 최고치를 이루고 이후 1일, 3일에 증가된 경향이 지속되었으며 (Fig. 5) 이것은 Iadarola등²²⁾과 Ruda등²⁴⁾이 보고한 백서 한쪽 발에 급성 염증을 유발하였을 경우 preprodynorphin mRNA가 염증 유발 후 8시간 혹은 24시간 이내에

Fig. 7. RNA blot probed for rat c-fos mRNA. Total cellular RNA (40ug) was prepared from whole-rat lumbar spinal cord at 0.5, 1, 2, 4, 8 h, 1, 3, 5, 7, 14 days after the tight ligations of 5th and 6th lumbar spinal nerves.

증가하기 시작하여 수일 이내에 최고치를 이루는 결과보다는 빠른 시간에 preprodynorphin mRNA 발현이 이루어졌다.

② **Preproenkephalin mRNA 발현 변화:** Preproenkephalin mRNA 변화는 preprodynorphin mRNA의 변화와 유사한 경향을 보였으나 증가의 정도는 미약하였다 (Fig. 6).

③ **c-Fos 발현 변화:** c-Fos mRNA 발현은 통증 유발 수술후 30분과 1시간에 증가됨을 보였으며 (Fig. 7) 이것은 Draisci와 Iadarola⁹⁾가 보고한 말초 염증 유발시에 염증유발 후 2시간에 c-fos mRNA가 상승된 결과와 매우 유사하다. 2시간 이후에는 수술하지 않은 대조치로 감소되었다가 다시 수술후 3일, 5일, 7일에 유의하게 발현이 증가되었으며 (Fig. 7) 3일, 5일, 7일의 발현상승은 신경장해성 통증이 증가된 시간과 매우 유사하게 일치하였으며 이러한 실험결과는 본 실험에서 처음으로 관찰된 결과이다 (Fig. 4, Fig. 7).

2) 교감신경 차단군

(1) 신경장해성 통증의 변화:

① **교감신경 차단전 기계적 이질통 측정:** 수술후 7일 Von Frey hair 자극에 대한 회피반응은 5마리 백서 (N, S1, S2, S3, S4)에서 각각 40%, 10%, 20%, 80%, 40%로 기계적 이질통이 유발된 상태이었다 (Fig. 8).

② **교감신경 차단전 냉각 이질통 측정:** 수술후 7일 acetone 자극에 대한 회피반응은 5마리 백서 (N, S1, S2, S3, S4)에서 각각 40%, 80%, 80%, 60%, 60%로 acetone에 대한 냉각 이질통이 유발되어 있었다 (Fig. 8).

Fig. 8. Effect of chemical sympathectomy (70mg/kg guanethidine monosulfate, 2 times a day for 3 days) on the postoperative 7 days. Signs of abnormal pain sensations, mechanical allodynia (Von Frey), cold allodynia (acetone) were reduced in the rats (S1, S2, S3, S4) which received chemical sympathectomy. C; control, N; neuropathic rat which not received chemical sympathectomy, S1, S2, S3, S4; neuropathic rats which received chemical sympathectomy.

③ **교감신경 차단후 이질통의 변화:** 신경장해성 통증이 유발된 후 70 mg/kg guanethidine monosulfate를 하루 2회 3일 동안 복강내 주사하는 화학적 교감신경을 실시한 4마리의 백서 (S1, S2, S3, S4)에서 회피반응이 20% 이하로 감소되어 Von Frey hair에 대한 기계적 이질통과 acetone에 대한 냉각 이질통이 감소되었다 (Fig. 8).

(2) 유전자 발현의 변화:

① **Preproenkephalin mRNA 발현 변화:** 교감신경 차단을 실시한 4마리의 백서 (S1, S2, S3, S4)와 교감신경 차단을 실시하지 않은 백서 1마리 (N), 정상 백서 1마리 (C)에서 각각 요부 척수를 적출하여 유전자 발현 변화를 검사하였다. Preproenkephalin

Fig. 9. RNA blot probed for rat preproenkephalin mRNA after sympathectomy. Top panel: RNA blot probed for rat preproenkephalin mRNA. Bottom panel: Same blot stripped and re-probed for rat β -actin mRNA. C; control, N; neuropathic rat which not received chemical sympathectomy, S1, S2, S3, S4; neuropathic rats which received chemical sympathectomy.

Fig. 10. RNA blot probed for rat c-fos mRNA after sympathectomy. C; control, N; neuropathic rat which not received chemical sympathectomy, S1, S2, S3, S4; neuropathic rats which received chemical sympathectomy.

mRNA 발현은 정상 백서, 교감신경 차단을 실시하지 않은 백서, 그리고 교감신경 차단을 실시한 백서 상호간에 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 9).

② **c-Fos 발현 변화:** c-Fos mRNA의 변화는 교감

신경 차단을 시행하지 않은 백서 (N)에서는 대조치로 사용한 정상 백서 (N)보다 c-fos mRNA 발현이 증가되었으며 화학적 교감신경 차단을 실시한 백서 (S1, S2, S3, S4)에서는 교감신경 차단을 실시하지 않은 백서보다 c-fos mRNA 발현이 감소되어 Von Frey hair 검사와 acetone에 대한 통증변화와 매우 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 10).

고 찰

신경장해성 통증 (작열통)은 Bonica¹⁾에 의하면 1. 신경손상에 의하여 통증이 유발되며 2. 통증의 성격은 지속적이고 심한 타는 듯한 증상을 호소하고 이질통과 통각과민을 특징을 가지며 3. 혈관운동 이상과 발한 이상 및 위축증을 보이고 4. 교감신경 차단에 의하여 통증 및 통증과 연관된 모든 증상이 완화되는 특징을 가지고 있다고 정의하였다.

실험적으로 신경장해성 통증을 유발할 수 있는 동물실험 모델은 1988년 Bennett과 Xi²⁾가 백서의 좌골신경 주위를 3~4회 느슨하게 결찰하는 방법과 1990년 Seltzer등³⁾이 고안한 백서 좌골신경의 배측 1/2~1/3을 견고하게 결찰하는 방법, 그리고 1992년 Kim과 Chung⁴⁾은 실험적인 변이를 최소화할 수 있는 실험적 모델로 백서 좌골신경을 이루는 제 4, 5, 6 요추신경 중 제 5, 6번 혹은 5번 요추신경을 좌골신경이 이루어지기 직전 부위에서 견고하게 결찰하는 방법이 제시되었다. 본 실험에서 사용한 척수신경을 견고하게 결찰하는 방법은 Bennett 모델의 느슨하게 3~4회 결찰하는 방법과 Seltzer 모델의 1/2~1/3을 결찰하는 방법에서 초래될 수 있는 실험적 오차를 최소화할 수 있다고 사료되어 본 실험에서 사용하였다.

실험적으로 유발된 작열통성 통증의 치료효과를 관찰하는데는 이질통과 통각과민의 방법이 자주 사용되고 있다. 이질통이라 함은 세계 통증 연구 학회 (International Association for the Study of Pain, IASP)의 분류법에 의하면 정상적인 상태에서는 통증을 유발할 수 없는 자극으로 통증이 유발되는 상태를 의미한다. 본 실험에서는 정상상태에서 통증을 유발하지 않는 2.35 g의 압력을 유발하는 Von Frey hair를 사용하여 자극에 대한 회피반응을 측정하였다.

이질통은 물리적인 기계적 자극 뿐만 아니라 온도의 변화에 의한 열자극에 의하여도 유발되기 때문에 본 실험에서는 표면 온도가 5°C로 유지되는 냉각판과 증발시에 표피온도를 감소시키는 acetone을 이용하여 냉각자극을 가하여 회피반응을 측정하였다. 회피반응에 양성으로 간주한 기준은 Attal등¹³⁾의 기준에 의하여 백서가 통증을 느끼고 있다고 생각되는 행동, 즉 자극시 발바닥을 들거나, 핥거나, 털거나, 도망가는 현상 등을 양성반응으로 간주하고 관찰자의 차이에 의한 오류를 없애기 위하여 모든 회피반응에 대한 관찰은 동일인이 실험을 진행하였다.

척수의 후각과 전각에서 면역조직 화학적 (immunohistochemical)인 방법을 통하여 opioid peptide가 발견되면서 척수에 유해감각을 전달하는 조절기전에 있어서 opioid와 opioid를 합성하는 신경원 (neuron)의 역할이 제시되어 왔는데 그 일례로 말초에서 염증을 유발할 수 있는 염증 유발 물질인 complete Freund's adjuvant, carrageenan, phorbol ester 등을 백서의 발에 주입하여 염증과 동시에 나타나는 통각과민, 부종 등의 증상과 opioid 제재인 dynorphin, enkephalin 등의 상관관계를 밝히려는 연구가 진행되었다. Ruda등²⁴⁾과 Iadarola등²⁵⁾은 백서의 한쪽 발에 급성 염증을 유발하였을 경우 dynorphin의 전구물질인 preprodynorphin mRNA가 염증 유발 후 8시간 혹은 24시간 이내에 증가하기 시작하여 수일 이내에 최고치를 이루며 dynorphin peptide는 preprodynorphin mRNA 보다는 약 2일 정도 늦게 최고치를 이루며 preproenkephalin mRNA는 preprodynorphin mRNA와 비슷한 시간에 미약한 증가 (56%)를 보이나 enkephalin peptide를 증가시키지는 않는다고 하였다. 이러한 opioid 증가는 opiate receptor의 down regulation에 의하지는 않으며 통각과민 등의 통증 증상과 비교할 때 시간적 관계에서 매우 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고하였다. 또한 in situ hybridization histochemistry와 immunocytochemistry의 방법을 통하여 preprodynorphin mRNA의 전사 (transcription)와 dynorphin peptide를 증가시키는 신경원의 위치를 척수 후각에서 확인하였는데 말초에서 유해감각을 전달하는 신경섬유가 투사 (projection)하는 척수 후각의 표재층 (superficial laminae I, II)과 심부층 (deep

laminae V, VI)에서 증가하는 것이 관찰되었다. 최근 신경장해성 통증의 실험 모델이 발표된 후 dynorphin에 관한 연구가 이루어져 Kajander등⁵⁾은 백서 좌골신경을 느슨하게 결찰하는 방법을 이용하여 신경장해성 통증을 유발하였을 때 술후 2~5일에 신경장해성 통증 증상이 나타나며 10일에 최고의 통증 증상을 보이며 수술을 시행한 동측의 척수 후각에서 dynorphin도 술후 5일에 증가하기 시작하여 20일에 최고치를 이루고 술후 20일까지 증가된다고 보고하였다. Wagner등⁶⁾은 백서 좌골신경을 얼리는 방법 (sciatic cryoneurolysis)으로 신경장해성 통증을 유발하였을 때 dynorphin양 면역반응 (immunoreactivity)이 양측의 척수 후각에서 술후 21일까지 증가함을 보고하였다. 백서 좌측 제 5, 6번 요추신경을 견고하게 결찰하는 방법을 이용한 본 실험에서도 술후 3일부터 신경장해성 통증이 유발되었으며 northern blot hybridization을 이용하여 시간에 따른 preprodynorphin mRNA와 preproenkephalin mRNA 발현 변화를 관찰하여 술후 2시간부터 preprodynorphin mRNA 발현이 증가하여 8시간에 최고치를 이루고 이후에도 증가된 상태가 지속되었으며 preproenkephalin mRNA 발현은 미약한 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 Ruda등²⁴⁾과 Iadarola등²⁵⁾의 결과보다는 빠른 시간에 preprodynorphin mRNA 발현이 최고치를 이루어졌음을 보이고 있다. 이것은 통증을 유발하는 말초신경을 자극하는 방법과 신경장해성 통증을 유발하는 신경 손상 방법의 차이에 의하여 preprodynorphin 발현의 시간적 차이가 있을 수 있다고 생각된다. 또한 Iadarola등²⁵⁾의 보고에서 말초 염증 유발시에 dynorphin mRNA는 염증 유발후 8시간 이내에 빠르게 증가되고 dynorphin A1-8 peptide는 염증 유발후 2일에 나타나기 시작하여 4일에 최고치를 이룬다는 보고를 볼 때 preprodynorphin mRNA가 8시간에 최고치를 이루는 본 실험 결과는 술후 3~5일에 dynorphin peptide가 증가할 것으로 쉽게 추정할 수 있으며 이것은 술후 3~7일에 신경장해성 통증이 최고치를 보이는 것과 일치하여 dynorphin peptide와 신경장해성 통증간에 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있다.

c-Fos는 mouse osteogenic sarcoma virus의 변형된 유전자인 viral oncogene v-fos의 세포 동류체 (cellular homolog)이며 세포 조기발현 유전자 (cellular im-

mediate-early gene)로 알려져 있다. 이것은 표적 유전자 (target gene)의 촉매부위 (promotor region)에 있는 DNA-결합단백 (binding protein)이나 DNA에 결합함으로써 신경계의 장기적 기능적 변화를 유도하는 초기 유전자 발현을 조절하는 전사인자 (transcriptional factor)로 작용한다²⁵⁾고 하였다. 또한 전기적, 화학적인 자극을 사용하거나 염증 등을 유발하여 일차성 유해 구심성 섬유 (nociceptive primary afferents)를 자극하였을 경우 척수 후각에 다량의 fos protein-like immunoreactivity (Fos-IR)가 증가되며²⁶⁾ c-fos cDNA probe를 사용한 RNA blotting analysis에서는 백서의 발에 염증 유발 물질을 주입하여 급성 염증을 유발하였을 경우 30분에 증가하기 시작하여 2시간에 최고치를 이루고 8시간에 거의 정상으로 환원되는 것이 보고되었다⁹⁾. Noguchi등²⁷⁾의 보고에 의하면 이렇게 자극에 대하여 빠르게 증가한 c-fos는 preprodynorphin mRNA의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있는데 이중 면역화학 방법 (double immunochemical method), in situ hybridization histochemistry 방법으로 척수 후각에 있는 신경원을 이중표지 (double labeling)시켰을 경우 Fos-IR과 preprodynorphin mRNA, preproenkephalin mRNA이 척수 후각의 표재층과 목부분에서 동시에 동일 부위에 위치하는 것이 관찰된다고 하였다. 또한 fos protein은 표적 유전자의 촉매부위에 있는 API DNA 인지부위에서 Jun protein과 함께 결합하여 전사를 조절하는 것으로 생각되는데 Naranjo등¹¹⁾은 백서 preprodynorphin gene의 촉매부위의 API-like binding site가 Fos, Jun protein과 결합하여 dynorphin 유전자 발현을 유도하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서도 술후 30분과 1시간에 c-fos mRNA 발현이 증가되었으며 뒤를 이어 술후 2시간부터 preprodynorphin mRNA의 발현이 증가되며 preproenkephalin mRNA도 증가되는 경향을 보여 요추신경 결찰에 의하여 유발된 신경장해성 통증도 c-fos에 의해서 dynorphin, enkephalin 유전자 발현이 유도되는 것으로 생각할 수 있다.

한편 본 실험의 제 5, 6번 요추신경을 견고하게 결찰하는 신경장해성 통증 유발 수술후 c-fos mRNA 발현이 30분, 1시간에 일시적으로 증가되었다가 다시 정상으로 환원된 후 술후 3일에 발현이 증가되어 5일, 7일에도 지속적으로 증가된 상태로 남아있

음이 관찰되었다. 이러한 결과는 본 실험에서 처음 관찰된 결과로써 어떠한 의미를 지니고 있는 것인가? Keay와 Bandler²⁶⁾는 백서에서 심부, 표재성 유해 자극으로 periaqueductal grey의 각각 다른 부위에 Fos-IR이 증가됨을 보고하였고 Lima등²⁸⁾은 화학적, 온열적, 기계적 유해자극으로 피부를 2시간 동안 자극하였을 때 Fos-IR가 척수 후각 표재층 laminae I에서 증가됨을 보고하였고 Strassman과 Vos²⁹⁾는 3차 신경 유해자극 전달경로의 신경활동의 지표로써 fos의 가능성을 보고하였다. 이러한 보고는 말초의 유해한 자극에 비례하여 중추신경계에서 c-fos의 발현이 증가될 수 있음을 입증할 수 있는 보고라고 생각된다. 또한 Sugimoto등³⁰⁾은 말초신경의 절단으로 유해자극에 의한 척수의 c-fos 발현이 절단 초기에는 감소되거나 21일이 지나 만성통증을 호소하는 경우에는 절단신경의 척수 영역 근접부위에서 유해자극에 대한 c-fos 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. Chi등³¹⁾은 백서 좌골신경의 절단에 의해서 c-fos 발현이 장시간 지속되며 초기 lidocaine에 의한 신경차단에 의하여 이러한 c-fos 발현은 신경절단 후 2일까지 감소됨을 보고하였다. 이러한 결과들은 본 실험에서 술 후 3~7일에 증가된 c-fos 발현이 신경장해성 통증과 직접적인 연관성을 가지고 있음을 제시하여 주는 것으로 생각되는데 그 근거로 첫째, 신경장해성 통증의 유발시기와 c-fos 발현시기가 동일하고 둘째, 본 실험에서 화학적 교감신경차단에 의하여 신경장해성 통증이 감소되었을 때 (Fig. 8) c-fos의 발현도 동시에 감소되었고 (Fig. 10) 셋째, 상기 문헌적 고찰에서 말초의 유해한 자극에 의하여 c-fos 발현이 증가되는 예 등을 근거로 들 수 있다. 그러므로 본 실험에서 술 후 30분~1시간에 증가된 c-fos 발현과 술 후 3~7일에 증가된 c-fos 발현은 각각 그 의미가 다른 것으로 생각된다. 즉 술 후 30분~1시간에 증가된 c-fos는 신경손상에 의한 유해감각 전달경로의 자극에 의하여 증가되어 술 후 8시간에 증가된 preprodynorphin 발현의 유도에 관여하여 신경장해성 통증을 유발하는 역할을 담당하는 것으로 생각된다. 술 후 3~7일에 증가된 c-fos 발현은 동일 시간에 preprodynorphin 유전자 발현이 증가하지 않고, 교감신경차단에 의해서 신경장해성 통증이 감소되었을 때 c-fos 발현도 동시에 감소됨을 보아 신경장해

성 통증의 정도를 나타내는 직접적인 지표로 사료된다. 즉, 신경장해성 통증시 통증자극에 대한 역치가 감소되어있어 무통성 자극에 대하여 통증을 느끼거나 (예, 발을 바닥에 대고 걷는 경우, 가벼운 접촉 등) 신경장해성 통증의 특징 중의 하나인 특별한 자극이 없이도 통증을 느끼는 자발통 (ongoing spontaneous pain)에 의하여 c-fos mRNA 발현이 지속적으로 증가되어 있는 것으로 사료된다. 그러므로 술 후 30분~1시간에 증가된 c-fos는 직접적인 조직이나 신경의 손상과 dynorphin의 발현에 의한 신경장해성 통증의 유발에 관계되고 이후 술 후 3~7일에 증가된 c-fos는 신경장해성 통증 자체와 교감신경계와 상호 연관이 있는 것 같으나 이 부분에 관한 연구는 더 진행되어야 한다고 생각된다.

결론적으로 백서 요추신경 절찰후 일시적으로 증가되는 c-fos와 dynorphin 유전자 발현으로 신경장해성 통증이 유발된다고 사료되며 수술 후 3일 이후 지속적으로 증가되는 c-fos 유전자 발현은 신경장해성 통증과 밀접한 관계가 있는 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

1. Bonica JJ: The management of pain. 2nd ed, Pennsylvania: Lea & Febiger. pp 220-43, 1990
2. Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988; 33: 87-107.
3. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A Novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain 1990; 43 :205-18.
4. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 1992; 50: 355-63.
5. Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, Bennett GJ: Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. Peptides 1990; 11: 719-28.
6. Wagner R, DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, Fromm C: Spinal dynorphin immunoreactivity increases bilaterally in a neuropathic pain model. Brain Res 1993; 629: 323-26.
7. Fromm C, DeLeo JA, Coombs DW, Colburn RW, Twitchell BB: The ganglioside GM1 decreases autotomy but not substance P depletion in a peripheral mononeuropathy rat model. Anesth Analg 1993; 77: 501-6.

8. Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM: Quantitative analysis of substance P and calcitonin gene-related peptide immunohistochemical staining in the dorsal horn of neuropathic MK-801-treated rats. *Brain Res* 1993; 607: 205-14.
9. Draisci G, Iadarola M: Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNA in rat spinal cord. *Molecular Brain Research* 1989; 6: 31-7.
10. Aanonsen LM, Kajander KC, Bennet GJ, Seybold VS: Autoradiographic analysis of 125I-substance P binding in rat spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. 1992; 596: 259-68.
11. Naranjo JR, Mellstrom B, Achaval M, Sassone-Corsi P: Molecular pathway of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron* 1991; 6: 607-17.
12. Drummond JC: MAC for halothane, enflurane, and isoflurane in the New Zealand white rabbit and a test for the validity of MAC determinants. *Anesthesiology* 1985; 62: 336-8.
13. Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G: Further evidence for pain-related behaviors in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain* 1990; 41: 235-51.
14. Iadarola MJ, Panula P, Majane EA, Yang HYT: The opioid octapeptide Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu: Characterization and distribution in rat spinal cord. *Brain Res* 1985; 330: 127-34.
15. Karlinsey J, Stamatoyannopoulos, Enver T: Simultaneous purification of DNA and RNA from small number of eukaryotic cells. *Anal. Biochem* 1989; 180: 303-6.
16. Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing condition, a critical re-examination. *Biochemistry* 1977; 16: 4743-51.
17. Virca GD, Northemann W, Shiels BR, Widera G, Broome S: Simplified northern blot hybridization using 5% sodium dodecyl sulfate. *BioTechniques* 1990; 8: 370-1.
18. Civelli O, Douglass J, Goldstein A, Herbert E: Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4291-5.
19. Yoshikawa K, Williams C, Sabol S: Rat brain preproenkephalin mRNA, cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system. *J Biol Chem* 1984; 259: 14301-8.
20. Chai KJ, Lee HK: c-Fos induction by UVC irradiation is mediated by protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Korean J Biochemistry*, 1991; 23: 195-200.
21. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem* 1983; 132: 6-12.
22. Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR: Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. *Brain Res* 1988; 455: 205-12.
23. Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R: Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 1988; 35: 313-26.
24. Ruda MA, Iadarola MJ, Cohen LV, Young III WS: In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Neurobiology* 1988; 85: 622-6.
25. Dubner R, Ruda M: Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *TINS* 1992; 15: 96-103.
26. Keay KA, Bandler R: Deep and superficial noxious stimulation increases Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal grey of the rat. *Neurosci Lett* 1993; 154: 23-6.
27. Noguchi K, Dubner R, Ruda MA: Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos-related proteins. *Neuroscience* 1992; 46: 561-70.
28. Lima D, Avelino A, Coimbra A: Differential activation of in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 1993; 4: 747-50.
29. Strassman AM, Vos BP: Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1993; 331: 495-516.
30. Sugimoto T, Ichikawa H, Mitani S, Nakago T: c-Fos expression by dorsal horn neuron chronically deafferented by peripheral nerve section in response to spared, somatotopically inappropriate nociceptive primary input. *Brain Res* 1993; 621: 161-6.
31. Chi SI, Levine JD, Basbaum AI: Effects of injury discharge on the persistent expression of spinal cord fos-like immunoreactivity produced by sciatic nerve transection in the rat. *Brain Res* 1993; 617: 220-4.