

## 포르말린 및 열성 자극 유발 통증에 대한 척수강 Melatonin의 항침해 효과

전남대학교 의과대학 마취통증의학교실

정성태 · 진원종 · 배홍범 · 김석재 · 최정일 · 강명우 · 정창영 · 윤명하

= Abstract =

### Antinociceptive Effects of Intrathecal Melatonin on Formalin- and Thermal-induced Pain in Rats

Sung Tae Chung, M.D., Won Jong Jin, M.D., Hong Beom Bae, M.D., Seok Jai Kim, M.D.,  
Jeong Il Choi, M.D., Myung Woo Kang, M.D., Chang Young Jeong, M.D., and Myung Ha Yoon, M.D.

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

**Background:** It has been known that melatonin is involved in the modulation of nociceptive transmission. However, the effect of melatonin administered spinally has not been examined. Therefore, we examined the effect of melatonin on the formalin-induced or thermal-induced nociception at the spinal level.

**Methods:** Intrathecal catheter was inserted into the subarachnoid space of male Sprague-Dawley rats. Pain was assessed by formalin test (induced by injection of 50  $\mu$ l of a 5% formalin solution to the hindpaw) or Hot-Box test (induced by radiant heat application to the hindpaw). The effect of intrathecal melatonin was examined on flinching behavior in the formalin test or withdrawal response in Hot-Box test.

**Results:** Intrathecal melatonin produced a limited, but dose-dependent reduction of the flinching response during phase 1 and 2 in the formalin test. In addition, melatonin delivered at evening also decreased the flinching response in both phases of the formalin test. Melatonin restrictively increased the withdrawal latency in Hot-Box test.

**Conclusions:** These results suggest that melatonin is active against the formalin- and thermal-induced nociception at the spinal level, but the effect is limited. (Korean J Pain 2006; 19: 137-141)

**Key Words:** formalin test, melatonin, nociception, spinal cord, Sprague-Dawley rat, thermal test.

## 서 론

염증 혹은 신경 손상에 의한 말초 및 중추 신경계에 대한 침해 자극은 척수에서 신경원의 과흥분성 반응을 일으켜 통각 과민 및 이질통 등 통증 반응을 보인다.<sup>1)</sup> 이러한 통증을 감소시키기 위해 비스테로이드성 항소염제 등이 널리 쓰이고 있지만 만성 염증성 통증이나 신경 손상 후 통증은 고식적인 약제에 잘 반응을 보이지 않는다.<sup>2,3)</sup> 따라서 통증 자극 전달 조절에 대한 신경 전달 물질들에 대한 많은 연구가 활발히 진행 중에 있으며 이를 통하여 통증조절을 위한 약제 개발 등이 이루어지고 있다.<sup>4)</sup>

Melatonin은 뇌의 송과체(pineal gland)에서 분비되는 호르몬이다. 이 화합물은 serotonin으로부터 유래되며 수면 및 항경련 효과 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 특히 동물 실험에서 복강 내나 뇌실 내로 투여한 melatonin은 열성 자극에 대해서 강력한 진통 효과를 나타냈으며 이러한 진통 작용은 melatonin 2 수용체와 연관된 것으로 알려져 있다.<sup>7-10)</sup> 또한, 통증에 대한 역치가 낮보다 밤에 더 작은 24시간 주기성(circadian rhythms)의 특성이 있고 melatonin도 이러한 24시간 주기성이 있다고 한다.<sup>11-13)</sup>

최근 보고에 의하면 melatonin은 전기 자극에 의한 척수 후각의 wind-up 현상을 억제하였고 이는 melatonin 2 수용체와 관련이 있다고 한다.<sup>14,15)</sup> 또한 척수 후각에는 melatonin 1,

접수일 : 2006년 7월 12일, 승인일 : 2006년 9월 21일

책임저자 : 윤명하, (501-757) 광주광역시 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-200537)에 의하여 연구되었음.

Received July 12, 2006, Accepted September 21, 2006

Correspondence to: Myung Ha Yoon, 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: mhyoon@chonnam.ac.kr

This paper was supported by Fund (CUHRI-U-200537) of Chonnam National University Hospital Research Institute of Clinical Medicine.

2 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있는데<sup>16,17)</sup> 이는 melatonin이 척수 수준에서 통증 자극 전달에 관여할 수 있다는 것을 시사한다. 반면 절개형 통증 모형에서 척수강 내로 투여한 melatonin은 통증 과민을 억제하지 못하였다.<sup>17)</sup> 한편, 급성 통증 및 조직 손상성 통증에 대한 척수 수준에서의 melatonin의 효과는 알려진 바가 없다.

포르말린 시험과 열 시험은 급성 통증이나 촉진성(facilitation) 통증 상태를 보여주는 특징적인 통증 유발 시험 모형이다.<sup>18,19)</sup>

이 연구의 목적은 포르말린 주입 및 열성 자극에 의해 유발된 통증에 대한 척수강 melatonin의 효과를 관찰하는 데 있었다.

## 대상 및 방법

모든 실험은 의과학 연구소의 동물 위원회로부터 실험 계획에 대한 승인을 얻은 후 규정에 따라 진행하였다. 실험 대상은 수컷 Sprague-Dawley (250-300 g) 쥐로 하였으며 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 척수강내 카테터는 Yaksh와 Rudy의<sup>20)</sup> 방법으로 거치하였다. 카테터 삽입 후 운동장애나 비정상적인 반응을 보인 쥐는 실험에서 제외하였다. 정상 소견을 보이는 쥐는 각각의 케이지에 넣어 사육시켰다. 약물 투여 후 행동학적 시험은 카테터 거치 5일 후에 하였다.

이 연구를 위해 사용한 약물은 melatonin (Tocris Cookson Ltd., UK)이었다. 약물은 80% dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 10 µl로 만들어 수동식 기어 장치 주사기에 카테터를 연결하여 척수강 내로 투여하고 카테터 내의 사강 용적을 고려하여 melatonin 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.<sup>18)</sup> 포르말린을 주입받은 쥐는 주입받은 발을 바닥에서 들었다는 특이적인 행동(flinching)을 보이는데 이를 통증 반응으로 간주하였다. 따라서 주입받은 발을 자발적으로 떴다꼴다는 횡수를 주기적으로 기록하여 정량화하였다. 이를 위해 포르말린 주입 후 1, 5분에 1분 동안 그리고 주입 10분 후부터 60분까지는 매 5분 간격으로 1분 동안 flinching 횡수를 기록하였다. 통증 행동은 포르말린 주입 직후 증가하였다가 점차 감소하여 반응을 거의 보이지 않다가 약 10분 후부터 다시 증가하는 이상성(biphasic) 형태를<sup>18)</sup> 보이므로 포르말린 주입 후 9분까지를 제1상으로 그리고 주입 후 10-60분까지를 제2상으로 정의하였다.

Hot-Box 시험이란 Hargreaves형 열성 시험 기구를 변형시

킨 것으로 쥐의 뒷발바닥에 방사성 열성 자극을 가한 후 그 발을 회피하는 데 걸리는 시간을 측정하는 것이다.<sup>19)</sup> 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 떼거나 20초(cut-off time)가 되면 자동적으로 멈추게 하였다. 대조치는 약물 투여 전에 두 뒷발에서 측정된 평균치로 하였다.

척수강 카테터 거치 5일 후 실험쥐를 10 × 10 × 30 cm 혹은 7 × 18 × 23 cm 크기의 실린더로 옮긴 후 약 20-30분 정도의 순응기간을 거친 후 오후 1시부터 4시 사이에 실험을 진행하였다. 포르말린 시험에서는 실험쥐를 한 번만 사용하였으나 Hot-Box 시험에서는 최소 4일 간격으로 같은 쥐를 이용하여 실험하였다. 대조군은 DMSO를 투여한 쥐로 하였다. 실험자가 투여 약물의 종류와 용량에 대해서 알지 못하게 진행하였다.

포르말린 주입 10분 전 척수강 내로 melatonin (11.2, 37.5, 112.5 nmol, n = 4-7)을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 60분 동안 관찰하였다. 한편 375 nmol 이상의 척수강 melatonin (n = 3)은 flinching 반응을 오히려 더 증가시켜서 본 실험에서는 112.5 nmol을 최대 사용량으로 하였다. 24시간 주기에 의한 melatonin (112.5 nmol, n = 5) 효과를 알아보기 위하여 오후 7시 이후 저녁에 포르말린 시험을 다른 쥐를 이용하여 추가로 시행하였다.

열성 자극에 대한 효과를 알아보기 위하여 척수강 내로 melatonin (112.5 nmol, n = 5) 투여 후 15, 30, 60, 90 및 120분에 회피 반응 시간을 측정하였다.

다음으로 melatonin (112.5 nmol, n = 5) 투여 후 운동 기능과 일반 행동을 관찰하였다. 운동 기능은 placing-stepping 반사(실험쥐를 책상의 모서리에 두면 발로 꼭 잡고 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 점수화하였다: 0, 정상; 1, 경미한 결손; 2, 중등도 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 횡수로 하였고 용량 반응 자료는 아래 공식을 이용하여 최대 가능 억제 효과(maximal possible inhibitory effect, MPIE) 백분율(%MPIE)로 하였다.

$$\%MPIE = \frac{\text{약물 투여군에서 제1상 (2상) 통증 행동 횡수 총 합계}}{\text{대조군에서 제1상 (2상) 통증 행동 횡수 총 합계}} \times 100$$

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.

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

통계 분석은 Jonckheere test나 unpaired t-test를 이용하였고 P값이 0.05 미만일 때를 통계적 유의 수준으로 하였다.

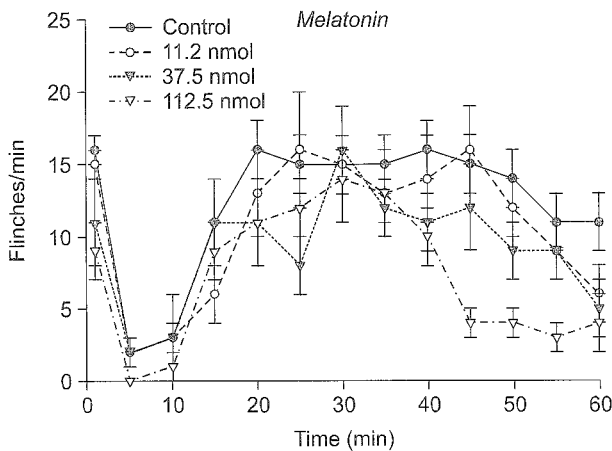


Fig. 1. Time effect curve of intrathecal melatonin for the flinching in the formalin test. Melatonin was administered 10 min before the formalin injection. Formalin was injected subcutaneously at time 0. Data are presented as the number of flinches. Each line represents mean  $\pm$  SEM of 6-7 rats.

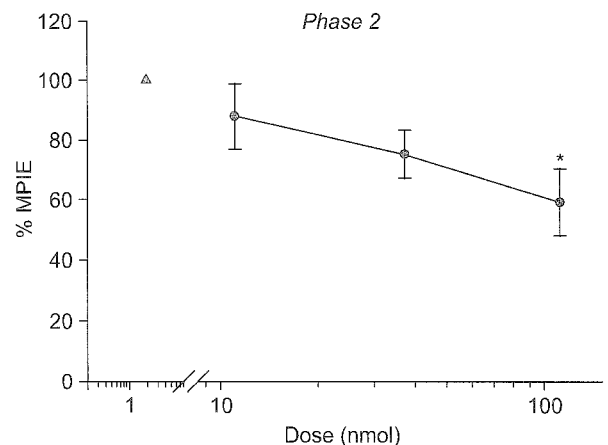
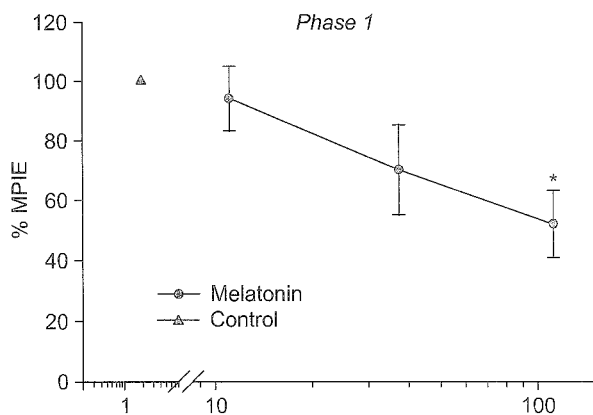


Fig. 2. Dose-response curve of intrathecal melatonin for the flinching during phase 1 and phase 2 in the formalin test. Data are presented as the percentage of maximal possible inhibitory effect (%MPE) in each phase. Intrathecal melatonin suppressed flinches during both phases. Each line represents mean  $\pm$  SEM of 6-7 rats. Asterisk represents dose-dependency ( $P < 0.05$ ).

## 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  $18 \pm 1$ ,  $141 \pm 11$ 회이었다. 척수강 내로 투여한 melatonin은 포르말린 시험 제1상과 제2상 모두에서 flinching 반응을 제한적이지만 용량 의존적으로 억제하였지만 항침해효과는 제한적이었다(Fig. 2). 저녁에 투여한 melatonin도 제한적으로 flinching 반응을 감소시켰다(Fig. 3).

Hot-Box 시험에서 열성 자극에 대한 대조군의 회피 반응 시간은  $6.7 \pm 0.2$  sec이었고 melatonin (112.5 nmol) 투여 후 관찰한 120분 동안 회피 반응을 증가시켰으나 효과는 제한적이었다(Fig. 4).

112.5 nmol의 melatonin은 척수강 투여 후 placing-stepping 반사는 0으로 정상이었으며 각막 반사 및 이개 반사는 모두 정상적으로 존재하였다.

## 고 찰

피하로 주입한 포르말린은 특징적인 이상성 형태의 통증 행동 반응을 보인다. 이는 포르말린 시험의 제1상과 2상 반응의 발생 기전이 근본적으로 서로 다르다는 것을 시사한다. 즉 제1상 반응은 포르말린 주입에 의해 1차 구심성 섬유 침해 수용체 자극에 의해 발생한다. 따라서 제1상 반응은 1차 구심성 섬유의 자체 활성화도가 매우 높아져 있는 상태로서 급성 통증을 반영한다. 반면 제2상 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 척수

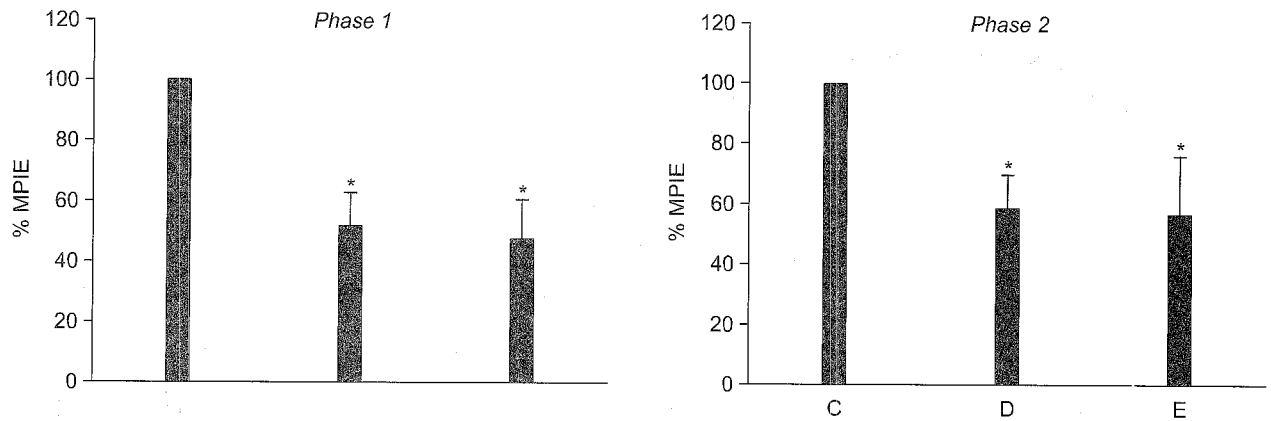


Fig. 3. Dose-response curve of intrathecal melatonin, administered at day or late evening, for the finching during phase 1 and phase 2 in the formalin test. Data are presented as the percentage of maximal possible inhibitory effect (%MPIE) in each phase. Intrathecal melatonin suppressed finches during both phases. Each bar represents mean ± SEM of 4-7 rats. C: control, D: day, E: evening. Compared with the control, \*P < 0.05.

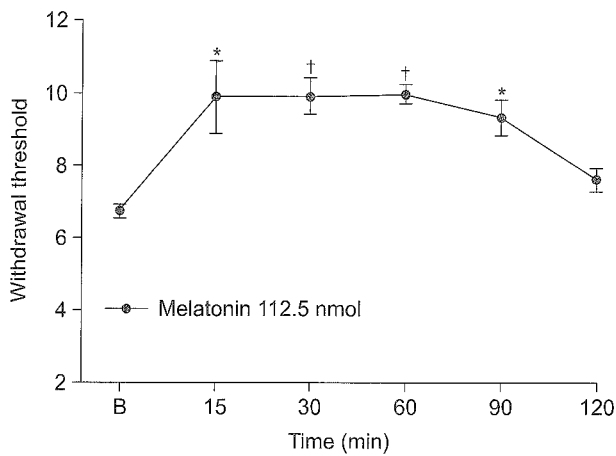


Fig. 4. Time effect curve of intrathecal melatonin in the Hot-Box test. Melatonin was administered immediately before the Hot-Box test. Data are presented as the latency of paw withdrawal. Intrathecal melatonin increased the paw withdrawal latency. Each line represents mean ± SEM of 6 rats. Compared with the baseline (B), \*P < 0.05. †P < 0.01.

에서 분비된 흥분성 아미노산과 펩타이드 등의 유리에 의해 시작되고 이어서 세포 내  $Ca^{2+}$  증가 및 kinase의 활성화<sup>21)</sup> 증가 등을 통하여 이루어진다. 결과적으로 제2상에서는 제1상처럼 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.

Melatonin은 송과체에서 분비되는 생체 주요 호르몬이다. 이 호르몬은 serotonin으로부터 유도되며 1958년에 분리되었다.<sup>22)</sup> Melatonin은 24시간 주기성을 포함한 다양한 생체 기능 조절에 관여한다고 한다.<sup>11-13)</sup> 특히 진정, 수면, 항경련 등의 정신약물학적 효과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 또한 동물실험에서 melatonin은 강력한 항침해효과를<sup>7-10)</sup> 나타

냈는데 이는 melatonin이 진통효과가 있다는 것을 시사한다. 이러한 melatonin의 진통작용에 대한 작용점과 기전은 아직 명백히 밝혀져 있지 않다. 전신적으로 투여한 melatonin은 염증성 물질인 cytokines 유리를 억제하여 통각과민을 약화시킨다고 하여 melatonin의 작용점이 말초임을 시사하였다.<sup>9)</sup> 그러나 melatonin은 높은 지질용해도로 인해 혈액장벽(blood-brain barrier)을 쉽게 통과하므로 중추 신경계를 통하여도 항침해 효과를 나타낼 수 있다고 한다.<sup>7)</sup> Melatonin 수용체는 중추신경에<sup>23,24)</sup> 널리 분포하고 있으며 특히 척수후각에<sup>16)</sup> 많이 존재한다고 한다. 또한 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse-transcription polymerase chain reaction)을 이용한 연구에서 melatonin 1 및 2형 수용체 아형의 mRNA 발현이 척수에서 증명되었으며<sup>17)</sup> 자가방사기록법(autoradiography) 실험을 통하여 척수에서 melatonin의 결합부위가 입증되었다.<sup>16,25-27)</sup> 따라서 본 연구자들은 melatonin이 척수 수준에서 melatonin 수용체를 중재하여 항침해효과를 나타낼 것으로 가정하였고 이 실험 결과 척수강 내로 투여한 melatonin은 포르말린 시험의 제1상과 제2상 모두에서 통증 행동 반응을 용량 의존적으로 억제하였다. 그러나 이 실험에서 사용한 melatonin 최대용량(112.5 nmol)에서 포르말린 시험 제1상과 2상에서의 %MPIE는 각각 52%와 59%이었다. 특히 24시간 주기성과 관련성을 고려하여 저녁에 투여한 melatonin (112.5 nmol)의 %MPIE도 제1상과 2상에서 각각 48%와 57%로 낮에 투여한 melatonin 효과와 차이가 없었다. 아울러 열성 자극에 대해서도 시간 경과에 따라 회복 반응을 증가시켰으나 %MPE는 32%이었다. 따라서 이상의 소견을 종합하면 melatonin이 척수 수준에서 급성 통증 및 촉진성 통증을 억제할 수 있으나 그 효과가 제한적이라는 것을 의미한다. 즉 melatonin은 척수 수준에서 침해자극 조절에 직접적으로 관여는 하나 그 역할이 크지는 않다는 것을 시사한다. 또한 melatonin의 항침해효과와 24시간 주기성은 관련이 없는 것으로 생각된다. 한편, 다른 보고에 의하면 복강 내 melatonin은 고용량에서만 진통효과

를 나타내나 운동장애도 일으키므로 순수한 진통효과와는 구별하기 어렵다고 하였다.<sup>6,28)</sup> 또한 척수강 melatonin은 절개형 통증을 감소시키지 못하거나<sup>17)</sup> 복강 내 melatonin도 포르말린에 의한 통증 반응에 영향이 없었다고 하여<sup>29)</sup> 이 실험 결과와 차이를 보였다. 이러한 효과 차이에 대한 이유는 정확히 알 수는 없으나 사용한 실험 약물 종류, 투여경로, 통증 모형 및 실험동물 종류 등에 의한 것으로 사료된다. 반면, 항침해효과가 없는 복강 내 혹은 척수강 melatonin은 포르말린 시험과 절개형 통증 모형에서 각각 diazepam과 morphine의 항침해효과를 강화시켰다.<sup>17,28)</sup> 이는 melatonin이 척수 및 전신적 수준에서 다른 진통제의 침해자극 조절에 간접적으로 조정 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다.

한편 이 연구에서 사용한 용량보다 더 많은 melatonin (375 nmol)은 포르말린 유발 통증 반응을 증가시켰다. 다른 보고에<sup>17)</sup> 의하면 300 nmol 이상의 척수강 melatonin은 통증 반응을 촉진시켰다. 또한 뇌실 내로 투여한 20 µg melatonin도 포르말린 통증 반응을 증가시켰다.<sup>30)</sup> 이상의 소견은 melatonin이 오히려 통증을 유발할 수도 있다는 것을 시사한다. 따라서 이 실험에서도 375 nmol보다 더 높은 용량에서의 실험은 진행하지 못했다.

결론적으로 melatonin은 척수 수준에서 포르말린 주입에 의해 유발된 급성 통증과 촉진성 통증 및 열성 자극에 대한 통증 반응을 억제하였지만 그 효과는 제한적이었다.

## 참 고 문 헌

1. Woolf CJ, Salter MW: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-9.
2. Moore RA, Tramer MR, Carrol D, Wiffen PJ, McQuay HJ: Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ* 1998; 316: 333-8.
3. Arner S, Meyerson BA: Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 1988; 33: 11-23.
4. Furst S: Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999; 48: 129-41.
5. Geoffriau M, Brun J, Chazot G, Claustrat B: The physiology and pharmacology of melatonin in humans. *Horm Res* 1998; 49: 136-41.
6. Sugden D: Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 227: 587-91.
7. Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC: The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 403: 49-53.
8. Yu CX, Zhu CB, Xu SF, Cao XD, Wu GC: Selective MT (2) melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. *Neurosci Lett* 2000; 282: 161-4.
9. Raghavendra V, Agrewala JN, Kulkarni SK: Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 395: 15-21.
10. Li SR, Wang T, Wang R, Dai X, Chen Q, Li RD: Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. *Brain Res* 2005; 1043: 132-8.
11. Kavaliers M, Hirst M: Daily rhythms of analgesia in mice. *Brain Res* 1983; 279: 387-93.
12. Konecka AM, Sroczyńska I: Circadian rhythm of pain in male mice. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 809-10.
13. Vanecek J: Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78: 687-721.
14. Laurido C, Pelissie T, Soto-Moyano R, Valladares L, Flores F, Hernandez A: Effect of melatonin on rat spinal cord nociceptive transmission. *Neuroreport* 2002; 13: 89-91.
15. Nosedá R, Hernández A, Valladares L, Mondaca M, Laurido C, Soto-Moyano R: Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent. *Neurosci Lett* 2004; 360: 41-4.
16. Pang SF, Wan Q, Brown GM: Melatonin receptors in the spinal cord. *Biol Signals* 1997; 6: 272-83.
17. Zahn PK, Lansmann T, Berger E, Speckmann EJ, Musshoff U: Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. *J Pineal Res* 2003; 35: 24-31.
18. 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.
19. Dirig DM, Salami A, Rathbun ML, Ozaki GT, Yaksh TL: Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods* 1997; 76: 183-91.
20. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.
21. 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.
22. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
23. Morgan PJ, Barrett P, Howell E, Helliwell R: Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; 24: 101-46.
24. Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F: Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 214-21.
25. Wan Q, Pang SF: [125I]iodomelatonin binding sites in the chicken spinal cord: binding characteristics and diurnal variation. *Neurosci Lett* 1993; 163: 101-4.
26. Wan Q, Pang SF: Segmental, coronal and subcellular distribution of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the chicken spinal cord. *Neurosci Lett* 1994; 180: 253-6.
27. Wan Q, Liao M, Brown GM, Pang SF: Localization and characterization of melatonin receptors in the rabbit spinal cord. *Neurosci Lett* 1996; 204: 77-80.
28. Shaji AV, Kulkarni SK: Central nervous system depressant activities of melatonin in rats and mice. *Ind J Exp Biol* 1998; 36: 257-63.
29. Pang CS, Tsang SF, Yang JC: Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. *Life Sci* 2001; 68: 943-51.
30. Takahashi H, Shibata M, Ohkubo T, Saito K, Inoki R: Effect of neurotrophin on hyperalgesia induced by prostaglandin E2, naloxone, melatonin and dark condition in mice. *Jpn J Pharmacol* 1987; 43: 441-4.