

## 백서의 척수신경결찰모델에서 Morphine의 투여가 항이질통 효과와 척수 $\alpha_2$ 아드레날린계 수용체 아형 mRNA 발현에 미치는 영향

부산대학교 의학전문대학원 마취통증의학교실

정규연 · 신상욱 · 권수아 · 김태균 · 백승훈 · 백승완

### The Antiallodynic Effect and the Change of the $\alpha_2$ Adrenergic Receptor Subtype mRNA Expression by Morphine Administration in a Spinal Nerve Ligation Rat Model

Kyu Yeon Chung, M.D., Sang Wook Shin, M.D., Su Ah Kwon, M.D., Tae Kyun Kim, M.D., Seung Hoon Baek, M.D., and Seong Wan Baik, M.D.

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

**Background:** The neuropathic pain arising from nerve injury is difficult to treat and the therapeutic effects of opioid drugs remain debatable. Agonists acting at the  $\alpha_2$  adrenergic and opioid receptors have analgesic properties and they act synergistically when co-administered in the spinal cord. The lack of subtype-selective pharmacological agents has previously impeded the synergistic effects that are mediated by the adrenergic receptor subtypes.

**Methods:** We created neuropathic pain model by ligating the L<sub>5</sub> spinal nerve in Sprague-Dawley rats (n = 18). We divided the rats into three groups (n = 6 for each group), and we administered intraperitoneal morphine (1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg) and then we measured the mechanical allodynia with using von-Frey filaments for 8 hours. We then injected morphine (5 mg/kg) intraperitoneally, twice a day for 2 weeks. We measured the tactile and cold allodynia in the morphine group (n = 9) and the saline group (n = 9). After 2 weeks, we decapitated the rats and harvested the spinal cords at the level of lumbar enlargement. We compared the  $\alpha_2$  subtype mRNA expression with that of control group (n = 6) by performing real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Results:** Intraperitoneal morphine reduced the neuropathic pain behavior in the dose-dependent manner. Chronic morphine administration showed an antiallodynic effect on the neuropathic pain rat model. The rats did not display tolerance or hyperalgesia. The expression of the mRNAs of the  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  subtypes decreased, and morphine attenuated this effect. But we could not get statistically proven results.

**Conclusions:** Systemic administration of morphine can attenuate allodynia during both the short-term and long-term time course. Morphine has an influence on the expression of  $\alpha_2$  receptor subtype mRNA. Yet we need more research to determine the precise effect of morphine on the  $\alpha_2$  subtype gene expression. (Korean J Pain 2009; 22: 21-27)

**Key Words:** allodynia,  $\alpha_2$  adrenergic receptor, mRNA, neuropathic pain, spinal nerve ligation.

접수일 : 2009년 2월 3일, 승인일 : 2009년 3월 25일  
 책임저자 : 신상욱, (626-770) 경남 양산시 물금읍 범어리  
 부산대학교 의학전문대학원  
 양산부산대학교병원 마취통증의학과  
 Tel: 055-360-2129, Fax: 055-360-2149  
 E-mail: shinsw@pusan.ac.kr

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

Received February 3, 2009, Accepted March 25, 2009  
 Correspondence to: Sang Wook Shin  
 Department of Anesthesia and Pain Medicine, Yangsan Pusan  
 National University Hospital, Pusan National University School of  
 Medicine, Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan 626-770, Korea  
 Tel: +82-55-360-2129, Fax: +82-55-360-2149  
 E-mail: shinsw@pusan.ac.kr  
 This work was supported for two years by Pusan National  
 University Research Grant.

## 서 론

신경 손상에 의하여 발생하는 신경병증통증은 치료하기 어려운 것으로 알려져 있으며, 강한 진통제로 여러 질환에 사용되는 morphine 등 아편양 제제의 효과도 논란의 대상이 되어 왔다.<sup>1)</sup> 교감 신경계에서 일반적으로  $\alpha_1$  아드레날린 수용체는 통증 항진에,  $\alpha_2$  아드레날린 수용체는 통증 억제에 작용한다고 보고된 바 있다.<sup>2)</sup>  $\alpha_2$  수용체는 진통 작용과 깊은 연관성이 있으며, 통증 억제에 관여하는  $\alpha_2$  아드레날린 수용체의 아형(subtype)은  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ 가 있다.<sup>3)</sup>  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 효현제와 아편양 제제는 척수강 내 투여 시 상승 효과가 나타났으며  $\alpha_{2A}$  아드레날린 수용체는 morphine에 의한 통증 억제 기전에 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup> 그 후  $\alpha_{2A}$ 에 작용하지 않는  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 효현제인 ST91 (2-[2,6-diethylphenylamino]-2-imidazoline hydrochloride)도 진통 효과와 아편양 제제와의 상승 효과가 있다는 연구가 있었다.<sup>5)</sup> 아편양 제제가  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 아형의 mRNA 발현에 미치는 영향을 명확히 밝혀 치료에 이용함으로써 약물의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 극대화하여 임상적으로 큰 유용성을 가질 수 있다. 저자들은 신경병증통증 모델에서 morphine을 피하 내 주사하여 통증 행동 양상의 변화를 통한 morphine의 항이질통 효과를 검증하고 장기적인 morphine 투여 후 통증 행동의 변화와 척수의  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 아형의 mRNA 발현 변화를 측정하였다.

## 대상 및 방법

몸무게 180–220 g인 24마리의 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 대상으로 하였으며 한 통에 두 마리씩 수용하였다. 실험 대상 쥐들은 모두 하루 12시간의 낮과 밤이 구분되는 사육장에서 자유로이 물과 사료를 섭취할 수 있게 하였다. 실험을 시작하기 전에 3일 이상의 적응기간을 두어 실험 방법에 익숙해지도록 하였으며 실험연구윤리위원회 심의를 거치고 동물실험 지침을 준수하여 시행하였다.

쥐들을 신경병증통증군(n = 18)과 대조군(n = 6)으로 나누어 신경병증통증군은 척수신경결찰모델<sup>6)</sup> 변형을 이용하여 척수신경을 결찰하였으며, 대조군은 수술 등의 아무 조작을 가하지 않았다. 척수신경결찰을 위하여 쥐를 플라스틱 통에 넣고 산소 4 L/min와 sevoflurane 5%

를 주입하여 마취 유도 후 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 실혈과 수분소실을 보충할 목적으로 생리식염수 5 ml를 피하로 주사하였다.

술 후 3일째 촉각이질통과 냉각이질통의 발현을 확인하였다. 촉각 이질통은 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 결찰한 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 하였다. 냉각 이질통의 측정은 acetone을 이용하였는데, 가느다란 polyethylene 관에 acetone을 묻힌 다음 수술한 발바닥 부위에 한 방울 떨어뜨린 후 발을 오므리거나 털거나 움츠리는 반응이 나타나면 이질통이 나타난 것으로 판정하였고, 3분 간격으로 5회 실시하여 반응이 일어나는 횟수를 측정하였다.<sup>7)</sup>

술 후 5일째 신경병증군 18마리를 세 군(n = 6)으로 나누어 각 군별로 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg<sup>1)</sup>을 복강 내 투여 후 시간(약물 투여 전, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간)에 따른 촉각이질통 역치의 변화를 측정하였다. 이 실험이 끝난 2일 후부터 신경병증군 쥐들을 morphine군(n = 9)과 saline군(n = 9)으로 나누어 2주에 걸쳐 하루에 2회씩 12시간 간격으로 morphine 5 mg/kg과 동량의 saline을 투여하고 각각 일정한 시간에 촉각이질통의 역치와 냉각이질통의 역치를 측정하였다.

2주 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 폭으로 가로로 절단한 다음 액화질소에 급속 냉동하여 보관하였다. 보관한 척수들은 모아서 척수의  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 아형 A, B, C의 mRNA의 양을 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 측정하였으며 그 방법은 아래와 같다.<sup>8)</sup>

Total RNA를 얻기 위해 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 ml를 채취한 쥐의 척수 조직에 넣고 균질화기(homogenizer)를 이용해 잘게 부순 다음 실온에 5분간 방치하였다. Chloroform 100  $\mu$ l를 첨가하여 약 10-20초간 혼합하고 얼음에서 15분간 반응시킨 다음 4°C, 12,000 rpm에서 약 20분간 원심 분리하였다. 상층액 400  $\mu$ l를 취하여 새 튜브에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 흔들어 섞은 다음 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 RNA 침전물(pellet)을 얻었다. Diethyl-ethylenepycarbonate (DEPC)로 처리한 물로 만든 75% 에탄올 1 ml를 넣어 두 차례 혼합하고 4°C, 12,000 rpm에서 약 115분간 원심분리하는 과정으로 RNA 침전물을 2회 연속 세척한 다음 실온에서 건조시켰다. 건조된 침전물을 Nuclease-Free Water (Promega, Madison, USA) 50  $\mu$ l에 잘 녹인 후, 260 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 용기 속에 들어있는 RNA양을 계산하였다. cDNA 합성에는 M-MLV 역전사 효소, RNase 억제제, M-MLV 10X reaction buffer, water, dNTP 혼합액(Promega, Madison, USA) 등을 적정비율로 혼합하여 master mixture를 제조하여 사용 전까지 얼음에 방치하였다. Total RNA와 oligo-p(dt)18 primer를 혼합하여 65°C에서 15분간 반응시키고 얼음에 잠시 방치한 다음 총 부피가 50  $\mu$ l가 되도록 master mixture를 첨가한 다음 실온에서 10분간, 42°C에서 1시간 동안 반응시키고 99°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화시켰다. 마지막으로 4°C에 방치한 다음 사용 전까지 초저온 냉동고에 보관하였다.

Real-time PCR 반응에는 조직인자 유전자의 증폭을 위해  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ 의 염기서열을 가지는 시발체(primer)를 (주)바이오닉스(서울, 한국)에 주문 의뢰하였고 참조 유전자와 표준 그래프를 얻기 위한 반응에  $\beta$ -actin을 이용하였다. 여러 조건의 조직 샘플들 중에서 total RNA가 가장 잘 분리된 샘플 하나를 선택하여 2  $\mu$ g으로 cDNA를 합성한 다음 이것을 10배의 비율로 연속 희석하여 다양한 농도의 cDNA 주형을 준비하였다.  $\beta$ -actin을 시발체로 사용하여 real time PCR 반응을 실시하고

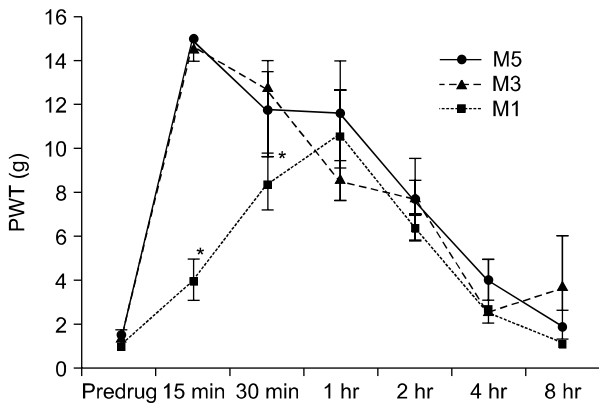
그래프 모니터링 분석으로 표준 그래프를 얻었다. 다양한 농도의 cDNA 주형들 중에서 실험하고자 하는  $\beta$ -actin이나 조직인자 반응 산물이 포함되는 범위를 정하여 1부터 103까지 표기하고 두세 차례 반복 실험으로 재현성을 확인하였다. PCR반응을 위하여 LightCycler-FastStart DNA master SYBER green I (Roche, Mannheim, Germany) kit를 이용하였다. Reaction mix SYBER green I과 효소를 혼합하고 여기에 H<sub>2</sub>O 11.6  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.4  $\mu$ l, primer를 sense, antisense 방향 각각 1  $\mu$ l를 첨가하여 master mixture를 제조하였다. 제조한 master mixture 18  $\mu$ l를 capillary에 주입하고 10배씩 연속 희석된 표준, 각기 다른 샘플의 cDNA 2  $\mu$ l씩 추가 주입하여 가볍게 혼합한 다음 수 초 동안 원심 분리 후 침강시켰다. Capillary를 LightCycler기기(LightCycler Operator, version 3.5, Roche, Mannheim, Germany)에 장착시킨 다음 프로그램을 열어 여러 변수들을 기입하였다. 증폭 사이클 반응은 변성(denaturation) 95°C, 10초, 결합(annealing) 54°C, 5초, 연장(elongation) 72°C, 10초로 50회 실시하였고 용해곡선(melting curve) 분석이 가능하도록 실험과정을 추가하였다.

결과 분석에서 real time PCR 반응은 시작과 동시에 기기와 연결된 컴퓨터 모니터를 통해 진행 중인 반응과정을 볼 수 있으므로 SYBER green I dye를 이용할 때는 때 사이클의 확대(extention) 직후에 형광 물질을 측정함으로써 사이클의 증가에 따른 반응 산물의 양을 모니터링 할 수 있었다. 이때 증폭 사이클이 진행함에 따라 형광 물질의 양이 갑자기 증가하기 시작하는 시점이 있는데 이 시점을 교차점(crossing point)이라 하고 반응이 완료되면 LightCycler 기기는 각 반응물로부터 교차점 값을 읽어 들여 표준 곡선의 양과 비교함으로써 각 반응물의 주형 cDNA의 양을 계산하였다. PCR 반응에 사용된 주형 cDNA의 값이 얻어지면 한 시료의 조직인자 값을 참조 유전자(reference gene)로 이용한  $\beta$ -actin값으로 나누어 최종적인 cDNA 값을 얻게 되고 이것을 조직인자의 mRNA 양과 동일하다고 간주하였다. 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.

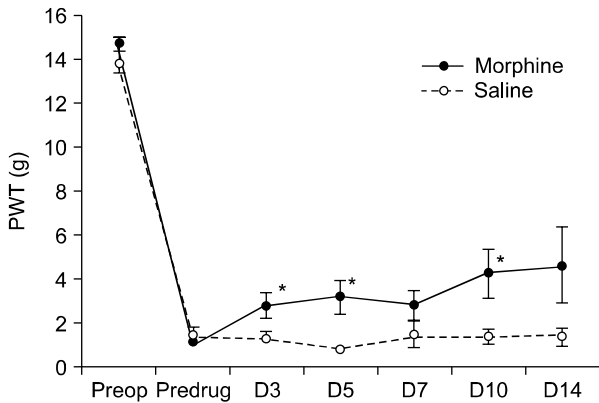
## 결 과

수술을 한지 3일 후 축각이질통과 냉각이질통의 발현

이 확인되었다. 술 후 5일째 각각 용량을 달리하여 시간에 따른 촉각 이질통의 역치를 측정 한 결과, 약물 투여 후 15분에 morphine 1 mg/kg군에서 다른 두 군에 비해 통계적으로 유의한 이질통 역치의 감소를 보였고( $P <$



**Fig. 1.** The change of tactile allodynia for 8 hrs after intraperitoneal morphine injection on the 5<sup>th</sup> day after L<sub>5</sub> spinal nerve ligation. This graph shows different tactile allodynic threshold to the intraperitoneal injection by different dose of morphine. Each point represents the mean  $\pm$  SD. PWT: paw withdrawal threshold (g), M1: rats injected morphine 1 mg/kg (n = 6), M3: rats injected morphine 3 mg/kg (n = 6), M5: rats injected morphine 5 mg/kg (n = 6). \* $P <$  0,05 compared with M3 and M5.



**Fig. 2.** The change of tactile allodynic threshold by the 2-week morphine administration. This graph shows that repetitive intraperitoneal morphine administration increases tactile allodynic threshold significantly at day 3, 5, and 10. Each point represents the mean  $\pm$  SD. PWT: paw withdrawal threshold (g), morphine: rats injected morphine 5 mg/kg twice a day for 2 weeks (n = 9), saline: group injected saline of the same volume of morphine twice a day for 2 weeks (n = 9), preop: preoperative state, predrug: postoperative state before drug injection, D3: 3<sup>rd</sup> day after drug injection, D7: 7<sup>th</sup> day after drug injection, D10: 10<sup>th</sup> day after drug injection, D14: 14<sup>th</sup> day after drug injection. \* $P <$  0,05 compared with saline group.

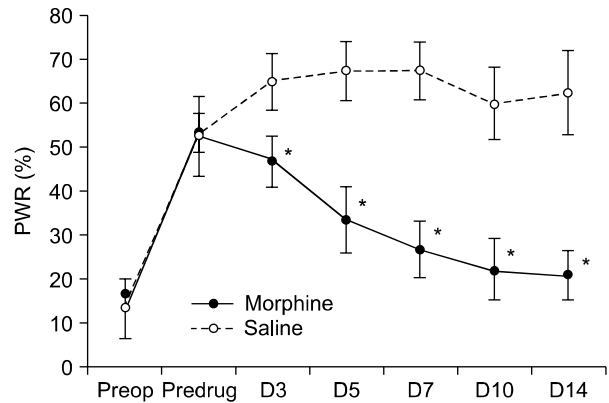
0.0001), 30분에 morphine 1 mg/kg과 3 mg/kg 사이에 역치의 차이( $P <$  0.05)가 나타났다. 또한 최대 효과도 morphine 3 mg/kg, 5 mg/kg에서는 15분에, morphine 1 mg/kg에서는 1시간에 보였다(Fig. 1).

2주간 morphine 5 mg/kg를 하루에 두 번 씩 12시간 간격으로 투여하고 일정한 시간에 촉각 이질통과 냉각 이질통의 역치를 측정 한 결과 morphine 투여군에서 saline 군에 비해 약물 투여 후 촉각 이질통의 역치가 증가하고( $P <$  0.05) (Fig. 2), 냉각 이질통이 감소하였다( $P <$  0.05) (Fig. 3).

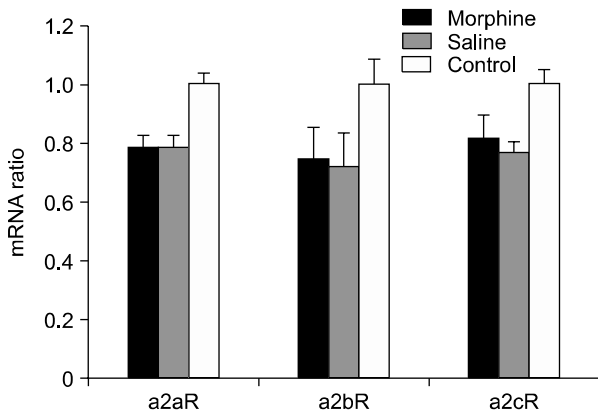
척수에서 추출한  $\alpha_2$  수용체 아형의 발현을 대조군과 비교한 결과, 세 가지 수용체 아형 모두에서 mRNA의 발현이 감소하였으나, morphine군과 saline군의 차이는 없었다(Fig. 4).

**고 찰**

백서의 척수 신경 결찰 모델에서 morphine의 용량에 비례하여 항이질통 효과가 증가됨을 알 수 있었다. 그리고, 장기간 투여 시 내성은 발생하지 않고 신경병증통증에 효과가 있는 것으로 나타났다.  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 아형의 mRNA 발현을 비교한 결과 신경병증통증에서



**Fig. 3.** The change of cold allodynic threshold during the 2-week morphine administration. This graph shows the marked anti-allodynic effect of morphine to cold stimuli by dropping acetone to the affected hindlimbs. Each point represents the mean  $\pm$  SD. PWR (%): ratio of paw withdrawal response (%), morphine: group injected morphine 5 mg/kg twice a day for 2 weeks, saline: group injected saline as the same volume of morphine, preop: preoperative state, predrug: postoperative state before drug injection, D3: 3<sup>rd</sup> day after drug injection, D7: 7<sup>th</sup> day after drug injection, D10: 10<sup>th</sup> day after drug injection, D14: 14<sup>th</sup> day after drug injection. \* $P <$  0,05 compared with saline group.



**Fig. 4.** Expression ratio of mRNA of  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  subtypes compared with control group after 2-week morphine administration. This graph represents mRNA contents of spinal nerve ligated rats compared with control group. Black columns are the morphine group (n = 9). Gray columns are the saline group (n = 9). White columns are control group (n = 6). Harvesting mRNA is performed by the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Each column and line shows the mean  $\pm$  SD. mRNA ratio: ratio of mRNA expression compared with control group. a2aR:  $\alpha_{2A}$  subtype ratio, a2bR:  $\alpha_{2B}$  subtype ratio, a2cR:  $\alpha_{2C}$  subtype ratio, morphine: group injected morphine 5 mg/kg twice a day for 2 weeks, saline: group injected saline as the same volume of morphine.

세 가지 아형에서 모두 감소하였고, morphine 투여에 의해 이 효과는 상쇄되었다. 그러나 각각 수용체 아형 간에 차이는 보이지 않았다.

신경 손상에 의해 발생하는 신경병증통증은 자발통, 통각 과민, 이질통을 특징으로 하며 일반적인 진통제나 아편양 제제에 잘 반응하지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 한편 spared nerve injury와 spinal nerve ligation model에서 척수강 내로 또는 피하로 morphine을 투여하였을 때 치료 효과가 있고 이 효과가 naloxone으로 반전된다는 것을 확인했다는 보고도 있었다.<sup>10)</sup> 이러한 상반된 보고들이 나타나는 것은 신경 손상의 종류에 따라 아편양 수용체의 증가나 감소가 다르게 나타남을 의미한다.<sup>11,12)</sup> 약물의 투여 경로에 따라서 척수강 내로 투여 시 전신적으로 투여하였을 때보다 진통 효과가 좋다는 보고도 있었고,<sup>13)</sup> 그 반대의 주장도 있었다.<sup>14)</sup> 또한 투여되는 아편양 제제의 효능의 차이에 의해 결과가 달라질 수 있다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 척수 신경 결찰 모델을 만들어 서로 다른 용량의 morphine을 투여하여 시간에 따른 통증 행동 양상과 최대 효과를 비교해 보았다. Morphine의 용량이 높아질수록 촉각이질통의 차단 효과가 빨리 강하게 나타남을 알 수 있었다. 다만, 개체수의 부족과 용량 측정

시간 간격의 제한으로 약리학적 특성을 더 자세히 알 수 있는 결과는 얻지 못하였다.

2주간 만성적인 morphine의 투여로 촉각이질통과 냉각이질통의 역치가 증가되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때 morphine을 신경병증성 통증에 장기간 투여 시에 효과가 있을 수 있다는 것을 시사한다. 또한 장기간 투여시에 생길 수 있는 내성도 관찰되지 않았다.<sup>16)</sup>

병적 통증 자극은 신경계의 가소성으로 정상적인 신경세포나 신경세포 간의 신호 전달과는 다른 생리적 조직학적 변화를 신경세포에 일으키며, 이러한 변화는 짧게는 신경 손상이 있을 수 시간 후부터 나타나서 지속된다.<sup>17)</sup> 통증 전달 과정에서 하행성 노르아드레날린 경로가 통증 억제기전에 중요한 역할을 한다.<sup>4)</sup> 침해성 자극이 가해지면 그 자극은 말초로부터 상행성의 전달 경로를 거쳐 뇌에서 통증으로 인식하게 되는데, 통증 전달 과정 중에 척수나 시상의 신경 연결부에서 여러 변조 과정을 지낸다. 이 과정을 거쳐 통증이 변조되고 조절되는데 중뇌나 뇌간에서 기시하여 척수후각의 포층과 심층에 분포하는 하행성 노르아드레날린 경로가 이러한 통증의 전달과 변조 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup>

아편양제제와  $\alpha_2$  아드레날린 효현제는 척수강 내에 투여 시 진통효과가 있으며, 서로 상승 효과가 있음이 보고되었다.<sup>4,5,19)</sup> 뇌간에는  $\alpha_2$  아드레날린 신경세포 핵이 풍부하게 분포하며, 하행성 노르아드레날린 경로를 통한 feedback을 통해 척수에서 norepinephrine 분비를 촉진함으로써 통증을 억제한다.<sup>20)</sup> 아편양 제제와  $\alpha_2$  아드레날린 효현제를 동시에 투여함으로써 단독 약제 투여의 양을 줄여 부작용을 감소시키므로써 진정, 저혈압, 호흡억제, 가려움증 등 부작용을 줄일 수 있다.<sup>17,21)</sup>

백서의 척수 신경 결찰 모델에서 northern blot analysis를 시행한 결과 척수의 등뿌리신경절에  $\alpha_{2A}$  아형과  $\alpha_{2C}$  아형 수용체의 발현이 감소됨이 보고되었다. 반면 쥐의 좌골 신경을 절단한 경우는 척수에서  $\alpha_2$  아드레날린 수용체가 증가된다는 연구 결과도 있었다.<sup>22)</sup> 쥐의 등뿌리신경절에서 발견되는  $\alpha_2$  아드레날린 수용체는 주로  $\alpha_{2A}$ 와  $\alpha_{2C}$  아형이며 척수에서도  $\alpha_{2A}$  아형은 척수 II, III층에,  $\alpha_{2C}$  아형은 큰 운동신경에 존재하는데 척수신경을 결찰하면 등뿌리신경절의 수용체중  $\alpha_{2A}$  아형은 증가하는 반면  $\alpha_{2C}$  아형은 감소하지만, 척수에서의 변화는 볼 수 없다는 보고와<sup>23,24)</sup> 신경 절단 이후에 척수에서는  $\alpha_{2C}$  아형이 약간 증가한다는 보고가 있다.<sup>24)</sup>

인간의 등뿌리 신경절에는  $\alpha_{2A}$ 와  $\alpha_{2B}$  수용체가 거의

비슷한 수로 분포하고,  $\alpha_{2C}$ 는 거의 없는 것으로 알려져 있고 mRNA의 발현은  $\alpha_{2B}$ 와  $\alpha_{2C}$ 가 많은 것으로 보고되었다.<sup>25)</sup> 백서의 경우  $\alpha_{2C}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ 의 순서로 등뿌리 신경절에서 mRNA의 발현이 많이 나타나고, 신경병증통증 모델에서는  $\alpha_{2A}$ 는 증가하고  $\alpha_{2C}$ 는 감소함이 보고되었다.<sup>21)</sup>

이와 같이 다양한 연구 결과를 정확히 분석하기 위해 본 연구에서는 real time polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 척수 신경 결찰 모델에서  $\alpha_2$  수용체 아형의 변화와 morphine의 작용을 조사하였다. 실험 결과 saline 투여군에서 세 가지  $\alpha_2$  수용체 아형 모두에서 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 작게 나타나는 것을 볼 수 있었고, morphine 투여군에서는 이와 같은 수용체 발현의 감소가 적은 것이 관찰되었다. 하지만 통계적으로 유의한 결과는 얻지 못했다(Fig. 4).  $\alpha_2$  아드레날린 뉴런의 지속적인 흥분으로 노르아드레날린 수용체의 down-regulation을 일으키거나 척수신경 세포의 감소나 사멸을 유발하여<sup>22)</sup> GABA나 glycine과 같은 억제성 신경전달물질의 양이 감소되어<sup>26)</sup> 이질통 발현을 항진시키며, morphine이 이런 효과를 상쇄한다고 설명할 수 있다.<sup>19)</sup> 하지만 통계적 유의성을 가지는 결과를 얻지는 못하였다. 그 이유는 등뿌리 신경절 부위만이 아닌 요천추 팽대부에서 mRNA를 추출한 데 있다고 생각한다.

결론적으로 본 연구를 통해 척수 신경 결찰 모델에서 morphine의 용량에 따른 이질통 역치의 시간 변화에 따라 측정하여 용량이 많을수록 작용 발현 시간이 단축되고 최대 효과도 증가됨을 알 수 있었다. Morphine의 장기적인 복용 내 투여가 측각 이질통과 냉각 이질통을 개선하는 효과를 확인할 수 있었고, 만성적인 투여로 인한 내성은 생기지 않는 것으로 나타났다. 이는 신경병증통증의 치료에 morphine의 전신적인 투여가 사용될 수 있음을 시사한다. RT-PCR을 이용한  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 mRNA의 발현을 비교한 결과 척수신경손상모델에서 세 가지  $\alpha_2$  아드레날린 수용체 아형이 감소됨과 이것을 morphine 투여로 상쇄됨을 관찰하였으나 통계적으로 의미있는 결과는 얻지 못하였다. 앞으로 좀 더 세분화된 용량으로 morphine을 투여한 후 통증 역치를 자주 측정하여 약리학적 특성을 밝힘이 필요할 것으로 생각하고, 신경병증통증에 아편양 제제와  $\alpha_2$  아드레날린 수용체의 관련성에 대한 분자생물학적 단위의 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Suzuki R, Chapman V, Dickenson AH: The effectiveness of spinal and systemic morphine on rat dorsal horn neuronal responses in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Pain* 1999; 80: 215-28.
2. Kim SK, Min BI, Kim JH, Hwang BG, Yoo GY, Park DS, et al: Effects of alpha1- and alpha2-adrenoreceptor antagonists on cold allodynia in a rat tail model of neuropathic pain. *Brain Res* 2005; 1039: 207-10.
3. Aantaa R, Marjamäki A, Scheinin M: Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Ann Med* 1995; 27: 439-49.
4. Stone LS, MacMillan LB, Kitto KF, Limbird LE, Wilcox GL: The alpha2a adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by alpha2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *J Neurosci* 1997; 17: 7157-65.
5. Stone LS, Kitto KF, Eisenach JC, Fairbanks CA, Wilcox GL: ST91 [2-(2,6-diethylphenylamino)-2-imidazoline hydrochloride]-mediated spinal antinociception and synergy with opioids persists in the absence of functional alpha-2A- or alpha-2C-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 899-906.
6. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-63.
7. Han DW, Kweon TD, Lee JS, Lee YW: Antiallodynic effect of pregabalin in rat models of sympathetically maintained and sympathetic independent neuropathic pain. *Yonsei Med J* 2007; 48: 41-7.
8. Kim TW, Shin CS, Kim CH, Shin SW: Tramadol, alpha-2 adrenergic receptor subtype and neuropathic rat model. *Korean J Anesthesiol* 2007; 52: 328-34.
9. Duffo F, Li X, Bantel C, Pancaro C, Vincler M, Eisenach JC: Peripheral nerve injury alters the alpha2 adrenoceptor subtype activated by clonidine for analgesia. *Anesthesiology* 2002; 97: 636-41.
10. Zhao C, Tall JM, Meyer RA, Raja SN: Antiallodynic effects of systemic and intrathecal morphine in the spared nerve injury model of neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 2004; 100: 905-11.
11. Besse D, Lombard MC, Perrot S, Besson JM: Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: Comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 1992; 50: 921-33.
12. Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L: Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 1998; 82: 559-74.
13. Yu W, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z: Comparison of the anti-allodynic and antinociceptive effects of systemic; intrathecal and intracerebroventricular morphine in a rat

- model of central neuropathic pain. *Eur J Pain* 1997; 1: 17-29.
14. Bian D, Nichols ML, Ossipov MH, Lai J, Porreca F: Characterization of the antiallodynic efficacy of morphine in a model of neuropathic pain in rats. *Neuroreport* 1995; 6: 1981-4.
  15. Przewlocka B, Mika J, Labuz D, Toth G, Przewlocki R: Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 367: 189-96.
  16. Zollner C, Mousa SA, Fischer O, Rittner HL, Shaqura M, Brack A, et al: Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 2008; 118: 1065-73.
  17. Woolf CJ, Costigan M: Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7723-30.
  18. Chung KY, Shin SW, Choi BS, Kim CH, Kim KH, Kim HK: Spinal alpha2 adrenoceptor and antiallodynic effect by clonidine after chronic administration of 4-methylcatechol in neuropathic rat pain model. *Korean J Pain* 2008; 21: 179-86.
  19. Stone LS, Vulchanova L, Riedl MS, Wang J, Williams FG, Wilcox GL, et al: Effects of peripheral nerve injury on alpha-2A and alpha-2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neuroscience* 1999; 93: 1399-407.
  20. Wei H, Pertovaara A: Spinal and pontine alpha2-adrenoceptors have opposite effects on pain-related behavior in the neuropathic rat. *Eur J Pharmacol* 2006; 551: 41-9.
  21. Nicholas AP, Pieribone V, Hökfelt T: Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1993; 328: 575-94.
  22. Leiphart JW, Dills CV, Levy RM: Decreased spinal alpha2a- and alpha2c-adrenergic receptor subtype mRNA in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2003; 349: 5-8.
  23. Shi TS, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T: Distribution and regulation of alpha(2)-adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain* 2000; 84: 319-30.
  24. Shi TJ, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T: Distribution of alpha2-adrenoceptor mRNAs in the rat lumbar spinal cord in normal and axotomized rats. *Neuroreport* 1999; 10: 2835-9.
  25. Ongioco RR, Richardson CD, Rudner XL, Stafford-Smith M, Schwinn DA: Alpha2-adrenergic receptors in human dorsal root ganglia: Predominance of alpha2b and alpha2c subtype mRNAs. *Anesthesiology* 2000; 92: 968-76.
  26. Chen YP, Chen SR, Pan HL: Effect of morphine on deep dorsal horn projection neurons depends on spinal GABAergic and glycinergic tone: implications for reduced opioid effect in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 696-703.