

산화질소 합성효소 억제제가 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 신경병증성 통증 쥐의 뒷다리근에 미치는 영향

최명애¹ · 안경주²

¹서울대학교 간호대학 교수, ²청주대학교 간호학과 조교수

Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Hindlimb Muscles in Rats with Neuropathic Pain Induced by Unilateral Peripheral Nerve Injury

Choe, Myoung-Ae¹ · An, Gyeong Ju²

¹Professor, College of Nursing, Seoul National University, Seoul

²Assistant Professor, Department of Nursing, Cheongju University, Cheongju, Korea

Purpose: The purpose of this study was to examine effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitor on muscle weight and myofibrillar protein content of affected and unaffected hindlimb muscles in rats with neuropathic pain induced by unilateral peripheral nerve injury. **Methods:** Neuropathic pain was induced by ligation and cutting of the left L5 spinal nerve. Adult male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to one of two groups: The NOSI group (n=19) had NOS inhibitor (L-NAME) injections daily for 14 days, and the Vehicle group (n=20) had vehicle injections daily for 14 days. Withdrawal threshold, body weight, food intake and activity were measured every day. At 15 days all rats were anesthetized and soleus, plantaris and gastrocnemius muscles were dissected from hindlimbs. Muscle weight and myofibrillar protein content of the dissected muscles were determined. **Results:** The NOSI group showed significant increases as compared to the Vehicle group for body weight at 15 days, muscle weight and myofibrillar protein content of the unaffected soleus and gastrocnemius. The NOSI group demonstrated a higher pain threshold than the vehicle group. **Conclusion:** NOSI for 14 days attenuates unaffected soleus and gastrocnemius muscle atrophy in neuropathic pain model.

Key words: Pain, Nitric oxide synthase inhibitor, Muscular atrophy, Muscle proteins

서론

1. 연구의 필요성

신경병증성 통증(neuropathic pain)은 흔히 신경 손상과 연관되어 발생하며 통각과민(hyperalgesia)과 이질통(allodynia)을 특징으로 하는 만성 통증 증후군으로서, 실제 임상에서 많이 경험할 수 있는 만성 척추질환, 대상포진 후 신경통, 암 통증, 당뇨병성 신경병증, 삼차

신경통, 복합부위 통증 증후군 등에서 나타나고 있다(Choi et al., 2009). 이러한 통증은 고통이 크고 아편양제제나 비스테로이드성 소염제 등 고전적 진통제에 잘 반응하지 않기 때문에(Kibaly, Meyer, Patte-Mensah, & Mensah-Nyagan, 2008) 불안, 우울 등 심리적 문제를 야기하고 일상생활을 제대로 수행하기 어려운 상황이 되므로 임상적으로 관심을 두어야 할 중요한 질병군이다(Han, Lee, Kim, Lim, & Sung, 2002).

Choe, Kim, An, Lee와 Choi (2008)의 연구에 의하면, 말초신경 손

주요어: 통증, NOS 억제제, 근위축, 근육 단백질

*본 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 지원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R01-2007-000-10573-0).

*This work was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by the Korea government (R01-2007-000-10573-0).

Address reprint requests to: An, Gyeong-Ju

Department of Nursing, Cheongju University, 586 Daeseong-ro, Sangdang-gu, Cheongju 360-764, Korea

Tel: +82-43-229-8992 Fax: +82-43-229-7988 E-mail: antheresa@cju.ac.kr

투고일: 2011년 4월 5일 심사외일: 2011년 4월 14일 게재확정일: 2011년 8월 4일

상 후 7일간의 신경병증성 통증에 의해 근위축이 유발되었으며 이러한 근위축은 신경손상뿐 아니라 통증으로 인한 활동저하와 영양 섭취감소가 유의한 영향을 준 것으로 나타났다. Choe, Kim, An, Lee와 Heitkemper (2011)는 일측성 말초신경손상에 의한 14일간의 신경병증성 통증에 의해 환측과 정상측 뒷다리근에 위축이 발생하였고 이러한 변화는 정상측보다 환측에 더 현저하였음을 보고하였다. 이러한 신경병증성 통증으로 유발된 근 위축을 예방하기 위해 Choe와 An (2009)은 근육단백질 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있는 Dehydroepiandrosterone (DHEA)을 일측성 신경손상으로 유발된 신경병증성 통증 모델 쥐에게 14일간 투여하여 신경손상을 입은 환측 근위축은 회복되기 어려웠으나 정상측 족척근과 비복근의 근 위축을 경감시킬 수 있음을 입증하였다(Choe & An, 2009).

또한 일측성 말초신경 손상으로 인한 신경병증성 통증 모델의 근위축을 예방하기 위해 14일간의 저강도 운동이라는 중재를 적용함으로써 환측 족척근 무게와 Type I 횡단면적을 증가시켰고, 정상측 가자미근과 족척근 근육무게와 가자미근, 족척근, 비복근의 Type I, Type II 횡단면적을 증가시켜 환측보다는 정상측 근육의 근 위축을 경감시킬 수 있음을 제시하였다(Choe & An, 2010). 따라서 운동중재가 정상측 근위축을 예방하는 효과가 있음을 규명했지만 말초신경 손상을 받은 환측 근위축을 회복시키기는 어려웠음을 보여주었다.

이상의 두 선행연구에서 일측성 말초신경손상에 의해 유발된 신경병증성 통증에 의한 근위축이 DHEA 투여와 운동에 의해 정상측에서는 경감되었으나 환측에서 경감되지 않았음을 제시하였다. 또한 Choe와 An (2009)은 신경손상의 영향을 받은 환측의 근위축을 경감시키기 위한 후속연구로 말초 신경병증 모델 쥐에 신경보호 효과가 있는 것으로 알려진 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS) 억제제를 투여하는 후속연구가 필요함을 제안하였다.

NOS 억제제는 유해자극뿐 아니라 비유해자극에 대한 항진된 반응을 억제하며(Leem et al., 2000) 신경보호 효과가 있다(Trifiletti, 1992). 산화질소(nitric oxide, NO)는 L-arginine으로부터 NOS에 의해 합성되어 유해자극을 척수로 전달하는 역할을 함으로써 신경병증성 통증의 유발과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Yoon, Sung, & Chung, 1998). 그러므로 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 신경병증성 통증의 환측 근위축을 예방할 수 있는 방안으로서 신경보호 작용(Trifiletti, 1992)과 단백질 합성 작용을 가진 것으로 알려진 NOS 억제제(N-nitro-L-arginine Methyl Ester, L-NAME)의 투여를 고려할 수 있다(Wang, Wang, & Hong, 2006). L-NAME는 비선택적인 광범위(broad spectrum) NOS 억제제로 알려져 있어 모든 유형의 NOS 억제에 적용 가능하다(Martinez et al., 2008).

또한, 신경병증성 통증에 의한 활동저하로 근위축이 유발되는 상황에서 NOS 억제제 투여는 단백질 합성을 촉진하고 말초신경 손상을 줄여 통증을 완화하고 활동량을 증가시켜 근위축을 예방할 수 있을 것으로 가정하였다.

이에 본 연구에서 NOS 억제제를 14일간 투여하여 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 신경병증성 통증 쥐의 환측과 정상측 뒷다리근에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

2. 연구 목적

본 연구의 목적은 NOS 억제제를 투여하여 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 신경병증성 통증 쥐의 환측과 정상측 뒷다리근에 미치는 영향을 규명하기 위한 것으로 구체적인 목적은 다음과 같다.

첫째, NOS 억제제가 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 쥐의 환측과 정상측 뒷다리근의 근육무게에 미치는 영향을 규명한다.

둘째, NOS 억제제가 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 쥐의 환측과 정상측 뒷다리근의 근원섬유 단백질 함량에 미치는 영향을 규명한다.

연구 방법

1. 연구 설계

본 연구는 S대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 진행되었다(IRB 승인번호 SNU-071231-3). 순수실험연구로 수행되었으며 실험동물은 무작위로 두 군에 배정하였다. 두 군 모두 좌측 제5요수신경을 절제한 후 절단하여 신경병증성 통증을 유발시켰으며, 그 후 nitric oxide synthase inhibitor (NOSI)군은 14일간 NOS 억제제를 투여한 군이고 Vehicle군은 vehicle인 생리식염수만을 14일간 투여한 군이다. 두 군 모두 실험시작일로부터 15일째에 가자미근, 족척근, 비복근을 절제하였다.

2. 연구 대상

체중 190-210 g의 male Sprague-Dawley rat (Daehan Experimental Animal Co., Korea)을 NOSI군과 Vehicle군으로 무작위 할당하여 각 군당 20마리를 실험대상으로 하여 시작하였으나 NOSI군 중 1마리가 복막염으로 탈락되어 총 39마리가 연구대상이 되었다.

두 군을 동일한 환경에 수용하였고(온도: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도: 45-55%) 12시간은 밝고 12시간은 어둡게 하였으며 동물의 고행사료(Samy-

ang Co., Korea)와 물은 마음대로 먹을 수 있게 하였다.

3. 실험 방법

1) 신경병증성 통증 유발 수술

신경병증성 통증을 유발하기 위해 Kim과 Chung (1992)의 방법을 이용하여 신경병증성 통증 모델을 제작하였다. 쥐에게 pentobarbital sodium을 50 mg/kg의 용량으로 복강내주사로 마취시킨 후 복와 위로 고정하였다. 요추추부위의 왼쪽 피부를 정중면으로 절개하고 그 안의 요추부위 근육도 척추로부터 왼쪽 약 0.5 cm 간격을 두고 정중면으로 절개한 뒤 근육을 왼쪽 아래로 젖히고 안의 근육들을 끊어내어 좌측 제6번 요추의 횡돌기를 노출시켰다. 그다음 현미경 하에서 횡돌기를 조심스럽게 제거하고 좌측 제4, 5요수신경 일부를 노출한 후 두 신경을 1 cc 주사기 2개를 이용하여 분리한 뒤 제5요수 신경을 수술용 전사실(6-0)을 이용해 2 mm 간격을 두고 양쪽을 단단하게 결찰한 후 그 사이 부위를 미세가위로 절단하였다. 수술이 끝난 후 근육과 피부를 봉합하였다.

2) 신경병증성 통증 모델 확인

신경병증성 통증 모델이 완성되었는지 확인하기 위해 통증 역치 검사(Chaplan, Bach, Pogrel, Chung, & Yaksh, 1994)를 통해 신경결찰을 수행했던 쪽의 환측 다리가 정상측 다리의 경우보다 50% 이상의 높은 값을 보인 동물을 성공적인 신경병증성 모델로 간주하였으며, 두 군의 실험동물 모두 신경병증성 통증 유발 수술 후에 정상측 다리의 통증역치보다 환측의 통증역치가 50%를 초과하는 값으로 나타나 신경병증성 모델이 완성된 것을 확인한 후 실험을 실시하였다.

3) NOS 억제제 투여

L-NAME (Tocris, Nottingham, UK)를 생리식염수에 녹여 10 mg/kg의 용량으로 쥐 복강내 1회/일, 14일간 투여하였다. 이러한 방법은 다른 동물 모델 연구(Wang et al., 2006)에서 단백질 합성 효과가 입증된 방법이다.

4) Vehicle 투여

Vehicle군에게 생리식염수를 L-NAME 용량과 동일하게 1회/일, 14일간 복강내 주사하였다.

4. 측정 방법

1) 통증 역치 검사

좌측 제5요수신경 손상 후 통증반응 역치 정도는 통증 역치 검

사(Chaplan et al., 1994)를 통하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14일에 검사하였다. 쥐를 금속철망(망 간격, 0.5×0.5 cm) 위쪽에 올리고 투명한 아크릴 상자(8×8×24 cm)로 덮은 뒤, 환경 변화에 따르는 스트레스를 피하도록 30분 동안 적응시킨 후 von Frey 필라멘트(압력 범주 0.41-15.1 g)가 부착된 자극기를 이용하여 철망 사이로 필라멘트를 환측 발바닥에 가해주면서 발의 통증 회피반응이 나타나는 무게를 기록하였다. 회피반응을 일으키는 최저 강도를 회피반응 역치(paw withdrawal threshold, PWT)라고 정의하며 회피반응 역치는 상하 검증법(up-down testing paradigm)으로(Dixon, 1980) 측정하였다.

2) 활동 측정

두 사람의 관찰자가 매일 오전 10시에 철망 사육상자 속의 음식과 물을 제거한 후 5분간 별다른 자극을 가하지 않고 쥐가 보여주는 활동을 각각 독립적으로 관찰하여 활동성(activity)은 1점, 몸치장활동(grooming)은 2점, 비활동성(inactivity)은 3점을 부여하여 5분간 관찰한 점수를 종합하였다(Kim, 2005).

관찰하는 기간 동안 쥐가 왕성하게 움직이며, 쥐장을 물어뜯던가, 계속적인 이행행동을 한다든가, 또는 앞발을 들고 일어서는 행동을 주로 할 때는 활동성으로 판정하였고, 털을 핥는다든가(licking), 세수한다든가(washing), 또는 긁적거리는(scratching) 행동을 주로 할 때는 몸치장활동으로 판정하였으며, 한곳에 가만히 앉아 있다든지 잠자는 듯한 모습을 주로 보일 때는 비활동성으로 판정하였다. 두 명의 관찰자가 15초마다 쥐의 행동을 20분 관찰하여 5분간 점수를 기록용지에 기록하였다. 두 관찰자의 활동점수를 이용하여 14일간의 총점을 구하고 평균을 산출하였다. 두 관찰자 간의 신뢰도(interrater reliability)는 Cohen's kappa .90로 나타났다.

3) 사료 섭취량 측정

체중측정 후 전날 제공한 사료무게와 섭취하고 남은 사료무게를 측정한 후, 제공한 사료무게에서 섭취하고 남은 사료 무게를 빼서 일일 식이섭취량을 산출하였다.

4) 체중 측정

쥐의 체중은 매일 활동측정 후에 rat digital balance (Daejong Instrument Co., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

5) 근육 절제 및 무게 측정

실험 15일째에 pentobarbital sodium을 50-70 mg/kg의 용량으로 복강내 주사로 투여하여 마취시킨 후, 환측인 좌측 뒷다리와 정상측인 우측 뒷다리에서 가자미근, 족척근 및 비복근을 절제하여 microbalance (Mettler PE160, USA)에서 무게를 측정하였다. 실험동물

은 보건사회부고시 제 88-39호에 따라 마취 상태에서 근육을 절제 한 후, pentobarbital sodium을 추가로 복강내 과량투여를 하여 신속히 안락사시켰다.

6) 근원섬유 단백질 함량 측정

Choe 등(2004)의 연구에서 제시된 방법에 따라 단백질 정량은 분광광도계(spectrophotometer, UV1601, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 Serva Blue G dye가 함유된 Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, USA) 1 mL를 Bradford assay 방법으로 분석하였다. 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 표준용액으로 이용하여 분광광도계에서 나타난 흡광도(absorbance, A_{595}) 수치를($\mu\text{g/mL}$)를 읽어 해당 근육의 단백질 함량(mg/g)을 산출하였다.

5. 자료 수집 절차

연구기간은 2009년 1월부터 9월까지였으며, 실험에 이용된 쥐들은 동물실에 반입된 후 7일간 실험실 환경에 적응하는 기간을 두었다. 실험기간 중 매일 체중과 사료섭취량을 측정하였고, 실험 15일째에 체중을 측정한 후 근육을 절제하였다. 동물실에서 쥐 실험기간은 15일이었으나 절제된 각 근육을 냉동처리한 후 근원섬유 단백질을 측정한 후 자료 분석하는 과정에 8개월이 소요되었다.

6. 자료 분석

SPSS WIN 14.0 프로그램을 이용하여 각 군의 실험시작 시와 근육절제 직전의 체중, 사료섭취량, 활동량, 통증역치, 근육무게, 근원섬유 단백질 함량은 평균과 표준편차로 나타내었고 두 군 간의 차

이는 t-test를 이용하여 분석하였다. 모든 통계적 유의 수준은 $p < .05$ 에서 채택하였다.

연구 결과

1. 통증 역치

통증역치 검사결과, Figure 1에서 제시된 바와 같이 신경병증성 통증유발 후 NOS 억제제를 투여한 쥐에서 실험 3일째부터 통증역치가 유의하게 높아진 것(8.80-11.70 범위)으로 나타난 반면, 신경병증성 통증유발 후 Vehicle을 투여한 쥐에서는 통증역치가 1.80-3.80 범위 내에서 낮게 유지되었다.

2. 체중

NOSI군과 Vehicle군의 실험 시작 시 체중(preweight)과 근육절제 직전의 체중(postweight)은 Table 1에서 보는 바와 같이, 실험 시작시의 체중은 두 군 간에 유의한 차이가 없었다. 14일간의 실험 후, NOSI군의 근육절제 직전 체중은 Vehicle군에 비해 유의하게 컸다.

3. 총 사료섭취량

두 군의 총 사료섭취량은 Table 1에 제시된 바와 같다.

NOSI군과 Vehicle군의 총 사료섭취량은 각각 260.17 ± 13.33 g, 266.51 ± 20.78 g으로 두 군 간의 차이가 유의하지 않은 것으로 나타났다.

4. 활동량

14일간 두 군의 활동 평균점수는 NOSI군 2.71 ± 0.10 , Vehicle군의

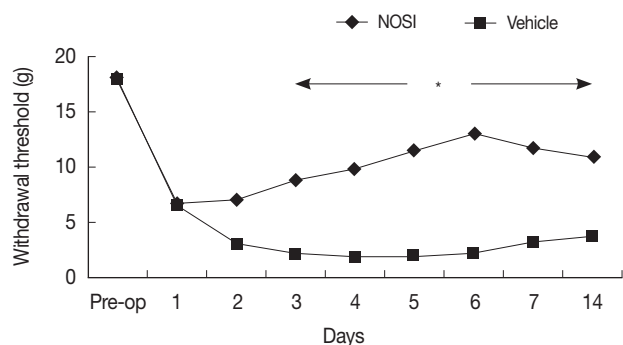


Figure 1. Time course of changes in withdrawal threshold.

* $p < .05$.

NOSI= Nitric oxide synthase inhibitor.

Table 1. Body Weight and Total Diet Intake of NOSI and Vehicle Rats

Group	Prewrite (g)	Postweight (g)	Total diet intake (g)
	Mean \pm SD		
NOSI (n=19)	202.45 \pm 5.11	291.06 \pm 13.36	260.17 \pm 13.33
Vehicle (n=20)	199.81 \pm 4.96	280.10 \pm 8.48	266.51 \pm 20.78
t (p)	1.45 (.157)	2.33 (.028)	0.95 (.350)

NOSI= Nitric oxide synthase inhibitor.

Table 2. Mean Daily Activity Score of NOSI and Vehicle Rats

Group	Mean daily activity score
	Mean \pm SD
NOSI (n=19)	2.71 \pm 0.10
Vehicle (n=20)	2.76 \pm 0.13
t (p)	0.84 (.409)

NOSI= Nitric oxide synthase inhibitor.

Table 3. Muscle Weight of NOSI and Vehicle Rats

Group		Soleus (mg)			Plantaris (mg)			Gastrocnemius (mg)		
		Left	Right	t(p)	Left	Right	t(p)	Left	Right	t(p)
NOSI (n=19)	Mean ± SD	81.12 ± 30.84	139.18 ± 11.51	6.27 (.001)	294.13 ± 57.65	319.79 ± 24.99	0.68 (.515)	1,044.61 ± 211.29	1,686.38 ± 116.55	11.45 (.001)
Vehicle (n=20)	Mean ± SD	66.30 ± 28.30	100.14 ± 35.69	2.97 (.021)	269.15 ± 47.44	304.32 ± 114.26	1.86 (.085)	976.66 ± 193.03	1,438.44 ± 411.57	2.95 (.021)
t (p)		1.14 (.270)	3.81 (.001)		1.09 (.288)	0.49 (.626)		0.74 (.463)	2.14 (.045)	

NOSI=Nitric oxide synthase inhibitor.

Table 4. Myofibrillar Protein Content of the Hindlimb Muscles in NOSI and Vehicle Rats

Group		Soleus (mg)			Plantaris (mg)			Gastrocnemius (mg)		
		Left	Right	t(p)	Left	Right	t(p)	Left	Right	t(p)
NOSI (n=19)	Mean ± SD	34.21 ± 4.57	45.30 ± 6.17	8.54 (.039)	60.36 ± 5.64	72.60 ± 7.67	3.40 (.027)	77.22 ± 6.89	88.45 ± 2.39	4.80 (.009)
Vehicle (n=20)	Mean ± SD	29.95 ± 6.45	32.92 ± 2.60	1.13 (.374)	51.94 ± 3.99	64.41 ± 2.59	5.82 (.028)	65.76 ± 12.13	81.52 ± 5.11	1.80 (.214)
t (p)		1.10 (.311)	3.21 (.018)		2.23 (.067)	1.74 (.133)		1.74 (.131)	2.68 (.036)	

NOSI=Nitric oxide synthase inhibitor.

경우 2.76 ± 0.13 으로 나타났으며 두 군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

976.66 ± 193.03 mg에 비해 유의하게 컸다($t=2.95, p=.021$).

6. 근원섬유 단백질 함량

5. 근육무게

두 군의 근육 무게를 비교한 결과가 Table 3에 제시되어 있다.

14일간의 NOSI 투여 효과를 확인하기 위해 NOSI군과 Vehicle군의 근육무게를 비교한 결과, NOSI군의 정상측 가자미근 무게 139.18 ± 11.51 mg은 Vehicle군의 100.14 ± 35.69 mg에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났으며($t=3.81, p=.001$), 정상측 비복근 무게도 $1,686.38 \pm 116.55$ mg은 Vehicle군의 $1,438.44 \pm 411.57$ mg에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다($t=2.14, p=.045$).

NOSI군의 좌우 근육무게를 비교한 결과, 정상측 가자미근 근육무게 139.18 ± 11.51 mg은 환측 가자미근 근육무게 81.12 ± 30.84 mg에 비해 유의하게 컸다($t=6.27, p=.001$). 정상측 족척근 근육무게는 환측에 비해 유의한 차이가 없었고, 정상측 비복근 근육무게 $1,686.38 \pm 116.55$ mg은 환측 비복근 근육무게 $1,044.61 \pm 211.29$ mg에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다($t=11.45, p=.001$).

Vehicle군의 좌우 근육무게를 비교한 결과, 정상측 가자미근 근육무게 100.14 ± 35.69 mg이 환측 가자미근 근육무게 66.30 ± 28.30 mg에 비해 유의하게 컸다($t=2.97, p=.021$). 정상측 족척근 근육무게는 환측과 비교해 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, 정상측 비복근 근육무게 $1,438.44 \pm 411.57$ mg도 환측 비복근 근육무게

Table 4에 두 군의 근원섬유 단백질 함량이 제시되어 있다. NOSI군과 Vehicle군의 정상측 가자미근 근원섬유 단백질 함량을 비교한 결과, NOSI군의 45.30 ± 6.17 mg은 Vehicle군의 32.92 ± 2.60 mg에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다($t=3.21, p=.018$). NOSI군의 비복근 근원섬유 단백질 함량은 88.45 ± 2.39 mg으로 Vehicle군의 81.52 ± 5.11 mg에 비해 유의하게 컸다($t=2.68, p=.036$).

NOSI군의 좌우 근원섬유 단백질 함량을 근육별로 비교한 결과, 가자미근의 근원섬유 단백질 함량은 정상측 45.30 ± 6.17 mg이 환측 34.21 ± 4.57 mg에 비해 유의하게 컸고($t=8.54, p=.039$), 족척근 근원섬유 단백질 함량은 정상측 72.60 ± 7.67 mg으로 환측 60.36 ± 5.64 mg에 비해 유의하게 컸다($t=3.40, p=.027$). 비복근의 근원섬유 단백질 함량은 정상측 88.45 ± 2.39 mg은 환측 77.22 ± 6.89 mg에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다($t=4.80, p=.009$).

Vehicle군의 좌우 근원섬유 단백질 함량을 근육별로 비교한 결과, 가자미근의 근원섬유 단백질 함량은 정상측과 환측 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났고, 족척근 근원섬유 단백질 함량은 정상측 64.41 ± 2.59 mg으로 환측 51.94 ± 3.99 mg에 비해 유의하게 컸다($t=5.82, p=.028$). 비복근의 근원섬유 단백질 함량은 정상측과 환측 간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

논 의

본 연구 결과, NOS1군은 Vehicle군에 비해 정상측 가자미근과 비복근에서 근육무게와 근원섬유 단백질 함량이 유의하게 큰 것으로 나타났다. 이는 14일간의 NOS 억제제 투여로 정상측에서 주로 Type I 근섬유로 구성된 가자미근과 Type I, II 근섬유가 혼합되어 있는 비복근에 근육 합성 효과가 있었음을 제시한다. 이러한 결과는 NOS 억제제 투여가 단백질 합성률을 증가시킨다는 선행연구 보고 (Lee, Choi, Lee, & Park, 2002)와 일치하는 결과이다. Qi, Zhang, Chen, Seaber와 Urbaniak (2004)의 연구에서도 NOS 억제제는 근육 염증과 괴사를 감소시키고 신경 손상 후 재관류 근육의 미세순환 혈류를 유의하게 증가시키고 단백질 합성을 증가시킨 것으로 보고하였다.

산화질소(NO)는 골격근 허혈 후 재관류시 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 세포 손상을 일으키는 자유 라디칼 가스이다(Khanna, Cowled, & Fitridge, 2005). 2주간 꼬리를 부유시킨 근위축 모델 쥐의 근육에서 산화질소 생성이 증가된 것으로 나타났으며, NOS는 산화질소를 생성하고 ubiquitin을 활성화시켜 근 위축을 초래한다(Suzuki et al., 2007). 특히, 산화질소에 의한 신경독성은 주로 peroxynitrite에 의한 것으로 알려져 있으며, peroxynitrite는 아주 적은 농도라 할지라도 뉴런에 대해 직접적으로 손상을 줄 정도로 매우 유독한 산화물이다(Joo, Lee, Shin, & Kim, 1999). 따라서 NOS는 산화 스트레스의 지표로 사용하므로 본 연구에서 사용된 NOS 억제제는 산화 스트레스로 인해 세포가 손상받는 것을 경감시켰을 것(Wang, Tsai, Huang, Lin, & Liu, 2009)으로 볼 수 있다.

그러나 환측인 좌측 뒷다리근은 NOS1군과 Vehicle 간에 근육무게와 근원섬유 단백질 함량에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 환측은 직접적인 신경손상의 영향을 받은 부분이기 때문에 정상측보다 근육무게가 현저히 감소되어 있는 부분으로 NOS 억제제 투여가 신경손상을 직접적으로 받은 쪽에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 NOS 억제제가 신경보호 작용이 강하다는 여러 선행연구보고(Lee et al., 2002; Wang et al., 2009)와 일치하지 않는 결과이다. 안면신경 손상 후 NOS 억제제를 투여한 결과, 축삭(axon) 재생을 증가시키는 것으로 알려졌고(Wang et al., 2009), 신경병증성 통증 모델 연구에서도 척수감각 신경세포의 세포생존율을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다(Lee et al., 2002). NOS 억제제 투여로 근위축성 축삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)의 진행을 지연시켰다는 연구결과(Martinez et al., 2008)에서도 알 수 있듯이, 산화질소의 독성은 신경세포 퇴화를 촉진시키는 중요한 기전으로 알려져 있다.

그러므로 선행연구들에서 나타난 NOS 억제제의 신경보호 및 재

생 작용을 토대로 본 연구에서 신경손상이 일어난 환측에 NOS 억제제가 신경보호 영향을 줄 것으로 가정하였으나, 환측 뒷다리근의 근위축 경감효과가 나타나지 않았다. Wang 등(2009)의 연구결과에 의하면 안면신경 손상 후 NOS 억제제를 투여하고 10주가 경과한 뒤 축삭 재생이 나타났기 때문에 NOS 억제제의 신경 보호 및 재생 효과가 나타나기까지는 본 연구기간인 14일이 부족했을 것으로 생각한다. 따라서 NOS 억제제의 신경보호 및 재생 효과를 알아보기 위해 투여기간을 14일 이상 연장하는 추후 연구를 수행할 필요가 있다고 생각한다.

NOS 억제제가 신경병증성 통증 역치를 증가시킨다는 선행연구 결과는 본 연구 결과에서도 증명이 되었다. 통증유발 수술 후 1-2일간 신경병증성 통증이 유발된 쥐는 신경병증성 통증환자들에서 나타나는 증상과 유사한 행동학적 증후를 보였다. 외부에서 자극이 없을 때도 가끔 신경손상을 받은 쪽의 다리를 들고 찰는 행동을 보이며 이러한 행동은 경미한 촉각자극에 의해 더욱 심해져 때로는 소리를 지르거나 다리를 움츠리고 방위 자세를 취하기도 하였다. 그러나 NOS1군은 통증유발 수술 후 3일째부터 Vehicle군에 비해 통증 역치가 유의하게 높아졌고 14일간의 실험기간동안 계속 통증 역치가 유의하게 높아져 통증이 현저히 감소된 것을 알 수 있다. 이와 같은 NOS 억제제의 진통 효과는 척수신경 결찰을 이용해 만든 신경병증성 통증 모델에서 NOS 억제제의 전신적 투여가 통증을 감소시켰다는 연구보고(Yoon et al., 1998)와 신경 손상 부위에서의 NO 생성을 차단해서 신경 손상에 따른 통각과민을 억제한다는 사실에 의해서도 확인된 바 있다(Thomas, Ren, Besse, Ruda, & Dubner, 1996). 그러나 Choe 등(2008)의 연구결과를 토대로, 통증이 감소되면 활동량이 증가하고 사료섭취량도 증가할 것으로 가정하였으나 본 연구 결과, 활동량과 총사료섭취량이 두 군 간에 차이가 보이지 않아 NOS1군에서 통증이 감소되어도 활동이나 섭취량 증가가 나타나지 않았다.

NOS1군과 Vehicle군 간에 체중과 총사료섭취량이 유의한 차이가 없는 것으로 나타난 본 연구결과, 본 연구에서 두 군 모두 신경병증성 통증이 유발된 쥐이기 때문에 Choe 등(2008)의 연구에서 규명되었듯이 통증이 식욕부진을 유발하고(Morley & Kraenzle, 1994), 식욕상실을 초래하여(Long & Greco, 2000) 영양섭취를 저하시키므로 본 연구에서 14일간 총사료섭취량이 Vehicle군 266.51 g, NOS1군 260.17 g으로 나타나 Choe 등(2008)의 연구에서 나타난 대조군의 7일간 총사료섭취량 152.4g에 비해 사료섭취량이 적음을 알 수 있다.

또한 활동량에서도 NOS1군과 Vehicle군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이는 Choe 등(2008)의 말초신경 손상 모델에서 나타난 바와 같이 본 연구에서 두 군 모두 말초신경 손상에 의한 신경병증성 통증 모델이기 때문에 신경손상 후 통증으로 활동량이 감소

된 것으로 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서 NOS 억제제 투여로 통증 정도가 경감되어 활동량이 증가할 것으로 생각했으나 실제 활동량은 증가하지 않았다. 이러한 상황은 NOS군의 통증 정도가 호전되었더라도 다시 활동을 활발히 할 수 있을 때까지 시간이 많이 필요한 것으로 유추할 수 있다. 그러나 Han 등(2002)에 의하면 신경 손상 이전에 NOS 억제제를 투여해야 신경병증성 통증 발생이 억제된다고 하여 산화질소가 신경 손상 초기의 통증 발생에 중요한 역할을 하고 있고, 반면에 신경병증성 통증이 유발된 후 NOS 억제제 처리는 통증 억제가 되지 않는다는 보고도 있다(Martinez et al., 2008). 따라서 NOS 억제제 투여로 통증 역치가 높아져 통증이 경감됨으로써 활동량이 증가되는지와 이로 인해 근위축 경감되는지는 NOS 억제제 투여를 신경손상 전부터 시작하여 연구해 볼 필요가 있다고 생각한다.

특히 본 연구에서 가자미근에서 근위축 경감 효과가 나타났는데, 이는 10일간 뒷다리 부유 모델 쥐에서 NOS 억제제를 투여하여 가자미근의 염증세포 수를 감소시키고 호중구와 대식구(macrophage)의 수도 감소시켜 근육의 염증을 경감시켰다는 Pizza, Hernandez와 Tidball (1998)의 연구결과를 토대로 NOS 억제제가 Type I 근섬유의 염증과 과사 감소에 영향을 주었음을 알 수 있다. 즉 Type I 근섬유로 구성비율이 85% 이상인 가자미근과 Type I 근섬유가 40% 이상 혼합된 비복근에서 근위축 경감 효과를 나타냈고, 이에 비해 Type II 근섬유 비율이 90% 이상인 족척근(American College of Sports Medicine, 2006)에서는 효과가 나타나지 않은 것은 Type I 근섬유가 산화대사에 주도적이므로 NOS 억제제가 항산화 작용을 함으로써 Type I 근섬유에 효과적임을 유추할 수 있다(Wadley & McConell, 2007). 하지만 이 부분은 in vitro 연구를 통해 좀 더 많은 지속적인 연구가 필요하기 때문에 본 연구 결과 해석에 신중을 기해야 할 것으로 생각한다.

본 연구에서 말초신경 손상 후 유발된 근위축을 NOS 억제제 투여로 경감시킨 기전은 세포 수준의 in vitro 실험을 수행하지 않아 기전을 설명할 수 없었지만 선행 연구 결과를 토대로 NOS 억제제의 항산화작용도 영향을 주었을 것이라 생각한다.

말초신경 손상으로 인한 신경통증성 모델 쥐를 대상으로 운동 적용(Choe & An, 2010)과 DHEA 투여(Choe & An, 2009)가 환축의 근위축을 경감시키지 못했던 것과 같이, 본 연구에서 NOS 억제제 투여 역시 환축의 근위축을 경감시키지 못했다. 따라서 신경손상의 영향을 받은 환축의 근위축을 경감시키기 위한 후속연구로 NOS 억제제를 신경손상 전부터 미리 투여하고 투여기간을 14일 이상으로 연장시키는 것으로 설계하여 환축 근위축의 경감효과가 나타나는지를 규명하는 후속연구를 제안한다.

결론

14일간의 NOS 억제제 투여가 일측성 말초신경 손상에 의해 유발된 신경병증성 통증으로 인한 환축 근위축에는 영향을 주지 못하였으나 정상측에서 가자미근과 비복근의 근육무게와 근위섬유 단백질 함량을 증가시켜 정상측 가자미근과 비복근의 근위축을 경감시킬 수 있음을 제시하였다.

REFERENCES

- American College of Sports Medicine. (2006). *ACSM's advanced exercise physiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53, 55-63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9
- Choe, M. A., & An, G. J. (2009). Effect of dehydroepiandrosterone on affected and unaffected hindlimb muscles in rats with neuropathic pain induced by unilateral peripheral nerve injury. *Journal of Korean Academy of Nursing*, 39, 632-640. doi:10.4040/jkan.2009.39.5.632
- Choe, M. A., & An, G. J. (2010). Effects of exercise on affected and unaffected hindlimb muscles in rats with neuropathic pain induced by unilateral peripheral nerve injury. *Journal of Korean Academy of Nursing*, 40, 611-619. doi:10.4040/jkan.2010.40.5.611
- Choe, M. A., An, G. J., Lee, Y. K., Im, J. H., Choi-Kwon, S., & Heitkemper, M. (2004). Effect of inactivity and undernutrition after acute ischemic stroke in a rat hindlimb muscle model. *Nursing Research*, 53, 283-292.
- Choe, M. A., Kim, K. H., An, G. J., Lee, K. S., & Choi, J. A. (2008). Hindlimb muscle atrophy of rat induced by neuropathic pain. *Journal of Korean Biological Nursing Science*, 10, 88-95.
- Choe, M. A., Kim, K. H., An, G. J., Lee, K. S., & Heitkemper, M. (2011). Hindlimb muscle atrophy occurs from peripheral nerve damage in a rat neuropathic pain model. *Biological Research for Nursing*, 13, 44-54. doi:10.1177/1099800410382291
- Choi, J. W., In, J. H., Kim, Y. S., Kang, Y. J., Im, Y. G., Cho, S. M., et al. (2009). Low dose ketamine reduces the induction of ERK1/2 and CREB signaling protein in a neuropathic pain model of rats. *Korean Journal of Anesthesiology*, 57, 210-216.
- Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 22, 441-462.
- Han, S. H., Lee, S. C., Kim, Y. C., Lim, Y. J., & Sung, J. S. (2002). Effect of L-NAME on neuropathic pain developed after peripheral nerve injury. *Journal of Korean Society of Anesthesiologists*, 43, 494-505.
- Joo, M. J., Lee, K. J., Shin, K. H., & Kim, J. C. (1999). Nitric oxide-mediated neurotoxicity after excimer laser photorefractive keratectomy. *Journal of Korean Ophthalmological Society*, 40, 688-698.
- Khanna, A., Cowled, P. A., & Fitridge, R. A. (2005). Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: Current controversies. *Journal of Surgical Research*, 128, 98-107. doi:10.1016/j.jss.2005.04.020
- Kibaly, C., Meyer, L., Patte-Mensah, C., & Mensah-Nyagan, A. G. (2008). Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanism by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spi-

- nal cord. *The FASEB Journal*, 22, 93-104. doi:10.1096/fj.07-8930com
- Kim, J. Y. (2005). *Effects of short-term undernutrition on type I and II muscles in rat*. Unpublished master's thesis, Seoul National University, Seoul.
- Kim, S. H., & Chung, J. M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50, 355-363.
- Lee, K. C., Choi, Y. S., Lee, H. B., & Park, S. T. (2002). Effect of NMDA receptor antagonist and NOS inhibitor on spinal sensory neurons of neuropathic pain animal model. *The Korean Journal of Pain*, 15, 13-18.
- Leem, J. W., Gwak, Y. S., Chung, S. S., Lee, K. R., Yoon, D. M., & Nam, D. S. (2000). Effects of NO Synthase inhibitor on responsiveness of dorsal horn neurons in neuropathic pain animal model. *Journal of the Korean Pain Society*, 13, 19-30.
- Long, J. P., & Greco, S. C. (2000). The effect of propofol administered intravenously on appetite stimulation in dogs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 39(6), 43-46.
- Martinez, J. A., Francis, G. J., Liu, W. Q., Pradzinsky, N., Fine, J., Wilson, M., et al. (2008). Intranasal delivery of insulin and a nitric oxide synthase inhibitor in an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, 157, 908-925. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.073
- Morley, J. E., & Kraenzle, D. (1994). Causes of weight loss in a community nursing home. *Journal of American Geriatric Society*, 42, 583-585.
- Pizza, F. X., Hernandez, I. J., & Tidball, J. G. (1998). Nitric oxide synthase inhibition reduces muscle inflammation and necrosis in modified muscle use. *Journal of Leukocyte Biology*, 64, 427-433.
- Qi, W. N., Zhang, L., Chen, L. E., Seaber, A. V., & Urbaniak, J. R. (2004). Nitric oxide involvement in reperfusion injury of denervated muscle. *The Journal of Hand Surgery*, 29, 638-645. doi:10.1016/j.jhsa.2004.01.003
- Suzuki, N., Motohashi, N., Uezumi, A., Fukada, S., Yoshimura, T., Itoyama, Y., et al. (2007). NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 2468-2476. doi:10.1172/JCI30654
- Thomas, D. A., Ren, K., Besse, D., Ruda, M. A., & Dubner, R. (1996). Application of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, on injured nerve attenuates neuropathy induced thermal hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letter*, 210, 124-126. doi:10.1016/0304-3940(96)12670-7
- Trifiletti, R. R. (1992). Neuroprotective effects of NG-nitro-L-arginine in focal stroke in the 7-day old rat. *European Journal of Pharmacology*, 218, 197-198. doi:10.1016/0014-2999(92)90168-4
- Wadley, G. D., & McConell, G. K. (2007). Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102, 314-320. doi:10.1152/jappphysiol.00549.2006
- Wang, S. M., Tsai, H. P., Huang, H. C., Lin, J. L., & Liu, P. H. (2009). Inhibition of nitric oxide synthase promotes facial axonal regeneration following neurotomy. *Experimental Neurology*, 216, 499-510.
- Wang, Q., Wang, F., & Hong, G. (2006). Inhibitor of nitric oxide synthase on the denervated muscle atrophy. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 20, 805-808.
- Yoon, Y. W., Sung, B., & Chung, J. M. (1998). Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *NeuroReport*, 9, 367-372.