

쥐의 포르말린시험에서 척수에서의 열충격 단백질들의 발현에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과마취학교실, *성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 마취과

황정태 · 윤태균* · 김현정 · 염광원

= Abstract =

Expression of Inducible Heat Shock Protein 70 in the Rat's Spinal Cord after Formalin Test

Jeong Tae Hwang, D.D.S., Tae Gyoon Yoon, M.D.*, Hyun Jeong Kim, M.D.
and Kwang Won Yum, M.D.

Department of Dental Anesthesiology, Seoul National University College of Dentistry, Seoul, Korea
*Department of Anesthesiology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University
School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Heat shock proteins (HSPs) are induced in the central nervous system by stressful stimuli and are thought to assist in the maintenance of cellular integrity and viability. Recently, several lines of evidence have indicated that HSPs are related to the synaptic plasticity phenomenon. The purpose of this study was to investigate the hypothesis that HSPs can be expressed in the nervous system, which is related to the nociceptive stimuli induced by formalin injection into the rat's hind paw.

Methods: Male Sprague-Dawley rats weighing 250–300 g were subcutaneously injected with 100 μ l of freshly made 5% formalin into the right hind paw. At 1 and 24 hour(s) after formalin injection, the right and left sides of the 5th and 6th lumbar spinal cord were collected. HSP90, HSP 70, and HSP27 levels were examined using Western blot analysis.

Results: Pain related behaviors induced by formalin were typically observed during 1 hr after formalin injection. However, at 24 hr after formalin injection, such pain behaviors were rarely observed. Only at 1 hr after formalin injection, HSP70 was significantly more expressed in the ipsilateral and contralateral lumbar spinal cord ($P < 0.05$). The others did not show significant changes in HSPs levels compared to those of the control group.

Conclusions: These results suggest that the overexpression of HSP70 in the lumbar spinal cord at 1 hr after formalin injection, which is associated with painful stress, may be related to the molecular mechanism of central sensitization.

Key Words: Formalin test, Heat shock protein 70, Sensitization, Spinal cord

책임저자 : 염광원, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 치과대학 치과마취학교실, 우편번호: 110-744

Tel: 760-3847, Fax: 766-9427, E-mail: kwyum@plaza.snu.ac.kr

본 연구는 서울대학교병원 일반연구비(04-2000-063) 지원으로 수행되었음.

서 론

중추신경계에서 inducible heat shock protein (HSP) 들은 고열, 허혈, 외독소 등 다양한 자극들에 의해 세포 내에 축적된 변성된 단백질들을 처리하거나, 부적절한 폴리펩타이드 응집을 방지하여 초기 조직 손상과 이후 손상에 대하여 세포를 보호하는 chaperone 기능을 수행하여 세포의 생존을 증진시키는 것으로 알려져 있다.^{1,3)}

조직손상은 침해성 수용기의 감각으로 구심성 신경섬유의 역할을 감소시키는 말초감작과 척수에서의 감각을 통해 척수신경의 흥분을 증가시키는 중추감작을 일으켜 통증을 증가시킨다. 척수에서의 중추감작은 일차 구심성 섬유를 통하여 이루어지는데, 조직이 손상되면 침해성 수용체가 자극되고, 구심성 C-섬유를 통하여 척수후각에 전달되며, 시냅스에서 glutamate, substance P, 그리고 calcitonin gene related peptide 등 신경전달물질을 분비하게 되며, 이들 물질들이 wide dynamic range (WDR) 신경세포의 수용체에 결합하여 탈분극을 일으킨 결과로 알려져 있다.^{4,6)}

최근에는 HSP들과 glutamate의 관련성 및 신경세포 접합부와 같이 고도로 분화된 세포 구획에서 HSP70가 발현된 사실들을 고려할 때, 중추감작이 있는 경우에서도 HSP들의 발현 가능성이 있겠다.^{7,9)} 그러나 말초신경을 통한 침해수용성 신경 전달에 의한 HSP의 유도에 관한 이전의 연구는 없었다.

본 연구의 목적은 쥐를 대상으로 포르말린을 뒷발에 주사하여 통증행동을 관찰한 후 요추부의 척수를 적출하여 HSP들의 발현 양상을 관찰하여, 말초 침해 수용성 신경전달에 의한 중추감작의 과정에 HSP들의 연관성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

동물실험은 세계통증연구학회(International Association for the Study of Pain)의 윤리규정에 의하여 시행되었다. 실험동물은 초기 체중 250~300 g의 웅성 Sprague-Dawley 쥐 28마리를 대상으로 12시간의 광주기성을 유지하며, 4~5마리씩 깔집이 있는 통에 사육하였다. 먹이와 물에 자유롭게 접근할 수 있도록

하고 표준적인 먹이를 주었다. 실험 전 실험동물이 이러한 상태에 적어도 3일 동안 적응시켰다. 모든 동물들은 NIH 지침에 명기되어 있는 실험동물의 사육과 이용에 관한 지침 및 의식 하 동물에서의 실험적 통증 연구에 관한 윤리적 지침에 따라 다루었다.¹⁰⁾

우선 행동관찰 실험통(지름 30 cm, 높이 30 cm)에 넣어 30분간 적응시킨 후 마취유도 상자(11 × 25 × 11.5 cm) 내에서 5 Vol% halothane과 100% 산소 3 L/min의 지속적인 공급에 의해서 실험동물을 심마취하였다. 의식이 소실되고, 정상적인 반사작용이 사라지면 생리식염수로 새로 희석한 5% 포르말린 100 μ l를 30 G 주사바늘을 이용하여 쥐의 오른쪽 뒷발 바닥에 주사하였다. 거울을 뒤에 세운 실험통에 넣어 오른 발의 통증반응을 다음과 같이 관찰하였다.

포르말린 주사 시 초시계를 작동하여 0분으로 하고, 각각 3~4분, 6~7분, 11~12분, 16~17분, 21~22분, 26~27분, 31~32분, 36~37분, 41~42분, 46~47분, 51~52분, 56~57분, 및 61~62분의 시간 동안 갑자기 오른 발을 들어올리는 통증 행동(flinching)을 1점, 발을 떠는 행동(shanking)은 2점, 및 혀로 발을 핥거나(licking) 무는 행동(biting)을 보일 때는 3점을 주는 weighted pain score를 사용하여 통증 행동을 측정하였다.

포르말린 주사 후 각각 1시간 및 24시간 후에 5 Vol% halothane에 의한 심마취 하에서 전척추궁 절제술을 시행한 후 제5번 및 제6번 요수를 적출한 후 좌우측을 분리하고 액화질소에 넣어 고정시킨 상태에서 분석 전까지 -70°C의 deep freezer 내에 보존하였다.

모든 척수 신경조직 표본이 수집된 후 Western blot 분석에 의하여 조직 내 HSP90, HSP70 및 HSP27의 발현 정도를 관찰하였다. 즉, 표본에 5 부피의 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology, NY, USA)를 첨가한 후 약 2분간 초음파 처리한 후 원심분리로 모든 단백질을 추출해 내고 bio-rad protein assay reagent (Bio-Rad, CA, USA)를 사용한 분광측광기로 정량하였다. 이온영동에는 12%(w/v) SDS-polyacrylamide gel (25 μ g protein per lane)을 사용하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose transfer membrane (Schleicher and Schuell, Germany)으로 옮겼고, 비특이성 IgG는 3% BSA in tris buffered saline (TBS) 용액으로 차단하였

다. 막들을 일차 항체인 1 : 1,000 rabbit polyclonal antibody (H-114, Santa Cruz biotechnology, CA, USA), 1 : 1,000 mouse monoclonal HSP70 (W27, Santa Cruz biotechnology, CA, USA), 및 1 : 1,000 goat polyclonal HSP70 (M-20, Santa Cruz biotechnology, CA, USA) 들을 4°C 냉장고에서 밤새 처리하였다. TBS로 세척한 후에 배지를 1 : 2,000 peroxidase-conjugated rabbit anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat IgG (DAKO, Denmark) 와 함께 2시간 동안 반응시킨 후 Enhanced chemiluminescence (ECL) systems (Pierce, IL, USA)에 의해 특정 단백질 band를 확인하였다.

내부 표준 단백질로는 β -actin (C-2, Santa Cruz biotechnology, CA, USA)을 사용하였으며, Quantiyone (Bio-rad, CA, USA)을 이용하여 단백질들의 밴드의 density를 측정 한 후 β -actin에 대한 보정값으로 단백질들의 발현을 확인하였다.

자료는 Kruskal-Wallis ANOVA (SPSS ver 10.0, USA)를 이용하여 분석하였다($P < 0.05$).

결 과

포르말린 피하주사 후 1시간 동안은 포르말린 시험에서 보이는 전형적인 통증 양상인 제1기 및 제2기 통증 반응을 확인할 수 있었다. 그러나 포르말린 주사 24시간 후에는 포르말린 주사 1시간 동안 보였던 통증과 연관된 행동은 관찰되지 않았고, 생리식염수 투여 군의 행동 반응과 유사한 반응을 보였다

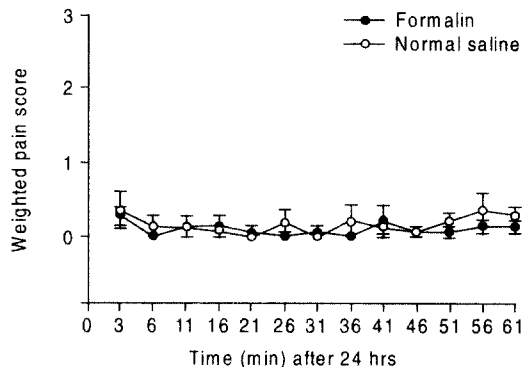
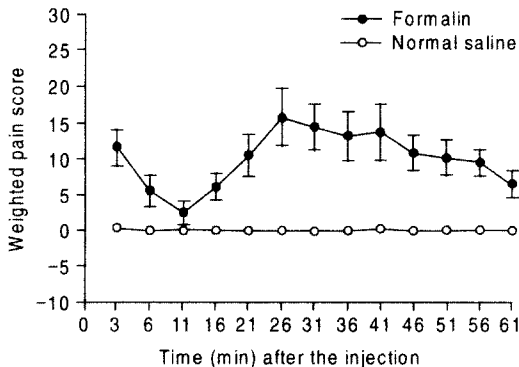


Fig. 1. Time course of 5% formalin-evoked weighted pain score of the 1 hr (left) or 24 hrs (right) after formalin injection and normal saline injected control group. Values depict mean \pm SEM for six or seven per group.

(Fig. 1).

대표적인 Western blot 결과를 보면, HSP70이 포르말린 투여 1시간 후에 양쪽 요수에서 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 24시간 후에는 모든 요수 조직에서 별다른 차이가 없었다(Fig. 2).

각 군마다 6-7개의 요수를 대상으로 내부 표준물질인 시행한 β -actin으로 보정한 Western blot의 결과를 보면 HSP70은 포르말린 주사 1시간 후에 대조군에 비하여 의미있는 발현의 증가를 보였으나, 24시간 후에는 대조군과 차이가 없었다. 다른 열충격 단

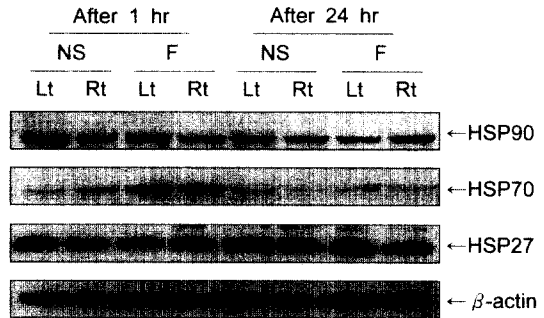


Fig. 2. Representatives of Western blots concerning heat shock proteins (HSPs). One hour after the formalin injection, HSP70 from the spinal cord was overexpressed compared to that of 24 hr after formalin injection and normal saline injected control groups. Lt, left; Rt, right; NS, normal saline injected group; F, formalin injected group.

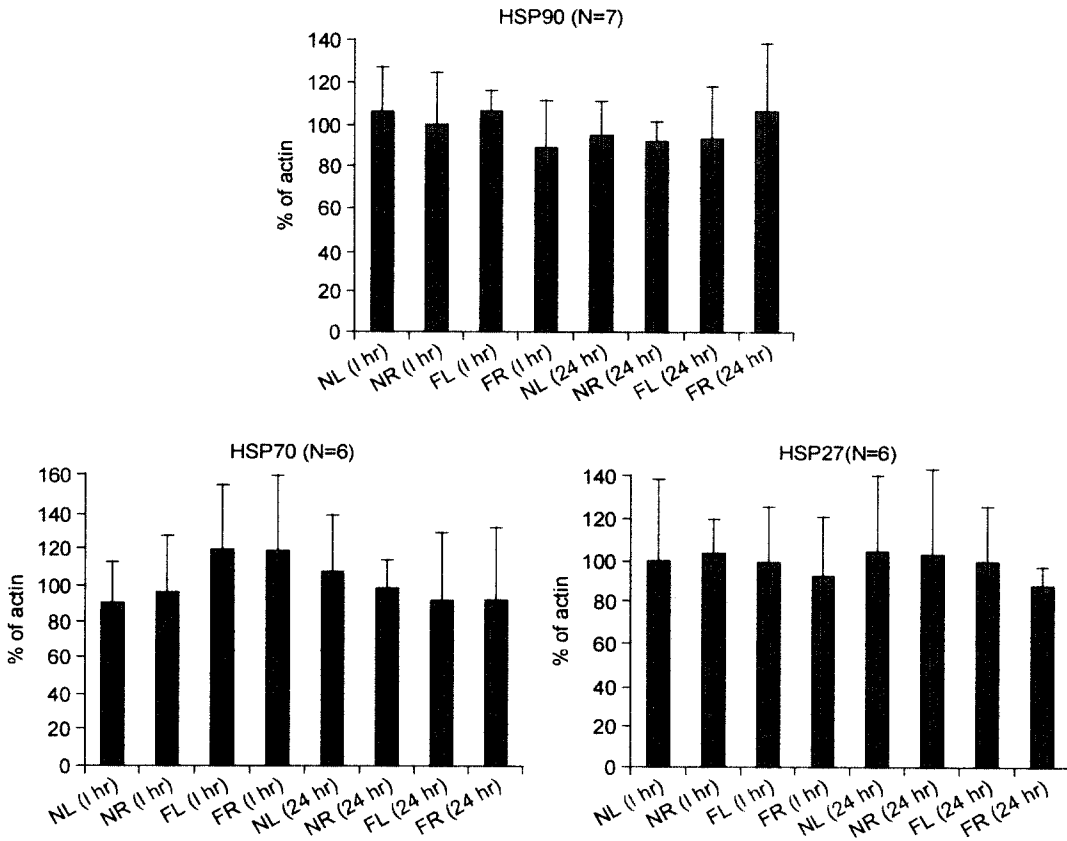


Fig. 3. Effect of formalin induced pain on protein expression of Hsp90, Hsp70, and Hsp27. Mean \pm SEM. *P < 0.05 compared to control group. NL: left side of spinal cords of normal saline injected group, NR: right side of spinal cords of normal saline injected group, FL: left side of spinal cords of formalin injected group, FR: right side of spinal cords of formalin injected group.

백질들인 HSP90과 HSP27은 대조군에 비하여 별다른 차이가 없었다(Fig. 3).

고 찰

HSP들은 단세포 동물에서부터 포유동물에 이르기까지 비교적 잘 유지되어 온 세포내 단백질들로서 고온, 중금속, 알코올, 자외선 조사, 허혈 및 감염 등의 여러 스트레스에 의하여 과생성된다.¹¹⁾ HSP들의 중요한 역할은 세포내에서 새로 생성된 단백질이나 펩타이드와 결합하여 3차원적 구조를 조절함으로써 세포들이 제 기능을 발휘할 수 있게 하며, 스트레스와 관련되어 신생 변성 단백질들과 결합하여 단백질 구조를 수정하거나, 이들의 대사와 관련된 일들을

수행함으로써 “molecular chaperon”이라 불리고 있다.¹²⁾

HSP들은 스트레스에 의해 유도되는 inducible heat shock protein (HSP)과 스트레스 자극과는 상관없이 세포내에 일정량 발현되는 cognate heat shock protein (HSC)으로 구분된다. 일반적으로, HSC는 대사과정에서 housekeeping 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데, 새로 합성된 polypeptide의 형태와 단백질 막간 이동 및 단백질 분해를 도와서 세포내 소포의 통행과 신호전달에 관여하며, 세포사멸(apoptosis) 과정과 세포 주기의 진행에 관련된다.¹²⁾

HSP들은 분자량에 따라 다양하게 분류된다. 본 연구에서는 중추신경계에서 스트레스에 반응하여 발현되는 대표적인 HSP90, HSP70 및 HSP27을 관찰하

였다. 일반적으로, HSP90은 스테로이드 수용체의 일부로, HSP27은 세포내 골격구조 및 세포내 이동에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾

HSPs 중 가장 많이 세포내 기능이 알려져 있는 것은 HSP70이다. HSP70은 열내성 및 여러 형태의 스트레스 자극에 대한 세포 수준에서의 내성 및 저항 획득에 관여한다.²⁾

포르말린시험은 조직손상과 연관된 급성 통증을 통증 행동을 통하여 관찰하는 것으로 통증 연구에 많이 이용되는 동물 모델이다. 포르말린시험은 포르말린 주입 후 1시간 동안 이루어지는데, 전형적인 이상성(biphasic) 통증 행동 양상을 관찰할 수 있다. 주사 후 10분 동안(제1기)에 특징적인 통증 행동이 나타나 점차 감소하다가 포르말린 주입 20-60분(제2기)에 다시 통증행동이 나타나며, 그 정도가 제1기보다 심한 것으로 알려져 있다. 제1기 반응은 조직손상과 연관된 침해수용기의 활성화에 의한 것이고, 제2기는 WDR 신경세포의 wind-up 현상에 의한 중추신경계의 변형, 즉 중추감작을 반영하는 것으로 지속적인 침해수용기의 신호전달에 의한 것이다.¹³⁻¹⁶⁾ 본 연구의 통증행동반응에서도 전형적 이상성 통증 행동 양상을 관찰할 수 있었다. 포르말린 주입 24시간 후에 통증행동을 보이지 않은 것은 포르말린에 의하여 구성성 C 섬유 구조가 손상을 받아 더 이상의 신호전달이 척수로 전달되지 않은 결과로 생각된다.

본 실험에서는 포르말린 주사 1시간 후에 주사된 발의 감각신경 세포가 있는 제5번과 6번 요수에서 대조군 및 통증이 동반되지 않은 염증 상태인 포르말린 주사 24시간 후와 비교하여 유의한 HSP70의 발현증가를 확인할 수 있었다. 이는 HSP70이 스트레스성 자극들에는 비특이적으로 발현되는 점을 생각할 때, 포르말린이 주입된 발의 염증에 의한 신경으로부터의 신호전달의 스트레스에 의한 HSP70의 발현은 배제할 수 있어, 침해 수용기를 통한 신호전달에 의한 중추감작과 연관될 가능성이 높다.

한편, HSP들이 신경손상에 대한 치유반응을 조절한다는 가설을 뒷받침하는 증거들이 있는데, 서로 다른 조직손상 모델들에서 HSP70의 과생산이 세포 사멸에 방어작용을 할 수 있음을 보고하였다.¹⁷⁻²⁰⁾ 그러나 스트레스 단백질이 세포 생존과는 무관한 부수적인 현상일 수도 있기 때문에 이러한 단백질의 세

포내 기능은 아직까지도 규명되지 않았다.²⁰⁾ 본 연구에서 확인된 HSP70의 발현이 중추감작의 과정에 어떤 역할을 하는 지는 추가 연구가 필요하리라 본다.

결론적으로, 이 연구에서는 백에서 포르말린 피하주사 후 말초신경을 통한 침해수용성 신경전달에 의한 척수에서의 중추감작에는 HSP70의 발현이 관여됨을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Moseley P: Heat shock proteins: a broader perspective. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 233-4.
2. Kiang JG, Tsokos GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 183-201.
3. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA: Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci* 1999; 22: 97-9.
4. Sorkin LS, Westlund KN, Sluka KA, Dougherty PM, Willis WD: Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time-course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. *Brain Res Brain Res Rev* 1992; 17: 39-50.
5. Yaksh TL: The spinal pharmacology of facilitation of afferent processing evoked by high-threshold afferent input of the postinjury pain state. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 250-6.
6. Dickenson AH: A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 307-9.
7. Ohtsuka K, Suzuki T: Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull* 2000; 53: 141-6.
8. Ambrosini MV, Mariucci G, Tantucci M, Bruschi G, Giuditta A: Induction of cerebellar hsp72 in rats learning a two-way active avoidance task. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 70: 164-6.
9. Kaneko M, Abe K, Kogure K, Saito H, Matsuki N: Correlation between electroconvulsive seizure and HSC70 mRNA induction in mice brain. *Neurosci Lett* 1993; 157: 195-8.
10. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (editorial). *Pain* 1983; 16: 109-10.
11. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ: The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 1997; 32: 1729.
12. Mayer MP, Bukau B: Hsp70 chaperone systems: di-

- versity of cellular functions and mechanism of action. *J Biol Chem* 1998; 379: 261-8.
13. 홍정연, 이운우, 이영숙, 남용택: 복강내 투여된 morphine, nalbuphin, ketorolac이 흰쥐 formalin test에 미치는 진통효과. *대한마취과학회지* 1998; 35: 438-45.
 14. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A: The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40: 229-38.
 15. Wheeler-Aceto H, Cowan A: Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991; 104: 35-44.
 16. Dickenson AH, Sullivan AF: Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987; 30: 349-60.
 17. Marber MS, Mestrlil R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH, et al: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95: 1446-56.
 18. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, et al: Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 1995; 95: 1854-60.
 19. Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, Moreadith RW, Graves KH, Zhao P, et al: Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2339-42.
 20. Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK: The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Tod* 1999; 5: 525-31.
-