



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사 학위 논문

백서의 허혈-재관류로 유발된
복합부위통증증후군 동물모델에서
비타민 C의 효과

2014년 2월

서울대학교 대학원
의학과 마취통증의학전공
김 재 현

A thesis of the Doctor' s degree

The effect of vitamin C in an
animal model of complex regional
pain syndrome produced by
prolonged hindpaw ischemia–
reperfusion in rats

February 2014

The Department of medicine,
Seoul National University
College of Medicine
Jae Hun Kim

초 록

서론: 복합부위통증증후군은 극심한 통증과 함께 동반되는 다양한 증상들을 특징으로 하는 질환이다. 복합부위통증증후군의 발생 기전으로 여러 가지 요인들이 복합적으로 관련되어 있는데, 그 중에 중요한 역할을 한다고 생각되는 것으로는 자유 라디칼과 산화 스트레스의 증가가 있다. 이번 연구에서는, 제 1형 복합부위통증증후군을 대변한다고 생각되는 만성 허혈 후 통증(chronic post-ischemic pain, CPIP) 모델에서의 비타민 C 투여를 통해 복합부위통증증후군이 이미 발생한 환자들의 치료에 비타민 C의 투여가 과연 효과가 있을 것인지를 가늠해 보고 비타민 C의 용량에 따른 효과에 차이가 있는지를 확인해 보았다.

방법: 체중 250-350 g의 수컷 백서 49개체들을 대상으로 세보플루란으로 마취를 유도한 후 왼쪽 족관절 근위부에 O-ring을 거치하고 3시간 뒤 이를 제거해 줌으로써 허혈-재관류를 일으켰다. 마취에서 깬 백서를 대상으로 CPIP 모델이 확립되었는지를 확인하기

위해 48시간 동안 기계적 자극에 대한 역치 변화를 관찰하였고 28 개체들에서 CPIP 모델이 확립되었다. 이들을 4개의 군($n = 7$)으로 나누었는데, 비타민 C를 경구 투여하지 않은 대조군, 5일 동안 하루에 1 mg 경구 투여한 1.0군, 2.5 mg 투여한 2.5군, 7.5 mg 투여한 7.5군으로 분류하였다. 각각의 군에서 비타민 C 투여 전, 투여를 시작한지 1일째, 5일째, 12일째와 26일째에 50% 기계적 회피 역치를 측정하였다. 또, 각 모델의 미정맥에서 혈액을 채취하여 약물 투여 전, 투여 시작 후 1일째, 5일째, 그리고 12일째에 채취한 혈액을 통해 혈중 총항산화제 농도(total antioxidant status, TAS)와 혈중 요산의 농도(uric acid concentration, UAC)를 측정하고 비교하였다.

결과: 비타민 C의 용량에 따른 50% 기계적 회피 역치에서 대조군과 1.0군, 7.5군 사이에는 통계적인 차이가 없었으나, 2.5군은 비타민 C 투여 후 대조군이나 1.0군보다 역치가 더 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$).

비타민 C 투여군의 각 시기별 혈중 TAS와 UAC의 값을 대조군과 비교한 결과 혈중 TAS는 2.5군과 7.5군에서 비타민 C 투여 시

작 후 1일째와(2.5군; $P = 0.041$, 7.5군; $P = 0.018$), 12일째에 (2.5군; $P = 0.002$, 7.5군; $P = 0.003$) 대조군과 유의한 차이는 것으로 나타났고, 혈중 UAC는 7.5군에서 비타민 C 투여 후 1일째에 대조군과 유의한 차이가 있었다($P = 0.025$).

각 군 내에서 비타민 C 투여 전과 후의 값을 비교하였을 때 50% 기계적 회피 역치에서 1.0군에서는 비타민 C 투여 후 1일째에($P = 0.027$), 2.5군에서는 비타민 C 투여 후 5일째와($P = 0.046$) 26일째에($P = 0.028$) 각각 통계적으로 유의한 증가가 있었다. 혈중 TAS에서는 대조군에서 비타민 C 투여 후 12일째에 통계적으로 유의한 증가가 있었고($P = 0.018$), 1.0군에서는 비타민 C 투여 12일째에 유의한 증가가 있었고($P = 0.028$), 7.5군에서는 1일째에 통계적으로 유의한 증가가 있었다($P = 0.043$). 혈중 UAC는 대조군에서 5일째에 유의한 증가가 있었고($P = 0.042$), 2.5군에서는 비타민 C 투여 후 1일째에 통계적으로 유의한 감소가 있었다($P = 0.027$).

결론: 적정 용량의 비타민 C 투여(2.5 mg/day)는 CPIP 모델에서 증가되어 있는 산화 스트레스를 줄여주면서 증가된 항산화물질들을

감소시켜 주었고, 이는 신경병증 통증과 관련해 감소된 기계적 회피
역치를 회복시키는 효과도 있었다. 이로 미루어 볼 때 비타민 C는
복합부위통증증후군 발생 초기에 투여할 경우 치료 효과가 있을 것
으로 기대된다.

.....
주요어: antioxidants, chronic post-ischemic pain model,
complex regional pain syndrome, oxidative stress, vitamin C

학 번: 2010-31139

목 차

초록.....	i
목차.....	v
표 목록.....	vi
그림 목록.....	vii
서론	1
연구 대상 및 방법.....	5
연구 결과	18
고찰	27
참고문헌	34
영문초록	39

표 목 록

Table 1. Experimental table of mechanical withdrawal threshold	14
Table 2. Time-course changes of 50% mechanical withdrawal threshold within each group	22
Table 3. Time-course changes of blood total antioxidative status within each group.....	24
Table 4. Time-course changes of blood uric acid concentration within each group.....	26

그림 목록

Fig. 1. Sprague–Dawley in the cage·····	6
Fig. 2. Anesthesia of rat with sevoflurane·····	9
Fig. 3. Photographs of rat hindpaws ·····	10
Fig. 4. Test of 50% withdrawal threshold with von Frey filament·····	13
Fig. 5. Flow chart of the study·····	15
Fig. 6. Time–course changes of 50% mechanical withdrawal threshold within each group ·····	21
Fig. 7. Time–course changes of blood total antioxidative status within each group·····	23
Fig. 8. Time–course changes of blood uric acid concentration within each group·····	25

서 론

복합부위통증증후군(complex regional pain syndrome, CRPS)은 국소적으로 증상이 나타나고, 원인으로 생각되는 손상이나 수술에 의해 정상적으로 예상되는 것보다 통증이 더 심하고 지속시간도 더 길면서 일반적으로는 동반되지 않는 다양한 증상들과 징후들이 함께 존재하는 질환이다^{1, 2}. 이러한 동반 증상들과 징후들로는 이질통(allodynia), 통각과민(hyperalgesia), 자발통(spontaneous pain)을 비롯한 극심한 통증과 함께 병변 부위의 피부 온도 변화나 색깔 변화와 같은 혈관운동 변화(vasomotor change), 부종, 병변 부위에 땀이 비정상적으로 많이 나거나 아니면 오히려 땀이 적게 나는 발한 이상(sudomotor change), 관절의 가동범위(range of motion)의 감소나 근력 저하(motor weakness), 떨림(tremor), 근육의 긴장 이상(dystonia) 등과 같은 운동 변화(motor change), 모발이나 손톱, 피부에 발생하는 이영양성 변화(trophic change) 등이 있다¹⁻⁴.

⁴. 복합부위통증증후군의 발생은 대부분의 경우 외상이나 수술, 캐스트 고정 등과 관련이 되어 있다고 알려져 있지만 일부에서는 원인 미상으로 발병하는 경우도 있다. 또, 손상과 관련이 있다고 하더라도 그 정도와는 크게 관련이 없는 것으로 알려져 있는 등 발생기전이나 원인에 대해서는 정확히 알고 있지 않은 것이 사실이다^{1, 2}.

복합부위통증증후군은 제 1형과 제 2형의 두 가지로 분류가 되는데, 이들에서 나타나는 질병의 양상은 유사하나 제 1형은 신경손상이 없이 발생하는 경우이고, 제 2형은 신경손상이 있으면서 발생하는 복합부위통증증후군을 말한다.

이러한 복합부위통증증후군의 약물치료는 항경련제, 항우울제, 아편양제제, 스테로이드제제, N-methyl-D-aspartate(NMDA) 통로 차단제, 칼슘 조절 약제 등이 널리 사용되고 있다^{2, 4}. 약물요법 외에도 신경블록, 물리치료, 직업치료(occupational therapy), 인지행동 치료(cognitive-behavior therapy), 바이오피드백(biofeedback), 척수자극술(spinal cord stimulation), 척수강내약물주입펌프(intrathecal drug administration system) 삽입술 등 다학파적인 다양한 치료가 이루어지고 있다. 이처럼 복합부위통증증후군을 위한 다양한 치료방법이 있다는 것은 다시 말해 복합부위통증증후군을 치료하는데 아주 효과가 좋은 특정한 치료법은 없다는 반증이기도 하다. 이 외에도 자유 라디칼(free radical) 제거제가 효과가 있다는 보고도 있다^{5, 6}. 이는 산소 자유 라디칼이 복합부위통증증후군의 발생과 관련이 있다는 보고에 바탕을 두고 있는데⁷⁻¹¹, 제 1형 복합부위통증증후군의 경우 조직 손상과 관련해 나타나는 염증 반응에서 독성을 가진 산소 자유 라디칼이 과량 생성되는 과정이 기여하는

것으로 생각되고 있다⁸.

2004년 캐나다의 McGill 대학에서 Coderre 등에¹² 의해 소개된 만성 허혈 후 통증(chronic post-ischemic pain, CPIP) 모델은 백서의 뒷다리에 허혈과 재관류를 만들어 신경 자체에는 손상이 없으면서 부종이나 색깔 변화, 통각과민, 이질통 등의 증상을 재현한 동물 모델이다. 이 모델은 신경 손상 없이 복합부위통증증후군과 유사한 증상이 유발되기 때문에 제 1형 복합부위통증증후군을 잘 대변하는 모델로 생각되고 있다^{12, 13}. 이 모델의 경우 허혈과 재관류 과정을 통해 발생한 자유 라디칼이 증상 발생에 기여하는 것으로 생각되고 있고, 이 모델을 사용한 여러 연구들에서 자유 라디칼 제거제를 투여할 경우 증상이 호전되는 것으로 보고하고 있다^{12, 14}.

Zollinger 등은¹⁵⁻¹⁷ 비타민 C를 투여한 환자군에서 복합부위통증증후군의 발생이 더 적었고, 또 비타민 C는 복합부위통증증후군을 예방하는 효과가 있다는 연구결과를 보고한 바 있다. 그러나 효과적인 비타민 C의 농도가 얼마인지, 또 비타민 C를 투여하는 것이 어떤 기전에 의해, 어떤 항산화제(antioxidant)를 통해 작용하는 것인지에 대한 연구는 많지 않다. 따라서, 이번 연구에서는 CPIP 모델에서 비타민 C를 투여함으로써 백서의 혈중에서 total

antioxidant status(TAS)를 측정하고 그 정도의 차이에 따라 증상의 개선과 관련이 있는지를 관찰하였다. 또, 여러 가지 용량의 비타민 C를 투여함으로써 효과적인 비타민 C의 용량은 얼마인지, 또 비타민 C의 용량을 높여가면 이에 비례하는 효과가 있는 것인지를 확인할 수 있을 것으로 기대하였다.

마지막으로 지금까지의 연구들은 외상이나 수술 후 환자들에서 비타민 C의 투여가 복합부위통증증후군의 발생에 예방효과가 있는지에 대한 내용이 대부분이었다. 본 연구에서는 제 1형 복합부위통증증후군을 대변한다고 생각되는 CPIP 모델에서 비타민 C 투여를 통한 연구를 함으로써 복합부위통증증후군 환자들의 치료에서도 비타민 C의 투여가 과연 효과가 있을 것인지를 가늠해 볼 수 있게 해 줄 것으로 기대하였다.

연구 대상 및 방법

연구대상은 분당서울대병원 동물실험위원회(IACUC)의 허가(52-2011-009)를 얻은 후에 체중 약 250-350 g의 수컷 백서(Sprague-Dawley, Orient Bio Co., Ltd., Seoul, Korea) 49개체를 대상으로 하였다. 모든 백서는 톱밥을 깐 플라스틱 케이지에 사육하되 하나의 케이지에 세 마리 이하의 백서를 넣고(Fig. 1), 일정한 온도(섭씨 21도 내외)를 유지시켰다. 사육 환경으로는 깨끗한 물과 사료를 공급하면서, 12시간 광주기성을 맞추어 주었다. 모든 백서는 모델 확립 전 최소 일주일간의 적응기간을 주어 실험실 환경에 적응시켰고, 모델 확립에 앞서 행동관찰 실험을 실시하여 이상이 없음을 확인하였다. 행동관찰 실험은 해당 백서가 경련, 소리를 지르는 등의 심한 흥분증상이나 과호흡이 나타나는지를 관찰하였고, 매일의 식사습관, 수면 및 행동양상의 변화가 있는지를 확인하였다.



Fig. 1. A Sprague-Dawley rat in the cage

1. CPIP 모델의 확립

모든 실험은 한 연구자에 의해 시행되었다. 백서를 밀폐된 상자에 옮기고 산소(3 L/min)와 3% 세보플루란(sevoflurane)으로 마취를 유도하였고, 약 3분 후 의식이 없어지면 2-3%의 세보플루란을 자체 제작한 마스크를 통해 투여하여 마취를 유지시켰다(Fig. 2). 이후, 마취가 된 백서의 왼쪽 뒷다리 족관절 근위부에 7/32인치 Nitrile 70 durometer O-ring(O-rings West, Seattle, WA)을 거치시켜 3시간 동안 유지하였다. O-ring은 안쪽 복사(medial malleolus) 근위부에 거치해 그 위치를 표준화시켰다. 이후 O-ring을 잘라 제거한 뒤 30분 정도 재관류 되는 양상을 확인하고 마취에서 회복시켰다(Fig. 3).

O-ring을 제거하고 재관류 후 1시간, 4시간, 24시간, 48시간 경과시점에서 von Frey filament(monofilament, Stoelting Co., Wood Dale, IL)로 50% 기계적 회피 역치(mechanical withdrawal threshold)를 확인하여 CPIP 모델 확립 여부를 확인하였다. 재관류 후 48시간에 확인한 기계적 회피 역치에서, 제일 마지막에 크기가 4.08이나 이보다 작은 크기의 von Frey filament에서 백서의 회피 반응이 나타났을 경우 CPIP 모델에 적합한 기계적 회피 역치가 확립된 것으로 하였다. 반면, 48시간이 경과해도 통각과민

(hyperalgesia)이나 이질통의 양상이 나타나지 않으면 실험에서 제외하였다(Table 1). CPIP 모델에서 냉, 온 자극에 대한 통각과민은 잘 발현되지 않기 때문에 이번 연구에서는 검사하지 않는 것으로 하였다.



Fig. 2. Anesthesia of a rat using sevoflurane

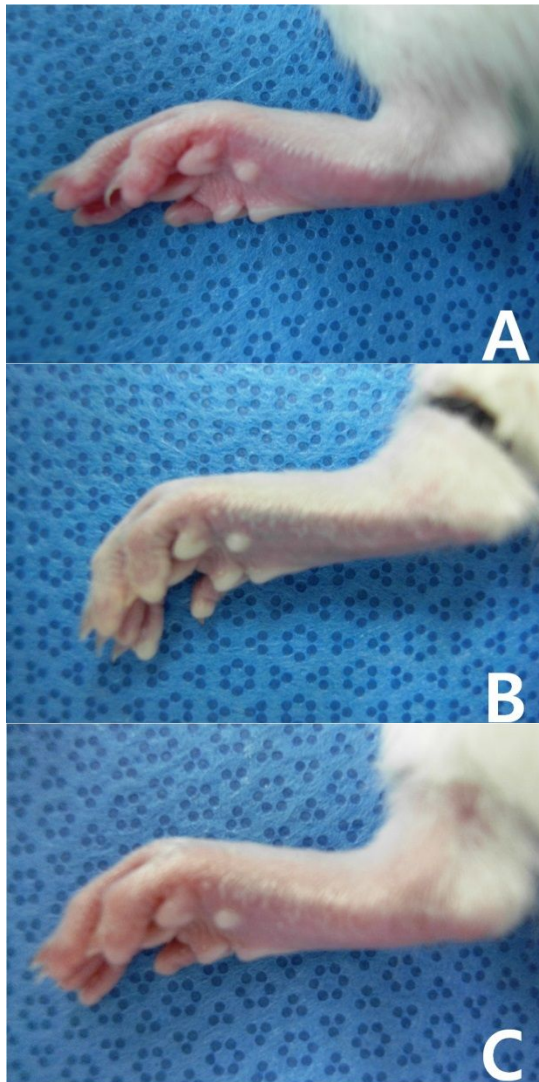


Fig. 3. Photographs of rat hindpaws

(A) before applying a tourniquet, (B) during applying a tourniquet, and (C) color change and mild edematous change of hindpaw at 24 h after reperfusion

결과적으로, 총 49마리의 백서를 대상으로 하여 28마리의 CPIP 모델이 확립되었다.

2. 실험군

CPIP모델이 확립된 28마리의 백서를 무작위로 7마리씩 4개의 군으로 나누어 실험하였다. 대조군(n=7)은 증상 발현 후 약물을 주입하지 않았다. 1.0군(n=7)은 모델이 발현된 실험 후 2일째부터 5일간 매일 비타민 C(sicobin inj., Myungmoon pharm Co., LTD, Seoul Korea) 1 mg을 주사기를 이용해 경구 복용시켰다. 2.5군(n=7)은 5일간 매일 비타민 C 2.5 mg을, 7.5군(n=7)은 비타민 C 7.5 mg을 투여하였다.

3. 기계적 회피 역치

바닥이 가늘고 촘촘한 철망으로 만들어진 플라스틱 실험상자에 CPIP 모델이 확립된 백서를 넣고 von Frey filament로 좌측 병변부 발바닥에 직각으로 접촉하고 filament가 약간 굽어질 정도로 2-3초간 힘을 주었을 때 백서가 회피 반응을 보이거나 발바닥을 핥는 경우에 반응을 보인 것으로 간주하였다(Fig. 4). 사용한 filament 규격은 3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93, 5.18로 8개였는데,

각각 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 15.0 g에 해당한다. 실험은 2.0 g(4.31 filament)를 이용해 시작하였는데, 이후 백서의 반응에 따라 filament를 증가 또는 감소시키면서 총 6번에 걸쳐 각각 다른 filament를 적용하였고, 이에 따라 반응의 역치를 구하였다¹⁸(Table 1). 각각의 filament에 대해 5회 적용하였는데, 중간에 3분간의 휴지를 가졌고, 5회 중 3회 이상에서 반응을 보이면 양성으로 기록하였다. 모든 백서에서 50% 회피 역치를 계산하였고 각 von Frey filament에 대한 양성/음성 반응에 따라 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$50\% \text{ 회피 역치 (g)} = 10^{[X(f) + Kd]/10000}$$

-X(f): 마지막으로 사용한 von Frey filament의 log unit

-K: Dixon 교정상수, 양성/음성 반응의 평판가¹⁸

-d: 사용한 filament들의 log unit 간의 평균차,

이 연구에서는 0.224

50% 회피 역치는 투약 전, 투약 1일째, 투약 5일째 그리고 12일째(투약 종료 후 7일째)와 26일째(투약 종료 후 21일째)에 각각 측정하였다(Fig. 5).



Fig. 4. Test of 50% withdrawal threshold using von Frey filament

Table 1. Experimental table of mechanical withdrawal threshold

Size	Before ischemia				1hr after reperfusion				4hr after reperfusion				24hr after reperfusion				48hr after reperfusion			
3.61																				
3.84																X			O	
4.08			X												O	O			O	
4.31	X	O	X	X					X				X	O			O			
4.56		O		O	X				X				O							
4.74						X				X	X									
4.93							X				O	O								
5.18								X												

Size: size of von Frey filament

Before ischemia: before applying tourniquet (O-ring)

O: There was withdrawal activity of rat.

X: There was no withdrawal activity of rat.

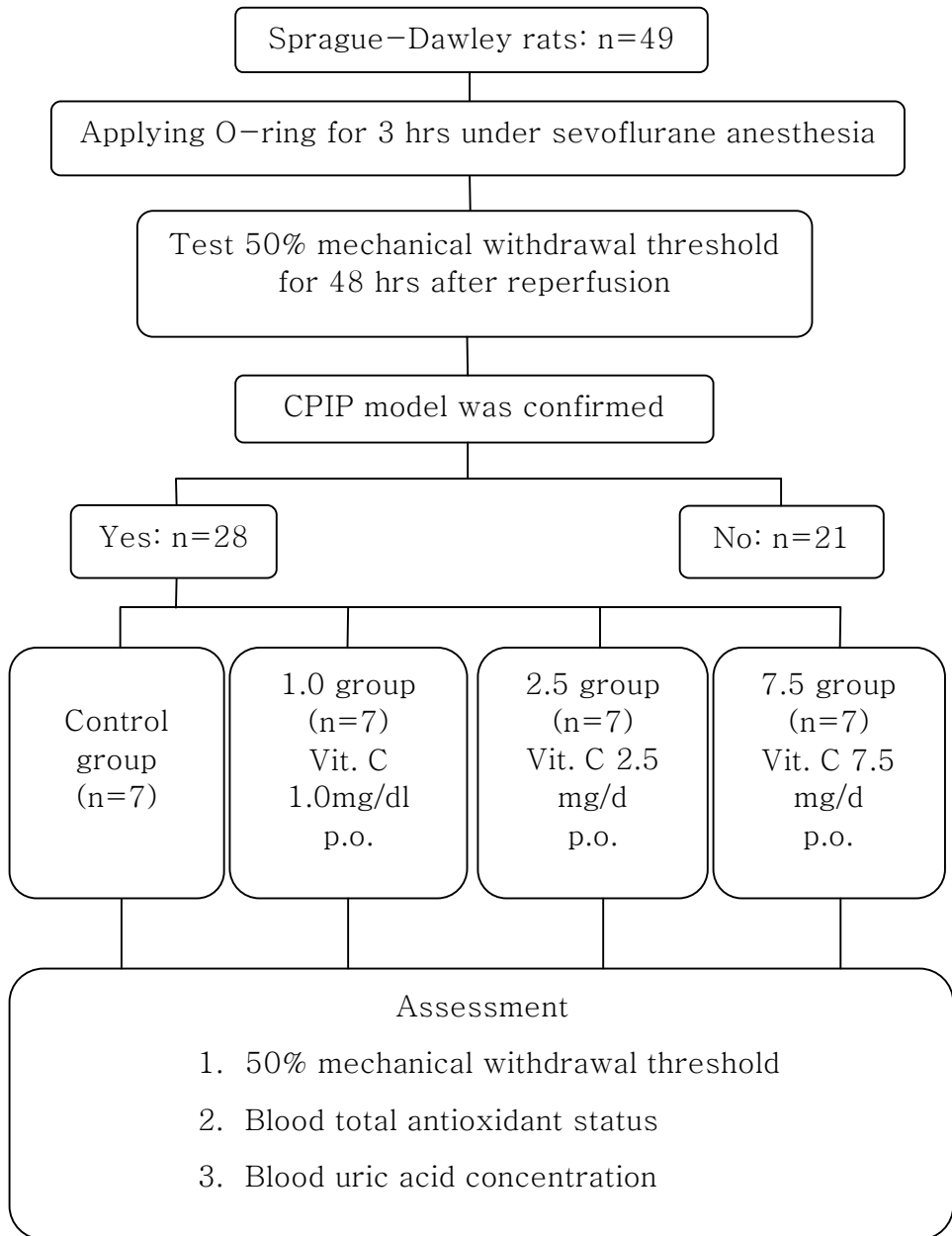


Fig. 5. Flow chart of the study

4. 혈액 채취

CPIP 모델이 확립된 백서의 미정맥(caudal vein)에서 약물투여 전, 약물투여 후 1일째, 5일째, 12일째에 각각 혈액채취를 시행하였다. 이들 혈액채취는 아침에 조식 투여 전에 시행하였다. 혈액은 EDTA가 함유된 튜브에 담아 8℃에서 1시간 가량 보관하고 4℃에서 3000 rpm으로 원심분리하였으며 이후 -20℃에서 polypropylene 튜브에 담아 보관하였다.

5. 혈중 총항산화 상태의 측정

혈중 TAS는 이를 측정할 수 있는 kit(Randox Labs., Crumlin, UK)를 이용해서 조사하였다. 이는 ABTS[®](2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid])라는 물질이 peroxidase (metmyoglobin) 및 H₂O₂와 함께 작용해 안정된 라디칼 양이온(radical cation)을 형성하게 되는데 이를 측정하는 방법으로 TAS 농도를 구하는 제품이다.

혈중 요산의 농도(uric acid concentration, UAC)는 Sentinel CH에서 만든 kit(Sentinel CH, Milano, Italy)를 이용하여 측정하였다.

6. 통계적 분석

모든 통계 분석은 SPSS 18을 이용해 시행하였다

약제의 용량에 따른 50% 기계적 회피 역치, 혈중 TAS, 혈중 UAC의 값은 repeated measures ANOVA로 검증하였다.

또, 사후검증을 대신해서 50% 기계적 회피 역치, 혈중 TAS, 혈중 UAC 값의 결과에서 각 시기별로 대조군과 비타민 C 투여군과의 비교는 Mann-Whitney U test로 하였고, 각 군 내에서 비타민 C 투여 전과 투여 후의 비교는 Wilcoxon signed rank test로 하였다.

$P < 0.05$ 일 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 보았다.

결 과

비타민C의 용량에 따른 50% 기계적 회피 역치에서 대조군과 1.0군(비타민 C 1 mg 투여군), 7.5군(비타민 C 7.5 mg 투여군) 사이에는 차이가 없었다. 그러나, 2.5군(비타민 C 2.5 mg 투여군)은 비타민 C 투여 이후 대조군과 1.0군보다 역치가 더 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$) (Fig. 6).

혈중 항산화상태와 관련해서는 혈중 TAS와 혈중 UAC를 repeated measures ANOVA로 분석한 결과 대조군과 비타민 C 투여군 간에는 유의한 차이가 없었다(Figs. 7,8). 그러나, 비타민 C 투여군의 각 시기별 혈중 TAS와 혈중 UAC를 대조군과 비교한 결과 혈중 TAS에서는 2.5군에서 비타민 C 투여 후 1일째에 1.133 ± 0.053 mmol/l로 대조군의 0.958 ± 0.246 mmol/l보다 높았고 ($P = 0.041$), 12일째에 1.024 ± 0.186 mmol/l로 대조군의 1.252 ± 0.068 mmol/l보다 낮았다($P = 0.002$). 7.5군에서도 비타민 C 투여 후 1일째에 1.270 ± 0.059 mmol/l로 대조군보다 높았고($P = 0.018$), 12일째에는 0.841 ± 0.344 (7.5군; $P = 0.003$)로 대조군보다 낮았다. 혈중 UAC에서는 7.5군에서 비타민 C 투여 후 1일째에 1.729 ± 0.419 mg/dl로 대조군의 1.250 ± 0.345 mg/dl 보다 높았다($P = 0.025$). 그러나, 비타민 C 투여 전 혈중 TAS 값에

서는 7.5군에서 1.199 ± 0.083 mmol/l로 대조군의 0.993 ± 0.120 mmol/l 보다 높았고($P = 0.004$), 비타민 C 투여 전 혈중 UAC에서는 2.5군에서 1.986 ± 0.626 mmol/l로 대조군의 1.267 ± 0.535 mmol/l와 차이가 있었다($P = 0.016$) (Figs. 7,8).

각 군 내에서 비타민C 투여 전과 투여 후의 값을 비교하였을 때 50% 회피 역치에서 대조군과 7.5군은 시간의 경과에 따른 차이가 없었고, 1.0군에서는 비타민 C 투여 후 1일째에 0.736 ± 0.173 g으로 비타민 C 투여 전의 0.558 ± 0.129 g 보다 높았고($P = 0.027$), 2.5군에서는 비타민 C 투여 후 5일째에는 2.312 ± 1.784 g($P = 0.046$), 26일째에는 2.942 ± 2.240 g으로($P = 0.028$) 비타민 C 투여 전의 0.674 ± 0.296 g 보다 각각 유의한 증가가 있었다(Table 2). 혈중 TAS에서는 대조군에서 12일째에 1.252 ± 0.068 mmol/l로 비타민 C 투여 전의 0.993 ± 0.120 mmol/l 보다 통계적으로 유의한 증가가 있었고($P = 0.018$), 1.0군에서도 12일째에 1.331 ± 1.101 mmol/l로 투여 전의 0.913 ± 0.719 mmol/l 보다 높았다($P = 0.028$). 2.5군에서는 시간 경과에 따른 차이가 없었으며, 7.5군에서는 비타민 C 투여 1일째에 1.270 ± 0.059 mmol/l로 비타민 C 투여 전의 1.199 ± 0.083 mmol/l 보다 유의한 증가가 있었다($P = 0.043$) (Table 3). 혈중 UAC를

비교하였을 때에는 대조군에서 5일째에 1.550 ± 0.718 mg/dl로 투여 전의 1.267 ± 0.535 mg/dl 보다 높았고($P = 0.042$), 1.0군과 7.5군에서는 시간경과에 따른 차이가 없었으며 2.5군에서는 비타민 C 투여 후 1일째에 1.171 ± 0.263 mg/dl로 투여 전의 1.986 ± 0.626 mg/dl 보다 낮았다($P = 0.027$) (Table 4).

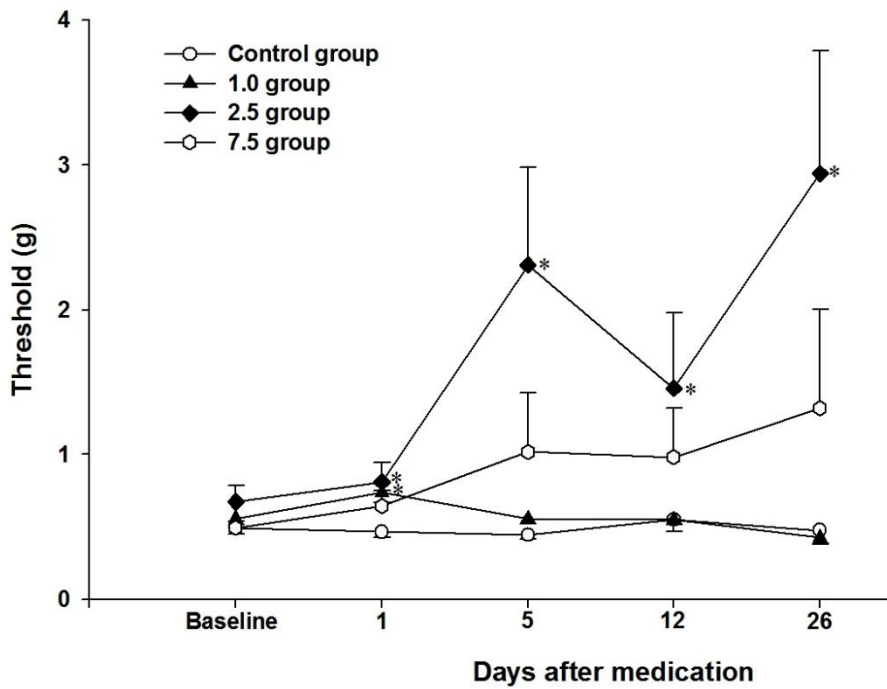


Fig. 6. Time-course changes of 50% mechanical withdrawal threshold within each group

*: $P < 0.05$ vs. control group

Error bar: standard error

Table 2. Time-course changes of 50% Mechanical withdrawal threshold within each group

Day after medication	Group	Mean \pm SE (g)	P value (vs. Baseline)
Baseline	Control	0.493 \pm 0.113	
	Group 1.0	0.558 \pm 0.129	
	Group 2.5	0.674 \pm 0.296	
	Group 7.5	0.493 \pm 0.113	
1	Control	0.465 \pm 0.107	0.598
	Group 1.0	0.736 \pm 0.173	0.027*
	Group 2.5	0.811 \pm 0.352	0.398
	Group 7.5	0.643 \pm 0.270	0.249
5	Control	0.442 \pm 0.066	0.140
	Group 1.0	0.555 \pm 0.095	0.705
	Group 2.5	2.312 \pm 1.784	0.046*
	Group 7.5	1.018 \pm 1.260	0.397
12	Control	0.548 \pm 0.089	0.416
	Group 1.0	0.517 \pm 0.239	0.463
	Group 2.5	1.457 \pm 1.386	0.115
	Group 7.5	0.981 \pm 0.905	0.236
26	Control	0.475 \pm 0.096	0.892
	Group 1.0	0.424 \pm 0.042	0.066
	Group 2.5	2.942 \pm 2.240	0.028*
	Group 7.5	1.319 \pm 1.808	0.273

*: $P < 0.05$ vs. baseline within each group

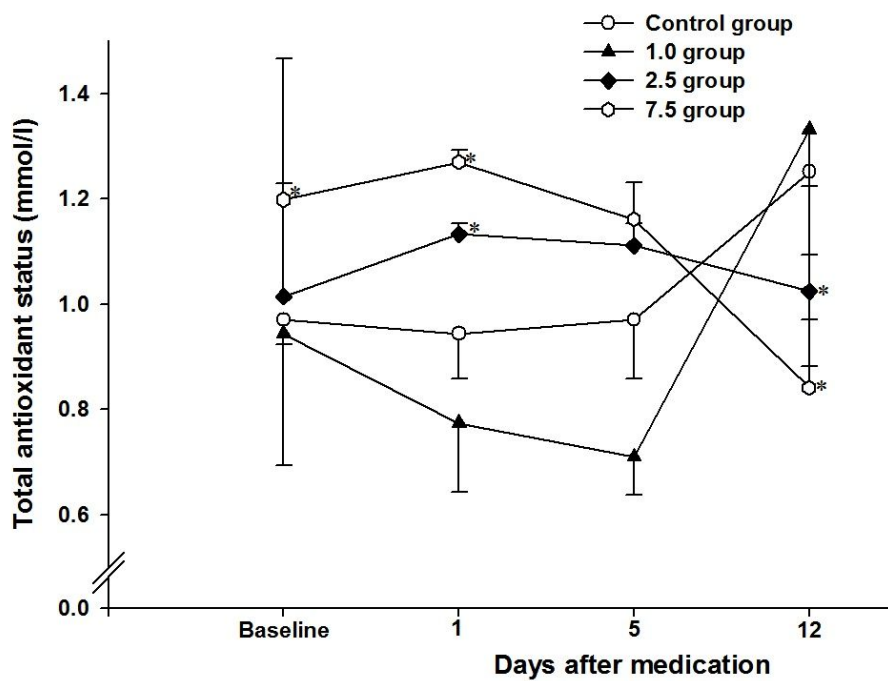


Fig. 7. Time-course changes of blood total antioxidative status within each group

*: $P < 0.05$ vs. control group

Error bar: standard error

Table 3. Time-course changes of blood total antioxidative status within each group

Day after medication	Group	Mean \pm SE (mmol/l)	P value (vs. Baseline)
Baseline	Control	0.993 \pm 0.120	
	Group 1.0	0.913 \pm 0.719	
	Group 2.5	1.014 \pm 0.119	
	Group 7.5	1.199 \pm 0.083	
1	Control	0.958 \pm 0.246	0.091
	Group 1.0	0.807 \pm 0.368	1.000
	Group 2.5	1.133 \pm 0.053	0.398
	Group 7.5	1.270 \pm 0.059	0.043*
5	Control	0.968 \pm 0.320	0.866
	Group 1.0	0.700 \pm 0.204	0.735
	Group 2.5	1.111 \pm 0.109	0.398
	Group 7.5	1.161 \pm 0.187	0.271
12	Control	1.252 \pm 0.068	0.018*
	Group 1.0	1.331 \pm 1.101	0.028*
	Group 2.5	1.024 \pm 0.186	0.917
	Group 7.5	0.841 \pm 0.344	0.733

*: $P < 0.05$ vs. baseline within each group

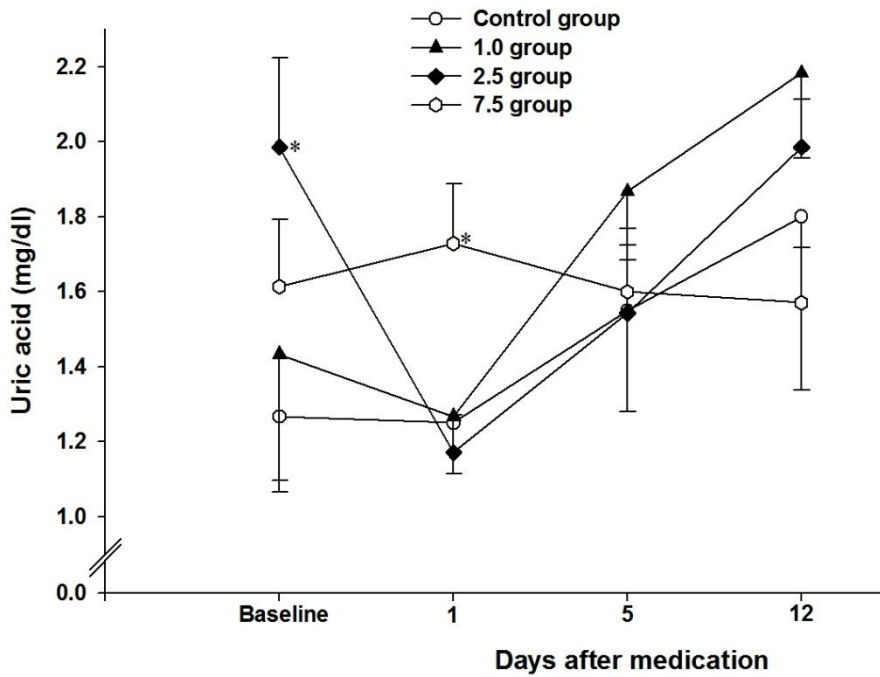


Fig. 8. Time-course changes of blood uric acid concentration within each group

*: $P < 0.05$ vs. control group

Error bar: standard error

Table 4. Time-course changes of blood uric acid concentration within each group

Day after medication	Group	Mean \pm SE (mg/dl)	P value (vs. Baseline)
Baseline	Control	1.267 \pm 0.535	
	Group 1.0	1.433 \pm 0.948	
	Group 2.5	1.986 \pm 0.626	
	Group 7.5	1.614 \pm 0.474	
1	Control	1.250 \pm 0.345	1.000
	Group 1.0	1.267 \pm 0.437	0.735
	Group 2.5	1.171 \pm 0.263	0.027*
	Group 7.5	1.729 \pm 0.419	0.611
5	Control	1.550 \pm 0.718	0.042*
	Group 1.0	1.867 \pm 0.288	0.553
	Group 2.5	1.543 \pm 0.597	0.237
	Group 7.5	1.600 \pm 0.327	0.611
12	Control	1.800 \pm 1.133	0.115
	Group 1.0	2.183 \pm 0.553	0.116
	Group 2.5	1.986 \pm 0.339	0.933
	Group 7.5	1.571 \pm 0.386	0.672

*: $P < 0.05$ vs. baseline within each group

고 찰

이번 연구에서 CPIP 모델의 백서에 비타민 C 2.5 mg을 5일간 투여하였을 때 기계적 역치 값이 대조군이나 비타민 C 1 mg 투여군 보다 더 높은 결과가 나왔다. 즉, 비타민 C 2.5 mg이 CPIP 모델에서 발생한 기계적 자극에 대한 이질통을 개선시키는데 기여하였다. 비타민 C 투여 후 1일째에는 비타민 C를 1 mg 투여한 군에서도 대조군에 비해 높은 값의 역치가 나타났었다. 이로 미루어 볼 때 비타민 C를 1 mg과 2.5 mg을 투여한 군에서 모두 증상의 개선에 효과를 보였고 이는 투여한지 1일 밖에 경과하지 않았음에도 대조군보다 유의한 차이를 나타냈다. 그러나 그 이후 시점에서 비타민 C를 1 mg 투여한 군은 기계적 역치에 대한 개선 효과가 뚜렷하지 않았고 2.5 mg 투여한 군에서만 지속적인 효과를 보였다. 또, 비타민 C 1 mg을 투여한 군보다 2.5 mg 투여한 군의 역치가 더 높았기 때문에, 비타민 C 1 mg과 2.5 mg 투여를 비교할 때 용량에 따른 역치의 개선 효과가 있다고 할 수 있다. 그러나 비타민 C 7.5 mg을 투여한 군에서는 대조군에 비해 역치 값에 차이가 없었다는 점은 우리가 기대했던 효과에 대한 용량 의존 관계에 의문을 가지게 만들었다.

비타민 C 7.5 mg 투여군에서 역치의 개선이 뚜렷하지 않았던

이유로 크게 두 가지를 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 실험군의 숫자가 많지 않았다는 점으로, 실제로는 7.5 mg에서도 기계적 자극에 대한 역치를 개선시키는 효과가 있지만 실험군의 숫자가 적어서 유의한 결과가 나오지 않았을 가능성을 생각할 수 있다. 또 다른 가능성으로는 비타민 C가 CPIP 모델에서 기계적 자극에 대한 역치를 개선시키는 효과가 있고 용량에 비례하는 효과가 있지만, 어느 한계 이상의 용량을 투여할 경우에는 오히려 증상을 개선시키는 효과가 떨어질 가능성도 생각해 볼 수 있다. Zollinger 등은¹⁶ 416명의 손목 골절 환자들을 대상으로 위약 투여군, 비타민 C 200, 500, 1500 mg/day 군으로 나누어 복합부위통증증후군 발생율을 조사하는 무작위 대조군 연구를 통해 1일 500 mg 투여군까지는 용량이 증가할수록 복합부위통증증후군의 발생율이 감소하는 양상을 보였지만, 1일 500 mg과 1500 mg을 투여한 경우의 비교에서는 복합부위통증증후군의 발생율에 큰 차이가 없었음을 보고한 바 있다. 그들은 이러한 결과를 바탕으로 복합부위통증증후군의 예방을 위해 비타민 C를 하루에 500 mg을 투여할 것을 권장하였다. 본 연구에서는 이미 신경병증 통증 양상이 발생한 백서에게 비타민 C를 투여하였을 때, 복합부위통증증후군의 예방을 위한 비타민 C 투여와 유사하게 비타민 C 2.5 mg 투여는 증상 개선에 효과가 있지만, 7.5 mg 투여는 용

량에 비해 효과가 떨어지는 결과를 보였다.

비타민 C의 경우 인체에서 1일 섭취량이 100 mg을 넘을 경우에는 대사되지 않은 아스코베이트(ascorbate)가 소변으로 배설되게 되고 1일 섭취량이 500 mg을 넘을 경우에는 더 이상 조직 내에서 아스코베이트의 농도 증가가 일어나지 않는다고 보고한 바 있다¹⁹. 이러한 결과는 앞서 언급한 Zollinger 등의¹⁶ 연구 결과에서 1일 500 mg 투여한 경우에는 복합부위통증증후군의 발생률이 낮았지만, 1일 1500 mg 투여한 경우에는 1일 500 mg 투여한 경우에 비해서 발병율이 차이를 보이지 않았다는 결과를 뒷받침한다고 할 수 있다.

Eisenberg 등은²⁰ 복합부위통증증후군의 발생 기전에 자유 라디칼과 산화 스트레스의 증가가 관여한다는 가설에 기인할 때 복합부위통증증후군 환자들의 체 내에는 항산화제와 자유 라디칼 제거제가 높은 농도로 존재할 것으로 생각하였고 이를 조사하는 연구를 하였다. 그들의 보고에 따르면 정상인과 복합부위통증증후군 환자들에서 타액과 혈장에 있는 항산화제와 자유 라디칼 제거제의 농도를 비교하였는데 복합부위통증증후군 환자에서 malondialdehyde, 혈중 TAS, 혈중 UAC가 정상인에 비해 모두 높았다. 따라서, 본 연구와 같은 CPIP 동물 모델에서도 마찬가지로

결과를 예상할 수 있다. 다시 말해 CPIP 모델에서도 혈중 TAS와 혈중 UAC가 높을 것으로 예상이 되며 이번 조사에서 CPIP 모델 확립 후 시간 경과에 따른 혈중 TAS와 혈중 UAC의 증가가 대조군에서 보였는데 이는 허혈-재관류 과정을 거치면서 증가된 산화 스트레스에 반응하기 위해 백서의 체 내에 항산화물질이 점차 증가하고 있었다는 것을 보여준다(Figs. 7,8). 그리고 이러한 변화는 산화 스트레스가 CPIP 모델이 확립되는 과정에 기여할 뿐 아니라 CPIP 모델이 확립되고 증상이 발현된 초기 시점에서도 지속적인 산화 스트레스가 존재하고 있다는 것을 암시해 준다. 따라서, 이러한 산화 스트레스를 감소시킬 수 있는 항산화제나 자유 라디칼 제거제를 복합부위통증증후군 발병 초기에 투여하는 것은 증상의 개선을 가져올 수 있을 뿐 아니라 질병이 진행되는 것을 막아주는 효과도 있을 것으로 보인다. 본 연구에서 대조군은 시간이 경과하면서 혈중 TAS가 증가한 데 비해, 비타민 C를 2.5 mg과 7.5 mg 투여한 군에서 대조군과 비교하였을 때 시간이 경과함에 따라 혈중 TAS가 유의하게 감소하는 현상을 보인 것은(Fig. 7, Table 3) 투여된 비타민 C로 인해 백서 체 내에 증가해 있던 산화 스트레스가 감소하였기 때문으로 해석된다. 혈중 UAC에서도 대조군은 시간의 경과에 따라 증가하는 양상을 보였지만, 비타민 C를 2.5 mg 투여한 군에서는 투

여한지 1일 후에 감소하는 소견을 보인 것도 동일한 이유에 기인한다고 생각된다(Fig. 8, Table 4).

허혈-재관류로 인한 손상은 중성구(neutrophil)에서 나오는 산화제(oxidant)에 의한 혈관의 내피(endothelium)와 내피하층(subendothelium)의 손상과 관련이 있다¹⁶. 연구에 의하면 비타민 C는 자유 라디칼을 감소시키는 효과 외에도 중성구에서 나오는 산화물질의 양을 감소시키는 효과가 있고 이는 산화물질에 의한 혈관 내피의 손상을 방어하는 역할을 함과 동시에 복합부위통증증후군에서 보이는 미세혈관의 기능장애나 염증반응을 예방하는 효과도 있다^{8, 10, 21, 22}.

이번 연구의 한계로는 첫째, 각 군에서 사용된 CPIP 모델 백서의 숫자가 많지 않았다. 비타민 C를 2.5 mg 투여한 군에서는 백서의 역치가 증가하는 효과를 보였지만, 7.5 mg 투여한 군에서는 뚜렷한 효과가 없었다는 점, 혈중 TAS나 혈중 UAC에서 일부 유의한 차이를 보이긴 했으나 전 기간에 걸쳐 일관된 결과가 있지는 않았다는 점도 이와 관련이 있을 것으로 생각된다. 둘째, 각 군의 혈중 TAS와 UAC에서 비타민 투여전의 값에서는 차이가 없어야 하는데, 그렇지 못했다는 점 또한 이번 연구에서의 한계점이다. 셋째, 비타민 C 2.5 mg 투여군에서는 유의한 개선효과가

있었던 반면 비타민 C 7.5 mg 투여군에서는 뚜렷한 차이가 없었고, 이를 명확하게 설명하기 어렵다는 점도 이번 연구에서 한계점으로 생각된다. 마지막으로, CPIP 모델 발현 초기에 투여한 비타민 C는 증상을 개선시키는 효과가 있다고 하더라도 짧은 기간 동안 관찰한 결과이므로 질환의 경과가 오래 된 경우에도 효과가 있을 것인지는 추후 연구가 필요할 것으로 보인다. 비타민 C를 투여하는 기간에 있어서도 일괄적으로 5일간 약물을 투여하였기 때문에 실제 임상을 통해 복합부위통증증후군 환자에서 몇 일간 투여하는 것이 가장 효과적이지에 대한 연구도 뒤따라야 할 것이다.

비타민 C는 다양한 항산화제 가운데 우리 주변에서 흔히 구할 수 있고 또, 인간에게 투여하였을 때 그 안전성이나 부작용이 잘 알려져 있는 약제이다¹⁹. 따라서 새롭게 발견되거나 개발된 약제와는 달리, 효과만 있다면 즉시 환자에게 투여가 가능하고 또 우리 주변에서 쉽게 구할 수 있다는 장점이 있다. 이번 연구를 통해, 복합부위통증증후군이 발생한 초기에 환자에게 비타민 C를 투여하는 것은 산화 스트레스를 감소시켜 질병의 진행을 억제하고 통증과 관련된 증상을 개선시키는 효과가 있을 것으로 기대된다.

결과적으로, 적정 용량의 비타민 C 투여는 CPIP 모델에서 증가되어 있는 산화 스트레스를 줄여주면서 증가된 항산화물질들을 감소

시켜 주었고, 이는 신경병증 통증과 관련해 감소된 기계적 회피 역치를 회복시키는 효과도 있었다. 이로 미루어 볼 때 비타민 C는 복합부위통증증후군 발생 초기에 투여할 경우 증상을 개선시키는 치료 효과를 가지고 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Bruehl S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*. 2010;**113**:713–725.
2. van Eijs F, Stanton–Hicks M, Van Zundert J, Faber CG, Lubenow TR, Mekhail N, et al. Evidence–based interventional pain medicine according to clinical diagnoses. 16. Complex regional pain syndrome. *Pain Pract*. 2011;**11**:70–87.
3. Perez RS, Zollinger PE, Dijkstra PU, Thomassen–Hilgersom IL, Zuurmond WW, Rosenbrand KC, et al. Evidence based guidelines for complex regional pain syndrome type 1. *BMC Neurol*. 2010;**10**:20.
4. Albazaz R, Wong YT, Homer–Vanniasinkam S. Complex regional pain syndrome: a review. *Ann Vasc Surg*. 2008;**22**:297–306.
5. Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, et al. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*. 2003;**102**:297–307.
6. Maihofner C, Seifert F, Markovic K. Complex regional pain

syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. *Eur J Neurol.* 2010;**17**:649–660.

7. Kwak KH, Jung KY, Choi JY, Ryu T, Yeo JS, Park SS, et al. Contralateral allodynia and central change in the chronic post-ischemic pain model rats. *Korean J Anesthesiol AID - 10.4097/kjae.2009.56.4.419 [doi]*. 2009;**56**:419–424.

8. Oyen WJ, Arntz IE, Claessens RM, Van der Meer JW, Corstens FH, Goris RJ. Reflex sympathetic dystrophy of the hand: an excessive inflammatory response? *Pain.* 1993;**55**:151–157.

9. Goris RJ, Dongen LM, Winters HA. Are toxic oxygen radicals involved in the pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy? *Free Radic Res Commun.* 1987;**3**:13–18.

10. van der Laan L, Kapitein PJ, Oyen WJ, Verhofstad AA, Hendriks T, Goris RJ. A novel animal model to evaluate oxygen derived free radical damage in soft tissue. *Free Radic Res.* 1997;**26**:363–372.

11. van der Laan L, ter Laak HJ, Gabreels–Festen A, Gabreels F, Goris RJ. Complex regional pain syndrome type I (RSD):

pathology of skeletal muscle and peripheral nerve. *Neurology*. 1998;**51**:20–25.

12. Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, Bennett GJ. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*. 2004;**112**:94–105.

13. Kim TK, Shin SW, Jung H, Lim DG. The effects of superoxide dismutase on the expression of c-fos gene in the chronic post-ischemic pain model rats. *Korean J Anesthesiol AID - 10.4097/kjae.2008.55.1.78 [doi]*. 2008;**55**:78–86.

14. de Mos M, Laferriere A, Millecamps M, Pilkington M, Sturkenboom MC, Huygen FJ, et al. Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). *J Pain*. 2009;**10**:1161–1169.

15. Zollinger PE, Tuinebreijer WE, Kreis RW, Breederveld RS. Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomised trial. *Lancet*. 1999;**354**:2025–2028.

16. Zollinger PE, Tuinebreijer WE, Breederveld RS, Kreis RW. Can vitamin C prevent complex regional pain syndrome in patients with wrist fractures? A randomized, controlled, multicenter dose-response study. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;**89**:1424–1431.
17. Zollinger PE, Kreis RW, van der Meulen HG, van der Elst M, Breederveld RS, Tuinebreijer WE. No Higher Risk of CRPS After External Fixation of Distal Radial Fractures – Subgroup Analysis Under Randomised Vitamin C Prophylaxis. *Open Orthop J*. 2010;**4**:71–75.
18. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;**53**:55–63.
19. Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res*. 2009;**58 Suppl 1**:S13–17.
20. Eisenberg E, Shtahl S, Geller R, Reznick AZ, Sharf O, Ravbinovich M, et al. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*. 2008;**138**:226–232.

21. Herbaczynska-Cedro K, Wartanowicz M, Panczenko-Kresowska B, Cedro K, Klosiewicz-Wasek B, Wasek W. Inhibitory effect of vitamins C and E on the oxygen free radical production in human polymorphonuclear leucocytes. *Eur J Clin Invest.* 1994;**24**:316-319.
22. Matsuda T, Tanaka H, Hanumadass M, Gayle R, Yuasa H, Abcarian H, et al. Effects of high-dose vitamin C administration on postburn microvascular fluid and protein flux. *J Burn Care Rehabil.* 1992;**13**:560-566.

Abstract

Introduction: Complex regional pain syndrome (CRPS) is a disease with severe pain. The pathophysiology of CRPS is complex; and it is known that increased free radical and oxidative stress is one of the major causes. The administration of vitamin C as an antioxidant can reduce the occurrence of CRPS from several investigations. In this study, we tested the hypothesis that vitamin C has dose-related treatment effect in chronic post-ischemic pain (CPIP) model.

Methods: A total 49 male-rats which have weight from 250 to 350 g were used. After anesthesia with sevoflurane, tight-fitting of O-ring for 3 hours at left proximal ankle and removal of the ring was conducted to lead ischemia and reperfusion. To confirm neurologic symptoms, the withdrawal threshold was investigated for 48 hours and CPIP model was confirmed in 28 rats. There are 4 groups: control (no medication), group 1.0 (administration of vitamin C 1 mg/day for 5 days), group 2.5

(administration of vitamin C 2.5 mg/day for 5 days) and group 7.5 (administration of vitamin C 7.5 mg/day for 5 days). Fifty percent mechanical withdrawal threshold was checked before administration of vitamin C, on 1st day and on 5th day after administration of vitamin C, and on 7th day and on 21th day after the discontinuation of vitamin C. Both total blood antioxidant status (TAS) and uric acid concentration (UAC) before the administration of vitamin C, on 1st day and on 5th day after the administration of vitamin C, and on 7 day after the discontinuation of vitamin C were measured from blood sample of the tail.

Results: Fifty percent mechanical withdrawal threshold of group 2.5 was higher that of control and group 1 after the administration of vitamin C ($P < 0.05$). But there are no difference between group 2.5 and group 7.5.

One day after the administration of vitamin C, blood level of TAS and UAC were different between control and group 7.5 ($P < 0.05$). One day and 12 days after the administration, the blood

TAS was different between control and group 2.5 ($P < 0.05$).

In comparison of withdrawal threshold between at baseline and after the administration of vitamin C in each group, the threshold of group 1.0 on day 1 after the administration of vitamin C ($P = 0.027$) and that of group 2.5 on day 5 ($P = 0.046$) and day 26 ($P = 0.028$) after the administration of vitamin C were higher than that of baseline. The blood TAS of control group 12 days after the administration of vitamin C ($P = 0.018$), that of group 1.0 12 day after the administration of vitamin C ($P = 0.028$) and that of group 7.5 1day after the administration of vitamin C ($P = 0.043$) was higher than that of baseline. The blood UAC of control group 5 days after administration of vitamin C was higher ($P = 0.042$) and that of group 2.5 1 day after administration of vitamin C was lower than that of each baseline ($P = 0.027$).

Conclusion: The administration of proper dose of vitamin C can reduce the oxidative stress and increased antioxidants and recover the mechanical threshold. It is suggested that vitamin C

has treatment effect in early stage of CRPS.

.....
keywords: antioxidants, chronic post-ischemic pain model,
complex regional pain syndrome, oxidative stress, vitamin C

Student Number: 2010-31139