

신경병증 통증 모델 쥐에서
통각과민성에 대한 말초
신경펩타이드의 역할

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 봉 효

신경병증 통증 모델 쥐에서
통각과민성에 대한 말초
신경펩타이드의 역할

지도교수 임 중 우

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 봉 효

김봉효의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

그 어느 날, 백광세 선생님의 저한테 주신 자극의 말씀 한마디가 오늘 제가 이 자리에 있게 되었음을 먼저 고백하며 선생님께 감사를 드립니다.

그동안 본 논문이 완성되기까지 자상한 지도와 가르침을 베풀어주신 임중우 선생님과 끊임없는 조언과 격려를 베풀어주신 남택상 선생님께도 머리 숙여 깊은 감사의 말씀 전합니다. 그 외에 여러모로 조언을 아끼지 않으셨던 박수철 신경과 교수님과 이배환 임상센터 교수님께도 고마운 말씀 드리며 실험에 많은 도움을 주신 생리학 교실의 여러 연구원님께도 이 자리를 빌어 감사드립니다.

제가 오늘 이 자리에 있기까지 곁에서 늘 사랑과 미소를 건네준 저의 사랑하는 부인 성양희님께 이 논문을 드리고 저 합니다. 그리고 늘 저의 기쁨이 되어준 자식들 하고도 이 순간을 같이 나누고 저 합니다.

여러분 모두에게 다시 한번 감사를 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 차례	
국문요약 -----	1
I. 서론 -----	3
II. 재료 및 방법 -----	6
1. 동물 준비 -----	6
2. 신경병증 모델 제작 -----	6
3. 행동검사 -----	7
4. 단일 신경섬유의 신경활동 기록 -----	7
5. 통각신경섬유의 반응역치와 초역치자극에 대한 반응도 측정 -----	8
6. 투약 -----	9
7. 통계처리 -----	9
III. 결과 -----	11
1. 분석 대상의 통각신경섬유 -----	11
2. 자발적 신경임펄스 -----	12
3. 기계자극과 열자극에 대한 반응역치 -----	12
4. 초역치자극에 대한 반응크기 -----	14
5. 신경결찰 유도 통각과민반응에 있어서 말초 substance-P나 CGRP 수용체의 역할 -----	17
IV. 고 찰 -----	25
V. 결 론 -----	30
참고문헌 -----	31
영문요약 -----	36

그림 차례

그림 1. 기계 및 열자극에 대한 C-섬유 반응도의 예 -----	13
그림 2. C- 및 A δ -섬유의 기계자극반응역치에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교 -----	15
그림 3. C-섬유의 열자극반응역치에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교 -----	16
그림 4. C- 및 A δ -섬유의 초역치기계자극에 대한 반응의 크기에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교 -----	18
그림 5. C-섬유의 초역치열자극에 대한 반응의 크기에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교 -----	19
그림 6. 후근절단과 척수신경결찰을 실시한 모델군과 허위수술을 실시한 대조군에 있어서 발 회피반응 역치의 변화 -----	21
그림 7. 후근절단 후 척수신경을 결찰한 모델쥐에서 결찰 전 SP나 CGRP 수용체 길항제의 처치가 신경결찰에 의해 유발되는 회피반응 역치 감소(통각과민반응)에 미치는 영향 -----	22
그림 8. 후근절단 후 척수신경을 결찰한 모델쥐에서 신경결찰에 의해 회피반응 역치 감소(통각과민 반응)가 유발된 후 이에 SP나 CGRP 수용체 길항제의 처치가 미치는 영향 -----	23

국문요약

신경병증 통증 모델 쥐에서 통각과민성에 대한 말초 신경펩타이드의 역할

말초신경 손상은 자발통, 이질통, 통각과민 등과 같은 신경병증통증을 야기한다. 신경병증통증의 한 원인이 일차 구심신경의 특징 변화 때문일 것이라는 실험 증거가 제시된 바 있다. 이러한 변화로서 손상 받은 구심신경 섬유는 자발적 신경발화 생성이 있는데, 이에 관해서는 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 변화에 관한 다른 가능성은 손상 받지 않은 온전한 통각신경 섬유의 민감화인데 이에 관해서는 연구가 되어 있지 않다. 한편, 신경손상 시 구심섬유에서 생성된 신경임펄스는 척수 쪽 뿐 아니라 말초 피부 쪽으로도 전도되어 양쪽의 신경말단에서 신경펩타이드와 같은 물질을 방출한다. 척수에서 방출되는 신경펩타이드의 신경병증통증 생성에 대한 역할에 관해서는 잘 알려져 있으나, 말초에서의 신경펩타이드의 역할에 관해서는 잘 알려지지 않고 있다. 본 연구에서는 신경병증 상황 하에서 말초 피부의 통각 수용기가 민감화되었는지를 조사하고, 말초의 신경펩타이드가 신경병증통증 생성에 기여할 수 있는가를 검증함을 연구목표로 삼았다.

수술(제5요 척수신경 결찰 수술 또는 대조실험을 위한 허위수술) 후 2~5주 경과 시, 신경손상을 받은 신경병증군에서는 기계적 통각과민 반응이 유발되었으나, 허위수술을 받은 대조군에서는 그렇지 않았다. 이들 두 군을 대상으로 단일신경활동 기록실험을 통해 발 피부에 분포하는 장딴지신경(sural nerve)과 발바닥신경(plantar nerve) 내 단일 통각섬유의 반응 및 신경활동 특성을 조사해 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉 1) 자발적 신경발화를 보이는 통각섬유의 빈도는 신경병증군(10.3%, 155 섬유 중 16 섬유)이 대조군(1.4%, 69 섬유 중 1 섬유)보다 높았고, 2) 통각섬유의 반응을 유발시키는 기계 및 열자극의 역치(반응역치)는 신경병증군이 대조군보다 낮았고, 3) 초역치자극강도의 기계자극에 의해 유발되는 반응의 크기(반응크기)는

신경병증준이 대조군보다 높았다. 두 번째 실험에서는 쥐에서 신경병증을 유도하기 위해 좌측의 제5요 후근(L5 dorsal root)을 절단한 후 동측의 제5요 척수신경을 결찰 하였는데, 이 경우 척수신경결찰에 의해 구심섬유에서 생성된 신경임펄스 중 척수로 입력되는 것은 차단되고 말초로 전도되는 것만 허용된다. 이 모델 쥐에서 제5요 척수신경 결찰 후 손상 측 발에 가해준 가는 필라멘트 대한 발 도피반응의 역치가 감소되었다(기계적 통각과민 반응으로 간주). 신경펩타이드인 SP와 CGRP의 수용체에 대한 길항제를 제5요 척수신경 결찰 직전에 손상 측 발바닥에 주입한 결과, 이들 길항제는 모두 발 도피반응 역치의 감소를 2~4일 지연시켰다(통각과민 반응 유발 지연). 한편, 이들 길항제를 제5요 척수신경 결찰에 의해 발 도피반응 역치 감소가 이미 유발된 상황 하에서 주입한 결과, CGRP 수용체 길항제 만이 감소되었던 역치를 약 105분 간 반전시켰다(통각과민 반응 억제).

이들 결과는 1) 부분적 말초신경손상 후 손상 받지 않은 온전한 신경이 분포하는 피부에 존재하는 통각수용기가 기계 및 열자극에 대해 민감화되었으며, 2) 말초피부에서의 신경펩타이드는 통각과민반응 생성에 관여하는데, 이때 SP와 CGRP는 이 반응의 유도(또는 개시)에 그리고 CGRP는 이 반응의 유지에 기여하였음을 의미한다. 이는 말초에서 방출된 신경펩타이드가 그 곳에 존재하는 손상 받지 않은 통각수용기를 민감화함으로써 신경병증통증 생성에 관여할 것임을 시사한다.

핵심되는 말: 신경병증통증, 신경손상, 기계적 통각과민, 통각수용기,
민감화, 신경펩타이드, 역방향성 임펄스

신경병증 통증 모델 쥐에서 통각과민성에 대한 말초 신경펩타이드의
역할

<지도교수 **임종우**>

연세대학교 대학원 의과학과

김봉호

I. 서론

말초신경의 손상은 신경병증성 통증(neuropathic pain)을 유발하는데, 이는 외부자극이 없이도 느끼는 자발통(spontaneous pain), 유해자극에 대해 정상보다 강하게 느끼는 통각과민(hyperalgesia), 무해자극에 대해 느끼는 이질통(allodynia) 등을 포함한다¹. 이러한 신경병증성 통증은 일차구심신경에서의 변화 때문일 수 있다는 증거가 제시된바 있다^{2,3,4}. 특히 중요한 변화로서 일차구심신경에서 자발적 신경임펄스가 새로 생긴다는 것인데, 그 결과 척수 내 체감각신경의 민감화 즉 중추성 민감화(central sensitization)가 유도된다. 쥐를 이용해 제5 및 제6요(L5, L6) 척수신경을 결찰한 신경손상 모델은 신경병증성 통증에 관한 동물모델로 흔히 이용되어지고 있다⁵. 이 모델을 이용한 연구에서 얻는 실험결과에 기초하여 신경병증성 통증의 생성 기전을 다음과 같이 설명하고 있다. 즉, 신경손상 후 구심신경의 손상 부위나 후근절세포에서 자발적 신경임펄스가 생기고 이들이 척수로 입력되어 척수 내 체감각신경을 민감화 시키며, 이 민감화된 척수신경에는 말초로부터 손상 받지 않은 구심신경이 연결되어 결과적으로 손상된 신경으로부터 생성된 자발적 신경임펄스는 자발통 생성에 관여하며 손상 받지 않은 구심신경은 통각과민과 이질통 등의 유발통 생성에 관여한다는 것이다. 이 “손상 섬유” 가설에서는 손상 받은 구심신경의 변화로서 자발적 신경임펄스의 생성에 관한 중요성을 강조하였는데, 다음의 실험결과는 이 가설을 뒷받침한다. 즉, 자발적 신경임펄스는 결찰모델 쥐의 손상된 척수신경 내 A-

신경섬유에서만 관찰되는데, 이 임펄스는 발생 후 시간경과에 따른 변화 양상에 있어서 신경병증성 통증 행동의 변화 양상과 일치함을 보였다^{6,7,8,9,10}. 그러나 이 가설에서 아직 풀리지 않은 의문점은 A-섬유의 자발적 신경임펄스가 척수 신경의 과민화를 유도할 수 있는가이다. 왜냐하면 척수신경의 과민화는 C-섬유의 신경활동에 의해서 유발 수 있음은 잘 알려져 있으나, A-섬유의 신경활동에 의해 유발된다는 증거는 없기 때문이다.

또 다른 가설로는 신경손상 시 손상된 신경섬유에 이웃하며 손상 받지 않은 구심섬유에서의 변화(특히 자발적 임펄스의 유도)가 신경병증성 통증 생성에 기여한다는 것이다. 이 “비손상 섬유” 가설은 다음의 실험결과에 의해 뒷받침된다. 즉, L5-L6 척수신경결찰 모델쥐에서 척수신경 손상 후 손상 받지 않고 살아남은 구심섬유 중 C-섬유에서 자발적 신경임펄스가 유도되었고^{11,12}, 신경병증성 통증 행동은 C-섬유에서 주로 발현된다고 알려져 있는 테트로도톡신-저항성 소듐이온 통로(TTX-R Na-통로) 단백질인 Nav1.8의 항체 처리에 의해 그 생성이 감소되었으며¹³, C-섬유만 선택적으로 사멸시킨다고 알려진 capsaicin을 손상 받지 않은 신경에 처리한 결과 이미 생성되었던 신경병증성 통증 행동이 제거되었다¹⁴. 이상의 결과는 손상 받지 않은 C-섬유의 신경활동이 신경병증성 통증 생성에 기여할 것임을 의미한다.

말초신경손상 후 살아남은 C-섬유에서 일어날 수 있는 또 다른 변화로서 통각수용기 민감화(nociceptor sensitization)가 있을 수 있으며, 이러한 통각수용기 민감화를 신경병증성 통증의 말초 기전으로 생각할 수 있다. 말초조직에 염증이 생성된 후에는 염증부위에서 기원하는 염증성 통증이 나타나는데, 이 경우 염증이 통각수용기의 민감화를 유도하며 이러한 민감화가 염증성 통증 생성에 기여함은 잘 알려져 있다^{15,16}. 한편 신경병증 하에서 통각수용체 민감화 가능성에 관한 실험결과가 있다. 즉, 신경병증을 유도하는 말초신경손상은 손상성 임펄스발화(injury discharge)를 생성하고 이 임펄스는 구심섬유를 통해 척수 쪽과 말초 쪽 양쪽으로 전도되는데, 특히 말초 쪽으로 전도되는 임펄스가 말초조직에서 substance-P (SP)와 calcitonin gene-related peptide (CGRP)와 같은 신경펩타이드의 분비를 향진시킴이 말

초신경의 역방향자극(antidromic stimulation) 실험에 의해 밝혀졌다^{17,18}. 이들 신경펩타이드 중 SP는 무릎관절에 분포하는 구심섬유를 민감화함이 관찰되었다¹⁹. 그러나 아직까지 신경병증 하에서 통각수용기 민감화가 일어났는지에 관한 직접적인 증거는 없는 상태이다.

말초의 신경펩타이드는 통증유발에 관여할 수 있는데, 이는 구심신경의 말초 쪽 말단 부위와 후근절세포에서 SP와 CGRP 수용체의 존재를 관찰한 연구결과^{20,21}와 말초조직에 이들 각 수용체의 효현제 처리가 통증반응을 유발하며 이러한 통증반응은 각 수용체의 길항제 처리에 의해 억제된다는 연구결과²²에 의해서 추측할 수 있다. 한편, 신경병증통증의 경우에는 그 통증유발에 척수 내 신경펩타이드가 관여함이 확인되었다. 즉 신경병증통증 모델 쥐에서 척수 내에 주입한 SP나 CGRP 수용체 길항제에 의하여 통증행동이 억제됨을 보였다^{23,24}. 그러나 이들 신경펩타이드가 말초에서 신경병증통증 생성에 관여하는지에 관해서는 아직 밝혀지지 않았다.

이상의 연구 결과에 기초하면 신경병증 하에서 피부 통각수용기의 민감화와 말초의 신경펩타이드가 신경병증통증 생성에 기여할 것이라는 가설을 설정할 수 있다. 본 연구의 목표는 이 가설을 증명하기 위해 1) 신경병증성 통증 하에서 피부 통각수용기의 민감화가 유도되는지, 2) 신경병증성 통증 유발에 있어서 말초의 신경펩타이드가 관여하는지를 밝힘이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 준비

실험동물로는 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley 종, 150~250g)를 이용하였는데, 이들은 3~4마리 씩 그룹지어 사육통에서 유지하였다. 수술 전 일주일부터 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하고, 자연스런 낮과 밤 주기에 맞추어 환경에 적응하도록 했다. 행동검사는 동물이 검사받기 전 30분 가량 주변 환경에 익숙하게 한 후 실시하였다. 본 연구에서 계획된 모든 실험은 연세대학교 의과대학 동물관리 지침을 준수하여 실시하였다.

2. 신경병증 모델 제작

두 가지 신경병증 모델 쥐를 이용하였다. 먼저 단일 구심성 통각섬유의 신경활동 기록실험에서 사용한 신경병증 모델은 Kim 및 Chung⁵에 의해 발표된 방법을 이용하여 제작하였다. 즉 enflurane 마취 하에서 좌측 제5요 척수신경(lumbar spinal nerve)의 일부를 노출시켜 이를 수술용 6-0 견사실로 단단히 묶어 결찰하고, 결찰부위에서 말초 쪽으로 약 1 mm 가량 떨어진 곳을 미세가위로 절단하였다. 대조군을 위해서는 신경의 결찰 및 절단 과정만을 제외하고는 모델 군과 동일하게 수술을 실시하였다. 수술이 끝난 뒤 근육과 피부를 봉합하여 회복실로 복귀시켰다.

한편 신경펩타이드 작용 억제제의 말초피부 내 국소 주입에 의한 영향을 조사하는 실험에서는 좌측의 제5요 척수신경 결찰에 더하여 6일 전에 동측의 제5 후근(dorsal root)을 절단한 모델 쥐를 이용하였다. 이 경우 제5 후근 절단은 enflurane 마취 하에서 제5요 척추 수준에서 추궁절제술(laminectomy)을 실시한 후 경막(dura matter) 일부를 절개하여 제5요 후근을 노출시킨 뒤 이를 약 5 mm 정도 부분 잘라 제거하였다. 수술이 끝난 뒤 근육과 피부를 봉합하여 회복실로 복귀시켰다. 7일 후 제5요 척수신경 결찰은 앞서 언급한 방법과 동일하게 실시하였다.

3. 행동검사

척수신경 손상 후 통증반응 유발 여부는 행동검사를 통하여 조사하였다. 동물을 금속철망(망 간격, 0.5x0.5 cm) 위쪽에 위치한 투명한 플라스틱 상자(8x8x24 cm) 안에 넣은 뒤, 이들이 환경 변화에 따르는 스트레스를 피하도록 30분 동안 적응시켰다. 동물이 적응된 후 가는 필라멘트(von Frey 필라멘트)가 부착된 자극기를 이용하여 철망 사이로 필라멘트를 뒤 발바닥에 가해주면서 발의 회피 반응 여부를 조사하였다. 여기서 회피반응을 일으키기 위한 필라멘트의 최저 강도를 회피반응 역치(PWT, paw withdrawal threshold)라고 정의하고 이를 구하여 통증반응 정도의 지표로 삼았다. 즉, 회피반응 역치가 감소하면 통증의 정도가 증가하는 것으로 판단하였다. 이때 회피반응 역치는 기존에 발표된 상하 검증법(up-down testing paradigm)으로 측정하였다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 여러 강도의 필라멘트(3.5, 5.3, 7.8, 25, 37, 52, 60, 125 mN) 중, 처음에 25 mN짜리 필라멘트를 시작으로 발바닥 중앙 부위를 3초간 찌르는데, 이에 회피반응을 보이면 한 단계 낮은 강도의 필라멘트를 그리고 반응을 하지 않으면 한 단계 높은 강도의 필라멘트를 선택하여 두 번째 자극을 가한다. 이와 같이 하여 회피반응을 보이기 시작하는 필라멘트 강도를 시점으로 그 이후 네 번째에 가해주게 되는 필라멘트의 강도를 역치강도로 결정한다. 검사절차 및 역치계산은 Chaplan 등²⁵에 의해 기술된 내용을 따라서 실시하였다.

4. 단일 신경섬유의 신경활동 기록

신경활동기록실험은 신경손상(모델군의 경우)이나 허위수술(대조군의 경우) 후 2~5주에 실시하였다. Urethane(1.5 g/kg)을 쥐의 복강 내에 투여하여 마취시키고, 신경손상을 가해준 쪽의 뒷다리를 절개하여 장딴지신경(sural nerve)과 발바닥신경(plantar nerve)을 노출시켰다. 노출된 신경과 조직은 따뜻한 paraffin oil로 채워진 pool을 만들어 보호하였고, 손상을 받은 뒷발은 고무찰흙으로 고정시켰다. 해부현미경하에서 이들 신경을 주위조직으로부터 분리하고, 좌골신경(sciatic nerve)과 합쳐지기 직전에 절단하여 그

끝을 oil pool안의 거울 위에 올려놓았다. 직장 내 온도는 자동온도조절 열방석을 이용하여 37°C로 유지시켰다.

해부현미경하에서 장딴지신경과 발바닥신경의 단일신경섬유를 기록하기 위해 거울로 만들어진 platform위에서 정교한 핀셋으로 가늘게 분리(teasing)하였다. 단일신경섬유의 기록은 기록전극과 근처 조직에 찢러 넣은 참조전극(reference electrode)을 통하여 기록한다. 피부통각수용기의 수용야에 전기자극을 가해 줘 3회 이상 동일한 시간간격 후에 단일활동전압이 유발되면 단일신경섬유로 간주하였다. 단일신경섬유가 확인되면 섬유를 통한 신경활동의 전달속도(conduction velocity)를 측정하고 이를 기준으로 A δ -섬유와 C-섬유를 나눈다(A δ -섬유: 2~20 m/s, C-섬유: <2 m/s). A β -섬유는 조사 대상에서 제외한다. 이들 통각수용성 섬유에 연결된 통각수용기의 반응특성을 알아보기 위해 일련의 자극(brush, pinch, heat, cold)을 수용장에 가해주고, 그 반응을 증폭기(Model 3000; A-M System, Carlsborg, WA, USA), 차별기(Model 121; WPI, New Haven, CT, USA.), 인터페이스(CED-1401 plus; Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK)를 통해 수집한 후, 자료분석 프로그램(spike3 program)을 이용하여 기록하고 분석하였다.

5. 통각신경섬유의 반응역치와 초역치자극에 대한 반응도 측정

통각신경섬유의 전달속도와 반응특성을 조사한 후, 각 통각섬유의 기계 자극에 대한 반응역치는 von Frey 필라멘트(0.24~900 mN 사이의 20개로 구성)를 이용하여 측정하였다. 낮은 강도의 필라멘트로부터 시작해서 섬유의 말초 수용장에 10초간 가해주는 각 필라멘트에 의해 신경임펄스가 유발되는지 확인하였다. 배경신경활동(background activity) 보다 3개 이상의 임펄스를 유발시키는 필라멘트의 강도를 반응역치로 간주하였다. 열자극에 대한 반응역치는 수용장에 접촉한 열자극기를 이용하여, 온도를 40°C에서 50°C까지 2°C 간격으로 높이면서 조사하였다. 이 역시 배경신경활동 보다 3개 이상의 임펄스를 유발시키는 필라멘트의 강도를 반응역치로 간주하였

다.

초역치자극에 대한 반응도는 기계자극의 경우 980 mN의 힘을 발휘하는 von Frey 필라멘트를 이용하여, 그리고 열자극의 경우는 50°C의 열자극기를 이용하여 각각 10초 동안 수용장에 가해주었을 때 생성되는 활동전위의 총수를 측정하여 분석하였다.

6. 투약

척수신경손상에 의한 통증과민 유발에 있어서 말초의 SP와 CGRP의 역할을 밝히기 위하여 SP가 결합하는 neurokinin 1(NK1) 수용체의 선택적 길항제인 L-733060나 CGRP1 수용체의 선택적 길항제인 CGRP 8-37을 생리식염수(PBS, phosphate-buffered saline)에 녹여 사용하였다. 이들 약물이나 매체(vehicle)는 신경손상 측 뒷발바닥에 피하 주입하였는데, 사용한 L-733060와 CGRP 8-37의 농도는 각각 100 µg/30 µl와 85 µg/30 µl 이었다. 약물이나 매체의 주입을 위해서는 Hamilton 주사기에 부착한 주사바늘(28 게이지)을 쥐 발바닥 피하에 삽입하고 바늘 끝을 약 10 mm정도 전진한 후 30 µl를 발바닥 중앙부위를 향해 밀어 넣었다. 약물이나 매체의 주입은 척수손상 바로 직전에 실시(전처치)하거나, 척수손상 후 통증과민이 이미 생성된 상태에서 실시(후처치)하였다.

7. 통계처리

자료를 통계 분석할 때 반복되는 수치의 비교는 Friedman ANOVA로 분석하고 필요시 Wilcoxon signed-rank test로 유의미한 차이를 검증하였다. 한편 주어진 날짜에서 처치 그룹 간 수치의 비교는 Kruskal-Wallis ANOVA로 분석하고 필요시 Mann-Whitney rank-sum test로 유의미한 차이를 검증하였다. 또한 통각섬유의 반응역치와 초역치자극에 대한 반응도에서 있어서 모델군과 대조군 간의 비교는 unpaired t-test를 이용하여 유의미한 차이를 검증하였다. 필요시에는 non-parametric analysis로서 Mann-Whitney rank sum test를 이용하였다. χ^2 test를 이용하여 통각섬유

중 자발적 임펄스를 보이는 섬유의 비율을 모델군과 대조군 간에 비교하였다. 자료 결과는 평균± 표준오차로 나타내었고, 모든 통계 처리의 유의성은 P값이 0.05이하의 경우를 유의미하다고 판단하였다.

III. 결 과

통각섬유 기록 실험을 위해 준비한 척수신경을 절찰한 신경손상군과 절찰하지 않은 대조군이 신경병증 통증 유사 행동이 유발했는지에 관한 여부를 약한 강도(25 mN)의 von Frey 필라멘트를 이용하여 조사하였다. 쥐의 좌측 발바닥에 필라멘트를 10번 찔렀을 때(2초에 한번씩), 4번 이상 회피반응을 보일 시, 기계자극에 대한 통각과민반응이 유발된 것으로 간주하였다. 신경손상군의 대부분의 경우(70마리 중 63마리), 절찰 후 2~3일 경과 시에 통각과민반응을 보이기 시작하였으며 이러한 반응은 측정기간인 5주 이상 지속됨을 보였다. 반면 대조군에서는 한 마리도 통각과민반응을 보이는 경우가 없었다. 통각섬유 기록 실험은 통각과민반응을 보인 63마리의 절찰군과 통각과민반응을 보이지 않은 28마리의 대조군을 대상으로 실시하였다.

1. 분석 대상의 통각신경섬유

실험에서 이용한 통각신경섬유는 발바닥 피부에 주로 분포하는 장딴지신경(sural nerve)과 발바닥신경(plantar nerve)에서 분리하였다. 분석한 총 통각섬유는 224개의 섬유(180 C-섬유, 44 A δ -섬유)로서, 이중 155개가 신경손상군(발바닥신경, 102 C-섬유 및 19 A δ -섬유; 장딴지신경, 27 C-섬유 및 7 A δ -섬유)에서 그리고 69개가 대조군(발바닥신경, 32 C-섬유 및 12 A δ -섬유; 장딴지신경, 19 C-섬유 및 6 A δ -섬유)으로부터 얻었다. C-섬유 중 일부(손상군에서 얻은 129 중 27개, 대조군에서 얻은 51 중 17개)는 기계자극과 열 자극 모두에 반응을 보였고 나머지 C-섬유는 기계자극에만 반응을 보였다. 반면 본 실험에서 조사한 A δ -섬유 모두는 기계자극에만 반응을 보였다. 신경섬유를 통한 활동전위의 전도속도(CV, conduction velocity)는 손상군과 대조군을 비교했을 때, C-섬유와 A δ -섬유 모두에 있어서 차이를 보이지 않았다(손상군 C-섬유 경우, 범위 0.09~1.92 m/sec, 평균 0.66 m/sec; 손상군 A δ -섬유의 경우, 범위 2.57~18.28 m/sec, 평균 9.04 m/sec; 대조군 C-섬유 경우, 범위 0.27~1.04 m/sec, 평균 0.58 m/sec; 대조군 A δ -섬유 경우, 범위 2.65~21.92

m/sec, 평균 9.00 m/sec).

2. 자발적 신경임펄스

자발적 신경임펄스는 신경손상군에서 조사된 155 신경섬유 중 16 경우 (10.3%)에서 관찰되었으며, 대조군에서 조사된 69 신경섬유 중 단지 한 경우(1.4%)에서만 관찰되었다. 이러한 자발적 신경임펄스를 보이는 신경섬유의 비율은 손상군과 대조군 간에서 통계적으로 유의미한 차이를 보였다 ($P < 0.05$, χ^2 test). 신경손상군 내 자발적 신경임펄스를 보이는 섬유 중 14개는 C-섬유였고 2개는 A δ -섬유였는데, 이들의 신경활동 방전율의 평균치는 각각 0.83 ± 0.19 imp/sec와 0.58 ± 0.27 imp/sec이었다. 모든 자발적 신경임펄스를 보이는 섬유는 열자극에는 반응하지 않고 기계자극에만 반응을 보였는데, 예외적으로 두개의 C-섬유는 열자극에도 반응을 보였다.

3. 기계자극과 열자극에 대한 반응역치

신경손상군의 결찰 측 발바닥에 분포하는 C-섬유와 A δ -섬유는 대조군의 경우와 비교하여 기계자극과 열자극 모두에 대한 반응역치가 감소되어 있음을 관찰하였다. 이러한 반응역치 감소의 전형적인 일례를 그림-1에 나타내었다. 그림-1B의 경우 대조군의 C-섬유에서 보듯이, 이 섬유는 35.3 mN 강도의 von Frey 필라멘트를 수용장에 가해주었을 때 아주 약하게 반응을 보였으며, 한 단계 약한 강도의 필라멘트에는 반응을 보이지 않는 반면 한 단계 강한 강도의 필라멘트에는 더욱 강하게 반응을 보였다. 이 섬유의 기계자극에 대한 반응역치는 35.3 mN로 간주하였다. 한편 그림-1C에서는 결찰군 C-섬유의 기계자극에 대한 반응역치를 결정하는 예를 보여주는데, 이 경우는 12.3 mN이었다. 열자극에 대한 반응역치는 온도를 36°C에서 2°C씩 증가한 자극(50°C까지)을 수용장에 가해 주면서 반응여부를 조사하였다. 그 결과의 일례를 그림-1D 및 E에 나타내었는데, 신경손상군과 대조군에서 얻은 C-섬유의 열자극에 대한 반응역치는 각각 42°C와 46°C이었다.

신경손상군의 통각수용섬유에서 기계자극에 대한 반응역치가 낮아져

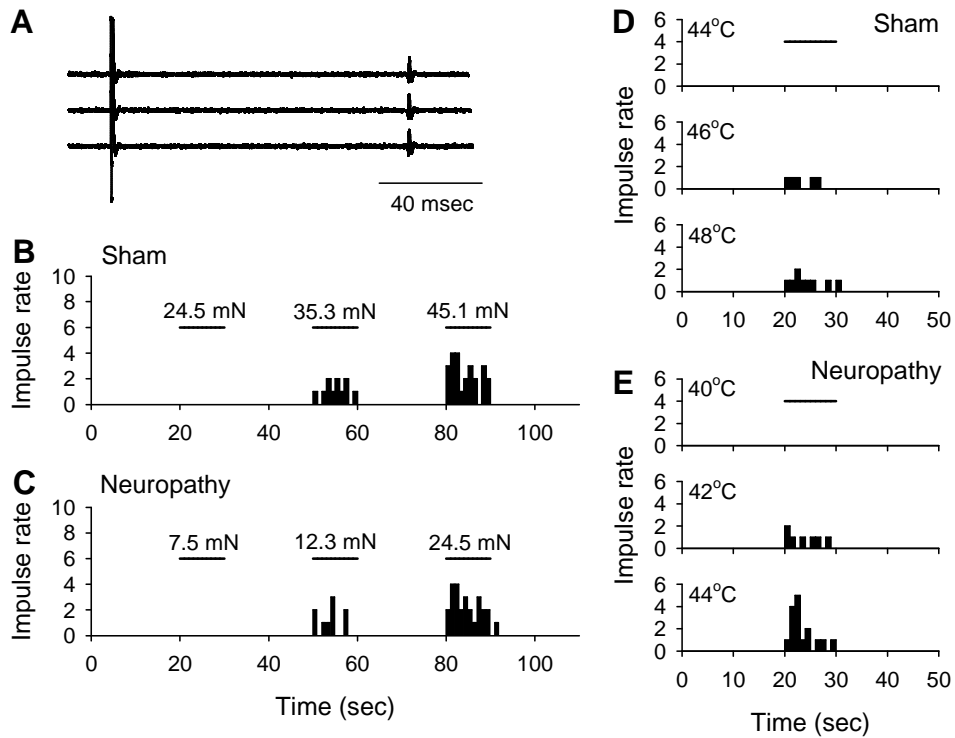


그림 1. 기계 및 열자극에 대한 C-섬유 반응도의 예. A: 수용장의 전기자극(1 ms 직각파, 6 mA)에 의해 생성되어 장딴지신경(sural nerve) 내 단일신경섬유로부터 기록한 활동전위를 보여주는 그림으로서 이는 허위수술군(대조군)에서 얻었음. 세 번의 반복 기록에서 활동전위가 일정한 잠복기 후에 동일한 시점에서 나타나는 것으로 보아 이 기록이 단일신경섬유로부터 얻어진 것으로 생각할 수 있다. 이 섬유의 활동전위 전달속도는 0.69 m/sec로서 C-섬유임을 알 수 있다. B: A의 기록을 얻은 섬유에서 얻은 결과로서 35.3 mN 강도의 von Frey 필라멘트를 수용장에 가해주었을 때 아주 약하게 반응을 보였으며, 한 단계 약한 강도의 필라멘트에는 반응을 보이지 않는 반면 한 단계 강한 강도의 필라멘트에는 더욱 강하게 반응을 보였다. 따라서 기계자극에 대한 반응역치는 35.3 mN로 간주하였다. C: 신경손상군에서 얻은 C-섬유의 기계자극에 대한 반응역치를 결정하는 예를 보여주는데, 이 경우는 12.3 mN이었다. D, E: 36°C에서 2°C씩 증가한 열자극(50°C까지)을 수용장에 가해 주면서 반응역치를 대조군(D)과 손상군(E)에서 얻은 예로서 반응역치는 각각 46°C와 42°C임을 보인다. 각 그림에서 수평막대는 자극기간을 나타낸다.

있음은 개별섬유의 반응역치의 분포를 조사해보면 더욱 확실하다. 그림-2(A, B, C)에는 신경손상군과 대조군을 대상으로 조사한 통각수용섬유의 개별적인 기계자극반응역치 분포가 나타나있다. 이들 분포자료를 C-섬유나 A δ -섬유만을 따로 분석하거나 이들을 합쳐서 함께 분석하여도, 모든 경우에 있어서 손상군이 대조군에 비하여 분포 양상이 좌측으로 치우쳐있음을 보인다. 개별 역치의 평균값을 비교해보아도, 손상군이 대조군에 비하여 유의미하게 감소해 있음을 C-섬유와 A δ -섬유를 합쳐서 분석한 경우($P < 0.001$, 18.9 ± 1.0 vs. 41.5 ± 2.2 mN, 그림-2D), C-섬유만 분석한 경우($P < 0.001$, 18.6 ± 1.0 vs. 36.6 ± 1.6 mN, 그림-2E), 그리고 A δ -섬유만 분석한 경우($P < 0.001$, 20.5 ± 2.6 vs. 55.3 ± 6.2 mN, 그림-2F) 모두에서 관찰되었다. 신경손상군의 통각섬유 중 자발적 신경입펄스를 보이는 섬유들과 그렇지 않은 섬유들은 기계자극반응역치에 있어서 서로 유의미한 차이를 보이지 않았다 [$P > 0.05$, 18.3 ± 3.6 (n=16) vs. 19.1 ± 0.8 (n=139) mN].

열자극에 대한 반응성질은 열자극과 기계자극 모두에 반응하는 통각수용성 신경섬유를 대상으로 조사하였다. 본 연구에서 사용한 50°C까지의 열자극(피부조직의 손상을 피하기 위하여)에 대하여 A δ -섬유는 반응을 보이지 않았으며, 반응을 보이는 섬유는 C-섬유였다. 신경손상군과 대조군을 대상으로 조사한 열자극에 반응하는 C-섬유의 개별적인 열자극반응역치의 분포를 그림-3A에 나타내었다. 이들 개별적 분포자료는 손상군이 대조군의 경우에 비하여 분포 양상이 좌측으로 치우쳐있음을 보인다. 개별 역치의 평균값을 비교해보면, 신경손상군이 대조군에 비하여 유의미하게 감소했다($P < 0.05$, 41.3 ± 0.5 vs. 43.5 ± 0.6 °C, 그림-3B).

4. 초역치자극에 대한 반응크기

초역치자극에 대한 통각수용성 신경섬유의 반응크기를 조사하기 위하여, 초역치자극으로서 990 mN-필라멘트나 50°C의 열자극을 수용장에 10초간 가해 주었을 때 유발되는 반응정도를 측정하였다. 그림-4A 및 B는 신경손상군과 대조군에서 채취한 C-섬유가 990 mN-필라멘트 자극에 의하여 생성하는 발화 양상

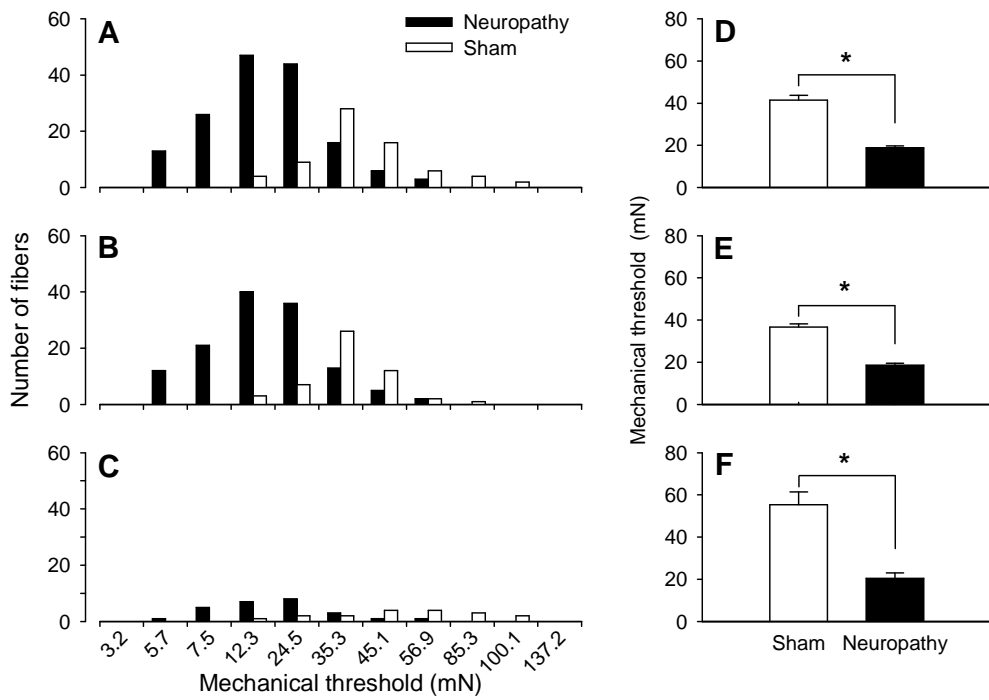


그림 2. C- 및 Aδ-섬유의 기계자극반응역치에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교. A, B, C는 각각 손상군과 대조군에서 수집한 C- 및 Aδ-섬유 합계의 경우, C-섬유의 경우, 그리고 Aδ-섬유의 경우에 있어서 반응역치의 분포를 보여준다. 세 경우 모두에서 손상군이 대조군에 비하여 분포 양상이 좌측으로 치우쳐있다. D, E, F에는 각각 A, B, C에 포함된 개별 섬유의 역치에 대한 평균값을 막대그래프로 나타내었는데, 세 경우 모두에서 손상군이 대조군에 비하여 유의미하게 감소해 있었다. *는 $P < 0.05$ 값에서 유의미한 차이가 있음을 의미함.

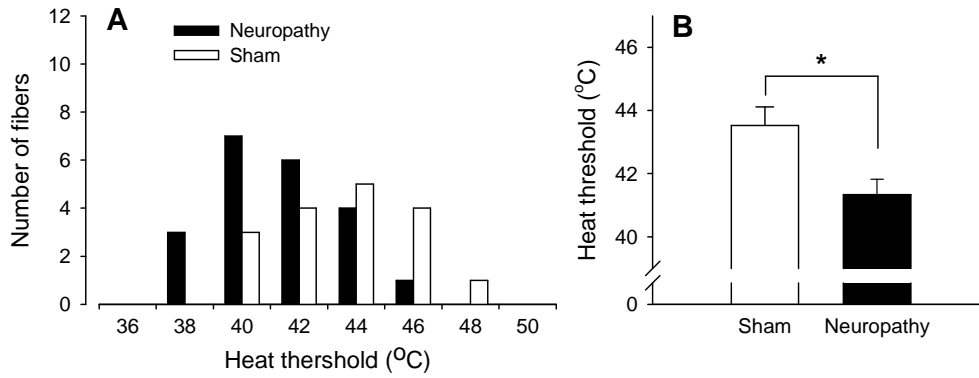


그림 3. C-섬유의 열자극반응역치에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교. A: 손상군과 대조군에서 수집한 C-섬유에 있어서 열자극에 대한 반응역치의 분포를 보여 준다. 손상군이 대조군에 비하여 분포 양상이 좌측으로 치우쳐있다. B. A에 포함된 개별 섬유의 역치에 대한 평균값을 막대그래프로 나타내었는데, 이 경우 손상군이 대조군에 비하여 유의미하게 감소해 있었다. *는 $P < 0.05$ 값에서 유의미한 차이가 있음을 의미함.

에 관한 일례를 보여준다. 이와 같이 측정된 통각섬유의 개별적인 초역치기계자극에 대한 반응크기를 모두 합치거나, C-섬유나 A δ -섬유만을 따로 분석하여 평균값을 그림-4C, D, E에 나타내었다. 세 경우 모두에서 신경손상군이 대조군에 비하여 반응크기의 평균값이 유의미하게 증가했다[C- 및 A δ -섬유 ($P < 0.001$, 74.8 ± 5.4 vs. 45.1 ± 3.3 imp), C-섬유 ($P < 0.01$, 56.5 ± 4.7 vs. 40.4 ± 2.7 imp), A δ -섬유 ($P < 0.001$, 101.0 ± 6.5 vs. 54.4 ± 7.8 imp)]. 결찰군의 통각섬유 중 자발적 신경임펄스를 보이는 섬유들과 그렇지 않은 섬유들은 초역치기계자극에 대한 반응크기에 있어서 서로 유의미한 차이가 없었다 [$P > 0.05$, 73.5 ± 4.6 (n=10) vs. 75.9 ± 4.8 (n=24) imp].

그림-5A 및 B에서는 신경손상군과 대조군으로부터 채취한 C-섬유에서 50°C 열자극 자극에 의하여 유발되는 발화양상의 일례를 보인다. 이와 같이 측정된 C-섬유들을 대상으로 초역치열자극에 대한 반응크기의 평균값을 그림-5C에 나타내었다. 이 초역치열자극에 대한 반응크기의 평균값은 손상군과 대조군 간에 유의미한 차이가 없었다 ($P > 0.5$, 20.6 ± 2.2 vs. 21.5 ± 5.5 imp).

5. 신경결찰 유도 통각과민반응에 있어서 말초 substance-P나 CGRP

수용체의 역할

L5 척수신경 결찰시 생성되는 임펄스는 중추 쪽인 척수 뿐 아니라 말초 쪽으로도 전도된다. 본 연구에서는 통각과민반응 유발에 있어서 중추로 전달되는 임펄스의 영향은 배제하고 말초 쪽으로 전도되는 임펄스의 역할을 조사하기 위하여, L5 척수신경 결찰하기 6일 전에 L5 후근을 절단한 신경병증 모델쥐를 사용하였다. 이 모델 쥐에서 수술 후 시간경과에 따른 통각과민반응의 유발 정도를 조사하여 그림-6에 나타내었다. 통각과민반응 정도는 결찰 측 발바닥에 가해진 von Frey 필라멘트에 대한 발 회피반응의 역치로 평가하였다. L5 후근을 절단한 후 L5 척수신경을 결찰한 모델 쥐에서 회피반응 역치는 후근 절단 1일 뒤 역치가 감소함으로서 통각반응이 생성되었으나 이는 약 6일 경과 후 원래상태로 회복하였다. 이렇게 회피반응에 있어서 일시적인 변화를 보이면서 회복된 경우는 L5 후근 절단을 실시한

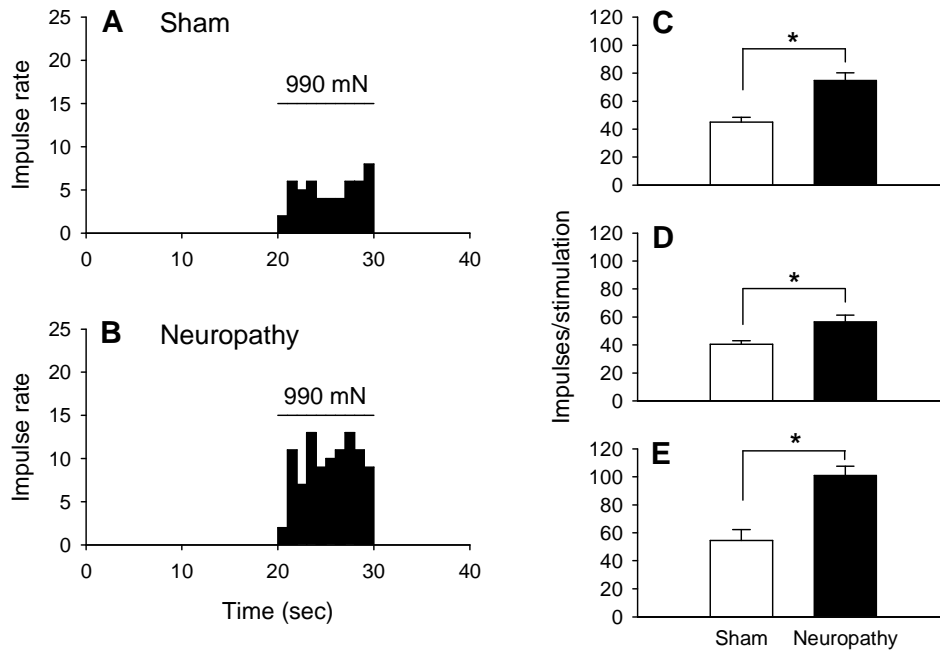


그림 4. C- 및 A δ -섬유의 초역치기계자극에 대한 반응의 크기에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교. A, B: 대조군과 손상군 각각에서 얻은 C-섬유의 수용장에 가해진 초역치기계자극(990 mN)에 의해 생성된 임펄스의 발화율의 예를 보여준다. C, D, E: 측정된 개별적인 C- 및 A δ -섬유의 반응크기에 대한 평균값을 막대그래프로 나타내었는데, C- 및 A δ -섬유 합인 경우(C), C-섬유의 경우(D), 그리고 A δ -섬유의 경우(E) 모두에서 손상군이 대조군에 비하여 유의미하게 증가해 있었다. *는 $P < 0.05$ 값에서 유의미한 차이가 있음을 의미함.

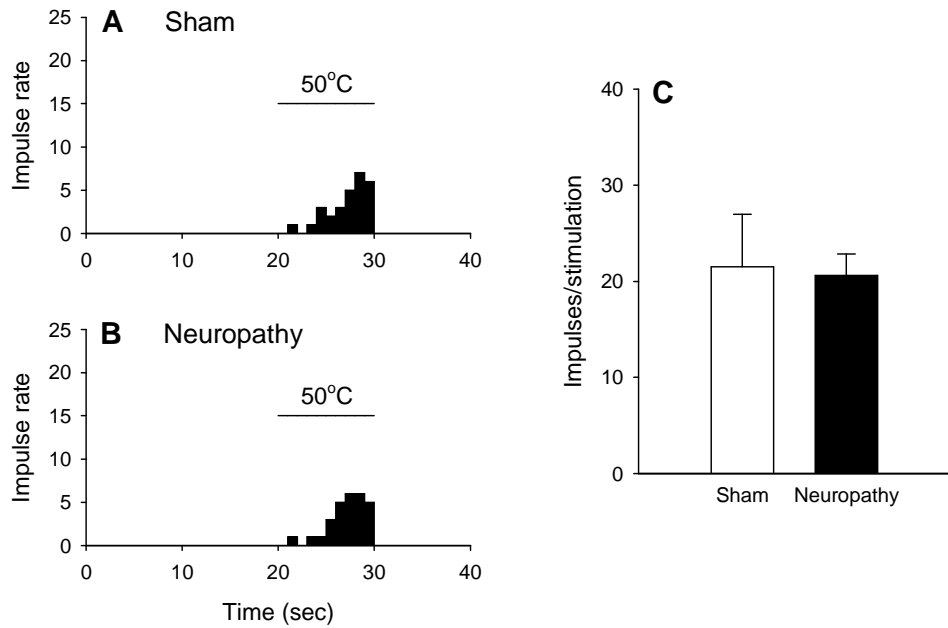


그림 5. C-섬유의 초역치열자극에 대한 반응의 크기에 있어서 신경손상군과 대조군 간의 비교. A, B: 대조군과 손상군 각각에서 얻은 C-섬유의 수용장에 가해진 초역치열자극(50°C)에 의해 생성된 임펄스의 발화율의 예를 보여준다. C: 측정된 개별적인 C-섬유의 반응크기에 대한 평균값을 막대그래프로 나타내었는데, 손상군과 대조군 간에 유의미한 차이가 없었다.

80마리 중 69마리에서 관찰되었는데, 이들 회복을 보이는 모델쥐를 대상으로 이후의 실험을 실시하였다. 회피반응역치가 정상으로 회복한 후 L5 척수신경결찰을 가한 결과, 결찰 측 발의 회피반응 역치는 다시 감소하기 시작하여 3일 째 최대로 감소함으로서 통각과민반응이 유발되었음을 보였고, 이 통각과민반응은 이후 7주간 장기적으로 유지되었다. 이러한 감소는 신경결찰 반대 측 발이나 대조군의 발의 경우에 비하여 유의하였다($P < 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA). 따라서 이 기간동안 생성되어 유지되는 통각과민반응에는 중추 쪽으로 입력되는 임펄스의 영향을 배제할 수 있으므로, 이 모델 쥐는 신경병증통증 유발에 있어서 말초 쪽으로 전도되는 임펄스의 역할을 조사하는데 이용할 수 있다.

L5 후근절단 후 L5 척수신경을 결찰한 모델 쥐를 세 무리로 나누어 통각과민반응의 유도(induction)[또는 개시(initiation)]에 있어서 신경펩타이드의 역할을 알아보았다. 이를 위하여 각 무리는 L5 척수신경을 결찰하기 직전에 NK-1 수용체의 길항제인 L-733060, CGRP1 수용체의 길항제인 CGRP 8-37, 또는 이들을 녹인 생리식염수(PBS, phosphate-buffered solution)를 손상 측 발바닥에 주입하고, 척수 신경 결찰에 따른 회피반응역치의 변화를 조사하였다. 그림-7에서 볼 수 있듯이, 생리식염수를 처리한 경우 회피반응역치는 처리 전 값에 비하여 척수신경결찰 후 다음날부터 42일 까지 전체 측정기간 동안 유의한 감소를 보였다($P < 0.05$, Friedman ANOVA). 그러나 L-733060 처리군의 경우 회피반응역치는 생리식염수 처리군에 비하여 척수신경결찰 후 2~4일간 유의하게 증가되어 있었다($P < 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Mann-Whitney rank-sum test). 이는 L-733060의 전처치에 의해 신경결찰에 의한 통각과민반응의 유도나 개시가 수일간 연기됨을 의미한다. CGRP 8-37로 전처치한 경우도 회피반응역치가 생리식염수 처리군에 비하여 척수신경결찰 후 1~3일간 유의하게 증가되어 있었다($P < 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Mann-Whitney rank-sum test). 이들 결과로부터 신경결찰에 의한 통각과민반응의 유도나 개시에 말초의 SP와 CGRP가 관여함을 알 수 있다.

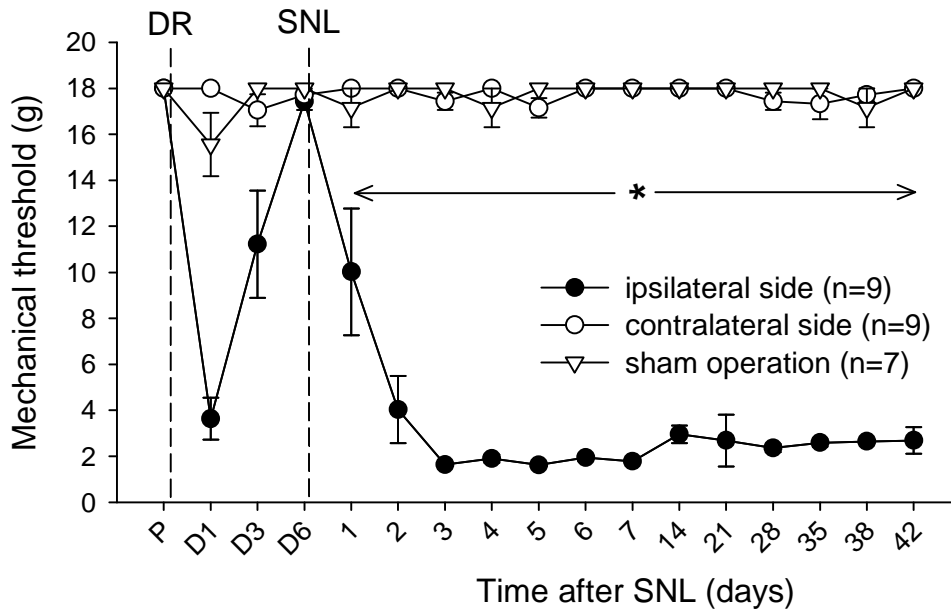


그림 6. 후근절단과 척수신경결찰을 실시한 모델군과 허위수술을 실시한 대조군에 있어서 발 회피반응 역치의 변화. 모델군의 경우 먼저 실시한 좌측 제5요 후근 절단에 의해 손상 측 발의 도피반응역치가 일시적으로 감소하였으나 6일 정도 후에 원래 상태로 복귀하였다(발도피반응역치 감소를 통각과민반응으로 간주하였고, 이 경우 일시적 통각과민반응 유도). 이 상황 하에서 동측의 제5요 척수신경을 결찰한 결과 도피반응역치는 다시 감소하는데 이렇게 감소된 상태는 7주 이상 장기적으로 지속되었다(장기적 통각과민반응 생성). *는 P<0.05 값에서 대조군이나 반대측 발의 역치와 비교하여 유의미한 차이가 있음을 의미함.

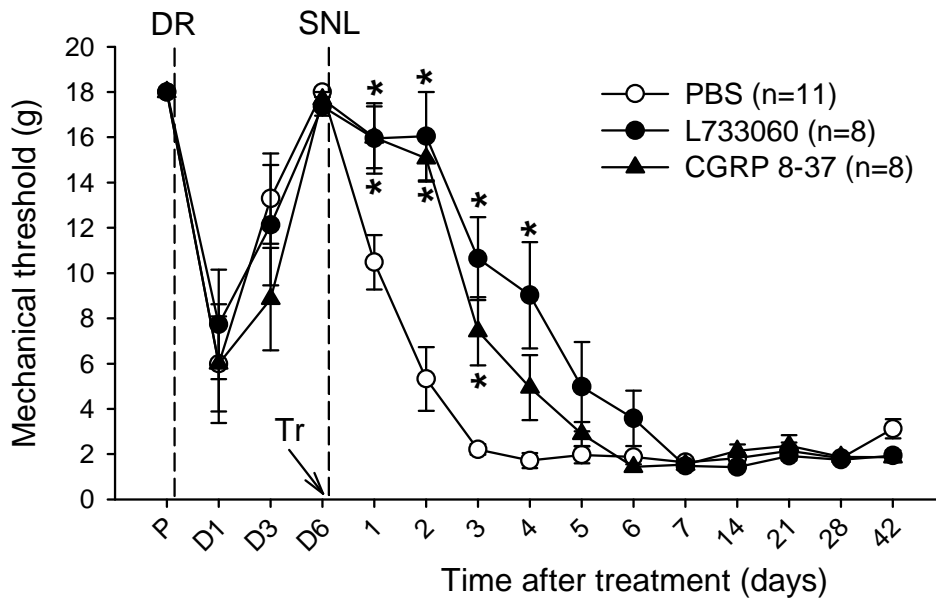


그림 7. 후근절단 후 척수신경을 결찰한 모델쥐에서 결찰 전 SP나 CGRP 수용체 길항제의 처치가 신경결찰에 의해 유발되는 회피반응 역치 감소(통각과민반응)에 미치는 영향. 세 무리의 모델쥐 각각에 L-733060, CGRP 8-37, 또는 생리식염수를 척수신경 결찰 바로 직전에 손상 측 발바닥에 주입하였다. 생리식염수 처리군(대조군)에 비해 L-733060 처리군과 CGRP 8-37 처리군 모두에서 신경결찰에 의한 회피반응 역치 감소의 유발이 1~4일 간 지연되었다. *는 $P < 0.05$ 값에서 대조군의 회피반응 역치와 비교하여 유의미한 차이가 있음을 의미함.

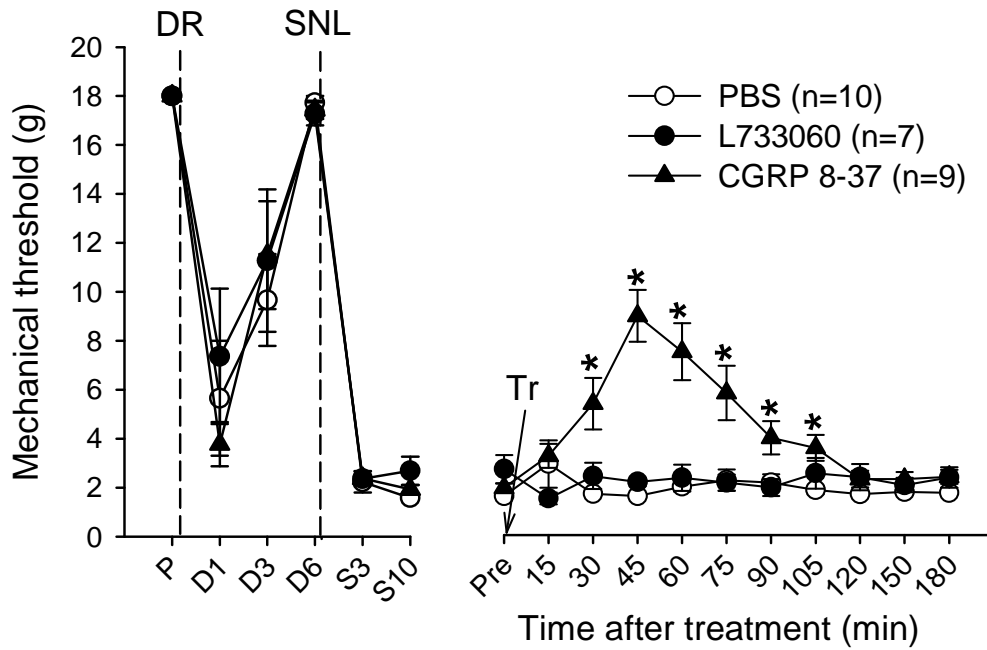


그림 8. 후근절단 후 척수신경을 결찰한 모델쥐에서 신경결찰에 의해 회피반응 역치 감소(통각과민반응)가 유발된 후 이에 SP나 CGRP 수용체 길항제의 처치가 미치는 영향. 그림의 좌측 부분은 그림 6과 그림 7에서와 같은 회피반응 역치 감소(후근절단과 척수신경 결찰에 의한)를 보인다. 이렇게 통각과민반응이 유발된 상황에서 모델쥐를 세 무리로 나누어 각각에 L-733060, CGRP 8-37, 또는 생리식염수를 손상측 발바닥에 주입하였다. CGRP 8-37 처리군은 생리식염수 처리군(대조군)에 비하여 처치 후 30분에서 105분 까지 회피반응 역치가 유의미하게 증가되어 있었다. *는 $P < 0.05$ 값에서 대조군의 회피반응 역치와 비교하여 유의미한 차이가 있음을 의미함.

다음 L5 후근절단 후 L5 척수신경을 결찰한 모델 쥐 중 다른 세 무리를 대상으로 통각과민반응의 유지(maintenance)에 있어서 SP와 CGRP의 역할을 알아보았다. 이를 위하여 각 무리는 L5 척수신경 결찰에 의한 통각과민 반응 유발 후 10일째에 L-733060, CGRP 8-37, 또는 생리식염수를 손상 측 발바닥에 주입하고 통각과민 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그림-8에서 보듯이, CGRP 8-37을 처리한 경우는 생리식염수를 처리한 경우에 비하여 처치 후 30분에서 105분 까지 회피반응역치가 유의미하게 증가되어 있었다 ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Mann-Whitney rank-sum test). 그러나 L-733060 처리군은 생리식염수 처리군과 비교하여 회피반응역치에 있어서 유의미한 변화가 없었다 ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA). 이들 결과로부터 신경결찰에 의해 이미 생성된 통각과민반응의 유지에는 말초의 CGRP가 관여함을 알 수 있다.

IV. 고 찰

본 연구는 말초신경손상에 의해 통각과민반응이 유발된 쥐 발바닥 피부에서 통각수용기가 민감화되었음과 이러한 통각과민반응의 생성에 손상된 말초신경의 말초 쪽 발 피부의 CGRP와 SP와 같은 신경펩타이드가 관여함을 보여준다. 이 결과는 신경병증통증의 말초 기전에 관한 새로운 설명을 가능케 한다. 즉, 말초 신경손상 시 생성되어 말초 쪽으로 전도되는 신경임펄스에 의해 말초 쪽 발 피부에서 신경펩타이드가 분비되고, 이 신경펩타이드가 주변에 있는 피부 통각수용기를 민감화한 결과 이러한 민감화가 통각과민반응 생성에 기여할 것으로 생각할 수 있다.

통각수용기 민감화 여부를 조사한 신경활동기록실험은 말초신경손상 후 2~5주 지나서 실시하였으므로 손상 받은 구심섬유는 이 시기에 모두 사멸하였을 것이며, 따라서 조사한 통각수용기는 신경손상을 받지 않은 구심섬유와 연결된 것임이 확실하다. 즉, 말초신경의 부분적 손상 시, 이웃하면서 손상 받지 않은 구심섬유와 연결된 통각수용기가 과민화되었음을 의미한다. 이러한 통각수용기 민감화에 관한 증거로서 본 연구에서는 1) 반응을 유발시키는 기계 및 열자극의 역치(반응역치)가 감소되었고, 2) 초역치자극강도의 기계자극에 의해 유발되는 반응의 크기(반응크기)가 증가되었으며, 3) 외부에서 아무런 자극 없이도 자발적인 신경임펄스가 발화(자발적 신경발화)됨을 보였다.

말초신경손상에 따르는 신경병증 상황 하에서 중추 특히 척수 내 체감각신경의 과민화(중추성 과민화)가 신경병증통증 생성에 관련되었을 가능성에 관해서는 많은 보고가 있으나^{26,27,28}, 말초신경손상 후 말초 통각수용기의 민감화가 존재할 지에 관해서는 명확한 실험증거가 없는 실정이다. 열자극, 화학물자극, 염증 등에 의해 유발되는 통증에 통각수용기 민감화가 관련되어 있음은 잘 알려져 있다^{29,30}. 그러나 본 연구의 실험결과는 염증이나 화학적 손상 없이도 신경병증 상황 하에서 통각수용기가 민감화 될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 보여준 통각수용기 민감화의 특성인 반응역치 감소, 반응크기 증가,

자발적 신경발화 생성은 다음의 두 방법으로 신경병증통증의 특징인 통각과민(hyperalgesia)과 이질통(allodynia)에 기여할 수 있다. 첫째, 민감화된 통각수용기가 전에는 보이지 않던 무해자극(innocuous stimuli)에 대한 반응성을 새로이 획득하고 유해자극(noxious stimuli)에 대한 과장된 반응성을 보임으로서 이질통과 통각과민에 직접적으로 기여할 수 있다. 둘째, 말초의 민감화된 통각수용기에서 생성되어 척수로 입력되는 자발적 신경발화가 척수 내에서 체감각신경의 민감화를 생성 및 유지하고, 그 결과 민감화된 척수신경이 말초로부터 입력되는 촉각정보와 통각정보에 대해 과장된 반응을 보임으로서 간접적으로 이질통과 통각과민에 기여할 수 있다.

말초신경의 부분적 손상 후 유발되는 비손상 통각섬유의 과민화 기전에 관해서는 현재까지 알려지지 않고 있으나, 손상 받은 신경에서 손상부위의 말초 쪽 축삭(axon)에서 일어나는 신경퇴화(즉, Wallerian degeneration)가 아마도 관련되어 있을 것으로 생각된다. Wallerian 퇴화가 일어나는 동안 말초신경다발 내에는 퇴화중인 축삭과 손상 받지 않은 온전한 축삭이 함께 섞여 있어 서로 상호작용을 하게 된다. Wallerian 퇴화 시에는 손상부위로 몰려드는 대식세포(macrophage)와 Schwann세포 내 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine, 예컨대 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α , interleukin-1 β 등)의 발현이 증가함이 관찰되었다³¹. 또한 최근 연구에 의하면 외부에서 가해진 TNF- α 가 비손상 구심섬유를 직접적으로 활성화하거나 민감화함이 밝혀졌다³². 따라서 신경손상 시 퇴화되는 신경섬유에서는 몰려든 대식세포와 Schwann세포로부터 TNF- α 가 분비되고, 이 TNF- α 가 이웃하는 비손상 통각섬유의 민감화에 관여할 것으로 생각된다. 다른 가능성은 퇴화되는 구심섬유가 분포하는 말초의 목표세포(target tissue)로부터 분비되는 neurotrophin[예컨대, 신경성장물질(nerve growth factor)]이 이웃하는 비손상 통각수용기를 민감화함이다. 이 가능성을 지지하는 실험증거는 다음과 같다. 통각수용섬유를 신경성장물질에 노출시켰을 때, 이들은 여러 다양한 자극에 대하여 민감화됨을 보였다. 예를 들어 신경성장물질이 존재하는 상황 하에서는, 과분극전류 주입에 의해 유발되는 신경발화가 항진되었고³³, capsaicin 처리에 의해

유발되는 이온전류가 항진되었다³³. 이 효과는 신경성장물질 수용체인 TrkA 수용체(고친화적, high-affinity)나 p75 수용체(저친화적, low-affinity)의 활성을 통해 발휘될 수 있다^{34,35}.

신경병증통증 상황 하의 말초 통각수용기 민감화에 관한 또 다른 설명은 다음과 같다. 즉 신경손상 시 생성되어 말초 쪽으로 전달되는 신경임펄스가 말초 피부에 있는 신경말단으로부터 CGRP나 SP와 같은 신경펩타이드를 분비시키고, 이들에 의하여 주변의 비손상 통각수용기가 민감화된다는 것이다. 이 가능성에 관한 실험증거는 다음과 같다. 말초신경의 역방향성 전기자극(antidromic electrical stimulation)이 가는 직경의 구심섬유의 말초 쪽 말단으로부터 SP와 CGRP의 분비를 유도하였다^{17,18}. 또한 형태학실험에서는 가는 직경의 구심섬유에 SP와 CGRP의 수용체가 존재함을 보였다^{20,36}. 무릎 관절에 분포하는 구심섬유가 외부에서 가해진 SP에 의해 민감화된다는 증거도 있다¹⁹. 따라서 신경병증상황 하에서는 말초에서 분비된 SP가 수용체에 직접 작용해 통각수용기를 민감화 할 수 있음이 가능하다. 그렇지 않으면, SP가 말초 조직에 존재하는 다른 세포(예컨대, synoviocytes)의 활성화를 통해 간접적으로 통각수용기를 민감화시킬 수도 있다. 그 이유로는 SP가 synoviocytes에 작용하여 통각수용기 민감화를 유도한다고 알려진 프로스타그란딘(PGE2)의 분비를 촉진함이 관찰되었기 때문이다³⁷. 말초의 CGRP에 관해서는 이 물질이 통각수용기 민감화에 관여한다는 실험증거가 아직까지는 전무한 상태이다. 그렇지만 CGRP가 말초 조직에서 소동맥에 작용하여 혈관확장을 야기함이 알려져 있기 때문에³⁸, 이러한 CGRP-유도 혈관확장이 통각수용기를 기계적으로 자극하여 민감화 유발에 관여할 가능성도 있다.

본 연구의 행동실험에 사용한 모델동물에서는 L5 척수신경 손상에 의해 생성된 임펄스 중 척수 쪽으로 전도되는 것은 차단하고(L5 후근 절단에 의해), 말초 쪽으로 전도되는 임펄스만을 허용하였다. 이 모델동물에서 L5 척수신경손상 직전에 NK1 수용체(SP가 작용함)나 CGRP1 수용체(CGRP가 작용함)의 길항제를 발바닥에 주입한 결과 생리식염수를 처리한 대조군의 경우에 비하여 척수손상에 의한 통각과민반응 생성이 지연됨을 보였다. 기존

연구에서 SP와 CGRP가 말초 통증에 중요한 역할을 한다는 다양한 실험 증거가 제시된 바 있다. 즉, NK1 수용체와 CGRP 수용체가 쥐 피부의 일차 구심섬유 말단²⁰과 작은 세포체를 갖은 후근절세포²¹에 존재함이 밝혀졌다. 또한 NK1 이나 CGRP 수용체의 효현제를 발바닥에 주입하여 통증행동을 유발할 수 있었으며 이러한 통증행동은 이들 수용체의 길항제를 전처치한 결과 그 유발이 억제됨을 보였다²². 따라서 본 연구의 결과를 포함한 선행 연구 결과는 신경손상 시 생성된 역방향성 임펄스에 의해 말초 피부에서 분비된 SP 및 CGRP가 신경병증통증의 개시(또는 유도)에 기여할 것임을 시사한다.

본 연구의 행동실험에서 얻은 흥미로운 또 다른 결과는 L5 척수신경손상에 의해 통각과민반응이 이미 생성된 상태에서 CGRP1 수용체의 길항제를 발바닥에 주입하면 통각과민 반응이 억제되었으나, 같은 조건에서 NK1 수용체의 길항제의 주입은 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 말초에서 CGRP는 신경병증통증의 유지에 관여하는 반면 SP는 그렇지 않음을 시사한다. NK1 수용체 길항제가 이미 확립된 통각과민반응을 억제하지 못했음을 보인 본 실험 결과는 다른 연구자들에 의해 신경병증통증 모델쥐에서 얻은 NK1 수용체 길항제의 척수 내 후처치가 통각과민 및 이질통반응에 대해 억제효과를 보였다는 관찰^{24,39}과는 일치하지 않는다. 이 두 결과 간에 차이를 보인 것은 아마도 SP가 신경병증통증 유지에 영향을 미치는데 있어서 말초와 척수 간에 서로 다르게 작동하기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 즉, 수용체에 대한 SP의 민감도(sensitivity)가 척수 내에서는 증가 되어 있는 반면 말초에서는 감소 되어 있을 것으로 추측해 볼 수 있다. 이 중 특히 척수 내에 관한 추측은 다음의 관찰에 의해 지지받고 있다. 즉 신경손상 후에는, 척수 내 통각정보전달계를 작동하는데 필요한 SP 양이 감소해 있었으며⁴⁰, 또한 척수 내 NK1 수용체의 발현이 감소해 있었다⁴¹. 그러나 신경병증통증이 확립된 상황 하의 말초에서, SP 양과 수용체에 대한 SP의 민감도가 감소 되어 있는지는 앞으로 해결해야 할 과제이다.

본 연구의 행동실험에 사용한 모델동물에서 보인 통각과민반응의 유발

기전은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. 그러나 다음의 두 사건이 통각과민반응 유발에 관련되어 있을 것이라고 생각된다. 첫 번째 사건은 척수손상 시 초기에 손상된 구심섬유에서 생성되어 말초 쪽으로 전도되는 손상성 발화(injury discharge)와 관련지을 수 있다. 두 번째 사건은 척수신경손상 후 손상섬유가 퇴화되면서 그 결과 이웃의 비손상 구심섬유에서 뒤늦게 유도되는 것으로 생각되는 자발적 발화(spontaneous discharge)와 관련지을 수 있다. 이러한 자발적 발화의 존재는 이미 밝혀진 바 있다⁴². 초기의 손상성 발화는 말초에서 SP와 CGRP의 분비를 통하여 주변의 비손상 통각수용기가 민감화를 시작하게 함으로서 통각과민반응의 초기과정을 야기하는 것으로 추측된다. 한편 뒤늦게 생성되는 자발적 발화는 말초에서의 비손상 통각수용기 과민화와 척수 내에서의 체감각신경 과민화(L4 후근을 통한 자발적 발화의 지속적인 척수입력에 의한)를 함께 초래하여 결과적으로 통각과민반응의 후기과정을 야기하는 것으로 추측된다. 본 연구의 행동실험에서 NK1이나 CGRP1 수용체의 길항제를 척수신경손상 직전에 발바닥에 주입한 결과 통각과민반응이 2~4일 정도 지연되어 생성됨을 보였는데, 이는 신경손상 후 초기의 손상성 발화에 의해 말초에서 분비된 펩타이드의 작용이 억제된 결과 통각과민반응의 초기 생성이 억제되었기 때문인 것으로 생각할 수 있다.

V. 결론

본 연구에서는 말초신경손상에 의한 신경병증 상황 하에서 피부 통각수용기의 민감화가 유도되었음을 보였으며(좌측 제5요 척수신경을 절찰한 모델 사용), 말초의 신경펩타이드가 신경병증통증의 생성에 관여함을 밝혔다(좌측의 제5요 후근을 절단한 후 동측의 제5요 척수신경을 절찰한 모델 쥐 사용).

통각수용기 민감화의 증거로서는 1) 반응을 유발시키는 기계 및 열자극의 반응역치의 감소, 2) 초역치자극강도의 기계자극에 의해 유발되는 반응 크기의 증가, 3) 자발적 신경임펄스의 발화 유도를 보였다. 신경병증통증 생성에 있어서 말초 신경펩타이드가 관여함에 관한 증거로서는 첫째로 말초신경에 손상을 가하기 직전에 말초부위에서 SP와 CGRP 작용을 차단하면 통각과민반응이 지연되어 나타났는데, 이는 신경병증통증의 유도(또는 개시)에 있어서 말초의 SP와 CGRP가 기여할 것임을 의미한다. 둘째 증거로서는 말초신경 손상에 의해 통각과민반응이 이미 생성된 후에는 말초에서의 CGRP 작용 차단 만이 통각과민반응을 억제하였는데(SP 작용 차단은 효과 없이), 이는 이미 생성된 신경병증통증의 유지에 있어서 말초의 CGRP가 관여할 것임을 의미한다.

이들 결과는 1) 부분적 말초신경손상 후 손상 받지 않은 온전한 신경이 분포하는 피부에 존재하는 통각수용기가 기계 및 열자극에 대해 민감화되었으며, 2) 말초피부에서의 신경펩타이드는 통각과민반응 생성에 관여하는데, 이때 SP와 CGRP는 이 반응의 유도(또는 개시)에 그리고 CGRP는 이 반응의 유지에 기여함을 보여준다. 그러나 말초에서의 신경펩타이드가 통각수용기 민감화 과정을 통하여(직접 또는 간접적으로) 신경병증통증 생성에 관여할 것인지에 관해서는 차후 밝혀져야 할 것이다.

참고문헌

1. Bonica JJ. Causalgia and other reflex sympathetic dystrophies. In: Bonica JJ, editor. *The Management of Pain*. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990. p.220-243.
2. Campbell JN, Meyer RA, Raja SN. Is nociceptor activation by alpha-1 adrenoreceptors the culprit in sympathetically maintained pain? *APS J* 1992;13:344-350.
3. Sato J, Perl ER. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science* 1992;251:1608-1610.
4. Noguchi K, Kawai Y, Fukuoka T, Senba E, Miki K. Substance P induced by peripheral nerve injury in primary sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *J Neurosci* 1995;15:7633-7643.
5. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355-363.
6. Liu X, Chung K, Chung JM. Ectopic discharges and adrenergic sensitivity of sensory neurons after spinal nerve injury. *Brain Res* 1999;849:244-247.
7. Han HC, Lee DH, Chung JM. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 2000;84:253-261.
8. Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 2000;85:503-521.
9. Liu X, Eschenfelder S, Blenk K, Jänig W, Habler HJ. Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain* 2000;84:309-318.
10. Ma C, Shu Y, Zheng Z, Chen Y, Yao H, Greenquist KW, et al. Similar electrophysiological changes in axotomized and neighboring intact dorsal

- root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2003;89:1588-1602.
11. Ali Z, Ringkamp M, Hartke TV, Chien HF, Flavahan NA, Campbell JN, et al. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. *J Neurophysiol* 1999;81:455-466.
 12. Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, et al. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 2001;21:RC140 (1-5).
 13. Lai J, Hunter JC, Ossipov MH, Porreca F. Blockade of neuropathic pain by antisense targeting of tetrodotoxin-resistant sodium channels in sensory neurons. *Methods Enzymol* 2000;314:201-213.
 14. Jang JH, Jeon YH, Kim JH, Leem JW, Nam TS, Paik KS. Mediation of mechanical hyperalgesia by uninjured capsaicin sensitive afferents in neuropathic rats. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA, abstract number 262.10, 2003.
 15. Andrew D, Greenspan JD. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *J Neurophysiol* 1999;82:2649-2656.
 16. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 2001;87:3-11.
 17. Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Alving K, Delay-Goyet P, Lou Y. Release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. *Ann NY Acad Sci* 1992;657:187-193.
 18. Yonehara N, Yoshimura M. Influence of painful chronic neuropathy on neurogenic inflammation. *Pain* 2001;92:259-265.
 19. Heppelmann B, Pawlak M. Sensitization of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. *Neurosci Lett* 1997;223:97-100.

20. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res* 1996;734:103-108.
21. von Banchet GS, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible HG. Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2002;110:131-145.
22. Nakamura-Craig M, Gill BK. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. *Neurosci Lett* 1991;124:49-51.
23. Bennett, AD, Chastain, KM, Hulsebosch, CE. Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP 8-37 in a rodent model of chronic central pain. *Pain* 2000;86:163-175.
24. Cahill CM, Coderre TJ. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- and post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain* 2002;95:277-285.
25. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth* 1994;53:55-63.
26. Palecek J, Paleckova V, Dougherty PM, Carlton SM, Willis WD. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1992;67:1562-1573.
27. Chapman V, Suzuki R, Dickenson AH. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *J Physiol* 1998;507:881-894.
28. Sotgiu ML, Biella G. Contribution of central sensitization to the pain-related abnormal activity in neuropathic rats. *Somatosens Mot Res*

- 2000;17:32-38.
29. LaMotte RH, Thalhammer JG, Torebjörk HE, Robinson CJ. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci* 1982;2:765-781.
 30. Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 1993;16:99-104.
 31. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci* 2002;22:3052-3060.
 32. Schäfers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- α after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2003;23:3028-3038.
 33. Zhang YH, Vasko MR, Nicol GD. Ceramide, a putative second messenger for nerve growth factor, modulates the TTX-resistance Na⁺ current and delayed rectifier K⁺ current in rat sensory neurons. *J Physiol* 2002;544:385-402.
 34. Shu X, Mendell LM. Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci Lett* 1999;274:159-162.
 35. Zhang YH, Nicol GD. NGF-mediated sensitization of the excitability of rat sensory neurons is prevented by a blocking antibody to the p75 neurotrophin receptor. *Neurosci Lett* 2004;366:187-192.
 36. Segond von Banchet S, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible H-G. Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2002;110:131-145.
 37. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*

- 1987;235:893-895.
38. Brain SD, Williams TJ. Substance P regulates the vasodilator activity of CGRP. *Nature* 1998;335:73-75.
 39. Gonzalez MI, Field MJ, Hughes J, Singh L. Evaluation of selective NK1 receptor antagonist CI-1021 in animal models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:444-450.
 40. Skilling SR, Harkness DH, Larson AA. Experimental peripheral neuropathy decreases the dose of substance P required to increase excitatory amino acids release in the CSF of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1992;139:92-96.
 41. Aanonsen LM, Kajander, KC, Bennett, GJ, Seybold, VS. Autoradiographic analysis of 125-I-substance P binding to spinal cord following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Brain Res* 1992;596:259-268.
 42. Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, Pogatzki EM, Hartke TV, Weerahandi HM, et al. Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 2002;22:7746-7753.

Abstract

Role of peripheral neuropeptides in mechanical hyperalgesia in a rat model of peripheral neuropathy

Bong Hyo Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joong Woo Leem)

A peripheral nerve injury leads to neuropathic pain consisting of spontaneous and abnormally evoked pain, such as allodynia and hyperalgesia. There is evidence suggesting that neuropathic pain is due to changes in the primary afferent neurons. Although the development of the ongoing or ectopic activity in the injured primary afferents, which results in changes in the central nervous system, is well studied, a possibility that uninjured nociceptive afferents are sensitized has not received attention. Nerve impulses induced by a peripheral nerve injury are conducted along the primary afferent fibers orthodromically to the spinal cord and antidromically to the peripheral terminals, causing the release of such neurotransmitters as neuropeptides from both ends. For neuropeptides, although their central role in neuropathic pain is well recognized, their peripheral role is not understood. This study was performed 1) to investigate whether or not the properties of cutaneous nociceptors are sensitized and 2) to test a possibility that neuropeptides in the periphery contribute to the generation of neuropathic pain.

Two to five weeks after the neuropathic (a lumbar 5 spinal nerve ligation, L5 SNL) or sham surgery, neuropathic rats developed a behavioral sign of mechanical hyperalgesia whereas those with the sham surgery did not. When

single fiber-recording experiments were performed on both neuropathic and sham animals to examine the properties of afferent fibers in the sural and plantar nerves, the following characteristics were observed: 1) spontaneous activity was observed in 16 of 155 fibers in the neuropathic group and one of 69 fibers in the sham group; 2) the response thresholds of nociceptive fibers to both mechanical and heat stimuli were lower in the neuropathic group than the sham group; 3) the magnitude of the responses of nociceptive fibers to the suprathreshold intensity of the mechanical stimulus, but not of the heat stimulus, was greater in the neuropathic group than the sham group. In the second set of experiments, rats that received L5 SNL plus a prior L5 dorsal rhizotomy on the left side, in which peripherally conducting injury-induced impulses remained unaffected with centrally conducting ones being blocked, were used. In these rats, a decrease of paw withdrawal threshold (PWT), a behavioral sign of mechanical hyperalgesia, developed following L5 SNL on the affected hind paw. When intraplantar injection to the affected hind paw was given immediately before L5 SNL, antagonists for both neurokinin 1 (NK1) and calcitonin gene-related peptide 1 (CGRP1) receptors delayed the onset of the PWT decrease for 2-4 days. However, when the same injection was given after L5 SNL, CGRP1, but not NK1, receptor antagonist reversed the decreased PWT for 105 min.

These results indicate 1) that after a partial peripheral nerve injury, the nociceptors on the skin supplied by an uninjured nerve become sensitized to both mechanical and heat stimuli and 2) that peripheral neuropeptides contribute to the generation of hyperalgesic behavior, with substance P and CGRP contributing to its induction phase, but only CGRP to its maintenance phase. It is suggested that peripherally released neuropeptides participate in the generation of neuropathic pain by making uninjured nociceptor terminals sensitized.

Key Words: neuropathic pain, nerve injury, mechanical hyperalgesia,
nociceptor, sensitization, neuropeptide, antidromic impulse