

## 말초신경 손상에 의한 배근신경절 세포의 전기생리적 특성 변화

연세대학교 의과대학 생리학교실, \*마취과학교실

장성구 · 정승수 · 임중우 · 은정우 · 윤덕미\* · 남택상

= Abstract =

### Changes of Electrophysiologic Properties of Dorsal Root Ganglion Cells in Peripheral Nerve-injured Rats

Sung Koo Chang, M.D., Seung Soo Chung, M.D., Joong Woo Leem, Ph.D.,  
Jung Woo Eun, Duck Mi Yoon, M.D.\*, and Taick Sang Nam, M.D.

Departments of Physiology and \*Anesthesiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** The neuropathic pain induced by peripheral nerve injury has been shown to be spontaneous, hyperalgesia and allodynia. If the neuropathic pain is related to the sympathetic system, it is classified as a sympathetically maintained pain (SMP). SMP is aggravated by sympathetic activation, and sympathetic block is used as a clinical treatment. Until now, it has been unclear what mechanism is involved in the aggravation of the pain due to sympathetic activation. Many investigations relating to this topic, using experimental animal models, have confirmed that the sensory nerve is activated due to sympathetic activation, and is mediated by the alpha adrenergic receptor. However, the detailed mechanism for the involvement of the alpha adrenergic receptor on the sympathetic-sensory coupling is controversial, as many previous experiments have been performed using in vivo preparations that could not exclude many complicating factors. Therefore, injured dorsal root ganglion cells were isolated, and the effects of norepinephrine, which is known to be involved in membrane excitability, investigated on several ionic channels.

**Methods:** The neuropathic animal models were made by ligation of the L5 and L6 spinal nerves of rats. The dorsal root ganglion cells were immediately isolated, and the electrophysiologic properties studied using a patch clamp technique.

**Results:** In the current clamp mode, the membrane excitability was confirmed to be increased by the norepinephrine, and in the voltage clamp mode, the inward  $Ca^{2+}$  and outward  $K^+$  currents were decreased by the norepinephrine, in the DRG neuron of the neuropathic model rat. Yohimbine, an  $\alpha_2$  antagonist, suppressed the inhibitory effect of the norepinephrine on the inward  $Ca^{2+}$  and outward  $K^+$  currents of the neuropathic DRG neuron. Cadmium, a calcium channel blocker, suppressed the inhibitory effect of the norepinephrine on the outward  $K^+$  current, and iberiotoxin, a calcium activated potassium channel ( $K_{Ca}$ ) blocker, suppressed the inhibitory effect of the norepinephrine on the outward  $K^+$  current of the neuropathic DRG neuron.

**Conclusions:** These results suggest the direct actions of norepinephrine on DRG neuron at least contribute to the sympathetic-sensory coupling, and that suppression of the  $K_{Ca}$  channel activity may be an important mechanism in this process.

---

**Key Words:** Dorsal root ganglion, Neuropathic pain, Norepinephrine, Patch clamp, Sympathetically maintained pain

## 서 론

말초신경 손상 후에 나타나는 신경병증성 통증(neuropathic pain)은 자발성 연소통을 포함하여, 통각과민, 이질통증 등의 증상을 보인다.<sup>1-3)</sup>

신경병증성 통증 중 특히 교감신경계와 연관되어 있는 경우를 교감신경의존성 유지 통증(sympathetically maintained pain, SMP)으로 분류하는데 SMP는 교감신경계의 활성화에 의해 통증이 더욱 악화되는 특징을 보이며<sup>4)</sup> 임상에서는 교감신경차단법이 치료 목적으로 자주 이용되고 있다.

현재 교감신경계가 어떻게 통증을 악화시키는지에 대한 자세한 기전은 알려져 있지 않으나 근래 몇 가지 신경병증성 통증 동물모델이 개발되면서 이에 대한 연구가 활기를 띠고 있다.<sup>5-7)</sup> 이들 모델쥐는 SMP 환자에서 나타나는 자발성 연소통, 통각과민, 이질통증 등의 증상을 보이는데 특히 Kim과 Chung에<sup>7)</sup> 의해 개발된 모델쥐(제 4, 5, 6 요척수 신경 중 하나 또는 두 개의 신경을 절찰함으로써 좌골신경에 부분적인 손상을 줌)의 경우 상술한 행동학적 증상이 교감신경 차단에 의해 매우 민감하게 억제되며<sup>8-10)</sup> 신경손상 전에 교감신경 절제술을 시행하면 신경병증성 통증의 유발이 방지됨이 보고되었다.<sup>10)</sup> 이 결과는 신경절찰 후 교감신경계에 어떤 변화가 일어나고 이에 의해 구심성 신경의 손상부위 또는 이에 연결된 배근신경절 세포 등에서 비정상적인 신경방전이 생성되고 이러한 방전이 척수로 지속적으로 입력되어 신경병증성 통증과 유사한 행동학적 징후를 유발시킬 수 있음을 시사한다. 교감신경과 감각신경간의 접합 기전으로써 교감신경절후섬유가 감각신경의 손상부위 또는 이에 연결된 배근신경절로 자라 들어가 비정상적인 접합이 형성될 가능성이 제시되었다. 실제 Chung 등은<sup>11)</sup> 면역조직화학을 이용한 형태학적 실험에서 신경절찰부위의 척수신경과 이에 연결된 배근신경절내에 교감신경절후섬유로부터 자라난 섬유를 관찰한 바 있고, 교감신경자극 시 손상 받은 신경에서 활동전압이 유발됨도 보고되었다.<sup>12)</sup>

현재 보고된 바로는 좌골신경을 절단한 후 절단부위에 신경종이 형성된 모델 쥐에서 아드레날린이 교감-감각신경간의 기능적 연결에 관련되어있음이 관찰되었다. 또한 이러한 아드레날린 수용체를 매개로

한 교감-감각신경간 접합은 신경종 부위뿐만 아니라 여기에 연결된 배근신경절에서도 이루어짐이 보고되었다.<sup>13-15)</sup> 본 실험에서 사용한 요척수 신경 절찰 모델쥐에서도 정상쥐와는 달리 구심성 신경섬유가 교감신경자극에 의해 흥분되며  $\alpha$  아드레날린 대항체에 의해 억제됨을 관찰할 수 있었으며 따라서 예비 실험 결과 사용할 모델 쥐가 SMP 연구를 위한 좋은 모델임을 재확인할 수 있었다.

이상과 같이 교감신경계의 활성화에 의해 감각신경이 활성화되고 이 과정이  $\alpha$  수용체를 매개로 한다는 사실은 서로 다른 동물모델에서 그리고 여러 보고자의 견해가 일치한다. 그러나 교감신경-감각신경간의 결합 과정에서 아드레날린 수용체의 매개가 어떻게 이루어지는지 그 구체적인 기전에 대해서는 의견이 분분하다. 교감말단의  $\alpha$  자가수용체를 통한 prostaglandin, leukotriene 등의 유리에 의해 간접적으로 손상 받은 신경의 흥분이 증가된다는 주장이 있으며,<sup>16-19)</sup> noradrenaline에 의해 배근신경절 근처의 혈관수축에 의한 혈류 감소에 의해 배근신경절 세포의 흥분이 증가될 가능성도 제시되었다.<sup>20)</sup> 그러나 Xie 등은<sup>21)</sup> 손상받은 신경의 배근신경절에서 alpha mRNA가 증가하며 따라서 손상된 신경의 배근신경절 세포 자체에서의  $\alpha$  아드레날린 수용체의 발현 증가를 그 원인으로 제시하였다.

이러한 이견이 발생하는 주요 원인은 보고된 대부분의 실험이 생체 내 상태에서의 실험으로 신경의 network이 존재하는 상태에서 여러 인자들에 대한 영향을 충분히 배제하기 힘든 것이 한 원인일 것으로 추측된다. 이런 논란에 대해 보다 명확한 해답을 얻기 위해서는 손상 받은 배근신경절 세포를 단일세포로 분리하여 손상 받은 배근신경절 세포에서의 norepinephrine (NE)에 대한 반응성을 직접 조사하는 것이 필요한데 본 저자들은 예비실험 결과 NE에 대한 반응성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 손상 받은 신경의 배근신경절 세포의 전기 생리학적 특성 중 NE에 의한 흥분성 증가가 어떤 기전에 의한 것인지를 밝히고자 흥분성 증가에 관여할 수 있는 몇 가지 이온통로(ionic channel)에 대한 NE의 영향을 직접 조사하여 그 기전을 밝히고자 하였다.

## 대상 및 방법

본 실험에서는 정상쥐 10마리와 신경병증성 통증 모델쥐 20마리를 사용하였다.

### 신경병증성 통증 동물모델 제작

실험 동물로는 체중 150-250 gm의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. Enflurane (1-2%), O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub>O (2 : 1)의 혼합개스로 동물을 마취시킨 후, 요추 부위 피부의 털을 깎고 척추의 중앙선을 따라 피부를 절개한 다음 주위근육을 제거 한 쪽의 좌골신경으로 합쳐지는 세 개의 요척수 신경(L4-L6)들 중 L5와 L6 신경을 노출시켜, 이들을 3-0 silk로 묶어 절찰한 뒤 근육과 피부를 다시 봉합하였다.

### 행동학적 검사

상술한 모델쥐의 경우 절찰을 받은 쪽 발이 절찰을 받지 않은 반대쪽 발에 비해 무해성 기계 자극에 대한 감수성이 증가되어 있음이 이미 알려져 있다. 감수성 증가는 신경절찰 후 첫째 날부터 나타나기 시작하여 10-15일에 최고에 도달하고, 증가 양상은 두 달 가량 유지된다. 따라서 본 연구에서는 절찰 10-15일 후에 행동학적 검사를 실시하여 기계자극에 대한 감수성 증가를 보인 모델 쥐들을 대상으로 전기생리학적 실험을 실시하였다.

모델쥐를 바닥이 철망으로 된 조그만 통속에 넣고, 무해성 기계자극으로서 von Frey filament를 철망을 통하여 아래쪽으로부터 동물의 발바닥에 가해준다. Von Frey filament는 2.5 g 정도의 힘으로 이를 실험자의 손 피부에 가하면 가벼운 촉각만을 감지할 수 있다. 이 filament로 모델 쥐의 발바닥을 2-3초 간격으로 10번 반복하여 자극하였을 때 몇 번이나 발을 도피하였는가를 측정함으로써 도피반응빈도가 절찰받지 않은 쪽보다 50% 이상 높을 때 성공적인 모델쥐로 간주하였다.

### 단일 배근신경절 세포의 분리

성숙한 Sprague-Dawley rat (100-400 g)의 쥐를 enflurane으로 마취시킨 후 등쪽 피부 및 근육을 절개하여 척추를 분리하였다. 분리한 척추를 4°C로 유지된 phosphate buffered solution (PBS)으로 옮겼다.

요추 5번 및 6번 척수신경에 연결되어 있는 배근신경절(dorsal root ganglion, DRG)을 떼어 내어 결합조직(connective tissue)을 제거한 뒤 미세가위로 2-3회 잘게 자른다. 배근신경절을 0.7 mg/ml collagenase (type D), 0.1 mg/ml trypsin (1 mg/ml, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) 및 0.1 mg/ml DNase type I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)이 들어 있는 modified Eagle's medium (EBSS, pH 7.4)에서 1시간 동안 교반(35°C, shaking water bath)하였다. 이때 EBSS에는 3.6 g/l의 glucose와 10 mM HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 강하게 흔들어서 분리한 후, 1,000 rpm으로 원심분리하여 10% fetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 minimum essential medium (MEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지에 재부유시켰다. 신경세포들은 poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 polystyrene culture dish (35 mm)에 옮긴 뒤 37°C 습식배양기에서 배양하였다. 모든 세포들은 분리 후 12시간 내 사용하였다.

### 전기생리학적 실험

이온전류는 patch clamp amplifier (axopatch 200A, Axon instruments Inc., CA, USA)를 사용하여 전형적인 whole-cell patch clamp 방법으로 기록하였다. 측정전극은 borosilicate glass capillary를 micropipette puller로 뽑아 제작하였다. 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5-2.5 MΩ이 되는 것을 사용하였다. 배근신경절세포의 직경과 감각신경섬유의 직경은 상관관계가 있는데 본 실험에서는 통증감각 전달에 관여하고 있다고 알려져 있는 세포(35μm 이하의 직경)를 선별적으로 실험에 사용하였다. 신경세포가 들어있는 culture dish를 도립현미경위에 올려놓고, 세포외액을 증력에 의해 1-2 ml/min 속도로 관류시켰다. 막전압 고정법(voltage clamp) 기록을 위해서 세포막의 전기용량과 직렬 저항은 80% 이상 보정하였으며, 실험 시 Sampling rate는 5-10 kHz, low-pass filter 5 kHz (-3 dB)로 하였다. 실험결과는 pclamp 6.0 software를 이용하여 IBM compatible PC에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21-24°C)에서 시행하였다.

### 세포외 및 전극내 용액

Ca<sup>2+</sup> 전류 측정을 위한 전극내 용액(internal solu-

tion)의 조성(mM)은 120 N-methyl-D-glucamine (NMG) methanesulfonate (MS), 20 TEA-MS, 20 HCl, 11 ethyleneglycol-bis-(beta aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgATP, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP, 14 Tris-phosphocreatine (pH 7.4, 318 mosm/kg H<sub>2</sub>O)으로 하였다. 세포외 관류액(external solution)의 조성(mM)은 140 MS, 145 TEA-OH, 10 HEPES, 15 glucose, 10 CaCl<sub>2</sub>, 0.001 tetrodotoxin (TTX) (pH 7.4 with TEA-OH, 310 mosm/kg H<sub>2</sub>O)으로 하여 실험하였다. K<sup>+</sup> 전류 측정과 DRG의 흥분성을 조사하기 위한 current clamp mode를 사용할 때 쓴 전극내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 134 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1 MgATP, 0.1 Na<sub>2</sub>GTP, 0.05 EGTA, 10.5 HEPES, 14 glucose (pH 7.2 with 315 mosm/kg H<sub>2</sub>O)으로 하였다. 세포외 관류액의 조성(mM)은 134 choline chloride, 6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 10.5 HEPES, 14 glucose (pH 7.4)으로 하여 실험하였다. Current clamp mode 사용 시 쓴 세포외 관류액 조성은 K<sup>+</sup> 전류 측정 시 사용한 세포외액 조성에서 choline chloride를 빼고 대신 NaCl을 사용하였다. 모든 약물은 polyethylene 관에 연결된 모세관을 통해 약물이 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

**사용약물 및 자료분석**

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA), DNase type 1, TTX, NE, yohimbine, iberiotoxin 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 각각 구입하였다. 세포배양과 관계된 모든 배지 및 시약은 GIBCO (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 student t test로 확인하였다. P값이 0.05 미만일 때 유의한 차이로 간주하였다.

**결 과**

**손상된 배근신경절세포의 NE에 대한 반응성**

정상쥐에서 분리한 배근신경절 세포의 경우 NE (10 M) 투여에 대하여 큰 변화가 없었다. 이에 반하여 신경병증성 통증 모델쥐에서 얻은 배근신경절 세포(L5, L6)에서는 NE 투여에 의하여 막전압이 조금 탈분극 되면서 활동전압 발화 빈도가 크게 증가하는

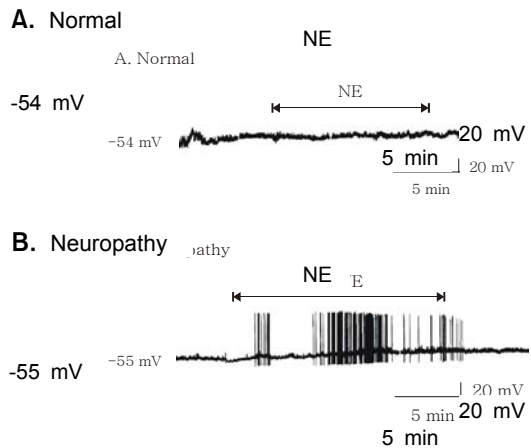
것을 볼 수 있었다. 즉, 모델 쥐의 경우 NE에 의해 흥분성이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

**내향성 Ca<sup>2+</sup> 전류에 대한 NE의 효과**

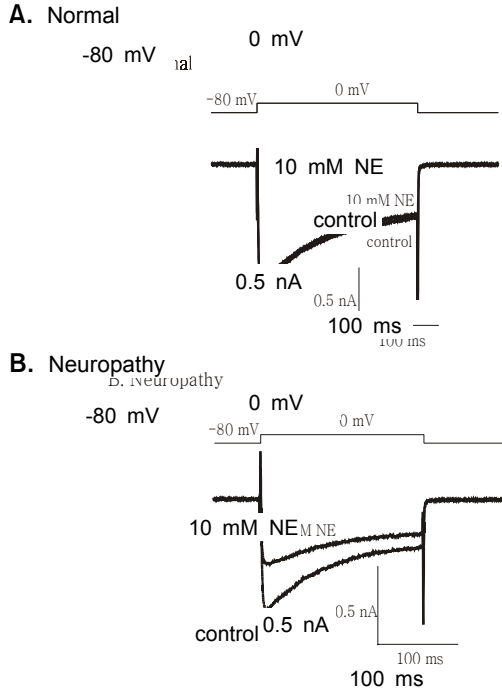
Whole cell mode 형성 후 세포막 전압을 80 mV로 고정된 상태에서 200 ms 동안 0 mV 탈분극 자극을 가하면서 그때 나타나는 내향성 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기 변화를 기록하였다. 정상쥐에서 DRG 세포의 Ca<sup>2+</sup> 전류에 대한 NE 효과를 관찰한 결과, NE는 내향성 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기에 거의 영향을 미치지 않았다 (8.35 ± 1.40% inhibition at 0 mV, n = 5)(Fig. 2A, 3A). 한편 모델쥐의 DRG 세포에서는 NE이 Ca<sup>2+</sup> 전류 크기를 상당히 감소시켰다(21.38 ± 3.01% inhibition at 0 mV, n = 6)(Fig. 2B, 3A).

**외향성 K<sup>+</sup> 전류에 대한 NE의 효과**

정상 혹은 모델 쥐에서 얻은 배근신경절 세포에서 NE의 K<sup>+</sup> 전류에 대한 효과를 관찰하였다. Whole cell mode 형성 후 세포막 전압을 80 mV로 고정된 상태에서 1초 동안 30 mV 탈분극 자극을 가하여 외향성 K<sup>+</sup> 전류를 기록하였다. 정상쥐의 경우 NE은 K<sup>+</sup> 전류 크기에 영향이 없거나 미미하게 억제하였



**Fig. 1.** The effects of norepinephrine (NE) on the excitability of rat DRG neurons. membrane potential and action potential were recorded using current clamp technique. Typical recordings from small DRG cells of normal rat and neuropathic rat are shown in A and B. The excitatory effects of NE are seen in the DRG cells of neuropathic rat.



**Fig. 2.** The effects of norepinephrine (NE) on inward  $Ca^{2+}$  currents of small DRG cells from normal and neuropathic rats. Typical recordings of the whole cell  $Ca^{2+}$  current induced by 0 mV pulses for 200 ms in the absence and presence of  $10\mu M$  NE in normal (A) and neuropathic (B) rats.

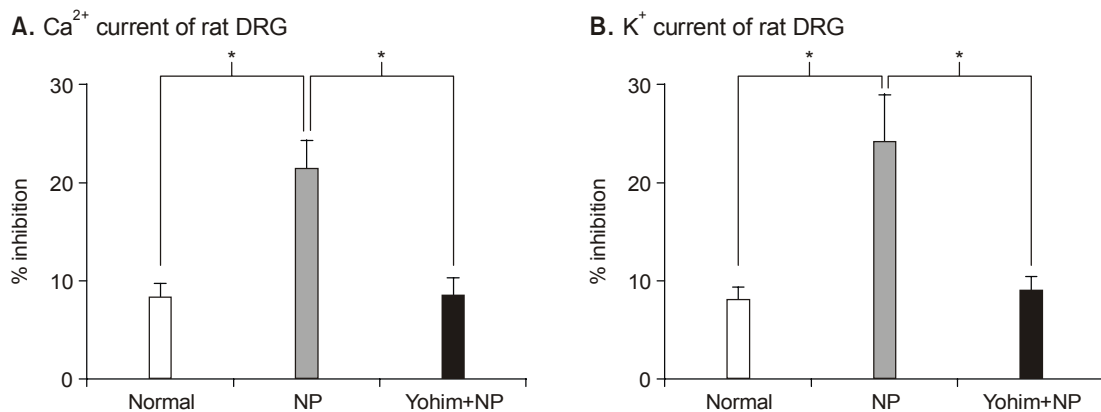
다( $8.14 \pm 1.5\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 5$ )(Fig. 3B, 4A). 이와 대조적으로 모델쥐의 경우, NE은  $K^+$  전류를 상당히 억제하였다( $24.22 \pm 4.86\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 6$ )(Fig. 3B, 4B).

**선택적  $\alpha_2$  길항제인 yohimbine이 NE의  $Ca^{2+}$  전류 및  $K^+$  전류 억제작용에 미치는 영향**

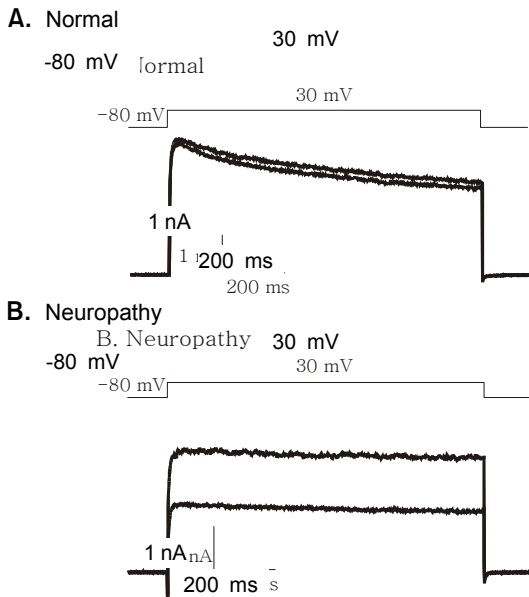
선택적  $\alpha_2$  길항제인 yohimbine이 모델쥐에서 NE의  $Ca^{2+}$  전류 및  $K^+$  전류 억제작용에 어떤 효과를 보이는지 관찰하였다. Yohimbine ( $1\mu M$ )을 10분간 전처리한 후 마찬가지로  $Ca^{2+}$  전류에 대한 NE의 효과를 관찰한 결과 효과가 없거나 조금 억제하였다( $9.24 \pm 1.59\%$  inhibition at 0 mV,  $n = 5$ )(Fig. 5A). 이와 유사하게 yohimbine 전처리시  $K^+$  전류에 대한 NE의 효과도 상당히 미미하였다( $9.01 \pm 1.41\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 6$ )(Fig. 3B). 따라서 신경손상 쥐에서 NE의  $Ca^{2+}$  전류 및  $K^+$  전류 억제작용은  $\alpha_2$  아드레날린 수용체를 통해 일어남을 알 수 있었다.

**$Ca^{2+}$  통로 억제제인 cadmium이 NE의  $K^+$  전류 억제작용에 미치는 영향**

$Ca^{2+}$  통로 억제제인 cadmium (Cd)의  $K^+$  전류에 대한 작용 및 NE의  $K^+$  전류 억제작용에 대한 효과를 관찰하였다. 위에서 기술한 바와 같이 모델쥐의 DRG에서 기록한 막전압을 80 mV에 고정된 상태에



**Fig. 3.** Comparison of norepinephrine (NE) effect on the  $Ca^{2+}$  current and  $K^+$  current among the normal, neuropathic and neuropathic rats with yohimbine. (A) showed the effect of NE on the  $Ca^{2+}$  current in the various conditions. (B) showed the effect of NE on the  $K^+$  current in the various conditions. \*:  $P < 0.05$  compared between groups. NP: neuropathy, Yohim: yohimbine.



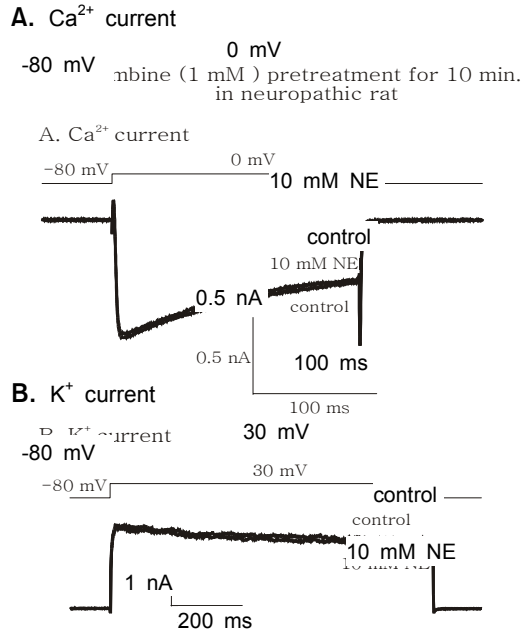
**Fig. 4.** The effects of norepinephrine (NE) on outward  $K^+$  currents of small DRG cells from normal and neuropathic rats. Typical recordings of the whole cell  $K^+$  current induced by 30 mV pulses for 1s in the absence and presence of  $10\mu M$  NE in normal (A) and neuropathic (B) rats.

서 1초 동안 30 mV의 탈분극 자극을 가하여 외향성  $K^+$  전류를 기록하였다. 이  $K^+$  전류에  $Cd^{2+}$  (1 mM)을 투여하면 전류의 크기는 상당히 억제되었다 ( $33.04 \pm 7.46\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 5$ )(Fig. 6). 그러나  $Cd^{2+}$ 에 대한  $K^+$  전류 억제가 일정해졌을 때 NE를 투여하면 NE에 의한 추가적인 전류 억제현상은 관찰되지 않았다( $36.08 \pm 8.22\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 5$ )(Fig. 6). 따라서 모델쥐의 DRG에서 NE에 의한  $K^+$  전류의 억제는  $Ca^{2+}$  전류를 억제함으로써 이차적으로 나타나는 것으로 생각된다.

**$Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  전류 억제제인 iberiotoxin이 NE의  $K^+$  전류 억제작용에 미치는 영향**

전술한 실험 결과 NE이  $Ca^{2+}$  전류를 억제함으로써 이차적으로  $K^+$  전류를 억제하는 것을 알 수 있었는데 이는  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  전류가 NE의  $K^+$  전류 억제기전에 관련될 가능성을 시사한다. 이를 확인하기 위해서  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  전류 억제제인 iber-

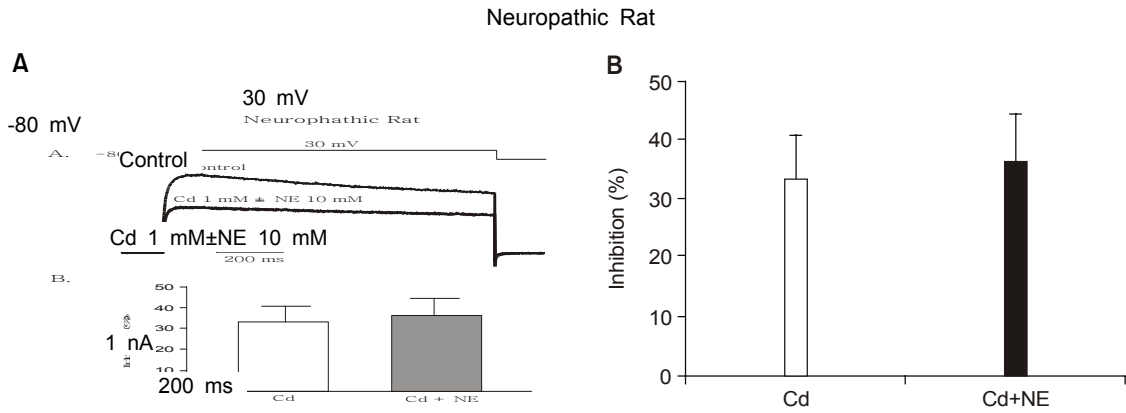
Yohimbine (1 mM) pretreatment for 10 min. in neuropathic rat



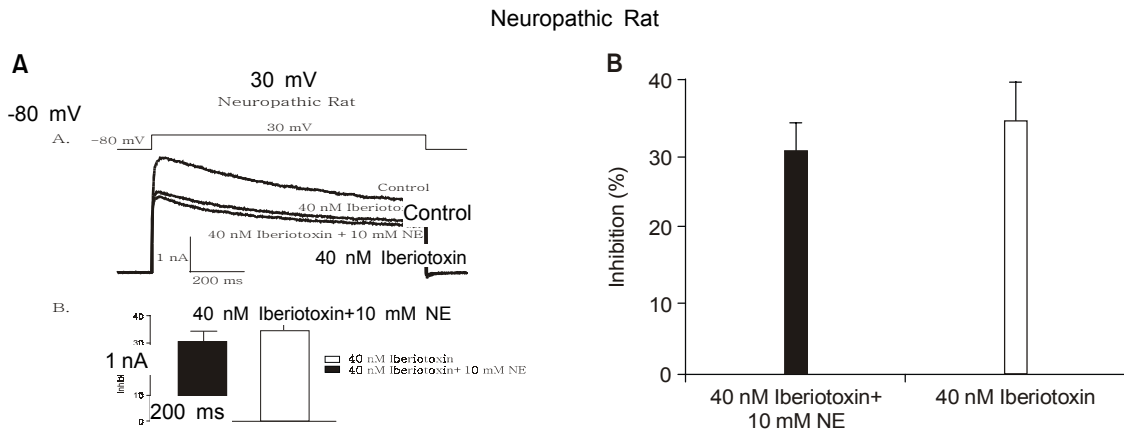
**Fig. 5.** The effects of yohimbine, an  $\alpha_2$  adrenergic antagonist, on the norepinephrine (NE) induced  $Ca^{2+}$  current and  $K^+$  current inhibition in neuropathic rats. A: Typical recordings of NE effect on the whole-cell  $Ca^{2+}$  current induced by 0 mV for 200 ms in the presence of yohimbine ( $1\mu M$ ). B: Typical recordings of NE effect on the whole-cell  $K^+$  current induced by 30 mV for 1s in the presence of yohimbine ( $1\mu M$ ).

iberiotoxin을 직접 투여하여 그 효과를 관찰하였다.

모델쥐의 경우 iberiotoxin (40 nM)을 투여한 결과,  $K^+$  전류가 억제되었는데( $30.39 \pm 4.16\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 5$ )(Fig. 7) iberiotoxin에 의한 전류 억제가 일정해졌을 때 NE를 투여하면 NE에 의한 추가적인 전류 억제현상은 거의 관찰되지 않았다( $34.50 \pm 5.34\%$  inhibition at 30 mV,  $n = 5$ ). 위의 실험 결과로 미루어 볼 때 모델 쥐의 DRG에서 NE에 의한 막의 흥분성 증가는 NE이  $Ca^{2+}$  전류를 억제하여 이차적으로  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  전류를 억제함으로써 막 전압을 탈분극시켜 일어나는 것으로 사료된다.



**Fig. 6.** The effect of cadmium (Cd), a calcium channel blocker, on the norepinephrine (NE) induced  $K^+$  current inhibition in neuropathic rats. (A) Typical recordings of Cd (1 mM) effect on inhibitory effect of NE on the  $K^+$  current in the neuropathic model rats. NE was applied to the cells when the inhibitory effect of Cd on potassium current was stable. (B) Comparison of inhibition of  $K^+$  current amplitude induced by Cd alone and Cd with NE. The data was shown as mean  $\pm$  SE.



**Fig. 7.** The effect of iberiotoxin, a  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channel blocker, on the norepinephrine (NE) induced  $K^+$  current inhibition in neuropathic rats. A: Typical recordings of iberiotoxin (40 nM) effect on inhibitory effect of NE on the  $K^+$  current in the neuropathic model rats. NE was applied to the cells when the inhibitory effect of iberiotoxin on potassium current was stable. B: Comparison of inhibition of  $K^+$  current amplitude induced by iberiotoxin alone and iberiotoxin with NE. The data was shown as mean  $\pm$  SE.

### 고찰

본 실험에서는 SMP에서 교감신경계와 감각신경 특히 통증전달에 관여하는 신경간의 접합 기전이 무엇인지를 밝히고자 하였다. 먼저 손상 받은 신경이 NE에 의해 흥분성이 증가하는지를 확인하여 본 결

과 정상세포와는 달리 NE에 의해 활동전위가 유발 되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 유사한 실험결과 는 좌골신경 전체를 절단한 통증모델에서 이미 보고 된 바 있으며<sup>22)</sup> 본 실험결과와 일치하는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 이러한 흥분성 증가 가 어떤 이온통로의 활성화도 변화와 연관되어 있는지를 조사하는데 초점을 맞추었다. 이를 위해 voltage

clamp 방법을 이용하였는데 이 방법은 막전위를 고정시킨 상태에서 이온통로의 활성도를 조사하기 때문에 막전위 변동에 의해 이차적으로 활성도가 변하는 여러 이온통로의 영향을 배제할 수 있는 장점이 있어 흥분성 증가와 연관될 가능성이 있는 개개의 이온통로를 명확히 밝힐 수 있기 때문이다.

먼저 흥분성 증가와 관계있을 가능성이 있고 또한 대표적 이온통로인  $Ca^{2+}$  channel과  $K^+$  channel에 대한 NE의 효과를 조사하였다. 손상받은 신경세포에서의 경우 정상세포와 달리 NE에 의해  $Ca^{2+}$  current와  $K^+$  current가 억제되었다.  $K^+$  channel은 일반적으로 안정막전위 형성에 중요한 역할을 하며 따라서  $K^+$  current의 감소는 막전위를 탈분극시켜 흥분성 증가에 기여하리라 생각된다. 이때 감소된  $K^+$  current의 종류가 무엇인지를 구체적으로 밝히기 위한 실험을 진행하였다.  $Ca^{2+}$  current 감소와 연관될 가능성이 있고 특히 afterhyperpolarization에 중요한 역할을 하여 신경세포의 연속적 신경방전(repetitive impulse firing)에 영향을 주는 것으로 이미 알려져 있는  $Ca^{2+}$  의존성  $K^+$  이온통로( $K_{Ca}$  channel)가 흥분성 증가에 관여할 가능성을 조사하였다.  $Ca^{2+}$  influx를  $Cd^{2+}$ 로 차단한 경우 NE에 의한  $K^+$  current의 감소가 나타나지 않는 것으로 보아  $K^+$  current의 감소는  $Ca^{2+}$  current의 변화에 의한 이차적인 현상으로 나타남을 확인할 수 있었고 이를 보다 직접 확인하기 위해  $K_{Ca}$  channel blocker인 iberiotoxin 처치 시 NE의 효과가 차단됨도 확인할 수 있었다. 특히  $Cd^{2+}$ 으로  $Ca^{2+}$  current를 억제한 상태에서 NE에 의한  $K^+$  current의 변화가 거의 없는 것으로 보아 delayed rectifier  $K^+$  channel 등 다른 종류의  $K^+$  channel은 흥분성 증가에 거의 관여하지 않을 것으로 사료된다.

한편  $\alpha$  아드레날린 차단제를 투여했을 때 NE에 의한 current 변화가 소실되는 것으로 보아 이 과정이  $\alpha$  아드레날린 수용체를 매개함을 알 수 있었는데 이 결과는 Leem 등의<sup>12)</sup> 결과와 일치하고 있다.

일부 보고에 의하면 정상 배근신경절 세포에서 NE이  $\beta$  아드레날린 수용체를 통해 L type  $Ca^{2+}$  current를 약간 증가시키나 이때 증가된  $Ca^{2+}$  current는  $K^+$  current에 영향을 주지 못해 막흥분성 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 보고되었다.<sup>23)</sup> 본 실험에서는 정상세포에서  $Ca^{2+}$  current의 증가를 관찰할 수 없었으며 일반적으로 약간 감소되는 경향을 보였

다. 이와 같은 상충되는 결과의 원인을 현재로서는 알 수 없다. 아마도 단일세포를 분리하는 과정에서의 미세한 차이가 원인일 가능성이 있고 또한  $Ca^{2+}$  channel은 세포 내 이차전달자에 의해 channel 활성도가 유지되는데 patch clamp시 세포 파괴 후 pipette 용액과 투석 과정에서  $Ca^{2+}$  current가 자연적으로 줄어드는 현상 즉, " $Ca^{2+}$  current run down"에 의해 약간의  $Ca^{2+}$  current의 감소가 유발되었을 가능성도 배제할 수는 없다.

McLachlan 등은<sup>13)</sup> 조직면역학적 방법을 통해 배근 신경절 주위에 교감말단이 둘러싸고 있는 basket 구조를 보고한 바 있다. 이 보고에 의하면 교감말단은 주로 크기가 큰 세포 주위에 분포하고 있다고 보고하였다. 그러나 Xie 등은<sup>24)</sup> 교감신경을 자극하면 C-신경섬유가 활성화되는 것으로 보고하였으며, 좌골 신경(sciatic nerve) 전체를 절단한 모델에서도 큰 세포에 비해 작은 세포에서 NE에 대한 반응의 빈도가 훨씬 높은 것으로 보고되었다.<sup>23)</sup> 상기한 실험결과들은 큰 세포 주위에서 분비된 NE이 확산되어 작은 세포를 활성화시킬 가능성을 암시하고 있다. 왜냐하면 실제 이와 유사한 기전이 bullfrog sympathetic ganglia에서 보고된 바 있는데 이 경우 C-세포 주위에서 분비된 LHRH-like peptide가 실제로는 직접 접촉되어 있지 않은 B-세포에 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>25)</sup> 본 실험에서도 예비실험결과 큰 세포에서는 NE에 대한 반응성을 거의 볼 수 없었으므로 단일신경세포로 분리된 배근신경절 세포에서 NE에 대한 반응성이 잘 나타나는 것으로 보고된 작은 세포를 대상으로 실험하였다.

그러나 NE에 대한 반응성이 있는 신경섬유의 종류에 대해서는 아직 논란이 많다. Leem 등은<sup>12)</sup> 생체 내 실험 상태에서 교감신경자극 시 활성화되는 신경섬유는 주로 큰 신경섬유로 보고한 바 있다. 이 경우에도 중추신경계감각(sensitization)이나 감각전달경로의 변화<sup>26)</sup> 등으로 인해 통증에 대한 과민반응이 올 수 있음을 설명할 수는 있다. 이러한 상충되는 결과에 대한 원인을 현재로는 확실히 알 수 없으며 다만 몇 가지 가능성을 추측할 수는 있다. 즉 만성 통증 동물모델이 여러 종류가 있는데 특히 전체 좌골신경을 절단한 모델과 부분손상모델에서 부분손상 모델은 손상된 신경과 손상되지 않은 신경간의 상호작용이 존재하고 이들 간의 상호작용이 대단히 복



잡할 가능성이 있으나 이에 대한 충분한 이해가 부족한 상태이다. 이런 점이 생체 내, 생체 외 실험에서의 결과에 어떤 차이를 유발할 가능성도 있으리라 추측되며, 생체 내 실험과 생체 외 실험의 중간단계인 뇌절편(brain slice)을 이용한 실험을 통해 이러한 상충되는 결과의 원인을 밝힐 수도 있으리라 생각된다. 한편 현재 배근신경절에서 교감-감각신경간 접합(sympathetic-sensory coupling)이 이루어지는 세포 차원에서의 구체적 기전에 대한 보고는 극히 제한적이다. 따라서 어느 정도 연구결과들이 축적된 후 이를 통해 상충되는 원인을 찾아나가야 할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 SMP 모델에서 배근신경절 세포에서의 교감신경과 통증전달세포간의 전기생리적 결합의 기전으로 막흥분성에 영향을 주는 것으로 이미 알려져 있는 이온통로를 patch clamp 방법을 통해 조사해본 결과  $Ca^{2+}$  의존성  $K^{+}$  전류가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 이러한  $Ca^{2+}$  의존성  $K^{+}$  전류를 조절하는  $Ca^{2+}$  channel의 유형이 무엇인지 NE에 의한  $\alpha$  아드레날린 수용체의 활성화에 의해 어떤 2차 정보전달계(secondary messenger system)가 동원되는지, 일반적인  $\alpha$  아드레날린 수용체 반응과는 어떤 차이점이 존재하는지 등에 대한 것은 앞으로 연구되어야 할 과제로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Mitchell SW: Injuries of nerves and their consequences. J.B. Lippincott, Philadelphia 1872; 252-300.
- Richards RL: Causalgia. A centennial review. Arch Neurol 1967; 16: 339-50.
- Devor M: Nerve pathophysiology and mechanisms of pain in causalgia. J Auton Nerv Syst 1983; 7: 371-84.
- Roberts WJ: A hypothesis on the physiological basis for causalgia and related pains. Pain 1986; 24: 297-311.
- Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988; 33: 87-107.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain 1990; 43: 205-18.
- Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 1992; 50: 355-63.
- Attal N, Neil A, Chen L, Guibaud G: Effects of adrenergic depletion with guanethidine before and after the induction of a peripheral neuropathy on subsequent mechanical-, heat- and cold-sensitivities in rats. Pain Suppl 1990; 5: S464.
- Shir Y, Seltzer Z: Effects of sympathectomy in a model of causalgiform pain produced by partial sciatic nerve injury in rats. Pain 1991; 45: 309-20.
- Kim SH, Na HS, Sheen K, Chung JM: Effects of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. Pain 1993; 55: 85-92.
- Chung K, Kim HJ, Na HS, Park MJ, Chung JM: Abnormalities of sympathetic innervation in the area of an injured peripheral nerve in a rat model of neuropathic pain. Neurosci Lett 1993; 162: 85-8.
- Leem JW, Gwak YS, Nam TS, Paik KS: involvement of alpha-2 adrenoceptors in mediating sympathetic excitation of injured dorsal root ganglion neurons in rats with spinal nerve ligation. Neurosci Lett 1997; 234: 39-42.
- McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M: Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. Nature 1993; 363: 543-6.
- Devor M, Janig W, Michaelis M: Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. J Neurophysiol 1994; 71: 38-47.
- Janig W, McLachlan M: The role of modification in noradrenergic peripheral pathways after nerve lesions in generating pain. Pharmacological approaches to the treatment of chronic pain: new concept and critical issues, IASP Press, Seattle, 1984; 101-28.
- Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetz EJ: Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. Science 1984; 225: 743-5.
- Levine JD, Taiwo YO, Collins SD, Tam JK: Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. Nature 1986; 323: 158-60.
- Taiwo YO, Levine JD: Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. Brain Res 1988; 458: 402-6.
- Coderre TJ, Basbaum AI, Levine JD: Neural control of vascular permeability: interactions between primary afferents, mast cells, and sympathetic efferents. J

- Neurophysiol 1989; 62: 48-58.
20. Lopez M, Stebbing M, Hodges PW, McLachlan EM: Noradrenaline produces non-specific effects in axotomized neurons in DRG in vitro. Abstract for Society for Neuroscience 29<sup>th</sup> annual meeting 1999; 1941.
  21. Xie J, Chung JM, Chung K: Alpha adrenergic mRNA expression in the dorsal root ganglion (DRG) after spinal nerve ligation. Abstract for Society for Neuroscience 29<sup>th</sup> annual meeting 1999; 1941.
  22. Peterson M, Zhang J, Zhang ZM, LaMotte RH: Abnormal spontaneous activity and responses to norepinephrine in dissociated dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction. Pain 1996; 67: 391-7.
  23. Abdulla FA, Smith PA: Ectopic alpha-2 adrenoceptors couple to N-type  $Ca^{2+}$  channels in axotomized rat sensory neurons. J Neurosci 1997; 17: 1633-41.
  24. Xie Y, Zhang J, Peterson M, LaMotte RH: Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. J Neurophysiol 1995; 73: 1811-20.
  25. Jan YN, Jan LY, Kuffler SW: A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 1501-5.
  26. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. Nature 1992; 355: 75-8.
-