압박성 신경병증 모델 쥐의 신경병증통증 유사 행동에 대한 말초 및 척수 내 GABA성 체계의 역할

연세대학교 대학원

의과학과

전 영 훈

압박성 신경병증 모델 쥐의 신경병증통증 유사 행동에 대한 말초 및 척수 내 GABA성 체계의 역할

연세대학교 대학원

의과학과

전 영 훈

압박성 신경병증 모델 쥐의 신경병증통증 유사 행동에 대한 말초 및 척수 내 GABA성 체계의 역할

지도 임 중 우 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

전 영 훈

전영훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

본 논문이 이루어지기까지 자상한 지도 편달과 아낌없는 조언을 베풀어 주신 임중우 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문 지도를 위해 애써주신 남택상 교수님, 윤덕미 교수님께도 깊이 감사드립니다.

항상 따뜻한 관심과 애정으로 지켜봐 주신 생리학 교실 선생님들께도 감사드리며, 오늘이 있기까지 사랑과 정성으로 키워주신 부모님과 사랑하는 아내 유선이와 함께 기쁨을 나누고자 합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약 · 1

Ⅰ. 서론 · 3

II. 재료 및 방법 · 6
1. 압박성 신경병증 모델 쥐의 제작 · · · · · · · · · · · · · · · · 6
2. 행동학적 실험 · 6
가. 약물투여 · 6
나. 기계적 통증반응 측정 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 7
3. 전기생리학적 실험 · 7
가. 전기생리실험을 위한 동물 준비 · · · · · · · · · · · · · · 7
나. 요수 내 후각신경세포 반응도 측정 · · · · · · · · · · · · 8
4. 약물 · 9
5. 통계분석 · 9

III. 결과 · 10
1. 만성후근절압박에 의해 유도된 통증행동 및 요수 내 후각 신경세포 반응도의 변화 · 10
2. 만성후근절압박 후 요수 후각 내 GABA성 억제의 소실 · 12
3. 압박성 신경병증 모델 쥐에 GABA 수용체 작용제를 요수에 적용 시 통증행동 및 요수 내 후각 신경세포 반응도에 미치는 효과 · 13
4. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 길항제의 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · 16
5. 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과 · 17

6. 정상 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과 ····· 18
7. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-B 수용체 작용제의 효과 ····· 20

IV. 고찰 ····· 21

V. 결론 ····· 25

참고문헌 ····· 26

영문요약 ····· 31

그림 차례

그림 1. 대조군 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐에서 기계적 통증반응의 변화 · 10

그림 2. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐 간의 요수 내 후각 신경세포의 반응도 · 11

그림 3. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐 간의 요수 내 후각 신경세포 반응도 비교 · 12

그림 4. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐에서 GABA-A 수용체 길항제의 요수 표면 적용이 요수 WDR 신경세포 반응도에 미치는 영향 · 13

그림 5. 압박성 신경병증 모델 쥐에 GABA 수용체 작용제의 거미막밑 주입이 통증행동에 미치는 영향 · · · · · · · · · · · 15

그림 6. 압박성 신경병증 모델 쥐에서 GABA 수용체 작용제의 요수표면 적용이 요수 내 후각 신경세포 반응도에 미치는 영향 · 16

그림 7. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 길항제의 효과 · · · · · · · · · · · · · 17

그림 8. 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과 · 18

그림 9. 정상 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과 · 19

그림 10. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-B 수용체 작용제의 효과 · · · · · · · · · · · · 20

국문요약

압박성 신경병증 모델 쥐의 신경병증통증 유사 행동에 대한 말초 및 척수 내 GABA성 체계의 역할

신경 손상은 신경병증(neuropathy)과 이에 수반하는 통증을 초래한다. 외상성 신경병증에 있어서 척수의 GABA성 억제의 소실이 신경병증통증 관련 행동을 유발한다고 알려졌지만 압박성 신경병증에서는 알려진 바 없다. 본 연구에서는 압박성 신경병증을 유도하는 만성후근절압박 모델을 이용해서 압박성 신경병증통증에 관해 척수 내 GABA성 체계의 역할과 말초에 가해준 GABA관련 약물의 효과를 조사하였다.

압박성 신경병증은 흰쥐의 좌측 요수 5번 후근절을 만성적으로 압박하여 유발하였다. 행동학적 실험으로 뒷발의 회피반응 역치를 측정하여 통증반응을 조사하였다. 전기생리학적 실험으로 요수 내 후각신경세포의 신경활동과 수용야에 가해준 자극에 대한 반응도를 측정하였다. GABA 수용체 작용제나 길항제는 행동실험의 경우 요수 거미막 밑 주입이나 압박 쪽 발바닥의 피하주사를 통해 그리고 전기생리학적 실험의 경우 요수표면 적용을 통해 가해주었다.

실험 결과 첫째, 압박성 신경병증 모델 쥐(모델 쥐)에서 후근절 압박 직후 압박된 쪽 발의 회피반응 역치가 감소함으로서 통증반응이 유발됨을 보였으며 이는 10주 이상 유의하게 지속되었다. 둘째, 통증반응을 보인 모델 쥐에서 요수후각세포는 무해자극과 유해자극에 대해 그 반응이 항진되어 있었다. 셋째, 모델 쥐 요수후각세포에서 조사된 반응도 항진은 정상 쥐에서 요수표면에 bicuculline(GABA-A 수용체 길항제) 적용 시 요수후각세포에서도 유사하게 관찰되었다. 넷째, 모델 쥐에서 관찰된 통증반응과 항진된 요수후각세포 반응도는 각각 거미막 밑 주사나 요수표면 적용을 통해 가해준 muscimol(GABA-A 수용체 작용제)과 baclofen(GABA-B 수용체 작용제)에 의해 완화 및 억제되었다. 다섯째, 모델 쥐의 압박 쪽 발에서 관찰된 통증반응은 압박 쪽 발바닥에 피하주사한 저농도 muscimol(0.015-0.03 nmol)에

의해 완화되었으나 고농도 muscimol(15 nmol)이나 baclofen(0.01-500 nmol)에는 영향 받지 않았다.

이상의 결과는 만성후근절압박에 의한 신경병증통증에 있어서, 척수 내 GABA성 억제의 소실을 통한 후각신경세포의 반응도 항진이 하나의 유발기전이며 저농도 muscimol의 말초처치가 한 치료법일 수 있음을 시사한다.

핵심되는 말 : 압박성 신경병증, 만성후근절압박, 통증반응, GABA 수용체

압박성 신경병증 모델 쥐의 신경병증통증 유사 행동에 대한 말초 및 척수 내 GABA성 체계의 역할

<지도교수 **임 중 우**>

연세대학교 대학원 의과학과

전 영 훈

Ⅰ. 서론

신경 손상은 신경병증(neuropathy)과 이에 수반하는 통증을 초래한다. 이러한 신경병증통증의 특징적인 증상으로는 특별한 자극을 주지 않았음에도 지속적이고 비정상적으로 타는 듯한 자발통(spontaneous burning pain), 기계적 또는 높은 온도의 유해자극을 가했을 때 정상에 비해 통증을 강하게 느끼는 통각과민(hyperalgesia), 비유해성 기계 또는 열자극에 대해서도 통증으로 인식하는 이질통(allodynia) 등이 있다[1]. 임상에서 신경병증통증 환자 중 신경병증 관련 요통(neuropathy involved low back pain) 환자가 60% 이상을 차지하는 것으로 보고하고 있다[2]. 이들 신경병증 관련 요통 환자는 그 통증의 정도가 매우 심하여 일상생활 유지에 심각한 문제점을 갖고 있는바 즉각적으로 치료되어야 함에도 불구하고 그렇지 못함이 현실이다. 이는 이 질병에 관한 발병 기전에 관한 정보가 매우 미약하기 때문이다[3].

신경병증 관련 요통의 주된 원인으로는 후근절(dorsal root ganglion) 및 신경근(nerve root)의 압박(compression)이 있는데, 이러한 압박은 요부의 추간판탈출증(herniation of nucleus pulposus)이나 추간공협착증(intervertebral foramen stenosis)에 의하여 이루어진다고 알려졌다. 신경의 압박에 의한 압박성 신경병증 이외에 신경의 외상(trauma)에 의한 외상성 신경병증(traumatic neuropathy) 역시 통증을 야기하는데 이를 외상성 신경병증통증으로 생각할 수 있다. 외상성 신경병증통증은 그 발병 기전에 관하여 많은 정보가

제공되었는데, 그 이유는 이 질병에 대한 다양한 동물모델이 개발되어 이를 이용한 실험적 접근이 용이하였기 때문이다. 이러한 모델에는 만성협착손상(chronic constriction injury)[4], 부분 좌골신경 결찰(partial sciatic nerve ligation)[5], 요수 5, 6번 척수신경 결찰(L5-6 spinal nerve ligation)[6] 모델 등이 있다. 그러나 앞서 언급한바와 같이 신경병증 관련 요통의 주원인인 압박성 신경병증에 관해서는 연구가 미미한 실정인데, 그 이유는 이에 관한 동물모델이 결여되었기 때문이다. 하지만 최근에 압박성 신경병증 유도를 위해 후근절과 신경근을 압박함으로서 신경손상을 가하는 만성후근절압박(chronic compression of dorsal root ganglion) 모델이 개발되었다[7]. 이 만성후근절압박 모델은 임상의 압박성 신경병증을 대변할 수 있는데, 그 이유로는 첫째, 후근절 및 신경근을 장기적으로 압박하며, 둘째, 만성적인 기계적 및 열 통각과민(mechanical and thermal hyperalgesia)을 유도하며, 그리고 셋째로, 특별한 운동장애를 보이지 않는다는 점이다[7]. 따라서 이 모델은 요통 연구에 매우 적합한 모델로서 이용되어 질 수 있으나 아직까지는 이를 이용한 요통의 발병 기전에 관한 연구가 부족한 실정이다.

외상성 신경병증 모델을 이용한 연구를 통하여 지금까지 신경병증통증의 생성기전에 관해 여러 가지 설명이 제시되고 있다[8]. 그중 하나로서 척수 내에서 억제성 긴장의 소실로 인한 체감각신경의 민감화 유도가 제시되고 있다[9]. 이에 관한 실험 증거는 다음과 같다. 첫째, 정상 척수 내에서 억제성 신경전달물질 GABA를 함유하는 중간신경섬유는 일차구심신경의 중추 쪽 종말 및 이차체감각신경의 세포체나 수상돌기에 연결되어 있음이 관찰되었다[10]. 둘째, 병적 상황인 말초신경이나 척수신경에 손상을 받은 경우에는 척수 내 GABA-면역반응(immunoreactive) 세포 수 감소[11-15], GABA 합성 효소인 GAD 65[12] 및 GABA의 재활용 효소인 GAT-1의 감소[16], 그리고 GABA-A 및 GABA-B 수용체의 변화 등이 보고되었다[17]. 셋째, 정상 쥐의 척수에 GABA 수용체 길항제를 주입한 결과 통증반응이 유발되고, 척수후각 내 신경세포가 민감화됨이 보고 되었다[9,18-20]. 넷째, 외상성 신경병증통증 모델 쥐에서 유도된 통증반응이 GABA-A 및 GABA-B 수용체 작용제의 거미막밑 주사(intrathecal injection)에 의해 완화됨이 관찰되었다[21-24]. 다섯째, 임상적으로 만성 통증 환자에서 GABA-B 수용체 작용제인 baclofen의 거미막밑 주입이 진통효과를 발휘함이 보고되었다[25,26]. 이들 결과는 외상성 신경병증

통증에서 척수 내 GABA성 중간신경세포의 소실이 통증 유발에 중요하다는 것을 의미한다. 하지만 추간판탈출증이나 추간공협착증 등에 의해 발생하는 압박성 신경병증 상황에서도 척수 내 GABA체계의 소실이 통증유발에 관여하는지는 밝혀지지 않고 있다.

GABA는 말초에 작용하여서도 통증 조절에 관여할 수 있는데 이에 관해서는 다음과 같은 실험증거가 있다. 즉, GABA 수용체가 일차구심신경의 말초 종말에 존재함이 관찰되었고, 포르말린 피하주사에 의해 유도된 통각과민이 GABA-A 수용체 효현제인 muscimol의 국소 주입에 의해 완화되었다[27]. 그러나 말초의 GABA 체계가 신경병증통증 조절에 관여하는지에 관해서는 전혀 알려지지 않고 있다.

본 연구는 압박성 신경병증을 유도하는 만성후근절압박 모델을 이용해서 압박성 신경병증통증에 관해 척수 내 GABA성 체계의 역할과 말초에 가해준 GABA관련 약물의 효과를 조사함을 연구목표로 삼았다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 압박성 신경병증 모델 쥐의 제작

실험동물은 연세대학교 의과대학 실험 동물부에서 사육한 흰쥐(Sprague-Dawley, 200~250 g)를 사용하였고, 압박성 신경병증 모델은 Hu SJ 의 방법에 따라 제작하였다[7]. 흰쥐를 enflurane(유도 3%, 유지 2%), O_2의 혼합가스로 마취시킨 뒤 요천추부위 척추를 따라 정중면으로 절개한 후 주위 근육을 젖혀 요추 5번(L5) 추간공을 드러냈다. 그 후 후근절 및 신경근을 압박하기위해 지름 0.7mm, 길이 4mm의 스테인레스 철심을 L5 추간공에 삽입하고, 근육과 피부를 다시 봉합한 후 회복실로 복귀시켰다. 수술과정은 같으나 후근절 및 신경근을 압박하지 않은 대조군(sham) 쥐를 제작하였다.

2. 행동학적 실험

가. 약물투여

척수 내 약물주입 방법은 요추천자(lumbar puncture)를 통해 거미막 밑 주입을 시행하였다. 흰쥐를 고농도의 enflurane(유도 4%), O_2 혼합가스로 신속히 흡입마취시킨 뒤, 천추로부터 극상돌기(spinous process)를 따라 T13-L1 척추를 확인한 후 Hamilton 주사기(26-G 바늘)를 T12-L1 극상돌기 사이에 있는 척수강(spinal canal)을 통하여 삽입하였다. 이때 주사기 끝은 거미막 밑에 존재토록 하는데 이는 lidocain(2%, 10 μl) 주입에 의한 하지마비로서 확인하였다. 삽입된 주사기를 통하여 약물을 주입하였고, 이때 물질의 주입은 15초에 걸쳐 시행하였다.

또 다른 약물주입 방법으로 발바닥 내 피하주사(intraplantar injection)을 시행하였다. 발바닥 내 주입은 신속히 흡입마취 후 Hamilton 주사기(30-G 바늘)를 이용하여 발바닥의 피하에 약물을 20 μl의 용량으로 주입하였고, 30초에 걸쳐 시행하였다.

나. 기계적 통증반응 측정

압박성 신경병증 모델에 있어서 통증반응 유발 여부는 행동검사를 통하여 조사하였다. 동물을 금속철망(망 간격, 0.5 x 0.5 cm) 위쪽에 위치한 투명한 플라스틱 상자(8 × 8 × 25 cm) 안에 넣은 뒤, 이들이 환경 변화에 따르는 스트레스를 피하도록 15분 동안 적응시켰다. 동물이 적응된 후 가는 필라멘트(von Frey filament; Stoelting, Chicago, IL; 범위 1.65-5.18로서 0.008-12.5 g에 상응)가 부착된 자극기를 이용하여 철망 사이로 필라멘트를 뒷 발바닥에 가해주면서 발의 회피 반응 여부를 조사하였다. 여기서 회피반응을 일으키기 위한 필라멘트의 최저 강도를 발회피반응 역치(PWT, paw withdrawal threshold)라고 정의하고 이를 구하여 기계적 통증반응 정도의 지표로 삼는다. 즉, 회피반응 역치가 감소하면 통증의 정도가 증가하는 것으로 판단한다. 이때 회피반응 역치는 기존에 발표된 상하 검증법(up-down testing paradigm)으로 측정하였다[28].

3. 전기생리학적 실험

가. 전기생리실험을 위한 동물 준비

전기생리실험을 위한 실험동물의 복강에 30% urethane(Sigma, St. Louis, MO, USA; 5 mg/kg)을 주사하여 마취시키고, 실험 도중에 동물이 깰 경우 추가 주사하였다. 골격근이완제(skeletal muscular relaxants)를 주입하기 위해 외경정맥(external jugular vein)에 가는튜브(PE-10 tube)를 삽입하고, 기관에 삽관하였다. 척수 후각에서의 신경기록을 위해 등쪽 털을 면도한 후 T13-L3 척추에서 후궁절제술(laminectomy)를 시행하여 요수 팽대(lumbar enlargement)를 드러내었다. 시술 후 동물을 귀고정장치(ear bar)와 척추 고정장치(spinal clamp)를 이용하여 뇌척수정위장치에 고정시키고 등쪽 피부를 펼쳐 외부 고정대에 잡아매어 풀(pool)을 형성한 뒤 척수 건조 방지를 위해 파라핀(paraffin) 오일을 채웠고, 이후 경막(dura mater)과 거미막(arachnoid membrane)을 제거하였다. Vecuronium bromide(베로니, 휴온스)를 미리 삽입한 외경정맥에 주사해 근육을 마비시킨 후 인공호흡기(CWE Inc, Ardomre, PA, USA)로 호흡시켰고, CO_2 분석기(CWE Inc, Ardomre, PA,

USA)를 이용해 호기의 CO_2 농도가 3.5-4.5%로 유지되도록 호흡량을 조절하였다. 전 실험 기간 동안 동물의 체온유지를 위해 직장온도를 감지하였으며, 열담요와 열전구를 사용하여 36-37°C의 체온을 유지하였다.

나. 요수 내 후각신경세포 반응도 측정

요수 내 후각신경세포 반응도 기록은 광범위작동역(WDR, wide dynamic range) 신경세포의 단일신경활동을 기록하였다. 탄소전극(carbon electrode, 2-4MΩ at 1 kHz)을 사용하여 L4-L5 척수 수준에서 척수 표면으로부터 미세위치조절기(Narishige, Tokyo, Japan)를 이용해 요수후각 내로 삽입하면서, 발바닥을 가볍게 솜방망이로 두드리며, 500-1000 μm 깊이의 척수 후각에 존재하는 단일 신경세포 중 WDR 신경세포를 찾았다. 이때 WDR 신경세포란 brush, press, pinch 자극에 대해 모두 반응하는 세포로서 통각정보를 척수에서 고위 중추로 전달하는데 관여한다고 알려져 있다. 기계적 자극으로는 세 종류가 이용되었는데, 체감각 수용장 중심을 붓으로 긁어가며 자극하거나(brush), 큰 동맥용 집게로 집거나(약 100 g의 힘 발휘, press), 또는 작은 동맥용 집게로 집는(약 400 g의 힘 발휘, pinch) 자극이었다. 각 자극을 실험자의 손등 피부에 가해주었을 때 가벼운 촉각, 압각, 그리고 통각으로 인식되었다. 자극에 의해 탐지된 신경활동은 신호확장기(DAM-80, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)로 10000배 증폭한 다음 오실로스코프 화면상에 나타내었다. 증폭된 여러 크기의 신경활동 신호로부터 분별기(window discriminator, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 동일한 크기를 가진 단일 신호를 분리하였으며, 단위 시간당 발생하는 단일 신경활동 신호의 개수는 전기생리자료 수집계(1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK)와 전기생리자료 분석 프로그램인 Spike 2(Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK)를 이용하여 컴퓨터에 기록하였다.

4. 약물

실험에 사용된 약물로는 GABA 수용체 아형들에 대한 작용제나 길항제가 포함되었는데, 이들은 행동실험의 경우 요수 거미막 밑 주입이나 압박 쪽 발바닥의 피하주사를 통해 그리고 전기생리학적 실험의 경우 요수표면 적용을 통해 가해주었다. GABA-A 수용체의 작용제와 길항제로는 각각 muscimol(Tocris Cookson, U.K.)과 (-)-bicuculline methobromide(Tocris Cookson, U.K.)를, 그리고 GABA-B 수용체의 작용제와 길항제로는 baclofen(Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 CGP 52432(Tocris Cookson, U.K.)를 사용하였으며, 모든 시약은 실험에 사용할 농도에 맞추어 0.9% saline에 녹였다.

5. 통계분석

모든 자료는 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 행동학적 실험과 전기생리학적 실험에서 각 그룹 간, 또는 신경세포 간의 비교는 Mann-Whitney rank-sum test로 분석을 하였고, 요수 내 후각 신경세포의 약물에 대한 반응도의 변화에 대한 분석은 paired *t*-tests를 통해서 분석하였다. p 값이 0.05보다 작은 경우에 의의 있는 차이가 있다고 간주하였다.

Ⅲ. 결과

1. 만성후근절압박에 의해 유도된 통증반응 및 요수 내 후각신경세포 반응도의 변화

압박성 신경병증 모델에 있어서 통증반응의 유발과, 요수 내 후각신경세포 반응도의 변화를 보기위해 행동학적 실험과 전기생리학적 실험을 하였다.

가. 행동학적 실험

요수 5번 후근절 및 신경근을 압박 후 발회피반응 역치(PWT)는 18 g에서 하루 뒤에 4.22 ± 1.45 g으로 감소했으며 운동장애는 보이지 않았다(그림 1). 반면 후근절 및 신경근을 압박하지 않은 대조군(sham)의 PWT는 변화를 보이지 않았다. 만성후근절압박에 의해 유발된 기계적 통증반응은 10주 이상 유의하게 지속되었다.

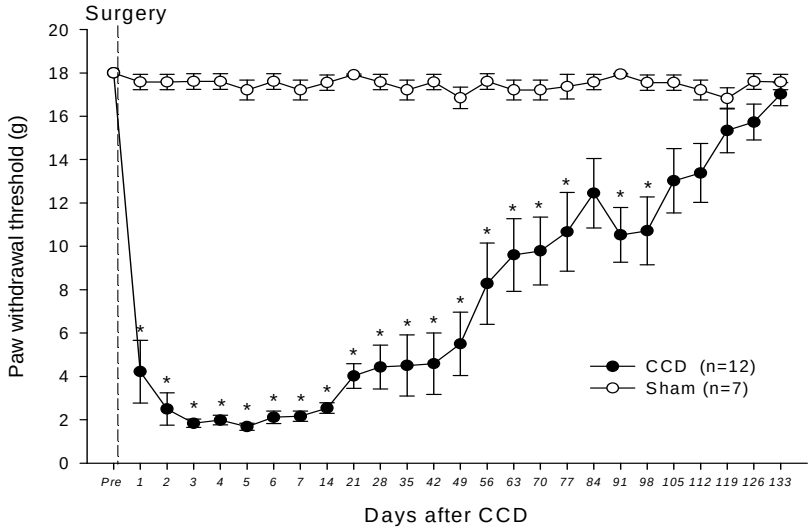

그림 1. 대조군 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐에서 기계적 통증반응의 변화. 후근절 및 신경근을 압박하여 압박성 신경병증 모델 쥐를 제작 후 발회피반응 역치(PWT)를 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 모델 쥐의 PWT는 대조군(Sham) 쥐에 비해 10주 이상 유의하게 감소하였다. CCD, chronic compression of dorsal root ganglion(만성후근절 압박 모델 쥐); pre, pre-PWT 값. (p<0.05, Mann-Whitney rank-sum test)

나. 전기생리학적 실험

정상 쥐와 후근절을 압박함으로서 통증반응을 보이는 모델 쥐를 대상으로 말초 수용야에 가해준 일련의 기계적 자극(brush, press, pinch)에 대한 요수후각세포의 반응도를 관찰하였다(그림 2). 본 실험에서 반응도가 기록된 WDR 신경세포는 제4~5 요수 표면에서 정상 쥐의 경우 645 ± 17 μm 깊이에 위치했으며, 모델 쥐는 693 ± 23 μm 깊이에 위치했다. Brush 자극에 대한 정상 쥐의 요수후각세포의 활동전위는 14.8 ± 1.2 spikes/sec을 보인 반면 모델 쥐는 28.2 ± 0.8 spikes/sec 보였다(그림 3). 또한 Press 자극(정상 쥐: 29.1 ± 2.6, 모델 쥐: 37.8 ± 5.4 spikes/sec)과 Pinch 자극(정상 쥐:42.1 ± 3.1, 모델 쥐: 55.4 ± 5.8 spikes/sec)에 대한 요수후각세포의 반응은 모델 쥐가 정상 쥐보다 증가하였다.

이와 같은 결과는 통증반응을 보인 모델 쥐에서 후각신경세포 반응도가 항진되었음을 의미한다.

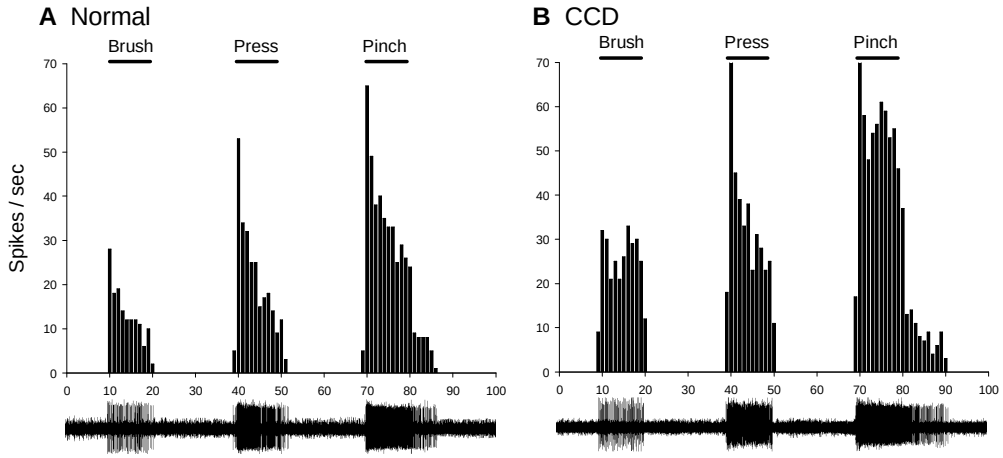

그림 2. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐 간의 요수 내 후각신경세포의 반응도. 정상 쥐(A)와 모델 쥐(B)의 요수 내 광범위작동역(WDR) 신경세포를 세포외기록법으로 기록하였으며, 말초 수용야에 가해준 brush, press, pinch자극(각 10초)에 의해 유발되는 활동전위(그림의 아래)와 그때의 초당 활동전위 빈도수(위의 그림)에 관한 예를 보여준다. 모델 쥐의 신경세포 반응도가 정상 쥐와 비교하여 모든 자극에 대해서 증가되었다.

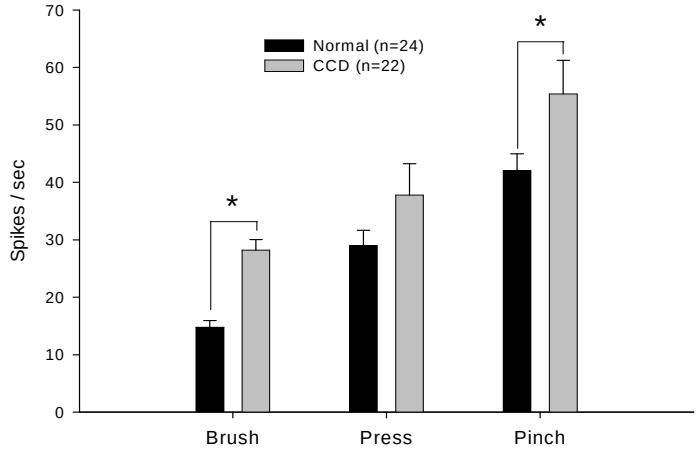

그림 3. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐 간의 요수 내 후각신경세포 반응도 비교. 말초 수용야에 가해준 brush, press, pinch 자극(각 10초)에 의해 개별 후각신경세포에서 유발된 평균 활동전위 수(자극기간인 10초 동안의 평균)를 총 샘플에 대한 평균값으로 표시하였다. 모델 쥐는 정상 쥐과 비교하여 brush와 pinch 반응에서 유의한 증가를 보였다. (p<0.05, Mann-Whitney rank-sum test)

2. 만성후근절압박 후 요수 후각 내 GABA성 억제의 소실

외상성 신경병증의 경우 요수 후각 내 GABA성 중간신경세포가 감소하여 이차체감각신경의 흥분성이 증가할 수 있다고 보고되었는데, 압박성 신경병증의 경우 보고 된 바가 없다. 본 실험은 압박성 신경병증에 있어서 세포외 기록법을 통해 GABA성 억제의 소실 여부를 관찰했다(그림 4).

정상 쥐의 경우 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(5 μg)을 요수 표면에 적용 후 15분경 말초 수용야에 가해준 기계적 자극(brush, press, pinch)에 대한 척수후각 신경세포의 반응도가 항진되었다(그림 4A,C). brush 자극에 대한 척수후각 신경세포 반응은 bicuculline 적용 전 반응(control, 100%)에 비해 280 ± 12.2% 증가했으며, press(414.9 ± 100.2%) 자극과 pinch(210.4 ± 40.1%) 자극에 대한 반응 역시 증가했다. 하지만 모델 쥐는 유의한 변화를 보이지 않았다(그림 4B,D).

이와 같은 결과는 정상 쥐는 요수 후각 내에서 GABA성 억제가 유지되고 있지만, 압박성 신경병증 모델 쥐는 소실되었음을 보여준다.

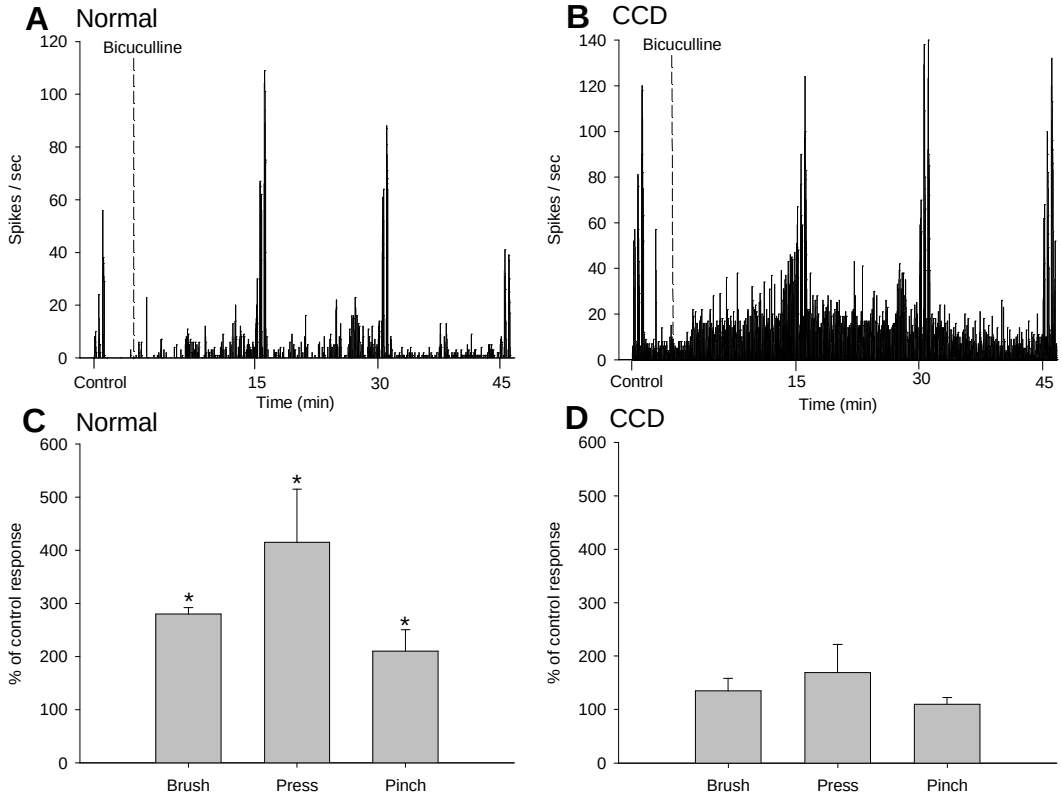

그림 4. 정상 쥐와 압박성 신경병증 모델 쥐에서 GABA-A 수용체 길항제의 요수 표면 적용이 요수 WDR 신경세포 반응도에 미치는 영향. *A* 와 *B*는 정상 쥐와 모델 쥐에서 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(5 μg)을 요수 표면에 적용 후 말초 수용야에 가해준 brush, press, pinch 자극에 대한 요수 내 후각 WDR 신경세포의 반응에 관한 한 예를 보여준다. 여기서 bicuculline을 적용하기 전의 반응에 대해 적용 후 15분경과 시의 반응의 변화율(%)을 체취한 모든 샘플에서 계산하여 그 평균 변화율을 C와 D에 나타내었다. 정상 쥐의 경우는 brush, press, pinch 반응 모두에서 유의한 증가를 보인 반면 모델 쥐의 경우는 유의한 변화를 보이지 못했다. ($p<0.05$, paired t-test)

3. 압박성 신경병증 모델 쥐에 GABA 수용체 작용제를 요수에 적용 시 통증행동 및 요수 내 후각신경세포 반응도에 미치는 효과

기계적 통증반응이 유발된 압박성 신경병증 모델 쥐에 GABA 수용체 작용제의 효과를 알아보기 위해 GABA-A 수용체 작용제(muscimol)와 GABA-B

수용체 작용제(baclofen)를 이용하여 행동학적 및 전기생리학적 실험을 하였다.

가. 행동학적 실험.

기계적 통증반응이 유발된 모델 쥐에 요추천자 방법으로 GABA-A, B 수용체 작용제인 muscimol과 baclofen을 각각 0.1, 0.3 μg, 그리고 1 μg을 요수 4, 5 부위 거미막 밑에 주입하고, 15분 간격으로 PWT을 측정하였다(그림 5). muscimol을 0.1 μg 주입 시 PWT는 주입 전 2.294 ± 0.15 g 에서 주입 후 11.2 ± 0.88 g 으로 증가하였다(그림 5A). 0.3 μg(주입 전: 2.485 ± 0.19 g, 15분: 11.74 ± 1.98 g), 1 μg(주입 전: 2.731 ± 0.28 g, 15분: 17.608 ± 0.36 g) 주입 시는 농도에 비례해서 PWT가 증가하였고 완화시간 역시 증가하였다. 하지만 1 μg을 주입 시 7마리 중 4마리에서 약간의 운동장애를 보였다. muscimol(1 μg)의 통증반응 완화효과는 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(5 μg)을 함께 주입했을 때 억제되었다.

모델 쥐에 baclofen을 0.1 μg을 주입 시 PWT는 주입 전 2.123 ± 0.15 g 에서 주입 후 7.692 ± 0.79 g 으로 증가하였다(그림 5B). 0.3 μg(주입 전: 2.332 ± 0.19 g, 15 분: 13.678 ± 1.73 g), 1μg(주입 전: 2.657 ± 0.24 g, 15분: 14.737 ± 1.8 g)을 주입 시는 농도에 비례해서 PWT가 증가하였고 완화시간 역시 증가하였다. baclofen(1 μg)의 통증반응 완화효과는 GABA-B 수용체 길항제인 CGP 52432(3 μg)를 함께 주입했을 때 억제되었다.

이와 같은 결과는 요수에 적용한 GABA 수용체 작용제가 압박성 신경병증 모델 쥐에서 유발된 통증반응을 효과적으로 완화하며, 이 효과는 요수 내 GABA 수용체를 통해 나타난 것을 보여준다.

나. 전기생리학적 실험

모델 쥐에서 GABA-A, B 수용체 작용제인 muscimol과 baclofen을 요수 표면에 적용 후 말초 수용야에 가해준 기계적 자극에 대한 요수 내 WDR 신경세포의 반응도를 측정했다(그림 6).

brush 자극에 대한 요수후각세포 반응은 muscimol(0.1 μg) 적용 전 반응(control, 100%)에 비해 48.8 ± 17.8%로 감소했으며, press(15.8 ± 3.6%) 자극과 pinch(12.4 ± 5.4%) 자극에 대한 반응 역시 감소하였다(그림 6A,C).

모델 쥐의 요수 표면에 baclofen(0.1 μg)을 적용 후 brush 자극에 대한 요수후각세포 반응은 baclofen(0.1 μg) 적용 전 반응(control, 100%)에 비해 51.6 ± 17.4%로 감소했으며, press(13.1 ± 6.8%) 자극과 pinch(17.3 ± 8.3%) 자극에 대한 반응 역시 감소하였다(그림 6B,D).

이와 같은 결과는 요수에 적용한 GABA 수용체 작용제가 압박성 신경병증에 있어서 요수 내 후각신경세포 반응도를 효과적으로 억제하며, 이는 행동학적 실험 결과와 일치함을 보여준다.

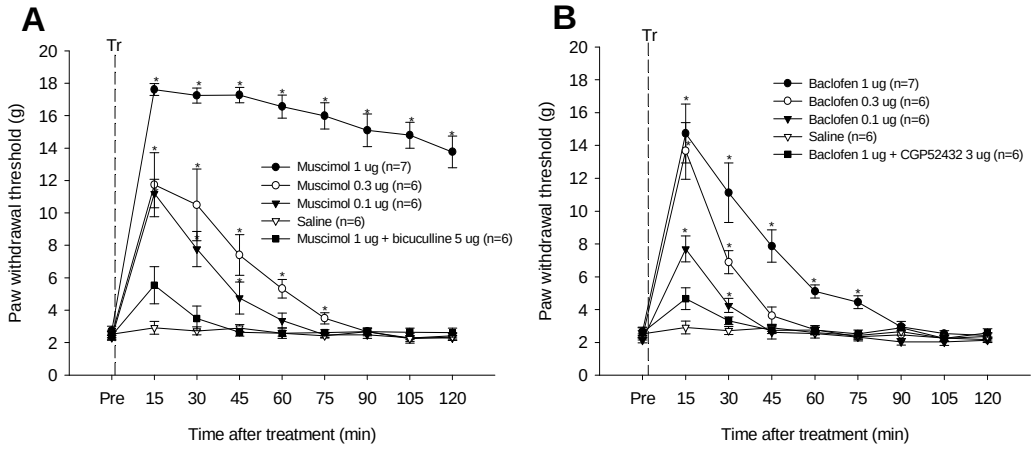

그림 5. 압박성 신경병증 모델 쥐에 GABA 수용체 작용제의 거미막 밑 주입이 통증행동에 미치는 영향. 모델 쥐에서 요추천자 방법으로 GABA-A 수용체 작용제인 muscimol(*A*)이나 GABA-B 수용체 작용제인 baclofen(*B*)을 요수 거미막 밑에 주입한 후 15분 단위로 PWT를 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. Muscimol과 baclofen는 모두 농도 의존적으로 발회피반응 역치(PWT)을 증가시킴으로서 통증반응을 완화시켰고, 완화시간 역시 증가시켰다. muscimol 1 μg 주입 효과와 baclofen 1 μg 주입 효과는 각각 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(5 μg)과 GABA-B 수용체 길항제인 CGP52432(3 μg)를 함께 주입했을 때 억제되었다. Tr, treatment(약물처치). (p<0.05, Mann-Whitney rank-sum test)

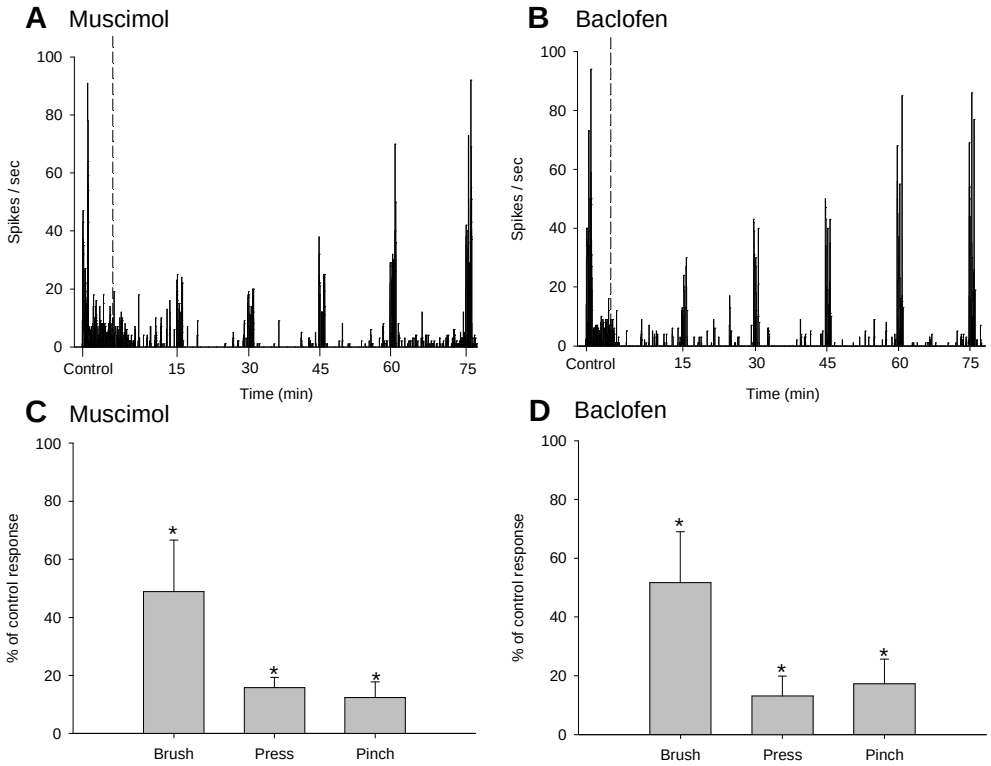

그림 6. 압박성 신경병증 모델 쥐에서 GABA 수용체 작용제의 요수표면 적용이 요수 내 후각 신경세포 반응도에 미치는 영향. *A* 와 *B*는 모델 쥐에서 GABA 수용체 작용제인 muscimol(0.1 μg)과 baclofen(0.1 μg)을 요수 표면에 적용 후 말초 수용야에 가해준 brush, press, pinch 자극에 대한 요수 내 후각 WDR 신경세포의 반응의 예를 보여준다. 여기서 각 약물을 적용하기 전의 반응에 대해 적용 후 15분경과 시의 반응의 변화율(%)을 체취한 모든 샘플에서 계산하여 그 평균 변화율을 C와 D에 나타내었다. muscimol과 baclofen 둘 다 brush, press, pinch 반응 모두에서 유의한 감소를 보였다. ($p<0.05$, paired t-test)

4. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 길항제의 효과

압박성 신경병증에서 말초 내 GABA성 체계가 통증반응을 유발하는데 기여하는지 보기 위해 발바닥 내 주입을 통해 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(0.09 μmol)을 가해주고 15분 단위로 PWT를 측정했다(그림 7).

정상 쥐와 모델 쥐의 PWT 모두에서 bicuculline을 주입 시 생리식염수를 주입한 경우와 비교하여 유의한 변화를 보이지 않았다.

이와 같은 결과는 척수 내 GABA성 체계와 달리 말초 내 GABA성 체계는 만성후근절압박에 의한 통증반응의 유발에 영향을 미치지 못함을 보여준다.

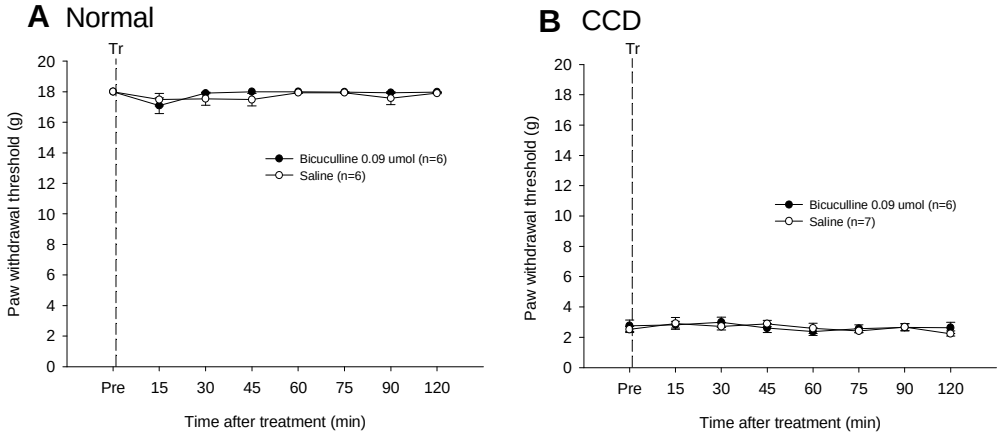

그림 7. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 길항제의 효과. 정상 쥐(*A*) 및 모델 쥐(*B*)의 발바닥에 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(0.09 μmol) 이나 생리식염수를 주입하고 15분 단위로 발회피반응 역치(PWT)를 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 정상 쥐와 모델 쥐의 PWT 모두에서 bicuculline를 주입한 경우가 생리식염수를 주입한 경우와 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다. (p<0.05, Mann-Whitney rank-sum test)

5. 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과

모델 쥐의 발바닥에 GABA-A 수용기 작용제인 muscimol을 발바닥 내 주입을 통해 가해주고, 15분 간격으로 PWT를 측정했다(그림 8). 저농도의 muscimol(0.015-0.03 nmol)은 만성후근절압박에 의해 낮아진 PWT(2.187 ± 0.2 g)를 45분 후 11.889 ± 1.06 g까지 증가시켰고 그 효과는 약 2시간 지속되었다. 하지만 고농도의 muscimol(15 nmol)은 PWT에 영향을 미치지 못했다

(그림 8A). 저농도 muscimol(0.03 nmol)의 주입 효과는 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(0.09 μmol)을 함께 주입함으로서 유의하게 억제되었다 (그림 8B).

이와 같은 결과는 저농도 muscimol의 말초처치가 압박성 신경병증 모델 쥐에서 유발된 통증반응을 효과적으로 완화하며, 이 효과는 일차구심신경의 말초종말에 존재하는 GABA-A 수용체를 통해 나타난 것을 보여준다.

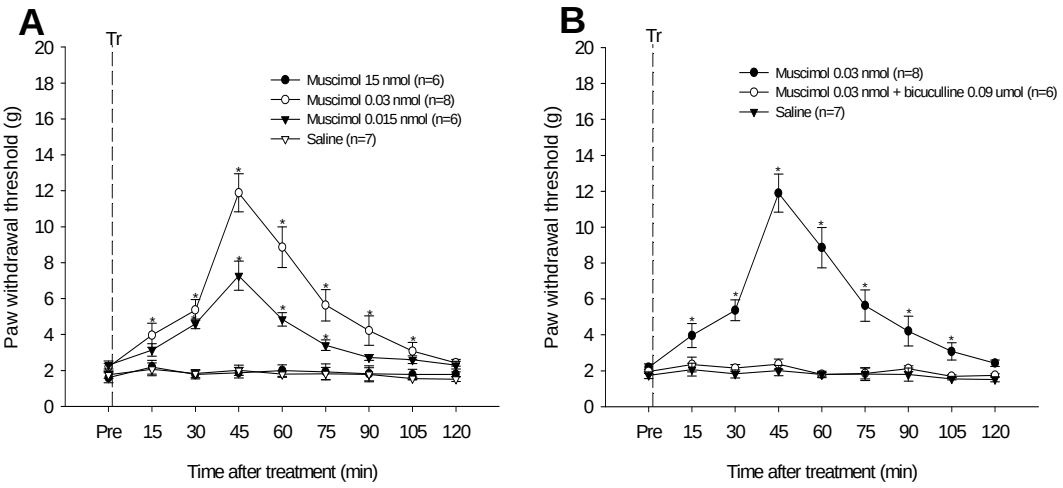

그림 8. 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과. 모델 쥐의 발바닥에 GABA-A 수용체 작용제인 muscimol을 주입하고 15분 단위로 발회피 반응 역치(PWT)를 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 저농도 muscimol(0.03 nmol, 0.015 nmol)을 주입한 경우는 생리식염수를 주입한 경우와 비교하여 PWT의 유의한 증가를 보였으나 고농도 muscimol(15 nmol)를 주입한 경우는 생리식염수 그룹과 유의한 차이를 보이지 않았다(*A*). 저농도 muscimol(0.03 nmol) 주입 효과는 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculine(0.09 μmol)을 함께 주입함으로서 유의하게 억제되었다(*B*). ($p<0.05$, Mann-Whitney rank-sum test)

6. 정상 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과

모델 쥐의 말초에 가해준 고농도의 muscimol(15 nmol)이 PWT에 영향을 미치지 못해서 정상 쥐에 발바닥 내 주입으로 muscimol을 주입하고

15분 단위로 PWT를 측정했다(그림 9). 모델 쥐의 통증반응을 완화했던 저농도의 muscimol(0.03 nmol)은 정상 쥐의 PWT에 영향을 주지 못했다. 하지만 고농도의 muscimol(0.15～15 nmol)을 가해주었을 때 PWT가 감소하였으며 그 감소효과의 지속시간은 농도 의존적 증가를 보였다(그림 9A). 고농도 muscimol(15 nmol)의 주입효과는 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(0.09 μmol)을 함께 주입했을 때 유의하게 억제되었다(그림 9B).

이와 같은 결과는 고농도 muscimol을 말초에 가했을 시 통증반응을 유발시키며, 이는 일차구심신경의 말초종말에 존재하는 GABA-A 수용체를 통해 나타난 효과임을 보여준다.

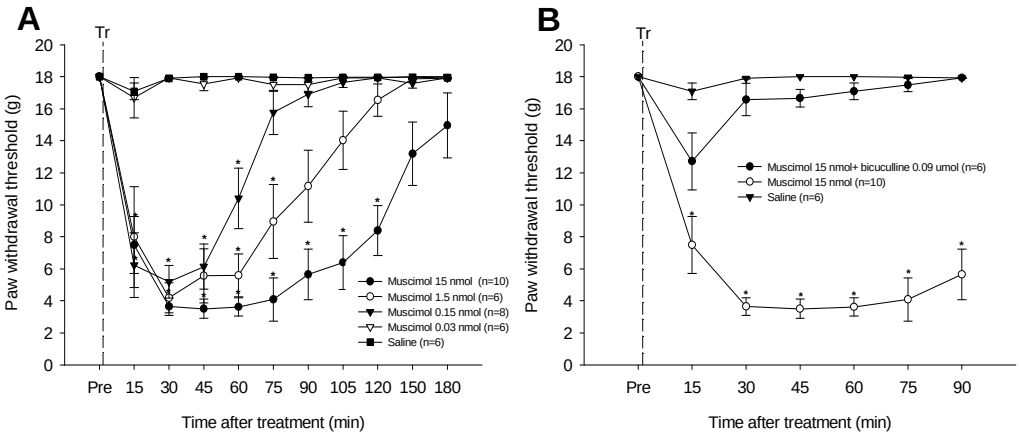

그림 9. 정상 쥐의 말초에 가해준 GABA-A 수용체 작용제의 효과. 정상 쥐에 발바닥 내 주입으로 GABA-A 수용체 작용제인 muscimol을 주입하고 15분 단위로 발회피반응 역치(PWT)을 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 저농도 muscimol(0.03 nmol)을 주입한 경우는 생리식염수를 주입한 경우와 비교하여 PWT에 있어서 유의한 변화를 보이지 않았으나, 고농도 muscimol(0.15～15 nmol)을 주입한 경우는 생리식염수 주입 그룹에 비하여 농도 의존적으로 유의한 PWT 감소를 보였으며 그 감소효과의 지속시간도 농도 의존적 증가를 보였다(*A*). 고농도 muscimol(15 nmol)의 주입 효과는 GABA-A 수용체 길항제인 bicuculline(0.09 μmol)을 함께 주입함으로서 유의하게 억제되었다(*B*). ($p<0.05$, Mann-Whitney rank-sum test)

7. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-B 수용체 작용제의 효과

정상 쥐 및 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-B 수용체 작용제가 PWT에 영향을 미치는지 보기위해 baclofen을 발바닥 내 주입으로 가해주고 15분 단위로 PWT를 측정했다(그림 10). 정상 쥐 및 모델 쥐의 PWT 모두에서 저농도의 baclofen(0.01 nmol)과 고농도의 baclofen(500 nmol)을 주입 시 생리식염수를 주입한 경우와 비교하여 유의한 변화를 보이지 않았다.

이와 같은 결과는 말초에서 baclofen이 정상 쥐와 모델 쥐의 PWT에 영향을 주지 못함을 보여준다.

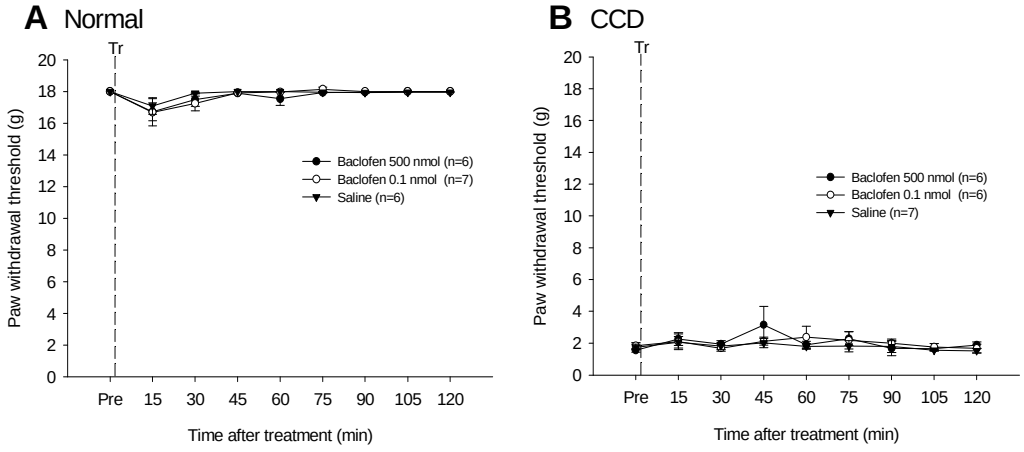

그림 10. 정상 쥐 및 압박성 신경병증 모델 쥐의 말초에 가해준 GABA-B 수용체 작용제의 효과. 정상 쥐(*A*) 및 모델 쥐(*B*)에 발바닥 내 주입으로 GABA-B 수용체 작용제인 baclofen을 주입하고 15분 단위로 발회피반응(PWT)을 측정한 결과를 평균 ± 표준오차로 나타냈다. 정상 쥐와 모델 쥐의 PWT는 saline을 적용해준 그룹과 비교하여 저농도의 baclofen(0.01 nmol)과 고농도의 baclofen(500 nmol)에 모두 영향을 받지 않았다. ($p<0.05$, Mann-Whitney rank-sum test)

Ⅳ. 고찰

압박성 신경병증의 경우 신경병증통증을 유발하는 기전에 대해 연구가 많이 부족하다. 하지만 외상성 신경병증에 있어서는 신경병증통증 유발 기전에 대해 많은 연구가 이루어졌는데, 특히 척수후각에서 여러 가지 변화가 일어난다고 보고되었다. 이와 같은 변화에는 첫째, 낮은 역치의 자극에 반응하는 Aβ 섬유가 발아(sprouting)하여 무해한 자극을 유해한 자극으로 전달하고[29,30], 둘째 척수후각세포의 민감화(sensitization)가 유발되거나[31], 셋째 척수 내 억제성 신경전달물질의 감소에 의해 척수후각세포의 흥분도(excitability)가 증가하는 탈억제(disinhibition) 등이 있다[32]. 척수 후각 내 GABA성 중간신경에 존재하는 GABA는 주요한 억제성 신경전달물질로서 통증정보 전달을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[33]. 본 실험은 압박성 신경병증에서도 GABA성 억제의 소실, 즉 탈억제에 의해 중추성 민감화 및 기계적 통증반응이 유발되는지 알아보았다.

실험 결과 압박성 신경병증 모델 쥐는 기계적 통증반응을 보이며, 정상 쥐와 비교하여 요수 내 후각 신경세포의 반응도가 증가하였다. 이러한 모델 쥐에서 관찰된 후각 신경세포의 반응도 증가는 정상 쥐를 대상으로 요수표면에 GABA-A 수용체 길항제(bicuculline)를 적용 시 후각 신경세포에서도 유사하게 측정되었다. 이는 압박성 신경병증 모델 쥐에서 후근절의 압박성 신경손상 후 척수 후각 내 GABA성 억제의 소실을 통해 후각신경세포의 반응도가 항진되었고 통증반응을 유발하였을 가능성을 시사한다. 이러한 가능성은 외상성 신경병증의 유발기전에 관한 하나의 설명으로 제시된 바 있는데, 다음과 같은 실험 근거에 기초한다. 즉, Ibuki[11]과 Eaton[13]은 만성 협착손상(CCI, chronic constriction injury) 모델에서 척수 후각의 GABA-면역반응세포가 90% 이상 감소한다고 보고했다. Castro-Lopes는 좌골신경을 절단한 모델에서 척수 후각의 GABA-면역반응세포가 감소한다고 보고하였다[17]. GABA-면역반응세포의 감소는 GABA성 중간신경의 세포사(cell death)를 의미하는데, 세포사를 유발하는 원인은 지금까지 밝혀진 바는 없지만 신경손상 시 유발된 신경임펄스에 의해 과도하게 글루타민산이 분비되고, GABA성 중간신경의 흥분독성(excitotoxic) 세포사를 유발하는 것으로 생각된다[34]. Moore는 척수후각신경을 대상으로 실시한 전기생리학적 실험을

통해 CCI와 SNI(spared nerve injury) 모델 쥐의 경우 정상 쥐에 비해 GABA 작용에 의한 억제 시냅스 후 전류(inhibitory post-synaptic currents)가 감소되었음을 보임[12]으로서, 외상성 신경병증 하에는 척수후각 내 GABA성 억제의 감소에 관한 가능성을 제시하였다. 이상에서 언급한 실험증거는 차후 압박성 신경병증통증 상황 하에서도 밝혀져야 할 것이다.

한편 외상성 신경병증통증 모델 쥐에서 척수후각의 얕은 층판에서 GABA성 중간신경의 수가 감소되지 않았음을 관찰한 보고가 최근에 발표되었다[35,36]. 이 결과는 본 연구에서 사용한 압박성 신경병증 모델 쥐의 척수후각 내에서 GABA성 중간신경의 소실 없이도 GABA성 억제의 감소가 이루어져 후각세포의 반응도 항진이 이루어질 수 있음을 시사한다. 즉, GABA성 중간신경 또는 GABA 수용체의 기능이상을 예상할 수 있는데, 그 가능성은 다음과 같다. 첫째, GABA성 중간신경에서 GABA가 고갈될 수 있다. 신경이 손상될 시 척수 후각 내에 과도하게 글루타민산이 분비되면, GABA성 중간신경에서 GABA 역시 많이 분비될 것이다. 차후 GABA가 다시 재생될 시간이 부족해 GABA의 분비가 감소하고 고갈될 수 있다. 둘째, GABA성 중간신경에서 GABA의 합성이 감소할 수 있다. 외상성 신경병증의 경우 척수 내 GABA를 합성하는 효소인 glutamic acid decarboxylase(GAD) 65 가 감소하였다고 보고되었는데[12], 이는 GABA의 감소로 이어지게 될 것이다. 셋째, GABA와 결합할 수 있는 GABA 수용체의 수가 감소할 수 있다. 외상성 신경병증의 경우 일차구심신경에 존재하는 GABA-A 수용체의 mRNA가 감소한다고 보고되었다[37]. 이는 일차구심신경의 중추종말에 존재하는 GABA-A 수용체 역시 감소할 수 있다는 것을 보여준다. 넷째, GABA와 GABA 수용체의 결합 친화력이 떨어질 수 있다. 좌골신경을 절단한 신경병증 모델의 경우에는 척수 후각에서 GABA와 GABA-B 수용체의 결합능력이 감소한다고 보고되었다[17]. 하지만 본 실험에서 사용한 압박성 신경병증 모델 쥐의 경우, 요수에 GABA 수용체 작용제를 적용 시 요수후각세포의 반응도가 감소함을 보였는데, 이는 압박성 신경병증에서는 위에서 언급한 세번째와 네번째 가능성은 배제될 수 있음을 시사한다.

압박성 신경병증의 중추성 민감화를 유발하는데 있어서 GABA성 억제의 소실이 기여한다면, 척수에 GABA 수용체 작용제를 적용하면 통증반응을 완화하는데 효과적일 수 있음을 의미한다. 본 실험에서 척수에 GABA-A, B

수용체 작용제(muscimol, baclofen)를 적용 시 만성후근절압박에 유발된 기계적 통증반응이 농도-의존적으로 완화됨을 보였다. 이 결과는 외상성 신경병증 모델에서 행동학적 실험을 통해 관찰한 결과와 일치하였다[23,24]. 고농도의 muscimol(1 μg) 적용 시 유발된 발회피반응 역치의 증가는 척수전각(ventral horn)에 존재하는 운동신경에 작용한 muscimol의 영향에 의한 운동장애의 결과도 포함되었을 가능성도 고려할 수 있다. 이는 GABA 수용체가 척수전각 내 운동신경에 존재하기 때문이다[33]. 전기생리학적 실험에서는 GABA-A, B 수용체 작용제 모두 말초 수용야에 가한 무해한 자극(brush)과 유해한 자극(pinch)에 대한 요수후각세포의 반응을 감소시켰다. 특히 무해한 자극보다는 유해한 자극에 대한 반응이 더욱 감소하였는데, 이는 Aβ 형 구심신경 보다 Aδ 및 C 형 구심신경에 GABA-A, B 수용체가 많이 존재한다는 관찰[38]에 의해 설명될 수 있다.

최근에 일차구심신경의 말초종말(peripheral terminal)에 GABA-A 수용체가 존재한다고 보고되었다[27]. 이는 GABA 수용체가 중추뿐만 아니라 말초에서도 통증조절에 관여할 가능성을 제시해 준다. 말초의 GABA 체계가 압박성 신경병증통증 조절에 관여하는지에 알아보기 위해 모델 쥐의 발바닥에 GABA-A 수용체 작용제(muscimol)를 저농도로 적용 시 기계적 통증반응이 완화되었다. 이에 대한 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 다음과 같은 가능성이 있다. 일차구심신경세포에 GABA를 적용 시에는 과분극이 아닌 탈분극을 유발하는 것으로 보고되었다[39]. 그 이유는 일차구심신경세포에 Na^+-K^+-$2Cl^-$ 동시수송기(cotransporter)가 많이 발현되어있어 세포내 Cl^- 농도가 세포외 Cl^- 농도보다 높고, 그에 따라 Cl^- 평형전위가 안정막 전위보다 높다. 그러므로 GABA가 GABA-A 수용체에 결합하여 Cl^- 통로가 열릴 시에는 Cl^- 이온이 세포막 밖으로 배출되고 막전압이 탈분극 된다[40]. 탈분극으로 인해 전위형 Na^+통로(voltage-gated Na^+ channel)와 Ca^+통로(voltage-gated Ca^{2+} channel)가 비활성화 되어 활동전위(action potential)의 크기가 작아지게 되고, 중추종말에서 흥분성 신경전달물질의 분비가 감소하는 것으로 알려졌다[41]. 본 실험과 같이 일차구심신경의 말초종말에 존재하는 GABA-A 수용체에 작용제가 결합해 탈분극을 유도한다면, 중추종말에서 흥분성 신경전달물질의 분비가 감소하고 통증반응을 완화할 수 있을 것이다. 하지만 고농도의 GABA-A 수용체 작용제는 정상 쥐에서 기계적 통증반응을 유발하였다.

이는 말초에 적용한 고농도의 GABA-A 수용체 작용제가 일차구심신경 특히 통각수용구심로(nociceptive afferent)의 막전위를 역치(threshold) 이상으로 탈분극시켜 활동전위를 유발하고, 이로 인해 척수후각 내 이차통증전달세포가 민감화되었기 때문인 것으로 설명될 수 있다.

일반적으로 일차구심신경의 중추종말에 위치하는 GABA-B 수용체에 GABA가 결합해 활성화되면, 전위 의존성 Ca^{2+} 통로를 차단해 흥분성 신경전달물질의 분비가 감소하는 것으로 보고되었다[42,43]. 하지만 압박성 신경병증 모델에 있어서 말초에 가한 GABA-B 수용체 작용제(baclofen)는 발회피반응 역치에 영향을 미치지 못했다. 그 이유는 일차구심신경의 말초종말에 GABA-B 수용체가 존재하지 않거나, 만약 존재하더라도 중추종말에 있는 전위형 Ca^{2+} 통로까지 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

결론적으로, 압박성 신경병증통증에 있어서 척수 내 GABA성 억제의 소실을 통한 척수후각세포의 반응도 항진이 하나의 유발기전으로 생각할 수 있다. 또한 임상적으로는 척수에 GABA-A, B 수용체 작용제의 적용이 그리고 말초에 저농도의 GABA-A 수용체 작용제의 적용이 압박성 신경병증 통증의 치료방법으로 이용될 수 있음을 제시해준다.

V. 결론

본 연구에서는 만성후근절압박에 의해 유발된 신경병증통증에 관해서 척수 내 GABA성 체계의 역할과 말초에 가해준 GABA 관련 약물의 효과를 조사하기 위해 압박성 신경병증 모델 쥐와 정상 쥐를 대상으로 행동학적 및 전기생리학적 실험을 실시하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 압박성 신경병증 모델 쥐에서 후근절 및 신경근 압박 직후 압박된 쪽 발의 회피반응 역치가 감소함으로서 통증반응이 유발됨을 보였으며 이는 10주 이상 지속되었다.
2. 통증반응을 보인 모델 쥐에서 요수후각신경세포는 무해한 자극뿐만 아니라 유해한 자극에 대해 반응도가 항진되어 있었다.
3. 모델 쥐 요수후각세포의 항진된 반응도는 요수표면에 가해준 bicuculline (GABA-A 수용체 길항제)에 의해 영향 받지 않았으나, 정상 쥐 요수후각세포는 같은 bicuculline 처리에 의해 그 반응도가 항진되었다.
4. 모델 쥐에서 관찰된 통증반응과 항진된 요수후각세포 반응도는 각각 거미막 밑 주사나 요수표면 적용을 통해 가해준 muscimol (GABA-A 수용체 작용제)과 baclofen (GABA-B 수용체 작용제)에 의해 완화 및 억제되었다.
5. 모델 쥐의 압박 쪽 발에서 관찰된 통증반응은 압박 쪽 발바닥에 피하 주사한 저농도 muscimol(0.015-0.03 nmol)에 의해 완화되었으며 고농도 muscimol(15 nmol)과 baclofen(0.01-500 nmol)에는 영향 받지 않았다.

이상의 결과는 만성후근절압박에 의한 신경병증통증에 있어서, 척수 내 GABA성 억제의 소실을 통한 후각신경세포의 반응도 항진이 하나의 유발기전일 수 있으며 저농도 muscimol의 말초처치가 한 치료법일 수 있음을 시사한다. 말초의 저농도 muscimol에 의한 통증 완화의 기전에 관해서는 차후 밝혀져야 할 것이다.

참고문헌

1. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet 1999;353:1959-1964.
2. Berger A, Dukes EM, Oster G. Clinical characteristics and economic costs of patients with painful neuropathic disorders. J Pain 2004;5:143-149.
3. Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. Lancet 1999;354:581-585.
4. 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.
5. Seltzer Z, Dibner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain 1990;43:205-218.
6. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 1992;50:355-363.
7. Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. Pain 1998;77:15-23.
8. Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. Life Sciences 2004;74:2605-2610.
9. Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABA-A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. J Neurophysiol 1994;72:169-179.
10. Todd AJ, McKenzie J. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. Neuroscience 1989;31:799-806.

11. Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J. Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. Neuroscience 1997;76:845-858.
12. Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. J Neurosci 2002;22:6724-6731.
13. Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martinez MA, Montanez K. Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. J Chem Neuroanat 1998;16:57-72.
14. Zhang AL, Hao JX, Seiger A, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Grant G et al. Decreased GABA immunoreactivity in spinal cord dorsal horn neurons after transient spinal cord ischemia in the rat. Brain Res 1994;656:187-190.
15. Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A. GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. Brain Res 1993;620:287-291.
16. Miletic G, Draganic P, Pankratz MT, Miletic V. Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. Pain 2003;105:347-353.
17. Castro-Lopes JM, Malcangio M, Pan BH, Bowery NG. Complex changes of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. Brain Res 1995;679:289-297.
18. Sorkin LS, Puig S, Jones DL. Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. Pain 1998;77:181-190.

19. Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A et al. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. Mol Cell Neurosci 2003;24:818-830.
20. Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Intrathecal gamma-aminobutyric acid B ($GABA_B$) receptor antagonist CGP 35348 induces hypersensitivity to mechanical stimuli in the rat. Neurosci Lett 1994;182:299-302.
21. Franek M, Vaculin S, Rokyta R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. Physiol Res 2004;53:351-355.
22. Patel S, Naeem S, Kesingland A, Froestl W, Capogna M, Urban L et al. The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. Pain 2001;90:217-226.
23. Malan TP, Mata HP, Porreca F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. Anesthesiology 2002;96:1161-1167.
24. Hwang JH, Yaksh TL. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. Pain 1997;70:15-22.
25. Loubser PG, Akman NM. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain. J Pain Symptom Manage 1996;12:241-247.
26. Zuniga RE, Schlicht CR, Abram SE. Intrathecal baclofen is analgesic in patients with chronic pain. Anesthesiology 2000;92:876-880.
27. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. Neuroscience 1999;93:713-722.
28. 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.

29. Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. J Comp Neurol 1995;360:121-134.
30. Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. Pain 1990;42:205-213.
31. Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. Nature 1983;306:686-688.
32. Sivilotti LG, Woolf CJ. The contribution of $GABA_A$ and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. J Neurophysiol 1994;72:169-179.
33. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. Trends Pharmacol Sci 1996;17:457-462.
34. Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. Pain 1990;42:205-213.
35. Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. Pain 2004;111:144-150.
36. Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. Pain 2003;104:229-239.
37. Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. Pain 1998;78:13-26.

38. Desarmenien M, Feltz P, Occhipinti G, Santangelo F, Schlichter R. Coexistence of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors on A delta and C primary afferents. Br J Pharmacol 1984;81:327-333.
39. Rudomin P, Schmidt RF. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. Exp Brain Res 1999;129:1-37.
40. Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E. Abnormal $GABA_A$ receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. J Neurosci 2000;20:7531-7538.
41. Willis WD Jr. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. Exp Brain Res 1999;124:395-421.
42. Teoh H, Malcangio M, Bowery NG. GABA, glutamate and substance P-like immunoreactivity release: effects of novel $GABA_B$ antagonists. Br J Pharmacol 1996;118:1153-1160.
43. Bowery NG. $GABA_B$ receptor pharmacology. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1993;33:109-147.

Abstract

Role of spinal and peripheral GABAergic system in neuropathic pain behaviors in a compressive neuropathy model of the rat

Young Hoon Jeon

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Joong Woo Leem)

Peripheral nerve injury often leads to neuropathic pain. A loss of GABAergic inhibition in the spinal cord is thought to be a major cause of neuropathic pain following traumatic nerve injury. However, it is not certain whether or not such a loss is also involved in neuropathic pain associated with compressive nerve injury. This study was conducted using rats with chronic compression of dorsal root ganglion (CCD) to investigate whether spinal GABAergic system is involved in CCD-induced neuropathic pain and to examine whether peripherally applied GABA-related drugs produce a relief of this pain.

CCD was produced unilaterally at L5 level. The mechanical sensitivity of the hind paw was measured as paw withdrawal thresholds (PWTs) to von Frey stimulation. Neuronal activities of dorsal horn neurons in the lumbar spinal cord were recorded extracellularly and their responses to mechanical stimuli applied to the receptive fields were examined. GABA receptor-related drugs were delivered with intrathecal or intraplantar (i.pl) injection for behavioral studies or with dropping onto the surface of the lumbar spinal cord for electophysiological studies.

CCD produced mechanical hyperalgesia as evidenced by a decrease in PWT of the affected hind paw. This pain behavior lasted over 10 weeks. In rats with pain behavior following CCD, lumbar dorsal horn

neurons showed enhanced reponses to both noxious and innocuous stimuli applied peripherally. A similar enhancement was observed with lumbar dorsal horn neurons of naive rats when bicuculline was applied onto the lumbar cord surface. Both GABA-A and GABA-B receptor agonists, muscimol and baclofen, respectively, suppressed pain behavior when applied intrathecally and attenuated enhanced mechanical responsiveness of dorsal horn neurons when applied onto the lumbar cord surface. CCD-induced pain behavior was suppressed by an i.pl injection of low-dose muscimol (0.015-0.03 nmol) into the affected hind paw, whereas it was not affected by the same application with either high-dose muscimol (15 nmol) or baclofen (0.01-500 nmol).

These results suggest that neuropathic pain following compressive injury to peripheral nerve is due to enhanced responsiveness of spinal dorsal horn neurons via a loss of spinal GABAergic inhibition. It is also suggested that peripheral application of low-dose GABA-A receptor agonist is a useful therapeutic option for treating this pain.

Key Words : compressive neuropathy, compression of dorsal root ganglion, pain behavior, GABA receptor