

Acid sensing ion channels이
말초신경 손상에 의한 과민통 반응에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김 경 화

Acid sensing ion channels이
말초신경 손상에 의한 과민통 반응에
미치는 영향

지도 임 중 우 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 경 화

김경화의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

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

항상 따뜻한 관심과 애정으로 지켜봐 주신 생리학 교실 선생님께도 감사드리며, 오늘이 있기까지 사랑과 정성으로 키워주신 부모님과 하나님과 함께 기쁨을 나누고자 합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 실험 동물	5
2. 수술 처치	5
3. 약물 투여	6
4. 행동 실험	6
5. 면역조직화학염색	6
가. 표본 제작	7
나. 면역과산화효소법	7
다. 면역형광법	7
6. 관찰 및 계측	8
III. 결과	10
1. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐의 말초에 가해진 ASICs 차단제의 효과	10
2. 배근신경절 내 ASIC3-면역반응 양성 신경세포	12
3. 배근신경절 내 ASIC2a-면역반응 양성 신경세포	15
4. 구심신경에서 ASIC3 및 CGRP의 말초 및 척수 쪽으로의 이동 양상	18
IV. 고찰	21
V. 결론	25
참고문헌	27
영문요약	31

그림 차례

그림 1. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐의 말초에 가해진 ASICs 차단제의 효과	11
그림 2. 모델쥐와 대조군에서 관찰된 제5요 배근신경절 내 ASIC3 면역반응 신경세포의 예	13
그림 3. 제5와 4요 배근신경절 내에서 ASIC3 양성 신경세포의 비율	14
그림 4. 모델쥐와 대조군에서 관찰된 제5와 4요 배근신경절 내 ASIC2a 면역 반응 신경세포의 예	16
그림 5. 제5와 4요 배근신경절 내에서 ASIC2a 양성 신경세포의 비율	17
그림 6. 모델쥐의 제4요 배근신경절과 제4요 척수후각 내에서의 ASIC3 혹은 CGRP 면역반응	19
그림 7. 사전에 결찰한 좌골신경의 결찰 전후부에서 보이는 ASIC3 혹은 CGRP의 면역반응성의 모델쥐와 대조군 간 비교	20

국문 요약

Acid sensing ion channels이 말초신경 손상에 의한 과민통 반응에 미치는 영향

말초신경 손상은 말초 쪽으로 왈레리 변성을 유도하는데, 손상부위에서 H^+ 이온 농도가 증가 된다. 또한 H^+ 는 acid sensing ion channels (ASICs)에 직접 작용하여 일차 구심신경의 흥분을 유도하는 것으로 알려졌다. 본 연구는 말초에서의 ASICs 활성화와 구심신경의 ASICs 발현 변화가 신경병증통증 유발에 기여하는지를 조사하였다.

신경병증은 쥐의 좌측 제5요 척수신경을 결찰하여 유발하였다. 과민통 반응은 발바닥에 가해진 von Frey filament에 대한 회피반응의 역치를 측정하여 조사하였다. 신경병증통증에서 ASICs의 기여 여부를 알기 위해 손상 측 발바닥에 피하주사한 amiloride (ASICs 차단제)가 과민통 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 신경병증통증시 구심신경의 ASICs 발현 변화의 관여 여부를 알기 위해 구심신경의 ASIC3와 ASIC2a의 발현 변화를 면역조직화학으로 조사하였다. 또한 말초신경에서 ASIC3의 말초 또는 중추 쪽 이동을 조사하였다.

신경병증 모델 쥐에서 신경손상 동측 발에 가해진 필라멘트에 대한 회피 반응의 역치감소로 측정된 기계적 과민통반응은 amiloride를 피하주사로 처치 시 완화되었다. ASIC3는 배근신경절 내 세 종류 신경세포 중, 작은 직경의 구심신경(C-구심신경)에서 주로 발현되는데 모델쥐는 대조군에 비하여 제4요 배근신경절에서 ASIC3 발현 C-구심신경의 수적 증가를 보였다. 한편, ASIC2a는 중간 및 큰 직경의 구심신경(각 각A δ -와 A β -구심신경)에서 주로 발현되는데, 이러한 발현은 제4요 및 제5요 배근신경절 모두에서 모델 쥐와 대조군 간에 차이를 보이지 않았다. ASIC3는 구심신경에서 척수 쪽으로는 이동이 이루어지지 않고 말초 쪽으로만 이동됨을 보이는데 이러한 이동양상은 모델쥐와 대조군 모두에서 관찰되었다.

이상의 결과는 부분적 말초신경손상에 의해 유발된 기계적 과민통 반응에는 손상에 의해 분비된 H^+ 이온에 의한 말초에서의 ASIC3 활성화와 이와 더불어 ASIC3를 발현하는 비손상 침해수용성 구심신경의 수적 증가가 기여함을 의미한다. 따라서 말초에서의 ASIC3 활성화의 차단과 ASIC3-발현 비손상 침해수용성 구심신경 증가의 억제가 신경병증통증 치료를 위해 이용될 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : 신경병증통증, 척수신경결찰, 알레리변성, 기계적 과민통, ASIC3, ASIC2a, 침해수용성 구심신경, 배근신경절

Acid sensing ion channels이 말초신경 손상에 의한 과민통 반응에 미치는 영향

<지도교수 임 중 우>

연세대학교 대학원 의과학과

김 경 화

I. 서론

말초신경에 부분적인 손상이 발생한 경우 만성적인 신경병증통증(neuropathic pain)이 유발되는데, 이 통증은 자발통(spontaneous burning pain), 과민통(hyperalgesia)과 이질통(allodynia)등이 특징적이다. 말초신경 손상에 의한 신경병증통증 기전으로 몇 가지 가설이 제시되어 왔으나, 아직 그 기전이나 증상의 경감에 대해서 명확히 알려진 바는 없다. 신경병증통증 기전으로 가장 널리 받아들여진 가설은 중추성 민감화(central sensitization)로, 이는 손상된 A-구심섬유에서 지속적인 구심성 신경임펄스가 발생하여 2차적으로 중추신경계의 변화를 유도하게 되어 척수후각신경세포의 흥분성이 증가되는 것을 말한다¹⁻³. 즉, 신경손상 모델에서 척수후각세포의 수용야(receptive field)가 확장되며 기계적 혹은 열적 자극에 대한 척수후각세포의 반응도가 현저히 증가되는 현상이 나타난다⁴. 하지만, 손상 A-구심섬유에서 발생한 이소성 신경방전(ectopic nerve activity)이 중추성 민감화를 유발하고 유지한다는 가설은 아직 논란의 여지가 있다.

신경병증통증 유발에 대한 다른 가설로서 손상부위에 근접한 비손상 C-구심섬유의 신경 흥분성 증가가 제안되었는데, 이는 신경손상 후 비손상 C-구심섬유에서 자발성 신경발화의 출현⁵⁻⁶과 반응유발 역치의 감소⁷에 관

한 발견에 의해 뒷받침된다. 이러한 비손상 C-구심신경의 흥분성 증가에 관한 근거로서 신경병증통증시 C-구심신경 특이적 채널 단백질인 transient receptor potential vanilloid receptor 1(TRPV1)과 Na⁺ 채널 아형인 Nav1.8의 비손상 C-구심신경 내 발현 증가⁸⁻⁹가 관찰되었다.

알레리 변성이 진행되는 손상신경 주변 부위에서는 염증전구물질 외에도 H⁺ 이온 농도가 증가함이 밝혀졌다¹⁰⁻¹². 또한 사람피부에 낮은 pH 용액 주입이 기계자극에 대한 과민반응을 유도하고¹³, H⁺ 이온의 처리가 침해수용 신경의 기계자극에 대한 과민화를 유도하였다¹⁴⁻¹⁶. 한편 H⁺ 이온에 반응하여 신경흥분성을 유발하는데 관여하는 채널로는 acid-sensing ion channels (ASICs)이 있는데¹⁷⁻¹⁹, 여러 아형 중 ASIC3가 C-구심신경에 특이적으로 존재한다고 밝혀진 바 있다²⁰⁻²². 따라서 신경병증통증시 말초에서 분비된 H⁺의 작용에 의한 C-구심신경 흥분성 유발에 관여하는 ASIC3의 발현 변화가 신경손상에 의한 과민통 유발에 기여할 것임을 추측할 수 있다. 실제로 염증유발시 ASIC3의 발현이 C-구심신경에서 증가하였고²¹, 다른 염증전구물질에 의해 ASIC3을 통한 C-구심신경의 흥분성이 증가되었다고 보고된 바 있다²³.

본 연구에서는 부분적 말초신경손상에 의해 유발되는 신경병증통증에 말초의 ASICs가 기여할 것임을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 말초신경손상에 의한 신경병증통증 모델로 잘 알려진 제5요 척수신경결찰(L5 spinal nerve ligation, L5 SNL) 모델 쥐를 이용하여, 1) ASICs 차단제의 손상 측 발바닥내 피하주입이 신경병증통증 생성에 영향을 미치는지를 행동학적 실험으로 확인하고, 2) ASICs의 아형인 ASIC3나 ASIC2a를 발현하는 구심신경의 수적변화를 L5 배근신경절(손상된 구심신경 세포체 존재)과 L4 배근신경절(비손상 구심신경 세포체 존재)에서 면역조직화학법으로 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구는 본교 의과대학 실험동물 윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 진행되었다. 실험대상인 수컷 Sprague-Dawley (200-250 g) 흰쥐는 실험에 앞서 12시간을 주기로 낮-밤을 교대로 유지할 수 있는 사육장에서 3일 이상 온도와 습도가 유지되는 상태로 충분한 물과 먹이를 제공받았다.

2. 수술 처치

신경병증통증 모델로는 제5요 척수신경 결찰(L5 SNL) 술을 시행했다. 실험동물을 고농도의 enflurane(유도 4%, 유지 2%)과 O₂의 혼합가스로 흡입 마취시킨 뒤, 수술 처치를 시행했다. 좌측 제5요 척수신경을 노출한 후 수술용 견사(6-0)를 이용해 노출된 신경을 결찰한 후 결찰 부위에서 1 mm 정도 말초쪽 부위를 절단하였다. 대조군으로는 척수신경 절단만 하지 않고 다른 모든 과정은 실험군과 동일하게 실시한 가성수술 (sham-operation)을 가해준 쥐를 이용하였다.

또한 배근신경절(dorsal root ganglion, DRG)에서 말초 신경말단으로의 이동(transportaion)을 알기 위해 L5 SNL 4일 후 동측의 좌골신경을 결찰(sciatic nerve ligation)했다. 무릎 부근의 좌골신경을 실크실(6-0)로 묶어 말초 쪽으로의 물질 이동을 차단하였으며 정상대조군(naive) 역시 같은 방법으로 결찰술을 시행 하였다. 물질 이동 차단 3일 후 차단 부위의 앞뒤로 각 10 mm 정도를 절단하여 이 조각을 대상으로 ASIC3와 CGRP (calcitonin-gene related peptide)에 대한 면역조직화학을 시행하였다.

3. 약물 투여

신경병증통증 모델 쥐에서 ASICs 차단제의 기계적 과민통에 대한 효과를 살펴보기 위해서 약물을 투여했다. ASICs 차단제 amiloride (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)를 사용 바로 직전에 멸균증류수에 녹여서 사용하였다. 약물은 동물을 enflurane으로 마취 한(3%, 2-3 분) 후 28-gauge의 주사바늘이 달린 50 μ l 해밀턴 주사기를 이용하여 발바닥 피하에 주입(0.01 mg/30 μ l)하였다. 주입 시 생성된 수포(bleb)는 10분 이내에 사라졌다. 대조군에는 동일량의 멸균증류수를 동일한 방법으로 주입하였다. 신경손상으로 유도된 기계적 과민통에 대한 amiloride의 전처치와 후처치 효과를 알아보기 위해, 약물을 신경결찰 30분전에 가해주거나 신경결찰 후 7일 째에 가해주었다.

4. 행동 실험

신경병증통증 모델 쥐에서 기계적 과민통 정도를 알아보기 위해서, 발회피역치(paw withdrawal threshold, PWT)로 행동검사를 시행하였다. 동물을 금속철망(망 간격, 0.5 \times 0.5cm²)위쪽에 위치한 투명한 플라스틱 상자 안에 넣은 뒤, 이들이 환경 변화에 따르는 스트레스를 피하도록 30분간 적응시켰다. 가는 필라멘트(von Frey filament)가 부착된 자극기를 사용하여 발회피역치를 조사하였다²⁴. 모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 나타낸 후, 동일한 측정 시각에 그룹간의 역치값은 Mann-Whitney rank-sum test를 실시하여 분석하였다. 또 측정 시각에 따른 같은 그룹의 역치값의 비교는 Wilcoxon signed-rank test를 시행하여 분석하였다. 각 경우에서 *p* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

5. 면역조직화학 염색

가. 표본제작

ASIC3 혹은 ASIC2a 양성 신경세포를 관찰하기 위해 면역과산화효소법 (immunoperoxidase staining)을 실시했다. 신경병증통증 모델쥐에서는 제5 요 척수신경 결찰 7일 후에 희생시킨 뒤, 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, PB)을 심장을 통해 관류하고, 4% paraformaldehyde고정액(0.1 M PB, pH 7.4)으로 관류 고정하였다. 적출된 배근신경절은 통상 표본제작과정에 따라 포매한 뒤 저온조 미세절단기를 이용하여 -21°C 에서 $10\ \mu\text{m}$ 로 절편하였다. 절편된 조직은 양이온으로 처리된 슬라이드(Probeon plus-slide, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 붙인 후 -70°C 에 보관 하고 필요시 사용했다.

나. 면역과산화효소법(immunoperoxidase staining)

ASIC3, ASIC2a 양성 신경세포의 확인을 위해 먼저, 박절된 배근신경절을 Histostain-*plys* kit(Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 1:100으로 희석한 anti-ASIC3 항체(Chemicon, Temucula, CA, USA), 1:20으로 희석한 anti-ASIC2a 항체(Alomone, Jerusalem, Israel)를 실온에서 24시간 처리하고 다시 PB로 세척한 후 DAB-plus kit(Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA)로 발색하였다. 표본을 건조시킨 후 핵과 인을 파악하기 위해 Mayer's hematoxylin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)으로 대조염색을 한 후 통상의 탈수과정을 거치고, 덮개 유리를 씌워 관찰할 수 있는 표본을 제작하였다. 모든 염색과정에서 항상 정상대조군과 신경손상군을 동시에 처리하여 과정상 염색정도를 균일하게 하였다.

다. 면역형광법(immunofluorescent staining)

척수와 배근신경절에서 ASIC3와 CGRP (calcitonin gene-related peptide)의 colocalization과 좌골신경결찰 후 두 단백질의 말초로의 이동은

면역형광법(immunofluorescent staining)을 통해 살펴보았다. L5 SNL 7일 후 비손상근접 L4 DRG와 그것과 연결되어 있는 척수는 30 μm 로, 좌골신경결찰술 3일 후 결찰한 좌골신경은 15 μm 로 앞선 과정과 동일하게 절편하였다. 1:100으로 희석한 guinea pig anti-ASIC3 항체(Chemicon, Temucula, CA, USA), 1:1000으로 희석한 rabbit anti-CGRP 항체(Chemicon, Temucula, CA, USA)를 실온에서 24시간 처리하고 다시 PB로 세척하였다. 그 다음에는 상온에서 1:100으로 희석한 Cy2 conjugated Goat anti-guinea pig IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West grove, PA, USA), 1:200으로 희석한 Cy3 conjugated Goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West grove, PA, USA)을 상온에서 1시간 처리하였다. 세척 후, Vectorshield (Vector Labs, Peterborough, UK)를 적용한 후 덮개 유리를 씌워 건조시켰다. 모든 염색 과정에서 항상 실험군은 대조군과 동시에 처리하여 과정상 염색정도를 균일하게 하였다

6. 관찰 및 계측

배근신경절의 세포 형태분류법에 따라 신경세포체의 장축과 단축의 평균값을 구한 후 세포직경에 따라 신경세포체를 계측하였다; small (<30 μm), medium (30-50 μm), large-sized neurons (>50 μm). Eye piece micrometer를 삽입한 광학현미경에서 전체 신경원을 연속으로 계수하였는데, 여기서 ASIC3 혹은 ASIC2a에 면역반응 양성 신경원이란, 명확한 핵속에 파란빛의 인을 가진 신경세포체중 진갈색의 과립 세포질을 가진 것으로 간주하였다. 요수신경 배근신경절내 신경세포체 인의 평균직경은 4 μm 로²⁵, 10 μm 로 절편한 조직에서 일부 중복이 있을 수 있으나, 뚜렷한 인을 가진 신경세포체만을 계측하여 중복을 가능한 피하려고 했다. 계측한 모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 면역반응 양성 신경세포체의 개수에 대한 다른 그룹간의 동일한 배근신경절에서의 비교는 unpaired p-test

(대조군 대 모델취)를 사용하여 통계 분석하였다. 각 경우에 있어서 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐의 말초에 가해진 ASICs 차단제의 효과

제5요 척수신경 손상 후 발생하는 기계적 과민통 반응을 발회피역치를 측정하여 판단하였다. 발회피역치는 손상 하루 후에 손상 전 값에 비하여 감소하였고 이러한 감소는 측정기간 내내 유지되었다($p < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test). 손상 측 발에서 측정된 발회피역치 감소는 반대측 발이나 가성수술군에서 얻은 값에 비해서도 유의하였다($p < 0.05$, Mann-Whitney rank-sum test).

ASICs 차단제가 신경손상에 의해 유도된 기계적 과민통에 효과가 있는지를 알아보기 위해, amiloride (0.01 mg)를 신경손상 전 혹은 후에 발바닥에 주입했다. 우선 전처치 효과를 살펴보기 위해 요수 5번 신경 손상 30분 전, 동측 발바닥내로 amiloride를 주입했다. 후처치 효과를 파악하기 위해 선 신경 손상 제 7일에, 동측 발바닥에 amiloride를 주입했다. 대조군으로는 동일한 용량의 멸균증류수를 동일 손상 모델군에 주입했다. 그림 1B에서 보는 것처럼, 신경손상 후 과민통반응이 확립된 동물에서 보인 감소된 발회피역치는 amiloride 주입 후 반전(reversion)되었고 이는 75분가량 지속되었다. 이러한 반전은 반대측 발이나 대조군에서 얻은 값에 비해서도 유의하였다.

전처치 효과를 살펴보기 위한 실험에서, 신경손상 30분전에 amiloride를 주입한 군은 멸균증류수를 주입한 군이나 반대측 발과 비교하여 신경손상에 의한 발회피역치 감소 양상에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다(그림1C). 대조군의 경우, 손상 후 1일 이내에서는 발회피역치 감소가 유도되기 시작하는 시점이 개체별로 심한 차이를 보였다.

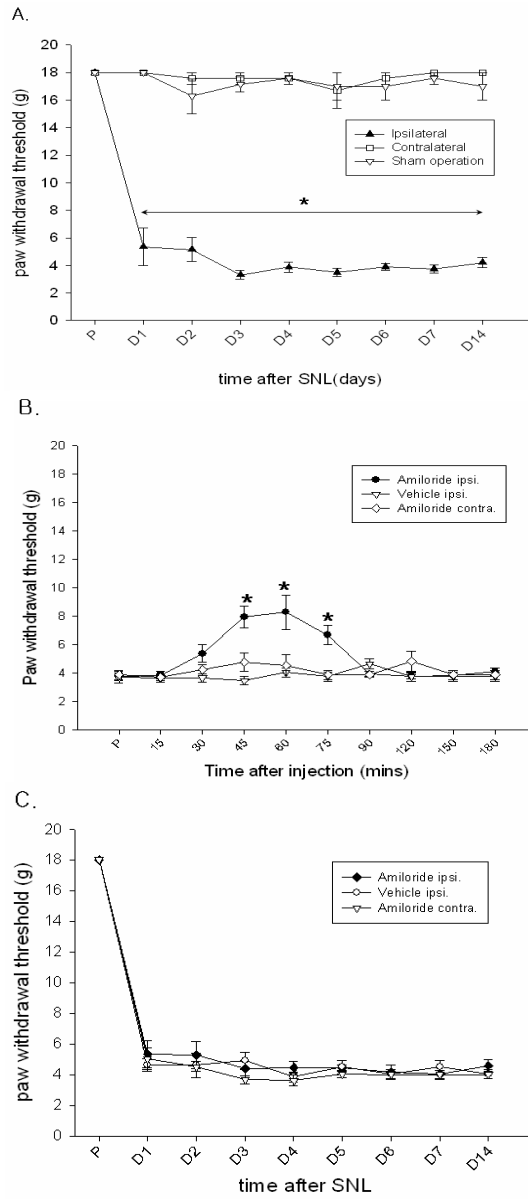


그림 1. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐의 말초에 가해진 ASICs 차단제의 효과. 모델 쥐의 손상 동측(ipsilateral side)은 대조군에 비해 2주 이상 PWT가 감소하였다(그림 1A). 신경손상 7일 후 amiloride를 동일 손상 측 발바닥내 피하주입했을 시 대조군에 비해 PWT가 증가했다(그림 1B). 신경손상 30분전 amiloride를 동측에 발바닥 내 피하주입 했을 시 대조군과 유의한 차이가 없었다(그림 1C)($p < 0.05$, Mann-Whitney rank-sum test).

2. 배근신경절 내 ASIC3-면역반응 양성 신경세포

배근신경절에서 ASIC3의 항체를 사용한 면역조직화학적 방법으로 염색한 표본에서 면역반응에 양성을 보이는 신경세포는 세포질에 짙은 갈색 과립으로 나타났다. ASIC3 면역반응 양성 세포체는 주로 직경이 작은 신경원에서 발견되었는데, 그 전형적인 예를 그림-2에 나타내었다. 이러한 ASIC3 면역반응 양성 신경세포를 모델쥐와 대조군의 제5요 및 제4요 배근신경절을 대상으로 계수하여 그림-3에 나타내었다. 먼저, 제5요 배근신경절 내 존재하는 총 신경세포 수의 평균값은 두 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나[p>0.05, 대조군=3806.3±60.4(n=3); 모델쥐=4295±65.17(n=3)], 제4요 배근신경절 내 존재하는 총 신경세포 수의 평균값은 모델쥐와 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다[p>0.05, 대조군=3539±179.0(n=3); 모델쥐=4820±387.5375(n=3)]. 배근신경절 내 세 종류의 세포집단 모두에서 ASIC3 면역반응 양성 신경세포가 차지하는 비율은 두 집단 간에 유의한 차이가 없었다.

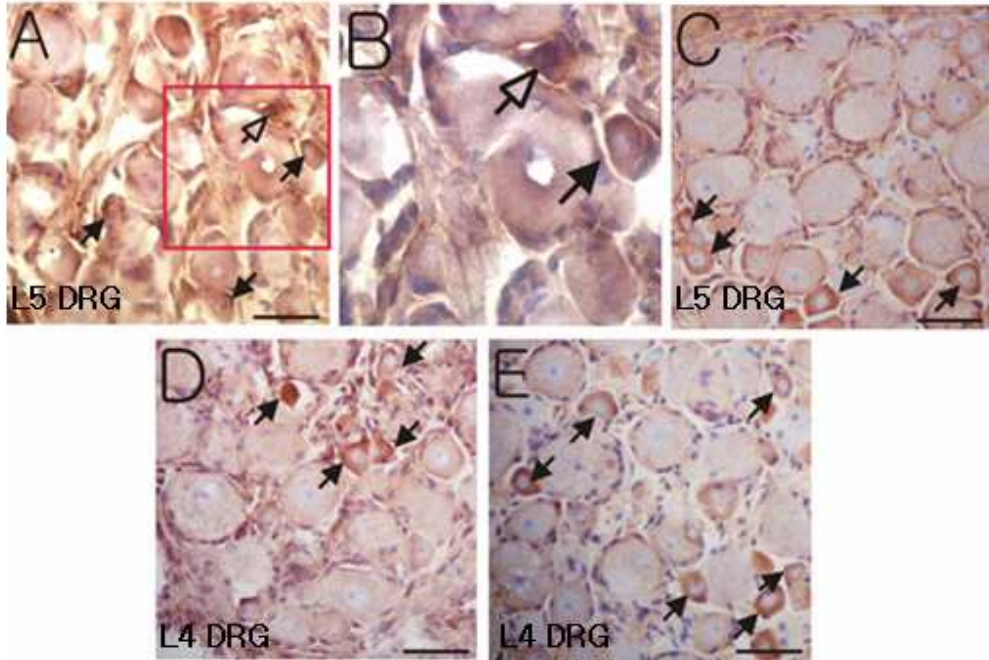


그림 2. 모델쥐와 대조군에서 관찰된 제5요 및 제4요 배근신경절 내 ASIC3 면역 반응 신경세포의 예. A와, D는 대조군, C와 E는 모델쥐의 신경절을 찍은 사진으로서 B는 A의 빨간 사각형 부분을 확대한 것이다. ASIC3 면역반응 신경세포는 대부분 작은 직경의 신경세포이었다(검은 화살표). 갈색 과립을 가진 세포질을 가졌지만 핵속에 인이 판별되지 않은 신경세포체는 면역반응 양성으로 간주하지 않았다(하얀 화살표)(그림 2B). 제4요 신경절에서 ASIC3 면역반응 신경세포가 작은 직경을 가진 세포에서 증가함을 확인했다(그림 2E). Scale bar: 50 μ m. 배율 : A, C, D, E- 200배, B-400배.

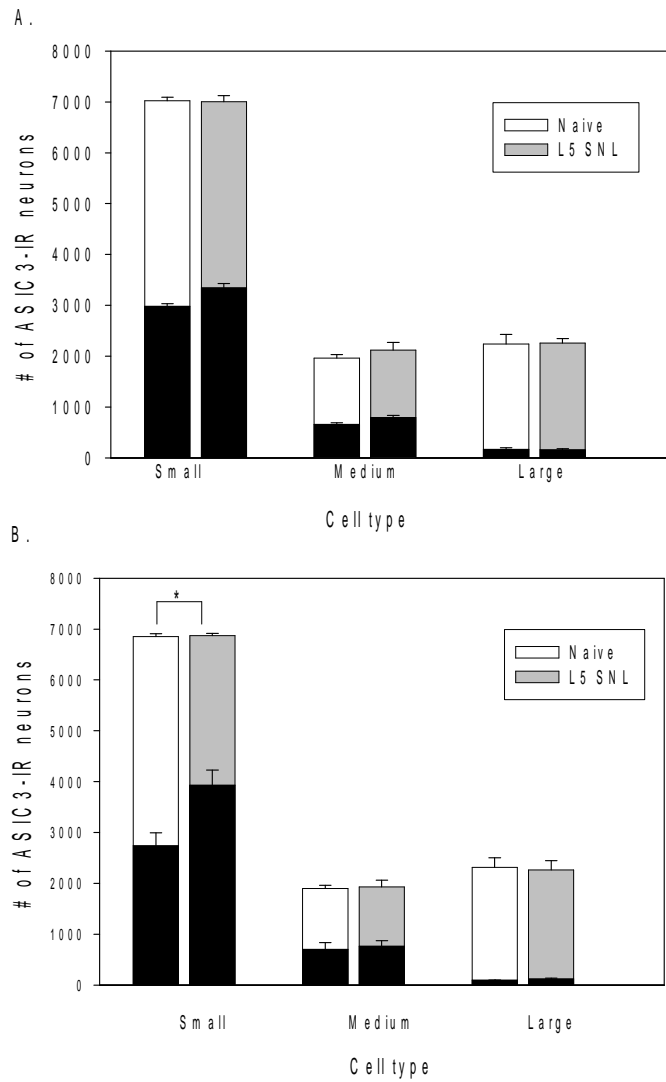


그림 3. 제5요 및 제4요 배근신경절 내에서 ASIC3 양성 신경세포의 비율. 대조군에서 얻은 ASIC3 면역반응 신경세포의 평균 개수를 나타내는 막대(전체)에 모델쥐에서 얻은 그것의 평균 개수를 나타내는 막대(검은 부분)를 겹쳐서 표시하였다. 제5요 신경절내에서는 대조군과 모델쥐 간의 유의한 차이가 없었으나(그림 3A), 제4요 신경절내에서는 작은 직경의 세포유형에서 대조군과 모델쥐간의 면역반응 신경세포의 유의한 차이가 있었다(그림 3B)($p < 0.05$, unpaired t-test)

3. 배근신경절 내 ASIC2a-면역반응 양성 신경세포

ASIC2a 면역반응 양성 신경세포를 모델쥐와 대조군의 제5요 및 제4요 배근신경절을 대상으로 계수하여 그림 5에 나타내었다. ASIC2a 면역반응 양성 세포체는 주로 직경이 큰크기와 중간크기의 신경세포에서 발견되었는데, 그 전형적인 예를 그림 4에 나타내었다. 제5요 배근신경절 내 존재하는 총 신경세포 수의 평균값은 두 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 [$p > 0.05$, 대조군 = 3772.03 ± 290.0 (n=3); 모델쥐 = 3950 ± 115.7 (n=3)], 제4요 배근신경절 내 존재하는 총 신경세포 수의 평균값도 두 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 [$p > 0.05$, 대조군 = 3631.7 ± 208.1 (n=3); 모델쥐 = 3398.7 ± 219.2 (n=3)]. 한편, 배근신경절 내 세 종류의 세포집단 모두에서 ASIC2a 면역반응 양성 신경세포가 차지하는 비율은 두 집단 간에 유의한 차이가 없었다.

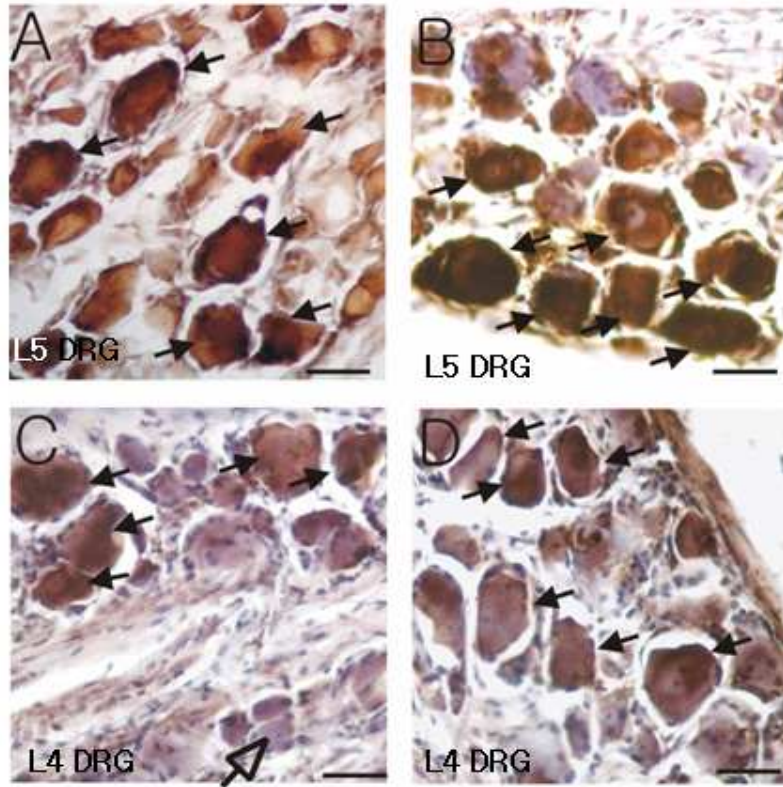


그림 4. 모델쥐와 대조군에서 관찰된 제5요 및 제4요 배근신경절 내 ASIC2a 면역 반응 신경세포의 예. A와 C는 대조군, B와 D는 모델쥐의 신경절에서 얻은 사진이다. ASIC2a 면역반응에 양성인 신경세포체는 대부분 중간 혹은 큰 직경의 신경원이었다(검은 화살표). 대부분 작은 직경의 신경원은 갈색 과립을 가진 세포질을 가졌지 않았다(하얀 화살표)(그림 4C). Scale bar: 50 μ m. 배율: 200배.

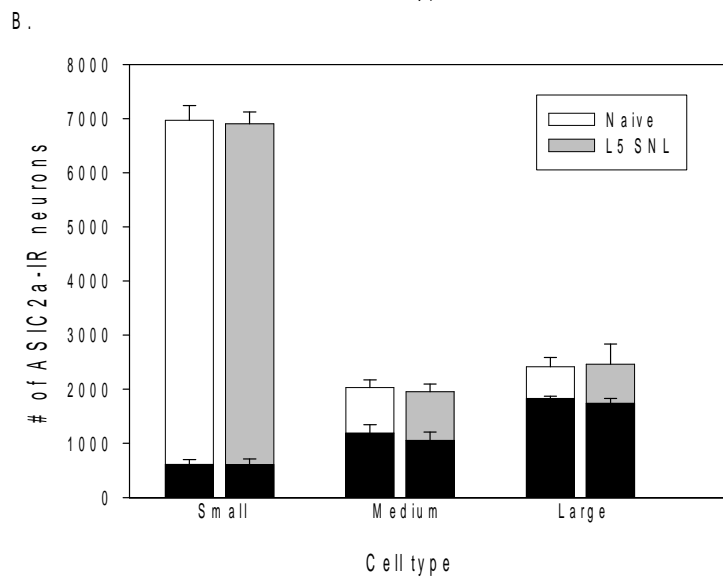
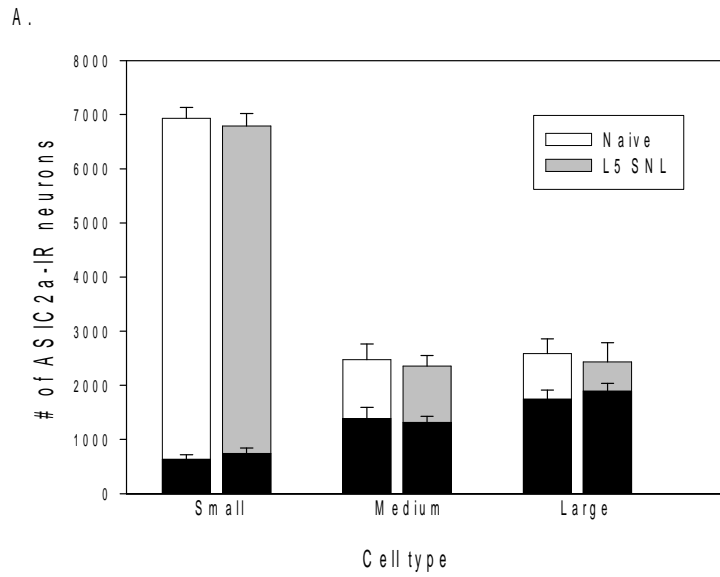


그림 5. 제5요 및 제4요 배근신경절 내에서 ASIC2a 양성 신경세포의 비율. 대조군에서 얻은 ASIC2a 면역반응 신경세포의 평균 개수를 나타내는 막대(전체)에 모델쥐에서 얻은 그것의 평균개수를 나타내는 막대(검은 부분)를 겹쳐서 표시하였다. 제5요 신경절에서도(그림 7A), 제4요 신경절에서도(그림 7B) 대조군과 모델쥐 간의 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$, unpaired t-test).

4. 구심신경에서 ASIC3 및 CGRP의 말초 및 척수 쪽으로의 이동 양상

이전 연구에서 정상 구심신경 내 생성된 일부 ASICs 아형은 척수 쪽 말단으로의 이동 없이 말초 쪽 말단 쪽으로만 이동함이 밝혀진 바 있다²⁶. 본 실험 결과에서 신경병증통증에서 비손상 구심신경의 ASIC3 발현이 증가되었음을 확인했다. 이 경우 ASIC3의 이동 양상에 변화가 있는지를 조사하였다. 말초 쪽으로의 이동은 좌골신경을 사전에 결찰하여 물질의 이동을 막은 후 결찰 앞부위에서 물질의 축적 여부로 확인하였고, 척수 쪽으로의 이동은 척수후각에서 물질의 존재 여부로 확인하였다. 이때, 구심신경에서 양방향으로 이동되는 물질로 잘 알려진 CGRP에 대한 실험을 함께 수행하였다.

신경결찰 후 7일 경과된 모델쥐에서 제4요 배근신경절 내 작은직경 신경세포에서 ASIC3와 CGRP에 함께 면역반응을 보이는 세포가 높은 비율로 존재함을 확인하였다(그림 6A, B, C). 이때, 제4요 척수의 후각에서 CGRP에 대한 면역반응은 뚜렷하였으나(그림 6E), ASIC3의 면역반응은 거의 존재하지 않았다(그림 6D).

한편 신경결찰 후 4일 경과된 모델쥐를 대상으로 무릎부근에서 좌골신경 결찰을 실시한 후 3일 경과된 뒤 결찰신경 전후 부위에서의 ASIC3와 CGRP에 대한 면역반응 정도를 면역형광법으로 측정하였다. 이때 대조군을 대상으로 동일한 방법을 적용하여 실험을 실시하였다. ASIC3의 경우 모델쥐와 대조군 모두에서 결찰 앞부위에 축적되었는데, 이러한 ASIC3의 축적은 모델쥐가 대조군에 비하여 더 높은 강도로 관찰되었다(그림 7A, B). CGRP의 경우도 모델쥐와 대조군 모두에서 결찰 앞부위에 축적됨이 관찰되었으나, 그 축적강도는 두 그룹 간에 차이를 관찰하기 어려웠다(그림 7C, D).

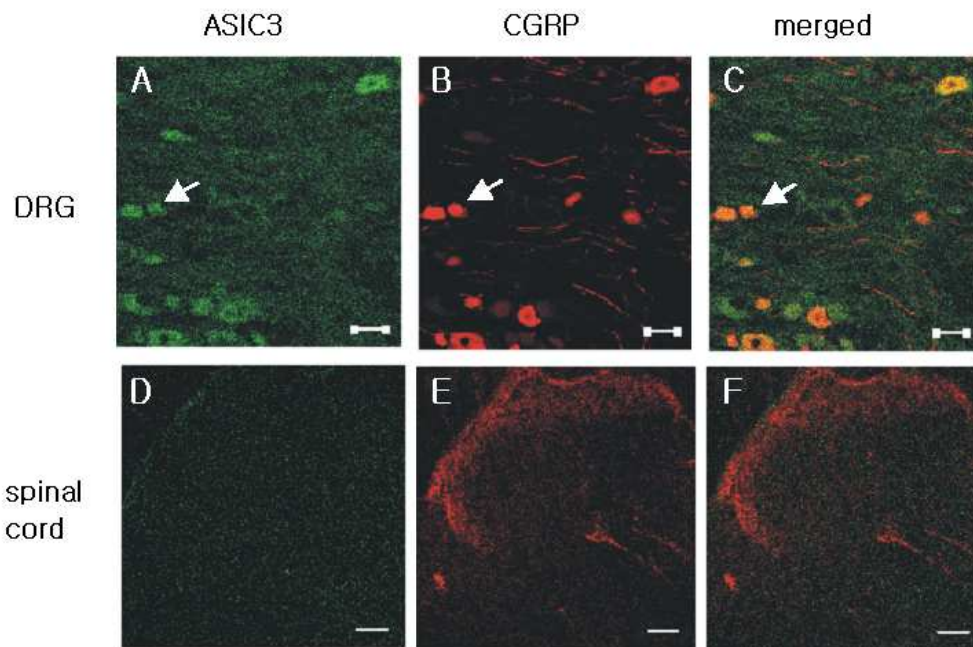


그림 6. 모델쥐의 제4요 배근신경절과 제4요 척수후각 내에서의 ASIC3 혹은 CGRP 면역반응. 면역형광법을 통해 ASIC3 항체(녹색)와 CGRP 항체(빨간색)를 볼 수 있다. 제4요 배근신절에서는 ASIC3와 CGRP 모두에 면역반응을 보이는 신경세포(이중염색된 세포, 하얀 화살표)가 많이 존재하나(A, B, C), 제4요 척수후각에서는 CGRP의 면역반응성은 뚜렷한 반면 ASIC3의 면역반응성은 없었다(D, E, F). 배율: 100배, scale bar: 100 μ m.

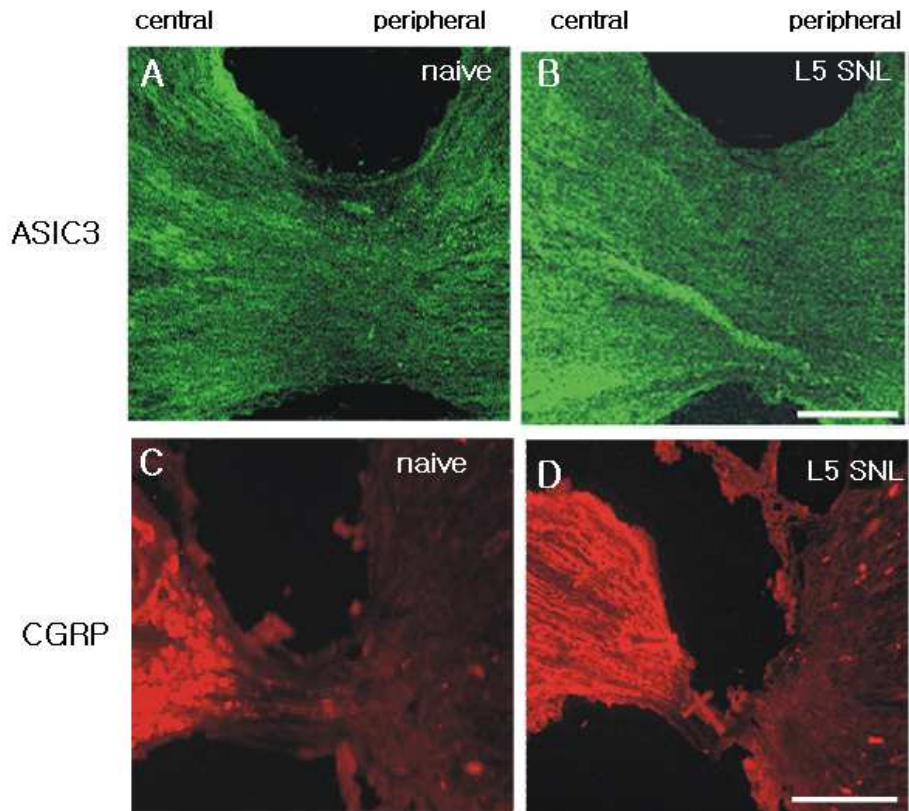


그림 7. 사전에 결찰한 좌골신경의 결찰 전후부에서 보이는 ASIC3 혹은 CGRP의 면역반응성의 모델쥐와 대조군 간 비교. 모델쥐와 대조군을 대상으로 좌측 좌골신경(무릎부근)을 수술실로 결찰한 뒤 3일 경과 후 결찰 앞뒤부위를 잘라 적출한 신경조각에서 결찰 앞 부위의 ASIC3와 CGRP의 축적된 정도를 면역형광법으로 조사하였다. ASIC3의 결찰 앞 부위 신경에서의 축적은 모델쥐와 대조군 모두에서 관찰되었는데, 축적의 정도는 모델군이 대조군에 비해 더욱 강한 것으로 관찰되었다(A, B). 한편 CGRP의 경우도 모델군과 대조군에서 결찰 앞 부위 신경에서 축적은 보였으나, 두 그룹 간에 축적정도의 차이는 관찰하기 어려웠다(C, D) 배율: 100배, scale bar: 100 μ m.

IV. 고찰

본 실험에서는 제5요 척수신경결찰 모델 쥐와 대조군을 이용하여, 손상 신경이 분포하는 뒷발피부에서 ASICs의 작동을 차단한 결과 이 모델쥐에서 관찰된 기계적 과민통 반응이 완화됨을 보였다. 또한 ASICs의 두 아형인 ASIC3와 ASIC2a 중 ASIC3를 발현하는 비손상 C-침해수용성 구심신경의 수가 모델쥐에서 대조군에 비해 증가됨을 보였다. 마지막으로 ASIC3의 구심신경 내 이동은 척수 쪽으로는 되지 않고 말초 쪽으로만 이루어졌는데, 이러한 이동 양상은 모델쥐 뿐 아니라 대조군에서도 관찰되었다.

척수신경손상 후 확립된 기계적 과민통 반응이 손상측 발피부에 국소적으로 적용한 ASICs 차단제에 의해 완화됨을 보였는데, 이 결과는 피부 부위에서의 지속적인 ASICs의 활성화가 과민통 반응 유지(maintenance)에 기여함을 의미한다. 한편 ASICs 차단제를 같은 방법으로 척수신경손상 전에 처리한 경우는 차단제를 처리하지 않은 경우와 비교해 볼 때, 신경손상 하루 후부터 측정된 기계적과민통 반응에 있어서 차이를 보이지 않았는데, 이는 과민통 반응 유도(induction)에는 ASICs의 활성화가 관여하지 않음을 시사한다. 그러나 ASICs 차단제의 전처치가 신경손상 후 하루 이내에서 짧은 기간 동안(예컨대, 수 시간동안) 과민통 반응을 억제 또는 지연시켰다면 이는 ASICs의 활성화가 과민통 반응 유도에도 기여했을 것인데, 이러한 가능성을 배제할 수 없다. 좌골신경결찰(sciatic nerve ligation)한 신경병증통증 모델쥐에서 melatonin 약물을 신경손상 전처치 시, 초기 30분과 1시간에만 과민통 반응이 완화됨이 보고된 바 있다²⁷. 본 연구에서 신경손상 후 하루 이내에서는 차단제의 전처치에 의한 과민통 반응 지연 여부를 결정하지 못했는데 그 이유는 정상쥐의 경우도 신경손상 후 하루 이내에서는 기계적 과민통 반응 유발 시간이 개체 간에 다양하게 관찰되었기 때문이다.

신경병증통증시 말초의 ASICs가 기계적 과민통 반응 생성에 어떻게 관여하는지에 관해서는 아직 밝혀지지 않고 있다. 하나의 가능한 설명은 부

분적 말초신경 손상 후 손상신경의 말초 쪽으로 진행되는 왈레리 변성 (Wallerian degeneration) 부위에서 염증반응이 유도되고 그 결과 여러 염증전구물질 뿐 아니라 H^+ 가 분비되는데, 특히 H^+ 는 비손상 침해수용성 구심신경에 존재하는 ASICs에 작용하여 이들 침해수용신경을 민감화하고 이를 통해 과민통 반응을 유발할 수 있다는 것이다. 이러한 가능성은 다음의 실험결과에 의하여 뒷받침되어진다. 즉, 왈레리 변성이 진행되는 손상신경 주변 부위에서는 염증전구물질 외에도 H^+ 이온 농도가 증가하였으며¹⁰⁻¹², H^+ 이온에 반응하여 신경흥분성을 유발에 관여하는 ASIC3 아형이 C-침해수용성 구심신경에 특이적으로 존재함이 밝혀졌다²⁰⁻²². 또한 낮은 pH 용액을 사람 피부에 주입한 결과 기계자극에 대한 과민통이 유도되었고¹³, H^+ 가 포함된 용액의 첨가가 침해수용신경의 흥분 뿐 아니라 이들 신경의 기계자극에 대한 과민화도 유도함을 보였다¹⁴⁻¹⁶. 그러나 H^+ 에 의한 침해수용신경의 과민화 기전에 관해서는 차후 연구되어야 할 과제이다.

ASIC3 활성화를 통한 과민통 유발에는 앞서 언급한 침해수용성 구심신경의 민감화 뿐 아니라 침해수용성 구심신경의 흥분으로 생성된 임펄스의 척수입력에 의한 척수신경 민감화도 기여할 수 있다. 어떤 경우의 민감화가 관여하던지 간에 만약 ASIC3를 발현하는 침해수용성 구심신경의 수가 증가한다면 민감화와 이를 통한 과민통의 생성은 가속화되고 증폭되어 나타날 것이다. 이러한 측면에서 보면 본 연구에서 관찰한 모델쥐 제4요 배근신경절 내 ASIC3-보유 침해수용성 구심신경(특히 C-구심신경)의 수적 증가는 신경손상 유발 과민통의 한 요인일 수 있다. 한편 신경병증통증시 개별 ASIC3-보유 침해수용성 구심신경 내 ASIC3 발현 증가도 ASIC3 보유 침해수용성 구심신경의 수적 증가와 유사한 결과를 초래할 것이다. 실제로 염증시 C-구심신경 내 ASIC3의 발현이 증가됨을 의미하는 실험결과가 보고된 바 있다²¹. 따라서 본 연구에서 개별적 ASIC3-보유 침해수용성 구심신경에서 신경손상 후 ASIC3의 발현이 증가했을 가능성을 배제할 수 없으나 이에 관한 조사는 수행치 못하였다.

신경병증통증시 ASIC3를 보유한 C-구심신경의 수적 증가가 어떻게 이

루어지는지에 관해서는 아직 밝혀지지 않았으나, 가능한 설명을 위해 신경성장물질(nerve growth factor)의 역할을 고려해 볼 수 있다. 말초의 손상된 구심신경은 와레리 변성을 거치면서 제거되는데 이 과정에서 변성 부위 주변의 비신경세포나 말단 부위의 표적조직으로부터 분비되는 신경성장물질은 모두 비손상 구심신경(특히 C-구심신경)으로 세포내이입(endocytosis)과정을 통해 흡입되게 될 것이다. 즉 신경손상 후 비손상 C-구심신경은 정상에 비해 더 많은 양의 신경성장물질을 받아들이고 이들 물질은 세포체로 이동하여 핵 내에서 유전자 발현에 관여하여 ASIC3의 생성 증가를 유도할 것이다. 따라서 정상에서 ASIC3를 거의 생성하지 못하던 C-구심신경이 신경병증통증시 다량의 ASIC3를 생성하게 되어 결과적으로 ASIC3 보유 C-구심신경의 수적 증가로 나타날 수 있다. 물론 이 경우 개별 C-구심신경 내 ASIC3의 발현 증가도 함께 나타날 것이다. 실제로 염증시 NGF에 의해 구심신경 내 ASIC3 발현 증가와 ASIC3를 발현하는 구심신경의 수적 증가가 유도되었는데, 이는 핵 내 전사계인 JNK/p38MAPK 체계를 통하여 이루어짐이 보고되었다^{23,28}.

ASIC2a의 경우 주로 A-구심신경에 분포하는 것으로 알려졌는데^{26,29}, 이는 본 실험에서 대조군의 배근신경절세포 내 큰직경세포, 중간직경세포, 작은직경세포 각 집단의 70%, 57%, 9%가 ASIC2a 보유 신경임을 보임으로서 확인하였다. 또한 본 실험결과는 이러한 배근신경절 내 세 집단에서 ASIC2a 보유 신경의 비율이 신경병증통증시 변하지 않았음을 보였다. ASIC2a도 H⁺와의 결합을 통하여 세포 흥분성을 유도하는데²⁹⁻³⁰, 그렇다면 신경손상 시 다량으로 분비되는 H⁺는 손상신경 중 특히 ASIC2a를 보유하는 A-구심신경을 흥분시켜 임펄스 생성을 초래할 것이다. 이 가능성은 신경병증 모델쥐를 이용한 전기생리실험에서 보인 말초신경 손상 후 손상된 A-구심신경에서 자발적 신경방전이 나타난다³¹⁻³³는 사실에 의해 뒷받침된다. 이를 기초로 하면, 본 실험에서 보인 A-구심신경의 ASIC2a가 정상에서도 A-구심신경에서 발현된다는 관찰은 정상에서 H⁺가 없거나 있어도 ASIC2a를 통해 임펄스를 생성하지 못할 정도로 소량 존재하기 때문이거

나, A-구심신경에 있는 ASIC2a가 기능을 발휘 못하는 비활성상태로 존재하기 때문에 A-구심신경에서 자발적 신경방전이 유도되지 않았을 것임을 추측케 한다. 따라서 신경병증통증시 손상된 A-구심신경의 자발적 신경방전 생성은 다량으로 분비된 H^+ 에 의하거나, ASIC2a의 활성상태로 전환에 의해 이루어 졌을 것으로 생각할 수 있다. 그러나 이들 손상된 A-구심신경에서 생성되는 자발적 신경방전이 신경병증통증으로 유발된 과민통 생성에 관여하는지, 관여하면 어떻게 관여하는지에 관해서는 차후 밝혀져야 할 과제이다.

결론적으로 본 연구에서는 부분적 말초신경손상 후 1) 손상신경이 분포하는 말초 피부에서 손상 시 분비된 H^+ 와의 반응에 의한 ASIC3의 지속적 활성화와 2) ASIC3를 발현하는 비손상 침해수용성 구심신경의 수적 증가가 신경손상 유발 기계적 과민통 유지에 중요한 요인임을 보였다. 따라서 말초에서의 ASIC3 활성화의 차단과 ASIC3-발현 비손상 침해수용성 구심신경 증가의 억제가 신경병증통증 치료를 위해 이용될 수 있을 것이다.

V. 결론

부분적 말초신경손상에 의해 유발되는 신경병증통증에 말초의 ASICs가 기여할 것임을 밝히고자, 제5요 척수신경결찰 모델 쥐를 이용하여 1) 손상 측 발바닥내 피하주입 한 ASICs 차단제가 신경병증통증 반응에 미치는 영향과 2) 두 아형인 ASIC3와 ASIC2a를 발현하는 구심신경의 수적 변화를 제5요 배근신경절(손상된 구심신경 세포체 존재)과 제5요 배근신경절(비손상 구심신경 세포체 존재)에서 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 제5요 척수신경결찰 모델 쥐에서 유발된 기계적 과민통 반응은 손상 동 측 발바닥의 피하 주사를 통해 국소적으로 가해준 amiloride (ASICs 차단제)에 의해 완화되었다.
2. 제4요 및 제5요 배근신경절 각각의 전체 세포 중 작은직경, 중간직경, 큰직경세포는 평균적으로 60%, 20%, 20%를 차지하고 있었다. ASIC3는 제4요 및 제5요 배근신경절 내 특히 작은직경세포에서 주로 발현되었는데(40%), 모델쥐의 경우는 특히 제4요 배근신경절 내에서 ASIC3 발현 작은직경세포의 수가 대조군에 비해 유의미하게 증가하였다(57%). 한편 제5요 배근신경절 내 ASIC3 발현은 세종류의 세포집단 모두에서 대조군과 모델쥐 간에 유의미한 차이가 없었다.
3. ASIC2a는 제4요 및 제5요 배근신경절 내 중간직경세포와 큰직경세포에서 주로 발현되었는데(각 집단의 57%와 70%에서 발현), 이러한 발현은 모델쥐와 비교하여 유의미한 차이가 없었다.
4. ASIC3는 구심신경에서 척수 쪽으로는 이동이 이루어지지 않고 말초 쪽으로만 이동됨을 보였는데, 이러한 이동양상은 모델쥐와 대조군 모두에서 관찰되었다.

이상의 결과는 부분적 말초신경손상에 의해 유발된 기계적 과민통 반응에는 손상에 의해 분비된 H^+ 이온에 의한 말초에서의 ASIC3 활성화와 이

와 더불어 ASIC3를 발현하는 비손상 침해수용성 구심신경의 수적 증가가 기여함을 의미한다. 따라서 말초에서의 ASIC3 활성화의 차단과 ASIC3-발현 비손상 침해수용성 구심신경 증가의 억제가 신경병증통증 치료를 위해 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Wall PD, Gutnick M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses origination from a neuroma. *Exp Neurol* 1974;43:580-593.
2. Devor M, Janig W. Activation of myelinated afferents ending in a neuroma by stimulation of sympathetic supply in the rat. *Neurosci Lett* 1981;24:43-47.
3. Welk E, Leah JD, Zimmermann M. Characteristics of A- and C-fibers ending in a sensory neuroma in the rat. *J Neurophysiol* 1990;63:759-766.
4. Laird JM, Bennett GJ. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1993;69:2072-2085.
5. 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.
6. 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* 2001;22:7746-7753.
7. Shim B, Kim DW, Kim BH, Nam TS, Leem JW, Chung JM. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors in rats with experimental peripheral neuropathy. *Neurosci* 2005; 132:193-201.
8. Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 2001;13: 2105-2114.
9. Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J. Redistribution of Nav1.8 in uninjured axons enables neuropathic

- thic pain. *J Neurosci* 2003;23:158-166.
10. Douglas W, Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve* 2000;9:33-38.
 11. Höke A, Sun HS, Gordon T, Zochodne DW. Do denervated peripheral nerve trunks become ischemic? The impact of chronic denervation on vasa nervorum. *Exp Neurol* 2001;172:398-406.
 12. Xu QG, Zochodne DW. Ischemia and failed regeneration in chronic experimental neuromas. *Brain Res* 2002;946:24-30.
 13. Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 1993;154:113-116.
 14. Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 1992;12:86-95.
 15. Steen KH, Issberner U, Reeh PW. Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. *Neurosci Lett* 1995;199:29-32.
 16. Steen KH, Steen AE, Kreysel HW, Reeh PW. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. *Pain* 1996;66:163-170.
 17. García-Añoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BT, Corey DP. BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:1459-1464.
 18. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton gated cation channel involved in acid sensing. *Nature* 1997;386:173-177.
 19. Waldmann R and Lazdunski M. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:418-424.
 20. Caterina MJ, David J. Sense and specificity: a molecular identity for

- nociceptors. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:525-530.
21. Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001;21:8026-8033.
 22. Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Shimada S. In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Mol Brain Res* 2005;136:125-133.
 23. Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2002;22:20662-20670.
 24. 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.
 25. Coggeshall RE, Chung K. The determination of an empirical correction factor to deal with the problem of nucleolar splitting in neuronal counts. *J Neurosci Methods* 1984;10:159-155.
 26. García-Añoveros J, Samad TA, Zúvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP. Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1a to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 2001; 21:2678-2686.
 27. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: Possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2006;78: 1592-1597.
 28. Mamet J, Lazdunski M, Voilley N. How nerve growth factor derives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* 2003;278:48907-48913.
 29. Price MP, Lewin GB, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, et al. The mammalian sodium channel BNC1 is required for

- normal touch sensation. *Nature* 2000;407:1007-1011.
30. Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Seguela P. Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd^{+3} . *J Biol Chem* 2000;275:28519-28525.
 31. Han HC, Lee DH, Chung JM. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 2000;84:253-261.
 32. Lui 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.
 33. 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.

Abstract

The contribution of peripheral acid sensing ion channels to mechanical hyperalgesia following peripheral nerve injury in the rat

Kyung Hwa Kim

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

(Directed by Professor Joong Woo Leem)

Peripheral nerve injury leads to Wallerian degeneration of the injured axons distal to the lesion, which causes an increase of H⁺ release at the lesion site. The H⁺ produces an excitation of primary afferent neurons by directly gating depolarizing ASICs. This paper examines whether peripheral ASICs contributes to and, if so, the modulation of their expressions in primary afferent neurons is involved in, nerve injury-induced neuropathic pain.

As a neuropathy model, a lumbar 5 spinal nerve ligation (L5 SNL) was performed unilaterally on rats. Mechanical sensitivity of hind paw was examined by measuring paw withdrawal threshold (PWT) to von Frey filament application. The ASICs blocker amiloride was given via an intraplantar (i.pl.) injection before and after nerve injury. The changes in immunoreactivity of antibodies against ASICs subtypes, ASIC3 and ASIC2a, were examined on dorsal root ganglion (DRG) neurons. The direction to which ASIC3 was transported in peripheral

nerve was also examined.

SNL induced mechanical hyperalgesia in affected hind paw as evidenced by a decrease in PWT. When an i.pl. injection of amiloride was given after SNL, established hyperalgesia was attenuated. ASIC3 was expressed mainly in small-sized neurons in L4 and L5 DRGs of control rats. ASIC3-immunoreactive (ir) small-sized neurons increased in number in L4 DRG of SNL-rats. ASIC2a was expressed mainly on medium- and large-sized neurons in L4 and L5 DRGs of control rats. This expression was not different from that of SNL-rats. ASIC3 was transported in the peripheral nerve to the periphery, but not to the spinal cord.

The results suggest that activation of peripheral ASICs by H⁺ released following nerve injury and increased number of uninjured ASIC3-ir nociceptive afferents contribute to nerve injury-induced mechanical hyperalgesia. Therefore, preventing the ASIC3 activation and the upregulation of ASIC3 expression in uninjured nociceptors may be novel therapeutic options for treating neuropathic pain.

Key Words : neuropathic pain, spinal nerve ligation, Wallerian degeneration, mechanical hyperalgesia, ASIC3, ASIC2a, nociceptor, dorsal root ganglion