

척수손상 흰쥐의 방광에서 Nerve
Growth Factor (NGF)의 변화와
Capsaicin이 NGF에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 창 희

척수손상 흰쥐의 방광에서 Nerve
Growth Factor (NGF)의 변화와
Capsaicin이 NGF에 미치는 영향

지도 한 상 원 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 창 희

홍창희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 각별한 지도와 관심을 베풀어주신 한상원 교수님께 진심으로 감사를 드리며 논문 준비과정 동안 자상한 충고와 가르침으로 이끌어주신 이종은 교수님, 조진선 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 연구 진행과정 중 필요할 때마다 도움을 아끼지 않으신 노지연 선생님과 김찬수 선생님께 감사를 드립니다.

그리고 끝없는 사랑으로 저를 물심양면으로 뒷받침해주신 부모님과 항상 곁에서 사랑으로 응원해 준 아내 은아와 딸 리나에게 이 논문을 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 실험동물 및 외과적 처치	4
2. Capsaicin 처치	4
3. 방광내압측정	4
4. ELISA 방법을 통한 방광조직의 NGF 단백질의 정량	5
5. RT-PCR 방법을 통한 방광조직의 mRNA NGF의 정량	6
6. 비교분석	7
III. 결과	8
1. 방광내압측정	8
2. 척수절단 후 방광에서 NGF 단백질의 변화	9
3. 척수절단 후 방광의 NGF mRNA의 변화	10
IV. 고찰	13

V. 결론	17
참고문헌	18
영문요약	20

그림 차례

Fig. 1. Awake cystometrography	8
Fig. 2. Changes of nerve growth factor following spinal cord injury in the urinary bladder using the NGF-ELISA.	9
Fig. 3. Effect of systemic capsaicin (Cap) treatment on the bladder nerve growth factor following spinal cord injury ..	10
Fig. 4. mRNA expression of nerve growth factor in the bladder following spinal cord injury (SCI).	11
Fig. 5. Changes of NGF mRNA following spinal cord injury and the effect of systemic capsaicin treatment.	12

척수손상 흰쥐의 방광에서 nerve growth factor (NGF)의 변화와
capsaicin이 NGF에 미치는 영향

목적: Nerve growth factor (NGF)는 방광을 포함한 많은 기관의 자율신경 지배에 중요한 역할을 하는 것으로 되어 있으나 민말이집신 경섬유가 배뇨반사에 관여하는 척수절단에서 NGF가 방광과반사에 관여하는 기전에 관한 연구는 미비한 상태이다. 본 연구는 척수손상이라는 병적 방광 상태에서 NGF가 배뇨반사에 관여하는 신경세포 형성성에 대한 기전을 규명하고 capsaicin이 방광의 향신경인자에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

방법: 흰쥐에서 척수절단 4일째인 급성기와 6주째인 만성기에 방광의 NGF는 ELISA를 통해 측정하였고 NGF mRNA는 RT-PCR로 측정하였다. capsaicin이 향신경인자에 미치는 영향을 보기 위해 급성기군은 척수절단 전에 capsaicin을 전처치하였고 만성기군은 지속적인 민말이집신경섬유의 탈감작을 위해 반복적으로 capsaicin을 처리한 후 NGF와 NGF mRNA를 비교하였다. 각 군에서 표적장기의 생리평가를 위해 방광내압측정을 시행하였다.

결과: 척수절단 후 방광의 NGF는 척수손상 후 장기간 (6주) 경과한 후에 증가하였다. 방광의 NGF mRNA는 무반사상태인 척수절단 급성기에 증가하고 시간이 경과하면서 감소하였다. 척수절단 후 capsaicin의 반복적 투여는 척수절단 후 발생하는 배뇨근 비역제성 수축을 봉쇄할 뿐만 아니라 방광의 NGF를 감소시켰다. 척수절단 급성기에 capsaicin을 전처치하면 방광의 NGF mRNA 생성이 감소하였다.

결론: 척수절단 후 방광에서 NGF 단백질과 NGF mRNA의 변화를 살펴봄으로써 NGF가 신경세포 형성성에 관여함을 확인할 수 있었고 표적기관인 방광에서 NGF가 역방향으로 축삭수송을 통해 배뇨반사에 관여함을 추정할 수 있었다. 또한 C 민말이집신경섬유의 탈감작을 통해 배뇨근과다반사를 봉쇄하는 것으로 알려진 capsaicin이 배뇨반사의 형성성에 관여하는 NGF mRNA 생성을 차단한다는 새로운 역할을 확인할 수 있었다.

핵심되는 말 : nerve growth factor, spinal cord injury, capsaicin

척수손상 흰쥐의 방광에서 nerve growth factor (NGF)의 변화와 capsaicin이 NGF에 미치는 영향

<지도교수 한상원 교수>

연세대학교 대학원 의학과

홍 창 희

I. 서 론

Nerve growth factor (NGF)는 방광을 포함한 많은 기관의 자율신경 지배에 중요한 역할을 한다. 하부요로의 폐쇄나 염증과 같은 병적 방광의 자율신경 지배의 변화는 NGF의 변화와 밀접한 관계가 있다. 이러한 병적 상태에서는 표적기관인 방광에서 NGF mRNA와 NGF의 증가가 일어나고 이것이 역행성 축삭수송을 통해 후근신경절에 도달하고 후근신경절의 신경세포 비대를 일으킨다.¹ 이것은 다시 방광의 신경생리학적 변화를 초래하게 된다. 결국 방광의 염증이나 폐쇄는 NGF의 변화를 일으켜 빈뇨, 방광과반사 등이 나타난다. 일례로 하부요로 폐쇄에 의한 방광과반사는 NGF autoimmunity로 소실됨을 관찰할 수가 있는데² 이것은 NGF를 포함한 향신경인자가 배뇨반사에 관여함을 간접적으로 시사한다고 볼 수 있다. 하지만 NGF가 방광과반사를 초래하는 기전에 관한 연구는 미비한 상태이다. Dmitrieva 등³은 NGF의 작용기전에서 들신경섬유가 중요한 역할을 하고 있으며 30분 동안 방광내 NGF를 주입하였을 때 말이집 Aδ 섬유와 민말이집 C 신경섬유를 감작시킨다고 하였다. 하지만 최근 Chuang 등⁴은 C 섬유를 탈감작시키기 위해 capsaicin을 전처리하고 방광내 NGF를 주입하였을 때 방광과반사가 지속되는 것을 관찰하여 NGF가 방광과반

사에 관여하는 경로는 말미집 Aδ 섬유가 중요한 역할을 할 것이라고 주장하였다. 하지만 NGF는 발생과정 중 감각신경의 생존과 C 섬유의 유지에 결정적인 역할을 하는 인자로 NGF가 C 들신경섬유에 영향을 주지 않는다고 단정하기는 어렵다. 특히 Chuang 등의 연구는 말미집 Aδ 섬유가 배뇨반사에 관여하는 정상방광에서 시행이 되었다는 한계를 가지고 있고 척수손상과 같은 병적 상태에서는 C 섬유가 배뇨반사에 관여하기 때문에 신경세포 형성성 (neuronal plasticity) 이 일어난 병적 방광에서 NGF가 capsaicin 민감 C 섬유에 미치는 영향을 규명하는 것은 중요하다.

본 연구는 척수손상으로 인한 병적 방광 상태에서 시기별로 방광의 NGF mRNA와 NGF의 양을 측정하여 배뇨반사에 관여하는 신경세포 형성성에 대한 NGF의 기전을 규명하고 capsacin 민감 C 섬유를 봉쇄할 수 있는 capsaicin을 처치한 후 방광의 NGF mRNA와 NGF의 변화를 관찰함으로써 capsaicin이 방광의 향신경인자에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 외과적 처치

실험동물로는 몸무게 250-300g인 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였고, 정상대조군 (5마리), 정상 쥐 capsaicin 처치군 (5마리), 척수절단군 (10마리), capsaicin 처치 후 척수절단군 (10마리)으로 분류하였다. 척수손상을 시행한 두 군은 급성기군 (5마리)과 만성기군 (5마리)으로 세분하였다. 척수손상은 흰쥐를 마취한 후 아홉 번째에서 열 번째 흉추의 척추궁관을 제거하고 아홉 번째 척수를 완전히 절단하였다. 척수가 절단된 부분에 젤폼을 넣고 절개부위를 봉합하였다. 시술 후 7일간 항생제 (암피실린 150mg/kg)를 근육주사하였다. 척수손상을 시행한 동물의 위생상태를 잘 유지하고 척수속 상태에서 벗어날 때까지 하루에 두 번씩 방광을 눌러 배뇨를 시켰다.

2. Capsaicin 처치

흰쥐를 sodium pentobarbital (50mg/kg i.p.)로 마취시키고 capsaicin (50mg/kg)을 피하주사하였다. Capsaicin 처치시 호흡장애를 방지하기 위해 atrophine (0.2mg/kg), terbutaline (0.2mg/kg), aminophylline (20mg/kg)을 capsaicin 주입 15분전에 복강내 주사하였다. 척수손상군 중 만성기군에서 capsaicin 처치 후 5일마다 eye wipe test를 시행하였고 capsaicin 탈감작 상태를 확인하고 지속적인 capsaicin 처치 효과가 유지되도록 capsaicin을 반복투여하였다.

3. 방광내압측정

실험쥐에서 방광조직을 적출하기 전에 요역동학 검사를 시행하였다. 하복부를 절개하고 방광을 노출한 다음 방광의 정부에 직경 2 mm의 절개를 가하고 4Fr. double lumen catheter를 삽입하고 3번 실로 묶어 밀봉하였다. Infusion channel에 microinjection pump(Kd

S-202, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA)를 catheter와 연결한 후 0.12ml/min의 속도로 주입하였다. Pressure transducer를 Biopac systems에 연결한 후 첫 배뇨근 수축이 일어나는 주입용적, 용적역치, 압력역치, 비역제성 배뇨근수축의 수, 수축사이기간을 기록하였다.

4. ELISA 방법을 통한 방광조직의 NGF 단백질 정량

척수절단군 중 급성기군은 척수손상 4일후에 방광을 적출하였고 만성기군은 척수손상 6주후에 방광을 적출하고 바로 액체질소에 보관하였다. 채취한 조직을 50 mM Tris buffer 용액에 균질화하고 lysis buffer(100mM NaCl, 10mM EDTA(pH 8.0), 10mM Tris-HCl(pH 7.6), 1 μ g/ μ l aprotinin, 100 μ g/ μ l PMSF)를 처리한 후, 4°C에서 12,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 bio-rad protein assay kit(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 정량된 단백질을 1:2로 희석한 다음 10 N HCl을 첨가하여 15분간 상온에서 반응시키고 10 N NaOH로 중화시킴으로써 산성화과정을 거쳤다. 방광조직의 NGF 단백질 측정은 Emax ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 먼저 NGF 표준값을 알기위한 standard 값은 0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500pg/ml 이 되도록 각각 준비하였다. 산성화 처리된 단백질 농도가 표준값 7.8-500pg/ml 범위에 들어가도록 sample buffer로 희석하였다. 96 well plate에 anti-NGF pAb 100 μ l를 첨가하여 4°C, 18시간 코팅한 후, Block & sample buffer를 처리하여 내인성 인자들을 차단하였다. NGF를 농도별로 희석시킨 standard 100 μ l와 각 군의 방광조직 100 μ l을 넣고, anti-NGF poly antibody 100 μ l를 첨가하여 4°C, 18시간 반응시킨 후 1x TBST (20mM Tris HCl(pH 7.6), 150mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20)로 5회 세척하였다.

Anti-Rat IgG, HRP Conjugate를 100ul씩 첨가하고 상온에서 2시간 30분 동안 반응시킨 다음 다시 5회 세척 후 TMB One 용액을 100ul 씩 넣어 상온에서 10분간 반응시켰다. 1N hydrochloride acid를 100ul씩 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA Reader (SpectraMax 250, Molecular Devices, Synnyvela, CA, USA)로 NGF의 양을 측정하였다.

5. RT-PCR 방법을 통한 방광조직의 mRNA NGF의 정량

RT-PCR을 위한 방광조직은 떼어낸 즉시 액체질소에 얼려서 -70℃ 냉동 보관하였다. 전체 RNA 및 mRNA의 분리와 정제 과정은 oligotex dT가 포함된 oligotex direct mRNA mini kit (Qiagen, CA, USA)을 사용하였고, 분리된 mRNA에서 cDNA를 합성하고 NGF primer로 PCR 하는 과정은 Qiagen oneStep RT-PCR kit (Qiagen, CA, USA)을 사용하였다. RT-PCR 반응은 PCR 튜브에 mRNA 1ug, 5x reaction buffer (100mM Tris, 500mM KCl, pH 8.3) 10ul, 5X Q-solution 10ul, dNTP (10mM mixture of dATP, dCTP, dGTP and dTTP) 각각 2ul, primer 2ul, RNase inhibitor 5ul, oneStep RT-PCR enzyme mix 2ul를 넣고 DEPC 처리 한 증류수를 혼합하여 전체 50ul의 용액을 만든 다음, 50℃, 30분, 95℃. 15분 역전사반응 후 , 94℃, 1분, 55℃, 1분 그리고 72℃, 1분 이 세 과정을 30 cycling 한 후, 72℃. 10분 조건으로 Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, westbury, NY, USA)를 사용하여 증폭시켰다.

NGF에 대한 primer는 5'-CTGCTGAACCAATAGCTGCCCCG-3' (forward primer)과 5'-CGCCTTGACAAAGGTGTGAGTCG-3' (reverse primer)였고, β -actin에 대한 primer는 5'-ATCGTGGGCCGCCCTAGGCAC-3' (forward primer)과 5'-TGGCCTTAGGGTTTCAGAGGGGC-3' (reverse primer)였다.

얻어진 RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel 전기영동을 통하여 확인하였으며 증폭된 NGF mRNA를 정량하기 위하여 densitometric scanning analysis (TINA version 2.10e)를 이용하였다. House keeping 유전자는 β -actin을 사용하였고 mRNA band의 강도와 β -actin의 강도에 대한 비를 구하여 mRNA NGF 발현을 상대적으로 정량화하였다.

6. 결과의 비교분석 방법

NGF 단백질과 NGF mRNA는 평균값 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 각 실험군간의 비교는 univariate analysis of variance (ANOVA)와 student t-test로 검정하였고 p값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 방광내압측정

방광내압측정은 깨어있는 상태에서 진행되었다. Capsaicin 처치를 받지 않은 척수절단 6주 후의 방광내압측정에서 방광이 채워지면서 비억제성 배뇨근수축이 관찰되었고 배뇨압 또한 계속 증가하여 평균 최대 배뇨압은 20 ± 3.32 cmH₂O에 해당하였다. 척수절단을 시행하고 나서 반복적인 capsaicin 주사를 시행하고 척수절단 6주 후에 시행한 방광내압측정에서 비억제성 배뇨근수축의 빈도는 변함이 없으나 평균 최대배뇨압은 통계학적으로 유의하게 감소하였다.

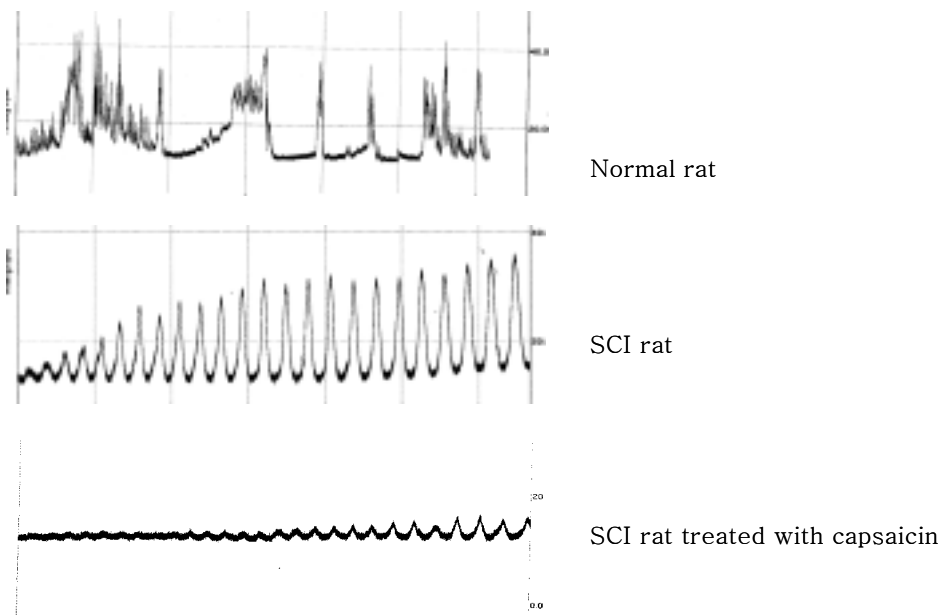


Fig. 1. Awake cystometography.

2. 척수 절단 후 방광에서 NGF 단백질의 변화

가. 척수절단

척수절단 4일 후에 측정한 방광의 NGF는 정상대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 척수절단 후 시간이 지날수록 방광의 NGF는 증가하였고 척수절단 5주 후에는 척수절단 4일째와 비교할 때 통계학적으로 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$) 척수절단 6주 후에는 정상대조군과 척수절단 5주째와 비교할 때 통계학적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig 2).

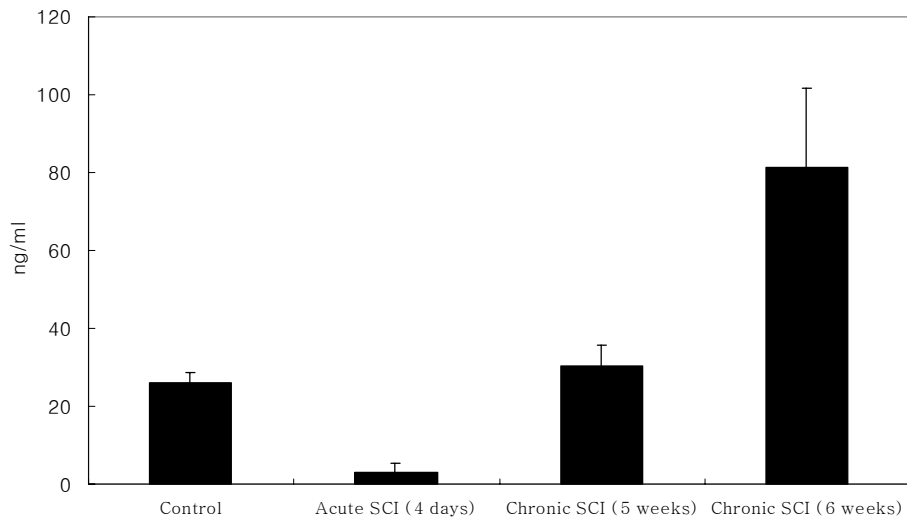


Fig. 2. Changes of nerve growth factor following spinal cord injury in the urinary bladder using the NGF-ELISA.

나. Capsaicin 처치

각각의 군에서 capsaicin을 전처리하고 방광의 NGF의 변화를 측정하였다. 정상대조군에서 capsaicin을 전처리할 때 방광의 NGF는 유의하게 감소하였고 capsaicin을 처리하고 척수절단을 시행한 후 4일째의 방광에서 NGF의 양은 거의 측정되지 않았다. 척수절단 후 반복

적인 capsaicin 처치를 시행한 척수절단 6주 후 방광의 NGF는 capsaicin 처치를 시행하지 않은 척수절단 6주군과 비교할 때 통계학적으로 유의한 감소가 관찰되었다 ($p<0.05$).

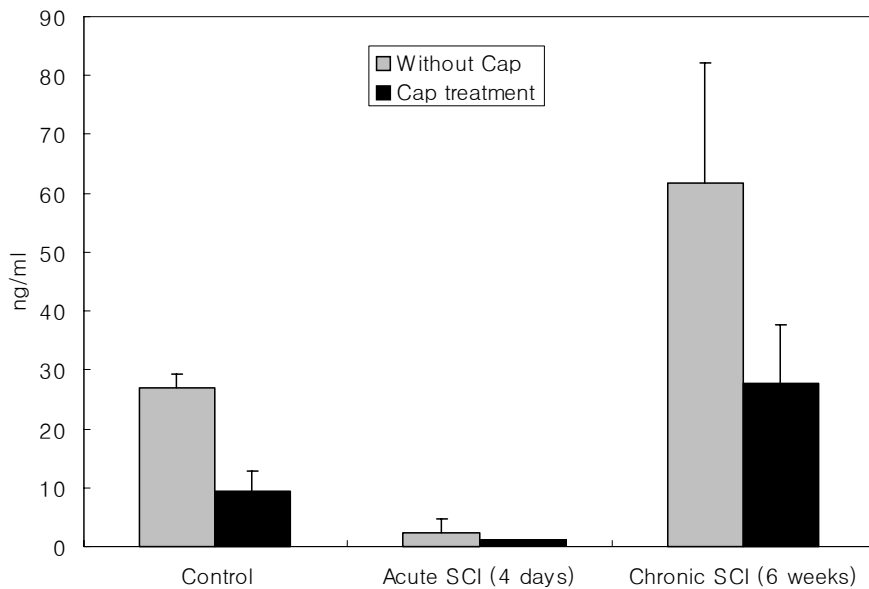


Fig 3. Effect of systemic capsaicin (Cap) treatment on the bladder nerve growth factor following spinal cord injury.

3. 척수절단 후 방광의 NGF mRNA의 변화

척수절단 후 4일째 방광에서 NGF mRNA의 상대적 밀도는 정상대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의하게 증가하였다 ($p<0.05$) (Fig 4, 5). 그러나 척수절단 6주 후 방광에서 NGF mRNA의 상대적 밀도는 척수절단 4일째와 비교할 때 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).

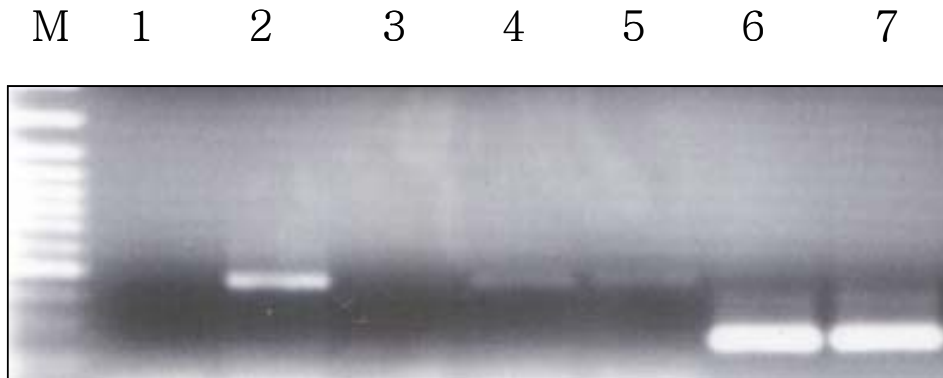


Fig. 4. mRNA expression of nerve growth factor in the bladder following spinal cord injury (SCI). Lane: M, marker; 1, control rat; 2, acute SCI rat (4 days); 3, chronic SCI rat (6 weeks); 4, acute SCI rat treated with capsaicin; 5, chronic SCI rat treated with repeated capsaicin; 6-7, β -actin.

각각의 군에서 capsaicin을 전처치하고 난 후 방광에서 NGF mRNA 상대적 밀도의 변화를 측정하였다. Capsaicin을 처치하고 척수절단을 시행한 후 4일째의 방광에서 NGF mRNA의 상대적 밀도는 capsaicin을 전처치하지 않은 척수절단 4일째와 비교하였을 때 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 척수절단을 시행하고 반복적인 capsaicin 치료를 시행한 척수절단 6주 후의 방광에서 NGF mRNA의 상대적 밀도는 capsaicin 처치를 시행하지 않은 척수절단 6주 군과 비교할 때 통계학적으로 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$) capsaicin을 전처치한 척수절단 4일째의 방광에서 NGF mRNA와 비슷한 밀도를 보였다.

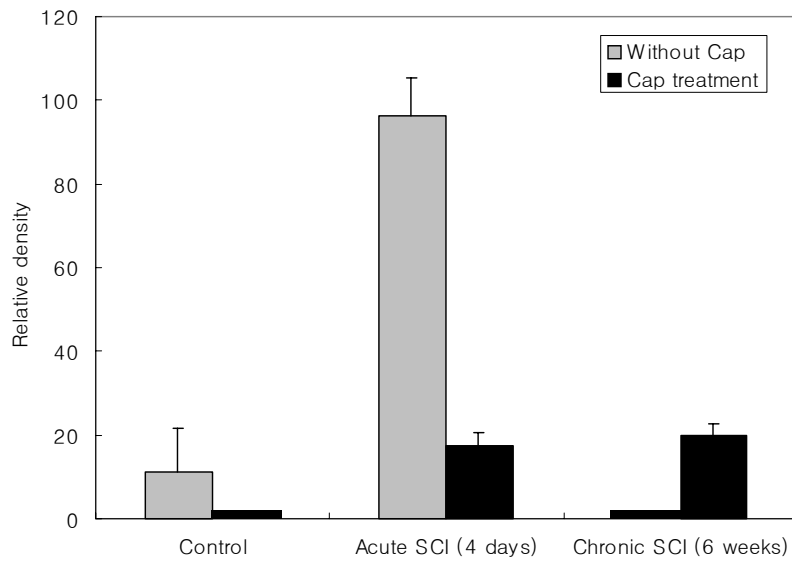


Fig. 5. Changes of NGF mRNA following spinal cord injury and the effect of systemic capsaicin treatment.

IV. 고 찰

Nerve growth factor는 neurotrophin이라고 알려진 증식인자 중 가장 먼저 알려진 단백질로 방광염증,⁵ 척수손상,⁶ 하부요로 폐쇄⁷ 등과 같은 병적 방광에서 하부요로의 신경생리학적 변화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 비억제성 배뇨근수축과 배뇨근-요도괄약근 실조를 특징으로 하는 척수손상 방광에서도 향신경인자의 증가가 방광 감각신경 경로의 기능변화와 연관되어 있다.⁸ 본 실험에서 척수절단 4일째에 측정된 방광에서의 NGF는 대조군에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었고 척수절단 6주째의 방광에서 NGF는 증가하였다. 반면 NGF mRNA는 급성기인 척수절단 4일째에 증가하였다가 시간이 지나면서 만성기인 척수절단 6주째에는 정상대조군보다 감소하였다. 이러한 결과는 화학적 자극에 의한 방광염의 결과와는 다르다. 비억제성 배뇨근수축을 특징으로 하는 방광염에서 방광의 NGF와 NGF mRNA는 4-8시간 이내에 증가한다.⁹ 이 경우 방광에서 증가된 NGF가 척수배뇨반사의 향진에 관여한다는 증거로 trkA-IgG fusion molecule을 사용하여 NGF를 봉쇄하면 방광의 비억제성 배뇨근수축이 차단되는 것을 보고한 바 있다. 방광염에서 NGF는 배뇨근 뿐만 아니라 염증으로 인해 활성화되는 림프구, 대식세포, 비만세포, 신경 집세포, 섬유모세포 등 염증세포에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다.¹⁰

척수절단 후 방광에서 NGF의 변화는 방광염 모델과는 달리 배뇨근-요도괄약근 실조에 의한 배뇨근 비후에 의한 것으로 생각된다. 척수절단 4일째의 방광은 무반사 상태로 배뇨근 수축이 없지만 방광의 무게는 정상대조군의 5배로 증가한다.⁶ 비후된 배뇨근에서 NGF가 증가하는 것은 부분 요도폐쇄에서도 확인할 수 있다.¹¹ 본 실험에서는 배뇨근 비후가 일어나는 급성기인 척수절단 4일째 방광에서 NGF는 정상대조군과 비교할 때 유의하게 감소하였다. 이것은 척수절단 이후

발생하는 척수배뇨반사의 신경세포 형성성과 관련되어 있다. 척수절단 급성기의 방광에서 NGF가 감소하는 것은 NGF가 역방향으로 방광 감각신경원인 후근신경절로 이송된 것으로 해석할 수 있다. 이것은 척수절단 급성기에 NGF mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 결과로도 설명할 수 있다. 역방향으로 축삭수송이 된 후근신경절의 NGF는 배뇨반사의 재구성을 유발하고 배뇨과다반사를 유도한다. 배뇨반사의 재구성이 완결되면 역방향 축삭수송은 감소하고 방광에서 NGF는 증가하게 되며 NGF mRNA 발현은 감소하게 된다. 본 실험에서 척수절단 6주에 시행한 방광내압측정에서 배뇨과다반사를 확인할 수 있었고 방광에서 NGF는 증가하였고 NGF mRNA 발현은 감소한 결과는 위 해석을 뒷받침한다.

Capsaicin은 고추에서 매운 맛을 내는 물질로 C 섬유 신경독이다.¹² C 감각신경이 배뇨반사에 관여하는 척수절단 흰쥐에서 capsaicin을 피하주사하게 되면 배뇨근과다반사로 표현되는 배뇨근 수축을 차단한다.¹³ 본 실험은 반복적인 capsaicin 투여를 시행한 경우로 척수절단 6주 후에 비역제성 배뇨근수축을 완전히 차단하지는 못하였지만 수축압은 유의하게 감소하였다. Capsaicin이 배뇨근과다반사를 봉쇄하는 기전으로는 C 말미집신경섬유를 탈감작하여 배뇨근과다반사에 관여하는 신경펩티드인 calcitonin gene-related peptide (CGRP)와 substance P (SP)의 고갈에 의해 나타난다.¹⁴ 또한 Taylor 등은 capsaicin이 감각신경의 축삭이동을 차단하고, NGF 주입으로 capsaicin의 축삭수송 차단을 막을 수 있었다고 하였다.¹⁵ 또 최근 Chuang 등⁴은 C 섬유를 탈감작시키기 위해 capsaicin을 전처리하고 방광내 NGF를 주입하였을 때 NGF 주입으로 발생하는 배뇨근과다반사가 지속되는 것을 관찰하여 NGF가 배뇨근과다반사에 관여하는 경로는 말미집 Aδ 섬유가 중요한 역할을 한다고 주장하였다.

본 실험에서 반복적인 capsaicin 처치를 시행한 척수절단 6주째의 방광에서 NGF는 capsaicin 처치를 하지 않은 군과 비교할 때 유의하

게 감소하였다. 하지만 척수절단 4일째의 NGF mRNA 발현 또한 capsaicin 처치를 하지 않은 군과 비교할 때 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 capsaicin에 의한 감각신경의 축삭수송 봉쇄라는 기전만으로는 해석할 수 없는 부분이다. Capsaicin의 효과가 감각신경의 봉쇄에 의한 것이라면 비후된 배뇨근에서 생성되는 NGF mRNA는 여전히 증가상태에 있을 것으로 생각되기 때문이다. 또한 NGF의 역방향 축삭수송에 말이집 Aδ신경섬유가 관여하는지 capsaicin 민감 C 섬유가 관여하는지에 관한 설명으로도 해석하기 어렵다. 추정해 볼 수 있는 기전으로는 capsaicin이 직접적으로 NGF의 생성을 억제하는 것이다. 기존의 연구에 의하면 오히려 후근신경절에서 NGF는 vanilloid receptor의 발현을 증가시킨다.¹⁶ 또한 흰쥐의 뒷발에 capsaicin을 주사한 후 NGF를 반복적으로 주사하면 후근신경절에서 capsaicin에 의해 유도된 CGRP mRNA의 감소가 회복된다.¹⁷ 이것은 capsaicin에 의해 발생한 감각신경의 변성을 NGF가 재생시킨 것으로 설명되고 있으나 capsaicin이 표적장기의 NGF mRNA에 미치는 영향에 관한 연구는 전무한 상태이므로 표적장기에서 capsaicin에 의해서 억제된 NGF를 보충하여 준 결과로 해석할 수도 있다. 보다 설득력 있는 두 번째 추정은 척수절단 전에 주사한 capsaicin이 배뇨근-요도괄약근 실조를 약화시켜 표적장기인 방광에서 NGF의 생성이 감소한 것으로 설명할 수 있다. 즉 말초장기인 방광에서 capsaicin에 의한 NGF 생성 감소는 방광의 기능호전에 의한 이차적인 결과로 보는 것이 타당하다. 방광에서 capsaicin이 NGF mRNA 생성을 직접 억제하는지를 검증하기 위해서는 근위부 요도의 기계적 폐쇄 모델에서 NGF mRNA의 변화에 대한 연구가 필요하다. 본 실험의 결과로 방광에서 NGF의 역방향 축삭수송이 말이집 Aδ신경섬유를 통해 수송되는지, capsaicin 민감 C 섬유를 통해 수송되는 지는 확인할 수 없다. 따라서 NGF가 어떤 감각신경을 통해 수송되는지를 capsaicin을 이용하여 연구한 기존결과의 해석에 있어서 capsaicin이

직접 NGF 생성을 억제하는 지에 관한 결과가 확인이 되기 전에는 세심한 주의를 요한다.

이상의 결과로 척수절단 후 방광에서 NGF 단백질과 NGF mRNA의 변화를 살펴봄으로써 NGF가 신경세포 항성성에 관여함과 표적기관인 방광에서의 NGF가 역방향 축삭수송을 통해 척수배뇨반사에 관여함을 추정할 수 있었다. 하지만 척수절단 흰쥐에서 NGF가 배뇨근과다반사에 직접적으로 관여함을 확인하기 위해서는 NGF 길항제를 사용하여 배뇨근과다반사의 소실을 확인하는 추가연구가 필요하고 NGF의 역방향 축삭수송을 확인하기 위해서는 후근신경절의 NGF의 축정을 동시에 시행함으로써 확인할 수 있을 것으로 생각한다.

V. 결 론

척수절단 흰쥐의 말초장기인 방광에서 신경세포 형성성에 관여하는 것으로 알려진 NGF 단백질과 NGF mRNA의 변화와 더불어 capsaicin이 NGF에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 급성 방광염 모델과는 달리 척수절단 모델의 방광에서 NGF는 척수절단 후 장기간 (6주) 경과한 후에 증가하였다.
2. 방광에서 NGF mRNA는 무반사상태인 척수절단 급성기에 증가하였고 시간이 경과하면서 감소하였다.
3. 척수절단 후 capsaicin의 반복적 투여로 척수절단 후 발생하는 비역제성 배뇨근수축과 NGF가 감소하였다.
4. 척수절단 급성기에 capsaicin의 전처치로 방광에서 NGF mRNA 생성이 차단되었다.

이상의 결과로 척수절단 후 방광에서 NGF 단백질과 NGF mRNA의 변화를 살펴봄으로써 NGF가 신경세포 형성성에 관여함을 확인할 수 있었고 표적기관인 방광에서 NGF가 역방향 축삭수송을 통해 배뇨반사에 관여함을 추정할 수 있었다. 또한 C 민말이집신경섬유의 탈감작을 통해 배뇨근과다반사를 봉쇄하는 것으로 알려진 capsaicin이 배뇨반사의 형성성에 관여하는 NGF mRNA 생성을 차단한다는 새로운 역할을 밝힐 수 있었다.

참고문헌

1. Dupont MC, Persson K, Spitsbergen J, Tuttle JB, Steers WD. The neuronal response to bladder outlet obstruction, a role for NGF. *Adv Exp Med Biol* 1995;385:41-54.
2. Steers WD, Creedon DJ, Tuttle JB. Immunity to nerve growth factor prevents afferent plasticity following urinary bladder hypertrophy. *J Urol* 1996;155:379-85.
3. Dmitrieva N, McMahon SB. Sensitisation of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* 1996;66:87-97.
4. Chuang YC, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. The role fo bladder afferent pathways in bladder hyperactivity induced by the intravesical administration of nerve growth factor. *J Urol* 2001;165:975-9.
5. Oddiah D, Anand P, McMahon SB, Rattray M. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNA in inflamed bladder. *Neuroreport* 1998;9:1455-8.
6. Vizzard MA. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. *Exp Neurol* 2000;161:273-84.
7. Steers WD, Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor in th urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *J Clin Invest* 1991;88:1709-15.
8. Kruse MN, Bray LA, de Groat WC. Influence of spinal cord injury on the morphology of bladder afferent and efferent neurons. *J Auton Nerv Syst* 1995;54:215-24.
9. Dmitrieva N, Shelton D, Rice AS, McMahon SB. The role of nerve growth factor in a model of visceral inflammation. *Neuroscience* 1997;78:449-59.
10. Christmas TJ. Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis. *Br J Urol*

1994;73:508–15.

11. **Steers WD, Ciambotti J, Etzel B, Erdman S, de Groat WC.** Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. *J Comp Neurol* 1991;310:401–10.

12. **Fitzgerald M.** Capsaicin and sensory neurons—a review. *Pain* 1983;15:109–30.

13. **de Groat WC, Kawatani M, Hisamitsu T, Cheng CL, Ma CP, Thor K et al.** Mechanisms underlying the recovery of urinary bladder function following spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 1990;30:71–8.

14. **Shaker HS, Tu LM, Kalfopoulos M, Hassouna M, Dion S, Elhilali M.** Hyperreflexia of the urinary bladder: possible role of the efferent function of the capsaicin sensitive primary afferents. *J Urol* 1998;160:2232–9.

15. **Taylor DC, Pierau FK, Szolcsanyi J.** Capsaicin-induced inhibition of axoplasmic transport is prevented by nerve growth factor. *Cell Tissue Res* 1985;240:569–73.

16. **Winston J, Toma H, Shenoy M, Pasricha PJ.** Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain* 2001;89:181–6.

17. **Schicho R, Donnerer J.** Nerve growth factor simulates synthesis of calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglion cells during sensory regeneration in capsaicin-treated rats. *Neurosci Res* 1999;35:183–7.

Abstract

Changes of Bladder Nerve Growth Factor (NGF) and Effects of Capsaicin on Bladder NGF in Spinalized Rat

Chang Hee Hong

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sang Won Han)

INTRODUCTION: NGF is responsible for the growth and maintenance of sympathetic and sensory neurons. However, the past emphasis on NGF in mediating the neuronal plasticity was associated with urethral obstruction and cystitis. This study investigated the role of NGF in the mechanism underlying the neuronal plasticity and the effect of capsaicin on bladder NGF in the spinalized rats.

MATERIALS AND METHODS; Thirty Sprague-Dawley rats were divided into normal controls (n=5); capsaicin treated normal rats (n=5), spinalized rats (n=10), capsaicin treated spinalized rats (n=10). Spinalized rats were subdivided into rats with acute SCI (4 days, n=5) and chronic SCI (6 weeks, n=5). In chronic SCI, capsaicin injection was repeated for ablation of unmyelinated C fiber. The bladder NGF was measured by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) and the NGF mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS; The bladder NGF following acute SCI was significantly lower compared to the controls. However, the bladder NGF increased significantly following SCI for longer periods of time (6 weeks). Rats with acute SCI exhibited the largest increase in NGF mRNA levels. But, the NGF mRNA in chronic SCI was significantly lower compared to the rat with acute SCI. The repeated capsaicin injection decreased the amplitude of detrusor contraction and bladder NGF in rats with

chronic SCI. The capsaicin injection before SCI also decreased the NGF mRNA in rats with acute SCI (4 days).

CONCLUSION; These study suggest that significant alterations of NGF mRNA and NGF following SCI are likely to mediate bladder afferent neuron plasticity. Discrepancies between NGF mRNA and NGF in bladder may reflect retrograde axonal transport of NGF to the dorsal root ganglia and retrogradely transported NGF may play a role in reorganization of the micturition reflex. Also decrease in NGF mRNA levels after capsaicin treatment suggest the possibility that capsaicin effect on detrusor is associated with alteration of bladder NGF.

Key Words : spianl cord injury, nerve growth factor, capsaicin