

Substance P Antagonist, [D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]- Substance P가 백서의 FCA 주입 후 유발된 기계적 통각과민에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 마취과학교실, †해부학교실
*연세대학교 의과대학 생리학교실

김민경 · 최 윤 · 공현석 · 임중우* · 양현철
정수진 · 황승준† · 황재현

= Abstract =

Effects of Substance P Antagonist, [D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]- Substance P on the Mechanical Hyperalgesia of Inflammation Induced by Freund's Complete Adjuvant in Rat Paw

Min Kyung Kim, M.S., Yoon Choi, M.D., Hyun Seok Kong, B.S.
Joong Woo Leem, Ph.D.*, Hyun Cheol Yang, M.D., Soo Jin Chung, M.D.
Seung Jun Hwang, M.D.†, and Jai Hyun Hwang, M.D.

Departments of Anesthesiology, †Anatomy, University of Ulsan College of Medicine, Seoul;
*Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The effect of substance P (SP) on the hyperalgesia induced by inflammation is controversial, and as SP remains in the periphery just for a short period of time after release from the nerve ending, the contribution of SP on the development of sustained mechanical hyperalgesia in rats with inflammation is questionable. The purpose of this experiment is to evaluate the effect of SP on the development of mechanical hyperalgesia induced by Freund's complete adjuvant (FCA) using SP antagonist [D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]-substance P (SPA).

Methods: Male Sprague Dawley rats were divided into four groups; control (normal saline) and three different doses of SPA (0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g/0.1 ml). Inflammation was induced in rats by injecting 0.15 ml of FCA intraplantarly. Rats showed typical hyperalgesia within 12 hours after injection and maintained it for about one week. To test the effect of SPA on the development of inflammation, either SPA or saline was injected at 1 h before and at the time of FCA injection under light halothane anesthesia after a baseline test. The effect of SPA on hyperalgesia was assessed by measuring mechanical hyperalgesia at 2, 6, 12, 24 hrs and 4 days after injection of the drug. To test the effect of SPA on fully developed inflammation, tests were done 2 days after injection of FCA. Mechanical hyperalgesias were assessed at 15, 30, 60, 90, 120 min after the drug injections.

논문접수일 : 1999년 10월 27일

책임저자 : 최 윤, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산대학교 의과대학 마취과학교실, 우편번호: 138-736

Tel: 2224-3868, Fax: 470-1363, E-mail: ychoi@www.amc.seoul.kr

이 논문은 1998년도 보건복지부 보건의료기술 연구개발과제(뇌의약학분야; 관리번호: HMP-98-N-2-0027)의 지원으로 일부 이루어졌음.

Results: SPA injected to suppress the initial SP spill over decreased the mechanical hyperalgesia in a dose dependent manner. SPA injected after the full development of inflammation also decreased mechanical hyperalgesia.

Conclusions: SP released at the initial phase of inflammation as well as SP released after the development of inflammation are all important for the maintainance of mechanical hyperalgesia. (Korean J Anesthesiol 2000; 38: 158~163)

Key Words: Animals: rat. Antagonist: substance P. Hyperalgesia: mechanical. Inflammation: Freund's complete adjuvant.

서 론

Substance P (SP)는 11개의 아미노산으로 이루어진 물질로, 여러 기관(타액선, 기관지, 이자, 신장, 방광, 전립선)과 신경계에 널리 분포하며,¹⁾ SP는 타액의 분비와 장의 운동, 근육과 지방조직에서의 혈관 이완작용, 인슐린 분비의 억제제로서의 역할 뿐만 아니라 신경전달물질로서 작용한다.²⁾ SP는 중추신경계에서 여러 생리학적 기능을 하는 신경에서 발견되며, 말초신경계에서 C-fiber의 중추와 말초돌기에서 모두 발견된다.¹⁾ SP는 C-fiber의 중추말단에서 신경전달물질로 작용한다고 생각되고 있지만³⁾ 여기에서 합성된 SP의 90% 이상은 신경말단으로 이동됨이 알려졌다.⁴⁾ 또한 이 뉴런에 생리학적 또는 전기적으로 자극을 주면 SP가 신경말단으로 분비된다는 보고도 있다.⁵⁾

한편 SP를 국부에 주입하면 혈관이완과 혈관의 투과성이 증가되고, 급성 염증에서 발견되는 조직의 변화가 수반되는데, 이러한 변화는 SP가 단핵구와 중성구를 자극하여 염증의 매개물질을 분비하게 하여 나타나는 결과임이 확인되었다.^{6,8)} 또한 류마티즘 관절염 환자의 혈액에 SP가 nM 정도의 농도로 존재한다는 것이 알려졌으며, 보조제로 관절염을 유발시킨 쥐에서 신경내의 SP가 관절염의 발생에 직접적인 역할을 한다는 보고도 있다.^{9,10)} 또한 SP가 분비되면 nitric oxide synthase (NOS)가 활성화되어 NO를 생성하고, 생성된 NO는 SP의 분비를 촉진시키는 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 염증 부위에서 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달체계 및 염증세포기능 등 여러 가지 생리현상에 관여하는데¹²⁾ 최근에는 NO가 통각에도 관여할 수 있음이 밝혀졌다.^{13,16)}

약리학적, 전기생리학적 연구에 의해 SP가 통증의 매개자로서 역할을 한다고 알려져 있으나¹¹⁾ 통각의 발생에 SP가 말초에서 어떤 작용을 하는지는 일지된 견해를 보이고 있지 못하다.

본 연구는 Freund's Complete Adjuvant (FCA)를 주입하여 염증을 유발시킨 쥐에서 나타나는 통각반응에 SP가 관여하는지를 알기 위해 SP 억제제인 substance P antagonist (SPA) ([D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]-substance P)을 이용하여 연구하고자 시행하였다.

대상 및 방법

실험 동물로는 실험실 도착시 6-8주령(200-250g) 수능 백서(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 실험에 사용될 백서는 검사 시작 1주일 전에 사육실에 도착하여 새 환경에 적응하게 하였으며, 12시간(오전 6시-오후 6시)의 광주기성을 유지시켰다. 쥐들은 실험에 들어가기 1주일 전에 본 실험과 동일한 행동학적 검사를 3번 이상 실행하여 미리 실험 상황에 익숙하게 만들었다.

염증 유발 시약으로는 FCA (Sigma Chemical Co., USA)를 이용하였다. 혼련시킨 백서를 30분간 실험실 환경에 적응시킨 후 2% halothane-O₂로 마취하여 쥐의 righting reflex가 소실되는 즉시 오른쪽 뒷발바닥 중간부분에 0.15 ml를 26 G tuberculin syringe를 이용하여 주입한 후 쥐가 마취에서 자연적으로 깨게 하였다. 이런 경우 쥐들은 대개 5분 이내에 완전한 회복을 보였다.

기계적 자극에 대한 통각과민을 측정하기 위하여, 쥐의 크기에 맞게 준비된 억제제를 준비하였다. 억제제는 적당한 크기의 실내화에 쥐의 발이 빠져나올 수 있도록 1 × 4 cm 크기의 구멍을 내어 만들었다.

기계적 자극에 대한 통각과민은 automated Randall-Sellitto algesiometer (Ugo Basile, Italy)를 이용하여 회피 역치를 측정하였는데 이 기계와 함께 제공된 자극용 probe는 끝이 뾰족하여 염증발생후 부종이 생긴 발에 적용시켰을 때 염증초반에는 손으로 눌렀을 때 아파하는 쥐들에게서도 높은 회피역치를 보여서 좀더 넓은 자극 장치가 필요한 것으로 판정되어 지름 0.8 cm 정도의 반구형으로 제작하여 측정에 이용하여 본 결과 염증초기에도 일정하게 통각과민을 측정할 수 있어 실험에 계속 이용하도록 하였다. 쥐의 발의 네 곳의 일정한 부위를 정하여 1) 발등, 2) 5번째 중족골 말단 (distal metatarsal), 3) 3-4번째 중족골 말단, 4) 2번째 중족골 말단 부위를 자극한후 쥐가 회피반응을 보일 때의 기계상에 표시된 수치를 당시의 회피 역치로 삼았으며, 1회의 시행에서 양발을 번갈아서 시행하였으며 양발에서 4곳씩의 자극이 끝난후 4회의 회피역치의 평균값을 그 측정시의 해당 발의 회피역치 값으로 삼았다. 측정 방법에 약간의 변형이 있었으므로 측정 환경에서의 기계적 통각과민의 시간에 따른 변화를 재확인하는 것이 필요하므로 FCA주입후 6시간, 1, 2, 3, 4, 7일, 2주, 4주후에 각각 기계적 통각과민의 정도를 측정하였다. 기계적 자극에 대한 회피 역치는 주입 전의 역치값을 기저치로 삼고 FCA주입후 측정치를 기저치에 대한 비율로 표시하였다.

백서 발바닥에 FCA를 주입후 생기는 통각 과민 반응에 substance P가 작용하는지 알아보기 위하여 antagonist를 주입한 후의 통각과민의 변화를 측정하였다. 먼저 정상 쥐의 기계적 통각과민을 측정하여 기저값으로 삼은 다음 마취한 상태에서 SPA (Sigma Chemical Co., USA)를 용량을 다르게 하여(0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g/0.1 ml) 1시간 간격으로 2회 오른쪽 뒷발의 발등과 발바닥에 각각 0.1 ml씩 주입한 쥐에 FCA를 0.15 ml 주입 후 2, 6, 12, 24시간 후와 4일 후 통각을 측정하였으며, 대조군은 생리식염수를 0.1 ml씩 주입한 후 FCA를 주입하여 측정하였다. 이때 약물 주입과 측정은 실험자가 결과에 대한 영향을 주지 않도록 맹검적으로 실시하였다.

염증 유발된 조직에 SP가 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 억제제를 염증 유발 조직에 주입하였다. 염증발생후 기계적 통각과민의 시간에 따른 변화를 알아 본 선행 실험을 통하여 염증유도 2일에

가정 통각과민이 심한 것으로 나타났으므로, FCA 주입 2일후 기계적 자극에 대한 회피 역치를 측정하여 기저치로 삼고, SPA를 용량을 달리하여(0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g/0.1 ml) 염증 유발 부위의 발등과 발바닥에 각각 0.1 ml씩 주사한 후 15, 30, 60, 90, 120분후 통각을 측정하였으며, 대조군은 생리식염수를 0.1 ml씩 주입하여 측정하였다. 이때 약물 주입과 측정은 실험자가 결과에 대한 영향을 주지 않도록 역시 맹검적으로 실시하였다.

약물 처리한 군들간의 비교는 분산 분석후 Duncan의 다중 비교법을 이용하였고, 정상 쥐들의 비교는 unpaired t-test를 이용하였으며, P 값이 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 간주하였다. 모든 data는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

결 과

FCA를 주입한지 12시간 안에 발바닥에 부종과 발적이 관찰되었으며, 주사한 발바닥이 주사하지 않은 반대쪽 발바닥보다 부피가 증가하였다.

FCA주입 후 기계적 자극에 대한 회피역치는 6시간과 24시간 후 기저치에 비해 각각 $78.9 \pm 6.8\%$,

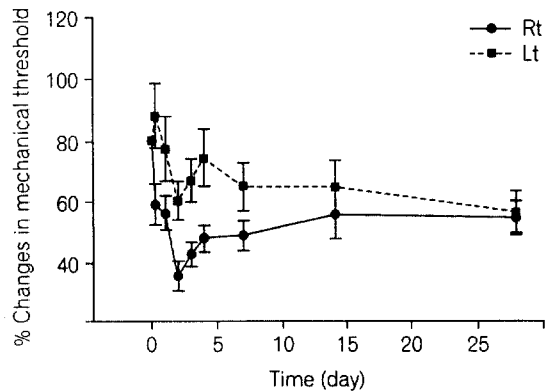


Fig. 1. Time course of mechanical hyperalgesia after Freund's complete adjuvant (FCA) injection into the hindpaw of rats. FCA was injected intraplantarly (0.15 ml) in right hindpaw (n = 10). Paw withdrawal thresholds to measure mechanical hyperalgesia were measured using Randall-Sellitto test at 6 hours, and 1, 2, 3, 4, 7, 14 days, and 4 weeks after injection. Data are presented as '% changes in paw withdrawal threshold' of each paw, and baseline data was measured just prior to FCA injection.

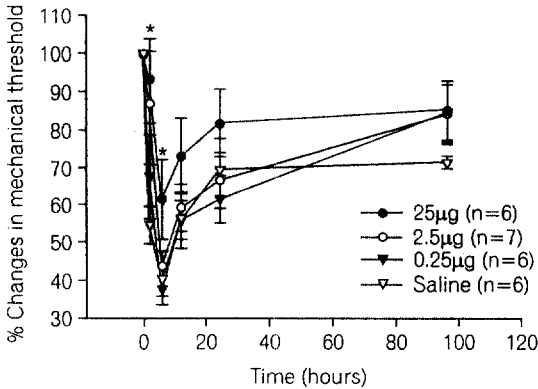


Fig. 2. Twenty five rats were divided into four groups. Rats in control group received normal saline (0.1 ml) intraplantarly. Three different doses of SPA were injected to remaining three groups (0.25 µg, 2.5 µg, 25 µg/0.1 ml) intraplantarly. Each paw pretreated with SPA 1 h before, just before FCA injection, after the measurement of baseline data. Data are presented as ‘% changes in paw withdrawal threshold’ of each paw. Mechanical hyperalgesias were measured at 2, 6, 12, 24, 96 hours after FCA injection. *: significantly different from N/S group (P < 0.05).

75.9 ± 5.6%였고 2일 후에는 55.3 ± 5.0%로 역치값이 가장 낮았으며, 3, 4, 7, 14일 후에는 각각 62.5 ± 3.9%, 67.6 ± 4.4%, 68.8 ± 4.9%였으며, 4주 후에는 74.5 ± 5.5%로 통각 과민 반응이 시간이 갈수록 따라 역치값이 높아졌으나 실험 4주 동안 통증이 완전히 없어지지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 1).

SPA를 전처치한 경우, 가장 높은 농도인 25 µg/0.1 ml를 주사한 군은 FCA주입 2, 6, 12, 24, 96시간 후 각각 92.9 ± 11.1%, 61.4 ± 10.8%, 73.1 ± 9.9%, 81.8 ± 8.9%, 85.3 ± 7.8%로 대조군 54.6 ± 5.1%, 40.1 ± 4.3%, 56.0 ± 5.2%, 69.4 ± 8.3%, 71.6 ± 1.8%에 비해 모든 시간대에서 기계적 자극에 대한 회피 역치가 증가하였고, 2, 6시간에서는 유의한 차이를 나타내었다(P < 0.05). 2.5 µg/0.1 ml를 투여한 군은 FCA 투입 2, 6, 12, 24, 96시간 후 각각 85.8 ± 14.9%, 43.3 ± 4.3%, 59.1 ± 6.1%, 66.5 ± 7.4%, 84.4 ± 7.6%로 대조군에 비해 역치값이 증가하였으나 유의한 차이는 없었다. 또한 0.25 µg/0.1 ml를 주입한 군은 2, 6, 12, 24, 96시간 후 각각 67.3 ± 11.0%, 37.5 ± 3.8%, 55.6 ± 7.3%, 61.6 ± 6.4%, 84.7 ± 8.3%로 대조군과 유의한 차이가 없었다

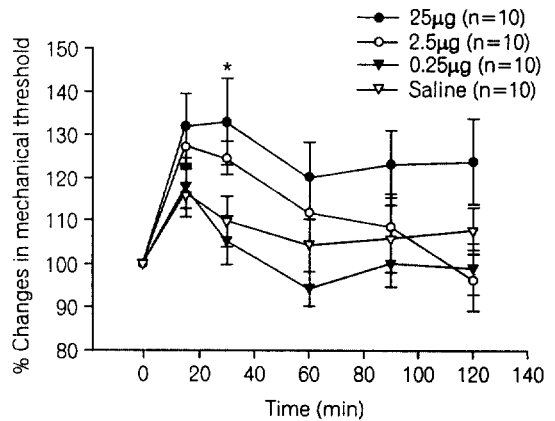


Fig. 3. Effect of substance P antagonist (SPA) on the FCA induced hyperalgesia was investigated. Experiments were performed 2 days after the injection on FCA, during which time degree of mechanical hyperalgesia was at its peak. Forty rats were divided into four groups. Rats in control group received normal saline (0.1 ml) intraplantarly. Three different doses of SPA were injected to remaining three groups (0.25 µg, 2.5 µg, 25 µg/0.1 ml) intraplantarly. Drugs were given after the measurement of baseline data. Data are presented as ‘% changes in paw withdrawal threshold’ of each paw. Mechanical hyperalgesias were measured at 15, 30, 60, 90, 120 min after injection. *: significantly different from N/S group (P < 0.05).

(Fig. 2).

염증유발 후 주입된 SPA가 염증 유발 통증에 미치는 영향을 보면, SPA 25 µg/0.1 ml를 투여한 군은 15, 30, 60, 90, 120분 후 각각 132.1 ± 7.3%, 133.0 ± 9.8%, 120.1 ± 7.9%, 123.3 ± 7.9%, 123.9 ± 10.1%로 대조군 116.6 ± 5.9%, 109.9 ± 5.8%, 104.3 ± 6.0%, 105.8 ± 7.9%, 107.8 ± 5.3%에 비해 모든 시간대에서 역치값이 증가하였고, 30분에는 유의한 차이를 나타내었다(P < 0.05). 2.5 µg/0.1 ml를 투여한 군은 각각 127.3 ± 5.3%, 124.6 ± 3.9%, 111.9 ± 7.5%, 108.6 ± 7.8%, 96.3 ± 6.8%로 대조군에 비해 역치값이 증가하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다. 0.25 µg/0.1 ml를 투여한 군은 117.9 ± 5.1%, 105.2 ± 5.6%, 94.3 ± 3.9%, 100.2 ± 5.4%, 98.9 ± 5.7%로 모든 시간대에서 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

고 찰

본 연구를 통하여 염증유발 전과 후에 투여된 SPA가 염증성 통증을 용량의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다.

염증은 상처나 자극에 대한 살아있는 조직의 반응으로 발적, 부종, 발열, 통증 등으로 나타난다.¹⁷⁾ 염증이 생기면 중성구의 침윤, 혈액삼출, histamine, bradykinin, prostaglandin E₂ (PGE₂) 등이 유리된다고 보고되었다.^{12,18,19)}

염증성 통증 연구를 위해 여러 종류의 염증유발 물질을 피하여 주입하여 통증을 유발시킨 동물 모델을 만들었는데 특히 FCA는 formalin, carageenin, mustard oil 등과 같은 염증 유발 물질에 비해 주입 부위에 주로 한정되어 발적, 부종, 통각과민 등의 염증 반응이 유발되는 특징이 있다. 또한 FCA를 쥐 발바닥에 주입할 시 염증반응에 수반하여 통각행동이 유도되며 이 염증성 통증행동은 장기적으로 지속됨이 관찰되었다.²⁰⁾ 이러한 모델 쥐에서 관찰된 통증행동의 유도 및 진전 상황은 염증질환성 만성통증 환자의 경우와 흡사한데, 이는 FCA에 의한 염증모델이 다른 염증모델에 비하여 만성 염증성 통증의 유발 기전을 연구하는데 있어서 특히 좋은 모델임을 시사한다.

SP는 여러 기관과 신경계에서 발견되는 11개의 아미노산으로 이루어진 물질로,¹⁾ 여러 가지 경로로 염증반응에 영향을 줄 가능성이 있다. 최근 보조제로 관절염을 유발시킨 쥐에서 신경내의 SP가 관절염 발생에 영향을 준다는 보고가 있었다.^{9,10)} 즉, 염증이 유발된 관절에 분포하는 말초 신경에서 SP의 농도가 증가했으며, SP를 관절강에 주입시 관절염의 정도가 증가하였고, SP antagonist를 주입하였을 때 염증의 정도가 감소하였다.¹⁰⁾ 또한 in vitro 연구에 의하면 류마티즘 관절염 환자의 활막세포(synoviocyte)에 SP를 주입했을 시 PGE₂의 생성을 자극시켰으며, SP antagonist에 의해 PGE₂ 생성이 감소되었다는 결과도 보고되었다.²¹⁾

약리학적, 전기생리학적 연구에 의해 SP가 통증의 매개자로서 역할을 한다고 알려져 있다.¹¹⁾ 실제로 Matsumura 등의 실험에서 SP를 척수내로 주입하여 기계적 통각과민을 측정하였을 시 용량 의존적으로

과민반응을 나타내었다.²²⁾ 또한 Okano 등의 실험에서도 FCA로 염증을 유발시킨 쥐에 NK1 억제제 주입 시 과민반응을 용량 의존적으로 억제함을 보였다.²³⁾ 그러나 Oehme 등의 실험에서 SP 주입 후 hot plate test 시 높은 농도에서는 진통효과를 나타내었으나, 낮은 농도에서는 과민반응을 나타내는 등²⁴⁾ 통각의 발생에 SP가 어떤 작용을 하는지는 명확히 알려져 있지 않다.

본 실험은 FCA에 의해 염증이 유발된 조직에 SPA의 말초 주입이 기계적 통각과민에 미치는 효과를 알아보고자 시행되었다. 실험에 사용된([D-Arg, D-Phe, D-Trp, Leu]-substance P)는 SP를 포함한 다른 신경펩타이드(neuropeptide)의 작용을 억제한다.²⁵⁾ 말초에서의 SP가 통각반응에 미치는 영향에 대하여는 대하여는 논란이 많을 뿐 아니라, 일단 말초에 분비된 SP는 염증조직의 내피세포에 있는 neurokinin type 1 (NK1) 수용체와 결합한 후 빠른 시간 내에 internalization되어 세포 표면의 NK1 수용체의 수를 감소시키므로²⁶⁾ 과연 SP가 말초에서 통각에 관여하는지, 염증 유도기에 분비된 SP가 통각의 유지에 관여하는지, 염증발생 후에 분비된 SPA가 통각의 유지에 중요한 작용을 하는지에 대하여 알아보는 것은 SP가 염증성통증에 미치는 영향을 체계적으로 알아보는 데 중요하다.

SPA 전처치 후 염증을 유발한 경우와 염증이 유발된 조직에 SPA를 투여한 후 통각을 측정하여 본 결과 두 경우 모두에서 용량 의존적으로 염증성 통증을 감소시키므로 SP는 염증 유도시에 작용하여 염증성 통증을 유지시키고 염증유도 후에도 계속 분비되어 통증을 유발시킴을 알 수 있었다. 본 실험에서 고농도(25 µg/0.1 ml)의 SPA 주입시 통각 측정 초기에만 대조군에 비해 유의한 차이를 보였는데 실험군의 수를 증가시키면 통각 측정 전기간 동안 유의한 차이를 나타낼 것이라 사료된다. 그러나 국소 마취 작용과 같은 SPA의 감각신경에 대한 비특이적인 작용 가능성과 같이 통증이나 과민반응과 관계없이도 진통효과가 있을 수 있으므로 보완 연구를 통하여 본 실험의 결과를 확인할 필요성은 있다.

이상의 결과로부터 FCA로 염증을 유발시킨 조직에 SP 억제제인 SPA를 염증유발 전과 후에 주입했을 경우 모두 통각과민 반응을 억제함을 보였는바 SP는 염증유발 전과 후의 통각과민 발현 및 유지에

중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Hokfelt T, Johansson O, Ljungahl A, Schultzberg M: Peptidergic neurons. *Nature* 1980; 285: 515-21.
2. Masson C: Substance P. *Nouv Presse Med* 1991; 10: 1721-2.
3. Leeman S, Gamse R: Substance P in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2: 119.
4. Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, Hokfelt T, Nilsson G: Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig brain. *Brain Res* 1980; 191: 443-57.
5. Olgart L, Gazelius B, Brodin E, Nilsson G: Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand* 1977; 101: 510-2.
6. Pernow B: Substance P. *Pharmacol Rev* 1983; 5: 85-121.
7. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by pharmacological agents. *Br J Pharmacol* 1967; 31: 138-51.
8. Roch-Areiller M, Regoli D, Chanaud B, Lenoir M, Muntaner O, Stralzko S, et al: Tachykinins: Effects on motility and metabolism of rat polymorphonuclear leucocytes. *Pharmacology* 1986; 33: 266-73.
9. Marshall KW, Chiu B, Inman RD: Substance P and arthritis: analysis of plasma synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 87-90.
10. Levine J, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz M, Basbaum A: Intraneural substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226: 547-9.
11. Urban MO, Gebhart GF: Central mechanisms in pain. *Med Clin North Am* 1999; 83: 585-96.
12. Brecht DS, Snyder SH: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
13. Duarte IDG, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Peripheral analgesia and activation of nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1990; 186: 289-93.
14. Ferreira SH, Duarte IDG, Lorenzetti BB: The molecular mechanism of peripheral morphine analgesia: stimulation of cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 1991; 201: 121-2.
15. Duarte IDG, Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992; 217: 225-7.
16. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M: Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31: 251-8.
17. Higgs GA, Moncada S, Vane JR: Eicosanoids in inflammation. *Ann Clin Res* 1984; 16: 287-99.
18. Stefanovic-racic M, Stidler J, Evans CH: Nitric oxide and arthritis. *Arthritis and Rheum* 1993; 36: 1036-44.
19. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
20. Stein C, Millan MJ, Herz A: Unilateral inflammation of the hind paw in rats model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharm Biochem & Behav* 1988; 31: 445-51.
21. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH: Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: Neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987; 235: 893-5.
22. Matsumura H, Sakurada T, Hara A, Sakurada S, Kishara K: Characterization of the hyperalgesic effect induced by intrathecal injection of substance P. *Neuropharmacology* 1985; 24: 421-6.
23. Okano K, Kuraishi Y, Satoh M: Involvement of spinal substance P and excitatory amino acids in inflammatory hyperalgesia in rats. *Jpn J Pharmacol* 1998; 76: 15-22.
24. Oehme P, Hilse H, Morgenstern E, Gores E: Substance P: does it produce analgesia or hyperalgesia? *Science* 1980; 18: 305-7.
25. Jones DA, Cummings J, Laugdon SD, Maclellan AJ, Higgins T, Rozengurt E, et al: Metabolism of the broad-spectrum neuropeptide growth factor antagonist: [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7, 9-Leu11]- substance P. *Br J Cancer* 1996; 73: 715-20.
26. Bowden JJ, Garland AM, Baluk P, Lefevre P, Grady EF, Vigna SR, et al: Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 8964-8.