

신생흰쥐에 투여한 capsaicin이 장신경계의 calcitonin gene-related peptide(CGRP) 함유신경세포에 미치는 영향

박경아, 이종은, 박승화,* 강유선,** 이원택

연세대학교 의과대학 해부학교실, 이과대학 생화학교실** 아주대학교 의과대학 해부학교실*

〈 초 록 〉

Capsaicin을 동물에 투여하였을 때 장신경계에는 영향을 주지 않는다고 알려져 있었으나 아래와 같은 실험을 수행하여 반대의 결과를 얻었다. Capsaicin을 생후 2일과 4일의 흰쥐에 주사한 후 10주 및 6개월 후에 소장을 각부위별로 적출하여 총분리표본을 제작하여 항 CGRP 항체에 대하여 면역조직화학염색을 수행하였다. 전자현미경관찰도 아울러 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1) CGRP 양성세포의 분포는 장의 각부위에 따라 차이가 있어서 회장이 가장 복잡하고 치밀하게 분포하고 있었다. 2) capsaicin 투여 후 CGRP에 대한 면역반응성은 10주 후에는 별 변화가 없었으나 6개월 후 크게 감소하였다. 3) 전자현미경관찰에 있어서도 축삭들이 팽대되고 미토콘드리아 같은 세포소기관이 파괴되는 등의 심한 퇴행현상을 관찰할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : capsaicin, 장신경계, Calcitonin Gene-Related Peptide, 말초축삭

서 론

Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)은 고추의 매운 맛을 내는 주성분으로 잘 알려져 있는 화합물이다. Capsaicin에 대한 연구는 1940년 N. Jancso에 의해 이루어진 이래 많은 보고가 있어, 심장혈관계통(Makara 등, 1967; Longhurst 등, 1980), 호흡기계통(Makara 등, 1967; Molnar와 Gyorgy, 1967; Coleridge와 Coleridge, 1977), 소화기계통(Napanitaya, 1973; 1974; Limlomwongse 등, 1979) 및 신경계통(Jancso 등, 1977; Virus와 Gebhart, 1979) 등 생체의 여러 부분에 있어서 다양한 변화를 일으킨다는 사실이 알려져 있다.

Capsaicin은 피부에 주사하였을 때, 통증을 수반하는 염증 반응을 일으키고, 피부의 화학적 자극에 대해 전반적인 탈감작(desensitization)을 일으키는 것으로 보고되어 있다(Jancso와 Jancso-Gabor, 1959; Szolcsanyi 등, 1975). 특히 이 화합물은 신생동물에 투여하였을 때에 강한 신경독성을 나타낸다는 것이 잘 알려져 있다. 신생흰쥐에 capsaicin을 투여하면, 무수초신경섬유와 직경이 작은 수초신경섬유가 선택적으로 다수 변성되어 소실된다고 한다(Jancso 등, 1977; 1980; Lawson과 Nickels, 1980; Nagy 등, 1981). 그 밖에 밝혀진

흥미있는 사실은 이 물질이 척수의 뒤뿌에서 substance P의 감소를 초래하는 등(Jessel 등, 1978), 신경전달물질(neurotransmitter)에 변화를 가져온다는 것이다.

신경계통의 정보전달의 기본이 되는 물질인 신경전달물질을 면역조직화학적 방법으로 염색할 수 있게 된 이후(Hó kfelt 등, 1975), 여러 연구자들은 이를 이용하여 신경계통의 복잡한 구성을 이해하려고 노력해 왔다. Capsaicin의 substance P에 대한 작용은 신경계통의 여러 부위에 걸쳐 많은 연구가 이루어졌으며(Jessel 등, 1978; Gamse 등, 1980; Nagy 등, 1980), 최근 들어서는 다른 신경전달물질들에 대한 연구가 진행되어 신생동물에 capsaicin을 투여하였을 때 척수뒤뿌에서 vasoactive intestinal polypeptide(VIP), somatostatin, cholecystokinin(CCK) 같은 신경펩타이드의 감소가 일어난다는 것이 보고된 바 있다(Jancso 등, 1981).

Calcitonin gene-related peptide(CGRP)는 calcitonin과 같은 유전자에서 alternative RNA processing에 의해 발현되는 37개의 아미노산으로 이루어진 신경전달물질(Amara 등, 1982)로 중추신경계통 및 말초신경계통에 널리 분포하고 있으며, 특히 척수에서는 뒤뿌의 lamina I, II에 있는 무수초신경섬유와 직경이 작은 수초신경섬유에서 발견된다(Gibson 등, 1984; Skofitsch와 Jacobowitz, 1985; Chung 등, 1988). CGRP는 통증을 전달하는 무수초신경섬유(C섬유)와 작은 수초신경섬유(A δ 섬유)에만 있다고 알려져 있으며(Gibson 등,

본 연구의 일부는 1993년도 연세대학교 의과대학 조교연구비로 이루어졌음.

1984) 척수뒤뿌에 있는 유일한 일차구심성 신경전달물질이라고 보고되어 있다(Chung 등, 1988). 또한 통각에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 같은 신경원 내에서 발견되는 것으로 보아 통각의 전도에 중요한 역할을 담당할 것이라고 추측되고 있어서(Harmann 등, 1988) 최근들어 활발히 연구되고 있는 신경전달물질이다.

Capsaicin은 CGRP의 경우에 있어서도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 신생원쥐에 투여한 capsaicin이 척수뒤뿌 및 척수신경절의 CGRP 면역반응도를 감소시킨다고(Skofitsch와 Jacobowitz, 1985; Hammond와 Ruda, 1989) 알려져 있고, 그 밖에 말초신경계통의 감각신경원들에서 CGRP를 감소시킨다는(Skofitsch와 Jacobowitz, 1985; Geppetti 등, 1988) 보고들이 있다.

그동안 capsaicin은 장신경계에 별 영향을 주지 못하는 것으로 알려져 있었다(Holzer 등, 1980). 그러나 본 연구자들은 substance P에 대하여 이와 상반된 결과를 얻었기에(Lee 등, 1992), 장신경계에 존재하는 것으로 알려진(Furness 등, 1985; Mulderry 등, 1985) CGRP에 대하여는 capsaicin이 어떤 영향을 미치는 지 살펴보고자 신생원쥐에 capsaicin을 투여했을 때 장신경계의 CGRP 함유 신경세포에서의 변화를 면역조직화학염색 및 전자현미경을 통하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 2일된 Sprague-Dawley계 원쥐를 암수 구별없이, 면역조직화학염색, NADH-TR 조직화학염색, 전자현미경 표본제작을 위하여 각각 10마리, 10마리, 5마리씩 사용하였다.

2. 실험방법

가. Capsaicin 투여

Ethanol, Tween 80, saline을 1:1:8의 비율로 혼합한 용액에 capsaicin(Sigma사 제품)을 10mg/ml의 농도로 녹인 후, 50mg/kg을 생후 2일된 원쥐에 피하주사하였고, 생후 4일에 다시 동일량을 주사하였다. 대조군에는 capsaicin을 뺀 나머지 혼합액을 같은 양 주사하였다.

나. 총분리표본제작

근육층신경얼기를 관찰하기 위하여 총분리표본(whole mount preparation)을 제작하였다. 주사한지 10주와 6개월 후에 동물을 4% paraformaldehyde, 0.1M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 관류고정하였다. 십이지장, 공장, 회장을 일정부위에서 떼어낸 후 절개하여 펼쳐서 나무판에 핀으로 고정시키고 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 동안 후고정하였다(Stefanini 등, 1967). 이것을 80%, 90%, 100% ethanol에서 20분씩 탈수하고 자일렌으로 투명한 후 다시 100%, 80%, 50% ethanol에 20분간 두어 흡수하고 4°C

하에서 0.1M PBS용액에서 보관하였다. 해부현미경 하에서 점막층, 점막하층, 돌림근층을 제거하였고, 남은 근육층신경얼기와 세로근층에 대하여 항 CGRP 항체로 면역조직화학염색을 수행하였다.

다. 면역조직화학염색

일반적인 면역조직화학염색 과정을 통하여 수행하였다(Stemberger, 1986). 총분리표본에 일차항체로 CGRP에 대한 항체(Peninsula사 제품)를 가한 후, ABC kit(Vector사 제품)와 DAB(diaminobenzidine, Sigma사 제품)를 이용하여 발색하였다.

라. NADH-TR 반응 염색

근육층신경얼기의 모든 세포의 형태와 배열을 관찰하기 위하여 Gabella(1969) 방법에 따라 NADH-TR(nicotinamide dinucleotide-tetrazolium reductase) 효소 반응염색을 시행하였다. Capsaicin 투여 10주, 6개월 후 ether 마취 하에서 실험동물의 배를 열고 십이지장, 공장, 회장을 일정부위에서 떼어내었다. 장의 한쪽 끝을 실로 묶고 식염수를 채운 다음 나머지 한쪽도 묶어 영하 70°C에서 보관하였다. 48시간 후 실온에서 NADH-TR 반응용액에 담가 천천히 녹였다. NADH-TR 반응용액은 NBT(0.5mg/ml), 0.1M phosphate buffer(pH 7.5) 5ml, H₂O 10ml, NADH 10mg의 조성으로 이용 직전에 만들어 바로 사용하였다. 반응의 진행은 해부현미경으로 관찰하여, 염색이 충분히 되었다고 생각되면(20~60분 경과) 10% 중성 formalin 용액에 담가 고정시켰다. 24시간 이상 고정한 후 식염수로 씻고 적당한 크기로 자른 후 해부현미경 하에서 근육층을 분리하였다. Glycerine jelly로 mounting한 후 현미경으로 근육층신경얼기를 관찰하였다.

마. 전자현미경 표본제작

전자현미경 관찰을 위해서는 3% paraformaldehyde, 3% glutaraldehyde, 0.1% picric acid 용액으로 관류 고정하여, 십이지장, 공장, 회장을 적출하여 1% OsO₄ 용액에 후고정한 후, 일반적인 전자현미경 표본제작과정에 따라 epon에 포매하였다. 얇은 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 Hitachi-500, Philips CM-10 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

바. 관찰, 계측 및 분석

Capsaicin을 주사한 후 시기에 따라 장의 각부위에 대하여 근육층신경얼기의 CGRP 면역반응성과 전자현미경 소견을 정상대조군과 비교하여 관찰하였다.

NADH-TR 염색한 표본에서는 근육층신경얼기 세포의 수를 단위면적당 계측하여 비교하였고, 세포체의 크기를 영상분석기(영국 Analytical Measuring System사 제품)를 이용하여 계측하였다. 모든 실험결과를 SPSS package program을 이용하여 통계처리하였다.

결 과

신생 흰쥐에 capsaicin 투여 후 10주 및 6개월 후에 소장의 근육층신경절기에 CGRP에 대한 면역조직화학 염색과 NADH-TR 염색을 하여 대조군의 경우와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전자현미경 관찰은 투여 후 10주 경과 후의 것을 관찰하였다.

1. 면역조직화학 염색

대조군의 경우 CGRP함유 신경세포 및 신경섬유가 소장의 각 부위에서 모두 관찰되었다. 각 신경절에 많은 CGRP 양성 신경섬유가 관찰되었고 CGRP양성 신경세포도 한 두개씩 관찰되었다. CGRP양성 신경절 및 신경절사이 섬유는 분포는 회장의 경우가 가장 뚜렷했으며, 공장의 경우는 그 정도가 약했다(그림 4, 5, 6).

Capsaicin을 투여한 실험군의 경우, 10주군은 대조군에 비교하여 별변화가 없었으나(그림 1, 2, 3), 6개월군의 경우 십이지장과 공장의 경우 CGRP면역반응도가 크게 감소함을 보여주었다(그림 7, 8). 특이한 경우는 회장의 경우로 십이지장, 공장에 비해 감소정도가 낮았다(그림 9).

2. NADH-TR 반응염색

NADH-TR 반응염색을 수행하여 일반 신경세포의 분포상태를 관찰하였다. 세포의 수는 실험군 및 대조군에 있어서 $5.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 면적에서 계수하였다.

대조군의 경우, 십이지장은 1565개, 공장은 868개, 회장은 1250개, 실험군의 경우는 십이지장 1614개, 공장 839개, 회장 1126개로 통계적으로 큰차이는 발견할 수 없었다(표 1).

신경절 당 평균 세포의 수도 계수하였는데 대조군의 경우 십이지장 17.02개, 공장 13.94개, 회장 18.15개이었고, 실험군의 경우는 십이지장 17.45개, 공장 13.03개, 회장 18.83개로 큰 차이가 없었다(표 2).

세포의 크기 측정은 십이지장에서 400개의 신경세포에 대해 수행하였는데, 대조군의 경우 최대값은 $564.92 \mu\text{m}^2$, 최소값은 $51.36 \mu\text{m}^2$ 이고 평균면적은 $183.80 \mu\text{m}^2$ 이었다. Capsaicin 투여군의 경우는 최대값이 $560.50 \mu\text{m}^2$, 최소값은 $32.17 \mu\text{m}^2$, 평균 면적은 $143.90 \mu\text{m}^2$ 이었다. 평균면적을 비교해볼 때 capsaicin을 투여했을 때 의의있게 감소했음을 알 수 있었다. 세포의 직경도 의의있게 감소한 것으로 나타났다(표 3).

3. 전자현미경 관찰

전자현미경 관찰 결과를 살펴보면 대조군에 비교하여 볼 때 capsaicin 투여시 근육층신경절기의 말초신경섬유다발들은 팽대되고 내부구조도 무정형 상태를 나타내었다(그림 10, 11). 신경세포들도 대조군의 경우(그림 12)는 정상적인 세포소기관의 형태를 관찰할 수 있었으나 capsaicin 투여 시에는

세포소기관에서 dense body가 증가하고 미토콘드리아의 모양이 바뀌고 골지 복합체도 불규칙하게 배열하고 있었다. 또한 이웃한 신경섬유들도 팽대되고, 미세소관들이 소실된 것을 관찰할 수 있었다(그림 13).

Table 1. Number of neurons in myenteric plexus in control and capsaicin group.

	control	capsaicin
duodenum	1565	1614
jejunum	868	839
ileum	1250	1126

* measured area $5.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$

Table 2. Average number of neurons in one ganglia in myenteric plexus.

	control	capsaicin
duodenum	17.02	17.45
jejunum	13.94	13.03
ileum	18.15	18.83

* measured ganglia 60(control jejunum, 50)

Table 3. Diameter and area of neurons in myenteric plexus of duodenum.

	control		capsaicin	
	diameter(μm)	area(μm^2)	diameter(μm)	area(μm^2)
Max	26.82	564.92	26.71	560.50
Min	8.09	51.36	6.40	32.17
Mean	14.85	183.80	13.07*	143.90*
S.D.	3.67	93.11	3.52	81.30

* n=400, p < 0.01

고 찰

Capsaicin은 고추의 매운 맛을 내는 물질로 capsaicin을 생체에 투여하면 심장혈관계통, 호흡기계통, 소화기계통, 신경계통 등에 다양한 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Coleridge와 Coleridge, 1977; Limlomwongse 등, 1979; Longhurst 등, 1980). Capsaicin의 반응효과는 투여되는 양이나 동물의 발달정도에 따라 다르게 나타나며(Virus와 Gebhart, 1979; Jancso와 Kiraly, 1980; 1981), capsaicin을 신생흰쥐에 투여하였을 경우 신경독성물질로 작용하여 무수초신경섬유와 직경이 작은 수초신경섬유를 선택적으로 파괴시킨다 (Gamse 등, 1980; Jancso 등, 1980; Cervero와 McRitchie, 1981). Capsaicin을 신생동물에 투여하면 직경이 작은 척수신경절세포와 무수초 일차감각 신경섬유가 대부분 파괴되어 동물들은 더 이상 동통에 대해 적절하게 반응하지 못한다고 하며 (Fitzgerald, 1983; Buck와 Burks, 1986), Henry(1976) 및 Ha-

yes와 Tyers(1980)는 신생원주에 capsaicin을 투여한 후 척수의 뒤뿌에서 substance P가 감소하였음을 보고하여 capsaicin의 신경독성효과와 substance P가 관계가 있음을 발표하였다. 그 이후로 capsaicin에 대한 최근까지의 연구의 대부분은 capsaicin이 substance P와 같은 신경전달물질들에 대해 depletion 효과를 나타낸다는 것이었으며, 근간에 와서는 전체 혈관계의 변화(Furness 등, 1982)나, 각 장기내부의 신경열기의 변화(Chung 등, 1985; Hoyes와 Barber, 1981) 등 여러 부분에 걸쳐 capsaicin에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다.

Capsaicin의 반응효과는 조직에 따라 다르게 반응하는 것으로 알려져 있으며, 주로 일차구심성 감각세포에 영향을 주며(Jancso 등, 1977; Gamse 등, 1981), 중추신경계의 신경세포들이나(Buck 등, 1983), 자율신경세포(Della 등, 1983) 및 장신경계의 신경세포(Gamse 등, 1981; Furness 등, 1982; Gibbins 등, 1985; Harti, 1988)에는 별 영향을 주지 않는다고 하였다. 또한 자율신경섬유와 장신경계 신경섬유들도 capsaicin에 별 영향을 안 받는다고 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다(Szolcsanyi와 Bartho, 1978). Holzer 등(1980)과 Geppetti 등(1988)은 특히 장신경계에서 capsaicin 처리 후에도 substance P나 CGRP의 양에 변화가 없었다고 보고하였다.

Calcitonin gene-related peptide(CGRP)는 37개의 아미노산으로 이루어진 신경펩타이드(Amara 등, 1982)로 radioimmunoassay나 immunocytochemistry 등에 의해 그 분포가 최근 알려지고 있는데, 뇌나 척수같은 중추신경계통 외에도 호흡기계통 및 소화기계통 등 여러 조직에 다양하게 분포하고 있다(Gibson 등 1984; Gibbins 등, 1985; Franco-Cereceda 등, 1987). 특히 장의 CGRP는 근육층신경열기에 주로 존재한다는 것이 면역조직화학염색에 의해 밝혀졌다(Ohtani 등, 1989). CGRP의 생리적인 기능은 잘 알려져 있지 않으나 통증 전달하는 무수초신경섬유(C섬유)와 작은 수초신경섬유(A δ 섬유)에 존재하고 통각에 관여하는 신경전달물질인 substance P와 같은 신경원 내에서 발견되는 것으로 보아 통각의 전도에 중요한 역할을 담당할 것이라고 추측되고 있으며(Harmann 등, 1988) 그 분포가 아주 다양하여 각 조직마다 기능도 다양할 것으로 추측되고 있다. 장에서는 근육의 수축 및 이완(Tippins 등, 1984; Maton 등, 1986)에 관여할 것으로 생각되고 있고 또한 vasodilator로서의 기능(Brain 등, 1985)도 주장되고 있다. CGRP는 이런 다양한 신경전달물질, 신경조절물질로서의 기능때문에 최근들어 활발히 연구되고 있으며 본 실험에서도 장에 존재하는 CGRP에 capsaicin이 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

장의 층분리표본을 준비하여 CGRP에 대한 면역조직화학염색을 수행한 결과 대조군에서는 CGRP에 양성인 신경세포들을 뚜렷이 관찰할 수 있었으며 CGRP에 양성인 신경섬유들도 규칙적으로 network를 형성하고 있었다. 특히 회장의 경우는 가장 복잡한 구조를 하고 있었으며 밀도도 높았다.

그러나 실험군에서는 capsaicin 투여 6개월 후 소장의 모든 부위에서 신경섬유나 신경세포에서 CGRP의 depletion을 명백히 관찰할 수 있었다. 십이지장과 공장 CGRP 면역양성 섬유가 거의 사라졌고 회장에서도 면역반응이 감소했으나 감소정도가 다른 부위에 비해 작았다. 소화기계통에 대한 다른 연구자들의 연구는 capsaicin의 투여가 CGRP에 별 영향을 주지 못한다는 것이 지배적이었다(Holzer 등, 1980). 그러나 이것은 조직을 과쇄하여 생화학적인 방법으로 정량한 결과로 이런 차이가 어디에서 온 것인지는 확실하지 않다. 다만 그들의 결과는 capsaicin 투여 후 2달 후의 것으로 본 실험의 10주 및 6개월보다 짧아서 capsaicin의 효과가 아직 미치지 않은 것으로 추측할 수 있다. 지금까지 일반적인 신생동물에 대한 capsaicin투여 실험은 대부분의 경우 10주 후에 결과를 보는 것이 관례였고 capsaicin이 신경독성을 나타내는 데는 10주면 충분한 것으로 알려졌었다(Scadding, 1980). 그러나 본 실험에서는 10주에서는 효과가 거의 나타나지 않았으며 6개월이 되었을 때 비로소 그 효과가 나타났다. 따라서 capsaicin의 효과가 나타나고 지속되는 시기에 관하여도 다시 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

이번 실험에서, 면역조직화학염색 결과에서는 회장의 CGRP 면역반응양성 섬유들이 가장 강하게 반응하고 모양도 가장 복잡했으나, NADH-TR 반응 후 수행한 세포 계수에 있어서는 십이지장의 세포의 수가 가장 많았고 공장이 가장 적었다. 신경절 당 세포의 수도 회장이 가장 많았으나 큰 차이는 없었다. 회장이 CGRP depletion에 있어서 capsaicin의 작용을 왜 덜 받았는지는 아직 알 수 없다. 따라서 이것의 연구를 위해서는 소장의 다른 부위 즉 회장 아래쪽의 결장과 직장, 그리고 십이지장 위쪽의 위(stomach)까지도 연구가 수행되어야 할 것이다.

신경세포의 크기 변화에 대한 결과를 살펴보면, capsaicin이 신경세포의 크기를 감소시키는 것으로 나타났다. Capsaicin이 신경세포의 크기에 영향을 준다는 보고는 거의 없었으나 본 실험실에서 수행한 연구에 의하면(김영주 등, 1991) capsaicin을 원주에 투여했을 때 A형 신경세포의 크기가 커졌다. 그리고 이는 B형 신경세포가 capsaicin에 의해 다수 파괴되었기 때문에 남아있는 세포들이 약 10~20%씩 팽대되어 나타나는 현상으로 생각되었다. 그러나 본 실험에서는 이와는 반대로 십이지장의 근육층신경열기의 세포가 capsaicin에 의해 감소하는 흥미있는 결과를 보였다. 앞으로 capsaicin이 신경세포의 크기에 어떤 영향을 미치는지 좀 더 체계적으로 살펴보기 위하여 소장의 각 부위별로, 또한 capsaicin 투여 후 시기별로 더 연구를 수행하려 한다.

전자현미경 연구에 있어서 장신경계는 capsaicin에 의해 크게 영향을 받지 않는다는 보고때문에 미세구조도 별로 변화하지 않을 것으로 기대하였으나, 본 실험결과에 있어서 축삭들이 팽대되고 내부구조가 변화되는 등의 심한 파괴현상을

관찰할 수 있었다. 이는 Chung 등(1985)의 결과와 일치하였으며, 장신경계의 신경섬유는 주로 무수초신경섬유(Barr와 Kiernan, 1988)라서 capsaicin의 영향을 많이 받은 것으로 생각되었다.

이상의 결과로 capsaicin을 신생동물에 투여하였을 때, 장신경계에 변화를 주지 않는다는 기존의 개념과는 달리 심한 변화를 초래하였으며 CGRP와 같은 신경전달물질에도 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

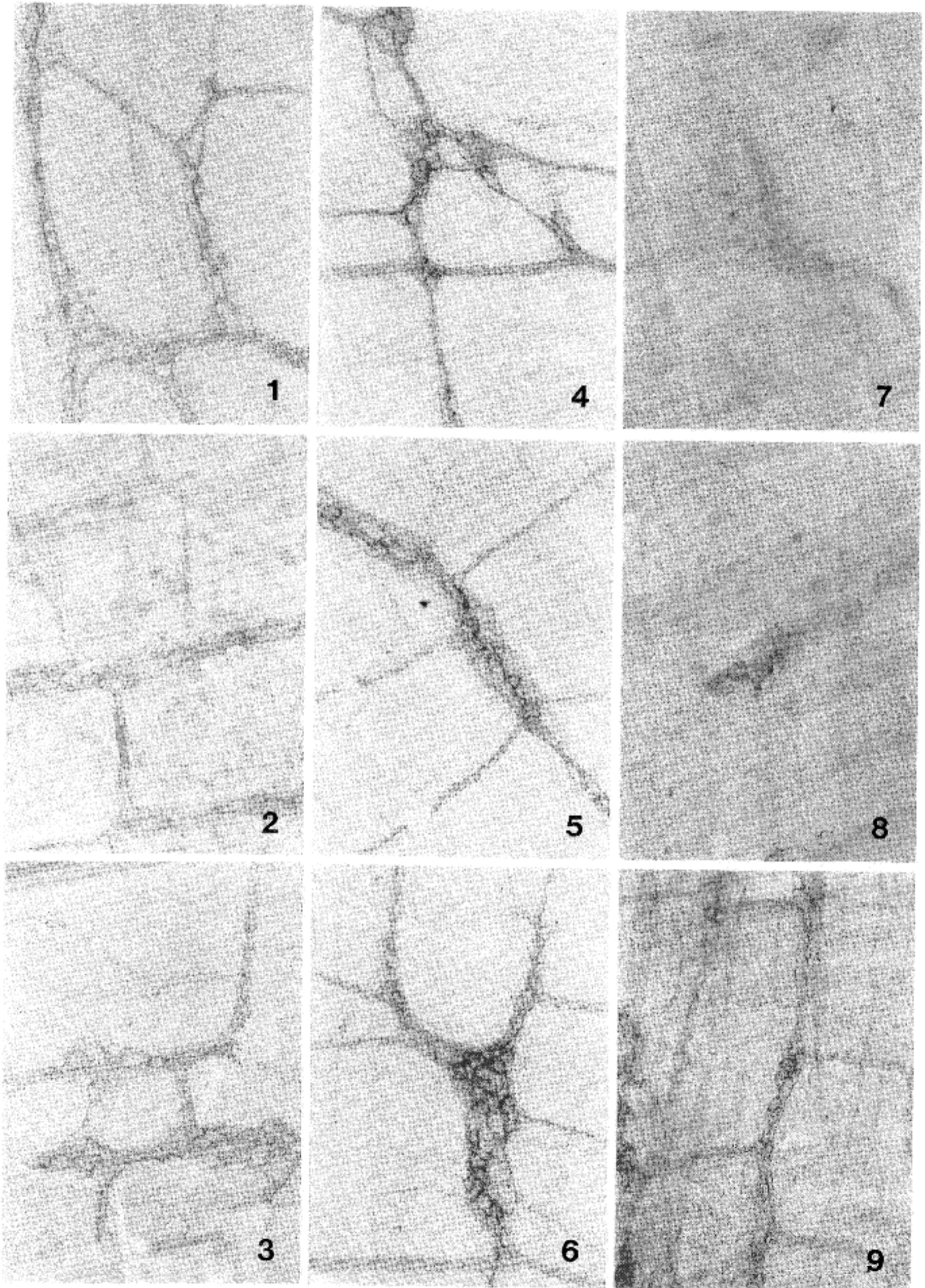
참 고 문 헌

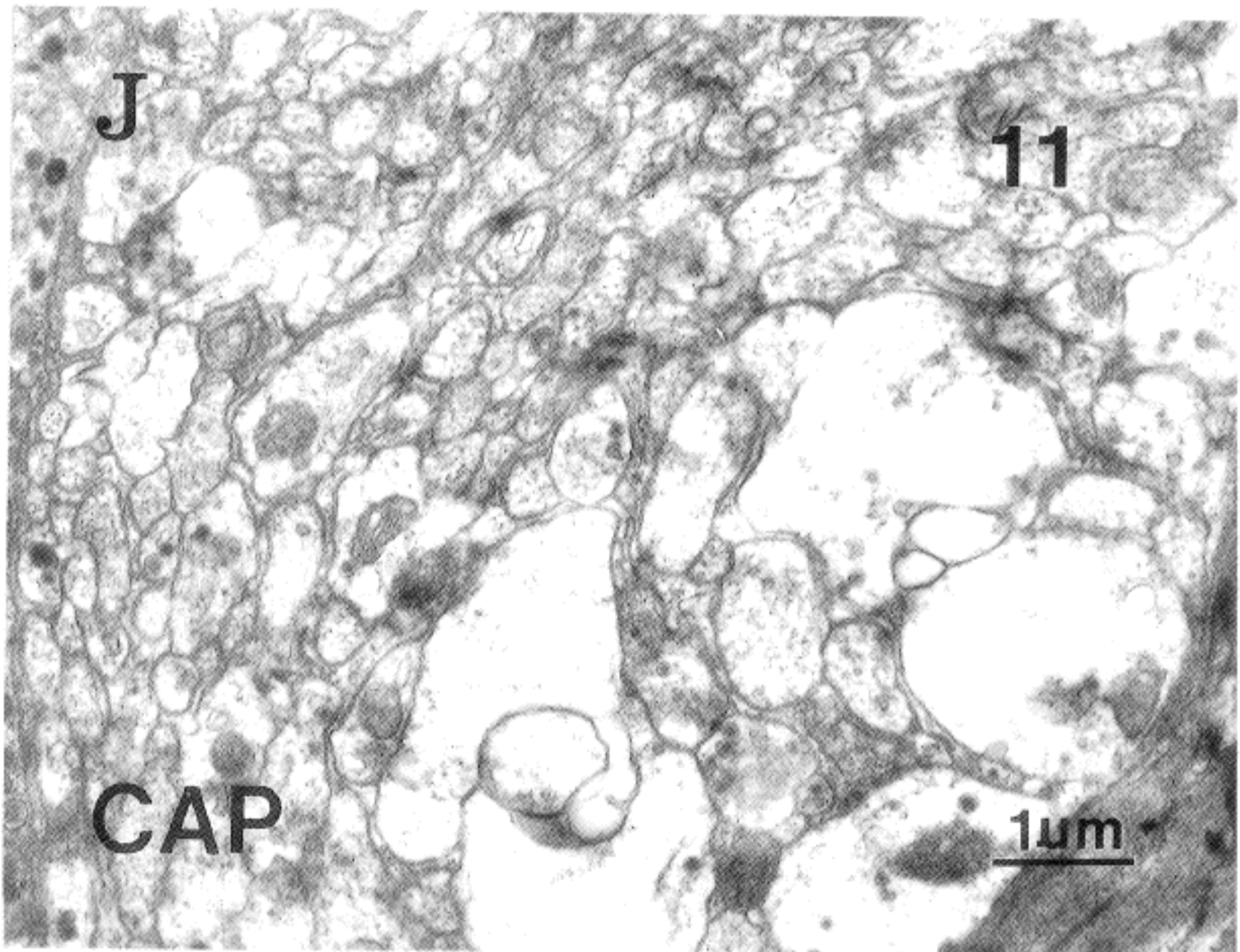
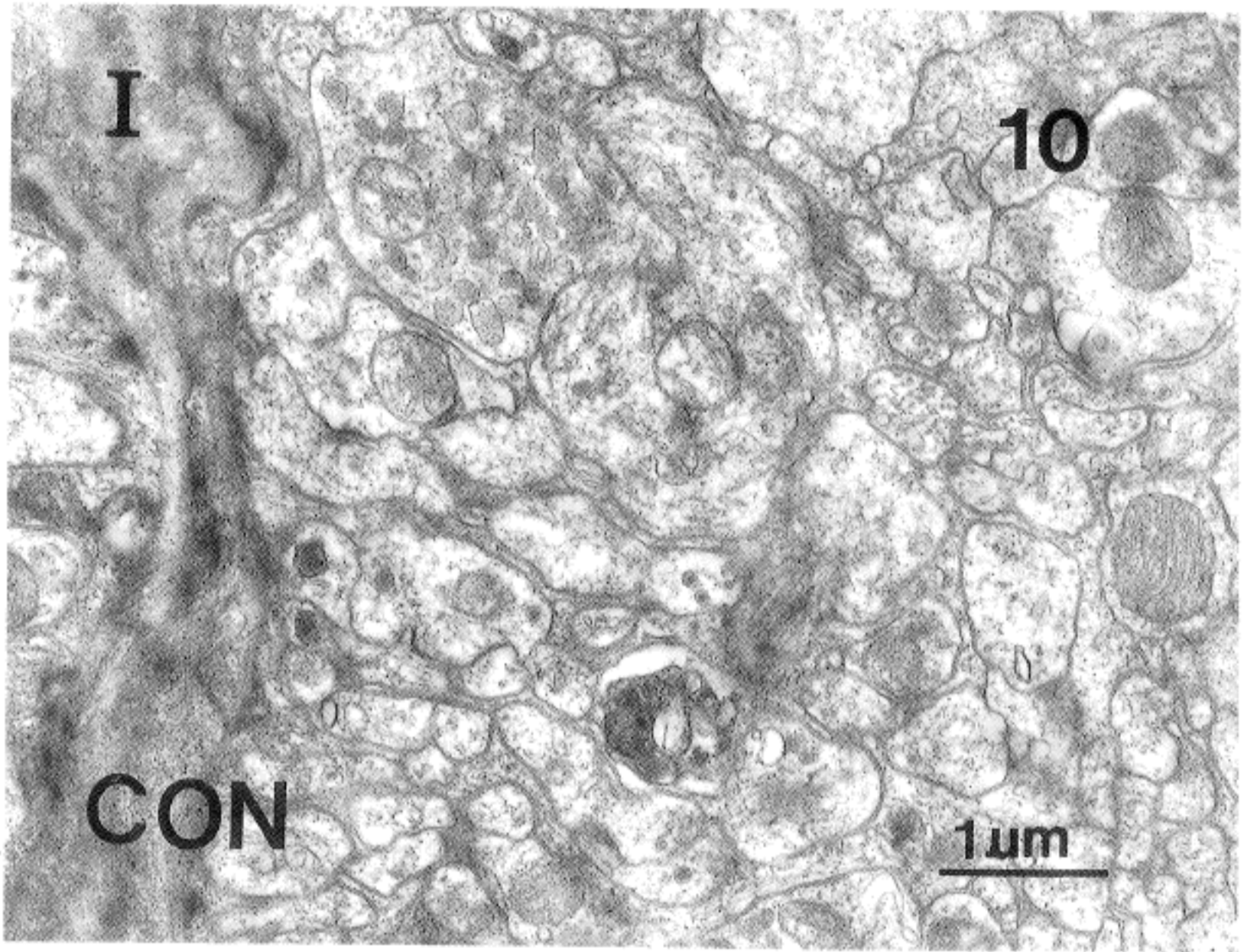
- 김영주, 이종은, 박경아: 신생 흰쥐에 capsaicin 투여가 척수신경절 세포체에 미치는 영향에 관한 형태계측학적 연구. *대한해부학회지* 24: 316-329, 1991
- Amara SG, Jonas V, Rosenfelt MG, Ong ES, Evans RM: Alternative RNA processing in calcitonin gene-expression generates m-RNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244, 1982
- Barr ML, Kiernan JA: The Human Nervous System. Harper International ed, J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp358, 1988
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I: Calcitonin-gene related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313: 54-56, 1985
- Buck SH, Burks TF: The neuropharmacology of capsaicin: Review of some recent observations. *Pharmacol Rev* 38: 179-226, 1986
- Buck SH, Walsh JH, Davis TP, Brown MR, Yamamura HI, Burks TF: Characterization of the peptide and sensory neurotoxic effects of capsaicin in the guinea pig. *J Neurosci* 3: 2064-2074, 1983
- Cervero F, McRitchie HA: Neonatal capsaicin and thermal nociception: a paradox. *Brain Res* 215: 414-418, 1981
- Chung K, Lee WT, Carlton SM: The effects of dorsal rhizotomy and spinal cord isolation on calcitonin gene-related peptide-labeled terminals in the rat lumbar dorsal horn. *Neurosci Lett* 90: 27-32, 1988
- Chung JM, Lee KH, Hori Y, Willis WD: Effects of capsaicin applied to a peripheral nerve on the responses of primate spinothalamic tract cells. *Brain Res* 329: 27-38, 1985
- Coleridge JC, Coleridge HM: Afferent C-fibers and cardiorespiratory chemoreflexes. *Am Rev Respir Dis* 115: 251-256, 1977
- Della NG, Papka RE, Furness JB, Costa M: Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea pigs. *Neuroscience* 9: 605-619, 1983
- Fitzerald M: Capsaicin and sensory neurons. A Review. *Pain* 15: 109-130, 1983
- Franco-Cereceda A, Henke H, Lundberg JM, Petermann JB, Hökfelt T, Fischer JA: Calcitonin gene-related peptide(CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides* 8: 399-410, 1987
- Furness JB, Costa M, Gibbins IL, Llewellyn-Smith IJ, Oliver JR: Neurochemically similar myenteric and submucous neurons directly traced to the mucosa of the small intestine. *Cell Tissue Res* 241: 155-153, 1985
- Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL: Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea pigs. *Neuroscience* 7: 447-459, 1982
- Gabella G: Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experimentia* 25: 218-220, 1969
- Gamse R, Holzer P, Lembeck F: Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol* 68: 207-213, 1980
- Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F: Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P and neurotensin in the nervous system of the rat. *Arch Pharmacol(Weinheim)* 317: 140-148, 1981
- Geppetti P, Frilli S, Renzi D, Santicioli P, Maggi CA, Theodorsson E, Fanciullacci M: Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in various rat tissue: correlation with substance P and other tachykinins and sensitivity to capsaicin. *Regul Pept* 23: 289-298, 1988
- Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S: Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57: 125-130, 1985
- Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor CP, Morrison JFB, Kelly JS, Evans RM, Rosenfeld MG: Calcitonin Gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 4: 3101-3111, 1984
- Hammond DL, Ruda MA: Developmental alterations in the thermal nociceptive threshold and the distribution of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P after neonatal administration of capsaicin in the rat. *Neurosci Lett* 97: 57-62, 1989
- Harmann PA, Chung K, Briner RP, Westlund KN, Carlton SM: Calcitonin gene-related peptide in the human spinal cord: A light and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 269: 371-380, 1988
- Harti G: Wirkung von Capsaicin auf afferente peptiderge Nervenfasern: Immunohistochemische Untersuchungen an Ratten, Meerschweinchen und Tauben(Dr rer nat thesis). *University of Gießen, 1988*
- Hayes AG, Tyers MB: Effects of capsaicin on nociceptive heat, pressure and chemical thresholds and substance P levels in the rat. *Brain Res* 189:561-564, 1980
- Henry JL: Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 114: 439-451, 1976
- Holzer P, Gamse R, Lembeck F: Distribution of substance P in the rat gastrointestinal tract-lack of effect of capsaicin pretreat-

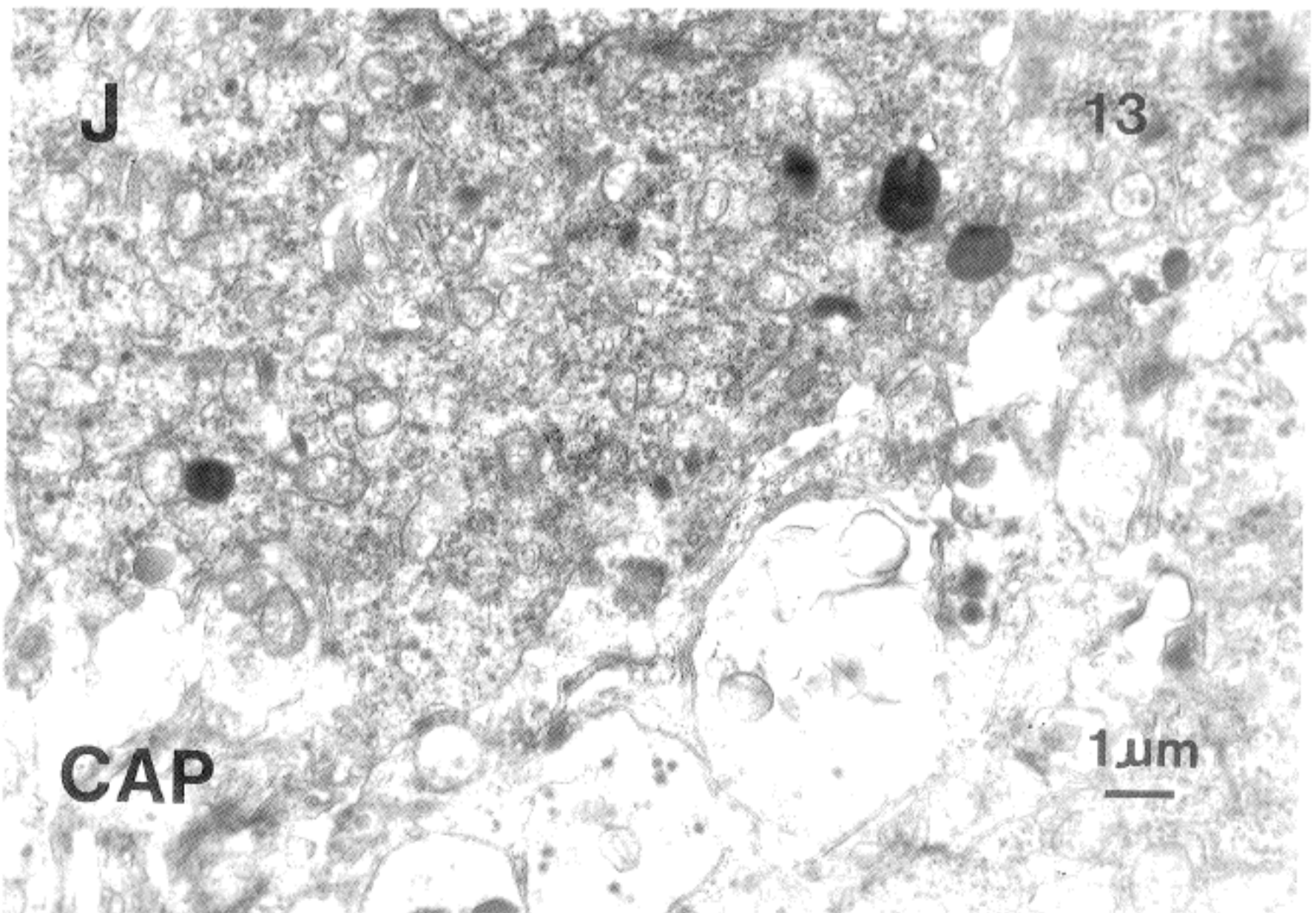
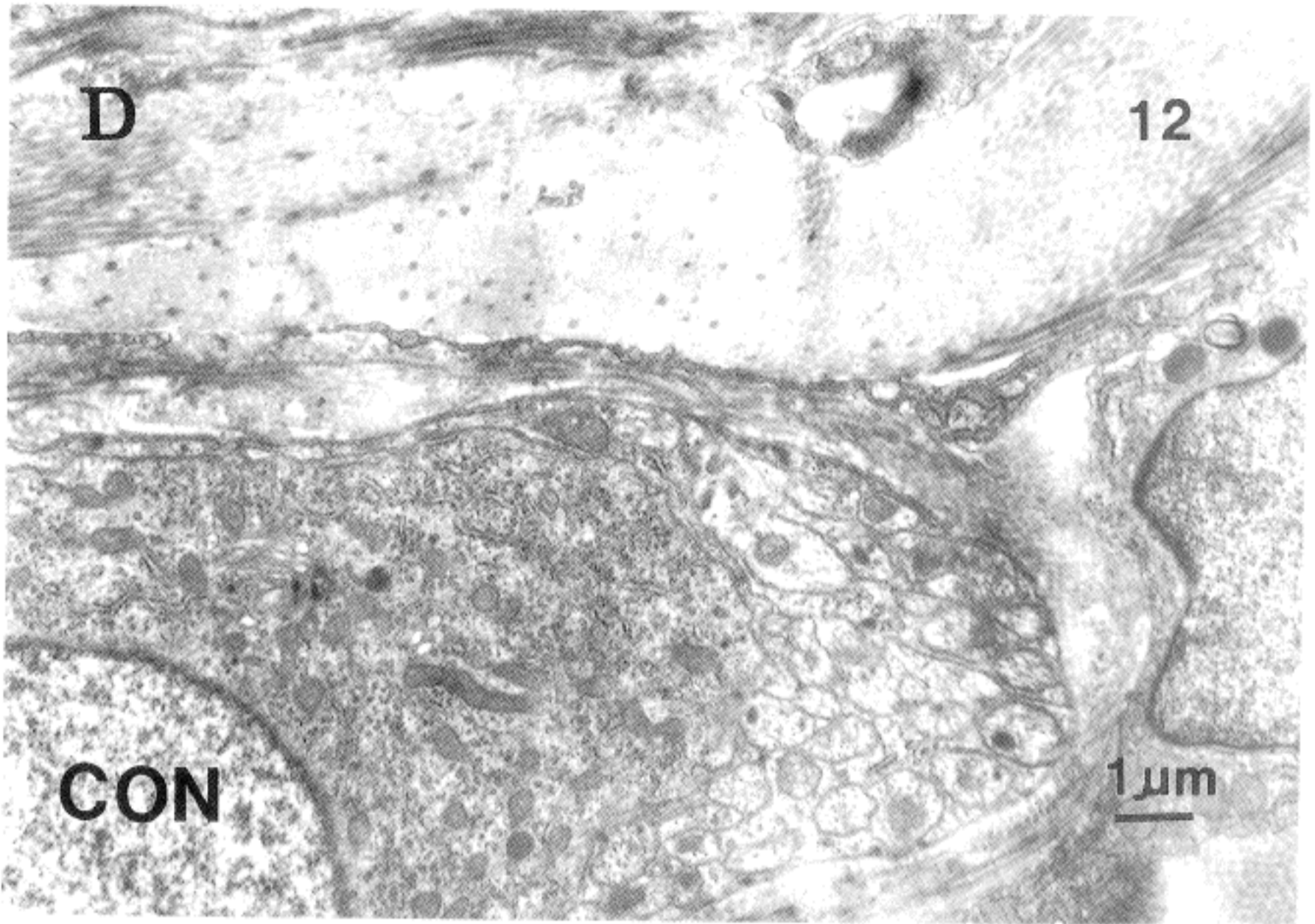
- ment. *Eur J Pharmacol* 61: 303-307, 1980
- Hoyes AD, Barber P: Degeneration of axons in the ureteric and duodenal nerve plexuses of the adult rat following in vivo treatment with capsaicin. *Neurosci Lett* 25: 19-24, 1981
- Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B: Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neuron. *Brain Res* 100: 235-252, 1975
- Jancso G, Kiraly E: Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 190: 781-792, 1980
- Jancso G, Kiraly E: Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Res* 210: 83-89, 1981
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A: Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 313: 91-94, 1980
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270: 741-743, 1977
- Jancso G, Hökfelt T, Lundberg JM, Kiraly E, Halsz N, Nilsson G, Terenius M, Rehfeld J, Steinbusch H, Verhofstad K, Elde R, Said S, Brown M: Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal cord and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin, and 5-hydroxytryptamine. *J Neurocytol* 10: 963-980, 1981
- Jancso N, Jancso-Gabor A: Dauerausschaltung der chemischen Schmerzen Empfindlichkeit durch Capsaicin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 236: 142-146, 1959
- Jessel TM, Iversen LL, Cuello AC: Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res* 152: 183-188, 1978
- Lawson SN, Nickels SM: The use of morphometric techniques to analyse the effect of neonatal capsaicin treatment of rat dorsal root ganglia and dorsal roots. *J Physiol(Lond.)* 303: 12P, 1980
- Lee KS, Yoon H, Lee JE, Kang YS, Park KA, Lee WT, Shin TS: Immunohistochemical and electronmicroscopical study of the myenteric plexus of the rat after capsaicin treatment. *Experimental Neurobiology* 1: 21-27, 1992
- Limlomwongse L, Chaitaichawong C, Tongyai S: Effect of capsaicin on gastric acid secretion and mucosal blood flow in the rat. *J Nutr* 109: 773-779, 1979
- Longhurst JC, Achton JH, Iwamoto CH: Cardiovascular reflexes resulting from capsaicin stimulated gastric receptors in anesthetized dogs. *Circ Res* 46: 780-785, 1980
- Makara GB, Gyorgy L, Molnar J: Circulatory and respiratory responses to capsaicin, 5-hydroxytryptamine and histamine in rats pretreated with capsaicin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 170: 39-44, 1967
- Maton PN, Sutliff VE, Zhou ZC, Gardner JD, Jensen RT: Characterization of receptors for calcitonin gene-related peptide(CGRP) on gastric smooth muscle cells. *Gastroenterology* 90: 1537, 1986
- Molnar J, Gyorgy L: Pulmonary hypertensive and other haemodynamic effects of capsaicin in the cat. *Eur J Pharmacol* 1: 86-95, 1967
- Mulderry PK, Ghatei MA, Bishop AE, Allen YS, Polak JM, Bloom SR: Distribution and chromatographic characterization of CGRP-like immunoreactivity in the brain and gut. *Regul Pept* 12: 133-143, 1985
- Nagy JI, Emson PC, Iversen LL: A re-evaluation of the neurochemical and antinociceptive effects of intrathecal capsaicin in the rat. *Brain Res* 211: 497-502, 1981
- Nagy JI, Vincent SR, Staines WA, Fibiger AC, Reisine TD, Yamamura HI: Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Res* 186: 435-444, 1980
- Napanitaya W: Effects of capsaicin in combination with diets of varying protein content on the duodenal absorption cells of the rat. *Am J Dig Dis* 19: 439-445, 1974
- Napanitaya W: Long-term effects of capsaicin on fat absorption and the growth of the rat. *Growth* 37: 269-275, 1973
- Ohtani R, Kaneko T, Kline LW, Labeledz T, Tang Y, Pang PKT: Localization of calcitonin gene-related peptide in the small intestine of various vertebrate species. *Cell Tissue Res* 258: 35-42, 1989
- Scadding W: The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. *J Anat* 131: 473-484, 1980
- Skofitsch G, Jacobowitz DM: Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptides* 6: 747-754, 1985
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L: Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216: 173-174, 1967
- Sternberger LA: Immunocytochemistry, 3rd ed. New York, John Wiley, 1986
- Szolcsanyi J, Jancso-Gabor A, Joo F: Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Arch Pharmacol(Weinheim)* 287: 157-169, 1975
- Szolcsanyi J, Bartho L: New type of nerve mediated cholinergic contractions of the guineapig small intestine and its selective blockade by capsaicin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305: 83-90, 1978
- Tippins JR, Morris HR, Panico M, Etienne T, Bevis P, Girgis S, MacIntyre I, Azria M, Attinger M: The myotropic and plasma-calcium modulating effects of calcitonin gene-related peptide(CGRP). *Neuropeptides* 4:425-434, 1984
- Virus RR, Gebhart CF: Pharmacologic actions of capsaicin; apparent involvements of substance P and serotonin. *Life Sci* 25: 1273-1278, 1979

Legends for Figures

- Figs. 1, 2, 3.** Photographs of the myenteric plexus of the duodenum(Fig. 1), jejunum(Fig. 2), ileum(Fig. 3) stained immunohistochemically with anti-CGRP antibody from capsaicin treated 10 week old rat. Capsaicin group($\times 175$)
- Figs. 4, 5, 6.** Photographs of the myenteric plexus of the duodenum(Fig. 4), jejunum(Fig. 5), ileum(Fig. 6) stained immunohistochemically with anti-CGRP antibody showing ganglia and internodal fibers from 10 week old rat. Control group($\times 175$)
- Figs. 7, 8, 9.** Photographs of the myenteric plexus of the duodenum(Fig. 7), jejunum(Fig. 8), ileum(Fig. 9) stained immunohistochemically with anti-CGRP antibody from capsaicin treated 6 month old rat. No CGRP immunoreactive fibers and CGRP containing neurons were found. Capsaicin group($\times 175$)
- Figs. 10, 11.** Electronmicrography of the peripheral nerve bundle in the myenteric plexus of the duodenum from 10 week old rat, control(Fig. 10) and capsaicin(Fig. 11) group. In control group, vesicles(V) in nerve axons are intact and mitochondrias(M) are well developed with prominent cristae. In capsaicin group, peripheral nerves were enlarged and swollen with amorphous inner structures.
- Figs. 12, 13.** Electronmicrography of the enteric neuron associated with nerve bundle in the myenteric plexus of the duodenum from 10 week old rat, control and capsaicin group. Increased dense bodies, changed mitochondria are shown and swollen peripheral axons are prominent in capsaicin group







—Abstract—

Effects of Capsaicin on Calcitonin Gene-related Peptide Containing Neurons in the Enteric Nervous System of the Rat

Kyung Ah Park, Jong Eun Lee, Seung Hwa Park,* You Sun Kang,**
Won Taek Lee

Department of Anatomy, Yonsei University College of Medicine

Department of anatomy, Aju University College of Medicine*

Department of Biochemistry, Yonsei University College of Science**

Capsaicin, the pungent extract of red pepper, has neurotoxic effects when injected into neonates and great interest has been focused on this subject. Capsaicin causes diminution of calcitonin gene-related peptide(CGRP) in the dorsal horn of spinal cord and in the peripheral nervous system. However, it is reported that capsaicin has no effects on the enteric nervous system. This experiment was performed to investigate the effect of capsaicin on CGRP containing neurons and on the peripheral axons in the enteric nervous system. Capsaicin 50mg/kg was injected in 2nd and 4th day of life to Sprague-Dawley rats, and 10weeks and 6 months later, the whole mount preparation of the intestine was prepared and stained immunohistochemically with anti-CGRP antiserum. Electron-micrographical samples were also prepared. The results obtained are as follows. 1) The distribution pattern of CGRP immunoreactive cells was different depending upon the site of the intestine, that is, the ileum showed the most complicated and dense pattern. 2) After capsaicin treatment, CGRP immunoreactive cells showed decreased or no reactivity in the 6 month group, while no changes were observed in the 10 week group. 3) In electron-micrographical findings, enteric neurons showed changes similar to the changes of the primary sensory neurons. Enlargement and destruction of mitochondria and increment of dense bodies were observed, while enlargement of peripheral nerve ending with cell organelles lysis was common.

Key words : capsaicin, myenteric plexus, calcitonin gene-related peptide, peripheral axon