

새로운 캡사이신 유도체 DA-5018의 진통활성 기전연구 : Substance P 관련성

손미원 · 손문호 · 배은주 · 김순희 · 김원배* · 양중익
동아제약(주)연구소

A Possible Mechanism of Analgesic Action of DA-5018, A New Capsaicin Derivative: Capsaicin-like Effect on The Release of Substance P

Miwon SON, Moon Ho SON, Eun Ju BAE, Soon Hoe KIM,
Won Bae KIM* and Junnick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received February 25, 97; accepted March 19, 1997)

Abstract – Capsaicin is known to be an analgesic agent, affecting the synthesis, storage, transport and release of substance P, the principal neurotransmitter of pain from periphery to the central nervous system(CNS). DA-5018, a newly synthesized capsaicin derivative has shown potent analgesic effect comparable to that of morphine in various rat models of experimentally induced acute pain. In this study the mechanism of analgesic activity of DA-5018 was examined. First, the electrically-evoked contraction of guinea pig trachea was inhibited by DA-5018 and these inhibition was recovered by incubation with capsazepine(3 μ M), capsaicin receptor antagonist and this result suggested that DA-5018 has affinity on capsaicin receptor. The correlation between the nociceptive threshold and the release of substance P was evaluated. *In vitro* perfusion of slices of the rat spinal cord with DA-5018(10, 100 μ M) produced a significant increase of the release of substance P and this increase was less than that of capsaicin(10 μ M). The nociceptive threshold of rat treated with DA-5018(1 mg/kg, p.o) in tail pinch test increased from 2.9 ± 0.3 to 23.5 ± 6.61 . Tail pinch latency increased to a maximum at 15 min after DA-5018 treatment and then declined to control values by 120 min. The capsaicin-evoked release of substance P from the spinal cord slices of rat treated with DA-5018 reduced from 2.38 ± 0.79 to 0.69 ± 0.26 pg/mg wet weight. This reduction reached to a minimum at 15 min after DA-5018 treatment and then recovered to control value by 120 min. These results mean that analgesic activity of DA-5018 is due to release of substance P. The effect of DA-5018 cream on electrically-evoked neurogenic inflammation of rat saphenous nerve was compared with capsaicin (zostrix-HP). DA-5018 showed 34% inhibition of the neurogenic extravasation while capsaicin showed significant 67% inhibition. This result indicates that the potency of DA-5018 in the release of substance P is less than that of capsaicin. These results suggest that the release of substance P is partially involved in the mechanism of analgesic action of DA-5018.

Keywords □ DA-5018, capsaicin, mechanism, substance P, analgesic

캡사이신은 고추의 매운 성분으로서 그 진통작용이 널리 알려진 바 있다. 캡사이신의 진통작용은 중추 및 말초 모두에서 통증을 전달하는 신경전달물질인 substance P의 생합성, 저장, 수송 및 유리에 대한 영향에 기인된다(Hokfelt 등, 1975, 1977, 1980; Cuello 등, 1978; Lembeck 등, 1977;

Nilssen과 Brodin, 1977). 캡사이신은 감각신경말단에서 substance P의 유리에 의한 고갈을 가져오고, dorsal root ganglia의 C-fiber의 cell bodies에서 substance P의 생합성을 억제하고(Branson 등, 1990) 시냅스말단으로의 axon transport를 감소시켜며, substance P 이외에 다른 신경전달물질의 유리에 대한 역치를 증가시킨다. 이와같은 substance P의 고갈은 결과적으로 통증전달을 감소시키거나

* To whom correspondence should be addressed.

차단을 가져온다. 유해자극은 뉴런(neuron)에서 substance P의 유리의 증가를 가져온다(Hokfelt등, 1980; Lembeck등, 1981; Yaksh 등, 1988). Synaptic junction에서 신경전달물질인 substance P유리는 neurogenic inflammation과 관계있는 여러 화학반응에 있어서 염증에 관여하는 여러 세포나 mast세포의 활성화, 통증증가, 염증이 일어난 조직에서 hyperalgesia를 유도한다(Lewis, 1937; Lembeck등, 1981, 1982; Burnstock: 1977; Bernstein등, 1981; Carpenter등, 1981). Synovial joint에서는 substance P는 synoviocyte의 증식과 PGE₂ 및 collagenase의 유리를 촉진하여 류마티스성 관절염의 원인이 된다(Lotz등, 1987). 캡사이신의 이와 같은 substance P를 고갈시키는 효과로부터 관절염, 당뇨병성 신경증 및 대상포진 등에 수반되는 통증에 개선효과를 기대할 수 있으며 실제로 국소용제제로서 유용성이 점차 증가되고 있다(McMahon등, 1991).

DA-5018(KR-25018)은 새로운 캡사이신 유도체로서 화학연구소의 박노상 박사 연구팀에서 최초로 합성되었다. DA-5018의 진통작용기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 캡사이신과 구조적 유사성이 있으며 pungent 화학물질로 확인된 바 있으며 경구투여시 진통효과가 보고된 바 있다(Park등, 1993). 본 연구에서는 DA-5018의 진통활성기전으로 substance P 관련여부를 캡사이신과 비교하여 밝히고자 하였다. 먼저 neurokinin 1(NK1) receptor binding assay와 calcitonin gene-related peptide(CGRP) receptor binding assay를 통하여 진통활성이 neurokinin receptor와 CGRP receptor를 경유하는지 확인하고자 하였으며, 기니픽기관 표본에서 수축에 대한 영향과 spinal cord에서 substance P유리와 유해자극역치에 대한 관련성을 보고자 하였으며, neurogenic inflammation에서 영향을 관찰하여 substance P 관련성 여부를 증명하고자 하였다.

실험방법

실험재료

DA-5018(N-{3-(3,4-dimethylphenyl)propyl}-4-2-(2-aminoethoxy)-3-methoxyphenylacetamide hydrochloride salt)은 동아제약 연구소 합성연구실에서 합성하여 사용하였으며, 실험당일 주사용중류수에 용해시킨 후 랫드에 투여하였다. 캡사이신등은 Sigma사에서, 모르핀·HCl(이하 모르핀)은 동광약품에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley(SD)계 웅성 랫드(4-5주령, 180~220 g)로서 특정 병원체 부재(SPF) 동물을 미국 B&K에서 구입하여 1주간 순화사육을 거쳐 체중 180~250 g 동물을 사용하였다. 사육기간 중 온도는 23±2℃, 습도는 40~70%, 조명시간은 12시간(07:00~19:00)을 유지하였고

사료와 음수는 자유롭게 섭취시켰으며, 실험 1일전에 18시간 절식시켜 사용하였다.

기니픽 적출기관

체중 250 g 전후의 기니픽의 기관을 적출하여 2 mm 폭이 되도록 절개한후 6~7개의 표본을 실로 고정하고 37℃의 마그누스 장치에 넣은 후 isometric transducer에 연결하였다. 1 g의 정지장력을 준후 1시간 동안 15분 간격으로 세척하면서 안정화시켰다. DA-5018 을 10⁻⁹~10⁻⁵ M까지 연속하여 가하고(n=6~7) 세척한 후 1시간 동안 안정화시키고 DA-5018을 반복해서 10⁻⁹~10⁻⁵ M까지 연속하여 가하였다. Capsaicin 길항제인 capsazepine(3 μM)은 DA-5018 첨가전에 가하고 세척후 1시간 동안 안정화시켰다. DA-5018의 수축력은 Carbachol의 최대수축력을 100%으로 하고 이에 대한 상대 %로 DA-5018의 효과를 나타내었다(Lundberg와 Saria, 1982).

Substance P 유리시험: in vitro 관류(perfusion)

SD계 랫드(200~250 g)을 단두치사 후 척수를 분리하고 이중 lumbar enlargement 부분을 분리하여 잘게 자른 후 (1 mm³), 관류장치에 옮겨 관류시켰다. 관류는 0.02% bovine serum albumin(BSA)와 단백질분해효소 억제제들(10 μM bestatin, 5 μM captopril, 1 μM leupeptin)이 포함된 Krebs bicarbonate용액을 사용하여 200 μl/min 속도로 37℃, 95% O₂, 5% CO₂에서 행하였다. 처음 30분 동안 관류 후 약물(ethanol에 녹임)을 가하고 10분 간격으로 분획들을 모았다. 관류분획들을 Sep-Pak C₁₈ cartridge을 사용하여 제염하였다. 세척액으로는 0.1% trichloroacetic acid(TCA)를 용출액으로는 acetonitrile-0.1% TCA (80:20 V/V)를 사용하였다. 용출액을 건조하고 용출된 immunoreactive substance P (iSP)를 radioimmunoassay법으로 정량하였다(Bucsic와 Lembeck, 1981; Oku 등, 1987).

Antinociceptive 효과는 tail-pinch 방법으로 다음과 같이 측정하였다(Saito와 Nomura, 1989). 랫드의 꼬리에 압력을 가하는 기구로서 1.0 kg의 힘을 가할 수 있는 랫드 동맥검자를 사용하였다. 랫드 꼬리 끝에서 약 3~5 cm 부위를 동맥검자로 집은 후 랫드가 몸을 돌려서 검자나 꼬리를 물거나 핏을 때까지 걸린 시간을 역치로 측정하였고, 꼬리의 손상을 피하기 위해 60초내에 하였다. 약물투여 1시간 전에 2회 측정하여 2회째에 10초 내에 반응을 보인 개체를 선별한 후 약물을 경구투여하였고, 약물투여 0.5, 1, 2 시간 및 4시간에 역치를 측정하였다.

신경원성 염증(neurogenic inflammation)

Garret C.(1991)등의 방법에 따라 다음과 같이 행하였다. 랫드(200 g 전후)를 urethane(20 g/50 ml, 4 ml/kg)으로 복강 주사하여 마취하고 약물을 0.05 ml씩 좌측후지의 발등에 바르고 일정시간 동안 방치한 후, 양쪽을 발을 물로 씻어주었다. Saphenous nerve를 분리한 다음 무릎관절의 경골근

위의 피부를 약 5 mm 절개하고 1호 수술실로 묶은 후 1% Evans blue(50 mg/kg, 5 ml/kg)를 정맥주사하였다. 전극을 신경에 걸어주고 15분간 전기자극(10 Hz, 25 Volts, 2 msec)을 한 후, 전기자극이 끝나면 경추탈골한 후 좌우측 발등 피부를 적출한 다음 겨낸 피부의 무게를 0.1 mg까지 측정 기록하였다.

벗겨낸 피부를 1N KOH 0.5 ml에 담가 37°C에서 하룻밤 방치한 다음 N H₃PO₄-acetone용액 4.5 ml를 넣어 원심분리한 후 상등액을 취하여 620 nm에서 흡광도 측정하였다. Evans blue용액으로 calibration curve를 작성하여 아래와 같은 식으로 측정값을 환산하였다.

$$\text{Left} \frac{(\text{Evans blue ug}) * 100}{(\text{Tissue, mg})} \quad \text{Right} \frac{(\text{Evans blue ug}) * 100}{(\text{Tissue, mg})}$$

$$= \text{Evans blue (ug) / Tissue 100 mg}$$

Neurokinin-1 수용체 결합 시험

웅성 SD계 랫드 (200~250 g)를 단두치사하여 뇌를 적출하여 냉각된 30배 부피의 homogenization buffer (150 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl)를 가하여 Brinkman polytron homogenizer로 균질화 시킨후 40,000 × g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 침강물을 buffer로 세척하여 50 mM buffer에 현탁시켜 사용하였다. 뇌세포막 현탁액의 단백질 농도는 5~10 mg/ml이 되도록 하였다 (Gitler 등, 1995).

수용체결합시험은 균질화용액(400 µg/ml)에 [³H]-[Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-substance P(Dupont NEN, 38.5 Ci/mmol, 최종농도 1.2 nM)와 약물을 가하여 4°C에서 90분 반응시켰다. Non-specific binding에는 1 µM substance P를 사용하였다. 반응액은 cell harvest를 사용하여 0.25% BSA 용액으로 미리 적신 G/FB Uniplate에 여과하고, 냉각된 buffer로 3번 세척하였다. Uniplate를 건조시킨 후 TopCount(PACKARD)를 사용하여 측정하였다.

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 수용체 결합 시험

웅성 SD계 랫드(200~250 g)를 단두치사하여 뇌(소뇌제외)를 분리하여 냉각된 20배 부피의 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 가하여 Brinkman polytron homogenizer로 균질화 시킨 후 48,000 × g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 침강물을 buffer로 세척하여 100 mM NaCl이 포함된 50 mM buffer에 현탁시켜 사용하였다. 뇌세포막 현탁액의 단백질 농도는 25~250 µg/100 µl이 되도록 하였다(Mimeault 등, 1992).

수용체결합시험은 균질화용액에 [¹²⁵I] hCGRP(Amersham, 2000 Ci/mmol, 최종농도 40 nM)와 약물을 가하여 4°C에서 120분 반응시켰다. Non-specific binding에는 1 µM hCGRP 사용하였다. 반응액은 cell harvest를 사용하여 0.1% polyethyleneimine용액으로 미리 적신 G/FB Uniplate에 여과하

고 냉각된 buffer로 3번 세척하였다. Uniplate를 건조시킨 후 TopCount(PACKARD)를 사용하여 측정하였다.

실험결과

기니픽 적출기관시험

DA-5018의 진통활성기전 연구로서 캅사이신 수용체의 대표적인 활성인 기니픽 적출기관의 전기자극에 대해 살펴 보고자 하였다. 기니픽 기관에 대해 10~100 nM의 DA-5018은 수축반응을 일으켰으며 1000 nM에서 최대치를 나타내었다. DA-5018의 수축반응은 DA-5018 전처리에 의해 완전히 소실되었고 캅사이신 수용체의 길항제인 capsazepine (3 µM)을 전처리에 의해서는 DA-5018의 수축반응이 Fig. 1과 같이 억제 되었다. 이러한 결과는 DA-5018의 기관에 대한 영향이 캅사이신 수용체에 의해 매개됨을 시사한다.

랫드의 유해자극역치와 substance P 유리와의 상관성

캅사이신의 대표적 활성이며 진통활성의 기전으로 여겨지는 척수에서의 substance P의 유리에 대한 DA-5018의 활성을 캅사이신과 비교하여 보고자 하였다. 척수중 substance P 유리가 가장 활발한 척추의 요부(lumbar) 부분의 in vitro 관류시험(perfusion)시 캅사이신과 같이 DA-5018 (100 µM)은 약물첨가 후 10분내에 substance P의 유리를 9배 정도 촉진시키고, 그 후 급격히 감소하였다(Fig. 2). 100 µM의 캅사이신에서도 DA-5018과 동일한 유리를 관찰하였으며, DA-5018과 캅사이신을 10과 100 µM에서 약물에 의해 유리된 substance P양을 비교시 그 활성은 DA-5018이 캅사이신보다 약하였다(Table I).

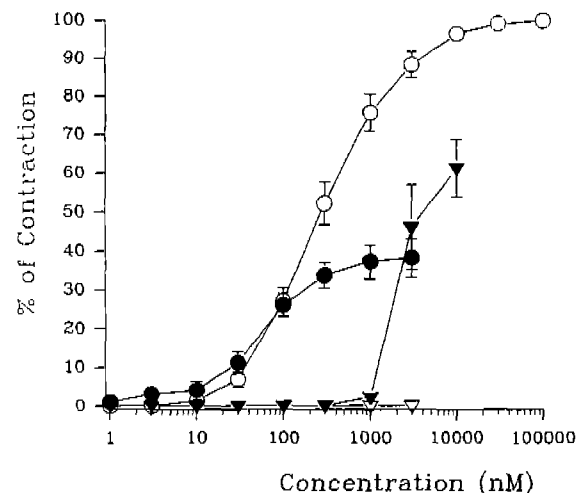


Fig. 1. Effect of capsazepin on the contractile response of DA-5018 in tracheal smooth muscle preparation from guinea pig. Each value is the mean ± S.E. of 6 experiments. (O) morphine; (●) DA-5018; (▽) DA-5018+capsazepine(3 uM); (▼) DA-5018+DA-5018.

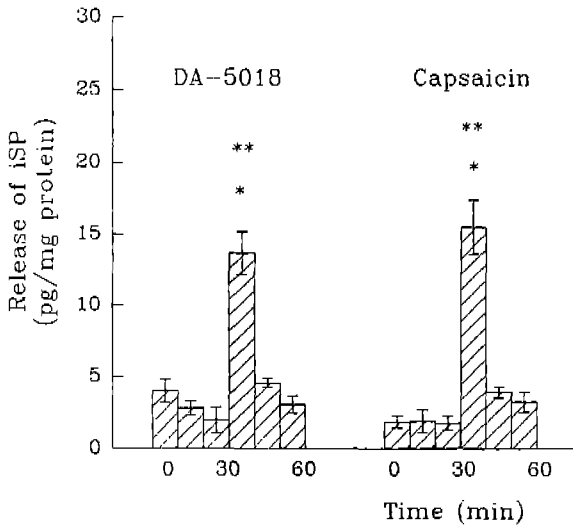


Fig. 2. Effect of DA-5018 and capsaicin on release of immunoreactive substance P (iSP) from dorsal-half slices of lumbar cord. DA-5018 (100 μ M) and capsaicin (100 μ M) was applied at the fourth fraction (**). The values represent mean \pm S.E. for 3 animals. * p <0.05 when compared with pre-fraction.

Table I. Effect of DA-5018 and capsaicin on the release of immunoreactive substance P (iSP) from the dorsal half-slices of the lumbar cord of the rats. The values represent mean \pm S.D. for 3 animals.

Drug	Concentration (μ M)	Evoked release of iSP (pg/mg wet weight)
Control	-	0.725 \pm 0.387
DA-5018	10	1.18 \pm 0.158
	100	2.099 \pm 0.818
Capsaicin	10	2.351 \pm 0.144
	100	2.379 \pm 0.789

랫드에서 DA-5018의 substance P의 유리와 유해자극에 대한 유해자극역치와의 상관성을 검토하고자 하였다. DA-5018에 대한 유해자극역치를 tail-pinch 방법으로 구하였고 결과는 Fig. 3와 같다. 약물투여전의 유해자극역치는 2.90 \pm 0.39 이였고, DA-5018을 1 mg/kg을 s.c로 투여하고 15분 후에 23.5 \pm 6.61로 최고치를 나타내었고 120분 후 약물투여 전과 비슷한 값을 나타내었다. 동일한 실험계의 랫드에 DA-5018의 진통용량인 1 mg/kg을 투여하고 척수를 분리하여 캡사이신에 의한 substance P유리에 대한 영향을 보고자 하였다. Substance P 유리는 capsaicin(100 μ M)로 유도하였다. DA-5018을 투여하고 15분후의 척수에서 substance P 유리는 대조군에 비해 현저히 감소되었고, 120분후 감소된 수치가 회복됨을 관찰하였다(Table II). 즉 유해자극역치값이 최고인 15분에서는 캡사이신에 의한 substance P의 유리가 감소되었고 유해자극역치가 회복되는 120분에서는 substance P 유리감소도 회복됨을 볼 수 있었다.

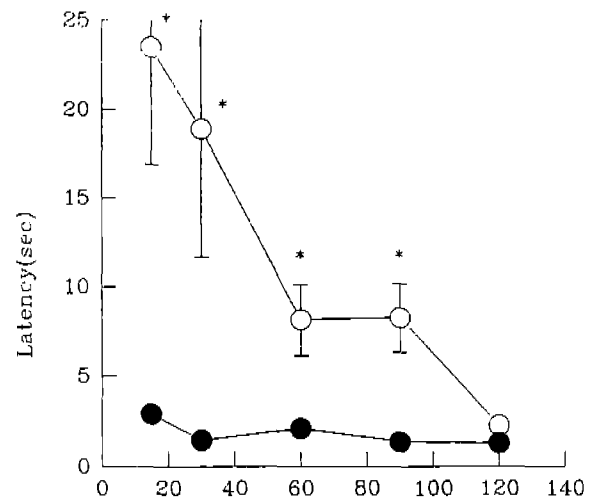


Fig. 3. Effect of DA-5018 on the nociceptive threshold in rats. The nociceptive threshold is expressed as biting latency. DA-5018, 1.0 mg/kg (○) and vehicle(●) were administered perorally, at time 0. Values are mean \pm S.E. of 7 animals. * p <0.05 when compared with vehicle at each time.

Table II. Effect of systemic administration of DA-5018 on 10 μ M capsaicin-evoked release of immunoreactive substance P (iSP) from the dorsal half-slices of the lumbar cord of the rats. DA-5018 (1 mg/kg) was administered s.c, 15 or 120 min before decapitation and removal of lumbar cord. The values represent mean \pm S.E. for 3 animals. * p <0.05 when compared with control.

Drug	Treatment time (min)	Evoked release of iSP (pg/mg wet weight)
Control		2.379 \pm 0.789
DA-5018	15	0.687 \pm 0.255*
	120	1.287 \pm 0.925

신경원성 염증

Saphenous nerve의 전기자극은 neurogenic inflammation을 유발하는데 이는 감각신경의 말단에서 substance P, neurokinin A 및 CGRP 등이 유리로 혈관투과성 증가와 혈관 확장에 의해 일어난다. Saphenous skin에 캡사이신의 단회투여는 Evans blue의 삼출을 35% 감소시키고 동시에 substance P함량도 50% 감소시켜 c-fiber의 efferent function을 억제함을 증명하였다(Lynn과 Costsell, 1992). DA-5018의 neurogenic inflammation에 대한 효과를 보고자 DA-5018투여후 피부의 saphenous nerve를 전기자극하여 neurogenic inflammation을 유발하였고 염증의 정도는 피부정맥내 투여한 evans blue 삼출량을 정량하여 측정하였다.

Zostrix는 neurogenic inflammation을 38.0% 억제하였고, Zostrix-HP는 67.0% 유의적으로 억제하였다. DA-5018 0.3% 크림은 34.7% 억제경향은 보였으나, vehicle처치군과 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4)

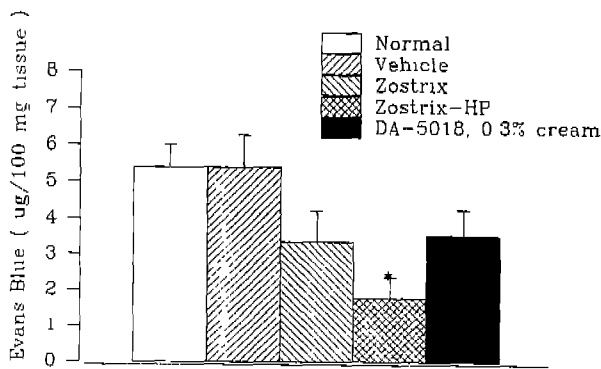


Fig. 4. Inhibitory effect of DA-5018 and zosterix on neurogenic inflammation. Evans blue content of tissue from rats 2hr after DA-5018 treatment was determined by spectrophotometry. The values represent mean \pm S.E. for 6-8 animals. * $p < 0.05$ when compared with vehicle control.

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 수용체 결합 시험 및 neurokinin-1 수용체 결합 시험

DA-5018의 진통활성에 대한 기전연구로서 말초에서의 통증전달과 관련이 있는 neurokinin 수용체와 calcitonin-gene related protein 수용체 [^3H]-[Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-substance P의 neurokinin 수용체에 대한 해리상수(K_d) 및 B_{max}는 1.43 \pm 0.35 nM, 0.583 \pm 0.032 pmoles/mg protein이었으며 [^{125}I] hCGRP의 CGRP수용체에 대한 K_d와 B_{max}값은 15.3 \pm 0.173 pM, 5.62 \pm 0.34 fmole/mg protein이었다. Competition analysis에서 DA-5018은 두 수용체에서 각각의 리간드에 대한 K_i값은 >10 μM 이상으로 두 수용체모두에 친화력이 거의 없는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로부터 DA-5018의 진통활성은 neurokinin 수용체와 CGRP수용체를 경유하지 않을 것으로 판단된다.

고찰

본 실험에서 DA-5018은 기니피크관 근육이완 작용을 나타냈으며 이 작용은 캡사이신 수용체의 길항제인 capsaizepine에 의해 길항되었다. 기니피크관 근육이완 작용은 캡사이신의 대표적 활성으로 DA-5018의 약리적 활성이 캡사이신 수용체와의 연관성을 시사하였다. 캡사이신의 순환계, 호흡기계, 감각계에 대한 여러 약물학적 활성은 말초와 중추신경계에 존재하는 신경전달물질인 substance P에 대한 효과로 설명하고 있다(Virus와 Gebhart, 1979). 캡사이신은 급성적으로 칼슘의존적으로 substance P의 유리를 가져오고 만성적 처치는 지속적인 substance P의 고갈을 가져오므로 탈감작(desensitization)을 가져온다. DA-5018은 캡사이신과 동일하게 primary afferent neuron terminal(Onogi 등, 1992)에서 substance P의 유리를 촉진시켰다. Primary afferents에서 캡사이신의 이러한 substance P 유리활성은

"capsaicin receptor"을 통하여 나타날 것으로 보고 있다(Szallasi와 Blumberg, 1990). 그러므로 DA-5018은 캡사이신과 crosstachyphylaxis를 직접적으로 관찰하지 않았으나 DA-5018은 캡사이신 수용체에 작용하는 캡사이신계 약물로 사료된다. 그러나 DA-5018의 진통활성에 대한 기전은 아직 확실하지 않으며 진통활성과 substance P 유리활성을 캡사이신과 비교시 진통활성이 강한 DA-5018이 substance P 유리활성은 약하게 나타났으므로 다른 기전이 진통활성에 관여할 것을 배제할 수 없는 것으로 사료된다.

Saphenous nerve의 전기자극으로 유발된 neurogenic inflammation에서 DA-5018 0.3% 크림은 Zostrix-HP에 비해 neurogenic inflammation에 대한 억제효과가 적었다. Neurogenic inflammation은 감각신경의 말단에서 substance P, neurokinin A 및 CGRP등이 유리로 혈관투과성 증가와 혈관확장에 의해 일어난다. Saphenous skin에 캡사이신의 단회 투여는 evans blue의 삼출을 35% 감소시키고 동시에 substance P함량도 50% 감소시켜 c-fiber의 afferent function을 억제됨이 보고 되었고(Lynn과 Costsell, 1992), 캡사이신 0.075% 크림을 10주간 반복투여한 경우에도 vehicle투여군에 비해 31% 삼출을 억제함을 보고하였다(McMahon등, 1991). 이와같은 캡사이신의 활성에 비해 DA-5018의 활성이 상대적으로 적은 활성을 나타낸 것은 neurogenic inflammation 주매개체인 substance P 유리에 대한 영향도 적은 것에 기인될 것으로 사료되며 이와 같은 결과는 척수에서 substance P유리에 대한 DA-5018의 효과와 상통한다. 이상의 결과들로부터 DA-5018의 진통효능은 substance P와 같은 캡사이신 유사기전이외의 다른 기전도 관여할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Bernstein, J. E., Swift, R. M., Soltani, K., Lorincz, A. L. (1981). Inhibition of axon reflex vasodilatation by topically applied capsaicin. *J. Invest Dermatol.* **76**, 394-395.
- Brorson, J. R., Bleakman, D., Miller, R. J. (1990). Capsaicin reduces voltage-gated calcium currents in sensory neurons. *Neurology* **40**(suppl 1), 232.
- Bucsecs, A. and Lembeck, F. (1981). *In vitro* release of substance P from spinal cord slices by capsaicin congeners. *Eur. J. Pharm.* **71**, 71-77.
- Burnstock, G. (1977). Autonomic neuroeffector junctions-reflex vasodilatation of the skin. *J. Invest Dermatol.* **69**, 47-57.
- Carpenter, S. E., Lynn, B. (1981). Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **73**, 755-758.
- Cuello, A. C., Del Fiacco, M., Paxinos, G. (1978). The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurons in the rat trigeminal system. *Brain Res.* **152**, 499-509.

- Garret, C., Carrulette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J. F., Blanchard, J. C. and Laduron, P. M. (1991). Pharmacological properties of a potent and selective mono-peptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 10208-10212.
- Gitter, B. D., Bruns, R. F., Howbert, J. J., Waters, D. C., Threlkeld, P. G., Cox, L. M., Nixon, J. A., Lobb, K. L., Mason, N. R., Stengel, P. W., Cockerham, S. L., Silbaugh, S. A., Gehlert, D. R., Schober, D. A., Iyenger, S., Calligaro, D. O., Regoli, D. and Hipskind, P.A. (1995). Pharmacological characterization of LY303870: A novel, potent and selective nonpeptide substance P (neurokinin-1) receptor antagonist. *J. Pharm. Exp. Thera.* **275**, 737-744.
- Hokfelt, T., Johansson, O., Kellerth, J. O., et al. (1977). Immuno-histochemical distribution of substance P. In: von Euler, U.S., Pernow, B., eds. *Substance P*. New York, NY: Raven Press. p 117-145.
- Hokfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M. and Schultzberg, M. (1980). Peptidergic neurons. *Nature* **284**, 515-521.
- Hokfelt, T., Kellerth, J. O., Nilsson, G. and Pernow, B. (1975). Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* **190**, 889-890.
- Lembeck, F. and Donnerer, J. (1981). Postocclusive cutaneous vasodilatation mediated by substance P. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **316**, 165-171.
- Lembeck, F., Donnerer, J. and Colpaert, F. C. (1981). Increase of substance P in primary afferent nerves during chronic pain. *Neuropeptides* **1**, 175-180.
- Lembeck, F. and Gamse, R. (1982). Substance P in peripheral sensory processes. In: *Substance P in the Nervous system*. CIBA Symposium 91. London, England: Pitman. p 35-54.
- Lembeck, F., Gamse, R. and Juan, H. (1977). Substance P and sensory nerve endings. In: von Euler, U. S., Pernow, B., eds. *Substance P*. New York, NY: Raven Press. p 169-181.
- Lewis, T. (1937). The nociceptor system of nerves and its reactions. *B. M. J.* p 431-435, 491-494.
- Lotz, M., Carson, D. A. and Vaughan, J. H. (1987). Substance P Activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* **235**, 893-895.
- Lundberg, J. M. and Saria, A. (1982). Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand*, **116**, 473-476.
- Lynn, B. and Costsell, Y. B. (1992). The actions of capsaicin applied topically to the skin of the rat on C-fiber afferents, antidromic vasodilation and substance P levels. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 400-406.
- McMahon, S. B., Lewin, G. and Bloom, S. R. (1991). The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat. *Pain* **44**, 301-310.
- Mimeault, M., Quirion, R., Dumont, Y., St-Pierre, S. and Fournier, A. (1992). Structure-Activity study of hCGRP₈₋₃₇, a calcitonin gene-related peptide receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **35**, 2163-2168.
- Nilsson, G., Brodin, E. (1977). Tissue distribution of substance P-like immunoreactivity in dog, cat, rat and mouse. In: von Euler, U. S., Pernow, B., eds. *Substance P*. New York, NY: Raven Press. p49-54.
- Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H. and Takaj, H. (1987). Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.* **403**, 350-354.
- Onogi, T., Minami, M., Kuraishi, Y. and Satoh, M. (1992). Capsaicin-like effect of (6)-shogaol on substance P-containing primary afferents of rats: A possible mechanism of its analgesic action. *Neuropharmacology* **31**, 1165-1169.
- Park, N. S., Ha, D. C., Choi, J. K., Kim, H. S., Hong, M. S., Lim, H. J. and Lee, K. S. (1993). Phenylacetamide derivatives and pharmaceutical compositions thereof. U.S. Patent No. 5,242,944.
- Saito, H. and Nomura, Y. (1989). *Screening methods for drug evaluation*. Hirokawa Publishing Company., Tokyo.
- Szallasi, A. and Blumber, P. M. (1990) Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analogue, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* **524**, 106-111.
- Virus, R. M. and Gebhart, G. F. (1979) Pharmacologic actions of capsaicin: Apparent involvement of substance P and serotonin. *Life sci.* **25**, 1273-1284.
- Yaksh, T. L., Bailey, J., Roddy, D. R., Harty, G. J. (1988). Peripheral release of substance P from primary afferents. In: Dubner, R., Gebhart, G. F., Bond, M. R., eds. *Proceedings of the Vth World Congress on Pain*. New York, NY: Elsevier Science Publishing Co. p 51-54.