

치수에서 Eugenol이 iCGRP(immunoreactive calcitonin gene-related peptide)의 분비 조절에 미치는 영향

오원만 · 최남기 · 김선현
전남대학교 치과대학, 치의학 연구소

ABSTRACT

EFFECT OF EUGENOL ON REGULATION OF iCGRP RELEASE FROM THE BOVINE DENTAL PULP

Won-mann Oh, Nam-ki Choi, Sun-hun Kim
College of Dentistry, Institute of Dental Science Chonnam Nat. Uni.

Eugenol has been reported to reduce odontogenic pain and is known to have a structure similar to capsaicin, a potent stimulant of certain nociceptors. We have hypothesized that the analgesic effect of eugenol may be due, in part, to inhibition of capsaicin-sensitive nociceptors. To test this hypothesis, we evaluate whether eugenol inhibits capsaicin-sensitive release of immunoreactive calcitonin generated peptide(iCGRP) from bovine dental pulp. Freshly extracted bovine incisors were transported to the lab. on ice, Splitted and pulp tissue was removed. The tissue was chopped into 200 μ m slices. Dental pulp was superfused(340 μ l/min) *in vitro* with oxygenated Krebs' s buffer. Eugenol and vehicle(0.02% 2-hydroxyl- β -cyclodextrin) were administered prior to stimulation of pulp with capsaicin and iCGRP was measured by RIA.

The results were as follows:

1. Administration of eugenol has no effect on basal release of iCGRP.
2. In the vehicle treated group, capsaicin evoked a 2.5-fold increase over basal iCGRP levels.
3. Administration of eugenol(600 μ M) reduced capsaicin evoked release of iCGRP by more than 40%(153.4 \pm 41.1% vs 258.9 \pm 21.7%).
4. 2-hydroxylpropyl- β -cyclodextrin of less than 0.02% is found to be an effective vehicle to dissolve eugenol without evoking iCGRP release from dental bovine pulp.

These data indicate that eugenol inhibits pulpal capsaicin-sensitive fibers and suggest that intracanal medicament of eugenol may relieve pain, in part, by this mechanism.

Key Words : Eugenol, Bovine dental pulp, iCGRP, Capsaicin, Superfusion, RIA

본 연구는 96 대학교수 해외파견을 위한 한국학술진흥재단의 지원에 의해서 이루어졌음.

산화아연유지놀은 치과에서 흔히 사용되는 치과재료로서 주로 임시 가봉재 및 합착제로 사용되고 있다. 특히 유지놀은 페놀계 약제로서 상아질지각과민이나 가역성 치수염의 경우에 동통 진정제로 작용할 수 있으며, 반면에 치수조직에 자극이나 세포독성을 야기한다고 보고되어 있으나¹⁾ 약물기전에 대해 아직 구체적으로 밝혀진 바 없다. 유지놀의 감각신경의 활동을 억제한다거나^{2,3)} PGI₂의 생성을 억제함으로써⁴⁾ 동통 진정제로서 작용을 지니며 반면에 말초 감각신경에 동통 유발 물질인 capsaicin과 같은 작용을 지니고 있다고 보고되어 있다. 즉 capsaicin은 고추의 주요 성분으로서 강력한 동통 유발의 자극성 물질이며 유지놀과 같이 페놀계의 분자 구조를 가지고 있고(Fig. 1) 말초감각신경의 특수 수용체에 선택적으로 작용하여 동통을 유발하나 시간이 경과 후에는 해로운 자극에 탈감작을 유도하는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

면역조직화학법, 신경절단(denervation) 혹은 capsaicin 전처리 등의 연구^{6,7)}에 의하면 신경펩타이드인 CGRP와 substance P는 치수의 침해수용 구심성 신경섬유에 함유되어 있다. 특히 치수에 상대적으로 다량 분포되어 있으며 특히, 구강점막, 피부 및 각막 등의 말단 조직에서 보다 2배 혹은 6배 이상의 농도로 존재한다^{8,9,10)}.

이들 신경펩타이드는 치수 조직의 손상이나 염증시 구심성 감각신경 섬유로부터 분비되어 혈관확장을 일으키거나, 비만세포를 자극하여 히스타민을 유리시키고 혈장의 일혈을 야기하는 등의 염증의 전구 반응인 신경성염증의 유발에 관여하며^{11,12,13)} 조직의 치유 반응에도 관여한다^{14,15)}. 말초 구심성 감각신경의 신경펩타이드의 분비조절에 대한 이해는 치수의 손상시 동반되는 통증을 해결하고, 염증 및 치유 반응을 파악하는데 새로운 임상적 접근법을 제공할 수 있을 것이다. 신경펩타이드의 치수내 분포, 역할 그리고 조직 손상시 이의 반응에 대해 많은 보고가 되어 있는 반면 말초신경으로부터 신경펩타이드 분비를 조절하는 인자와 작용기전에 대한 보고는 희귀한 편이다. 따라서 치수 자극제이면서 치수신경을 진정시키는 작용을 가지는 1) 유지놀의 소의 치수에서 iCGRP 분비의 조절에 미치는 영향을 평가하고 2) capsaicin에 의해 야기되는 iCGRP 분비조절에 유지놀의 미치는 역할에 대해 평가하고 3) 분비조절에 영향을 미친다면 이에 관한 기전을 구명하고 4) 유지놀을 잘 희석시키며 분비를 야기하지는 약물운반체(vehicle)를 찾기 위하여 본 연구를 시행하였다.

1. 치수 조직 처리 및 관류(Superfusion)

도살된 직후 소의 치조골에서 치아를 발거한 후 치수의 생활력을 유지하기 위하여 얼음에 담겨 가능한 신속히 실험실로 운반하고 bolt cutter로 치아를 파절시켜 치수를 분리하였다. 분리된 치수를 면도날을 이용하여 1mm 크기로 절단하고 McIlwain tissue chopper(Mickle Laboratory Engineering Co. LTD, USA)를 이용하여 치수 조직을 200 μ m \times 200 μ m 입방체로 절단하였다. 치수 조직은 silicon으로 코팅된 미세관(microtubule)에 담아서 무게를 잰 후 oxygenated(95% O₂: 5% CO₂) Kreb's buffer로 채워진 2ml의 관류 챔버(chamber)에 삽입했다. 각 챔버에는 약 300~350mg의 소의 치수조직이 담기도록 하였다. 각 챔버에 담겨 있는 평균 조직의 양은 333.9 \pm 13.7mg(mean \pm S.E.; n=24)이 되게 했다. *In vitro* 관류실험(superfusion) 실험은 Hargreaves 등^{16,17,18)}에 의해 제시된 방법에 따라 37 $^{\circ}$ C의 수조에서 행해졌다. 즉 연동펌프(peristaltic pump, Manostat Inc., USA)를 이용하여 oxygenated Kreb's buffer를 340 μ l/min의 속도로 치수 조직을 관류시켰다(Fig. 2). Kreb's buffer 용액은 NaCl(135mM), KCl(3.5mM), MgCl₂(1mM), Hepes(10mM), NaH₂PO₄(1mM), CaCl₂(2.5mM), NaHCO₃(2.5mM), dextrose(3.3mM), bovine serum albumin(0.1%), ascorbic acid(0.1mM), Thiorphan(0.01mM)으로 구성되게 하였다. Kreb's buffer의 pH는 관류 과정 동안 pH 7.4로 일정하게 유지시켰다. 안정적인 baseline을 얻기 위하여 77분간 조직표본을 관류하여 wash-out시킨 후 Kreb's buffer가 챔버의 바닥에 채워지고, 밖으로 흘러나오는 관류액을 각 fraction 당 각 7분 씩 fraction collector(Gilson FC 203, USA)를 이용하여 수집하였다. 유지놀을 용해시켜 치수조직에 적용하기 위한 약물 운반체로써 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin(RBI, USA)을 Kreb's buffer에 0.015%, 0.02%, 0.15% 및 5% 농도로 희석시켰다. 치수조직에 관류시켰다. 유지놀의 치수로부터 iCGRP의 유리에 미치는 영향을 구명하고 dose-response 관계를 알기 위해서 Kreb's buffer내에 용해된 0.02% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin(Fig. 3)에 유지놀(Sigma Co., U.S.A.)을 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M 및 1.0mM 농도로 희석시켰으며 7번째 및 8번째 fraction에서 각 농도의 유지놀을 치수조직에 가하여 관류액을 수집하였고, 치수조직의 반응 및 치수 조직의 생사를 판단하기 위하여 capsaicin(Sigma Co., USA)을 100% 에탄올에 용해시킨 후 Kreb's buffer에 다시 희석하여 최종 농도가 100 μ M (에탄올의 최종 농도는 0.17%)이 되게 한 후 13번째 및 14번째

째 fraction에서 capsaicin을 치수조직에 가하여 관류액을 수집하였다. 매 fraction 마다의 관류액은 12 × 75mm 크기의 borosilicate 시험관을 이용하여 수집하였다.

2. 면역방사선분석(radioimmunoassay)에 의한 iCGRP의 정량:

수집된 관류액은 면역방사선분석법에 의해 iCGRP을 정량하였다. CGRP antiserum (MI-2, provided by Dr M. Iadarola)은 CGRP의 C-terminal에 부착하지만 cholecystokinin, neuropeptide Y 혹은 FMRF-amide peptide 같은 유사한 C-terminal residue와는 교차 반응하지 않았다. 실험 직후 수집된 관류액의 각 fraction의 시험관에 MI-2 antiserum(1:200,000 CGRP antiserum) 100μl을 첨가하고 시험관을 vortex상에서 잘 선회시킨 후 4℃에서 배양시켰다. 배양 48시간 후 [¹²⁵I]-TyrCGRP₂₈₋₃₇(대략 20,000-25,000cpm)의 100μl와 ferric bead가 부착된 goat anti-rabbit antisera(Advanced Magnetics Inc.)

50μl를 시험관에 첨가하고 vortex에서 선회시킨 후 4℃에서 배양하였다. 배양 48시간 후 magnetic rack (Perspective Diagnostics, Cambridge, Ma) 내에 30분 동안 각 시험관을 삽입시켜 면역침강 반응물(immunoprecipitated reaction products)이 자력에 의해 시험관 벽에 부착되도록 한 후 면역침강되지 않은 액체(관류액)는 진공 흡입기를 이용하여 시험관으로부터 제거하고 면역침강반응물은 감마 카운터(gamma counter: Wallac, Inc., USA)로 방사선량(cpm)을 측정하였다. 면역방사선분석시 비특이성 효과를 배제하기 위해서 각 약물의 농도를 포함하고 있는 Kreb's buffer로 표준곡선 (standard curve)을 만들었으며 Logit-log 분석법을 이용하여 iCGRP의 양을 계산하였다. 비평형조건(non-equilibrium condition)하에서 면역방사선분석을 위한 최소 측정 한계치(minimum detection limit)는 각 시험관 당 1~3 fmol이었으며 각 시험관 당 10~30 fmol 사이에서 50% displacement를 보였다.

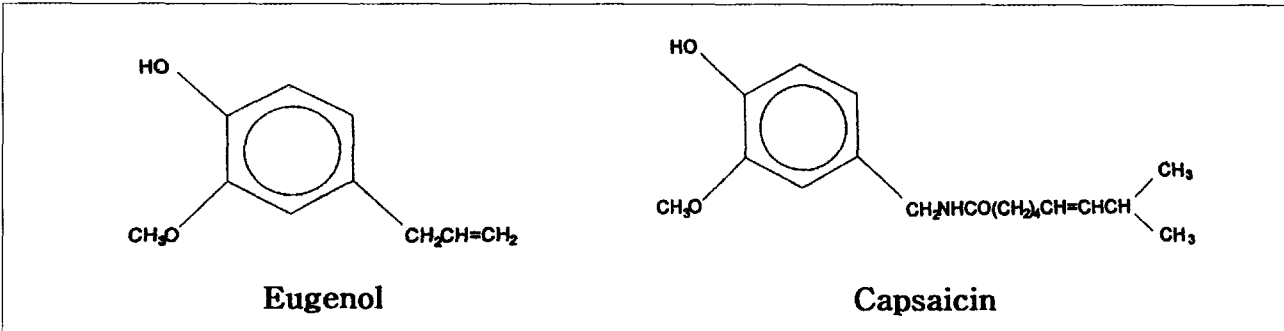


Fig. 1. Chemical structures of eugenol and capsaicin. They have a similar phenolic structure.

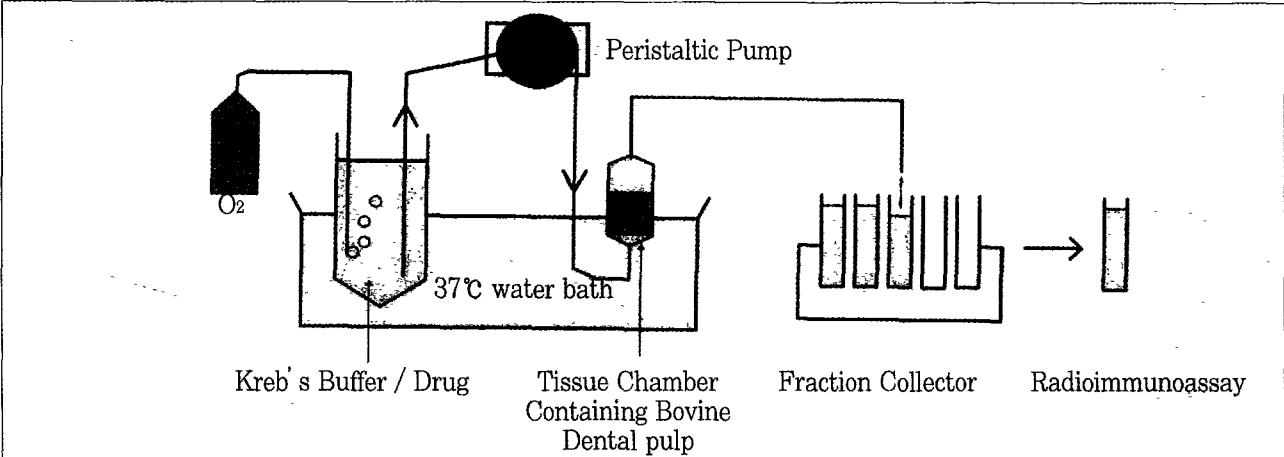


Fig. 2. Superfusion Setup. The chopped bovine dental pulp was loaded in a superfusion chamber (2ml) and placed in a waterbath (37℃). Oxygenated Kreb's buffer was pumped through the system (flow rate ≈ 340 L/min) and collected in 7 min fractions. Fractions were subjected to radioimmunoassay using polyclonal antiserum against CGRP.

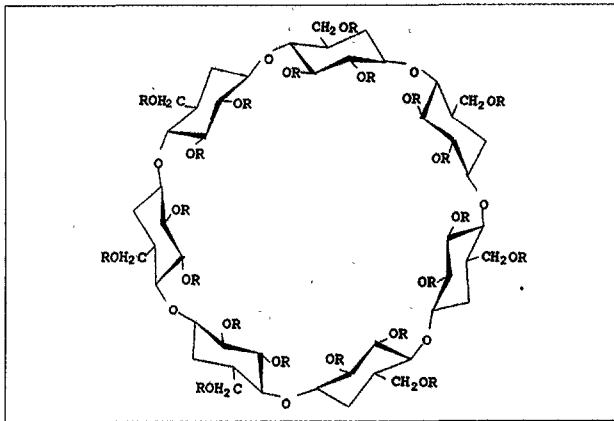


Fig. 3. Chemical structure of 2-(hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. Cyclodextrin is a group of homologous cyclic oligosaccharides which increase apparent aqueous solubility of various medicinal agents through noncovalent inclusion complexation.

3. 통계처리:

각 군간의 iCGRP의 분비량을 비교하기 위하여 one way ANOVA 및 Student's-t 검정을 시행하였다.

III. 연구 결과

Fig. 4는 소의 치수로부터 iCGRP 분비에 대한 약물 운반체인 2-hydroxyl- β -cyclodextrin의 영향을 나타내고 있다. 2-hydroxyl- β -cyclodextrin을 Krebs' s buffer에 0.015%, 0.02%, 0.15%, 1.5% 및 5% 농도로 용해시켜 치수 조직에 관류시킨 결과 분비된 iCGRP량 각각 22.21 ± 3.13 fmol, 13.4 ± 3.20 fmol, 19.18 ± 1.59 fmol, 23.7 ± 3.94 fmol 및 25.0 ± 5.23 fmol을 나타냈다. 약물을 가하지 않고 Krebs' s buffer만 소의 치수에 관류시켰을 때 자연히 분비되는 baseline은 iCGRP량은 19.74 ± 3.80 fmol, 12.48 ± 4.10 fmol, 14.53 ± 2.49 fmol, 15 ± 3.41 fmol 및 12.65 ± 1.74 fmol을 보였다. 0.015% 및 0.02%의 2-hydroxyl- β -cyclodextrin은 iCGRP의 분비에 있어서 baseline과 유의한 차이를 나타내지 않았으나 0.15% ($p < 0.05$), 1.5% 및 5% ($p < 0.01$)의 2-hydroxyl- β -cyclodextrin은 baseline에 대해 유의성 있는 증가를 나타냈다.

Fig. 5는 소의 치수로부터 iCGRP 분비에 대한 유지놀의 영향을 나타내는 도표이다. 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M 및 1.2mM의 유지놀을 77분 wash-out한 다음 7과 8번째 fraction에서 소 치수조직에 적용하였다. Vehicle과 유지놀 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M 및 1.0mM 네개의 다른 농도를

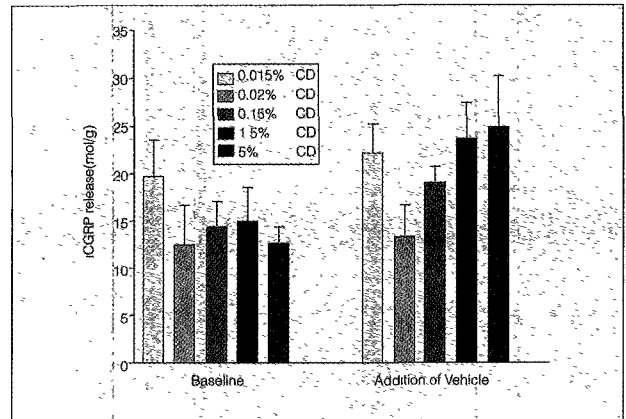


Fig. 4. Effect of vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) on iCGRP release from bovine dental pulp. (Fraction 7, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ vs baseline, $n = 7-8$ /group, error bar = S.E.M).

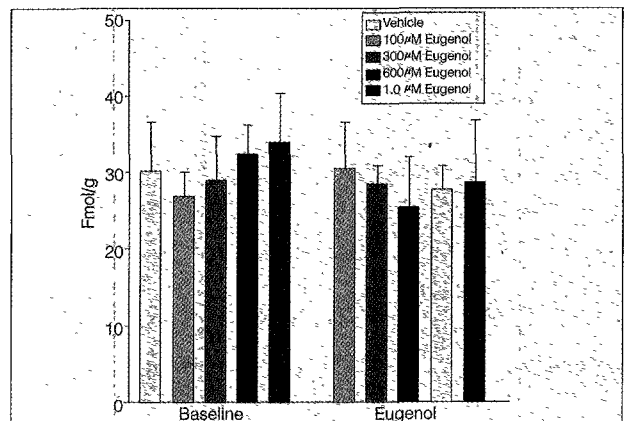


Fig. 5. Evaluation of effect of Eugenol on spontaneous iCGRP release from bovine dental pulp. $n = 7-11$ /group, Error bar = S.E.M, $p = 0.05$

가했을 때 분비되는 iCGRP량은 30.54 ± 6.18 fmol/g, 28.54 ± 2.37 fmol/g, 25.39 ± 6.74 fmol/g, 27.91 ± 2.95 fmol/g 및 28.88 ± 7.92 fmol/g을 나타냈고 자발적으로 분비되는 baseline의 iCGRP량은 각각 30.12 ± 6.50 fmol/g, 26.93 ± 3.11 fmol/g, 29.05 ± 5.74 fmol/g, 32.45 ± 3.81 fmol/g 및 34.09 ± 6.49 fmol/g을 보여 baseline과 유지놀에 의한 분비량 사이에는 통계학적 유의한 차가 없었다. 이와 같은 결과는 유지놀이 말초 신경말단에 자발적으로 일어나는 iCGRP 분비에 대해 어떤 영향도 주지 않음을 나타낸다.

Fig. 6은 소의 치수로부터 iCGRP 분비에 대한 capsaicin의 영향을 나타내는 도표이다. 자발적으로 일어나는 iCGRP 분비의 baseline은 25.97 ± 2.3 fmol/g을 보였으며 100 μ M capsaicin은 91.93 ± 7.80 fmol/g을 분비하여

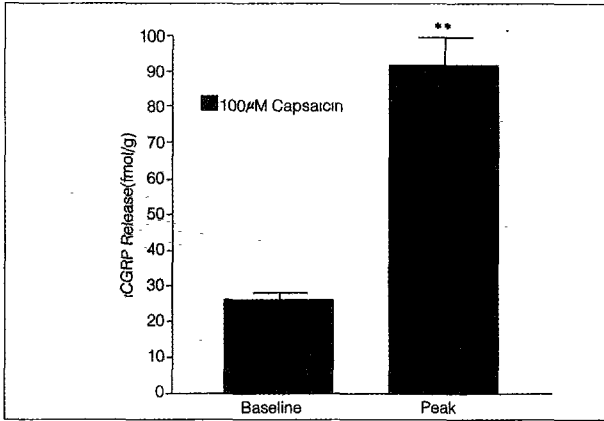


Fig. 6. Effect of 100 M capsaicin on iCGRP release from bovine dental pulp. (** $p < 0.01$, error bar = S.E.M. $n = 8$)

100µM capsaicin이 baseline에 대해 2.5배의 iCGRP 분비를 증가시켰다($p < 0.01$).

Fig. 7은 소의 치수로부터 capsaicin에 의해 야기되는 iCGRP 분비에 대해 유지놀이 미치는 영향에 대한 도표를 나타내고 있다. 100µM capsaicin, 600µM 유지놀+100µM capsaicin 및 600µM 유지놀을 7과 8번째 fraction에서 치수조직에 가하였으며 치수조직의 생존 여부를 확인하기 위해서 13과 14번째 fraction에서 100µM capsaicin을 가하였다. 100µM capsaicin 단독으로 조직에 가했을 때는 약 91.93 ± 7.78 fmol이 분비되었고 100µM capsaicin과 함께 600µM 유지놀을 조직에 가한 경우에는 68.84 ± 12.22 fmol이 분비되었으며, 600µM 유지놀 단독은 baseline과 차이가 나지 않았다. 결과적으로 600µM 유지놀이 100µM capsaicin의 의해 야기되는 iCGRP 분비를 40% ($153.4 \pm 41.1\%$ vs $258.9 \pm 21.7\%$) 이상 감소시켰다($p < 0.05$).

7번과 8번째 fraction에서 100µM capsaicin 단독으로 가한 경우와 100µM capsaicin과 함께 600µM 유지놀을 가한 경우에는 13과 14번째 fraction에서 재차 100µM capsaicin에 의해 iCGRP의 분비가 일어나지 않았는데 이는 이미 100µM capsaicin에 의해 치수조직의 신경말단이 탈감작(desensitization)되었음을 의미한다

IV. 고 찰

치수는 소성 결합조직으로서 단단한 경조직에 둘러싸여 있고 혈액의 측부순환이 부족하기 때문에 일단 해로운 자극을 받게되면 염증반응이 일어난다. 충분한 혈액 공급을 받았을 때 쉽게 회복되는 다른 구강조직과 달리 치수는 회복이 더디고 지속적인 자극에 의해 심한 염증 반응이 일어나며 결국에는 괴사에 빠지게 된다. 특히 치수에는 풍부한 구

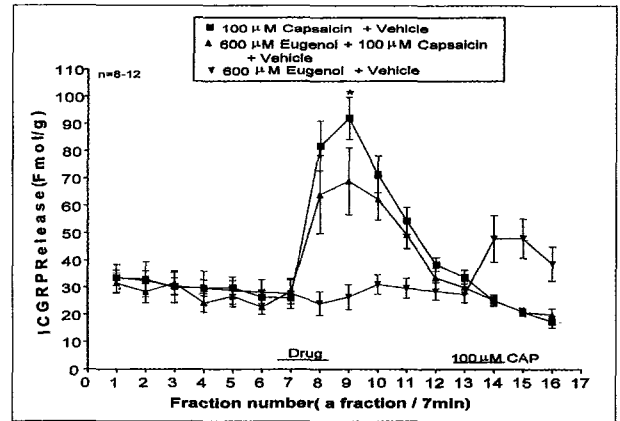


Fig. 7. Effect of eugenol on capsaicin-evoked release of iCGRP. * $p < 0.05$.

심성 감각신경 섬유와 원심성 교감신경이 분포되어 있어 자극에 대해 매우 빠르게 반응한다¹⁹. 치수는 모든 자극에 대해서 단지 동통으로만 인지하는 특이한 조직으로 알려져 있어 말초의 구심성 감각신경의 동통기전에 대한 연구에 중요한 소재가 되고 있다. 구심성 감각신경의 종말에는 CGRP나 substance P와 같은 신경펩타이드가 풍부하게 존재하고 있으며 특히 치수내에서는 CGRP가 substance P보다 17배 이상 분포되어 있다고 보고되어 있다¹⁷. K^+ , H^+ 및 capsaicin과 같은 자극제나 염증반응시 염증조직으로부터 브라디키닌, 프로스타그란딘, 히스타민 및 leukotriene 등과 같은 염증매개체에 의해서 감각신경이 감작되어 동통 유발과 함께 신경펩타이드의 분비가 증가한다^{5,18}. 따라서 면역조직화학법에 의한 CGRP나 substance P 함유 신경섬유의 발아(sprouting) 정도를 관찰하거나 면역방사선분석법(RIA)을 이용한 위의 신경펩타이드의 정량에 의해서 자극에 대한 동통반응의 강도를 추정할 수 있다^{12,13,16,17}. 소 치수의 iCGRP는 인간의 치수의 iCGRP와 유사한 면역조직화학적 염색밀도와 분포양상을 보이며, 소 치수 1g당 약 50 pmol의 iCGRP를 가지고 있고, capsaicin에 의해 iCGRP 분비가 야기되기 때문에 치수로부터 신경펩타이드의 분비 조절에 작용하는 약물 평가시에 소 치수가 *in vitro* 관류시험법에 유용한 소재임이 보고되어 있다¹⁶. 따라서 본 연구에서도 소의 치수를 관류하여 유지놀이 iCGRP 분비조절에 미치는 영향을 면역방사선분석법(RIA)을 이용하여 관찰하였다.

고농도의 유지놀이 치수에 직접 도포되면 세포성장을 억제하거나 세포사멸을 유발하는 등의 세포독성을 야기하며 염증부위에서 중성구로부터 superoxide의 분비를 촉진시켜 조직손상을 증가시키며^{20,21} 상대적으로 고농도인 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ mol의 유지놀의 경우 살균작용을 지니고 있다고 보고되어 있다²². 저농도의 유지놀(즉 산화아연유지놀 세멘트

형태로 치아의 와동에 적용하는 경우)은 프로스타그란딘 합성, superoxide 형성, 신경활동 및 백혈구의 화학주성 (chemotaxis) 등을 억제한다²³⁾. Hume²⁴⁾는 H³-eugenol을 산화아연에 혼화한 후 대구치의 교합면 와동에 삽입하여 유리되는 유지놀의 양을 측정하되 산화아연유지놀세멘트 하방에서는 10⁻²mol을 그리고 치수강 내의 치수액에서는 10⁻⁴mol을 보였으며 1주일 동안 이 농도가 지속되었다고 했다. 또한 유지놀의 유리 정도가 산화아연/유지놀의 혼화율에 크게 영향받지 않았고 치수강과 산화아연시멘트 사이의 잔존 상아질의 두께에 의해 좌우되었다고 보고했다. 따라서 임상적으로 산화아연유지놀 시멘트가 임시충전재, 가봉재 그리고 상아질지각과민제의 탈감작제 (desensitizing agent) 등에 사용될 때는 치수에 가해지는 유지놀의 농도가 대략 10⁻⁴mol로 추정된다. 본 연구에서 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M 및 1.2mM 유지놀이 치수에 iCGRP 분비 조절에 미치는 영향을 평가한 바 어느 농도에서도 iCGRP 분비 조절에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Cyclodextrin은 링 형태의 oligosaccharide로서 내부는 소수성의 구조를 띄고 있어 오일계통의 약물이 쉽게 침투하고 외부는 친수성이 때문에 용매에 쉽게 용해되는 성질을 가지고 있기 때문에 약물전달체 (vehicle)로 많이 사용되고 있다^{25,26,27)} 유지놀은 벤젠고리를 갖는 페놀계의 약물로서 증류수에 용해되지 않고 비중이 낮아 표면에 뜨는 성질을 성질을 가지고 있어 저농도로 희석시키기 어렵다. 본 연구에서는 0.02%의 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin내에 유지놀이 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M 및 1.2mM 농도로 쉽게 용해되어 소의 치수 조직에 적용시킬 수 있었으며 따라서 효과적인 유지놀 전달체로서 이용될 수 있음을 시사하였다. 효과적인 약물전달체로서 사용되기 위해서 세포독성을 나타내지 않아야 하기 때문에 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin을 소의 치수에 가하여 iCGRP 분비에 미치는 영향을 평가할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 0.015%, 0.02%, 0.15%, 1.5% 및 5% 농도를 관류시켜 본 결과 0.02% 및 0.015% 농도에 의한 iCGRP 유리가 baseline과 차이가 나지 않았으나 0.15% 농도 이상에서는 농도가 증가함에 따라 iCGRP 유리가 증가됨을 알 수 있었는데 이는 0.02% 농도 이하의 cyclodextrin은 세포막의 용해를 유발하지 않으면서 유지놀의 약물전달체로서 유용한 제제임을 나타냈다.

Capsaicin은 말초의 일차 구심성 감각신경을 자극하여 신경펩타이의 분비 및 동통을 유발하는 것으로 알려져 있다. 구심성 감각섬유에는 capsaicin 수용체 (혹은 vanilloid 수용체)가 존재하고 있어 이 수용체가 자극 받게되면 양이온 채널이 개방되고 칼슘이온과 Na⁺ 이온이 신경내로 침투하여 탈분극이 시작되며 임펄스가 중추신경에 전달된다. 특히 신경세포내 침투한 칼슘이온이 신경펩타이드를 분비한

다^{28,29)}. 일차 구심성 신경에 대한 capsaicin의 작용기전에 대한 연구는 선택적인 capsaicin 수용체에 의해 경쟁적으로 길항 작용하는 benzazepine 유도체인 capsazepine에 의해 많이 수행되고 있다³⁰⁾. Capsaicin과 유지놀은 유사한 페놀 구조의 화학구조식을 가지고 있다는 것이 매우 흥미롭다. Patachinni 등⁵⁾은 유지놀이 쥐 방광의 말초감각 신경에서 capsaicin과 같은 작용을 발휘한다고 보고했고, Ohkubo와 Kitamura³¹⁾도 유지놀이 쥐의 DRG (dorsal root ganglion) 신경세포내로 Ca²⁺ 침투를 활성화시킨다고 하여 유지놀과 capsaicin이 구심성 감각신경에 대해 같은 기전으로 작용한다고 주장하였다. 또한 capsaicin과 유지놀이 다형 침해수용 뉴런과³²⁾, 치수 및 척수에서³³⁾ substance P 분비를 야기했다고 보고하였다. 본 연구에서도 100 μ M capsaicin이 약물처리를 하지 않았을 때 분비되는 baseline에 비해 2.5배정도 분비를 증가시켰으며 capsaicin이 신경펩타이의 분비 및 동통을 야기하는 것을 확인할 수 있었다. Capsaicin과 유지놀은 유사한 페놀 구조 뿐만 아니라 유사한 작용도 한다는 보고^{5,33)}와 달리 임상적으로 상반되는 성질을 지니고 있기 때문에 저자들은 capsaicin에 의해 야기되는 iCGRP 분비에 유지놀이 어떻게 작용하는가를 검토해본 바 600 μ M 유지놀이 capsaicin 작용을 40% 정도 억제하는 것으로 나타났다. 이는 유지놀이 capsaicin에 민감한 신경섬유를 부분적으로 억제시키는 기전에 의해 동통을 억제시키는 것으로 생각되나 Patachinni⁵⁾과 Ohkubo 및 Kitamura³¹⁾의 연구결과와 상반되는 것으로써 유지놀과 capsaicin이 치수조직의 말초 구심성 감각섬유로부터 iCGRP 분비에 미치는 영향 및 상호작용에 대해 앞으로 많은 연구가 시행되어야 할 것이다.

IV. 결 론

치수 자극제이면서 치수신경을 진정시키는 작용을 가지는 유지놀이 치수에서 iCGRP 분비의 조절에 미치는 영향과 capsaicin에 의해 야기되는 iCGRP 분비 조절에 유지놀의 미치는 역할에 대해 평가하고 분비 조절에 영향을 미친다면 이에 관한 기전을 구명하며, 유지놀을 잘 희석시켜 조직에 잘 적용할 수 있는 바람직한 약물운반체 (vehicle)를 찾기 위하여 살아있는 소의 치수를 200 μ m 크기로 절단하고 산소가 공급되는 Kreb's buffer에 340 μ /min의 속도로 치수 조직을 관류시켰다. 유지놀과 capsaicin 그리고 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (RBI, USA)을 치수 조직에 관류한 후 그 관류액을 면역방사선분석법에 의해 분비된 iCGRP 량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유지놀이 소의 치수로부터 iCGRP 분비에 영향을 주지 않았다.
2. 100 μ M capsaicin은 iCGRP 분비의 baseline에 대해

2.5 배 증가를 야기했다.

3. 유지놀 (600 μ M)은 capsaicin에 의해 야기된 iCGRP 분비를 40%(153.4 \pm 41.1% VS 258.9 \pm 21.7%) 이상 감소시켰다.
4. 0.02% 이하 농도인 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin이 소의 치수로부터 iCGRP분비를 야기하지 않았고 유지놀을 용해시킬 수 있는 효과적인 vehicle로 판명되었다.
이상의 결과로 보아 유지놀은 치수로부터 CGRP 분비를 야기하지는 않으나 capsaicin에 민감한 신경섬유를 부분적으로 억제시키는 기전에 의해 동통을 억제시키는 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Sneddon IB, Glew RC : Contact dermatitis due to propandid an anesthetic. *Practitioner* 211:321-323, 1973.
2. Ozeki M : The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Com Biochem Physiol* 50(C):183-191, 1975.
3. Trowbridge H, Edwall L, Panopoulos P : Effect of zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide on intradental nerve activity. *JOE* 8:403-406, 1982
4. Hirafuji M : Inhibition of prostaglandin I₂ biosynthesis in rat dental pulp by phenolic dental medicaments. *Jpn J Pharmacol* 36:544-546, 1984.
5. Patacchini R, Maggi CA : Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferent. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342:72-77, 1990
6. Olgart L, Hokfelt T, Nilsson G, Pernow B : Localization of substance P-like immunoreactivity in nerves in the tooth pulp. *Pain* 4:153-159, 1977.
7. Wakisaka S, Ichikawa H : The distribution and origin of calcitonin gene-related peptide-containing nerve fibers in feline dental pulp. *Histochemistry* 86:585-589, 1987.
8. Brodin E, Gazelius B, Olgart L, Nilsson G : Tissue concentration and release of substance P-like immunoreactivity in the dental pulp. *Acta Physiol Scand* 111:141-149, 1981.
9. Bucsecs A, Holzer P, Lembeck, F : The substance P content of peripheral tissues in several mammals. *Peptide* 4:451-455, 1983.
10. Gazelius B, Edwall B, Olgart L, Lundberg M, Hokfelt T, Fischer J : Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. *Acta Physiol Scand* 130:33-40, 1987.
11. Khayat BG, Byers MR, Taylor PE, Mecifi K, Kimberly CL : Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin-gene related peptide immunocytochemistry. *JOE*, 14:577-587, 1988.
12. Kimberly CL, Byers MR : Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anatomical Record* 222:289-300, 1988.
13. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL : Effect of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *JOE* 16:78-84, 1990.
14. Kim S : Pulpal inflammation resulting from restorative procedures has a neurogenic origin. [Abstract] *J Dent Res* 70:451, 1991.
15. Lundbad L, Saria A, Lundberg JM, Anggard A : Increased vascular permeability in rat nasal mucosa induced by substance P and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. *Acta Otolarygol Stockh* 96:479-484, 1983.
16. Hargreaves KM, Bowles WR, Garry MG : Evaluation of the release of immunoreactive CGRP from peripheral tissue using an in vitro superfusion method. [Abstract] *Soc Neurosci* 17:1371, 1991.
17. Hargreaves KM, Bowles WR, Garry MG : An in vitro method to evaluate regulation of neuropeptide release from dental pulp. *JOE* 18:597-600, 1992.
18. Hargreaves KM, Swift J, Rozkowski MT, Bowles WR, Garry MG, Jackson DL: Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78:503-510, 1994.
19. Fristad I : Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. *Acta Odontol Scand* 55:236-254, 1997.
20. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S : Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73:729-737, 1992.
21. Suzuki Y, Sugiyama K, Furuta H : Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. *Jpn J Pharmacol* 39:381-386, 1985.
22. Cox C : Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. *Oper Dent* 12:146-151, 1987.
23. Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Tagai N : Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res* 65:53-56, 1986.
24. Hume WR : An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc-oxide mixtures. *J Dent Res* 63:881-884, 1984.
25. Rajewski GA, Traiger G, Bresnhan J, Jaberaboansari P, Stella VJ, Thompson DO : Preliminary safety evaluation of parentally administered sulfoalkyl ether β -cyclodextrin derivatives. *J Pharmaceut Sci*. 84:927-932, 1995.
26. Barrow PC, Oliver P, Marzin D : The reproductive and developmental toxicity profile of beta-cyclodextrin in rodents. *Reprodu Toxicol* 9:389-397, 1995.
27. Gerloczy A, Hosino T, Pitha J : Safety of oral cyclodextrins: effects of hydroxypropyl cyclodextrins, cyclodextrin sulfates and cationic cyclodextrins on steroid balance in rats. *J Pharmaceut Sci* 83:193-196, 1994.
28. Santiciolli P, Bianco ED, Figini M, Bevan S, Maggi CA : Effect of capsazepine on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity(CGRP-LI) induced by low pH, capsaicin and potassium in rat soleus muscle. *Br J Pharmacol* 110:609-612, 1993
29. Wood JN, Winter J, James LF, Rang HP, Yeats J, Bevan S: Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 8:3208-3220, 1988.
30. Bevan S, Hothi S, Huges G, James LF, Rang HP, Shah K : Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107:544-552, 1992.
31. Ohkubo T, Kitamura K : Eugenol activates Ca²⁺-permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J Dent Res* 76:1737-1744, 1997.
32. Bevan SJ, Szolcsanyi J : Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and applications. *Trends Pharmacol Sci* 11:330-333, 1990.
33. Shibata M, Ohkubo T, Tsuruda K, Takahashi H. Mode of analgesics action of phenolic dental medicaments through substance P release. *JPN J Oral Biol* 36:49-59, 1994.