

척수통증과민반응에서 Glutamate의 역할에 대한 분자생물학적 연구

— 포르말린 시험에서의 NMDAR과 mGluR5의 변화 —

부산대학교 의과대학 마취과학교실, *생리학교실

김 해 규 · 정 진 섭* · 백 승 완

= Abstract =

Molecular Biologic Study on the Role of Glutamate in Spinal Sensitization

Hae-Kyu Kim, M.D., Jin-Sup Jung*, and Seong-Wan Baik, M.D.

Departments of Anesthesiology and *Physiology, College of Medicine,
Pusan National University, Busan, Korea

Background: Subcutaneous injection of 5% formalin into the hind paw of the rat produces a biphasic nociceptive response. The second phase depends on changes in the dorsal horn cell function that occur shortly after an initial C-fiber discharge, spinal sensitization, or windup phenomenon. This study was performed to investigate the role of glutamate during spinal sensitization.

Methods: Sprague-Dawley rats weighing 200 to 250 g were used for this study. Under light anesthesia (0.5% isoflurane) the rats were segregated in a specially designed cage and 50 μ l 0.5% formalin was injected subcutaneously in the foot dorsum of right hindlimb. Forty minutes after the formalin injection, the rat was quickly decapitated and spinal cord was removed. The spinal segments at the level of L3 (largest area) was collected and stored in a deep freezer (-70°C). The mRNA gene expression of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) and the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) were determined by the polymerase chain reaction.

Results: The number of flinches was $19.8 \pm 2.3/\text{min}$. at one minute after formalin injection and decreased to zero after then. The second peak appeared at 35 and 40 minutes after formalin injection. The values were 17.8 ± 2.2 and $17.2 \pm 3.0/\text{min}$. The mRNA gene expressions of NMDAR and mGluR5 were increased by $459.0 \pm 46.8\%$ ($P < 0.01$) and $111.1 \pm 4.8\%$ ($P > 0.05$) respectively at 40 minutes after formalin injection. The increased rate of NMDAR was significantly higher than that of mGluR5 ($P < 0.01$).

Conclusions: From these results, it suggested that NMDAR partly contributed to the mechanism of central sensitization after the formalin test but mGluR5 did not.

Key Words: Central sensitization, Formalin test, mGluR5, NMDAR, Spinal cord

서 론

신경병증성 통증의 발생은 그 유형에 따라 서로 다른 여러 가지 경로를 통하여 발생된다고 알려져 있다. 열성 감각항진은 C형 신경섬유에 의하여 매개되고 척수의 아편양 수용체에 의하여 차단될 수 있으며, 촉각성 이질통의 경우는 A β 형 신경섬유에 의하여 매개되며 척수의 아편양 수용체와는 잘 연관되지 않는다고 한다.¹⁾

포르말린에 의한 통증 모델은 백서의 발에 포르말린을 피하 주사하여 말초신경조직 손상을 일으켜 중추 감각으로 인한 감각항진의 전형적 모델로 널리 사용되고 있다.^{2,3)} 포르말린 주사 후 즉시 나타나서 수분간 지속되는 발을 터는 동작(flinching)(제1상), 그후 한동안 잠잠하다가 다시 flinching이 생겨(제2상) 40분이나 그 이상 지속되는 이상반응(biphasic reaction)을 거의 항상 보인다. 제2상 반응은 자극 후 즉시 생기는 C형 신경섬유의 활동에 의해 야기되는 척수의 통증반응 전달의 촉진에 의해 발생한다.^{4,5)} 제2상 반응이 나타나는 시기에 척수에서 증가되는 glutamate와 aspartate 등의 흥분성 아미노산들은 구심성 섬유에 의한 후각세포의 활성화에 관계하는 주요 통증 전달 물질이다.

척수 후각의 N-methyl-D-aspartate 수용체(NMDAR)는 정상적으로는 구심성 섬유에서 유리되는 흥분성 아미노산에 반응하지 않는다. 그러나 반복적인 유해 자극 후에는 이들 수용체들도 자극되어 일련의 세포내 반응을 야기하게 되고 뒤따르는 감각 자극에 대한 반응까지도 강화시키고 연장시킨다.^{6,8)}

이와 같은 통증에 대한 감각, 즉 유해 자극에 대한 척수 후각세포의 반응의 증가가 포르말린 점사시의 제2상 반응을 일으키는 것으로 생각된다.¹⁰⁾ 사람에게 있어서도 술 후 통증의 많은 임상 양상들이 후각신경세포의 흥분에 의한 척수 감각에 기인하는 것으로 여겨지고 있다.¹¹⁾

이 연구 목적은 흰쥐의 척수에서 제2상 반응 즉 중추 감각이 발생하는 동안 glutamate의 역할을 알기 위하여 척수후각에서 포르말린 말초 주입이 NMDAR과 metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5)의 활동에 어떤 변화를 주는지를 알아보기 위하여 시행하였다.

대상 및 방법

체중 200-250 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 15마리를 대상으로 하였으며 이들 실험동물은 실험기간 동안에 자유로이 먹이와 물을 먹게 하였다.

흰쥐를 안정시킨 상태에서 움직이지 못하도록 하기 위하여 단두대가 설치된 통속에 넣은 채 0.5 vol%의 isoflurane으로 가벼운 진정상태를 유도하였다. 흰쥐가 안정상태에 접어들어 더 이상 과도하게 움직이지 않고 있을 때 바깥으로 나온 흰쥐의 우측 뒤쪽 다리의 발등에 0.5% 포르말린 50 μ l를 피하 주사하였다. 이후 flinching을 관찰하면서 포르말린 주사 후 첫 5분간은 매분간 flinch 횟수를 세어 기록하였으며 그 후는 매 5분마다 1분간씩 flinch 횟수를 관찰하였다. 척수조직을 채취하기 위한 시기 결정을 위하여 흰쥐 5마리는 주사 후 60분까지 flinch 횟수를 관찰하였다. 그리고 나머지 10마리는 중추 감각이 일어난 시기의 glutamate 수용체의 변화를 관찰하기 위하여 앞선 5마리의 시험결과에 의거하여 포르말린 피하주사 후 40분에 flinch 횟수가 계속 증가하는 제2상의 중간에 들어서는 것을 확인하고 단두대를 이용하여 신속하게 단두한 후 요부 척추간에 50 ml주사기로 생리식염수를 빠르게 주입하여 척수를 재빨리 배출시켜 얻었다. 가장 굵은 요부의 척수부위에서 아래쪽으로 1 cm까지의 척수를 분리 절개하고 다시 포르말린 주입 측과 반대측으로 양분한 후 -70°C의 냉동고에 보관하였다. 분리시킨 척수의 조직에서 이윤우의¹²⁾ 방법과 같이 각각 RNA를 추출해 내고 이를 이용하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR; 역전사 PCR)을 시행하였다. 그 방법을 약술하면 다음과 같다. 먼저 조직을 homogenization을 하여 RNA를 추출한 후 침전 및 세척하여 RNA를 분리하여 optical density를 측정하여 260 nm의 값을 280 nm의 값으로 나눈 값(P)이 $1.5 \leq P < 2.0$ 이 되어야 순수한 RNA라고 판정하여 실험에 이용하였다. NMDAR과 mGluR5의 mRNA발현을 측정하기 위하여 RT-PCR의 시행하였고 이후 증폭시키기 위하여 oligonucleotide primer와 cycling paradigm을 사용하였다. 여기에서 나타난 NMDAR과 mGluR5의 mRNA 유전자 발현의 정도변화를 포르말린이 주입된 동측과 반대측으로 비교 관찰하였다.

각 유전자 발현을 위하여 사용한 primer는 다음과 같다.

NMDAR

upstream

5'-CTG-TGG-TTG-CTA-GTA-GGA-CTG-T-3'

downstream

5'-GCA-TTC-CTG-ATA-CCG-AAC-CCA-3'

mGluR5

upstream

5'-TCC-AAT-CTG-CTC-CTC-CTA-CC-3'

downstream

5'-CAA-CGA-TGA-AGA-ACT-CTG-CG-3'

모든 측정치는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 구간 비교를 위한 통계분석은 Kruskal-Wallis test 후 Mann-Whitney test를 이용하였다. P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

포르말린을 주입한 후 나타난 흰쥐의 flinch 횟수는 첫 1분에 19.8 ± 2.3회/분으로 가장 빈번했으며 그 후 5분간에 걸쳐 그 횟수가 점차 감소하여 거의 나타나지 않게 되었다. 그러나 20분 후에 다시 flinch 이 발생하기 시작하여 35분 및 40분에 17.8 ± 2.2,

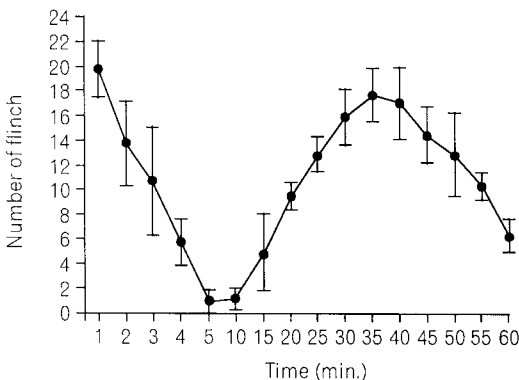


Fig. 1. This figure shows the increasing and decreasing (biphasic) pattern of the number of flinches after formalin injection at the foot dorsum of hindlimb in the preliminary study (n = 5). The peak point in second phase was appeared at thirty five and forty minutes after formalin injection.

17.2 ± 3.0회/분으로 다시 최고점을 이루고 점차 flinch 횟수가 감소하였다(Fig. 1).

Flinch가 발생한 후 중추 감각이 일어난 기간 중인

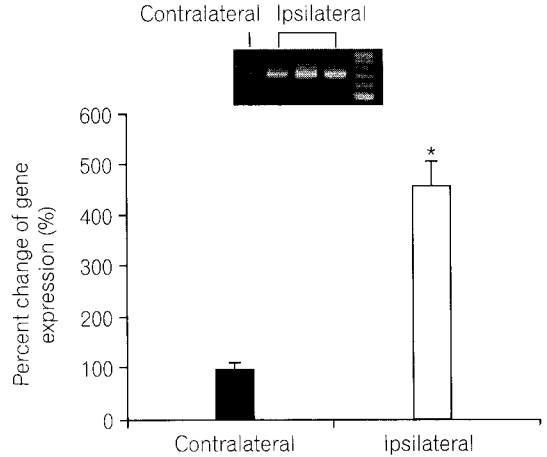


Fig. 2. The percent change of mRNA gene expression of NMDAR was measured at 40 minutes after formalin injection at the foot dorsum of hindlimb. The gene expression of NMDAR in ipsilateral side of formalin injection was significantly higher than that in contralateral side. The upper photograph was one of the results of PCR. *means P < 0.01 compared with contralateral side.

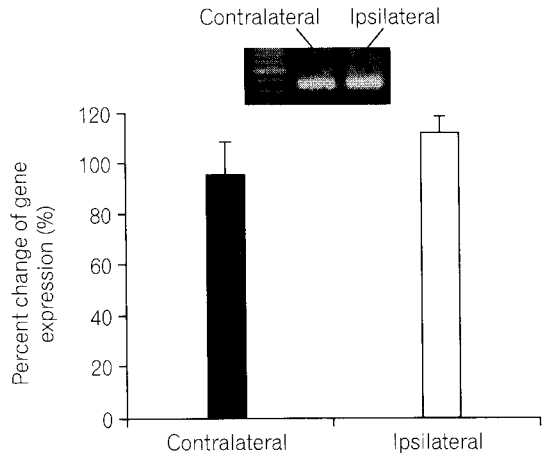


Fig. 3. The percent change of mRNA gene expression of mGluR5 was measured at 40 minutes after formalin injection at the foot dorsum of hindlimb. The gene expression of mGluR5 in ipsilateral side of formalin injection was significantly higher than that in contralateral side. The upper photograph was one of the results of PCR.

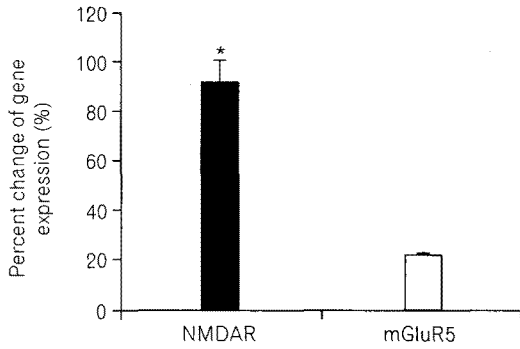


Fig. 4. The gene expression of NMDAR 40 minutes after formalin injection was significantly higher than that of mGluR5. *means $P < 0.01$ compared with the percent change of mGluR5.

포르말린 주입 후 40분에 측정된 포르말린 주입한 측의 NMDAR과 mGluR5 mRNA 유전자 발현은 포르말린을 주입받지 않은 반대측의 $97.8 \pm 15.7\%$ 에 비하여 $459.0 \pm 46.8\%$ (Fig. 2, $P < 0.01$), $111.1 \pm 4.8\%$ (Fig. 3, $P > 0.05$)의 증가폭을 보여주었다. 또한 NMDAR의 증가는 mGluR5에 비하여 유의있는 차이를 보였다 (Fig. 4, $P < 0.01$).

고 찰

수술이나 외상 등으로 조직 손상이 일어나면 말초와 중추에서 각각 통증에 대한 반응이 일어난다.¹³⁻¹⁵ 조직손상은 신경계에서 두 가지 반응 변화를 일으킨다. 하나는 말초에서 침해성 수용체의 감각으로 구심성 신경섬유의 역할을 감소시키는 것이며, 다른 하나는 척수에서 감각을 일으켜 척수신경의 흥분을 증가시키는 것이다. 이 두 가지 반응은 함께 일어나며 흔히 수술 후 통각과민 상태를 형성하게 된다.¹⁶ 말초에서의 통증에 대한 감각은 세포 내에서 K^+ 이 유리되고 bradykinin, serotonin, substance P, prostaglandin, histamine, H^+ , norepinephrine 등이 분비되어 통각수용체를 계속 자극하여 급성 통증을 야기한다. 즉 말초의 감각은 말초신경이 염증성 물질에 노출되어 통증자극의 유입이 계속되는 것이다. 중추 감각은 척수 후각의 신경세포의 과민 반응으로 A-delta와 C형 섬유에 의해 계속적으로 전달되는 통증 자극에 의해 정상적으로는 잘 활성화되지 않는 NMDA 수용체를 활성화시킴으로서 통증자극의 유입보다 더 강

하고 시간적으로도 증폭된 자극을 내게 되어 심한 통증을 야기하게 된다. 이를 wind-up현상이라고 하며 술 후 통증의 가장 중요한 원인이 된다.

최근 많은 연구가¹⁷⁻¹⁹ 이루어짐에 따라 척수에서의 중추 감각을 수술 전부터 방지함으로써 수술 후 통증을 감소시키려는 선행 진통법의 시도가 있게 되었으며 임상적으로 효과를 얻고 있다.

척수의 신경전달물질 중에서 glutamate는 중요한 것 중 하나이다. 조직에 침해성 자극을 받거나 신경 손상이 발생된 경우 척수의 표재층에서 glutamate의 분비가 증가되는데 C형 신경섬유를 자극할 때는 아주 급격히 증가하나 A형 신경섬유를 자극할 때는 변화가 없다.²⁰ 따라서 흥분성 아미노산에 의한 중추 감각은 침해성 자극에 의한 것이며 포르말린 검사에서 그 기전을 추측해 볼 수 있었다. 즉 반복적인 침해성 자극이 말초에 가해지면 일차 구심성 C-신경섬유에 의해 전달되고 척수의 시냅스전 부위에서 여러 가지 신경전달물질이 분비되는데 흥분성 아미노산 중에서는 glutamate, 펩타이드 중에서는 substance P가 대표적이다. 특히 glutamate는 non-NMDAR과 NMDAR에 작용하며 그 중 wide dynamic range neuron에 존재하는 NMDAR이 활성화되면 중추 감각의 원인이 되고 통각 과민이 발생한다. 이 연구에서도 NMDAR의 mRNA는 정상에 비하여 약 460%나 증가하여 이를 뒷받침하고 있다.

Ren과 Dubner는²¹ 중추 감각의 발생이 척수 후각 세포의 흥분성이 증가되어서 발생한다고 하였다. 이 과정은 NMDAR에서 전압 의존성으로 통로가 마그네슘에 의해 차단되고 있는 것이 처음 신경세포가 탈분극되어 마그네슘이 제거된 후 신경세포 내로 칼슘이 유입되고 NMDAR이 인산화되고 세포의 흥분성이 변하고 시냅스의 힘이 증가되는 일련의 과정을 밟아간다고 하였다. 여기에 통증의 악순환설을 적용할 수 있는데 NMDA수용체가 glutamate에 의해 활성화되면 칼슘이온을 매개로 한 nitric oxide 및 prostaglandin의 합성이 연속적으로 촉진되며 이들은 통증 전달물질로 작용하고 이는 다시 일차 구심성 신경원의 시냅스에서 신경전달물질의 분비를 증강시킨다. 이러한 악순환에 의하여 WDR neuron에서 전기적 증폭이 발생하고 통증에 대한 역치는 낮아짐으로써 통증 전달과정의 변형이 일어나는 것이며 임상적으로 통각과민으로 나타난다.²²

좌골신경 손상 후 glutamate와 같은 흥분성 아미노산이 증가하는 것이 뇌척수액의 미세투석에 의해 구체적으로 입증되었고 통각 과민이 흥분성 아미노산의 증가에 맞추어 나타나는 것으로 보아 신경손상에 의한 통각과민은 포르말린 검사에서 나타나는 통각과민과 비슷한 중추 감각에 의한 기전으로 해석될 수 있다.²³⁾ 따라서 신경손상 후 흥분성 아미노산활성이 이질통 발현에 중요한 역할을 한다면 NMDA 길항제에 의해 이질통이 예방될 수 있으리라 추측된다.

Glutamate에 의한 신경전달이 이렇듯 포유동물의 척수에서 중요한 역할을 가지고 있으며 흥분성 독성과의 관련성도 잘 알려져 있다.^{24,25)} 이와 같은 glutamate의 작용은 양이온을 위한 이온통로를 포함하면서 빠른 신경흥분을 일으키는 ionotropic glutamate receptors (iGluRs)와 guanine nucleotide-binding protein과 결합하여 조정반응을 일으키는 mGluRs에 의하여 매개된다.²⁶⁾

흰쥐의 척수에서 통증과 연관이 있는 laminae I과 II부위에 Vidnyanszky 등은²⁷⁾ mGluR5가 많이 나타난다고 하였다. 이는 분포 위치에 의거할 때 mGluR5가 통증에 관련된 신경전달에 어떤 작용을 나타낸다고 연관지어 볼 수가 있다. 또한 Schoepp 등은²⁸⁾ 흰쥐에서 mGluRs 중 제1군에 대한 작동제인(RS)-3, 5-dihydroxy-phenylglycine을 사용하여 자발적인 통증 행동(spontaneous nociceptive behaviors; SNB)을 나타내게 하였으며, Fisher와 Coderre는^{29,30)} 이렇게 유발된 SNB가 길항제인 α -methyl-carboxy-phenylglycine을 사용하면 감소된다는 것을 보고하였다. 즉, 제1군의 mGluR는 glutamate의 유리를 조장하여 신경병증 통증의 발생에 기여하는 것으로 생각되어진다.

다만 Fundytus 등은³¹⁾ 항 mGluR5 IgG를 사용하였을 때 급성 열성자극이나 formalin에 의한 자극에 대한 민감도가 감소되지는 않았다고 하여 제1군의 mGluRs가 모든 형태의 통증을 느끼는데 관여하는 것은 아니라고 하였다. 이와 같은 주장은 이 연구의 결과에서도 알 수 있는데 포르말린에 의한 통증발생에 있어서 mGluR5 mRNA유전자 발현이 약 110%의 증가만을 가져왔으며 또한 통계적으로 유의있는 변화가 아니었다. 이와 같은 결과는 이윤우의¹²⁾ 연구와도 상반된다. 그러나 Chung모델이나 Bennett모델에서와 같이 mGluR5의 증가가 나타나는 신경병증성 통증 모델은 주로 만성 통증의 모델로 인정되어 있

다. 즉 신경병증성 통증을 유발시키는 원인이 발생한 후 어느 정도 시간이 지난 후에 발생하는 형태로서 이번 연구에서 다룬 것과 같이 원인발생에서 1시간 이내의 현상들이 아니므로 mGluRs가 뒤늦게 작용을 하고 있지 않는가 추측된다.

이상과 같은 연구 결과에 의하면 포르말린에 의한 급성 신경자극에 의하여 NMDA수용체는 척수 감각이 일어나는 시기에 활발한 활동을 하여 척수 감각 발생기전에 어떠한 형태로든 일조를 하는 것으로 판단되며, mGluR5는 척수 감각 발생에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, Porreca F: Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 909: 12-24.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R: Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-8.
- Dubuisson D, Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-74.
- Schouenborg J, Dickenson A: Long-lasting neuronal activity in rat dorsal horn evoked by impulses in cutaneous C fibers during noxious mechanical stimulation. *Brain Res* 1988; 439: 56-63.
- Woolf CJ: Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 1983; 306: 686-8.
- Woolf CJ, Thompson SW: The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; 44: 293-9.
- Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH: Evidence for spinal N-methyl D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res* 1990; 518: 218-26.
- Yamamoto T, Yaksh TL: Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK 801, an NMDA antagonist, in the formalin test in the rat. *Anesthesiology* 1992; 77: 757-63.
- Namiki A, Collins JG, Kitahata LM: Effects of halothane on spinal neuronal responses to graded noxious

- heat stimulation in the cat. *Anesthesiology* 1980; 53: 475-80.
10. Dickenson AH, Sullican AF: Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987; 30: 349-60.
 11. McQuay HJ, Carroll D, Moore RA: Postoperative orthopedic pain: the effect of opiate premedication and local anesthetic blocks. *Pain* 1988; 33: 291-5.
 12. 이윤우: 신경결찰로 인한 이질통에서 metabotropic glutamate 5형 수용체의 변화에 대한 연구. *대한통증학회지* 1995; 12: 8-15.
 13. Woolf CJ, Chong MS: Preemptive analgesia-treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg* 1993; 77: 362-79.
 14. Sandler AN: *Anesthesiology clinics of north America: current concepts in acute pain control*. Philadelphia: WB Saunders. 1992; pp 211-28, 247-69.
 15. 송선옥: 술후 통증관리의 접근. *대한통증학회지* 1995; 8: 1-7.
 16. Woolf CJ, Chong MS: Pre-emptive analgesia treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg* 1993; 77: 362-79.
 17. Rang SN, Bevans S, Dray A: Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br Med Bull* 1991; 47: 534-8.
 18. Coderre TJ, Melzack R: The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 1992; 12: 3665-70.
 19. Tverskoy M, Oz Y, Isakson A, Finger J, Bradley EL Jr, Kissin I: Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. *Anesth Analg* 1994; 78: 205-9.
 20. Al-Ghoul WM, Li Volsi G, Weinberg RJ, Rustioni A: Glutamate immuno-cytochemistry in the dorsal horn after injury or stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res Bull* 1993; 30: 453-9.
 21. Ren K, Dubner R: Central nervous system plasticity and persistent pain. *J Orofac Pain* 1999; 13: 155-63.
 22. Yaksh TL: The spinal pharmacology of facilitation of afferent processing evoked by high threshold afferent input of the post injury pain state. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 250-6.
 23. Marsala M, Yang LC, Lee YW, Yaksh TL: Chronic nerve compression results in a delayed but persistent increase in spinal glutamate release in the unanesthetized rat. 8th World Congress on Pain. Vancouver, IASP Press. (Abstracts) 1996, p 240.
 24. Young MR, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Munro FE: Evidence for a role of metabotropic glutamate receptors in sustained nociceptive inputs to rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacology* 1994; 33: 141-4.
 25. Young MR, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Dickinson T: The involvement of metabotropic glutamate receptors and their intracellular signalling pathways in sustained nociceptive transmission in rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1033-41.
 26. Nakanishi S: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258: 596-603.
 27. Vidnyanszky Z, Hamori J, Negyessy L, Ruegg D, Knopfel T, Kuhn R, et al: Cellular and subcellular localization of the mGluR5a metabotropic glutamate receptor in rat spinal cord. *Neuroreport* 1994; 6: 209-13.
 28. Schoepp DD, Goldsworthy J, Johnson BG, Salhoff CR, Baker SR: 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem* 1994; 63: 769-72.
 29. Fisher K, Coderre TJ: The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* 1996; 68: 255-63.
 30. Fisher K, Coderre TJ: Comparison of nociceptive effects produced by intrathecal administration of mGluR agonists. *Neuroreport* 1996; 7: 2743-7.
 31. Fundytus ME, Fisher K, Dray A, Henry JL, Coderre TJ: In vivo antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats. *Neuroreport* 1998; 9: 731-5.