

## 쥐 척수후각세포의 유해자극 반응에 대한 칼슘이온통로 차단제의 억제작용

신 흥 기 · 강 석 한 · 김 기 순

한양대학교 의과대학 생리학교실 및 의과학연구소

**Calcium Channel Blockers Suppress the Responses of Rat Dorsal Horn Cell to Nociceptive Input.** Hong Kee Shin, Sok Han Kang, and Kee Soon Kim Department of Physiology, School of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Calcium ions are implicated in a variety of physiological functions, including enzyme activity, membrane excitability, neurotransmitter release, and synaptic transmission, etc. Calcium antagonists have been known to be effective for the treatment of exertional angina and essential hypertension. Selective and nonselective voltage-dependent calcium channel blockers also have inhibitory action on the acute and tonic pain behaviors resulting from thermal stimulation, subcutaneous formalin injection and nerve injury. This study was undertaken to investigate the effects of iontophoretically applied  $Ca^{++}$  and its antagonists on the responses of WDR (wide dynamic range) cells to sensory inputs. The responses of WDR cells to graded electrical stimulation of the afferent nerve and also to thermal stimulation of the receptive field were recorded before and after iontophoretical application of  $Ca^{++}$ , EGTA,  $Mn^{++}$ , verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA,  $\omega$ -conotoxin MVIIC and  $\omega$ -agatoxin IVA. Also studied were the effects of a few calcium antagonists on the C-fiber responses of WDR cells sensitized by subcutaneous injection of mustard oil (10%). Calcium ions and calcium channel antagonists ( $Mn^{++}$ , verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA &  $\omega$ -agatoxin IVA) current-dependently suppressed the C-fiber responses of WDR cells without any significant effects on the A-fiber responses. But  $\omega$ -conotoxin MVIIC did not have any inhibitory actions on the responses of WDR cell to A-fiber, C-fiber and thermal stimulation. Iontophoretically applied EGTA augmented the WDR cell responses to C-fiber and thermal stimulations while spinal application of EGTA for about 20~30 min strongly inhibited the C-fiber responses. The augmenting and the inhibitory actions of EGTA were blocked by calcium ions. The WDR cell responses to thermal stimulation of the receptive field were reduced by iontophoretical application of  $Ca^{++}$ , verapamil,  $\omega$ -agatoxin IVA, and  $\omega$ -conotoxin GVIA but not by  $\omega$ -conotoxin MVIIC. The responses of WDR cells to C-fiber stimulation were augmented after subcutaneous injection of mustard oil (10%, 0.15 ml) into the receptive field and these sensitized C-fiber responses were strongly suppressed by iontophoretically applied  $Ca^{++}$ , verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA and  $\omega$ -agatoxin IVA. These experimental findings suggest that in the rat spinal cord, L-, N-, and P-type, but not Q-type, voltage-sensitive calcium channels are implicated in the calcium antagonist-induced inhibition of the normal and the sensitized responses of WDR cells to C-fiber and thermal stimulation, and that the suppressive effect of calcium and augmenting action of EGTA on WDR cell responses are due to changes in excitability of the cell.

**Key Words:** Normal and sensitized WDR cell, C fiber responses, Thermal response, Calcium channel antagonist, Iontophoresis

## 서 론

세포내 칼슘농도의 변동은 효소의 활성화, 세포막의 흥분성, 신경전달물질의 방출 및 시냅스에서의 정보전달 등을 포함한 다수의 세포기능조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Olivera, 1994). 한편 칼슘길항제는 운동성 협심증(exertional angina) 및 본태성 고혈압(essential hypertension)의 치료제로 처방될 뿐만 아니라 진통효과도 있다는 연구결과가 이미 보고된 바 있다(Fleckenstein et al, 1985; Freedman & Waters, 1987).

열자극에 의한 급성통증(acute pain) 뿐만 아니라 formalin의 피하주사와 kaolin 및 carrageenan을 관절내에 주사하여 유발된 염증성 통증과 신경손상에 의한 통증도 칼슘길항제의 투여에 의하여 크게 경감되는 것으로 알려져 있다. Harris 등(1976)과 Iwamoto 등(1978)은 흰쥐의 측내실과 PAG(periaqueductal gray)내로  $La^{3+}$ 를 투여한 후 tail flick 및 hot plate latency의 변동을 관찰해 본 바  $La^{3+}$  투여에 의하여 latency가 길어져 진통작용이 유발되었다는 연구결과를 보고하였다. 또한 세포내 칼슘농도를 감소시키는 TMB-8과 칼슘 chelator인 EGTA 등을 뇌실내로 투여해도 tail flick latency가 용량 의존적으로 연장되며, 유발된 진통작용은 칼슘투여에 의하여 억제된다고 한다(Schmidt & Way, 1980; Welch & Dewey, 1986).  $Mn^{2+}$  및 EGTA는 행동으로 나타나는 통각반응 뿐만 아니라 receptive field(RF)의 기계적 자극에 의하여 유발된 고양이 WDR(wide dynamic range)세포의 반응도 강력하게 억제한다(Kim et al, 1991).

한편 verapamil과 diltiazem을 포함한 L-type 칼슘이온통로 차단제는 사용된 통증모델에 따라 효과가 상이한 것 같다. L-type 칼슘이온통로 차단제는 진통작용이 없다고 주장한 대부분의 연구자들은 hot plate test와 같은 급성통증모델을 이용한 반면에(Contreras et al, 1988; Horvath et al, 1990; Malmberg & Yaksh, 1994), formalin test 및 acetic acid writhing test와 같은 tonic pain model에서는 L-type 칼슘이온통로 차단제의 투여용량에 비례하여 통각반응이 억제된다는(Coderre & Melzack, 1992; Del Pozo et al, 1987; Gürdal et al, 1992) 상반된 견해가 있다. N-type의 칼슘이온통로 차단제는 formalin 및 carrageenan 피하주사에 의한 염증성 통각반응과(Diaz & Dickenson, 1997; Neugebauer et al, 1996) 신경손상에 의한 통각과민반응 및 tactile allodynia를 보다 강력하게 억제하며 일주일 이상 계속해서 투여해도 약내성이 발생하지 아니하므로 탁월한 진통효과가 유지된다고 한다(Bowersox et al, 1996; Chaplan et al, 1994; Xiao & Bennett, 1995). 또한 N-type 칼슘이온통로 차단제는 척수후근 자극에 의하여 유발된

monosynaptic 및 long-latency polysynaptic reflex도 억제한다(Bell, 1993). 그러나 P-type 칼슘이온통로 차단제인  $\omega$ -agatoxin IVA는 carrageenan 및 formalin 통각반응은 억제하지만(Malmberg & Yaksh, 1994), 제 5번 및 6번 척수 신경 손상에 의한 신경성통증에는 효과가 없는 것으로(Chaplan et al, 1994) 보고되었다. 이상의 연구결과는 세포내외의 칼슘이온농도의 변동에 따라 통각정보의 전달이 억제되거나 촉진될 수 있음을 시사한다.

또한 morphine성 물질의 진통효과는 칼슘농도변동에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. PAG와 측뇌실내로 칼슘을 투여하거나 세포내로의 칼슘이동을 촉진하는 A-23187을 투여하면 morphine,  $\beta$ -endorphine 및 meperidine의 진통효과가 억제되는 반면에(Chapman & Way, 1982; Kakunaga et al, 1966; Guerrero-Múnoz et al, 1981) EGTA,  $La^{3+}$  및 verapamil등을 포함한 L-type 칼슘이온 통로 차단제는 세포내로의 칼슘이동을 억제하여 morphine성 물질의 진통효과를 증가시킨다고 한다(Harris et al, 1976; Horvath et al, 1990; Kakunaga et al, 1966; Omote et al, 1993).

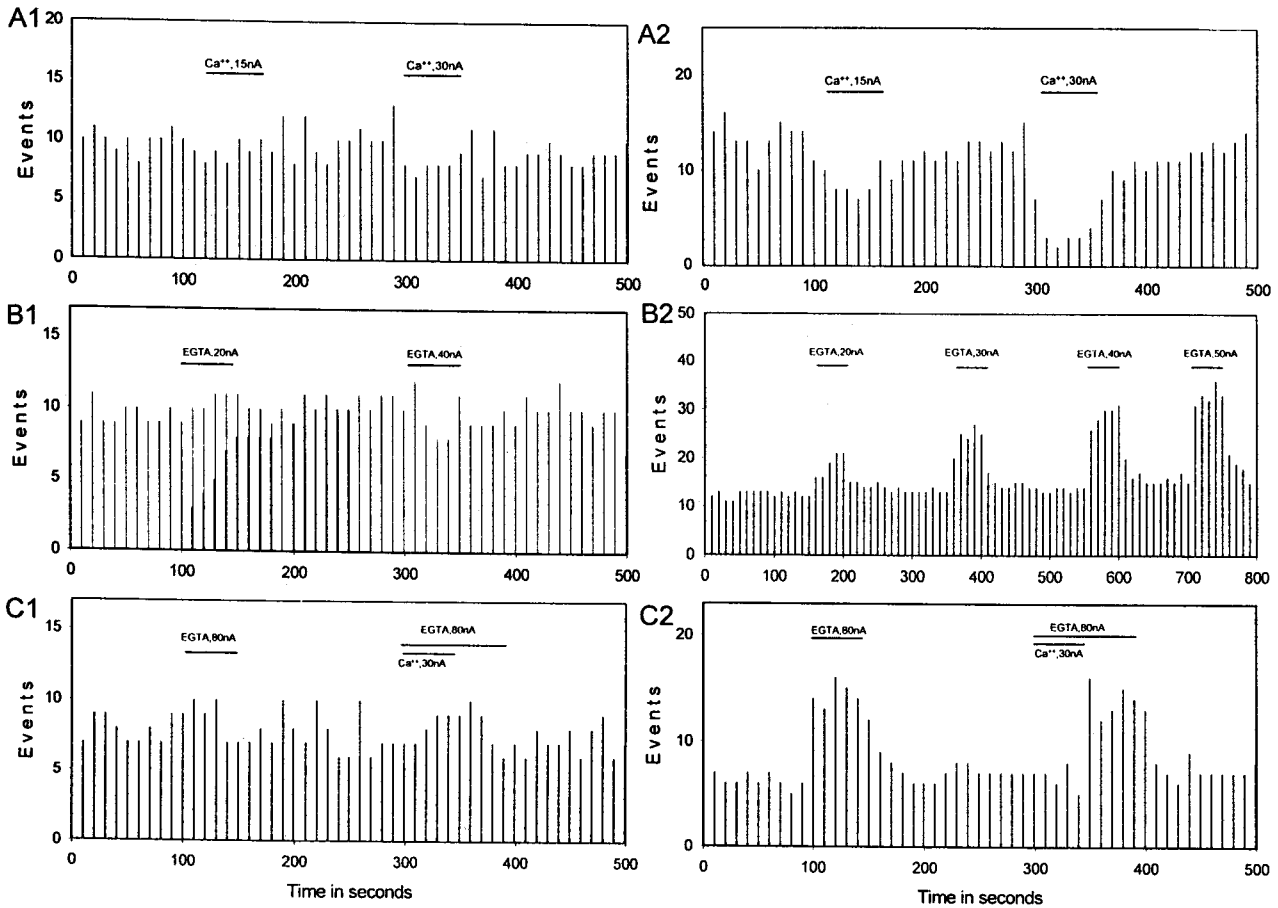
칼슘농도의 변동이 감각정보 특히 통각정보의 전달에 미치는 영향을 관찰한 대부분의 실험에서는 행동으로 나타나는 반응을 통각의 지표(behavioral test)로 이용하였으므로 칼슘농도의 변동이 말초로부터 감각정보를 받아들이는 척수후각세포의 반응에 미치는 영향은 명확하지 않다. 본 실험에서는 통각정보의 전달에 관여한다고 알려진 WDR 세포에서 1)통각반응이라고 생각되는 C 신경섬유 반응과 비유해 자극 반응인 A신경섬유 반응에 대한 칼슘 및 칼슘길항제의 효과에 차이가 있는지를 확인함과 동시에 2)진통작용의 유발에 관여하는 주요 칼슘이온 통로를 구명하고자 한다. 3)또한 겨자유를 RF에 피하주사한 후 증가된 척수후각 세포의 반응에 미치는 칼슘 및 칼슘길항제의 영향을 겨자유를 피하주사하기전의 대조반응과 비교하므로써 급성통증 및 tonic pain에 대한 칼슘길항제의 효과에 차이가 있는지를 밝히고자 한다.

## 방 법

체중 300~450 gm의 건강한 흰쥐 65 마리를 50 mg/kg 용량의 pentobarbital sodium을 복강내로 주사하여 마취한 후 외경정맥에 연결된 polyethylene관(PE-60)을 통하여 20~30 mg/kg/hr용량의 pentobarbital sodium을 전 실험기간 동안 계속주입하여 일정한 마취상태를 유지하였다. 실험동물의 호흡은 기도를 절개한 후 인공호흡기에(Harvard apparatus, Model 683)연결하여 end-tidal  $CO_2$ 농도가 3.5~

4.5%가 되도록 호흡횟수와 일회 호흡량을 조절하였으며 수술로 인하여 야기되는 체액의 손실을 방지하고 아올리근을 마비시키기 위해서는 5% mannitol을 함유하는 생리적 식염수에 d-tubocurarine chloride(Sigma chemical. Co.) (0.3 mg/kg/hr)를 혼합하여 계속 주입하였다. 동물의 체온은 homeothermic blanket system(Harvard apparatus)을 이용하여 일정하게(37°C)유지하였다. 제 13흉추와 제 3요추 사이의 척수와 슬와(popliteal fossa)부위의 경골신경 및 충비골신경을 분리 노출시킨 후 말초구심성신경의 전기 자극에 의하여 활성화되는 척수후각세포의 반응을 기록하기 위한 목적으로 사용하였다. 이상의 수술이 완료된 후 실험동물을 뇌정위장치에 고정하였으며 노출된 신조직의 건조를 방지하기 위해서는 액체 파라핀폴을 만들었다. 또한 액체 파라핀 폴의 온도는 온수가 순환되는 heating coil을 이용하여 일정하게(37°C)유지시켰다.

경골신경 및 충비골신경의 전기자극에 의하여 유발된 cord dorsum potential이 최대로 기록되는 척수부위에 7 barrel중 가장 중심에 위치한 barrel에 carbon filament를 삽입하여 만든 7 barrel microelectrode를 서서히 척수내로 삽입하면서 말초구심성 신경의 전기자극에 의하여 활성화되는 척수후각세포를 탐색하였다. 일단 척수후각세포의 single activity가 확인되면 먼저 receptive field(RF)에 가해진 기계적 자극(brush 및 pinch)에 대한 반응에 따라 세포형을 결정하였다. 본 실험에서는 A신경섬유 뿐만 아니라 C신경섬유의 입력까지 모두 받는 wide dynamic range (WDR) 세포만을 선택하여 실험대상으로 하였다. 경골신경 혹은 충비골신경에 A신경섬유만을 활성화 시킬 수 있는 강도의 단일 자극(0.1 msec, 10T)과 C신경섬유를 포함한 모든 신경섬유를 활성화 시킬 수 있는 강도의 3 train stimuli(0.5 msec, 33 Hz 혹은 50 Hz, 200~500 T)를 10회씩



**Fig. 1.** Effect of iontophoretically applied  $Ca^{2+}$  and EGTA on the A- and C-fiber responses of rat dorsal horn neuron. A1 and A2: iontophoretically applied  $Ca^{2+}$  had little effect on A-fiber responses(A1) while C-fiber responses were current-dependently inhibited by  $Ca^{2+}$  (A2). A-fiber responses were not changed significantly by iontophoretic application of EGTA alone (B1) or EGTA plus  $Ca^{2+}$  (C1). Iontophoretically applied EGTA current-dependently augmented C-fiber responses (B2) and EGTA-augmented C-fiber responses were suppressed by  $Ca^{++}$  (C2).

가하였으며 이때 유발된 WDR세포의 activity변동을 각각 누적시켜 histogram을 작성하였다. 전기자극의 강도는 A 신경섬유의 자극역치를 기준(1T)으로 하여 그 배수로 표시하였다. 작성된 histogram상에서 자극잠복기(latency)에 따라 A신경섬유와 C신경섬유의 자극에 의하여 유발된 활동전위 발생빈도의 변동을 분리하여 1회 전기자극시에 유발된 활동전위의 개수를 막대그림으로 기록하여 대

조반응으로 하였다. RF에 열자극(45~50°C)을 10초동안 가하여 활성화 되는 WDR세포의 대조반응을 기록하였으며 또한 확인된 RF에 10% 겨자유 0.15 ml를 피하 주사한 다음 변동된 WDR세포의 전기자극반응을 60분후에 기록하여 감각현상이 유발되었는지를 확인한 후 이에 미치는 칼슘길항제의 효과를 구명하고자 하였다.

7 barrel중 가장 중심부의 기록전극을 제외한 6 barrel중

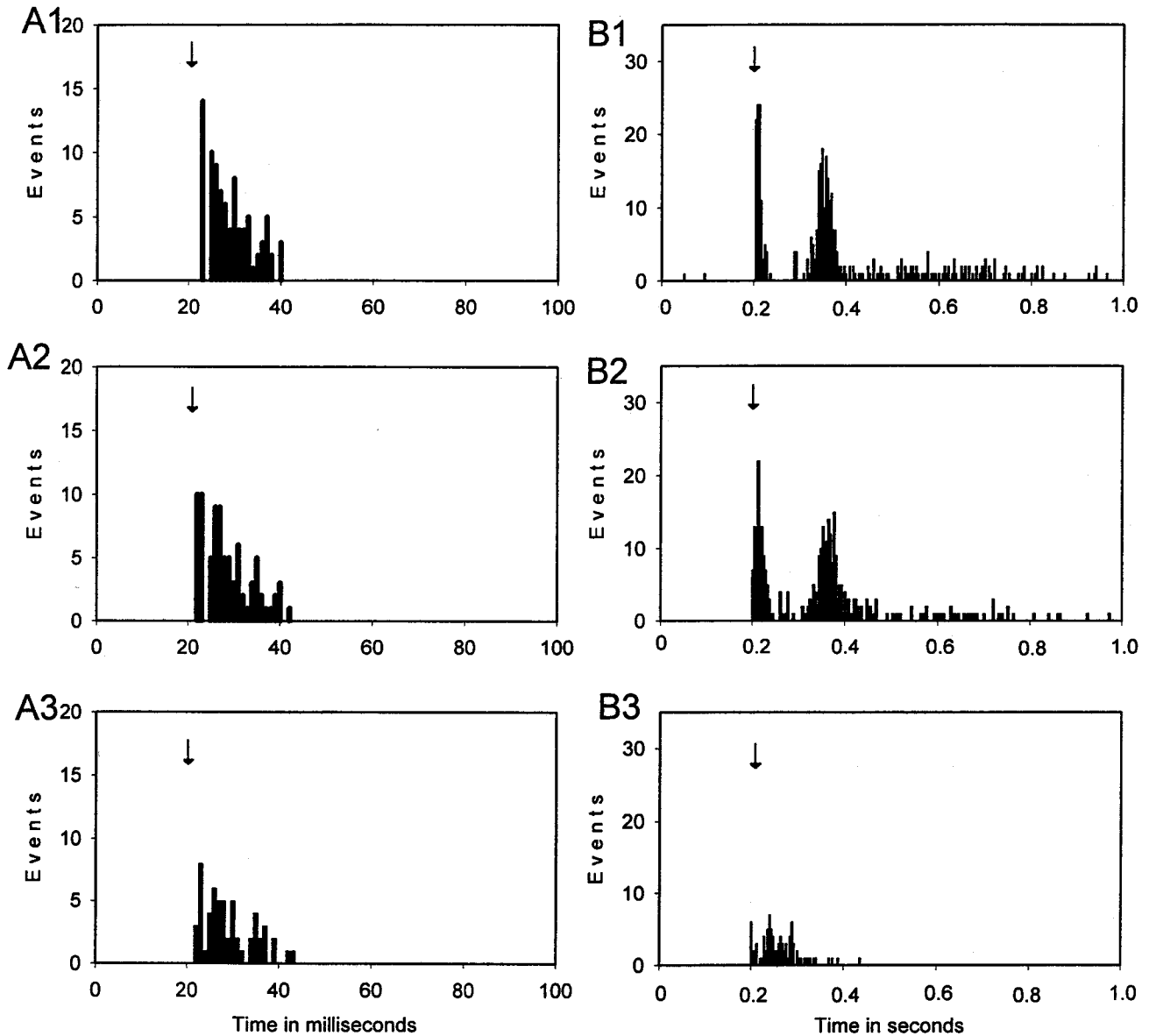
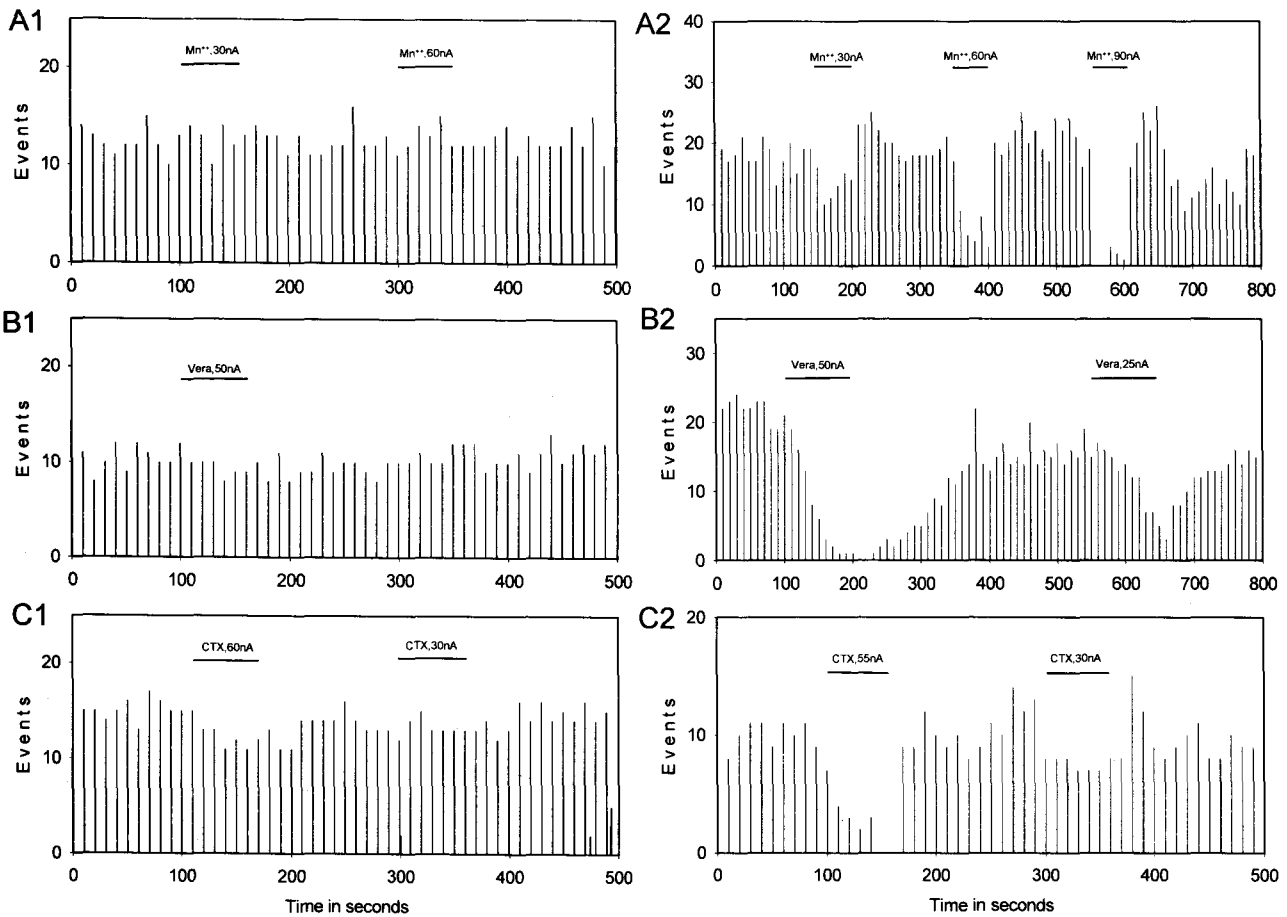


Fig. 2. Spinal application of EGTA inhibits C-fiber responses of rat dorsal horn neurons (DHN). Arrows indicate the time at which single or 3 train stimuli were applied to the afferent nerves. A1 & B1: the control A-(A1) and C-(B-1) fiber responses of DHN induced by graded electrical stimulation of afferent fibers. A-(A2) and C-(B2) fiber responses were not changed after combined application of EGTA (20 mM) and calcium ions (20 mM) onto spinal cord while C-fiber responses (B3) were almost completely suppressed by spinal application of EGTA alone with weak suppression of A-fiber responses(A3).

1 barrel에는 0.15 M의 NaCl용액을 채워 current balancing 목적으로 사용하였으며 나머지 5 barrel에는  $Ca^{++}$  (0.1 M), EGTA(0.1 M),  $Mn^{++}$  (0.2 M), (이상 Sigma chemical Co.), verapamil(0.03 M),  $\omega$ -conotoxin GVIA(0.1 mM),  $\omega$ -conotoxin MVIIC(0.1 mM)(이상 RBI, USA) 및  $\omega$ -agatoxin IVA(0.1 mM, Peptide Inst. 일본) 용액을 미리 채운 후 이온영동법(iontophoresis)으로 각종 약물을 기록하는 WDR 세포 가까이에 투여하였다. 전기자극 및 열자극에 의하여 유발된 대조반응과 이온영동기(Iontophoretic system, IP2 Module, Medical system Corp. USA)를 이용하여 EGTA를 제외한 나머지 약물의 경우는 각 barrel에 "+" 전류를 흐르게 함으로서 약물을 기록하는 WDR세포가 가까이에 투여하였다. 전기자극 및 열자극에 의하여 유발된 대조반응과 이온영동법으로 각종 약물을 투여하였을 때

에 유발된 척수후각세포 반응의 변동을 기록하여 서로 비교하였다.

이상의 모든 실험에서 유발된 WDR세포의 activity변동은 preamplifier(WPI, DAM 80)로 증폭한 다음 window discriminator로 원하는 activity만 선별하여 computer에 입력시켜 poststimulus time histogram을 작성하거나 자극장 복기에 따라 A신경 및 C신경 섬유반응만을 각각 분리하여 1회 전기자극에 의하여 유발된 활동전위의 개수를 막대 그림으로 표시하였다. 이온영동법을 이용하여 투여한 약물에 대한 효과는 대개 current-dependent 하였으나 유발된 반응의 크기와 threshold current는 세포에 따라 차이가 매우크기 때문에 기록하는 각 세포에 고정된 ejection current를 적용할 수가 없었다. 이런 이유로 인해서 한 가지 약물에 대한 효과를 통합하여 평균치를 계산하는 것



**Fig. 3.** Changes in the A- and C-fiber responses of rat dorsal horn neurons (DHN) induced by iontophoretic application of manganese ions ( $Mn^{++}$ ), verapamil (VERA) and  $\omega$ -conotoxin GVIA (CTX). A-fiber responses of DHN were not changed significantly after iontophoretic application of  $Mn^{++}$  (30 nA, 60 nA, A1), verapamil (50 nA, B1) and CTX (30 nA, 60 nA, C1). Iontophoretically applied  $Mn^{++}$  (A2), verapamil (B2) and CTX (C2) strongly suppressed C-fiber responses and in general, verapamil effect was fairly sustained.

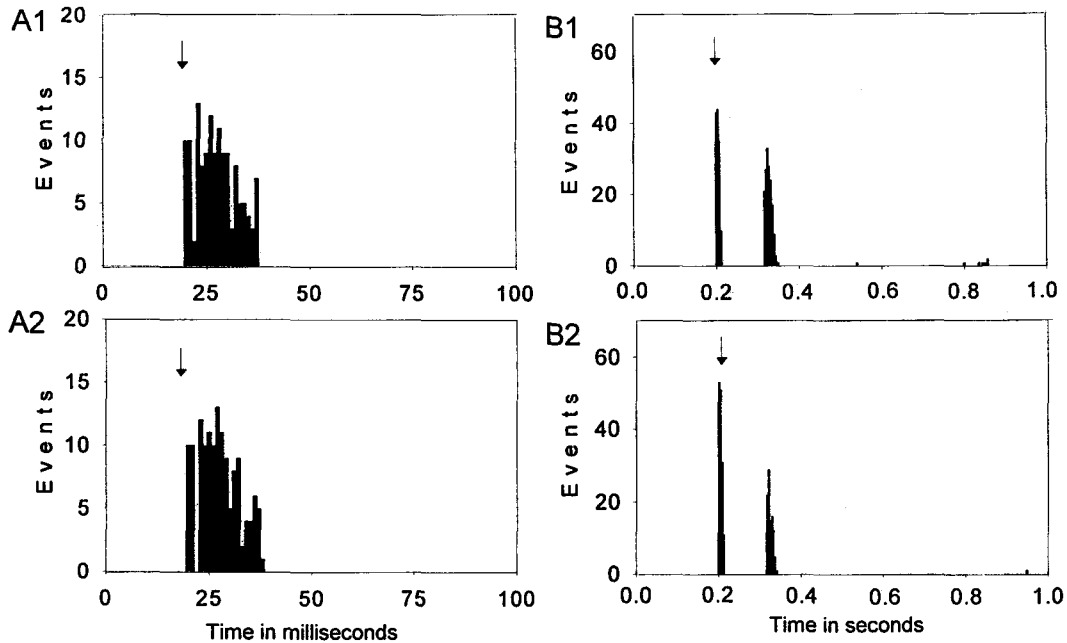


Fig. 4. Changes in the responses of WDR cells to A- and C-fiber stimulation following iontophoretic application of  $\omega$ -agatoxin IVA. Arrows indicate the time at which graded electrical stimuli were applied to afferent nerve. A1 and B1 are the control A- and C-fiber responses of WDR cell to graded electrical stimulation of afferent nerve. Iontophoretically applied  $\omega$ -agatoxin IVA induced weak inhibition of C-fiber responses of WDR cell (B2) without any significant effect on A-fiber responses (A2).

은 불가능하였으므로 각 세포의 대조반응의 백분율로 표시하였다.

## 결 과

척수내 칼슘농도의 변화가 말초에서 척수후각대로 전달된 감각정보의 전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기록하는 WDR세포 가까이 이온영동법을 이용하여 칼슘과 EGTA를 투여해 본 바 A신경섬유반응은 칼슘(Fig. 1 A1) 및 EGTA(Fig. 1B1)투여에 의하여 유의하게 변동되지 아니하였다( $n=19/20$  units). 그러나 C신경섬유반응은 칼슘투여에 의하여 current-dependent하게 억제되었으나 (Fig. 1 A2,  $n=17/19$  units) EGTA는 오히려 C신경섬유 반응을 크게 증가시키는 효과가 있음을(Fig. 1 B2,  $n=20/23$  units)알 수 있었다. C신경섬유 반응을 증가시키는 EGTA의 작용은 칼슘투여에 의하여 차단되었다(Fig. 1 C2). 또한 이온영동법을 이용한 EGTA투여 시간은 약 50여초였으므로 20~30분 이상 지속적으로 EGTA를 작용시켰을 때의 효과를 구명하기 위하여 20 mM 농도의 EGTA와 칼슘을 동시에 척수에 적용해 본 바 A신경 및 C신경 섬유 반응이 모두 큰 변동이 없었으나(Fig. 2 A2 및 B2) EGTA

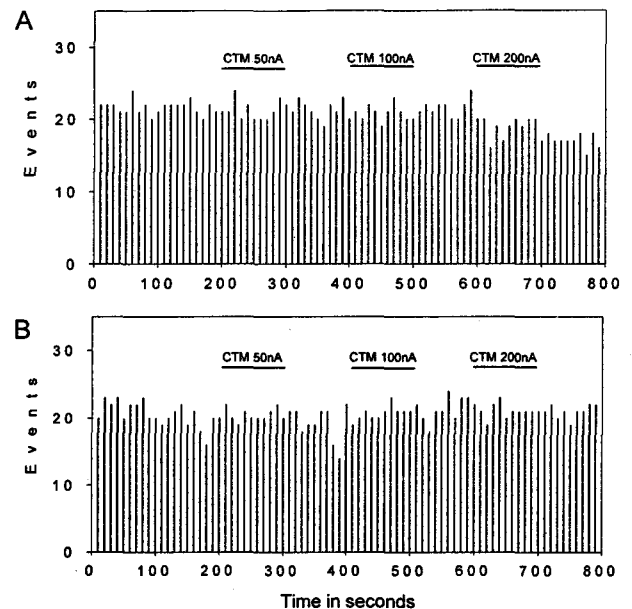
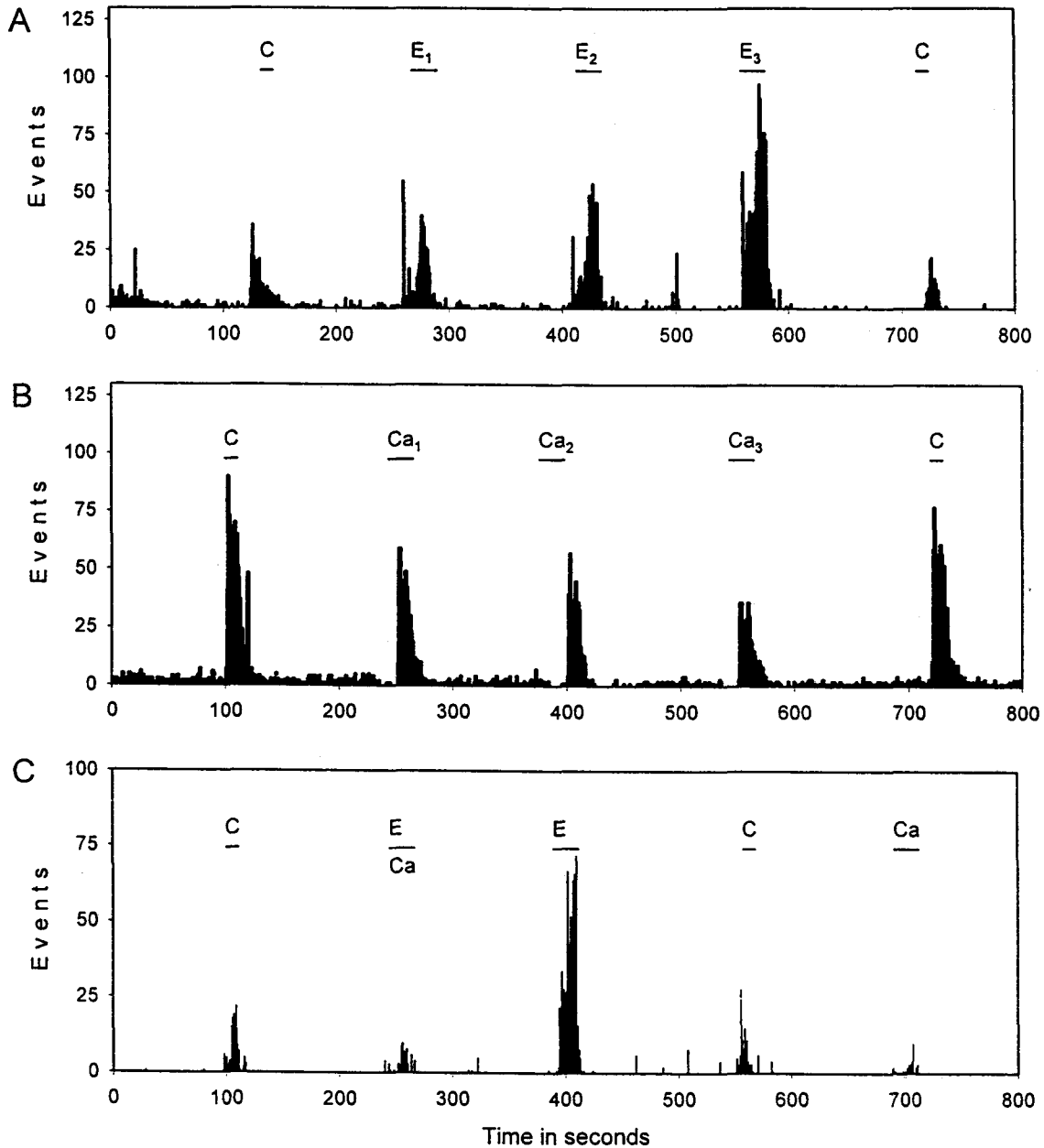


Fig. 5. Effect of iontophoretically applied  $\omega$ -conotoxin MVIIC (CTM) on the responses of WDR cell to electrical stimulation of A-fiber and C-fiber stimulation. A-(A) and C-(B) fiber responses were not changed significantly after iontophoretic application of  $\omega$ -conotoxin MVIIC (50 nA, 100 nA, 200 nA).

를 단독 투여하면 A신경섬유 반응 보다는( $34.5 \pm 5.5\%$ ) C신경 섬유 반응이(약  $91.9 \pm 6.3\%$ ) 보다 강력하게 억제되었다(Fig. 2 A3 및 B3,  $n=8/10$  units).

각종 칼슘이온 통로차단제가 A신경 및 C신경섬유 반

응에 미치는 효과를 밝히기 위하여  $Mn^{++}$ , verapamil 및  $\omega$ -conotoxin GVIA를 이온영동법을 이용하여 척수내로 투여한 후 변동된 WDR세포의 반응을 기록한 실험에는 Fig. 3에서 보는 바와 같다( $n=13/16$  units). A신경섬유 반



**Fig. 6.** Effects of iontophoretically applied EGTA and calcium ions on the responses of dorsal horn neuron (DHN) to thermal stimulation. C is the control responses of DHN to thermal stimulation of receptive field ( $46^{\circ}C$ ). E1, E2 & E3 denote that EGTA was ejected at the current of 20, 40 and 60 nA, respectively. Ca1, Ca2 and Ca3 represent that calcium ions were ejected at the current of 10, 20, and 40 nA, respectively. E/Ca is the combined application of EGTA (60 nA) and calcium ions (20 nA). EGTA (A) and calcium ions (B) current-dependently augmented and suppressed the thermal responses, respectively. The augmenting action of EGTA was blocked by combined application of EGTA (60 nA) and  $Ca^{++}$  (20 nA) (C).

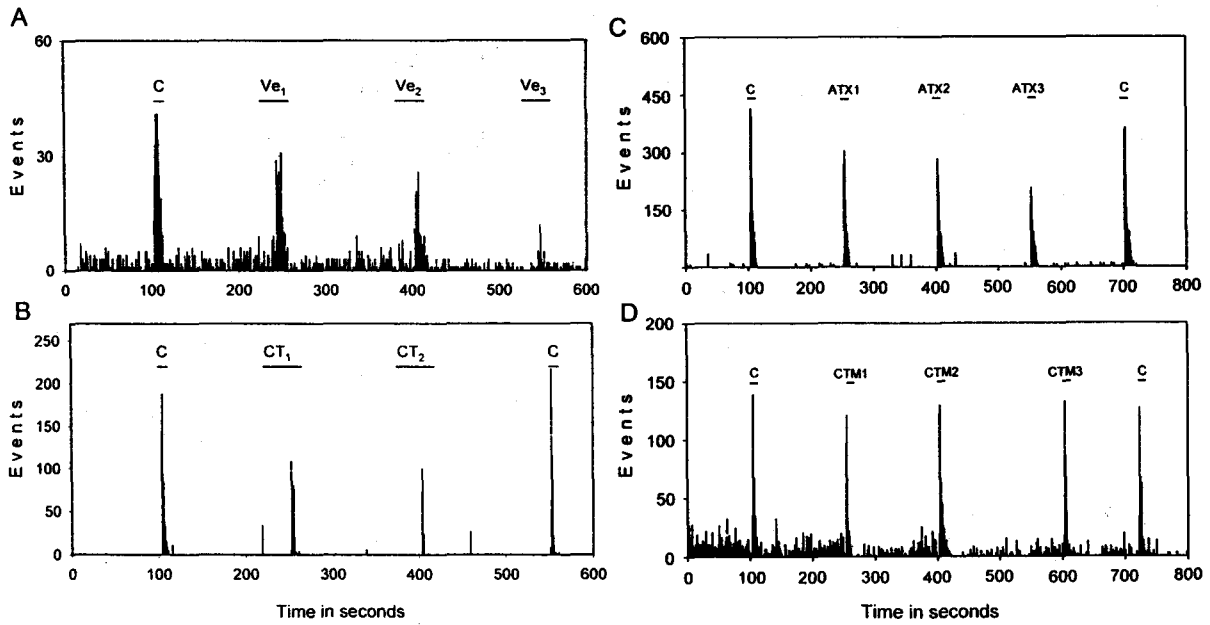


Fig. 7. Changes in the responses of dorsal horn neurons to thermal stimulation of receptive field produced by iontophoretic application of verapamil (VE),  $\omega$ -conotoxin GVIA (CT),  $\omega$ -agatoxin IVA (ATM) and  $\omega$ -conotoxin MVIIC (CTM). C is the control responses to thermal stimulation (46°C in A & B, 48°C in C, & 50°C in D). Verapamil was ejected at the current of 60 (VE1), 90 (VE2) and 120 (VE3) nA, respectively.  $\omega$ -Conotoxin GVIA was ejected at the current of 100 (CT1) and 200 (CT2)nA, respectively. Verapamil strongly inhibited the thermal responses (A) while  $\omega$ -conotoxin GVIA had mild inhibitory action (B).  $\omega$ -Agatoxin IVA ejected at the current of 50(ATM1), 100(ATM2) and 150(ATM3)nA induced weak inhibition of thermal responses (C). The thermal responses were not influenced by CTM ejected at the current of 50 (CTM1), 100 (CTM2) and 200 (CTM3) nA (D).

응은  $Mn^{2+}$ , verapamil 및  $\omega$ -conotoxin GVIA의 투여에 의하여 거의 변동이 없었으나(Fig. 3 A1, B1 및 C1) C신경 섬유 반응은 current-dependent하게 억제되는 경향이 있었다(Fig. 3 A2, B2 및 C2).  $Mn^{2+}$ 은 투여를 중단하면 곧 정상으로 회복되었으나 많은 실험 예에서 verapamil은 투여를 중단한 후에도 지속적인 억제효과가 나타나는 경향이었으며 대개의 경우에 많은양의 전류를 흐르게 해야만(high ejection current)  $\omega$ -conotoxin GVIA의 억제작용이 유발되었다. 또한 P-type 및 Q-type 칼슘이온통로차단제인  $\omega$ -agatoxin IVA와  $\omega$ -conotoxin MVIIC가 A신경 및 C신경 섬유 반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 이들 칼슘이온통로 차단제를 이온영동법을 이용하여 척수내로 투여해본 바  $\omega$ -conotoxin MVIIC는 A신경 및 C신경 섬유 반응에 거의 영향이 없었으나(Fig. 5A 및 B, n=9/12 units)  $\omega$ -agatoxin IVA는 C신경 섬유 반응을 약하지만 유의하게 억제(약 22.6%)하였다(Fig. 4B2, n=9/11 units).

RF의 열자극에 대한 WDR세포의 반응에 미치는 칼슘, EGTA, verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA,  $\omega$ -agatoxin IVA 및  $\omega$ -conotoxin MVIIC의 영향을 기록한 실험결과는 Fig. 6

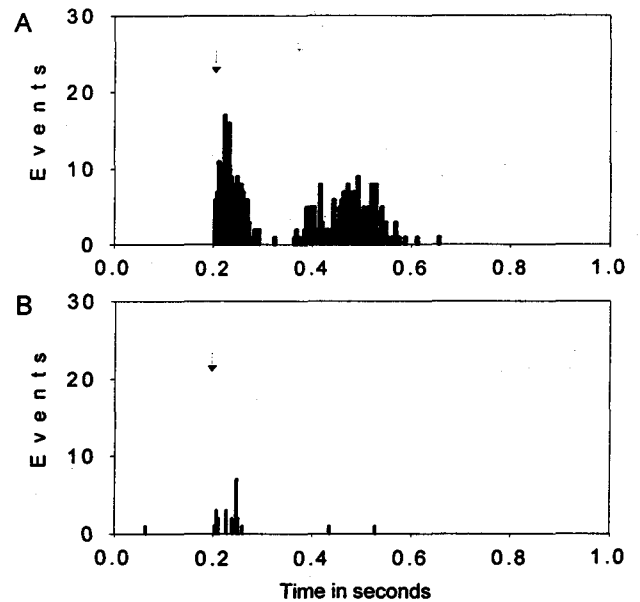
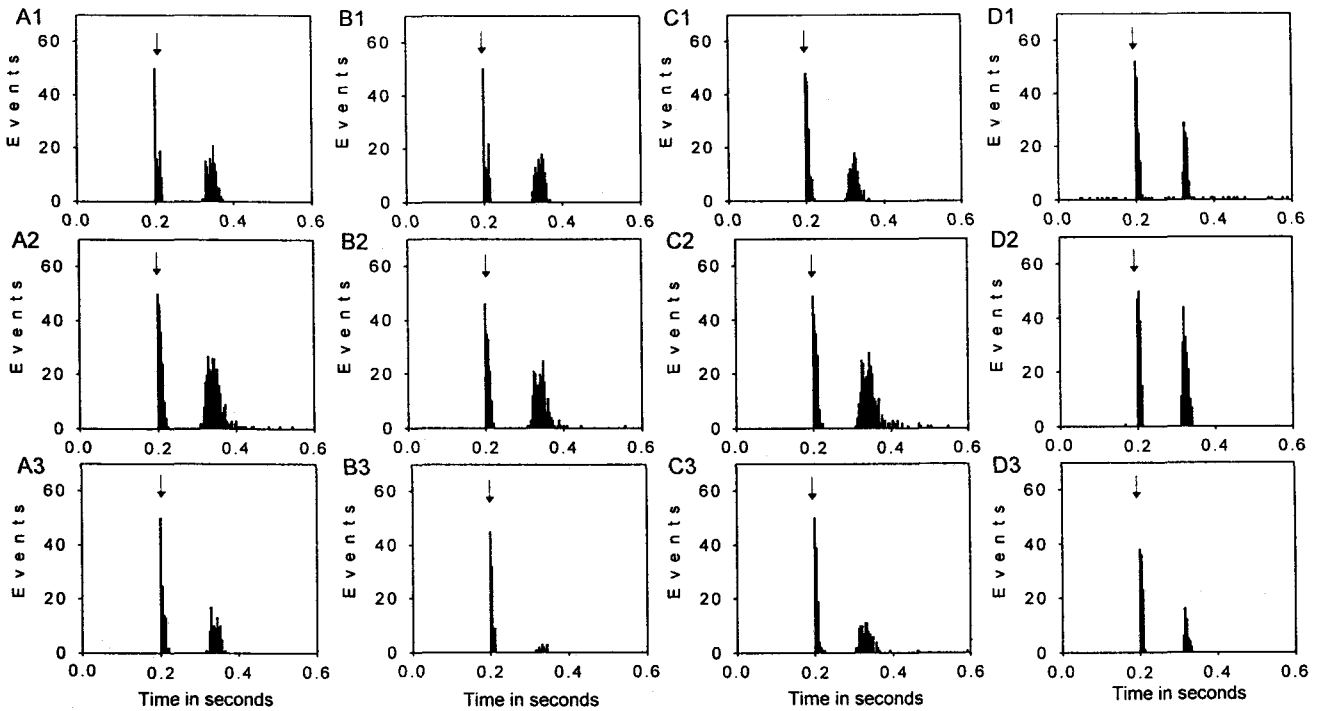


Fig. 8. Desensitization of C-fiber responses of WDR cell by subcutaneous injection of mustard oil (10%, 0.15ml) into the receptive field (RF). A: The control responses of WDR cell to electrical stimulation of RF. B: After subcutaneous injection of mustard oil, A- & C-fiber responses were greatly inhibited.





**Fig. 9.** Sensitized C-fiber responses of WDR cell by subcutaneous injection of mustard oil were suppressed by iontophoretically applied  $Ca^{2+}$ , verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA and  $\omega$ -agatoxin IVA. Arrows indicate the time at which electrical stimuli were applied to afferent nerve. A1, B1, C1, and D1 are the control C-fiber responses to electrical stimulation of afferent nerve. After subcutaneous injection of mustard oil (10%, 0.15ml) into receptive field, C-fiber responses were greatly enhanced (A2, B2, C2 & D2). Enhanced C-fiber responses were inhibited by iontophoretically applied  $Ca^{2+}$  (15 nA, A3), verapamil (50 nA, B3),  $\omega$ -conotoxin GVIA (100 nA, C3) and  $\omega$ -agatoxin IVA (50 nA, D3).

및 7에서 보는 바와 같다. 46°C의 열자극에 의해 유발된 척수후각 세포의 반응은 EGTA투여에 의해서는 증가되었으나(Fig. 6A) 칼슘투여는 열자극 반응을 억제하였으며(Fig. 6B) EGTA와 칼슘의 효과는 current-dependent하였다. 한편 EGTA에 의하여 증가된 열자극 반응은 칼슘투여에 의하여 강력하게 억제되었다(Fig. 6C, n=7/8 units).

WDR세포의 열자극 반응은 verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA 및  $\omega$ -agatoxin IVA의 투여에 의해서도 current-dependent하게 억제되는 경향이었으나(Fig. 7A, B, 및 Fig. 7C, 11/14 units)  $\omega$ -conotoxin GVIA와  $\omega$ -agatoxin IVA는 verapamil에 비하여 억제효과가 약하고 많은 양의 전류를 흐르게 해야만 억제작용이 유발되었다. 그러나 Q-type 칼슘이온 통로 차단제로 알려진  $\omega$ -conotoxin MVIIC는 50°C 열자극에 대한 WDR세포반응에 아무런 영향이 없었다(Fig. 7D)

한편 말초에 가해진 유해자극에 의해서 감각된 WDR 세포반응에 미치는 칼슘길항제의 효과를 구명하기 위하여 먼저 확인된 RF내에 10% 겨자유를 피하주사한 다음

약 60분이 경과한 후에 구심성 신경의 전기자극에 의하여 유발된 WDR세포반응을 기록해 본 바 대조반응보다 약 50~150%이상으로 증가되었음을 알 수 있었으며(Fig. 9. A2, B2, C2 및 D2) 이는 척수내에서 감각효과가 유발되었음을 시사한다. 그러나 겨자유가 주사된 RF 부위를 직접 전기자극해 본 바 A신경 및 C신경섬유 반응이 거의 완전하게 억제됨으로(Fig. 8B) 보아 탈감작(desensitization)되었음을 알 수 있으며(n=12/15 units) RF는 오히려 확대되었다. RF내에 피하주사된 겨자유에 의하여 감각된 WDR세포의 C신경 섬유 반응은(Fig. 9 A2 및 B2)  $Ca^{++}$  (Fig. 9 A3) 및 verapamil(Fig. 9 B3) 투여에 의하여 감각된 반응의  $31.5 \pm 8.5\%$  및  $6.6 \pm 6.4\%$ 까지 매우 강력하게 억제 되었으며  $\omega$ -conotoxin GVIA와  $\omega$ -agatoxin IVA도 verapamil의 억제 효과보다는 약하지만 C신경 섬유 반응을 각각 감각된 C신경섬유반응의  $35.1 \pm 5.8\%$  및  $24.4 \pm 8.6\%$ 까지 강력하게 억제하였다(Fig. 9 C3 및 D3).

## 고찰

일차구심성 신경의 말단으로 전달된 활동전위에 의하여 탈분이 유발된 후 신경섬유내로 유입되는 칼슘에 의하여 방출된 신경전달물이 척수후각세포에 작용하여 감각정보를 전달하게 된다는 것은 잘 알려진 사실이다. 주로 세포외액의 칼슘농도가 변동될 때에 감각정보의 전달이 어떻게 변하는지를 알아보기 위하여 이온영동법을 이용하여 기록하는 WDR세포 가까이 칼슘을 투여해본 바 유해자극으로 생각되는 C신경섬유 반응과 열자극 반응이 current-dependent하게 억제되었다. 그러나 비유해자극 반응인 A신경 섬유 반응은 거의 변동되지 아니하였다. 한편 칼슘을 chelate시키는 EGTA는 C신경섬유 반응과 열자극 반응을 오히려 증가시켰으며 증가된 반응은 칼슘 투여에 의하여 차단된 반면에 A신경섬유 반응에는 유의한 영향이 없었음을 알 수 있었다. EGTA 투여에 의하여 국소적으로 칼슘농도가 감소되면 자극역치가 낮아져 자발성 흥분과 발사 빈도가 증가하는 반면에 칼슘농도가 증가되면 역치가 높아져 흥분성이 감소될 것으로(Frankenhaueser, 1957; Frankenhaueser & Meves, 1958) 생각되며 본 실험에서도 신경자극이나 열자극을 가하지 않고, EGTA만 투여해도 자발성 흥분과 발사율이 크게 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다. Curtis 등(1960)은 이온영동법으로 투여된 EGTA는 세포외액 뿐만 아니라 세포막의 운반단백질(carrier protein)과 결합한 칼슘양을 감소시켜 탈분극을 일으키기 때문에 세포막의 흥분성이 증가될 것이라는 주장은 EGTA 투여에 의하여 증가된 WDR세포반응이 칼슘투여에 의하여 억제된 본 실험의 결과를 뒷받침해주는 실험적 증거라고 생각한다. 한편 기록전극 주위의 척수표면에 20~30분간 비교적 긴시간동안 20 mM의 EGTA를 적용해본 바 C신경섬유 반응이 현저하게 억제되었으나 같은 농도의 칼슘을 동시에 적용하면 EGTA의 억제작용이 거의 완전하게 차단됨을 알 수 있었다. 흰 쥐의 뇌실내로 투여한 EGTA는 tail flick latency를 용량의존적으로 연장시켰다는 Schmidt 및 Way(1980)의 주장과 기계적 자극에 대한 WDR 및 HT(high threshold)세포의 반응중 특히 pinch자극에 대한 반응이 EGTA 투여에 의하여 강력하게 억제되었다는 김등(1991)의 보고는 이온영동법으로 투여된 EGTA에 의하여 C신경섬유 반응과 열자극 반응이 증가된 본 실험의 결과와는 상반되지만 척수 표면에 장시간 동안 적용한 EGTA에 의하여 억제작용이 유발된 것과는 일치된다. 이와 같은 차이는 투여방법상의 차이보다는 EGTA 투여에 의하여 칼슘농도가 감소되는 정도의 차이에 기인되는 것으로 생각된다. 즉 이온영동법으로 짧은 기간동안 투여한 EGTA는 국소적인 칼

슘농도 변동을 초래하는 반면에 넓은 부위에 걸쳐 장시간 동안 적용한 EGTA는 세포내외의 칼슘농도를 현저하게 감소시켜 감각정보전달의 시냅스전 및 시냅스후 섬유성기전을 모두 억제 할 것으로 사료된다.

척수내에서의 감각정보전달과정에 미치는 각종 칼슘이온통로차단제의 효과를 알아보기 위하여 말초구심성 신경의 전기자극 및 RF의 열자극에 의하여 유발된 척수후각세포의 대조 반응을 기록한 후 이온영동법을 이용하여 칼슘이온 통로차단제를 투여해본 바  $Mn^{++}$ , verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA, 및  $\omega$ -agatoxin IVA는 C신경섬유 및 열자극에 대한 WDR세포의 반응을 대개 current-dependent하게 억제하였으나 A신경섬유 반응에는 거의 영향이 없었다. 그러나 A신경 및 C신경섬유 반응과 열자극 반응을 포함한 모든 WDR세포의 반응은  $\omega$ -conotoxin MVIIC 투여에 의해서는 전연 변동되지 아니하였다. 또한 칼슘이온 통로차단제는 비유해 자극인 A신경섬유 반응에는 영향이 없었으나 유해자극이라고 생각되는 C신경섬유 반응과 열자극 반응만을 선택적으로 억제하는 특성이 있음을 본 실험결과로부터 알 수 있었다. 척수내로 투여된 A23187과 Bay K 8644는 formalin 피하주사에 의하여 유발된 tonic pain을 증가시킨다는 Coderre 및 Melzack(1992)의 보고는 칼슘이온통로를 통한 칼슘의 이동양이 통각정보의 전달에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 한편 hot plate test, formalin test 및 신경성 통증모델에서 칼슘길항제의 진통효과를 조사한 결과, L-type 칼슘이온통로차단제는 전연 진통효과가 없으나 morphine성 물질의 약내성과 금단증상을 약화시켜 진통효과를 증가시킨다는 주장(Contreras et al, 1988; Gürdal et al, 1992; Horvath et al, 1990; Omote et al, 1993)과 morphine성 물질의 진통효과를 증가시키는 작용과 함께 투여용량에 비례하는 진통작용을 유발한다(Del Pozo et al, 1987; 1990; Gürdal et al, 1992; Miranda et al, 1993)는 상반된 견해가 대두되었다. 본 실험에서는 이온영동법으로  $\omega$ -conotoxin GVIA 와  $\omega$ -agatoxin IVA를 투여 할 때에는 많은 양의 전류를 흐르게 해야만 억제작용이 유발되었으며, 유발된 억제작용도 강력하지는 않았으나 verapamil은 보다 강력하고 지속적인 억제작용을 유발하였다.

C신경섬유 및 열자극에 대한 WDR세포반응과 실험적으로 유발한 통각반응이 칼슘이온통로차단제의 투여에 의하여 억제된 것은 다른 기전도 있겠으나 방출되는 신경전달 물질의 양과 보다 긴밀한 관계가 있을 것으로 생각된다. 척수후근신경절과 척수내에는 L-, N- 및 P-type 등을 포함한 칼슘이온통로의 존재가 인정되며(Aosaki & Kasai, 1989; McCarthy & TanPiengo, 1992; Mintz et al, 1992a & b)방출되는 신경전달물질의 양은 주로 N- 및

P-type의 칼슘이온통로활성에 따라 크게 변동된다고 한다. 그러나 Holz등(1988)과 Rane등(1987)은 강력한 탈분극상태가 오래 지속되는 상태에서는(time- & voltage-dependent) L-type칼슘이온통로 차단제도 신경전달물질의 방출양과 칼슘이온전류를 강력하게 억제한다고 주장하였다. 한편 흰쥐척수에서 방출되는 CGRP와 aspartate의 양은 N-type칼슘이온통로 차단제인 SNX-III의 투여에 의해서는 전연 변동되지 않으나 P/Q-type 이온통로 차단제인 SNX-230에 의해서는 이들 신경전달물질의 방출이 거의 완전하게 차단된다는 보고도 있다(Gaur et al, 1994). 이처럼 일차구심성섬유의 중추단에서 방출되는 신경전달물질의 양은 다수의 칼슘이온통로의 복합작용에 의하여 조절된다는 견해가 가장 합리적인 것으로 생각된다. 이와같은 관점에서 볼때에 C 신경섬유반응과 열자극반응이 L-, N- 및 P-type 이온통로차단제에 의하여 억제된 본실험의 결과도 단일 이온통로보다는 다수의 이온통로의 복합작용에 의한 결과라고 생각된다. WDR세포의 C 신경섬유반응이 억제된 것은 방출되는 신경전달물질의 양이 감소되는 시냅스전 기전에 의하여 어느 정도 설명이 가능하지만 A 신경섬유반응이 어떤 종류의 칼슘이온통로 차단제의 투여에 의해서도 변동되지 아니한 것은 본 실험의 결과만으로는 설명하기가 어려우며, 이를 구명하기 위해서는 앞으로 더욱 구체적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

감작된 척수후각세포반응에 미치는 칼슘이온통로차단제의 효과를 알아보기 위하여 먼저 10% 겨자유를 확인된 RF내에 주사한 후 약 60분에 WDR세포의 C신경섬유 반응을 기록해 본 바 겨자유를 피하주사하기전 대조 반응에 비하여 크게 증가되었으며 RF의 확대와 자발성 흥분과 발사율의 증가 현상도 나타났다. 그러나 겨자유를 주사한 RF부위는 오히려 탈감작 되었음을 알 수 있었다. 감작현상이 유발되면 역치의 감소, RF의 확대, 자발성 흥분과 발사율의 증가 및 같은 강도의 자극에도 더 큰 반응이 유발되는 등의 특징이 나타난다고 알려져 있으며 이와 같은 기준에 따라 판단해 볼 때 본 실험에서도 겨자유 의 피하주사에 의하여 척수내에서 감작현상이 유발되었음을 알 수 있었다. 겨자유는 주로 A $\delta$  및 C신경섬유를 자극하여 척수내로 전달되는 구심성 입력을 증가시키게 되며(Russell et al, 1987; Woolf & Wall, 1986) 그 결과 척수내로 과량 분비된 여러 가지 신경전달물질의 복합작용에 의하여 감작현상이 유발되는 것으로 알려져 있다(Kocher et al, 1985; Reeh et al, 1986). 겨자유를 피부 혹은 신경에 적용하면 초기에는 구심성 신경을 강력하게 자극하지만 시간이 경과할수록, 사용한 겨자유의 농도가 높을수록 탈감작 혹은 전도차단을 유발하는 경향이 크게

나타난다(Reeh et al, 1986; Shin & Kim, 1994). WDR세포의 C신경섬유 반응이 감작된 것을 확인한 후 비교적 억제작용이 뚜렷하였던 칼슘, verapamil,  $\omega$ -conotoxin GVIA, 및  $\omega$ -agatoxin IVA를 투여해본 바 C신경섬유 반응이 칼슘길항제의 투여에 의하여 억제된 본 실험의 결과는, 흰쥐에서 행동으로 나타나는 통각반응을 검사한 실험에서 formalin 피하주사에 의해 유발된 tonic pain 및 척수후각 세포반응과 말초신경 손상에 의하여 유발된 통각과민증 및 tactile allodynia가 P-type 및 N-type 칼슘이온통로차단제의 투여에 의하여 크게 억제된다는 보고(Bowersox et al, 1996; Chaplan et al, 1994; Diaz & Dickenson, 1997; Malmberg & Yaksh, 1994)를 전기생리학적인 방법으로 확인한 실험적 증거라고 생각된다. 또한 N-type 칼슘이온통로 차단제인 SNX-111을 약 일주일동안 신경성 통증모델 쥐에 계속 투여해도 약내성이 생기지 않으므로 진통효과가 매우 지속적이라고 한다(Bowersox et al, 1996; Malmberg & Yaksh, 1994).

칼슘길항제를 morphine성 물질과 함께 투여하면 morphine성 물질의 약내성과 금단증상이 약화되어 진통효과가 더욱 증가되는 것으로 알려져 있다(Bongiannin et al, 1986; Contreras et al, 1988; Harris et al, 1976; Omote et al, 1993). 이런 점을 감안해 볼 때에 칼슘길항제를 단독 투여해도 충분한 진통효과가 유발되지만 morphine성 물질과 함께 사용하면 더욱 강력하고 지속적인 진통효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때에 척수내로 전달된 유해자극 반응은 단일 종류의 칼슘이온통로 보다는 다수의 칼슘이온통로의 복합작용에 의하여 억제되거나 촉진될 수 있음을 알 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 1996년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음(01F0475).

## 참 고 문 헌

- Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca channel current in chick sensory neurons. Different sensitivity to dihydropyridines and  $\omega$ -conotoxin GVIA. *Pflügers Arch* 414: 150-156, 1989
- Bell JA. Selective blockade of spinal reflexes by  $\omega$ -conotoxin in the isolated spinal cord of the neonatal rat. *Neuroscience*

- 52: 711–716, 1993
- Bongianni F, Carla V, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE. Calcium channel inhibitors suppress the morphine-withdrawal syndrome in rats. *Brit J Pharmacol* 88: 561–567, 1986
- Bowersox ss, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang Y-X, Luther RR. Selective N-type neuronal voltage sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat model of acute, persistent and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1243–1249, 1996
- Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1117–1123, 1994
- Chapman DB, Way EL. Modification of endorphin/enkephalin analgesia and stress-induced analgesia by divalent cations, a calcium chelator and an ionophore. *Brit J Pharmacol* 75: 389–396, 1982
- Coderre TJ, Melzack R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12: 3671–3675, 1992
- Contreras E, Tamago L, Amigo M. Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Europ J Pharmacol* 148: 463–466, 1988
- Curtis DR, Perrin DD, Watkins JC. The excitation of spinal neurones by the iontophoretic application of agents which chelate calcium. *J Neurochem* 6: 1–20, 1960
- Del Pozo E, Cars G, Baeyens JM. Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice. *Europ J Pharmacol* 137: 155–160, 1987
- Del Pozo E, Ruiz-Garcia C, Baeyens JM. Analgesic effects of diltiazem and verapamil after central and peripheral administration in the hot-plate test. *Gen Pharmacol* 21: 681–685, 1990
- Diaz A, Dickenson AH. Blockage of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain* 69: 93–100, 1997
- Frankenhaeuser B, Meves H. The effect of magnesium and calcium on the frog myelinated nerve fibre. *J Physiol* 142: 360–365, 1958
- Fleckenstein A, Frey M, Zorn J, Fleckenstein-Grün G. Experimental basis of the long-term therapy of arterial hypertension with calcium antagonists. *Am J Cardiol* 56: 3H–14H, 1985
- Frankenhaeuser B. The effect of calcium on the myelinated nerve fibre. *J Physiol* 137: 245–260, 1957
- Freedman DD, Waters DD. Second generation dihydropyridine calcium antagonists. Greater vascular selectivity and some unique application. *Drugs* 34: 578–598, 1987
- Gaur S, Ramachandran J, Miljanich G. Effects of the calcium channel antagonists, SNX-III(MVIIA) and SNX-230 (MVIIC), on the release of glutamate and CGRP from spinal cord slices. *Soc Neurosci Abst* 20: 964, #396.14, 1994
- Guerrero-Múnoz F, Adames C, Fearon Z, Way EL. Calcium-opiate antagonism in the periaqueductal grey(PAG) region. *Europ J Pharmacol* 76: 417–419, 1981
- Gürdal H, Sara Y, Tulunay FC. Effect of calcium channel blockers on formalin-induced nociception and inflammation in rats. *Pharmacology* 44: 290–296, 1992
- Harris RA, Loh HH, Way EL. Antinociceptive effects of lanthanum and cerium in nontolerant and morphine tolerant-dependent animals. *J Pharmacol Exp Ther* 196: 288–297, 1976
- Holz IV GG, Dunlap K, Kream RM. Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: Methods and dihydropyridine sensitivity. *J Neurosci* 8: 463–471, 1988
- Horvath G, Benedek G, Szikszay M. Enhancement of fentanyl analgesia by clonidine plus verapamil in rats. *Anesth Analg* 70: 284–288, 1990
- Iwamoto ET, Harris RA, Loh HH, Way EL. Antinociceptive responses after microinjection of morphine or lanthanum in discrete rat brain sites. *J Pharmacol Exp Ther* 206: 46–55, 1978
- Kakunaga T, Kaneto H, Hano K. Pharmacologic studies on analgesics-VII. Significance of the calcium ion in morphine analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 153: 134–141, 1966
- Kim JH, Shin HK, Kim KS, Huh C. Analgesic action of calcium modulators in the cat. *J Hanyang Med Coll* 11: 464–473, 1991
- Kocher L, Jung S, Reeh PW, Handwerker HO. Mustard oil but not antidromic nerve stimulation affects sensitivity of cutaneous polymodal C-fibers in the rat. *Pflüger Arch* 403: R59, 1985
- Malmberg AB, Yaksh TL. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci* 14: 4882–4890, 1994
- McCarthy RT, TanPiengco PE. Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high affinity block of neuronal L-type by nimodifine. *J Neurosci* 12: 2225–2234, 1992
- Mintz IM, Adams ME, Beans BP. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9: 85–95, 1992a
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider

- toxin-aga-IVA. *Nature* 355: 827–829, 1992b
- Miranda HF, Pelissier T, Sierralta F. Analgesic effects of intracerebroventricular administration of calcium channel blockers in mice. *Gen Pharmacol* 24: 201–204, 1993
- Neugebauer V, Vangegas H, Nebe J, Rümennapp P, Schaible H-G. Effects of N- and L-type calcium channel antagonists on the responses of nociceptive spinal cord neurons to mechanical stimulation of the normal and the inflamed knee joint. *J Neurophysiol* 76: 3740–3749, 1996
- Olivera BM. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The  $\omega$ -conotoxins and  $\omega$ -agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63: 823–867, 1994
- Omote K, Sonoda H, Kawamata M, Iwasaki H, Namiki A. Potentiation of antinociceptive effects of morphine by calcium channel blockers at the level of the spinal cord. *Anesthesiology* 79: 746–752, 1993
- Rane SG, Holz IV GG, Dunlap K. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pflügers Arch* 409: 361–366, 1987
- Reeh PW, Kocher L, Jung S. Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of unmyelinated nociceptors in the rat? *Brain Res* 384: 42–50, 1986
- Russell NJW, Heapy CG, Jamieson A. Afferent activity in models of inflammation. *Pain Suppl* 4: S255, 1987
- Schmidt WK, Way EL. Hyperalgesic effects of divalent cations and antinociceptive effects of a calcium chelator in naive and morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther* 212 :22–27, 1980
- Shin HK, Kim KS. Conduction block of the primary afferent fibers by topically applied allyl isothiocyanate. *Kor J Physiol* 28: 123–132, 1994
- Welch SP, Dewey WL. A characterization of the antinociception produced by intracerebroventricular injection of 8-(N,N-diethylamino) octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 320–326, 1986
- Woolf CJ, Wall PD. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci* 6: 1433–1442, 1986
- Xiao W-H, Bennett GJ. Synthetic  $\omega$ -conopeptides applied to the site of nerve injury suppress neuropathic pains in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 666–672, 1995
-