

백서 척수에서 Capsaicin과 Eugenol이 iCGRP (immunoreactive calcitonin gene-related peptide) 분비 조절에 미치는 영향.

오원만 · 김원재 · 최남기 · 박상원 · 황인남 · 김선현
전남대학교 치과대학, 치의학 연구소

ABSTRACT

EFFECT OF CAPSAICIN AND EUGENOL ON ICGRP (IMMUNOREACTIVE CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE) RELEASE FROM RAT LUMBAR SPINAL CORD.

Won-Mann Oh, Won-Jae Kim, Nam-Ki Choi, Sang-Won Park, In-Nam Hwang, Sun-Hun Kim
College of Dentistry, Dental Science Research Institute, Chonnam Natl. Uni.

Neuropeptide such as calcitonin gene-related peptide and substance P may mediate neurogenic inflammation, but little is known about the regulation of neuropeptide release from rat spinal cord. Eugenol has been reported to reduce odontogenic pain and is known to have a structure similar to capsaicin, a potent stimulant of certain nociceptors. This study was done to examine the effect of capsaicin and eugenol on immunoreactive calcitonin gene-related peptide (iCGRP) release from rat spinal cord and whether eugenol regulates capsaicin-sensitive release of iCGRP or it evokes capsaicin-sensitive release of iCGRP. The dorsal half of rat lumbar spinal cord was chopped into 200 μ m slices. They were superfused (500 μ l/min) *in vitro* with an oxygenated Kreb's buffer. The EC₅₀ of capsaicin on iCGRP release was measured. Eugenol (600 μ M and 1.2mM) and vehicle (0.02% 2-hydroxyl- β -cyclodextrin) were administered prior to stimulation of rat lumbar spinal cord with capsaicin. The amount of iCGRP release from rat lumbar spinal cord was measured by radioimmunoassay.

The results were as follows:

1. iCGRP release from rat lumbar spinal cord was dependent on concentration of capsaicin. The EC₅₀ of capsaicin on iCGRP release was 3 μ M.
2. In the vehicle treated group, capsaicin (3 μ M) evoked a 14-fold increase over basal iCGRP level.
3. Administration of 600 μ M and 1.2mM eugenol evoked a 2.2-fold increase and a 2.3-fold increase over basal iCGRP level respectively.
4. Administration of 600 μ M and 1.2mM eugenol increased capsaicin evoked release of iCGRP by more than 50%.

These results indicate that eugenol evoke CGRP release from central nervous system and potentiate the pain-inducing action of capsaicin on it

Key words : Eugenol, Capsaicin, Rat lumbar spinal cord, Superfusion, Radioimmunoassay

※본 연구는 1998년도 전남대학 학술연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

I. 서 론

통각과민 (hyperalgesia)이란 동통 역치가 감소되어 있는 상태에서 역치 이상의 자극이 가해지면 동통이 증가되는 현상으로 때때로 자발통이 유발된다¹⁾. 통각과민 유발은 말초기전 뿐 만 아니라 중추기전에도 관련이 있다. 특히 중추기전의 경우, 통각과민은 중추 지각과민 (central sensitization)에 의해서도 유발된다. 중추 지각과민은 척수의 후각 (dorsal horn)의 흥분과다로 일어난다^{2,3)}. 통각과민이 일어나면 척수의 후각으로부터 CGRP (calcitonin gene-related peptide)와 substance P의 분비가 증가한다고 보고되어 있다⁴⁾.

신경펩타이드인 CGRP와 substance P는 침해수용 구심성 신경섬유에 함유되어 있다. 특히 척수, 구강점막, 피부 및 각막 등의 말단조직에서 높은 농도로 존재하며⁵⁻¹⁰⁾. 또한 중추신경계에도 다량 존재한다고 보고되어 있다⁴⁾. 프로스타그란딘 (prostaglandin), 브래디키닌 (bradykinin), 뉴코트리엔 (leukotriene B4) 및 히스타민 (histamin) 등과 같은 동통 유발성의 염증매개체들은 말초 신경을 활성화시켜 substance P나 CGRP 등의 분비를 촉진시켜 신경성 염증을 유발시킨다¹¹⁻¹⁴⁾.

유지놀은 상아질지각과민이나 가역성 척수염의 경우에 동통 진정제로 작용할 수 있으며, 반면에 척수조직에 자극이나 세포독성을 야기한다고 보고되어 있으나¹⁵⁾ 약물 기전에 대해 아직 구체적으로 밝혀진 바 없다. 유지놀은 감각신경의 활동을 억제하거나^{16,17)} 프로스타그란딘의 생성을 억제함으로써¹⁸⁾ 동통 진정제로서 작용을 지니며, 반면에 말초 감각신경에 동통 유발 물질인 캡사이신 (capsaicin)과 같은 작용을 지니고 있다고 보고되어 있다¹⁹⁾. 유지놀과 캡사이신은 다형침해수용체 (polymodal nociceptive neuron)와²⁰⁾ 척수 및 척수로부터²¹⁾ substance P의 분비를 촉진시킨다고 보고되어 있다. 즉 캡사이신은 고추의 주요 성분으로서 강력한 동통 유발하는 자극성 물질이며 유지놀과 같이 폐활계의 분자 구조를 가지고 있고^{21,22)}, 말초감각 신경의 특수 수용체에 선택적으로 작용하여 동통을 유발하나 시간이 경과 후에는 해로운 자극에 탈감각을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 오 등²²⁾은 낮은 농도의 유지놀은 소의 척수로부터 iCGRP (immunoreactive CGRP)의 분비를 유발하지 않았으며 캡사이신에 의해 감작된 신경을 억제하는 효과를 갖는다고 보고하였다.

신경펩타이드인 CGRP의 말초조직내 분포, 역할 그리고 조직 손상시 이의 반응에 대해 많은 보고가 있었으나 중추신경계인 척수에서의 분포, 역할 및 신경펩타이드 분비를 조절하는 인자와 작용기전에 대한 보고는 희귀한 편이다. 따라서 척수 자극제이면서 척수신경을 진정시키는 작용을 가지는 유지놀의 백서의 척수에서 iCGRP 분비 조절에 미

치는 영향을 평가하고, 캡사이신에 의해 야기되는 iCGRP 분비조절에 유지놀의 미치는 역할에 대해 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 백서 요추척수 (rat lumbar spinal cord) 처리 및 관류 (superfusion)

백서를 단두를 이용하여 희생시킨 후 생리식염수에 정수압을 가하여 척수를 적출하고 요추척수의 배측 풍음부 (dorsal lumbar enlargement)를 예리한 면도날로 절단 채득하였다. McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, USA)로 채득된 척수조직을 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ 입방체로 절단하였다. 척수 조직은 silicone으로 코팅된 미세관 (microtube)에 담아서 무게를 잰 후 산소가 공급되는 Kreb's buffer (95% O₂: 5% CO₂)로 채워진 2ml의 관류 챔버 (chamber)에 삽입했다. 각 챔버에는 $200 \pm 14.7\text{mg}$ (mean \pm S.E.; n=7)의 백서 척수 조직이 담기도록 하였다. *In vitro* 관류실험 실험은 Hargreaves 등^{11,23,24)}에 의해 제시된 방법에 따라 37°C의 수조에서 행해졌다 (Fig. 1). 즉 연동펌프 (peristaltic pump, Manostat Inc., USA)를 이용하여 Kreb's buffer를 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 관류시켰다 (Fig. 1). 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) 및 Thiorphan (0.01mM)으로 구성되게 하였다. Kreb's buffer는 pH 7.4로 일정하게 유지시켰다. 안정적인 baseline을 얻기 위하여 40분간 척수조직을 관류하여 wash-out시킨 후 Kreb's buffer가 chamber를 채운 후, 밖으로 흘러나오는 관류액을 각 fraction 당 각 3분씩 fraction collector (Gilson FC 203, USA)를 이용하여 수집하였다. 유지놀을 용해시켜 척수 조직에 적용하기 위한 약물전달제 (vehicle)로 사용하기 위하여 0.02% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (RBI, USA)을 사용하였다. 캡사이신이 척수로부터 iCGRP의 분비에 미치는 영향을 구명하고 dose-response 관계를 알기 위해서 캡사이신 (Sigma, USA)을 에탄올에 용해시킨 후 Kreb's buffer (0.02% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin)에 0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM , 10 μM 및 100 μM 농도로 희석시켰으며 5번째 및 6번째 fraction에서 각 농도의 캡사이신을 척수조직에 가하여 iCGRP가 유리되는 양의 EC₅₀을 구하였다. 유지놀과 캡사이신이 척수로부터 iCGRP의 분비에 대한 상호작용을 구명하기 위하여 유지놀을 Kreb's buffer (0.02% 2-

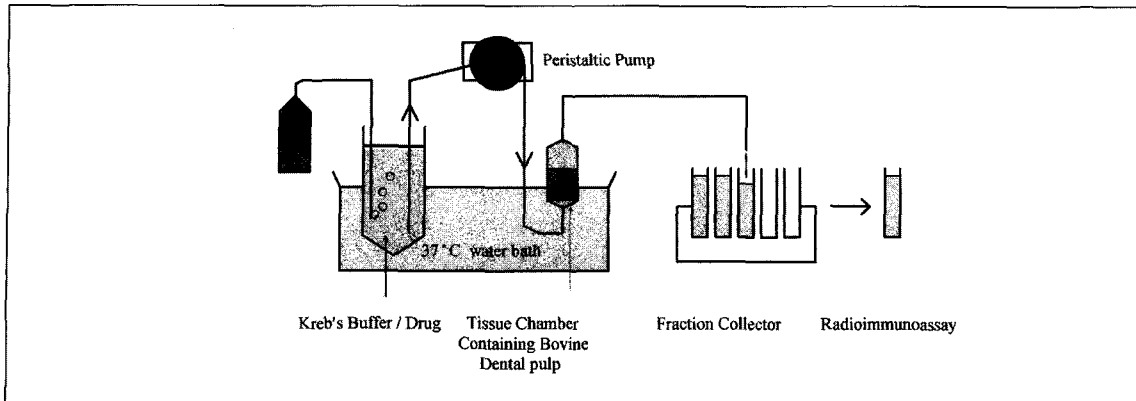


Fig. 1. Superfusion Setup. The dorsal lumbar enlargement of rat spinal cord was loaded in a superfusion chamber (2ml) and placed in a waterbath(37°C). Oxygenated Kreb's buffer was pumped through the system (flow rate 500L/min) and collected in 3min fractions. Fractions were subjected to radioimmunoassay using a polyclonal antiserum against CGRP.

hydroxylpropyl- β -cyclodextrin)에 희석시켜 600 μ M과 1.2mM이 되도록 하고 3번부터 6번 fraction까지 척수 조직에 관류시켰으며, 3 μ M 캡사이신 (에탄올의 최종 농도는 0.005%)을 5번 및 6번 째 fraction에서 척수조직에 가하여 관류액을 수집하였다. 매 fraction 마다 관류액은 12 \times 75mm 크기의 borosilicate 시험관을 이용하여 수집하였다.

2. iCGRP의 정량

수집된 관류액은 면역방사선분석법에 의해 iCGRP를 정량하였다. CGRP antiserum (MI-2, Dr M. Iadarola 제공)은 CGRP의 C-terminal에 부착하지만 cholecystokinin, neuropeptide Y 혹은 FMRF-amide peptide 같은 유사한 C-terminal residue와는 교차 반응하지 않았다. 실험직 후 수집된 관류액의 각 fraction의 시험관에 MI-2 antiserum (1:200,000 CGRP antiserum)의 100 μ l을 첨가하고 시험관을 vortex상에서 잘 선회시킨 후 4°C에서 배양시켰다. 배양 48시간 후 [¹²⁵I]-TyrCGRP₂₈₋₃₇ (대략 20,000~25,000cpm)의 100 μ l와 ferric bead가 부착된 goat anti-rabbit antisera (Advanced Magnetics Inc.)의 50 μ l를 시험관에 첨가하고 vortex에서 선회시킨 후 4°C에서 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 면역침강 반응물은 감마 카운터 (gammar 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 fmol 이었으며 각 시험관 당 10~30 fmol 사이에서 50% displacement를 보였다.

3. 통계처리

각 처리군 간의 분비량 유의성을 검정하기 위하여 Student's-t 검정을 시행하였다.

III. 연구 결과

약물을 가하지 않고 Kreb's buffer만 백서 요추척수의 배측 풍용부를 Kreb's buffer로 40분 동안 wash-out시킨 후 관류시켰을 때 자연히 분비되는 iCGRP의 baseline은 30 \pm 20 fmol/0.2g을 나타냈고 유지놀을 희석시키는 약물운반체 (vehicle)로 사용된 0.02%의 2-hydroxyl- β -cyclodextrin는 40 \pm 19.5 fmol/0.2g을 분비시켰으나 유의한 차이는 나타내지 않았다 (Fig. 2).

600 μ M 및 1.2mM 농도의 유지놀은 각각 90 \pm 25.5 fmol/0.2g과 110 \pm 40.3fmol/0.2g를 분비시켰으며 baseline에서는 각각 30 \pm 20fmol/0.2g과 34 \pm 21fmol/0.2g이 분비되어 600 μ M과 1.2mM 농도의 유지놀이 baseline에 대해 각각 2.2배 와 3.2배 분비시켰다(P<0.01). 그러나 두

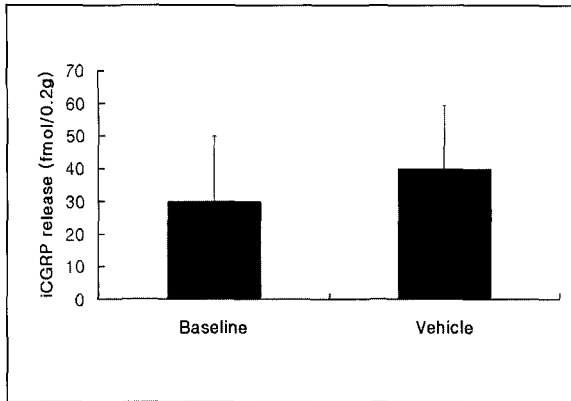


Fig. 2. The effect of vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) on iCGRP release from the lumbar enlargement of rat spinal cord is not significant from the baseline (fraction 4, n=7, error bar=S.E.M).

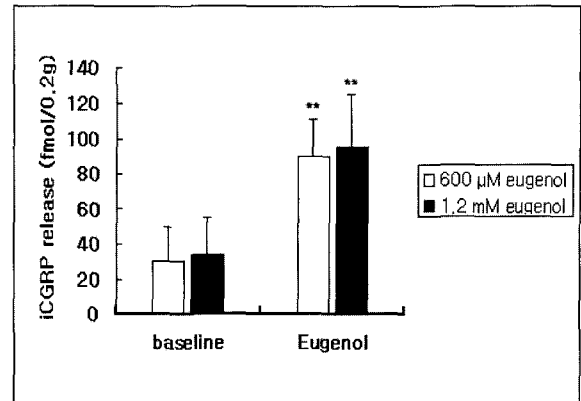


Fig. 3. Evaluation of effect of eugenol on spontaneous iCGRP release from the lumbar enlargement of rat spinal cord. Both different concentration of eugenol significantly effect on iCGRP release ($p < 0.01$). But there is no significance between them (fraction 5, n=7, error bar=S.E.M).

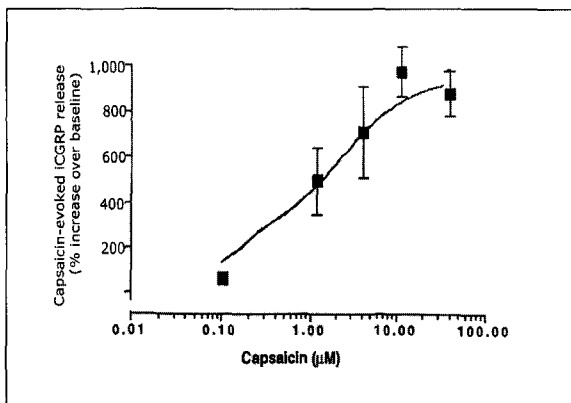


Fig. 4. Effect of capsaicin on iCGRP release from the dorsal half of rat spinal cord. Tissue was treated with various concentration of capsaicin for 3min (n=5-7/group). Datas are represented as the percentage increase in iCGRP release over basal release. Error bars are S.E.M.

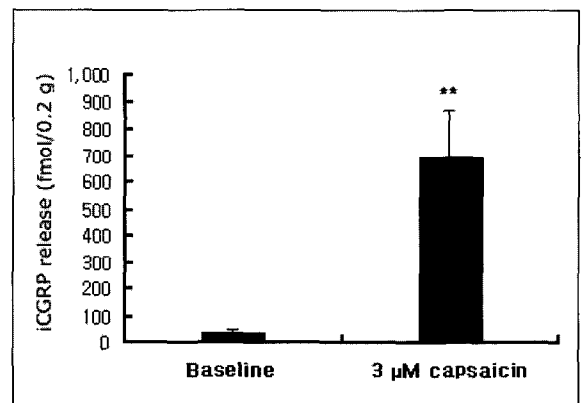


Fig. 5. The effect of 3 μ M capsaicin on spontaneous iCGRP release from rat dorsal spinal cord (fraction 6, n=6, ** $p < 0.01$, error bar=S.E.M.).

농도간에는 분비량에 있어서 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 3).

백서의 요추척수 배측 풍용부로부터 iCGRP 분비에 대한 캡사이신의 농도 효과를 관찰하기 위하여 캡사이신을 Krebs' buffer에 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 및 100 μ M 농도로 희석시켰으며 5번째 및 6번째 fraction의 척수조직에 가한 결과 iCGRP의 분비량은 캡사이신의 농도가 증가함에 따라 늘어났다. 캡사이신의 EC₅₀는 3 μ M을 나타냈

다 (Fig. 4).

3 μ M 캡사이신은 백서 척수로부터 평균 700.5 \pm 170 fmol/0.2g의 iCGRP를 분비시켰으며 baseline에서는 50 \pm 25 fmol/0.2g이 분비되어 유의한 차이를 보였다 (Fig. 5, $p < 0.01$).

Fig. 6와 Fig. 7은 백서의 요추척수의 배측 풍용부로부터 iCGRP 분비에 대한 유지놀과 캡사이신의 영향을 나타내는 도표이다. 40분 동안 wash-out한 다음 3번째에서 6번째

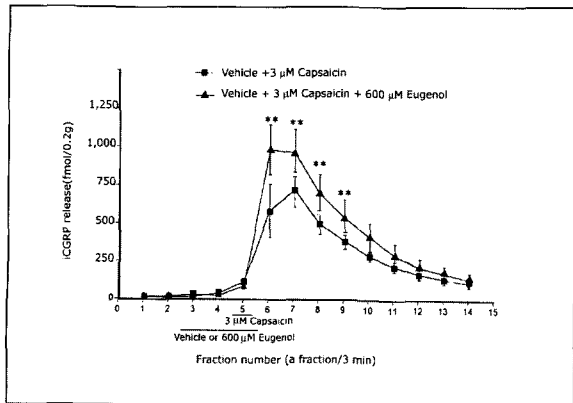


Fig. 6. The Effect of 600μM Eugenol on capsaicin-evoked release of iCGRP. ** p<0.01.

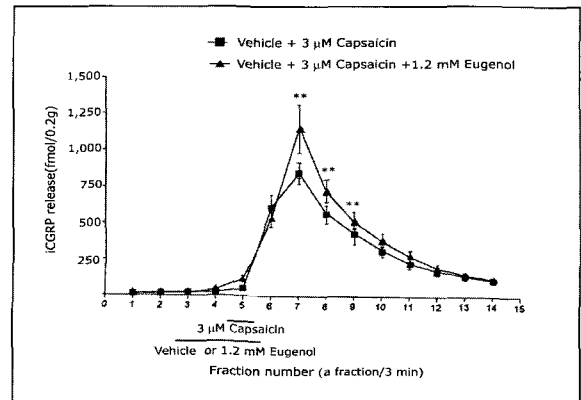


Fig. 7. The Effect of 1.2mM Eugenol on capsaicin-evoked release of iCGRP. ** p<0.01.

fraction까지 vehicle과 유지놀 600μM 및 1.2mM의 두개 다른 농도를 척수조직에 적용하였고 동시에 3μM capsaicin을 5번과 6번 fraction에 적용하여 iCGRP 분비량을 측정된 결과를 나타내고 내고 있다. 600μM 유지놀과 3μM 캡사이신을 함께 척수조직에 가한 경우에는 980±150 fmol/0.2g이 분비되었고 3μM 캡사이신만 가한 경우에는 651±140fmol/0.2g이 분비되어 유지놀이 캡사이신의 iCGRP 분비를 약 50%강화시켰다 (p<0.01, Fig. 6).

1.2mM 유지놀과 3μM 캡사이신을 함께 척수조직에 가한 경우에는 1150±200fmol/0.2g이 분비되었고 3μM 캡사이신만 척수조직에 가한 경우 750±150fmol/0.2g이 분비되어 유지놀이 캡사이신의 iCGRP 분비를 약 53% 증가시켰다 (p<0.01, Fig. 7). 그러나 600μM 유지놀과 3μM 캡사이신에 의한 iCGRP 분비량과 1.2mM 유지놀과 3μM 캡사이신에 의한 iCGRP 분비량 차이에는 유의한 차가 없었다.

IV. 고 찰

구심성 감각신경의 종말에는 CGRP나 substance P와 같은 신경펩타이드가 풍부하게 존재하고 있다²³⁾. 또한 삼차신경절이나 척수에도 다량 분포되어 있다⁴⁾. K⁺, H⁺ 및 캡사이신과 같은 자극 물질이나 프로스타그란딘, 브래디키닌, 뉴코트리엔 B4 및 히스타민 등과 같은 염증매개체에 의해서 감각신경이 감각되어 동통 유발과 함께 신경펩타이드의 분비가 증가한다^{11,19)}. 따라서 면역조직화학법에 의한 CGRP나 substance p 함유 신경섬유의 발아 (sprouting) 정도를 관찰하거나 면역방사선분석법 (RIA)을 이용한 신경펩타이드의 정량에 의해서 자극에 대한 동통반응의 강도를 추정한다^{13,14,23,24)}. 척수로부터 신경펩타이드의 분비 조절에 작용하는 약물 평가시에 소 척수가 *in vitro* 관류시험법

에 유용한 소재임이 보고되어 있으며²²⁻²⁴⁾ 삼차신경절이나 척수로부터 신경펩타이드의 분비 조절에 작용하는 약물 평가 시에는 백서가 유용한 소재이다⁴⁾. 특히 척수에 분포되어 있는 신경펩타이드는 척수 후각부의 일차 구심성 뉴론에 주로 많이 존재하기 때문에 본 연구에서는 백서 요추부의 배측 풍음 부위를 예리한 면도칼로 절단하여 실험소재로 사용하였다. 척수는 변성이 쉽게 일어나기 때문에 백서 척추로부터 척수를 제거하는 방법에 대해서 익숙해야한다. 따라서 본 연구에서는 마취하지 않은 상태에서 백서의 경부를 절단기로 절단한 후 외과용 가위로 요추 후방부 척추를 절단하고 생리식염수가 들어 있는 20cc 주사를 두부측 척수관에 삽입하여 주사한 후 척수를 분리하였다.

Garry 등⁴⁾은 NO 발생 물질인 SNP (sodium nitroprusside)는 백서 척수의 후각에 위치하는 일차 구심성 뉴론으로부터 iCGRP 및 iSP (immunoreactive substance P)의 분비를 촉진시키며, SNP에 의해서 야기된 iCGRP의 분비는 guanylate cyclase inhibitor인 methylene blue에 의해 억제된다고 하여 SNP에 의한 iCGRP분비가 cGMP의 증가와 관련이 있다고 보고하였다.

캡사이신은 일차 구심성 감각신경을 자극하여 신경펩타이드의 분비 및 동통을 유발한다. 구심성 감각섬유에는 캡사이신 수용체가 존재하고 있다. 이 수용체가 자극 받게되면 양이온 채널이 개방되고 칼슘이온과 Na⁺ 이온이 신경내로 침투하여 탈분극이 시작되고 임펄스가 중추신경에 전달된다. 특히 신경세포내 침투한 칼슘이온이 신경펩타이드를 분비한다^{25,26)}. 일차 구심성 신경에 대한 캡사이신의 작용기전에 대한 연구는 선택적인 캡사이신 수용체에 의해 경쟁적으로 길항 작용하는 benzazepine 유도체인 capsazepine에 의해 많이 수행되고 있다²⁷⁾.

본 연구에서는 캡사이신을 0.01μM, 0.1μM, 1μM, 10μM 및 100μM 농도로 희석시켜 척수조직에 가한 결과 농

도가 증가함에 따라 iCGRP가 분비량이 늘어나 농도가 커짐에 따라 척수에 가해지는 자극이 커짐을 알 수 있었다. EC₅₀는 3 μ M을 나타내 캡사이신에 의해 야기되는 iCGRP 분비조절에 유지놀이 미치는 역할에 대해 평가하기 위해서 3 μ M 농도의 캡사이신을 본 실험에 사용하였다.

Ohkubo와 Kitamura²⁸⁾은 백서의 DRG (dorsal root ganglion)를 whole-cell patch-clamp 실험한 결과 유지놀이 신경세포내로 Ca²⁺ 채널과 Cl⁻ 채널을 활성화시키며 캡사이신에 길항 작용하는 capsazepine이 eugenol-induced current를 부분적으로 억제하였고 또한 capsaicin-induced current를 완전히 억제하여 유지놀이와 캡사이신이 구심성 감각신경에 대해 같은 기전으로 작용한다고 주장하였다. Patachinni 등¹⁹⁾도 유지놀이 쥐 방광의 말초각각 신경에서 캡사이신과 같은 작용을 발휘한다고 하였고, 캡사이신과 유지놀이 척수 및 척수²⁰⁾, 다형 침해수용 뉴런²¹⁾에서 substance P를 분비시키는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 3 μ M 캡사이신이 약물처리를 하지 않았을 때 분비되는 baseline에 비해 약 14배 정도 분비를 증가시켰으며 캡사이신이 신경펩타이드의 분비 및 동통을 야기하는 것을 확인할 수 있었다.

캡사이신과 유지놀은 유사한 페놀 화학구조식을 가지고 있으며 유사한 작용을 한다^{19,30)}. 본 연구에서도 600 μ M과 1.2mM 농도의 유지놀이 백서의 척수에서 baseline에 비해 각각 2.2배와 3.2배 정도 iCGRP의 분비를 야기하여 척수 조직을 자극하는 것으로 생각되며 두 농도 사이에 분비량에 있어서 유의한 차가 없었는데 이는 600 μ M과 1.2mM 농도의 유지놀은 백서 척수가 감당하기에 힘든 큰 자극제임을 시사한다. 또한 본 실험에서 유지놀이 3 μ M 캡사이신에 의해 분비되는 iCGRP량을 50% 정도 강화시켰는데 이는 백서 척수에서 유지놀이 캡사이신에 의한 iCGRP의 분비에 대해서 상승 (synergism) 작용하는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Ohkubo와 Kitamura²⁸⁾ 그리고 Patachinni 등¹⁹⁾의 연구결과와 일치하는 것이다. 그러나 필자 등²²⁾이 보고한 소의 척수에 유지놀의 iCGRP의 분비조절에 미치는 영향이란 연구에 의하면 600 μ M과 1.2mM 유지놀이 소의 척수에서는 iCGRP의 분비에 영향을 주지 않았으며 오히려 iCGRP 분비를 40%이상 감소시켜 본 연구 결과와 상반된 결과를 보이고 있는데 이는 소의 척수는 소성결합조직이고 쥐의 척수는 중추 신경조직으로서 구성 조직이 전적으로 다르고, 중추신경이 척수조직에 비해 자극에 예민하게 반응하는 것으로 생각된다. 또한 600 μ M과 1.2mM 농도의 유지놀은 소의 척수에서는 큰 자극제로서 작용하지 않았던 것 같으나 iCGRP가 매우 많이 함유되어 있는 백서 척수에서는 위와 같은 농도의 유지놀이 큰 자극제로 작용하여 iCGRP의 분비를 야기하였고, 오히려 캡사이신에 의해 야기되는 iCGRP분비를 강화시킨 것으로 생각된다.

유지놀이와 캡사이신은 유사한 작용뿐만 아니라 상반되는 작용도 하기 때문에 척수조직의 말초 구심성 감각섬유 뿐만 아니라 척수와 같은 중추신경에서도 iCGRP 분비에 미치는 영향 및 상호작용에 대한 연구가 시행되어야 할 것 같다.

IV. 결 론

척수 자극제이면서 척수신경을 진정시키는 작용을 가지는 유지놀이 백서 척수에서 iCGRP 분비의 조절에 미치는 영향을 평가하고, 캡사이신에 의해 야기되는 iCGRP 분비조절에 유지놀의 미치는 역할을 구명하기 위하여 본 연구가 시행되었다. 백서의 요추척수의 배측 풍음부를 채득하고 200 μ m×200 μ m 입방체로 잘게 절단하여 산소가 공급되는 Kreb's buffer에 500 μ /min의 속도로 척수조직을 관류시켰다. 유지놀이와 캡사이신 및 약물전달체 (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin)를 척수 조직에 관류한 후 그 관류액을 면역방사선분석법에 의해 분비된 iCGRP량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 캡사이신의 농도가 증가함에 따라 백서척수로부터 iCGRP의 분비량이 늘어났으며 캡사이신의 EC₅₀는 3 μ M을 나타냈다.
 2. 3 μ M 캡사이신은 baseline에 대해 iCGRP 분비를 14 배 증가시켰다 (p<0.01).
 3. 600 μ M 농도와 1.2mM 농도의 유지놀은 baseline에 대해 각각 2.2배와 3.2배 증가시켰으나 두 농도간에는 분비량에 있어서 유의한 차이를 나타내지 않았다.
 4. 유지놀이 (600 μ M과 1.2mM)은 캡사이신에 의해 야기된 iCGRP 분비를 50% 이상 증가시켰다 (p<0.01).
- 이와 같은 결과는 유지놀이 백서 척수로부터 CGRP 분비를 야기하며, 유지놀이 캡사이신의 통통 유발작용을 강화시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Campbell JN, Myer RA : Primary afferents and hyperalgesia. In: Spinal afferent Processing (Yaksh TL, ed). New York: Plenum.
2. Simone DA, Sorkin LS, OH U, Chung JM, Owens C, LaMotte RH, Willis WD : Neurogenic hyperalgesia: Central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. J Neurophysiol 66:228-246, 1991.
3. Grubb MG, Stiller RU, Schiabl H-G : Dynamic changes in the receptive field properties of spinal cord neurons with ankle input in rats with chronic unilateral inflammation in the ankle region. Exp Brain Res 92:441-452, 1993.
4. Garry MG, Richardson J-D, Hargreaves KM : Sodium nitroprusside evokes the release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P from dor-

- sal horn slices via oxide-dependent and nitric oxide-independent mechanisms. *J Neuroscience* 17:4329-4337, 1994.
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. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL : Effect of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *JOE* 16:78-84, 1990.
 15. Sneddon IB, Glew RC : Contact dermatitis due to propanidid an anesthetist. *Practitioner* 211:321-323, 1973.
 16. Ozeki M : The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Com Chem Physiol* 50(C):183-191, 1975.
 17. Trowbridge H, Edwall L, Panopoulos P : Effect of zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide on intradental nerve activity. *JOE* 8:403-406, 1982.
 18. Hirafuji M : Inhibition of prostaglandin I2 biosynthesis in rat dental pulp by penolic dental medicaments. *Jpn J Pharmacol* 36:544-546, 1984.
 19. 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.
 20. Bevan SJ, Szolcsanyi J : Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and application. *Trends Pharmacol Sci* 11:330-333, 1990.
 21. 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.
 22. 오 원만, 최남기, 김선현: 치수에서 Eugenol이 iCGRP의 분비 조절에 미치는 영향. *대한치과보존학회지*, 24:180-186, 1999.
 23. 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.
 24. Hargreaves KM, Bowles WR, Garry MG : An in vitro method to evaluate regulation of neuropeptide release from dental pulp. *JOE* 18:597-600, 1992.
 25. 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.
 26. Wood JN, Winter J, James LF, Rang HP, Yeats J, Bevan S Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neuorsci* 8:3208-3220, 1988.
 27. 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.
 28. Ohkubo T, Kitamura K : Eugenol activates Ca²⁺-permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J Dent Res* 76:1737-1744, 1997.