

## 추간판성통증 동물모델의 개발: 초기 연구

고려대학교 의과대학 신경과학교실<sup>1</sup>, 의학대학원<sup>2</sup>, 생리학교실<sup>3</sup>, 영상의학교실<sup>4</sup>김병조<sup>1</sup> · 이 민<sup>2</sup> · 임은정<sup>3</sup> · 유성욱<sup>1</sup> · 홍성하<sup>1</sup> · 홍석주<sup>4</sup> · 나홍식<sup>3</sup>Development of a Discogenic Pain Animal Model:  
Preliminary StudyByung-Jo Kim, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Min Lee, B.A.<sup>2</sup>, Eun Jeong Lim, M.S.<sup>3</sup>,  
Sung-Wook Yu, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Sung-Ha Hong, B.A.<sup>1</sup>, Seok Joo Hong, M.D., Ph.D.<sup>4</sup>,  
Heung Sik Na, M.D., Ph.D.<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Neurology, Korea University College of Medicine;<sup>2</sup>Department of Biomedical Science, Korea University Graduate School;Departments of <sup>3</sup>Physiology and <sup>4</sup>Radiology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Received 14 April 2009; received in revised form 8 June 2009; accepted 28 July 2009.

**Background:** Discogenic pain can develop into chronic low back pain that is very difficult to treat effectively, because the pathogenesis of the disease still remains controversial. To clarify the pathogenesis, numerous animal models of intervertebral disc degeneration have been proposed in the literature, each with attendant advantages and disadvantages. The aim of this study was to determine the most efficacious method and dose of complete Freund's adjuvant (CFA) injection into intervertebral disc to develop a discogenic pain in a rat. **Methods:** CFA was injected into the L5-L6 or L4-L5 disc of male Sprague-Dawley rats in various conditions including a dose of CFA (10, 20, or 50 uL), drilling, injection site sealing using cyanoacrylate, and injection velocity. Sham animals were subjected to the same procedure, except for the CFA injection. Mechanical and heat allodynia were serially measured at both hindpaws until 8 weeks post-operatively. Serial MRI analyses were performed to observe degenerative changes of the discs. In addition, CGRP & Substance P-immunoreactivities (ir) in the superficial dorsal horn were evaluated at 4 weeks using immunohistochemistry. **Results:** Each condition provoked various problems such as development of hindpaw paralysis, CFA leakage, and no pain development. Mid-sagittal T2 MRI revealed no significant degenerative changes in the CFA injected disc. The CGRP-ir of the bilateral superficial dorsal horns at the level of L5-L6 was significantly increased in the CFA group. **Conclusions:** A total of 10 uL CFA injection into L5-L6 disc for a period of 10 minutes using a 26-gauge needle without drilling was the most efficacious way to develop discogenic pain animal model.

**Key Words:** Discogenic pain, Complete Freund's adjuvant, Animal model, Rat, Pain behavior, Immunohistochemistry

Address for correspondence;

Byung-Jo Kim, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Korea University Medical Center,  
Korea University College of Medicine, 126-1 Anam-dong 5 ga,  
Seongbuk-gu, Seoul 136-705, Korea  
Tel: +82-2-920-6619 Fax: +82-2-925-2472  
E-mail: nukbj@korea.ac.kr

\* This work was supported by the Korea Research Foundation Grant, funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund; KRF-2006-311-E00080).

## 서 론

2004년 국민보험공단 통계 자료에 의하면 요통 및 요추 부 통증의 상병으로 지출된 의료비만 약 3,100억 원이었으며 이는 상기도 감염과 치과 질환 및 고혈압 다음으로 많이 소모된 의료비였다.<sup>1</sup> 급속도로 고령화 사회로 접근하고 있는 국내 사정을 볼 때, 노인에서 많을 수밖에 없는 척추

통증 질환에 의료비 지출은 해가 갈수록 늘어날 수밖에 없을 것으로 추정하고 있다. 임상적으로는 척추 통증 치료를 위해 아주 다양한 치료 기법이 개발되었지만, 그 치료 효과의 효용성에 대해서는 아직도 논란이 많은데, 이는 아직까지도 척추통증의 발현에 관여하는 발병기전에 대한 규명이 명확하지 않기 때문이다.

위의 문제점에 대한 연구를 위해, 척추통증질환 동물 모델을 이용한 연구가 시행되고는 있으나 대부분이 척추 퇴행성 변화 모델들이 주가 되고 있다. 이러한 기존의 모델들은 기질적인 변화를 일으켜 추간판 용적 감소 등의 인간의 퇴행성 변화와 유사한 변화를 일으키나 추간판이 원인인 통증을 반영한 동물모델은 아직까지 보고된 적이 없다.<sup>2,4</sup> 과거, Aoki 등이 추간판에 complete Freund's adjuvant (CFA)를 주입하여 추간판 염증모델을 개발하였다고 보고하였으나, 이때도 통증 유발 여부의 객관적 평가는 없었으며, CFA를 추간판 이외에 신경근부위에도 인위적으로 노출시켰었기 때문에 이는 신경근염증 모델이지 순수한 추간판 성통증모델이라고 할 수 없는 연구였었다.<sup>5</sup> 기존의 가설에 의하면 추간판성통증은 기계적 손상이 발생한 추간판에 염증반응이 일어나고 이로 인하여 통증성 신경이 재 분포되면서 만성적인 통증이 발현되는 것으로 추론되고 있다.<sup>6</sup>

본 연구는 임상적 척추질환을 대변할 수 있는 적절한 추간판성통증동물모델 제작 방법을 설정하기 위한 초기 연구로서, 추간판 내에 CFA를 다양한 조건하에 주입하여 염증반응을 유발하고 이 때 발생하는 통증과 추간판의 영상학적 변화를 통증행동검사, 자기공명영상 및 면역조직화학 검사법을 이용하여 관찰하였다.

## 연구대상과 방법

### 1. 실험 동물

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(250~300 g)를 사용하였다. 실험동물들은 각각 우리에서 사육하였고 실내 온도는 25℃로 유지하였으며, 물과 먹이는 자유로이 먹게 하였고 12시간마다 점등을 반복하였다. 이 실험은 고려대학교 의과대학 연구소의 실험동물사용 및 사육에 관한 규정을 준수하여 시행하였다.

### 2. 실험대상군의 선별을 위한 통증행동검사

동물모델 제작에 사용될 대상 군을 선별하기 위하여 시술 하루 전에 통증행동검사를 시행하였다.

기계적이질통 (von-Frey검사). 바닥을 제외한 사방이 막

힌 투명한 플라스틱 박스(10×10 cm)를 철망(3×3 mm) 위에 놓고 실험동물을 넣어 약 20분간 적응시켰다. 각각 다른 강도의 총 8개로 구성된 뾰뾰한 나일론 von-Frey 단일 필라멘트 시리즈(3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93 and 5.18 mN, Stoelting, Wood Dale, IL, USA; equivalent in grams to 0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 15.0)를 이용하였고 50% 문턱 값을 사용한 up-down 방법<sup>7</sup>을 적용하여 통증반응을 평가하였다. 우선 8개 von-Frey 필라멘트 가운데 중간인 2.0 g (4.31 mN)의 필라멘트를 필라멘트가 구부러질 정도의 힘으로 양쪽 발바닥의 여러 부위를 3~4초 동안 찰러서 가장 민감한 부위를 찾아 실험을 진행하였다. 만약 발의 회피반응이 나타나지 않는다면 그보다 한 단계 더 강한 강도의 필라멘트로 실험을 반복하였다. 만약 반응이 있다면 더 약한 필라멘트로 최초 선별된 민감한 부위에 자극을 가하여 회피반응을 평가하였다. 각각의 자극은 2초의 간격을 두고 행하여 바로 전에 시행한 자극에 의한 영향을 최소화하도록 하였다.

열통각과민(열 자극으로부터의 회피). 열 민감성은 Hargreaves 등의 방법<sup>8</sup>대로 발바닥 검사 장치를 사용하여 평가하였다. 유리판 위에 실험 동물을 올려놓고 아크릴 박스로 가둔 뒤 역시 20분간 환경에 적응시켰다. 자극은 유리판 아래에서 일정한 열 강도를 가진 레이저를 발바닥에 쬐는 방법을 사용하였다. 이 때 과도한 열에 의한 조직 손상을 막기 위해 각각의 자극은 30초로 제한하였다. 총 세 번의 열 자극을 5~10분 간격으로 각각의 발바닥에 주어 발 회피 반응이 나타날 때까지의 시간(잠복기)을 반복 측정한 후 이들의 평균을 최종 평가 치료 결정하였다.

### 3. 동물 모델 제작

통증행동검사에서, 반복된 같은 정도의 자극에 일정한 반응을 보이지 않으며 기계적 이질통증검사에서 cut-off value 인 15.1 g<sup>7</sup>보다 높은 대상 군은 배제하고, 안정적인 대상군만을 선택하여 동물모델제작을 위한 시술을 시행하였다. 30% O<sub>2</sub> 및 5% enflurane의 혼합체로 흡입마취를 한 다음 무균적으로 모든 시술을 시행하였다. 복와위로 고정시킨 후, 흰쥐의 복부 중심부를 약 3 cm 정도 절개하고, 복막을 노출시킨 후에, 대동맥의 좌측을 따라 후복강을 절개한 다음, 대동맥과 왼쪽 허리근(psoas)사이의 제5~6 요추간 수핵을 노출시켰다. 수핵의 표면에서 26-gauge 주사바늘을 이용하여, 0.3 mm 깊이가 되도록 찢어, 바늘의 끝이 수핵의 배부에 위치하도록 한 다음, complete Freund's adjuvant (CFA, sigma, St louis, MO)를 주입속도와 용량을 자동으로

조절할 수 있는 펌프를 이용하여 주입하였다. 동물모델 제작 중에 *macroscope*을 사용하여 주입한 CFA의 누출 여부를 관찰하였다. 이 때 CFA 최소적절 주입 용량과 적절한 주입속도를 결정하기 위하여 단계적인 실험을 진행하였다. 각 단계마다 결과를 토대로 다음 단계의 실험 방법을 결정하였다. 이 과정 중에 횡륜섬유를 뚫기 위하여 드릴을 사용한 경우도 있었고, CFA 주입 이후 누출을 막기 위하여 시아노아크릴레이트(*cianoacrylate*)를 사용하여 횡륜섬유의 주입부위 구멍을 막기도 하였다. 각 단계별 실험 내용은 다음과 같다: 1) 제1 단계, 다섯 마리의 흰쥐에 드릴을 이용하여 제5~6 요추간 횡륜섬유를 뚫고 50 uL의 CFA를 5분에 걸쳐 주입한 후 시아노아크릴레이트를 사용하여 추간판의 주입 부위를 막았다. 2) 제2단계, 다섯 마리의 흰쥐에 드릴을 이용하여 제5~6 요추간 횡륜섬유를 뚫고 20 uL의 CFA를 5분에 걸쳐 주입하고 시아노아크릴레이트를 사용하여 추간판의 주입 부위를 막았다. 대조군은 한 마리를 사용하였다. 3) 제3단계, 다섯 마리의 흰쥐에 드릴을 이용하여 제4~5 요추간 횡륜섬유를 뚫고 20 uL의 CFA를 5분에 걸쳐 주입하고 시아노아크릴레이트를 사용하여 추간판의 주입 부위를 막았다. 대조군은 3마리였다. 4) 제4단계, 두 마리의 흰쥐에 드릴을 이용하여 제5~6 요추간 횡륜섬유를 뚫고 20 uL의 CFA를 세 마리는 10 uL를 5분에 걸쳐 주입하고 시아노아크릴레이트를 사용하여 추간판의 주입 부위를 막았다. 대조군은 세 마리였다. 5) 제5단계, 다섯 마리의 흰쥐에 드릴을 사용하지 않고 주사바늘만으로 10 uL의 CFA를 제5~6 요추간 수핵 내에 5분에 걸쳐 주입하고 시아노아크릴레이트 사용 없이 생리식염수로 복강 내를 세척하였다. 대조군은 다섯 마리였다. 6) 최종단계, 18마리의 흰쥐에 드릴을 사용하지 않고 주사바늘만으로 10 uL의 CFA를 10분에 걸쳐 주입하고 생리식염수로 복강 내를 세척하였다. 대조군은 13마리였다.

제2단계 실험부터 제작한 대조군은 CFA 주입군과 같은 수술을 받았으나, CFA만 주입하지 않은 경우로 하였다.

#### 4. 통증여부를 판단하기 위한 통증행동검사

수술 이후 통증 동물 모델의 정량적 통증 진단을 위하여 제5~6 요추간판과 같은 영역의 후근신경절에 해당하는 뒷발바닥에 기계적·열 자극과 열·열 자극검사를 시술 전 시행하였던 방법과 동일하게 시행하였다. 모든 행동검사는 검사자가 CFA 주입군과 대조군을 모르는 채 시행한 맹검법 (*blind study*)으로 시행하였다.

기계적 및 열 자극에 대한 이질통 검사는 수술 하루 전, 수술 후 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56일에 반복하여 시행

하였다. CFA 주입군과 대조군에서 시술 전 시행한 검사결과를 기준으로 시술 이후 56일째까지 시행한 검사에 차이를 *repeated one way ANOVA* 혹은 *Friedman's rank test*를 이용하여 분석하였고, 통계적으로 의미 있는 차이를 보이는 경우는 사후검정을 통하여 재분석하였다. 통계적인 유의성은  $P < 0.05$ 로 정하였다.

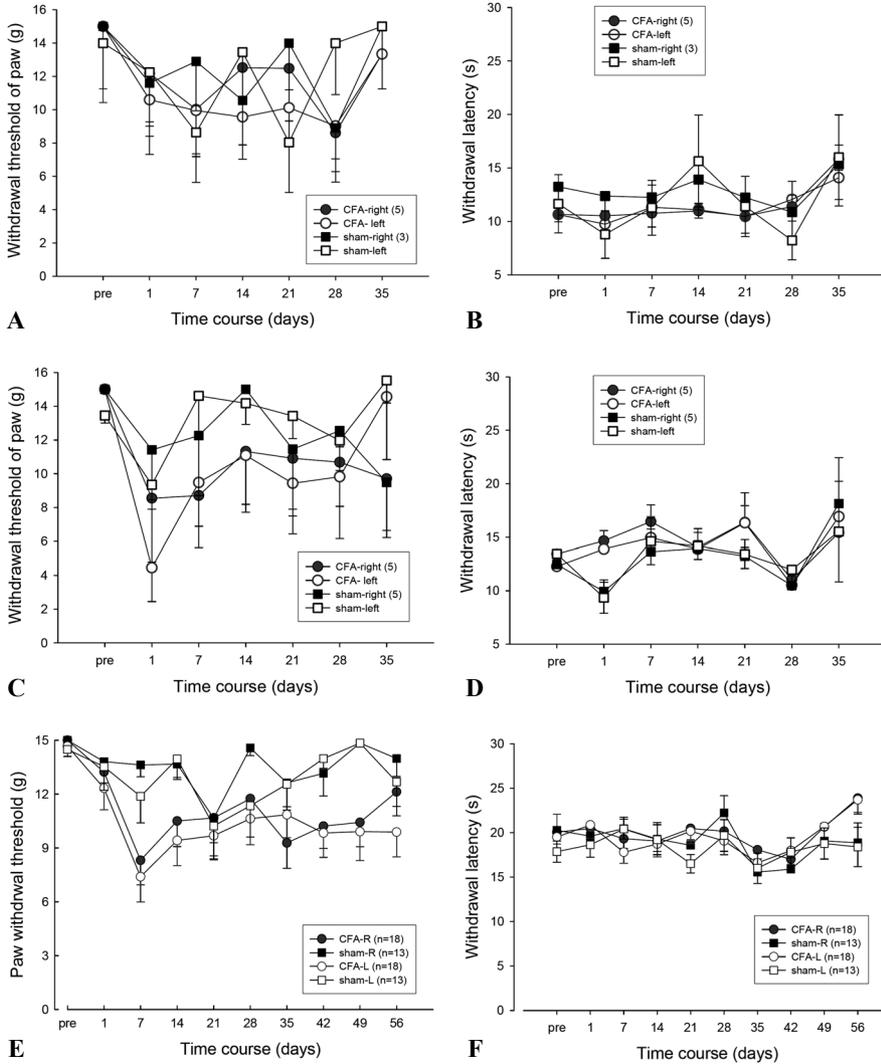
#### 5. 자기공명영상

최종단계의 방법대로 총 10 uL의 CFA를 26페이지 주사바늘로 드릴 없이 추간판 내 10분간에 걸쳐 삽입하고, 복강 내를 식염수로 세척하여 제작한 동물 모델 두 마리를 대상으로 척추간판의 퇴행성 변화를 검증하기 위하여 자기공명영상촬영을 시행하였다. CFA 주입 이후 각 1, 2, 4, 8주째에 *pentobarbital sodium*을 복강 내 주입하여 마취시킨 후 제5~6 요추간판을 중심으로 T2 (TR, 3,500 milliseconds; TE, 100 milliseconds) 강조영상 MRI (1.5 T, *Signa Horizon LX*, *General Electric Medical Systems*, *Florence, SC*)를 시행하여 정중시상면의 추간판 내 신호강도를 *region of interest (ROI)* 기법으로 측정 비교하였다.

#### 6. 면역조직화학검사

최종단계의 방법대로 시술 후 4주째 된 CFA 주입군과 대조군 각각 세 마리씩의 흰쥐를 대상으로 통증발현여부를 객관적으로 확인하기 위하여, 제5~6 요추 수준의 척수 후각에서 통증신경전달물질인 *calcitonin gene-related peptide (CGRP)*와 *substance-P (Sub-P)*의 발현을 면역조직화학검사를 이용하여 관찰하였다. 실험대상 흰쥐를 *pentobarbital sodium*으로 복강 마취한 다음 0.1 M *sodium phosphate-buffered saline (PBS)*을 이용하여 1차 관류하고, PBS에 녹인 4% *paraformaldehyde*를 이용하여 2차 관류하여 고정 후 척수를 적출하였다. 조직은 같은 고정액에 1일간 처리한 다음, 30% *sucrose*에 넣어 4°C 냉장고에 3일간 보관하였다. *cryotome*을 이용하여 30 um 두께로 절편을 만든 후, 각 조직 절편은 *Tris-buffered saline (TBS)*으로 3회 세척한 후, 0.1% *Triton-X 100*으로 1시간 동안 처리하였다. 다시 PBS로 3회 세척한 후에 일차 항체들(*substance P*, *CGRP*)을 24시간 동안 4°C 냉장고에서 반응시켰다. 이어서 한 시간 정도 상온에서 반응시킨 조직 절편을 TBS로 세척하고, 약 60분간 *EnVision* 시약을 이용하여 반응시켰다. 마지막으로 TBS로 2회 세척한 다음 0.05% 3,3'-*diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma)*와 0.01%  $H_2O_2$  혼합액으로 발색시켜 관찰하였다.

각 개체마다 척수 후각의 CGRP 발현 정도를 측정하기



**Figure 1.** Temporal courses of mechanical and heat allodynia induced by the CFA injection with various methods into the intervertebral disc (IVD) in rats. The mean ( $\pm$ SEM) withdrawal thresholds and latencies in both hindpaws to von Frey hair (A, C, and E) and laser (B, D, and F) stimulation are plotted against postinjection day(s). (A) The bilateral hindpaws withdrawal thresholds of the CFA injected rat into L4-L5 IVD do not differ from the thresholds of the sham operated group. (C) The plot of thresholds in rats with CFA injection for 5 minutes reveal decrease compared to preinjection value.

(E) The bilateral hindpaws withdrawal thresholds of the CFA-treated, but not sham, group are significantly decreased following the injection of CFA with 10  $\mu$ l dose and 10 minutes duration compared to preinjection value (Repeated one way ANOVA followed by Dunn's test method for CFA-injected group; Friedman rank test for Sham group). (B, D, and F) The withdrawal latencies for heat allodynia in CFA injected rats and sham operated rat do not show any differences.

위하여 두 개의 연속된 척추 절편을 촬영한 후 0~255 범주의 회색조 디지털영상으로 변형하였다. 각 절편마다 척추 후각의 lamina I과 II의 density에서 lamina VI과 VII의 density를 뺀 값을 NIH Image Software (Bethesda, MD, USA)를 이용하여 측정하여 분석에 이용하였다. 두 군 간에 차이는 Mann-Whitney test를 사용하여  $P < 0.05$ 를 기준으로 분석하였다.

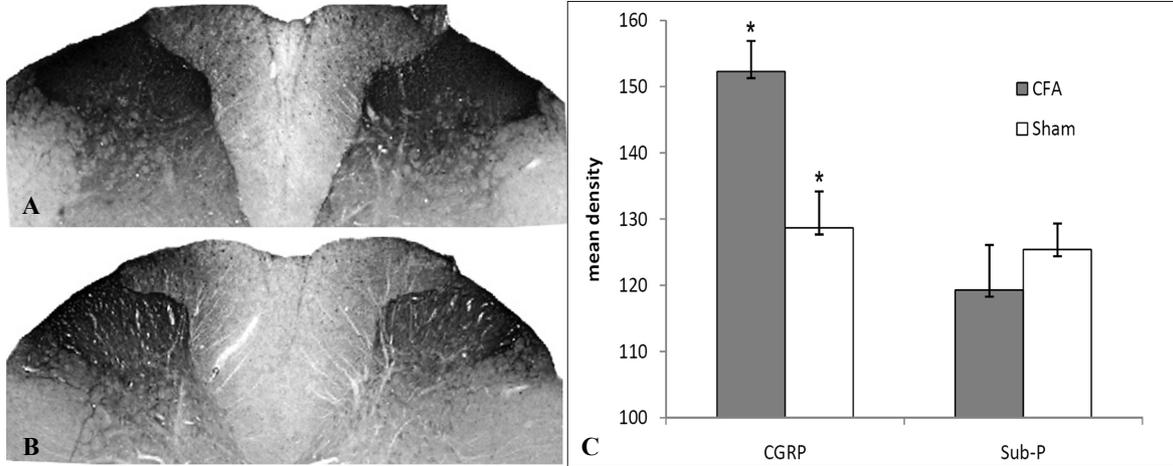
## 결 과

### 1. 통증행동검사 결과

제1단계. 대조군 없이 시행한 첫 번째 단계 실험으로서, 기계적 이질통검사에서 술후 1주부터 4주까지 현저한 통증을 보이다가 5주부터 서서히 회복되어 7, 8주에는 정상 수준까지 돌아왔으나 열통각과민 검사에서는 차이를 보이지 않았다.

제2단계. 용량을 줄여 20  $\mu$ L의 CFA를 사용하였지만, 술후 1, 2주에 최고점을 이룬 뒤 3주부터 서서히 호전되는 기계적 이질통이 발현되었다. 열통각과민은 역시 발현되지 않았다.

제3단계. 제1, 2군의 실험에서 뒷발바닥 자극으로 통증 발현을 의미 있게 관찰할 수 있었으므로 L5-6가 아닌 상위



**Figure 2.** The density of CGRP at spinal cord dorsal horn in CFA injected rats (A) is significantly higher compared to the one at sham operated rat spinal cord (B), while substance P does not show difference. The bar graph shows significant difference between the CFA injected rats and the sham operated rats (C). \*means that the bars have significant difference with  $p<0.05$ .

추간판에서의 손상도 같은 통증행동검사에 의미 있는 결과를 보이는 지 확인하기 위하여 제2군과 같은 방법으로 제4~5 요추간판에 주입하였으나 기계적 이질통이 발현되지 않았다(Figure 1A & 1B).

제4단계. CFA 최소 용량을 확인하기 위하여 같은 시기에 20 uL와 10 uL를 투여하여 비교하였다. 20 uL나 10 uL 모두 통증 발현에 큰 차이를 보이지 않았으나, 이 때 두 마리의 실험군에서 좌측 다리에 마비가 발생하였다.

제5단계. 드릴로 사용하여 횡륜섬유를 파괴하는 경우, CFA에 의한 염증반응에 의한 통증 발현이 아닌, 드릴에 의한 기계적 손상이 유발한 통증의 가능성을 배제하기 위하여, 주사바늘만으로 10 uL를 주입하여 실험을 진행하였다. 제4단계에서 20 uL의 주입군에 뒷다리 마비가 발생하였던 이유가 시아노아크릴레이트에 의한 신경손상의 가능성이 있어 시아노아크릴레이트의 사용 없이 시술 후 복강 내에 잔재하였을 가능성이 있는 CFA를 제거하기 위하여 식염수로 세척하였다. 이번 실험군에서도 마찬가지로 열통각과민은 발생 없이 기계적 자극에 통증이 현저하게 발현되었다(Figure 1C&D). 그러나 시술 중 macroscope으로 관찰 시 주입한 CFA가 역류하는 것이 의심되어 주입속도를 낮추기 위하여 주입시간을 5분에서 10분으로 늘려 실험하는 것으로 결정하였다.

최종단계. 술전 통증검사에서 안정적인 검사결과를 보인 31마리 중 18마리에 CFA를 주입하고 13마리는 CFA 주입 없는 대조군으로 제작한 후 통증행동검사를 관찰한 결과 술후 7, 14, 21, 35, 42, 49일에 술 전에 비하여 CFA 주입군

에서 유의한 기계적 통증 발현( $P<0.05$ , repeated one way ANOVA)이 관찰되었고, 대조군에서는 유의한 차이를 술 전에 비하여 관찰할 수 없었다(Friedman's rank test; Figure 1E). 그러나 열통각과민 검사 결과는 두군 모두 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 1F).

## 2. MRI검사 결과.

개체 내 시기에 따른 변화를 관찰하기 위하여 CFA를 주입한 흰쥐 두 마리를 대상으로 촬영한 결과 술후 7일에는 술 전에 비하여 신호강도의 차이가 없었으나 14일, 28일에 L5-6 요추간판의 신호강도가 각각 83%와 75%로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 8주에는 95%로 차이를 관찰할 수 없었다.

## 3. 면역조직화학검사

CFA 주입군( $152.3\pm 4.63$ )에서 CGRP의 발현이 lamina I과 II 부위에서 대조군( $128.7\pm 5.49$ )에 비해 현저히 증가되었으나, Substance P는 CFA 주입군( $119.3\pm 6.8$ )과 대조군( $125.4\pm 3.95$ )에서 차이를 보이지 않았다(Figure 2).

## 고 찰

추간판성통증모델을 위하여 CFA를 추간판 내 주입한 과거 연구는 Pubmed에서 검색하여 볼 때 Aoki 등에 의해 시행된 것이 유일한 것으로 생각된다. 당시 저자들은 총 50 uL의 CFA를 사용하였는데, 이 중 10 uL를 추간판 내 주입

하고 나머지 40 uL는 스폰지에 적서 추간판의 앞쪽 표면에 위치시켜 모델을 제작하였다.<sup>5</sup> 당시 연구 결과에서 후근신경절에 GAP-43과 CGRP가 동시에 양성으로 염색되는 신경원이 증가하는 것을 발견함으로써 추간판염증을 일으킨 흰쥐에서 통증신경전달물질을 함유한 신경섬유의 증가가 있고, 이것이 추간판성통증의 중간 기전이라고 주장하였다. 이 연구는 추간판 내에 발생한 염증이 추간판 내 신생혈관과 신생신경섬유를 유도하게 되고, 이 때 발생한 신생신경섬유들이 만성 통증을 일으키는 인자라는 과거의 주장을 뒷받침해주는 연구였다. 그러나 한 가지 오류는 당시 스폰지에 담아 복강 내에 넣은 CFA는 주변 신경섬유 특히 신경뿌리에 직접적인 염증 반응을 일으켜, 추간판성염증뿐만 아니라 신경뿌리염증을 일으켰을 가능성이 높기 때문에 후근신경절에 보인 GAP-43의 발현 증가가 추간판 내 염증때문만에 의한 것인지는 확실하지 않다.

CFA는 캡슐 내에 비활성화시킨 박테리아를 담은 강력한 염증유발물질로서 그 염증 유발 정도가 너무나 강해 심한 통증을 유발할 수 있기 때문에 윤리적인 문제로 동물실험에서도 꼭 필요한 경우가 아니면 그 사용을 자제하고, 필요한 경우라도 최소량을 사용할 것을 권장하는 물질이다.<sup>9</sup> 본 연구에서는 처음 50 uL의 용량을 사용하고 차츰 줄여 20 uL와 10 uL를 사용하였으나 모든 경우 통증발현 여부에는 큰 차이가 없었다. 정상적으로 추간판 내에는 빈 공간이 없기 때문에 일정 수준 이상의 내압이 유지되어 있다.<sup>10</sup> 따라서 협소한 공간 내 10 uL의 작은 용량이라도 빠른 시간 내에 주입하면 다시 역류해 나올 가능성이 있어 본 연구에서는 주입 속도를 조절할 수 있는 펌프를 사용하여 10분 동안에 걸쳐 서서히 주입하였다. 실험군 중 5분 동안에 주입하는 경우에도 macrocope으로 확인이 가능한 정도의 역류가 의심되어 10분으로 설정하였고, 이 경우에는 macrocope상에서도 역류가 관찰되지 않았다. 이는 추간판 내 수핵으로 주입한 CFA가 충분히 흡수되어 역류 현상이 발생하지 않은 것으로 추정된다. 추간판의 횡륜섬유는 세 가지 방향의 섬유가 서로 엮여 있어 그 탄성도가 높아 바늘을 삽입하기가 쉽지 않고 삽입하고 뺄 경우에도 구멍이 남아 있지 않고 즉시 닫히게 되어 있다.<sup>11</sup> 본 연구의 초기 실험군에서는 드릴을 사용하여 횡륜섬유에 구멍을 뚫었으나, 기존 추간판성동물모델들 중 횡륜섬유에 기계적 손상을 초래하여 제작한 방법들이 있어, 이들과 차별을 위하여 최종 모델에서는 드릴 없이 26게이지 주사바늘로 직접 CFA를 주입하는 방법을 사용하였다. 따라서 초기실험군에서는 드릴 구멍이 잘 닫히지 않아 역류가 발생할 가능성이 높았기 때문에 시아노아크릴레이트를 사용하여 추간판의 주입 부

위를 막는 방법을 사용하였었다. 그러나 결과에서도 언급 하였던 것처럼 두 마리의 실험군에서 뒷다리가 마비된 경우를 관찰하였고, 문헌 고찰을 통하여 시아노아크릴레이트와 연관된 신경독성에 대한 가능성<sup>12</sup>을 확인한 후 동물 모델 제작 방법을 변경하였다. 결국 최종 방법으로 횡륜섬유에 기계적 손상을 최소화하기 위하여 드릴을 사용하지 않고 26게이지 바늘을 조심스럽게 수핵에 도달할 때까지 삽입한 후 10 uL의 CFA를 10분의 기간 동안 서서히 주입시키며 macrocope으로 역류의 여부를 확인하였다. 이 후 복강 내 혹시나 남아 있을 CFA를 제거하기 위하여 생리식염수로 세척한 후 복강을 닫는 방법으로 동물모델 제작을 하기로 결정하였다. 이와 같은 방법으로 제작한 최종단계에서 CFA 주입군 18마리와 대조군 13마리를 가지고 시행한 행동검사에서 CFA 주입 후 7주째까지 지속되는 통계적으로 유의한 통증발현을 관찰할 수 있었다. 쥐의 월령을 사람의 연령에 맞추어 고려해 볼 때 이는 사람에서 수년간 지속되는 만성 추간판성통증의 기간에 상응하는 것으로 생각된다. 비록 본 연구에서는 10 uL의 용량을 최종 용량으로 선정하였지만, 향후 보다 작은 용량의 CFA를 이용한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

추간판성 통증모델의 검증을 위하여 MRI를 이용한 형태학적 변화와 면역조직화학검사를 이용한 CGRP와 Sub-P의 척수후각 내 관찰에서는 향후 연구 과제를 많이 남기는 결과를 볼 수 있었다. 임상에서 흔히 관찰하는 추간판성통증의 경우, 추간판 퇴행화로 인한 전체 부피 감소 때문에 결국 추간판의 높이가 감소하는 현상을 종종 관찰할 수 있다. 그러나 본 연구의 MRI 소견에서는 추간판의 부피 감소를 시사하는 어떤 형태학적 변화도 관찰할 수 없었다. ROI 기법을 이용하여 비교한 추간판 내 신호강도의 변화도 2, 4주에는 감소하는 추세였지만, 8주에는 대조군과 차이를 느낄 수 없을 정도였기 때문에, 비록 이 모델이 통증 발현은 관찰할 수 있었지만, 추간판의 형태학적인 퇴행화 변화는 동반되지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 비록 현재 추간판의 형태학적인 변화가 임상에서 치료의 방법 및 적응증을 선택하는 중요 기준 중의 하나로 고려되고 있지만, 최근에는 임상에서도 추간판의 형태학적인 변화와 통증발현 정도에 연관성이 높지 않다는 주장이 제기되고 있기 때문에, 본 연구의 결과가 동물모델의 성공여부에 반하는 결과는 아니라고 생각된다.<sup>13-15</sup> CGRP와 Sub-P는 대표적인 통증신경전달물질들이다. 특히 CGRP는 신경섬유가 통증성신경섬유임을 증명하기 위하여 흔히 선택되는 신경전달물질이다. 본 연구에서는 CGRP의 경우 4주째 모델에서 척수후각 내 발현 증가를 관찰할 수 있었지만, Sup-P의 경우에는

대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 두 인자의 특성상 Sub-P는 보다 초기에 발현 변화가 관찰되는 인자일 가능성이 있다. 즉 급성기 통증에는 Sub-P, 만성기 통증에는 CGRP가 보다 더 대표적인 인자일 가능성이 있으나, 이에 대한 증명을 위해서는 시술 후 주기적인 인자들의 발현 변화를 관찰하는 추가 연구가 필요하다. 행동검사에서도 의문으로 남는 결과가 있는데, 기계적이질통은 관찰되었으나 열자극에 의한 이질통은 관찰되지 않았다는 점이다. 이는 기계적이질통과 열이질통의 발생기전에 어떤 차이가 있을 가능성을 시사하는 점이다. 또한 추간판 내 분포 신경 섬유유의 특성상 열에 대한 이질통에 관여하는 인자들이 근본적으로 발현되지 않을 가능성도 있다. 이도 향후 연구과제로 남는 부분이다.

추간판이 퇴행화 되는 경우 만성적인 통증의 유발로 일상적인 생활에 어려움을 겪게 되어 치료의 적응증이 된다. 그러나 모든 추간판퇴행성 변화가 통증을 일으키는 것은 아니다. 따라서 추간판 퇴행성 변화가 추간판성통증과 같은 의미로 사용되어서는 안 된다. 그러나 현재까지 문헌에 보고된 추간판성통증동물 모델들은 대부분 객관적인 통증 발현여부의 확인은 없이 형태학적인 검사를 통해 퇴행화 변화만을 검증하는 데 그치고 있다. 이는 추간판성 통증 여부를 확인할 수 있는 객관적인 통증행동검사가 제시되어 지지 않았기 때문이며, 심지어는 추간판성 통증 자체가 존재하지 않는다는 주장까지 나오게 되었다. 본 연구를 통해 병변이 만들어진 추간판과 같은 신경뿌리의 영역에 해당하는 뒷발바닥에서 기계적 이질통을 측정할 결과 대조군에 비해 의미 있는 역치의 감소를 확인할 수 있었다. 그러나 열과민감각 측정에서는 변화가 없어, 본 동물모델은 기계적이질통을 유발하는 동물모델로 생각된다. 통증 인자들의 면역조직화학법 검사를 통해 CGRP가 증가되는 것을 척수 부위에서 확인할 수 있었다.

종합하여 볼 때 본 연구에서는 추간판염증모델이 만성 추간판성통증동물모델로 사용될 수 있는 가능성을 관찰하였고, 목적인 동물모델의 제작이 가능할 정도의 충분한 염증을 유발할 수 있는 CFA의 최소 용량을 결정하기 위한 각 단계별 실험을 통하여 비교적 일관된 통증을 유발할 수 있는 CFA 주입방법과 용량을 결정하였다. 이는 현재까지 동물모델들 중 최초로 통증행동검사를 통해 통증 발현을 검증한 추간판성통증동물모델이다. 비록 향후 병리검사와 생물학적 인자들에 대한 추가 연구를 통하여 동물모델로서의 적절성 및 안전성에 대한 검증이 필요할 것으로 생각되지만, 본 동물모델은 아직까지도 규명되지 못한 추간판성 통증에 대한 기전 및 치료 연구에 발전을 유도할 수 있을

것으로 기대된다.

## REFERENCES

1. 국민건강보험공단. 건강보험 급여실적. 2004 건강보험통계연보 2004.
2. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine* 2005;30:5-14.
3. Rousseau MA, Ulrich JA, Bass EC, Rodriguez AG, Liu JJ, Lotz JC. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine* 2007;32:17-24.
4. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, Wallach CJ, Robertson DD, Vogt MT, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine* 2005;30:15-24.
5. Aoki Y, Ohtori S, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, et al. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats. *Spine* 2004;29:2621-2626.
6. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MI. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 1997;350:178-181.
7. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 1994;53:55-63.
8. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
9. Jackson LR, Fox JG. Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. *ILAR J* 1995;37:141-152.
10. Seo KS, Derby R, Date ES, Lee SH, Kim BJ, Lee CH. In vitro measurement of pressure differences using manometry at various injection speeds during discography. *Spine J* 2007;7:68-73.
11. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract* 2008;8:18-44.
12. Hanft JR, Kashuk KB, Toney ME, McDonald TD. Peripheral neuropathy as a result of cyanoacrylate toxicity. *J Am Podiatr Med Assoc* 1991;81:653-655.
13. Maezawa S, Muro T. Pain provocation at lumbar discography as analyzed by computed tomography/discography. *Spine* 1992;17:1309-1315.
14. Antti-Poika I, Soini J, Tallroth K, Yrjonen T, Kontinen YT. Clinical relevance of discography combined with CT scanning. A study of 100 patients. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:480-485.
15. Millette PC, Melanson D. A reappraisal of lumbar discography. *J Can Assoc Radiol* 1982;33:176-182.