

## Intracisternal Administration of Voltage Dependent Calcium Channel Blockers Attenuates Orofacial Inflammatory Nociceptive Behavior in Rats

Kyoung A. Won, Sang H. Park, Bo K. Kim, Kyoung S. Baek, Dong H. Yoon\*, and Dong K. Ahn\*

Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu 700-412, Korea

(received February 14, 2011 ; revised April 13, 2011 ; accepted April 15, 2011)

Voltage dependent calcium channel (VDCC), one of the most important regulator of  $Ca^{2+}$  concentration in neuron, play an essential role in the central processing of nociceptive information. The present study investigated the antinociceptive effects of L, T or N type VDCC blockers on the formalin-induced orofacial inflammatory pain. Experiments were carried out on adult male Sprague-Dawley rats weighing 220-280 g. Anesthetized rats were individually fixed on a stereotaxic frame and a polyethylene (PE) tube was implanted for intracisternal injection. After 72 hours, 5% formalin (50  $\mu$ L) was applied subcutaneously to the vibrissa pad and nociceptive scratching behavior was recorded for nine successive 5 min intervals. VDCC blockers were administered intracisternally 20 minutes prior to subcutaneous injection of formalin into the orofacial area. The intracisternal administration of 350 or 700  $\mu$ g of verapamil, a blocker of L type VDCC, significantly decreased the number of scratches and duration in the behavioral responses produced by formalin injection. Intracisternal administration of 75 or 150  $\mu$ g of mibefradil, a T type VDCC blocker, or 11 or 22  $\mu$ g of cilnidipine, a N type VDCC blocker, also produced significant suppression of the number of scratches and duration of scratching in the first and second phase. Neither intracisternal administration of all VDCC blockers nor vehicle did not affect in motor dysfunction. The present results suggest that central VDCCs play an important role in orofacial nociceptive transmission and a targeted inhibition of the VDCCs is a potentially important treatment approach for inflammatory pain originating in the orofacial area.

**Key words:** VDCCs, orofacial pain, antinociception, formalin test

### 서 론

전압 의존성 칼슘 통로(voltage dependent calcium channels, VDCCs)는 칼슘이온을 선택적으로 수용할 수 있는 세포막 당단백질로 중추신경계에는 T, L, N, P/Q 그리고 R type의 다양한 종류의 칼슘 통로가 존재한다(Miller, 1987). 이러한 전압 의존성 칼슘 통로들은 낮은 전압에서 활성화 되는 T type과 높은 전압에서 활성화되는 L, N, P/Q 그리고 R type으로 크게 두 분류로 나누어진다(Gribkoff, 2006). 일반적으로 칼슘 통로는 세포 내로 칼슘이온 유입을 촉진하여 세포 흥분(excitability)을 조절할 뿐 아니라 신경전달물질과 호르몬 방출, 근육 수축 등 다양한 세포 기능에 관여한다(Levi *et al.*, 1993; Himpens *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1998; Barclay *et al.*, 2005).

전압 의존성 칼슘 통로는 통증전도에도 중요하게 작용한다고 알려져 있는데 L type 칼슘 통로의 경우 면역조직화학적 연구를 통하여 척수 내 신경세포의 세포체와 수상돌기에 분포하는 것을 보여 주었다(Ahlijanian *et al.*, 1990; Hell *et al.*, 1993). 이러한 위치에 존재하는 L type 칼슘 통로는 신경전달물질의 방출뿐 아니라  $Ca^{2+}$  의존성 potassium channel과 같은 이온 채널의 조절에 관여하는 것(Xu and Lipscombe, 2001; Lipscombe *et al.*, 2004)으로 알려져 있다. T type 칼슘 통로의 경우는 주로 척추후근신경절(dorsal root ganglion)의 말초감각 신경세포(peripheral sensory neuron)에 위치하여 척추후근신경절의 신경 흥분성을 조절함으로써 통증 전도에 관여한다(Carbone *et al.*, 1984; White *et al.*, 1989)고 알려져 있다. 반면, N type 칼슘 통로는 척수의 lamina I 과 II 영역에 집중적으로 분

\*Corresponding author: Dong-Kuk, Ahn, Dong-Ho, Yoon Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, 188-1 Sam Deok 2ga, Chung-gu, Daegu 700-412, Korea.  
Tel.: +82-53-660-6840 ; Fax.: +82-53-421-4077  
Email: dkahn@knu.ac.kr

포되어 있어서 신경전달물질의 방출을 조절함으로써 유해 감각 전도를 조절하는데 필수적인 역할을 한다(Kerr *et al.*, 1988; Gohil *et al.*, 1994; Diaz and Dickenson, 1997).

선행연구에서 동물 통증 행위반응을 이용하여 전압 의존성 칼슘 통로의 통증억제 작용을 보고하였다. 척수 강 내로 투여된 L type 칼슘 통로 차단제인 diltiazem, nimodipine 혹은 verapamil은 흰 쥐의 뒷발바다으로 포르말린을 주입하여 발생하는 염증성 통증을 감소시켰다(Malmberg and Yaksh, 1994). 또한 T type 칼슘 통로 차단제인 mibefradil을 척수 강으로 투여한 다음 흰 쥐의 발바다에 주입한 포르말린에 의해 나타나는 통증 행위반응을 평가한 결과 일차 반응(first phase)과 이차 반응(second phase) 모두에서 굽는 행위반응의 횟수와 물거나 핥는 행위반응을 나타내는 시간을 농도 의존적으로 감소시켰다(Cheng *et al.*, 2007). N type 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine 또한 척수 강 내로 주입하였을 경우에도 포르말린을 주입하여 나타나는 이차 통증반응(second phase)에서 나타나는 통증 행위반응을 현저하게 감소시키는 것을 보여주었다(Murakami *et al.*, 2000). 이러한 연구결과들은 척수에 존재하는 전압 의존성 칼슘 통로가 통증 전도에 중요하게 작용한다는 것을 말해 주며, 전압 의존성 칼슘 통로 차단제가 통증 전도 차단에 중요하게 작용할 것이라는 것을 말해 주고 있다. 이러한 사실로 볼 때 악안면 영역에서 나타나는 염증성 통증에도 전압 의존성 칼슘 통로가 중요하게 작용할 것으로 예상되지만 악안면 영역에서 발생하는 염증성 통증 전도에 전압 의존성 칼슘 통로의 역할에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.

본 연구에서는 악안면 영역에서 발생하는 통증의 중추성 전도에 삼차신경계에 존재하는 L, T 그리고 N type의 전압 의존성 칼슘 통로의 역할을 구명하고자 실험하였다. 이를 위하여 실험동물 흰 쥐에서 포르말린을 안면부 피하에 주입하여 염증성 통증을 유발 시킨 다음, L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제 verapamil, T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil 그리고 N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine을 소뇌연수조로 투여한 후 통증 행위반응에 미치는 영향을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물과 수술

실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(300~350 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 실험동물용 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 치의학전문대학원 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 의식이 있는 동물의 실험에 관한 통증연구 학회의 윤리적 규정을 준수하였다.

안면부의 정보를 투사 받는 삼차신경핵군에 약물이 효과를 나타내기 위하여 소뇌연수조로 약물을 투여하기로 하였으며 이를 위하여 실험동물의 소뇌연수조로 카테터(catheter)를 삽관하는 수술을 실시하였다(Yaksh and Rudy, 1976; Ahn *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). 실험동물은 ketamine 0.5 ml/kg으로 마취시켰으며 마취된 쥐는 stereotaxic frame (David Kopf instruments, USA)으로 머리를 고정시키고 약물을 주입하기 위한 폴리에틸렌관(PE10)을 소뇌연수조 내로 삽관하였다. 폴리에틸렌관은 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진(Densply, USA)을 사용하여 머리에 고정하였다. 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다.

### 안면부위 포르말린 테스트

실험을 실시하기 전 실험용 흰 쥐를 관찰통에 놓아 적어도 15분 이상 적응시켰다. 실험통에서 적응된 흰 쥐에서 안면부 통증을 유발하기 위하여, 5% 포르말린 50  $\mu$ L를 안면부 피하로 주입하였다. 포르말린을 피하조직으로 주입하면, 주입 직후 안면 부위를 긁는 행위반응(scratching)을 나타내는데 이를 통증 행위반응으로 판단하여 평가하였다. 통증 평가는 선행연구의 방법(Abbott *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2003 a,b; Raboisson and Dallel, 2004; Ahn *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010)을 따라서 포르말린을 주입한 다음 나타나는 자발적으로 안면부위를 긁는 횟수와 이러한 긁는 행위를 나타내는 데 소비하는 총 시간을 측정 한 지속시간(duration)을 5분 단위로 누적하여 45분간 기록하여 정량화하였다. 일반적으로 포르말린에 의해 발생하는 통증 행위반응은 주입 직후 나타났다가 점차 감소하여 반응을 거의 보이지 않다가 약 10분 후부터 다시 나타나는 이상성(bisphasic) 형태를 보인다(Tjolsen *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 1995; Raboisson *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2003 a,b; Raboisson and Dallel, 2004). 따라서 포르말린 주입 직후부터 10분까지 나타나는 1차 반응(first phase)과 10분에서 실험이 종결되는 45분까지 나타나는 2차 반응(second phase)로 구분하여 평가하였다.

### 전압 의존성 칼슘 통로 차단제의 효과

L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil (350 or 700  $\mu$ g/rat)과 T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil (75 or 150  $\mu$ g/rat) 그리고 N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine (11 or 22  $\mu$ g/rat)을 식립한 폴리에틸렌관을 통해 소뇌연수조로 주입하였다. 폴리에틸렌관의 용적을 고려하여 약물주입 후 생리식염수 10  $\mu$ L를 추가로 주입하였다. 모든 약물은 0.9% 생리식염수에 용해시켰고, 냉장보관 하였다. 포르말린 주입 20분전에 소뇌연수조 내로 약물을 투여하고 포르말린 주입에 의해 유발된 통증 행동을 45분 동안 관찰하였다.

### 전압 의존성 칼슘 통로 차단제가 운동기능에 미치는 영향

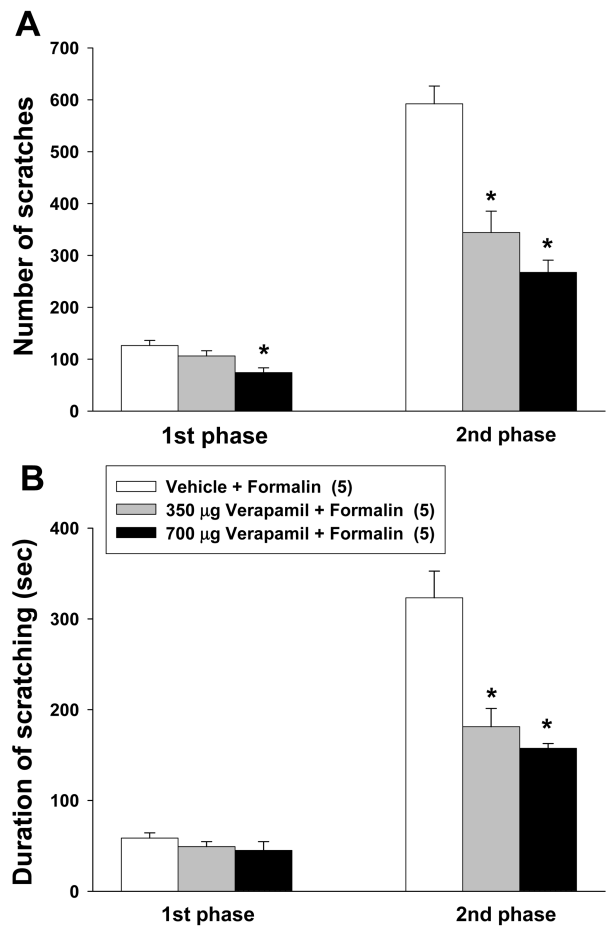
실험동물의 소뇌연수조로 투여된 약물이 운동기능에 미치는 영향을 rota-rod (Ugo Basile, Rota-rod 7700, Italy)를 이용하여 평가하였다. 이 평가방법은 약물 투여 이후에 중추신경계와 신경근육의 약물 독성으로 인해 나타나는 운동능력의 장애(motor disturbance)을 확인할 수 있는 방법(Dunham and Miya, 1957, Rozas *et al.*, 1997)으로, 포르말린 주입 후 나타나는 앞발 혹은 뒷발로 걷는 행위 반응에 미치는 영향을 간접적으로 확인하기 위하여 실시하였다. 16rpm의 속도로 회전하는 rota-rod에서 180초 이상 견딜 수 있도록 실험동물을 적응시켰으며, 적응된 실험동물의 소뇌연수조 내로 L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil (700 µg/rat)과 T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil (150 µg/rat) 그리고 N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine (22 µg/rat)를 각각 처치하고 rota-rod에서 실험동물이 유지하는 시간을 측정하여 평가하였다.

### 통계분석

행위 반응 실험 결과의 통계분석은 반응 횟수의 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석(ONE-WAY ANOVA)과 bonferroni의 사후 분석(post-hoc analysis)을 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은  $p < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 표준 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

## 결 과

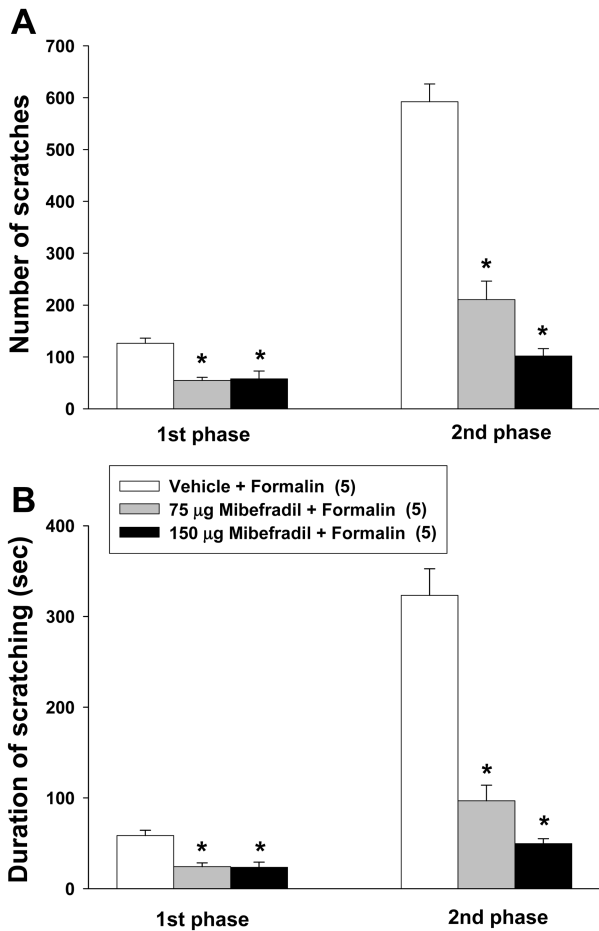
포르말린을 안면 피부로 주입하면 유해자극에 의해 유발되는 걷는 행위반응이 45분 동안 지속되었고, 이 반응은 0-10분 동안 빠르고 즉각적으로 나타나는 일차 반응(first phase)과 10-45분 동안 장기간에 지속적으로 나타나는 이차 반응(second phase)으로 구별되어 나타났다. 흰 쥐의 안면부 피하에 포르말린을 주입하여 나타나는 통증전도에 다양한 전압 의존성 칼슘 통로가 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 전압 의존성 칼슘 통로 차단제를 전처치하고 포르말린 테스트를 실시하였다. L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil을 전처치하고 포르말린 테스트를 실시하여 나타난 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군으로 생리식염수를 소뇌연수조로 투여하면 포르말린에 의해 유도되는 통증 행위반응에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 또한 L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil 350 µg을 소뇌연수조로 전처치하였을 경우 포르말린에 의해 유도되는 일차통각에는 유의한 영향을 미치지 못하였다. 그리고 verapamil 700 µg을 소뇌연수조로 전처치하였을 경우 포르말린을 안면부 피하에 주입하여 나타나는 통증반응에서 일차 반응의 걷는 횟수는 유의하게 감소하였지만 걷는



**Fig. 1.** Change in the number of scratches (A) and duration of scratching (B) produced by orofacial formalin injection after intracisternal administration of the vehicle (saline), 350 µg or 700 µg of verapamil, an L type VDCC blocker. Pretreatment with 350 µg or 700 µg of verapamil significantly reduced both the number scratches and duration of scratching in second phase, as compared with the vehicle-treated group. There were 5 animals in each treatment. \* $p < 0.05$ , vehicle vs. drug-treated group.

행위를 지속한 시간에는 아무런 변화를 미치지 못하였다. 그러나 이차반응의 경우에는 L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil 350 혹은 700 µg을 소뇌연수조로 투여하면 포르말린 주입으로 발생하는 통증반응을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다(Fig. 1,  $p < 0.05$ ).

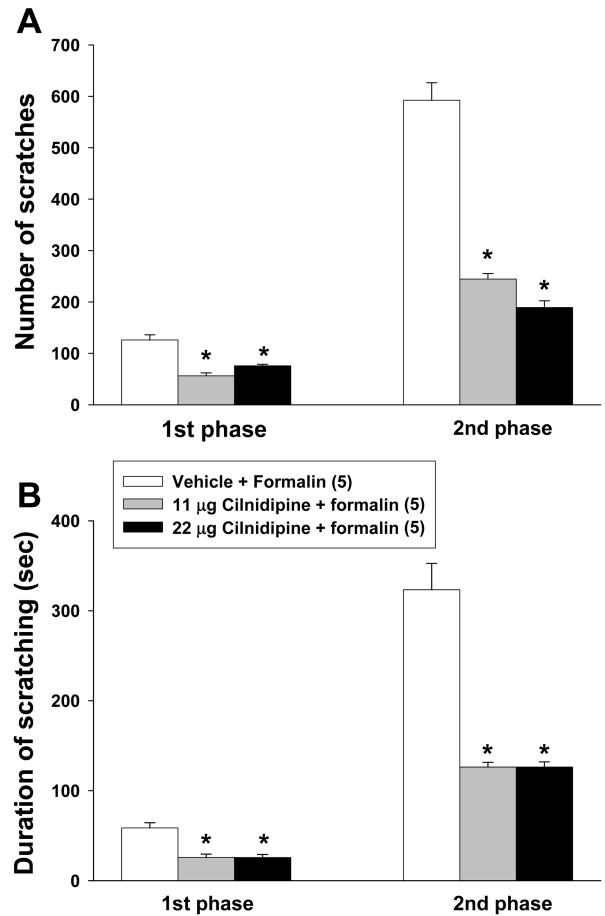
T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil을 소뇌연수조로 투여하고 포르말린 테스트를 실시하여 나타난 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대조군으로 생리식염수를 소뇌연수조로 투여하면 포르말린에 의해 발생하는 통증 행위반응에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그러나, T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil 75 µg 혹은 150 µg을 소뇌연수조로 전처치 하였을 경우 포르말린을 안면부 피하에 주입하였을 때 나타나는 일차 통증반응과 이차 통증반응이 모두 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Change in the number of scratches (A) and duration of scratching (B) produced by orofacial formalin injection after intracisternal administration of the vehicle (saline), 75 µg or 150 µg of mibefradil, a T type VDCC blocker. Pretreatment with 75 µg or 150 µg of mibefradil reduced nociceptive behavioral responses in the first and second phases, as compared with the vehicle-treated group. There were 5 animals in each treatment. \*p < 0.05, vehicle vs. drug-treated group.

N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine을 소뇌연수조로 전처치하고 안면부 피하내로 포르말린을 주입하여 나타난 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 대조군으로 생리식염수를 소뇌연수조로 투여한 그룹과 비교하였을 때, N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine을 11 혹은 22 µg을 소뇌연수조로 전처치 하였을 경우 포르말린을 피하로 주입하였을 때 나타나는 통증반응에서 일차반응과 이차반응을 모두 유의하게 감소시켰다(Fig. 3, p < 0.05).

전압 의존성 칼슘 통로 차단제의 진통작용이 실험동물 흰 쥐의 운동기능에 영향을 미치지 않고 나타나는 것인지 확인하기 위해 본 실험에서 사용한 농도 중 진통작용이 유발되는 농도의 전압 의존성 칼슘 통로 차단제를 소뇌연수조로 주입하고 rota-rod 운동기능을 평가하였다. 용매를 포함한 모든 약물의 농도에서 rota-rod 운동기능에 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 1).



**Fig. 3.** Change in the number of scratches (A) and duration of scratching (B) produced by orofacial formalin injection after intracisternal administration of the vehicle (saline), 11 µg or 22 µg of cilnidipine, an N type VDCC blocker. Pretreatment with 11 µg or 22 µg of cilnidipine reduced nociceptive behavioral responses in the first and second phases, as compared with the vehicle-treated group. There were 5 animals in each treatment. \*p < 0.05, vehicle vs. drug-treated group.

**Table 1.** Effects of intracisternal administration of verapamil, mibefradil or cilnidipine on motor performance

Drugs	Time on rota-rod (sec)	
	Baseline	Drug administration
Vehicle (saline)	180 ± 0.0	180 ± 0.0
Verapamil (750 µg)	180 ± 0.0	180 ± 0.0
Mibefradil (150 µg)	180 ± 0.0	180 ± 0.0
Cilnidipine (22 µg)	180 ± 0.0	180 ± 0.0

The time course of motor performance (min) was evaluated with a rota-rod test after injection of VDCC blockers. The time course of motor performance before VDCC blockers and the cut-off time is 180 sec. Neither vehicle nor all VDCC blockers changed the time course of motor performance. There were 6 animals in each treatment.

**고 찰**

본 연구에서는 소뇌연수조로 투여된 전압 의존성 칼슘

통로 차단제들이 포르말린을 안면부 피하에 주입함으로써 발생하는 통증 행위반응에 미치는 영향을 확인하였다. L, T, N type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제를 각각 소뇌연수조로 전치치 하였을 경우 포르말린을 안면부 피하로 주입하였을 때 나타나는 통증반응을 유의하게 감소시켰다. 또한 전압 의존성 칼슘 통로 차단제의 효과는 운동신경에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 전압 의존성 칼슘 통로 차단제는 안면부위에서 발생하는 염증성 통증 조절에 중요하게 작용할 수 있다는 사실을 보여준다.

포르말린 테스트는 안면부위에서 발생하는 염증성 통증을 평가할 수 있는 실험 모델로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2003 a,b; Raboisson and Dallel, 2004). 실험동물의 피하에 포르말린을 주입하여 유발된 조직손상과 염증 반응에 의해 나타나는 통증 행위반응은 두 단계로 나누어진다. 포르말린 주입 후 즉각적으로 나타나는 일차 반응(first phase)은 포르말린이 감각 수용체에 작용하는 직접적인 영향에 의한 것이고 이어서 나타나는 이차 반응(second phase)은 통증을 매개하는 염증물질의 방출과 중추성 감각에 의해 나타난다(Tjolsen *et al.*, 1992; Abbott *et al.*, 1995; Raboisson *et al.*, 1995; Raboisson and Dallel, 2004). 본 연구에서도 안면부 피하로 포르말린을 주입하였을 때 10분 이내에 나타나는 일차 반응과 10분 이후부터 45분까지 나타나는 이차 반응을 나타냈다.

전압 의존성 칼슘 통로는 신경세포(neuron)를 포함한 다양한 세포에서 칼슘 농도를 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있으며 특히 유해자극을 감지하는데 필수적인 작용을 한다고 알려져 있다(Gribkoff, 2006). 선행연구에서 전압 의존성 칼슘 통로를 조절하여 통증을 조절하려는 시도는 많이 보고되었다(Sluka, 1998; Hatakeyama *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Barton *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007). 본 실험에서 L type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 verapamil을 소뇌연수조로 투여하면 포르말린 주입으로 발생하는 통증 행위반응을 농도 의존적으로 감소시켰다. 이러한 연구 결과는 verapamil을 전신적으로 투여하였을 때 포르말린 유도 통증반응을 20-90% 경감시켰다는 결과와 일치하였다(Gúrdal *et al.*, 1992). 그러나 L type 칼슘 통로 차단제인 verapamil을 척수내로 전치치하였을 경우 뒷발바닥으로 주입된 포르말린 유도 통증반응에 영향을 미치지 못하였다(Diaz and Dickenson., 1997). 또한 L type 칼슘 통로 차단제인 nifedipine을 카라기닌을 무릎 관절에 주입하여 염증성 통증을 발생시킨 실험동물의 척수내로 투여하였을 때 진통작용을 나타내지 못하였다(Sluka, 1998). 또한 척수로 투여된 L type 칼슘 통로 억제제는 포르말린 유도 통증반응에 미약한 효과를 나타내었다(Coderre and Melzack, 1992; Malmberg and Yaksh, 1994). 이러한 L type 칼슘 통로 억제제의 진통작용의 차이는 L type 칼슘 통로의 발현 위치에 따른 차이에서 기인되는 것으로 보여지며, 척수에 존재하는 L type 칼슘 통로에 비하여 삼차

신경핵에 존재하는 L type 칼슘 통로가 통증 전도에 더욱 중요하게 작용하는 것으로 생각된다. T type 칼슘 통로 차단제인 ethosuximide, trimethadione 그리고 mibefradil 등을 복강 혹은 소뇌연수조로 전치치 하였을 때 캡사이신 또는 포르말린을 흰 쥐의 발바닥 내로 주입하여 발생한 통증반응이 유의하게 억제되었다(Barton *et al.*, 2005). 나아가 T type 칼슘 통로의 발현이 억제된 유전자 결핍 마우스를 이용한 연구에서도 정상적인 마우스에 비해서 유해자극, 열자극 그리고 화학적 자극에 대한 반응의 역치가 유의하게 감소됨을 확인하였다(Choi *et al.*, 2007). 이러한 연구결과들은 본 연구에서 보여준 T type 전압 의존성 칼슘 통로 차단제인 mibefradil을 소뇌연수조로 전치치 하였을 경우 포르말린을 안면부 피하에 주입하였을 때 나타나는 일차 통증반응과 이차 통증반응을 감소시킨 결과와 일치하며, 악안면 영역에서 통증 조절에 중요하게 작용한다는 것을 말해 준다. T type 칼슘 통로 차단제의 진통효과 기전으로는 일차 구심 신경 섬유(primary afferent nerve fiber)와 척수신경세포 사이의 시냅스 효율(synaptic efficiency)을 조절함으로써 통증의 감수성(sensitivity)에 관여한다(Ikeda *et al.*, 2003; Heinke *et al.*, 2004)고 알려져 있다. N type의 칼슘 통로 또한 다른 전압 의존성 칼슘 통로들과 같이 통증전도에 중요하다는 것은 이미 알려진 사실이다(Altier *et al.*, 2004; Snutch, 2005). N type 칼슘 통로 유전자를 억제시킨 마우스를 이용한 연구에서 마우스의 발바닥에 포르말린을 주입할 경우 통증과 연관된 반응이 감소하였다(Kim *et al.*, 2001; Hatakeyama *et al.*, 2001). 또한 구강 혹은 척수 내로 투여한 N type 칼슘 통로 차단제인 cilnidipine이 흰 쥐의 뒷발에 포르말린을 주입함으로써 유도한 통증반응을 유의하게 억제하였다(Koganei *et al.*, 2009). 이러한 N type 칼슘 통로 차단제는 신경전달물질의 방출을 조절하여 작용하는 것으로 알려져 있다(Mochida *et al.*, 1998). 본 연구에서도 L 과 T type 전압 의존성 칼슘 통로를 차단하였을 때 안면부 피하에 포르말린을 주입하였을 때 발생하는 통증을 억제한 것과 마찬가지로 N type 전압 의존성 칼슘 통로 억제제도 진통작용을 유발시켰다.

얼굴영역에서 전압 의존성 칼슘 통로가 통증 조절에 관여한다는 증거는 많은 선행연구를 통하여 알려져 있다. 전압 의존성 칼슘 통로가 삼차신경절에 분포하여 안면부위를 지배하는 신경 활동을 조절하고 있다(Ikeda *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2010). 또한 삼차신경계의 중추신경에도 전압 의존성 칼슘 통로의 작용을 보고하였는데 N type 혹은 L type 칼슘 통로 억제제를 뇌간으로 투여하면 삼차신경핵에 존재하는 신경세포의 자발적 활동을 유의하게 감소시켰다(Ebersberger *et al.*, 2004). 본 연구에서 L, T 그리고 N type 칼슘 통로를 차단하였을 경우 안면부 피하에 포르말린을 주입하였을 때 발생하는 유의하게 통증을 억제하였다. 이러한 실험 결과들과 선행 연구결과들은 안면부에서

발생하는 통증전도에 있어서 삼차신경계에 존재하는 전압 의존성 칼슘 통로가 중요하게 작용하고 있다는 사실을 증명하고 있다.

면역조직화학염색을 통해 L 타입 칼슘 통로가 마우스의 요추에 존재하는 운동신경세포에 위치하고 있다(Jiang *et al.*, 1999)는 사실은 전압 의존성 칼슘 통로는 운동기능 조절에도 중요하게 작용한다는 것을 말해 준다. 또한 N type 칼슘 통로 차단제인 SNX-111은 포르말린을 구불결장 점막 내로 주입하였을 때 발생하는 내장통증을 경감시켰지만 고농도(0.5 microg/kg)에서는 운동기능장애를 유발한 것을 볼 때(Chen *et al.*, 2005) 전압 의존성 칼슘 통로가 운동신경 기능에 중요하게 작용한다는 것을 말해 준다. 따라서 통증 전도 차단을 위하여 전압 의존성 칼슘 통로 차단제를 사용하기 위해서는 운동신경에 미치는 영향을 반드시 평가하여야 한다는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 칼슘 통로 차단제가 운동기능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시한 rota-rod 시험은 depressant activity를 시험하는데 널리 이용되어져 온 방법으로, 약물 투여 이후에 중추신경계와 신경근육의 약물 독성으로 인해 나타나는 운동능력의 장애(motor disturbance)을 확인할 수 있다(Dunham and Miya, 1957, Rozas *et al.*, 1997). 따라서 소뇌연수조로 투여된 약물이 중추신경계에 작용하여 진정작용(sedation) 혹은 운동장애를 유발하게 되면 포르말린을 주입하였을 때 정상적인 굽는 행위반응을 나타낼 수 없을 것으로 보여진다. 최근까지도 삼차신경과 관련된 통증을 약화시키는 약물이 운동기능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 rota-rod 시험을 실시한 보고가 많이 있다(Christensen *et al.*, 1999; Idanpaan-Heikkila and Guilbaud, 1999; Stirling *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). 본 실험에서는 L, T 혹은 N type 칼슘 통로 차단제를 소뇌연수조로 전처치 하여 rota-rod로 운동기능을 평가한 결과 어떠한 영향도 미치지 않았다. 따라서 본 실험에서 사용한 L, T 혹은 N type 칼슘 통로 차단제는 포르말린 주입 의해 발생하는 안면부 통증에 적절한 진통제로 적합하다고 보여진다.

최근에는 칼슘 통로 차단제를 임상에서 진통제로 사용하는데 그 중 가장 대표적인 예가 N-타입 칼슘 통로 차단제인 ziconotide(상품명 Prialt®)이다. 암, 에이즈에 의한 통증 혹은 신경병성 통증을 가진 환자의 척수 내로 ziconotide를 투여하였을 때 환자의 통증이 효과적으로 경감됨을 임상적으로 증명하였다(Schmidt *et al.*, 2010). 또한 삼차신경통을 가진 여성 환자에게 ziconotide를 척수 내로 투여하였을 경우에도 통증을 유의하게 경감시켰다(Lux, 2010). 하지만 현기증, 메스꺼움, 구토뿐만 아니라 심할 경우 기억력 장애, 기형, 마비와 같은 부작용이 나타나기도 해 임상적인 사용에 주의가 필요한 것(Schmidt *et al.*, 2010)으로 미루어보아 안전한 진통제의 개발이 필요해 보인다.

이상의 결과들을 요약하면, 포르말린을 안면부 피부 내

로 주입하면 통증반응을 발생시켰고, 이러한 통증이 L, T 그리고 N type 전압 의존성 칼슘 통로 억제제를 전처치하였을 때 유의하게 억제되는 것으로 미루어 보아 다양한 전압 의존성 칼슘 통로들이 포르말린에 의해 발생하는 안면부의 통증반응을 억제할 수 있다는 것을 보여준다. 또한 이러한 진통작용은 운동기능에는 아무런 영향을 미치지 않고 나타났다. 이러한 실험 결과는 안면부위 통증전도에 다양한 전압 의존성 칼슘 통로가 관여하고 있다는 사실을 증명해 줄 뿐 아니라 안면부 통증 이해와 치료에 기여할 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0012329).

## 참고 문헌

- Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 1995;60:91-102.
- Ahlijanian MK, Westenbroek RE, Catterall WA. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord and retina. *Neuron*. 1990;4:819-32.
- Ahn DK, Lee KR, Lee HJ, Kim SK, Choi HS, Lim EJ, Park JS. Intracisternal administration of chemokines facilitated formalin-induced behavioral responses in the orofacial area of freely moving rats. *Brain Res Bull*. 2005;66:50-8.
- Ahn DK, Kim YS, Park JS. Central NO is involved in the antinociceptive action of intracisternal antidepressants in freely moving rats. *Neurosci Lett*. 1998;243:105-8.
- Altier C, Zamponi GW. Targeting Ca<sup>2+</sup> channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:465-70.
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD. Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium*. 2005;38:343-53.
- Barton ME, Eberle EL, Shannon HE. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur J Pharmacol*. 2005;521:79-85.
- Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. 1984;310:501-2.
- Chen JQ, Chen WH, Deng MC, Li G, Kang Y, Ding ZH, Liang SP. Analgesic effect of huwentoxin-I, a new N-type voltage-sensitive calcium channel blocker, on acute visceral pain in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005;25:10-4.
- Cheng JK, Lin CS, Chen CC, Yang JR, Chiou LC. Effects of intrathecal injection of T-type calcium channel blockers in the rat formalin test. *Behav Pharmacol*. 2007;18:1-8.

- Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Jung CY, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of TNF- $\alpha$  injected intracisternally on the nociceptive jaw-opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003a;27:613-8.
- Choi HS, Ju JS, Lee HJ, Kim BC, Park JS, Ahn DK. Effects of intracisternal injection of interleukin-6 on nociceptive jaw opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Brain Res Bull*. 2003b;59:365-70.
- Choi S, Na HS, Kim J, Lee J, Lee S, Kim D, Park J, Chen CC, Campbell KP, Shin HS. Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)<sub>3.2</sub> T-type channels. *Genes Brain Behav*. 2007;6:425-31.
- Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, Kayser V. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain*. 1999;83:433-40.
- Coderre TJ, Melzack R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci*. 1992;12:3671-5.
- Diaz A, Dickenson AH. Blockade 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*. 1997;69:93-100.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. 1957;46:208-9.
- Ebersberger A, Portz S, Meissner W, Schaible HG, Richter F. Effects of N-, P/Q- and L-type calcium channel blockers on nociceptive neurones of the trigeminal nucleus with input from the dura. *Cephalalgia*. 2004;24:250-61.
- Fang Z, Hwang JH, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. R-type Calcium Channel Isoform in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2010;14:45-9.
- Gohil K, Bell JR, Ramachandran J, Miljanich GP. Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium channel antagonist, SNX-230 (q-conopeptide MVIIC), *Brain Res*. 1994;653:258-66.
- Gribkoff VK. The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17:555-64.
- Gurdal H, Sara Y, Tulunay FC. Effects of calcium channel blockers on formalin-induced nociception and inflammation in rats. *Pharmacology*. 1992;44:290-6.
- Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S. Differential nociceptive responses in mice lacking the  $\alpha$ (1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport*. 2001;12:2423-7.
- Heinke B, Balzer E, Sandkühler J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci*. 2004;19:103-11.
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP and Catterall WA. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel  $\alpha$ 1 subunits. *J Cell Biol*. 1993;123:949-62.
- Himpens B, Missiaen L, Casteels R. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in vascular smooth muscle. *J Vasc Res*. 1995;32:207-19.
- Idanpaan-Heikkilä JJ, Guilbaud G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain*. 1999;79:281-90.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*. 2003;299:1237-40.
- Ikeda M, Matsumoto S. Classification of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in trigeminal ganglion neurons from neonatal rats. *Life Sci*. 2003;18:1175-87.
- Jiang Z, Rempel J, Li J, Sawchuk MA, Carlin KP, Brownstone RM. Development of L-type calcium channels and a nifedipine-sensitive motor activity in the postnatal mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1999;11:3481-7.
- Katoh A, Jindal JA, Raymond JL. Motor deficits in homozygous and heterozygous p/q-type calcium channel mutants. *J Neurophysiol*. 2007;97:1280-7.
- Kerr LM, Filloux F, Olivera BM, Jackson H, Wamsley JK. Autoradiographic localization of calcium channels with [<sup>125</sup>I]omega-Conotoxin in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1988;146:181-3.
- Kim C, Jun K, Lee T, Kim SS, McEnery MW, Chin H, Kim HL, Park JM, Kim DK, Jung SJ, Kim J, Shin HS. Altered nociceptive response in mice deficient in the  $\alpha$ (1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol Cell Neurosci*. 2001;18:235-45.
- Koganei H, Shoji M, Iwata S. Suppression of formalin-induced nociception by cilnidipine, a voltage-dependent calcium channel blocker. *Biol Pharm Bull*. 2009;32:1695-700.
- Lee MK, Choi BY, Yang GY, Jeon HJ, Kyung HM, Kwon OW, Park HS, Bae YC, Mokha SS, Ahn DK. Low doses of cannabinoids enhance the antinociceptive effects of intracisternally administered mGluRs groups II and III agonists in formalin-induced TMJ nociception in rats. *Pain*. 2008;139:367-75.
- Levi AJ, Brooksby P, Hancox JC. One hump or two? The triggering of calcium release from the sarcoplasmic reticulum and the voltage dependence of contraction in mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 1993;27:1743-57.
- Liang YC, Huang CC, Hsu KS. The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 2007;53:169-77.
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol*. 2004;92:2633-41.
- Lux EA. Case report: successful treatment of a patient with trigeminal neuropathy using ziconotide. *Anesth Analg*. 2010;110:1195-7.
- 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*. 1994;14:4882-90.
- Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*. 1987;235:46-52.
- Mochida S, Yokoyama CT, Kim DK, Itoh K, Catterall WA. Evidence for a voltage-dependent enhancement of neuro-

- transmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14523-8.
- Murakami M, Nakagawasai O, Fujii S, Hosono M, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, Okamura T, Suzuki T, Sasano H, Yanagisawa T, Tan-no K, Tadano T, Kitamura K, Kisara K. Antinociceptive effect of cilnidipine, a novel N-type calcium channel antagonist. *Brain Res*. 2000;868:123-7.
- Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28:219-26.
- Raboisson P, Dallel R, Clavelou P, Sessle BJ, Woda A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *J Neurophysiol*. 1995;73:496-505.
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997;2:75-84.
- Schmidtko A, Lotsch J, Freynhagen R, Geisslinger G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet*. 2010;375:1569-77.
- Sluka KA. Blockade of N- and P/O-type calcium channels reduced the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:232-7.
- Snutch TP. Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx*. 2005;2:662-70.
- Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Wood JN, Matthews EA, Dickenson AH, Nassar MA. Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain*. 2005;113:27-36.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17.
- Wang XM, Zhang ZJ, Bains R, Mokha SS. Effect of antisense knock-down of alpha(2a)- and alpha(2c)-adrenoceptors on the antinociceptive action of clonidine on trigeminal nociception in the rat. *Pain*. 2002;98:27-35.
- White G, Lovinger DM, Weight FF. Transient lowthreshold Ca<sup>2+</sup> current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6802-6.
- Xu W, Lipscombe D. Neuronal Ca(v)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*. 2001;21:5944-51.
- Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 1976;17:1031-6.
- Yang GY, Woo YW, Park MK, Bae YC, Ahn DK, Bonfa E. Intracisternal administration of NR2 antagonists attenuates facial formalin-induced nociceptive behavior in rats. *J Orofac Pain*. 2010;24:203-11.
- Zheng X, Bobich JA. A sequential view of neurotransmitter release. *Brain Res Bull*. 1998;47:117-28.