

Differential Role of Central GABA Receptors in Nociception of Orofacial Area in Rats

Ah-Ram Lee^{1†}, Nak-hyung Lim^{1†}, Hye-Jin Kim¹, Min-Ji Kim¹, Jin-Sook Ju¹, Min-Kyoung Park²,
Min-Kyung Lee³, Kui-Ye Yang¹, and Dong-Kuk Ahn^{1*}

¹Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Department of Dental Hygiene, Kyung-Woon University, Gumi, Korea

³Department of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Busan, Korea

(received August 04, 2015; revised August 28, 2015; accepted August 31, 2015)

The present study investigated the role of central GABA_A and GABA_B receptors in orofacial pain in rats. Experiments were conducted on Sprague-Dawley rats weighing between 230 and 280 g. Intracisternal catheterization was performed for intracisternal injection, under ketamine anesthesia. Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced thermal hyperalgesia and inferior alveolar nerve injury-induced mechanical allodynia were employed as orofacial pain models. Intracisternal administration of bicuculline, a GABA_A receptor antagonist, produced mechanical allodynia in naive rats, but not thermal hyperalgesia. However, CGP35348, a GABA_B receptor antagonist, did not show any pain behavior in naive rats. Intracisternal administration of muscimol, a GABA_A receptor agonist, attenuated the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats with CFA treatment and inferior alveolar nerve injury, respectively. On the contrary, intracisternal administration of bicuculline also attenuated the mechanical allodynia in rats with inferior

alveolar nerve injury. Intracisternal administration of baclofen, a GABA_B receptor agonist, attenuated the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats with CFA treatment and inferior alveolar nerve injury, respectively. In contrast to GABA_A receptor antagonist, intracisternal administration of CGP35348 did not affect either the thermal hyperalgesia or mechanical allodynia. Our current findings suggest that the GABA_A receptor, but not the GABA_B receptor, participates in pain processing under normal conditions. Intracisternal administration of GABA_A receptor antagonist, but not GABA_B receptor antagonist, produces paradoxical antinociception under pain conditions. These results suggest that central GABA has differential roles in the processing of orofacial pain, and the blockade of GABA_A receptor provides new therapeutic targets for the treatment of chronic pain.

Key words: GABA receptors, thermal hyperalgesia, mechanical allodynia

[†] These authors contributed equally to this study

*Correspondence to: Dong-Kuk, Ahn, 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
E-mail: dkahn@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

GABA (gamma-aminobutyric acid)는 중추신경계에 존재하는 대표적인 억제성 신경전달물질로 통증전도에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다[1,2]. GABA는 척수후각에서 통증전도에 중요하다고 알려진 lamina I, II에 많이 존재하며[3], 특히 개재뉴론에서 분비되어 작용을 나타낸

다[3-5]. 신경말단에서 분비된 GABA는 GABA_A, GABA_B 수용기를 통하여 작용을 나타낸다[1,6]. 일반적으로 GABA_A 수용기는 리간드와 결합하여 활성화되고, Cl⁻ 이온 투과도를 증가시켜서 세포막을 과분극 상태로 만들어 억제성 작용을 나타낸다[7-9]. 이와는 다르게 GABA_B 수용기는 G단백과 연결되어 있어 대사성 수용기로 작용한다[10]. GABA_B 수용기가 활성화되면 일차구심신경의 시냅스 말단에서 칼슘이온이 세포 내로 이동하는 것을 억제하거나 시냅스 후신경에서 K⁺ 이온의 투과도를 증가시켜 흥분성 전도를 차단한다[10].

중추신경계에서 GABA가 통증조절에 중요하게 작용한다는 것은 이미 많은 선행연구들에 의해 알려져 있다. GABA_A 수용기 작용제로 알려진 muscimol이나 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen을 실험동물의 척수강으로 주입하면 통증 행위반응을 유의하게 억제하였고[11-14], glutamate 투여로 나타나는 신경세포의 흥분[15,16]이나 통증 행위반응[17]을 억제하였으며, 신경손상으로 유발되는 신경병성 통증도 유의하게 억제하였다[18-20]. 정상상태에서도 GABA 수용기는 감각신경 전도를 조절하는 것으로 알려져 있다. 정상상태의 실험동물의 척수강으로 GABA_A 수용기 대항제를 주입하면 외부 자극에 대한 반응을 증가시켰을 뿐만 아니라 통증행위반응도 유발하였다[19,21,22]. 또한 정상상태의 실험동물에서 GABA_B 수용기 대항제를 투여하였을 때에도 이질통증을 유발하였다[19,23,24]. 이러한 실험결과는 억제성으로 작용하는 GABA가 안정상태에서도 지속적으로 분비되어 수용기를 활성화시켜 신경전도를 차단한다는 것을 알 수 있으며, 안정상태에서 작용하는 지속적인 억제는 통증발생에 매우 중요하다는 것을 보여준다.

최근 연구에서 통증이 발생한 실험동물에서 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline을 주입하면 예상과는 다르게 오히려 통증을 억제하는 진통작용을 나타내었다[25]. 이러한 실험결과는 비록 GABA성 약물이 억제성으로 작용하지만 주위 환경에 따라 작용이 다르게 나타날 수 있다는 것을 암시하고 있다. 그리고 GABA가 얼굴부위를 지배하는 삼차신경 감각신경핵에서도 발견되고, 조절된다는 것은 이미 알려져 있지만 [26,27] 수용기 종류와 통증유무에 따라 나타나는 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 안면에서 발생하는 다양한 통증에 중추성 GABA_A와 GABA_B 수용기가 어떠한 작용을 나타내는지 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 통증 모델은 Complete Freund's Adjuvant (CFA)를 피하로 주입하여 나타나는 열통증과 아랫니틀신경을 손상시켜 나타나는 신경병성 이질통증을 이용하였다. 정상상태의 실험동물과

통증이 유발된 실험동물의 소뇌연수조로 GABA_A와 GABA_B 수용기 약물을 주입하여 통증에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험동물과 수술

실험동물은 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(230-280 g)를 사용하였고, 경북대학교 치의학전문대학원 동물실에서 일정한 온도와 12시간 주/야 빛의 순환주기를 갖는 환경에서 실험동물용 사료와 물을 자유롭게 공급하여 사육하였다. 본 연구는 경북대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KNU2015-53)을 얻었으며, 의식이 있는 동물의 실험에 관한 세계통증연구학회의 윤리적 규정을 준수하였다.

안면부의 감각정보를 투사받는 삼차신경핵군에서 약물이 작용하는 효과를 검증하기 위하여 소뇌연수조로 약물을 투여하였다. 이를 위하여 실험동물의 소뇌연수조로 카테터(catheter)를 삽관하는 수술을 실시하였다[28-31]. 실험동물은 ketamine 40 mg/kg으로 마취시켰으며, 마취된 쥐는 stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)으로 머리를 고정시키고 약물을 주입하기 위한 폴리에틸렌관(PE10)을 소뇌연수조 내로 삽관하였다. 폴리에틸렌관은 두개골 부위로 빼내어 금속 나사못과 치과용 레진(Dentsply Caulk, Milford, USA)을 사용하여 머리에 고정하였다. 수술 후 72시간 동안 실험동물을 회복시켰다.

통증실험모델

CFA에 의해 유도되는 염증성 열통증 모델: 안면영역에 만성적인 염증성 통증을 유발하기 위해 3% isoflurane으로 흡입 마취한 다음 CFA oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)과 생리식염수를 1:1 비율로 혼합한 용액 40 μ L를 실험동물 흰 쥐의 안면영역 피하에 주사하였다. 선행연구에서 CFA를 안면영역 피하에 주입하면 1일째부터 열과민성 통증이 발생하여 주입 후 10일째까지 이어지다가 14일째가 되면 주입하기 전과 같은 양상으로 회복된다는 것을 보고한 바 있다[32].

신경병성 이질통증 모델: 실험동물을 ketamine (40 mg/kg)과 xylazine (4 mg/kg)의 혼합액으로 마취한 뒤 선행연구에서 사용된 방법과 동일하게 수술을 하였다[33,34]. 아래턱 좌측 제2대구치를 발거하고, 작게 만든 임플란트(직경 1 mm, 길이 4 mm, Megagen, Gyeongsan, Korea)를 식립하여 아랫니틀신경 손상을 야기하였다. 대조군은 치아를 발거하고 임플란트를 식립하지 않은 동물을 사용하였다. 실험을 마친 후 아랫니틀신경이 임플

란트에 의해 손상된 실험동물만 최종분석에 이용하였다.

안면통증 평가

열통증 평가: 행위반응을 관찰하기 위해 실험동물이 목을 빼내어 자유롭게 움직일 수 있도록 설계된 투명한 플라스틱 관찰용 통에 한 마리씩 넣어 열자극을 수행하였다. 동물실험은 밝지 않으면서 조용한 곳에서 최소 30 분 이상 안정화시킨 다음 실험을 실시하였다. 열자극은 레이저 자극기(Infrared Diode Laser, LVI-808-10, LVI tech, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 피부로부터 10 cm 떨어진 곳에서 90° 각도로 적용하였다[33,35]. 레이저 자극의 power와 current는 11 W와 18.1 A로 고정하였으며, 안면영역에 열자극을 적용한 다음 얼굴을 피하는 시간(head withdrawal latency)을 측정하여 평가하였다. 실험동물은 적어도 5분의 시간 간격을 두고 2번 이상의 자극을 수행한 후 평균값을 산출하였으며, 조직손상을 방지하기 위해 cut-off time을 20초로 설정하였다.

이질통증 평가: 기계적 이질통을 평가하기 위해 공기자극 테스트(air-puff test)를 이용하였는데[33,36-38], 삼차신경이 지배하는 안면영역에 가해지는 연속된 10번의 공기자극(4초 동안의 지속시간, 10초의 간격)에 반응하여 머리를 회피하거나 깨우는 등의 공격적인 행동을 행위반응의 평가기준으로 삼았다. 공기자극은 금속관(26 gauge, 10 cm)을 통해 피부로부터 1 cm 떨어진 곳에서 90° 각도로 적용하였다. 공기자극 세기와 간격은 pneumatic pump module (BH2 system, Harvard Apparatus, USA)로 조절하였다. 자극의 역치는 총 시도에서 50% 이상의 반응을 보인 경우로 평가하였으며[39,40], 40 psi 이상의 자극에서도 반응이 나타나지 않으면 자극을 중지하였다. 정상적인 동물은 40 psi이하의 압력에서는 어떠한 통증반응도 보이지 않았다.

실험 프로토콜

정상상태에서 GABA성 약물의 효과: 정상상태의 실험동물에 중추성 GABA 수용기 작용을 알아보기 위하여 소뇌연수조로 GABA성 약물을 주입한 다음 통증이 발생하는지를 평가하였다. 소뇌연수조로 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline (50, 100 ng)과 GABA_B 수용체 대항제인 CGP35348 (30, 300 µg)을 주입한 다음 10, 20, 30, 45, 60, 90분에 head withdrawal latency time을 측정하여 열통증의 발생 유무를 평가하였다. 또한 bicuculline과 CGP35348을 투여한 다음 air-puff test를 실시하여 기계적 자극에 대한 이질통도 평가하였다. 각 그룹 당 8마리의 실험동물에서 평가하였다.

CFA로 유도된 염증성 열통증에 GABA성 약물이 미

치는 영향: 실험동물에 CFA를 주입하면 열통증이 발생하였다. CFA 주입 후 5일째 GABA_A 수용기 작용제인 muscimol (50, 100, 1000 ng)과 대항제인 bicuculline (50, 100 ng), 그리고 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen (0.1, 0.3, 0.6 µg)과 대항제인 CGP35348 (30, 300 µg)을 소뇌연수조로 각각 주입한 다음 10, 20, 30, 45, 60, 90분에 head withdrawal latency time을 측정하여 열통증에 미치는 영향을 평가하였다. 각 그룹 당 8마리의 실험동물에서 평가하였다.

신경병성 이질통증에 GABA성 약물이 미치는 영향: 기계적 이질통의 평가는 아랫니틀신경을 손상시키기 3 일 전에 평가하였고, 신경손상 후 7일째에 GABA_A 수용기 작용제인 muscimol과 대항제인 bicuculline, 그리고 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen과 대항제인 CGP35348을 소뇌연수조로 각각 주입하였다. 주입 후 10, 20, 30, 45, 60, 90분에 기계적 자극에 대한 이질통을 평가하였다. 각 그룹 당 8마리의 실험동물에서 평가하였다.

실험에 사용한 GABA 수용기 약물

실험에 사용한 GABA_A 수용기 작용제는 muscimol을 사용하였으며 대항제는 bicuculline을 사용하였다. 그리고 GABA_B 수용기 작용제는 (±)baclofen을 사용하였으며 대항제는 CGP35348을 사용하였다. 모든 시약은 생리식염수를 사용하여 용해시켰으며 muscimol, bicuculline, (±)baclofen은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)사로부터 구입하였고, CGP35348은 Tocris bioscience (Langford, Bristol, UK)사로부터 구입하였다. 대조군은 사용한 약물의 용매인 생리식염수를 주입하여 평가하였다.

통계분석

실험결과의 유의성을 검증하기 위해 다중 그룹에서 반복측정분산분석법과 Holm-Sidak 사후 분석법을 이용하였다. 개별 시간에 따른 유의성을 확인하기 위해서 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준값은 P<0.05로 설정하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였다.

결 과

정상상태의 실험동물에서 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline (50, 100 ng)을 소뇌연수조로 주입한 다음 열자극을 가할 때 회피반응이 나타나는 시간과, 공기자극을 가하였을 때 회피반응을 유발하는 공기자극의 세기

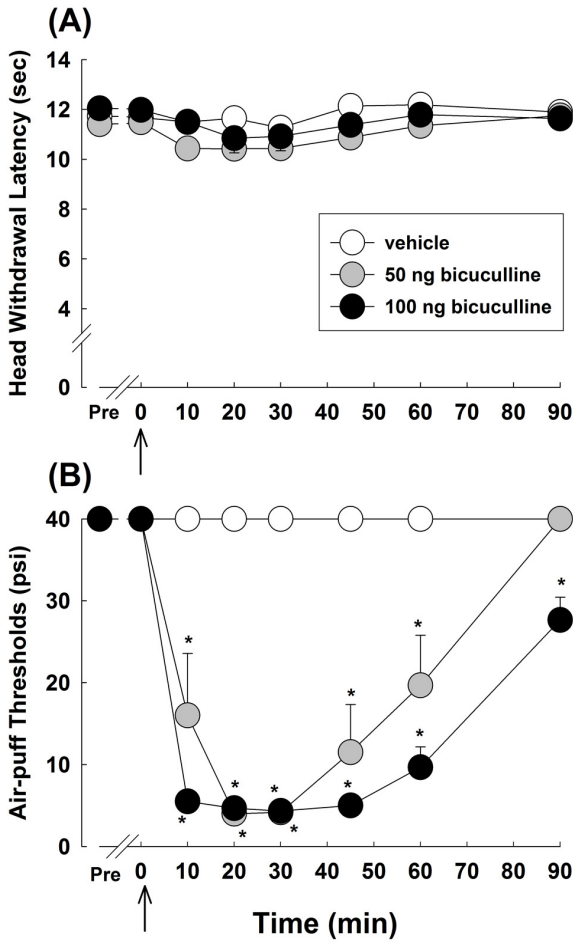


Fig 1. Effects of intracisternal administration of bicuculline (50, 100 ng), a GABA_A receptor antagonist, on head withdrawal latency time (A) and air-puffs thresholds (B) in the naive rats. Intracisternal administration of bicuculline produced a significant inhibition of air-puffs thresholds. Arrow: intracisternal injection. *P < 0.05, vehicle- vs. drug-treated group, n=8 animals per group.

를 측정된 결과를 그림 1에 나타내었다. 소뇌연수조로 주입한 bicuculline (50, 100 ng)은 열자극을 가한 후 나타나는 회피반응에 아무런 영향을 주지 못하였다(Fig. 1A). 그러나 50이나 100 ng 용량의 bicuculline을 소뇌연수조로 주입한 다음 공기자극에 대한 반응을 측정해 보면 공기자극의 역치가 유의하게 낮아진 것을 볼 수 있다(P<0.05, Fig 1B). 이와 같이 나타나는 기계적 이질통증은 약물 주입 후 60분까지 지속되다가 90분이 지나면 정상으로 회복되었다. 대조군으로 약물의 용매만을 주입하였을 때는 공기자극 역치에 아무런 영향을 주지 못하였다.

그림 2는 정상상태의 실험동물에서 GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348 (30, 100 µg)을 소뇌연수조로 주입한 다음 열통증과 기계적 이질통증을 평가한 결과를 보여 주고

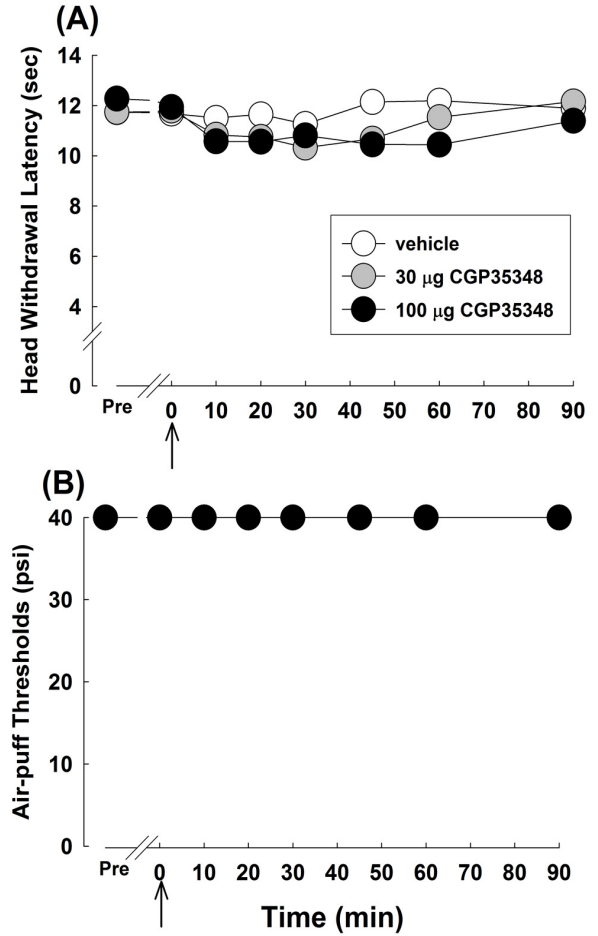


Fig 2. Effects of intracisternal administration of CGP35348 (30, 300 µg), a GABA_B receptor antagonist, on head withdrawal latency time (A) and air-puffs thresholds (B) in the naive rats. Arrow: intracisternal injection. n=8 animals per group.

있다. 소뇌연수조로 주입한 CGP35348은 열자극이나 공기자극을 가하여 나타나는 회피반응에 아무런 영향을 주지 못하였다.

CFA를 피하조직으로 주입하면 실험동물에서 열통증 과민현상이 발생하였다. CFA 주입 5일 후 GABA_A 수용기 작용제인 muscimol (50, 100, 1000 ng)과 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline (50, 100 ng)을 소뇌연수조로 주입한 다음 열통증에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 3). 소뇌연수조로 고농도의 muscimol (1000 ng)을 주입하면 열통증 과민현상을 유의하게 억제하였다($F_{(2,15)} = 138.467, P < 0.05$). 그러나 낮은 농도의 muscimol (50, 100 ng)은 어떠한 영향도 미치지 못하였다. GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline은 어떠한 농도에서도 열통증 과민현상을 억제하지 못하였다.

아랫니틀신경을 손상시켜 이질통증을 유발한 실험동물에서 GABA_A 수용기 작용제인 muscimol (50, 100, 1000 ng)

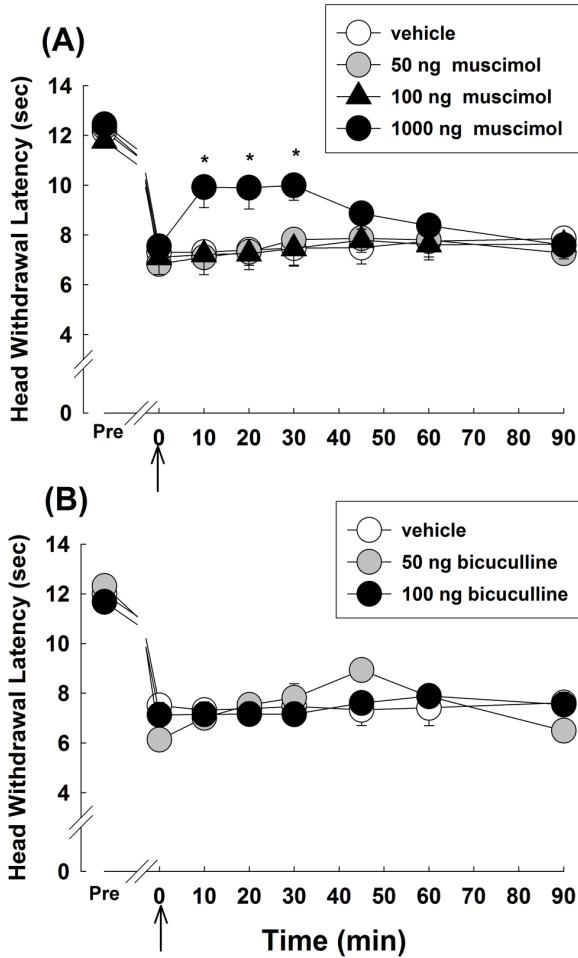


Fig. 3. Effects of intracisternal administration of muscimol (50, 100, 1000 ng; A), a GABA_A receptor agonist, or bicuculline (50, 100 ng; B), a GABA_A receptor antagonist, on thermal hyperalgesia in rats with CFA treatment. Intracisternal administration of high doses of bicuculline produced a significant decrease in the head withdrawal latency response to thermal stimuli in rats. Arrow: intracisternal injection. *P < 0.05, vehicle- vs. drug-treated group, n=8 animals per group.

과 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline (50, 100 ng)을 소뇌연수조로 주입한 다음 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다(Fig. 4). 소뇌연수조로 주입한 muscimol은 모든 농도에서 유의하게 이질통증을 억제하였다(P<0.05). 또한 소뇌연수조로 주입한 bicuculline도 이질통증을 유의하게 억제하였다(P<0.05).

CFA를 피하 주사하여 열통증 과민현상을 유발시킨 실험동물에서 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen (0.1, 0.3, 0.6 µg)과 GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348 (30, 300 µg)을 소뇌연수조로 주입한 다음 열통증 과민현상에 미치는 영향을 평가한 결과를 그림 5에 나타내었다. 소뇌연수조로 주입한 baclofen은 열통증을 유의하게 감

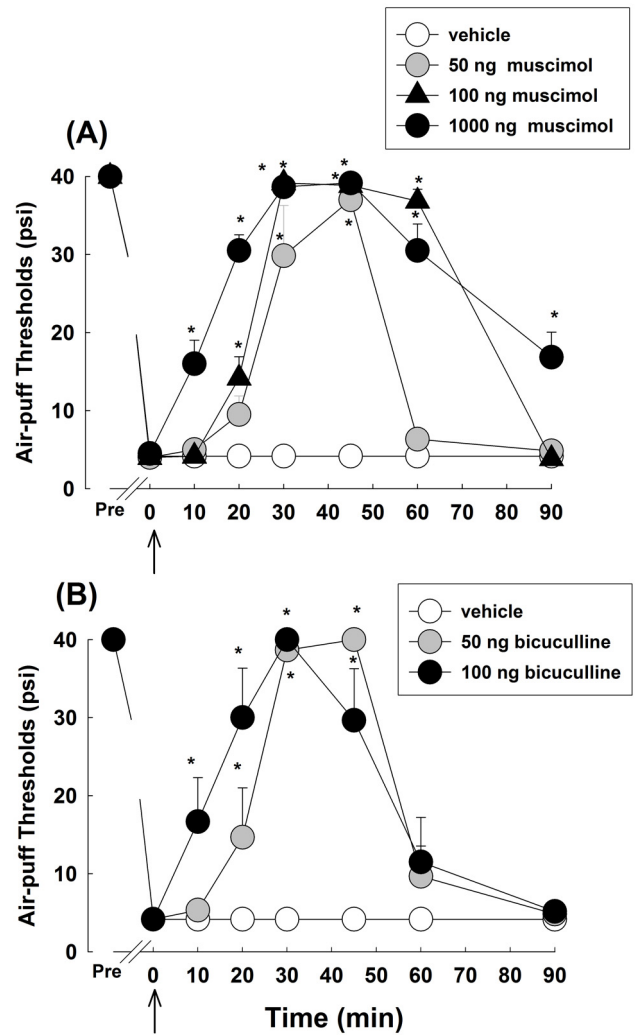


Fig. 4. Effects of intracisternal administration of muscimol (50, 100, 1000 ng; A), a GABA_A receptor agonist, or bicuculline (50, 100 ng; B), a GABA_A receptor antagonist, on neuropathic mechanical allodynia in rats. Intracisternal administration of both muscimol and bicuculline produced a significant inhibition of air-puffs thresholds in rats with inferior alveolar nerve injury. Arrow: intracisternal injection. *P < 0.05, vehicle- vs. drug-treated group, n=8 animals per group.

소시켰지만(P<0.05), CGP35348은 CFA에 의해 발생하는 열통증에 아무런 영향을 주지 않았다.

그림 6은 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen (0.1, 0.3, 0.6 µg)과 GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348 (30, 300 µg)을 소뇌연수조로 주입한 다음 신경손상으로 나타나는 이질통증에 미치는 영향을 평가하였다. GABA_A 수용기 약물이 나타내는 반응과는 다르게 소뇌연수조로 주입한 GABA_B 수용기 작용제인 baclofen은 이질통증을 유의하게 감소시켰지만(P<0.05), GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348은 아무런 영향을 미치지 못하였다.

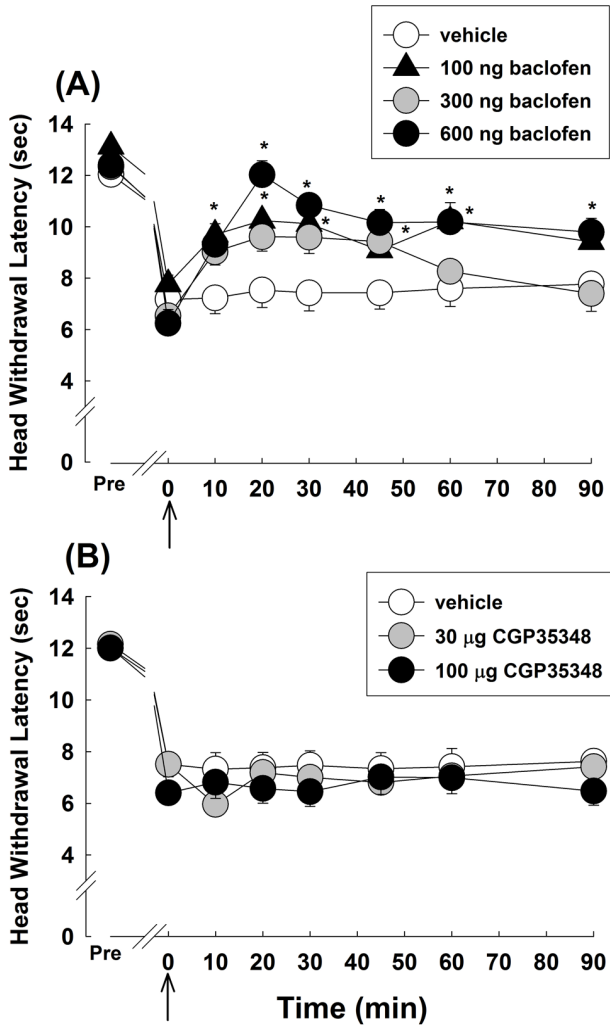


Fig. 5. Effects of intracisternal administration of baclofen (0.1, 0.3, 0.6 µg; A) a GABA_B receptor agonist, or CGP35348 (30, 300 µg; B), a GABA_B receptor antagonist, on thermal hyperalgesia in rats with CFA treatment. Intracisternal administration of baclofen but not CGP35348 produced a significant decrease in the head withdrawal latency response to thermal stimuli in rats. Arrow: intracisternal injection. *P < 0.05, vehicle- vs. drug-treated group, n=8 animals per group.

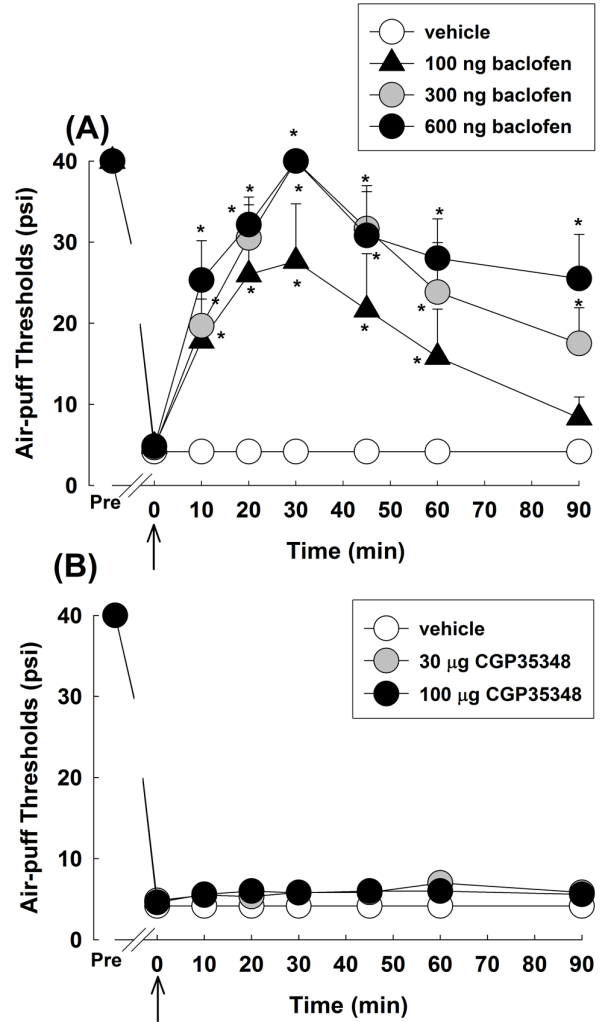


Fig. 6. Effects of intracisternal administration of baclofen (0.1, 0.3, 0.6 µg; A), a GABA_B receptor agonist, or CGP35348 (30, 300 µg; B), a GABA_B receptor antagonist, on neuropathic mechanical allodynia in rats. Intracisternal administration of baclofen but not CGP35348 produced a significant inhibition of air-puffs thresholds in rats with inferior alveolar nerve injury. Arrow: intracisternal injection. *P < 0.05, vehicle- vs. drug-treated group, n=8 animals per group.

고 찰

본 실험에서는 GABA 수용기 약물들이 정상상태와 통증이 발생한 상태에서 수용기 종류에 따라 어떤 반응을 유발하는지 알아보려고 수행하였다. 정상상태에서 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline은 통증을 유발하였지만, GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348은 아무런 영향을 나타내지 못하였다. GABA_A와 GABA_B 수용기 작용제는 CFA에 의한 열통증과 신경손상에 의한 이질통증 모두 유의하게 억제하였다. 그러나 GABA_A 수용기

대항제가 신경손상에 의한 이질통증을 오히려 억제하였다. 이러한 실험 결과는 통증을 억제한다고 알려진 GABA 수용기는 통증 유무와 수용기 종류에 따라 반응이 다르게 나타난다는 것을 보여준다.

중추신경계에서 억제성 신경전달물질을 차단하면 흥분성으로 전환하게 되고 통증이 발생하는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline을 척수로 주입하면 GABA_A에 의해 나타나는 억제성 작용이 차단되어 흥분성으로 전환하게 되어 이질통증을 발생한다[41,42]. 본 연구에서도 bicuculline을 소뇌연수조로 주입하면 안면영역에서 이질통증을 발생시켰다. 그러나

GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348은 통증을 유발하지 못하였다. 이러한 실험결과는 안정상태에서 GABA가 유리되어 긴장성으로 억제작용을 나타낸다는 것을 말해주고 있으며, 안정상태에서 긴장성 억제작용은 GABA_A 수용기를 통해서 나타난다는 것을 보여준다. 그러나 선행 연구에서 GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348을 정상상태 실험동물의 척수로 주입하면 C 신경섬유에 의해 전도되는 반응과 자극에 의해 유도되는 반응이 유의하게 증가되었고[24], 무해한 자극에서도 실험동물이 통증을 느낄 때 나타나는 소리(vocalization)를 유발하였다[23]는 보고로 미루어 볼 때 GABA_B 수용기도 긴장성으로 작용할 가능성이 있을 것으로 판단된다. 또한 소뇌연수조로 주입한 bicuculline은 안정상태의 실험동물에서 열통증을 발생시키지 못하고 이질통증만 발생시켰다. 열통증과 이질통증의 통증의 발생과 전도에는 서로 다른 신경섬유가 관여한다는 실험결과[38]를 고려해 볼 때, 안정상태에서 GABA_A 수용기에 의해 나타나는 긴장성 억제작용은 이질통증을 전도하는 A β 신경섬유의 전도에만 나타난다는 것을 알 수 있다. 그러나 관여하는 명확한 기전은 향후 더 연구되어야 할 것으로 판단된다.

일반적으로 GABA는 중추신경계에서 억제성으로 작용한다고 알려져 있으며 실험동물에서 발생하는 다양한 통증을 억제한다[2,17,43]. 본 연구에서도 CFA에 의해 유도되는 열통증과 신경손상으로 유도되는 이질통증 모두 중추신경계로 주입한 GABA 수용기 작용제인 musimol과 baclofen에 의해 진통작용을 야기하였다. 이러한 진통작용은 GABA_A 뿐만 아니라 GABA_B 수용기 작용제에서도 나타나는 것으로 보아 통증 억제작용에는 두 종류의 수용기가 모두 관여하는 것으로 판단된다.

통증이 발생한 실험동물에서 GABA_A 수용기 대항제의 작용은 안정상태에서 관찰한 반응과 다르게 나타났다. 안정상태에서 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline을 투여하면 통증을 야기하였는데 반하여 신경손상을 받은 실험동물에 bicuculline을 투여하면 이질통증이 오히려 억제되었다. 이와 같은 GABA_A 수용기 대항제가 야기하는 paradoxical anti-allodynic 작용은 선행연구에서 보고한 실험내용과 일치한다. 실험동물에서 carrageenan이나 CFA로 염증성 통증을 유발시키면 척수에서 억제성으로 작용하는 GABA에 면역 염색되는 신경세포나 GABA 분비가 오히려 증가하였는데[44,45], 이러한 실험 결과는 증가된 GABA성 작용을 차단하면 예상과는 다르게 오히려 진통작용이 나타날 수 있다는 것을 보여준다. 본 연구에서도 신경손상에 의해 이질통증이 발생한 실험동물에서 중추로 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline을 주입하면 이질통증을 오히려 억제하였다. 이러한 실험

결과는 통증이 발생하였을 때에는 GABA성 작용이 억제성에서 흥분성으로 바뀔 수 있다는 것을 보여준다. 그러나 GABA_A 수용체 대항제인 bicuculline을 소뇌연수조로 투여하면 신경손상에 의한 이질통증을 유의하게 억제하였지만, GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348은 아무런 영향을 미치지 못하였다. 이러한 실험결과는 억제성에서 흥분성으로 작용이 바뀌어 나타나는 GABA성 신경은 GABA_A 수용체를 통하여 나타난다고 판단된다.

통증이 발생한 실험동물에서 GABA_A 수용기를 차단하여 나타나는 역설적인 진통작용의 기전은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않지만 세포 내의 Cl⁻ 이온농도가 변화하여 나타나는 것으로 보여진다. 신경세포에서 Cl⁻ 이온 조절은 GABA_A 수용기가 조절하는 이온 통로와 cation-chloride cotransporter에 의해 조절되는 통로를 통하여 이루어진다[46-49]. 특히 Cl⁻ 이온을 조절하는 cotransporter에는 이온을 세포 내로 이동시키는 Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC)와 세포 외로 유출하는 K⁺-Cl⁻ cotransporter (KCC)가 있다[50,51]. 결과적으로 NKCC는 세포 내 Cl⁻ 이온을 증가시키는 작용을 나타내며 KCC는 세포 내 Cl⁻ 이온 농도를 감소시키는 작용을 나타낸다. 최근 연구에서 염증이 발생하였을 때 유발되는 통증에 Cl⁻ 이온의 농도를 조절하는 NKCC1이나 KCC2가 관여한다는 것이 보고된 바 있다. 관절염에 이완된 실험동물에서 통증을 전도하는 척수 후각의 lamina I과 II 부위에서 NKCC1 mRNA 발현이 증가하였고, 신경세포에서 Cl⁻ 이온 농도가 높게 나타난다는 결과[52]를 보고하였다. 또한 말초 신경의 손상으로 척수후각에 있는 신경세포에서 KCC2 발현이 억제[53]되었는데, KCC2의 발현억제는 Cl⁻ 이온이 세포 밖으로 나가지 못하게 되어 결국은 세포 내 Cl⁻ 이온 농도가 증가하게 된다. 이와 같이 NKCC1 발현이 증가하거나 KCC2 발현이 억제되어 세포 내 Cl⁻ 이온의 농도가 증가한 상태에서 GABA_A 수용기가 활성화되어 Cl⁻ 이온통로가 열리게 되면 Cl⁻ 이온이 세포 밖으로 유출되어 막전위가 흥분성인 탈분극으로 나타나게 된다[54-56]. 이러한 실험 결과는 GABA_A 수용기를 통한 조절이 향후 이질통증 발생과 치료에 중요한 요인이 될 수 있다는 것을 보여준다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면 정상상태에서 GABA_A 수용기 대항제인 bicuculline은 통증을 유발하였지만, 신경손상에 의해 발생한 이질통증은 오히려 억제하였다. 그러나 GABA_B 수용기 대항제인 CGP35348은 아무런 영향을 나타내지 못하였다. 이러한 실험 결과는 GABA 수용기는 수용기 종류에 따라 통증에 작용하는 것이 서로 다르다는 것을 보여주며, 특히 GABA_A 수용기는 안정상태에서 긴장성으로 통증을 조절할 뿐만 아니라 통증이 발생한 상태에서는 오히려 통증을 억제할 수 있다는 것을 보여준다. 이와 같은 GABA_A 수용기를

통하여 나타나는 paradoxical anti-nociception은 항 후 통증조절 기전을 규명하거나 치료방법을 개발하는데 중요한 단서가 될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) and funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2012M3A9B6055414).

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

1. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17:457-462.
2. Reichl S, Augustin M, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain* 2012;153:129-141. doi: 10.1016/j.pain.2011.09.028.
3. Carlton SM, Hayes ES. Light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol.* 1990;300:162-182.
4. Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J. Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 1996;73:509-518.
5. Millhorn DE, Hökfelt T, Seroogy K, Oertel W, Verhofstad AA, Wu JY. Immunohistochemical evidence for colocalization of gamma-aminobutyric acid and serotonin in neurons of the ventral medulla oblongata projecting to the spinal cord. *Brain Res.* 1987;410:179-185.
6. Chebib M, Johnston GA. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:937-940.
7. Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T, Ahring PK. The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *J Biol Chem.* 2002;277:41438-41447.
8. Johnston GA. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther.* 1996;69:173-198.
9. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:795-816.
10. Kerr DI, Ong J. GABAB receptors. *Pharmacol Ther.* 1995;67:187-246.
11. Hammond DL, Drower EJ. Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold. *Eur J Pharmacol.* 1984;103:121-125.
12. Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci.* 1986;39:1667-1674.
13. Wilson PR, Yaksh TL. Baclofen is antinociceptive in the spinal intrathecal space of animals. *Eur J Pharmacol.* 1978;51:323-330.
14. Yaksh TL, Reddy SV. Studies in the primate on the analgetic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology* 1981;54:451-467.
15. Lin Q, Peng YB, Willis WD. Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol.* 1996;75:109-123.
16. Willcockson WS, Chung JM, Hori Y, Lee KH, Willis WD. Effects of iontophoretically released amino acids and amines on primate spinothalamic tract cells. *J Neurosci.* 1984;4:732-740.
17. Aanonsen LM, Wilcox GL. Muscimol, gamma-aminobutyric acidA receptors and excitatory amino acids in the mouse spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248:1034-1038.
18. Hwang JH, Yaksh TL. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 1997;70:15-22.
19. Malan TP, Mata HP, Porreca F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 2002;96:1161-1167.
20. Rode F, Jensen DG, Blackburn-Munro G, Bjerrum OJ. Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA(A) receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2005;516:131-138.
21. Reeve AJ, Dickenson AH, Kerr NC. Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. *J Neurophysiol.* 1998;79:1494-1507.
22. Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol.* 1994;72:169-179.
23. Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Intrathecal gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptor antagonist CGP 35348 induces hypersensitivity to mechanical stimuli in the rat. *Neurosci Lett.* 1994;182:299-302.
24. Sokal DM, Chapman V. Spinal GABA(B)-receptor antagonism increases nociceptive transmission in vivo. *Neuroreport* 2001;12:3247-3250.
25. Park YH. Central mechanisms of mechanical allodynia produced by subcutaneous injection of IL-1 β [dissertation]. Daegu: Kyungpook National University. 2012.
26. Almond JR, Westrum LE, Henry MA. Post-embedding immunogold labeling of gamma-aminobutyric acid in lamina II of the spinal trigeminal subnucleus pars caudalis: I. A qualitative study. *Synapse* 1996;24:39-47.
27. Ginestal E, Matute C. Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry* 1993;99:49-55.

28. Ahn DK, Choi HS, Yeo SP, Woo YW, Lee MK, Yang GY, Jeon HJ, Park JS, Mokha SS. Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects on inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. *Pain* 2007;132:23-32.
29. 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;139:367-375. doi: 10.1016/j.pain.2008.05.005.
30. 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.
31. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 1976;17:1031-1036.
32. Park MK, Song HC, Yang KY, Ju JS, Ahn DK. Participation of peripheral P2X receptors in orofacial inflammatory nociception in rats. *Int J Oral Biol.* 2011;36:143-148.
33. Han SR, Yeo SP, Lee MK, Bae YC, Ahn DK. Early dexamethasone relieves trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res.* 2010;89:915-920. doi: 10.1177/0022034510374056.
34. Won KA, Kim MJ, Yang KY, Park JS, Lee MK, Park MK, Bae YC, Ahn DK. The glial-neuronal GRK2 pathway participates in the development of trigeminal neuropathic pain in rats. *J Pain* 2014;15:250-261. doi: 10.1016/j.jpain.2013.10.013.
35. Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* 2009; 144:84-94. doi: 10.1016/j.pain.2009.03.016.
36. Han SR, Yang GY, Ahn MH, Kim MJ, Ju JS, Bae YC, Ahn DK. Blockade of microglial activation reduces mechanical allodynia in rats with compression of the trigeminal ganglion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;36:52-59. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.10.007.
37. Jeon HJ, Han SR, Park MK, Yang KY, Bae YC, Ahn DK. A novel trigeminal neuropathic pain model: compression of the trigeminal nerve root produces prolonged nociception in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 38:149-158. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.03.002.
38. Kim MJ, Lee SY, Yang KY, Nam SH, Kim HJ, Kim YJ, Bae YC, Ahn DK. Differential regulation of peripheral IL-1 β -induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats. *Pain* 2014;155:723-732. doi: 10.1016/j.pain.2013.12.030.
39. Jung CY, Choi HS, Ju JS, Park HS, Kwon TG, Bae YC, Ahn DK. Central metabotropic glutamate receptors differentially participate in interleukin-1beta-induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *J Pain* 2006;7:747-756.
40. Yang CS, Jung CY, Ju JS, Lee MK, Ahn DK. Intracisternal administration of mitogen-activated protein kinase inhibitors reduced IL-1beta-induced mirror-image mechanical allodynia in the orofacial area of rats. *Neurosci Lett.* 2005;387:32-37.
41. Ishikawa T, Marsala M, Sakabe T, Yaksh TL. Characterization of spinal amino acid release and touch-evoked allodynia produced by spinal glycine or GABA(A) receptor antagonist. *Neuroscience* 2000;95:781-786.
42. Yaksh TL. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 1989;37:111-123.
43. Vaught JL, Pelley K, Costa LG, Setler P, Enna SJ. A comparison of the antinociceptive responses to the GABA-receptor agonists THIP and baclofen. *Neuropharmacology* 1985;24:211-216.
44. Castro-Lopes JM, Tavares I, Tölle TR, Coito A, Coimbra A. Increase in GABAergic Cells and GABA Levels in the Spinal Cord in Unilateral Inflammation of the Hindlimb in the Rat. *Eur J Neurosci.* 1992;4:296-301.
45. Castro-Lopes JM, Tavares I, Tölle TR, Coimbra A. Carrageenan-induced inflammation of the hind foot provokes a rise of GABA-immunoreactive cells in the rat spinal cord that is prevented by peripheral neurectomy or neonatal capsaicin treatment. *Pain* 1994;56:193-201.
46. Kaila K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1994;42:489-537.
47. Lauf PK, Adragna NC. K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10: 341-354.
48. Park JH, Saier MH Jr. Phylogenetic, structural and functional characteristics of the Na-K-Cl cotransporter family. *J Membr Biol.* 1996;149:161-168.
49. Price TJ, Hargreaves KM, Cervero F. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res.* 2006;1112:146-158.
50. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 2009;61:820-838. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.003.
51. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4:490-503. doi: 10.1038/ncpneuro0883.
52. Morales-Aza BM, Chillingworth NL, Payne JA, Donaldson LF. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis.* 2004;17:62-69.
53. Asiedu MN, Mejia G, Ossipov MK, Malan TP, Kaila K, Price TJ. Modulation of spinal GABAergic analgesia by inhibition of chloride extrusion capacity in mice. *J Pain* 2012; 13:546-554. doi: 10.1016/j.jpain.2012.03.002.
54. CCoull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424:938-942.
55. De Koninck Y. Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:93-99.
56. Hasbargen T, Ahmed MM, Miranpuri G, Li L, Kahle KT, Resnick D, Sun D. Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1198:168-172. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05462.x.