

흰쥐의 척수에서 Glutamate가 매개하는 Nociceptive Response에 있어서 Protein kinase C의 관련성

김성정 · 박전희 · 이영욱 · 양성준 · 이종은 · 이병천 · 손의동 · 허인희*

중앙대학교 약학대학 약리학교실

(Received March 16, 1999)

The Involvement of Protein kinase C in Glutamate-Mediated Nociceptive Response at the Spinal Cord of Rats

Sung Jeong Kim, Cheon Hee Park, Young Wook Lee, Seong Jun Yang,
Jong Un Lee, Byung Cheon Yi, Uy Dong Sohn and In Hoi Huh*

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—When glutamate was injected intrathecally, the result is similar to those produced by TPA injected. The involvement of protein kinase C (PKC) in the nociceptive responses in rat dorsal horn neurons of lumbar spinal cord was studied. In test with formalin, a PKC inhibitor (chelerythrine) inhibited dose-dependently the formalin-induced behavior response. Neomycin also inhibited it significantly. But, a PKC activator (12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester, TPA) showed reverse effect. When glutamate was injected intrathecally, we observed the result is similar to those produced by TPA injection. On the other hand, intrathecal injection of glutamate induced thermal and mechanical hyperalgesia. In Tail-flick test, we examined the involvement of PKC on the glutamate-induced thermal hyperalgesia. Chelerythrine showed an inhibitory effect and TPA enhanced thermal response. Glutamate decreased the mechanical threshold significantly. A pretreatment of chelerythrine and neomycin inhibited glutamate-induced mechanical hyperalgesia, but the effect of neomycin was not significant. TPA had little effect on the mechanical nociceptive response. These results suggest that the PKC activation through metabotropic receptor at postsynaptic region of spinal cord dorsal horn neurons may influence on the persistent nociception produced by chemical stimulation with formalin, thermal and mechanical hyperalgesia induced by glutamate.

Keywords □ PKC, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester (TPA), nociceptive responses, glutamate, hyperalgesia.

Glutamate는 mammalian CNS에서 작용하는 주요한 excitatory amino acid(EAA) 신경전달물질로 long-term potentiation과 neurotoxicity등과 같은 여러 가지 neuronal response에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} CNS에서의 excitatory synaptic transmission은 3가지 type의 glutamate receptor 즉, ionotropic NMDA(N-methyl-D-aspartate) receptor와 amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole pro-

pionic acid(AMPA)/kainate receptor, 그리고 metabotropic receptor³⁾에 의해 매개된다.^{4,5)} 특히 감각신경으로 이루어져 있는 척수의 dorsal horn cell들은 EAAs인 glutamate, aspartate등에 의해 대부분 흥분되는데, 이러한 말초 자극에 의해 일어나는 척수내에서의 NMDA receptor 활성화는 말초부위의 신경손상이나 염증반응에 따른 hyperalgesia(통각과민현상: 유해 자극에 대해 민감하게 반응을 보이는 상태)를 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

Fig. 1에 나타나 있는 바와 같이, NMDA receptor는 ligand-gated channel로서 Ca²⁺유입을 촉진하고

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5597 (팩스) 02-826-8752

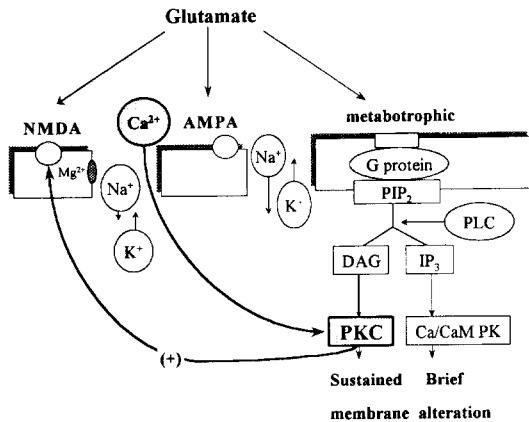


Fig 1—A possible mechanism by which glutamate leads to central sensitization of spinal cord dorsal horn neurons. A high level of neural activity induced by peripheral injury, such as formalin injury stimulates a release of glutamate from dorsal horn neurons. PKC: protein kinase C, NMDA: N-methyl-D-aspartate, AMPA: amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, PLC: phospholipase C, PIP₂: phosphatidyl inositol bis phosphate, NMDA: N-methyl-D-aspartate, DAG: diacylglycerol, IP₃: inositol-3-phosphate, Ca/CaM PK: calcium/calmodulin protein kinase.

AMPA/low-affinity kainate receptor는 Na⁺/K⁺ flux를 활성화시키고, metabotropic receptor는 PLC 활성화라는 세포내 신호전달 경로와 coupling되어 있어 PI 경로를 통해 세포내 저장소로부터 Ca²⁺ 유리시키고 DAG를 통해서 PKC를 활성화시킨다.⁷⁾ 현재 AMPA에 의한 NMDA responses 조절에 대해서는 보고된 바가 많지만, NMDA receptor가 매개하는 반응에 대한 metabotropic receptor의 역할에 대해서는 최근에 연구되기 시작했다.⁸⁻¹⁰⁾ Rat의 sciatic nerve를 결찰하여 유도한 chronic constriction injury(CCI) 병태 model에서 나타나는 thermal hyperalgesia와 spontaneous pain behaviors를 PKC translocation/activation inhibitor인 GM1 ganglioside가 억제하였고¹¹⁾ 이들의 lumbar 척수를 autoradiographic assay하여 본 결과 dorsal horn laminae I-VI에서 membrane-bound PKC가 증가된 것을 볼 수 있었다.¹²⁻¹⁴⁾ 또한 NMDA를 직접 척수강 내로 주입하여 유발된 thermal hyperalgesia 현상이 PKC억제에 의해 억제되었다는 보고도 있다.¹⁵⁾ Worley와 Willis 등은 척수에 있는 substantia gelatinosa에 PKC가 고농도로 존재한다¹⁶⁾는 사실과 phorbol ester(PMA)에 의한

PKC 활성이 mechanical, thermal stimuli에 대한 primate spinothalamic neurons의 반응을 증강시켰다는 사실을 발견하였는데, 이로써 dorsal horn neurons의 sensitization process에서의 PKC의 역할이 확인되었다.¹⁷⁾ 한편, formalin에 의한 조직손상 후 나타나는 persistent nociceptive responses가 spinal cord dorsal horn neuron의 sensitization에 의존한다는 사실이 밝혀지면서 이들에 대한 여러 가지 intracellular messengers에 대한 연구가 진행되고 있는데, 최근 이러한 formalin에 의한 반응이 EAAs에 의해 매개된다는 것이 증명되었다.¹⁸⁾ formalin이나 EAAs가 짧은 시간 동안에 일으키는 dorsal horn neurons의 depolarization이나 Wind-up(activity-dependent hyperexcitability) 현상은 NMDA receptor가 주로 매개하는 것으로 알려졌고, A β -와 C-fiber에 의한 반응과 반복적인 C-fiber stimulation 후 일어나는 discharge는 non-selective EAA agonist가 매개, 지속적인 discharge는 NMDA가 매개하는 것으로 보여진다.¹⁹⁾ Torence 등은 이러한 formalin과 같은 말초자극에 의해 primary afferent fiber에서 EAAs와 substance P가 동시에 유리되어 glutamate가 일으키는 neuronal activity를 증강시킨다는 것을 입증하였는데,²⁰⁾ 이는 substance P와 glutamate 모두가 IP₃ system과 voltage-gated Ca²⁺ channel을 통한 Ca²⁺ influx를 자극함으로써 일어나는 세포내 Ca²⁺ 농도 상승과 PKC 활성화에 주로 의존하는 것으로 알려졌다.²¹⁾ 이러한 주장들은 PLC 억제제들과 PKC 억제제들 처리 후 관찰한 formalin test에서 그 nociceptive behaviour response가 억제되고, phorbol ester에 의한 PKC 활성화에 의해 증강되었다는 연구결과로 확인되었다.²²⁾

위의 보고들로 EAAs의 작용으로 활성화된 PKC가 이들의 반응을 매개할 뿐 아니라, 그러한 반응들이 PKC에 의해서 조절될 수 있음을 알 수 있다.²³⁾ 그러나, 이에 대한 자세한 mechanism은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 단지 PKC activation이 neurotransmission에 영향을 줄 수 있다는 몇 가지 가능한 가설들이 제시되고 있다. PKC에 의한 receptor protein의 phosphorylation은 receptor subunits의 assembly뿐 아니라 receptors의 desensitization, open-channel probability, 그리고 aggregation 등을 조절하는 것으로 보고 있는데 이에 의한 ligand-gated ion channel 조절로

neuronal plasticity가 일어나는 것으로 본다.^{24,25)}

최근 연구에서 삼차 신경핵에서 분리한 neurons의 NMDA에 대한 반응이 PKC활성에 의해 강화됨이 보고 되었는데, 이는 PKC에 의한 단백질산화에 의해 NMDA channel opening의 확률이 높아졌고, NMDA receptor-channel complex의 voltage-dependent Mg^{2+} block이 감소되었다는 사실로 설명될 수 있다.^{26,27)} 따라서 PKC activity는 NMDA가 일으키는 세포내 Ca^{2+} 증가에 필요하고 submaximal effect concentrations에서의 NMDA의 반응을 강화시킨다고 할 수 있다. 또 하나의 가설로는, nitric oxide synthase(NOS)를 활성화시켜 그 결과로 유리된 NO가 post-와 presynaptic process 모두에 영향을 준다는 것이다.²⁸⁾ 여기서 NMDA는 PKC에 의존적으로 NOS를 선택적으로 자극한다는 사실이 알려졌다.²⁹⁾ 또한, 유리된 NO와 활성화된 PKC에 의해 핵내에서 유전자들의 발현이 증가된다는 주장도 있다(Fig. 2). PKC activation이 GABA수용체를 억제하는 기전³⁰⁾ 또한 말초자극에 의한 dorsal horn neurons의 반응성 증가를 설명해 줄 수 있다. 또한 PKC 활성 자체가 sensory neuron의 presynaptic terminals에서부터의 신경전달물질의 유리를 증가시켜 neuronal sensitization(hyperalgesia)를 일으킨다는 보고³¹⁾도 있으나, PKC에 의한 EAAs 유리 증가는 일시적인 것으로 밝혀졌다.

이에 본 연구는 앞에서의 여러 가지 연구보고들로 미루어 보아 PKC가 척수에서의 nociceptive signal

transduction에 관여하고 있음을 확인하고 실험에 임하였다. Rat의 척수에서의 EAA, 특히 glutamate에 초점을 맞추어 이의 증가로 일어나는 persistent nociceptive behaviours(formalin test)와 hyperalgesia를 mechanical, thermal stimuli에 대한 반응성 변화로 확인하고 이에 있어서의 PKC의 관련성을 알아보고자 하였다. 또한 이들의 반응이 metabotropic glutamate receptor를 통한 PLC 경로를 통해서 일어나는지도 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기 - L-Glutamic acid는 Gibco에서, chelerythrine는 Calbiochem에서, Neomycin sulfate, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)는 Sigma에서 구입하였고, pentobarbital sodium, atropine sulfate은 Merck에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 1급 시약을 사용하였다.

실험동물 - Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 삼육동물(Korea)에서 구입하여 항온·항습($21 \pm 2^{\circ}C$, $50 \pm 2\%$) 조건하에서 인공으로 12시간 명암주기(09:00~21:00)를 만들어 주어 사료와 식수는 자유롭게 섭취시키면서 3일이상 순화기간을 거친 후, 체중 200~250 g 되는 동물을 실험 전에 12시간 절식시켜 사용하였다.

약물 투여 방법(Intrathecal injection method) - 척수강 속으로 약물을 주입하는 방법으로 formalin test를 위해서는 단시간에 수술이 가능하고 정확한 약물주입이 가능한 direct transcutaneous intrathecal injection Method³²⁾를 이용하였고, tail-flick과 paw pressure test를 하기 위해서는 장기간 catheter를 꽂아두고 약물을 반복적으로 안전하게 투여하는 방법으로써 Yaksh와 Rudy, 그리고 LoPachin가 함께 개발, 개선한 chronic catheterization method^{33,34)}를 참고하여 이를 변형하여 사용하였다.

직접 척추 간극내 바늘 삽입(Direct transcutaneous injection)

흰쥐를 먼저 20분 전에 atropine(1 mg/kg, i.p.)으로 전마취한 후 pentobarbital sod.(40 mg/kg, i.p.)으로 마취한다. 마취된 쥐를 수술대 위에 고정시키고 등쪽 하단부의 털을 깎아낸 다음, bethadine용액으로 감염을 예방한다. 제 1척추에서부터 손으로 만져 요추부

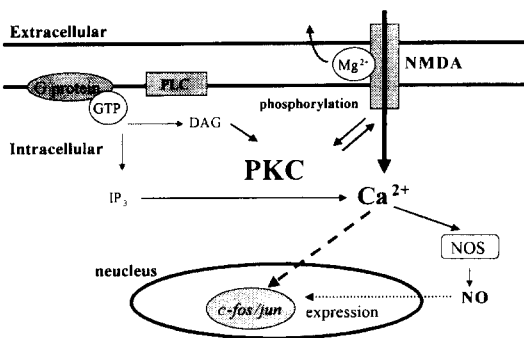


Fig 2— Model of various described alternatives involved in the neuronal plasticity regulated by PKC activation. PKC: protein kinase C, NOS: nitric oxide synthase, NMDA: N-methyl-D-aspartate, PLC: phospholipase C, NMDA: DAG: diacylglycerol; IP₃: inositol-3-phosphate, GTP: guanine triphosphate.

위의 위치를 찾아 그 위 피부를 1.5 cm 정도 절개하여 좌우로 젖힌 뒤 미리 제작해 놓은 26_{1/2}-G needle에 polyethylene tube(PE-50)를 연결한 것을 L₅와 L₆ 사이에 삽입한다. PE tube 내부는 0.9% 생리식염수로 충전한다(내부용적 6 μ l). 삽입시 관내에 충전시킨 생리식염수가 척수강내로 빨리 들어가는 모세관 현상과 외부 이물질의 유입을 막기 위하여 tube 바깥 끝을 가열·밀봉하고 혈액응고로 인한 needle 폐쇄를 피하기 위해 heparin(400 unit/ml)를 needle 끝에 묻혀서 삽입한다. 삽입 성공여부는 쥐의 꼬리가 측면으로 움직이는 것으로 확인하고, needle이 움직이거나 빠지지 않도록 plastic tube(길이 1 cm, 내경 0.7 cm)를 취하여 한쪽 끝을 잘라 바깥쪽으로 펼친 뒤 절개부위 양쪽사이에 넣어 needle을 감싸고 그 주위와 그 사이 공간에 미리 준비한 cranioplast cement를 부어 고정시킨다. 이윽고, 허를 빼내어 기도를 확보하고 heating pad를 사용, 39°C 내외의 온도조건 하에서 2시간 방치하고 마취에서 회복이 되면 cage당 한 마리씩 넣어 항온·항습 사육기(Environmental control set)안에서 48시간 방치, 수술 후유증(large central dorsal vessel hemorrhage, motor problem) 여부 및 사료와 식수를 제대로 섭취하는지 면밀히 관찰한다.

척수 지주막하강내 삽관(Chronic catheterization into subarachnoid space; i.t. cannulation)

앞에서와 동일하게 마취한 쥐를 stereotaxic apparatus 위에 올려놓고 ear bar를 흰쥐의 양쪽 고막 앞부분에 있는 acoustic meati에 끼운 뒤 위턱의 절치를 holder에 걸어서 조인다. 후두부의 털을 깎아내고 소독액으로 소독한다. 후두골과 제1번 경추 연결부(atlanto-occipital portion)를 절개하여 근육 층을 좌우로 젖힌 뒤, atlanto-occipital membrane(dura)이 나타나면 가볍게 절개하여 PE tube(PE-10, 7 cm와 PE-50, 5 cm)를 연결하여 그 내부는 생리식염수로 충전한다. 내부용적 12 μ l로 제작한 cannula를 subarachnoid space로 밀어 넣어 제 1-5번 요추부분 혹은 요추팽대부(lumbar enlargement)에 이르도록 한다. 삽관이 성공하면, 관이 움직이지 않도록 앞에서와 같이 고정시키고, 마취에서 회복되기를 기다렸다가 한 마리씩 cage안에 넣어 사료와 식수를 제공하여 72시간 동안 방치한다. 실험 전에 운동이상을 보이거나 상태가 좋지 않은 쥐들은 실험에서 제외하였다. 실험이 끝나면 tube안으로 1%

methylene blue 10 μ l를 주입하고 ether 과량으로 치사시킨 후 해부하여 염색부위를 육안으로 확인하고, 삽관이 잘못된 것은 결과분석에서 제외하였다.

약물투여

수술 후 정상적으로 회복된 쥐를 움직이지 않도록 고정시킨 후 약물은 1회 주입량이 2 μ g가 되도록 조제해서 microsyringe를 사용하여 tube를 통해 20~30초 동안 서서히 주입함으로써 급격한 뇌압상승을 피했다. 이어 tube에 잔류하고 있는 약물이 모두 척수강내로 들어가도록 tube의 내부용적만큼 생리식염수를 추가로 주입하였다.

Formalin test - 말초로 주입한 formalin은 두 감각신경섬유 A-fiber, C-fiber가 각각 시간차이를 두고 반응하는 독특한 2상의 반응을 유도한다. 특히 2상(formalin투여 20분 후)에서 나타나는 persistent nociceptive response(chronic pain)는 척수내에서 흥분성 아미노산의 유리에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 본 실험에서는 척수강내로 투여한 약물이 이에 미치는 영향을 알아보고자 실험하였다.

먼저 투명한 cage(10×20 cm plexiglas box)에 관찰이 용이하도록 반사거울을 한쪽면에 설치하고, 사육한 흰쥐를 cage안에 10분간 방치하여 환경에 적응시킨다. 시험약물을 2 μ l씩 척수강 내로 주입하고 30분 후(glutamate 투여 10분 후)에 2.5% formalin-용액 50 μ l를 발바닥에 주사한 뒤 나타나는 행동반응을 50분동안 관찰한다. 이때 nociceptive score은 50분동안 5분간격으로 관찰되는 행동반응에 다음 4개의 behavioural categories에 속하는 score를 결정하고, 그 각각에 소요되는 시간(sec)을 곱하여 합산하여 계산한다.³⁶⁾

- 0: 주사한 발에 변화없음
- 1: 주사한 발을 약간 바닥에서 든 상태
- 2: 주사한 발을 올려 들고 있음
- 3: 주사한 발을 핥거나 물어뜯거나 흔들

Tail-flick test - 척수강내로 투여한 약물의 thermal stimuli에 대한 효과를 검정하는데 사용하였다. Radiant heat를 꼬리의 하단 1/3되는 부위에 가하여 tail flick response를 보이는 시간(TF latency; sec)를 측정하였다. 모든 약물의 투여 전에는 Tail-flick Unit의 voltage를 조절해서 회피반응이 4~6초(CRT: control reaction time, baseline tail flick latency)

안에 일어나도록 빛의 강도를 조정하였다. 조직상해를 막기 위하여 설정하는 cut off time 은 12초로 하고 처음 5분간격으로 측정하 값 3개의 산술평균값을 baseline latency로 정한다. 피검약물은 glutamate투여 30분 전에 투여하고 glutamate처리 후 0, 5, 10, 15분 간격으로 TF latency를 측정하여 이 중 가장 작은 값을 취하여 아래의 식으로부터 TF latency effect(%)를 계산하여 약물의 효과를 비교하였다.

$$\text{TF latency effect(\%)} = \frac{(\text{maximal decrease in tail flick latency after drug baseline latency}) / \text{baseline latency} \times 100$$

Paw pressure test(Randall-selitto method) - 척수강 내로 glutamate를 투여하고 투여 직후, 5, 10, 30분 간격으로 통증의 역치를 측정하여 최대로 동통이 유발된 때를 관찰한다. 이 때로부터 30분 전에 피검약물을 투여하고 glutamate로 인한 통각의 역치감소에 미치는 이들의 영향을 관찰하였다.

측정방법은 Analgesy-meter로 흰쥐 발등에 일정(66g/sec)한 압력을 가할 때 흰쥐가 소리를 지르거나, 발을 빼내려는 순간의 추이동거리에 추 무게를 곱한 값을 통각의 역치로 정하였다. 역치값은 15초 간격으로 세 번 반복 측정하여 산술평균값을 취하였다.

$$\text{Nociceptive threshold changes(\%)} = \frac{(\text{postdrug threshold} - \text{predrug threshold}) / \text{predrug threshold} \times 100$$

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각 군간의 차이는 Student t-test를 사용하여 P값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

Rat의 척수에서의 EAA, 특히 glutamate에 초점을 맞추어 이의 증가로 일어나는 persistent nociceptive behaviours(formalin test)와 hyperalgesia를 mechanical, thermal stimuli에 대한 반응성 변화로 확인하고 이에 있어서의 PKC의 관련성을 알아보고자 PKC 활성화제와 PKC inhibitor를 사용하였으며 그리고 이들의 반응이 metabotropic glutamate receptor를 통한 PLC 경로를 통해서 일어나는지를 알아보기 위해

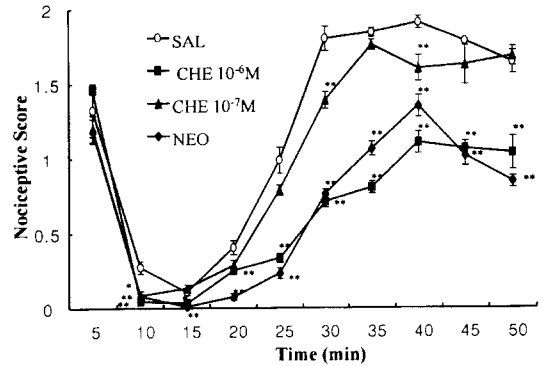


Fig 3 - Nociceptive responses induced by 2.5% formalin injection in rats pretreated with i.t. saline, chelerythrine (10⁻⁶, 10⁻⁷ M), neomycin (20 mg). n=6 for each group. Significant differences from saline group (*p<0.05, **p<0.01). SAL: saline, CHE: chelerythrine, NEO: neomycin.

PLC inhibitor를 사용하여 동일한 실험을 하였다.

PKC 활성화가 formalin 투여에 의한 nociceptive response에 미치는 영향

PKC inhibitor와 PLC inhibitor 전처리의 효과 - 수술에서 회복된 흰쥐의 lumbar cord내로 saline(SAL)과 potent, selective한 PKC inhibitor인 chelerythrine (CHE), 그리고 PLC inhibitor인 neomycin(NEO)을 직접 주입하고, 30분 후에 한쪽 발바닥에 2.5 % formalin 50 μl 주입한 다음 50분 동안 5분 간격으로 nociceptive score를 결정하여 이를 Fig. 3에 나타내었다.

척수강내로 주입한 chelerythrine은 formalin이 일으키는 nociceptive response중 glutamate가 매개하는 것으로 알려진 2상의 반응을 농도의존적으로 억제하였다. 또한 PLC inhibition에 의해서도 이 반응이 유의성있게 억제되는 것으로 보아 formalin의 2상반응이 metabotropic glutamate receptor를 통한 PKC activation에 의해 매개되고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 Torence 등이 formalin과 같은 말초자극에 의해 primary afferent fiber에서 EAAs와 substance P가 동시에 유리되어 glutamate가 일으키는 neuronal activity를 증강시킨다는 것을 입증한 결과²⁰⁾와 일치한다. 이는 substance P와 glutamate 모두가 IP₃ system과 voltage-gated Ca²⁺channel을 통한 Ca²⁺ influx를 자극함으로써 일어나는 세포내 Ca²⁺농도 상승과 PKC activation에 주로 의존하는 보고와²¹⁾

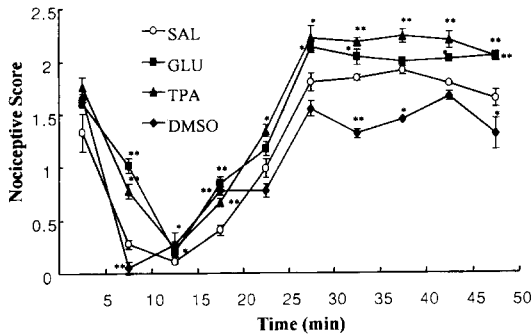


Fig 4—Nociceptive responses induced by 2.5% formalin injection in rats pre-treated with i.t. saline, 1% DMSO, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester (100 ng), glutamate (40 mg). $n=6$ for each group. Significant differences from saline group (* $p<0.05$, ** $p<0.01$). DMSO: dimethylsulfoxide, TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester; GLU: glutamate.

PLC 억제제들과 PKC 억제제들 처리 후 관찰한 formalin test에서 nociceptive behaviour response가 억제되고, phorbol ester에 의한 PKC activation에 의해 증강되었다는 연구결과를 미루어보아²²⁾ 위가설을 더욱 뒷받침해주고 있다.

TPA와 외인성 glutamate가 formalin 반응에 미치는 영향 비교— Agonist로 작용하는 glutamate(GLU)를 주입한 후 10분 뒤와 PKC 활성화제인 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를 30분 전처리한 후 주입한 formalin에 대한 반응을 saline처리군과 함께 나타내어 그 작용을 비교하였다(Fig. 4). Glutamate는 saline처리군의 반응을 2상에서 유의성있게 증강시켰고, TPA 역시 glutamate와 유사한 효과를 나타내었다. 외부에서 주입한 glutamate의 반응과 TPA의 반응이 유사한 것으로 보아 척수내로 유리된 glutamate가

PKC를 활성화시켜 작용을 나타낸다는 사실, 즉 NMDA receptor의 반응이 PKC활성화에 의해 증강된다는 것이 간접적으로 증명되었다. 또한, 이들이 formalin의 2상 반응만을 선택적으로 증강시킨 것으로 미루어 보아 glutamate가 매개하는 persistent nociception에 PKC가 관여함을 재확인할 수 있었다. 한편, 여기서 vehicle로 사용한 1% DMSO는 2상의 후반부의 반응을 약간 감소시키는 것으로 나타났으나, 이를 vehicle로 사용한 TPA는 DMSO의 영향을 배제한다면 위의 formalin이 유도하는 반응을 더욱 증강시킬 것으로 생각된다. 이는 glutamate등 PKC 활성화제로 작용하는 것들이 IP₃ system과 voltage-gated Ca²⁺ channel을 통한 Ca²⁺ influx를 자극함으로써 일어나는 세포내 Ca²⁺ 농도 상승과 PKC 활성화에 주로 의존하는 것으로 알려져 있다는 보고²¹⁾와 비슷함을 함을 알수 있었다.

척수의 Subarachnoid space내로 투여한 glutamate가 일으키는 hyperalgesia에 있어서의 PKC역할

척수강내로 투여된 외인성 glutamate의 hyperalgesic effects— 척수강으로 glutamate(40 μg)를 투여하면, 투여 직후 짧은 시간동안 hyperalgesia가 일어나는데 이는 척수의 dorsal horn에 감각전도도가 존재하며 또 여기에 glutamate receptor가 분포되어 있기 때문이다.^{37,38)} Glutamate의 효과는 Tail-flick test에서는 투여 전, 0, 5, 10, 15, 30분에, Paw pressure test는 투여전, 5, 10, 30분 후에 각각 실험을 실행하여 그 경시적인 % MPE값의 변화를 Table I에 나타내었다. Tail-flick test를 통한 thermal nociceptive test에서는 투여후 약 15분 후에 최대 반응을 나타내었고, mechanical nociceptive threshold는 30분 후에 최대로

Table I— Hyperalgesic effect of intrathecally administered glutamate (40 mg) in Tail-flick (TF) test and Paw pres-

Time (min)	% MPE			
	TF	PP	Saline	Glutamate
	Saline	Glutamate	Saline	Glutamate
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	-5.95±0.32	-6.57±0.51	0.32±0.05	-14.94±0.62
10	-11.95±0.91	-22.09±1.52	0.32±0.05	-14.94±0.62
15	-2.88±0.14	-37.36±1.77 ^{a)}		
30	2.29±0.11	-8.16±0.37	0.46±0.02	-25.98±1.20 ^{a)}

Minus values are expression of recessed antinociceptive effect from i.t. administration. %MPE: Percent maximal possible effect, which can not show analgesic rate but effect of substances to tested group. %MPE=(test latency-control latency)/(cut off time latency-control latency)×100. a: Indication of maximally induced nociception time after glutamate (40 mg) injection.

감소하는 것을 볼 수 있었다. 아래 Table I에 나타나 있는 바와 같이 척수강내로 주입된 glutamate는 thermal stimuli와 mechanical stimuli에 대한 정상취의 nociceptive threshold를 둘 다 감소시켰지만 mechanical nociceptive response 보다는 thermal response에 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. Glutamate가 mechanical nociceptive response보다는 thermal response에 더 많은 영향을 주는 것은 각각 그 자극을 전달하는 primary afferent fiber가 다르다는 차이도 있겠지만, 척수 감각신경로에 분포하고 있어 이를 매개하는 glutamate receptor의 selectivity와 activity의 차이 즉 주로 작용하는 NMDA receptor가 thermal hyperalgesia를 매개하는 한편, mechanical hyperalgesia는 non-NMDA와 metabotropic receptor에 의해 일어나는 것이라는 최근의 주장¹⁵⁻¹²⁷⁾과 어느 정도 일치하는 것이라고도 볼 수 있으나, 이에

관하여는 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

Tail-flick test를 통한 glutamate가 유발한 thermal hyperalgesia반응 - Fig. 5과 6는 glutamate 증가로 일어나는 thermal hyperalgesia가 PKC activation에 의해 매개되는 것인지를 알아보기 위해 PKC inhibitor인 chelerythrine과 PKC activator인 TPA를 각각 30분 전에 전처치한 후에 glutamate를 투여하여 유발되는 Tail flick latency를 측정된 결과이다. 측정은 glutamate 투여 직후 0, 10, 15분후에 측정하여 그 중 최대값을 비교하여 나타낸 것이다. 즉, i.t.로 투여한 chelerythrine은 농도의존적으로 glutamate의 반응을 억제한 반면, TPA를 전처치한 군에서는 Tail flick threshold가 glutamate 단독 처리군에서 보다 더 감소되었다. 이것은 수용체를 통해 전달된 신호가 세포내에서 PKC를 활성화시켜 이를 통해 감각신경로의 과도 흥분이 일어난 것이라 볼 수 있다. 이는 기존의 보고^{26,27)}와 일치하는 것으로 PKC활성화가 NMDA수용체를 인산화시켜 NMDA receptor를 매개하여 나타나는 thermal hyperalgesia를 증강시켰다고 설명할 수 있다. 한편, 척수내로 단독 투여된 약물 자체는 TF latency에 영향이 없는 것으로 나타났다.

한편 이러한 glutamate의 작용에 관여하는 PKC가 PIP₂ 경로를 통한 metabotropic receptor에 의해 activation되는 것인지를 살펴보기 위해 PLC inhibitor인 neomycin을 사용하여 실험하였다. Neomycin 20 µg을 전처리 한 후 glutamate를 투여한 후 Tail-flick test를 실행하였다. 앞에서 한 formaline test에서의 결과와 유사하게 neomycin이 glutamate의 Tail flick latency에

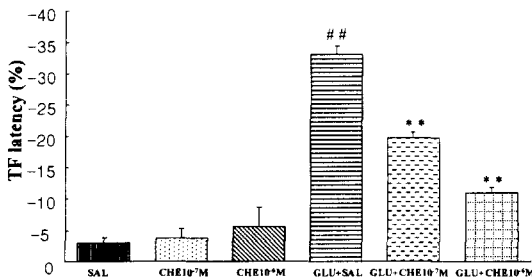


Fig 5— Dose-dependent effect of chelerythrine (10⁻⁶, 10⁻⁷ M) on thermal Tail flick latencies induced by glutamate (40 mg). n=6 for each group. # Significantly different from saline (p<0.01). **Significantly different from glutamate alone (p<0.01). SAL: saline, CHE: chelerythrine, GLU: glutamat.

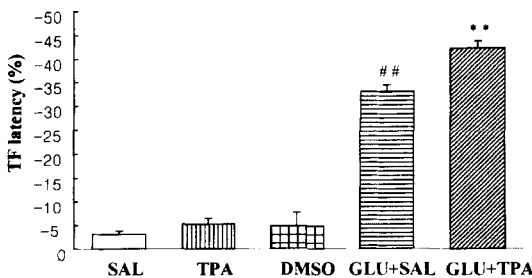


Fig 6— Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester (100 ng) on the thermal hyperalgesia produced by glutamate (40 mg). n=6 for each group. # Significantly different from saline (p<0.01). ** Significantly different from glutamate alone (p<0.01). SAL: saline, TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester, GLU: glutamate, DMSO: dimethylsufoxide.

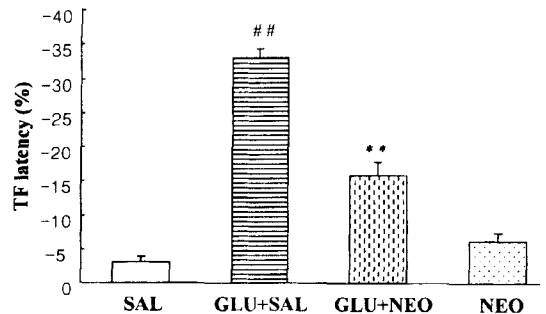


Fig 7— Effect of neomycin (20 mg) on thermal hyperalgesia produced by glutamate (40 mg). # Significantly different from saline (p<0.01). **Significantly different from glutamate alone (p<0.01). n=6 for each group. SAL: saline, GLU: glutamate, NEO: neomycin.

미치는 영향을 감소시켰다(Fig. 7). 이는 metabotropic receptor를 통한 intracellular messenger system에 의해 NMDA 수용체의 작용이 조절되고 있음을 보여주는 것이다. 이는 metabotropic receptor가 PLC를 거치는 세포내 신호전달 경로와 coupling 되어 있어 생성된 IP_3 를 통해서 세포내 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시키고 DAG를 통해서 PKC를 활성화시킨다는 보고와 일치한다.⁷⁾ 또한, Neomycin 단독 처리는 이러한 thermal stimuli에 대한 반응에 그다지 뚜렷한 영향을 미치지 못하는 것으로 보아, PLC 경로는 정상적인 상태에서 보다는 glutamate의 유리가 항진된 상태에서의 thermal nociception process에 더 크게 관여하고 있음을 확인할 수 있었다.

PKC 관련약물들이 glutamate에 의해 감소된 말초 mechanical nociceptive threshold에 미치는 영향 -

Fig. 8은 척수내로 직접 투여한 glutamate에 의해 감소된 mechanical nociceptive threshold를 chelerythrine, neomycin 그리고 TPA 모두 증가시켰음을 보여준다. 특히 chelerythrine은 농도 10^{-6} M에서 saline 투여군의 threshold와 유사한 수준으로 이를 상승시켰으나, neomycin과 TPA의 작용은 유의성이 없는 것으로 나타났다. 또한, 전처리한 TPA가 예상과는 달리, glutamate의 반응을 증강시키기는 커녕 오히려 억제시키는 결과를 나타냈는데, 이러한 결과로 보아 PLC activation을 거쳐 일어나는 PKC activation과정이 mechanical nociception에는 그다지 영향을 미치지 않는다고 할 수 있다.

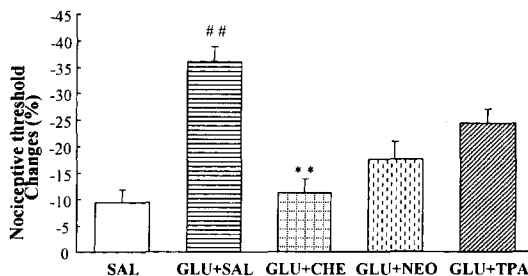


Fig 8—Effect of saline, chelerythrine (10^{-6} M), neomycin (20 mg), and TPA (100 ng) on mechanical threshold decrease induced by glutamate (40 mg). ## Significantly different from saline ($p < 0.01$). ** Significantly different from glutamate alone ($p < 0.01$). $n = 6$ for each group. SAL: saline, GLU: glutamate, CHE: chelerythrine, NEO: neomycin, TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ester.

본 실험에서는 척수내에서 유리된 EAA(glutamate 사용)가 일으키는 nociceptive response에 있어서 PKC activation이 미치는 영향에 대해 알아보았다. 이는 PKC inhibitor로 사용한 chelerythrine이 formalin으로 유발되는 persistent nociception response뿐 아니라 척수로 주입한 glutamate가 매개하는 hyperalgesia를 용량 의존적으로 억제함으로써 증명되었다. 즉 PKC가 formalin 반응에서 C-fiber가 일으키는 2상(EAA 유리에 의해 매개되는 반응)에 관여함을 확인하였고, 또한 EAA receptor 직접 자극으로 나타나는 thermal·mechanical hyperalgesia에도 영향을 주는 것으로 보아, 이 때에 활성화되는 PKC가 spinal cord dorsal horn neurons내에서의 EAA가 관여하는 nociceptive process에서 intracellular messenger로서 작용한다고 볼 수 있다.

현재까지 밝혀진 바로는 척수내에 유리된 EAA로 인한 NMDA receptor 활성화로 thermal hyperalgesia가 유발되고, mechanical hyperalgesia는 metabotropic receptor를 통해 일어나는 것으로 알려져 있는데, 본 실험 결과, 비록 mechanical hyperalgesia에 대한 관련성은 미약하게 나타났지만, 이들 receptors의 작용 모두에 PKC가 관여하고 있음이 보여진다. 이는 유리된 glutamate가 metabotropic receptor를 자극, 이를 통하여 PKC가 membrane으로 translocation되고 membrane에 존재하는 여러 ion channel들의 phosphorylation을 유도함으로써 이들의 ion permeability를 조절, 결과적으로는 neuronal synaptic plasticity를 초래한다는 것을 뒷받침한다. 한편, CNS에서의 PKC의 활성화는 이러한 EAA의 작용에 관여하는 것 이외에 serotonin에 의한 glycine의 작용항진과 같은 억제성 전달과정도 매개하는 것으로 보여진다.³⁹⁾ 이러한 nociceptive response에 있어서의 PKC의 facilitatory(excitatory) effect는 presynaptic site에서 활성화되어 neuropeptides의 유리를 촉진시킨다는 사실들로 한층 더 증명될 수 있을 것이다.

결론

흰쥐의 척수에서의 통각전달에 있어서 excitatory amino acid인 glutamate가 일으키는 persistent nociception과 hyperalgesia에 있어서의 protein ki-

nase C (PKC) activation이 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로부터 얻은 결론은 다음과 같다.

척수강내로 투여한 PKC inhibitor chelerythrine 10^{-6} M과 10^{-7} M은 formalin 에 대한 persistent nociception response를 용량 의존적으로 억제한 반면, PKC 활성화제인 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA) 100 ng는 외인성 glutamate와 유사하게 formalin에 대한 반응을 증가시켰다. 또한 Glutamate가 매개하는 thermal hyperalgesia에서 chelerythrine 10^{-6} M은 이를 유의하게 억제하였고 TPA는 증강작용을 보였다.

Phospholipase C inhibitor인 neomycin 20 μ g은 formalin의 반응과 glutamate에 의한 thermal nociceptive response를 모두 억제하였는데 이로써, metabotropic receptor를 통한 PKC activation이 이에 관련되어 있음을 알 수 있다.

한편, glutamate에 의해 일어나는 mechanical nociceptive threshold 감소 현상(mechanical hyperalgesia) 에 있어서는 이들의 반응이 chemicals와 thermal stimuli에 대한 반응과 비교해 볼때 그다지 유의성을 나타내지 못하였다.

이상과 같은 결과로 척수내에서의 흥분성 아미노산의 작용에 있어서 PKC의 관련성이 증명되었으나, 말초에 가하는 자극의 종류에 따라 차별적인 반응이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이에 신경세포내에서의 signal transduction 경로에 있어서 다양한 PKC의 역할에 대해서는 더 많은 세부적인 연구가 필요하다고 본다.

문 헌

- 1) Collingridge, G. L. and Singer, W. : Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends. Pharmacol. Sci...*, **11**, 290 (1990).
- 2) Zieglansberger, W. and Tolle, T. R. : The pharmacology of pain signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 611 (1993).
- 3) Neugebauer, V., Lucke, T. and Schaible, H. G. : Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **6**, 1179, (1994).
- 4) Sroblewski, J. T. and Danysz, W. : Modulation of glutamate receptors : molecular mechanisms

- and fuctional implications. *Brain Res.*, **29**, 441 (1989).
- 5) Collingridge, G. L. and Lester, R. A. J. : Excitatory amino acid receptors in the vetebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, **40**, 143 (1989).
- 6) Mao, J., Price D. D. and Mayer, D. J. : Mechanisms of hyperalgesia and mophine tolerance : a current view of their possible interactions. *Pain*, **62**, 259 (1995).
- 7) Berridge, M. J. : Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 159 (1987).
- 8) Cerne, R. and Randic, M. : Modulation of AMPA and NMDA responses in rat spinal dorsal horn neurons by trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid. *Neurosci. Lett.*, **144**, 180 (1992).
- 9) Palecek, J., Paleckova, V., Dougherty, P. M. and Willis, W. D. : The effect of t-ACPD, a metabotropic excitatory amino acid receptor agonist, on the responses of primate spinothalamic tract neurons. *Pain*, **56**, 261 (1994).
- 10) Ugolini, A., Corsi, M. and Bordi, F. : Potentiation of NMDA and AMPA Responses by Group I mGlu R in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology*, **36**(8), 1047 (1997).
- 11) Mao, J., Price, D. D., Hayes, R. L., Lu, J. and Mayer, D. J. : Intrathecal GM1 ganglioside and local nerve anesthesia reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain. Res.*, **584**, 28 (1992).
- 12) Worley, P. F., Baraban, J. M. and Snyder, S. H. : Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain : autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding. *J. Neurosci.*, **6**, 199 (1986).
- 13) Mao, J., Price, D. D., Mayer, D. J. & Hayes, R. L. : Pain-related increase in spinal cord membrane-bound Protein kinase C following peripheral nerve injury. *Brain Res.*, **588**, 144 (1992).
- 14) Mao, J., Price, D. D., Phillips, L. L., david, J. L. and Mayer, J. : Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci. Lett.*, **198**, 75 (1995).

- 15) Meller, S. T., Dykstra, C. and Gebhart, C. F. : Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. *Neuroscience*, **71**(2), 327 (1996).
- 16) Saito, N., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. & Tanaka, C. H. : Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. *J. Neurosci.*, **8**, 369 (1988).
- 17) Palecek, J., Paleckova, V., Dougherty, P. M. and Willis, W. D. : The effect of phorbol esters on the responses of Primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J. Neurophysiol.*, **71**(2), 529 (1994).
- 18) Coderre, T. J. and Melzack, R. : The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.*, **12**(9), 3665 (1992).
- 19) Coderre, T. J. and Yashpal, K. : Intracellular messengers contributing persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur. J. Neurosci.*, **6**, 1328 (1994).
- 20) Coderre, T. J. : Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. *Neurosci. Lett.*, **140**, 181 (1992).
- 21) Urban, L., Thompson, S. W. N. and Dray, A. : Modulation of spinal excitability : co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends. Neurosci.*, **17**(10), 432 (1994).
- 22) Mao, J., Price, D. D. and Mayer, D. J. : Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats : roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J. Neurosci.*, **14**(4), 2301 (1994).
- 23) Kelso, S. R., Nelson, T. E. and Leonard, J. P. : Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in xenopus oocytes. *J. Physiol.*, **449**, 705 (1992).
- 24) Aanonsen, L. M., Lei, S. and Wilcox, G. L. : Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*, **41**, 309 (1990).
- 25) Swope, S. L., Moss, S. J., Blackstone, C. D. and Haganir, R. L. : Phosphorylation of ligand-gated ion channels : a possible mode of synaptic plasticity. *FASEB. J.*, **6**, 2514 (1992).
- 26) Chen, L. and Huang, L. Y. : Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*, **356**, 521 (1992).
- 27) Murphy, N. P., Cordier, J., Glowinski, J. and Premont, J. : Is protein kinase C activity requires for the N-methyl-D-aspartate-evoked rise in cytosolic Ca^{2+} in mouse striatal neurons? *Eur. J. Neurosci.*, **6**, 854, (1994).
- 28) Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L. and Bregestovski, P. : Protein kinase C modulation of NMDA currents : an important link for LTP induction. *Trends. Neurosci.*, **15**, 333 (1992).
- 29) Bockaert, J. A. : Nitric-oxide synthase activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 425 (1992).
- 30) Leidenheimer, N. J., Mcquilkin, S. J., Hahner, L. D., Whiting, P. and Harris, R. A. : Activation of protein kinase C selectively inhibits the gamma-aminobutyric acid receptor-role of desensitization. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 116 (1992).
- 31) Barber, L. A. and Vasko M. R. : Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons. *J. Neurochem.*, **67**, 72 (1996).
- 32) Mestre, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G. and Eschalier, A. : A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, **32**(4), 197 (1994).
- 33) Yaksh, T. L. and Rudy, T. A. : Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.*, **17**, 1031 (1976).
- 34) LoPachin, R. M. and Rudy, T. A. : An improved method for chronic catheterization of the rat spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.*, **27**, 559 (1981).
- 35) Yamamoto, T., Tony, M. D. and Yaksh, L. : Comparison of the antinociceptive effects of pre-

- and posttreatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology*, **77**, 757 (1992).
- 36) Coderre, T. J. and Empel, I. V. : The utility of excitatory amino acid(EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the nociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. *Pain*, **59**, 345 (1994).
- 37) Farooqui, A. A. and Horrocks, L. A. : Excitatory amino acid receptor, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.*, **16**, 171 (1991).
- 38) Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. : The physiology of excitatory amino acid in vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **28**, 197 (1987).
- 39) Tian-Le Xu, T. L., Nabekura, J. and Akaike, N. : Protein kinase C-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurones by serotonin. *J. Physiol.*, **496**(2), 491 (1996).