흰쥐에서 Capsaicin 대조(Cisterna Magna) 내 주입 후 삼차신경 유해자극수용전달로에서의 Fos 단백의 발현

가톨릭대학교 의과대학 마취과학교실, *신경과학교실

정 성 우* · 김 영 인* · 김 성 년

= Abstract =

Fos Protein Expression in Trigeminal Nociceptive Central Pathway of the Rat Brain by Cisternal Capsaicin Injection

Sung Woo Chung, M.D.*, **Yeong In Kim**, M.D.*, and **Sung Nyeun Kim**, M.D.

Departments of Anesthesiology and *Neurology, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: Trigeminovascular system is implicated in the pathophysiology of the headache in migraine. This study was designed to evaluate the pattern of Fos protein expression in trigeminal nociceptive central pathway after meningeal stimulation of rats by capsaicin.

Methods: The expression of Fos protein was examined by immunohistochemistry in thalamus, brainstem and upper cervical cord (at three levels corresponding to obex, 0.8 mm and 2 mm below obex) 2 hours after intracisternal injection of either diluted capsaicin solution (0.1 ml, 61 μg/ml) or normal saline (0.1 ml) through a catheter placed in the cisterna magna, or following epidural instillation of diluted capsaicin solution in urethane-anesthetized Sprague-Dawley rats.

Results: Fos immunoreactivity was strongly expressed within lamina I, II of bilateral trigeminal nucleus caudalis (TNC) after cisternal capsaicin injection and magnitude of expression was greatest at level 2.0 mm below obex. Epidural capsaicin caused much less labelling than cisternal capsaicin. Fos positive cells were also observed in area postrema, nucleus of the solitary tract, medullary reticular nucleus and midline nuclear groups of the thalamus with similar intensity between capsaicin and control group.

Conclusions: These results indicate that the injection of capsaicin into the cisterna magna is an effective stimulus for the induction of Fos protein within TNC through activation of trigeminovascular afferents and this animal model can be useful for the evaluation of the pathophysiology and drug development in migraine and related headache.

Key Words: Pain: mechanism. Fos: trigeminal nucleus caudalis; capsaicin.

서 론

편두통을 포함한 두통의 발생기전들 중 삼차신경혈관계통(trigeminovascular system)이 중요한 역할을 한다. 즉 편두통의 발생초기에는 여러 가지 신경생리학적 변화에 의해, 그리고 수막염이나 지주막하 출혈 시에는 화학적 자극물질에 의해 삼차신경혈관섬유(trigeminovascular fiber)가 활성화되면서 neuropeptide가 신경말단에서 경막혈관벽으로 분비되어 신경인성염증을 일으킨다[1]. 이러한 침해수용성 정보(nociceptive information)는 수막조직과 혈관들에 분포한 삼차

책임저자 : 김성년, 서울시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 부속 강남성모병원
마취과학교실, 우편번호: 137-701
Tel: 02-590-1545, Fax: 02-537-1951.

석사학위 논문임.

신경에 의하여 삼차신경절로 전달되고, 여기서 시작하는 무수 신경섬유를 통하여 뇌간의 미측 삼차신경핵(trigeminal nucleus caudalis)으로 전달되어 두통이 발생한다고 알려져 있다[2].

Proto-oncogene인 c-fos는 AP-1 복합체로 알려진 전사 조절자(transcriptional regulator)에 관여하는 fos 단백질(이하 Fos)을 발현시키는 유전자로서[3-5], 자극이 주어지면 체내에서 급속히 발현되어 이차적으로 다른 유전자의 전사를 조절할 수 있는 조절단백질을 생성하고, 세포가 자극에 반응할 수 있게 하는 즉각조기유전자(immediate early gene)로 알려져 있고[5], 최근 Fos의 발현은 신경세포의 기능적 활성화의 지표로 이용되고 있다[6].

실험적 두통의 연구에는 여러 가지 자극에 의해 삼차신경혈관계통을 활성화시켜 신경인성염증의 정도를 측정하거나 삼차신경 유해자극수용전달로(trigeminal nociceptive pathway) 중 미측삼차신경핵의 신경세포활성화를 관찰하는 모델들이 이용되고 있다[7]. 이에 저자들은 흰쥐에서 강력한 자극물질인 capsaicin을[8,9] 대조(cisterna magna)내로 주입하여 수막을 자극한 뒤 경수상부 및 뇌간의 미측삼차신경핵과 시상을 포함한 상부전달로에서 Fos 발현을 관찰하여, 삼차신경 유해자극수용전달로의 역할을 포함한 두통의 발생기전을 이해하고 두통실험모델의 정립을 위한 기초연구를 하고자 하였다.

대상 및 방법

실험동물은 6주 이상 동일한 조건에서 사육된 250~300 g의 Sprague-Dawley계의 흰쥐 수컷 15마리로서 실험군에 10마리 및 대조군에 5마리를 각각 사용하였다.

Capsaicin 용액은 capsaicin (Sigma Co. USA) 3.05 mg을 생리식염수, 에탄올, Tween 80의 비율이 8 : 1 : 1인 혼합용액 1 ml에 녹여 냉장 보관한 후 사용하였고, urethane (Sigma Co. USA)은 16.5 g을 100 ml의 증류수에 녹여 사용하였다.

대조군(n=5)은 흰쥐에게 urethane (1.3 g/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 다음 정위고정기(stereotaxic frame)에 머리를 고정시키고 후두부융기에서 경추부위까지 정중선을 따라 피부를 절개하였다. 환추후두막(atlantooccipital membrane)을 통해 대조 안으로 가늘고 부드러운 폴리에틸렌 카테테르를 집어넣고, 30분 후 생리식염수 0.1 ml를 자동주입기를 이용하여 1분 동안 카테테르를 통해 대조 안으로 주입하였다. 생리식염수 주입 2시간 후에 가슴을 열고 심장을 거쳐 상행대동맥에 18 G 바늘을 삽입한 후, 생리식염수 150 ml를 먼저 관류하고, 이어서 4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)용액 300 ml를 관류하여 고정한 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌는 같은 고정액에 4°C에서 하룻밤 동안 담궈 고정한 다음, 뇌주형(brain matrix, ASI Instruments, Warren Inc., USA)을 이용하여 5 mm 크기로 시상, 뇌간 및 경수상부를 관상절단하고 vibratome (Technical product international, USA)을 이용하여 두께 50 μm의 관상절편을 만들어 면역염색을 시행하였다.

경막외(epidural) capsaicin군(n=5)은 복강 내에 urethane을 주사하여 마취한 후 흰쥐를 정위고정기에 고정시키고 두개골을 노출시킨 뒤 치과용 천공기를 이용하여 양쪽 두정골에 2개의 구멍을 냈다. 구멍을 통하여 capsaicin 희석용액 0.1 ml (61 μg/ml)를 경막외로 점적 주입하고 2시간 후에 대조군과 같은 방법으로 관류고정하고 뇌를 적출하여 표본을 제작하였다.

대조(cisterna magna) 내 capsaicin군(n=5)은 urethane으로 마취시킨 다음 대조 내에 삽입된 폴리에틸렌 카테테르를 통하여 capsaicin 희석용액 0.1 ml (61 μg/ml)을 자동주입기를 이용하여 1분 동안 대조 안으로 주입하였다. Capsaicin이 지주막하강에서 잘 퍼질 수 있도록 흰쥐를 30분간 30° 머리를 낮춘 위치로 유지한 후 90분간 수평복와위를 취했다. Capsaicin 주입 2시간 후에 대조군과 같은 방법으로 관류고정하고 뇌를 적출하여 표본을 제작하였다.

면역염색은 DAKO LSAB® kit를 사용하여 실시하였다. 조직 내 특이면역반응을 제거하기 위하여 3% H_2O_2와 blocking reagent를 적용시킨 후, 일차 Fos 항체(polyclonal rabbit antibody, Oncogene Science, USA)를 1 : 20으로 희석하여 4°C에서 24시간 동안 incubation하였다. Biotinylated link antibody와 peroxidase labelled streptavidin을 2시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 3% 3-amino-9-ethylcarbazole과 0.3% H_2O_2 혼합액으로 발색하여 관찰하였다(DAKO LSAB® kit, DAKO Corporation, USA).

각 실험군으로부터 얻은 시상, 뇌간 및 경수상부의 관상절편에서 Fos의 발현을 광학현미경으로 관찰

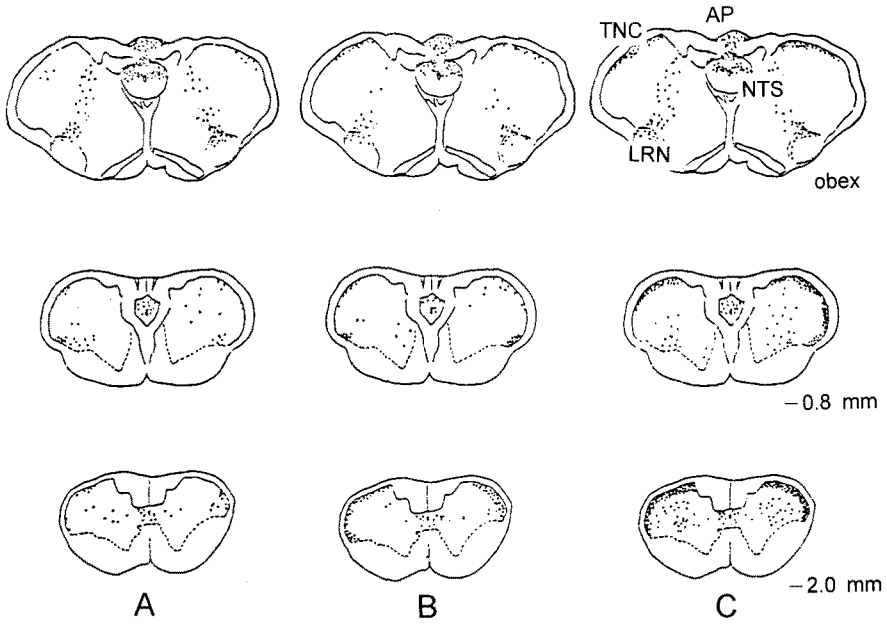

Fig. 1. Drawings showing the location of Fos immunostained cells (dots) in coronal brainstem sections taken from control (A), epidural capsaicin (B), and cisterna magna capsaicin (C) groups. The distance in millimeters caudal (−) to obex is given to the right side of each drawing (TNC: trigeminal nucleus caudalis, NTS: nucleus of the solitary tract, AP: area postrema, LRN: medullary lateral reticular nucleus).

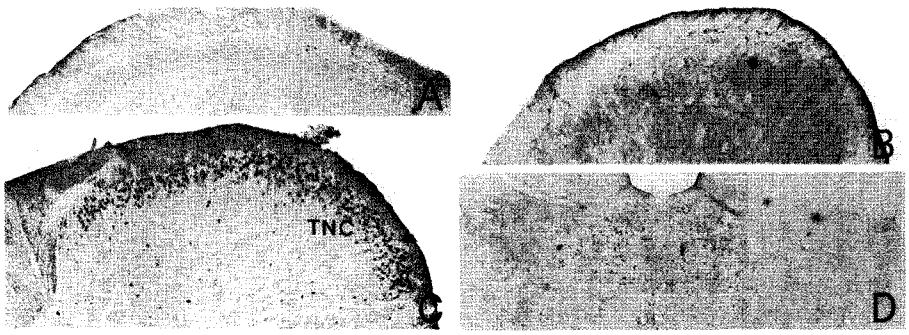

Fig. 2. Photomicrographs showing Fos immunoreactive cells within trigeminal nucleus caudalis (TNC) of control (A), epidural capsaicin (B), and cisterna magna capsaicin (C) groups and in the thalamus (D) of cisterna magna capsaicin group. Scale bars = 100 μm.

하였고, 경수상부 및 뇌간의 미측삼차신경핵 영역의 관상절편 중 빗장(obex)부위, 빗장아래 0.8 mm 부위, 빗장아래 2 mm 부위에서 Fos의 발현을 비교하여 그림으로 도식화하였다(Fig. 1A, B, C).

결 과

흰쥐 뇌의 경수상부 및 뇌간의 선택된 세 관상절편(빗장부위, 빗장아래 0.8 mm 부위, 빗장아래 2 mm 부위)과 시상에서 Fos의 발현은 다음과 같았다.

대조군에서 Fos 양성세포가 양측 미측삼차신경핵의 제 I, II층(lamina)(Fig. 2A), 최후야(area postrema), 고립로핵(nucleus of solitary tract), 연수그물핵(medullary reticular nucleus)에서 관찰되었다(Fig. 1A).

경막외 capsaicin 자극 시 미측삼차신경핵의 제 I, II층에서 Fos 양성세포수는 대조군에 비해 약간 증

가되었으나(Fig. 2B), 최후야, 고립로핵, 연수그물핵에서는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 1B).

대조 내 capsaicin 주입 후 Fos 양성세포수는 양측 미측삼차신경핵의 제 I, II층 부위에서 현저히 증가되었고(Fig. 2C), 특히 빗장 아래 2 mm 부위에서 가장 뚜렷하였다. 최후야, 고립로핵, 연수그물핵에서도 Fos 양성세포가 관찰되었으나 대조군과 차이는 없었다(Fig. 1C).

시상핵에서의 Fos 양성세포는 제3뇌실에 인접한 정중선핵(midline nuclei)군에서만 관찰되었고, 대조군과 실험군의 차이는 없었다(Fig. 2D).

고 찰

Capsaicin은 선택적으로 양이온 channel을 열어 일차구심성 감각신경세포에 특징적으로 작용하므로[10] Fos발현을 유도하는 강력한 자극물질로 널리 이용되어 왔다[8,9]. Strassman과 Vos등[11]은 안와상부자극으로 연수삼차신경핵 복합체의 제 I, II층에서 Fos발현을 유도하기 위하여 capsaicin을 이용하였고, 최근 대조내 capsaicin 주입은 지주막하 공간으로 광범위하게 퍼져 삼차신경혈관구심성섬유를 활성화시켜 양측 미측삼차신경핵에서 Fos 발현을 유도하는 효과적인 자극임을 보고하여[12] 저자들도 본 실험에 capsaicin을 이용하였다. 또한 capsaicin의 희석농도에 따라서 즉, Cutrer등[12]이 30.5 μg/ml 이상의 농도에서 Fos발현이 현저하게 증가함을 보고하여, 저자들은 61 μg/ml로 희석하여 사용하였다.

Fos는 신경조직에서 여러 가지 자극, 즉 수용체를 자극하는 여러 약물들에 의한 신경회로의 활성화[13], 성장인자들[3], 칼슘 ionophores[14], 외상[15], 허혈성 손상[16], 흥분성 독작용에 의한 손상(excitotoxic insult)[17] 등에 의하여 일시적으로 급속히 발현된다. 현재까지 알려진 Fos 발현의 의의는 아직까지 불분명하지만 신경회로의 활성화나 신경세포의 가소성(neural plasticity) 등 일련의 과정에서 자극-반응 coupling에 관여하는 비특이적인 역할(third messenger)을 한다고 생각된다. 최근 Fos의 발현이 신경세포의 기능적 활성화의 지표로 이용될 수 있다는 보고가 있었다[6,18]. 즉, 체감각계에서는 흰쥐의 뒷발을 자극한 뒤 요천추부위 척수에서 Fos 발현을 확인하였으며, 자극부위와 종류에 따라 종전의 미세전극기록연구의 결과에 일치하는 분포를 보였고[13], 흰쥐의 안면에 여러 가지 유해성 자극을 가했을 때 연수와 상부경수의 배측각에서 체성순서적(somatotopic)인 Fos 발현이 관찰되었다[11]. 따라서 중추신경계에서 Fos 발현기법은 그동안 신경세포 활성 분포의 연구에 이용되어온 미세전극기법의 단점인 sampling의 한계를 보완하여 기능적으로 규명된 신경세포집단의 공간적인 분포의 개요를 제공한다는 점에서 이용가치가 크다고 할 수 있다. 그러나 Fos 발현은 여러 비특이적인 자극에 의해 영향을 받을 수 있으며, 신경전달로에서 활성화된 신경세포의 정확한 기능은 알 수 없는 제한점도 있다.

경막과 Willis환 혈관에는 삼차신경절분지와 상부경수의 후근신경절(dorsal root ganglia)로부터 나온 가는 무수신경섬유가 분포하고 있고[2,19], 미측삼차신경핵의 제 I, II층에는 삼차신경 수용야로 들어오는 침해수용성 정보를 전달하는 것으로 알려진 일차 구심성 신경섬유와 상부중추로 통증정보를 전달하는 2차 구심성 신경섬유를 갖는 신경세포의 시냅스가 있다[20]. 뇌조 안으로 capsaicin을 주입하면 무수신경섬유가 자극되어 상부로 자극을 전달하여 삼차신경계 신경세포의 활성화로 인해 일차 시냅스인 미측삼차신경핵의 제 I, II층에서 Fos가 발현되는데 이는 본 실험에서 증명할 수 있었고, 여러 가지 자극으로 삼차신경말단이 분포된 부위를 자극한 다른 실험과도 일치하였다[11,21,22]. 실험적으로 미측삼차신경핵의 신경세포를 활성화하기 위해서는 삼차신경근이나 신경절 세포를 직접 자극하는 것 보다는 수막지배신경섬유를 활성화시키는 것이 더 중요한 것으로 보인다. 인위적으로 수막지배 삼차신경을 절단하였을 때 뇌조내 혈액주입 후에 미측삼차신경핵에서의 Fos 발현이 의의 있게 감소한 실험이 이를 뒷받침한다[21].

편두통이나 수막염에서 경막과 Willis환의 혈관에 분포한 삼차신경혈관섬유가 활성화되면 신경말단으로부터 경막혈관벽으로 substance P, bradykinin, neurokinin-1 (NK-1), calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y 등의 물질이 분비되어 신경인성 염증반응을 일으키고[23] 이는 혈관벽을 확장시켜 혈관 내 혈장의 혈관외유출(extravasation)을 조장하며, 한편으로는 이러한 침해수용성 정보를 삼차신경핵에 전달하여 혈관성 두통을 일으키고 주변의 화학적 변화에 민감한 최후야와 연수자

율신경중추의 하나인 고립로핵 등에도 전달되어 오심, 구토와 자율신경 증상 등을 일으킨다고 알려져 있다[21,24]. 본 실험에서 대조군과 capsaicin 주입군에서 최후야 및 고립로핵의 Fos 발현의 차이가 없었는데, 이는 실험과정에서 capsaicin에 의한 삼차신경 자극 외에 동물을 다루는 과정이나 마취약제 등에 의한 이차적인 영향으로 생각한다.

본 실험에서는 capsaicin에 의한 수막자극이 미측삼차신경핵 상부의 유해자극수용전달로의 Fos 발현에 미치는 영향을 알아보려 하였는데, 시상에서의 Fos 발현은 삼차신경 중추전달로에 속하는 내측복후측핵(ventroposterior, medial)에서는 관찰되지 않고, capsaicin 자극에 관계없이 대조군과 실험군 모두 제3뇌실에 인접한 시상의 정중선핵(midline nuclei)군에서만 관찰되었다. Bullitt[18]는 흰쥐의 사지말초 부위에 유해한 자극을 준 뒤 뇌간부터 대뇌피질까지 Fos 발현을 관찰하였는데, 그 중 시상에서는 양측 수판내핵(intralaminar nuclei)군과 정중선핵군이 주로 발현되고, 외측복후측핵(ventroposterior nucleus, lateral)은 반대편에서 약하게 발현된다고 보고하였고. 이는 기존의 전기생리학적 연구결과와 차이를 보이며, 시상핵 부위에 따라 신경세포의 탈분극이 Fos의 발현에 영향을 덜 미칠 수 있으며, 유해자극에 의한 2차적인 자율신경계의 영향이나 스트레스 반응도 고려해야 한다고 설명하였다. 본 실험결과에서도 urethane 마취에 의한 자율신경계의 영향[25], 실험조작시의 비특이적 자극 등 다른 원인에 의해 시상의 정중선핵군이 활성화되었을 가능성이 있으며, 삼차신경전달로의 2차 시냅스인 시상핵의 효과적인 자극을 위해서는 capsaicin 자극의 강도 및 시간 그리고 마취의 깊이도 고려해야 할 것으로 보인다.

경막외 capsaicin 주입군은 미측삼차신경핵에서 Fos 발현이 대조내 capsaicin 주입군에 비해 현저하게 적었는데, 경막 위에 capsaicin을 점적 주입한 방법은 지주막하강으로 직접 들어가지 못하고, 자극부위가 국한되어 있어 경막신경섬유말단을 효과적으로 자극하지 못한 것으로 보이며, capsaicin 농도와 자극시간도 영향을 미칠 것으로 보인다. 따라서 capsaicin에 의한 경막외 자극은 효과적인 실험모델이 되지 못할 것으로 생각된다.

환추후두막을 뚫고 가는 카테테르를 대조안으로 집어 넣는 조작이 미측삼차신경핵에서의 Fos 발현에 영향을 주지 않도록 하기 위하여 카테테르 삽입 6시간 후에 capsaicin을 주입하는 방법이 이론적으로 맞고 이전의 다른 실험에서도 이 방법을 사용하였다. 저자들이 예비실험에서 카테테르 삽입 1시간 이내 또는 6시간 후에 capsaicin을 주입한 결과 미측삼차신경핵의 Fos 발현세포수에는 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 향후 이러한 실험을 할 경우에는 카테테르 삽입 후 capsaicin을 바로 주입해도 될 것으로 생각된다.

결론적으로 대조내 capsaicin 주입에 의해 상부경수 및 연수의 미측삼차신경핵에서는 Fos 발현이 현저히 증가하여 이를 삼차신경 활성화와 관련된 두통의 실험동물모델의 지표로 이용할 수 있으나, 시상핵 부위는 비특이적 반응으로 생각된다. 향후 이 실험모델을 보완하여 약제개발 및 병태생리학적 기전연구에 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1) Strassman A, Mason P, Moskowitz M, Maciewicz R: Response of brainstem trigeminal neurons to electrical stimulation of the dura. Brain Res 1986; 379: 242-50.
2) Mayberg MR, Zervas NT, Moskowitz MA: Trigeminal projections to supratentorial pial & dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. J Comp Neurol 1984; 223: 46-56.
3) Curran T, Morgan JI: Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. Science 1985; 229: 1265-8.
4) Curran T, Franza BR Jr: Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell 1988; 55: 395-7.
5) Schilling K, Curran T, Morgan JI: The excitement of immediate-early genes. Ann NY Acad Sci 1991; 627: 115-123.
6) Morgan JI, Curran T: Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. Annu Rev Neurosci 1991; 14: 421-51.
7) Olesen J, Moskowitz MA: Experimental headache models. Philadelphia, Lippincott-Raven. 1995, pp63-73.
8) Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hoekfelt T: Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter characterized neurons after stress. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9569-73.
9) Pelto-Huikko M, Dagerlind U, Ceccatelli S, Hoekfelt T: The immediately-early genes c-fos and c-jun are

differentially expressed in the rat adrenal gland after capsaicin treatment. Neurosci Lett 1991; 126: 163-6.
10) Bevan S, Szolcsanyi J: Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 330-3.
11) Strassman AM, Vos BP: Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. J Comp Neurol 1993; 331: 495-516.
12) Cutrer FM, Moussaoui S, Garret C, Moskowitz MA: The non-peptide neurokinin-1 antagonist, RPR 100 893, decreases c-fos expression in trigeminal nucleus caudalis following noxious chemical meningeal stimulation. Neuroscience 1995; 64: 741-50.
13) Hunt SP, Pini A, Evan G: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature 1987; 328: 632-4.
14) Morgan JI, Curran T: Role of ion flux in the control of c-fos expression. Nature 1986; 322: 552-5.
15) Sharp FR, Gonzalez MF, Hianaga K, Mobley WC, Sagar SM: Induction of the c-fos gene product in rat forebrain following cortical lesions and NGF injections. Neurosci Lett 1989; 100: 117-22.
16) Jorgersen MB, Deckert J, Wright DC, Gehlert DR: Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study. Brain Res 1989; 484: 393-8.
17) Le Gal La Salle G: Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. Neurosci Lett 1988; 88: 127-30.
18) Bullitt E: Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol 1990; 296: 517-30.
19) Keller JT, Saunders MC, Beduk A, Jollis JG: Innervation of the posterior fossa dura of the cat. Brain Res Bull 1985; 14: 97-102.
20) Menetrey D, Basbaum AI: Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. J Comp Neurol 1987; 255: 439-50.
21) Nozaki K, Boccalini P, Moskowitz MA: Expression of c-fos-like immunoreactivity in brainstem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. Neuroscience 1992; 49: 669-80.
22) Cutrer FM, Schoenfeld D, Limmroth V, Panahian N, Moskowitz MA: Suppression by the sumatriptan analogue, CP-122, 288 of c-fos immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis induced by intracisternal capsaicin. Br J Pharmacol 1995; 114: 987-92.
23) Edvinsson LR, Ekman R, Jarsen I: Peptide-containing nerve fibers in human cerebral arteries: Immunochemistry, radioimmunoassay, and in vitro pharmacology. Ann Neurol 1987; 21: 431-7.
24) Coil JD, Norgren R: Taste aversions conditioned with intravenous copper sulphate: attenuation by ablation of the area postrema. Brain Res 1981; 212: 425-33.
25) Maggi CA, Meli A: Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. Experientia 1986; 42: 109-14.