

하악신경 절삭이 삼차신경절 신경세포와 연수후각 소교세포 활성화에 미치는 영향

임요한 · 최목균

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:227-237)

EFFECTS OF MANDIBULAR NERVE TRANSECTION ON TRIGEMINAL GANGLION NEURONS AND THE ACTIVATION OF MICROGLIAL CELLS IN THE MEDULLARY DORSAL HORN

Yo-Han Lim, Mok-Kyun Choie

Department of Dentistry, College of Medicine, Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Microglial cell activation is known to contribute to neuropathic pain following spinal sensory nerve injuries. In this study, I investigated its mechanisms in the case of trigeminal sensory nerve injuries by which microglial cell and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) activation in the medullary dorsal horn (MDH) would contribute to the facial pain hypersensitivity following mandibular nerve transection (MNT). And also investigated the changes of trigeminal ganglion neurons and ERK, p38 MAPK manifestations.

Activation of microglial cells was monitored at 1, 3, 7, 14, 28 and 60 day using immunohistochemical analyses. Microglial cell activation was primarily observed in the superficial laminae of the MDH. Microglial cell activation was initiated at postoperative 1 day, maximal at 3 day, maintained until 14 day and gradually reduced and returned to the basal level by 60 days after MNT. Pain hypersensitivity was also initiated and attenuated almost in parallel with microglial cell activation pattern. To investigate the contribution of the microglial cell activation to the pain hypersensitivity, minocycline, an inhibitor of microglial cell activation by means of p38 MAPK inhibition, was administered. Minocycline dose-dependently attenuated the development of the pain hypersensitivity in parallel with inhibition of microglial cell and p38 MAPK activation following MNT.

Mandibular nerve transection induced the activation of ERK, but did not p38 MAPK in the trigeminal ganglion.

These results suggest that microglial cell activation in the MDH and p38 MAPK activation in the hyperactive microglial cells play an important role in the development of facial neuropathic pain following MNT. The results also suggest that ERK activation in the trigeminal ganglion contributes microglial cell activation and facial neuropathic pain.

Key words: Mandibular nerve, Medullary dorsal horn, Microglial cell, Trigeminal ganglion, p38 MAPK, ERK

I. 서 론

두개안면 영역에서 안면골 골절 등의 외상, 악골 및 연조직의 낭종이나 종양의 적출, 매복치 발거 등의 외과적인 수술로 인하여 하치조신경 (inferior alveolar nerve), 이신경 (mental nerve), 설신경 (lingual nerve) 또는 안면신경 (facial nerve) 등이 손상을 받는 경우 신경병증성 통증이 발생할 수 있다. 이 중 치아와 하순을 지배하는 감각신경인 하치조신경과 이신경이 손상을 받을 경우, 감각마비, 감각이상, 작열감이나 통증이 유발될 수 있

다. Sweet¹⁾에 의하면 신경손상에 의한 신경병증성 통증 (neuropathic pain)이나 이질통증 (allodynia)과 같은 통증은 척수보다 삼차신경계에 훨씬 더 많이 발생하며, Fields²⁾는 특히 삼차신경계에서의 이와 같은 병적인 통증은 치료와 관련되어 나타나는 경우도 있으며, 삼차신경의 손상과 깊이 연관되어 있다고 보고한 바 있다.

최근에 이런 신경병증성 통증에 있어서, 통증신호를 직접적으로 중추로 전달하는 신경세포 외에도 아교세포 (glial cell)의 활성화가 중요한 역할을 한다는 여러가지 증거들이 보고되고 있다^{3,4)}. Garrison 등⁵⁾은 좌골신경 (sciatic nerve)의 손상으로 신경병증성 통증이 야기되는 경우, 척수후각 (spinal dorsal horn)의 소교세포 (microglial cell)가 활성화된다는 사실을 면역조직화적인 방법으로 최초로 보고하였다. 또한 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 수용체 길항제인 MK-801을 투여한 경우에 신경손상에 의해서 유발되었던 통증과민반응이 사라졌을 뿐만 아니라 소교세포 활성화도 차단된다고 하여⁶⁾, 적어도 척수 부위

임요한

137-701 서울특별시 서초구 반포동 505

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실

Yo-Han Lim

Dept. of Dentistry, College of Medicine, Catholic University of Korea

Banpo-dong 505, Seocho-gu, Seoul, 137-701, Korea

Tel: 82-2-529-2885 Fax: 82-2-2187-7008

E-mail: drjohn@empal.com

에서 척수후각 소교세포의 활성화가, 신경손상에 의해서 유발되는 신경병증성 통증의 발생과 밀접하게 관련되어 있을 가능성을 제기하였다. 그 후 이와 같은 소교세포 활성화는 말초신경절단, 결찰이나 좌상, 화학적인 자극과 같은 다양한 종류의 말초신경 손상에 의해서 유발될 수 있음이 보고되었다^{6,8,9}. 그리고 이렇게 활성화된 소교세포가 통증과민반응을 유발하는 과정에서 P2X₄ receptor와 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등을 필요로 한다는 것이 밝혀지고 있다¹⁰⁻¹³. 한편 minocycline은 소교세포 p38 MAPK의 인산화를 억제하여 신경 보호 작용을 가지고 있다는 사실이 파킨슨병 모델¹⁴과 glutamate/NMDA를 투여한 실험에서 보고된 바 있다^{15,16}.

최근에 말초신경의 손상에 의해 어떻게 소교세포가 활성화되는지에 대한 여러가지 가능성들이 제기되고 있다. 말초신경에 의해 소교세포가 활성화되는 기전으로는, 첫째, 말초신경 손상으로 인해 말초신경 중추단으로부터 신경전달물질 (neurotransmitter)이 과도하게 분비되는 데에 따른 영향, 둘째, 중추단의 퇴행성 변화 (degenerative change)에 의한 영향, 셋째, 척수후각 개재신경세포 (spinal dorsal root interneuron)들의 활성화에 따른 여러 신경매개물질 (intermediary)들의 분비에 의한 영향, 넷째, 척수후각 개재신경 사멸에 의한 영향 등을 들 수 있다^{13,17}.

본 연구에서는 먼저 하악신경 (mandibular nerve)을 절삭한 후, 연수후각 (medullary dorsal horn)에서의 소교세포 활성화와 통증과민반응의 발생여부 및 시간에 따른 변화와, 양자 사이의 관계를 관찰하였다. 그리고 소교세포의 활성화가 통증과민반응에 직접적으로 관여하는지 알아보고자, 소교세포 p38 MAPK의 인산화를 억제하여 결과적으로 소교세포 활성화를 저하시키는 것으로 알려진 minocycline으로 소교세포 활성화를 억제하였을 때의 통증과민반응의 변화를 관찰하였다. 또한 연수후각 및 삼차신경절 신경세포에서, MAPK 중의 하나인 p38 MAPK 및 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)의 발현양상 및 활성화 여부를 관찰하여, 이것이 소교세포 활성화와 어떤 관계가 있는지 규명하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

(1) 동물

모든 동물실험 과정은 국제통증연구학회의 규범에 따라 행하여졌다¹⁸. 체중 180-200 g (수술시)의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 168 마리를, (1) 정상대조군 (normal control group, n=20), (2) 수술대조군 (sham operation group, n=35), (3) 생리식염수 투여 후, 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군 (mandibular nerve transection group, n=80), (4) minocycline 투여 후, 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군 (minocycline+mandibular nerve transection group, n=33)의 4 가지 군으로 나누어 실험하였다.

흰쥐는 온도 23±2°C, 12시간의 명암 사이클 (빛 노출은 08:00에서 20:00까지)하에 방치하였으며, 음식과 물은 자유로이 먹을 수 있도록 하였다. 흰쥐는 실험 전에 1주일 동안 사육시설에

서 적응할 수 있도록 하였으며, 가능한 한 스트레스 환경에 노출되지 않도록 하였다.

(2) 수술

흰쥐는 pentobarbital sodium (Hanlim Pharm., Yongin, Korea) 30 mg/kg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취하였다. 하악신경을 절삭하기 위하여 한쪽 고근 위의 피부를 절개하고, 하악골을 노출시킨 후, 하악신경 위의 골을 조심스럽게 제거하여 하악신경을 분리하였다. 노출된 하악신경을 3 mm 정도 절삭하고 고근을 재위치 시킨 후 피부를 봉합하였다. minocycline은 소교세포 p38 MAPK의 인산화를 억제하여 소교세포 활성화를 저하시키는 것으로 알려져 있는데, 소교세포 활성화를 억제한 경우에 신경절삭 후 나타나는 통증과민반응에 어떠한 변화가 생기는지 알아보기 위하여 투여하였다. 용량은 이전의 보고들^{19,23}에 근거하여 두 군으로 나누어 각각 15 mg/kg 과 30 mg/kg 을 복강 내 투여하였다. 생리식염수와 minocycline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 각각 신경을 절삭하기 한 시간 전에 복강 내로 투여하였고, 수술 후 14일까지 매일 같은 시간에 동일한 양을 투여하였다.

수술대조군은 실험군과 같은 쪽 하악신경을 노출시켰지만 절삭하지 않은 상태로 그대로 봉합하였다.

(3) 행동실험

통증과민반응의 발생여부와 정도, 변화를 관찰하기 위하여 각 군의 실험동물에 대하여 행동실험을 하였다. 행동실험은 수술 2일전, 그리고 수술 후 1, 3, 7, 14, 28 및 60일에, 온도 23±2°C, 습도 55±5%의 일정한 조건에서, 오전 9시에서 12시 사이에 시행하였다. 동물을 잘 관찰하기 위해서 흰쥐를 깔짚이 없는 플라스틱 사육통 (25×40×18 cm)에 옮기고, 30분간 적응하도록 하였다. 일련의 von Frey filaments를 이용하여 기계적 자극에 대한 통증반응을 결정하였다. von Frey filaments (bending force; 8.0 mg - 6.0 g)를 흰쥐의 수염 난 영역에 적용하였을 때, 각각을 동일 영역에 5초 간격으로 5번 적용하면서 흰쥐가 머리를 피하거나 얼굴을 긁거나 건드리는 경우를 통증반응으로 판단하였다. 각 von Frey filament에 대한 자극을 마친 후에는 5분간의 회복기를 주었다. 통증에 대한 역치는 5번의 자극에 대해 적어도 3번 이상의 통증반응을 나타내는 경우로 결정하였다. 신경절삭 전 통증반응의 역치를 관찰하여 기준값 (100%)으로 정하고, 신경절삭 후 1, 3, 7, 14, 28 및 60일에 통증반응의 역치를 다시 얻어, 기준값에 대한 상대값으로 환산하여 통증반응의 역치 변화를 분석하였다.

(4) 면역조직화학염색

각 군의 흰쥐를 수술 후 1, 3, 7, 14, 28 및 60일에 각각 희생시켰다. 희생시킨 흰쥐는 일차적으로 생리식염수로 심장관류를 시

행한 후, 고정액 (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 다시 한 번 심장관류를 하여 고정하였다. 이어서 두개골을 제거한 후 두개강저에 위치한 삼차신경절을 적출하고, 또한 연수후각을 포함하는 연수하부와 경수를 포함하는 부위를 하나의 블록으로 적출하여, 4°C 고정액에 밤새 보관하였다. 그 후 30% sucrose (in PBS)에 48시간 보관한 후 냉동시킨 다음, 냉동 절편을 30 µm 두께로 제작하여 면역조직화학염색을 하였다. 이후의 모든 과정은 대부분 상온에서 시행하였다. 우선 내재되어 있는 peroxidase 활성을 제거하기 위해 30분간 3% H₂O₂ (in 0.1 M PBS, pH 7.4)에 보관하였고, 5% NGS (normal goat/horse serum), 2% BSA (bovine serum albumin), 2% FBS (fetal bovine serum) 및 0.1% triton X-100으로 구성되어 있는 blocking solution에 2시간 보관하였다. 그리고 다음과 같이 면역조직화학염색을 하였다. 예비실험을 통하여 관찰한 결과, 소교세포의 활성화 척도로 사용한 OX-42의 경우, 그 염색 정도는 연수후각 심층부에서는 미약하였고, 표층부의 내측 1/3 부위에서 현저하게 나타났으며 (Fig. 1 좌측 맨 위), obex를 기준으로 하여 하방 2.4 mm에 해당하는 부위에서 소교세포 활성화가 가장 잘 관찰되었다. 그러므로 OX-42를 관찰하는 경우에는, 이 부위의 염색상을 분석에 이용하였다.

1) 신경절삭에 따른 연수후각의 소교세포 활성화 여부를 관찰하기 위하여, 정상대조군, 수술대조군, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서 다음과 같이 염색하였다. 연수후각부 조직절편을, 1차 항체인 rabbit anti-mouse anti-OX-42 (CD11b/c) (1:2,000; Cedarlane, Hornby, Canada)에 4°C로 하룻밤 처리하고 PBS로 세척한 후, 1:200배로 희석된 biotinylated 2차 항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 1시간 처리하였으며, 이어 1:200배로 희석된 ABC (avidin and biotinylated HRP complex) solution (Vector Laboratories)에 1시간 보관한 후, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; D-5637; Sigma-Aldrich)으로 발색시켰다.

2) 신경절삭과 minocycline 투여에 따른 연수후각 소교세포와 소교세포 p38 MAPK의 활성화의 변화를 관찰하기 위하여, 수술대조군, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군, minocycline 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서 다음과 같이 형광염색을 하였다. 비교를 위하여 하악신경을 절삭한 두 군에서는 신경절삭을 한 반대측도 염색하였다. 연수후각부 조직절편에, p-p38 MAPK와 소교세포를 관찰하기 위하여 각각에 대한 1차 항체를 단독으로 적용하였고, p-p38 MAPK가 소교세포에 있는 것임을 관찰하기 위하여 이중염색을 하는 경우에는 두개를 동시에 4°C에서 하룻밤 처리하였다. 사용한 1차 항체는 rabbit anti-p-p38 MAPK antibody (1:500; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 mouse anti-OX-42 antibody (1:1,000)이다. 그 후 2차 항체인 TRITC- 와/또는 FITC-conjugated rabbit/mouse IgG antibody (1:200; Jackson ImmunoResearch,

WestGrove, PA, USA)로 실온에서 1시간 동안 처리하였으며, VectaShield (Vector Laboratories)로 조직표본을 제작하였다.

3) 신경절삭 후 삼차신경절 신경세포에서의 ERK와 p38 MAPK의 활성화 여부를 관찰하기 위하여, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서 다음과 같이 삼차신경절 조직절편을 염색하였다. 비교를 위하여 신경절삭을 한 반대측도 염색하였다. 삼차신경절에는 안신경, 상악신경, 하악신경의 신경세포가 있는데, 이중 상악신경과 하악신경의 신경세포를 대상으로 하였다. 삼차신경절을 cresyl violet으로 염색하여 상악신경의 신경세포와 하악신경의 신경세포의 위치를 확인한 후 (Fig. 5A), 해당 부위의 조직절편을 염색하였다. 먼저 하악신경을 절삭한 측에서, 신경절삭 후 손상을 받은 신경세포와 받지 않은 신경세포를 구별하기 위하여 신경손상표지자인 ATF3 (activating transcription factor 3)로 염색하였고, 이 두 신경세포군에서 ERK, p38 MAPK의 활성화 여부를 알아보기 위하여 p-ERK, p-p38 MAPK 각각에 대한 항체로 염색하였다. 반대측 삼차신경절 신경세포는 대조군으로 삼았다. 1차 항체로 각각 ATF3 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-ERK1/2 (1:400; Cell Signaling Technology), p-p38 MAPK (1:400; Cell Signaling Technology)를, 2차 항체로는 AB enzyme reagent (ABC kit, Vector Laboratories)를 사용하여 염색하였다. 염색을 마친 조직절편은 젤라틴으로 처리된 유리 슬라이드에 올려놓고 일련의 ethanol로 탈수시킨 후 permount를 이용하여 조직표본을 제작하였다.

(5) 결과분석

연수후각부 조직절편에서 소교세포 활성화 여부는 실험조건을 모르는 실험자가 평가하였다. 활성화 정도의 평가는 기존의 보고²⁰⁾를 참고로 하였는데, 소교세포의 모양, 단위면적당 소교세포의 밀도, OX-42의 염색강도로 평가하였다. 조직절편에서 면역조직화학염색으로 얻어진 자료는 광학현미경하에서 이미지시스템 (KAPPA ImageBase DX 30, KAPPA opto-electronic Inc., Huizen, Netherlands)으로 컴퓨터에 저장하였다.

p-p38 MAPK와 OX-42의 형광염색은 공초점레이저현미경 (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 분석하였으며, 염색정도를 정량화하기 위하여, 수술 후 3일째 obex 기준으로 하방 2.4 mm 에서 연수후각의 내측 표층부의 0.5 mm² 지점의 평균 pixel 강도를 관찰하였다. 삼차신경절 조직절편의 염색에서는 ATF3, p-ERK, p-p38 MAPK의 발현 여부를 관찰하였다.

모든 군에서 조직에 따른 변이정도를 최소화하기 위해 동일 조건하에서 염색을 시행하였으며, 해부학적인 변이를 최소화하기 위해 연수후각과 1번 경수 사이의 동일 영역에서의 염색상을 비교하였다.

(6) 통계처리

모든 결과는 평균 ± S.E.M 값을 표시하였다. unpaired Student's t-test를 이용하여 얻어진 결과 사이의 차이를 비교하였으며, P 값이 0.05 보다 작은 경우를 유의한 차이가 있다고 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

(1) 하악신경 절삭 후 연수후각 소교세포의 활성화

하악신경을 절삭한 후 1, 3, 7, 14, 28 및 60일에 연수후각에 존재하는 소교세포의 활성화 정도를 OX-42 (CD11b/c)에 대한 항체를 이용한 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 먼저 정상대조군과 수술대조군에서 연수후각부 소교세포를 각각 관

찰하였을 때, 작은 세포체를 중심으로 가늘고 긴 가지가 사방으로 뻗은 모양이 보이며, 전반적으로 염색 정도는 약하고 균일한 정도로 관찰되었다 (Fig. 1A). 이를 통하여 신경손상이 없는 경우에는 소교세포가 거의 활성화되지 않고 안정 상태에 있음을 관찰하였다. 하지만 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서는 소교세포의 염색 정도가 크게 증가되었고, 정상대조군이나 수술대조군에 비해 세포체가 커지고 보다 굵은 가지 모양을 보였으며 그 수도 증가하여, 소교세포가 활성화된 상태를 보였다.

시간의 경과에 따른 소교세포 활성화 정도를 비교 관찰하였을 때, 신경절삭 후 1일에서 다소 증가하였고 (Fig. 1B), 3일에 현저하게 증가하여 최고조에 다다른 후 7일까지 이어졌다 (Fig. 1C, D). 하지만 14일과 28일에서는 소교세포의 활성화가 감소되었고 (Fig. 1E, F), 60일에는 현저히 감소하여 (Fig. 1G) 정상대조군과 유사한 정도의 염색상이 관찰되었다.

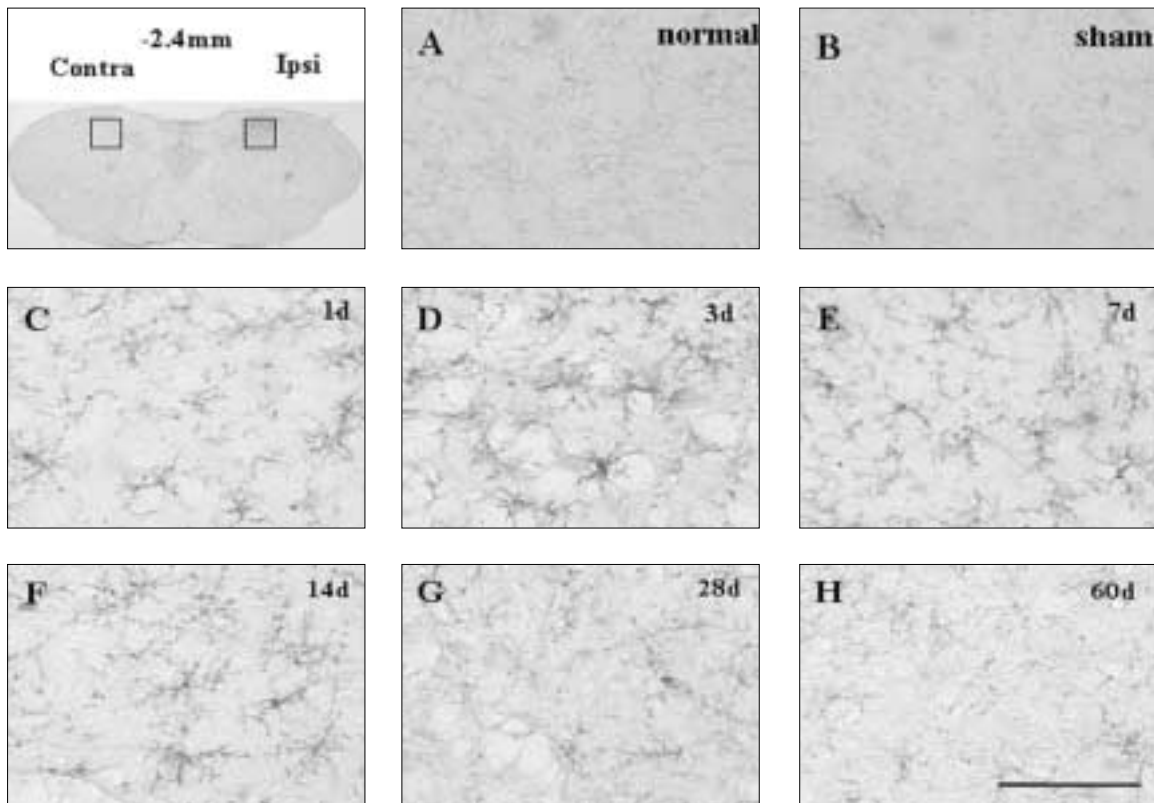


Fig. 1. OX-42 is immunoreactive in the superficial laminae of the MDH following mandibular nerve transection (MNT) at the level of 2.4 mm caudal to obex. A~H show the magnified images of the inset indicated in the left top panel. A, Normal control group; B, Sham operation group at 3 days after surgery; C~H, MNT group at 1, 3, 7, 14, 28, and 60 days after surgery, respectively.

OX-42 immunoreactivity (IR) was intense at postoperative 3 day (D) and 7 day (E) with many hypertrophic microglial cells, and moderate at postoperative 14 day (F). OX-42 immunoreactivity (IR) was mild with several less ramified microglial cells at postoperative 1 day (C) and 28 day (G) after MNT. At postoperative 60 day (H), OX-42 IR was very mild, which was comparable to that of normal control (A) and sham operation group (B). Scale bar : 100 μm.

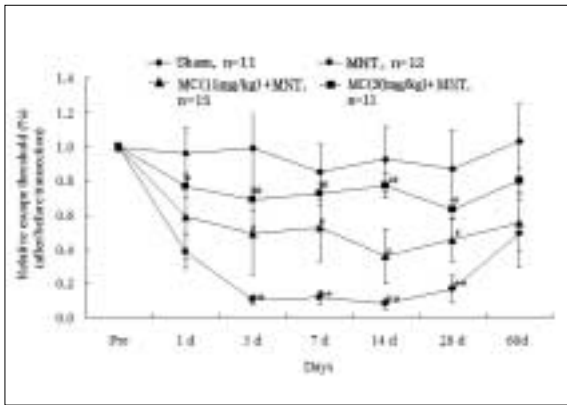


Fig. 2. Effects of mandibular nerve transection (MNT) on pain hypersensitivity in response to the mechanical stimulation in the whisker pad area. Sham, sham operation group; MNT, mandibular nerve transection group; MC+MNT, minocycline +mandibular nerve transection group. The decrease of escape threshold to the application of von Frey filaments was significant in the MNT group at 1~28 days after surgery. The decrease of escape threshold was significantly prevented in the MC+MNT group at 1~28 days after surgery (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. preoperative value (Pre)), (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; MC+MNT vs. MNT).

(2) 하악신경 절삭에 의한 통증과민반응

통증과민반응의 발생여부와 정도 및 변화를 관찰하기 위하여 수술 2일전, 그리고 수술 후 1, 3, 7, 14, 28 및 60일에 행동실험을 시행하였다. 수술대조군에서는 수술 후 통증반응 역치가, 시간이 경과한 후에도 수술 전과 비슷한 값을 보였다. 그러나 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서는, 기계적인 자극을 가했을 때 1일에서부터 역치가 유의하게 감소한 후 28일까지 감소상태가 계속되었다가, 그 후 차츰 증가하여 60일에 이르러 역치가 거의 정상 수준에 이르렀다(Fig. 2). 이를 통하여 하악신경 절삭으로 인하여 통증과민반응이 발생하였음을 관찰할 수 있었다. 그리고 신경절삭에 의한 통증과민반응의 발생 시기 및 정도와 변화의 추이가, 소교세포 활성화의 그것과 시간적으로 거의 일치하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2).

(3) minocycline의 하악신경 절삭 후 통증과민반응에 대한 영향

minocycline의 투여에 의하여 소교세포 활성화가 억제된 경우, 하악신경 절삭 후 나타나는 통증과민반응에 어떠한 변화가 생기는지를 행동실험을 통하여 관찰하였다. minocycline은 신경절삭에 의한 통증과민반응을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2). minocycline 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서, minocycline 30 mg/kg을 투여한 군의 경우, 수술 후 1일의

통증반응의 역치는 수술 전 역치의 76% 수준에 달해, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군(수술 전의 39% 수준)에 비해 역치가 거의 두 배 증가하였다. 이와 같은 역치의 증가현상은 수술 후 28일까지 관찰되다가, 60일에는 정상수준으로 회복되는 양상을 보였다($P < 0.01$). minocycline을 15 mg/kg 투여한 경우에도, 역치의 증가 폭은 30 mg/kg을 투여한 경우에 비하여 작았으나, 시간의 경과에 따른 변화는 유사한 양상을 보였다($P < 0.05$). 이를 통하여 소교세포 활성화가 통증과민반응의 발생 여부와 정도 및 변화에 직접적으로 관련이 있음을 관찰할 수 있었다.

(4) 하악신경 절삭 후 minocycline 투여에 의한 연수후각 소교 세포 p38 MAPK 활성화의 변화

신경절삭과 minocycline 투여에 따른 연수후각 소교세포 활성화의 변화와 소교세포 p38 MAPK 활성화의 변화를 관찰하기 위하여 형광염색을 하였다. 1차 항체를 처리하지 않은 경우에는 형광염색이 관찰되지 않아, 항체가 특이적으로 작용하고 있음을 관찰하였다. 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서 소교세포 활성화의 표식자인 OX-42와 소교세포 p-p38 MAPK는, 신경절삭을 하지 않은 반대측에서는 염색 정도가 미약하였으나(Fig. 3A, B), 신경절삭을 했던 측에서는 증가하였다(Fig. 3D, E). 그리고 OX-42와 p-p38 MAPK를 이중 염색한 결과, p-p38 MAPK 형광염색을 보이는 세포는 소교세포임을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C, F, I). 소교세포가 최고의 활성을 보이고, minocycline에 의한 통증과민반응 억제가 가장 큰 수술 후 3일에, minocycline 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서 염색상을 관찰한 결과, p38 MAPK의 인산화와 소교세포의 활성화가 minocycline에 의해 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3G~I).

p-p38 MAPK와 OX-42의 염색정도를 정량적으로 분석한 결과, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서는, 수술대조군이나 신경절삭을 하지 않은 반대측에 비해 염색정도가 유의하게 증가하였음을 관찰하였다. 그리고 minocycline 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에서는, 생리식염수 투여 후 한쪽 하악신경을 절삭한 실험군에 비해 염색정도가 유의하게 감소하였음을 관찰하였다.

(5) 하악신경 절삭 후 삼차신경절 신경세포 MAPK의 변화

하악신경을 절삭한 후 삼차신경절에서 손상 받은 신경세포를 관찰하기 위하여, 먼저 신경손상표식자인 ATF3의 염색정도를 관찰하였다. ATF3는 신경절삭측 삼차신경절의 절삭된 하악신경세포에서는 관찰되었으나, 신경절삭측이라고 하더라도 절삭되지 않은 상악신경세포에서는 관찰되지 않았다. 그리고 하악신경절삭을 하지 않은 반대측 삼차신경절에서도 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이 결과를 근거로 하여, 절삭된 하악신

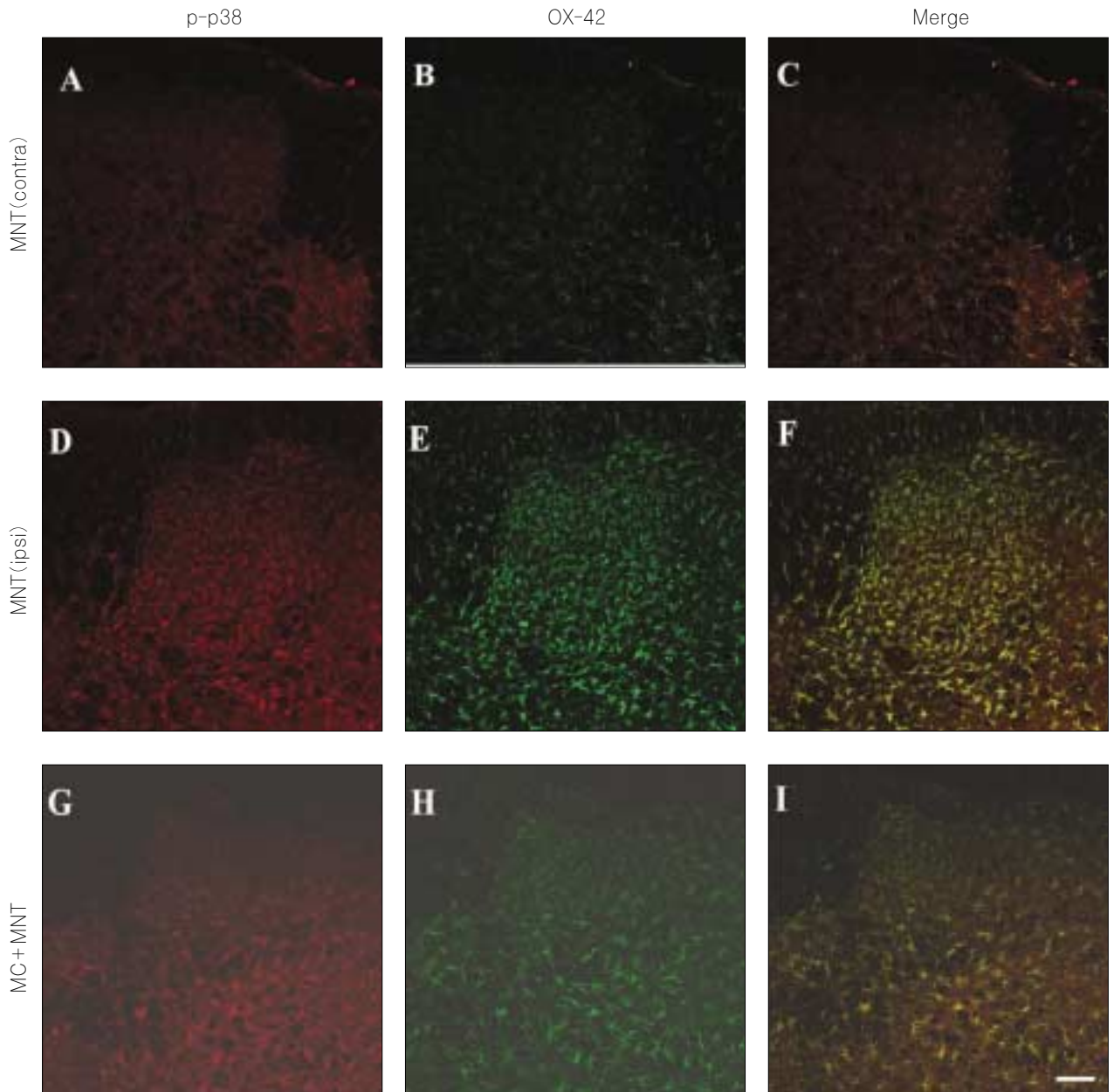
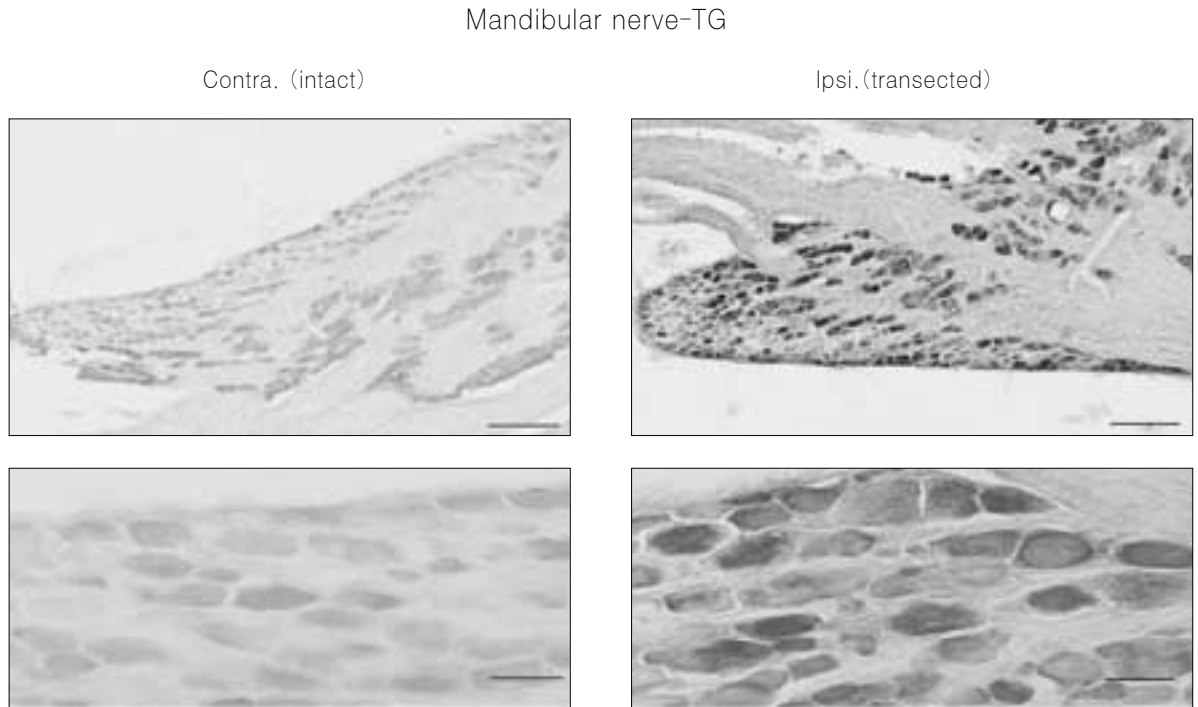


Fig. 3. p-p38 MAPK and OX-42 immunoreactivity (IR) in the medial portion of the superficial laminae of the medullary dorsal horn (MDH) 3 days after mandibular nerve transection (MNT) at the level of 2.4 mm caudal to obex. While p-p38 MAPK IR (red) and OX-42 IR (green) of the ipsilateral side of MNT were increased (D, E) being compared to the contralateral side of MNT (A, B), they were reduced by minocycline (MC) treatment (30 mg/kg, G, H). A~C, Contralateral side to MNT group; D~F, MNT group; G~I, MNT side to MC+MNT group; A,D,G, p-p38 MAPK; B,E,H, OX-42; C,F,I, Merged images, Scale bar : 100 μ m

경이 중지하는 삼차신경절 신경세포를 손상 받은 신경세포로 간주하였고, 절삭되지 않은 하악신경이나 상악신경이 중지하는 삼차신경절 신경세포를 손상 받지 않은 신경세포로 간주하여, 이 두 신경세포군에서 ERK, p38 MAPK의 변화를 관찰하였다. p-ERK는 신경절삭을 하지 않은 반대측 삼차신경절에서는

발현되지 않았지만, 신경절삭측 삼차신경절에서는 손상을 받은 하악신경세포뿐만 아니라, 손상을 받지 않은 상악신경세포에서도 발현되었다 (Fig. 5). 반면에 p-p38 MAPK는 손상 받은 신경세포와 손상 받지 않은 신경세포 모두에서 거의 발현되지 않았다 (Fig. 6).



Maxillary nerve-TG (intact)

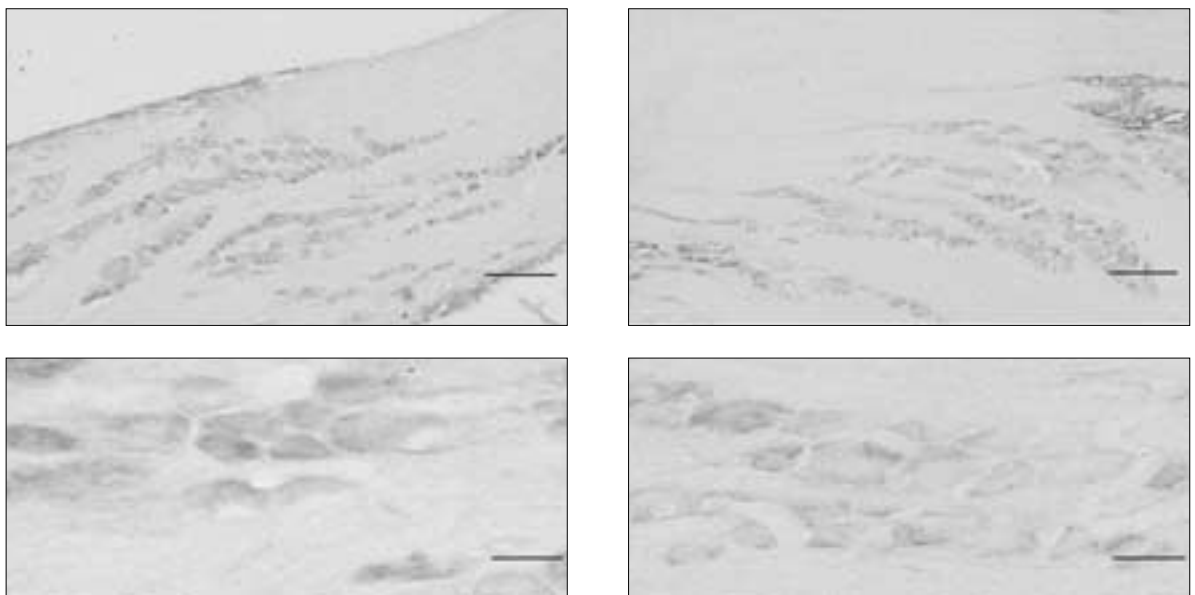
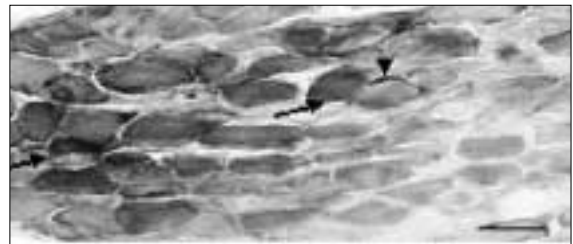
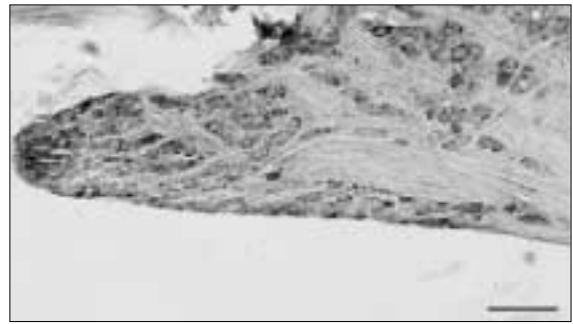


Fig. 4. ATF3 immunoreactivity (IR) in the trigeminal ganglion (TG) at 3 days after mandibular nerve transection. Increased ATF3 IR was clearly apparent in the ipsilateral transected mandibular nerve neurons.

Mandibular nerve-TG

Contra. (intact)

Ipsi. (transected)



Maxillary nerve-TG (intact)

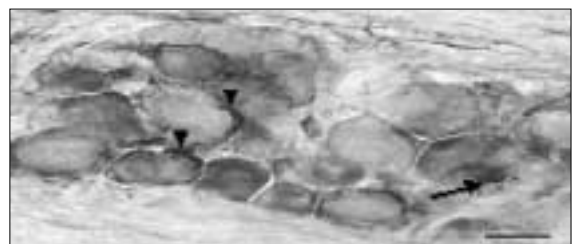
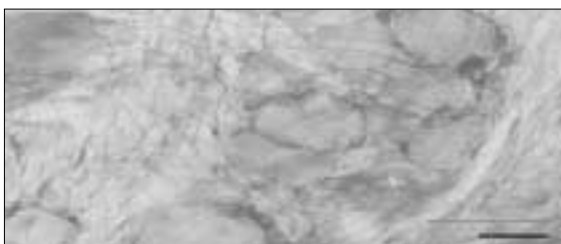
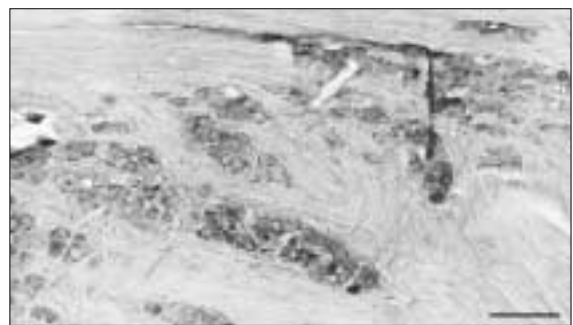
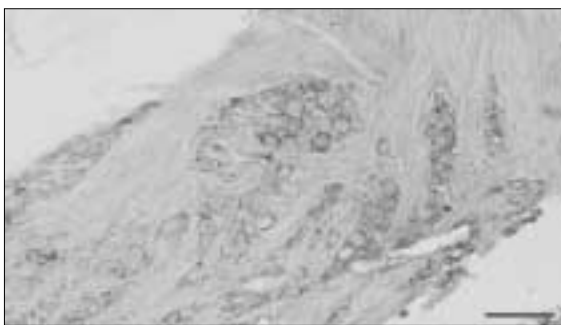
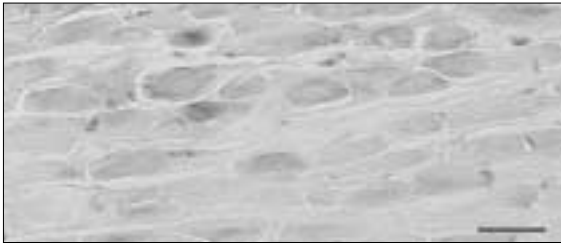


Fig. 5. p-ERK immunoreactivity in the trigeminal ganglion (TG) at 3 days after mandibular nerve transection. Increased p-ERK expressions in neurons (arrows) and surrounding satellite cells (arrow head) in the ipsilateral transected mandibular nerve side and the ipsilateral intact maxillary nerve side. Scale bar : 100 μ m.

Mandibular nerve-TG

Contra. (intact)

Ipsi. (transected)



Maxillary nerve-TG (intact)



Fig. 6. p-p38 immunoreactivity in the trigeminal ganglion (TG) at 3 days after mandibular nerve transection. There were no specific alterations of p-p38 MAPK expressions in all sides. Scale bar : 100 μ m.

IV. 고 찰

중추신경계에서 소교세포는 염증, 종양, 허혈 혹은 외상 등의 손상에 대해 처음으로 반응하는 세포로 알려져 있다²⁵. 또한 말초신경에 손상을 준 후에도 소교세포는 매우 빠르게 활성화되어 성상세포 (astrocyte), 개재신경세포 (interneuron) 등 인접세포에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다²⁶. 그리고 좌골신경을 손상시킨 동물 모델에서 활성화된 척수후각 소교세포가 통증과민화에 매우 중요하게 작용하는 것으로 생각되고 있으며¹⁷, 말초신경손상에 의한 소교세포의 활성화가 통증과민화의 필수적인 요인이 보고되고 있다²⁵. 하지만 안면 부위를 대상으로 한 신경병증성 통증 모델에서의 연구는 드문 실정이었다.

본 연구에서는 하악신경절삭 통증 모델에서 소교세포 표식자인 OX-42를 이용하여 연수후각에서 활성화된 소교세포를 관찰하였다. 좌골신경 손상 모델과 유사하게 소교세포의 활성화가 절삭 후 1일부터 관찰되기 시작하였다. 이후 3일에 최고조에 달한 후 7일까지 지속되다가, 14일부터 차츰 감소되기 시작하여 60일에는 현저히 감소하면서 거의 정상으로 돌아왔다 (Fig. 1). 또한 신경절삭 후 통증과민반응이 발생하였는데, 이것 역시 절삭 후 1일부터 시작되어 28일까지 지속되다가 감소하기 시작하여 60일에 회복되는 양상을 보였다. 이와 같이 연수후각 소교세포 활성화의 시기 및 진행 양상과 통증과민반응의 발생 및 진행 양상이 거의 일치하였다 (Fig. 1, 2). 그리고 소교세포의 활성화를 억제하는 minocycline을 투여한 경우에, 통증과민반응이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, 3). 이러한 결과들은 삼차신경이 지배하는 안면 영역에 있어서도, 말초신경 손상에 의해 유발되는 소교세포 활성화가 통증과민반응을 일으키는 중요한 인자임을 암시하고 있다.

활성화된 소교세포는 cytokines, chemokines, trophic factors 등 각종 bioactive diffusible factors를 방출하거나 contact factors를 활성화 시켜서, 1차 구심신경으로부터 glutamate 같은 신경전달물질의 유리를 증가시키거나 이들에 대한 수용기를 활성화시키는 것으로 알려지고 있다. 그리하여 통증을 전달하는 척수후각 신경세포의 흥분성에 영향을 주기도 하고, 통증을 억제하는 GABAergic, glycinergic 억제개재신경세포 (inhibitory interneuron)를 억제하기도 하면서, 통증과민화 현상에 관여하는 것으로 알려지고 있다^{34,13}. 이 연구에서 하악신경 절삭에 의해서도 연수후각 소교세포가 활성화되었고, 또 소교세포를 억제한 결과 통증과민반응이 현저하게 감소한 것으로 보아, 소교세포는 척수 부위에서 뿐만 아니라 안면 영역에서의 신경병증성 통증의 발생에도 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

최근에 소교세포는 신경병증성통증의 초기 발생에 중요하며, 신경병증성통증의 유지에는 다른 기전이 존재하리라는 보고가 있었다. 즉, 소교세포 활성화 억제제인 minocycline은 신경병증성 통증의 발생은 억제하였지만, 이미 발생한 신경병증성 통증을 억제하지는 못한다는 사실이 알려졌다^{10,22}.

이러한 모든 보고들은 소교세포의 활성화가 말초신경손상에 의한 단순한 반응이 아니라, 통증과민화에 관여하는 보다

중요한 역할을 하고 있음을 보여준다. 이와 관련하여 신경병증성 통증에 있어서 소교세포의 역할에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

삼차신경절 척수감각핵 미측소핵 (spinal sensory nucleus caudalis) 은 척수후각과 마찬가지로 층판 구조를 가지고, 기능적으로도 유사하여 연수후각이라고도 불리는데, 연수후각은 laminae I과 II를 포함하는 표층부와 laminae III와 IV를 포함하는 심층부로 나눈다. 활성화된 소교세포는 연수후각의 표층부에서 주로 관찰되었는데, 이 부위는 절삭된 하악신경의 중추단이 중지하는 부위에 해당한다. 그러므로 소교세포의 활성화 기전과 관련하여, 절삭된 신경의 중추말단에서 과도하게 분비되는 신경전달물질이나, 혹은 말초신경 손상에 의해 유발될 수 있는 삼차신경절 신경세포의 괴사 또는 사멸로 인한 중추말단의 퇴행성 변화가 연수후각 소교세포 활성화에 관여하는 것으로 가정할 수 있다^{4,13}. 최근 척수부위의 연구에서 chemokine의 하나인 fractalkine, ATP, 그리고 substance P 등이 소교세포를 활성화시킬 수 있는 물질로 보고된 바 있다^{11,27}. 이러한 보고들은 척수 부위와 마찬가지로, 이 실험에서 사용한 하악신경 절삭 모델에서도 위의 물질들이 소교세포를 활성화시킬 수 있는 가능성을 제기하고 있어서 이들에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

활성화된 소교세포에서 일어나는 세포내 신호전달과정 (signal transduction)에 대해서는 아직까지 많이 밝혀져 있지 않지만, 척수 부위에서는 p38 MAPK가 관여하는 것으로 보인다^{10,12}. 본 연구에서도 하악신경 절삭후 p38 MAPK의 활성화가 연수후각에서 관찰되는 것으로 보아, p38 MAPK의 활성화가 통증과민화에 중요한 요소일 것으로 생각된다 (Fig. 3).

하악신경 절삭 후 신경손상의 표식자로 알려져 있는 ATF3를 이용하여 염색을 한 결과, 손상 받은 신경세포와 손상 받지 않은 신경세포를 구분할 수 있었다 (Fig. 4). 하악신경을 절삭하였기 때문에 하악신경 말단이 중지하는 삼차신경절 신경세포들은 ATF3에 친하게 염색되었으나, 동측에 절삭되지 않은 상악신경이 중지하는 삼차신경절 신경세포들과 반대측 신경세포는 거의 염색이 되지 않았다. 한편 최근 연구에서, 다섯 번째 요추로 들어가는 후근을 절단한 후 네 번째 척수후근절 (spinal dorsal root ganglion)과 다섯 번째 척수후근절의 신경세포를 관찰하여 MAPK의 발현정도를 비교하였는데, 손상 받은 후근절에서는 ERK, p38 MAPK 등의 활성화가 관찰되었고, 손상 받지 않은 후근절에서는 p38 MAPK의 활성화가 관찰되었다²⁸. 그런데 본 연구에서는 척수에서의 연구보고와는 달리 ERK의 활성화는 관찰되었지만 (Fig. 5), p38 MAPK의 활성화는 관찰되지 않았다 (Fig. 6). 척수후근절 신경세포와 삼차신경절 신경세포가 말초신경 손상에 대해 달리 반응하는 이유는 분명하지 않다. 다만 손상 받은 삼차신경절 신경세포뿐만 아니라 손상 받지 않은 삼차신경절 신경세포에서도 ERK가 활성화되는 것으로 보아, 이러한 MAPK의 활성화가 삼차신경계에서의 신경병증성통증에도 중요하게 작용할 것으로 생각되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

이상과 같은 연구에서 다음의 사실들을 알 수 있었다. 첫째, 하악신경 절삭 후 연수후각의 표층부에서 p38 MAPK의 인산화가 일어나면서 소교세포가 활성화되었다. 둘째, 하악신경 절삭 후 실험동물에게 기계적인 자극을 가한 결과 통증과민반응이 나타났다. 셋째, Minocycline으로 신경절삭 후 나타나는 소교세포 p38 MAPK의 인산화를 억제하여 소교세포 활성화를 저하시킨 결과 통증과민반응이 줄어들었다. 넷째, 하악신경 절삭 후 ERK의 인산화는 관찰되었으나, p38 MAPK의 인산화는 관찰되지 않았다.

이상의 사실들은 연수후각 소교세포 활성화가 하악신경 절삭 후 통증과민반응의 발생과 변화에 매우 중요한 요소임을 보여준다. 그리고 삼차신경절 신경세포에서 ERK의 인산화는 신경절삭 후 나타나는 통증과민화반응의 발생에 관여하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Sweet WH: Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb, and herpes zoster. *Neurosurgery* 1984;15:928-932.
2. Fields HL: Treatment of trigeminal neuralgia. *N Engl J Med* 1996;334:1125-1126.
3. Watkins LR, Maier SF: Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 2002;82:981-1011.
4. Watkins LR, Maier SF: Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:973-985.
5. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR: ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 2005;114:149-159.
6. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM: Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 1991;565:1-7.
7. Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM: GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol* 1994;129:237-243.
8. Fu KY, Light AR, Matsushima GK, Maixner W: Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res* 1999;825:59-67.
9. Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CU, et al: Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 2001;436:182-201.
10. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR: p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 2003;23:4017-4022.
11. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka

- S, Salter MW, et al: P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003;424:778-783.
12. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 2004;45:89-95.
13. Tsuda M, Inoue K, Salter MW: Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia. *Trends Neurosci* 2005;28:101-107.
14. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al.: Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14669-14674.
15. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J: Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001;21:2580-2588.
16. Tikka TM, Koistinaho JE: Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001;166:7527-7533.
17. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF: Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 2001;24:450-455.
18. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.
19. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J: Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15769-15774.
20. Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, et al: Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 2002;22:1763-1771.
21. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, et al: Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002;417:74-78.
22. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA: Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:624-630.
23. Zhang SC, Goetz BD, Duncan ID: Suppression of activated microglia promotes survival and function of transplanted oligodendroglial progenitors. *Glia* 2003;41:191-198.
24. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF: Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 1997;79:163-175.
25. Kreutzberg GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312-318.
26. Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA: Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res* 1999;829:209-221.
27. Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR: Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int* 2004;45:389-395.
28. Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, et al: Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2004;24:10211-10222.