

백서 척수강내 이식한 부신수질 크로마핀 세포의 진통 효과

경북대학교 의과대학 마취과학교실, *의공학교실, †의학연구소

백운이 · 전영훈 · 문철원 · 한창규 · 김유미* · 임정옥†

= Abstract =

Analgesic Effect of Transplanted Adrenal Medullary Chromaffin Cells in Rats Spinal Cord

Woon Yi Baek, M.D., Young Hoon Jeon, M.D., Cheol Won Mun, M.D.
Chang Gyu Han, M.D., Yu Mi Kim*, and Jeong Ok Lim†

Departments of Anesthesiology, *Biomedical Engineering and †Medical Research Institute,
School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Background: Despite of numerous researches on the mechanisms and new therapeutic methods of chronic pain, patients are still suffering even with the help of opioids. In recent years, however, with the development of molecular-biology cell transplantation gives us a new chance for treating intractable chronic pain. The major purpose of the present study was to determine if the chromaffin cells have robust analgesic effects in the spinal atlanto-occipital subarachnoid space even without nicotine stimulation.

Methods: In order to determine whether cultured bovine adrenal medullary chromaffin cells transplanted in the spinal cord can produce analgesic effects, we purified adrenal medullary chromaffin cells and implanted them into the subarachnoid space of rats' (n = 10) spinal cord without immunosuppression, and investigated the hot sensitivity of rats' hind-paw by a light-beam test.

Results: It was found that compared with the control group, hot response latency of the group which received adrenal medullary chromaffin cells had increased at 14 days and the analgesic efficacy was maintained for at least 3 months.

Conclusions: Adrenal medullary chromaffin cells transplanted in the rats' spinal cord may provide a permanent and locally available source of neuropeptides for the relief of intractable pain. Furthermore, these kinds of analgesic effect even produced without any stimulation such as nicotine. (**Korean J Anesthesiol 2001; 41: 490~494**)

Key Words: Implantation: rats spinal cord. Pain: analgesic effects. Research: bovine adrenal medullary chromaffin cells.

논문접수일 : 2001년 8월 17일

책임저자 : 백운이, 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지, 경북대학교병원 마취과학교실, 우편번호: 700-721

Tel: 053-420-5863, Fax: 053-426-2760, E-mail: webaik@knu.ac.kr

서 론

현대의학에서 환자들이 병원을 찾는 주소 중 가장 많은 통증을 효과적으로 해결할 수 있는 방법에서 많은 제한을 받고있다. 지금까지 난치성 통증을 치료하기 위해 가장 보편적으로 이용되고 있는 마약성 진통제의 주사법이나 지주막하 혹은 경막외 투여에 의한 난치성 통증 치료 방법은 약제의 내성, 약제의 증량에 의한 전신적 부작용이나 경막외 도관 이식 시 감염 기회의 증가, 그리고 반복 투여에 따르는 불편성 때문에 만족스럽지 못한 경우가 많다. 이러한 통증은 신경병증성 통증으로 변해감으로써 더욱 곤란을 겪는 경우가 많다.

최근에 난치성 통증에 대처하기 위해 유전자 치료법,¹⁾ 약물을 서서히 투여하는 약물전달조절기법(control release system),^{2,3)} 특정 신경세포를 겨냥해 conjugating toxin을 투여해 수용체를 파괴하여 유해자극 인지 불능상태를 유도하는 저격 세포법(molecular murder),⁴⁾ 그리고 가장 가능성이 있는 새로운 접근 방법인 세포 이식 법 등이 등장하게 되었다. 세포이식 방법은 중추신경계의 통증 변조 영역에서 신경활성 물질을 지속적으로 방출시켜 통증을 완화시키는 새로운 개념의 치료법이다. 이 방법의 이점은 중추신경계의 통증 변조 지역 근처에서 신경활성 물질을 장기적이거나 영구적으로 분비하기 때문에 진통제의 반복 투여기회를 현저히 감소시키거나 배제할 수 있다는 것이다.

지난 10여 년간 많은 연구소에서 신경활성 물질을 이용하여 통증을 완화시키려는 새로운 치료법을 개발하기 위해 사람 및 동물에게 부신수질 chromaffin 세포를 척수강 내에 이식하여 통증을 감소시킨 연구 결과들을 보고하였다.^{5,6,8-11)} 본 연구에서는 난치성 통증치료에 개선된 부신수질 세포 이식 법을 이용할 수 있는지를 알기 위하여 소의 부신수질 chromaffin 세포를 배양하여 정상 흰쥐의 척수강 내에 이식하여 침해성 자극에 어떻게 반응하는지를 관찰하여 평가하였다.

대상 및 방법

실험은 경북대학교병원 동물실험 윤리위원회의 허

가를 얻어 진행하였으며 실험에는 쥐(Sprague-Dawley, 250-300 g) 20마리가 이용되었으며 모두 수컷이었다. 대조군은 7마리, sham수술군은 3마리, chromaffin 세포이식군은 10마리로 하였다.

소 부신수질 chromaffin세포 준비

소의 부신을 주위 결합조직과 함께 절제하여 50-80 ml의 Lock' solution으로 세척하였으며, 무균적 조작으로 불필요한 결합조직과 혈관을 제거한 후 노출된 부신의 바깥 면을 Lock' solution으로 다시 세척 후 50 ml의 digestion buffer (0.2% [w/v] collagenase in Lock' solution)에서 37°C로 20분간 배양하였다. 처리된 부신에서 피질 조직으로부터 수질조직을 분리하여 잘게 조각 낸 후 50 ml의 digestion buffer와 함께 진탕 용액기에 넣어 1시간 동안 37°C에서 다시 배양하였다. 분해된 조직은 폴리프로필렌 그물망(100 μ m in diameter)을 통해 여과시켰으며, 여과를 마친 세포부유액은 40 ml Lock' solution으로 약 5분 동안 원심분리 하였다. 상층액은 폐기하고 cell pellet은 다시 부유시켜서 5분 동안 다시 원심분리하였다. 마지막 원심분리 후 cell pellet은 DMEM/F12 + 10% FBS 배지에서 다시 부유시키고 5×10^6 cells/dish의 농도에서 5 ml의 조직배양용 접시에서 배양하였다. 조직배양용 접시는 4일 동안 humidified 0.5%의 CO₂ 환경에서 37°C로 배양하여 이용하였다.

Chromaffin세포이식

먼저 ketamine (20 mg/kg, ip)으로 쥐를 마취하여 면도 후 potadine으로 소독하여 환추 후두골(Occipito-atlant joint) 돌기에서 1-2 cm 정중절개 하였다. 근육을 박리하여 경막이 노출되면 chromaffin세포부유액(4 μ l, 50,000 cells/ μ l)을 Hamilton 주사기에 담아 지주막하에 주사하였다. 주사 후 근육과 피부를 봉합 후 회복시켰다.

행동검사

실험에 이용된 쥐들은 실험 전 7일 동안 하루 한 번씩 실험기구에 대한 적응 과정을 거쳤다. light beam이 자극기로 장착된 analgesiometer (IITC Life Instrument, Woodland Hills CA, USA)를 사용하였으며, 실험시 조사된 유리관의 온도는 평균 54-56°C였으며 쥐의 발바닥을 자극하여 반응시간을 측정하

었다. 대조군에 비해 5초 이상 회피반응이 없는 경우를 chromaffin세포에서 분비된 동통억제 물질에 의해 침해반응 억제효과가 있는 것으로 간주하였다. 이 온도에서 대조군에 비해 10초 이상 회피반응이 없는 경우는 쥐의 발바닥에 열손상을 줄 수 있기 때문에 인위적으로 검증을 중단하였다. 통증 반응에 대한 검정은 세포이식 전, 세포이식 후 3, 6, 9, 14, 20, 35, 45, 90일에 실시하였다.

모든 자료는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 세 군간의 시간에 따른 침해성 반응억제 효과 검정은 paired t-test와 repeated measure ANOVA를 사용하였으며 세 군간에 침해성 억제효과의 비교는 Mann-Whitney rank sum test를 하였다. 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

실험 전 7일간의 적응기간을 거치고 임의로 쥐들을 대조군($n = 7$), sham군($n = 3$), chromaffin세포이식군($n = 10$)으로 나누어 실험 전 각 군에 대한 반응시간을 측정하고 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 대조군과 sham군에서는 실험 후 3일부터 90일까지 통계적으로 유의한 변화가 없었으며 두 군간 비

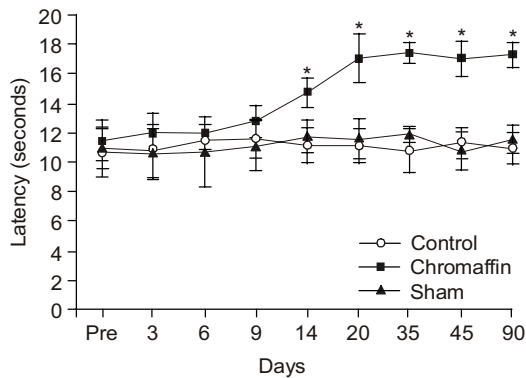


Fig. 1. Control group: not receive any procedure, chromaffin group: chromaffin cell was implanted in the subarchnoid space, sham group: saline was injected into subarchnoid space. The pain threshold was elevated significantly at 14 days after chromaffin cell implantation and the potent analgesia was observed for 3 months. * $P < 0.05$ compared with control group and sham group. Pre: pre-injection of chromaffin cell or normal saline.

교시에도 유의한 차이가 없었다. Chromaffin세포이식군에서는 세포이식 전부터 세포이식 후 3일, 6일, 9일 까지 각각 11.52 ± 1.37 , 11.98 ± 1.29 , 11.99 ± 1.07 , 12.81 ± 1.07 로 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 chromaffin세포이식 후 14일부터 반응시간이 14.77 ± 0.97 로 유의하게 증가하기 시작하여($P < 0.05$) 이식 후 20일, 35일, 45일, 90일 에는 17.06 ± 1.63 , 17.41 ± 0.72 , 17.03 ± 1.20 , 17.31 ± 0.86 으로 세포이식 전과 이식 후 3일, 6일 보다 평균 반응시간의 차이가 5초 이상 증가하였다. Chromaffin세포이식군을 대조군과 sham군과의 비교시 세포이식 후 9일까지는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 이식 후 14일부터 대조군과 sham군보다 유의한 반응시간의 연장이 있었으며($P < 0.05$) 이식 후 20일, 35일, 45일, 90일에는 평균 반응시간의 차이가 5 초 이상 증가하였다(Fig. 1).

고 찰

소의 부신수질 chromaffin세포를 배양하여 정상 흰 쥐의 척수강 내에 이종 이식하여 침해성 자극에 어떻게 반응하는지를 90일간 관찰하여 평가한 본 연구에서 부신수질 chromaffin세포를 척수강 내에 이식한 정상 흰쥐에서 침해성 자극에 대해 억제효과가 지속되었음을 보았다.

본 실험에서 침해성 자극에 대한 억제효과는 세포이식 후 9-10일째까지는 관찰할 수 없었으나 14일째부터는 대조군에 비해 조금씩 차이가 나기 시작하여 이 기간 이후 관찰한 90일까지는 지속적으로 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 연구자에 따라 이식 후 첫 2-3주간은 침해성 자극에 대한 억제 효과를 관찰하지 못했다는 보고도 있었다.⁷⁾ 그 이유로는 침해성 자극에 대한 억제 효과를 볼 수 없었던 첫 2-3주간은 척수강내에 이식된 세포가 새로운 환경에 적응하거나 안정되는 기간으로 생각된다.

Sagan 등은¹²⁻¹⁴⁾ 쥐의 부신 수질 chromaffin세포를 쥐의 척수강내에 동종이식하여 최소한 일년간 생존시켰었고, 이 기간 동안 침해 자극억제 효과가 지속되었음을 보고했다. 이러한 침해 자극억제 효과는 최소한 부분적으로는 이식된 chromaffin세포에서 분비되는 opioid peptides와 catecholamines에 의해 기인된다고 주장했다. 왜냐하면 마약 길항제인 naloxone

에 의해 진통효과가 억제되고 alpha adrenergic antagonist인 phentolamine에 의해서는 부분적으로 진통효과가 약해지기 때문이라고 했다. 또한 부신수질을 이식한 쥐의 척수액 내의 met-enkephaline과 catecholamines치가 증가되었다는 보고도 있다.^{11,15,16} 본 연구에서는 쥐의 척수강 내에 소의 부신세포를 이식한 이종이식을 시도했고 이식된 쥐를 3개월간 생존시킨 점이 상기 연구와는 다르지만 소의 부신수질 chromaffin세포를 정상 흰쥐의 척수강 내에 이식해도 역시 침해자극억제 효과가 있음을 볼 수 있었다.

중뇌구조와 척수후각사이에는 말초신경계로부터 오는 통증 임펄스를 변조시키는 하행성 통증변조 및 억제경로가 있다. 이들은 자체내에서 분비되는 endorphine, norepinephrine과 외부에서 투여한 opioid peptide, α -adrenergic agonist 등에 의해 활성화되어 C 섬유활동을 강력하게 억제한다.¹⁷ 부신 수질세포가 척수강 내에 이식되어 통증억제 작용을 나타내는 것은 opioid peptides와 catecholamines 이외에도 neuropeptides Y, somatostatin, neurotensin 그리고 vasoactive intestinal polypeptide 등의 약리학적으로 활성화된 neuropeptides도 이식된 부신수질 세포에서 분비되어 기여하는 것으로 보고되어 있다.^{18,19}

그러나 Lindner 등은²⁰ 소의 부신수질 세포를 쥐의 척수강내에 이식하여 6주 동안 관찰했으나 침해성 자극에 대한 억제 효과를 관찰하지 못했다고 보고하였으나 소의 부신 수질세포를 쥐의 척수강내에 이식한 본 연구에서는 12주간 관찰하여 대조군에 비해 이식군에서 침해자극억제 효과를 볼 수 있었다.

척수강내에 세포이식을 위한 해부학적 위치선택은 본 연구에서는 환추 후두골돌기 근처에서 경추 경막을 통해 부신세포를 이식했는데 연구자에 따라 하부 흉추나, 요추 부위에서 세포이식을 시도하기도 한다. 흉추나 요추부위 접근방법은 환추 후두골돌기 지역보다 경막을 노출시킬 때까지의 외과적 접근이 어렵고, 또한 환추 후두골돌기 부위는 경막과 척수 사이의 간격이 넓어 시술 시 중추신경계의 외과적 손상을 덜 받을 수 있기 때문에 초심자에게는 유리한 면이 있다.

만성통증 모델동물에서 부신수질 chromaffin세포를 척수강 내에 이식하여 통증억제 효과가 있는지를 연구한 보고들에 의하면 세포 이식 전에는 통증 때문에 실험 동물들의 체중이 줄거나 체중 증가속도가

아주 느리다가 세포 이식 후에는 체중 증가가 급속히 진행되는데 이는 통증에 의한 스트레스가 줄어들기 때문일 것이라고 추론했다.^{21,22} 정상 쥐를 실험 대상으로 한 본 연구에서는 대조군들이나 소의 부신수질 세포를 이식한 실험군들의 체중증가 차이는 관찰할 수 없었다. 이유는 만성 통증과 같은 스트레스가 없었으므로 세포이식이 체중 증가에 영향을 미치지 않았을 것으로 생각된다.

부신수질 세포 이식에서 이종이식은 동종이식에 비해 세포 거부반응에 더욱 세심하게 대처해야 함은 주지의 사실인 바이다. 이종이식 시에는 세포 거부반응을 최소화하기 위해 면역억제제인 cyclosporin A를 처리하거나,^{23,24} 면역분리를 위해 반 투과성 고분자 막에 부신세포를 싸서 chromaffin세포, 단백항원 그리고 항체 등은 통과하지 못하게 하고, 통증 치료 물질인 opioid peptides와 catecholamine 같은 분자량이 적은 물질들은 자유롭게 통과할 수 있게 하는 방법을²⁵ 동원하거나, arginate와 같은 고분자 물질로 부신수질 세포를 micro-encapsulation하여 척수강 내에 직접 주입하는 방법도⁵ 시도되고 있다. 중추신경계는 자체가 면역원성이 저하되어있고, 또한 부신은 태생학적으로 neural-crest에서 기원했기 때문에 중추신경계에 노출되어도 항원성이 적기 때문에 본 연구에서는 이종이식을 했지만 이식 세포의 면역억제에 관해서는 별다른 처치를 하지 않았다. 실제로 Czech 등은²⁷ 소의 부신수질 세포를 면역억제 처리를 하지 않고 쥐의 척수강 내에 이식하여 쥐의 lymphocytes 증식이 많이 나타나지 않았음을 관찰하였고 Perlow 등에²⁶ 의하면 소의 chromaffin세포를 쥐의 뇌실(cerebral ventricle)에 이식하여 2개월 동안 면역거부반응이 없었으며 chromaffin세포의 catecholamine의 생산, 분비가 정상적이었다고 보고하였다. 본 실험에서도 12주 동안 관찰한 결과 대조군에 비해 침해억제효과가 있으므로 chromaffin세포가 활동함을 알 수 있었으며 면역거부에 따른 쥐의 이상현상들을 관찰하지 못하였으나 이에 대한 연구가 더 필요하리라 본다.

본 연구의 결과 소의 부신수질 chromaffin세포를 쥐의 척수강 내에 이식하여 급성 통증자극시 통증억제 효과가 있음을 알 수 있었으며 앞으로 만성통증 동물모델에서 chromaffin세포의 통증 억제효과를 확인해야 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC: Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 16: 3211-6.
2. 백운이, 전영훈, 최병영, 임정옥: 작용시간 연장을 위해 고안된 이식형 혼합국소 마취제의 효과. *대한마취과학회지* 1998; 34: 493-8.
3. 임정옥, 박성식, 백운이: 생체분해성 고분자 미립구를 이용한 Lidocaine 작용시간의 연장방법 개발. *대한마취과학회지* 1999; 36: 305-10.
4. Wiley RG: Molecular murder. *Trends Neurosci* 1998; 21: 423-6.
5. Aebischer P, Buchser E, Joseph JM, De Tribolet N, Lysaght M, Rudnick S, et al: Transplantation in humans of encapsulated xenogeneic cells without immunosuppression. *Transplantation* 1994; 58: 1275-7.
6. Winnie AP, Papas GD, Das Gupta TK, Wang H, Ortega JD, Sagen J: Alleviation of cancer pain by adrenal medullary transplants in the spinal subarachnoid space. A preliminary report. *Anesthesiology* 1993; 79: 644-53.
7. Wang H, Sagen J: Absence of appreciable tolerance and morphine cross-tolerance in rats with adrenal medullary transplants in the spinal cord. *Neuropharmacology* 1994; 33: 681-92.
8. Sagen J, Pappas GD, Pollard HB: Analgesia induced by isolated bovine chromaffin cells implanted in rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 7522-6.
9. Sagen J, Wang H: Prolonged analgesia by enkephalinase inhibition in rats with spinal cord adrenal medullary transplants. *Eur J Pharmacol* 1990; 179: 427-33.
10. Sagen J, Wang H, Pappas GD: Adrenal medullary implants in the rat spinal cord reduce nociception in a chronic pain model. *Pain* 1990; 42: 69-79.
11. Kemmler JE, Sagen J: Increased catecholamine levels in spinal cord superfusates of rats with adrenal medullary implants. *Soc Neurosci Abst* 1989; 15: 1243.
12. Pappas GD, Sagen J: Fine structural correlates of vascular permeability of chromaffin cell transplants in CNS pain modulatory regions. *Exp Neurol* 1988; 102: 280-9.
13. Sagen J, Pappas GD: Morphological and functional correlates of chromaffin cell transplants in CNS pain modulatory regions. *Ann NY Acad Sci* 1987; 495: 306-33.
14. Sagen J, Pappas GD, Perlow MJ: Adrenal medullary tissue transplants in the rat spinal cord reduce pain sensitivity. *Brain Res* 1986; 384: 189-94.
15. Kemmler JE, Sagen J, Wang H: Adrenal medullary transplants increase spinal cord cerebrospinal fluid catecholamine levels and reduce pain sensitivity. *J Neurochem* 1991; 56: 623-7.
16. Sagen J, Kemmler J: Increased levels of Met-enkephalin-like immunoreactivity in the spinal cord CSF of rats with adrenal medullary transplants. *Brain Res* 1989; 502: 1-10.
17. Irving GA, Wallace MS: Pain management for the practicing physician. New York, Churchill Livingstone. 1997, pp 9-16.
18. Bommer N, Herz A: Neuropeptides and other secretagogues in bovine chromaffin cells. Their effect on opioid peptide metabolism. *Neuropeptides* 1989; 13: 243-51.
19. Kondo H: Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland. *Arch Histol Jpn* 1985; 48: 453-81.
20. Lindner MD, Francis JM, Saydoff JA: Intrathecal polymer-encapsulated bovine adrenal chromaffin cells fail to produce analgesic effects in the hot plate and formalin test. *Exp Neurol* 2000; 165: 370-83.
21. Colpaert FC: Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain* 1987; 28: 201-22.
22. Dardick SJ, Basbaum AI, Levine JD: The contribution of pain to disability in experimentally induced arthritis. *Arthr Rheum* 1986; 29: 1017-22.
23. Orega JD, Sagen J, Pappas GD: Short-term immunosuppression enhances long-term survival of bovine chromaffin cell xenografts in rat CNS. *Cell Transplant* 1992; 1: 33-41.
24. Schuler SB, Sagen J, Pappas GD, Kordower JH: Long-term viability of isolated bovine adrenal medullary chromaffin cells following intrastriatal transplantation. *Cell Transplant* 1995; 4: 55-64.
25. Sagen J, Wang H, Tresco PA, Aebischer P: Transplantations of immunologically-isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain reducing neuroactive substances. *J Neurosci* 1993; 13: 2415-23.
26. Perlow MJ, Kumakura K, Guidotti A: Prolonged survival of bovine adrenal chromaffin cells in rat cerebral ventricles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5278-81.
27. Czech KA, Pollak R, Pappas GD, Sagen J: Bovine chromaffin cells for CNS transplants do not elicit xenogeneic T cell proliferative responses in vitro. *Cell Transplant* 1996; 5: 257-67.