흰쥐의 CFA로 유도한 무릎 관절통에 대한 중추에서의 Group I mGluRs의 역할

인제대학교 의과대학 서울백병원 마취통증의학과, *고려대학교 의과대학 안암병원 마취통증의학과

한 미 애 · 장 성 호*

The Role of Central Group I mGluRs for CFA-induced Knee Joint Pain Model in Rats

Mi Ae Han, M.D., and Seong Ho Chang, M.D.*

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Seoul Paik Hospital, College of Medicine, Inje University, *Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Glutamate is the predominant excitatory neurotransmitter in the central and peripheral nervous system and has known to be involved in nociceptive transmission and central sensitization. It acts through ligand gated ionotropic glutamate receptors (iGluRs) and G protein-coupled metabotropic glutamate receptors (mGluRs). And mGlu 1, 5 receptors have been recognized to play a role in nociceptive processing. We want to investigate whether central mGluR1 and mGluR5 antagonists could reverse the behavioral signs of weight bearing and secondary mechanical hyperalgesia induced by chronic knee joint inflammation.

Methods: mGluR1 antagonist, (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA: 25, 50, 100 μ M/10 μ l, n = 7 per group) and selective mGluR5 antagonist, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP: 25, 100, 200 nM/10 μ l, n = 7 per group) were injected intrathecally 5 days after Complete Freund's Adjuvant (CFA, 150 μ l) injection into knee joint and behavior signs of weight bearing and secondary mechanical hyperalgesia were observed.

Results: CFA significantly reduced the magnitude of right hind paw weight bearing and decreased the withdrawal threshold to mechanical stimulation compared to contralateral side. Higher dose of AIDA (100 μ M) significantly reversed the reduction of weight bearing, but MPEP did not. AIDA reversed the decrease of the paw withdrawal threshold to mechanical stimulation at the dosage of 50 and 100 μ M respectively. MPEP significantly increased the paw withdrawal threshold to mechanical stimulation in a dose dependent manner.

Conclusions: Group I mGluRs were involved in maintenance of primary and secondary mechanical hyperalgesia. (Korean J Anesthesiol 2007; 53: 504~12)

Key Words: arthritis, CFA, metabotropic glutamate receptors, weight bearing.

서 론

실험동물에서 무릎관절의 염증은 염증 유발 부위를 보호 하려는 자세의 변형, 움츠림(flinching), 핥기(licking) 등의 자 발통(spontaneous pain) 행동뿐만 아니라 염증이 유발된 곳에 서 통각수용성 역치가 감소(일차 통각과민, primary hyperalgesia)되고 확장된 주변 부위에서의 통각 수용성 역치의 감

소(이차 통각과민, secondary hyperalgesia)가 나타난다.¹⁻⁴⁾ 이러한 통증민감도의 증가는 통각 수용체의 감작에 의해 척 수 후각 뉴런의 흥분성(excitability)의 증가와 조직손상이나 염증 부위에서 유리되는 염증성 화학물질들(chemicals)이나 매개체들(mediators)에 의해 촉진된다.^{1,5,6)}

Glutamate는 중추신경계와 말초신경계에서 가장 중요한 흥분성 신경 전달 물질로서 신경흥분성과 시냅스전달에 관 여하며,⁷⁾ 염증발생 후 척수 후각에서 농도가 증가되어 감작 을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{1,8)} Glutamate 수용체는 자 극에 대한 정보를 빠르게 전달하는 배위자관문 이온통로 (ligand-gated ion channel) 수용체(ionotropic glutamate recep- tors, iGluRs)와 이차전령물질 연속단계(second-messenger cas- cade)를 활성화시키는 G-단백 결합 수용체(metabotropic glu-

논문접수일 : 2007년 7월 5일

책임저자 : 장성호, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1

고려대학교 안암병원 마취통증의학과, 우편번호: 136-705

Tel: 02-920-5771, Fax: 02-929-2936

E-mail: torchid@korea.ac.kr

박사학위 논문임.

tamate receptors, mGluRs)로 구분된다.^{9,10)}

이온통로 수용체에 작용하는 물질로는 N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)가 있으며 중추뿐만 아니라 말초에서도 조직손상 후에 활성화되어 유해한 정보의 전달을 조절한다.¹¹⁾

G-단백 결합 수용체는 화학적 상동관계, 약리학적 특성, 신호전달 기전 등에 의하여 group I (mGluRs 1, 5), group II (mGluRs 2, 3), group III (mGluRs 4, 6, 7, 8)로 나누어진다. 특히 Group I mGluRs는 Gq/11 단백질과 결합한 다음 phospholipase C (PLC)를 활성화하여 phosphoinositide (PI)를 가수분해하여, 세포내 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시키며 protein kinase C (PKC)를 활성화시킨다.^{11,12)} Group II와 Group III mGluRs는 Gi/Go 단백질을 통한 adenylyl cyclase (AC)의 결합을 방해함으로써 cyclic AMP(cAMP) 형성과 cAMP 의존적인 protein kinase (PKA)의 활동을 억제한다.¹²⁻¹⁴⁾

생리학, 행동학적 연구를 통해 중추신경계 mGluRs가 유해한 자극의 전달에 관여하며 이 중 group I (mGluRs 1, 5) mGluRs가 척수뉴런에서의 염증 유발 과흥분성에 중요한 작용을 한다고 알려졌다. Group I mGluRs의 작용제들을 척수강내로 주입하였을 때 통각과민, 이질통, 자발적인 통증 관련 행동들이 유발되었고,^{15,16)} group I mGluRs의 길항제들을 척수강내로 주입하였을 때는 염증과 신경병증 통증관련 행동들을 줄여주었다.^{17,18)}

최근에는 다양한 동물모델을 통해 말초부위의 통증전달에도 group I mGluRs가 관여하며¹⁹⁻²¹⁾ 신경병증 통증에서 mGluR5 길항제를 말초로 주입하여 온통각과민증이 감소된 것을 확인하였다.²²⁾ 쥐에게 carrageenan 무릎주사 후 급성 염증성 관절통 모델을 만들고 체중부하 검사와 이차적 기계적 이질통 역치를 검사하여 관절강내로 함께 투여한 group I mGluRs 길항제인 AIDA와 MPEP의 역할을 밝힌 바 있었으나²³⁾ 만성 관절 염증성 통증 모델에서 중추로 투여한 mGluRs 길항제의 역할을 체중부하 검사와 기계적 역치에 대해 연구된 바는 없다.

따라서 본 연구는 쥐의 무릎관절에 Complete Freund's Adjuvant (CFA, 150 μ l, Sigma, St Louis, MO, USA)를 주사하여 만성관절염 모델을 만들고, 뇌척수강내로 group I mGluRs 길항제를 투여하여 관절통의 유지단계에서 체중부하검사와 이차적 기계적 이질통 역치를 관찰함으로써 중추에서의 mGluRs의 역할을 밝히고자 하였다.

연구대상 및 방법

실험동물

실험동물은 6주령 이상(200–300 g)의 수컷 흰쥐(Sprague-

Dawley) 100마리를 사용하였다. 실험동물이 동물사육센터(샘타코, 오산)로부터 도착하면 각 사육 상자에 5마리씩 넣고 낮과 밤의 주기가 각각 12시간, 사육실의 온도는 22–25°C가 유지되는 항온 항습기 안에서 사육하였다. 음식과 물은 실험동물이 필요에 따라 자유롭게 먹을 수 있게 하였고, 본 실험에 들어가기 하루 전날 물만 반으로 줄여서 공급하였다.

관절염의 유도 및 약물처리

실험동물들은 enflurane (0.5–2%)을 이용하여 마취시킨 후 환추 후두막(atlanto-occipital membrane)을 노출시켜 뇌척수강내 도관(PE-10 tube)을 예비실험을 통해 확인한 7 cm 길이로 거치하여 L3와 L4까지 삽입하였다.²⁴⁾ 도관은 생리식염수로 채우고 한쪽 끝은 밀봉하였으며 뇌척수강내 수술을 한 쥐는 개별 우리에 넣고 1주일 정도의 회복기를 가졌다. 이 기간 동안 죽거나 CBS (combined behavioral score of Gale)를 측정하여 운동 능력 감소가 확인된 12마리는 실험에서 제외하였다.²⁵⁾

뇌척수강내 수술 1주일 후 16마리의 실험동물에게 enflurane (0.5–2%)을 이용하여 마취시킨 후 오른쪽 무릎 관절강내로 CFA (150 μ l)를 주입하여 관절염을 유도하였다. CFA를 주입한 후에는 약 3분 정도 무릎관절의 펌과 굽힘을 반복하였다.²⁶⁾ 시간에 따른 CFA 유도 관절염증의 경과를 관찰하고 통증행동에 미치는 영향을 확인하기 위해 먼저 CFA 주입 후 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21일째 체중부하검사, 기계적 역치검사, 온통각과민 검사를 실시하였다.

또한 Group I mGluRs의 길항제가 관절통의 유지단계에 미치는 작용을 보기위해 56마리의 쥐에게 CFA (150 μ l)를 주입하여 관절염을 유발시킨 다음 5일째 mGluR1의 선택적 길항제인 (RS)-1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA 25, 50, 100 μ M/10 μ l; n = 7) 또는 mGluR5의 선택적 길항제인 2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine (MPEP 25, 100, 200 μ M/10 μ l; n = 7)를 뇌척수강내에 설치한 도관을 통하여 주입하였다. 약물 처리에 대한 대조군에는 생리식염수를 주입하였으며, 길항제 투여 후 30, 60, 90, 120분까지 행동학적 검사로 통증행동의 변화를 관찰하였다.

염증정도의 평가

CFA를 주입한 후에 관절강내에 염증반응을 객관적으로 측정하고자 CFA 투여 전과 주입한 5일째 무릎의 직경을 측정하였다. 무릎관절의 직경은 쥐의 무릎을 신전시킨 상태에서 캘리퍼스를 이용하여 외측과 내측 측부인대 사이의 직경을 3회 측정하여 평균값을 얻었다. 또한 실험 약제인 AIDA와 MPEP 투여 후 60분째 염증반응의 변화가 있는가를 확인하기위해 무릎직경을 같은 방법으로 측정 하였다.

행동학적 검사

체중부하 검사(weight bearing test): CFA를 주입하기 전 모든 실험동물들은 예비실험(pretest) 과정을 통해 측정 장치에 적응하도록 하였다.³⁶⁾ 체중부하검사는 측정 장치의 출발지에서 도착지까지 2-3회 통과하도록 하였으며 발판의 경계선을 밟지 않고 정확히 밟은 발판의 값만을 선별하였다. 관절염을 유도하여 오른쪽 뒷발에 실리는 체중부하의 정도를 통증관련행동으로 간주하고 오른쪽 뒷발과 왼쪽 뒷발의 값을 5개 이상 구하여 그 값의 평균을 각각 왼발과 오른발의 무게값으로 정해서 평가하였다.

실험장치는 아크릴로 제작된 출발지와 통로 그리고 도착지로 구성하였다. 출발지는 무색 투명한 아크릴로 제작하였고, 도착지는 밝은 곳을 싫어하는 쥐들의 습성을 이용하여 검은색 아크릴로 제작하였다. 장치의 통로는 길과 같이 만들어 쥐가 걸어 다닐 수 있게 하였으며 통로의 양측 벽은 너비를 조절할 수 있도록 설계되어 실험동물의 크기에 따라 조절이 가능하도록 하였다. 발판은 5 × 10 cm의 크기의 아크릴로 제작되었으며 총 8개의 아크릴을 2줄로 각각 4개씩 배치하고 각 발판 밑에는 무게 감지 sensor인 load cells (Dana load cell, strain gauge type, working range 0-1000 g, Dana load cell LTD., Korea)을 부착하여 각 발판에 부하되는 무게를 따로 기록할 수 있도록 하였다. 발판 밑에 부착된 각각의 load cell은 디지털 변환기(DN-AM300, Dana load cell LTD., Korea)에 연결하여 load cell에서의 신호를 증폭시키고 여과하였다(< 2 Hz 또는 > 20 Hz). 이렇게 처리된 신호는 아날로그 디지털 변환기(DN-AM300, Dana load cell LTD., Korea)를 통해 컴퓨터에 보내지고 특정한 소프트웨어(WBT, Korea)에 의해서 시간 축을 가지는 무게의 변화곡선을 그릴

수 있게 하였다. Load cell의 교정은 각 load cell이 부착된 발판에 일정한 무게의 분동(10-300 g)을 올려놓아 무게에 대해 sensor의 반응이 정비례하는지를 확인하고 그 증폭값을 일정하게 교정하였다. 정상적인 보행에서의 시간-체중 곡선은 첫 번째(앞쪽다리) 정점 보다는 두 번째(뒤쪽다리) 정점이 높은 2개의 정점을 가지는 곡선을 보이지만 관절염이 유도되면 시간-체중 곡선은 두개의 정점이 반대인 곡선을 보인다(Fig. 1).³⁶⁾

기계적 역치 검사(mechanical threshold test): 기계적 역치 검사는 Von Frey filaments (0.41, 0.70, 1.20, 2.00, 3.63, 5.50, 8.50, 15.10 g, Stoeling, Wood Dale, IL, USA)를 이용하여 발바닥에 기계적인 자극을 가한뒤 발바닥에서의 회피반응으로 평가하였다. 실험동물은 금속철망으로 된 바닥위에 올려놓고 투명한 플라스틱 유리(28 × 28 × 10 cm)로 덮어 움직이는 범위를 최소화 하였다. Von Frey filament는 발바닥 표면에 접근시켜 filament가 약간 구부러질 정도로 각 뒷발바닥에 3-4초 정도 자극하였다. 50% 회피역치는 이전에 사용되었던 up-down 방법으로²⁷⁾ 결정하였고, 최초 filament의 강도는 2.0 g (4.31 mN)으로 시작하였다. 최초 자극으로 회피반응이 나타나면 더 약한 filament (0.41, 0.70, 1.20 g)로, 회피반응이 없으면 더 강한 filament (3.63, 5.50, 8.50, 15.10 g)를 적용시켰고, 자극은 수초간격으로 실시하였다. 50% 역치의 변화는 Dixon 방법에²⁸⁾ 따라 시행하였다.

온통각과민 검사(thermal hyperalgesia test): 온통각과민검사는 뒷발바닥에 가해지는 복사열에 의한 발의 회피반응시간으로 평가하였다. 실험동물은 유리로 덮여진 탁자(약 2 mm 두께) 위에 각각 분리된 투명한 플라스틱 유리에 넣고 약 20분 정도 새로운 환경에 적응하도록 하였다. 자극은 Planter Tester (Ugo Basile; Italy)를 이용하여 뒷 발바닥 표면

Fig. 1. Typical time-weight curves. Since the front and hind paws press similar areas along the path of the weight load test device, each of the time-weight curves has two peaks. The first and second peaks represent the weight loads on the front and hind paws, respectively. After the induction of arthritis, the weight load on the right hind paw decreases. Reciprocal increase of weight load on the left hind paw is observed.

에 적용하였으며 자극된 발을 들어 올릴 때까지 실시하였다. 실험은 각 뒷발바닥에 독립적으로 실시하였고 약 5분 정도의 간격으로 총 3회 실시하였다. 발바닥 회피반사에 대한 열적응중단(cut-off) 시간은 10초로 하여 고강도 열에 의한 조직손상을 방지하였다.

자료분석 및 통계 처리: 각각의 측정치는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M.)로 표시하였다. 통계적 분석은 시간에 따른 군내에서의 변화는 분산분석(repeated measures of ANOVA)을, 각 시간대에서 군들 간의 변화는 경우에 따라서 ANOVA 또는 다중비교(comparison test)를 시행하였고 세 실험군 중 두 실험군을 뽑아 검정한 Post hoc test (Turkey test)방법을 이용하였다. 통계적 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

시간에 따른 CFA 유도 관절통양상

체중부하 검사: CFA 주입으로 유발된 무릎 관절염증은 체중부하 시 통증을 유발시키며 이는 관절염의 주 증상으로 본 실험에서 CFA 투여 1일째 우측 뒷다리는 급격한 체중부하감소를 보였으며 이후에는 서서히 회복되는 양상을 보였지만 14일째 까지 좌측에 비해 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 2).

기계적 역치검사: 체중부하검사에서 CFA 주입 1일째 가장 현격한 감소를 보이는 것과 달리 기계적 역치의 감소는 3일째 급격하게 저하되기 시작하여 5일째 가장 큰 폭의 감소를 보이다 서서히 회복하는 양상으로 14일째 까지도 역치 감소가 관찰되었다(Fig. 3).

Fig. 2. Time course of the reduction in weight bearing in rats. CFA injection decreases in hind limb weight bearing on the injected leg with chronic phase beginning from Day 1 to Day 14. Data are mean $\pm$ S.E.M. (n = 8) *: $P < 0.05$, compared to the contralateral side at the same time period, D: day.

온통각과민증 검사: CFA 투여 후 대조군에 비해 시간에 따른 통계적으로 유의한 열자극역치의 감소가 관찰되지 않아 실험예제 처치 후 실험에서 제외 하였다(Fig. 4).

염증정도의 평가: 무릎직경의 증가는 CFA 주사 1일째 가장 현저하게 관찰되었고 서서히 감소되어 10일째는 왼쪽 무릎 직경과의 차이는 소실되었다(Fig. 5).

CFA로 유발된 관절통에서의 AIDA의 효과

체중부하검사: 관절통의 유지단계에 mGluR 1 길항제의 효과를 확인하기 위해 CFA 주입 5일째 뇌척수강으로 AIDA

Fig. 3. Time course of the reduction in mechanical threshold on hind paw in rats. CFA injection decreases in hind paw mechanical withdrawal threshold on the injected knee with chronic phase beginning from Day 1 to Day 14. Data are mean $\pm$ S.E.M. (n = 8) *: $P < 0.05$, compared to the contralateral side at the same time period, D: day.

Fig. 4. Time course of the change in thermal hyperalgesia in rats. CFA injection does not decrease in hind paw thermal hyperalgesia on the injected leg. Data are mean $\pm$ S.E.M. D: day.

를 주입하자 60분째 AIDA ($100 \mu\text{M}/10 \mu\text{l}$)는 대조군과 비교하여 체중부하를 증가시킨 것으로 나타났다. 그러나 25, 50 μM 의 작은 용량에서는 통계적으로 유의한 체중부하의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

기계적 역치검사: AIDA (50, $100 \mu\text{M}/10 \mu\text{l}$) 투여 60분째 기계적 역치가 증가되었으며 100 μM 농도에서는 투여 90분에도 역치 증가가 관찰되었다(Fig. 7).

염증정도의 평가: 무릎 직경으로 확인한 염증성 부종은

Fig. 5. Time course of the change in knee joint diameter in rats. CFA injection increases in the knee joint diameter on the injected leg. Data are mean $\pm$ S.E.M. ($n = 8$): *: $P < 0.05$, compared to the contralateral side at the same time period, D: day.

Fig. 6. The effects of intrathecal AIDA on CFA induced weight bearing. Five days after injection of CFA, rats received intrathecal AIDA (25, 50, $100 \mu\text{M}$) once, followed by assessment of hind limb weight bearing for 120 minutes. AIDA ($100 \mu\text{M}$) restores hind limb weight bearing at 60 min. Data are mean $\pm$ S.E.M. *: $P < 0.05$, compared to the saline group. †: $P < 0.05$, compared to pretest value.

CFA주입 전과 비교하여 증가하였으나 AIDA주입 후 60분째 무릎직경의 변화는 없었다(Table 1).

CFA로 유발된 관절통에서의 MPEP의 효과

체중부하검사: MPEP (25, 100, 200 nM/ $10 \mu\text{l}$)는 모든 용량에서 CFA로 유발된 만성관절염에서의 체중부하감소에 영향을 주지 못하였다(Fig. 8).

기계적 역치검사: 관절통의 유지단계에서 모든 용량의

Fig. 7. The effects of intrathecal AIDA on CFA induced mechanical threshold. Five days after injection of CFA, rats received intrathecal AIDA (25, 50, $100 \mu\text{M}$) once, followed by assessment of hind paw mechanical threshold for 120 minutes. AIDA ($50 \mu\text{M}$) restores hind paw mechanical threshold at 60 minutes and AIDA ($100 \mu\text{M}$) restores hind paw mechanical threshold at 60, 90 minutes. *: $P < 0.05$, compared to the saline group. †: $P < 0.05$, compared to the pretest value of each group.

Table 1. The Effects of AIDA on CFA-induced Knee Joint Diameter in the Rat (mm)

Treatment	Pretest	5 day after CFA inj.	60 min
Control (Saline)	99 $\pm$ 0.12	158 $\pm$ 1.14*	155 $\pm$ 0.99*
AIDA (25 μM)	100 $\pm$ 1.01	156 $\pm$ 0.58*	154 $\pm$ 1.31*
AIDA (50 μM)	98 $\pm$ 1.24	153 $\pm$ 1.19*	152 $\pm$ 1.45*
AIDA (100 μM)	100 $\pm$ 0.21	154 $\pm$ 1.32*	153 $\pm$ 1.35*

Five days after injection of CFA, rats received intrathecal AIDA (25, 50, $100 \mu\text{M}$) once, followed by assessment of knee joint diameter 60 min later. All doses of AIDA does not have any effect on the joint diameter. Data are mean $\pm$ S.E.M. ($n = 7$, each) *: $P < 0.05$, compared to the pretest value of each group.

Fig. 8. The effects of intrathecal MPEP on CFA-induced weight bearing. Five days after injection of CFA, rats received intrathecal MPEP (25, 100, 200 nM) once, followed by assessment of hind limb weight bearing for 120 minutes. All doses of MPEP does not have any significant effect on weight bearing. Data are mean $\pm$ S.E.M.

Fig. 9. The effects of intrathecal MPEP on CFA-induced mechanical threshold. Five days after injection of CFA, rats received intrathecal MPEP (25, 100, 200 nM) once, followed by assessment of hind paw mechanical threshold for 120 minutes. All doses of MPEP significantly restores hind paw mechanical threshold at 60 min and MPEP (100 nM) also restores hind paw mechanical threshold at 90 min. Data are mean $\pm$ S.E.M. *: $P < 0.05$, compared to the saline group. †: $P < 0.05$, compared to the pretest value of each group.

MPEP (25, 100, 200 nM/10 μ l)는 60분째 기계적 역치의 증가를 보여주었다(Fig. 9).

염증정도의 평가: AIDA와 마찬가지로 CFA 유발성 무릎 관절염에서 MPEP는 60분 짜 모든 용량에서 무릎직경에 변화를 주지 못했다(Table 2).

Table 2. The Effects of MPEP on CFA-induced Knee Joint Diameter in the Rat (mm)

Treatment	Pretest	5 day after CFA inj.	60 min
Control (Saline)	100 $\pm$ 0.21	153 $\pm$ 0.41*	153 $\pm$ 1.49*
MPEP (25 μ M)	100 $\pm$ 0.01	154 $\pm$ 1.23*	153 $\pm$ 1.01*
MPEP (100 μ M)	99 $\pm$ 0.14	156 $\pm$ 1.21*	154 $\pm$ 0.51*
MPEP (200 μ M)	100 $\pm$ 1.11	153 $\pm$ 0.18*	154 $\pm$ 1.27*

Five days after injection of CFA, rats received intrathecal MPEP (25, 100, 200 nM) once, followed by assessment of knee joint diameter 60 min later. All doses of MPEP does not have any effect on the joint diameter. Data are mean $\pm$ S.E.M. (n = 7, each) *: $P < 0.05$, compared to the pretest value of each group.

고 찰

CFA 유발 무릎관절염에서 중추로 투여된 mGluR1 길항제인 AIDA (50, 100 μ M/10 μ l)와 mGluR5 선택적 길항제인 MPEP (25, 100, 200 nM/10 μ l)는 생리 식염수투여군에 비해 유의하게 발바닥의 기계적 회피반응 역치(mechanical withdrawal threshold)를 증가시켰다. 체중부하검사에서 AIDA 100 μ M 투여군에서만 CFA 유발성 체중부하 감소를 줄여준 것으로 나타났다. 염증반응으로 인한 부종에는 영향을 주지 못하였다.

실험을 이중 맹검법으로 시행하였고 말초감각신경말단의 mGluRs를 통하지 않도록 CFA 무릎 관절 주사 후 5일째에 뇌척수강 내로 직접 주입하였는데 이는 예비 실험에서 CFA 투여 후 21일 동안 체중부하 및 기계적 역치검사를 실시하여 현저한 감소가 관찰된 시기를 선택하였다. CFA에 의한 기계적 역치검사에서 최대 감소시점은 5일째로 체중부하검사의 최대 감소 시점 이 1일째인 것과는 차이가 있었는데(Fig. 2, 3) 이차적 기계적 통각과민이 발생하는데 걸린 시간 때문으로 생각된다.

실험약제 용량 선택은 기존의 신경병증 유발 모델에서²⁹⁾ 사용된 척수강내 투여 MPEP 농도(30, 90, 270 nM) 및 척수에 microdialysis 방법으로 AIDA를 투여한 실험농도(58 μ M)를³⁰⁾ 참조하였다. Soliman 등에³¹⁾ 따르면 capsaicin에 의한 기계적 과민성 연구를 통해 척수로 전달된 AIDA와 MPEP는 같은 용량에서 비슷한 정도의 제통효과를 갖는다고 하며 쥐의 말초신경 손상 후 척수후각에 mGluR1수용체 발현의 감소가 관찰되었다는 연구결과³²⁾가 있어서 이번 실험에서도 AIDA는 MPEP에 비해 높은 농도를 실험에 사용하게

되었다.

체중부하검사는 무릎 염증으로 다리의 체중부하를 피하는 행동으로 휴식 시의 자발통과는 다르다. 또한 CFA 무릎 주사 후 von Frey 자극에 대해 발바닥에서 발회피 반응역치의 감소를 측정하는 것은 이차적 통각과민을 보기위한 것인데 이들 현상들은 관절염증으로 척수후각 뉴런의 형성변화(plastic change)가 초래되고,^{6,33,34} 모든 자극에 대해 광역범위 뉴런(wide dynamic range neuron)이 활성화되어 통각자극 뉴런의 역치가 낮아져서 나타난다.³³ 즉 무릎의 염증으로 척수 후각으로 glutamate의 방출이 증가하고,^{1,8,35} NMDA, non-NMDA glutamate 수용체, mGluRs 등이 활성화되어 척수후각 뉴런이 감작되는 것이다.³⁴ 즉 초기의 일차적 통각과민(primary hyperalgesia)과 더불어 시간이 경과되면서 손상된 주변부에서 일어나는 이차적 통각과민(secondary hyperalgesia)이 초래되는 것이다. 어떻게 group 1 mGluRs가 척수뉴런의 감작에 기여하는지에 대해서는 알려진 바 없으나 수용체의 흥분으로 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면 세포내 protein kinase C가 활성화되고 이는 K^{+} 의 전도를 감소시켜 중추신경 뉴런을 탈분극화 시키는 것으로 추측된다.^{36,37}

또한 뇌척수강내로 투여한 AIDA와 MPEP가 무릎염증으로 발생한 기계적역치의 감소를 역전시킨 것은 척수 mGluRs가 안쪽관절신경(medial articular nerve)의 후근반사(dorsal root reflex) 발생에 관여된다는 의미이다.^{38,39} 즉 mGluRs는 중추에서 염증의 시작과 통각과민의 발생에 관여된다고 생각된다.

과거 연구들을 살펴보면 염증유발 물질로 formalin,^{20,40} carrageenan,⁴¹ CFA 등을²¹ 발바닥에 주입하고 일어나는 일차적 통각과민의 지표로 온통각과민역치, 기계적 회피반응 역치에 대해서 측정을 하였다. Walker 등⁴¹의 연구에서는 carrageenan으로 발바닥 염증을 유발하기 전 미리 group 1 mGluRs의 작용제(CHPG, DHPG)와 mGluR 5 길항제(MPEP)를 발바닥에 투여하니 기계적 이질통이 줄어들며 CFA로 유발된 쥐의 발바닥에 투여한 MPEP가 기계적 유발통을 줄여주었다. 또한 formalin으로 유발된 쥐의 뒷발바닥의 염증에서 온통각과민역치는 mGluR1의 길항제(CPCCOEt, LY367385)의 말초투여로 증가될 수 있다는 결과도 있었다.²⁰ 또한 쥐의 뒷발바닥에 formalin과 AIDA를 동시 투여하자 mGluR 1 α 수용체를 길항하여 염증성 기계적 이질통이 감소되었지만 꼬리와 뒷발바닥의 온통각과민 역치에는 영향을 미치지 못하였다는 결과도 존재한다.⁴⁰ 본 실험과 유사한 통증모델로 Zhang 등은³⁰ 무릎 관절강내로 kaolin과 carrageenan의 혼합물을 주입한 관절염모델을 이용하여 관절염 유발 전과 유발 후에 group 1 mGluRs의 길항제(LY393053, LY367385, AIDA)를 척수강내로 주입하였을 때 관절염의 발생과 유지 단계 모두에서 이차적 온통각과민을 효과적으로 줄여주는

것을 관찰하였다.

이번 실험에서는 중추로 투여한 mGluR5 길항제 MPEP는 모든 농도에서 60분째 무릎염증으로 인한 이차적 기계적 이질통 역치를 증가시킨 것으로 나타났고 100 nM에서는 90분째에도 기계적 이질통 역치를 증가시키는 양상이었다(Fig. 9). 또한 mGluR1 길항제 AIDA도 50, 100 μ M 농도에서 60분째 기계적 이질통 역치를 증가시켰다(Fig. 7). 그러나 체중부하검사에서 MPEP는 모든 농도에서 오른쪽 뒷다리의 체중부하 감소를 줄여주지 못한 것으로 나타났으며(Fig. 8), AIDA는 가장 높은 농도인 100 μ M에서만 60분째 대조군과 비교하여 체중부하의 감소를 줄이는 효과가 관찰되었다(Fig. 6). 이번 실험에서 MPEP의 경우 기계적 역치검사에 서만 이질통 역치의 증가 효과가 있던 것에는 검사방법 상 민감도의 차이도 한 원인이 될 수 있다고 생각한다. 즉 과거 연구에서 관절염증은 이환된 다리의 체중부하를 50%에서 10-20%까지 크게 감소시켰으나 morphine 5 mg/kg을 투여하였을 경우 체중부하는 12-13% 증가되는 반면,⁴² 발회피 반응 역치는 1-2 g에서 10-12 g로 큰 폭으로 증가되었다⁴³고 보고된 바 있었기 때문이다.

체중부하장치는⁴² 관절염이 유발된 다리 쪽으로 체중을 부하하지 않으려는 특성을 이용해 체중변화 정도를 측정하는 장치로서 기존의 염증이 유발된 부위를 보호하려고 하는 자세의 변형, 움츠림(flinching), 핥기(licking) 등의¹⁻⁴ 자발통 행동 관찰보다는 더 정량적이고 객관화되어 염증이 유발되지 않은 쪽과 정확하게 비교할 수 있는 장점을 가지고 있다.⁴⁴

Zhu 등도⁴⁵ 쥐의 발바닥 수술 절개 후의 통증에 복강(ED₅₀ = 15 mg/kg) 혹은 뇌척수강내(ED₅₀ = 65 μ g/rat)로 투여된 MPEP의 효과를 연구하였는데 본 실험장치와 유사한 Incapacitance analgesia meter(Stoelting, Wood Dale, USA)로 움직임을 제한한 상태에서 염증을 유발한 다리와 유발되지 않은 다리의 체중부하차이를 측정하였다. 말초로 MPEP를 주입하면 다리의 체중부하정도는 용량 의존적으로 증가되었다. 또한 쥐에서 복강으로 투여한 MPEP가 발바닥의 CFA 유발성 염증성 온통각과민과 기계적 이질통도 효과적으로 줄여주었다고 보고 하였다.⁴⁶ 본 실험에서 뇌척수강내로 투여된 MPEP가 체중부하를 증가시키지 못한 것과는 차이가 있으며 우리 실험에서의 MPEP 투여 용량이 적었던 것도 원인이 될 수 있었다고 본다.

Group 1 mGluRs는 신경병증 통증모델에서도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 쥐의 L₅/L₆ 척수신경절찰 모델(spinal nerve ligation model)에서 말초 혹은 척수강내 mGluR5의 선택적 길항제(SIB-1757)를 주입하였을 때 기계적 이질통에는 부분적 길항효과가 관찰되었지만 온통각과민은 현저하게 감소시켜 주었으며 유발되지 않은 쪽 말초

약물을 주입 시에는 아무런 영향을 미치지 못했다.²²⁾ 물론 신경병증 통증모델과 염증 통증모델의 기전의 차이는 있으나 말초로 투여된 group I mGluRs 길항제도 관절강내 glutamate 수용체와 결합하여 일차 구심 신경섬유의 흥분을 막고 척수를 통한 침해자극의 전달을 방해하여 척수후각(dorsal horn)의 중추 감각을 감소시키는 것으로 생각된다. 이상의 결과들을 종합하여 보면, 이차전령물질연속단계(second-messenger cascade)를 활성화하여 통증의 전달에 중요한 역할을 담당하고 있는 mGluRs는 말초와 중추신경계에서 활성화되는 되는 것을 알 수 있고, mGluRs의 아형 중에서 흥분성으로 작용하는 group I mGluRs는 다양한 통증 모델에서 상위 중추로 통증의 정보전달에 관여하고 있다고 본다.

본 연구에서는 중추 group I mGluRs 길항제가 CFA 유발 관절염의 유지단계에서 이차 기계적 통각과민을 감소시키는 데 효과가 있었지만 체중부하 검사에서는 mGluR1 길항제 AIDA 100 μ M만이 효과가 있는 것으로 나타났다. 결론적으로 이 실험은 Group I mGluRs가 무릎 염증으로 유발되는 일차적, 이차적 통각과민의 유지에 관여한다는 사실을 보여주고 있으며 향후 Group I mGluRs의 선택적 차단을 통한 관절통 감소에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Sluka KA, Westlund KN: An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate increases. *Neurosci Lett* 1992; 145: 141-4.
- Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF: Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996; 64: 493-501.
- Zahn PK, Umali E, Brennan TJ: Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain* 1998; 74: 213-23.
- Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ: Characterization of A δ - and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol* 2002; 87: 721-31.
- Sorkin LS, Westlund KN, Sluka KA, Dougherty PM, Willis WD: Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time-course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. *Brain Res Rev* 1992; 17: 39-50.
- Schaible HG, Schmidt RF, Willis WD: Enhancement of the responses of ascending tract cells in the cat spinal cord by acute inflammation of the knee joint. *Exp Brain Res* 1987; 66: 466-89.
- Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM: Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuro Report* 1997; 8: 941-6.
- Sluka KA, Westlund KN: Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 1993; 55: 367-77.
- Nakanishi S: Metabotropic glutamate receptors; synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 1994; 13: 1031-7.
- Conn PJ, Pin JP: Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 205-37.
- Carlton SM, Coggeshall RE: Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res* 1999; 820: 63-70.
- Anwyl R: Metabotropic glutamate receptors: Electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 1999; 29: 83-120.
- Gasparini, Kuhn R, Pin JP: Allosteric modulators of group I metabotropic glutamate receptors: novel subtype-selective ligands and therapeutic perspectives. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 43-9.
- Neugebauer V: Metabotropic glutamate receptors: novel targets for pain relief. *Expert Rev Neurother* 2001; 1: 207-24.
- Fisher K, Fundytus ME, Cahill CM,Coderre TJ: Intrathecal administration of the mGluR compound, (S)-4CPG, attenuates hyperalgesia and allodynia associated with sciatic nerve constriction injury in rats. *Pain* 1998; 77: 59-66.
- Lorrain DS, Correa L, Anderson J, Varney M: Activation of spinal group I metabotropic glutamate receptors in rats evokes local glutamate release and spontaneous nociceptive behaviors: effects of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine pretreatment. *Neurosci Lett* 2002; 327: 198-202.
- Young MR, Fleetwood-Walker SM, Dickinson T, Blackburn-Munro G, Sparrow H, Birch PJ, et al: Behavioural and electrophysiological evidence supporting a role for group I metabotropic glutamate receptors in the mediation of nociceptive inputs to the rat spinal cord. *Brain Res* 1997; 777: 161-7.
- Han JS, Neugebauer V: mGluR1 and mGluR5 antagonists in the amygdala inhibit different component of audible and ultrasonic vocalizations in a model of arthritic pain. *Pain* 2005; 113: 211-22.
- Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW: Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. *J Neurosci* 1998; 18: 8056-64.
- Bhave G, Karim F, Carlton SM, Gereau RW: Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci* 2001; 4: 417-23.
- Walker K, Bowes M, Panesar M, Davis A, Gentry C, Kesingland A, et al: Metabotropic glutamate receptor subtype 5 and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. *Neuropharmacol* 2001; 40: 1-9.
- Dogruel A, Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, Porreca F: Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGLUR (5)) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 2000; 292: 115-8.
- Lee KS, Kim J, Yoon YW, Lee MG, Hong SK, Han HC: The peripheral role of group I metabotropic glutamate receptors on nociceptive behaviors in rats with knee joint inflammation. *Neurosci Lett* 2007; 416: 123-7.
- Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6.

25. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR: Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 1985; 88: 123-34.
26. Yu YC, Koo ST, Kim CH, Lyu Y, Grady JJ, Chung JM: Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. *J Neurosci Methods* 2002; 115: 107-13.
27. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Qualitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55-63.
28. Dixon WJ: Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20: 441-61.
29. Fisher K, Lefebvre C,Coderre TJ: Antinociceptive effects following intrathecal pretreatment with selective metabotropic glutamate receptor compounds in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 411-8.
30. Zhang L, Lu Y, Chen Y, Westlund KN: Group I metabotropic glutamate receptor antagonists block secondary thermal hyperalgesia in rats with knee joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 149-56.
31. Soliman AC, Yu JS, Coderre TJ: mGlu and NMDA receptor contributions to capsaicin-induced thermal and mechanical hypersensitivity. *Neuropharmacology* 2005; 48: 325-32.
32. Hofmann HA, Siegling A, Denzer D, Spreyer P, De Vry J: Metabotropic glutamate mGlu 1 receptor mRNA expression in dorsal root ganglia of rats after peripheral nerve injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 135-8.
33. Neugebauer V, Schaible HG: Peripheral and spinal component of the sensitization of spinal neurons during an acute experimental arthritis. *Agents Actions* 1988; 25: 234-6.
34. Neugebauer V, Lucke T, Schaible HG: Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 1179-86.
35. Sluka KA, Westlund KN: An experimental arthritis model in rats: the effects of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. *Neurosci Lett* 1993; 149: 99-102.
36. Ugolini A, Corsi M, Bordi F: Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology* 1997; 36:1047-55.
37. Chen Y, Bacon G, Sher E, Clark BP, Kallman MJ, Wright RA, et al: Evaluation of the activity of a novel metabotropic glutamate receptor antagonist ($\pm$)-2-amino-2-(3 *cis* and *trans*-carboxycyclobutyl-3-(9-thioxanthyl)propionic acid) *in vitro* neonatal spinal cord and *in vitro* pain model. *Neuroscience* 2000; 95: 787-93.
38. Westlund KN, Sun YC, Sluka KA, Dougherty PM, Sorkin LS, Willis WD: Neural changes in acute arthritis in monkeys. II. Increased glutamate immunoreactivity in the medial articular nerve. *Brain Res Rev* 1992; 17: 15-27.
39. Neugebauer V, Schaible HG, Schmidt RF: Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. *European J Physiology* 1989; 415: 330-5.
40. Zhou S, Komak S, Du J, Carlton SM: Metabotropic glutamate 1 α receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. *Brain Res* 2001; 913: 18-26.
41. Walker K, Reeve A, Bowes M, Winter J, Wotherspoon G, Davis A, et al: mGlu5 receptors and nociceptive function II. MGLu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurons mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2001; 40: 10-19.
42. Min SS, Han JS, Kim YI, Na HS, Yoon YW, Hong SK, et al: A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. *Neurosci Lett* 2001; 308: 95-8.
43. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas, T, et al: Pain related behavior in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004; 112: 83-93.
44. Schött E, Berge OG, Möller A, Hammarström H, Dalsgaard CJ, Brodin E: Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. *JPM* 1994; 31: 79-83.
45. Zhu CZ, Wilson SG, Mikusa JP, Wismer CT, Guavin DM, Lynch JJ, et al: Role of central and peripheral mGluR5 receptors in post-operative pain in rats. *Pain* 2005; 114: 195-202.
46. Zhu CZ, Wilson SG, Mikusa JP, Wismer CT, Guavin DM, Lynch JJ, et al: Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. *Eur J Pharmacol* 2004; 506: 107-18.