

척수신경결찰 흰쥐에서 척수강내로 투여한 Memantine의 기계적 항이질통 효과

김두식

고신대학교 의과대학 마취통증의학교실

The Effect of Memantine in Reducing Tactile Allodynia in Rats with Spinal Nerve Ligation

Doo-Sik Kim

Department of Anesthesia and Pain Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : Peripheral nerve injury can cause neuropathic pain states in which patients report painful sensation to stimuli that are normally innocuous (allodynia), or enhanced pain mechanism underlying neuropathic pain states are poorly understood. Since spinal glutamate receptor activation is a critical step in central sensitization, leading to spinal hyperexcitability in pain processing.

Methods : Left L5/6 spinal nerves were tightly ligated (SNL) to induce neuropathic pain in Harlan Sprague Dawley rats as described by Kim et al (1992). Two weeks after SNL, memantine 2 mg/kg directly injected into L5/6 spinal region in 10 μ l followed by 10 μ l saline. Hind paw withdrawal thresholds (PWT) to von Frey filament stimulation were tested for mechanical hypersensitivity in SNL rats injected intrathecally with memantine, before and post intrathecal injections in a blinded manner as detailed in Chaplan et al (1994).

Results : Intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine significantly reversed the allodynia state in SNL rats.

Conclusion : The evidence provided by the study shows a strong correlation between inhibition of NMDA receptors and tactile allodynia. Increased NMDA activation can lead to a tactile allodynia under innocuous stimuli. Memantine can block the facilitated state of NMDA receptors and tactile allodynia in the SNL rats.

Key words : Allodynia, NMDA receptor, Memantine

서 론

말초신경 손상 후 통각과민, 이질통, 자발통, 감각이상 등을 증상으로 하는 신경병증성 통증이 유발됨을 볼 수 있다.^{1,2)} 흥분성 아미노산인 glutamate는 일차 구심성 신경 섬유에서 생성되어, 척수 후각의 신경연접 부위에서 분비되어 신경접합후부에 존재하는 몇 가지 수용체에 작용하여 척수 후각 신경세포를 흥분시키는 역할을 한다.³⁾ 이들 glutamate와 작용하는 glutamate 수용체를 작용 약물에 대한 민감도에 따라 N-methyl-D-aspartic acid

(NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), Kainic acid 등의 이온형(ionotropic) 수용체와 대사형(metabotropic) 수용체로 분류한다.^{4,5)} 이중 NMDA 수용체는 전기생리학적 및 약리학적으로 다른 수용체와 명확하게 구분되지만 AMPA 수용체와 Kainate 수용체는 구분의 근거가 충분하지 않아 non-NMDA 수용체로 불린다.⁶⁾ 이들은 서로 다른 과정을 통해 구심성 신경 섬유의 흥분에 기능적으로 관여하여 통각 전달 과정에서 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 전형적인 신경병증성 모델인 척수신경 결찰 모델에서 NMDA 수용체 길항제인 memantine (1-amino-3, 5-dimethyladamantane hydrochloride)을 척수강내로 투여한 후 어떻게 영향을 미치는가 조사하였다.

교신저자 : 김 두 식

주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 복음병원 마취통증의학과 외국
TEL : 051-990-6283, FAX : 051-254-2504

대상 및 방법

1. 척수신경결찰 모델

체중 80-100 g 수컷 흰쥐를 온도, 습도, 소음, 조명이 자동적으로 유지되는 동물사육실에서 물과 먹이를 자유로이 먹을 수 있도록 한 상태에서 3일 동안 환경 적응기간을 기다린다. 수컷 흰쥐를 마취유도용 아크릴 통 안에서 2 vol% Isoflurane과 1 L/min의 산소로 흡입마취 유도하였다. 마취된 상태에서 L1에서 S2까지 등 부분의 털을 제거한 후 마스크를 사용하여 흡입마취를 유지하면서 수술을 시작한다. 체위는 복와위 상태로 수술대 위에 옆드리게 한 후 절개부분을 포함하여 광범위하게 소독하였다. L5 하단에서 S1 범위로 midline에서 5 mm 외측에서 3 cm 정도의 평행하게 절개(longitudinal incision)하여 좌측 척추 옆 근육(paraspinal muscle)을 노출시킨다. 경험적으로 좌측이 우측보다 시술이 편리하여 보통 좌측 척수 신경 결찰을 시행하며 근육을 젖히고 L5에서부터 S1의 좌측 뼈까지 노출시킨다. 장골능(Iliac crest)에서 약간 미측에 L6 횡돌기를 발견할 수 있는데 이 L6횡돌기를 현미경하에 rongeur를 사용하여 주의 깊게 제거한다. 이때 유념할 것은 이 횡돌기 바로 밑으로 L4, L5 척수신경이 주행하는데 보통 L5척수신경이 내측(medial)에, L4 척수신경이 외측(lateral)에 위치하며 이 두 신경은 약간 원위부에서 합쳐진다(Fig 1). L6 척수신경은 천골(Sacrum)밑으로 주행하므로 직접 볼 수는 없고 유리봉 갈고리(glass hook)를 이용한 맹목적 방법(blind technique)으로 신경을 찾아낸 후 결찰한다. 결찰 목표로 하는 척수신경이 L5, L6 두 신경이고 L4 신경이 전혀 손상이 되지 않아야 되고 만약 L4 척수신경의 미약한 손상이라도 입게 된다면 L4 척수

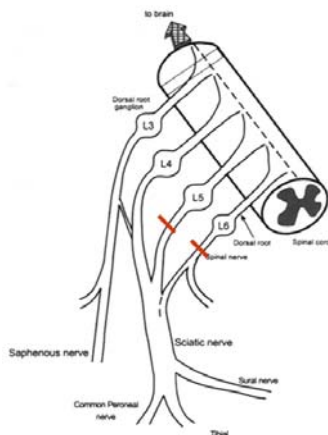


Fig. 1. Ipsilateral L5/L6 spinal nerve ligation model (Kim & Chung 1992)

신경손상으로 나타나는 운동장애인 뒷다리를 끄는 (dragging foot) 상태가 되어 비록 강한 통증반응에도 정확한 양성반응을 보일 수 없으므로 실험에서 제외한다. 이 통증모델의 성공여부의 critical point이다. L5 척수신경과 L6 척수신경을 6-0 silk 로 단단히 결찰한 후 층별로 절개반대 순으로 봉합하였다.

2. 통증행동검사

실험에 사용된 동물은 Harlan Sprague-Dawley 흰쥐 수컷으로 우리 속에서 12시간씩 밤낮을 교대로 유지하며 흰쥐가 항상 자유롭게 먹이와 물을 먹을 수 있도록 하였다. 척수신경 결찰전과 후 von Frey filament를 사용하여 흰쥐 양발바닥을 자극하여 자극에 대한 반응을 기록하였다.

해당 흰쥐를 자유롭게 움직일 수 있는 상태에서 철판(간격, 12 × 12 mm)위에 올려놓고, 그 위에 투명한 플라스틱 덮개(21 × 27 × 15 cm)를 씌운 후 주위 환경에 적응하게 하였다. 기계적 자극에 대한 반응 검사는 철판 밑에서 발바닥 중 5, 6 번째 요추신경이 지배하는 영역을 von Frey filament (Stoelting Co IL)로 강도가 약한 것에서 강한 순서로(1.4 g, 2.0 g, 4.0 g, 6.0 g, 8.0 g, 10.0 g, 15.0 g, 26.0 g) 약간 구부러질때까지 up-down technique으로 압력을 가하는 자극을 주었을 때 회피 반응이 있는지를 관찰하였다. 이때 빠르게 다리를 들거나 자극을 피하는 행동을 보이면 회피 반응(withdrawal response)이 있는 것으로 간주하였고 자극에 반응이 없는 경우에는 한 단계 높은 강도의 자극을 가하였다. 한 번의 자극은 약 5초간 실시하였고 자극과 자극의 시간 간격은 30초로 하였다. 모두 여섯 차례 검사한 후 계산하여 50% von Frey filament Paw withdrawal threshold (PWT) 값을 산출하였

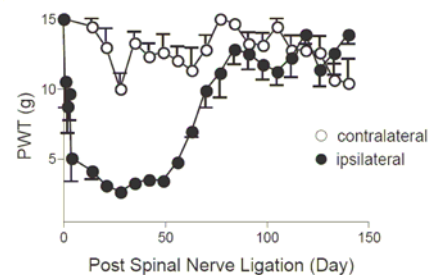


Fig. 2. Spinal nerve ligated rats developed reduced paw withdrawal thresholds to von Frey filament stimulation (tactile allodynia) at the ipsilateral side compared with contralateral side, followed by a recovery phase. Means SEM, n = 6

다. 척수신경 결찰 후 이틀에서 삼일이 지나면 von Frey 필라멘트 검사에서 50% PWT의 감소를 보이기 시작하여 보통 1주일 경에는 촉각성 이질통(tactile allodynia) 발현이 50% PWT에서 4 g 미만으로 통각에 예민한 상태를 보이며 3개월 가량동안 이질통을 계속 보이다가 이질통이 사라지는 경향을 보인다. 본 연구에서도 척수신경결찰 1주일 후 50% PWT는 3.5 g을 보였으며 척수강내 주입 실험은 척수신경결찰 2주일 후에 시작하였다(Fig 2).

3. 척수강내 약물주입

약물의 척수강내 투여는 척수강내 catheter를 삽입한 후 약을 주입하는 방법과 직접 바늘로 요부 척수강 천자 후 약을 주입하는 방법이 있다. 저자는 직접 천자 후 약물 주입방법을 사용하였으며 따로 catheter는 거치지 않았다. 실험에 사용된 약물은 memantine (MW=215.76, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)로 4℃ 냉장고에 보관하였다. 약물의 척수강내 투여는 산소와 isoflurane 흡입마취 유도 후 등쪽 털을 깎은 후 옆드린 자세로 수술대 위에 놓고 요부전만을 감소시킨 자세를 취했다. 시술 방법은 흡입마취상태에서 복외위자세를 취한 후 microinjector에 30 G 바늘을 연결하여 정확한 용량을 전달하기 위해 Hamilton syringe에 glycerine oil-생리식염수-약물 순서로 syringe 내에 채운다. 요부전만(lumbar lordosis)을 줄인 후 수직으로 직접 요부 5-6번째 inter-lamina approach를 하였고 정확한 위치 확인은 바늘이 경막외천자시 보이는 tail-flick movements를 기준으로 하였다.

일단 경막외천자가 성공적으로 된 후 바늘을 고정시킨 후 geared microinjector가 붙은 Hamilton glass syringe를 사용하여 drug-saline 순서로 약 20초 동안에 걸쳐 주입하였다. 주입이 끝나면 바늘을 뺀 후 추가로 주입 신호를 누르면 glycerine oil이 나오면 성공적으로 약물과 생리식염수가 주입되었다고 생각하였다.

4. 척수강내 memantine 주입 후 통증행동검사로 약물 작용 평가

척수신경결찰 후 이질통이 명확한 2주에 열두 마리의 흰쥐를 대상으로 실험을 시작하였다. 여섯 마리는 대조군으로 생리식염수를 주입하였고 나머지 여섯 마리는 실험군으로 memantine을 척수강내로 주입하였다. 생리식염수와 NMDA 길항제인 memantine 주입 후 미치는 효과를 von Frey 필라멘트에 자극에 의한 50% PWT로 평가하였다. 척수강내 약물 주입 후 30분 간격으로 3시간 까지 측

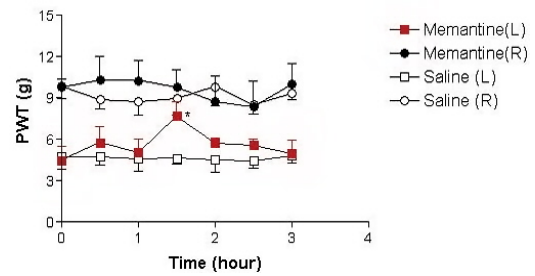


Fig. 3. The tactile allodynia in the spinal nerve ligation rats could be reversed by intrathecal injection of memantine 2 mg/kg at 1.5 hour after injection. L:Left(spinal nerve ligated site), R:Right. *: $P < 0.05$ compared with Saline(L) group.

정하였다. 쥐의 생체리듬의 영향을 최소화 하고자 주간 실험을 하였으며 최소한 저녁 6시 이전에 실험을 끝내도록 하였다.

결 과

1) 척수강내 memantine 주입 후 흰쥐의 PWT 변화
약물 주입 후 30분 간격으로 50% PWT 측정에서 신경 결찰된 좌측 뒷다리에서는 memantine을 주입한 군에서 1시간 30분 후에 생리식염수를 주입한 군에 비해 50% PWT의 유의한 증가가 관찰되었으나 30분, 1시간, 2시간, 2시간 30분, 3시간에서는 차이가 없었다. 또한 신경결찰을 하지 않은 우측 다리에서는 두 군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig 3).

고 찰

Glutamate는 일차 구심성 신경의 손상 후 후근신경절(dorsal root ganglion)내에서 생성되어 신경 말단에서 분비되어 척수 후각 세포들을 흥분시킨다.⁷⁾ 신경말단에서 분비된 흥분성 아미노산인 glutamate와 substance P는 연결 부위에서 척수 후각의 수용체와 결합하여 척수 후각 신경세포를 흥분시키는 중요한 역할을 한다.³⁾ 이들 glutamate 수용체를 크게 분류하면 직접 수용체를 통한 이온의 이동이 일어나는 이온형(ionotropic) 수용체와 G-protein의 중개에 의한 대사형(metabotropic) 수용체로 분류한다. 이온형 수용체는 NMDA 수용체와 AMPA, kainic acid 등이 있으며 대사형 수용체도 여러 군으로 나

는다.^{4,6)} 그 외 여러 신경모델에서 aspartate나 glutamate와 같은 흥분성 아미노산이 척수부위에서 증가하는 것을 볼 수 있다.^{8,9)} 이러한 NMDA의 작용에 관한 연구와 실험이 진행되었는데 동물실험에서 척수강내로 NMDA 작용제를 투여한 후 말초에 열자극이나 저강도의 기계적 자극을 가하면 민감하고 과다한 행동변화를 보였다.^{10,11)} 반면에 NMDA 수용체 길항제의 척수강내 투여는 일차성 구심성 신경섬유의 반복적인 자극에 의한 wind-up 현상을 완화시킨다는 보고도 있다.^{12,13)}

이와 같은 결과들은 척수 후각에서 glutamate system이 중추신경의 통증전달과정과 진행에 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 보여주며 흥분성 아미노산이 일차성 구심성 섬유의 말단에서 분비되고 척수 후각의 신경세포막에 존재하는 NMDA 혹은 non-NMDA 수용체와 결합하여 활성화되고 나면 중추감작(central sensitization)으로 진행됨을 설명한다. NMDA 수용체의 활성화는 ligand-gated calcium 통로를 열어 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키는데 이때 수용체를 phencyclidine (PCP) site, polyamine site, strychnine-insensitive glycine regulatory site, magnesium binding site 등을 포함한 몇 개의 allosteric site가 통로의 개폐에 영향을 준다. 반면에 non-NMDA 수용체는 ligand-gated calcium 통로에 직접 작용하는 것이 아니라 sodium 통로에 작용하여 신경세포막의 탈분극을 일으켜 NMDA 수용체를 통로를 막고 있는 magnesium을 제거함으로써 NMDA 수용체의 활성화에 의한 calcium 통로의 개방을 촉진시킨다.¹⁴⁾ 실험에 사용한 memantine은 발작이나 운동장애 등의 부작용이 있을 수 있는데 적정 용량을 찾기 위한 사전 실험에서 memantine 5 mg/kg의 척수강내 주입 경우 시행한 여섯 마리 쥐 모두에서 하지마비를 보였는데 주입 후 10분 뒤에는 운동기능 회복을 보였다. 그러나 본 연구에서 주입한 용량인 memantine 2 mg/kg의 척수강내 주입에서는 전혀 하지마비를 보이지 않았다.¹⁵⁾ 흰쥐의 좌측 L5/6 척추신경 결찰모델에서 신경병증성 통증의 전형적인 증상인 기계적 자극에 대한 이질통이 충분히 발현된 상태에서 NMDA 길항제인 memantine 2 mg/kg의 척수강내 투여가 척수 후각에 중추감작을 차단하여 무해성 자극에 대한 이질통의 감소를 볼 수 있었다.

Yamamoto 등¹⁶⁾은 좌골신경을 결찰해서 만든 열자극에 의한 통각과민 상태에서 척수에 주입한 NMDA 수용체 길항제가 효과가 있었다고 보고하였고 Mao 등¹⁷⁾은 흰쥐의 좌골신경을 느슨하게 결찰하여 그 원위부에서 발생되

는 열자극에 의한 통각과민 상태에서 non-NMDA 수용체 길항제인 CNQX의 척수강내 단회투여가 통각과민 상태를 감소시키지 못한다고 보고하였다. 이와 같은 보고들은 우리의 관찰과 비슷한 결과이며 NMDA 수용체 길항제 중 MK801과 마찬가지로 memantine의 척수강내 주입도 통각과민을 억제하는 것으로 보이고 NMDA 수용체 길항제는 반복적인 C 섬유의 자극에 의해서 발생하는 척수 후각세포의 촉진(facilitation) 상태를 억제하는 것으로 보인다. 다른 연구와 비교했을 때 신경모델이 차이를 보이고 약제의 종류, 투여량, 투여방법 등과도 관련이 있겠지만 glutamate 수용체 중 일차성 구심성 섬유의 결찰에 의한 지속적인 자극에 의해 중추감작을 일으키는데 NMDA 수용체 활성화가 더 관련이 있다고 본다. Memantine은 임상적으로 파킨슨 효과와 항간질효과로 알려져 있고 특히 유럽에서 파킨슨치료에 효과가 뛰어나면서도 부작용은 거의 없는 약제로 알려져 있다. 본 연구에서 나타난 바와 같이 임상적으로 신경병증성 통증에 NMDA 길항제인 memantine 사용이 고려될 수 있다고 생각되지만 여러 다양한 경로와 용량에 대해 더 많은 연구가 필요하리라 생각한다.

결론

말초신경 손상 후 신경병증성 통증은 흥분성 아미노산인 glutamate 물질이 척수 후각의 신경연접 부위에서 분비되어 신경접합후부에 존재하는 몇 가지 glutamate 수용체에 작용하여 척수 후각 신경세포를 흥분시키는 역할을 한다. 이들 glutamate 수용체 중 NMDA 수용체를 선택적으로 차단하기 위하여 NMDA 수용체 길항제인 memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane hydrochloride)을 척수강내로 주입하였을 때 주입 1시간 30분 후 이질통 감소를 보였다. 이는 memantine을 인간에서 파킨슨병이나 항간질치료 이외에 신경병증성통증에도 적용할 수 있다는 가능성을 제시하나 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- 1) Sheen K, Chung JM : Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model. Brain Res 610:62-68, 1993
- 2) Kim SH, Chung JM : An experimental model for peripheral

- neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363, 1992
- 3) Battaglia G, Rustioni A : Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 277:302-312, 1988
- 4) Littauer UZ, Dudai Y, Silman I, Teichberg VI, Vogel Z : Neurotransmitters and their receptors, 1st ed., London, Wiley, 1980, 333-347
- 5) Lombardini JB, Kenny AD : The role of peptides and amino acids as neurotransmitters, 1st ed, New York, Alan Liss, 1981, 19-27
- 6) Davies J, Evans RH, Jones AW, Smith DAS, Watkins JC : Differential activation and blockade of excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous systems. *Comp Biochem Physiol* 72:211-224, 1982
- 7) Schneider SP, Peri ER : Comparison of primary afferent and glutamate excitation of neurons in the mammalian spinal dorsal horn. *J Neurosci* 8:2062-2073, 1988
- 8) Sulka KA, Westlund KN : An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate increases. *Neurosci Lett* 145:141-144, 1992
- 9) Mamborg AB, Yaksh TL : The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol* 114:1069-1075, 1995
- 10)Coderre TJ, Melzack R : The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formain-induced tissue injury. *J Neurosci* 12:3665-3670, 1992
- 11) Malmberg AB, Yaksh TL : Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance-P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 257:1276-1279, 1992
- 12) Davies SN, Lodge D : Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in "wind-up" of class 2 neurons in the dorsal horn of the rat. *Brain Res* 424:402-406, 1987
- 13) Dickenson AH, Sullivan AF : Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following C fiber stimulation. *Neuropharmacology* 26:1235-1238, 1987
- 14) Lodge D, Johnson KM : Non-competitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trens Pharmacol Sci* 11:167-172, 1990
- 15) Netzer, R., and Bigalke, H : Memantine reduces repetitive action potential firing in spinal cord nerve cell cultures. *Eur J Pharmacol* 186(2-3):149-155, 1990
- 16) Yamamoto T, Yaksh TL : Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain* 49:121-128, 1992
- 17) Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DJ : Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 598:271-278, 1992
- 18) Schneider E, Fischer PA, Clemens R, Balzereit F, Funfgeld EW, Haase HJ : Effects of oral memantine administration on Parkinson symptoms: Results of a placebo controlled multicenter study. *Dtsch Med Wochenschr* 109:987, 1984
- 19) Wesemann W, Sturm G, Funfgeld EW : Distribution of metabolism of the potential anti-parkinson drug memantine in the haman. *J Neural Transm Suppl* 16:143-148, 1980