

신경손상에 의해 유발된 과민통반응에서 말초 케모카인 CCL3의 역할

연세대학교 의과대학 생리학교실, *마취통증의학교실 및 마취통증의학연구소

임중우 · 이현주 · 남택상 · 윤덕미*

The Role of the Peripheral Chemokine, CCL3, in Hyperalgesia following Peripheral Nerve Injury in the Rat

Joong Woo Leem, Ph.D., Hyun Joo Lee, M.S., Taick Sang Nam, M.D., Ph.D., and Duck Mi Yoon, M.D., Ph.D.*

Department of Physiology, *Department of Anesthesiology and Pain Medicine and Anesthesia & Pain Research Institute, Yonsei University Medical College, Seoul, Korea

Background: Upregulation of one type of the pro-inflammatory chemokine (CCL2) and its receptor (CCR2) following peripheral nerve injury contributes to the induction of neuropathic pain. Here, we examined whether another type of chemokine (CCL3) is involved in neuropathic pain.

Methods: We measured changes in mechanical and thermal sensitivity in the hind paws of naïve rats or rats with an L5 spinal nerve ligation (SNL) after intra-plantar injection of CCL3 or met-RANTES, an antagonist of the CCL3 receptor, CCR1. We also measured CCL3 levels in the sciatic nerve and the hind paw skin as well as CCR1 expression in dorsal root ganglion (DRG) cells from the lumbar spinal segments.

Results: Intra-plantar injection of CCL3 into the hind paw of naive rats mimicked L5 SNL-produced hyperalgesia. Intra-plantar injection of met-RANTES into the hind paw of rats with L5 SNL attenuated hyperalgesia. L5 SNL increased CCL3 levels in the sciatic nerve and the hind paw skin on the affected side. The number of CCR1-positive DRG cells in the lumbar segments was not changed following L5 SNL.

Conclusions: Partial peripheral nerve injury increases local CCL3 levels along the degenerating axons during Wallerian degeneration. This CCL3 binds to its receptor, CCR1, located on adjacent uninjured afferents, presumably nociceptors, to induce hyperalgesia in the neuropathic pain state. (Korean J Pain 2008; 21: 187-196)

Key Words: CCL3, chemokine, hyperalgesia, neuropathic pain, spinal nerve injury.

서 론

말초신경계의 손상이나 중추신경계의 손상의 결과로서 신경병증통증이 유발된다. 이들 신경병증통증의 특징적인 증상은 특별한 자극을 주지 않았음에도 지속적

이고 비정상적으로 타는 듯한 자발통, 기계적 또는 높은 온도의 유해 자극이 가해졌을 때 정상에 비해 통증을 강하게 느끼는 통각과민, 비유해성인 기계자극이나 열자극에 대해서도 통증으로 인식하는 이질통 등이 있다.¹⁾

신경손상 후 말초 및 중추신경계에서는 염증반응과 함께 면역과정이 유도되고 이것이 신경병증통증에 기여

접수일 : 2008년 10월 28일, 승인일 : 2008년 11월 25일
책임저자 : 윤덕미, (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 마취통증의학교실 및
마취통증의학연구소
Tel: 02-2228-2408, Fax: 02-312-7185
E-mail: dmyoon@yuhs.ac

본 연구는 연세대학교 의과대학 2006년도 교수연구비(6-2006-0065)에 의하여 이루어졌음.

Received October 28, 2008, Accepted November 25, 2008
Correspondence to: Duck Mi Yoon
Department of Anesthesiology and Pain Medicine and Anesthesia & Pain Research Institute, Yonsei University College of Medicine, 134, Shinchon-dong Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2408, Fax: +82-2-312-7185
E-mail: dmyoon@yuhs.ac
This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 2006 (6-2006-0065).

할 수 있는데, 이는 신경손상에 반응하여 염증세포(비만세포, 중성세포, 대식세포 등)가 모여들고 상주하는 면역세포가 활성화하여 여러 염증중재물의 생성과 분비를 유도함을 보인 연구결과에²⁻⁴⁾ 의해 뒷받침된다. 염증중재물 중 사이토카인의 한 종류인 케모카인(chemokine)은 2-4개의 시스테인(cystein)을 포함한 100개 이상의 아미노산으로 구성되며 G-단백 커플 수용체에 결합하는 특성을 보이는데, 아미노기 말단의 시스테인(cystein)의 수 및 위치 차이에 따라 4개의 아계(subfamily)로 분리된다. 대부분의 케모카인은 CC (CC motif, β chemokine)와 CXC (α -chemokine) 아계로 구성되어 있다.⁵⁻⁷⁾ N-말단에 두개의 시스테인이 있는 경우에는 CC 아계로 분류되며 CXC 아계의 경우에는 2개의 시스테인과 하나의 아미노산으로 이루어져 있다. 이들 아계 중 아미노기 말단에 두 개의 시스테인이 서로 인접되어 있는 것을 케모카인 아계(CC chemokine)라 하는데 이에 28개의 상동형이 있다(CCL1-28). 이들 상동형 중 CCL2와 CCL3는 각각 단핵세포와 대식세포에서 분비되는 염증전구물질로서 생물학적 특성을 반영하여 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)과 macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)로 불리어지기도 하고, 조직손상에 따른 염증 상황이나 신경손상에 따른 신경병증 상황에서 그 생성이나 분비가 증가하는 것으로 밝혀졌다.⁸⁻¹¹⁾

CCL2와 CCL3 중 CCL2가 염증성통증과 신경병증통증에 기여할 것임이 다음의 실험결과에 기초하여 제안되었다. 즉, 염증이나 신경손상 부위에서 CCL2 생성이 증가하며, CCL2의 수용체인 CCR2의 mRNA 발현이 염증 조직이나 손상된 구심신경에서 증가하였다.¹¹⁾ 또한 CCR2 결여 생쥐(CCR2 knockout mice)에서 염증성통증 반응과 신경병증통증반응이 유발되지 않음이 관찰되었다.¹²⁾ 한편 CCL3의 경우는 염증반응에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 염증 유발 시 염증조직에서는 CCL3와 그 수용체인 CCR1의 발현이 증가하며,¹³⁾ CCR1 수용체 길항제의 처치가 염증 유발을 억제시켰다.^{14,15)} 그러나 신경병증 상황에서의 CCL3와 그의 수용체인 CCR1의 발현변화에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 CCL3가 말초신경 손상에 의한 신경병증통증 유발에 관여하는지 알아보는 일환으로서, 신경병증통증 모델로 잘 알려진 제5요 척수신경결찰(L5 spinal nerve ligation, L5 SNL) 모델 쥐를 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 첫째 CCL3가 정상 쥐에서 과민통반응을 유발하며 L5 SNL로 인한 신경손상에 의해 유발된 과민통 반응이 CCL3의 억제제에 의하여 완화되

는지 조사하고, 둘째 손상된 신경이나 손상된 신경이 분포하는 발피부 부위에서 CCL3의 생성에 변화가 있는지 조사하고, 셋째 손상된 신경 주변의 구심신경에서 CCL3의 수용체인 CCR1의 발현에 변화가 있는지 조사하였다.

대상 및 방법

1. 제5요 척수신경 손상 신경병증통증 모델 제작

본 연구는 연세대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회에서 승인을 받은 후 규정에 따라 진행되었다. 실험대상인 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley, 180-200 g)를 사용하였다. 신경병증통증 모델로 Kim과 Chung이¹⁶⁾ 개발한 제5요 척수신경 결찰법을 약간 수정하여 시행하였다. 즉 실험동물을 enflurane (유도 3%, 유지 2%)과 O₂의 혼합가스로 흡입 마취시킨 상태에서, 좌측 제5요 척수신경을 노출한 뒤 수술용 견사(6-0)를 이용해 노출된 신경을 결찰한 후 결찰부위에서 말초 쪽으로 1 mm 정도 되는 곳을 절단하였는데, 이에 의해 신경병증통증이 효과적으로 유발됨은 확인한 바 있다.¹⁷⁾ 신경손상을 받은 동물은 근육과 피부를 다시 봉합한 후 회복실로 복귀시켰다(L5 spinal nerve ligation, L5 SNL).

2. 행동학적 실험

제5요 척수신경병증통증 모델에 있어서 통증반응의 유발여부 및 완화여부는 행동검사를 통해 조사하였다.

1) 열적 과민통반응: 실험동물을 투명한 유리바닥 위에 위치한 투명한 플라스틱 상자에 넣은 후 스트레스를 줄이기 위하여 15분 동안 환경에 적응 시켰다. 열자극은 프로젝트 램프를 이용해 자체 제작한 자극기를 이용하여 광원이 아래에서 유리바닥을 통과하여 쥐의 발바닥 중앙 부위에 초점이 맞춰질 수 있도록 쏘여 줌으로서 가해주었다. 신경병증통증 모델 쥐의 경우 발을 오므리게 되어 중앙부위가 바닥에 닿지 않을 때에는 바닥에 닿는 부위 중에 일차적으로 가장 중앙에 가까운 부위를 쏘여 주며 그렇지 않을 경우에는 발 뒷부분을 쏘여 주었다. 광원의 강도는 정상 쥐 발바닥에 쏘여 주었을 때 발이 회피할 때까지의 시간, 즉 발회피잠복기간(paw withdrawal latency)이 11 ± 1 초가 되도록 조정하였다. 조직의 손상을 피하기 위하여 가해주는 열자극을 20초가 넘지 않게 하였다. 5분 간격으로 3회 측정된 것의 평균을 결과로 얻었다.

2) 기계적 과민통반응: 실험동물을 금속철망(망 간격, 0.5 × 0.5 cm)으로 된 바닥 위에 위치한 투명한 플라스틱

상자(8 × 8 × 25 cm) 안에 넣은 후 환경 변화에 따른 스트레스를 피하도록 15분간 환경에 적응시켰다. 동물이 적응한 후에 다양한 강도의 필라멘트(von Frey filament; 0.35, 0.53, 0.78, 2.5, 3.7, 5.2, 8.0, 20 g)가 부착된 자극기를 사용하여 필라멘트를 뒷발바닥에 가해주면서 발의 회피반응 여부를 조사하였다. 여기서 회피반응을 일으키기 위한 필라멘트의 최저 강도를 발회피역치(paw withdrawal threshold)라고 정의하고 이를 구하여 기계적 통증반응의 지표로 삼았다. 회피반응의 역치는 기존에 발표된 상하 검증법(up-down testing paradigm)으로¹⁸⁾ 측정하였다.

3. 약물투여

CCL3 (rat MIP-1 α , Peprotech, Rehovot, Israel)와 CCL3의 수용체인 CCR1의 길항제인 Met-RANTES (R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 각각 정상 쥐와 L5 SNL 모델 쥐의 좌측 발바닥에 주입한 후 발의 기계자극이나 열자극에 대한 회피반응 역치의 변화를 조사하였다. 각 물질은 주사하기 직전에 멸균한 0.1 M 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)에 녹여서 사용하였다. 약물주입 방법으로는 발바닥 내 피하주사(intraplantar injection)를 시행하였다. 쥐를 흡입마취 시킨 후에 Hamilton 주사기에 부착된 바늘(26-gauge)을 좌측 발바닥 중앙부 피하에 삽입하고 서서히 약 2분에 걸쳐 약물(30 μ l)을 주입하였다. 이때 약물 주입 시나 주입 완료 후 주사바늘 제거 시에 약물이 역류되어 밖으로 새어 나오지 않는지를 수술 현미경으로 관찰하면서 확인하였다.

정상 쥐를 사용한 약물투여 실험은 6개의 군을 대상으로 실시하였다. 즉 열자극에 대한 회피역치 조사를 위한 CCL3 주입군, 생리식염수 주입군, CCL3 및 met-RANTES 주입군(각 군 n = 9)과 기계자극에 대한 회피역치 조사를 위한 CCL3 주입군, 생리식염수 주입군, CCL3 및 met-RANTES 주입군이다(각 군 n = 9). 한편 L5 SNL 모델 쥐를 사용한 약물투여 실험은 4개 군을 대상으로 신경손상 후 3일째에 시행하였다. 즉 열자극에 대한 회피역치 조사를 위한 met-RANTES 주입군 및 생리식염수 주입군(각 군 n = 8)과 기계자극에 대한 회피역치 조사를 위한 met-RANTES 주입군 및 생리식염수 주입군이다(각 군 n = 8).

4. 효소결합 면역흡수 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

제5요 척수신경 손상을 가한 이후에 1, 3, 5, 7, 14, 21 일째 되는 6개 실험군과 대조군으로서의 정상 쥐를 대상으로 좌우측에서 채취한 좌골신경과 발피부조직에서의 CCL3 농도를 측정하였다(각 실험군의 모델 쥐 n = 6, 정상 쥐 n = 3). 좌골신경은 신경손상 부위에서 2 cm 떨어진 곳에서부터 1.5 cm를 잘라 적출하였으며, 반대측의 대칭되는 지점에서 동일한 길이의 좌골신경도 적출하였다. 또한 뒷발의 발바닥 피부조직을 신경손상 측과 반대측 발에서 적출하였다. 채취한 좌골신경과 발피부조직을 -80°C 냉동고에서 실험을 시행하기 직전까지 보관하였다. 실험을 시행하기 위하여 포본을 4°C에서 녹인 후 좌골신경과 발피부조직은 단백질 분해를 막는 억제제(protease inhibitor)를 포함한 lysis buffer (20 mM imidazole-HCl, pH 6.8, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1.0% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM sodium molybdate, 1 mM EDTA, 1 μ g/ml of leupeptin, aprotinin, and PMSF, sigma, Roche)에서 균질화(homogenization)시켰다. 원심분리(10,000 g, 4°C, 10 min)를 한 뒤, 상층액을 취하고 ELISA kit (rat MIP-1 α , Antigenix America, New York, NY, USA)를 이용하여 ELISA 분석을 시행하였다. 표준곡선(standard curve)은 CCL3 (rat CCL3, Antigenix America, New York, NY, USA)를 이용하여 100 ng/ml에서부터 1/2씩 순차적으로 희석하였고(serial dilution) 광학밀도는 450 nm 파장에서 분석하였다.

5. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

제5요 척수신경 손상 후 배근절(dorsal root ganglion) 내 CCR1을 발현하는 배근절세포의 수적 변화가 있는지를 알아보기 위해 척수신경을 결찰한 뒤 3일째 된 모델 쥐와 대조군으로서의 정상 쥐로부터(모델 쥐 n = 6, 정상 쥐 n = 3) 좌우측의 L4 및 L5 배근절을 채취하여 면역조직화학 염색법을 실시하였다.

1) 표본제작: 흰 쥐를 마취한 후 0.1 M PBS를 심장을 통해 관류하고, 4% 중성완충 포르말린 고정액(0.1 M PBS를 용매로 이용, pH 7.4)으로 관류고정 하였다. 배근절(L4 및 L5)을 신경손상측 및 손상 반대측에서 적출한 후 4% 중성완충 포르말린 고정액에 4시간 동안 고정한 뒤, 4°C에서 sucrose가 첨가된 PBS에 담가두었다(10%, 20%, 30% sucrose 용액에서 각각 4시간, 4시간, 12시간). 배근절은 동결절편 제작용 포매제(optical cutting tem-

perature, OCT compound, Torrance, CA, USA)를 이용하여 통상 표본 제작과정에 따라 포매한 뒤 저온도 미세절단기를 이용하여 -21°C 에서 $14\ \mu\text{m}$ 의 두께로 동결절편하였다. 절편된 조직은 양이온으로 처리된 슬라이드(Pro-beon plus-slide, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 붙인 후 면역조직화학 염색을 위하여 -80°C 에서 보관하였다.

2) 면역조직 화학염색법(immunohistochemistry): 절편 조직은 배경염색을 막기 위해 PBS로 세정하여 포매제를 잘 씻어내어 1시간 동안 blocking한 후, 1 : 100으로 희석한 anti-CCR1 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 실온에서 하룻밤 동안 처리한 뒤 PBS로 세척하였다. 다음 이차항체인 biotinylated anti-rabbit IgG 항체를 1시간 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 그 뒤 HRP-conjugated streptavidin을 붙인 후 상온에서 10분 동안 incubation하였다(Histostain-plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA). 이를 3,5-diaminobenzidine (DAB)으로 발색하였다(DAB-plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA). 면역반응 양성 신경세포를 계수하기(counting) 위하여 헤마톡실린(hematoxylin)으로 적절하게 핵염색을 실시하였다. 에탄올 계열로 탈수하고 xylene으로 투명시킨 후 봉입과정을 거친 후 현미경 관찰을 하였다.

3) 관찰 및 계측: 각 배근절 내에서 CCR1-면역반응 양성세포 수와 총 신경세포 수를 세어 비율로 나타내었다. 총 신경세포의 계수 시 hematoxylin에 진하게 염색된 세포만을 포함하였다. 배근절세포의 세포체 직경은 세포체 원주의 장축과 단축을 측정하여 그 평균값으로 계측하였다. 장축과 단축의 측정은 영상자료 분석 프로그램(Meta-Morph image analyzer, Universal Imaging Corp., Downington, PA, USA)을 이용하여 실시하였다. 배근절 세포는 Harper와 Lawson 등에¹⁹⁾ 의해 제시한 세포직경의 크기에 따라 $30\ \mu\text{m}$ 이하는 소형세포, $30-50\ \mu\text{m}$ 는 중형세포, 그리고 $50\ \mu\text{m}$ 이상은 대형세포로 분류하였다.

6. 통계분석

계측한 모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 배근절 내 면역반응 양성 신경세포의 개수에 관해 다른 처리를 받은 군 간의 비교와 CCL3의 농도에 관해 신경손상 후 시간 경과가 다른 군 간의 비교는 unpaired *t*-tests를 통해 분석하였다. 행동학적 실험에서 피하주사한 약물에 대한 회피반응 변화는 주사 전 대조값과 약물 주사 시간 경과 후 값 간의 paired *t*-test를 통해 분석하였

다. 각 경우에 있어서 *P* 값이 0.05보다 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 제5요 척수신경손상에 의한 과민통반응 유발에서 CCL3의 관련 여부

CCL3를 정상 쥐 발바닥에 주입 하였을 때 열자극에 대한 발회피반응을 보일 때까지의 시간인 발회피잠복기간과 기계자극에 대한 발회피반응의 역치인 발회피역치를 측정함으로써, 각각 열적 및 기계적 과민통반응을 조사하였다(Fig. 1). 발바닥에 CCL3 ($8\ \mu\text{g}/\text{PBS}\ 30\ \mu\text{l}$)를 주입한 경우는($n = 9$) 생리식염수($30\ \mu\text{l}$)를 주입한 경우에($n = 9$) 비하여 열자극에 대한 발회피잠복기간이 주입 직후 의미 있게 감소했으며 이러한 감소는 약 5시간 정도(Fig. 1A) 유지되었다. 그러나 CCL3의 수용체인 CCR1의 길항제인 met-RANTES를 CCL3와 함께 주입한($8\ \mu\text{g}\ \text{CCL3} + 7.5\ \mu\text{g}\ \text{met-RANTES}$ in $30\ \mu\text{l}\ \text{PBS}$) 경우($n = 9$)에서는 열자극에 대한 발회피잠복기간에 있어서 변화를 보이지 않았다. 이와 유사한 결과가 약물주입 후 기계자극에 대한 발회피역치의 변화를 조사한 실험에서도 관찰되었다. 즉 CCL3 ($8\ \mu\text{g}/\text{PBS}\ 30\ \mu\text{l}$)를 주입한 경우($n = 9$)는 PBS를 주입한 경우($n = 9$)에 비하여 기계자극에 대한 발회피역치가 주입 직후 의미 있게 감소했으며 이러한 감소는 약 3시간 정도(Fig. 1B) 유지되었다. 그러나 이 경우도 CCL3의 수용체인 CCR1의 길항제인 met-RANTES를 CCL3와 함께 주입($8\ \mu\text{g}\ \text{CCL3} + 7.5\ \mu\text{g}\ \text{met-RANTES}$ in $30\ \mu\text{l}\ \text{PBS}$)한 경우($n = 9$)에서는 기계자극에 대한 발회피역치의 변화를 보이지 않았다.

제5요 척수신경손상에 의해 유발된 과민통반응에 CCL3가 관여하는지를 알아보기 위해 신경손상 쪽 발바닥에 CCL3의 작용을 차단하는 met-RANTES를 주입한 후 과민통반응의 변화를 조사하였다. 이미 잘 알려져 있는 바와 같이, 제5요 척수신경손상은 열적 및 기계적 과민통반응을 유발하는데 이들 과민통반응은 신경손상 후 1-2일 사이에 최대에 도달해서 수 개월 이상 유지된다. 본 실험에서는 척수신경손상에 의한 과민통반응이 최대에 도달한 후 3일째에 met-RANTES의 효과를 조사하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이, 신경손상에 의해 감소된 열자극에 대한 발회피잠복기간을 보인 실험 쥐 중 met-RANTES ($7.5\ \mu\text{l}/\text{PBS}\ 30\ \mu\text{l}$)를 주입한 경우($n = 8$)는 생리식염수($30\ \mu\text{l}$)를 주입한 경우($n = 8$)에 비하여 발회피잠복기간이 약물주입 후 30분부터 시작하여 5시간가량 유의

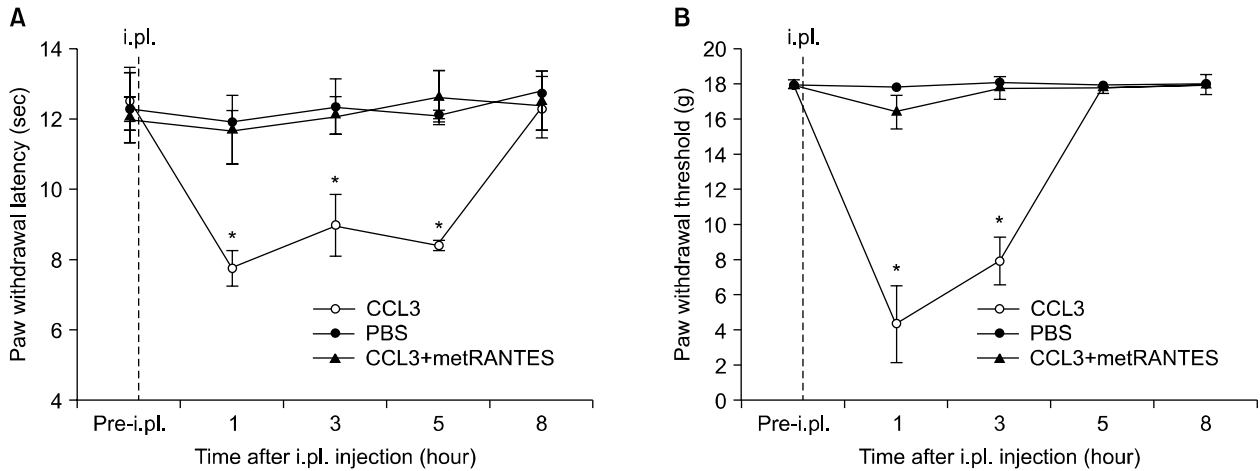


Fig. 1. Effects of intraplantar injection of CCL3 on thermal and mechanical sensitivities of the hind paw of the naive rat. The CCL3 (8 μ g in 30 μ l PBS) injection results in a decrease in paw withdrawal latencies to heat stimuli (A), a sign of thermal hyperalgesia, as well as a decrease in paw withdrawal threshold to mechanical stimuli (B), a sign of mechanical hyperalgesia. Each hyperalgesia was prevented from occurring when CCL3 receptor antagonist met-RANTES is co-injected with CCL3 (8 μ g CCL3 plus 7.5 μ g met-RANTES in 30 μ l PBS). * $P < 0.05$ compared with PBS injected hind paws.

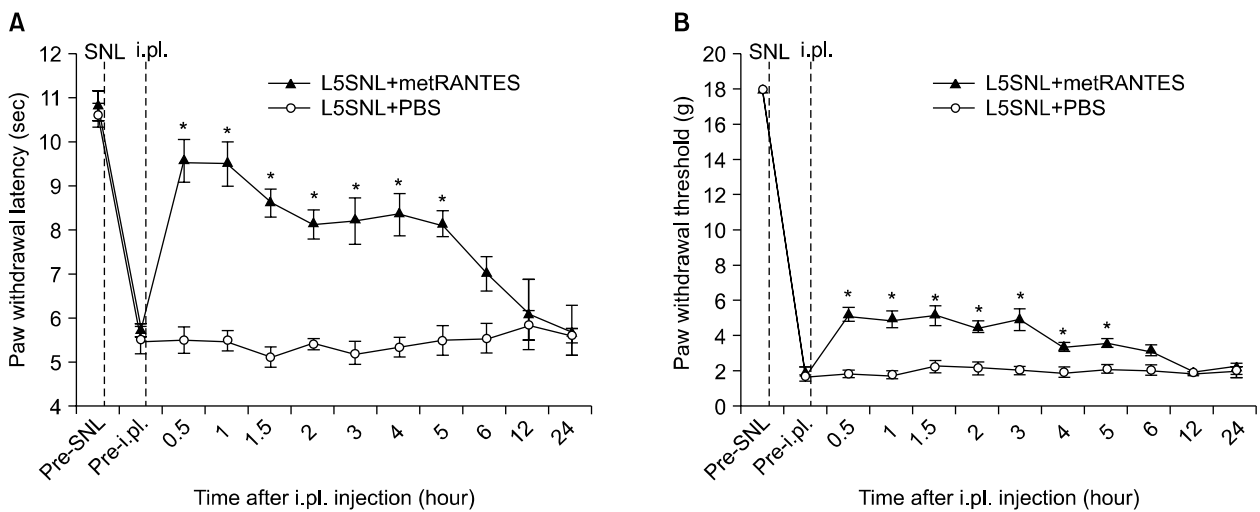


Fig. 2. Effects of intraplantar injection of met-RANTES on thermal and mechanical hypersensitivities established after L5 spinal nerve ligation. L5 spinal nerve ligation results in a decrease in paw withdrawal latencies to heat stimuli (A) as well as a decrease in paw withdrawal threshold to mechanical stimuli (B). On post-operative day 3, met-RANTES (7.5 μ g met-RANTES in 30 μ l PBS) injected into the affected hind paw leads to a reversal of both decreased paw withdrawal latencies and decreased paw withdrawal thresholds. * $P < 0.05$ compared with PBS-injected hind paws.

미하게 반진되어 증가하였다. 한편 제5요 척수신경손상에 의해 생성된 기계적 통증반응에 대한 met-RANTES의 효과를 조사한 결과를 Fig. 2B에 나타내었다. 즉 신경손상에 의해 감소된 von Frey 필라멘트 자극에 대한 발회피역치를 보인 실험 쥐 중 met-RANTES (7.5 μ l/PBS 30 μ l)를 주입한 경우(n = 8)는 생리식염수(30 μ l)를 주입한 경우(n = 8)에 비하여 발회피역치가 약물주입 후

30분부터 시작하여 3시간가량 유의미하게 반진되어 증가하였다.

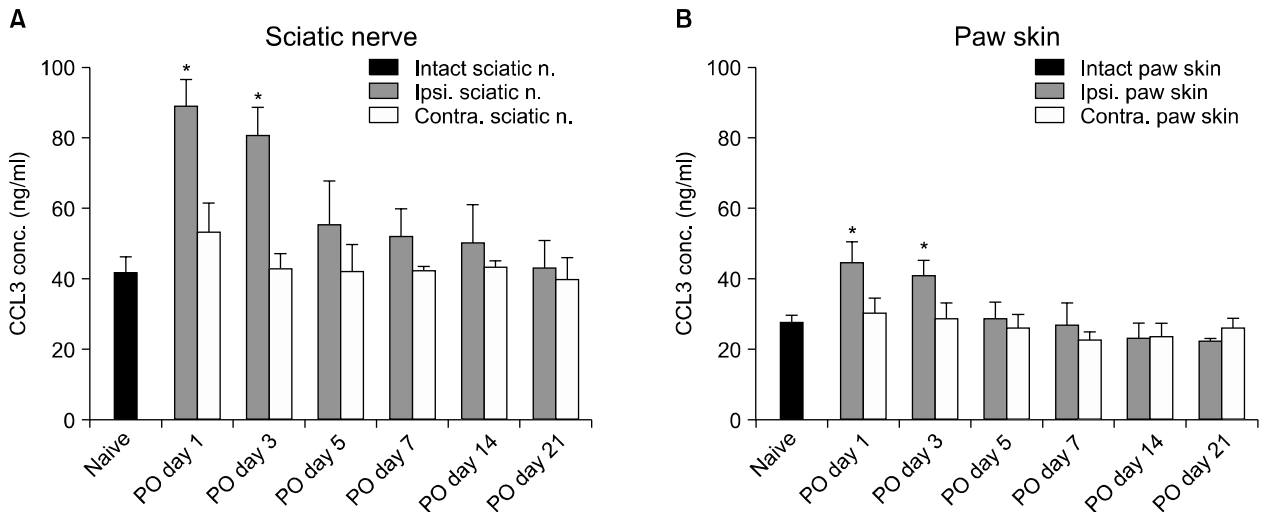


Fig. 3. Changes in CCL3 levels in the sciatic nerve and the paw skin of rats at different times after L5 spinal nerve ligation. Concentrations of CCLs are measured from a piece of the sciatic nerve (A) or from a part of the sole of the hind paw skin (B), which are distally placed from the ligature. The CCL3 levels of both the sciatic nerve and the paw skin on the ipsilateral side increase significantly in groups of post-operative day 1 and 3 as compared with naïve rats. Such CCL3 levels return to the baseline on post-operative day 5 and remain so until post-operative day 21. The CCL3 levels of the sciatic nerve and the paw skin on the contralateral side is not significantly different from those of naive rats. **P* < 0.05 compared with naive rats.

2. 제5요 척수신경손상 후 퇴화되는 신경섬유가 있는 말초 쪽 좌골신경 및 발피부 부위에서의 CCL3 농도 변화

제5요 척수신경손상 후에 왈레리변성(Wallerian degeneration)이 진행되는 신경섬유가 있는 말초 쪽 좌골신경 및 발피부 부위에서의 CCL3 농도변화를 효소결합면역흡수 분석법을 이용하여 측정하였다. 먼저 신경손상을 가한 이후에 1, 3, 5, 7, 14, 21일째 되는 6개 실험군과 대조군으로서의 정상 쥐를 대상으로 좌우측에서 채취한 좌골신경과 발피부에서의 CCL3 농도를 조사하였다(각 실험군의 모델 쥐 n = 6, 정상 쥐 n = 3). Fig. 3A에 나타냈듯이, 정상 쥐인 대조군에서 채취한 좌골신경 내 CCL3 농도(41.97 ± 3.78 ng/ml)에 비해 신경손상 후 1일째 실험군과 3일째 실험군에서 채취한 좌골신경 내 CCL3 농도는 각각 89.48 ± 7.41 ng/ml와 80.69 ± 7.98 ng/ml로서 유의미한 증가를 보였다. 이와 유사한 증가현상이 신경손상 쪽 뒷발의 피부조직에서도 관찰되었다. Fig. 3B에서 볼 수 있듯이, 정상 쥐인 대조군에서 채취한 발피부에서의 CCL3 농도(27.62 ± 1.96 ng/ml)에 비해 신경손상 후 1일째 실험군과 3일째 실험군에서 채취한 발피부에서의 CCL3 농도는 각각 45.12 ± 5.24 ng/ml와 40.89 ± 4.81 ng/ml로서 유의미한 증가를 보였다.

3. 제5요 척수신경손상 후 손상된 신경섬유에 이웃하는 비손상 구심신경이 있는 L4-DRG 내의 CCR1-발현 신경세포의 변화

제5요 척수신경 손상 후 배근절 내 CCR1을 발현하는 배근절세포의 수적 변화가 있는지를 알아보기 위해 척수신경을 절찰한 뒤 3일째 된 모델 쥐와 대조군으로서의 정상 쥐로부터(모델 쥐 n = 6, 정상 쥐 n = 3) 채취한 좌우측의 L4 및 L5 배근절을 대상으로 CCR1의 항체에 대한 면역반응에 양성을 보이는 신경세포를 조사하였다. 그 전형적인 예를 Fig. 4에서 볼 수 있는데, 면역반응 양성 배근절세포는 주로 직경이 비교적 작은 세포였다. 이러한 CCR1 면역반응 양성 배근절세포를 계수하여 직경이 $5 \mu\text{m}$ 씩 증가하는 크기의 무리로 분류하여 각 무리에 포함되는 신경세포 수의 분포를 히스토그램으로 Fig. 5에 나타내었다. 각각의 배근절에 존재하는 총 신경세포 수의 평균값은 모든 집단 간에 유의미한 차이가 없었다. 또한 정상 쥐의 배근절(L4 및 L5) 내 CCR1 면역양성세포가 차지하는 비율과 비교하여 제5요 척수손상 모델 쥐의 손상 측 L4 또는 L5-배근절과 반대 측 L4 또는 L5-배근절 내 CCR1 면역양성세포가 차지하는 비율은 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.

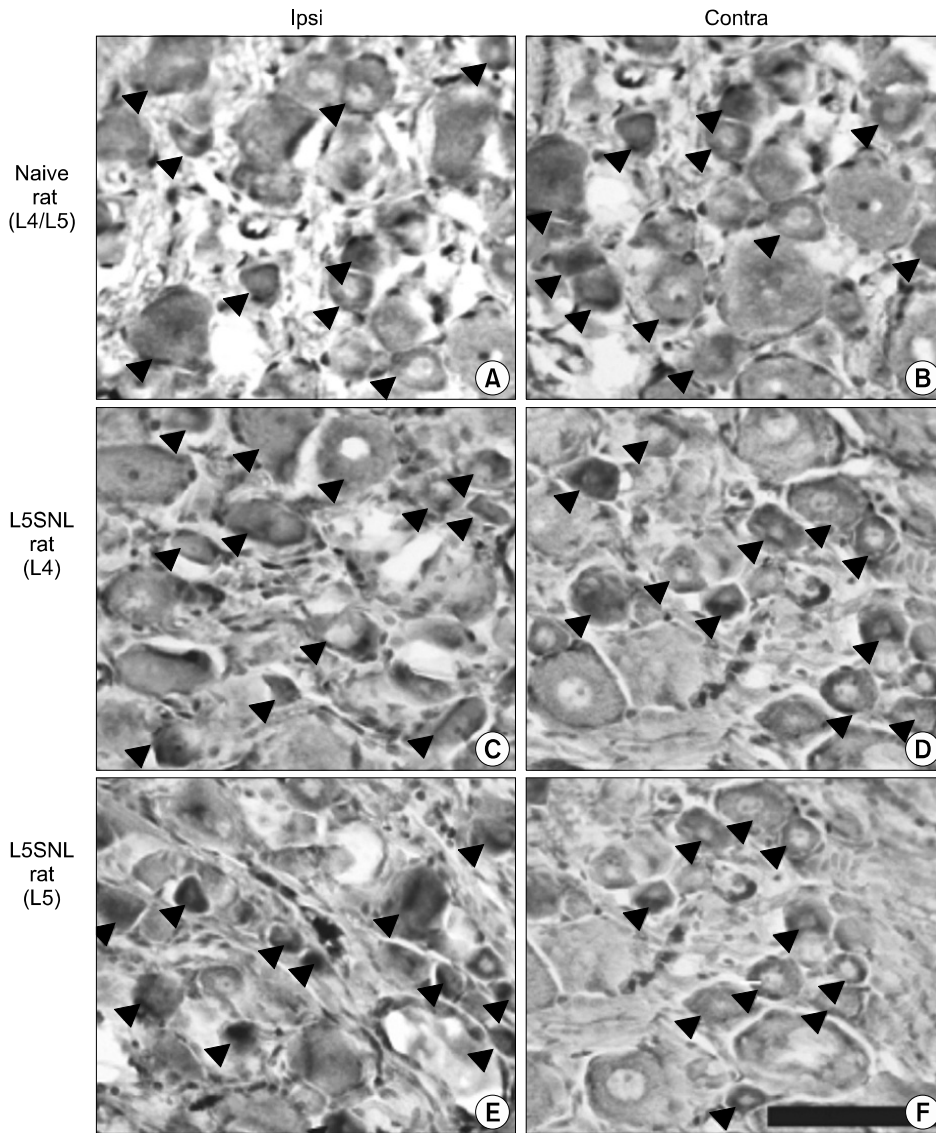


Fig. 4. Photomicrographs of immunohistochemical staining of lumbar dorsal root ganglia after incubation with anti-CCR1. The majority of CCR1 immunoreactive neurons are small- and medium-sized ones as indicated by arrowheads. The proportions of CCR1 immunoreactive neurons in both L4 and L5 dorsal root ganglia appear not to be different between naive and L5 spinal nerve ligation rats. The same holds true for such proportions on the ipsilateral side versus the contralateral side of L5 spinal nerve ligation rats. Scale bar, 100 μ m.

고 찰

본 실험에서는 제5요 척수신경 결찰(L5 SNL) 모델을 이용하여, 손상신경이 분포하는 뒷발피부에서 CCL3의 작동을 차단한 결과 이 모델에서 관찰된 기계적 및 열적 과민통반응이 완화됨을 보였다. 또한 CCL3를 정상 쥐 발바닥에 주입하였을 때 L5 SNL에 의해 생성된 기계적 및 열적 과민통반응과 유사한 반응이 유발되었으며, 이 과민통반응은 CCL3의 수용체 차단제에 의해 억제되었다. 그리고 L5 SNL 후 신경 손상부위의 말초 쪽 좌골신경 조직에서 CCL3의 농도가 정상 쥐의 경우와 비교하여 유의미하게 증가하였는데, 특히 신경손상 후 1일과 3일

째 날에 증가함이 관찰되었다. 이와 비슷한 CCL3의 증가는 신경손상 측의 뒷발 피부조직에서도 관찰되었다. 마지막으로 CCL3의 수용체인 CCR1은 정상상황에서 뒷발에 분포하는 통각수용성 구심신경(nociceptive afferent neuron)에 존재하는데, L5 SNL 후에 이 CCR1을 보유한 통각수용성 구심신경은 수적으로 아무 변화를 보이지 않았다.

정상 쥐의 발에 피하주사 한 CCL3는 기계적 및 열적 과민통반응을 유발하였는데 이러한 과민통반응은 L5 SNL에 의해 생성된 기계적 및 열적 과민통반응과 유사하였다. 또한 CCL3의 피하주사에 의해 유발된 과민통반응은 CCL3의 수용체 차단제인 met-RANTES를 함께 주사하면 그 생성이 억제됨을 보였다. 이들 결과로부터 L5

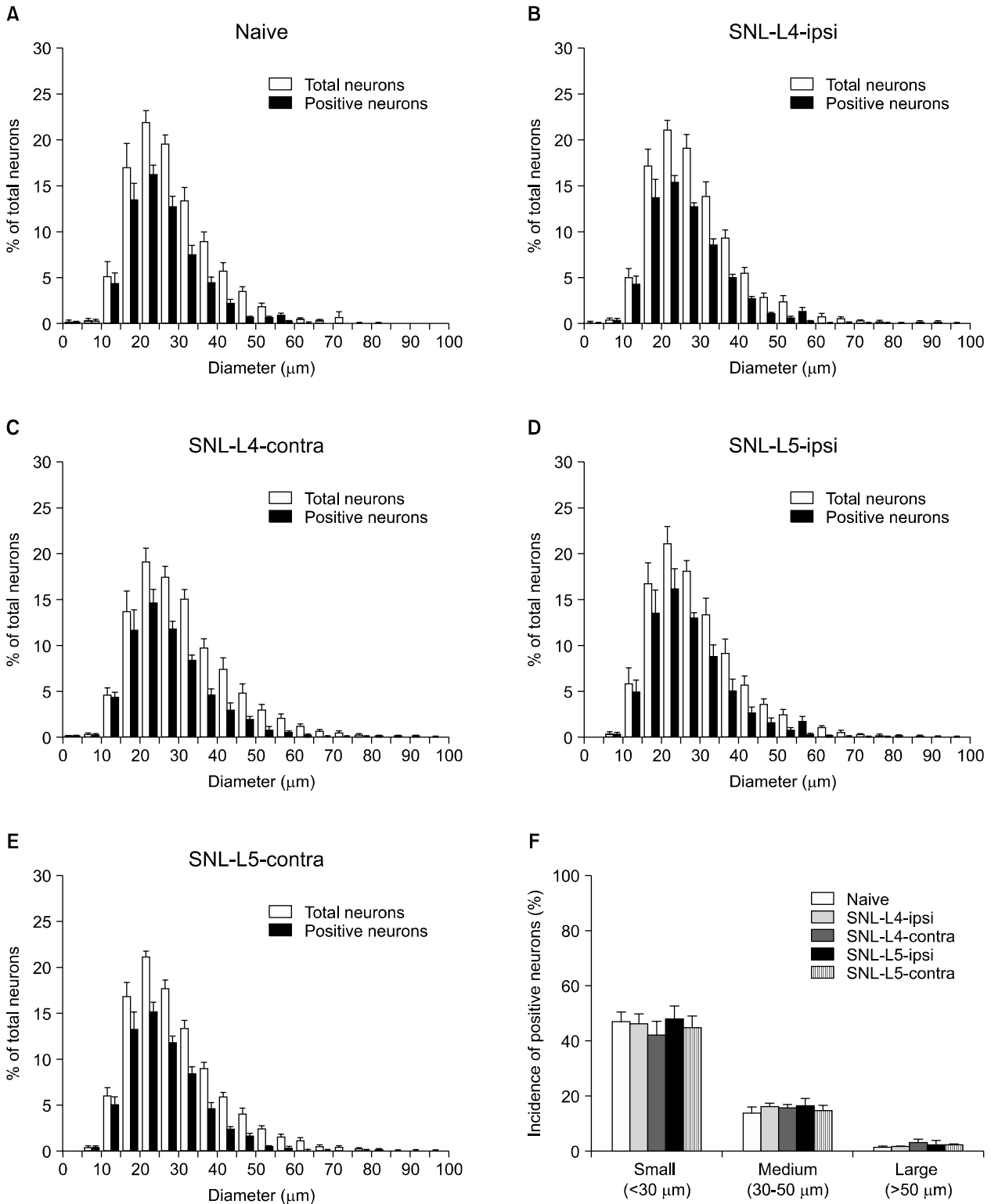


Fig. 5. Size distributions of CCR1 immuno-reactive neurons in dorsal root ganglia of lumbar spinal segments of rats. Histograms indicate the mean number of total (unfilled bars) and CCR1 immuno-reactive neurons (filled bars) belonging to particular groups of neurons with soma at different diameters ranging from 5 to 100 μm with a 5- μm step increment for naive rats and L5 spinal nerve ligation rats (A–E). The proportions of CCR1 immuno-reactive neurons classified into small (< 30 μm), medium (30–50 μm), and large (> 50 μm) groups are shown in F. No significant differences in proportions of CCR1 immuno-reactive positive neurons in L4 and L5 dorsal root ganglia are observed for all groups of neurons between naive and L5 spinal nerve ligation rats.

SNL에 의한 과민통반응의 생성은 CCL3가 수용체인 CCR1에 작용하여 이루어질 것임을 추측할 수 있다. 또한 L5 SNL에 의해 생성된 기계적 및 열적 과민통반응이 유지되는 상황에서 손상 측 발피부에 국소적으로 주입해 준 CCR1 수용체 차단제인 met-RANTES에 의해 과민통반응이 완화됨을 보였는데, 이 결과는 뒷발의 피부조직에서 CCL3에 의한 CCR1 수용체의 지속적인 활성화가 과민통반응의 유지(maintenance)에 기여함을 의미한다.

CCL3는 관절염과 같은 염증상황에서 주로 대식세포로부터 분비됨이 밝혀졌다.²⁰⁾ 또한 면역보강제(adjuvant)를 피하에 주입한 관절염모델을 이용한 연구에서 염증조직 내 CCL3의 mRNA 발현이 증가하고 CCL3 항체에 양성반응을 보이는 세포가 증가함이 보고되었다.^{14,15)} 이들 실험결과는 염증상황 시 CCL3 생성에 관여하는 세포의 수가 증가하고 그 결과 많은 양의 CCL3가 분비될 것임을 의미한다. 한편, 좌골신경이 완전절단된 상황에서 절단된 좌우 근위부 신경조직에서 CCL3의 농도가 증가하고⁹⁾ CCL3의 mRNA가 양적으로 증가하였음이 밝혀졌는데,²¹⁾ 이로 보아 신경손상 시 손상부위에서 국소적으로 염증상황이 유도됨을 알 수 있다. 본 연구에서는 L5 SNL 후 말초 쪽으로 분포하는 손상된 신경섬유를 포함하는 좌골신경 부위와 발피부 부위에서 CCL3의 농도가 정상 쥐의 경우와 비교하여 손상 후 3일째까지 최대의 증가함을 보이다가 5일째에 원상으로 회복됨을 보였다. 이들 좌골신경 부위와 발피부 부위에는 왈레리변성을 보이는 손상신경 축색과 손상 받지 않은 구심신경의 축색들이 밀착하여 함께 뒤섞여 존재한다. 이로 보아 왈레리변성이 진행되는 부위에서 염증반응에 의해 증가한 CCL3가 주변의 손상 받지 않은 구심신경 특히 통각성구심섬유에 작용하여 그 반응성에 영향을 미칠 수 있음을 생각해 볼 수 있다.

쥐의 체감각성 구심신경에는 정상상태에서도 CCR1이 발현되어 있음이 관찰된 바 있다.²²⁾ 염증조직에서는 CCL3 농도와 CCR1 발현이 증가되어 있음이 보고되었다.^{14,15)} 본 실험에서는 신경병증 상황으로서 말초신경에 부분적으로 손상이 가해진 경우에 CCR1의 발현이 어떻게 변화하는지를 조사하였다. 이를 위해 손상 받은 구심신경과 손상 받지 않은 구심신경의 배근절세포체(dorsal root ganglion cell)를 대상으로 CCR1 항체에 대해 면역반응을 보이는 신경세포의 수적 변화를 검사하였다. 이에 관한 이론적 배경으로는 병리적상황에서 특정단백질을 발현하는 신경세포가 여러 성장인자(trophic factor)의 작용으로 인하여 수적으로 증가하는 경우가 자주 관찰된

다는 점이다.²³⁻²⁵⁾ 그러나 본 실험결과는 부분적 신경손상 후 손상 측이나 손상 반대 측 모두에서 CCR1 항체에 대해 면역양성반응을 보이는 세포의 수적 변화가 손상 신경세포나 비손상신경세포에서 관찰되지 않았다. 그러나 수적인 면에서의 변화와는 상관없이 신경세포 내 CCR1 발현이 증가되었을 가능성을 배제할 수 없다. 실제로 전립선암과 관련한 macrophage migration inhibitory factor의 경우 이들을 포함하는 세포의 수적 변화 없이 그 발현이 항진됨이 보고된 바 있다.²⁶⁾ 따라서 L5 SNL 후 좌골신경 부위에서 발현되는 CCR1의 세포 내 단백질이나 mRNA 수준에서의 양적 변화에 관한 연구가 차후 수행되어야 할 것이다.

말초신경의 부분손상에 따른 신경병증 시 손상부위에서 말초 쪽의 신경에서 생성된 CCL3가 기계적 및 열적 과민통반응 유발에 어떻게 기여하는지에 관하여 아직 밝혀진 바가 없다. 그러나 CCL3가 열과 캡사이신의 수용체인 TRPV1 채널을 민감화시킨다는 보고는²²⁾ 그 기전 설명을 위한 단서를 제공한다. 즉, 부분적 말초신경 손상 후 손상신경의 말초 쪽으로 진행되는 왈레리변성 부위에서 국소적으로 염증반응이 유도되고 그 결과 CCL3를 포함하는 여러 염증전구물질이 생성되어 분비될 것이다. 특히 CCL3는 왈레리변성이 진행되는 손상된 구심섬유의 주변에 있는 비손상 통각수용성 구심신경에 존재하는 수용체인 CCR1에 작용하여 TRPV1 채널을 민감화 할 것이다. 이를 통해 통각수용성 구심신경은 민감화 되고 결과적으로는 과민통반응이 유발될 것으로 생각한다.

결론적으로, 부분적 말초 신경손상에 의해 유발된 기계적 및 열적 과민통반응 유발에는 손상신경 부위에서 케모카인 CCL3의 발현 증가가 관여한다고 생각한다. 한편 CCL3 수용체인 CCR1을 보유한 구심신경의 수적 증가는 관찰되지 않았으나, CCL3 증가에 따른 CCR1의 증가를 가정한다면 단일 신경 내 CCR1 발현 증가를 추측해 볼 수 있다. 임상적인 측면에서 CCL3의 작용을 효과적으로 차단하는 CCR1 길항제의 개발은 신경병증통증의 효과적인 치료를 위한 한 방법이 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999; 353: 1959-64.
2. Schroeter M, Jander S: T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med* 2005; 7:

- 183-95.
3. Scholz J, Woolf CJ: Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002; 5(Suppl): 1062-7.
 4. Marchand F, Perretti M, McMahon SB: Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 521-32.
 5. Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.
 6. Tran PB, Miller RJ: Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 444-55.
 7. White FA, Bhargoo SK, Miller RJ: Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 834-44.
 8. Taskinen HS, R ytt  M: Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv Syst* 2000; 5: 75-81.
 9. Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M: Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res* 2004; 48: 463-9.
 10. Carollo M, Hogaboam CM, Kunkel SL, Delaney S, Christie MI, Perretti M: Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1166-79.
 11. Abbadie C: Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol* 2005; 26: 529-34.
 12. Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, Peterson LB, Mudgett JS, Bayne EK, et al: Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7947-52.
 13. Shahrara S, Amin MA, Woods JM, Haines GK, Koch AE: Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3568-83.
 14. Shahrara S, Proudfoot AE, Woods JM, Ruth JH, Amin MA, Park CC, et al: Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1907-19.
 15. Bhatia M, Proudfoot AE, Wells TN, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J: Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 698-704.
 16. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-63.
 17. Jang JH, Nam TS, Yoon DM, Leem JW, Paik GS: Role of peripheral glutamate receptors to mechanical hyperalgesia following nerve injury or antidromic stimulation of L5 spinal nerve in rats with the previous L5 dorsal rhizotomy. *Korean J Pain* 2006; 19: 33-44.
 18. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55-63.
 19. Harper AA, Lawson SN: Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 1985; 359: 31-46.
 20. Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, Hesselgesser J, Strieter R, et al: Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J Clin Invest* 1998; 101: 2910-9.
 21. Perrin FE, Lacroix S, Avil s-Trigueros M, David S: Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin1beta in Wallerian degeneration. *Brain* 2005; 128: 854-66.
 22. Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, et al: A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4536-41.
 23. George A, Kleinschnitz C, Zelenka M, Brinkhoff J, Stoll G, Sommer C: Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 2004; 188: 187-91.
 24. Mahad DJ, Trebst C, Kivis kk P, Staugaitis SM, Tucky B, Wei T, et al: Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 262-73.
 25. Haas CS, Martinez RJ, Attia N, Haines GK 3rd, Campbell PL, Koch AE: Chemokine receptor expression in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3718-30.
 26. Meyer-Siegler K, Fattor RA, Hudson PB: Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7: 44-50.