

케모카인 CCL3가 말초신경 손상에
의한 과민통 반응에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

이 현 주

케모카인 CCL3가 말초신경 손상에
의한 과민통 반응에 미치는 영향

지도교수 임 중 우

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2007년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

이 현 주

이현주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 6월

감사의 글

나의 가는 길을 오직 그가 아시나니 그가 나를 단련하신 후에 내가 정금같이 나오리라 욥기 23:10

본 논문이 이루어지기까지 가르침을 베풀어주시고 예리한 지적으로 끊임없이 과학적인 사고를 가르쳐주신 임중우 교수님께 감사와 존경을 드립니다. 논문지도를 위해 애써주시고 아낌없는 조언해 주신 남택상 교수님과 그리고 김종선 교수님께도 깊이 감사드립니다. 면역학교실의 최수정 선생님과 해부학교실의 안수경 선생님의 효소결합 면역흡수 분석법과 면역조직화학염색법과 같은 실험기법들을 가르쳐주심에 감사드립니다. 일일이 헤아릴 수 없지만 생리학 교실 모든 선생님들께도 감사드리며 특별히 민경에게 이 글을 통해 고마운 마음을 전합니다. 각기 다른 전공이지만 함께 연세대에서 공부할 수 있었던 순령, 진희, 혜경, 보금 그리고 영경이 그들과 기쁨을 함께 나누겠습니다. 10년 전, 우리는 꿈을 공유 할 수 있었는데 먼저 그 꿈을 실현하여 제게 힘이 되어준 배우 하재숙에게 감사드리며 힘든 시간을 보내고 있는 그녀에게 제가 힘이 되어주고 싶습니다. 기도로 중보해 주신 화평교회 이재옥 목

사님과 천준호, 강현구, 청년교구 이상현 목사님께도 감사드리며 화평교회동기들 희진, 수진, 금순, 유래, 소희에게 고마움을 전합니다. 약리학교실에서 모인 연대 목요성경공부모임의 최형철 목사님 그리고 보람, 지현, 민주, 경주, 보미, 선화 선생님에게 감사드립니다. 제게 위로의 시간이었습니다. 멀리 시드니에서 주희, 광저우에서 원영이 콜로라도에서 수민 서울까지 사랑과 격려를 보내주었던 이들에게도 감사의 마음을 전합니다. 신혜, 순영, 문경, 미조 그리고 경희에게도 감사를 전합니다. 측량할 수 없는 사랑으로 길러주시고 무한한 지지를 보내주신 부모님과 사랑하는 가족 진주와 준노 그리고 어느 곳이라도 함께 있을 성현과 이 기쁨을 나누고자 합니다.

그러나 나의 나된 것은 하나님의 은혜로 된 것이니...

고린도전서 15:10

영광, 그 이전에 반드시 십자가 고난의 시간이 있음을 알게 하셨습니다. 아무것도 보이지 않아 캄캄한 터널에서 끝도 보이지 않는 시간의 때 하나님, 그분을 전적으로 의지하고 신뢰하는 것임을 깨닫게 하심을 감사드리며 모든 영광과 존귀를 드립니다.

저자 씀

<차례>

국문요약.....	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 제5요 척수 손상신경병증 통증모델제작	5
2. 행동학적 실험	5
가. 약물투여	5
나. 열적 과민통 반응	6
다. 기계적 과민통 반응	6
3. 면역염색법	7
가. 표본제작	7
나. 면역조직화학염색법	7
다. 관찰 및 계측	8
4. 효소결합 면역흡수 분석법	8
5. 통계분석	9
III. 결과	10
1. 정상 쥐와 모델 쥐의 발바닥 피하에 주사한 CCL3와 CCR1 길항제 에 의한 열 및 기계자극에 대한 발 민감도의 변화	10
2. 배근절 내 CCR1- 면역반응 양성 신경세포	13
3. 손상신경 부위에서의 CCL3의 농도변화.....	16
IV. 고찰.....	20
V. 결론.....	22
참고문헌.....	25
영문요약.....	30

그림 차례

그림1. CCL3를 정상 쥐 발바닥에 주입했을 때 유발된 기계적 및 열적 과민통 반응의 확인.....	11
그림2. 제5요 척수 신경손상 모델 쥐의 말초에 가해진 CCR1 수용체의 길항제의 열적 과민통증에서 효과.....	12
그림3. 제5요 척수 신경손상 모델 쥐의 말초에 가해진 CCR1 수용체의 길항제의 기계적 과민통증에서 효과	13
그림4. 배근절 내 CCR1 양성 신경세포를 보여주는 예	14
그림5. 배근절 내 CCR1 양성 신경세포 비율에 있어서 척수신경 손상 쥐와 정상 쥐 간의 비교	15
그림6. 정상쥐, 모델쥐의 손상측, 모델쥐의 반대측의 좌골신경 간의 CCL3 농도 비교	17
그림 7. 정상쥐, 모델쥐 손상측, 모델쥐 반대측의 L4 배근절	

간에 CCL3 농도 비교18

그림 8. 정상쥐, 모델쥐 손상측, 모델쥐 반대측의 L5 배근절
간에 CCL3 농도 비교19

국문 요약

케모카인 CCL3가 말초신경 손상에 의한 과민통 반응에 미치는 영향

<지도교수 임 중 우>

연세대학교 대학원 의과학과

이 현 주

신경손상은 신경병증(neuropathy)과 이에 수반하는 통증을 초래한다. 신경손상 후 말초 및 중추신경계에서는 염증과 면역반응이 유도되고 염증중재물의 생성과 분비를 초래함이 보고되었다. 이러한 염증중재물 중 케모카인 CCL3는 대식세포에서 분비되는 염증전구물질로서, 조직손상에 따른 염증상황이나 완전신경 절단 상황에서 그 생성이나 분비가 증가하는 것으로 밝혀졌다. CCL3와 그의 수용체인 CCR1의 발현의 증가는 염증과 염증성 통증에 관계된 보고는 있으나, 부분신경손상에 따르는 신경병증 통증 상황에서 CCL3와 CCR1의 발현의 변화에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다.

본 실험에서는 CCL3가 말초신경의 부분손상에 의한 신경병증 통증 유발에 관여하는지 알아보는 일환으로서, 부분신경손상 모델로 잘 알려진 제5요 척수 신경결찰(L5 spinal nerve ligation, L5 SNL) 쥐를 이용하여, CCL3가 신경병증 통증 반응 생성에 관련되어 있는지 행동학적 실험을 통해 알아보았고, 신경손상 인접 부위에서의 CCL3의 발현 증가 여부를 조사하였다. 마지막으로 CCL3의 수용체인 CCR1의 발현 변화 여부를 구심신경의 CCR1 면역양성 정

도를 측정하여 조사하였다.

실험 결과 첫째 L5 SNL에 의해 생성된 열적 및 기계적 과민통은 CCL3의 작용 억제제인 met-RANTES를 발바닥에 피하주사 했을 시 완화되었다. 둘째 이러한 L5 SNL 유도 과민통 반응은 CCL3를 정상 쥐 발바닥에 피하주사 했을 시에도 유사하게 생성되었다. 셋째 L5 SNL 후 신경손상 부위의 말초 쪽인 좌골신경 부위에서 CCL3의 농도는 정상쥐의 경우에 비교하여 유의미하게 증가하였는데, 특히 신경손상 후 1일과 3일 째에 증가가 관찰되었다. 한편 손상 반대 측 좌골신경조직과 좌우 측의 L4- 및 L5-배근절에서는 CCL3 농도의 변화가 없었다. 넷째 CCL3의 수용체인 CCR1에 면역 양성반응을 보이는 구심신경은 좌우 측 L4- 및 L5-배근절 모두에서 정상군의 경우와 비교하여 수적으로 변화를 보이지 않았다.

이상의 결과는 부분적 말초 신경손상에 의해 유발된 기계적 및 열적 과민통 반응 유발에는 손상신경 부위에서 케모카인 CCL3의 발현 증가가 관여함을 보여준다. 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. CCL3의 작용을 효과적으로 차단하는 CCR1 길항제의 개발은 신경병증통증 치료를 위한 새로운 방법이 될 것이다.

핵심되는 말; 신경병증통증, 케모카인, CCL3, 척수신경결찰, 윌레리변성, 기계적 통각과민, 열적 통각과민, 구심신경

케모카인 CCL3가 말초신경 손상에 의한 과민통 반응에 미치는 영향

<지도교수 임 중 우>

연세대학교 대학원 의과학과

이 현 주

I. 서론

말초신경계의 손상이나 중추신경계의 손상의 결과로서 신경병증 통증이 유발 된다¹. 이들 신경병증통증의 특징적인 증상은 특별한 자극을 주지 않았음에도 지속적이고 비정상적으로 타는 듯한 자발통(spontaneous burning pain), 기계적 또는 높은 온도의 유해 자극이 가했을 때 정상에 비해 통증을 강하게 느끼는 통각과민(hyperalgesia), 비유해성 기계 또는 열자극에 대해서도 통증으로 인식하는 이질통(allodynia) 등이 있다².

신경손상 후 말초 및 중추신경계에서는 염증반응과 함께 면역과정이 유도되고 이것이 신경병증통증에 중요한 역할을 할 것임이 제안되었다. 즉 신경손상에 반응하여 염증세포(비만세포, 중성세포, 대식세포 등)가 모여들고 상주하는 면역세포가 활성화하여 여러 염증중재물의 생성과 분비를 초래함이 보고되었다^{3,4,5}. 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)과 CXC(α -chemokine)아계로 구성되어있다^{6,7,8}. N-말단에 두개의 시스테인이 있는 경우에는 CC아계로 분류되며 CXC 아계의 경우에는 2개의 시스테인과 하나의 아미노산으로 이루어져있

다. 이 아계 중 아미노기 말단에 두 개의 시스테인이 서로 인접되어 있는 케모카인 아계(CC chemokine)에는 28개의 상동형(isoform)이 있다(CCL1-28). 이들 상동형 중 CCL2와 CCL3는 각각 단핵세포와 대식세포에서 분비되는 염증전구물질로서 생물학적 특성을 반영하여 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)와 macrophage inflammatory protein-1a(MIP-1a)로 불리어지기도 하고, 조직손상에 따른 염증상황이나 신경손상에 따른 신경병증 상황에서 그 생성이나 분비가 증가하는 것으로 밝혀졌다^{9,10,11}.

CCL2가 염증성통증과 신경병증통증에 기여할 것임이 다음의 실험결과에 기초하여 제안되었다. 즉, 염증이나 신경손상 부위에서 CCL2 생성이 증가하며, CCL2의 수용체인 CCR2의 mRNA 발현도 염증 조직이나 손상된 구심신경에서 증가하였다^{9,12}. 또한 CCR2 결여 생쥐(CCR2 knockout mice)에서 염증성 통증반응과 신경병증통증반응의 유발이 결여되어 있음도 관찰되었다¹². 한편 CCL3의 경우는 염증반응에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 염증 유발 시 염증조직에서는 CCL3와 그 수용체인 CCR1의 발현이 증가하였으며¹³, CCR1 수용체 길항제의 처치는 염증 정도를 완화시켰다^{14,15}. 그러나 신경병증 상황에서의 CCL3와 그의 수용체인 CCR1의 발현변화에 대해서는 알려진 바가 없다.

위에 언급한 연구결과를 토대로 하여 본 실험에서는 CCL3가 말초 신경 손상에 의한 신경병증 통증 유발에 관여하는지 알아보는 일환으로서, 신경병증 통증 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 SNL에 의해 유발된 과민통 반응이 CCL3의 억제제에 의하여 완화되는지 조사하고, 둘째 신경손상 부위에서 CCL3 생성의 증가 여부를 조사하고, 셋째 CCL3의 수용체인 CCR1의 발현증가를 조사하기 위해서 CCR1 면역양성 구심신경의 수적 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 제5요 척수 신경손상신경병증 통증모델제작

본 연구는 연세대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회에서 승인을 받은 후 규정에 따라 진행되었다. 실험대상인 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley, 180-200g)를 사용하였다. 신경병증 통증 모델로 제5요 척수신경 결찰(L5 SNL) 술을 시행하였다. 실험동물을 고농도의 enfluerane(유도 3%, 유지 2%)과 O₂의 혼합가스로 흡입 마취시킨 후, 수술 처치를 시행하였다. 좌측 제 5요 척수신경을 노출한 후 수술용 견사(6-0)를 이용해 노출된 신경을 양쪽으로 두 군데 결찰한 후 결찰부위의 중간을 1 mm정도 말초 쪽 부위를 절단하였다¹⁶. 근육과 피부를 다시 봉합한 후 회복실로 복귀시켰다.

2. 행동학적 실험

제 5요 척수 신경병증 모델에 있어서 통증 반응의 유발여부 및 감소여부는 행동검사를 통해 조사하였다.

가. 약물투여

CCL3(rat MIP-1 α , Peprotech, Rehovot, Israel)와 CCR1 길항제인 met-RANTES¹⁷(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 각각 정상 쥐와 모델 쥐의 좌측 발바닥에 주입한 후 발의 기계자극에 대한 민감도 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 흡입 마취시킨 후에 Hamilton 주사기에 부착된 바늘(26-gauge)을 좌측 발바닥 중앙 부 피하에 삽입하고 서서히 약 2분에 걸쳐 약물을 주입(CCL3 8 μ g/PBS

30 μ l)하였다(n=2). 이때 약물 주입 시나 주입완료 후 주사바늘 제거 시에 약물이 역류되어 밖으로 새어나오지 않는지를 수술 현미경으로 관찰하면서 확인하였다. 각 경우 대조군으로서 동일량의 멸균된 생리식염수를 같은 방법으로 주입하였다. 모델 쥐의 경우 약물을 신경 손상 후에 3일째에 주입하였다.

나. 열적 과민통증

실험동물을 투명한 유리바닥 위에 위치한 투명한 플라스틱 상자에 넣은 후 스트레스를 줄이기 위하여 15분 동안 환경에 적응시켰다. 열자극은 광원을 아래에서 유리바닥을 통과하여 쥐의 발바닥 중앙 부위에 초점이 맞춰질 수 있도록 쥘을 쥘로서 가해주었다¹⁸. 신경병증 통증 모델 쥐의 경우 발을 으르리게 되어 중앙부위가 바닥에 닿지 않을 때에는 바닥에 닿는 부위 중에 일차적으로 가장 중앙에 가까운 부위를 쥘해주며 그렇지 않을 경우에는 발 뒷부분을 쥘해주었다. 광원의 강도는 정상 쥐 발바닥에 쥘 주었을 때 발이 회피할 때까지의 시간 즉 발회피시간이 11 ± 1 초 되게 조정하였다. 조직의 손상을 피하기 위하여 가해주는 열자극을 20초가 넘지 않게 하였다. 5분 간격으로 3회 측정된 것의 평균을 결과로 얻는다. 왼발과 오른발을 무작위적으로 양쪽 모두 측정하였다(n=9).

다. 기계적 과민통반응

실험동물을 금속철망(망 간격, 0.5 x 0.5 cm)으로 된 바닥 위에 위치한 투명한 플라스틱 상자(8 x 8 x 25 cm) 안에 넣은 후 환경 변화에 따른 스트레스를 피하도록 15분간 환경에 적응시켰다. 동물이 적응한 후에 가는 필라멘트(von Frey filament; 3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93, 5.18로서 0.35, 0.53, 0.78, 2.5, 3.7, 5.2, 6.0, 12.5 g에 상응)가 부착된 자극기를 사용하여 필라멘트를 뒷발바닥에 가해주면서 발의 회피반응 여부를 조사하였다. 여기서 회

피반응을 일으키기 위한 필라멘트의 최저 강도를 발회피반응 역치(paw withdrawal threshold, PWT)라고 정의하고 이를 구하여 기계적 통증반응의 지표로 삼았다. 회피 반응의 역치는 기존에 발표된 상하 검증법(up-down testing paradigm)으로 측정하였다¹⁹(n=6).

3. 면역염색법

가. 표본제작

CCR1의 양성 신경세포를 관찰하기 위해 면역조직화학 염색법을 시행하였다. 신경병증 통증 모델 쥐의 경우에는 제 5요 척수신경 결찰 3일 후에 실시하였다. 흰 쥐를 마취한 후 0.1 M PBS로 심장을 통해 관류하고, 4% 중성 완충 포르말린 고정액(0.1 M PBS를 용매로 이용, pH 7.4)으로 관류고정 하였다. 배근절을 적출한 후 4% 중성완충 포르말린 고정액에 4시간동안 고정된 뒤, 4°C에서 sucrose가 첨가된 PBS에 담가 두었다(10%, 20%, 30% sucrose 용액에서 각각 4시간, 4시간, 12시간). 배근절은 동결절편 제작용 포매제(optimal cutting temperature, OCT compound, Torrance, CA, USA)를 이용하여 통상 표본 제작과정에 따라 포매한 뒤 저온도 미세절단기를 이용하여 -21°C에서 14 μ m로 조직을 동결 절편하였다. 절편된 조직은 양이온으로 처리된 슬라이드(Probeon plus-slide, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 붙인 후 -80°C에서 보관하여 필요시 사용하였다.

나. 면역조직 화학염색법(immunohistochemistry)

배근절에서 CCR1의 양성신경세포의 확인을 위해 먼저 박절된 절편조직은 배경염색을 막기 위해 PBS로 세정하여 포매제를 잘 씻어낸 후 1시간 동안 blocking한 후, 1:100으로 희석한 anti-CCR1 항체(Santa Cruz

Biotechnology, Santa cruz, CA, USA)를 실온에서 하룻밤동안 처리한 뒤 PBS 세척하였다. 이에 이차항체인 biotinylated anti-rabbit IgG 항체를 1시간 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 그 뒤 HRP-conjugated streptavidin을 붙인 후 상온에서 10동안 incubation하였다(Histostain-plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA). 이를 3,5-diaminobenzidine(DAB)으로 발색하였다(DAB-plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA). 면역양성 신경세포의 수를 계수하기(counter staining) 위하여 헤마톡실린(hematoxylin)로 적절하게 핵염색을 실시하였다. 에탄올 계열로 탈수하고 xylene으로 투명시킨 후 봉입과정을 거친 후 현미경 관찰을 하였다(n=6).

다. 관찰 및 계측

각 배근절 내에서 CCR1에 대해 양성으로 발색된 세포의 수와 총 배근절 세포 수를 세어 비율로 나타내었다. 총 세포의 계수 시 hematoxylin에 진하게 염색된 세포만을 포함하였다. 배근절 세포의 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)를 이용하여 실시하였다. 배근절세포는 직경의 크기에 따라 30 μm 이하는 소형세포, 30-50 μm 는 중형세포, 그리고 50 μm 이상은 대형세포로 분류하였다²⁰.

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

실험동물은 제5요 척수 신경 손상 후, 1, 3, 5, 7, 14, 21일째로 분류하였다. 신경손상 후 왈레리변성(Wallerian degeneration)이 진행되는 좌골신경(sciatic nerve, n=6) 및 반대측 좌골신경과 좌우측 L4- 및 L5-DRG(n=4)를 대

상으로 하였다. 좌골신경은 신경손상을 한 부위에서 2 cm 떨어진 곳에서부터 1.5 cm를 잘라 적출하였다. 반대측은 대칭되는 같은 지점의 좌골신경을 적출하였다. 채취한 표본을 -80°C 냉동고에서 실험을 시행하기 직전까지 보관하였다. 실험을 시행하기 위하여 표본을 4°C 에서 녹인 후 좌골신경과 배근절은 단백질을 분쇄를 막는 억제제(protease inhibitor)를 포함한 lysis buffer (20 mM imidazole-HCl, pH 6.8, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 1.0% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM sodium molybdate, 1 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of leupeptin, aprotinin, and PMSF, sigma, Roche) 에서 균질화(homogenization)를 시켰다²¹. 원심분리 (10,000 g, 4°C , 10 min)를 한 뒤, 상층액을 취하고 ELISA kit (rat MIP-1 α , Antigenix America, NewYork, NY, USA)에 지시에 따라 ELISA 분석을 시행하였다. 표준 곡선(standard curve)은 CCL3 (rat CCL3, Antigenix America, NewYork, NY, USA)를 이용하여 100 ng/mL부터 1/2씩 순차적으로 희석하였고(serial dilution) 광학밀도는 450 nm파장에서 분석하였다²².

5. 통계분석

계측한 모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 배근절 내 면역반응 양성 신경세포의 개수에 관해 다른 처리를 받은 그룹 간의 비교와 CCL3의 농도에 관해 신경손상 후 시간 경과가 다른 그룹간의 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 분석하였다. 각 경우에 있어서 p 값이 0.05보다 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 정상 쥐와 모델 쥐의 발바닥 피하에 주사한 CCL3과 CCR1 길항제에 의한 열 및 기계자극에 대한 발 민감도의 변화

CCL3를 정상 쥐 발바닥에 주입 하였을 때 제5요 척수신경 손상 시 생성된 과민통 반응과 유사하게 과민통 반응이 생성되었고, 제5요 척수 신경손상 모델에서 관찰된 과민통 반응은 met-RANTES를 주입하여 CCR1의 활성을 차단할 결과 통증반응이 감소됨을 확인하였다. 이때 열과민통 반응의 감소가 기계과민통 반응의 감소에 비하여 감소정도가 약했다.

그림-1에 경우 CCL3의 정상 쥐 발바닥에 주입 시 기계적 및 열적 과민통 반응의 생성효과를 살펴보았다. 이는 제5요 척수 신경손상 신경병증 모델 시 생성되는 과민통 반응과 유사하였다. 그림-1에서 A는 정상 쥐에 CCL3 (8 μg /PBS 30 μl)을 주입한지 1시간 후부터 3, 5, 8시간 후에 발바닥에 가해준 열 자극에 대한 발회피 반응을 보이기까지의 시간을 조사하였는데, 발회피시간은 CCL3 주입 후 1시간에서 5시간까지 대조군의 값에 비하여 유의하게 감소함으로서 열적 과민통반응을 보였다. 반면 발바닥에 가해준 기계자극에 대한 발회피반응의 역치는 대조군의 값에 비하여 CCL3 주입 후 1시간 후에 유의하게 감소함으로서 기계적 과민통반응을 보였다(그림-1B).

제5요 척수 신경손상에 의해 유도된 열적 과민통반응과 CCL3가 관련이 있는지 알아보기 위해 CCL3 수용체인 CCR1의 길항제를 국소적으로 손상 측 발바닥에 주입한 후에 열 자극에 대한 발회피시간의 변화를 조사하였다. 그림-2에서 볼 수 있듯이, 신경손상 후 감소하였던 발회피시간은 met-RANTES (7.5 μg /PBS 30 μl) 주입 후 30분부터 시작 하여 5시간가량 대조군에 비하여 유의하게 반전되어 증가하였다. 즉, 신경병증 모델 쥐에서 열자극에 대한 발

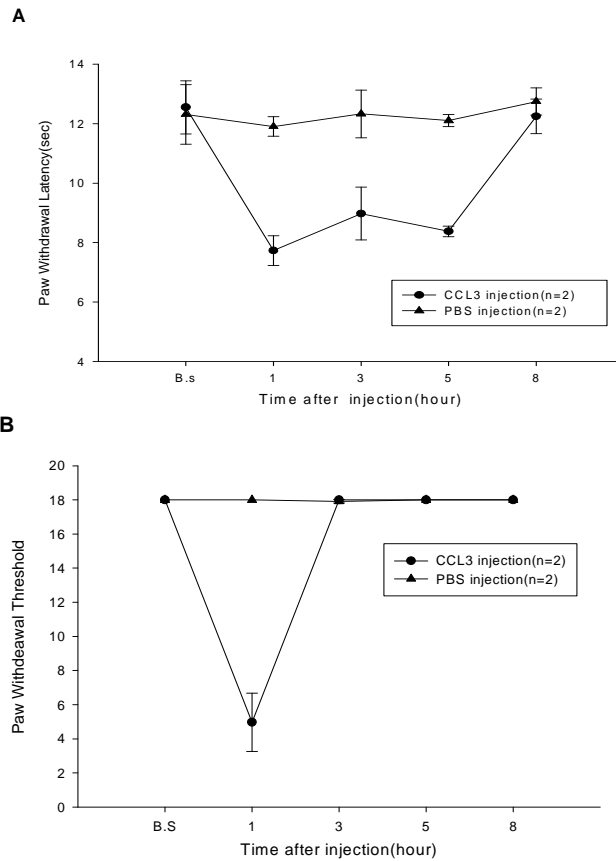


그림 1. 정상 쥐에서 CCL3을 발바닥에 주입한 후 시간 경과에 따른 기계 및 열자극에 대한 발회피반응 역치의 변화. (A) 정상 쥐에 CCL3 주입군이 대조군인 식염수 주입군에 비하여 1시간 후부터 5시간 까지 열자극에 대한 발회피반응 역치가 감소하였다. (B) 정상쥐에서 기계 자극에 대한 발회피반응 역치는 CCL3 주입군이 대조군에 비하여 주입 1시간 후에 유의미하게 감소하였다. 각 경우 CCL3는 8 μ g/PBS 30 μ l, 식염수는 30 μ l 주입하였다.

회피시간은 met-RANTES를 주입 전 4.8017 ± 0.2298 초에서 주입 후 9.6350 ± 0.2322 초로 증가하였다. 한편 제5요 척수신경손상에 의해 유도된 기계적 통증반응에 대한 CCR1 길항제의 효과를 조사한 결과를 그림-3에 나타내었다.

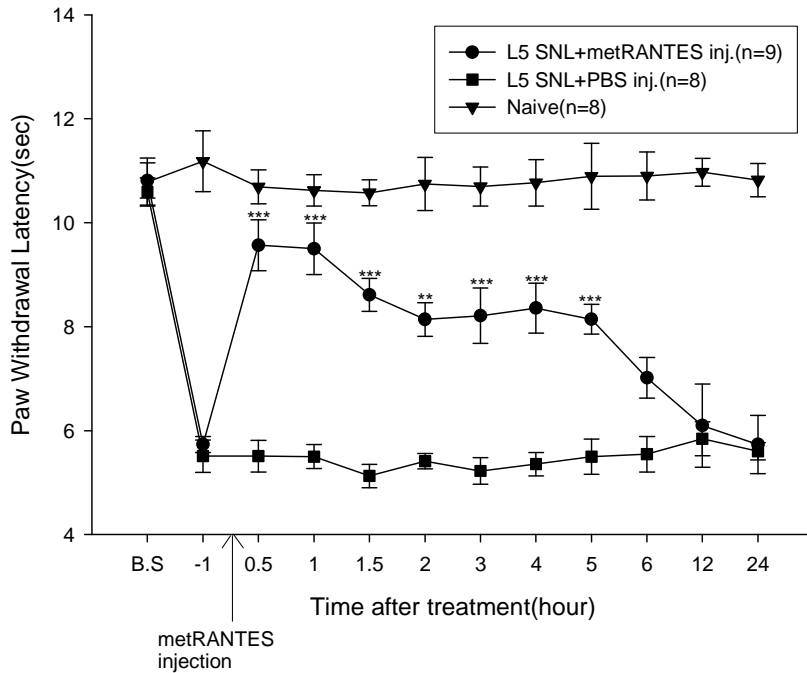


그림 2. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐에서 생성된 열적 과민통반응에 대한 발바닥에 주입한 met-RANTES의 효과. 모델 쥐에서 신경손상 후 열자극에 대한 발회피역치가 감소함을 보임으로서 열적 과민통반응을 보였다. 이 상태에서 CCR1의 길항제인 met-RANTES (7.5 $\mu\text{g}/\text{PBS}$ 30 μl)을 신경손상 동측의 발바닥 피하에 주입하였더니 감소하였던 발회피역치가 반전되면서 증가하였다. 이러한 반전은 생리식염수를 주입(30 μl)해 준 대조군의 경우와 비교하여 5시간 가량 유의미하게 지속되었다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Mann-Whitney Rank Sum Test)

그림-3 에서 보이는 것처럼 신경손상 후 감소된 발회피 역치는 met-RANTES 주입 전 1.8407 ± 0.4016 g 에서 주입 30분 뒤에 5.1803 ± 0.3653 g으로 증가하였는데, 이러한 증가는 5시간가량 지속되었다.

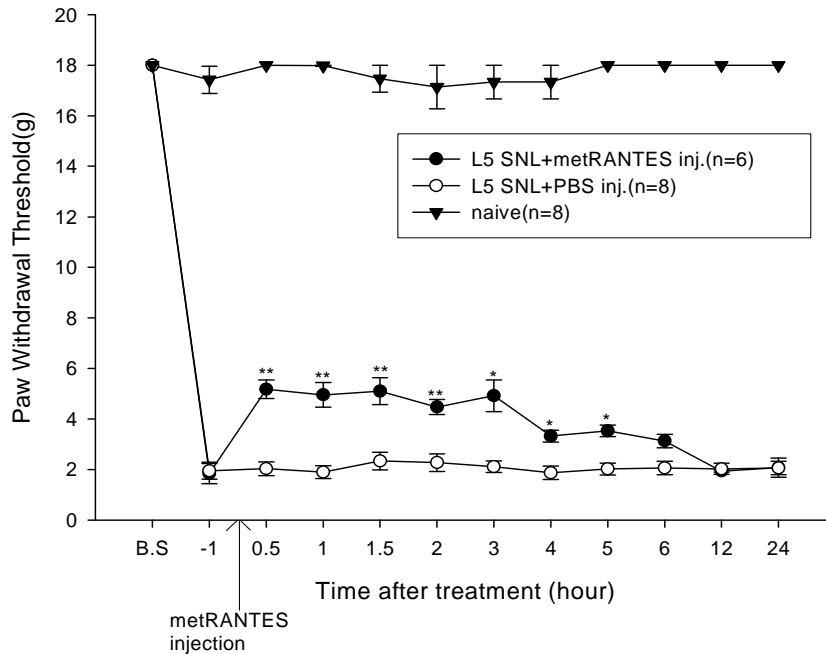


그림 3. 제5요 척수신경 손상 모델 쥐에서 생성된 기계적 과민통반응에 대한 발바닥에 주입한 met-RANTES의 효과. 모델 쥐에서 신경손상 후 기계자극에 대한 발회피역치가 감소함을 보임으로서 기계적 과민통반응을 보였다. 이 상태에서 CCR1의 길항제인 met-RANTES (7.5 μ g /PBS 30 μ l)을 신경손상 동측의 발바닥 피하에 주입하였더니 감소하였던 발회피역치가 반전되면서 증가하였다. 이러한 반전은 생리식염수를 주입(30 μ l)해 준 대조군의 경우와 비교하여 5시간 가장 유의미하게 지속되었다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ Mann-Whitney Rank Sum Test)

2. 배근절 내 CCR1-면역반응 양성 신경세포

배근절에서 CCR1의 항체를 사용한 면역조직화학 염색 방법으로 염색한 표본에서 면역반응에 양성을 보이는 신경세포는 주로 직경이 작은 신경원에서 발견되었는데, 그 전형적인 예를 그림-4에서 나타내었다. 이러한 CCR1 면역반응 양성 세포를 모델쥐와 대조군의 제5요 척수 배근절에서 계수하여 직경이

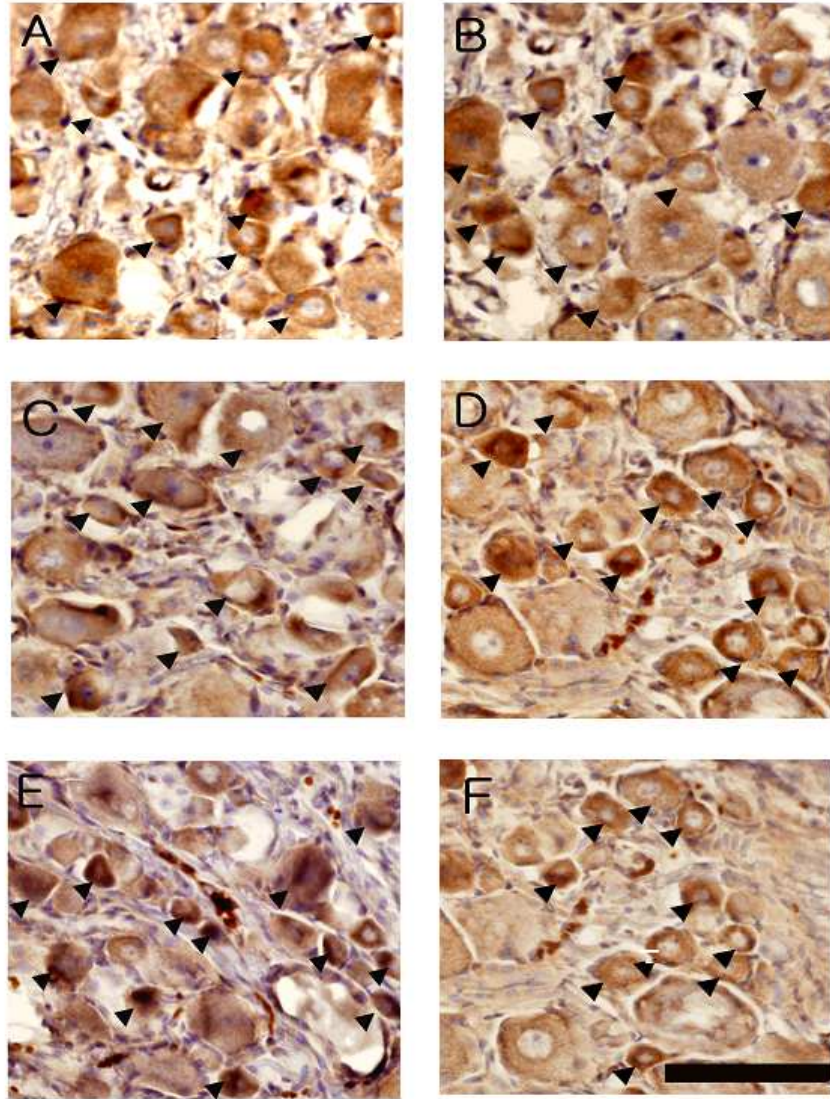


그림 4. 배근절 내 CCR1 양성 신경세포를 보여주는 예. (A) 정상 쥐의 좌측 L4 배근절. (B) 정상 쥐의 좌측 L5 배근절. (C-F) 척수신경손상 모델 쥐의 손상측 L4(C), 반대측 L4(D), 척수신경손상 모델 쥐의 손상측 L5(E), 반대측 L5(F) 배근절. ▲표시는 CCR1 면역반응 양성인 신경세포를 나타낸 것이며 대부분 작은 직경의 신경원이었다. Scale bar 100 μ m, 배율 400배

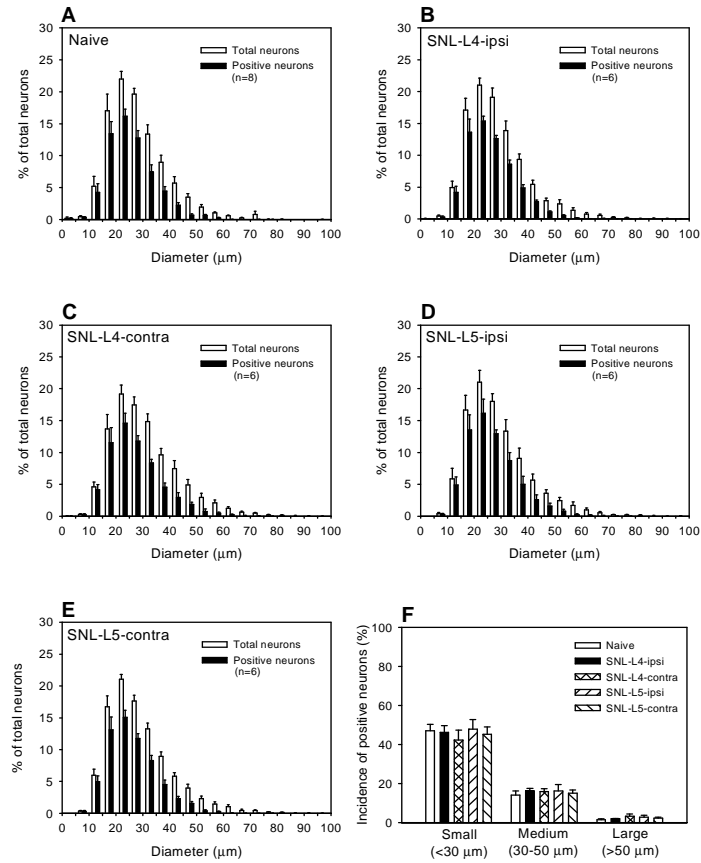


그림 5. 배근절 내 CCR1 양성 신경세포 비율에 있어서 척수신경 손상 쥐와 정상 쥐 간의 비교. (A-E)는 특정 배근절 내에서 크기 별로 배근절세포가 차지하는 비율을 나타내는 히스토그램으로서 총 세포와 CCR1 양성세포로 구분하였다. 정상 쥐의 경우 L4와 L5 배근절(A)에서, 그리고 모델 쥐의 경우 손상 측 L4(B)와 반대측 L4(C), 손상 측 L5(D)와 반대측 L5(E)의 배근절에서 분석하였다. (F)는 A-E의 결과를 작은직경(<30 μm), 중간직경(30-50 μm), 큰직경(>50 μm)의 배근절세포로 재구분하여 각 세포그룹 내 다섯 배근절에서 보이는 CCR1 양성 세포 빈도를 나타내었다. CCR1 양성 세포 빈도는 세 그룹 모두에서 모델 쥐의 손상 측 L4와 L5 배근절, 그리고 비손상 측 L4와 L5 배근절 어느 경우도 대조군의 경우와 비교하여 차이를 보이지 않았다.

5 μm 씩 증가하는 크기를 가진 신경세포에 포함되는 수의 분포를 히스토그램

으로 그림-5에 나타내었다. 각각의 배근절에 존재하는 총 신경세포 수의 평균 값은 모든 집단 간에 유의미한 차이가 없었다. 또한 정상 쥐의 제4요 배근절 내 CCR1 면역양성 세포가 차지하는 비율과 비교하여 통증모델 쥐의 손상 측 L4/L5-배근절과 반대 측 L4/L5-배근절 내 CCR1 면역양성 세포가 차지하는 비율은 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.

3. 손상신경 부위에서의 CCL3 농도 변화

제5요 척수 신경손상 이후에 말초 쪽으로 왈레리변성이 진행되는 좌골신경 부분에서와 중추쪽인 배근절에서 CCL3의 농도변화를 효소결합 면역흡수 분석 방법을 이용하여 측정하였다. 그림-6에서 좌골신경의 경우 신경손상을 가한 이후에 1, 3, 5, 7, 14, 21일째 되는 실험군에서 확인하였다(각 그룹, n=6). CCL3의 농도의 증가는 손상을 받지 않은 정상 쥐인 대조군(n=6)에 비해 특히 1, 3일째에 유의하게 증가하였다. 정상 쥐의 좌골신경의 CCL3 농도는 41.9702 ± 3.7754 ng/ml 이며, 통증 모델 쥐에서 신경손상을 가한 뒤 1, 3일째에 손상 부위 좌골신경의 CCL3 농도는 각각 89.4758 ± 7.4121 ng/ml과 80.6943 ± 7.9750 ng/ml로서 대조군에 비해 유의미한 증가를 보였다.

배근절 내 CCL3 농도변화의 경우는 정상 쥐, 모델 쥐 손상 측, 모델쥐 손상 반대 측의 L4-배근절과 L5-배근절에서 조사하였다(정상 쥐, n=4; 모델 쥐 각 그룹, n=4). 그림-7에서 보듯이, L4 배근절 CCL3 농도는 정상 쥐에 비하여 모델쥐의 손상측이나 손상 반대측 모두에서 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다. L5 배근절 CCL3 농도 역시, 그림-8에서 보듯이 정상 쥐에 비하여 모델쥐의 손상측이나 손상 반대측 모두에서 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다. 비록 통계적 의의는 없었더라도, L4 및 L5 배근절 내 CCL3 농도는 신경손상 후 1일째 대조군에 비하여 증가하는 양상을 보였다.

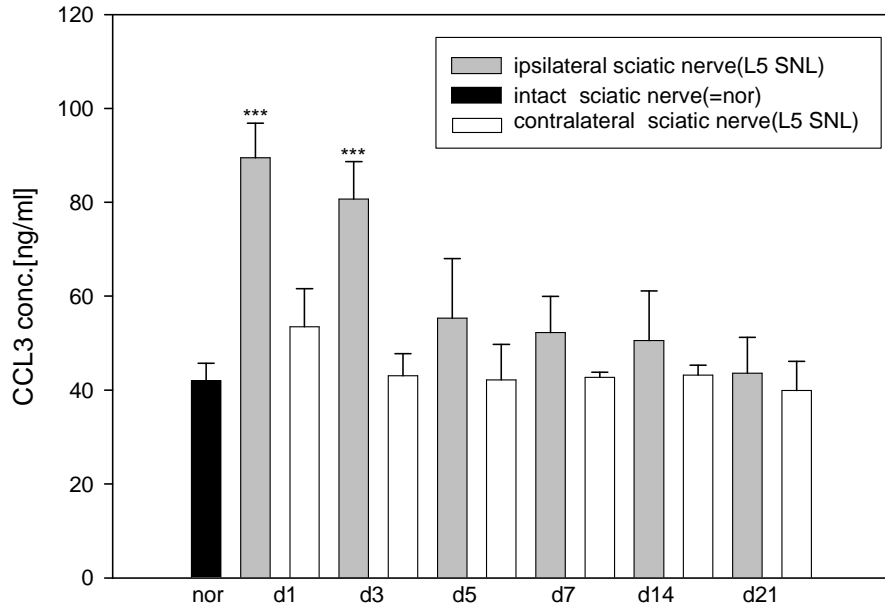


그림 6. 정상쥐, 모델쥐 손상측, 모델쥐 반대측의 좌골신경 간에 CCL3 농도 비교. 제5요 척수신경 손상 후 1일과 3일째 손상측 좌골신경에서 대조군의 경우에 비해 CCL3 농도가 2배 가량 증가하였다(n=6, * p<0.05, ** p<0.005, ***p<0.001, unpaired t-tests). 그러나 반대측 좌골신경의 경우는 대조군에 비해 변화가 없었다. 각 그룹에서 n=4.

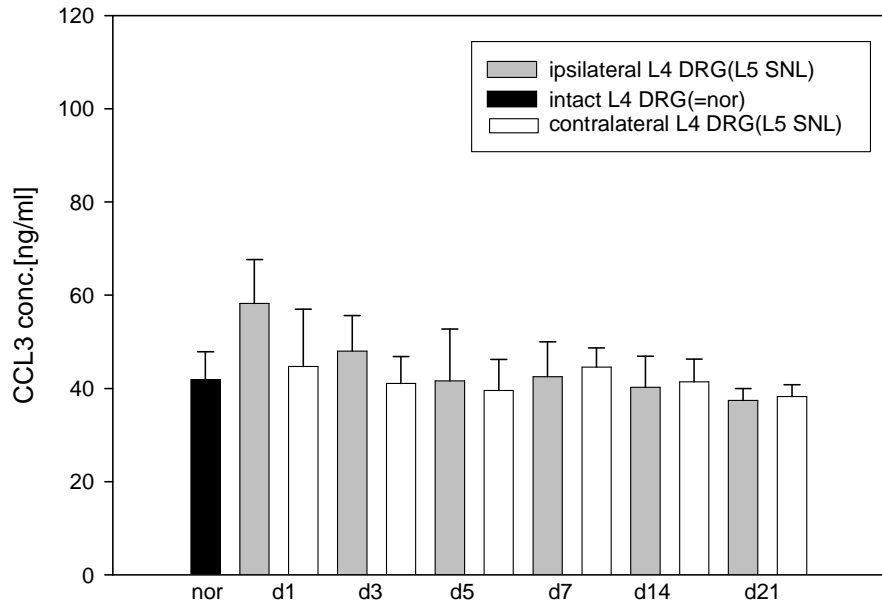


그림 7. 정상쥐, 모델쥐 손상측, 모델쥐 반대측의 L4 배근절 간에 CCL3 농도 비교. 제5요 척수신경 손상 후 손상받지 않은 비손상 구심신경의 세포체가 포함되어있는 L4 배근절에서는 정상쥐의 배근절에 비교하여 CCL3 농도의 차이를 보이지 않았다(n=4). 손상 반대측 L4 배근절의 경우도 차이가 없었다. 각 그룹에서 n=4.

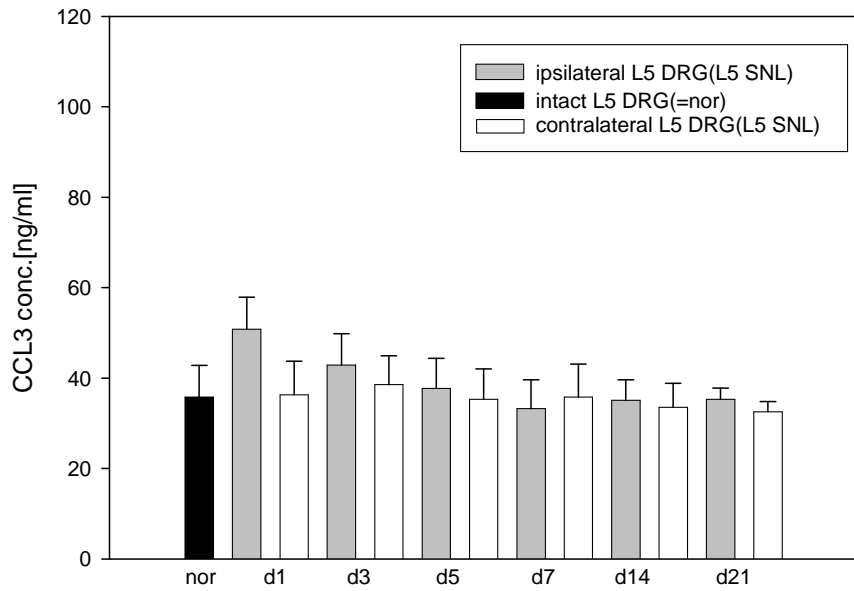


그림 8. 정상쥐, 모델쥐 손상측, 모델쥐 반대측의 L5 배근절 간에 CCL3 농도 비교.

제5요 척수신경 손상 후 손상반은 비손상 구심신경의 세포체가 포함되어있는 L5 배근절에서는 정상쥐의 배근절에 비교하여 CCL3 농도의 차이를 보이지 않았다(n=4). 손상 반대측 L5 배근절의 경우도 차이가 없었다. 각 그룹에서 n=4.

IV. 고찰

본 실험에서는 제5요 척수신경 결찰(L5 SNL) 모델 쥐와 대조군을 이용하여, 손상신경이 분포하는 뒷발피부에서 CCL3의 작동을 차단한 결과 이 모델에서 관찰된 기계적 및 열적 과민통 반응이 완화됨을 보였다. 또한 CCL3를 정상 쥐 발바닥에 주입하였을 때 L5 SNL 모델 쥐에서 관찰된 기계적 및 열적 과민통과 유사한 반응이 생성되었다. 그리고 L5 SNL 후 신경 손상 부위의 말초 쪽인 좌골신경 조직에서 CCL3의 농도가 정상 쥐의 경우와 비교하여 유의하게 증가하였는데, 특히 신경손상 후 1일과 3일 째 날에 증가가 관찰되었다. 마지막으로 CCL3의 수용체인 CCR1에 면역 양성반응을 보이는 구심신경은 좌우 측 L4- 및 L5-배근절 모두에서 정상군의 경우와 비교하여 수적으로 변화를 보이지 않았다.

L5 SNL 후 확립된 기계적 및 열적 과민통 반응이 손상측 발피부에 국소적으로 주입해 준 CCR1 길항제인 met-RANTES에 의해 완화됨을 보였는데, 이 결과는 흰쥐 발바닥 피부에서 지속적인 CCL3의 활성화가 과민통 반응의 유지(maintenance)에 기여함을 의미한다. 한편 CCL3가 과민통 반응의 유도(induction)에 기여하는가를 알아보기 위해서는 CCL3와 met-RANTES를 동시에 주입하여 CCL3 작용을 차단 후 L5 SNL가 과민통증 반응을 유도하는지를 살펴보는 것이 한 방법일 것이다. 만약 met-RANTES를 전처치한 뒤 L5 SNL에 의한 기계적 및 열적 과민통증반응의 유도가 억제된다면 CCL3가 L5 SNL에 의한 과민통 반응의 유도에 관여할 것이라고 예측할 수 있다.

CCL3는 관절염과 같은 염증 상황에서 주로 대식세포로부터 분비 된다²¹. 면역보강제(adjuvant)를 피하에 주입한 관절염모델을 이용한 연구에서 염증조직 내 CCL3의 mRNA 발현이 증가하고 CCL3 항체에 양성반응을 보이는 세포가 증가함을 확인하였다^{14,15}. 이는 염증상황 시 CCL3 생성에 관여하는 세포

의 수가 증가하고 그 결과 많은 양의 CCL3가 분비될 것임을 의미한다. 한편, 좌골신경을 완전절단(complete transection)한 모델을 이용한 실험에서 절단된 신경 주변부위에서 CCL3의 증가⁹와 CCL3의 mRNA의 증가를 보고하였다²⁴. 이는 신경손상 상황에서도 염증상황 시와 유사하게 CCL3 생성이 증가함을 보여준다. 이 결과는 좌골신경에 부분적 신경손상을 가해준 모델을 사용한 본 연구의 결과와 일치한다. 즉, L5 SNL으로부터 말초 쪽인 좌골신경 부위에서 CCL3의 농도가 정상 쥐의 경우와 비교하여 손상 후 1일과 3일 째 날에 증가하였다. 이곳 좌골신경부위에는 왈레리변성(Wallerian degeneration)을 보이는 손상신경 축색과 손상 받지 않은 구심신경의 축색들이 밀착하여 함께 뒤섞여 존재하는데, 이러한 상황에서 증가된 CCL3가 작용할 수 있는 여러 세포 중에는 손상 받지 않은 구심신경을 생각할 수 있다. CCL3의 증가는 그 수용체인 CCR1의 발현 증가를 유도할 수 있을 것이다. 정상 쥐의 구심신경의 신경세포체에는 CCR1이 발현되어 있음이 밝혀진 바 있다²⁵. 따라서 신경병증 상황에서 손상 받지 않은 구심신경에서 CCR1 발현이 더욱 향진될 것임을 예측할 수 있다.

본 실험에서는 부분적으로 말초신경에 손상이 가해진 신경병증 상황에서 CCR1의 발현이 어떻게 변화하는지를 조사하였다. 이때 손상 받은 구심신경과 손상 받지 않은 구심신경에서의 CCR1 발현 변화를 조사하기 위하여 CCR1 면역 양성 세포의 수적 변화를 검사하였다. 이에 관한 이론적 배경으로는 병리적 상황에서 특정단백질을 발현하는 신경세포가 여러 성장인자(trophic factor)의 작용으로 인하여 수적으로 증가하는 경우가 자주 관찰된다는 점이다^{26,27,28}. 그러나 본 실험결과는 부분신경 손상 후 손상 측이나 손상 반대 측 모두에서 CCR1 면역양성반응을 보이는 세포의 수적 변화가 손상신경세포나 비손상 신경세포에서 관찰되지 않았다. 그러나 수적인 면에서의 변화와는 상관 없이 신경세포 내 CCR1 발현이 증가되었을 가능성을 배제할 수 없다. 실제로

전립선 암과 관련한 MIF(macrophage migration inhibitory factor)의 경우 이들을 포함하는 세포의 수적 변화 없이 그 발현이 항진됨이 보고된 바 있다²⁹. 따라서 L5 SNL 후 좌골신경 부위에서 발현되는 CCR1의 세포내 단백질이나 mRNA 수준에서의 양적 변화에 관한 연구가 차후 수행되어야 할 것이다.

말초신경의 부분손상에 따른 신경병증 시 손상 말초 쪽 신경에서 생성된 CCL3가 기계적 및 열적 과민통 반응 유발에 어떻게 기여하는지에 관하여 아직 밝혀진 바가 없다. 그러나 다음 실험결과는 그 기전 설명을 위한 단서를 제공한다. 즉, 정상 쥐에서 CCL3의 수용체인 CCR1은 C- 및 A δ -구심신경에 존재하며²⁵, 염증상황에서는 CCL3와 CCR1의 발현이 증가한다³⁰. 또한 CCL3는 열과 캡사이신의 수용체인 TRPV1 채널을 민감화시킨다^{20,31}. 따라서 이들 결과에 기초하면, 부분적 말초신경 손상 후 손상신경의 말초 쪽으로 진행되는 왈레리변성 부위에서 국소적으로 염증반응이 유도되고 그 결과 CCL3를 포함하는 여러 염증전구물질이 분비될 것이다. 특히 CCL3는 비손상 침해수용성 구심신경에서 항진되어 발현되는 CCR1에 작용하여 TRPV1 채널과 함께 여러 채널을 민감화하고, 이를 통해 침해수용성 구심신경이 민감화 한 결과 행동학적으로 과민통 반응이 유발될 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 제5요 척수 신경손상 신경병증 모델 쥐에서 부분적 말초신경손상에 의해 유발되는 신경병증통증에 말초의 CCL3가 기여할 것임 밝히고자, 제5요 척수 신경결찰모델 쥐를 이용하여 1) 신경손상 동측 발바닥 내 피하주입한 CCL3 작용 차단제가 신경병증 통증반응에 미치는 영향을 조사하고, 2) CCL3의 수용체인 CCR1를 발현하는 구심신경의 수적변화를 제5요 척수 배근절(손상된 구심신경 세포체 존재)과 제4 요 척수 배근절(비손상 구심신경세포체 존재)에서 조사하고, 3) 신경손상 부위의 말초 쪽 좌골신경 부위에서 CCL3의 농도 변화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CCL3의 정상 쥐 발바닥에 주입 시 기계적 및 열적 과민통 반응이 생성되었다. 이는 제5요 척수 신경손상 시 생성된 과민통 반응과 유사하였다.
2. 제5요 척수 신경손상 시 유발된 기계적 및 열적 과민통증 반응은 손상 동측 발바닥 피하 주사를 통해 국소적으로 가해준 CCR1의 길항제인 met-RANTES에 의해 완화되었다.
3. 제5요 척수 신경손상 후 신경 손상 부위의 말초 쪽인 좌골신경 조직에서 조사한 CCL3의 농도는 정상 쥐의 경우와 비교하여 유의미하게 증가하였는데, 특히 신경손상 후 1일과 3일 째 날에 증가가 관찰되었다. 한편 손상 반대측 좌골신경과 좌우측의 L4- 및 L5-배근절에서는 CCL3 농도의 변화를 관찰하지 못했다.
4. CCL3의 수용체인 CCR1에 면역 양성반응을 보이는 구심신경은 신경 손상

측과 반대 측의 L4- 및 L5-배근절 모두에서 정상군의 경우와 비교하여 수적으로 변화를 보이지 않았다. CCR1 면역양성세포는 주로 작은직경과 중간직경 크기의 세포에서 발견되었다.

이상의 결과는 부분적 말초 신경손상에 의해 유발된 기계적 및 열적 과민통 반응 유발에는 손상신경 부위에서 케모카인 CCL3의 발현 증가가 관여함을 보여준다. 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. CCL3의 작용을 효과적으로 차단하는 CCR1 길항제의 개발은 신경병증통증 치료를 위한 새로운 방법이 될 것이다.

참고문헌

1. Catherine A. Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol* 2005;26: 529-34.
2. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999;353:1954-64.
3. Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med* 2005;7:183-95.
4. Scholz J, Woolf C.J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002;5:1062-7.
5. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:521-32.
6. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
7. Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:444-55.
8. White FA, Bhangoo SK, Miller RJ. Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:834-44.
9. Taskinen HS, Roytta M. Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv*

Syst 2000;5:75-81.

10. 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.

11. Carollo M, Hogaboam CM, Kunkel SL, Delaney S, Christie MI, Perretti M. Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experiment algranulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol* 2001;134:1166-79.

12. Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, Peterson LB, Mudgett JS, Bayne EK, DeMartino JA, MacIntyre DE, Forrest MJ. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7947-52.

13. Shahrara S, Mohmmad AA, James MW, Haines GK, Koch AE. Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathway 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, Haas CS, Pope RM, Haines GK, Zha YY, Koch AE. 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;50:355-363.
17. Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 1996;271:2599-603.
18. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
19. 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.
20. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 1985;359:31-46.
21. Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, Hesselgesser J, Strieter R,

Horuk R, Perez HD. Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J Clin Invest* 1998;101:2910-19.

22. George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C. Serial determination of tumor necrosis factor- α content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 1999;160:124-32.

23. Patricia M, Anja W, Jo Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & Growth Factor rev* 2002;13:455-81.

24. Perrin FE, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin1 β in Wallerian degeneration. *Brain* 2005;128:854-66.

25. Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun R, Wang JM, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4536-41.

26. 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.

27. Mahad DJ, Trebst C, Kivisakk P, Staugaitis SM, Tucky B, Wei T, Lucchinetti CF, Lassmann H, Ransohoff RM. 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.
28. Haas CS, Martinez RJ, Attia N, Haines GK, Campbell PL, Koch AE. Chemokine Receptor Expression in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3718-30.
29. Meyer-Siegler K, Fattor RA, Hudson PB. Expression of macrophage migration inhibitor factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:44-50.
30. Tak p, Smeets T, Daha M, Kluin P, Meijers K, Brand R, Meinder A, Breedveld F. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217-25.
31. Zhang N, Oppenheim JJ. Crosstalk between chemokine and neuronal receptor bridges immune and nervous systems. *J Leukoc Biol* 2005;78:1210-14.

ABSTRACT

The involvement of peripheral chemokine CCL3 in hyperalgesia following peripheral nerve injury in rats

Hyun Ju Lee

*Department of medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joong Woo Leem)

Peripheral nerve injury often leads to neuropathic pain. When a nerve is damaged, immune cells infiltrated lead to release of numerous inflammatory mediators including chemokines. Chemokines are produced and released from macrophages during inflammation. There have been many studies concerned with upregulation of a proinflammatory chemokine CCL3 and its receptor CCR1 in inflammatory pain states. However, it is not elucidated to date whether CCL3 and CCR1 are involved in mediating neuropathic pain following peripheral nerve injury.

The goal of this study is to investigate whether CCL3 is involved in nerve injury-induced neuropathic pain using an L5 spinal nerve ligation (L5 SNL) rat model of neuropathy. To achieve this, we examined 1) whether CCL3 is related to the induction or maintenance of heat and mechanical hyperalgesia following L5 SNL, 2) whether CCL3 expression following L5 SNL changed in

degenerating axons in the affected sciatic nerve, and 3) whether CCR1 expression following L5 SNL changed in unaffected L4- and affected L5-afferent neurons.

The results obtained were as follows. First, intraplantar injection of CCR1 antagonist met-RANTES into the hind paw of the rat with L5 SNL attenuated both L5 SNL-induced mechanical and heat hypersensitivities. Second, intraplantar injection of CCL3 into the hind paw of the naive rat mimicked the effects of L5 SNL by showing increased mechanical and heat sensitivities of affected hind paw. Third, following L5 SNL, the level of CCL3 increased in the sciatic nerve with degenerating axons on post-injury days 1 and 3. No changes in CCL3 level were observed in the contralateral sciatic nerve and L4/L5 DRGs of ipsi- and contra-lateral sides. Lastly, following L5 SNL, CCR1-expressing DRG neurons showed no changes in number in both unaffected L4 and affected L5 DRGs as compared with DRGs of naive rats.

The results suggest that chemokine CCL3 is involved in nerve injury-induced hyperalgesia via increased expression in the degenerating nerve following nerve injury. A specific CCR1 antagonist may provide a novel therapeutic option for the treatment of neuropathic pain.

Key Words: neuropathic pain, chemokine, CCL3, spinal nerve ligation, Wallerian degeneration, mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia, nociceptor