

류마티스관절염 동물모델에서 관절염 치료에 따른 통증수용체의 발현

방지혜¹ · 하은영^{2,3} · 허지안⁴

계명대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²생화학교실, ³통증연구소, ⁴영남대학교 의과대학 내과학교실

Expression of Pain Receptors by Arthritis Treatment in Collagen Induced Murine Model of Rheumatoid Arthritis

Jihye Bang¹, Eunyoung Ha^{2,3}, Jian Hur⁴

Departments of ¹Internal Medicine and ²Biochemistry, ³Pain Research Center, Keimyung University School of Medicine, ⁴Department of Internal Medicine, Yeungnam University College of Medicine, Daegu, Korea

Objective. Rheumatoid arthritis, the most common form of arthritis, is typically characterized by induced inflammatory pain in joints. Recent studies have reported on the expression of pain receptors such as transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and acid sensing ion channel 3 (ASIC3), which are related to pain induction and regulation. This study was conducted to investigate the expression of TRPV1 and ASIC3 in response to the analgesic effect of an arthritis treatment in a collagen-induced arthritis (CIA). **Methods.** Mice were divided into 3 groups: Control, CIA, and CIA with arthritis treatment. Mice received intraperitoneal injection with 10 mg/kg infliximab and 10 mg/kg meloxicam five times per week for 3 weeks. Mechanical hyperalgesia, histologic examination of the feet, serum levels of inflammatory cytokine such as interleukin-6 (IL-6), and interleukin-17 (IL-17), TRPV1 and ASIC3 expression were investigated. **Results.** The serum levels of IL-6 and IL-17 were lower in the treatment group (73.77 ± 10.11 pg/mL and 26.75 ± 7.17 pg/mL, respectively) compared to the CIA group ($p < 0.001$). Histological analysis showed decreased synovial cell proliferation, leukocyte infiltration, and cartilage destruction in the treatment group compared with the CIA group. The CIA group that underwent arthritis treatment showed a significantly increased withdrawal threshold of mechanical nociception on the hind paw and increased expression of TRPV1 and ASIC3 compared to the CIA group. **Conclusion.** Arthritis treatment resulted in an anti-inflammatory and analgesic effect through upregulation of the activity of TRPV1 and ASIC3 in CIA mice. (*J Rheum Dis* 2015;22:85-92)

Key Words. Rheumatoid arthritis, TRPV1, ASIC3, Inflammatory pain

서론

류마티스관절염은 정확한 원인과 병태생리는 밝혀지지 않았지만 면역체계 이상으로 자신의 인체를 공격하는 자가면역질환이며, 만성 염증성 질환이다[1]. 류마티스관절염은 관절 내 대식세포 및 T세포 등 염증세포의 침윤 및

활막의 이상증식을 특징으로 하고, interleukin (IL)-1 β , 종양괴사인자(tumor necrosis factor [TNF]- α)와 같은 사이토카인들이 병인에 관여하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 염증이 지속됨에 따라 활막 증식과 연골 및 뼈 손상이 동반되며 이로 인해 관절변형이 가속화된다[2]. 또한 류마티스관절염은 심각한 통증을 초래하기 때문에 일상생활 수

Received : November 3, 2014, Revised : December 16, 2014, Accepted : January 15, 2015

Corresponding to : Jian Hur, Department of Internal Medicine, Yeungnam University Medical Center, Yeungnam University College of Medicine, 170 Hyeonchung-ro, Nam-gu, Daegu 705-703, Korea. E-mail : sarang7529@hanmail.net

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718

Copyright © 2015 by The Korean College of Rheumatology. All rights reserved.

This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

행능력의 장애와 우울을 야기시킬 수 있으며, 신체적, 정신적 건강관련 삶의 질의 저하를 가진다[3]. 류마티스관절염 환자들에 대한 통증 치료의 초점은 객관적 평가로의 질병상태뿐 아니라 주관적으로 느끼는 신체적, 심리적, 사회적 기능까지 폭 넓게 고려하여 환자의 삶의 질을 개선하기 위함이라 할 수 있다.

이에, 최근 통증과 관련한 분자적 접근으로 통증의 강도와 통증수용체 조절과의 관계에 대한 연구가 보고되고 있다. 대표적으로 열자극에 반응하는 단백질로 transient receptor potential 채널에 아형(subtype)으로 transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)과 기계적 유해자극에 반응하는 acid sensing ion channel 3 (ASIC3)가 통증을 매개하는 수용체로서의 역할이 밝혀지고 있다[4,5]. TRPV는 캡사이신 수용체(capsaicin receptor)로서 열민감성·비선택적 양이온채널로 분류되며 감각 뉴론에서 통증 자극(nociceptive stimuli)을 통합하는 것으로 알려져 있다. 중추신경계뿐 아니라 말초신경계 및 피부, 척수, 뇌 등 모든 신경계에서 발견되고 있고, 염증을 촉발시키며 통증을 전달한다[6]. 그리고 ASIC는 조직 산도(acidity)의 증가에 의하여 유해자극에 대한 흥분을 유도하는 물질로서, H^+ 이온에 반응하여 신경흥분성을 유발하는 데 관여하는 채널로 알려져 있다[7]. 특히 여러 아형 중 ASIC3는 염증 유발 시 C-구심신경에 발현이 증가하고, 다른 염증전구물질에 의해 ASIC3를 통한 C-구심신경의 흥분성이 증가되었다고 보고된 바 있다[5,7].

선행연구들에서는 류마티스관절염 동물모델에서 통증수용체의 발현 및 통증기전을 밝히고자 신경세포와 신경계 조직을 이용하는 데 그쳤지만[5,7], 실제 통증을 느끼게 되는 말초조직(손, 발)에서 통증수용체의 발현을 밝힌 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 류마티스관절염 유도 동물모델에서 약물치료 유·무에 따른 말초조직에서의 통증과 염증에 미치는 통증수용체의 발현을 파악함으로써 나아가 류마티스 환자들의 증상관리를 위한 과학적 근거를 마련하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

류마티스관절염의 제작 및 약물 투여

생후 6~8주령 DBA/1J 마우스 수컷(Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan)을 사용하였다. 실험기간 동안 일반 고형 사료와 물을 충분히 공급하였으며 실내온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55\% \pm 5\%$, 명암은 12시간을 주기로 실험 종료 시까지 사육조건을 유지하였다. 생쥐의 관리, 사용 및 취급은 미국 국립보건원(National Institutes of Health) 기준과 계명대학교 동물윤리위원회의 승인에 준하여 시행하였다(승인번호: KM-2010-21R).

상용화된 bovine type II collagen (Chondrex, Redmond, WA, USA)을 구입한 후 50 mM acetic acid를 이용하여

4 mg/mL의 농도가 되도록 하여 혼합하였으며, 사용 시까지 -20°C 에서 보관하였다. 4 mg/mL 농도의 complete Freund's adjuvant를 type II collagen과 1:1의 농도로 혼합하여 유탕시킨다. 실험 1일째, 상기 준비한 용액 100 μL 을 생쥐 꼬리에 피내(interadermal)로 1차 주사한다. 그 후 실험 21일째, incomplete Freund's adjuvant와 type II collagen을 1:1로 섞어 100 μL 를 꼬리에 피하로 2차 주사하였으며, 1차 주입 이후 41일이 지난 후 infliximab와 meloxicam을 각 10 mg/kg의 농도로 복강(intraperitoneal)으로 1주일에 5회 3주 동안 투여 후 졸레틸(zoletil):럼퐁(rompun)으로 마취 후 희생(sacrifice)하였다. 각 그룹당 아무것도 처리하지 않은 그룹(정상군) 8마리, type II collagen 유도군(실험군) 12마리, type II collagen 유도 치료군 10마리를 사용하였다.

관절염 중증도의 임상적 측정

실험동물은 각각의 관절에 대하여 다음의 방법으로 관절염의 정도를 점수화하여 기간별로 기록하였다[8]. 관절염 점수는 쥐마다 2개의 뒷발에서 판단한 관절염 점수를 합계한 수치로 정의하였다. 따라서 가능한 최대 관절염 점수는 8점이 되도록 하였다. 임상적 관절염의 중증도는 각각의 발에서 최대 부종이 있는 지점에서 캘리퍼(Digital Caliper; Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 두께를 측정하여 판단하는 것을 병행하였다. 관절염의 정도를 점수화한 기준은 아래와 같다.

Grade 0=부종(edema)이나 종창(swelling)이 없는 경우
Grade 1=발 또는 한 발가락의 경한(mild) 부종 또는 발적(erythema)이 있는 경우

Grade 2=발목 관절에서 발가락에 걸친 중증도의 부종과 발적이 있는 경우

Grade 3=발 전체에 걸친 중증도의 부종과 발적이 있는 경우

Grade 4=전체 발에 걸쳐 심한 부종과 발적 혹은 관절강직(ankylosis)이 동반된 경우

기계적 압·통증 측정

각 기간별 통증에 반응하는 행동을 측정하였으며 기계내·외 환경과 적응할 수 있도록 1시간 정도의 순응시간을 거친 후 양쪽 뒷발바닥 가운데를 von-Frey filament (Ugo Basile, Varese, Italy)를 이용하여 기계적 자극을 주었을 때 반응에 대한 역치값을 측정하였다[9]. 모든 값의 단위는 g로 표기하며 filament에 가해진 세기(force)를 뜻한다. 정상군에서 모두 최고치를 10 g까지 측정하였으며, 3회 이상 측정한 평균값 \pm 표준편차를 나타내었다.

관절염 중증도의 조직학적 소견

실험 62일째, 희생시킨 각 그룹당 쥐들의 발을 면역조직화학 염색을 실시하였다. 각 군의 마우스들의 발을 10%

포르말린으로 고정한 후 10% ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA; pH 7.4) 용액을 이용하여 탈석회화 (decalcification) 과정을 거친 후, 파라핀에 매립하여 조직 염색을 실시하였다. 4 μ m 두께의 파라핀 절편들은 H&E 염색과 Safranin O 염색하여 광학 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

마취 후 심장천자 (heart puncture)로 얻은 혈청 (serum)을 각 군별로 type II collagen 항체, IL-17 및 IL-6을 측정하기 위해 생쥐 항 type II collagen 항체 (Chondrex), IL-17과 IL-6 ELISA kit (Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 각 kit의 매뉴얼 지침에 따라 시험을 수행하였다. 각 혈청의 정량적 수치는 ELISA plate 측정기 (Biochrom, Cambridge, England)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

역전사 폴리머레이즈 연쇄 반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

각 그룹 간의 통증유발 수용체 발현을 측정하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 각 그룹당 쥐의 발 조직에서 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 5 μ g/ μ L의 RNA에 oligo-(dT) primer와 reverse transcriptase를 넣어 42°C에서 5분, 95°C에서 60분, 4°C에서 20분 조건으로 cDNA 합성을 하였다. 얻어진 cDNA와 각 primer (Bioneer, Daejeon, Korea)로 PCR을 통하여 통증유발 수용체의 발현을 측정하였다. PCR 수행의 각 primer sequence들은 TRPV1 forward : 5'-CATCCTCGCAGCTTTAG

TCC-3', TRPV1 reverse : 5'-GTGCTCACAACAGGATGTGG-3', TRPV4 forward : 5'-ACCAAGGCTAGCTCAGTCCA-3', TRPV4 reverse : 5'-ATGCTCAGGGCCAGCTAGTA-3', ASIC1 forward : 5'-AATTTCTGCGTGGGTACTGG-3', ASIC1 reverse : 5'-ACCTGGGTGGCTCCTTACTT-3', ASIC3 forward : 5'-GGTGCAGAAGGTAGGTGATC-3', ASIC3 reverse : 5'-TCTGTCTTGAAA AACCTGGG-3', internal control로 사용한 GAPDH forward : 5'-GGTGAAGGTCGGTG TGAACG-3', GAPDH reverse : 5'-GGTAGGAACACGGAAG GCCA-3'을 사용하였다. 반응물은 ethidium bromide (EtBr)이 포함된 1.0%~1.2% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 Las-3000 (Fuji Film, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였으며, Multi gauge software (Fuji Film)을 이용하여 도표화하였다.

특수 단백질 검출 검사 (western blot)

각 그룹 사이의 TRPV1과 ASIC3의 단백질 수준에서의 발현 차이를 알아보기 위해 western blot을 수행하였다. 마우스의 회생 후 얻어진 발 조직에서 1 \times lysis 용액 (50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL aprotinin)을 이용하여 부유시킨 후 4°C에서 30분간 반응시켰다. 60 μ g의 단백질을 5 \times sample buffer와 섞어 100°C에서 7분간 끓인 다음 10%~12% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 전기영동을 통해 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore)으로 220 mA로 1시간 20분 transfer시킨 후, membrane은 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 다음, TRPV1 (1:100; SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ASIC3 (1:1,000; Abcam, Cambridge,

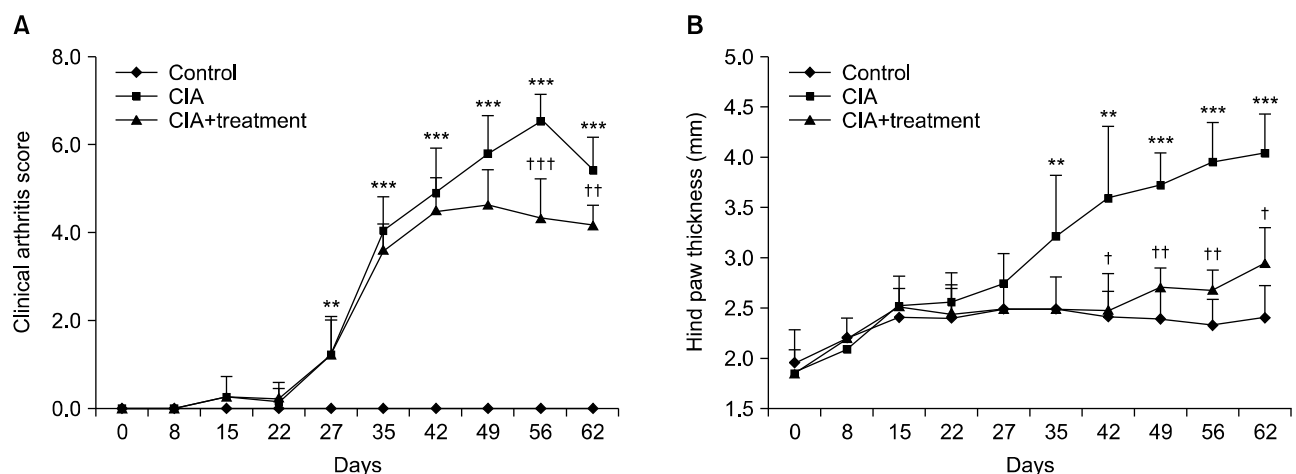


Figure 1. Suppression of arthritis progression in CIA with treatment group. Arthritis was induced by immunization with type II collagen in complete Freund's adjuvant on day 0. On day 41, mice also received normal saline or treatment (infliximab and meloxicam) five times per week for three weeks. (A, B) Severity of arthritis was determined as described in Materials and Methods. Data are expressed as the mean \pm standard deviation. CIA: type II collagen induced arthritis. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group; $^{\dagger}p < 0.05$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. CIA group.

MA, USA), β -actin (1:2,000, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)으로 4°C에서 16시간 반응시켰다. 이를 TBS-T로 3회 세척한 후 anti-rabbit immunoglobulin G conjugated horseradish peroxidase 항체와 상온에서 2시간 반응시키고 enhanced chemiluminescence 용액(Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)으로 기질반응시켜 Las-3000으로 감광하였다. 이미지는 Multi gauge software를 이용하여 β -actin에 대한 발현 비율로 나타내었다.

통계방법

본 연구에서는 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 류마티스관절염 유발 후 각 실험군 간의 시기별 통계적 유의성을 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였으며, 사후검증은 Tukey's test로 실

시하였다. 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위하여 독립표본 t 검정을 실시하였다. 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타냈으며, 통계적 유의수준은 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

류마티스관절염의 치료에 따른 관절염의 효과

Type II collagen 유도 관절염 동물모델에서 관절염 치료에 따른 효과를 보기 위하여 콜라겐의 1차 주사 이후 임상적 점수를 날짜별로 비교하였으며, 62일째 치료군에서는 4.17 ± 1.20 점으로 실험군 5.44 ± 1.85 점에 비해 임상적 점수가 감소하였고($p < 0.001$) (Figure 1A), 특히 콜라겐의 2차 주사 이후부터 관절염 증상이 뚜렷하게 나타났다. 반면 치료를 한 이후 1주일(42일째)부터는 더 이상 관절염

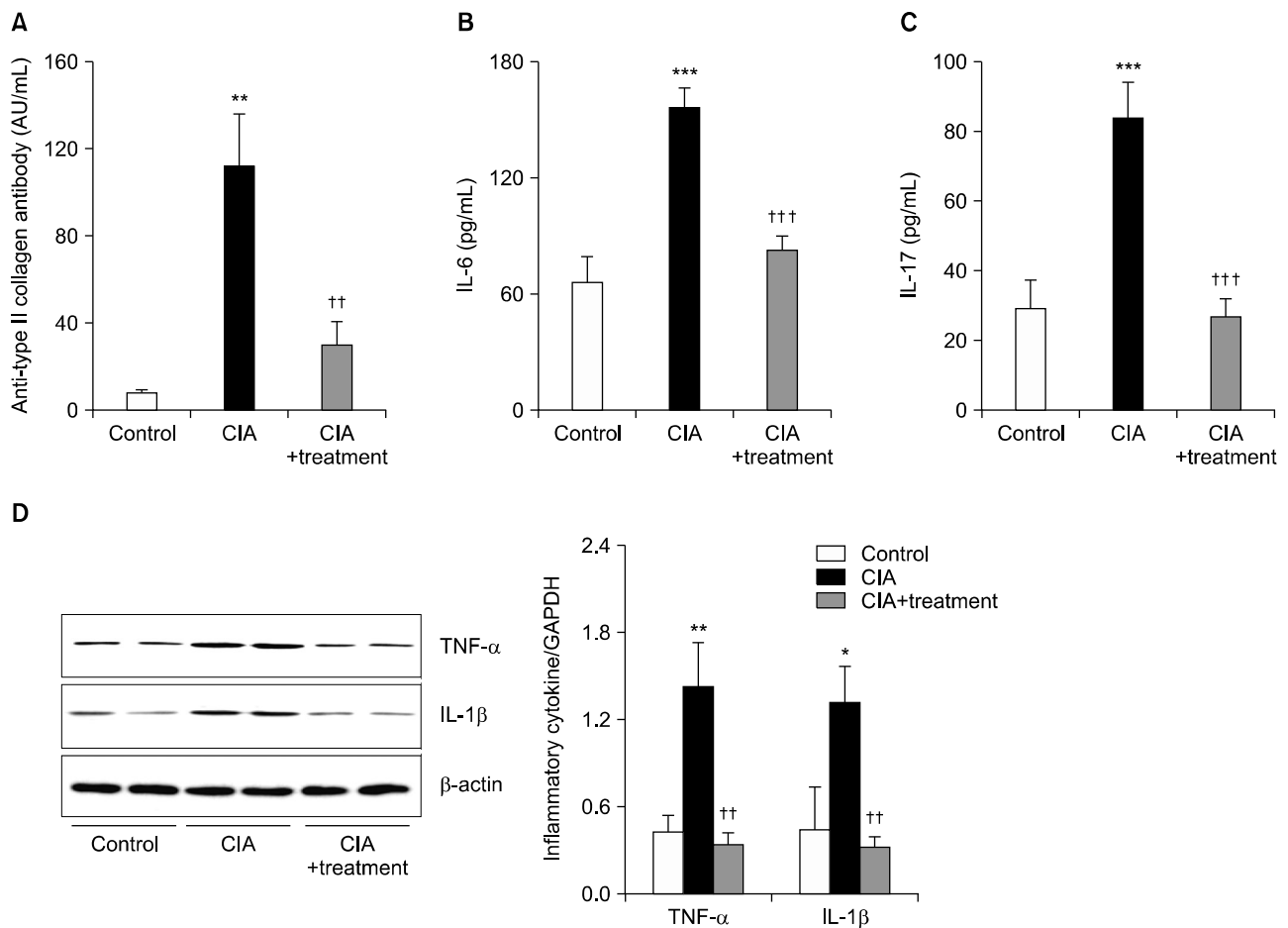


Figure 2. Suppressive effect of arthritis treatment on levels of inflammatory cytokines. (A) The levels of immunoglobulin G anti-type II collagen antibody, (B) interleukin (IL)-6 and (C) IL-17 were determined in CIA mice by enzyme-linked immunosorbent assay. (D) Protein levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-1 β were measured in CIA hind paw tissue by western blot. Data are expressed as the mean \pm standard deviation. Values are expressed as the optical density. AU: arbitrary unit, CIA: type II collagen induced arthritis, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs. CIA group.

의 임상적 징후의 진행이 억제되었다. 또한 실제 양쪽 뒷 발의 평균 두께값 역시 콜라겐의 2차 접종 이후 급격히 증가하였다. 실험시작 후 62일째 희생 전 발 두께를 측정한 결과 실험군은 4.04 ± 0.39 mm로 정상군 2.41 ± 0.32 mm에 비해 증가하였으며($p < 0.001$), 치료군에서는 2.95 ± 0.35 mm로 감소하였다($p < 0.05$) (Figure 1B).

관절염의 치료에 따른 항염증효능을 보기 위하여 심장천자로 얻은 혈청에서 항 type II collagen 항체, 염증성 사이토카인인 IL-6과 IL-17를 측정하였다. 그 결과 류마티스관절염의 유도를 위해 면역반응을 일으켰던 type II collagen의 투여와 이에 반응하는 항 type II collagen 항체의 혈중 농도는 치료군에서는 30.00 ± 10.60 IU/mL (AU/mL)로 실험군 111.80 ± 24.26 AU/mL에 비해 감소하였으며($p < 0.01$), 정상군은 7.63 ± 1.03 AU/mL에 비하여는 증가하였다(Figure 2A). IL-6의 농도는 실험군 156.66 ± 23.79 pg/mL로 정상군에서 66.75 ± 13.01 pg/mL에 비하여 증가하였으며 치료군에서는 73.77 ± 10.11 pg/mL로 실험군에 비하여 약 2배 가까이 감소하였다($p < 0.001$) (Figure 2B). IL-17 농도는 실험군 83.63 ± 10.24 pg/mL로 정상군 28.96 ± 8.55 pg/mL에 비해 증가하였으며, 치료군에서는 26.75 ± 7.17 pg/mL로 실험군에 비해 의미있게 낮았고($p < 0.001$), 정상군은 통계적인 차이가 없었다(Figure 2C). 또한 쥐 발 조직의 단백질을 통하여 가장 대표적인 염증성

사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 측정한 결과 TNF- α 의 경우 실험군과 비교하여 치료군($p < 0.01$)에서 약 4배 가까이 발현이 감소하였으며, IL-1 β 의 발현은 실험군에서 1.32 ± 0.25 ratio, 치료군에서 0.32 ± 0.07 ratio (p

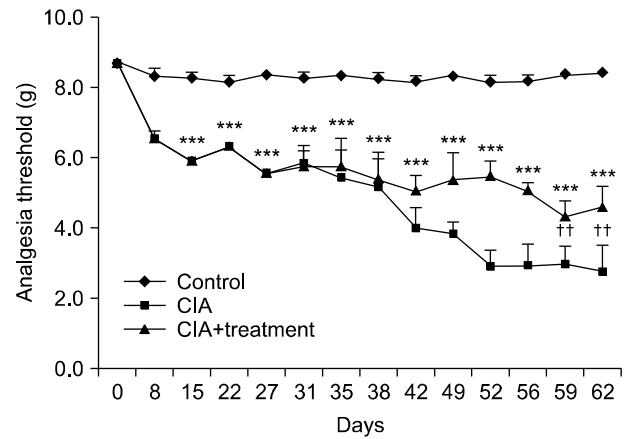


Figure 4. Analgesic effects of arthritis treated in CIA mice. Arthritis treatment (infliximab and meloxicam) ameliorate mechanical threshold measured to von-Frey filament. Data are expressed as the mean \pm standard deviation. CIA: type II collagen induced arthritis. *** $p < 0.001$ vs. control group; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. CIA group.

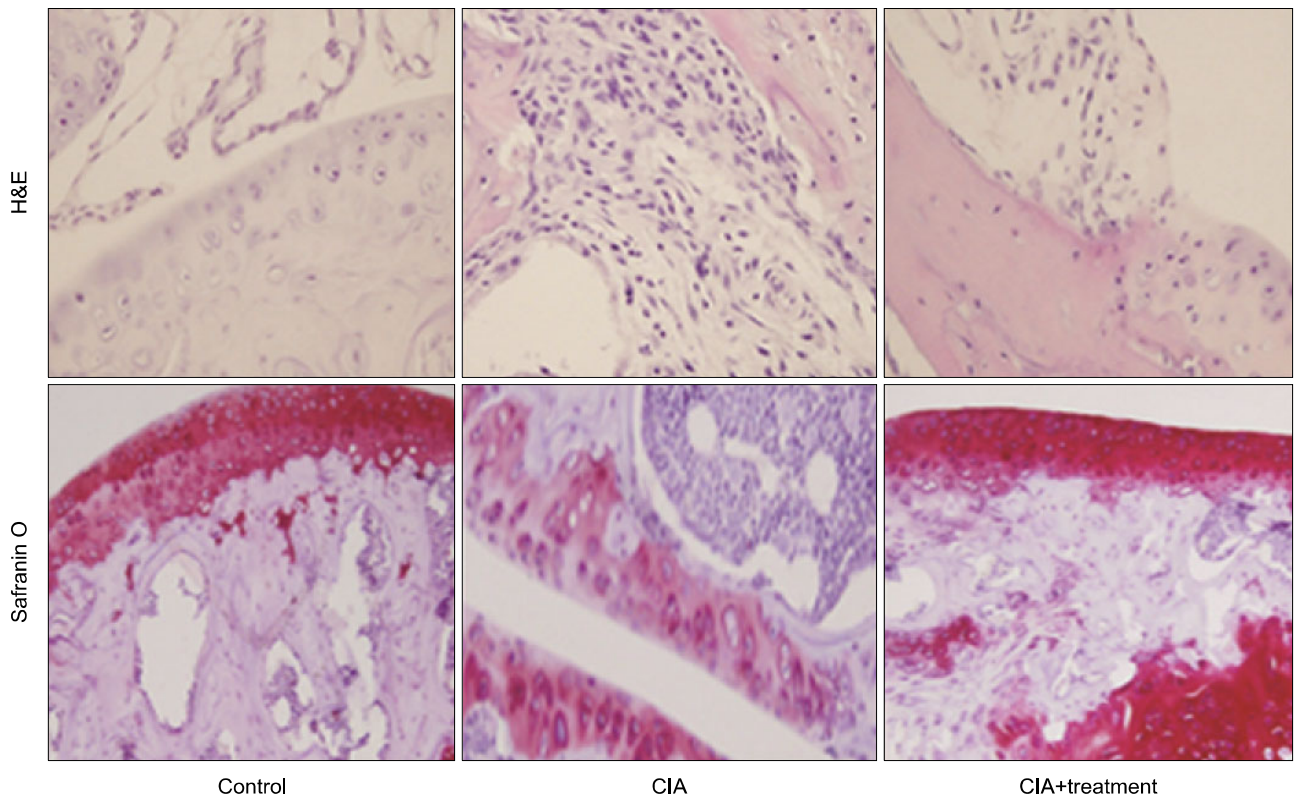


Figure 3. Representative histological analysis of knee joints and paws was assessed by H&E ($\times 200$) and Safranin O staining ($\times 200$). CIA: type II collagen induced arthritis.

<0.01)로 관절염 치료에 따라 염증성 사이토카인의 감소하였다(Figure 2D).

Figure 3에서는 관절조직의 모양변화 및 염증 관련 세포의 침착 정도를 알아보기 위하여 H&E 염색을 통하여 관찰하였으며, 실험군에서는 염증 관련 세포들이 조직 내로 다량 침착된 정도를 보이고 관절 내 모양도 변화하였지만, 치료군에서는 실험군에 비해 염증 관련 세포들의 침착이 감소하는 소견을 보였으며 정상군과 비슷하였다. 또한 Safranin O 염색을 통하여 type II collagen으로 관절염의 유도도 인하여 연골(cartilage)에 손상을 유발하고 관절염 치료를 한 후에는 연골의 손상이 억제되었음을 관찰하였다.

관절염 치료에 따른 진통효과 및 통증수용체의 발현 조절

Figure 4에서는 관절염의 치료에 따른 통증의 정도를 알아보기 위하여 von-Frey filament를 이용하여 쥐의 뒷발에

가해진 기계적 유해자극에 대한 반응도를 측정하였다. Type II collagen 유도 후 점차적으로 통증에 대한 역치값이 감소하는 것으로 보아 시간이 지날수록 통증에 대한 반응이 증가하였으며, 52일 정도에 역치값이 최하로 나타났다. 관절염 치료에 따른 기계적 유해자극에 대한 회피반응 역치값은 실험군과 비교하여 높게 나타났으며, 치료 후 1주(42일째)부터 통증에 대한 반응의 차이가 나타나기 시작하였다. 실험 시작 62일째 통증의 정도를 측정한 결과 치료군(4.61 ± 0.57 g)에서 실험군(2.77 ± 0.77 g)에 비해 의미있는 역치값의 증가를 보였다($p < 0.001$).

통증유발수용체로 알려진 TRPV1과 ASIC3의 mRNA 수준에서의 발현은(Figure 5A) 각 정상군에 비하여 2배 가까이 발현이 증가하였으며($p < 0.01$), 각 실험군에 비하여 약 1.2배 정도 발현이 증가하였다. 특히 관절염 치료에 따라 증가된 ASIC3 발현의 차이는 실험군과 비교하였을 때 통계적 의의를 가졌다($p < 0.05$). TRPV4와 ASIC1의 mRNA

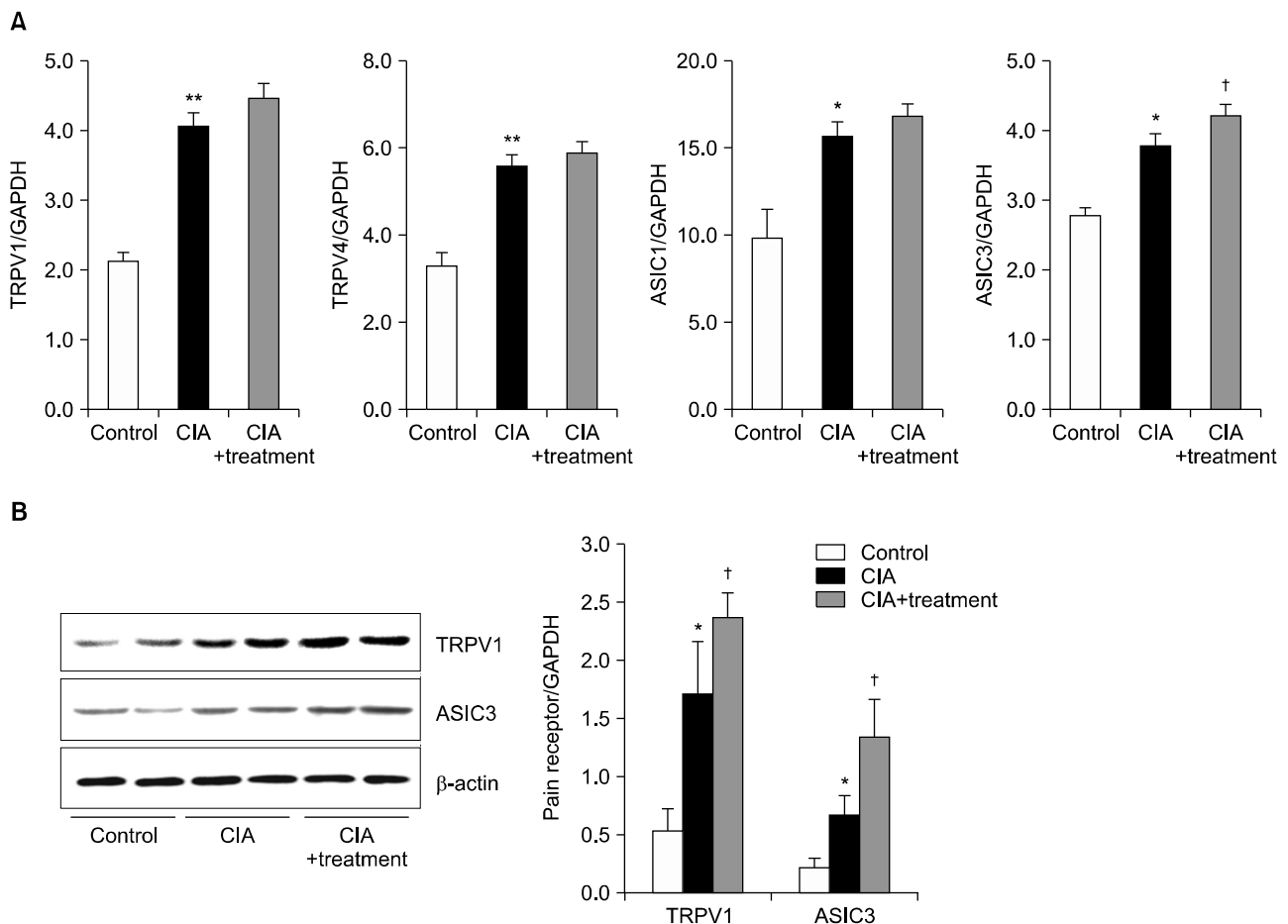


Figure 5. Expression of pain related ion channel such as TRPV1 and ASIC3 in CIA mice. (A) Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of TRPV1, TRPV4, ASIC1 and ASIC3 expression in CIA mice. (B) Western blot analysis of TRPV1 and ASIC3 expression in CIA mice. β -actin was used as a loading control. Results were normalized for β -actin expression. Statistical data repeat of three independent experiments. Values are mean \pm standard deviation. ASIC: acid-sensing ion channel, CIA: type II collagen induced arthritis, TRPV: transient receptor potential vanilloid. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group; † $p < 0.05$ vs. CIA group.

발현은 정상군과 비교하여 실험군(TRPV4, $p < 0.01$; ASIC1, $p < 0.05$)에서 증가하였고 치료군에서는 실험군과 비교하여 약간의 증가하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적 의미를 지니지는 않았다. 이에 같은 조직에서 단백질 수준의 TRPV1과 ASIC3의 발현은 실험군과 비교하여 치료군에서 증가하였다($p < 0.05$) (Figure 5B).

고 찰

Type II collagen 유도 관절염(type II collagen induced arthritis, CIA)은 T세포 매개에 의한 만성 염증성 관절염의 동물 모델로서, 신생혈관증식과 판누스 형성, 활막 세포의 비정상적인 증식과 활성화로 인한 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화를 유도한다[10,11]. 이로 인한 관절의 염증 및 파괴를 특징으로 사람의 류마티스관절염 증상과 유사하며, 염증성 통증의 연구에도 많이 활용되고 있는 동물모델이다[10,11]. 이를 이용하여 type II collagen 유도 관절염에서 치료의 유무에 따른 통증유발 수용체의 조절에 미치는 효과를 파악하기 위하여 시도되었다.

연구결과 관절염의 치료가 콜라겐 유도 관절염 동물모델에서 실험군과 비교하여 관절염 점수 및 관절염의 발병을 낮추고 조직학적으로 연골파괴, 류마티스관절염의 병인과 관련한 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-17의 정도를 개선시키고, 발바닥에 가해진 기계적 유해 자극에 대한 회피반응을 측정할 역치값 또한 향상시키는 등의 효과를 보여주었다.

염증이 지속되면서 사이토카인 및 분비물질들에 의해 통증을 수반하게 되는데 이는 개인차가 심하며 주관적인 척도라 객관적 수치화를 하기에는 한계가 있고 균일화된 마우스에서처럼 활발한 연구가 어려운 문제점이 있다. 실제 임상에서는 최근 많은 연구자들이 가시적 유추 척도(visual analogue scale), 맥길-멜락의 통증 조사서 등을 이용하여 많은 연구가 진행 중이다[12,13]. 이에 본 연구에서는 비교적 균일화된 동물모델에서 통증을 정량화하고자 하였고 염증성 통증의 측정을 위해 type II collagen 유도 관절염 동물모델에서 von Frey filament를 이용하여 기계적 유해자극에 대한 회피반응을 관절염 치료의 유무에 따라 비교 조사하였다. 그 결과 실험군에서는 시간이 지날수록 역치값이 감소하는 것으로 약간의 자극에도 민감도(sensitization)를 보였으며, 치료군에서는 약물의 투여 이후 더 이상 역치값이 낮아지지는 않았으며, 대체로 실험군보다 높은 역치값을 나타내었다.

통증을 느끼게 하는 각종 자극에 대한 반응으로 분자적 접근으로 알려진 수용체들이 있다[14,15]. 첫째, 열 자극에 반응하는 단백질로 TRPV1은 캡사이신에 반응하는 수용체로 nerve growth factor (NGF), pH의 감소, 조직 손상 시 분비되는 염증유발 물질에 의해 자극에 대한 민감한 반응을 보이게 된다[16]. 둘째, 기계적 자극에 반응하는 ASIC3와 dorsal root acid sensitive ion channel은 어떤 기전으로

기계적 자극을 탐지하는지에 대한 기전은 알려진 바 거의 없지만 유해자극 수용의 기계적 민감도에 필요하다는 보고가 있다[17]. 최근 TRPV4가 결핍된 쥐의 꼬리에 기계적 압력에 대한 역치값은 정상과 비교하여 증가하였다는 보고가 있다. 이 TRPV4가 저장성 자극에 반응하여 활동전위를 일으킨다는 보고는 TRPV4는 열과 기계적 유해자극 수용에도 관여한다는 것을 보여준다[18]. 셋째, 통증 조절 수용체로서 화학적 자극에 반응하는 P2X (purinergic receptor)는 adenosine triphosphate에 의해 열리는 이온 통로이며, 특히 통증과 관련해서 감각신경 세포에서 isolectin B4 (IB4)를 함유한 C섬유에서 주로 P2X3 수용체가 과발현된다[19]. 마지막으로, 유해자극 수용기에 강한 자극으로 인해 주변에서 분비되는 여러 물질에 의해 동일한 자극에 대한 반응이 증가하는 민감화 현상을 보이기도 하는데, 염증에 의한 과민증의 원인으로 NGF는 조직손상이나 염증에 의해 주변 세포에서 분비가 증가하여 유해자극 수용 세포의 TRPV1과 ASIC3의 생산을 증가시키며, NGF를 정상 쥐에 주사하면 열이나 기계적 자극에 민감한 반응을 보이며 통각과민증을 보인다는 보고도 있다[16]. TRPV와 ASIC가 각종 자극 및 면역현상에 의해 활성화되면 Ca^{2+} , Na^{+} 이 세포막 안으로 수송되며, protein kinase C 혹은 protein kinase A pathway, ERK mitogen-activated protein kinase를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, DRG와 HEK293세포를 co-culture하여 캡사이신(capsaicin) 자극에 의해 발현하는 endothelin-1과 TRPV1의 co-localization을 가진다고 보고된 바 있다[20]. 또한, ASIC3는 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 낮은 pH (pH 6.0)와 IL-1 β 의 자극에 의해 염증과 통증을 유발하며 활막세포의 사멸을 조절하는 중요한 역할을 한다[21].

본 연구에서는 정상군과 비교하여 type II collagen으로 관절염을 유도한 그룹에서는 염증상태로 인하여 생성되는 각종 사이토카인들의 자극, 조직의 산증, 열자극 및 기타 다른 pathway들의 활성화로 인하여 TRPV1과 ASIC3 수용체의 흥분을 유도하였을 것이다. 치료군에서는 TRPV1과 ASIC3의 발현이 실험군보다 더 증가한 것으로 나타났다. 이는 TRPV는 캡사이신 등에 의해 활성화를 보일 때 이온채널이 탈감작되는 특성을 가지는데 이것이 장기화될 때 통증을 감소시키는 결과를 가진다고 보고[22] 된 바와 상통한다. 또한 통증을 줄여주는 여러 치료약 중 하나로 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)는 NSAID activated gene-1 (NAG-1)를 활성화시키고 Cox, prostaglandin과 같은 염증성 사이토카인 등의 활성을 억제하고 결국 통증을 줄여준다고 보고된 바 있다[23,24].

이것으로 미루어 보아 type II collagen 유도 관절염 동물 모델에서 치료에 따라 TRPV1과 ASIC3 이온 채널의 활성화를 극대화하여 이를 장기화시켜 이온채널의 탈감작을 일으키고, NAG-1과 같은 진통과 관련한 또 다른 기전의 활성화를 유도함으로써 통증 경감 효능을 보이는 것으로

추측한다. 본 연구에서는 관절염 치료에 따른 통증수용체인 TRPV1과 ASIC3의 발현조절 관찰에만 그쳤지만 향후 염증성 사이토카인과 통증수용체의 발현조절에 관한 관계 규명에 뒷받침할 수 있는 연구가 될 것으로 생각한다. 또한 통증과 통증수용체의 조절로 인한 진통효능을 가지는 새로운 치료약물 개발에 타겟이 될 것이며 이들과의 직접적인 기전들의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 type II collagen으로 유도한 관절염 동물 모델에서 치료에 따라 IL-6와 IL-17의 발현이 감소하며, von-Frey filament를 이용한 기계적 유해자극에 대한 회피 반응 역치값 또한 증가시켰다. 또한, 통증을 일으키는 분자적 접근에서 TRPV1과 ASIC3와 같은 통증유발 수용체의 발현을 증가시켜 이온채널의 탈분극을 일으켜, 진통효능을 나타내었다. 이러한 결과는 류마티스관절염 치료에서 통증 조절의 분자적 기전을 연구하는 데 중요한 기초 자료가 될 수 있다고 생각된다.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-16.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995;63:289-302.
- Kojima M, Kojima T, Ishiguro N, Oguchi T, Oba M, Tsuchiya H, et al. Psychosocial factors, disease status, and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *J Psychosom Res* 2009;67:425-31.
- Billeter AT, Hellmann JL, Bhatnagar A, Polk HC Jr. Transient receptor potential ion channels: powerful regulators of cell function. *Ann Surg* 2014;259:229-35.
- Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2002;22:10662-70.
- Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 1993;154:113-6.
- Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:418-24.
- Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-208.
- Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:1117-23.
- Stuart JM, Townes AS, Kang AH. Collagen autoimmune arthritis. *Annu Rev Immunol* 1984;2:199-218.
- Kim HO, Lee SI. Experimental animal models for rheumatoid arthritis: methods and applications. *J Rheum Dis* 2012;19:189-95.
- Sokka T. Assessment of pain in patients with rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17:427-49.
- Melzack R. The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain* 1975;1:277-99.
- Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, et al. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 2008;27:3047-55.
- Chung MK, Jung SJ, Oh SB. Role of TRP channels in pain sensation. *Adv Exp Med Biol* 2011;704:615-36.
- Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 2005;24:4211-23.
- Ikeuchi M, Kolker SJ, Burnes LA, Walder RY, Sluka KA. Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* 2008;137:662-9.
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 2003;278:22664-8.
- Staikopoulos V, Sessle BJ, Furness JB, Jennings EA. Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 2007;144:208-16.
- Plant TD, Zöllner C, Kepura F, Mousa SS, Eichhorst J, Schaefer M, et al. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain* 2007;3:35.
- Sluka KA, Rasmussen LA, Edgar MM, O'Donnell JM, Walder RY, Kolker SJ, et al. Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:1194-202.
- Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 2011;107:490-502.
- Baek SJ, Wilson LC, Lee CH, Eling TE. Dual function of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1126-31.
- Mimeault M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol* 2010;224:626-35.