

Carrageenan으로 유도된 염증성 근통증 흰쥐 모델에서 경피신경전기자극과 냉치료에 의한 비복근의 cyclooxygenase-2의 감소

광주보건대학 물리치료과

백윤웅·채윤원

Reduction of muscle cyclooxygenase-2 with transcutaneous electrical nerve stimulation and cold therapy in rats of carrageenan-induced inflammatory muscle pain

Paek, Yun-Woong Ph.D., Chae, Yun-Won, M.S., P.T.

Department of Physical Therapy, Kwangju Health College

- ABSTRACT -

Prostaglandins are generated through two isoforms of the enzyme cyclooxygenase, constitutively expressed cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2, which is induced at sites of inflammation. Inhibition of COX-2 is desirable as this may avoid side effects seen with NSAIDs. We examined the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation and cold therapy on the levels of muscle cyclooxygenase-2 mRNA in rats of carrageenan-induced inflammatory. The method of behavioral assessment were paw withdrawal latency(PWL) and tail flick test(TFT). The COX-2 mRNA levels were quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Following the transcutaneous electrical nerve stimulation and cold therapy, PWL and TFT were increased and COX-2 mRNA expression in gastrocnemius muscles were decreased. These results suggest that a transcutaneous electrical nerve stimulation and cold therapy were good therapy for a muscle pain.

Key words : Carrageenan, COX-2, TENS, Cold therapy, RT-PCR

I. 서론

Prostaglandins(PGs)는 유해수용성 처리과정, 면역반응, 신장기능, 암 등에 수많은 생물학적인 중요한 기능을 가지고 있다. Arachidonic acid에서 prostaglandins으로 전환은 두 가지 등위효소(isozyme) cyclooxygenase-1, 2(COX-1, 2)에 의해 촉매 되어진다. COX-1은 대부분의 조직에서 항상 발현되는 constitutive form이어서 어떤 외부 자극에 대해 변화가 크지 않다. 반면에 COX-2는 대부분의 정상조직에 존재하지 않다가 다양한 약물이나 유해수용성 자극, growth factor, cytokines, 호르몬, 종양 등에 의해 유도되어지는 inducible form이다(Hla and Neilson, 1992; Rimarachin et al, 1994; Herschman, 1994).

이러한 자극에 증가된 COX-2는 COX-1보다 병리적 상태에 더 중요한 영향을 미치기 때문에 COX-2를 감소시키기 위하여 NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 예: aspirin)제제를 사용한다.

NSAIDs는 항염증과 해열, 진통효과가 있는데 작용은 PGs의 생합성에서 COX을 억제한다. 만성통증과 만성관절염 등에 많이 사용되는데 이러한 약물을 장기간 복용시는 위장장애, 신장독성 같은 부작용이 생긴다(Kawamori, 1998). 특히 류마티스성 관절염환자의 활액조직 COX-2 발현이 증가되어 이것을 감소시키기 위하여 선택적인 COX-2 억제제인 Celecoxibe(Montsanto searle), Rofecoxib (Merk Co.) 등이 장기간 사용되고 있다(Crofford et al, 1994; Hawkey, 1999). 이러한 COX-2 억제제를 사용하는 것 보다 비약물적 치료인 물리치료를 적용해서 COX-2를 감소시킨다면 훨씬 더 좋은 방법이라 하겠다. 근골격계로부터 기인한 통증을 관리하기 위한 물리치료로는 전기치료, 열치료, 도수치료를 적용한다(Wright and Sluka, 2001). 통증치료를 위해 가장 많이 쓰이는 전기치료는 경피신경 전기자극(TENS)로서, 수술후 통증, 급성과 만성 통증, 근통증, 신경병증 통증을 경감시키기 위해 사용되는 비침투적 임상도구이다(Walsh, 1997). 또한 냉적용은 통증과 종창을 감소시키고(Webb et al, 1998) 이차적인 조직 손상을 예방하는데 효과적이다(Merrick et al, 1999; Kenjo et al, 2002). 이러한 물리치료 적용 후 통증의 정도와 진통의 효과를 평가하기 위해 유해수용성 자극 검사로서 꼬리치기와 열판 검사를 한다. 그리고 최근에 c-fos, COX-2와 같은 유전자는 말초유해자극 초기에 반응하여 발현되는

유전자(immediate early genes)로 알려져 있어서 통증연구의 marker로 사용되어지고 있다(Harris, 1998; Yamagata et al, 1993; Adams et al, 1996).

그래서 근통증 모델을 확립한 후, 물리치료인 TENS와 냉을 적용하여 행동반응을 측정하고 COX-2의 발현 수준을 조사하여 치료효과가 있는지를 알아보고자 한다.

II. 연구방법

흰쥐(Sprague-Dawley)의 비복근(gastrocnemius muscle)에 carrageenan으로 근육주사하여 근통증 모델을 확립한 후, 물리치료인 TENS와 냉을 적용하고 행동반응을 측정 (behavioral assessment)하였다. 그리고 비복근에서의 COX-2 mRNA 발현 정도를 RT-PCR를 통해 비교하여 치료의 상관관계를 조사하였다.

1. 근통증의 유발

200g의 수컷 흰쥐의 오른쪽 후하퇴 비복근에 멸균된 PBS에 용해된 2% carrageenan, 0.1ml를 근육 주사하였다.

2. 행동반응 측정

근통증에 대한 행동반응을 측정하기 위해 발 움추림 잠복기(paw withdrawal latency, PWL)와 꼬리치기 검사(tail flick test, TFT)를 실시하였다. PWL은 체중을 지지하고 있는 쥐의 족저면에 열을 적용한 순간부터 발을 들어올리는데 까지의 시간으로 결정하였다. 쥐를 30°C를 유지하고 있는 열판 위에 올려놓고 적응을 위해 15분간을 두었다가 적응 시간이 끝나면 열을 53±0.1°C로 상승시켜 PWL의 시간을 측정하였다.

TFT를 측정하기 위해 쥐의 체형에 맞게 제작된 원통형으로 생긴 작은 실험관에 넣고 꼬리만 밖으로 나오게 하였다. 적응을 위해 5분의 시간을 주고 적응 시간이 끝나면 쥐의 꼬리 끝을 53°C로 가열된 증류수의 비이커 안에 넣어 꼬리치기가 일어나기 까지의 시간을 측정하였다.

PWL과 TFT를 측정시 열에 대한 쥐의 손상을 피하기 위하여 제한시간은 20초로 하였고 5분 간격으로 3번 측정하여 평균 시간을 계산하였다.

3. 적용된 물리치료

1) TENS 적용

TENS 치료는 근통증 유발 4시간 후에 적용하였고 TENS를 적용하기 전에 비복근 부위의 털을 조심스럽게 가위로 제거한 후, 미용 제모제 일동 니트크림®(일동제약, 한국)을 발라 털을 깨끗이 제거한 후 실험을 하였다. TENS(EMPI, Eclipse™)를 적용하기 위하여 2% halothane으로 마취시켜 마취된 쥐의 비복근 부위에 두 개의 전극(linch, round)을 배치시키고 빈도는 100Hz, 펄스의 폭은 100 μ s, 자극의 강도는 감각자극하여 20분간 적용하였다. 감각자극은 근수축이 일어나는 강도에서 자극의 강도를 약간 줄여 근수축이 일어나지 않게 하였다.

2) 냉적용

냉치료는 근통증 유발 4시간 후에 적용하였으며 냉치료를 적용하기 전에 2% halothane으로 마취를 시켰다. 마취된 쥐의 비복근 부위를 4°C의 물이 20분간 순환되도록 장치하였다.

4. 비복근에서 RNA 추출과 RT-PCR를 이용한 COX-2 mRNA의 expression 비교

Ultraspec™ RNA 분리계 (Biotech Laboratories, Inc., Houston, Tx, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법으로 비복근으로부터 total RNA를 분리하였다. 즉 0.1g의 얼린 비복근 조직을 1 ml의 Ultraspec™ RNA 용액에서 Polytron homogenizer (KINEMATIKA)로 균질화한 후 4°C에 5분간 incubation한다. 다음에 Ultraspec™ RNA 용액 1 ml당 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 samples을 격렬하게 섞고 4°C에 5분간 incubation하였다. 균질액을 12,000 g, 4°C에서 15분동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 시료를 4°C에서 10분간 incubation한 후 12,000 g, 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 RNA를 침전시킨다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 75% ethanol 1ml로 세번 세척하였다. RNA pellet을 공기 중에서 말린 후 DEPC를 처리한 물에 용해시켜 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였다. 역전

사(reverse transcription)를 위하여 total RNA 1 μ g을 200 U reverse transcriptase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10 U RNasin, dNTP mix (0.5 mmol/L), DTT (10 mmol/L), MgCl₂ (2.5 mmol/L), oligo (dT) (0.5 μ g), reaction buffer [200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 500 mmol/L KCl]에 첨가하여 최종 volume이 20 μ L가 되게 하여 Gibco사의 절차에 따랐다. COX-2의 PCR 조건은 94°C에서 1분 30초간 denaturation, 54°C에서 1분 30초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension step을 밟았다. β -actin은 94°C에서 45초간 denaturation시킨 후, 56°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension시켰다.

COX-2(Yang et al, 1998) 그리고 β -actin(Abassi et al, 1998)의 oligonucleotide 서열은 다음과 같다.

COX-2 primers (sense primer, 5'-ACACTCTACTGGCATCC-3', antisense primer 5'-GAAGGGACACCCCTTTCACAT-3')을 이용하며, 최종산물은 584 bp fragment이다. β -actin primers는 (sense primer: 5'-GACTACCTCATGAAGATCCTGACC-3': antisense primer: 5'-TGATCTTCATGGTCTAGGAGCC-3')을 이용하며, 최종산물은 423bp fragments이다. PCR을 위하여 각 primer 20 pmole, dNTP mix (250 μ mol/L), MgCl₂ (1.5 mmol/L), 1U Taq polymerase를 혼합하여 최종 volume 20 μ L를 만들어 사용하였다. PCR로 증폭된 반응 산물은 ethidium bromide가 함유된 agarose gel에 전기영동하여 UV transilluminator로 비추어 사진을 찍은 후 COX-2 mRNA의 발현정도를 IMAGER™ & 1D MAIN (Bioneer, Korea)을 이용하여 정량화하였다.

5. 자료처리

PWL과 TFT에서의 변화는 ANOVA를 이용하여 비교하였고, 사후검정은 Tukey 검정법을 이용하였다.

RT-PCR에서 얻은 결과는 student t-test를 이용하였다. 통계학적 유의수준은 .05로 하였고, SPSS 10.0 for Window를 사용하여 통계 처리하였다.

III. 결 과

1. TENS와 냉을 적용한 후 경과시간대별 실험군간 PWL, TFT의 변화

Carrageenan을 투여하기 전과 투여한 후 4시간에서 대조군과 실험군간에 PWL과 TFT 변화는 없었다(Table. 1, 2). 그러나 약물 투여 후 10시간과 24시간에서는 carrageenan군과 TENS와 냉이 적용된 실험군간의 PWL과 TFT 변화는 유의한 차이를 보였다(Table. 1, 2). PWL과 TFT의 차이는 약물 투여 후 10시간과 24시간에서 관찰되었는데 이는 이차성 열 통각과민이 유발된 후에 TENS와 냉이 적용된 실험군의 PWL과 TFT은 적용하지 않은 carrageenan군에 비해 상승되었음을 알 수 있었다. 그리고 약물 투여 후 10시간과 24시간에 있어 PWL과 TFT에 대한 TENS와 냉 적용간의 차이는 보이지 않았다.

Table. 1. PWL difference between groups in each time (단위 : sec)

Time	carrageenan			F	p
	carrageenan	carrageenan + cold	carrageenan + TENS		
Baseline	12.00±0.76	11.50±1.20	11.86±0.64	.674	.520
Hour 4	6.13±1.46	5.38±0.92	6.63±1.30	2.038	.155
Hour 10	5.75±1.04	8.88±0.64	9.38±0.52	52.929	.000*
Hour 24	6.00±1.07	10.88±0.84	11.38±0.74	88.440	.000*

mean±SD

* p<.05

Table. 2. TFT difference between groups in each time (단위 : sec)

Time	carrageenan			F	p
	carrageenan	carrageenan + cold	carrageenan + TENS		
Baseline	11.38±0.52	11.63±0.52	11.50±0.59	.339	.717
Hour 4	5.38±0.52	5.25±0.46	5.38±0.52	0.179	.848
Hour 10	6.00±0.76	9.00±0.53	10.63±0.74	31.764	.000*
Hour 24	5.40±0.53	11.00±0.76	11.38±0.52	273.000	.000*

mean±SD

* p<.05

2. 비복근에서의 COX-2 mRNA의 변화

대조군, carrageenan을 투여한 실험군과 carrageenan을 투여하고 TENS 혹은 냉치료를 적용한 실험군에서 COX-2 mRNA의 발현 정도를 비교한 결과 carrageenan을 투여한 후, 24시간이 지난 carrageenan 실험군에서 COX-2

mRNA가 대조군에 비해서 현저히 증가하였으며 carrageenan을 투여하고 4시간 후, TENS 혹은 냉치료를 하여 20시간이 지난 실험군에서는 carrageenan으로 증가된 COX-2 mRNA가 대조군 수준으로 유의성 있게 감소하였 다 (Fig. 1).

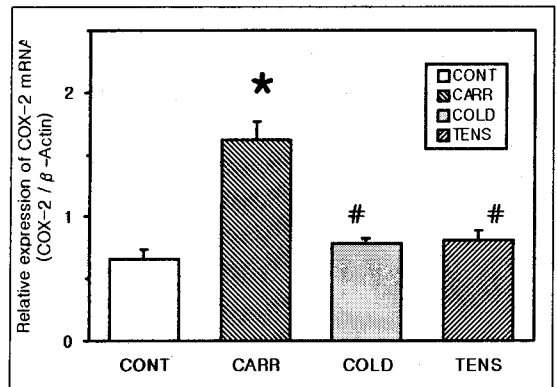
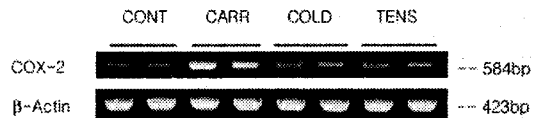


Fig. II. Expression of COX-2 mRNA in the gastrocnemius. Levels of COX-2 mRNA expression were determined using RT-PCR technique.

Original data of 2 animals per groups are shown in (a). Each column are presented the densitometric analysis (b). * means p<.05 vs. CONT. # means p<.05 vs. CARR(CONT : control, CARR : carrageenan).

IV. 고찰

근골격계의 통증을 관리하기 위하여 전기치료, 열치료, 도수치료를 적용하고(Wright and Sluka, 2001) 진통의 효과를 평가하기 위해 통증과 관계된 행동반응인 유해수용성 자극 검사를 측정하게 되는데 가장 흔한 유해성 자극 검사는 꼬리치기 검사와 열판검사가 이용된다.

Gopalkrishnan과 Sluka(2000)는 실험동물의 발바닥에

carrageenan을 주입한 후 발바닥에서의 발 움추림 잠복기를 측정하여 이차성 열 통각과민을 감소시켰으며 24시간 동안 유지되었다고 보고하였다. Sluka 등(1998)은 실험동물의 슬관절에 kaolin과 carrageenan을 주입한 후 이차성 열 통각과민을 알아보기 위해 발바닥에서 발 움추림 잠복기를 평가하였는데, 고빈도와 저빈도 TENS 모두에서 이차성 열 통각과민을 감소시켰다. 그러나 이차성 열 통각과민의 지속시간은 서로 달랐다. 저빈도 TENS는 이차성 열 통각과민의 감소가 12시간 지속되었으나 고빈도 TENS에서는 24시간 지속되었다. 이러한 결과는 실험동물의 비복근에 carrageenan을 주입한 후 고빈도 TENS에 의해 이차성 열 통각과민을 감소시킨 본 연구의 결과와 유사하였다.

통증을 감소시키기 위한 냉 적용은 오래 전부터 사용되어 왔으나 그 효과에 대한 근거는 불분명한 상태이다. 냉의 국소 적용은 피부, 근육, 그리고 관절내 온도를 낮추고 (Oosterveld et al, 1992; Merrick et al, 1993), 말초신경의 전도 속도를 느리게 한다고 보고되어 왔다(Halar et al, 1980). 일차 구심성 신경 섬유를 통한 척수로의 감소된 유해수용성 정보는 통증에 대한 행동반응의 감소와 척수 후각 신경원의 신경활동을 감소시킬 것이다. 본 연구의 결과에서 이차성 열 통각과민에 대한 냉의 적용으로 발 움추림 잠복기와 꼬리치기 잠복기의 증가를 보였다. 이러한 결과는 슬관절의 동물모델에서 냉 적용이 이차성 열 통각과민을 감소시켰다는 Sluka 등(1999)의 연구 결과와 유사하였다. 냉 적용 후의 이차성 열 통각과민의 감소 결과로부터 냉 적용이 척수 신경원의 활동을 감소시키고 확장된 수용야를 시켰다고 추측된다.

그러나 이러한 치료효과를 평가하는데 있어 행동반응 측정만으로는 불합리적인데가 있어 보다 객관적이고 정확한 생체내의 분자생물학적인 수준에서 조사가 필요하리라 생각된다. 그래서 최근에 c-fos, COX-2 등은 말초유해자극 초기에 반응하여 발현되는 유전자로 알려져 있어서 통증의 연구의 marker로 사용되어지고 있다(Harris, 1998; Yamagata et al, 1993; Adams et al, 1996). 근통증 모델을 확립한 후, TENS와 냉을 적용하여 병리적 상태에 영향을 끼치는 COX-2의 발현을 조사한 결과 carrageenan에 의해 유도되어 현저히 증가되었던 COX-2가 TENS와 냉의 적용에 의해 대조군 수준으로 감소함을 확인하였다. 이러한 통증연구에서 실험모델에 적합한 표준물질이 될 수 있는

생리적 물질이 있다면 물리치료 적용 후 그 효과를 평가하는 marker로 사용하면 보다 좋은 객관적인 자료가 되리라 생각한다.

V. 결 론

흰쥐의 비복근에 carrageenan으로 근육주사하여 근통증 모델을 확립한 후, TENS와 냉을 적용하여 행동반응을 측정한 결과 PWL과 TFT 모두에서 약물 투여 후 10시간과 24시간에서 carrageenan군과 TENS와 냉을 적용한 실험군 사이에서 유의한 차이를 보였다. 그리고 RT-PCR에 의해 COX-2 mRNA를 조사한 결과 위의 두 가지 물리치료 적용 후에 carrageenan에 의해 증가되었던 COX-2가 대조군 수준으로 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 행동반응측정과 COX-2의 결과는 근육통 치료에 TENS와 냉치료가 효과가 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I, et al. Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide. *Am J Physiol*, 274(4 Pt 2):F766-74, 1998.
- Adams J, Collaco-Moraes Y, de Bellerocche J. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem*, 66:6-13, 1996.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156-159, 1987.
- Corfford LJ, Wilder RL, Risitimaki AP, et al. Cyclooxygenase-1 and 2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effect of interleukin 1b, phorbol ester and corticosteroids. *J Clin Invest*, 93:1095-1101, 1994.
- Gopalkrishnan P, Sluka KA. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil*, 81:984-990, 2000.

- Halar EM, DeLisa JA, Brozovich FV. Nerve conduction velocity : Relationship of skin, subcutaneous and intramuscular temperatures. *Arch Phys Med Rehabil*, 61:199-203, 1980.
- Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Research Bulletin*, 45(1):1-8, 1998.
- Hawkey CJ. Cox-2 inhibitors. *The Lancet*, 353:307-314, 1999.
- Herschman HR. Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Metastasis Rev*, 13:241-256, 1994.
- Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad USA*, 89:7384-7388, 1992.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 58:409-412, 1998.
- Kenjo T, Kikuchi S, Konno S. Cooling decreases fos-immunoreactivity in the rat after formalin injection. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 394:271-277, 2002.
- Merrick MA, Knight KL, Ingersoll CD, et al. The effects of ice and compression wraps on intramuscular temperatures at various depths. *J Athl Train*, 28:236-245, 1993.
- Merrick MA, Rankin JM, Andres FA, et al. A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 31(11):1516-1521, 1999.
- Oosterveld FGJ, Rasker JJ, Jacobs JWG, et al. The effect of local heat and cold therapy on the intraarticular and skin surface temperature of the knee. *Arthritis Rheum*, 35:146-151, 1992.
- Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cell. *Artheroscler Thromb*, 14:1021-1031, 1994.
- Sluka KA, Bailey K, Bogush J, et al. Treatment with either high or low frequency TENS deduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain*, 77:97-102, 1998.
- Sluka KA, Christy MR, Peterson WL, et al. Reduction heat treatment in an animal model of acute arthritis. *Arch Phys Med Rehabil*, 80:313-317, 1999.
- Walsh DM. TENS clinical applications and related theory. 1st, New York, Churchill Livingstone. 1997.
- Webb JM, Williams D, Ivory JP, et al. The use of cold compression dressings after total knee replacement: a randomized controlled trial. *Orthopedics*, 21(1):59-61, 1998.
- Wright A, Sluka KA. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. *Clin J Pain*, 17(1):33-46, 2001.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, et al. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11:371-386, 1993.
- Yang T, Singh I, Pham H, et al. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*, 274:F481-F489, 1998.