

Effect of Carrageenan on the Tendon of Skeletal Muscle of the Rat

Gi-Youn Hong¹, Seung-Taeck Park¹, Seung-Joo Jekal² and Kang-Chang Lee^{1†}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Wonkwang University, Jeonbuk 570-749, Korea,

²Department of Clinical Pathology, Wonkwang Health Science College, Jeonbuk, 570-749, Korea

The aim of present study was to examine the effect of carrageenan on the tendon of skeletal muscle of rat. The tendon damage was induced by injection of carrageenan into skeletal hind muscle of rats. Rats were killed on 48 hours after carrageenan injection. The resulting tendons were fixed with 10% neutral buffered formalin (NBF), dehydrated, embedded, sectioned by 4 μm, and stained by phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) or hematoxylin-eosin (H-E). Carrageenan induced the segregation of tendon fibers, intratendinous cleft, segregation of muscle cell group, wave arrangement of tendon fiber. The results suggest that carrageenan induced tendon damage of rat's skeletal muscle by morphological changes.

Key Words: Carrageenan, Tendon damage, Skeletal muscle

서 론

골격근 (skeletal muscle)은 뼈에 부착하여 수동적인 뼈의 운동을 능동적으로 할 수 있도록 도와주는 기관계로서 내장 근육과는 달리 우리가 마음대로 움직일 수 있는 근육계통이다 (Carvalho et al., 1997; Dirks et al., 2002). 특히, 골격근은 빠른 운동을 할 수 있는 백색근과 느리면서도 지속적으로 운동할 수 있는 적색근으로 구성되어 있다 (Carvalho et al., 1997). 이 두 종류의 골격근은 어떠한 인체운동이라도 그 상황에 적절히 대응할 수 있도록 수축과 이완이 잘 발달되어 있는데 이러한 운동을 가능하게 해주는 것은 골격근내에 근탄력을 도와주는 다량의 근원섬유 (myofibril)와 함께 골격근의 기시부 (origin point)와 정지부 (insertion point)에 부착되어 있는 건 (tendon)의 신축성 때문이다 (Amiel et al., 1984). 그러므로 골격근의 손상은 건의 손상을 초래하게 되며 역으로 건의 손상은 심한 통증의 유발과 함께 건이 부착되어 있는 골격근의 굴신운동을 방해함으로써 행동의 제한을 받게 된다 (Amiel et al., 1984; Armstrong et al., 1984). 건은 근육처럼 다수의 근세포와 근원섬유의 함량대신 수많은 건섬유인 교원섬유 (collagenous fiber)가 주를 이루고 있어 일단 손상을 받게 되면 근육에 비하여 재생이 어려울 뿐만 아니라 정상적

인 운동을 하기까지에는 장기간의 회복시간을 필요로 하기 때문에 일상생활에 많은 불편이 따른다 (Birk et al., 1982; Carvalho et al., 1997). 건의 손상은 건세포를 비롯한 건섬유의 손상을 초래하게 되는데 이 때 건의 수축능과 이완능은 물론이고 건섬유의 함량, 수분의 함량, 무게 및 아미노산 등 다양한 요소적 변화를 초래하게 된다 (Largos et al., 1972). 건의 손상이 장기간 계속될 경우 건이 부착되어 있는 근육과 함께 심한 통증과 함께 염증성 반응을 일으키게 된다 (Millian, 1999). 이러한 경우 근육의 경직과 함께 건의 팽창력이나 수축력이 떨어지게 된다 (Yoon et al., 1999). 특히, 건이 손상되면 건섬유의 변화에 따라 건내에 위치하고 있는 지각신경종말장치인 건방추 (neurotendinous spindle)가 활성화 됨으로서 심한 통증이 유발되며 이러한 통증은 척수의 지각신경세포에 탈분극을 야기시킴으로서 통증수용체를 자극하게 된다 (Millian, 1999; Yoon et al., 1999). 건이 부착되어 있는 근육에 염증이 유발된 경우 이는 곧 바로 건에 과급되어 통각물질과 함께 tumor necrosis factor (TNF)-α를 비롯한 interleukin (IL)-1과 같은 cytokine의 분비나 neurokinin과 같은 염증성매개물질들이 통증수용체를 계속적으로 자극하여, 자극된 통증수용체는 척수세포로 하여금 흥분성 아미노산의 분비를 촉진시킨다 (Lang et al., 1994). 흥분성 아미노산의 분비는 척수의 후각신경세포에 위치하고 있는 Ca²⁺의 수용체인 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor를 자극하게 되며 이러한 자극은 feedback 효과에 의해 다시 근육세포에 영향을 미침으로서 근육에 이어 곧 건이 손상을 받게 된다 (Corderre et al., 1992; Sluka et al., 1993). 이중, 특히 염증성 통증기전에 가장 많은 영향을 미치는 것은 Ca²⁺ 채널과 관련된 신호체계회로이다

*논문 접수: 2004년 8월 17일

수정재접수: 2004년 9월 8일

†교신저자: 홍기연, (우) 570-749 전북 익산시 신륵동 344-2

원광대학교 의과대학 산부인과학교실

Tel: 063-850-1228, Fax: 063-852-7520

e-mail: hong57@wonkwang.ac.kr

(Birdsell et al., 1966; Bryans et al., 1998). 칼슘은 신경전달물질의 분비와 함께 근세포를 탈분극 시키기 때문에 근육의 수축과 이완작용에 절대적으로 필수적인 인자이다 (Amstrong et al., 1984; Bryans et al., 1998). 그러나 만약 칼슘의 대사에 이상이 유발되어 칼슘항상성에 손상을 받는 경우 세포내 과량의 양의 칼슘유입에 의하여 세포를 팽창시킴으로서 세포사멸 (apoptosis)을 초래할 뿐만 아니라 이차적으로 세포내 신호전달체계에 관여하고 있는 cAMP나 cGMP를 비롯한 protein kinase C (PKC)와 같은 세포의 이차전달자의 활성을 방해하게 됨으로서 세포조절기전이 손상된다 (Hohman et al., 1989; Goodll et al., 1996). 특히, 통증유발시 통각물질이 척수의 후각신경세포를 자극하면 흥분성 아미노산에 의한 glutamate 수용체의 활성화를 유도하며 이의 활성은 세포내 Ca^{2+} 의 유입을 초래케 하여 근세포나 건섬유 등에 영향을 줌으로서 근육과 건의 운동기전에 이상을 유도함으로써 결국 근육이나 건의 퇴행성 변화를 유발하게 된다 (Frank et al., 1983; Cho et al., 1998). Carrageenan은 근육에서 bradykinin을 비롯한 neurokinine과 같은 물질을 분비하여 통증수용체를 자극하고 이는 이차적으로 glutamate나 aspartate와 같은 흥분성 아미노산 (extotoxic amino acids, EAAs)을 분비하여 세포내 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과활성 및 세포내 칼슘의 유입을 촉진시킴으로서 세포의 고사를 유발한다. 이와 동시에 통증은 cytokine의 일종인 interleukin (IL)-1, 6 또는 TNF (tumor necrosis factor)- α 와 같은 염증매개물질의 분비를 촉진시킴으로서 세포의 퇴화를 가속화함으로써 근육에 손상을 유도한다고 알려져 있다 (Hohman et al., 1989). 따라서 본 연구에서는 랫드의 하지골격근에 carrageenan으로 근손상을 유발한 후 이들이 건에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 원광대학교 의과대학 실험동물실에서 사육하고 있는 Sprague-Dawley (150~200 g) 계통의 수컷 랫드를 사용하였으며 실험전 모든 쥐에게 사료와 물을 마음대로 먹게 하였다.

2. 시약처리

멸균된 phosphate buffered saline (PBS)에 5 mg carrageenan (Sigma)을 멸균된 100 ml, 10 ml, 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 각각 5%, 50%, 100%로 만들어 냉암소에 보관하였으며 실험당일 필요한 농도로 희석한 후 사용하였다.

3. 근손상 유발 및 건의 적출

대조군과 실험군으로 3마리씩 2조로 나눈 후 백서를 ether

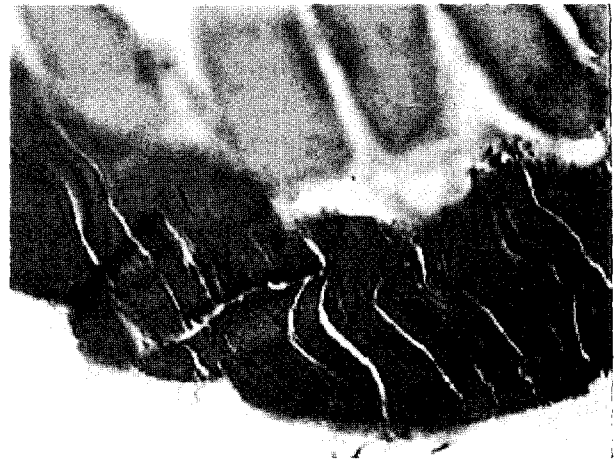


Fig. 1. A microphotograph showing control group stained by PTAH. Tendon fibers were arranged regularly and fibers were contacted each other closely. The free margin of tendon was not separated by the fusion of tendon fibers. $\times 100$

로 마취시켰다. 마취 후 실험군은 왼쪽 하지근에 2% carrageenan을 0.1 ml를 주입하였으며 대조군에서는 약물대신 실험군과 동일한 량의 생리적 식염수를 주입후 모두 48시간 후에 희생하였다. 희생 후 건의 적출은 골격근의 기시부를 절개하여 사용하였다.

4. 조직절편의 제작

10% neutral buffered saline (NBF)에 고정된 건조직을 PBS로 3회 세척한 다음 알코올을 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%의 농도 순으로 탈수하여 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직은 4 μ m로 박절한 후 John 등 (1977)의 방법에 따라 PTAH (phosphotungstic acid hematoxylin)로 염색을 시행하였다. 즉, 박절한 절편을 1% potassium permanganate 수용액에 5분 동안 처리한 후 PBS로 3회 세척하였으며 세척 완료 후 PTAH용액에서 24시간 동안 처리한 다음 투명, 봉입한 다음 관찰하였다. 또한 hematoxylin-eosin (H-E) 염색은 통상적인 방법에 의하여 행하였다.

결 과

1. 대조군

대조군에서는 건을 형성하고 있는 건섬유들이 서로 긴밀하게 융합되어 있었으며 건과 인접하고 있는 근육세포들의 간격이 일정하게 배열되어 있었다. 또한 건막 (aponeurosis)의 손상이나 건섬유의 분리가 나타나지 않았다 (Fig. 1).

2. 실험군

실험군에서는 대조군에 비하여 건을 구성하고 있는 건섬

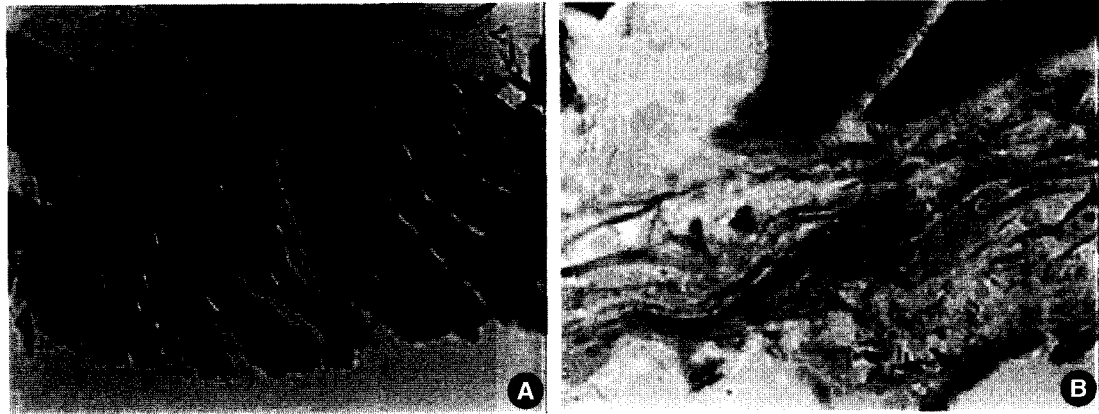


Fig. 2. A microphotograph showing experimental group stained by PTAH. Tendon were separated by small gab, and free margin of tendon was separated (A). Tendon fibers stained by H-E were separated some strips with damage of tendon fascia. some fibroblasts (dark stain) were seen within tendon fibers (B). $\times 100$

유들의 부착이 긴밀하지 못하여 건분리가 관찰되었으며 일부에서는 건섬유의 파상배열도 관찰되었다. 또한, 건의 자유연은 건섬유가 분리된 채 수개의 군으로 나뉘어져 있었으며 건과 근육과의 경계부위에는 대조군에 비하여 근육세포군이 간극에 의하여 더욱 넓게 떨어져 있었다 (Fig. 2A). 동시에 건막의 손상과 함께 건섬유가 심하게 분리되어 있는 것도 관찰되었다 (Fig. 2B).

고 찰

골격근의 건손상은 근육의 굴신운동 제한과 함께 불편한 행동장애를 유발한다 (Yoon et al., 1999; Dirks et al., 2002). 건의 손상은 건이 부착하고 있는 골격근의 손상으로 인하여 유발되기도 하지만 이 밖에 직접 외부의 심한 충격에 의한 외상이나 약물, 또는 절단에 의해서도 손상을 받는다 (Frank et al., 1983). 이러한 경우 대개 염증이나 염좌 등이 동반되어 지는데 일단 건이 손상을 입게 되면 장기간의 치료를 필요로 하며 또한 치유 후에도 강력한 운동을 하기에는 제한을 받게 된다 (Frank et al., 1983; Armstrong et al., 1984). 골격근의 손상은 건에 직접적으로 영향을 주지만, 건은 근육의 굴신작용에 따라 신축성 있게 반응하여야 됨으로 건이 손상된 경우 역으로 근육의 활동을 방해함으로써 근손상을 초래하게 된다 (Frank et al., 1983; Carvalho et al., 1997). 근육에 염증이 발생된 경우 이는 곧바로 건으로 파급되기 때문에 빨리 치료하지 않을 경우 심각한 후유증을 초래하게 된다 (Amiel et al., 1984; Malmberg et al., 1995). 건은 손상이 되면 자가면역반응 (autoimmune response)에 의하여 어느 정도 회복은 되어지지만 이보다 심한 경우 대부분 수술이나 장기간의 약물복용과 함께 물리적 치료를 병행하는 경우가 많다 (Holloszy et al., 1991). 만약 근육에 염증이 유발된 경우는 chemokine이나

cytokine과 같은 염증성 물질의 분비를 비롯하여 glutamate나 substance P와 같은 물질들이 통각수용체를 자극함으로써 심한 통증과 함께 병변이 더욱 촉진된다고 알려져 있다 (Frank et al., 1983; Hohman et al., 1989; Lang et al., 1994). 건의 손상은 건섬유의 손상이나 퇴화를 나타내게 되며 또한 건섬유를 형성하는 섬유모세포 (fibroblast)의 활성을 증가시키기도 한다 (Hohman et al., 1989). 건은 건세포를 비롯하여 건섬유를 생성하는 섬유모세포들로 이루어져 있기 때문에 이의 손상이 건의 구성물질인 건세포나 건섬유의 함량변화를 비롯하여 건섬유의 sugar level이나 탄수화물의 함량 및 건의 직경 등과 같은 여러 요인에 영향을 미치게 된다 (Malmberg et al., 1993). 이들 요인의 변화는 건세포를 비롯한 건섬유 등에 영향을 주게 되며 더욱 진행되는 경우에는 건의 재생이나 회복에 심각한 영향을 미치게 된다 (Armstrong et al., 1984; Hohman et al., 1989). 그러나 아직까지 골격근과 건사이에 일어나는 손상기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다 (Birk et al., 1982; Dirks et al., 2002). 따라서 본 연구에서는 근육의 염증 유발에 따른 건의 손상현상을 조사하기 위하여 carrageenan으로 백서의 하지골격근에 근염증을 유발한 후 근염증이 골격근의 건에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 약제를 처리하지 않은 대조군에서는 건섬유들이 서로 밀접하게 연결되어 있었으며 건과 인접하고 있는 근세포군간의 간격이 일정하게 배열되어 있었다. 또한 건막의 손상이나 건섬유의 분리가 나타나지 않았다. 이에 비하여 carrageenan으로 근손상을 유발한 실험군에서는 대조군에 비하여 건을 구성하고 있는 건섬유들간에 작은 분열이 나타나 건의 분리가 관찰되었으며 건섬유가 대조군에 비하여 더욱 파상모양으로 배열되어 있었다. 동시에 건의 자유연은 건섬유가 분리된 채 수개의 소군으로 나뉘어져 있었다. 또한 건과 근육과의 경계부위에는 대조군에 비하여 근육세포군이 간극에 의하여 더욱 넓

게 떨어져 있었으며, 건막의 파괴와 건섬유가 심하게 분리되어 있는 것도 관찰되었다. 이러한 변화는 carrageenan에 의한 근손상이 건에 영향을 미쳤다는 것을 말해주고 있으며 이 같은 건의 손상은 건섬유의 퇴화를 유도함으로써 건섬유의 부착능과 배열 등에 영향을 준 것으로 생각된다 (Bora et al., 1972; Largos et al., 1972; Hohman et al., 1989). 그러나 골격근과 건간의 손상에 대한 상호작용에 대한 기전을 더욱 자세히 규명하기 위해서는 건의 손상이나 재생 시 관계되는 여러 인자들, 즉 근육내의 염증매개물질인 cytokine을 비롯한 chemokine, Ca²⁺-channel associated receptor의 활성을 비롯하여 건섬유 내의 콜라겐의 합성능, 수분의 변화, amino sugar의 양적 변화 등과 같은 다양한 인자들에 대하여 보다 종합적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res.* 1984. 1: 257-265.
- Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988. 33: 87-107.
- Birdsell DC, Tustanoff ER, Lindsay WK. Collagen production in regenerating tendon. *Plast Reconstr Surg.* 1966. 37: 504-511.
- Birk DE, Lande MA. Corneal and scleral collagen fiber formation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1982. 670: 362-369.
- Bora FW jr, Lane DM, Prockop PJ. Inhibitions of collagen biosynthesis as a means of controlling scar formation in tendon injury. *J Bone Joint Surg.* 1972. 54: 21-59.
- Bryans JS, Davies N, Gee NS, Dissanayake VU, Ratacliffe GS, horwell DC, Bennett GJ, Zotterman Y. Identification of novel ligands for the gabapentin binding site on the alpha 2 delta subunit of a calcium channel and their evaluation as anti-convulsant agents. *J Med Chem.* 1988. 41: 1838-1845.
- Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ. Metabolic and contractile responses of fast and twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg.* 1997. 99: 163-171.
- Cho SW, Cho EH, Choi SY. Activation of two types of brain glutamate dehydrogenase isoproteins by gabapentin. *FEBS Lett.* 1998. 426: 196-200.
- Corderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci.* 1992. 12: 3665-3670.
- Dirks A, Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002. 282: R519-527.
- Frank C, Schachar N, Dittrich D. Natural history of healing in the repaired medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 1983. 1: 179-188.
- Goodill AL, Oh HS, Meyer SA, Smart RC. Epidermal protein kinase C-β is highly sensitive to downregulation and exclusively expressed in Langerhans cells: Downregulation is associated with attenuated contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 1996. 107: 354-359.
- Hohman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 1989. 170: 607-612.
- Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Aging* 1991. 60: 199-213.
- John G, Bancroft, Alan S. Theory and practise of histology technique 2nd ed. Churchill Living Scone Press. pp. 91-92.
- Lang CW, Hope PJ. Evidence for localized release of substance P within rat spinal cord evoked by physiological and electrical stimuli. *Neuropeptide* 1994. 26: 413-419.
- Laros GS, Cooper RR. Electron microscopic visualization of proteopolysaccharides. *Clin Orthop.* 1972. 84: 179-192.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Spinal nitric oxide synthase inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 1993. 54: 291-300.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in anesthetized rats. *J Neurosci.* 1995. 15: 2768-2776.
- Millian MJ. The introduction of pain: An integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999. 57: 1-164.
- Sluka KA, Westlund KN. An experimental arthritis model in rats: the effect of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. *Neurosci.* 1993. 149: 99-102.
- Yoon MH, Yaksh TL. The effect of intrathecal gabapentin on pain behavior and hemodynamic on the formalin test in the rat. *Anesth Analg.* 1999. 89: 434-439.