

우슬과 초음파가 퇴행성관절염 백서의 관절 연골에 미치는 영향

김은정 · 정현우¹ · 김계엽*

동신대학교 물리치료학과, 1: 동신대학교 한의학과

Effect of *Achyranthis Radix* and Ultrasound in Osteoarthritis Rats Articular Cartilage

Eun Jung Kim, Hun Woo Chung¹, Gye Yeop Kim*

Department of Physical Therapy, 1: Department of Oriental Medicine of Dongshin University

Osteoarthritis(OA) diseases are characterized by joint pain, tenderness, limitation of movement, crepitus, occasional effusion, and variable degrees of inflammation without systemic effects. We investigated the effects of *Achyranthis radix* cream treatment and low intensity ultrasound in monosodium iodoacetate(MIA) induced experimental osteoarthritis rat. Sprague-Dawley 40 rats of 7-8 weeks, weight 250 ± 50 g were divided into four groups including the control group and osteoarthritis group(30 rats). Histopathological examination, Mankin's score, and immunohistochemical were performed. Histological findings in control group that are similar to those observed in human osteoarthritis, such as disorganization of chondrocytes, erosion and fibrillation of cartilage surface, and subchondral bone exposure. Safranin O-fast green staining revealed that marked diffuse reduction of proteoglycans and chondrocyte treated with MIA. The Mankin's score were closely correlated to the grade of histological findings. The level of Bax and caspase-3 expression decreased experimental groups. This study shows that a *Achyranthes Radix* cream treatment and low intensity ultrasound exerts a beneficial influence on the severity of chondral lesion in osteoarthritis rats. This treatments could related to a reduced level of chondrocyte apoptosis through anti-apoptotic capacities of MIA-induced apoptotic protein overexpression.

Key words : *Achyranthis radix*, Ultrasound, Osteoarthritis, Cartilage

서 론

퇴행성 골관절염(degenerative osteoarthritis)은 관절 질환 중 가장 흔한 형태의 하나로 가동관절에서 비염증성 원인에 의해 관절 연골의 퇴화 및 마모로 인해 만성 통증과 장애를 수반하는 질환이다¹⁾. 최근 고령화에 따른 65세 이상의 인구에서 흔히 볼 수 있으며²⁾, 현재까지도 연령이 증가할수록 퇴행성 변화의 발생과 악화는 비례하여 증가되는 것으로 알려져 있다. 퇴행성 골관절염은 주로 체중 부하를 많이 받는 슬관절과 고관절에서 호발하며, 연골하골의 변화뿐만 아니라 관절 연골의 퇴행을 포함

하고 있다³⁾.

퇴행성 골관절염의 가장 흔한 임상적 특징은 통증, 강직, 부종, 염증과 함께 관절의 점진적 운동장애를 초래하며, 그 외에 뼈마찰음(bony crepitus), 골비대(enlargement), 변형, 불안정, 근육 약화, 활막 비대(synovial thickening), 삼출(effusion) 등의 징후를 보인다⁴⁾. 관절염 발생의 위험 요인으로는 노령화, 반복되는 움직임, 가족력, 비만, 외상 등으로 알려져 있다⁵⁾. 퇴행성 골관절염 환자의 관절 연골에서 중요한 특징은 연골 재생과 파괴의 균형이 적절하게 이루어지지 못해, 결국 연골 기질의 파괴와 연골세포수의 감소로, 만성적인 연골파괴 현상이 나타난다^{6,7)}. 이는 연골 세포의 세포고사와 관련되어 지는 것으로 보인다.

특히 세포고사의 내인성경로와 관련하여 세포고사를 촉진하는 Bax 단백질 같은 자극은 세포질 내로 단백질분해효소군인 caspase family를 활성화시켜 세포고사를 유도하게 된다^{8,9)}.

* 교신저자 : 김계엽, 전남 나주시 대호동 252 보건복지대학 물리치료학과
· E-mail : kykim@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3391
· 접수 : 2008/02/27 · 채택 : 2008/03/20

caspase는 세포의 DNA손상을 결정하는데 중요한 역할을 하며, caspase-3는 정상상태에서 불활성화 형태인 pro-caspase-3로 존재하다가 세포고사가 일어나면 active-caspase의 형태로 된다¹⁰. 이는 세포고사에 중요한 역할을 하는 물질 중의 하나로 알려져 있으며, 염증 전 사이토카인과 관련되는 것으로 알려져 있다¹¹. 우슬(牛膝)은 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 다년생 식물로 국내와 중국, 일본에 주로 분포하는 다년생 초본이다. 우슬은 오래전부터 귀한 약재로 사용하고 있으며, 국내에 실제 생약으로 실용화 되는 것은 최무릎이고, 일부 남부지역에서 긴잎최무릎(Archyranthes longifolia)로 사용되고 있다. 우슬은 진통, 이뇨, 고혈압, 류마티스, 골관절염등의 치료 및 민간에서 많이 사용되어 지고 있는 약재이다^{12,13}. 저강도 초음파는 조직 내에 간접적인 기계적 스트레스를 줌으로 현재까지도 여러 세포 종류에서 골형성 증진, 단백질 합성, 칼슘 흡수, DNA 합성들이 보고되고 있다^{14,15}. 저강도 초음파의 기계적 자극은 인접한 세포의 세포막 투과성을 변화시켜, 세포 안으로 Ca²⁺이온을 유입시키므로, 세포 내에 Ca²⁺ 농도를 증가시키고¹⁶ 이러한 세포 내의 변화는 세포의 움직임이나 성장인자(growth factor)들의 합성을 증가시켜 조직 및 상처 치유에 이로인 영향을 준다고 보고되었다¹⁷.

따라서 본 연구에서는 우슬 엑스가 함유된 크림을 만들어 슬관절 부위에 도포하고, 초음파 처치에 따라 monosodium iodoacetate (MIA)로 유도된 퇴행성 관절염 백서의 슬관절 연골에 이들 처치가 어떠한 영향을 미치는가 알아보고자 실시하였다. 이를 위해 퇴행성 관절염을 유발한 백서에 우슬엑스가 함유된 크림과 초음파를 처치하여 퇴행성 관절염이 유도된 슬관절의 병리조직학적 변화와 세포고사와 관련된 단백질 발현에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물

본 연구에서는 체중이 약 250±50 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐(8주령, 웅성, 대한실험동물)를 사용하였고, 군당 10마리씩 40마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 25±1℃, 습도 55 ± 10%를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 물과 사료는 자유롭게 급여하였다. 우슬과 초음파를 처리하기 전에 관절염 유발을 확인하여 관절염이 유발된 흰쥐를 선별하여 그룹화 하였다. 실험 동물은 실험대조군은 퇴행성 골관절염 유발군(n=10), 실험군 I은 저강도 초음파 적용군(n=10), 실험군 II는 우슬 크림 처치군(n=10) 그리고 실험군 III는 저강도 초음파 적용 후 우슬 연고 처치군(n=10)으로 나누었다(Table 1).

Table 1. Classification of experimental groups.

Group(n=10)	Characteristics
Control group	MIA induced osteoarthritis group
Experimental group I	OA induced and treated with ultrasound
Experimental group II	OA induced and treated with Archyranthes Radix extract cream
Experimental group III	OA induced and treated with ultrasound and Archyranthes Radix extract cream

2. 퇴행성 관절염 동물 모델

퇴행성관절염 유발 모델을 제작하기 위해 Dunham 등(1993)¹⁸의 방법에 따라 관절염을 유발하였다. 실험 동물실에서 적응된 흰쥐를 마취 챔버(Royal medical, 한국)에 넣고, 70% N₂O와 28.5% O₂ 가스에 2.0% 엔플루란(enflurane)을 혼합시킨 마취가스로 흡입전신마취 후 수술대에 고정시키고, monosodium iodoacetate(I2512, Sigma, Poole, UK)를 오른쪽 슬관절의 슬개골 인대를 통해 관절내 주사(intraarticular injection)를 하였다. MIA는 0.9% sterile saline에 마리당 3 mg의 농도가 되게 용해하여 한 관절에 50 µl씩 26 gauge를 사용하여 주사하였다. 우슬과 초음파 처치 전에 관절염 유발 시 정상 대조군은 동일한 위치에 0.9% sterile saline 50 µl씩 주사하여 비교하였다. 관절염 유발 성공여부에 관한 병리조직학적 평가는 퇴행성 관절염 유발 전, 유발 14일째에 10마리를 부검하여 퇴행성 관절염유발 정도를 조직학적으로 확인한 후에 그룹화 하여, 처치하였다.

3. 우슬 처리 및 초음파 적용

우슬을 이용한 경피투과제의 제조는 이한섭(2001)¹⁹과 Yang 등(2006)²⁰의 선행연구를 기초로 하였다. 경피투과제 제조 시 용매에 우슬의 양을 일정하게 취하여 각각 용해시켰다. 연고의 제조는 우슬 엑스 1.0 g을 녹인 Labrafil 15.0 ml에 정제수 20 ml, 에탄올 5.0 ml과 oleic acid 10.0 ml을 넣어 섞고 triethanolamine 1.0 ml을 넣어 기계식 교반기를 사용하여 천연고분자와 약물이 균일하게 섞이도록 교반하였다. 이와 같이 얻은 경피투과제는 밀봉하여 사용할 때까지 보관하였다. 각 실험군에 연고도포 방법은 우슬 엑스가 3% 함유된 크림 0.1 g을 실험 기간 동안 관절염 유발 흰쥐의 슬관절 부위에 고르게 퍼서 도포하였다. 병합군인 실험군 III는 초음파 처치 후 관절 부위에 도포하였다. 초음파 치료군은 기포가 제거된 물을 플라스틱 용기에 담아 흰 쥐를 고정틀에 묶은 다음 양하지를 물에 담그고 좌, 우측 후지와 초음파 도자 사이의 거리는 1.2 cm를 유지하는 간접 조사방법을 이용하였다. 관절염치료를 많이 사용되는 주파수인 1 MHz로 비온열적 방법으로 Fyfe와 Chahl(1980)²¹의 방법으로 1:4의 단속형 비율을 사용하였고 0.5 W/cm²의 강도로 주 5회 동안 초음파 치료를 시행하였다.

4. 병리조직학적 검사

퇴행성 골관절염이 유발된 흰쥐의 슬관절을 조직병리학적 검사를 하기 위하여 치료 종료 후에 각각 5마리씩 부검하여 슬관절을 채취하였다. 채취한 슬관절은 10% 포르말린(formalin)에 24시간 고정하였고, 그 후 파라핀 포매 전 formic acid로 탈회하였다. 일반적인 탈수, 투명 및 침투 과정을 거쳤으며, 파라핀 블록의 제작과 냉각은 자동 포매 장치(Tissue-TEX, Japan)를 사용하였다. 제작된 파라핀 블록은 회전식 미세 박절기(Rotary Microtome 2040, Japan)를 사용하여 쥐의 우측 슬관절을 박절하였으며, 부유 온수조와 신전기 과정을 거쳐 슬라이드에 슬관절을 부착시켰다. 슬관절 절편은 관절 조직 및 주변 조직의 염증성 침윤(infiltration) 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin & Eosin (H

& E) 염색을 실시하였고, 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green 염색을 실시하였다.

5. Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색

박절한 조직 절편은 탈파라핀 과정을 거쳐 Hematoxylin과 Eosin으로 염색한 후 과염색된 부분은 흐르는 수돗물에 5~10분 정도 수세한 다음 핵이 청명한 색이 되도록 세포질 대조 염색으로 염색한 다음 15초간 과도한 Eosin 용액을 흐르는 물로 세척하고 탈수 및 투명과정을 거쳐 봉입하였다.

6. Safranin O-fast green 염색

탈파라핀과 함수 처리 과정을 거친 후 Weigert's iron hematoxylin 용액에 10 분간 반응시킨 후 10 분간 흐르는 물에 수세하였다. Fast green (FCF) solution(F7258, Sigma, St Louis)에 5 분간 염색한 후, 1% acetic acid solution에 10-15 초간 반응시켰다. 0.1% safranin O(S2255, Sigma, St Louis) solution에 5 분간 염색하고, Safranin O-fast green으로 염색된 슬라이드는 5-10 분 정도 충분히 세척하여 핵이 청명한 색이 되도록 하였다. 탈수 및 투명과정을 거친 후 봉입하였다. 그 후 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)을 사용하여 각각의 조직절편의 염증세포의 침윤정도, 연골과 뼈의 파괴 유무, 세포 파괴 유무를 관찰하였으며, 현미경에 장착된 디지털 CCD 카메라(Foculus, Germany)로 각 군의 조직들을 촬영하였다.

7. 조직학적 평가

퇴행성 관절염 부분의 정도를 평가하기 위하여 Galois 등²²⁾의 방법을 변형하여 Mankin's score를 측정하였다. Mankin's score는 2명의 독립된 관찰자에게 단계에 대해 설명한 후 등급을 매기게 하였다. 이 점수는 조직 구조(structure), 세포형(cellularity), safranin o-fast green 염색 정도, 연골세포층의 비대 두께(thickness of hypertrophic chondrocyte layer), 골 재형성과 골파괴(bone remodelling and osteolysis) 등으로 구분화하여 점수화 하였다. 전체 점수의 합계는 총 15점으로 하였다.

8. 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 후 5 µm 두께로 박절한 관상 절편은 Bax와 caspase-3 단백질 발현을 알아보기 위해 면역조직화학 반응 검사를 실시하였다. 각 실험 조건에 따라 처리한 관절조직의 면역조직학적 염색은 조직의 탈파라핀 과정을 끝낸 후 면역조직화학염색을 위한 전 처리 과정으로 3%의 endogenous peroxidase를 반응시키고, 0.15% triton X-100을 첨가한 PBS 용액을 사용하여 조직의 투과성을 높여 조직 내부에 1차 항체 용액이 잘 흡수되도록 하였다. BSA가 포함된 용액 1% 차단 용액으로 처리하여 비특이적 반응을 차단한 후, 0.01 M PBS로 세척하고, Bax(1:50, Cell Signaling Technology Inc., USA)와 caspase-3 (1:50, Cell Signaling Technology Inc., USA)로 4℃에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하였다. 이후 anti-rabbit Ig G (1:1,000, Abcam, UK)로 반응시킨 후 0.1% Triton X-100으로 반응시켰다.

다시 절편을 0.01 M PBS로 수세한 후 ABC-Kit (Vector, USA)로 60분간 반응시켰으며, 0.01 M PBS로 수세과정을 거쳐 10분간 DAB (3,3'- Diaminobenzidine, ZYMED Lab, Germany)로 발색을 하였다. 0.01 M PBS로 수세한 후 조직을 슬라이드에 올려 Hematoxylin으로 3분간 염색한 후 흐르는 물에서 수세하고 에탄올과 xylene에 조직을 처리하여 탈수 및 투명화 과정을 거쳤다. 그 후 모든 슬라이드에 permanent mounting media를 이용하여 봉입을 실시하였다. 조직형태학적 관찰은 광학 현미경(Olympus, BX 50, Japan)을 이용하였고, 현미경에 장착된 CCD 카메라(Foculus, IIEE 1394, Germany)로 단백질 발현 정도를 관찰하였다.

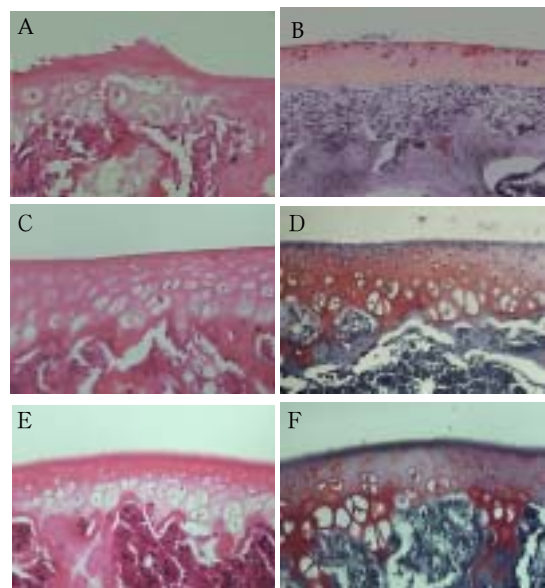
9. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS ver. 12.0 windows를 사용하였다. 각 Mankin's score에서 실험군들의 차이를 검정하기 위하여 paired t-test를 실시하였다. 모든 통계학적 유의 수준은 p<0.05 수준에서 채택하였다.

결 과

1. 치료 종료 후 병리조직학적 소견

퇴행성 골관절염 유발 후 저장도 초음파와 우울 크림을 처리 한 후 21일째 연골의 변화를 보기 위하여 백서의 우측 슬관절을 H & E와 safranin O-fast green 염색으로 관찰하였다(Fig. 1). 실험 종료 후 21일째 safranin O-fast green에 의해 연골의 침습 정도를 확인한 결과 실험대조군에서 슬관절의 연골 부분이 현저히 감소하였으며, 미약한 염증성 소견이 발견되었다(Fig. 1A, 1B). 이 염증은 활액막의 팽창에 의한 것으로 보여 진다. 실험군 I (Fig. 1C, 1D), II (Fig. 1E, 1F), III (Fig. 1G, 1H)에서는 경증의 활액막이 관절 부분에서 관찰 되었으며, 약간의 proteoglycan의 소실과 세포질이 관절의 일부 구획에서 관찰되었으나, 연골층이 대조군에 비해 많이 호전됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).



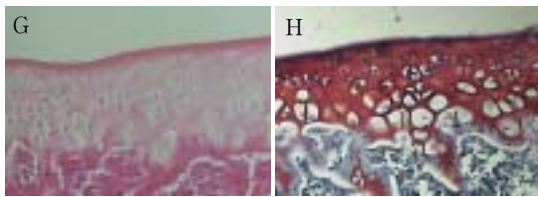


Fig. 1. Histological change of cartilage undergoing a treatment during osteoarthritis rats(21 days, H & E stain, safranin O-fast green stain, × 200). A, B: MIA induced osteoarthritis group. C, D: Experimental group I. E, F: Experimental group II. G, H: Experimental group III.

2. 치료 종료 후 병리조직학적 평가

우슬 크림제와 저장도 초음파 처치 후 21일에 백서의 우측 슬관절을 H & E와 safranin-O fast green 염색으로 관찰하고, 이를 토대로 Mankin's score로 측정된 결과 Fig. 2와 같다. 21 일째에 실험대조군은 7.2±0.54점, 실험군 I은 5.8±0.52점, 실험군 II는 5.1±0.73점, 실험군 III은 4.8±0.76점으로 실험군들에서 대조군에 비해 유의하게 점수가 감소하여, 치료 이후에 손상되었던 관절연골이 조직의 구조, 세포의 형태, 주위 세포의 기질의 염색성 등의 현미경적 소견이 어느 정도 정상 연골 조직으로 수복되어 가고 있는 과정임을 관찰하였다(P<0.05)(Fig. 2).

Fig. 2. Influence of a calibrated effort on histological lesions (according to Mankin's score) in post-monosodium iodoacetate (MIA) injection. (Values are showed mean±S.E. Statistically significant as compared with control group, *p<0.05).

3. 면역조직화학적 평가

1) Bax의 면역조직화학적 변화

우슬 크림제와 저장도 초음파를 처치 한 후 21일째 연골의 세포고사 관련 단백질 발현 정도를 확인 해보기 위하여 백서의 우측 슬관절을 면역조직화학적 방법으로 염색하여 Bax의 발현 정도를 관찰하였다(Fig. 3). 슬관절 부분 연골세포에서의 Bax 발현을 관찰하여 본 결과 실험 대조군에서 Bax는 진한 갈색으로 관찰되었다(Fig. 3A). 실험군 I (Fig. 3B), II (Fig. 3C), III (Fig. 3D)은 Bax 발현량이 대조군에 비해 많이 감소되어 있음을 관찰할 수 있었으며, 각 실험군들 발현 정도는 실험군 I과 실험군 II에서는 거의 동일한 감소를 보였고, 실험군 III에서는 실험군 I과 실험군 II 보다 더 많은 감소가 관찰되었다(Fig. 3).

2) Caspase-3의 면역조직화학적 변화

우슬 크림제와 저장도 초음파를 처치 한 후 21일째 연골의

세포고사 정도를 보기 위하여 백서의 우측 슬관절을 면역조직화학적 방법으로 염색하여 caspase-3의 발현 양상을 관찰하였다(Fig. 4). 슬관절 부분 연골세포에서의 caspase-3 발현을 관찰하여 본 결과 caspase-3는 진한 갈색으로 관찰되었으며, 실험대조군은 치료 21일째에는 caspase-3 발현 반응이 현저히 증가해 있음이 관찰되었다(Fig. 4A). 실험군 I (Fig. 4B), 실험군 II (Fig. 4C), 실험군 III (Fig. 4D)은 caspase-3 발현량이 대조군에 비해 감소되어 있음을 관찰할 수 있었으며, 저장도 초음파 처치 후 우슬을 병용한 실험군 III에서 더욱 현저하게 감소하였다(Fig. 4).

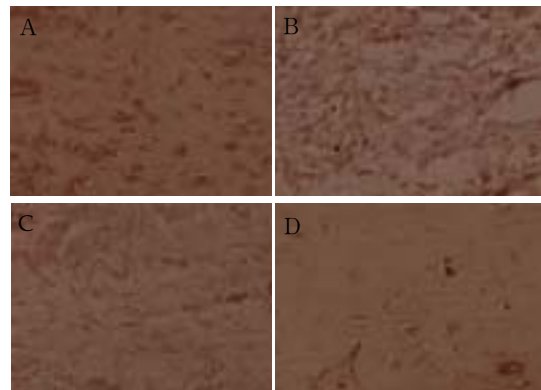


Fig. 3. Immunohistochemical Bax expression changes in osteoarthritic cartilage after ultrasound and AR treatment(Day 21, × 400). A: Control group: MIA induced osteoarthritis group. B: Experimental group I. C: Experimental group II. D: Experimental group III.

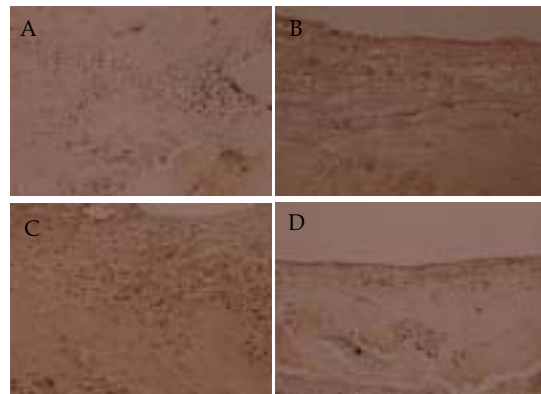


Fig. 4. Immunohistochemical caspase-3 expression changes in osteoarthritic cartilage after ultrasound and AR treatment(Day 21, × 400). A: Control group: MIA induced osteoarthritis group. B: Experimental group I. C: Experimental group II. D: Experimental group III.

고 찰

퇴행성 골관절염은 관절연골세포와 세포외기질간의 형태적, 생화학적, 분자적, 그리고 생역학적 변화가 분명하고, 임상적으로 관절통, 압통, 움직임의 제한, 뼈 마찰음, 염증 등을 특징으로 한다²³⁾. 관절염에 많이 사용되는 우슬은 주요 성분으로 saponin, betaines, achyranthine, amino acid, inokosterone, glactose, β-ecdysone, flavonoids와 미량원소인 티타늄 등이 함유되어 있다

고 보고되었다^{24,26}). 이와 같이 우슬의 성분 등의 연구가 일부 보고된바가 있으며, 실제 임상에서 퇴행성 골관절염 환자에게 민간요법으로 우슬과 초음파 치료를 많이 이용하고 있으나, 세포고사 단백질과 관련하여 관절연골세포에 대한 정확한 기전이나 치료 효과는 많이 밝혀져 있지 않다.

실험적 퇴행성 골관절염은 외과적 수술방법²⁷, collagenase 등의 효소이용²⁸, vitamin A 등을 이용한 연골세포의 대사 방해 등 여러 방법에 의해 유도되어 진다²⁹. Monosodium iodoacetate (MIA)로 유도한 관절염 모델은 Kalbhen에 의해 20년 전에 처음 소개되었다³⁰. 연골 세포의 정상 기능을 이루기 위해 관절 연골의 구조적인 통합이 이루어지는데, 국소적인 MIA 주사는 연골세포 내의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 활동억제로 인하여 해당 작용의 대사 작용 파괴로, 관절 연골의 퇴행화를 유도한다^{28,30}. Janusz 등(2001)³¹은 이러한 모델에서 관절 퇴행화의 조직학적 변화는 사람의 골관절염의 상태와 매우 유사하다고 하였다. 따라서 이러한 유사성 때문에 퇴행성 골관절염의 병태생리학적 실험과 약물 연구에 많이 사용하고 있다^{30,31}. 이러한 모델에서 많은 수의 관절 세포들이 퇴행성 변화나, 연골세포의 세포고사가 증가함을 보였다³².

Bove 등(2003)³³에 의하면, 관절 내 MIA 주사는 초기 염증 반응을 보이며, 단백 부종액, 섬유소, 대식세포, 중성구, 형질세포 대식구 등을 보인다고 하였다. 더욱이 MIA로 유도한 관절염 동물 모델에서 초기 염증반응은 후기 상태에서 1차 구심성 섬유막초 수송기 감작을 유도하여 특성화된 반응을 보이며³⁴, 이는 C 섬유와 관련하여 척수로 들어가는 입력을 더 증가시키고³⁵, 활막의 손상과 연골하 골의 노출로 사람과 같은 관절통이 발생되게 된다³⁶. 따라서 이러한 유사성 때문에 퇴행성 골관절염의 병태생리학적 실험과 약물 연구에 많이 사용하고 있다^{30,31}. 관절통각은 활액막 내 자유 신경 종말로부터 관절염이 있을 때 유발되며, MIA 유발 관절염 모델은 초기에 일시적 활막염을 유발한다³³. 국소 부위에 substance P, bradykinin, prostaglandins와 같은 물질의 유리를 유도하며³⁷, 관절염에서 대식세포의 역할에 대해 Haywood 등(2003)³⁸에 의해 확인된바가 있다. MIA 처치 후 염증 외에 연골하 골과 연골에 물리적 힘을 가함으로써 더욱 관절에 염증과 통증을 발생시키게 되며, 이러한 연구들은 최근 여러 연구에서 보고되고 있다³⁹. 본 연구결과에서 관절염 유발 후 실험 대조군에서 연골 전체적으로 두께와, 세포충실성(cellularity)이 현저히 감소하였고(Fig 1A, 1B), 퇴행성병변이 관절 모든 부분에서 잘 관찰되어 퇴행성 골관절염이 유발되었음을 조직학적 검사 및 평가를 통해 확인할 수 있었다. 처치 종료 후 각 실험군들에서 연골세포의 두께가 대조군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 1C-1H). 또한 이러한 조직학적 변화를 Mankin's score로 측정된 결과 실험대조군에 비해 처치한 각 실험군들에서 점수의 유의한 감소 효과를 관찰하였다($p < 0.05$). 세포고사와 관련하여 Bax와 caspase-3의 단백질 발현 정도를 면역조직화학적 방법을 통하여 관찰하여 보았다. 실험 대조군에서 Bax와 caspase-3의 세포고사 관련 단백질 발현이 유의하게 증가됨을 관찰 할 수 있었다. Blanco 등(1998)⁴⁰은 조직학적 소견에서 정상인의 관절 연골세포

에서는 자가 고사가 일어나지 않으나 퇴행성 골관절염 환자의 관절 연골에서는 평균 6%가 자가 고사 기전을 통해 세포사멸이 일어난다고 하였다. 본 연구에서 퇴행성 골관절염 모델에서 Bax와 caspase-3가 많이 증가됨을 보여, MIA로 관절염 유도 시 세포 대사작용의 억제로 인한 세포고사작용이 있는 것으로 사료된다. 우슬은 진통, 이뇨, 혈류 개선 등의 효과, 그리고 항산화작용이 있다고 알려지고 있다⁴¹. 또한 김성진 등(2002)⁴²의 논문에 의하면 백서의 두개관 세포 배양에서 우슬 추출물 투여 시 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 조골세포의 증식을 촉진시키고 경조직의 석회화를 촉진하여 세포 증식효과를 나타낸다고 보고된 바가 있다. 저강도 초음파와 우슬 크림제를 처리했던 각각의 실험군들에서는 이러한 Bax와 caspase-3의 발현이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4).

치료적 초음파의 생물학적, 조직학적 효과는 1 MHz로 치료적으로 3 W/cm² 강도가 보편적으로 사용되고 있으며, Deyne 등(1995)⁴³은 세포막의 이온의 흐름 증진과 세포내 Ca²⁺ 이동을 증가시켜, 세포이동 및 성장인자의 합성으로 인해 조직을 치유한다고 하였다. 초음파를 처리했던 각실험군에서는 Bax와 caspase-3의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과로 보아 MIA로 유도한 퇴행성 관절염 백서에서 우슬 엑스가 함유된 크림과 초음파를 처치 시 실험대조군에 비해 실험군들에서 관절 연골의 침식 정도가 많이 호전됨이 관찰되었으며, 연골세포의 세포고사와 관련한 Bax와 caspase-3의 단백질 발현에도 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 따라서 우슬 크림과 초음파를 처치하였을 때 세포고사를 많이 억제하는 것으로 보여지나, 이들과 관련한 세포고사와 관련하여 정확한 기전을 밝히는데 더 많은 연구들이 더 필요할 것으로 사료된다.

결론

실험적으로 MIA로 유도한 퇴행성 관절염 백서에서 우슬 엑스가 함유된 크림과 초음파를 3주간 치료하여 조직병리학적 검사, 면역조직화학적 검사를 통하여 이들 처치가 퇴행성 관절염에 미치는 영향을 관찰하였다. 조직병리학적 소견상 관절염 유발군에 비하여 모든 실험군에서 연골의 파괴 정도가 많이 호전되었으며, 세포고사 단백질 발현 정도를 알아보기 위하여 Bax와 Caspase-3의 발현정도를 검사하여 본 결과 우슬 엑스가 함유된 크림 처치와 초음파 처치는 세포고사 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신 인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 참여기업인 화순전남생약협동조합에 감사드립니다.

참고문헌

1. Witter, J., Dionne, R.A. What can chronic arthritis pain

- teach about developing new analgesic drugs? *Arthritis Res Ther.* 6(6):279-281, 2004.
2. Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Lubrano, E. Complementary medicine in rheumatoid arthritis, *Reumatism.* 57(4):226-231, 2005.
 3. DiPiro, J.T., Talbert, R.L., Hayes, P.E., Yee, G.C., Matzke, G.R., Posey, L.M. *Pharmacotherapy; A Pathophysiologic Approach.* 6nd ed, Connecticut, Appleton & Lange, pp 1860-1862, 2005.
 4. Jones, A., Doherty, M. ABC of rheumatology ; osteoarthritis. *Br Med J.* 310: 1299-1300, 1995.
 5. Macfarlane, D.G., Buckland-Wright, J.C., Emery, P., Fogelman, I., Clark, B., Lynch, J. Comparison of clinical, radionuclide, and radiographic features of osteoarthritis of the hands. *Ann Rheum Dis.* 50(9):623-626, 1991.
 6. Belia, S., Pietrangelo, T., Fulle, S., Menchetti, G., Cecchini, E., Felaco, M., Vecchiet, J., Fanò, G. Sodium nitruprusside, a NO donor, modifies Ca²⁺ transport and mechanical properties in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 19(8):865-876, 1998.
 7. Kim, H.A., Lee, Y.J., Seong, S.C., Choe, K.W., Song, Y.W. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* 27: 455-462, 2000.
 8. Grutter, M.G. Caspase ; key players in programmed cell death, *Curr Opin Struct Biol.* 10: 649-655, 2000.
 9. Raskin, C.A. Apoptosis and cutaneous biology, *J Am Acad Dermatol.* 36: 885-896, 1997.
 10. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazenbnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, N.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., Miller, D.K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376(6535):37-43, 1995.
 11. Reed, C.J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol.* 37(4 Suppl 7):9-16, 2000.
 12. 박인현, 이상래, 이상득, 송원섭. *약용식물재배*, 서울, 선진문화사, pp 281-283, 1993.
 13. 이승택, 채영암. *약용작물재배*, 서울, 향문사, pp 159-162, 1996.
 14. Chen, Y.J., Wang, C.J., Yang, K.D., Chang, P.R., Huang, H.C., Huang, Y.T., Sun, Y.C., Wang, F.S. Pertussis toxin-sensitive Galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett.* 6:554(1-2):154-158, 2003.
 15. Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M., Mikuni-Takagaki, Y. : Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *Bone Miner Res.* 18(2):360-369, 2003.
 16. Chang, W., Tu, C., Chen ,T.H., Komuves, L., Oda, Y., Pratt, S.A., Miller, S., Shoback, D. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology.* 140(12):5883-5893, 1999.
 17. Dinno, M.A., Dyson, M., Young, S.R., Mortimer, A.J., Hart, J., Crum, L.A. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys Med Biol.* 34: 1543-1552, 1989.
 18. Dunham, J., Hoedt-Schmidt, S., Kalbhen, D.A. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Pathol.* 74(3):283-289, 1993.
 19. 이한섭. 키토산 연고의 수용성 비타민 B2(Ribokalvin)의 경피 투과, 용인대학교 자연과학연구소 논문집, 6(1):1-7, 2001.
 20. Yang, K.H., Parvizi, J., Wang, S.J., Lewallen, D.G., Kinnick, R.R., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res.* 14(5):802-809, 1996.
 21. Fyfe, M.C., Chahl, L.A. The effects of ultrasound on experimental oedema in rat, *Ultrasound Med Biol.* 6(2):107-111, 1980.
 22. Galois, L., Etienne, S., Grossin, L., Watrin-Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Loeuille, D., Netter, P., Mainard, D., Gillet, P. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats ; a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage.* 12(10):779-786, 2004.
 23. Kuettner, K.E., Goldberg, V.M. *Osteoarthritic disorders, Rosemont (IL): American Academy of Orthopaedic surgeons.* pp 111-115, 1995.
 24. Ratra, P.S. Alkaloid in two species of *Achyranthes* at different stages of their growth. *Trends Sci Life.* 4:81-85, 1979.
 25. Seshatri, V., Batta, A.K., Rangaswami, S. Structure of two new saponins from *Achyranthes aspera*. *Indian J Chem Ser.* 20: 773-775, 1981.
 26. Raman, M.H., Faroque, A.S.M. Studies on the antibacterial properties of *Achyranthes aspera* stem. *Fitoterapia LXII.* 92-93, 1996.
 27. Marshall, K.W., Chan A.D. Bilateral canine model of osteoarthritis. *J Rheumatol.* 23: 344-350, 1996.
 28. van der Kraan, P.M., Vitters, E.L., van de Putte, L.B. & van den Berg, W.B. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol.* 135(6):1001-1014, 1989.
 29. Jouzeau, J.Y., Gillet, P., Netter, P. Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine.* 67: 565-569, 2000.
 30. Kalbhen, D.A. Chemical model of osteoarthritis-a pharmacological evaluation, *J Rheumatol* 14: 130-131, 1987.
 31. Janusz, M.J., Hookfin, E.B., Heitmeyer, S.A., Woessner, J.F.,

- Freemont, A.J., Hoyland, J.A., Brown, K.K., Hsieh, L.C., Almsstead, N.G., De, B., Natchus, M.G., Pikul, S., Taiwo, Y.O. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors, *Osteoarthritis Cartilage* 9(8):751-760, 2001.
32. Sandell, L.J., Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis, *Arthritis Res.* 3(2):107-113, 2001.
33. Bove, S.E., Calcaterra, S.L., Brooker, R.M., Huber, C.M., Guzman, R.E., Juneau, P.L., Schrier, D.J., Kilgore, K.S. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 11(11):821-830, 2003.
34. Petersen-Felix, S., Curatolo, M. Neuroplasticity-an important factor in acute and chronic pain, *Swiss Med Wkly.* 132(21-22):273-278, 2002.
35. Woolf, C.J., Salter, M.W. Neuronal plasticity ; increasing the gain in pain, *Science* 288(5472):1765-1769, 2000.
36. Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P. & Gillet, P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis ; a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry, *Arthritis Rheum.* 40(9):1670-1679, 1997.
37. Rang, H.P., Bevan, S., Dray, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons, *Br Med Bull.* 47(3):534-548, 1991.
38. Haywood, L., McWilliams, D.F., Pearson, C.I., Gill, S.E., Ganesan, A., Wilson, D., Walsh, D.A. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 48(8):2173-2177, 2003.
39. Combe, R., Bramwell, S., Field, M.J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci Lett.* 370(2-3):236-240, 2004.
40. Blanco, F.J., Guitian, R., Vázquez-Martul, E., de Toro, F.J., Galdo, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis ; A possible pathway for osteoarthritis pathology, *Arthritis Rheum.* 41(2):284-289, 1998.
41. Xie, F., Li, X., Sun, K., Chu, Y., Cao, H., Chen, N., Wang, W., Liu, M., Liu, W., Mao, D. An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage, *J. Tradit Chin Med.* 21(3):225-231, 2001.
42. 김성진, 박준봉, 권영혁, 박건구, 정세영. 우슬 추출물의 경조직 재생촉진효과, *응용약물학회지* 10: 253-257, 2002.
43. Deyne, P.G., Kirsch-volder, M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts, *Physical Therapy* 75(7):629-643, 1995.