류마티스 관절염 흰쥐에서 수중운동과 우슬추출물이 염증 및 통증 반응에 미치는 영향

최기복 · 남기원 · 김계엽* · 심기철 · 김은정

동신대학교 물리치료학과

Effect of Swimming Exercise and *Achyranthes Radix* Extracts on Inflammatory and Pain Responses in Rheumatoid Arthritis Rats

Ki Bok Choi, Ki Won Nam, Gye Yeop Kim*, Ki Cheol Sim, Eun Jung Kim

Department of Physical Therapy, Dongshin University

This study was performed to investigate the effects in inflammatory and pain status on rheumatoid arthritis(RA) induced rats by swimming exercise and *Achyranthes Radix*(AR) extracts ointment according to the application methods with the change of motor-behavioral and histochemistry study through the change of safranin o-fast green stain in the knee joint and prostaglandin E_2(PGE_2) concentration production in serum for 28 days. They were randomly divided into four groups; Group I : RA induction, Group II : application of only swimming exercise after RA induction, Group III: application of only AR extracts ointment after RA induction, Group IV: application of both AR extracts ointment and swimming exercise after RA induction. The following results were obtained. Volume change of hind paw edema and arthritis indices test and arthritic dorsal flexion & plantar flexion pain test, group II, III, IV were showed that significantly decrease to each scores compared with group I ($p<.01$). Safranin o-fast green stain were showed histological indices, group II, III, IV were showed that significantly decrease the scores of cellular infiltration and synovial hyperplasia($p<.05$), pannus formation and cartilage destruction($p<.01$) compared with group I . Group IV were the most decreased compared with group II, III. The PGE_2 concentration of the group II, III, IV were decreased compared to the group I ($p<.01$) In conclusion, swimming exercise and AR extracts ointment acts were the most therapeutic intervention in inflammatory and pain control of RA induced rats.

Key words : rheumatoid arthritis, *Achyranthes Radix*, swimming exercise, prostaglandin E_2

서 론

류마티스 관절염은 초기에는 외부의 감염물질에 대항하여 보호하려는 면역반응을 통해 T세포가 활성화되어 염증반응이 시작되는 것으로[1], 계속 진행되면서 T세포의 영향력은 감소하고 활막 세포의 비정상적인 증식과 활성화로 인해 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화를 야기시켜 이로 인해 관절의 염증과 파괴가 지속적으로 나타나게 된다[2,3].

그러나 그 정확한 원인과 병태생리는 밝혀져 있지 않지만 류마티스 관절염 환자의 약 75%에서 면역글로불린 IgG의 Fc portion에 결합하는 자가 항체가 검출되며[4], 관절 내 type II collagen, collagenase, prostaglandin E_2(PGE_2), stromelysin, plasminogen activator 등이 증가되는 것으로 보고되고 있다[5]. 이러한 분비 물질의 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해서 발생되고 조직 내에서는 prostaglandin, histamine, bradykinin, serotonin, substance P, TNF-α, IL-1β, IL-1, IL-6, IL-8, chemokine, growth factor 등 많은 종류의 화학매개물질(chemical mediators)이 염증세포와 손상조직, 신경 말단 등에서 유리되어 조직의 해부학적, 생리학적 변화를 유발한다[6].

현재 류마티스 관절염의 약물치료방법은 크게 세 가지로 분류할 수 있다. 첫째로는 DMARDs(Disease modifying anti-rheumatic drugs)가 있고, 두 번째로는 steroid가 있으며, 세 번째로는 NSAID(Non-steroidal anti-inflammatory drugs)방법이

* 교신저자 : 김계엽, 전남 나주시 대호동 252 보건복지대학 물리치료학과

· E-mail : kykim@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3391

· 접수 : 2008/11/07 · 수정 : 2008/12/12 · 채택 : 2009/01/06

있다. DMARDs는 현재 질환의 초기에 사용되어 관절의 파괴를 예방하는데 효과가 있으나 골수억제, 간기능 손상 등 나아가 발암의 가능성을 아직 배제하지 못하고 있는 실정이다[7]. 그리고 steroid 제제 약물은 단기간 사용에는 효과적이나 장기간 사용하면 체중증가, 여드름, 신장피질괴사, 골다공증, 감염, 근력감소, 골괴사증, 의인성 쿠싱 증후군, 고혈압, 당뇨병, 위궤양을 유발하여 장기간 사용이 어렵다[8]. 반면 NSAID은 세계에서 가장 널리 사용되고 있는 약물이며, Cycloxygenase(COX)를 억제하여 Prostaglandin(PG) 합성을 억제함으로써 항염 및 진통작용을 나타내는 긍정적인 효과가 있는 것으로 알려져 왔다[9,10].

최근 천연물질에 대한 관심이 증폭되고 있으며, 그 중 본 연구에서 사용된 우슬(*Achyranthes Radix*)은 Oleanolic acid, Saponin, Metamorphosis hormone, β-sitosterol, stigmasterol, Rubrosterone, Inokosterone, Phytoecdysteroid, Ecdysteroid 등의 여러 가지 성분이 분리되어 보고되었다[11,12]. 또한 진통과 소염작용, 면역기능 조절작용, 혈압강하작용, 항노화작용, 이뇨작용, 항알레르기 효과 등이 알려져 있어, 고혈압, 류마티스 관절염과 같은 울혈의 치료, 이뇨 및 강장제 등의 치료 및 민간요법으로 널리 사용되어 왔다[13,14]. 현재 우슬을 이용한 관절의 통증이나 염증성 질환에 관련된 여러 연구가 진행되고 있으나, 구체적인 성분과 활성의 연구와 관련지어 보고된 경우는 거의 없는 실정이다[15].

또한 물리치료적 중재 방법 중의 하나인 수중운동(Swimming exercise)은 환자의 외부 자극에 대한 반응에 의해 얻어지는 정서 및 물리적 환경 변화에 대한 적응과정으로, 물속에서 운동의 효과와 더불어 열 자극에 의한 표면열의 온도상승과 함께 혈관확장, 대사과정의 증진, 교원조직의 신전성 증가 등을 얻을 수 있다[16]. 특히 약 33℃~35℃의 물의 온도는 근육의 경직 없이 스트레칭과 마사지를 통한 근골격계의 이완을 유도함으로써 척수 수준으로 유해성 감각의 전달을 억제하는 결과를 가져와 통증을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[17]. 또한 정수압(Hydrostatic pressure)은 골내 혈관(Intraosseous vessel)으로부터 혈액의 반송을 증가시켜 연골하 압력(Subchondral pressure)이 저하되어 CPN(C polymodal nociceptor)의 활동을 감소시켜 통증을 감소시킨다고 알려져 있다[18]. 이밖에도 부력(Buoyancy)과 밀도(Density), 물의 흐름(Flow)과 물결(Wave) 등 물의 특수한 성질로부터 여러 가지의 생물학적 효과를 얻을 수 있는 것으로 보고하고 있다[19].

본 연구에서는 류마티스 관절염 흰쥐에 우슬 추출물을 이용한 연고와 수중운동을 적용하여 관절염 지수, 족부종율, 관절염 배측 및 저측굴곡 통증 지수와 병리조직학적 분석 및 혈청에서의 PGE_2의 변화를 관찰하여 통증 및 염증반응에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물

실험동물은 생후 7주령의 체중 약 250 ± 25 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐(Hawin Co, Korea)를 각 군당 27마리를 할당하여 총 108마리를 사용하였다. 흰쥐를 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료(Samyang Co, Korea)와 물을 충분히 자유급식하면서 실험실 환경(실내온도 25 ± 1℃, 습도 55 ± 10%, 12시간 명암주기)에 1주일간 적응시킨 후 사용하였다.

2. 방법

1) 관절염 유발

Chicken type II collagen(Sigma, St, Louis, MO, USA)을 0.1 M 아세트산에 4 ㎎/㎖의 농도로 4℃에서 12시간 정도 저어준 다음 동량의 Freund's incomplete Adjuvant(Sigma, St, Louis, MO, USA)와 혼합하여 유탁시킨다. 그 후 흰쥐의 족척부위에 유탁액을 200 ㎍의 용량으로 총 2회 주입한다. 일차접종은 우측 족척의 중족골 부위에 주입하고, 이차접종은 일차주사 후 7일 후에 꼬리 기시부의 1~3번째 부위에 동량의 유탁액을 주입하여 유발하게 된다[20]. 마지막 접종일로부터 14일째에 육안으로 관절주위부의 발적이나 부종 등의 임상적 관절염 증후를 관찰 및 평가하여 개체를 선별한 후 다음날부터 실험을 하였으며[21], 실험동물의 분류는 Table 1에서와 같다.

Table 1. Classification of Experimental groups.

Group	Characteristics
I	RA* induced (n=27)
II	Application of Swimming exercise after RA* induced (n=27)
III	Application of *Achyranthes Radix* extracts ointment after RA* induced (n=27)
IV	Application of Swimming exercise and *Achyranthes Radix* extracts ointment after RA* induced (n=27)

*: Rheumatoid arthritis

2) 우슬추출물 경피투과제의 제조 및 연고도포방법

우슬을 이용한 경피투과제의 제조는 이한섭[22]의 연구를 기초로 하였다. 경피투과제 제조시 용매에 우슬의 20-hydroxyecdysone 성분의 양을 일정하게 취하여 각각 용해시켰다. 연고의 제조는 20-hydroxyecdysone 1.0 g을 녹인 labrafil 15.0 ㎖에 정제수 20 ㎖, 에탄올 5.0 ㎖과 oleic acid 10.0 ㎖을 넣어 섞고 triethanolamine 1.0 ㎖을 넣어 기계식 교반기를 사용하여 천연고분자와 약물이 균일하게 섞이도록 교반하였다. 이와 같이 얻은 경피투과제는 밀봉하여 사용할 때까지 냉장실(2~3℃)에 보관하였다. 각 실험군에 연고도포 방법은 우슬추출물을 이용한 연고 0.1 g을 최종 유발일로부터 28일 동안 고르게 펴서 도포하였다.

3) 수중운동의 적용방법

수중운동은 온도 조절이 되는 스테인리스 재질의 원통형 수조(직경: 160 ㎝, 깊이: 60 ㎝)에서 실시하였다. 물의 온도는 류마티스 관절염에 효과가 있는 온도를 설정하기 위해 35 ± 1 ℃로 하였으며[17], 물의 깊이는 50 ㎝ 높이로 하여 흰쥐가 임의로 멈추어 있거나 풀에서 탈출하는 것을 방지하였다. Contarteze 등[23]의 선행연구를 기초로 체중의 5.5% 부하를 주어 운동에 대한 스트레스를 받지 않는 범위에서 운동효과를 높여 주었으며, 주 3회 25분씩, 총 3주간 실시하였다. 수중운동 후 급격한 체온 저하를 방지하기 위해 수건으로 젖은 몸을 닦아주고 온풍기를 이용하여 체온

을 유지하도록 하였다.

4) 족 부종의 체적변화

Winter 등[24]의 연구방법을 수정한 것으로 water-displacement 방법에 의하여 유발 전 용적(Volume)을 대조용적(Control volume)으로 하여, 매일 같은 시각에 측정한 용적과의 차이를 비교하였다. 또한 족 부종의 체적측정은 유발 전, 유발 후 3, 7, 14, 21, 28일째에 각각 3회 반복 측정하여 평균을 내어 체적(㎖)을 산출하였다.

5) 관절염 지수의 임상적 평가

Hughes 등[25]의 연구방법을 수정한 것으로 관절염의 중증도를 정량적으로 평가하고자 흰쥐의 각 지절에서 관절 주위부의 염증이나 발적 및 부종과 같은 임상적 관절염의 증상을 육안으로 관찰한 후 흰쥐의 후족부를 0점에서 4점으로 점수를 배점하였고, 다시 사지의 점수를 합산하여 각각의 개체에 최대 16점으로 채점하여 관절염 지수(Arthritic index)를 구하였다(Table 2).

Table 2. Clinical Assessment of Arthritis Indices

Grade	Clinical symptom
0	Paws with no swelling and focal redness
1	Paws with swelling of finger joints
2	Paws with mild swelling of ankle or wrist joint
3	Paws with severe inflammation of the entire paws
4	Paws with deformity or ankylosis

6) 관절염의 배측굴곡과 저측굴곡 통증 지수

Liu 등[26]의 연구방법에 따라 흰쥐의 족관절을 저측방향으로 5초 간격으로 5번씩 부드럽게 굴곡시킨다. 이와 같은 방법을 적용할 때 족관절에 가하는 힘은 혈액순환의 차단을 관찰하기 위해 엄지발가락의 색깔 변화를 관찰하면서 적용하였다. 각각의 개체에 대하여 총 발회피 점수는 0~5점 사이에서 얻을 수 있으며, 정상측과 비교하여 빠르지 않은 발회피 반응을 보이면 0점, 정상측과 비교하여 활발한 발회피반응을 보일 경우를 1점으로 주었다. 이와 같은 점수방법을 배측굴곡의 발회피 반응에도 적용하여 점수를 내었다.

7) 병리조직학적 관찰 및 조직학적 지수

Safranin O-fast green 염색은 탈 파라핀 과정을 거친 후 Weigert's iron hematoxylin 용액에 10 분간 반응시킨 후 10 분간 흐르는 물에 세척하고, fast green (FCF) solution에 5 분간 염색하였다. 1% acetic acid solution에 10 초간 반응시킨 후 0.1% safranin O solution에 5 분간 염색하였다. Safranin O-fast green으로 염색된 슬라이드는 5~10분 정도 충분히 세척하여 핵이 청명한 색이 되도록 하고, 탈수 및 투명과정을 거친 후 봉입하였다. 그 후 광학현미경 (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)에 디지털 CCD 카메라(Foculus, IEEE 1394, Germany)를 장착하여 각 군의 조직들을 촬영하였다. 이를 Beehler 등[27]의 방법을 응용하여 세포침윤, 활액막의 과다증식, 판누스 형성, 연골의 파괴정도를 조직학적 지수(Histological index)로 구분하여 0(normal), 1(mild changes), 2(moderate changes), 3(severe changes)으로 점수화하여 평가 하였다.

8) 혈청에서의 Prostaglandin E_2의 농도 측정

혈청에서 PGE_2의 측정은 PGE_2 assay kit(R & D System Inc., Minneopolis, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정방법은 류마티스 관절염 유발 전, 유발 후 28일째에 각 군으로부터 심장 채혈하여 혈청을 분리하였다. 먼저 Calibrator Diluent RD5-39를 비특이적 결합(nonspecific binding, NSB)을 한 well에 150 ㎕ 첨가하고, Calibrator Diluent(RD5-3950)를 100 ㎕ 첨가하여 zero standard well을 만들었다. 다음으로 microplate well에 sample과 100 ㎕의 standard 용액을 첨가하였다. 또한 blank와 NSB well을 제외한 나머지 sample well에 50 ㎕의 PGE_2 primary antibody solution을 첨가하고, blank를 제외한 나머지 well에 50 ㎕의 Conjugate를 첨가하였다. 마지막으로 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 wash buffer(200 ㎕)로 4번 깨끗이 수세한 후 암실에서 substrate solution을 각각의 well에 200 ㎕ 첨가하여 30분간 반응시켰다. 마지막으로 50 ㎕의 stop solution을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 microplate reader(Model 680, BIO-RAD Inc., Japan)의 기기로 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계방법

본 연구에서는 윈도우용 SPSS 12.0을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 류마티스 관절염 유발 후 수중운동과 우슬추출물의 연고도포를 각 실험군 간의 시기별 통계학적 유의성을 검증하기 위하여 일요인분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 Duncan's multiple range test로 실시하였다. 그리고 각 실험군의 측정시기에 따른 차이를 검정하기 위하여 일표본 대응 T검정(paired t-test)을 실시하였다. 실험의 분석 시 유의수준은 $p<.05$로 설정하여 검정하였다.

결 과

1. 족 부종의 체적변화에 미치는 영향

각 실험군의 시기별 족 부종의 체적변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다($p<.01$). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에는 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 사이에는 유의한 차이를 보였다($p<.05$)(Fig. 1). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, Ⅰ군은 유발 14일째($p<.05$), 유발 21일째, 28일째($p<.001$)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났고, Ⅱ군은 유발 14일째($p<.05$), 21일째($p<.01$), 28일째($p<.001$)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다. 또한, Ⅲ군은 유발 21일째($p<.01$), 28일째($p<.001$)에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, Ⅳ군에서는 유발 21일째($p<.05$), 28일째($p<.01$)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다(Fig. 1).

2. 관절염 지수에 미치는 영향

각 실험군의 시기별 관절염 지수의 임상적인 평가의 변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이

후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다(p<.01). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에는 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 사이에는 유의한 차이를 보였다(p<.05)(Fig. 2). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T 검정으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, Ⅰ군은 유발 14일째(p<.01), 유발 7일째, 21일째, 28일째(p<.001)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났고, Ⅱ군은 유발 21일째(p<.01), 7일째, 14일째, 28일째에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다(p<.001). 또한, Ⅲ군은 유발 7일째, 28일째(p<.01), 14일째, 21일째(p<.001)에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, Ⅳ군에서는 유발 7일째, 14일째, 21일째, 28일째(p<.001)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다(Fig. 2).

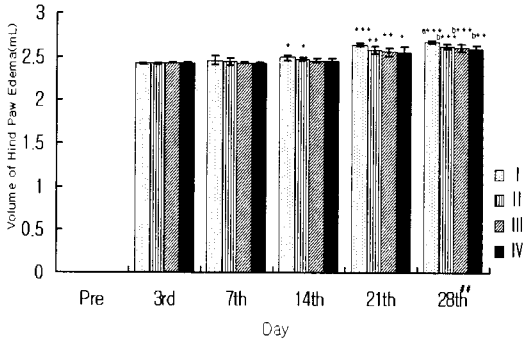

Fig. 1. Volume Change of Hind Paw Edema in Rheumatoid Arthritis Rat. Values are showed mean±SD. Tested by One-way ANOVA(##: p(.01). Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p(.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(*: p(.05, **: p(.01, ***: p(.001).

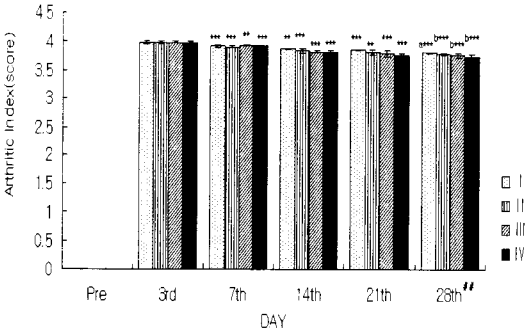

Fig. 2. Change of Arthritic Index in Rheumatoid Arthritis Rat. Values are showed mean±SD. Tested by One-way ANOVA(##: p(.01). Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p(.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(**: p(.01, ***: p(.001).

3. 관절염의 배측굴곡 통증지수에 미치는 영향

각 실험군의 시기별 관절염 배측굴곡 통증 지수의 변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다(p<.01). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 사이에는 유의한 차이를 보였다(p<.05)(Fig. 3). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, Ⅰ군은 시기별로 호전된 차이가 유의하지 않았으나(p>.05), Ⅱ군은 유발 28일째에서 호전된 차이가 유의하게 나타났다(p<.01). 또한, Ⅲ군은 유발 14일째, 21일째(p<.01), 유발 28일째(p<.001)에서 각각 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, Ⅳ군에서는 유발 21일째(p<.05)와 유발 28일째(p<.01)에서는 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다(Fig. 3).

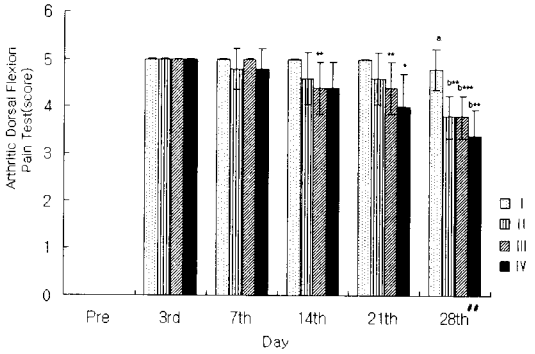

Fig. 3. Change of Scoring of Arthritic Dorsal Flexion Pain Test in Rheumatoid Arthritis Rat. Values are showed mean±SD. Tested by One-way ANOVA(##: p(.01). Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p(.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(*: p(.05, **: p(.01, ***: p(.001).

4. 관절염의 저측굴곡 통증지수에 미치는 영향

각 실험군의 시기별 관절염 저측굴곡 통증 지수의 변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 28일째에는 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다(p<.01). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에 실험군 Ⅰ과 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 사이에는 유의한 차이를 보였다(p<.05)(Fig. 4). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T 검정으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, Ⅰ군, Ⅱ군에서는 유발 28일째에 호전된 차이가 유의하게 나타났다(p<.01). 또한, Ⅲ군에서는 유발 21일째(p<.01)와 유발 28일째(p<.001)에 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, Ⅳ군에서는 유발 21일째와 유발 28일째에 호전된 차이가 유의하게 나타났다(p<.001)(Fig. 4).

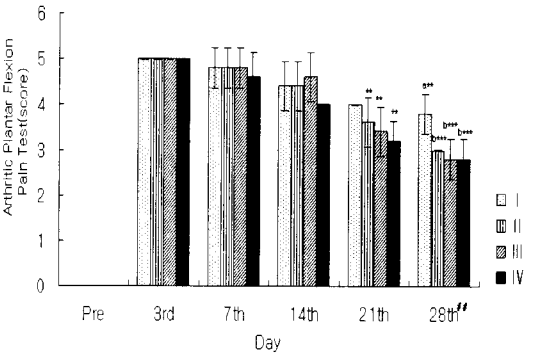

Fig. 4. Change of Scoring of Arthritic Plantar Flexion Pain Test in Rheumatoid Arthritis Rat. Values are showed mean±SD. Tested by One-way ANOVA(##: p(.01). Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p(.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(**: p(.01, ***: p(.001).

5. Safranin O-fast green 염색을 통한 조직화학적 반응

Safranin O-fast green 염색을 통하여 슬관절의 조직화학적 소견을 관찰한 결과 실험전에서는 대퇴(femur)와 슬개골(patella)의 관절연골, 연골하 골조직, 활액막, 관절강 및 관절낭 등에서 정상적인 조직소견을 볼 수 있었다(Fig. 5A). 류마티스 관절염 실험 종료 후, 실험군 Ⅰ은 슬관절의 활액막의 과다증식으로 인하여 염증 세포침윤과 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus)를 형성하고 있었다. 이로 인하여 관절연골(Articular cartilage), 연골하 골조직(subchondral bony tissue)이 심하게 파괴되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5B). 반면, 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서는 만성 염증성 세포침윤과 활액막의 과다증식은 거의 보이지 않았으며, 섬유성 판누스의 형성, 관절연골의 파괴는 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 특히 골간단(metaphysis)부위에서는 골외막의 증식성 변화와 신생골조직의 증식이 관찰되었다(Fig. 5C-5E).

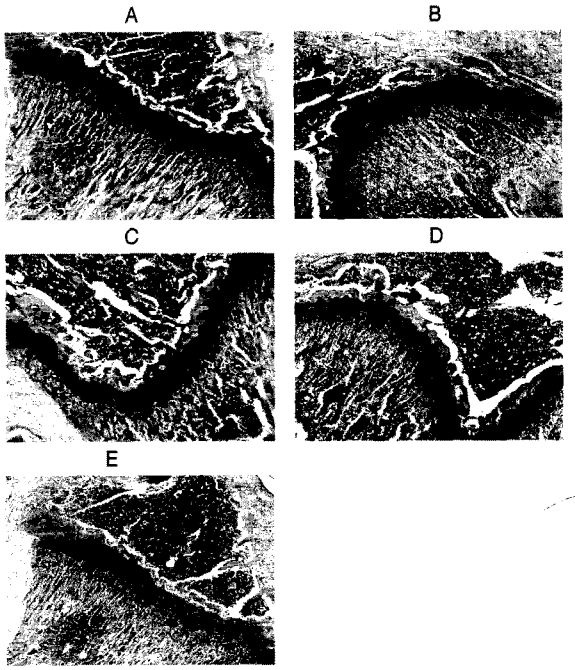

Fig. 5. Histological Finding in Synovial Tissue and Articular Cartilage(After 28 days, Safranin O-fast green stain, × 200). A: normal group B: RA induced group C: RA induced and application of Swimming exercise D: RA induced and application of *Achyranthes Radix* extracts ointment E: RA induced and application of Swimming exercise + *Achyranthes Radix* extracts ointment

6. Safranin O-fast green 염색을 통한 조직학적인 지수 평가

류마티스 관절염 유발 28일 후, 각 실험군에서 슬관절부위에 Safranin O-fast green 염색을 실시하여 세포침윤, 활액막 과다증식, 판누스 형성, 연골의 파괴정도를 측정하였으며, 실험군간 변화를 일표본 대응 T검정을 통해 비교한 결과는 다음과 같다. 실험군 Ⅰ과 비교하여 본 결과 세포침윤정도는 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며($p<.05$), 활액막 과다증식 정도는 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 호전된 차이가 유의하게 나타났고 ($p<.05$), 판누스 형성정도는 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며($p<.01$), 또한 연골의 파괴정도는 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 호전된 차이가 유의하게 나타났다($p<.01$)(Fig. 6).

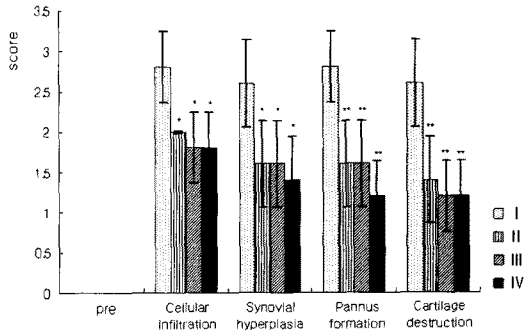

Fig. 6. Change of Histological Score by Safranin O-fast Green Stain in Rheumatoid Arthritis Rat. Values are showed mean±SD. Significantly different as compared with experimental group Ⅰ by paired t-test(*: $p<.05$, **: $p<.01$).

7. 혈청에서의 Prostaglandin E_2(PGE_2)의 농도 변화

류마티스 관절염 유발 28일 후, 각 실험군들에 대해 ELISA를 이용하여 혈청에서의 PGE_2의 농도를 분석한 결과 실험군 Ⅰ의 농도는 유발 전과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가함을 볼 수 있었다($p<.001$). 반면에 실험군 Ⅰ의 농도와 비교하여 볼 때 각각 치료적 중재를 실시한 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ의 농도는 통계적으로 유의하게 감소함을 볼 수 있었다($p<.01$)(Fig. 7).

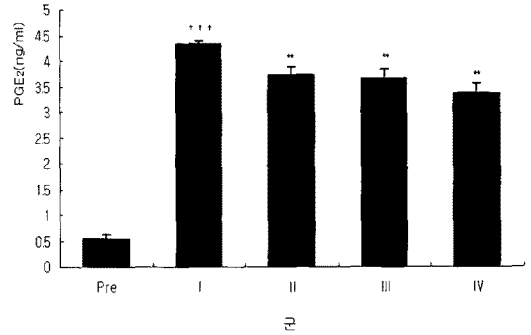

Fig. 7. Change of Concentration on Prostaglandin E_2 Production in Serum. Values are showed mean±SD. Significantly different as compared with pre and experimental group Ⅰ by paired t-test(†††: $p<.001$). Significantly different as compared with experimental group Ⅰ by paired t-test(**: $p<.01$).

고 찰

의학과 과학기술의 발달로 인하여 인구의 고령화가 진행되고 있으며 이로 인해 여러 가지 난치성 질환이 문제점으로 대두되고 있는데, 그중 하나가 류마티스 관절염이다[28]. 이 질환은 만성적인 염증질환으로 초기에는 관절부위 중 활막(Synovial membrane)에 부종 및 동통을 초래하며 점차적으로 관절변형과 관절강직이 유발되는 질환이며, 여기서 활막은 관절액을 분비하고 관절에서 생기는 노폐물을 흡수하여 처분하는 얇은 막으로써, 보통 만성이라고 하는 것은 활막의 염증이 6주 이상 지속됨을 의미한다[29]. 본 연구에서도 관절의 부종과 염증이 유지되는 것으로 보아 만성적인 류마티스 관절염이 지속되었음을 관찰할 수 있었다.

지금까지 알려진 발병기전은 크게 항원-특이적 기전(Antigen-specific)과 항원-비특이적(non-antigen-specific)기전으로 나뉜다. 항원-특이적 기전은 T세포 항원이 바이러스나 세균에 의한 것으로 추측하고 있으며 특히 특이적인 주 조직 적합항원(Class Ⅱ major histocompatibility complex, MHC)과 림프구 활성에 관여하는 부수분자들이 발현되어 침윤된 T세포를 활성화시켜 자가항원과 교차반응을 하여 대식세포를 자극하여 관절염을 유도하게 되는 기전이다[30]. 또한 항원-비특이적 기전에서 관절염의 발생은 감염이나 조직손상 및 예방접종 등과 같은 비특이적 자극이 대식세포를 활성화시키고, 활성화된 대식세포로부터 Tumor necrosis factor-α(TNF-α), Interleukin 등의 싸이토카인에 의해 수지상세포(Dendritic cell)의 분화가 유도되고, 수지상세포가 자가 항원을 자동반응 T세포(Autoreactive T cell)에 전달함으로써 T세포가 자극되어 관절염이 유도되는 기전이다[31].

본 연구에서 사용한 우슬(*Achyranthes Radix*)의 성분 중 Ecdysteroid는 곤충의 변태호르몬으로서 ecdysone(2β, 3β, 14α, 22(R), 25-pentahydroxy-7-cholesten-6-one)과 20-hydroxyecdysone (2β, 3β, 14α, 20β, 22, 25-hexahydroxy-7-cholesten-6-one)과 관련된 polyhydroxyecdysteroids군을 형성하며 곤충의 성장 과정에서 짧은 기간에 생산과정이 시작되고 조절되기에 관련학자들에게 ecdysteroids의 동정과 정량에 대한 관심을 가져왔다[32]. 비록 ecdysteroids가 곤충에서 분리되었지만 식물에 훨씬 많이 존재한다고 알려져 있어 몇 가지의 식물들은 ecdysteroids원으로 주목되고 있으며, 그 외에도 우슬의 여러 성분들은 항염증, 진통, 진경, 이뇨, 항알레르기 효과 외에 혈류개선 효과, 항산화작용으로 인한 항노화 효과가 있다고 알려지고 있다[33,34].

한편 본 연구에서 수중운동은 물의 특수한 성질을 토대로 운동을 적용하는 방법으로서 여러 치료분야에서 사용되고 있으며, 특히 뇌졸중, 뇌성마비, 척수손상과 같은 중추신경계 병변과 관절질환, 골절, 절단, 다발성 근염 등과 같은 근골격계 병변으로 인한 통증 및 기능장애, 심장 및 순환기, 호흡기질환 등 임상적으로 적용분야가 다양하고 광범위하다[35]. 더욱이 통증이 있는 상태에서도 관절가동범위, 강직 감소, 이완, 균형 및 지구력 등을 향상시키며 근골격계의 손상을 줄이고 유산소성과 유연성 향상에 기여하며, 심박수를 감소시켜 심근의 부담을 줄이고 산소섭취량을 증가시키는데 지상운동보다 효과적이라고 하였다. 그러나 류마티스 관절염의 통증은 재발이 되는 특성이 있어 마약성 진통제나 진정제 등을 사용하는 것이 최선의 방책이 아니며, 안정적이고 규칙적인 운동이 환자의 통증경감이나 염증관리에 있어 기본적인 방법이 된다고 하였다[36]. 박상규[37]는 규칙적인 운동 후 염증과 면역에 관여하는 물질인 백혈구, 림프구가 유의하게 증가하여 숙주방어기전(Host defense mechanisms)에 유의한 효과가 있었다고 보고하였으며, 그 외에도 대다수의 동물 및 인간을 대상으로 한 선행연구에 의하면 장시간, 규칙적인 유산소 운동은 면역과 숙주방어 및 통증감소에 긍정적인 영향을 보였다고 보고하고 있다[38,39].

하지만 현재 우슬추출물을 이용한 연고제제와 수중운동에 대한 통증 및 염증의 효과를 알아보고자 한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우슬추출물을 이용한 연고제제와 수중운동을 통하여 족 부종체적변화와 관절염지수평가 및 혈액학적인 분석과 병리조직학적 변화를 관찰 및 분석하여 임상적 효율성을 위한 자료를 제공하고자 실시하였다.

첫 번째로, 족 부종의 체적변화와 관절염 지수에서는 28일째에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며($p<.01$), 실험군 Ⅰ과 비교하여 볼 때 시간이 지남에 따라 실험군 Ⅱ, Ⅲ에서 통계적으로 유의한 족부의 염증반응 감소를 확인할 수 있었으며($p<.05$), 실험군 Ⅳ에서는 수치상으로 실험군 Ⅱ, Ⅲ보다 더 긍정적인 결과를 보이고 있다. 특히 이러한 염증반응 감소의 결과와 함께 관절염의 배측굴곡 및 저측굴곡 통증지수검사에서는 28일째에 실험군 Ⅰ에 비해 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 통계적으로 유의한 통증반응의 감소를 확인할 수 있었다($p<.01$).

두 번째로 실험종료 후 Safranin O-fast green 염색 후 조직학적인 지수로 정량화하여 분석한 결과, 실험군 Ⅰ은 슬관절 부위의 활액막의 과다증식으로 인하여 염증 세포침윤과 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus)를 형성하고 있었으며, 이로 인하여 관절연골(articular cartilage), 연골하 골조직(subchondral bony tissue)이 심하게 파괴되었음을 관찰할 수 있었다. 반면, 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서는 만성 염증성 세포침윤과 활액막의 과다증식은 거의 보이지 않았으며, 섬유성 판누스의 형성, 관절연골의 파괴는 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6).

세 번째로 PGE_2는 구심성 신경말단 수용체에서 bradykinin과 histamine 등과 반응하여 통증과 감각과민의 상태를 일으키고 부종, 강한 발열 및 혈관확장 등의 염증 반응을 일으키는 류마티스 관절염의 염증 반응에 가장 중요한 PG 중 하나이다[40]. 본 연구에서 혈청에서의 PGE_2 농도를 측정한 검사 결과, 실험군 Ⅰ의 농도를 유발 전과 비교하여 볼 때 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있는 반면($p<.001$), 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ의 농도는 통계학적으로 유의하게 감소함을 볼 수 있었다($p<.01$)(Fig. 7). 이러한 PGE_2의 효과적인 억제는 곧 만성적 염증 및 통증반응을 효과적으로 감소시켰다고 볼 수 있다.

이처럼 수중운동과 우슬추출물이 류마티스 관절염 흰쥐의 염증과 통증반응의 감소에 지대한 영향을 주었고, 결과적으로는 운동행동학적인 기능수준의 향상을 기대할 수 있으며, 류마티스 관절염의 임상 활용에 타당성을 제공할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 류마티스 관절염 흰쥐 모델을 대상으로 수중운동과 우슬추출물을 이용한 연고제제를 28일 동안 적용한 후 족부의 체적변화, 관절염지수, 관절염의 배측굴곡 및 저측굴곡 통증지수 그리고 조직학적인 검사(Safranin O-fast green)와 ELISA를 이용하여 PGE_2의 농도 변화를 측정하여 염증 및 통증반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 모든 실험결과는 치료적 중재를 실시한 후 측정한 결과를 토대로 하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

족부의 체적 변화, 관절염 지수 검사, 관절염의 배측굴곡과 저측굴곡 통증지수에서 류마티스 관절염 유발 28일째에 실험군 Ⅰ에 비하여 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 통계적으로 유의한 감소를 확

인할 수 있었다($p<.01$). 류마티스 관절염의 실험종료 후 슬관절 부위의 Safranin O-fast green 염색결과를 관찰하여 조직학적인 지수로 표현한 결과, 실험군 Ⅰ보다 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서 염증세포침윤과 활액막의 과증식($p<.05$), 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus) 형성과 연골파괴 지수가 통계적으로 유의한 감소를 보였다($p<.01$). PGE_2의 발현량을 측정한 결과 실험군 Ⅰ에서는 PGE_2의 분비는 증가한 반면에 실험군 Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ에서는 발현 억제의 효능이 일부 관찰 되었다($p<.01$).

감사의 글

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

참고문헌

1. Sweeney, S.E., Firestein, G.S. Rheumatoid arthritis : regulation of synovial inflammation. Int J Biochem Cell Biol. 36(3):372-378, 2004.
2. Kutuk, O., Basaga, H. Inflammation meets oxidation : NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. Trends Mol Med. 9(12):549-557, 2003.
3. Firestein, G.S., Zvaifler, N.J. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? : Ⅱ. T cell-independent mechanism from beginning to end. Arthritis Rheum. 46(2):298-308, 2002.
4. Van Boekel, M.A., Vossenaar, E.R., van den Hoogen, F.H., van Venrooij, W.J. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis : specificity, sensitivity and diagnostic value. Arthritis Res. 4(2):87-93, 2002.
5. Van Lent Holthuysen, A.E.M., van den Bersselaar, L.A.M., van Rooijen, N., Joosten, L.A.B., van de Loo, F.A.J., van de Putte, L.B.A., van den Berg, W.B. Phagocytic lining cells determine local expression of inflammation in type Ⅱ collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 39(9):1545-1555, 1996.
6. Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E. Immune activation : the role of pro- inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. Pain. 63(3): 289-302, 1995.
7. Bae, S.C., Corzillius, M., Kuntz, K.M., Liang, M.H. Cost-effectiveness of low dose corticosteroids veusus non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 specific inhibitors in the long-term treatment of rheumatoid arthritis. Rheumatology. 42(1):46-53, 2003.
8. Bonney, R.C. Treating autoimmune diseases: The market potential for new therapeutic options. PJBPJB Publication pp 1-244, 2001.
9. 윤형란. 류마티스 관절염 치료 시 비스테로이드성 소염제 단독,위장관 부작용 예방 약제 병용 투여 및 COX-2 특이 억제제 사용의 비용-효과 분석. 한양대학교 박사학위논문, 2000.
10. Schmelzer, K.R., Inceoglu, B., Kubala, L., Kim, I.H., Jinks, S.L., Eiserich, J.P., Hammock, B.D. Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 103(37):13646-13651, 2006.
11. Ida, Y., Satoh, Y., Katoh, M., Katsumata, M., Nagasao, M., Yamaguchi, K., Kamei, H., Shoji, J. Achyranthosides A and B, novel cytotoxic saponins from Achyranthes fauriei root. Tetrahedron Lett. 35:6887-6890, 1994.
12. Takemoto, T., Ogawa, S., Nishimoto, N., Hirayama, H., Taniguchi, S. Studies on the constituents of achyranthis radix Ⅶ. The insert-moulting substances in Achyranthes and Cyathula genera "supplement". Yakugaku Zasshi. 88(10):1293-1297, 1968.
13. Han, S.B., Lee, C.W., Yoon, Y.D., Lee, J.H., Kang, J.S., Lee, K.H., Yoon, W.K., Lee, K., Park, S.K., Kim, H.M. Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from Achyranthes bidentata and Atractylodes japonica. Arch Pharm Res. 28(8):902-908, 2005.
14. 이승택, 채영암. 약용작물재배. 서울, 향문사, pp 159-1625, 1996.
15. 손건호, 황지현, 이승호, 박정일, 강신정, 장승엽, 이경순. 우슬로부터 20-Hydroxyecdysone의 분리 및 함량분석. 생약학회지 30(3):335-339, 1999.
16. 서동원, 편성범, 김세주. 표면열 적용에 따른 피부온도 및 동통의 변화. 대한재활의학회지 18: 227-233, 1994.
17. Campion, M. Hydrotherapy principles and practice. In Rheumatic Diseases(L.M.Tinsley, eds), Oxford: Butterworth-Heinemann, pp 3-13, 1998.
18. 김태열, 김계엽, Johan Lambeck. 류마티스 관절염의 수중치료. 대한물리치료학회지 12(3):407-414, 2000.
19. 김지혁, 김용권. 수중치료 후 척수손상 환자의 독립. 대한물리치료학회지 6(4):97-105, 1998.
20. Joosten, L.A., Lubberts, E., Durez, P., Helsen, M.M., Jacobs, M.J. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. Arthritis Rheum. 40(2):249-260, 1997.
21. Chen, Q., Wei, W. Effects mechanisms of glucosides of chaenomeles speciosa on collagen-induced arthritis in rats. Int Immunopharmacol. 3(4):593-608, 2003.
22. 이한섭. 키토산 연고의 수용성 비타민 B2(Ribokalvin)의 경피투과. Bull Nat Sci. Yong-In Univ 6(1):1-7, 2001.

23. Contarteze, R.V., Manchado, F.B., Gobatto, C.A., De Mello, M.A. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 151(3):415-422, 2008.
24. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chloro-benzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid. J Pharmacol Exp Ther. 141:369-376, 1963.
25. Hughes, C., Wolos, J.A., Giannini, E.H., Hirsch, R. Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. J Immunol. 153(7):3319-3325, 1994.
26. Liu, H.X., Tian, J.B., Luo, F., Jiang, Y.H., Deng, Z.G., Xiong, L., Liu, C., Wang, J.S., Han, J.S. Repeated 100 Hz TENS for the Treatment of Chronic Inflammatory Hyperalgesia and Suppression of Spinal Release of Substance P in Monoarthritic Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 4(1):65-75, 2007.
27. Beehler, B.C., Hei, Y.J., Chen, S., Lupisella, J.A., Ostrowski, J., Starrett, J.E., Tortolani, D., Tramposch, K.M., Reczek, P.R. Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis. J Rheumatol. 30(2):355-363, 2003.
28. 김용준. 황금추출물의 항류마티즘 효능에 관한 연구. 전북대학교 석사 학위 논문, 2004.
29. Yin, G., Liu, W., An, P., Li, P., Ding, I., Planelles, V., Schwarz, E.M., Min, W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. Mol Ther. 5(5Pt1):547-554, 2002.
30. Fox, D.A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. Arthritis Rheum. 40(4):598-609, 1997.
31. Thomas, R., Lipsky, P.E. Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 39(2):183-190, 1996.
32. Nembo, B., Duie, P., Garcia, M., Breton, P., Gayral, P., Porcheron, P., Goudey-Perriere, F. Levels of ecdysteroid-like material in adults of Nippostrongylus brasiliensis during the intestinal phase. J Helminthol. 67(4):305-315, 1993.
33. Wilson, I.D., Bielby, C.R., Morgan, E.D., McLean, A.E. Comparison of high-performance liquid chromatography and gas chromatography for the analysis of ecdysteroids. J Chromatoqr. 194(3):343-52, 1980.
34. 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.
35. 조윤미. 수중 운동치료가 뇌졸중 환자에서 균형기능에 미치는 영향. 전남대학교 석사 학위 논문, 2007.
36. Burckhardt, C.S. The impact of arthritis on quality of life. Nursing Research 34(1):11-16, 1985.
37. 박상규. 규칙적인 운동이 면역반응 및 호르몬에 미치는 영향. 한국응급구조학회, 5(5):15-22, 2005.
38. Dishman, R.K., Warren, J.M., Hong, S., Bunnell, B.N., Mougey, E.H., Meyerhoff, J.L., Jaso-Friedmann, L., Evans, D.L. Treadmill exercise training blunts suppression of splenic natural killer cell cytolysis after footshock. J Appl Physiol. 88(6):2176-2182, 2000.
39. Lambert, C.P., Flynn, M.G., Braun, W.A., Mylona, E. Influence of acute submaximal exercise on T-lymphocyte suppressor cell function in healthy young men. Eur J Appl Physiol. 82(1-2):151-154, 2000.
40. Maxis, K., Delalandre, A., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Duval, N., Lajeunesse, D. The shunt from the cyclooxygenase to lipoxygenase pathway in human osteoarthritic subchondral osteoblasts is linked with a variable expression of the 5-lipoxygenase-activating protein. Arthritis Res Ther. 8(6):R181, 2006.