

# 제 2형 콜라겐 유도 관절염에서 수중운동과 우슬추출물이 행동반응과 관절 조직에 미치는 영향



The Journal Korean Society of Physical Therapy

■ 최기복, 김계엽<sup>1</sup>, 남기원<sup>1</sup>, 김경윤<sup>1</sup>, 김은정<sup>1</sup>

■ 동신대학교 일반대학원 물리치료학과, <sup>1</sup>동신대학교 보건복지대학 물리치료학과

The Effect of Behavioral Response and Arthritic Tissue on Swimming Exercise and Achyranthes Radix Extracts in Type II Collagen-Induced Arthritic Rat

Ki-Bok Choi, PT, MS; <sup>1</sup>Gye-Yeop Kim, VMD; <sup>1</sup>Ki-Won Nam, PT, PhD; <sup>1</sup>Kyong-Yoon Kim, PT, PhD; <sup>1</sup>Eun-Jung Kim, PT, PhD

Department of Physical Therapy, College of Health and welfare, Dongshin University; <sup>1</sup>Department of Physical Therapy, College of Health and welfare, Dongshin University

**Purpose:** This study examined the effects of swimming exercise and Achyranthes Radix extracts on the inflammatory and behavioral responses in type II collagen-induced arthritic rats for 28 days.

**Methods:** Sprague-Dawley rats were allocated randomly to one of the following four groups: only type II collagen-induced (group I), application of swimming exercise after type II collagen-induced (group II), application of Achyranthes Radix ointment after type II collagen-induced (group III), application of swimming exercise and Achyranthes Radix ointment after type II collagen-induced (group IV). Arthritis was established in SD rats by an intradermal injection of Chick type II collagen plus incomplete Freund's adjuvant at the base of the tail of the animals. The swimming exercise program consisted of a 25 min swimming session/day with a load corresponding to 5.5% of the weight bearing, three days/week for four weeks. The Achyranthes Radix ointment (0.1g) was applied twice a day for five days. The changes in behavior, H & E stain, and cyclooxygenase-2 (COX-2) level in the knee joint were assessed.

**Results:** The gross and histological examination, after RA induction showed reddening, edema and erythema. The H & E stain revealed the destruction of articular cartilage, bony erosion and the infiltration of inflammatory cells after RA induction. The mechanical allodynia test results were significantly higher in group I than in groups II, III and IV ( $p < 0.01$ ). The immunohistochemical response of COX-2 in the knee joint showed that groups II, III, IV had a lower response effect than group I.

**Conclusion:** Swimming exercise training and Achyranthes Radix ointment decreased the inflammatory responses and enhanced the behavioral responses in the arthritic rats.

**Keywords:** Achyranthes Radix, Swimming exercise, Type II collagen-induced arthritic model

논문접수일: 2009년 4월 29일

수정접수일: 2009년 6월 6일

게재승인일: 2009년 6월 8일

교신저자: 김은정, ddosuny@hanmail.net

## 1. 서론

관절부위의 질환에 대한 연구는 수십 년 전부터 실험동물을 이용하여 집중적으로 연구되어 왔으며, 그 중 다발성 관절염(poly arthritis) 모델은 약 50년 전부터 Adjuvant를 실험적으로 유도

하여 연구되어 왔다.<sup>1</sup> 이러한 관절염 모델은 활막의 비후와 염증세포의 침윤을 특징적으로 반복 진행하게 되어 관절의 연골과 골을 파괴시켜 변형을 유도하는 자가면역질환(autoimmune disease)으로써, 인간의 질환과 유사한 병리학적 특징을 나타내는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)이라고도 불린다.<sup>2</sup>

이러한 염증반응을 통하여 발적, 열감, 부종, 통증과 기능소실이 나타나며 일반적으로 좌상 혹은 관통상과 같은 외상에 의해 발생하는 질환과는 다른 신체의 제한이 뒤따른다.<sup>3</sup> 이로 인하여 발생하는 통증은 조직의 손상으로부터 보호하기 위한 신체 기작이고 다양한 자극에 의해 몇 가지 형태로 유도 된다.<sup>4</sup>

대개 COX는 Arachidonic acid를 Prostaglandin (PG)으로 전환시키며 I형과 II형의 두 가지 효소로 구성되어 있다.<sup>5</sup> COX-1은 그 효소가 어느 조직에서나 발현하기 때문에 부작용도 위장관이나 신장에서 다양하게 나타나는 반면, 이 효소의 아형인 COX-2는 여러 종류의 자극에 의해 나타나는 유도 효소로서 염증이 있는 조직에서만 발현되어, 염증과 통증에 관여하는 PG의 생성을 조절하여 통증의 중추전달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>6</sup> 그러므로 관절염의 치료를 위해서는 염증에 대한 치료와 더불어 동반되는 통증을 조절하는 것이 매우 중요하다.

한편 류마티스 관절염의 치료에 있어서 규칙적인 운동은 내분비시스템(adrenalin, noradrenalin, cortisol, corticotrophin liberator hormone, adrenocorticotropical hormone)과 면역시스템(leukocyte, NK-cell, T and B lipocyte, immunoglobins, cytokines)을 포함하여 신체의 긍정적인 변화를 가져 온다.<sup>7</sup> 또한 규칙적인 운동은 염증부위에서 백혈구 이동, 대식세포의 증가 등 염증반응에서의 수복과정을 가속화하며 촉진한다고 하였다.<sup>8</sup> 그러나 부적절한 운동은 면역학적 항상성을 방해하거나, 감염률을 증가시켜서, 증상을 더욱 악화시킬 수도 있다.<sup>9</sup>

현재 인간과 동물을 포함하여 가장 많이 사용되고 있는 운동은 트레드밀 운동(treadmill exercise)과 수중운동(swimming exercise)이다.<sup>10</sup> 그러나 트레드밀 운동의 한계점으로는 속도유지와 조절의 어려움, 전기적 자극에 의한 스트레스 요인에 대한 통제의 어려움 등이 있다.<sup>11</sup> 반면 수중운동은 물의 열자극 및 기계적 마찰을 통해 부분적인 혈관 운동 활동을 활성화시켜 국소 대사작용이 회복되게 하는 표피-장기반사를 작동시킨다. 이 기전은 통증 매개 물질의 감소를 유도하며, 이로 인해 통증과 근경축이 감소되며,<sup>12</sup> 심폐지구력, 근지구력, 근력의 향상, 유연성 등이 증가한다. 이를 토대로, Kim<sup>13</sup>은 국내에서 처음으로 류마티스 관절염 환자에게 수중운동을 실시한 후 관절염 환자들의 통증이 감소되고 관절각도의 개선이 있었다고 하였다. 그 외에도 수중운동은 관절 가동범위의 증진과 부력으로 인하여 관절에 부하가 걸리지 않아 체중에 대한 부담이 없기 때문에 각종 관절염 환자들도 체중의 부담을 느끼지 않으면서 운동에 참여할 수 있다는 장점이 있다.<sup>14</sup> 또한 물속에서는 신체적 고통을 가진 사람들의 움직임을 좀 더 용이하게 하는 물의 특성 때문에 치료효과와 안정성이 지상의 어떤 치료보다 뛰어난 것으로 보고되었다.<sup>15</sup>

또한, 현재 한의학에서 관절염의 치료로 대표적으로 사용되고

있는 천연물질인 우슬(achyranthes radix)은 saponin (oleanilic acid, glycoside)과 metamorphosis hormone, rubrosterone, polysaccharides, inokosterone, ecdysterone, ponasteroside, k-succinate, k-oxalate 등으로 구성되어 있으며,<sup>16</sup> 치료적인 효과는 항바이러스, 항경련(antispasmodic), 항염증(antiinflammation) 등이 있다.<sup>17</sup> 지금까지는 인간을 대상으로 한 연구가 대다수이며 이러한 연구로는 염증성 질환에 대한 행동 및 조직화적인 반응에 대한 연구가 거의 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제 2형 콜라겐 유도 관절염 흰쥐를 대상으로 수중운동 실시와 천연물질인 우슬 추출물을 이용한 연고를 치료적인 증재 방법으로 사용한 후 행동반응 및 병리조직화적인 변화를 평가하여 관절염에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

## II. 연구방법

### 1. 연구대상

본 연구는 생후 7주된 250±25g의 Sprague-Dawley계 흰쥐(웅성, 대한실험동물)를 각 군당 27마리씩 할당하여 108마리를 사용하였다. 항온과 항습이 되는 사육실의 온도는 25±1℃, 습도 55±10%를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였고, 물과 고형사료는 자유롭게 공급하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 실험군의 분류

실험동물의 분류는 관절염만 유발한 유발대조군(group I), 관절염 유발 후 수중운동을 실시한 군(group II), 관절염 유발 후 우슬 연고를 적용한 군(group III), 관절염 유발 후 수중운동과 우슬 연고를 병합 적용한 군(group IV)으로 구분하여 각 군에 무작위로 27마리씩 할당하였다.

#### 2) 관절염 유발

Chicken type II collagen (sigma, 미국)을 0.1M 아세트산에 4mg/ml의 농도로 4℃에서 12시간 정도 저어준 다음 동량의 Freund's incomplete Adjuvant (sigma, 미국)와 혼합하여 유탕 시켰다. 그 후 흰쥐의 족척부위에 유탕액을 200µg의 용량으로 총 2회 주입한다. 일차접종은 우측 족척의 중족골 부위에 주입하고, 일차주사 후 7일 후에 꼬리 기시부의 1~3번째 부위에 동량의 유탕액을 추가 접종하였고, 정상 대조군에는 동량의 생리식염수를 접종하였다.<sup>18</sup> 마지막 접종일로부터 14일 째 육안으로 관절주위부의 발적, 부종 등의 임상적 관절염 증후를 관찰 및 평가하여 개체를 선별한 후 다음날부터 실험하였다.<sup>19</sup>

### 3) 수중운동

수중운동은 온도 조절이 되는 스테인리스 재질의 원통형 수조 (직경: 160cm, 깊이: 60cm)에서 실시하였다. 물의 온도는 제 2형 콜라겐 유도 관절염에 효과가 있는 온도를 설정하기 위해  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하였으며,<sup>20</sup> 물의 깊이는 50cm 높이로 하여 흰쥐가 임의로 멈추어 있거나 풀에서 탈출하는 것을 방지하였다. Contarteze 등<sup>10</sup>의 선행연구를 기초로 체중의 5.5% 부하를 주어 운동에 대한 스트레스를 받지 않는 범위에서 운동효과를 높여 주었으며, 주 3회 25분씩, 총 3주간 실시하였다.

### 4) 우슬추출물을 이용한 연고도포 방법

우슬을 이용한 경피투과제의 제조는 Lee<sup>21</sup>의 연구를 기초로 하였다. 이와 같이 얻은 경피투과제는 밀봉하여 사용할 때까지 냉장실( $2 \sim 3^\circ\text{C}$ )에 보관하였다. 각 실험군에 연고도포 방법은 우슬 연고 0.1g을 최종 유발일로부터 28일 동안 고르게 펴서 하루에 2회씩 도포하였다.

5) 기계적 이질통 측정(measurement of mechanical allodynia) 외부자극에 대한 통각 회피 역치검사는 Shimizu 등<sup>22</sup>의 연구방법을 수정 보완하였으며, von Frey filament라고 불리는 Touch-Test™ Sensory Evaluator Instructions (CA 95037, North Coast Medical Inc, 미국)을 up-down 방법을 사용하여 자극하였다. 검사를 위해 흰쥐의 발바닥에 매우 쉽게 접근할 수 있도록 만들어진 금속철망( $10 \times 10\text{cm}$ )의 위에 사각형 모양의 투명한 플라스틱을 올려놓고 흰쥐를 실험상자에 넣고 15분 이상 적응시켰다. 그 후 흰쥐의 움직임이 없고 조용해지면 von Frey filament를 사용하여 낮은 강도에서 높은 강도로, 3~4번째 발바닥의 밑에서부터 수직으로 올려 5~6초간 유지할 때 흰쥐가 신속한 회피반응을 보이거나, hairs를 떨 때 즉시 움찔하거나 발바닥을 핥으면 양성자극으로 간주하였다. 이와 같은 방법으로 반응에 대한 역치 값을 찾은 후 각 개체에 6회의 자극에 대해 반응을 얻을 때까지 계속하였다. 이때, von Frey filament의 구부리는 힘은 1.0, 1.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0 및 26.0g을 사용하였는데, 자극 시 구부리는 힘이 체중의 10%를 초과할 경우 능동적인 “foot withdrawal”이 아니라 수동적인 “foot lift”가 되는 결과를 초래하기 때문에 26.0g을 최대 구부리는 힘으로 하였다.<sup>23</sup>

### 6) 슬관절의 면역조직학적 관찰

Inflammatory cytokine인 COX-2의 율관절막내 발현량의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학 염색 방법을 이용하였다. 우선 박절된 슬관절 조직절편을 0.01 M PBS로 여러 번 세척한 후 남아있는 고정액 성분을 제거하기 위하여  $37^\circ\text{C}$ 의 온도에

서 1% normal blocking serum으로 1시간 처리하였다. 면역화학염색을 위한 전처리 과정으로 0.3%의 과산화수소수 용액에 30분간 처리하여 조직 내의 내재된 peroxide 활성을 차단하였다. 다시 0.01 M PBS로 3회 세척한 후 각각의 조직절편을 anti COX-2(N-20, cat# sc-1746, Santa Cruz, 미국)로  $4^\circ\text{C}$ 에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하고, anti-biotinylated universal secondary (PK-8800, Vectastain, 미국)로 1시간 반응시켰다. 다시 0.01M PBS로 10분씩 3회 수세한 후 Strepta-vidin/peroxidase (PK-8800, Vectastain, 미국)로 60분간 반응시켰으며, 0.01 M PBS로 수세과정을 거쳐 1분간 DAB (3,3'-Diaminobenzidine, 60382248, ZYMED Lab, 독일)로 발색을 실시하였다. 0.01 M PBS로 10분씩 3회, 증류수로 10분씩 3회 수세한 후 Hematoxylin (MHS-32, Sigma, 미국)으로 대조 염색한 후 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 광학현미경 (Olympus BX50, Olympus Optical Co, 일본)으로 관찰한 후 현미경에 장착된 디지털 CCD 카메라(Foculus, IEEE 1394, 독일)로 각 군의 조직들을 촬영하였다.

## 3. 자료분석

본 연구의 모든 통계는 SPSS ver. 12.0 windows®을 사용하였다. 각 실험군 간의 시기별 통계학적 유의성을 검증하기 위하여 일요인분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후검정(post hoc)으로 Duncan의 다중범위검정을 실시하였다. 그리고 각 실험군의 측정시기에 따른 차이를 검증하기 위하여 일표본 대응 t-검정(paired t-test)을 실시하였다. 분석 시 유의 수준  $p < 0.05$ 로 하였다.

## III. 결과

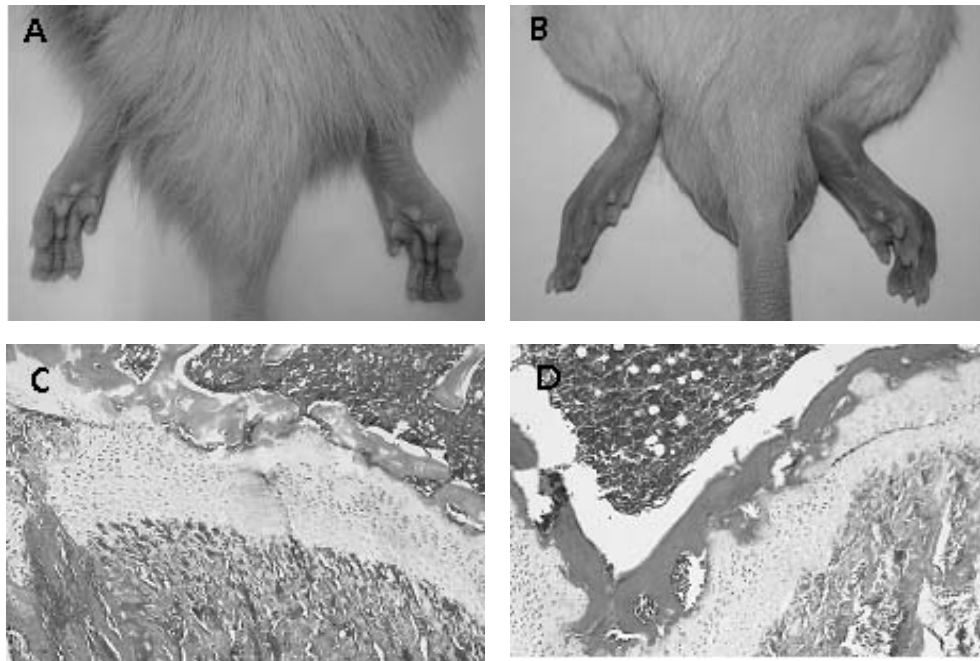
### 1. 류마티스 관절염의 육안 및 조직학적 유발 소견

흰쥐의 족부에서 관찰되는 발적과 홍반 및 부종을 동반하는 관절염의 육안적 소견은 다음과 같았다(Figure 1A, B). Chicken type II collagen으로 관절염을 유발시킨 후 14일째에 정상개체와 유발개체를 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 통하여 조직학적으로 관찰하여 본 결과 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤 등 기타 염증의 소견을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Figure 1C, D).

### 2. 행동반응의 변화

1) 기계적 이질통 측정(measurement of mechanical allodynia) 각 군의 류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 관절





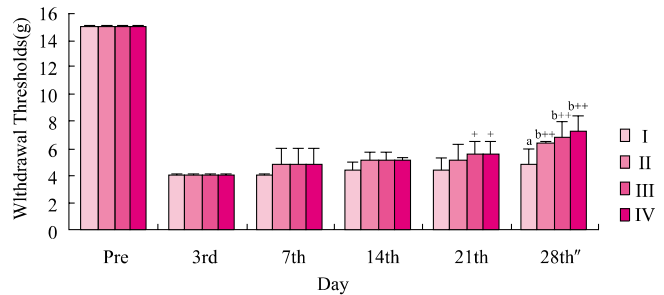
**Figure 1.** Gross & histological examination of the Hind Paw of a Rat 2 Weeks after the Secondary Immunization with Chicken Type II Collagen(B, D) and Normal Hind Paw(A, C). (Hematoxylin & Eosin stain, ×200).

염의 기계적 이질통의 변화를 일요인 분산분석(one-way ANOVA)으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나( $p>0.05$ ), 실험적 중재 이후 28일째에는 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다( $p<0.01$ ). 각 실험군 사이의 차이를 알아보기 위해 Duncan의 다중범위검정을 실시한 결과, 실험군 I과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으나( $p<0.05$ ), 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p>0.05$ ). 또한 각 실험군별 유발 후 초기 측정시기의 값(유발 3일째)과 각 측정시기별 값을 일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시하여 보면, I군은 각 시기별로 호전된 차이가 유의하지 않았으나( $p>0.05$ ), II군은 유발 28일째( $p<0.01$ ), III, IV군은 유발 21일째( $p<0.05$ ), 28일째( $p<0.01$ )에 호전된 차이가 유의하게 각각 나타났다(Figure 2).

### 3. 면역조직화학적 변화

#### 1) 슬관절에서 COX-2 단백질의 면역조직화학적 변화

유발 28일 후 제 2형 콜라겐 유도 관절염 흰쥐의 염증의 발현 정도를 측정하기 위하여 COX-2에 대한 면역조직화학적 반응을 검사하였다. 면역조직화학적 방법으로 표본을 염색한 결과, COX-2의 면역반응은 진한 갈색 과립상으로 관찰되었으며, 주로 윤활관절막의 주변 영역에서 면역 양성 반응이 증가함을 확



**Figure 2.** Change of Mechanical Allodynia in chicken Type II Collagen-induced Arthritic Rat.

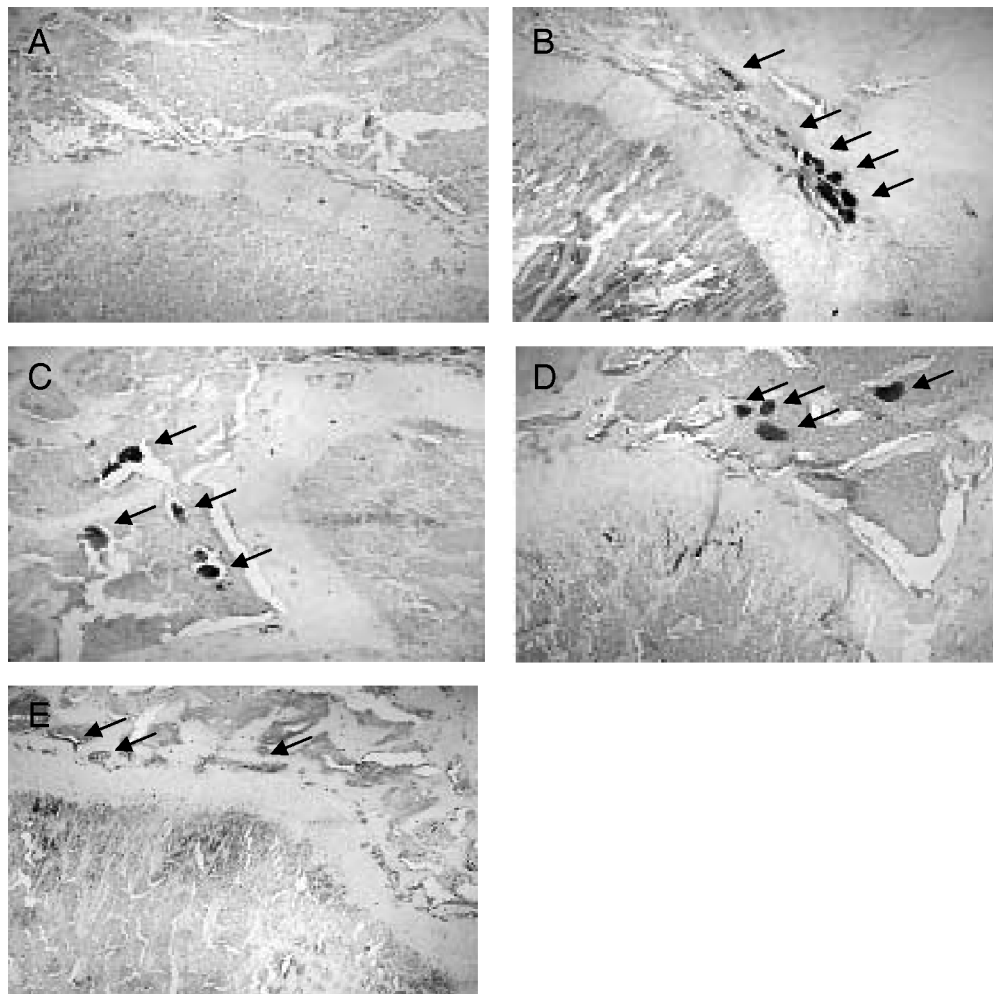
Values are showed mean±SD.

Tested by One-way ANOVA(††  $p<0.01$ ).

Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

Significantly different as compared with 3<sup>rd</sup> days by paired t-test (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ ).

- I: Chicken Type II collagen-induced arthritic
- II: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Swimming exercise
- III: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Achyranthes Radix Ointment
- IV: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Swimming exercise + Achyranthes Radix Ointment



**Figure 3.** Immunoreactivity with the COX-2 Expression in Synovial Tissue of knee joint after 28<sup>th</sup> Day in Each Groups (×200).  
 A: Normal  
 B: Chicken Type II collagen-induced arthritic (Experimental Group I)  
 C: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Swimming exercise (Experimental Group II)  
 D: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Achyranthes Radix Ointment (Experimental Group III)  
 E: Chicken Type II collagen-induced arthritic + Swimming exercise + Achyranthes Radix Ointment (Experimental Group IV)

인할 수 있었다. 유발 후 아무런 치료도 하지 않은 실험군 I에 비해 치료적 중재를 실시한 실험군 II, III, IV에서 COX-2 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었으며, 특히 실험군 IV에서 COX-2 발현이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다(Figure 3A-E).

#### IV. 고찰

자가 면역 관절염증이 생기는 생화학적 기전은 현재 정확히 밝혀져 있지 않으나 지금까지 알려진 것은 다음과 같다. 즉 활막에 염증유발과 동반하여 화학주성인자(chemotaxisfactor)가 형

성되고 활성화된 활막 세포 표면에 세포유착분자(celladhesion-molecule)발현이 향진되어 관절 안으로 림프구와 단핵구들이 이동되어 활막 세포에 부착된다. 활성화된 활막 세포 표면에서는 MHC(major histocompatibility complex) 제 2 항원분자와 림프구 활성화에 관여하는 부수분자들이 발현되어 침윤된 T세포를 활성화시킨다.<sup>24</sup> 활성화된 T 세포는 B세포를 자극하여 항체를 생성하게 하고, 생성된 항체는 자신의 IgG 불변부위에 대한 IgG 자가항체를 생성하며 류마티스 인자가 활성화하여 염증반응이 생기게 된다. 염증반응으로 모여든 염증 세포들은 라이소좀 단백 분해효소, 프로스타글란딘과 산소라디칼들을 분비하여 관절의 콜라겐과 연골에 손상을 입힌다.<sup>25</sup> 이러한, 류마티

스 관절염 환자의 대부분은 약 30~40%의 유전적인 소인과 60~70%의 환경적인 요인들이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>26</sup>

최근에는 천연물질을 이용한 치료제의 가능성이 대두되고 있는 실정이며, 그 중 특히 진통 및 진경, 항염증 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 우슬은 NSAID 약물을 대신하여 치료적인 중재로 실시하였을 경우 앞서 언급한 여러 부작용 없이 환자에게 적용할 수 있어서 각광받고 있다.<sup>27</sup> 그러나 현재는 우슬의 성분분석 및 경구투여를 통한 효과에 대해 근거를 제시한 선행연구는 있으나,<sup>28</sup> 아직까지 물리치료적인 중재로서 초음파의 매개전도체로 쓰이는 연고나 젤과 같은 경피투과 약물에 대한 연구는 미비한 실정이다.

또한 본 실험에서 치료적 중재로 실시한 수중운동은 반대편으로도 저항을 유발해 상대 근육의 균형적인 발달이 이루어질 수 있다. 즉, 주동근 뿐만 아니라 길항근까지 동시에 운동시킬 수 있다는 장점이 있다.<sup>29</sup> 이를 토대로 Fallon 등<sup>30</sup>은 규칙적인 운동이 염증과 관련된 C-reactive protein (CRP) 수치를 감소시켰다고 보고하였다. 그리고, Sugiura 등<sup>31</sup>은 마우스에서, 8주 동안 바퀴 위에서 자발적인 달리는 대식세포(macrophage)의 기능과 림프구 반응을 강화시킨다고 하였다. 본 연구에서 치료적인 중재에 앞서 제 2형 콜라겐 유도 관절염 흰쥐모델 유발이 되었는지 선행적으로 확인한 결과, 2차 접종 후 흰쥐의 족부에서 홍반 및 부종을 육안 사진으로 확인할 수 있었다. 또한 슬관절 부위에서 H & E 염색으로 확인한 결과, 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤 등 기타 염증의 소견이 관찰되었다(Figure 1). 다음으로 치료적인 중재 후에 기계적 이질통 검사 결과, 유발 전에는 모든 실험군에서 hair의 높은 역치 값을 확인할 수 있었으나 유발 후에는 모든 실험군에서 hair의 역치 값이 급격히 낮아짐을 볼 수 있었다. 이러한 이유는 족부의 염증과 통증이 심해짐에 따라 족부의 민감화를 초래하기 때문이라고 생각되어진다. 또한, 치료적 중재를 실시한 후 시간이 지날수록 족부의 역치 값이 증가하는 것으로 보아 염증과 통증 반응이 감소되고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 28일째에는 hair의 역치 값이 통계적으로 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다( $p<0.01$ )(Figure 2). 규칙적인 수중운동과 우슬추출물은 COX-2의 억제를 유도하는 중재방법으로서, 주요 작용기전은 Arachidonic acid 대사에서 Cyclooxygenase(COX)를 억제하면 PG의 합성을 억제하게 되어 항염증효과를 나타낸다.<sup>32,33</sup> COX-2는 LPS, tumor promoters, oncogenes, mitogens, hormones, cytokine과 성장인자와 같은 여러 종류의 자극에 반응하여 유도되며, 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스 관절염,

Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관 이완과 혈관 신생성에도 관여한다.<sup>34</sup>

본 연구에서도 염증과 통증감소에 중요한 매개체인 COX-2의 발현량을 관찰하였다. 실험종료 후 슬관절 조직의 COX-2의 면역조직화학적 염색결과, 아무런 실시도 하지 않은 정상군과 유발대조군인 실험군 I과 비교하여 볼 때, 실험군 I의 활막 부위에서 다발성의 양성 세포의 발현을 관찰할 수 있었으나, 치료적 중재를 실시한 실험군 II, III, IV의 활막 부위에서는 국소적으로 억제된 양성반응 세포의 발현이 관찰되었다(Figure 3). 이러한 결과는 제 2형 콜라겐 유도 관절염의 슬관절 조직에서의 COX-2의 발현이 억제된다는 선행연구 결과와 일치하였다.<sup>35,36</sup> 이러한 결과는 Arachidonic acid 대사에서 COX를 억제하면 PG의 합성을 억제하게 되어 항염증 효과가 나타났다는 선행연구들의 결과와 일치하였다.<sup>37,38</sup>

이상의 연구결과에 의하면 수중운동과 우슬추출물을 이용한 연고제는 제 2형 콜라겐 유도 관절염 흰쥐에서 만성적 염증 및 통증반응을 악화시키는 COX-2의 발현을 효과적으로 억제시켰으며, 이는 행동학적인 통증역치 수준의 향상의 결과를 가져왔다. 그러나 육안적인 사진을 토대로 한 H & E 및 면역조직화학적 염색인 COX-2의 양성세포수의 발현에 대한 정량화를 적절히 고려하지 못하였다. 따라서, 본 연구를 바탕으로 앞으로 세부적인 임상적 연구 등이 다각적으로 제시된다면 제 2형 콜라겐 유도 관절염 환자들의 회복에 기여할 것으로 사료된다.

## V. 결론

본 연구에서는 제 2형 콜라겐 유도 관절염 흰쥐에서 규칙적인 수중운동과 우슬추출물을 치료적중재방법으로 적용하여 만성염증 및 통증을 효과적으로 중재할 수 있는지를 시간의 경과에 따라 비교하여 확인하였다. 관절염의 유발 전·후의 육안적인 소견을 비교하여 볼 때 유발 후 발적과 부종 및 홍반이 관찰되었으며, H & E를 통한 조직학적인 소견에서도 유발 후에 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤을 확인할 수 있었다. 기계적 이질통 검사결과, 유발 전에 비하여 유발 후 족부의 민감화를 확인할 수 있었으며, 유발 28일째에는 실험군 I과 비교하여 볼 때 실험군 II, III, IV에서 통계적으로 유의한 증가를 확인할 수 있었다( $p<0.01$ ). 슬관절의 활액막 부위에서 COX-2의 면역조직화학적반응 결과, 실험군 II, III, IV의 활액막 부위에서 양성 세포의 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다.

## Author Contributions

Research design: Choi KB

Acquisition of data: Kim GY

Analysis and interpretation of data: Choi KB, Kim EJ

Drafting of the manuscript: Choi KB, Kim EJ

Administrative, technical, and material support: Kim KY, Nam KW

Research supervision: Kim EJ

### Acknowledgements

1. 본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 연구비 지원을 받았음.
2. 본 논문은 최기복의 석사학위 논문 일부를 출판하였음.

### 참고문헌

1. Stoerk HC, Bielinski LC, Budzilovich T. Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants. *Am J Pathol.* 1954;30:616.
2. Boissier MC, Bessis N. Therapeutic gene transfer for rheumatoid arthritis. *Reumatismo.* 2004;56(Suppl 1):51-61.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc, 2005.
4. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia medica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002:516-26.
5. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001;15(5):801-20.
6. Spangler RS. Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;26(1):435-46.
7. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British Journal of Sports Medicine.* 2000;34(4):246-51.
8. Nieman DC. Influence of carbohydrate on the immune response to intensive prolonged exercise. *Exerc Immunol.* 1998;4:64-76.
9. Shavit Y, Terman GW, Martin FC et al. Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *Journal of immunology.* 1985;135:834S-7S.
10. Contarteze RV, Manchado Fde B, Gobatto CA et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2008;151(3):415-22.
11. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130(1):21-7.
12. Seo DW, Pyen SB, Kim SJ. Changes of local temperature and pain produced by superficial heat. *The Journal of Korean Academy of Rehabilitation Medicine.* 1994;18(2):227-33.
13. Kim JI. An effect of aquatic exercise program with selfhelp group activities and strategies for promoting self-efficacy on pain, physiological parameters and quality of life in patients having rheumatoid arthritis. Seoul University. Dissertation of Doctorate Degree. 1994.
14. Kim EH. Effect and principal of rhythmical exercise and swimming exercise. *The Journal of Rheumatology Health.* 1998;5(2):296-302.
15. Basmajian JV. Therapeutic exercise in the management of rheumatic diseases. *J Rheumatol Suppl.* 1987;14(15):22-5.
16. Fang JN, Zhang ZH, Liu BN. Chemical studies on polysaccharide of *Achyranthes bidentate*. *Yaoxue xuebao.* 1990;25:526-9.
17. Eum HA, Lee WY, Kim SH et al. Anti-inflammatory activity of CML-1: an herbal formulation. *Am J Chin Med.* 2005;33(1):29-40.
18. Trentham DE. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1982;25(8):911-6.
19. Chen Q, Wei W. Effects mechanisms of glucosides of *Chaenomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in rats. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(4):593-608.
20. Champion M. Hydrotherapy principles and practice. In: Tinsley LM, eds, *Rheumatic Diseases*, Oxford, Butterworth-Heinemann, 1998:3-13.
21. Lee HS. Transdermal permeation to hydrophilic vitamin B<sub>2</sub>(riboflavin) of chitosan ointments in vitro. *Bull Nat Sci Yong-In Univ.* 2001;6(1):1-7.
22. Shimizu I, Iida T, Guan Y et al. Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X<sub>3</sub>. *Pain.* 2005;116(1-2):96-108.
23. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994;53(1):55-63.
24. John R. Human interferon action; Reciprocal regulation by retinoic acid and  $\beta$ -carotene. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70(5):833-7.
25. Jung WJ. Effects of dietary antioxidants on inflammatory responses and rheumatoid arthritis. Sookmyung Women's University. Dissertation of Master's Degree. 2005.
26. Park W. The treatment effect of Honghwa-ja herbal



- acupuncture to inhibitory MIF activation on synovial membrane by LPS-induced arthritis. Dongguk University. Dissertation of Master's Degree. 2006.
27. Kim SJ, Park JB, Kwon YH et al. Therapeutic effects Archyranthes Radix on hard tissue regeneration. *The Journal of Applied Pharmacology*. 2002;10(4):253-257.
  28. Lee JC. The effects of Achyranthes radix and electroacupuncture on type II collagen-induced arthritis. Dongshin University. Dissertation of Master's Degree. 2007.
  29. Cho YM. The effect of hydrotherapy on the balance in stroke patient. Chonnam National University. Dissertation of Master's Degree. 2007.
  30. Fallon KE, Fallon SK, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *Br J Sports Med*. 2001; 35(3):170-3.
  31. Sugiura H, Nishida H, Inaba R et al. Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. *Acta Physiol Scand*. 2000;168(3):413-20.
  32. Surh YJ, Chun KS, Cha HH et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*. 2001;480-481:243-68.
  33. Kim DH, Park LJ, Jern KH. The effect of cryotherapy on release of inflammation in patient with rheumatoid arthritis. *J Kor Soc Phys Ther*. 2001;13(1):175-88.
  34. Rothketter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;72(1-2):157-65.
  35. Han GY. Protective Effects of Monotropin Isolated from *Morinda officinalis* against FCA-Induced Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. Kyungsoong University. Dissertation of Doctorate Degree. 2006.
  36. Cuzzocrea S, Ayroldi E, Di Paola R et al. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. *FASEB J*. 2005;19(10):1253-65.
  37. Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR et al. Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3439-47.
  38. Olszanecki R, Gebaska A, Korbut R. Production of prostacyclin and prostaglandin E2 in resting and IL-1beta-stimulated A549, HUVEC and hybrid EA.HY 926 cells. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(4):649-60.