Research Article

Open Access

흰쥐의 MIA 유발 무릎 뼈관절염에 대한 840 nm LED의 효과

제갈승주 · 권필승 · 김진경¹ · 이재형^{2†}

원광보건대학교 임상병리과, ¹미용피부관리과, ²물리치료과

Effect of 840 nm Light-Emitting Diode(LED) Irradiation on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats

Seung-Joo Jekal, PhD, Pil-Seung Kwon, PhD, Jin-Kyung Kim, PhD¹, Jae-Hyoung Lee, PhD^{2†}

Department of Clinical Laboratory Science, ¹Department of Cosmetics

²Department of Physical Therapy, ElectroTherapy Research Laboratory for Tissue Growth and
Repair, Wonkwang Health Science University

Received: January 28, 2014 / Revised: March 18, 2014 / Accepted: March 31, 2014

© 2014 J Korean Soc Phys Med

| Abstract |

PURPOSE: The purpose of this study was to evaluate whether light-emitting diodes (LED) irradiation could be effective in a noninvasive, therapeutic device for the treatment of osteoarthritis(OA).

METHODS: Twenty-four male Sprague-Dawley rats were divided into four groups: Vehicle control (saline); monosodium iodoacetate-injection (MIA); LED irradiation after MIA injection (MIA-LED); indomethacin-treatment after MIA injection (MIA-IMT). OA was induced by intra-articular injection of 3 mg MIA through the patellar ligament of the right knee. Vehicle control rats were injected with an equivalent volume of saline. The LED was irradiated for 15 min/day for a week after 7 days of MIA treatment. To compare with the effect of LED irradiation, the indomethacin

was administrated 20 mg/kg twice a week orally after 7 days of MIA treatment. Knee joints were removed and fixed overnight in 10% neutral buffered formalin and decalcified by EDTA for 2 week before being embedded in paraffin. The assessment of OA induction were monitored by knee movement and radiographic finding. Histologic analysis were performed following staining with hematoxylin and eosin, safranin O-fast green, or toluidine blue, picosirius red, and histologic changes were scored according to a modified Mankin system. Apoptotic cell in tissue sections was detected using TUNEL method.

RESULTS: Radiographic examination could not show the differences between the MIA-treated and the MIA-LED-treated rats. In the histologic analysis, however, LED irradiation prevented cartilage damage and subchondral bone destruction, and significantly reduced mononuclear inflammatory cell infiltration and pannus formation. LED irradiation also reduced apoptosis of cartilage cells, but it prevented apoptosis of infiltrated inflammatory cells in synovium. In addition, LED irradiation showed an increase of collagen production in the meniscus.

†Corresponding Author : jhee@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CONCLUSION: These results suggest that the 840 nm LED irradiation would be a suitable non-thermal phototherapy for the treatment of OA, as a cartilage protection and anti-inflammatory modality.

Key Words: Osteoarthritis, LED irradiation, Monosodium iodoacetate treatment

I. 서 론

뼈관절염 (osteoarthritis, OA)은 관절연골을 침범하는 만성 염증 질환으로 무릎관절에서 흔히 발생한다. 조직 병리학적으로는 관절연골의 주요 성분인 연골세포, 세포외기질을 구성하는 프로테오글리칸 (proteoglycan) 및 콜라겐의 변성과 함께 윤활막 (synovium)과 연골밑 뼈 (subchondral bone) 대사의 변화로 인해 발생하는 윤활막 염증이 특징이다 (Martel-Pelletier 등, 2008). 윤활막 염증과 관절 내 염증유발 증개제의 농축은 통증의 직접적인 원인이 되고 있다 (Clegg 등, 2006).

뼈관절염의 치료는 일반적으로 약물치료와 외과적인 수술치료가 병행되고 있다. 그러나 약물치료는 윤활 작용을 돕고 통증을 감소시키는 효과는 있지만 히알루론산의 경우 시간경과에 따라 점진적으로 효과가 줄어들고 반복투여로 인해 관절부위 감염의 위험이 있으며 (Puhl 등, 1993), 비스테로이드 소염제의 경우 장기간 사용 시 위장관과 콩팥을 손상시킬 수 있고, 특이적 cyclooxygenase-2 억제제의 사용은 심혈관계통의 부작용이 있기 때문에(Clegg 등, 2006; Passmore과 Cunningham, 2013) 보다 안전하고 항염증성 및 관절연골의 보존 효과가 있는 보존적 치료법의 개발이 요구되고 있다.

뼈관절염의 통증 완화와 기능 및 삶의 질을 향상시키기 위한 보존적 치료방법으로 운동치료, 경피신경전기 자극, 열치료, 맥동전자장치료, 단파치료, 초음파치료, 저출력레이저치료 등이 제시되고 있으며 (Stemberger와 Kersch-Schindl, 2013), 운동치료, 경피신경전기 자극, 저출력레이저치료 등은 근거가 잘 제시되고 있다

(Jamtvedt 등, 2008).

최근 상처, 염증, 피부질환에 발광다이오드 (light emitting diode: LED)를 사용하는 광선치료 활용도가 증가하고 있다 (Barolet, 2008; Whelan 등, 2001). LED는 레이저와 유사한 기전의 효과를 가지고 있으며, 빛이 국소적으로 집중되는 레이저와 달리 넓은 면적을 효율적으로 치료할 수 있는 장점이 있고 부작용이 없이 안전하고 비침습적인 치료 도구로 알려져 있다 (Barolet, 2008). 또한 사용하는 반도체 소재에 따라 자외선에서부터 가시광선 및 적외선 영역까지 넓은 파장영역의 빛을 쉽게 만들 수 있으며, 가격이 저렴하고 LED 칩의 출력 및 효율이 향상됨에 따라 빠르게 레이저나 램프를 사용하는 광선치료기기를 대체할 것으로 예상된다.

뼈관절염에 대한 저출력레이저의 항염증효과에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있으나 (da Rosa 등, 2012; Pallotta 등, 2012; Alves 등, 2013), LED의 효과에 대해서는 연구가 많지 않고 소수의 연구에서 서로 다른 결과를 보고하고 있는 실정이다 (Oshima 등, 2011; de Moraes 등, 2010). 따라서 본 연구는 실험적으로 유도한 뼈관절염 쥐의 무릎관절에 840 nm의 LED를 조사하여 뼈관절염의 조직병리학적 치료효과를 평가하여 광선치료법으로서 LED의 활용 가능성을 검토하기 위해 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 7주령의 특정병원군 부재 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 KOATECH(Pyungtaek, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 원광보건대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후 실험동물 관리 및 이용에 관한 지침에 따라 관리하였다. 실험기간 동안 고휘사료 (KOATECH, Pyungtaek, Korea)와 물을 자유롭게 공급하면서 사육하였다. 동물 사육실의 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 2\%$ 를 유지하였으며, 명암 주기는 12시간 간격으로 사육하면서 일주일간 적응시킨 후 평균체중 210 ± 20 g인 것을 사용하였다.

2. 뼈관절염 유발

뼈관절염은 Dunham 등(1993)의 방법에 따라 유발시켰다. 흰쥐의 오른쪽 무릎관절 주위의 털을 깎은 다음 알코올로 피부를 소독하고 무릎을 90도 굽힌 자세에서 monosodium iodoacetate (MIA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3 mg/50 μ l를 무릎뼈인대를 관통하여 관절강 내에 주사한 후 5분간 무릎관절의 펌과 굽힘을 반복하였다. 관절염 유발 여부는 관절의 움직임과 부종, 치과용 x-선 촬영기 (Ecoray Co., Gwangju, Korea)를 사용한 방사선 사진을 확인한 후 관절염이 유발된 개체를 관절염을 유발시킨 MIA군, 관절염 유발 후 LED를 조사한 MIA-LED군, 그리고 현재 흔히 치료제로 사용되는 비스테로이드성 소염제와의 비교를 위하여 관절염 유발 후 indomethacin (IMT)을 투여 한 MIA-IMT군에 6마리씩 무작위로 배정하였다. 용매 대조군 (vehicle control)은 동일한 위치에 0.9% 멸균 생리식염수 50 μ l를 관절강 내에 주사하였다.

3. LED 조사 및 indomethacin 투여

MIA-LED군은 MIA 주입 1주일 후 부터 매일 LED를 조사하였다. 실험에 사용한 LED를 자체 제작하여 사용하였다. 가로 75 mm $\times$ 세로 110 mm 판에 정점 파장 840 nm인 직경 5 mm infra-red dome lamp (IWL-EI5R15F-TNB, Itswell Co., Ltd., Incheon, Korea) 192 (12 $\times$ 16)개를 장착하였다. 무릎관절을 90도 굽힌 자세에서 무릎 측면에서 1 cm의 거리를 두고 15분씩 7일간 조사하였다. 조사 시 출력밀도는 2.5 mW/cm², 에너지밀도는 11.47 J/cm²이었다. 출력 밀도는 FieldMaxII-TO Powermeter (Coherent Inc., Santa Clara, CA 95054 USA)를 사용하여 측정하였다. MIA-IMT군은 indomethacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0.9% 멸균 생리식염수에 녹여 20 mg/kg의 농도로 1주일에 두 번 경구 투여하였다.

4. 조직병리학적 분석

뼈관절염이 유발된 흰쥐의 무릎관절을 조직병리학적으로 검사하기 위하여 치료 종료 후에 오른쪽 무릎관절을 채취하였다. 채취한 무릎관절은 10% 중성완충포름알린에 24시간 고정하여 EDTA-Glycerol용액 (Miao

와 Scutt, 2002)으로 탈회하였으며 일반적인 탈수, 투명 및 침투과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 파라핀블록은 회전식 박절기 (HM340E, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 사용하여 4 μ m 두께의 파라핀절편을 제작하여 관절조직 및 주변조직의 염증 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 하였고, 연골의 변성과 연골기질의 주성분인 프로테오글리칸의 소실 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green 및 toluidine blue염색을 하였으며, 반달연골 (meniscus)의 섬유화 정도를 보기 위해 picrosirius red 염색법 (Leon과 Rojkind, 1985)을 변형시켜 실시하였다.

뼈관절염 정도를 평가하기 위하여 변형 Mankin 점수 체계 (Mankin 등, 1971)를 사용하여 관절연골의 변화를 분석하였다. 무릎관절 연골은 연골구조의 변화를 0-6 점으로, 연골세포의 비정상 정도를 0-3점으로, 연골기질의 염색성 정도를 0-4점으로 점수화하여 각 군을 비교하였다. 또한 연골밀세포 조직 손상부위의 뼈파괴세포 (osteoclasts)의 형성 정도는 0-4점으로 구분하였고, 염증세포의 침윤 정도와 피질뼈 내로의 파누스 (pannus) 형성 범위는 0-4점으로 나누어 평균점수를 구하였다. 이 밖에 추가로 picrosirius red 염색을 하여 반달연골 내 콜라겐 변화를 광학현미경에 부착된 Olympus DP-72 디지털카메라 (Olympus Co., Tokyo, Japan)로 이미지를 촬영하고 Image-Pro Plus ver. 4.5 프로그램 (Media Cybernetics Inc., Georgia, USA)을 사용하여 단위면적당 %로 구하여 비교하였다.

5. TUNEL 검사

관절연골과 염증세포 침윤 부위의 세포자멸사 (apoptosis)를 조사하기 위해 ApopTag Peroxidase In Situ Detection kit (Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 사용하여 제조사 매뉴얼을 따라 시행하였다. 파라핀절편을 탈파라핀하여 함수한 후 H₂O₂-methanol을 사용하여 내인성 과산화효소 활성을 차단하였고 proteinase K (Dako, Carpinteria, USA)를 실온에서 15분간 전처리한 다음 equilibration buffer로 10초간 처리하였고 이어 terminal deoxynucleotidyl transferase에서 1시간 반응시켰다. 이 절편은 antidigoxigenin conjugate에 반응시킨 후 diaminobenzidine으로 발색한

다음 Gill hematoxylin으로 대조염색하여 DPX로 봉입하였다.

6. 통계분석

각 군의 관절연골 변화를 비교하기 위해 일원분산분석을 시행하였으며, 유의한 차이가 있을 경우 Turkey 다중순위검정으로 사후 검정하였다. 통계분석은 SPSS ver 10.0을 사용하였으며, 통계적 유의수준 α 는 .05로 하였다.

III. 결 과

1. 방사선 검사

정상대조군에 비해 MIA 군에서는 정강뼈끝 모서리(tibioepiphyseal margin)에 인접하여 경화부위(sclerotic area)를 관찰할 수 있었고 뼈끝도 얇아져 있었으며 뼈관절염의 특징인 작은 뼈결돌기(osteophyte)도 확인할 수 있었다. 이에 대해 MIA-LED 군에서는 MIA군에 비해 방사선 소견에서는 뚜렷하지는 않으나 뼈결돌기 형성과 경화부위가 다소 감소한 것을 관찰 할 수 있었고, MIA-IMT 군에서는 MIA 군에 비해 경화부위와 뼈결돌기가 뚜렷하게 감소되어 있었고 뼈끝의 두께도 정상대조군과 거의 비슷한 상태를 유지하고 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig 1).

Fig 1. Radiographs of knee joint from vehicle control, MIA, MIA-LED and MIA-IMT rats. The osteophyte formation and sclerosis were decreased in the MIA-LED and MIA-IMT rats compared to the MIA rat.

2. 조직병리학적 소견

관절면의 연골구조와 연골기질의 변화를 보기 위한 safranin O-fast green과 toluidine blue염색 결과 용매 대조군의 관절연골은 접촉부위, 이행부위 그리고 방사부위의 연골세포들이 평행으로 배열되어 있고 연골기질도 잘 보존되어 진한 염색성을 유지하고 있었다 (Fig 2A와 B). 이에 비해 MIA군에서는 연골이 광범위하게 손상되고, 연골의 두께가 정상의 약 50% 이상으로 얇아져 있고, 연골기질이 전체적으로 소실되어 매우 창백하였으며, 연골밑뼈조직이 광범위하게 파괴되어 있었다 (Fig 2, A와 B). 뼈관절염의 중증도를 Mankin의 변형 점수체계를 사용하여 분석한 결과에서도 용매 대조군에 비해 정강뼈와 넓다리뼈 모두에서 연골기질의 염색성이 매우 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($p<.001$). MIA-LED군에서는 MIA군에 비해 정강뼈의 경우 비정상연골세포의 정도는 각각 유의하게 감소하였으나 ($p<.05$) 넓다리뼈의 경우 연골구조와 비정상연골세포의 정도는 유의한 차이가 없었다. 또한 연골기질의 염색성에서 정강뼈와 넓다리뼈 관절에서 모두 증가하는 경향을 보였으나 정강뼈에서는 통계학적인 차이가 없었고 넓다리뼈에서만 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 ($p<.05$). 그러나 MIA-IMT군에서는 MIA군에 비해 정강뼈와 넓다리뼈 관절 모두에서 관절연골의 층별 연골세포의 배열도 정상에 가깝게 보존되어 있었고 연골기질의 염색성도 모두 매우 유의한 증가를 나타내었다 ($p<.01$) (Fig 2A와 B).

B

Fig 2. Histologic analysis of the joint cartilage from vehicle control, MIA, MIA-LED and MIA-IMT rats. The tissue sections from knee joints were stained with safranin O-fast green and toluidine blue. Original magnification, x100. The OA lesion was graded on a scale using the modified Mankin scoring system. Values are the mean $\pm$ SEM. The data were obtained from stained sections of right knee joint per rat (n=6 rat for each of the four experimental groups).

뼈파괴세포의 형성과 뼈 파괴 정도를 Mankin의 변형 점수체계를 사용하여 분석한 결과 정강뼈와 넓다리뼈 관절에서 모두 정상군에 비해 MIA군에서 연골밑뼈조직의 심한 파괴로 인해 광범위하게 뼈잔기둥 (bone trabeculae)과 골수가 소실되었고, 뼈 소실부위에 많은 뼈파괴세포 증식과 함께 육아조직이 형성되었다. 이에 비해 MIA-LED군의 경우 정강뼈에서 MIA군에 비해 뼈파괴세포의 수가 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계학적인 차이가 없었고, 넓다리뼈에서는 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$). 이에 비해 MIA-IMT군에서는 정강뼈와 넓다리뼈 관절에서 모두 MIA군에 비해 연골밑뼈조직의 소실 범위도 적고 뼈파괴세포의 수도 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$) (Fig 3).

윤활막과 반달연골의 변화를 관찰한 결과 정상군에서는 윤활막과 반달연골이 잘 보존되어 있었고 윤활막도 단층 세포로 잘 배열되어 있었으며 그 밑의 지방조직도 뚜렷하였다. 이에 대해 MIA군에서는 윤활막이 섬유모세포와 침윤된 단핵성 염증세포들에 의해 확장되

Fig 3. Osteoclast formation (arrow) around subchondral bony tissue from vehicle control, MIA, MIA-LED and MIA-IMT rats. The tissue sections from knee joints were stained with hematoxylin and eosin. Cartilage degeneration and subchondral bone destruction are seen in the MIA, MIA-LED and MIA-IMT group, except vehicle control group. Original magnification, x200. The formation of osteoclast was graded on a scale using the modified Mankin scoring system. Values are the mean $\pm$ SEM. The data were obtained from stained sections of right knee joint per rat (n=6 rat for each of the four experimental groups).

어 있었고 관절강의 일부가 파누스 조직으로 대체되어 있었다 (Fig 4). MIA-LED의 경우 Mankin의 변형 점수체계를 사용하여 분석한 결과 MIA군에 비해 단핵성 염증세포 침윤과 파누스 조직이 다소 감소하는 경향을 보였으며 통계학적으로도 유의한 감소를 나타내었다 ($p<0.05$). MIA-IMT군에서도 단핵성 염증세포들의 뚜렷한 감소와 함께 파누스 조직도 거의 형성되지 않아 indomethacin에 의한 염증 억제 효과를 확인 할 수 있었다 ($p<0.01$). 또한 반달연골의 콜라겐 변화를 보기 위해 picrosirius red 염색을 한 결과에서는 용매 대조군에 비해 MIA군의 경우 콜라겐이 유의하게 감소하였으나 ($p<0.01$) MIA-LED 군에서는 반달연골 내 콜라겐이 MIA군에 비해 유의하게 증가하였고 ($p<0.01$), MIA-IMT군에서도 유의하게 증가하였다 ($p<0.05$).

Fig 4. Histologic changes for inflammatory cell infiltrate and pannus (P) of the menisci (M) and perimeniscal synovium (S) were determined in hematoxylin & eosin and picosirius red-stained sections. In the normal rats, the synovial membrane was preserved, while in the MIA-treated rats, there were massive proliferation of synovial cells and marked infiltration of inflammatory cell and pannus formation in the articular space. Inflammatory cell infiltration and pannus formation were significantly decreased in the MIA-LED rats, compared to the MIA-treated rats. Also, the normal menisci had strong picosirius red staining, while the menisci of MIA-treated rats had weak picosirius red staining. In the MIA-LED and MIA-IMT rat, collagen staining showed a significant increase inside the OA menisci, compared to the MIA-treated rats. Original magnification, x40. Values are the mean $\pm$ SEM. The data were obtained from stained sections of right knee joint per rat (n=6 rat for each of the four experimental groups).

세포자멸사를 보기 위한 TUNEL 분석결과 관절연골의 경우 용매 대조군에 비해 MIA군에서 자멸세포수가 유의하게 증가하였으나(p<.001), MIA-LED군과 MIA-IMT군에서는 MIA군에 비해 유의하게 감소하였다 (p<.01). 윤활막의 단핵성 염증세포 침윤 정도는 MIA군에서 가장 높았고 MIA-LED군, MIA-IMT군 순으로 감소한데 반해, 침윤 단핵성 염증세포 수에 대한 자멸세포의 수의 비율은 오히려 MIA 군에 비해 MIA-LED군과 MIA-IMT군에 자멸세포의 수가 유의하게 증가하였다 (p<.05, p<.01) (Fig 5).

Fig 5. TUNEL assay for apoptosis of articular cartilage cells and mononuclear inflammatory cells in synovium. The apoptotic cell number of articular cartilage cells were significantly decreased in the MIA-LED and MIA-IMT rats compared with in MIA rats, but the apoptotic cells ratio for total inflammatory cells were significantly increased in the MIA-LED and MIA-IMT rats. Original magnification x100. Values are the mean $\pm$ SEM. The data were obtained from stained sections of right knee joint per rat (n=6 rat for each of the four experimental groups).

IV. 고 찰

뼈관절염에 대한 LED의 치료효과를 조직병리학적으로 평가하기 위한 본 연구에서 840 nm의 LED를 사용하였다. 빛의 파장은 조직 내 침투 깊이에 영향을 준다. 빛의 조직 침투 깊이는 파장 400 nm의 경우 1 mm이하, 514 nm의 경우 0.5-2 mm, 630 nm의 경우 1-6 mm, 700-800 nm의 경우 6 mm이상으로 알려져 있다 (Simpson 등, 1998). 따라서 관절까지 깊이 빛이 도달하기 위해서는 가능한 긴 파장의 LED를 사용하는 것이 효과적일 것으로 판단되어 840 nm의 LED를 선택하여 실험하였다.

관절연골은 2형 콜라겐과 프로테오글리칸이 풍부한 연골기질을 포함하고 있는데, 뼈관절염이 발생하면 시간 경과에 따라 연골 내 콜라겐의 구성 그물이 점점 더 느슨해지고 프로테오글리칸 함량이 감소한다 (Lahm 등, 2010; Saarakkala 등, 2010; Sun 등, 2012). 뼈관절염으로 인한 연골의 변성과정에는 콜라겐 분해효소

의 하나인 matrix metalloproteinase 13 (MMP 13)이 깊이 관여하며 (Reboul 등, 1996), MIA로 유도한 뼈관절염 쥐의 연골에서도 MMP 13 발현이 유의하게 증가하는 것으로 보고되어 있다 (Barve 등, 2007).

최근 LED 조사가 상처치유에 효과가 있다는 것이 알려지면서 상처치유 및 염증치유와 관련된 보고들이 증가하고 있다. Lee 등(2007)은 LED를 피부 상처에 조사하였을 때 진피층의 콜라겐 합성을 증가시키는 반면 MMP를 감소시킨다는 보고하였고, Oshima 등(2011)도 뼈관절염 유발 동물실험에서 LED 조사가 TNF- α 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서 관절강내에 MIA를 1회 소량 주입한 결과 Guingamp 등(1997)이 보고한 바와 같이 사람의 뼈관절염과 유사하게 연골세포 괴사와 연골밀세포조직의 변화가 유발되었으며, 840 nm LED를 조사한 결과 비교군인 MIA-IMT군만큼 뚜렷하지는 않았지만 MIA군에 비해 넓다리뼈와 정강뼈 부위에 따라 정도의 차이는 있었으나 관절연골의 표면 손상이 감소하고 연골기질 내 프로테오글리칸 소실이 감소하여 LED 조사가 MMP 활성이 억제되어 관절연골을 보호해주는 효과를 보였다. 비교군인 MIA-IMT군만큼 뚜렷한 감소는 없었지만 연골밀뼈가 광범위하게 붕괴되고 뼈파괴세포의 수가 많이 출현한 MIA군에 비해 MIA-LED군의 넓다리뼈에서 뼈파괴세포 수가 유의하게 감소하여 LED 조사가 뼈파괴세포 생성 및 활성을 억제하는 효과도 확인할 수 있었다. 또한 관절강 내에 침윤되어 있던 염증성 단핵세포들과 관절면을 따라 형성되어 있던 파누스가 LED 조사군에서는 비교군인 MIA-IMT군 만큼 뚜렷하지는 않았으나 MIA군에 비해 유의하게 감소하여 LED 조사의 항염증 효과도 확인하였다. 이와 같은 결과는 저장도 880 nm LED 조사가 침윤된 염증세포들과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 cytokine을 감소시켜 항염증 효과를 나타내었다는 보고 (Xavier 등, 2010)와 토끼 무릎의 뼈관절염 모델에서 630 nm와 870 nm LED를 조사한 결과 관절연골을 보존하고 염증을 감소시키는 효과가 있다는 보고(Oshima 등, 2011)와 일치한다.

한편, 뼈관절염의 진행에서 중요한 관절구조의 하나인 반달연골 내 콜라겐 변화를 분석한 결과에서 MIA군에서는 반달연골 내 콜라겐이 현저하게 감소하였으나

MIA-LED군에서는 반달연골 내 콜라겐이 증가하였으며, 630 nm와 870 nm LED를 조사로 콜라겐 발현이 증가했다는 Oshima 등 (2011)의 보고와 일치한다. 이러한 결과는 *in vitro* 실험에서 LED 조사가 섬유모세포, 뼈모세포, 골격근세포, 상피세포와 같은 다양한 세포주의 성장을 자극하며(Whelan 등, 2001), 당뇨유발 쥐의 피부 상처 치유과정에서 섬유모세포를 활성화하는 기능(Jekal 등, 2010)도 있음을 시사한다. 섬유모세포의 활성화는 cyclooxygenase를 하향 조절하여 prostaglandin E₂ 합성을 억제함으로써 염증을 감소시키는 기전과 관계가 있을 것으로 생각된다 (Lim 등, 2007; Xavier 등, 2010). 최근의 보고에서도 뼈관절염에서의 반달연골의 변성 정도가 연골병변의 중증도 (Crema 등, 2010)와 관련이 있고, 뼈관절염 반달연골 연골세포들에서 정상 반달연골세포 보다 칼슘이 더 많이 침착되는 것으로 보고하고 있어 (Sun 등, 2012), 추후 반달연골 손상 정도와 뼈관절염 진행과의 관련성에 대한 좀 더 세밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 게다가 반달연골은 관절연골과 달리 뼈관절염에서 콜라겐 소실이 심하지만 프로테오글리칸 소실은 심하지 않다는 것과 반달연골은 1형 콜라겐이 98%를 차지하며 약 1% 정도의 프로테오글리칸을 포함하고 있어서 (Sun 등, 2012) 뼈관절염에서의 반달연골의 생화학적 변화가 관절연골과는 다르게 나타난다는 것을 고려하면 반달연골 내 세포기질의 변성은 관절연골의 변성과정과는 다른 경로로 진행되는 것을 의미하므로 앞으로 보다 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

끝으로 뼈관절염 진행 과정에서 세포자멸사에 대한 연구에서 Blanco 등(1998)은 조직학적 변화를 검토한 결과 정상인의 관절 연골세포에서는 세포자멸사가 일어나지 않으나 퇴행성 뼈관절염 환자의 관절 연골에서는 평균 6%가 세포자멸사 기전을 통해 세포사가 일어난다고 하였다. 본 실험에서도 관절연골의 TUNEL 염색결과 MIA군에서 자멸세포의 수가 증가하였으나 MIA-LED군에서는 MIA-IMT군과 유사하게 자멸세포의 수가 뚜렷이 감소하여, LED 조사가 세포자멸사를 억제하는 효과가 있다는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 윤활막에 침윤된 염증세포의 경우에는 관절연골의 결과와 반대로 MIA군에 비해 MIA-LED군과 MIA-IMT에서는 오히려 자멸세

포 수도 증가하였는데, 이는 LED 조사나 IMT가 염증세포들에 대해서는 세포자멸사를 촉진하여 염증세포의 수를 감소시킨 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

V. 결론

뼈관절염에 대한 LED의 치료효과를 조직병리학적으로 평가하기 위한 본 연구에서 MIA로 유발한 흰쥐의 무릎 뼈관절염에 출력밀도 2.5 mW/cm², 에너지밀도 11.47 J/cm²로 840 nm의 LED를 조사한 결과 기존의 비스테로이드 소염제에 비해 그 효과는 덜하지만 연골세포 보호효과, 뼈파괴세포 감소 효과, 반달연골 내 섬유모세포 활성 효과, 염증억제 효과 및 세포자멸사 억제 효과가 있음을 확인하였으며 비침습적이고 부작용이 적고 비용이 저렴한 LED조사가 뼈관절염 치료에 활용 가능성이 있는 광선치료방법으로 사료된다. LED의 치료효과가 어떤 기전을 통해 이루어지는가에 대해서는 앞으로 분자생물학적 기법 등을 통해 좀 더 면밀하게 규명되어야 하고, 동일한 에너지밀도라도 출력밀도와 조사시간에 따라 세포활성이 다르기 때문에 추후 파장, 출력밀도, 조사시간 등 최적 치료 변수에 대한 연구가 필요하고 임상 적용에 앞서 뼈관절염 환자를 대상으로 한 잘 설계된 임상시험이 요구된다.

Acknowledgements

This work was supported partly by the Academic Research Fund of Wonkwang Health Science University (2013).

References

Alves AC, Vieira RD, Leal-Junior EC, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in

acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R116.

Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008;27(4):227-38.

Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(10):1190-8.

Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41(2):284-9.

Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med.* 2006;23(8):795-808.

Crema MD, Guermazi A, Li L, et al. The association of prevalent medial meniscal pathology with cartilage loss in the medial tibiofemoral compartment over a 2-year period. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(3):336-43.

da Rosa AS, dos Santos AF, da Silva MM, et al. Effects of low-level laser therapy at wavelengths of 660 and 808 nm in experimental model of osteoarthritis. *Photochem Photobiol.* 2012;88(1):161-6.

de Moraes NC, Barbosa AM, Vale ML, et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):227-32.

Dunham J, Hoedt-Schmidt S, Kalbhen, DA. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Pathol.* 1993; 74(3):283-9.

Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, et al. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1670-9.

Jamtvedt G, Dahm KT, Christie A, et al. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the

- knee: an overview of systematic reviews. *Phys Ther.* 2008;88(1):123-36.
- Jekal SJ, Kwon PS, Kim JK. Effect of 630 nm light emitting diode(LED) irradiation on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Exp Biomed Sci.* 2010;16(4):365-76.
- Lahm A, Mrosek E, Spank H, et al. Changes in content and synthesis of collagen types and proteoglycans in osteoarthritis of the knee joint and comparison of quantitative analysis with Photoshop-based image analysis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010;130(4):557-64.
- Lee SY, Park KH, Choi JW, et al. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings. *J Photochem Photobiol B.* 2007;88(1):51-67.
- Leon AL, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(8):737-43.
- Lim W, Lee S, Kim I, et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med.* 2007;39(7):614-21.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage fromosteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53(3):523-37.
- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(2):351-84.
- Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phsohatase activity in decalcified bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50(3):333-40.
- Oshima Y, Coutts RD, Badlani NM, et al. Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(3):224-9.
- Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):71-8.
- Passmore P, Cunningham E. Managing osteoarthritis pain in the older population. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2013;27(3):292-5.
- Puhl W, Bernau A, Greiling H, et al. Intraarticular sodium hyaluronate in osteoarthritis of the knee: a multicenter, double-blind study. *Osteoarth Cartilage.* 1993;1(4):233-41.
- Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, et al. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1996;97(9):2011-9.
- Saarakkala S, Julkunen P, Kiviranta P, et al. Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(1):73-81.
- Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, et al. Near infrared optical properties of ex-vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys Med Biol* 43:2465-2478, 1998.
- Stemberger R, Kersch-Schindl K. Osteoarthritis: physical medicine and rehabilitation-nonpharmacological management. *Wien Med Wochenschr.* 2013;163(9-10): 228-35.
- Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, et al. Histological Examination of Collagen and Proteoglycan Changes in Osteoarthritic Menisci. *Open Rheumatol J.* 2012;6:24-32.
- Whelan HT, Smits Jr RL, Buchman EV, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2001;19(6):305-14.
- Xavier M, David DR, de Souza RA, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6):553-8.