

초음파가 흰쥐 아킬레스건 손상부위의 TGF- β 발현에 미치는 영향

대구대학교 재활과학대학원 물리치료전공
윤수진

The Effect of Ultrasound on TGF- β Expression
in the Injured Achilles Tendons of Rats

Yoon, Soo-Jin

Major in Physical Therapy, Graduate School of Rehabilitation Science,
Daegu University

Supervised by prof. Kim, Jin-Sang

<Abstract>

This study was performed to investigate the effect of ultrasound irradiation on TGF- β_1 expression in the surgically injured achilles tendons of rats.

The results of this study were as following:

1. The control group(3 days after injury) expressed little

immunoreactivity for TGF- β_1 .

2. In the experimental groups, TGF- β_1 immunoreactivity of group II(applied US for 3 days) was increased markedly than that of group I(applied US for 1 day).

3. The experimental group II(applied US for 3 days) expressed higher immunoreactivity for TGF- β_1 than control group.

These findings suggest that ultrasound irradiation on the injured Achilles tendon may be of benefit such as increasing TGF- β_1 release in the inflammatory phase of healing process.

I. 서 론

초음파는 조직 치유를 가속화시키는 효과가 있어 건이나 인대 같은 연부 조직을 치료하는데 널리 사용되어 왔으며(Ramirez, 1997) 정상 생리 반응을 유도하여 염증, 수복반응이 일어나고 급성 및 만성 창상의 상처치유를 증진시킨다고 하였다(이재형, 1995). 초음파의 효과는 열 효과와 비 온열 효과로 구분할 수 있고, 비 온열효과는 조직에 기계적 자극을 주어 막 투과성을 변화시키게 되며, 이러한 변화가 단백질 합성, 성장인자 생산, 칼슘 농도, 섬유모세포의 운동을 증가시켜서 조직 치유를 촉진한다고 하였다(Baker 등, 2001). 연부 조직 치유에 대한 동물 실험 연구들은 초음파 조사가 섬유모세포 증식, 콜라겐 합성 및 기능 회복에 효과적이었다고 보고 하였는데(Frieder 등, 1988; Enwemeka 등, 1990; Jackson 등, 1991; Bly 등, 1992; Gum 등, 1997), 다른 연부 조직과 달리 건은 혈액 공급 및 신경 지배가 잘 되지 않기 때문에 손상이 생기면 치유 반응이 강하지 못하고, 장기간의 재활 과정이 필요하다고 하였다(Best 등, 1993; Maffulli, 1999).

건은 나선구조로 단단하게 결합된 콜라겐 섬유다발과 건에 분화된 섬유

모세포(tenocyte)로 이루어져서(Cula 등, 1999) 신장부하에 저항하고 근육에서 뼈로 힘을 전달하는 역할을 한다. 정상 조직에서는 세포표면의 유착 분자가 근수축 등의 기계적 스트레스 변화를 감지하여(Ingber 등, 1994) 적절한 세포 반응을 유도하는 신호를 보내게 되고(Shyy 등, 1997; Galbraith 등, 1998), 섬유모세포는 전달된 신호에 따라 콜라겐 합성을 조절한다고 한다(Chiquet, 1999). 조직이 손상을 입게되면 섬유모세포가 활성화되어 많은 양의 세포외기질 성분을 합성하고(Hayem, 2001) 기질 성분의 전환(turnover)을 보조하게 되는데, 이 과정동안 세포활성물질(cytokines)과 성장인자들의 영향을 받는다고 한다(Moller 등, 2000).

일반적으로 건 치유는 염증기, 증식기, 성숙기의 패턴을 따르며(Komarcevic, 2000) 손상 후 혈관 투과성 증가와 함께 혈소판 세포활성물질들의 유리가 증가하고 염증세포들이 활성화되면서 면역 작용이 진행된다(Chang 등, 2000). 염증기는 손상된 조직을 제거하여 면역학적인 방어체계를 회복하게 하고(유원민 등, 1998) 치유과정에 중요한 역할을 하는 성장인자들을 많이 만들어내는 단계인데(Patrano 등, 2001), 염증세포에서 분비된 성장인자들이 섬유모세포를 상처로 끌어들이면서 증식기가 시작된다고 한다(Greenhalgh, 1998). 성장인자들은 단백질 발현과 효소 작용에 관여하고 혈관 재생과 세포 증식을 자극하여 상처를 치유시키는 잠재력을 갖고 있다. 조직손상과 동시에 염증 세포와 손상 세포로부터 분비되는 TGF- β (Transforming Growth Factor-beta; 형질변환성장인자)는 상처 치유를 조정하는 중요 인자 중 하나로써 염증이거나 손상 부위에 단핵구를 동원하여 식작용을 증진시키고 대식세포의 활성화를 유도하는 한편 염증 해소 중재물질로서의 역할을 한다고 한다(Ascroft, 1999).

TGF- β 는 64-82% 아미노산 상동 배열을 공유하는 분자량 25 kDa의 동일 이합체로 구성된 폴리펩티드로 인체에는 3가지 아형(TGF- β_1 , β_2 , β_3)이 있으며 세포의 증식, 분화와 사멸을 조절한다(Moustakas 등, 2002). TGF- β 은 면역 세포들에 의해 생성되어 자가분비(autocrine), 부가 분비

(paracrine) 방식으로 작용하게 되며(Martin 등, 2000), 세포막에 있는 type I, II 수용체와 결합하고 serine/threonine kinases를 활성화시켜서 신호 전달을 한다. 또한 단핵구와 대식세포에 화학주성(chemotaxis)으로 작용하면서 면역 세포 증식을 조절하는데(Osada 등, 1995) 대식세포는 염증, 면역 반응에 관한 정상적이거나 병리적 과정에서 중요한 역할을 맡고 있으며 생물학적으로 세포활성 물질들을 많이 분비할 수 있다. TGF- β 는 염증부동원된 염증세포의 식작용을 증진시키고 활성화된 대식세포 기능을 억제하여 염증 반응을 억제할 수 있기 하는 것 외에도 섬유모세포의 콜라겐 합성을 자극한다(Qi 등, 1999).

조직이 손상되면 치유 과정 대부분은 TGF- β 분비가 높아지는 것과 관련되어 시작하게 되는데, 기계적 스트레스가 TGF- β 생성을 증가시킨다고 하였다(Branton 등, 1999). 스트레스가 섬유모세포에 적용되는 경우, 섬유모세포가 수용체와 작용해서 TGF- β 를 분비하는 동시에 콜라겐 분해 효소를 억제하여 전체적으로 콜라겐 생성이 증가한다고 하였고(Eckes 등, 2000) 염증기동안 대식세포에 영향을 주어 세포활성 물질 분비를 자극할 수 있다고 하였다(Maxwell, 1992). 물리치료에서 초음파는 기계적 스트레스를 조직에 줄 수 있기 때문에 성장인자 분비를 자극하는 유인물 역할을 하고(Skutek 등, 2001), 초음파가 막 투과성을 변화시키고 칼슘이온 농도를 증가시켜서 성장인자 합성이 증가한다고 한다(성진형 등, 1999). 세포 기능이나 단백질 합성 등에 영향을 주는 초음파의 기전은 명확하지 않지만 복잡한 세포 내 신호 전달 분자 및 경로 활성이 빠르게 일어나게 한다고 하였다(Ito 등, 2000). 상처치유가 순차적으로 일어나는 일련의 사건들이고, 장기간의 재활과정이 필요한 건 치유에서 치유과정이 빠르게 진행된다면 건 재활과 회복을 지연시키는 합병증들을 최소화 할 수 있을 것이다.

이에 본 연구는 염증 부위에 많이 나타나는 TGF- β_1 가 순환하는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되고, 초음파가 이들 염증세포들의 성장인자 분비에 영향을 주어 염증 반응이 감소되고 콜라겐 생성이 자극되면서 건 치

유가 촉진된다고 가정하고, 흰쥐 아킬레스건을 손상시킨 후 염증기동안 초음파를 조사하여 TGF- β_1 발현에 미치는 영향을 면역조직화학적으로 알아보고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

실험동물은 생후 8-10주 체중 200-250g의 건강하고 성숙된 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 15마리를 대상으로 하였다. 실험군은 초음파 치료 1일(n=6), 3일(n=6)로 나누어 시행하였으며, 대조군(손상후 3일, n=3)은 초음파 치료를 하지 않았다. 실험기간 중 물과 먹이는 제한 없이 공급하였고 사육실의 온도는 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $63\pm 5\%$ 로 유지하였으며 일정한 조도와 광주기 및 암주기를 12시간으로 조절하였다.

2. 실험방법

1) 실험전 처치

염산케타민(Ketamine HCl, 유한양행)과 럼푼(Rumpun, 바이엘코리아)을 1:1의 비율로 섞어 제조한 전신 마취제를 복강주사(0.4ml)하여 흰쥐를 마취한 후 Frieder 등의 천공법(puncture technique)을 수정하여 아킬레스건을 손상시켰다. 우측 하퇴부 후측을 삭모하여 종골 부착부로부터 상방 0.5-1.5 cm 지점에서 18 gauge 바늘을 사용하여 3-4회에 걸쳐 수직으로 관통한 후 소독하였다.

2) 초음파 적용

손상 후 1일부터 초음파(Sonotens 501, DAEYANG MEDICAL CO. LTD) 치료를 시작하였다. 치료 전 체중을 재고 특수하게 제작된 원뿔형 통에 넣어 우측 하지만을 밖으로 나오도록 한 후 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도의 물에 침수시켰으며, 초음파 head는 하지로부터 1.0 cm 거리를 두었고 1 MHz 단속 파장, 0.5 W/cm^2 강도로 매일 5분씩 조사하였다.

3) 조직절편 제작

실험군의 조직은 초음파 조사 후 심장관류(0.9% NaCl)와 전고정(8% paraformaldehyde, pH 7.4)을 실시하여 우측 아킬레스건을 절취하였고 면역조직화학검사를 위하여 두 시간 동안 후고정(8% paraformaldehyde)하였다. 조직절편은 탈수, 청명, 파라핀 포매의 일반적 제작 과정에 따라 실시하였고 미세절단기(microtome, BRIGHT 5040)를 사용하여 10 μ m 두께로 잘라 슬라이드를 제작하였으며 40 $^{\circ}$ C의 건조기(C-SLS, Chang Shin Scientific Co., Korea)에서 하루 동안 건조시킨 후 헤마톡시린-에오진 염색과 면역조직화학염색을 시행하였다.

4) 헤마톡시린-에오진(Hematoxylin & Eosin) 염색

일반적인 조직형태를 관찰하기 위해 헤마톡시린-에오진 염색을 실시하였다. 탈파라핀(deparaffin)과 함수(hydration) 과정 시행 후 흐르는 물에서 5분간 수세(washing)하였다. 수세 후 헤마톡시린에 5분간 침수시키고 흐르는 물에 1분간 수세하였으며, 1% HCL-Alcohol 용액에 담겼다 빼기(dip)를 4회 반복한 후 흐르는 물에 1분간 수세하였다. 암모니아 용액에 4회 담겼다 빼기를 반복 후 흐르는 물에 5분간 수세하였으며, 에오진에 2분간 침수 후 탈수와 청명의 과정을 거쳐 봉입(mounting)을 실시하였다.

5) 면역조직화학염색

각 군의 아킬레스건에서 TGF- β_1 의 면역반응성을 보기 위하여 파라핀에 포매된 조직편에서 10 μ m 두께의 절편을 만들어 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 3% 과산화수소수에 10분간 처리해 내인성 과산화 효소(endogenous peroxiases) 활성을 억제시킨 후 0.01M PB(phosphate buffer)로 10분간 3회 수세하였다. 일차 및 이차 항체에 의한 비특이적 결합을 억제하기

위해 protein blocking agent에 20분간 작용시킨 후 여분의 용액을 제거한 후 1:50으로 희석한 일차 항체(다크론성 TGF- β_1 , Santa Cruz Biochemistry Co.)를 실온에서 24시간 반응시킨 후 0.01M PB에 10분 3회 수세하였다. 다시 biotin 결합 이차 항체(anti-rabbit Ig antibody)를 90분간 반응시킨 다음 0.01M PB로 10분간 3회에 걸쳐 수세하였고 ABC(avidine-biotin peroxidase complex, Vector USA)를 실온에서 60분간 반응시켰다. 0.01M PB로 다시 10분 3회 수세를 하고 여과된 DAB 용액에 10분간 작용시켜 Wasserstoffperoxid 30% H₂O₂(Perhydrol)를 0.03%로 처리하였다. 0.01M PB와 3차 정류수에 각각 3회 10분간 수세하고, cresyl violet acetate 용액으로 대조염색을 한 후 탈수하여 봉입하였다.

6) 결과처리

견 조직에서 TGF- β_1 의 발현이 분명하게 연갈색의 색소 침착이 나타나면 양성(+), 염색반응을 보이지 않는 경우에는 음성(-)로 구분하였으며, 양성인 경우는 염색 강도에 따라 높음은 +++, 보통은 ++, 적음은 +으로 구분하여 평가하였다.

III. 결 과

1. 광학현미경적 소견

헤마톡시린-에오진 염색을 시행하였고 손상 부위에서 많은 염증 세포가 관찰되었다. 건 섬유들이 단절된 부위에서 많은 염증 세포들이 침윤되어 있는 소견을 보였고 손상 후 1일에는 섬유모세포 수의 변화가 미미한 정도로 관찰되었다. 손상 3일 후에는 대조군에 비해 초음파를 적용한 실험군에서 염증세포가 다소 감소되었고, 실험군과 대조군에서 정상조직에 비해 섬유모세포의 수가 증가되어 있었다(Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

2. 면역조직화학적 소견

대조군과 각 실험군에서 TGF- β_1 에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 시간적 변화 양상을 관찰하였다.

1) 손상 후 대조군에서 TGF- β_1 의 발현

초음파를 적용하지 않은 손상 후 3일이 되는 대조군은 아킬레스건 손상 부위에서 TGF- β_1 가 미약하게 발현되었다(Fig. 7, 8).

2) 손상 후 실험군에서 TGF- β_1 의 발현

초음파 조사 1일군에서 TGF- β_1 항체에 대한 면역반응성이 경미하게 관찰되기는 하였으나 일부 조직에서는 면역반응이 나타나지 않았다. 이에 비해 초음파 조사 3일 군에서는 손상부위 및 주변에 걸쳐 TGF- β_1 이 더욱 현저하게 발현되었고 초음파 치료기간에 따라 1일군과 3일군간 뚜렷한

차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 3, 4, 5, 6).

3) 손상 3일 후 TGF- β_1 발현 비교

초음파 치료 여부와 관계없이 실험군과 대조군에서 TGF- β_1 에 대한 면역반응성이 관찰되었다. 초음파 조사 3일군에서 TGF- β_1 가 보다 강하게 관찰되었고 이에 비해 손상 후 3일째의 대조군에서는 적은 면역반응이 관찰되었으며, 여러 군들을 비교해 보았을 때 초음파 조사 3일군에서 가장 강한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 5, 6, 7, 8).

<Table 1> Changes of TGF- β_1 expression after injury

	Control	Group I	Group II
TGF- β_1	+	\pm	++

(++: strong, +: moderate, \pm : weak)

Control : no ultrasound irradiation group

Group I : 1 day ultrasound irradiation group

Group II : 3 days ultrasound irradiation group

IV. 고 찰

아킬레스건 손상은 달리기 선수가 겪는 흔한 부상중 하나이고 많은 경우 스포츠 활동 중에 발생하며(Fahlstrom 등, 1998) 최근 들어 스포츠 인구가 증가하면서 발병률이 높아지고 있다(Maffulli, 1999). 건 파열은 반복된 미세 손상 및 노화 등이 원인이 되어 주로 종골 종지부 2-6 cm 상방의 저혈 지역에서 일어나게 되며 치료법으로 수술법과 고정법이 있는데 각각 높은 합병증과 장기간의 고정 및 재 파열이 단점이라 하겠다. 물리치료에서는 초음파, 전기치료, 레이저가 이용되고 있으며 그 중에서 초음파는 조작이 간편하고 안전하여 손상 후 증상 완화 및 건, 인대 같은 연부 조직을 치료 하기 위해 널리 사용되고 있다.

초음파의 효과는 일반적으로 열 효과와 비 온열 효과로 구분하는데 열 효과는 초음파가 다른 에너지로 전환되면서 발생하는 열에 의해 조직 내 온도상승이 일어나게 되어 조직 신장성, 대사활동 및 혈류를 증가시키고 동통을 억제한다고 한다. 비 온열효과는 가스 공동화(cavitation)와 기계적 효과로 나눌 수 있으며, 공동화는 초음파 진동으로 인해 조직 내 미세한 가스 기포가 형성되는 것이고, 기계적 효과는 초음파가 조직으로 전달되면서 분자들이 움직이게 되어 발생한다고 한다(Baker 등, 2001). 공동형성, 혈소판 응집 촉진, 막 투과성 변화, 매질 운동 및 정상파 등 비 온열 효과로 밝혀진 반응 외에는 거의 온도 상승에 의한 효과이며, 비 온열 효과라고 하는 것들도 온도 상승에 의한 효과와 일부분 중복되기도 한다.

조직에 흡수된 초음파는 조직 내 미세 진동을 일으킴으로써 생리학적 효과가 나타나고, 조직 온도 상승을 감소시키기 위해 연속파보다 단속파를 사용하게 되는데, Holmes 등은 단속 초음파가 동통과 부종 같은 염증 증상을 감소시키고 연부 조직, 만성 부종 등의 치유률을 높이기 위해서 전형적으로 사용되는 치료법이라고 하였다(Craig 등, 1997). 1968년 Dyson 등이 조직 재생에 대한 초음파 효과에 관하여 일련의 연구를 시작한 이후,

여러 동물 실험 연구들이 시행되었고 연부 조직 치유에서 초음파가 효과적이라고 보고하였다.

Frieder 등(1988)과 Jackson(1991)은 초음파 치료 후 아킬레스건 파열 장력과 콜라겐 생성이 증가했다고 하였다. Frieder 등은 흰쥐 아킬레스건을 손상시킨 후 2-3주간 1주일에 3회, 3분간 연속 초음파 조사를 실시하여 치료받은 건의 파열장력이 증가하고 치유 부위에 매우 밀집한 콜라겐 원섬유가 나타났다고 하였으며, Jackson은 1.5 W/cm² 강도로 4분간 치료하여 콜라겐 합성과 파열강도가 높아졌다고 하였다. Enwemeka(1989)는 가토 아킬레스건을 완전 손상시켜 1.0 W/cm² 강도로 9일간 초음파 치료를 실시하여서 장력 증가가 있었다고 하였고, Byl 등(1992)은 Yucatan pig의 절개창상에 초음파 치료가 창상조직의 장력을 24%, 콜라겐 침착을 29% 증가시켰다고 했으며, Gum 등(1997)은 초음파, 전기 및 레이저 치료를 손상 1일 후부터 14일간 시행하여 손상부위의 콜라겐 양이 23% 증가하였다고 보고하였다.

세포외기질은 많은 단백질로 구성되어 치유과정의 각 단계에 따라 발현되는 수준이 달라지게 되고, 효과세포로써 콜라겐을 생성하는 섬유모세포는 조직 생성과 분해사이의 균형을 유지하기 위하여 외적 인자들의 영향을 받게 되며, 기계적 힘이 섬유모세포의 여러 세포외기질 단백질 합성을 조절할 수 있다고 하였다(Chiquet, 1999). 섬유모세포에 스트레스가 적용되면 수용체와 작용하여 TGF- β 분비가 되면서 콜라겐 분해 효소가 억제되어 콜라겐 생성이 증가하게 된다(Eckes 등, 2000). 초음파의 비온열 효과는 조직에 기계적 스트레스를 줄 수 있고 많은 연구들에서 초음파 조사가 섬유모세포의 증식과 콜라겐 성숙이 증진되었다고 보고하였다.

Ramirez(1997)는 쥐 아킬레스건 섬유모세포에 0.4 W/cm², 1 MHz를 조사했을 경우, 세포증식 및 분열이 증가하는 것을 보고하였고 Dyson과 Pond는 손상된 가토 귀를 초음파로 조사하였더니 섬유모세포의 형태학적 변화가 있었으며 초음파 치료가 콜라겐을 합성하는 섬유모세포의 분자 과정을

자극했다고 하였다. Harvey는 배양된 인간 피부와 근섬유모세포에 3 MHz, 0.5-2.0 W/cm²로 초음파 치료후 단백질 합성이 증가했으며 Webster 등은 인간 배아 섬유모세포에서 콜라겐과 일반 단백질 합성이 증가했다고 하였고(Ramirez 등, 1997) Harle 등은 초음파를 인간 골모세포양 세포와 periodontal ligament(PDL) 세포에 3.0 MHz, 140-990 mW/cm², 5분간 조사하여 fibronectin과 골 단백질 발현이 있었다고 보고하였다. 또한 Doan 등은 초음파 적용으로 섬유모세포와 골모세포에서 35%-52% 세포 증식이 있었다고 하였고(Doan 등, 1999) Ito 등(2000)은 1.5 MHz, 30 mW/cm², 4일간 20분씩 초음파를 조사하여 인간 골모세포와 내피세포에서의 성장인자 발현을 증가시켜 골절 치유가 빨라졌다고 보고하였다.

연부 조직이 손상되면 합성과 분해가 견고한 균형을 유지하면서 세포의 기질 분자들이 빠르게 합성되어야 하고 이런 균형을 조절하는 방법 중 하나가 염증세포나 결합조직 세포에서 생성되어 콜라겐 생성에 영향을 주는 TGF- β , PDGF 등과 같은 성장인자들의 분비이다. 성장인자들은 치유를 위해서 혈소판, 염증세포, 섬유모세포 등 여러 세포들에 의해 합성되고 분비되며, 많은 신호들이 조직치유를 시작하고 조절하도록 보내지는데 혈소판에서 배출되는 성장인자들이 상처에 세포들을 끌어 모으고 손상부위의 동원된 대식세포는 조직치유를 조절하고 괴사조직을 식작용한다. 염증세포가 배출하는 성장인자 및 세포활성물질들은 섬유모세포를 상처로 이동하게 하여 증식기를 시작하도록 하며 3-5일 경에 섬유모세포가 빠르게 유입되어 콜라겐과 glycosaminoglycan의 첫 침착이 일어난다. Chang 등(2000)은 대식세포를 혈관재생과 콜라겐 합성의 강한 자극 인자라고 하였고, 대식세포는 혈액을 따라서 순환하다가 화학주성의 신호에 의하여 탐식구가 되고 이러한 과정 중에서 섬유모세포 및 다른 염증세포를 동원하고 섬유모세포 증식을 자극하는 세포활성물질을 생성하며 TGF- β 발현이 높아지는 것과 관련되어 치유과정이 시작된다. TGF- β 는 주로 혈소판과 면역세포에서 비 활성 형태로 분비되며, 활성화가 이루어진 후 type I, II

serine/threonine kinase receptors로 구성된 transmembrane 수용체 복합체와 결합하고, 수용체는 Smads, MAPK 등의 신호전달경로를 활성화시켜 (Ottaviani 등, 2001) 복합적으로 연결되어진 신호 전달망 체계가 총체적으로 작용함으로써 TGF- β 가 세포작용을 조절하게 된다(Yue 등, 2001).

인체에서 TGF- β 는 $\beta_1, 2, 3$ 의 3 가지 아형이 발견되었고 각 subunit가 112 아미노산으로 구성된 25 kDa 동질 이합체이며 생물학적으로 비슷하게 작용한다. TGF- β 는 초기 배아 발달, 세포 성장, 분화, 세포 이동, 그리고 세포사의 거의 모든 세포 과정에서 필수적인 역할을 하며 손상 후 상처치유 및 세포외기질 구조와 기능, 세포 이동과 유착 조절 등에 관여한다 (Patruno 등, 2001). TGF- β 의 경우는 많은 세포에서 작용을 나타내는데 세포의 종류에 따라 증식을 자극하거나 억제하기도 하지만 대부분의 세포에서 증식을 자극하고, 또한 다른 성장인자의 분비를 조절할 뿐만 아니라 (Martin 등, 2000) 세포외기질 생성과 세포-기질 상호작용을 조절하여 콜라겐 합성을 증가(Watanabe 등, 2000)시키고 분해효소 억제물질 발현을 증가시킨다. Chang 등(2000)은 TGF- β 가 I, III 형 콜라겐 mRNA의 섬유모세포 발현을 증가시켜 콜라겐 생성을 자극하고 콜라겐 다발의 성숙 증가를 선택적으로 유도하여 과립 조직 형성을 증가한다고 하였다.

Mackiewicz 등(1990)은 TGF- β 가 세포외기질 성분과 여러 가지 호르몬의 합성을 조절하며 인간 간암세포에서 혈장단백질 유전자 발현을 조절한다고 하였고, Tateshita 등(2001)은 지연된 상처 치유에서 TGF- β_1 이 콜라겐 겔 수축을 증가시켰다고 보고하였으며 Ottaviani 등(2000)은 절개 상처에 TGF- β_1 과 PDGF-AB를 외재적으로 관리하여 치유가 촉진되었다고 했다. Pierce 등(1992)은 TGF- β 가 섬유모세포를 활성화시켜 상처 치유의 증식기로 바로 들어가게 하였다고 보고하였고, 다른 종류의 성장인자들의 합성을 자극하며 종국에는 콜라겐 합성을 자극하여 축적을 일으키고 콜라겐 변성을 억제한다고 하였다(김한구 등, 1997).

조직 치유 과정 중 염증기는 TGF- β 가 과립조직 형성을 시작하기 위해

대식세포와 혈소판으로부터 유리되는 단계이므로 중요하게 인식되고 있다 (Abe 등, 2000). 혈소판의 탈 과립화에 의해 분비된 TGF- β 가 염증세포의 화학주성작용(chemotaxis)을 일으키고 이로 인해 활성화된 대식세포는 TGF- β 같은 세포활성물질을 분비하여 손상 세포들을 자극한다. 동시에 TGF- β 는 자신의 증식을 조절하는 자가분비 기능(autocrine action)과 인접세포에 작용하는 부가적 분비 기능(paracrine action)을 조절하면서 치유 과정을 시작한다. TGF- β_1 는 염증이나 손상 부위에 우세하게 존재하는 아형이고 순환하는 단핵세포와 조직 대식세포가 주로 분비하기 때문에 염증 반응에 대한 다수 연구들이 TGF- β_1 에 집중되어 있다고 하였다 (Ascroft, 1999). 물리치료에서는 염증과 부종을 감소시키기 위해 초음파를 널리 적용하고 있는데, 초음파의 비 온열 효과가 세포막 투과성을 변화시키고 칼슘 이온의 유입이 증가시켜서 대식세포의 기능과 분비하는 물질에 영향을 줄 수 있다고 하였다.

Young과 Dyson(1990)은 대식세포양 세포에 5일간 0.5 W/cm², 0.75 MHz 또는 3.0 MHz, 5분씩 초음파 조사가 막 투과성 변화를 일으킴으로써 세포 분열성 물질 유리를 자극하여 섬유모세포 분열인자를 합성하고 분비하는 능력을 자극한다고 하였고 De Dyene 등(1995)은 배양된 인간 섬유모세포의 만성 염증에서 초음파가 식작용을 촉진했다고 하였다. Dinno 등은 초음파 조사가 세포 형질막의 통합과 수송에 강한 영향을 준다고 하였고 (Harle 등, 2001) Mortimer 등은 배양된 섬유모세포에 0.5-1.0 W/cm² 강도로 5분간 초음파를 적용하였더니 단백질 합성 등의 수많은 세포 과정을 조절하는 세포내 칼슘 증대에 영향을 준다고 하였다(Enwemeka, 1990). 이러한 세포내의 변화는 초음파가 인접한 세포의 막 투과성에 영향을 주어 칼슘 이온이 세포 내로 유입되면서 세포 내 칼슘 농도가 증가하여 세포의 이동이나 성장인자 합성이 증가하기 때문이다(성진형 등, 1999). 치료적 초음파로 유도된 칼슘이온에 대한 막투과성 변화는 세포의 효소적 활동을 조절하고 특정 단백질의 합성과 분비 증가를 자극하는 화학적 신호로써 작

용한다. Maxwell(1992)은 초음파가 콜라겐 합성과 성숙에 필요한 lactate, 산소 수준에 영향을 줌으로써 섬유모세포의 단백질 합성을 자극한다고 보고하였고 Murrell 등도 산소 유리기가 섬유모세포 증식을 자극한다고 하였다(Maxwell, 1992). 초음파가 세포 기능이나 단백질 합성에 영향을 주는 기전은 명확하지 않지만 신장, 압력, 장력, 전단력 등의 기계적 스트레스가 칼슘 이온 채널 개방 등 복잡한 세포 내 신호전달 분자 및 경로 활성이 빠르게 일어나게 하여 TGF- β 같은 조직구조와 기능을 조절하는 성장인자 발현 및 단백질 합성에 변화를 준다고 하기 때문에(Ito 등, 2000) 조직에 기계적 에너지를 전달할 수 있는 초음파가 성장인자 분비를 자극하는 유인물로 작용한다고 하였다(Skutek 등, 2001).

본 연구에서는 아킬레스건을 부분 손상시켜 염증기 동안 초음파를 조사하여 손상 유발 후 1일에서 3일까지의 조직학적 변화를 관찰하였다. 초음파 조사 1일에서는 염증세포가 침윤되기 시작하였고 초음파 조사 3일에서는 대조군에 비해 섬유모세포의 수가 증가하였으며 육안적으로도 염증이 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 손상부위에서의 TGF- β_1 은 초음파 조사 3일군에서 발현이 강하였으나 초음파 조사 1일군에서는 경미하게 관찰되었고 일부 조직에서는 나타나지 않았다. Frank 등(1996)은 TGF- β_1 mRNA이 손상후 24시간 내에 증가하여 며칠동안 높은 수준을 유지한다고 하였는데, 초음파 조사 1일군에서의 TGF- β 발현이 미미하게 나타난 것은 아킬레스건 조직의 혈액공급이 좋지 못하기 때문이라고 생각된다. Grainger 등은(2000) TGF- β 가 말초혈액의 혈소판에서 주로 합성되어 저장되었다가 손상 후 방출된다고 하였고, Fenwick 등(2001)은 손상된 건 조직의 혈관 부위에서 TGF- β_1 발현이 관찰되었지만 기질에서는 염색반응을 나타내지 않았다고 보고하였다. 김창열 등(1997)은 신경 손상으로 혈액순환이 원활하지 못해 손상 원위부에서 TGF- β_1 의 발현 증가가 나타나지 않았다고 했으며, Kang 등(1990)은 부분적으로 손상된 건을 치유하는데 혈관분포 패턴이 증가하여 수술 없이도 완전 치유되었다고 하였다. 이와 같

은 연구들은 손상 초기에 TGF- β_1 이 경미하게 관찰되었다는 본 실험 결과와도 부합한다고 사료된다.

TGF- β 는 혈관손상 후 발현과 신호 전달이 증가하여 여러 형태의 염증 세포들로부터 분비되는데, 초음파 조사 3일의 실험군에서 초음파를 조사하지 않은 손상 후 3일의 대조군에 비해 TGF- β_1 의 발현이 강하게 관찰되었다. 손상된 조직에서 TGF- β 를 활성화시키는 자극은 플라즈민(섬유소 용해효소), 트롬보스폰딘, 산소, 칼슘 등 여러 가지가 있으며(Branton 등, 1999) Sakai 등은 fluid shear stress가 배양된 골모세포의 TGF- β 생성을 증가시킨다고 하였다(Branton 과 Kopp, 1999). 초음파는 미세한 직경의 기포가 주기적으로 진동하는 안정된 공동화를 만들어내며, 이런 microstreaming이 세포 투과성 변화의 원인으로 작용하여 세포 내 칼슘이온 농도 변화를 유도하고, Maxwell(1992)은 막 투과성 변화에 대해 칼슘이온의 흐름이 세포의 효소적 활동을 조절하고 특정 단백질의 합성과 분비 증가를 자극하는 화학적 신호(이차 메신저)로써 작용한다고 하였다. 초음파를 조사한 실험군에서 TGF- β_1 발현이 대조군에 비해 높게 관찰된 것은 초음파의 기계적 스트레스가 염증기 동안 대식세포의 성장인자 유리에 영향을 주어서 TGF- β_1 발현 변화가 유도되었기 때문으로 사료된다.

황지혜 등(2000)은 염증기 동안 손상된 흰쥐 아킬레스건에 저강도 단속 초음파 치료를 시행하여 조직학적 위해 소견 없이 치유 초기 콜라겐 생성이 증진되었다고 하였다. 본 연구에서도 염증기 초기부터 치료를 시작하였기 때문에 저강도 단속 파장(1 MHz, 0.5 W/cm²)으로 손상 후 1일부터 초음파를 조사하였고 초음파를 조사하지 않은 대조군에 비해 흰쥐 아킬레스건 손상조직의 TGF- β_1 발현이 높게 관찰되었다. TGF- β 의 증가가 세포의 활발한 재생을 의미한다는 점에서 손상 후 염증기 동안 적용한 초음파가 건 치유를 촉진시켰고 염증세포로부터 TGF- β 같은 성장인자 유리에 영향을 줄 수 있다고 생각된다.

이러한 실험 결과는 염증기 동안 부종 감소와 염증 진정을 위해 사용되

는 초음파의 치료기전에 대한 설명을 제공한다고 생각된다. 임상적으로 초음파가 염증 억제와 상처치유를 위해 폭 넓게 이용되고 있는 것에 반하여 초음파 치료의 생리적 효과에 대한 연구는 많지 않다. 아킬레스건 치유는 장기간의 재활과정이 필요하고, 성장인자는 정상 조직 발달 및 상처 치유 과정을 조절할 수 있으므로 지연된 상처 치유를 촉진시키는 방법으로 외재적으로 성장인자들을 적용하려는 연구들이 활발하게 시행되고 있는 추세이다. 앞으로는 조직 손상 후 초음파가 치유과정을 촉진하는 세포학적 기전에 대한 더욱 깊이 있는 연구 뿐 아니라 이러한 결과를 임상에 적용할 수 있는 방향으로의 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

염증기 동안 초음파를 조사하여 염증 해소와 콜라겐 생성에 관여하는 TGF- β_1 발현 양상을 시간 경과에 따라 알아보기 위하여 Sprague-Dawley 계 흰쥐 15마리의 아킬레스건을 부분 손상시키고 손상 후 1일, 3일 동안 1 MHz, 단속 파장, 0.5 W/cm² 강도로 5분간 수중에서 초음파를 조사하였으며, H&E 염색과 TGF- β_1 를 이용한 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 건 손상 후 초음파를 적용하지 않은 대조군에서 TGF- β_1 의 발현은 손상부위에서 경미하게 관찰되었다.
- 2) 초음파 치료 3일군에서 TGF- β_1 이 강하게 발현되었으며 초음파 치료 1일군에서는 미약하게 관찰되었고 일부 조직에서는 발현되지 않았다.
- 3) 대조군에 비해 손상 후 3일간 초음파를 조사한 실험군에서 TGF- β_1 의 발현이 강하게 관찰되었다. 다른 실험군과 비교하여 손상부위 주변까지 강한 면역 반응이 관찰되었다.

이러한 연구 결과들을 통해 손상조직에서의 TGF- β_1 발현은 대조군에 비해 염증기 동안 초음파를 조사한 실험군에서 높게 관찰되었고 초음파가 대식세포 같은 염증세포의 성장인자 유리를 증가시켰다는 것을 확인하였다. 본 연구는 초음파의 염증기 동안 염증을 해소시키고 치유를 촉진시키는 치료 기전에 대한 설명을 제공한다고 사료된다.

<참고문헌>

- 김창열, 서경목. (1997). 좌골신경 손상 후 신경전도 시간의 변화와 TGF- β 발현에 관한 연구. 대한재활과학회지, 21(4), 731-739.
- 김한구, 백무현, 김승홍, 민대홍, 김미경. (1997). 태자, 신생 및 성숙 가토의 초기 창상에서 혈소판 유리 성장인자(PDGF) 및 형질 변환 성장인자 베타(TGF- β)의 발현 양상에 관한 연구. 대한성형외과학회지, 24(4), 637-650.
- 성진형, 류재덕, 김원유, 한창환, 신상영, 최은석, 김진영. (1999). 치료용 저 에너지 초음파가 배양중인 관절 연골세포에 미치는 영향. 대한정형외과학회지, 34(3), 617-624.
- 유원민, 박철, 나동균, 박병윤. (1998). TGF- β 1의 길항제인 Decorin이 백서의 창상치유에 미치는 영향. 대한성형외과학회, 25(2), 191-198.
- 이재형. (1995). 전기치료학. 서울: 대학서림.
- 황지혜, 강세윤, 김현숙, 신현보. (2000). 흰쥐 아킬레스힘줄 손상 후 단속적 초음파 치료의 치유 효과. 대한재활과학회지, 24(5), 824-835.
- Abe, Y., Inagaki, K., Fujiwara, A., & Kuriyama, K. (2000). Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor- β inducer, SEK-1005. European Journal of Pharmacology, 408, 213-218.
- Aschroft, G. S. (1999). Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . Microbes and Infection, 1, 1275-1282.
- Baker, K.G., Robertson, V.J., & Duck, F.A. (2001). A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. Physical Therapy, 81(7), 1351-1358.
- Best, T.M., Collins, A., Lilly, E.G., Seaber, A.V., Goldner, R., & Murrell, G.A.C. (1993). Achilles tendon healing: a correlation

- between functional and mechanical performance in the rat. *Journal of Orthopaedic Research*, 11, 897-906.
- Branton, M.H., & Kopp, J.B. (1999). TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1, 1349-1365.
- Byl, N.N., McKenzie, A.L., Wets, J., Whitney, J.D., Hunt, T.K., & Scheuenstuhl, H.A. (1992). Low-dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with Yucatan pigs. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 73, 656-664.
- Chang, L., Crowston, J.G., Cordeiro, M.F., Akbar, A.N., & Khaw, P.T. (2000). The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Survey of Ophthalmology*, 45, 49-68.
- Chiquet, M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology*, 18, 417-426.
- Craig, J.A., Bradley, J., Walsh, D.M., Baxter, G.D., & Allen, J.M. (1999). Delayed onset muscle soreness: lack of effect of therapeutic ultrasound in humans. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 80, 18-23.
- Cula, E.M., Clark, C.H., & Merrilees, M.J. (1999). Connective tissue: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Physical Therapy*, 79, 308-319.
- De Deyne, P.G. & Kirsch-Volders, M. (1995). In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Physical Therapy*, 75(7), 629-634.
- Doan, N., Reher, P., Meghji, S., & Harris, M. (1999). In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and

- monocytes. *Journal of Oral and maxillofacial Surgery*, 57(4), 409-419.
- Eckes, B., Zigrino, P., Kessler, D., Holtkotter, O., Shephard, P., Mauch, C., & Krieg, T. (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biology*, 19, 325-332.
- Enwemeka, C. S. (1989). The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 68(6), 283-287.
- Enwemeka, C.S., Rodriguez, O., & Mendosa, S. (1990). The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Medicine in Biology*, 16, 801-807.
- Fahlstrom, M., Bjornstig, U., & Lorentzon, R. (1998). Acute Achilles tendon rupture in badminton players. *American Journal of Sports Medicine*, 26, 467-470.
- Fenwick, S.A., Curry, V., Harrall, R.L., Hazleman, B.L., Hackney, R., & Riley, G.P. (2001). Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in chronic tendinosis. *Journal of Anatomy*, 199(Pt 3), 231-240.
- Frank, S., Madlener, M., & Werner, S. (1996). Transforming growth factors β 1, β 2, and β 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10188-10193.
- Frieder, S., Weisberg, J., Fleming, B., & Stanek, A. (1988). A pilot study: the therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of achilles tendons in male rats. *The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*, 10(2), 39-46.
- Galbraith, C.G. & Sheetz, M.P. (1998). Forces on adhesive contacts

- affect cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 566-571.
- Grainger, D.J., Mosedale, D.E., & Metcalfe, J.C. (2000). TGF- β in blood: a complex problem. *Cytokine & Growth Factor Review*, 11, 133-145.
- Greenhalgh, D. G. (1998). The Role of Apoptosis in Wound Healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30, 1019-1030.
- Gum, S.L., Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., & Pencev., D. (1997). Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 76(4), 288-297.
- Harle, J., Salih, V., Mayia, F., Knowles, J.C., & Olsen, I. (2001). Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 27(4), 579-586.
- Hayem, G.(2001). Tenology: a new frontier. *Joint Bone Spine*, 68, 19-25.
- Ingber, D.E., Dike, L., Hansen, L., Kard, S., Liey, H., Maniotis, etc. (1994). Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *International Review of Cytology*, 150, 173-224.
- Ito, M, Azuma, Y., Ohta, T., & Komoriya, K. (2000). Effects of Ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 26(1), 161-166.

- Jackson, B.A., Schwane, J.A., & Starcher, B.C. (1991). Effect of ultrasound therapy on the repair Achilles tendon injuries in rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise.*, 23(2), 171-176.
- Kang, H.J., Park, B.M., Hahn, S.B., & Kang, E.S. (1990). An experimental study of healing of the partially severed flexor tendon in chickens. *Younsei Medical Journal.*, 31(3), 264-273.
- Komarcevic, A. (2000), [The modern approach to wound treatment] *Meditinski Pregled.*, 53(7-8), 363-368.
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M.K., Schultz, D., Brabence, A., Weinstein, J., Kelley, M.F., & Kushner, I. (1990). Transforming growth factor β 1 regulates production of acute-phase proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 1491-1495.
- Maffulli N. (1999). Rupture of the Achilles tendon [Current Concepts Review]. *Journal of Bone and Joint Surgery America*, 81-A(7), 1019-1036.
- Martin, M., Lefaix, J., & Delanian, S. (2000). TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 47(2), 277-290.
- Maxwell, L., (1992). Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanism of inflammation and repair. *Physiotherapy*, 78(6), 421-426.
- Moller, H.D., Evans, C.H., and Maffulli, N. (2000). [Current aspects of tendon healing]. *Orthopade.*, 29(3), 182-187.
- Moustakas, A., Pardali, K., Gal, A., & Heldin, C. (2002). Mechanism of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunology Letters*, 00, 1-7.

- Osada, K., Seishima, M., Kitajima, Y., Yaoita, H., & Moris, S. (1995). Decreased integrin $\alpha 2$, but normal response to TGF- β in scleroderma fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 9, 169-175.
- Ottavianin, E., Franchini, A., & Kletsas, D. (2001). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β in invertebrate immune and neuroendocrine interactions: another sign of conservation in evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 129, 295-306.
- Patruno, M., Thorndyke, M.C., Carnevali, C., Bonasoro, F., & Beesley, P.W. (2001). Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *The Journal of Experimental Biology*, 204, 843-848.
- Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yangagihara, D., Mustoe T.A., Fox G.M. & Thomason, A. (1992). PDGF(BB homodimer), TGF- $\beta 1$ and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. *American Journal of Pathology*, 140, 1375.
- Qi, Y., Lian, J., Wang, K, et al. (1999). [The immunohistochemical changes of TGF-[beta], type I and III collagen in corneal healing after photorefractive keratectomy]. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih*, 35(4), 274-276.
- Ramirez, A., Schwane, J.A., McFarland, C., & Starcher, B. (1997). The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Medicine and science in sports and exercise.*, 27, 326-332.
- Shyy, J.Y-J. & Chien, S. (1997). Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Current Opinion in*

Cell Biology, 9, 707-713.

- Skutek, M., van Griensven, M., Zeichen, J., Brauer, N., & Bosch, U. (2001). Cyclic mechanical stretching enhances secretion of interleukine 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 9, 322-326.
- Tateshita, T., Ono, I., & Kaneko, F. (2001). Effects of collagen matrix containing transforming growth factor(TGF)- β 1 on wound contraction. *Journal of Dermatological Science*. 27, 104-113.
- Watanabe., N., Celechovsky, C., Niyibizi, C., Wang, JH, Takai, S., & Woo, S.L. (2000). The effects of growth factors on proliferation and matrix synthesis of fibroblasts from goat medial collateral ligament. *Journal of Musculoskeletal Research*, 4, 257-264.
- Young, S.R. and Dyson, M. (1990). Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 16(8), 809-816.
- Yue, J., & Mulder, K.M. (2001). Transforming growth factor- β signal transduction in epithelial cells. *Pharmacology & Therapeutics*, 91, 1-34.

Legends for figures

Fig. 1. Hematoxylin & Eosin stain in normal tendon($\times 100$)

Fig. 2. Hematoxylin & Eosin stain in injured tendon($\times 100$)

Fig. 3. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in ultrasound irradiation group at 1 day after injury($\times 100$)

Fig. 4. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in ultrasound irradiation group at 1 day after injury($\times 200$)

Fig. 5. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in ultrasound irradiation group at 3 days after injury($\times 100$)

Fig. 6. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in ultrasound irradiation group at 3 days after injury($\times 200$)

Fig. 7. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in control group at 3 days after injury($\times 100$)

Fig. 8. Immunoreactivity with the TGF- β_1 in control group at 3 days after injury($\times 200$)

