

# 당뇨병증 골절렛트의 골치유 과정에서 맥동성 초음파가 미치는 효과

민순규, 천진성<sup>1</sup>, 용준환<sup>2</sup>, 유영대<sup>3</sup>

동신대학교 보건복지대학 물리치료학과, <sup>1</sup>동신대학교 대학원 물리치료전공 석사과정, <sup>2</sup>동남보건대학 작업치료과, <sup>3</sup>원광대 광주한방병원

## The effects of Pulsed Ultrasound on the bone healing process in Fracture Model of Diabetes Mellitus Rat

Soon-Gyu Min, PT, PhD; Jin-Sung Chun, PT<sup>1</sup>; Jun-Hwan Yong, VM, PhD<sup>2</sup>; Young-Dae Yoo, PT, PhD<sup>3</sup>

Department of Physical Therapy, College of Health and Welfare, Dongshin University; <sup>1</sup>A Physical Therapy Master, Graduate School of Health and Welfare, Dongshin University; <sup>2</sup>Department of Occupational Therapy, Dongnam Health College; <sup>3</sup>Department of rehabilitation medicine, Wonkwang University Medical Center

Purpose: The study to pulsed ultrasound effects of diabetes mellitus fracture model in rat. Methods: We used 36 Sprague-Dawely rats which were divided into 3 groups; the animals were divided into group of 4 rats each 4th, 14th and 28th days. All animal was induced diabetes mellitus model to used streptozotocin with 45 mg/kg. Pulsed wave were divided into 50 mW/cm<sup>2</sup> and 100 mW/cm<sup>2</sup>. Results: T-ALP value was significantly change from group II,III on 14th, 28th days (p<0.05). Especially T-ALP value to between groups was significantly change from group II on 14th days (p<0.05). Osteocalcin value was significantly change from group II on 28th days(p<0.05). At fracture site, osteoblast, osteoclast expression was observed from 4th days after treatment and it reached its maximum intensity at 28th days. At fracture site, TGF-β<sub>1</sub> expression was observed from 4th days after treatment and it reached maximum intensity at 14th days. Conclusion: According to this study, diabetes mellitus fracture model to the more effective is divided into 50 mW/cm<sup>2</sup> pulsed ultrasound. (*J Kor Soc Phys Ther 2006;18(2):47-58*)

**Key Words :** Fracture healing, Diabetes mellitus, Pulsed ultrasound

### 1. 서론

최근 의료기술의 발달과 함께 평균수명이 증가하면서 건강유지와 질 높은 삶을 영위하기 위한 관심이 높아지고 있다. 당뇨병과 고혈압, 심혈관질환 등 만성 퇴행성 질환과 대사성 질환의 발병률 상승은 심각한 사회문제와 경제적 손실을 초래하고 있다. 특히 당뇨병은 전 세계 모든 나라에서 주목받고 있는 만성질환이며(WHO, 1994), 국내 대표적인 성인

병의 하나로 주요사망원인에서 1991년도에 7위였던 것이 2001년에 4위로 오르면서 당뇨에 의한 사회적 문제가 위험수위에 있음을 보여주고 있다(홍영혜 등, 2005).

조남한(2005)은 국내 당뇨병 발생률의 증가는 노령 인구의 증가, 소아비만, 서구화된 생활습관 및 식습관, 국가 보건정책에 따른 조기 검진사업 이외에도 급격한 병인요소의 변화에서 오는 현상 등을 들 수 있다고 하였다. 이러한 당뇨병은 이차적으로 많은 합병증을 동반하는데, 특히 골절이나 창상의 수복 과정을 지연시키는 것으로 나타났다(Funk 등, 2000; Macey 등, 1989).

Spanheimer(1992)와 Toppine(1994)에 의하면 당뇨

논문접수일: 2006년 2월 15일  
수정접수일: 2006년 3월 7일  
게재승인일: 2006년 3월 23일  
교신저자: 유영대, ptyoo@hanmail.net

로 인한 생체적 특성의 장애로는 당뇨병 골절모델의 실험에서 골절치유과정 초기에 세포막의 투과성과 교원질의 합성이 감소하였다고 보고하였으며, Loder(1988)에 의하면 비신경성 당뇨병 환자와 비당뇨성 환자들의 골절치유정도를 비교한 결과 당뇨병 환자들의 골절부위에서 약 187% 정도의 골절지연유합을 보이는 것으로 보고 되었다.

골절은 손상의 정도, 골절형태, 골의 결합구조, 혈관손상의 유무, 감염여부, 연령, 호르몬과 영양상태, 유전적 요인, 세포와 생화학적 요인 및 전신성 질환 유무 등의 다양한 요인들에 의해 치유과정에서 영향을 받게 된다(Goodship 등, 1998; Hadjiargyrou 등, 1998).

골절치유과정에서 진행되는 분자와 세포들의 활동에 대한 이해는 골절환자의 치유과정을 향상시키고 촉진시키기 위한 가장 기본적인 요구사항이다. 최근 이 분야에 대한 연구 활동이 임상과 실험적인 주요 논제로 떠오르고 있고, 연구 또한 활발하게 진행 중에 있다(Mark 등, 2004; Parvizi 등, 2002; Sena 등, 2005).

초음파는 진동주파수가 17,000 ~ 20,000 Hz 이상의 불가청 진동주파수로 임상에서 사용되는 심부투열치료기 중 가장 널리 사용되고 있는 치료장비이다(Kristiansen 등, 1997). Knoch와 Klug은 1965년 최초로 저에너지 초음파를 골절치유 촉진에 응용하였으며, 초음파가 뼈에 부딪칠 때 골표면의 압전위(piezoelectric potential)가 변화하여 가골형성을 촉진시키는 것을 발견하였다(Knoch와 Klug, 1990).

골절치유를 촉진시키는 유효 초음파 영역은 30 ~ 100 mW/cm<sup>2</sup>, 0.5 ~ 1.5 MHz의 맥동파(pulsing sine wave)로 알려져 있으며, 골절부에 하루 15 ~ 20분간 적용함으로써 골막에서 형성되는 가골의 형성을 유도하고 골절치유를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Cook 등, 1997; Kristiansen 등, 1997). 국소적인 골재생(유합)을 촉진시키기 위한 몇 가지 방법들이 있는데, 그 중에서도 저장도 맥동성 초음파는 골재생 효과에 있어서 탁월한 기능을 발휘한다(Sena 등, 2005).

골형성 지표에는 총알칼리성 포스파타제(total alkaline phosphatase, T-ALP), 골 특이성 알칼리성 포스파타제(bone specific alkaline phosphatase, B-ALP), 오스테오칼신(osteocalcin, OC), 전구 1형 콜라겐 C-말단부 첨가단백(procollagen type 1 C-terminal propeptide, PICP) 등이 있다(김덕윤,

1999). 이 중 가장 유용하게 사용되는 것이 osteocalcin이며 T-ALP 또한 널리 이용되고 있다. 골절 후 골유합에는 여러 세포가 관여하는데 특히 골아 세포는 가장 중요한 세포로 골기질을 형성하고 골의 무기질화(mineralization)에 중요한 역할을 한다(이호승, 1999). T-ALP는 파골세포에서 분비되는 당단백질로 골아세포 및 간이나 장에서 생성되며, 임상에서 가장 흔히 이용되는 골형성 지표이다(김덕윤, 1999).

Bone Gla protein으로 알려진 osteocalcin은 비타민 K 의존성 단백질로 골아세포에서 생성되어 골기질 내 비교원 단백질의 약 10 ~ 20% 정도를 차지하며(이호승, 1999), 골의 구조에서 hydroxyapatite 및 Ca<sup>2+</sup>과 단단하게 결합되어 있는데 새로운 골형성시 골아세포 활성을 간접적으로 관여하는 골형성 지표로 알려져 있다(Bowles 등, 1996; Duda 등, 1988).

TGF-β<sub>1</sub>은 골 및 연골의 분화, 피부 반흔 조직의 생성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 골 및 연골 분화 과정에서 TGF-β<sub>1</sub>의 기능은 골아 세포의 이동을 조절하고, 증식을 조절하며, 세포간질 단백질의 생산과 분해를 조절하는 것으로 요약할 수 있다(Bae 등, 1995; Salkeld 등, 2001).

TGF-β<sub>1</sub>은 상처를 입었을 경우 그 부위에 일시적으로 섬유모세포를 끌어들이고 교원결합조직의 형성을 자극하여 조직의 복원에 중요한 역할을 한다고 하였다(Ignot와 Massague, 1986). 물리치료적 영역에서는 염증과 부종의 감소를 위한 목적으로 초음파를 다양한 증상에서 광범위하게 적용하고 있으며, 초음파의 효과 중 하나인 비온열 효과가 세포막 투과성을 변화시키고 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 증가시켜서 성장인자 합성을 촉진시키며(성진형 등, 1999), 대식세포의 기능과 분비하는 물질에 영향을 줄 수 있다(윤수진, 2002).

골의 조기수복에 관한 초음파의 영역에 대한 연구는 지금까지 활발하게 진행되어져 왔다. 또한 맥동성 초음파의 적용기법에 대해서는 다양한 연구들에서 이미 제시되었지만, 당뇨병을 동반한 골절환자들에게 맥동성 초음파를 초기에 적용 시 적절한 치료적 강도와 범위 및 골치유 과정에 나타나는 다양한 생리학적 기전에 대한 연구들은 많이 부족한 실정이다. 이러한 근거를 바탕으로 당뇨병증 골절모델에 대한 맥동성 초음파의 적용이 골치유 과정에 효과적인지 알아보려고 본 연구를 실시하였다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물

본 연구에서 사용된 실험동물은 Sprague - Dawley계 수컷 백서 36마리를 당뇨를 유발하여 각 군당 12마리씩 할당하였다. 사육실 온도는 25±1 °C, 습도 55±10%를 유지하였으며, 고형사료와 물은 자유

롭게 먹도록 하였다. 명암은 12시간 주기로 하였다. 실험군 I 은 대퇴골을 골절시키고 치료를 실시하지 않는 대조군, 실험군 II는 대퇴골 골절 후 초음파 강도를 50 mW/cm<sup>2</sup> 저장도 맥동성 초음파 치료, 실험군 III은 대퇴골 골절 후 100 mW/cm<sup>2</sup> 저장도 맥동성 초음파 치료를 적용하였다. 실험군의 일반적인 분류는 표 1과 같다.

표 1. 실험군의 일반적인 분류.

실험군	강도(mW/cm <sup>2</sup> )	주파수(MHz)	맥동비	당뇨병증	희생일
I (n=12)	없음	없음	없음	적용	치료후 4, 14, 28일
II (n=12)	50	1	1:4	적용	치료후 4, 14, 28일
III (n=12)	100	1	1:4	적용	치료후 4, 14, 28일

### 2. 당뇨 유발 및 혈당 측정

Citrate buffer(pH 4.5)에 용해된 STZ(S-0130, Sigma aldrich, 미국)을 45 mg/kg 농도로 복강 내 1회 주사하여 췌장의 베타세포를 선택적으로 파괴하는 방법(고영철, 2003)을 사용하였으며 당뇨유발 유무를 48시간 후 확인하여 당뇨병 모델을 만들었다. 당뇨유발 48시간 후 공복상태에서 각 개체의 미정맥 채혈을 실시하여 혈당측정기(Roche Diagnostics GmbH, 독일)로 혈당을 측정하여 혈당이 200 mg/dl 이상인 백서를 대상으로 무작위 추출하여 당뇨유발 군인 실험군 I, 실험군 II, 실험군 III에 각각 할당하였다.

### 3. 골절유발

골절유발을 위해 실험동물들의 좌측 대퇴부를 사소한 다음, 면도기로 피부표면을 다듬었다. 마취는 Xylazine hydrochloride(Rompun, Bayel Co., 대한민국) 주사액을 0.6 mg/kg 사용하여 동물들을 전 마취시킨 후, 본 마취로 케타민(Ketamin, Ketara, Yuhan Co., 대한민국) 0.5 mg/kg을 사용하여 2단계로 시행하였다.

마취된 실험동물들은 해부용 틀에 골절 반대부위

지절을 고정시킨 다음, 알코올로 소독한 다음 대퇴골을 따라 피부, 근육의 절개를 시행하여 대퇴골을 노출시킨 후 수술용 드릴(Strong 207, Saeshin Co., 대한민국)을 이용하여 와이어를 고정할 수 있도록 골절유발 부위 양 옆으로 구멍을 뚫은 후 양쪽 구멍의 중간지점을 수술용 드릴을 이용해 골절을 유발하고 이후에 와이어로 단단히 고정하였다. 골절부위를 알코올로 다시 소독한 후 근육, 피부 순서로 실크세사를 이용하여 5 mm 간격으로 단순 결찰 봉합하였고, 항생제를 주사한 후 10% 포비돈 요오드로 소독하였다. 본 실험에 사용된 모든 골절모델들은 위의 방법으로 동일하게 처치하였으며, 골절유발 후 24시간 동안 안정을 취하게 한 후 실험을 개시하였다.

### 4. 초음파 적용

당뇨병 골절유발 모델에서 초음파 치료는 초음파 치료기(Sonoplus 590, Enraf-Nonius Co., 네덜란드)의 1 MHz 초음파 도자를 사용하여 각 개체당 1일 1회 치료하였으며, 초음파의 강도는 50 mW/cm<sup>2</sup>, 100 mW/cm<sup>2</sup>을 사용하였고, 맥동비는 1:4로 일률적으로 제공하였다. 초음파 치료 부위에는 초음파용 전도겔(Soung Heong Co., 대한민국)을 이용하여 초음파가 심부조직으로 충분히 전달될 수 있도록 하고, 초음파 도자

민순규 외 3인 : 당뇨병증 골절렛트의 골치유 과정에서 맥동성 초음파가 미치는 효과

를 고정틀을 이용해 골절부위와 밀착 고정 시킨 후 15분간 치료하였다. 대조군은 골절유발 후 실험 종료 시까지 아무런 치료적 처치도 제공하지 않았다. 각각의 실험군은 4일, 14일, 28일에 희생시켰다.

#### 5. T-ALP(Total Alkaline Phosphatase)와 osteocalcin 측정

실험기간 종료 후 심장 채혈한 직후 원심분리기(MICRO 17TR, Hanil Science industrial Co., 대한민국)를 사용하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 혈청 중 T-ALP와 osteocalcin의 활성도를 측정하였다.

T-ALP 시약(PASL-0420, ELITECH. Division of SEPPIM S.A., 프랑스)과 생화학분석기(RM 2060-18, Eltec. Co., 이탈리아)를 사용하여 T-ALP의 활성도를 측정하였으며, osteocalcin 측정을 위한 시약으로 Rat osteocalcin EIA kit(Osteocalcin, BTI Co., 미국)를 사용하였고, 분석은 ELAISA reader(Sunrise, TEGAN Co., 호주)를 이용하여 측정하였다.

#### 6. 조직학적 검사

대퇴골을 10% 포르말린으로 고정 후 탈회용액(5% nitric acid, 80% ethanol 혼합용액)에서 약 2주간 탈회한 후, 일반적인 조직의 탈수, 투명 및 침투과정을 TISSUE-TEK<sup>®</sup>(Model No. 4640B, Sakura, 일본)기기를 사용하여 처리하였으며, 파라핀 블록의 제작과 냉각은 Embedding Console System(TISSUE-TEK<sup>®</sup>, Sakura, 일본)을 사용하였다. 제작된 파라핀 블록을 회전식 미세박절기(Finesse315, Thermo Shandon Co., 영국)를 사용하여 5 µm 두께로 미세절편을 취하였으며, 부유수조와 신전기 과정을 거쳐 슬라이드를 부착시켰다. 자일렌으로 5분씩 3회에 걸쳐 탈파라핀 과정을 진행하였고, 고농도에서 저농도로 알코올에 흡수한 후 흐르는 물에 수세하였다.

헤마톡실린용액(Hematoxylin solution)에 핵염색 후 다시 수세하여 에오진용액(Eosin solution)으로 3분간 세포질 염색 후 수세하였다. 저농도에서 고농도로 3단계 탈수과정을 진행하였으며, 자일렌 용액에 3단계 흡수하여 조직을 투명하게 한 후 봉입하였다. 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical

Co., 일본)을 사용하여 각 군의 대퇴골 골절 후 회복 정도를 관찰, 각 군의 조직들을 촬영하였다.

#### 7. 면역조직화학적 검사

각 군의 대퇴골 골절부위에서 TGF-β<sub>1</sub>의 면역반응을 보기위해 파라핀에 포매된 조직편에서 5 µm 두께로 절편한 후 60 °C에서 12시간 이상 건조시켜 자일렌으로 탈파라핀하고 에탄올을 이용하여 재흡수시켰다.

내인성 과산화효소를 억제하기 위해 0.3% 과산화수소를 포함하고 있는 증류수에 30분간 담근 후 증류수로 10분간 2회 수세하였다.

다시 절편을 1M PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 비특이적 반응을 억제하기 위해 1% normal goat serum을 반응시켰다. 계속해서 1% normal goat serum을 일차항체(다크론성 TGF-β<sub>1</sub>, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 미국)를 1:200으로 희석해 실온에서 12시간 반응시킨 후 1M PBS로 수세하였다.

2차항체를 실온에서 반응시킨 후 1M PBS로 수세하였다. ABC(avidine-biotin peroxidase complex, vector, 미국)를 반응시킨 후 1M PBS로 수세하여 발색제로 3,3-diaminobenzidine(DAB)를 사용하여 5분간 반응시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행한 후 봉입한 다음 광학현미경을 사용하여 각 군의 대퇴골 골절 후 TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도를 관찰하였다.

#### 8. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 윈도우용 SPSS 12.0 version을 사용하여 분석하였다. 실험결과는 실험군 별로 평균치와 표준편차를 구하였다.

각 실험군간 T-ALP, osteocalcin의 치료 4일 14일 28일간 기간별 변화를 알기위해 대응표본 t-test를 사용하였고, 실험군간의 차이를 비교하기 위하여 one-way ANOVA를 사용하였다.

또한 당뇨와 치료매개에 따른 변화를 알기 위해서 two-way ANOVA를 이용하여 비교 분석하였으며, 사후 검정은 Duncan 방법으로 하여 통계학적 유의 수준 α=0.05로 설정하여 검정하였다.

### III. 결 과

#### 1. T-ALP(Total Alkaline Phosphatase) 측정

골형성 지표중의 하나인 T-ALP의 측정 결과이다. 실험군 I(당뇨 및 골절유발 대조군)은 4일 152.25±7.80 IU/ℓ에 비해 14일 170.50±3.70 IU/ℓ로 유의한 차이를 보였다. 실험군 II(당뇨 및 골절유발

후 50 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군)는 4일 155.25±11.03 IU/ℓ에 비해 14일과 28일에 185.50±6.56 IU/ℓ와 170.00±8.75 IU/ℓ로 유의한 차이를 보였다.

실험군 III(당뇨 및 골절유발 후 100 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군)은 4일 160.50±4.52 IU/ℓ에 비해 14일 169.50±4.65 IU/ℓ에 비해 28일 163.75±5.12 IU/ℓ로 유의한 차이를 보였다(그림 1)(표 2, 3).

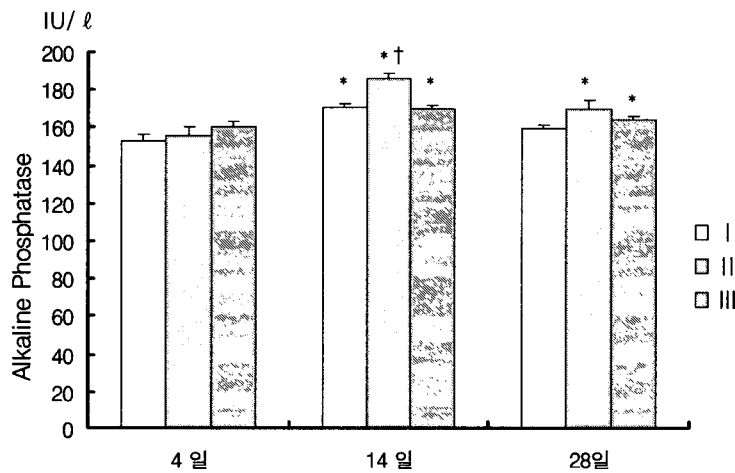


그림 1. 각 실험군의 치료 4일, 14일과 28일 후 T-ALP 수치의 변화.

\*: 실험군의 치료기간별 대응표본 T-test의 통계학적 유의(p<0.05)

†: 실험군의 치료강도별 one-way ANOVA의 통계학적 유의(p<0.05)

표 2. T-ALP의 변화에 대한 대응표본 T-test의 결과

치료기간	비교변수	t	자유도	P
4	4 일 : 14 일	-3.511	3.00	0.039*
	4 일 : 28 일	-2.335	3.00	0.102
	14 일 : 28 일	3.133	3.00	0.052
14	4 일 : 14 일	-5.595	3.00	0.011*
	4 일 : 28 일	-4.055	3.00	0.027*
	14 일 : 28 일	-2.649	3.00	0.077
28	4 일 : 14 일	-3.216	3.00	0.049*
	4 일 : 28 일	-1.008	3.00	0.388
	14 일 : 28 일	12.011	3.00	0.001*

\*: p<0.05

표 3. T-ALP의 변화에 대한 one-way ANOVA의 결과

치료기간	비교변수	제공합	자유도	평균제공	F	P
4	실험군간	125.167	2	62.583	0.926	0.431
	실험군내	608.500	9	67.611		
14	실험군간	642.667	2	321.333	12.306	0.003 <sup>†</sup>
	실험군내	235.000	9	26.111		
28	실험군간	233.167	2	116.583	2.765	0.116
	실험군내	375.500	9	42.167		

<sup>†</sup>: p<0.05

## 2. Osteocalcin 측정

골형성 지표중의 하나인 Osteocalcin 측정 결과이다. 실험군 I은 치료 기간별로 증가하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 실험군 II는 치료

기간별 증가하였으며, 4일 20.42±4.08 ng/ml에 비해 28일에 27.27±2.40 ng/ml로 유의한 증가를 보였다. 실험군 III은 14일 21.32±2.35 ng/ml에 비해 28일에 24.02±3.99 ng/ml로 증가를 보였으나 유의한 차이는 없었다(그림 2, 표 4, 5).

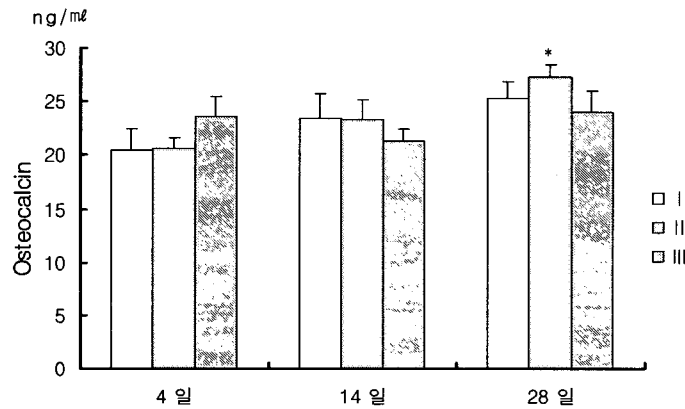


그림 2. 각 실험군의 치료 4일, 14일과 28일 후 osteocalcin 수치 변화.

\*: 실험군의 치료기간별 대응표본 T-test의 통계학적 의미(p<0.05)

표 4. Osteocalcin의 변화에 대한 독립표본 T-test의 결과

치료기간	비교변수	t	자유도	P
4	4 일 : 14 일	-0.744	3.00	0.511
	4 일 : 28 일	-1.707	3.00	0.186
	14 일 : 28 일	-1.349	3.00	0.270
14	4 일 : 14 일	-1.065	3.00	0.365
	4 일 : 28 일	-4.327	3.00	0.023*
	14 일 : 28 일	-2.911	3.00	0.062
28	4 일 : 14 일	0.800	3.00	0.482
	4 일 : 28 일	-0.113	3.00	0.917
	14 일 : 28 일	-1.486	3.00	0.234

\*: p<0.05

표 5. Osteocalcin의 변화에 대한 one-way ANOVA의 결과

치료기간	비교변수	제곱합	자유도	평균제곱	F	P
4	실험군간	25.865	2	12.933	1.065	0.384
	실험군내	109.258	9	12.140		
14	실험군간	11.932	2	5.966	0.463	0.644
	실험군내	116.035	9	12.893		
28	실험군간	21.327	2	10.663	1.054	0.388
	실험군내	91.043	9	10.116		

### 3. 조직학적 검사

치료 시작 후 4일, 14일과 28일의 조직학적 검사를 실시하였다. 치료 시작 후 4일에서 모든 실험군에서 골모세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)는 거의 관찰되지 않았다. 치료 시작 후 14일의 모든 실험군은 4일에 비하여 비교적 많은 양의 골모세포

와 파골세포를 관찰할 수 있었다.

치료 시작 후 28일에서는 14일에 비하여 많은 양의 고모세포와 파골세포를 관찰할 수 있으며, 대조군에 비해 초음파 치료를 실시한 실험군에서 더 많은 관찰을 보였다. 초음파 치료를 실시한 실험군중에 50 mW/cm<sup>2</sup>보다 100 mW/cm<sup>2</sup>에서 더 관찰되었으나 많은 차이를 보이지는 않았다(그림 3).



그림 3. 각 실험군의 치료 후 28일 골절부의 조직학적 검사(H&E ×100).

- A: 당뇨 및 골절유발 대조군
- B: 당뇨 및 골절유발 후 50 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군
- C: 당뇨 및 골절유발 후 100 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군

### 4. 면역조직화학적 검사

초음파 적용 후 4일, 14일과 28일 쯤에 각 군에서 조직을 적출하여 TGF-β<sub>1</sub>에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 시간의 경과에 따른 TGF-β<sub>1</sub>의 변화정도를 관찰하였다.

치료 4일 후의 조직소견에서는, 당뇨병 골절 모델군 중 초음파를 적용한 II군과 III군 모두에서 대조군보다 강한 중등도의 면역반응을 보였으며, 그 중

50 mW/cm<sup>2</sup> 강도를 적용한 II군보다는 100 mW/cm<sup>2</sup> 강도를 적용한 III군에서 TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도가 더 좋은 것으로 나타났다.

치료 14일 후의 조직소견에서 모든 실험군은 실험기간 중에서 가장 강한 면역반응을 보였으며, 이 시기에서는 100 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 TGF-β<sub>1</sub>의 발현이 더 뚜렷하였다(그림 4).

치료 28일 후의 조직소견에서는 실험군 I인 대조군에서만 경미한 정도의 반응이 관찰되었다.

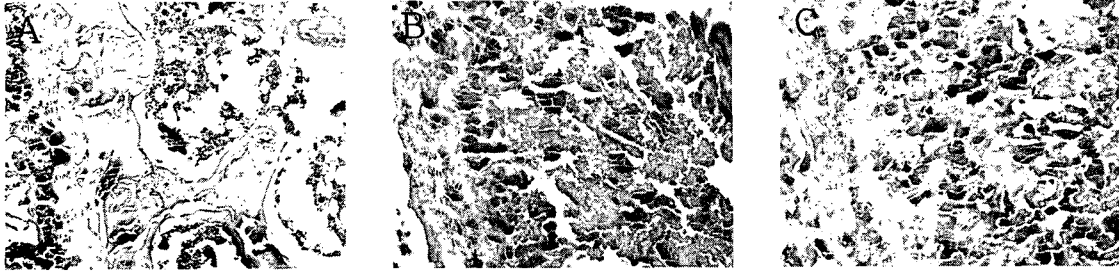


그림 4. 각 실험군의 치료 14일 후 골절부의 면역조직학적 검사(TGF-β<sub>1</sub> ×200).

- A: 당뇨 및 골절유발 대조군
- B: 당뇨 및 골절유발 후 50 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군
- C: 당뇨 및 골절유발 후 100 mW/cm<sup>2</sup> 초음파 치료군

#### IV. 고 찰

본 연구는 당뇨병증 백서의 우측대퇴골을 골절시킨 후 1일부터 초기에 맥동성 초음파를 적용하여 초음파의 적용 여부와 출력강도의 변화에 따른 골유합의 치료효과에 대해 알아보고자 조직학적 변화와 골성장인자 변화의 측정을 실시하였다.

염증반응 없이 골의 재생은 기대할 수 없을 만큼 골절에 있어서 염증반응은 필수적이다(Phillips, 2005). 골절 직후에는 혈종의 형성과 혈소판의 파괴 등이 유발되며, 대부분 TGF-β(transforming growth factor beta)와 PDGF(platelet-derived growth factor)가 분비된다(Bolander, 1992). 골절치유기간 동안에 일어나는 분자와 세포들의 작용은 Einhorn(1995)에 의해 상세하게 보고 되었다. 골절 24시간 이내에 간엽세포에서 골형성단백질(bone morphogenetic proteins; BMPs)이 출현하며, 2~5일 사이에는 골외막하부에서 경가골의 형성이 시작된다. 막내골화 과정은 움직임에 의해 촉진되고, 내적 고정에 의해 억제되는 특징을 가지고 있다. 6~10일 동안에는 경가골 부위에서 osteocalcin이 출현하며, 경가골과 연가골 부위에서 활발한 세포들의 증식을 관찰할 수 있다. 골절 후 약 21~25일 경에는 세포들의 분화가 중단되며, 경가골 부위는 새로운 직골의 형태를 형성하게 된다(Einhorn, 1995; Phillips, 2005).

현재 골절에 대한 조기접근방법으로 맥동초음파 적용에 가장 좋은 예는 골막의 손상이 심하지 않은 골절이며, 지연유합 소견이 관찰되는 골절에서도 유

효한 것으로 알려져 있다(양규현 등, 1998; Jingushi 등, 1992). 본 연구에서도 수술시 골절부의 골막을 최대한 보존하여 초음파의 효과를 극대화 시키도록 주의 하였으며, 골절부의 고정 또한 중요한 요인으로 고려하였다. 그 결과 초기 가골이 절골부를 잘 보호하여 골절부의 치유과정이 촉진된 것으로 생각된다. 골절회복정도가 비교적 빠른 것은 실험동물의 치유능력이 사람에서의 치유능력보다 앞서기 때문으로 여겨지며, 이는 양규현 등(1998)과 Heckman 등(1994)의 보고와 의미를 같이 한다. 실험에 사용된 골절모델 중 일부의 개체에서 골절부가 정상적으로 고정되지 않고 전단력에 의한 부정유합이 발생하였는데, 이는 골절부의 고정방법상 유발된 것으로 보인다. 향후 이 분야에 대한 연구를 진행하고자 할 때는 골절부의 고정방법에 보다 기술적으로 향상된 방법들을 사용하여야할 것으로 사료된다.

저강도 초음파는 골의 비후성 영역의 길이에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 현상은 초음파가 비-비후성 연골세포들을 자극하는 것이 아니라 골의 경계부에서 골모세포와 같은 골화물질의 생성에 보다 영향을 미치기 때문으로 판단된다(Nolte 등, 2001). Hadjiargyrou 등(1998)의 연구에 따르면 저강도 초음파의 적용이 골세포들의 활동성을 증가시켜 연골세포의 활발한 활동에 직접적으로 영향을 미친다고 보고하였다.

50 mW/cm<sup>2</sup>의 저강도 초음파는 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 실시간 이동성을 증가시키며 (Parvizi 등, 1999), *in vivo* 실험(Yang 등, 1996)과 *in vitro* 실험(Parvizi J 등,



1999)에서 유전자의 발현을 촉진시킨다는 보고도 있었다. 치료적 초음파 중 100 mW/cm<sup>2</sup>의 저강도 초음파는 교원질과 비-교원성 단백질의 합성을 촉진시키지만, 1.0~2.0 mW/cm<sup>2</sup>의 고강도 초음파는 오히려 이들 단백질의 합성을 억제시키는 작용을 한다(Reher 등, 1997). 본 연구에서도 맥동성 초음파의 적용이 골경계부의 세포들의 활성화에 직접적인 작용을 한 것으로 나타났다.

골절 후 골유합 과정에서 골아세포는 골기질 형성과 무기질화(mineralization)에 중요한 역할을 하며 T-ALP와 osteocalcin은 골아세포의 활성도를 반영하는 대표적인 지표 중 하나이다(Delmas, 1993; Leung 등, 1993). T-ALP와 osteocalcin의 골절 후 증가시기에 대하여는 이견이 있지만 전반적으로 osteocalcin이 증가하는 시기에 앞서 T-ALP가 증가한다. 이는 골아세포 분화 과정에서, 먼저 골기질이 성숙되는 시기에는 T-ALP가 주로 발현되고 이후 무기질화가 진행되며 osteocalcin이 증가하기 때문이다(이호승 등, 2002). 본 연구에서도 치료 후 14일에 T-ALP의 증가가 나타났으며, osteocalcin은 치료 후 28일에서 증가하는 양상이 나타났다.

T-ALP는 14일에 모든 실험군에서 유의한 증가를 보였으며, 28일에는 초음파 치료군의 T-ALP의 유의한 증가를 볼 수 있었다. 이기수 등(2001)과 Wang 등(2006)의 실험과 같이 T-ALP는 14일에 최고치를 나타내었으며 각 실험군간의 비교에서는 14일에 50 mW/cm<sup>2</sup>의 저강도 초음파를 적용한 실험군에서 다른 실험군에 비하여 유의한 차이를 보였다.

김덕윤(1999)은 T-ALP의 50% 이상이 뼈 이외의 장기 즉 간, 장, 신장, 태반 등에서 생성된 동종효소에 의한 것이기 때문에 검사의 특이도가 낮다고 하였으나, B-ALP는 분석방법이 까다로워 실제로 임상에서 적용하기 힘든 측면이 있어서(이호승 등, 2002), T-ALP의 측정을 통한 분석방법이 보편적으로 사용된다. 이에 본 연구에서도 각 개체의 T-ALP의 수치 변화를 통해 골의 형성지표로 사용하였다.

Osteocalcin은 비타민 K 의존성 단백질로서 골과 상아질에 특이적으로 분포하며 골의 비교원성 단백질 중 20%를 차지하고(Hauschka 등, 1975; Price 등, 1976), 골형성 시 무기질 침착으로 출현하며 골형성 표지자 중 임상적으로 가장 유용하게 사용된다(Hauschka 등, 1978). Fini 등(2001)의 실험에서는 48 시간과 7일에 측정된 결과 osteocalcin의 수치는 증

가하였다. 김남수 등(2002)의 실험에서도 osteocalcin은 4주에서 8주까지 현저히 증가하다가 12주 이후 20주 까지 감소하였으며, 이호승 등(2002)의 실험에서도 osteocalcin은 8주경에 가장 증가하는 양상을 보였다. 본 실험에서도 4일, 14일에는 비슷하거나 약간 증가를 보였으나 유의한 차이는 없었으나, 50 mW/cm<sup>2</sup>의 저강도 초음파를 적용한 실험군의 28일에서 4일에 비하여 유의한 차이를 보였다.

본 연구에서도 이호승 등(2002)의 보고와 같이 Osteocalcin은 T-ALP처럼 14일에 더 많은 증가를 보이지 않았는데, T-ALP가 발현되고 이후 무기질화가 진행되면 osteocalcin이 증가하기 때문에 T-ALP가 발현된 14일 후 증가하게 되었을 것으로 생각되어진다.

TGF-β<sub>1</sub>는 섬유아세포에 대한 화학주성과 성장을 촉진하는 능력이 있으며, 세포외 기질 단백질의 합성을 유도하는 기능을 가지고 있다. 뿐만 아니라 조골세포의 증식과 분화에도 발생학적으로 영향을 미치며 창상치유 과정에서 중요한 역할을 한다(Ignatz와 Massague, 1986). Ekholm 등(2000)은 경골골절 백서 모델의 가골조직에서 TGF-β<sub>1</sub>의 발현이 7일 째에 최고로 나타나고, 이후 점차 감소하는 것에 대하여 보고 되었으며, 이는 Rosen 등(1988)의 *in vitro* 실험에서 나타는 결과와 일치하는 것을 볼 수 있다.

본 실험에서도 TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도를 관찰한 결과, 14일 후 조직조건에서 초음파를 적용한 실험군 II와 III에서 TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도가 강한 반응을 보였으며, 그 중에서 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 발현정도가 가장 높게 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 당뇨병증 골절모델에 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도를 적용했을 때 골치유 과정에 보다 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 당뇨병을 동반한 골절에서 골의 조기 유합을 위한 목적으로 맥동성 초음파를 적용하고자 할 때는 50 mW/cm<sup>2</sup>의 낮은 강도로 적용하는 것이 보다 효과적일 것이다.

## V. 결론

본 연구는 STZ로 유도된 당뇨병증 백서를 이용하여 골절을 유발시킨 후, 시간에 따른 골절치유정도를 T-ALP 변화, osteocalcin 변화, 조직학적 검사 및

면역조직화학 검사 등을 통하여 알아보고자 하였으며, 이들 항목을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

전체 실험군에서 일반적으로 T-ALP 수치가 4일 후보다 14일 후에 증가하다가 28일 후에는 감소하는 경향을 보였다. 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도와 100 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 14일과 28일 후의 측정값이 유의한 차이를 보였으며, 특히 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 14일 후의 측정값은 다른 실험군과의 비교에서도 유의한 차이를 보였다(P<0.05).

각 기간에 따른 osteocalcin 측정값을 비교한 결과 실험군 I, II, III의 경우 시간이 경과함에 따라 osteocalcin의 양이 점차적으로 증가하였으며, 특히 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 28일 후의 측정값이 유의한 증가를 보였다(p<0.05).

각 군에서의 H & E 염색을 실시한 결과 당뇨병증 골절모델의 50 mW/cm<sup>2</sup>와 100 mW/cm<sup>2</sup>의 강도 모두에서 세포의 활동성을 뚜렷하게 증가시키지는 못하였다.

TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도를 관찰한 결과, 14일 후 조직 소견에서 초음파를 적용한 실험군 II와 III 군에서 TGF-β<sub>1</sub>의 발현정도가 가장 강한 면역반응을 보였으며, 그 중에서도 50 mW/cm<sup>2</sup>의 강도에서 발현정도가 가장 높게 나타났다.

## 참고문헌

- 고영철. Streptozotocin 당뇨 유발 흰쥐에서 상엽복합 추출물과 운동이 혈당 및 지질대사에 미치는 효과. 명지대학교 대학원, 박사학위 논문. 2003.
- 김덕윤. 골대사의 생화학지표. 대한핵의학회지. 1999; 33(4):341-51.
- 성진형, 류재덕, 김원유 등. 치료용 저 에너지 초음파가 배양중인 관절 연골세포에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1999;34(3):617-24.
- 양규현, 최중혁, 조재호. 저에너지 초음파를 이용한 골절치유 촉진. 대한골절학회. 1998;11(2):247-53.
- 윤수진. 초음파가 흰쥐 아킬레스건 손상부위의 TGF-β 발현에 미치는 영향. 대구대학교 재활과학 대학원 석사논문. 2002.
- 이기수, 이택우, 김성진. 스트렙토조토신 유발 당뇨병 백서에서 실험적 치아이동종의 치조골 교체. 대한치과교정학회지. 2001;31(3):357-67.
- 이호승. 골절 환자 혈청 내 Alkaline Phosphatase와 Osteocalcin의 변화에 관한 연구. 충북의대 학술지. 1999;9(2):267-74.
- 이호승, 이춘성, 장재석 등. 골절 치유 과정의 혈청 내 Alkaline Phosphatase와 Osteocalcin의 변화. 대한정형외과학회지. 2002;37(3):411-5.
- 홍영혜, 조명옥, 태영숙. 한국 성인당뇨병 환자의 식생활에 관한 문화기술적 연구. 대한간호학회지. 2005;35(2):313-22.
- 조남한. 우리나라 당뇨병의 유병률과 관리 상태. 대한내과학회지. 2005;68(1),1-3.
- Bae HW, Geiser AG, Kim DH et al. Characterization of the promotor region of the human transforming growth factor-beta type II receptor gene. J Biol Chem. 1995; 270(49):29460-8.
- Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med. 1992;200(2):165-70.
- Bowles SA, Kurdy N, Davis AM et al. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. Ann Clin Biochem. 1996;33(3):196-200.
- Cook SD, Ryaby JP, McCabe J et al. Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. Clin Orthop Relat Res. 1997;337:198-207.
- Delmas PD. Biological makers of bone metabolism. Presse Med. 1993;22(6):263-8.
- Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA et al. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab. 1988;66(5): 951-7.
- Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. J Bone Joint Surg Am. 1995;77(6):940-56.
- Ekholm EC, Ravanti L, Kahari V et al. Expression of extracellular matrix genes: Transforming growth factor (TGF)-beta1 and ras in tibial

- fracture healing of lathyritic rats. *Bone*. 2000;27(4):551-7.
- Fini M, Torricelli P, Giavaresi G et al. Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from and osteopenic rats. *Biomed Pharmacother*. 2001;55(4):213-20.
- Funk JR, Hale JE, Carmines D et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res*. 2000;18(1):126-32.
- Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J : Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355:105-115.
- Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP et al. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355:216-29.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(10):3925-9.
- Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J et al. Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive low intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*. 1994; 76(1):26-33.
- Ignatz RA and Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261(9):4337-45.
- Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res*. 1992; 7(9):1045-55.
- Knoch H, Klug W. Stimulation of fracture healing with ultrasound. 1st ed. New York, Springer-Verlag. 1990:1-87.
- Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79(7):961-73.
- Leung KS, Fung KP, Sher AH et al. Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg*. 1993;75(2):288-92.
- Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop*. 1988;232:210-6.
- Macey LR, Kana SM, Jingushi S et al. Defects of early fracture healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71(5): 722-33.
- Mark H, Penington A, Nannmark U et al. Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats. *Bone*. 2004;35(2):535-42.
- Nolte PA, Klein-Nulend J, Albers GH et al. Low-intensity ultrasound stimulates endochondral ossification in vitro. *J Orthop Res*. 2001;19(2):301-7.
- Parvizi J, Parpura V, Greenleaf JF et al. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. *J Orthop Res*. 2002;20(1):51-7.
- Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res*. 1999;17(4):488-94.
- Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005;36:5-7.
- Price PA, Poster JW, Raman N. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine bone. *Proc Natl Sci USA*. 1976;73(10):3374-5.
- Reher P, Elbeshir el-NI, Harvey W et al. The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 1997;23(8):1251-8.
- Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY et al. Transforming growth factor-beta modulates

the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. *J Cell Physiol.* 1988;134(3):337-46.

Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL et al. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(6):803-16.

Sena K, Leven RM, Mazhar K et al. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(5):703-8.

Spanheimer RG. Correlation between decreased collagen production in diabetic animals and in cells exposed to diabetic serum: response to insulin. *Matrix.* 1992;12(2):101-7.

Topping RE, Bolander ME, Balian G. Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;2:220-8.

Wang J, Asou Y, Sekiya Y et al. Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold. *Biomaterials.* 2006;27(13):2738-46.

WHO. Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;844:1-100.

Yang KH, Parvizi J, Wang SJ et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur-fracture model. *J Orthop Res.* 1996;14(5):802-9.