

## 스트렙토조토신 유도 당뇨 흰쥐에서 전기자극이 상처치유와 피부 비만세포에 미치는 영향

원광보건대학 임상병리과<sup>1</sup>, 전주기전대학 임상병리과<sup>2</sup>, 원광보건대학 물리치료과<sup>3</sup>

제갈승주<sup>1</sup> · 이 경 선<sup>1</sup> · 정 옥 봉<sup>2</sup> · 이 재 형<sup>3</sup>

### Effects of Electrical Stimulation on Wound Healing and Skin Mast Cells in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Seung-Joo Jekal<sup>1</sup>, Kyung-Sun Lee<sup>1</sup>, Ok-Bong Chung<sup>2</sup>, and Jae-Hyoung Lee<sup>3</sup>

*Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-711, Korea<sup>1</sup>*

*Department of Clinical Pathology, Jeonju Kijeon College, Jeonju 560-701, Korea<sup>2</sup>*

*Department of Physical Therapy, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-711, Korea<sup>3</sup>*

The aim of this study was to investigate the effect of electrical stimulation on healing of impaired wound and alteration of mast cells in experimental diabetic rats. Thirty male Sprague-Dawley rats were divided into three groups : incision (control), diabetes+incision (diabetes) and diabetes + incision + electrical stimulation (D/ES). Diabetes was induced in rats by streptozotocin (STZ) injection (60 mg/kg, one time) and 20 mm length incision wounds were created on the back after shaving hair. The electrical stimulation rats were treated with a current intensity of 30~50 V at 120 pps and 140  $\mu$ s for 10 days from 3 days after STZ injection. The lesion and adjacent skin tissues were fixed with 10% buffered formalin, embedded with paraffin. For wound healing analysis, hematoxylin-eosin (HE) and picosirius red staining were performed. Mast cells (MC) were stained with toluidine blue (pH 0.5) and quantified at  $\times 200$  using a light microscope. The density of keratinocyte proliferation and microvessels in skin tissues were analyzed using a computerized image analysis system on sections immunostained with proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), respectively. The results showed that the wound healing rate, collagen density and neopidermis thickness, density of PCNA-positive cells and density of  $\alpha$ -SMA-positive vessels were significantly higher in D/ES rats than in diabetic rats. The density of MCs and degranulated MCs in D/ES rats were also significantly higher than those in diabetic rats. These findings suggest that the electrical stimulation may promote the tissue repair process by accelerating collagen production, keratinocyte proliferation and angiogenesis in the diabetic rats, and MCs are required for wound healing of skin in rats.

**Key Words** : Electrical stimulation. Diabetic wound healing, Mast cells, Rat skin

## I. 서 론

교신저자 : 제갈승주, (우)570-750, 전북 익산시 신용동 344-2 원광  
보건대학 임상병리과  
TEL : 063-840-1215  
E-mail : sjjei@wkhc.ac.kr

당뇨병의 유병률은 전세계적으로 매우 급속히 증가하  
고 있고 그 합병증은 공중보건의 심각한 문제가 되고 있

다. 당뇨병 환자의 상처 치유 지연도 당뇨병 합병증의 하나로 잘 알려져 있다(Brem와 Tomic-Canic, 2007; Pavlovic 등, 2007). 상처치유와 조직수복은 응고, 염증, 육아조직 형성, 상피화, 콜라겐 합성, 조직 재형성의 활동적인 일련의 사건이 포함된 복잡한 과정이다(Blakytyny 등, 2000; Jude 등, 2002; Brem와 Tomic-Canic, 2007). 당뇨병에서의 상처치유 악화의 정확한 병인에 대해서는 아직 완전하게 규명되어 있지는 않다. 그러나 당뇨병 환자 및 당뇨병 유발 동물 모형에 대한 연구에서 상처치유 과정의 여러 단계에서 몇몇 비정상 증거들이 발견되었다. 이들 실험에 의하면 당뇨병 유발로 인한 상처치유 지연은 염증 반응, 혈관신생, 섬유증식의 억제 및 콜라겐 침착과 세포 외기질의 분화 결함으로 발생하는 것으로 보고하였다(Goodson와 Hung, 1977; Fahey 등, 1991).

최근 전기자극이 섬유모세포의 활성과 콜라겐 합성능을 촉진시킨다는 연구가 많이 나오고 있다. Bourguignon과 Bourguignon(1987)은 고전압맥동전류(high voltage pulsed current, HVPC)자극이 배양 섬유모세포의 단백질 및 DNA 합성능을 증가시킨다고 하였고, Guzelsu 등(1994)은 전기자극이 닭 배양 힘줄의 섬유모세포에서 DNA 합성을 증가시킨다고 하였다. 또한 Gum 등(1997)은 전기자극이 간의 콜라겐 합성능을 증가시킨다고 하였고 Canseven과 Atalay(1996)는 고전압맥동전류 자극이 토끼 피부 상처치유 과정에서 콜라겐 합성능을 증가시킨다고 하였으며 Lee 등(2007)은 전극자극이 피부의 콜라겐 합성에 관여하는 TGF- $\beta_1$  mRNA와 제 I형 콜라겐 mRNA 발현을 증가시킨다고 보고하였다.

한편 비만세포는 초기 상처치유 과정에서 히스타민, 세로토닌, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )를 분비하여 국소 혈액응고, 백혈구의 혈관밖 유출, 백혈구 동원 등과 같은 상처초기 염증상의 중요한 특징들의 유도에 기여하며(Kauhanen 등, 1998; Ramos 등, 1992; Werner와 Grose, 2003; Deiters 등, 2004), 그로 인해 비만세포는 상처치유 증식기에 섬유모세포, 내피세포, 각질세포 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Maurer 등, 1997; Katayama 등, 1992; Lavi-Schaffer와 Kupietzky, 1990).

이처럼 전기자극이 정상조직 수복과정 또는 상처 치유에 유익한 효과가 있음을 보고하고 있으나 당뇨병에서의 상처 치유 효과에 대해서는 연구가 거의 없는 실정이다.

본 연구의 목적은 streptozotocin(STZ) 유도 당뇨 흰쥐에서 지연된 상처치유에 대한 전기자극의 효과와 비만세포의 변동을 조사하기 위하여 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 피부병변이 없는 생후 9 주, 체중 249.39 $\pm$ 7.88 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(Korea Animal Tech, 평택, 한국) 30 마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 습도는 50~60%로 조절하였고, 매일 광주기는 10 시간 및 암주기는 14 시간이 되도록 하였으며, 고형사료(수퍼피드, 원주, 한국)와 물을 24 시간 완전 자유 급식으로 공급하였다. 30 마리의 흰쥐를 대조군, 당뇨군 및 당뇨/전기자극군에 각각 10 마리씩 무작위로 배정하였다.

### 2. 당뇨유발

당뇨군과 당뇨/전기자극군의 흰쥐에게 당뇨를 유발시키기 위해 신선한 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 streptozotocin(S0130, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) 65 mg/kg을 복강 내 주사하였다. 혈당치는 Accu-Check Advantage glucometer(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN)를 사용하여 STZ 투여 후 3 일후부터 측정하여 확인하였다. 당뇨병 유발 쥐는 실험 내내 고혈당 상태에서 실험을 수행하였다. 모든 흰쥐는 STZ 투여 후 3 일 이후에 당뇨병이 유발되었다. 혈당치가 300 mg/dL 이하의 흰쥐는 연구에서 배제하였다.

### 3. 상처유발

대조군, 당뇨군 및 당뇨/전기자극군의 흰쥐에게 ketamine hydrochloride(유한양행, 서울, 한국) 40 mg/kg과 xylazine hydrochloride(바이엘코리아, 서울, 한국) 5 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 허리부위와 등부위 피부의 털을 전기이발기(HA 944, Hasung Co., Korea)를 사용하여 제거하고 면도날을 사용하여 깨끗이 면도한 다음 75% 알코올로 피부를 소독하고 요추에서 외측으로 2 cm 떨어진 허리에 외과용 메스를 사용하여 20 mm의 전층절개(full-thickness incision)상처를 만들었다. 절개 후 2 차

치유를 유도하기 위해 봉합하지 않았다.

#### 4. 전기자극

당뇨/전기자극군은 생리식염수를 적신 거즈로 상처를 덮고 그 위에 탄소실리콘전극(2×2 cm)을 고정하여 전기자극기의 단자에 연결하였다. 같은 크기의 비활성전극을 상처에서 5 cm 떨어진 등에 고정한 후 전기자극기의 단자에 연결하였다. 고전압맥동전류자극기(EGS<sup>®</sup> 100 SL, Electro-Med Health Industries, Miami, U.S.A)를 사용하여 맥동빈도 120 pps, 맥동기간 140  $\mu$ s, 육안적으로 수축이 일어나지 않는 30~50 V 내외의 강도로 전기자극하였다. 전기자극은 1 회 40 분씩 1 일 1 회 8 일간 시행하였다. 절개 직후부터 3 일까지는 양극을 활성전극으로 하였으며 4 일 후부터는 음극을 활성전극으로 하였다. 당뇨군은 당뇨/전기자극군과 동일한 방법으로 전극을 배치하고 전기자극기를 작동시키지 않았다.

#### 5. 상처치유율 평가

절개 직후부터 최종 처치 직후까지 매일 0.05 mm 단위로 길이를 측정할 수 있는 캘리퍼(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)를 사용하여 육안적으로 관찰되는 상처의 길이를 측정하였다. 매 처치 후 상처길이를 절개 직후의 상처길이로 나누어 백분율로 환산하여 상처치유율로 판정하였다.

#### 6. 조직병리학적 및 면역조직학적 검사

실험동물은 마지막 전기자극 및 대조 처치 직후 에테르 마취 하에 도살하였다. 각 군의 상처부위 피부를 약 1.5×1.5 cm의 크기로 적출하고 조직의 수축을 막기 위해 카드보드에 붙인 다음 즉시 10% 중성완충포르말린 용액에 넣어 고정하였다. 고정한 조직은 자동침투기(Citadel 1,000, Shandon, Life Science International Ltd., Runcorn, England)에 옮겨 알코올에 탈수, 자일렌에 투명 후 파라핀에 포매하였다. 포매조직은 회전식 박절기(rotary microtome HM 340E, Microm Co., Walldorf, Germany)를 사용하여 절개면 중앙부위에서 수직방향으로 4  $\mu$ m의 두께로 박절하여 조직병리학적 관찰을 위해 hematoxylin-eosin(HE) 염색을 하였다.

#### 1) 신생표피 두께의 측정

HE 염색표본으로부터 절개 수복부위와 그 인접조직을 광학현미경 200 배에서 임의로 3 군데의 표피층을 CCD 카메라로 영상을 포착하여 JPG 파일로 저장하였다.

#### 2) 진피내 콜라겐 밀도 비율 측정

상처치유 과정에서 진피내 콜라겐 생성 비율을 보기 위해 micro-sirius red 염색을 하였다. 염색 과정은 Lopez-De Leon와 Rojkind(1985)의 방법을 약간 수정하여 절편을 picric acid 포화수용액에 녹인 0.1% sirius red F3B(Sigma, St. Louis, Mo, USA) 용액에 1 시간 염색한 후 5% acetic acid에 2 회 세척하고 탈수, 투명 및 봉입하였다. 절개 수복부위와 그 인접 진피층을 100 배에서 CCD 카메라(Thosiba U-CMAD-2, Japan)로 영상을 포착하여 JPG 파일로 저장하였다.

#### 3) 피부 비만세포와 탈과립 세포 밀도 측정

비만세포의 검출을 위해 toluidine blue 염색을 하였다. Toluidine blue 염색을 위해서는 Enerback(1966)의 방법을 약간 수정하여 0.5% toluidine blue(0.5 N HCl에 용해한 후 농염산으로 pH 0.5으로 조정)(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 옮겨 1 시간 30 분간 염색한 다음 증류수에 5 분간 세척한 후 대조염색없이 수돗물에 행군 후 탈수, 투명화하여 Permount로 봉입하였다. Toluidine blue로 염색한 조직표본에서 절개 수복부위와 그 인접 진피층을 400 배에서 CCD 카메라로 영상을 포착하여 JPG 파일로 저장하였다.

#### 4) 각질세포 증식능 및 미세혈관 밀도의 측정

4  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하여 ProbeOn<sup>™</sup> Plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.A)에 붙이고 58°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈과립, 하강 계열알코올에 함수한 다음 각화세포의 증식능을 보기 위해 proliferative cell nuclear antigen(PCNA)와 혈관 신생을 보기 위해  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) 면역조직화학염색을 MicroProbe System(Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.A)을 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정을 간단히 요약하면 절편을 수세 후 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)에 넣어 압력솔(Cell marque, Austin, TX,

USA)에서 15 분간 항원부활을 하였다. 이어 조직 내 내인성 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 3% hydrogen peroxide로 45°C에서 5 분간 작용시킨 후, DNA/Immuno buffer(Invitrogen, Carlsbad, USA)으로 세척한 다음 비특이적 반응을 차단하기 위해 protein block(Dako, Grostrup, Denmark)에서 45°C에서 20 분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 mouse anti-PCNA(Dako, Grostrup, Denmark)와 mouse anti-human  $\alpha$ -SMA(Dako, Grostrup, Denmark)를 1:400으로 희석하여 실온에서 30 분간 작용시킨 다음 DNA/Immuno buffer로 적당히 세척하고 Dako Envision Detection kit를 사용하여 45°C에서 30 분간 작용시켰다. 그 후 DAB로 45°C에서 5 분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 Permount로 봉입하였다.

PCNA와  $\alpha$ -SMA 면역염색표본으로부터 절개 수복부위와 그 인접부위의 상피층과 진피층에서 각각 200 배율에서 CCD 카메라로 영상을 포착하여 JPG 파일로 저장하였다.

### 7. 영상분석

모든 저장된 영상의 분석을 위해서는 컴퓨터 영상분석 프로그램(Image-Pro<sup>®</sup> Plus ver 3.01, Media Cybernetics Inc., Georgia, USA)을 사용하여 시행하였다. 신생표피 두께 계측은 저장된 영상 내의 각질층을 배제한 표피층의 두께를 측정하여 평균 두께를 산출하였으며, 콜라겐 밀도는 저장된 영상 내의 적색으로 염색된 콜라겐의 면적을 계측하여 영상의 총 면적으로 나누어 단위면적 당 콜라

겐이 차지하는 비율(%)을 산출하였다. 비만세포와 탈과립세포 밀도, PCNA-양성 각질세포와  $\alpha$ -SMA-양성 미세혈관 밀도는 1 mm<sup>2</sup> 당 평균 수로서 산출하였다.

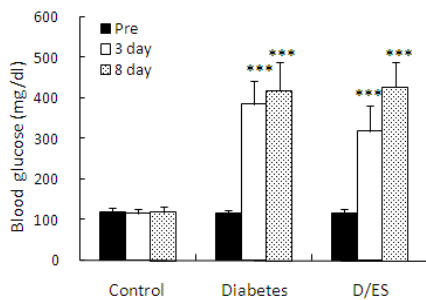
### 8. 통계분석

각 군간 체중, 혈당치, 상처치유율, 신생표피 두께, 비만세포 및 탈과립 비만세포 밀도, PCNA-양성세포 밀도 그리고  $\alpha$ -SMA-양성 미세혈관 밀도의 차이를 비교하기 위해 일원분산분석(one-way ANOVA test)을 하였으며, 유의한 차이가 있을 경우 Turkey's multiple range test로 사후 검정하였다. 통계학적 유의수준은 0.05로 하였으며 통계분석에는 SPSS ver 10.0 프로그램을 사용하였다.

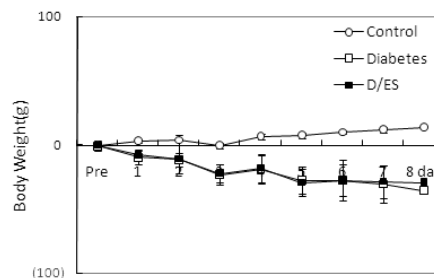
## III. 결 과

### 1. 혈당치와 체중의 변화

각 군 흰쥐의 혈당을 반복측정 분산분석한 결과 시간이 경과함에 따라 혈당이 유의하게 변화하였으며 (p<0.001), 세 군간 유의한 차이(p<0.001)가 있었다. 대조군의 혈당은 시간에 따라 유의한 변화 없이 정상혈당을 유지하였으나, 당뇨군은 STZ투여 3 일 후 혈당이 유의하게 증가하여 10 일 후 418.9±64.17 mg/dL의 고혈당을 유지하였으며, 당뇨/전기자극군도 STZ투여 3 일 후 혈당이 유의하게 증가하여 10 일 후 혈당 428.0±62.59 mg/dL의 높은 혈당을 유지하였다(Fig. 1A).



A



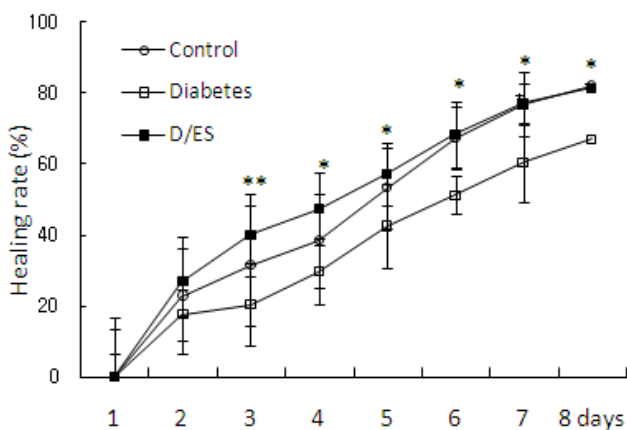
B

**Fig. 1.** Blood glucose level and body weight in rats (n=10 in each group) receiving, respectively, saline only (10 daily I.p. injections), STZ (65 mg/kg, I.p. injection) and STZ/ES in conjunction with 10 daily electrical stimulation). Rats were treated with single dose of STZ to induce hyperglycemia that was lasted until the time of the experiment (A). Diabetic and D/ES rats showed the more body weight loss as compared to control rats (B). \*\*\*, p<0.001 vs control.

각 군 흰쥐의 체중을 반복측정 분산분석한 결과 시간이 경과함에 따라 체중이 유의하게 변화하였으며( $p < 0.001$ ), 세 군간 유의한 차이( $p < 0.001$ )가 있었다. 대조군은 시간이 경과함에 따라 체중이 유의하게 증가하였으며 8 일 후 14.46% 증가하였다. 반면 당뇨군과 당뇨/전기자극군은 시간이 경과함에 따라 체중이 유의하게 감소하였으며 8 일 후 각각 34.83%, 28.41% 감소하였다(Fig. 1B).

## 2. 상처치유율

각 군의 상처치유율을 반복측정 분산분석 결과 시간이 경과함에 따라 상처치유율이 유의하게 변화하였으며( $p < 0.001$ ), 세 군간 유의한 차이( $p < 0.01$ )가 있었다. 당뇨/전기자극군의 상처치유율은 절개 후 3 일부터 당뇨군보다 유의하게 증가하였으나 대조군과는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Wound healing rate of full-thickness incisional skin in respective groups. Healing of full-thickness incisional skin wound is impaired in diabetic rats as compared to control and D/ES rats. \*\*:  $p < 0.01$  vs diabetes group, \* $< 0.05$  vs diabetes group.

## 3. 조직변화 및 콜라겐 밀도의 비교

3 군 모두에서 절개부위에 적은 양이지만 염증세포가 남아 있었으며, 섬유모세포들도 관찰되었다. 당뇨군 흰쥐는 대조군에 비해 염증세포가 많고 섬유모세포가 적었으며 미숙한 아교질이 많이 출현하였으나, 당뇨/전기자극군은 당뇨군 흰쥐에 비해 염증세포가 적게 출현하였으며

섬유모세포의 수가 많고 성숙한 콜라겐이 많이 관찰되었다. Picro-sirius red 염색결과 표층부에 표면과 평행하게 배열된 얇고 황색을 띤 미성숙 콜라겐이 여전히 관찰되었으나 심부에서는 교차 구성을 보이는 좀더 두껍고 성숙된 적황색의 콜라겐 섬유가 출현하였다(Fig. 3).

## 4. 비만세포의 분포 및 밀도 변화

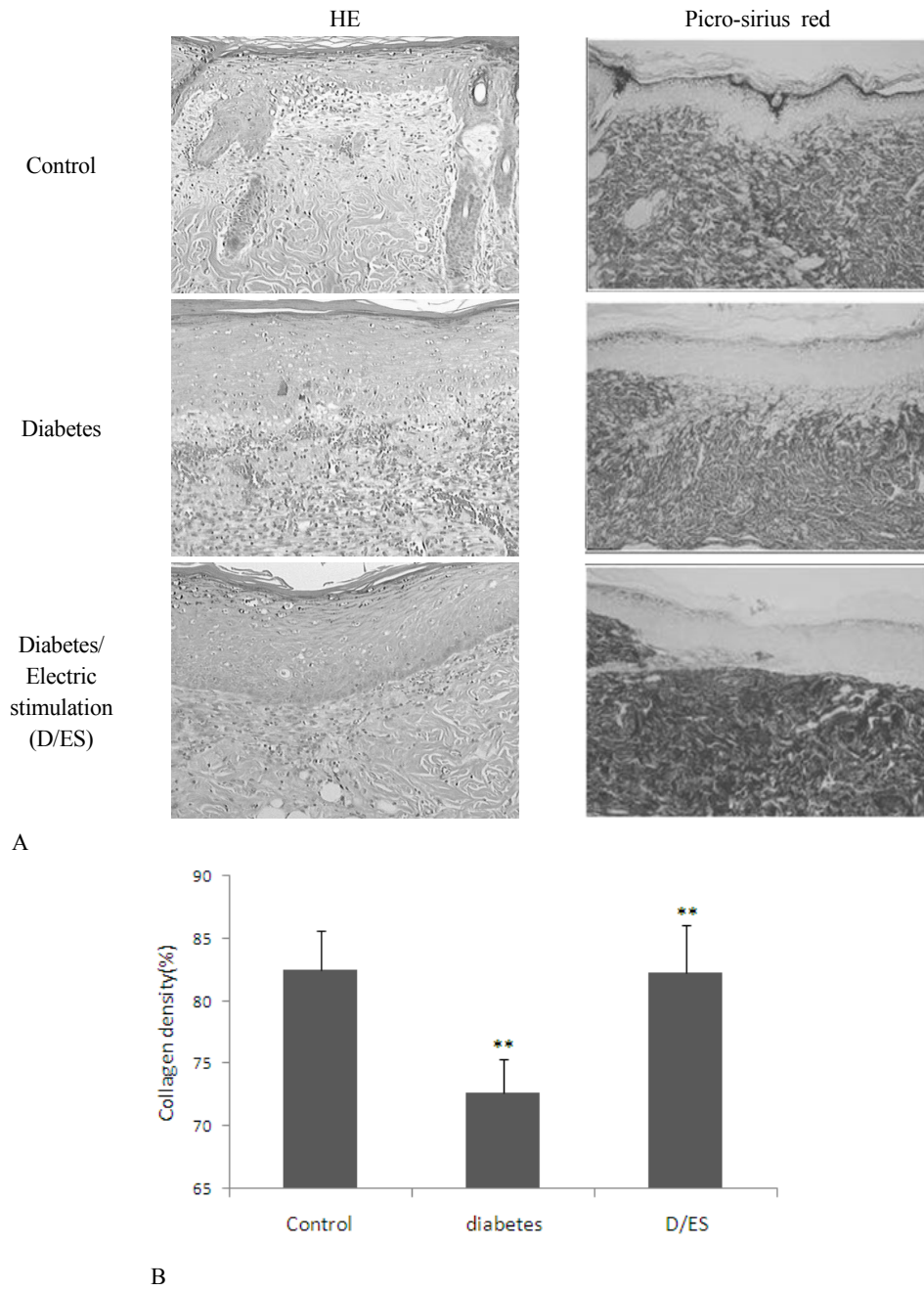
비만세포는 세 군 모두 육아조직의 심부에 주로 출현하였고 그 대부분은 난원형으로 혈관 가까이에서 분포하였으며 과립형과 탈과립형의 두 형태로 관찰되었다(Fig. 4).  $1 \text{ mm}^2$  당 평균 비만세포 수는 대조군에 비해 당뇨군에서 통계학적으로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.01$ ), 당뇨/전기자극군에서는 당뇨군에 비해 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 탈과립 비만세포의 평균 수에 있어서도 대조군에 비해 당뇨군에서 통계학적으로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.01$ ), 당뇨/전기자극군에서는 당뇨군에 비해 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ )(Fig. 5).

## 5. 각질세포 증식능과 신생표피 두께의 변화

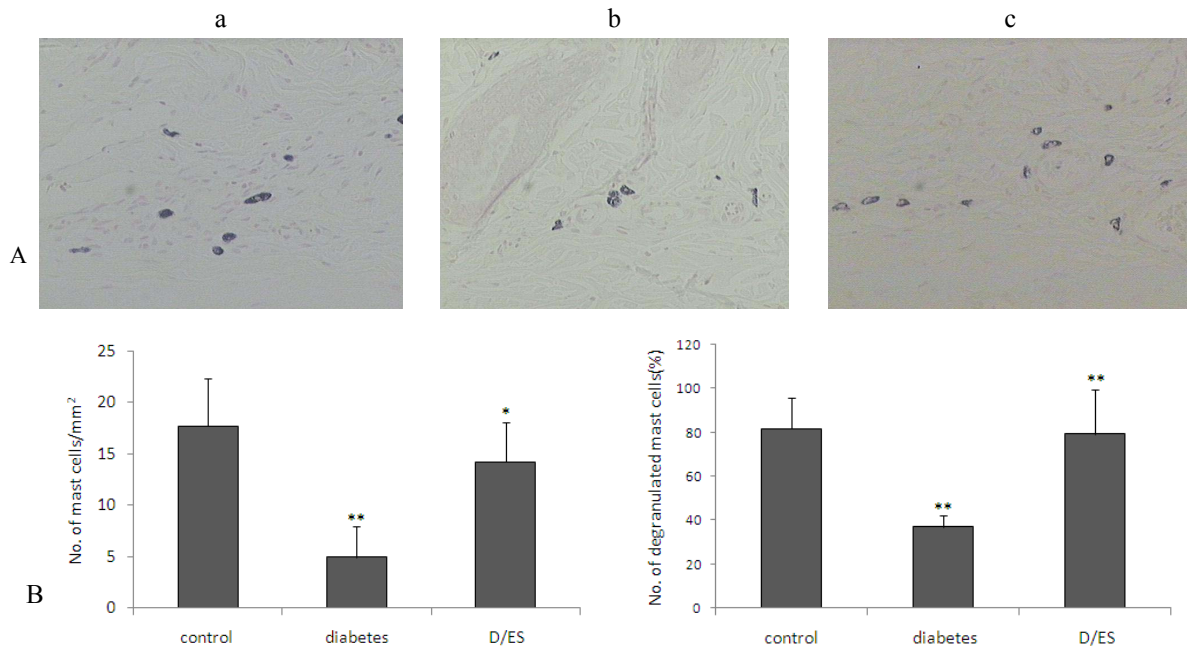
표피층의 재생은 당뇨군과 당뇨/전기자극군의 일부를 제외하고 모든 군에서 피부 절개 후 10 일에 완전하지는 않았으나 거의 대부분 상피의 재형성이 이루어졌다. 신생표피 두께 형성에 관여하는 각질세포의 증식능의 지표가 되는 PCNA염색 결과에서 PCNA 양성은 주로 표피 바닥 세포층, 털주머니 상피층 및 섬유모세포에서 관찰되었다. 당뇨군의 PCNA-양성세포 밀도는 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며( $p < 0.001$ ), 당뇨/전기자극군은 당뇨군에 비해 유의한 증가를 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 5A와 B). 신생표피의 평균 두께는 대조군에 비해 당뇨군에서 통계학적으로 유의하게 얇았으며( $p < 0.001$ ), 당뇨/전기자극군에서는 당뇨군에 비해 유의하게 두꺼워져( $p < 0.05$ )(Fig. 5C), PCNA-양성세포의 밀도 증가와 신생표피 두께의 변화가 일치하였다.

## 6. 미세혈관 밀도의 변화

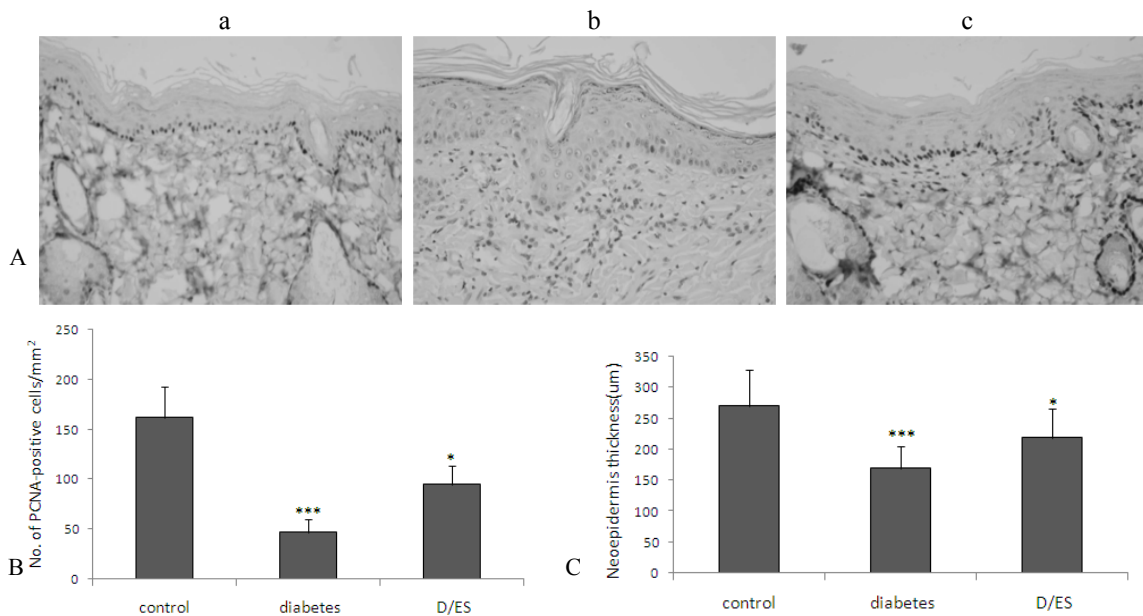
피부 재생과정에서 미세혈관 밀도를 함께 관찰하기 위해  $\alpha$ -SMA 면역염색을 한 결과 미세혈관은 주로 절개부위 가까이에서 위치한 진피 유두층과 심부에 출현하였다.  $\alpha$ -SMA-양성 미세혈관 밀도는 대조군에 비해 당뇨군에



**Fig 3.** Histologic change and collagen density in control, diabetic and D/ES groups at day 10 after incision wounding (A). Diabetic group shows a higher amount of fibroblasts, inflammatory cells and collagen fibers in granulation tissue of dermal papillary layer than control and D/ES group. Hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ . Picro-sirius red staining,  $\times 200$ . The collagen density was significantly lower in diabetic group than in control and D/ES groups (B). \*\*:  $p < 0.01$  vs control group, \*\*:  $p < 0.01$  vs diabetic group.



**Fig. 4.** Mast cells in control (a), diabetic (b) and D/ES group (c). Toluidine blue, pH 0.5.  $\times 200$  (A). The density of mast cells and degranulated cells were significantly higher in D/ES group than in diabetic group (B). \*\*:  $p < 0.01$  vs control group, \*:  $p < 0.05$  vs diabetic group.



**Fig. 5.** PCNA-positive cells in control (a), diabetic (b) and D/ES group (c) at day 10 after incision wounding. Immunohistochemical staining,  $\times 200$ . PCNA-positive cells present along basal cell layer of epidermis and hair follicles (A). The density of PCNA-positive cell was significantly higher in D/ES group than in diabetic group (B). Neoepidermis thickness was also significantly higher in D/ES group than in diabetic group (C). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs control group. \*:  $p < 0.05$  vs diabetic group

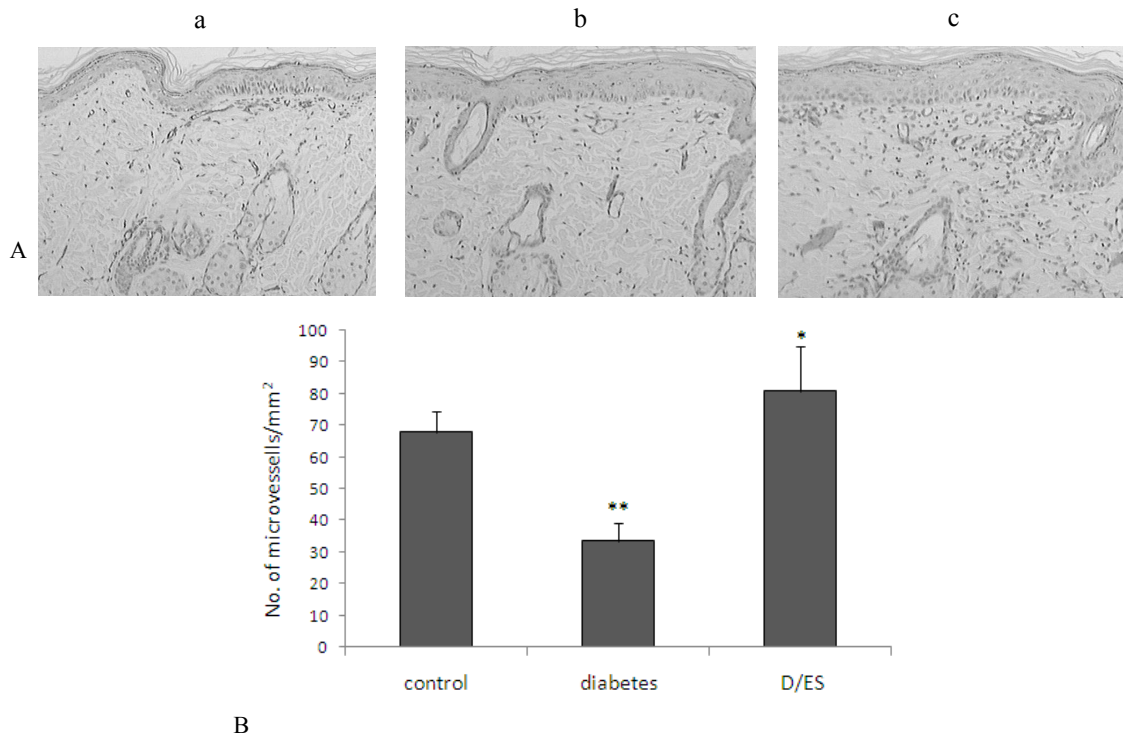
서 유의하게 감소하였고( $p<0.01$ ), 당뇨/전극자극군에서는 당뇨군에 비해 유의한 증가를 보였다( $p<0.05$ ). 특히 신생 혈관 주위에는 비만세포가 많이 출현하였다.

#### IV. 고 찰

당뇨병에 의한 상처 치유의 악화 기전은 복잡하며, 그 기전에는 혈관, 신경, 면역기능 및 비정상적 생화학적 변화가 포함되어 있는 것으로 보고되어 있다(Blakytmy와 Jude, 2006; Brem과 Tomic-Canic, 2007). 실험적 연구에서 당뇨병 환자에서 관찰되는 피부 상처치유 지연의 병리학적 특징은 유전적 또는 화학적으로 유도된 당뇨흰쥐 또는 생쥐의 실험모델과 거의 비슷한 것으로 알려져 있다(Tsuboi 등, 1992; Blakytmy와 Jude, 2006). STZ는 선택적으로 췌장의  $\beta$ -세포를 파괴하여 인슐린 합성과 분비

를 억제하여 고용량 STZ 일회 투여 후 2~3 일 내에 1형 당뇨병을 유발하며, STZ 유도 당뇨병은 전형적으로 여러 합병증을 동반한다(Seifter 등, 1981; Tsuboi 등, 1992; Connelly 등, 2007). 고혈당과 관련된 당뇨병 환자에서의 상처치유 악화도 이미 잘 알려져 있다(Blakytmy와 Jude, 2006; Brem과 Tomic-Canic, 2007). 따라서 본 연구에서는 STZ 유도 당뇨흰쥐를 당뇨병 상처 치유 연구의 당뇨병 모델로 사용하였다.

고전압맥동전류는 단상맥동전류로 맥동기간과 맥동간격의 비가 1 : 90 정도로 매우 짧고 전 맥동기간에 걸쳐 형성되는 평균전류는 1.5~2.0 mA에 지나지 않아 생체에 조직 손상 없이 비교적 안정하다(Lee 등, 2007). 본 연구는 고전압맥동전류에 의한 전기자극이 STZ유도 당뇨흰쥐의 악화된 상처 치유에 있어 상처치유율, 육아조직 형성에 있어서 비당뇨흰쥐의 자연 상처와 거의 비슷하게 향상된 치료효과를 보여 주었다. 또한 당뇨 흰쥐에 비해



**Fig. 6.** Microvessel density in control (a), diabetic (b) and D/ES group (c) at day 10 after incision wounding. Immunohistochemical satining,  $\times 200$ .  $\alpha$ -SMA-positive microvessels show a small dark brown ring in dermal papillary layer. The density of  $\alpha$ -SMA-positive microvessel was significantly higher in D/ES group than in diabetic group (B). \*\*:  $p<0.01$  vs control group, \*:  $p<0.05$  vs diabetic group.



당뇨/전기자극군에서 비만세포 및 탈과립세포의 증가와 함께 표피층의 두께 및 각질세포 증식능이 뚜렷이 증가하는 것은 탈과립 과정에서 방출된 히스타민과 헤파린이 쥐의 표피각질세포의 분열촉진 효과를 발휘한다는 결과와 일치한다(Maurer 등, 1997; Katayama 등, 1992). 더욱이 비만세포는 상처치유 과정에서 섬유모세포의 증식과 이주를 자극하며 섬유모세포의 증식과 혈관생성을 조절할 수 있음도 보고되어 있다(Maurer 등, 1997). 이는 본 실험에서 당뇨군에 비해 당뇨/전기자극군에서 육아조직 형성이 비교적 빠르게 진행되고 신생혈관이 증가한 것은 전기자극에 의해 비만세포의 증가가 증가와 함께 탈과립이 증가되어 방출된 중개제들에 의해 섬유모세포 및 내피세포의 증식이 촉진된 결과로 생각된다. 일부 연구에서도 비만세포는 상처치유 동안 nitric oxide(NO)를 합성하며 NO합성의 억제제는 미세혈관 투과성과 백혈구 침윤을 증가시키는 비만세포의 탈과립과 히스타민 방출을 강화시킨다고 보고하였다(Masini 등, 1991).

조직치유 동안에 각질세포의 이동과 증식은 독립적으로 발생한다. 조직 손상 후 각질세포는 표피를 재형성하기 위해 상처 가장자리로 이주하며, 이주를 마친 각질세포는 증식하여 표피를 재구성한다(Metze와 Luger, 2001). 각질세포의 증식과 이주는 transforming growth factor- $\beta$  1(TGF- $\beta$  1), vesicular endothelial growth factor(VEGF) 그리고 epidermal growth factor(EGF)를 포함하는 몇 가지의 성장인자에 의해 조절에 의해 이루어진다(Singer와 Clark, 1999; Stallmeyer 등, 1999). 본 연구에서 전기자극 흰쥐는 당뇨흰쥐에 비해 상처유발 10 일 후에 신생표피 두께가 뚜렷이 증가함을 보여 주었다. 이 같은 신생표피 두께의 증가는 전기자극이 각질세포의 증식을 증가시키는 EGF 증가에 기인하는 것으로 보여진다.

혈관신생은 정상 상처치유의 중요한 요소의 하나이며, 이 과정에서 NO는 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ziche와 Morbidelli, 2000). 또한 NO는 VEGF와 TGF- $\beta$  1의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Vodovotz 등, 1999). Ma와 Wallace(2000)는 위궤양 치유동안 endothelial nitric oxide synthase(eNOS) 억제제가 육아조직 내 혈관신생을 악화시킨다고 하였고, Amadeu와 Costa(2006)는 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)-처리 흰쥐에서 상처 후 21 일에서 육아조

직의 심부 내 혈관 부피가 대조군에 비해 감소하였으며, 이 변화는 비만세포와 신생혈관인자들의 양적 변화와 관련되어 있다고 하였다. 즉 비만세포는 혈관신생을 자극하고 히스타민은 내피세포 성장, 미세혈관 투과성 및 혈관 확장을 자극하기 때문에 본 실험에서 전기자극이 상처유발 후 10 일에 상처부위에서 비만세포 수와 탈과립세포 수를 증가시켜 히스타민 방출을 강화시켰을 것으로 추정한다. 또한 같은 시점에 당뇨/전기자극군의 혈관 부피 밀도가 대조군과 유사하게 증가된 것과 당뇨 흰쥐에서 혈관 밀도의 감소된 것 역시 육아조직 내에 비만세포의 감소에 기인한 것으로 생각된다.

이를 종합해 볼 때 본 연구를 통하여 전기자극이 STZ 유도 당뇨 흰쥐에서 상처치유 악화를 개선할 수 있음을 보여주었다. 이 결과는 전기자극이 염증세포 동원 및 이주를 증가시키고, 상처부위에서 비만세포의 기능을 자극하여 표피세포의 증식을 자극하며 섬유모세포의 증가와 혈관밀도를 증가시킴으로써 상처치유 향상에 기여함을 시사한다. 또한 전기자극이 피부 상처치유의 초기에 비만세포의 증가가 사이토카인과 성장인자 방출에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 앞으로 당뇨 환자의 피부 상처치유에 있어 전기자극의 정확한 역할을 규명하기 위해서는 이 실험모델에서 전기자극으로 인한 비만세포의 증가가 상처치유에 관여하는 사이토카인이나 성장인자와 같은 분자 발현에 어떻게 영향을 미치며, 주변 세포들과는 어떻게 상호 관련되어 있는가에 대한 조사가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008학년도 원광보건대학 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

## 참고 문헌

1. Amadeu TP, Costa AMA. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol* 33(7):465-473, 2006.

2. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 23(6):594-608, 2006.
3. Blakytyn R, Jude EB, Martin Gibson J, Boulton AJ, Ferguson MW. Lack of insulin-like growth factor 1(IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *J Pathol* 190(5): 589-594, 2000.
4. Bourguignon GJ, Bouruignon LY. Electrical stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblast. *FASEB*. 1(5):398-402, 1987.
5. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117(5):1219-1222, 2007.
6. Canseven AG, Atalay NS. Is it possible to trigger collagen synthesis by electrical current in skin wound? *Indian J Biochem Biophys.* 33(3):223-227, 1996.
7. Connelly K, Kelly D, Gilbert R. Clinically relevant models of diabetic cardiac complications. *Circ Res* 101(6):78-80, 2007.
8. Deiters U, Barsig J, Tawil B, Muhlrad F. The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* 13(12):731-739, 2004.
9. Fahey TJ 3rd, Sadaty A, Jones WG 2nd, Barber A, Smoller B, Shries GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res* 50(4):308-313, 1991.
10. Goodson WH 3rd, Hung TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res* 22(3):221-227, 1977.
11. Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil* 76(4):288-296, 1997.
12. Guzelsu N, Salkind AJ, Shen X, Patel U, Thaler S, Berg RA. Effect of electromagnetic stimulation with different waveforms on cultured chick tendon fibroblasts. *Bioelectromagnetics* 15(2):115-131, 1994.
13. Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K. Mast-cell-derived mediators induce epidermal cell proliferation: clue for lichenified skin lesion formation in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 98(4):410-414, 1992.
14. Kauhanen P, Kovanen PT, Reunala T, Lassila R. Effects of skin mast cells on bleeding time and coagulation activation at the site of platelet plug formation. *Thromb Haemost* 79(4):843-847, 1998.
15. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19(6):440-447, 2002.
16. Lee JH, Lee JS, Park RJ, Park CE. Electrical stimulation induces TGF- $\beta$ 1 mRNA expression and collagen deposition in skin wound of rat. *4th World Congress of International Society of Physical and rehabilitation Medicine*. 10-14 June, Seoul, 2007.
17. Levi-Schaffer F, Kupietzky A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Exp Cell Res* 188(1):42-49, 1990.
18. Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2):G341-346, 2000.
19. Masini E, Salvemini D, Pistelli A, Mannaioni PF, Vane JR. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. *Agents Actions* 33(1-2):61-63, 1991.
20. Maurer M, Opitz M, Hens BM, Paus R. The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-alpha inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci* 16(1): 79-84, 1997.
21. Metze D, Luger T (eds). *The biology of the skin*. New York: Parthenon Publishing, pp265-270, 2001.
22. Pavlovic MD, Milenkovic T, Dinic M, Misovic M, Dakovic D, Todorovic S, Dakovic Z, Zecevi RD,

- Doder R. The prevalence of cutaneous manifestation in young patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 30(8):1964-1967, 2007.
23. Ramos BF, Zhang Y, Angkachatchai V, Jakschik BA. Mast cell mediators regulate vascular permeability changes in Arthus reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 262(2):559-565, 1992.
24. Seifter E, Rettura G, Padawer J, Stratford F, Kambosos D, Levenson SM. Impaired wound healing in streptozotocin diabetes. Prevention by supplemental vitamin A. *Ann Surg* 194(1):42-50, 1981.
25. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341(10):738-746, 1999.
26. Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 113:1090~1093, 1999.
27. Tsuboi R, Shi CM, Rifkin DB, Ogawa H. A wound healing model using healing-impaired diabetic mice. *J Dermatol* 19(11):673-675, 1992.
28. Vodovotz Y, Chesler I, Chong H et al. Regulation of transforming growth factor beta I by nitric oxide. *Cancer Res.* 59:2142~2144, 1999.
29. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83(3): 835-870, 2003.
30. Ziche M, Morbidelli I. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 50: 139~142, 2000.