

비침습식 미세전류자극이

토끼 경골의 골절 후 BMP-4 발현에 미치는 영향

Effects of Non-Invasive Constant Microcurrent Stimulation on
Expression of BMP-4 After Tibia Fracture in Rabbits조미숙
영동대학교Cho mi-suk
Youngdong Univ.

요약

골절 후 골 유합에 대한 미세전류자극의 효과를 관찰하기 위하여 체중 2.5~3 kg내외의 6개월령 뉴질랜드 옹성 토끼 24마리를 대상으로 경골 골절 후 미세전류 자극을 적용한 실험군과 비적용군인 대조군으로 나누어 3일, 7일, 14일 및 28일 후 BMP-4에 대한 면역조직화학적 염색을 실행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

BMP-4의 발현은 비침습식 미세전류를 적용한 실험군과 자연치유군인 대조군 모두 시간이 경과함에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하다가 감소되었다. 그러나 실험군에서 경골 골절 3일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)을 보였다. 경골 골절 7일 후 대조군은 하버씨계의 동심원과 간질층판을 중심으로 중등도의 갈색의 면역양성반응(++)을 보였으나 실험군의 경우 바깥층판을 포함하여 매우 강한 갈색의 면역양성반응(++++)을 보였다. 경골 골절 14일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판과 동심원을 중심으로 강한 갈색의 면역양성반응(+++)을 보였으며 실험군 또한 강한 면역양성반응(+++)을 보였다. 그 후 점차 감소하여 경골 골절 28일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)을 보였다.

위의 결과로 보면 골절 후 미세전류를 비침습적으로 적용할 때 치유과정 초기에 골형성단백질인 BMP-4의 발현을 증가시켜 골절 치유를 촉진시킬 수 있다.

■ 중심어 : | 골형성단백질 | 미세전류 | 경골골절

Abstract

This study aims to examine the effects of non-invasive constant microcurrent stimulation on expression of Bone Morphogenetic Protein(BMP) 4 after tibia fracture in rabbits. Twenty four rabbits with tibia fracture were randomly divided into control and experimental groups. Each group was divided into four subgroups, based on the duration of the experiment (3, 7, 14, 28 days). The experimental groups received a constant microcurrent stimulation of 20~25 μ A intensity with surface Ag-AgCl electrode (diameter 1cm, Biopac, U.S.A.) for 24 hours a day. Cathode of the microcurrent stimulator located on the tibia directly, anode of it did on the gastrocnemius muscle. Rabbits were sacrificed on each of the postoperative days 3, 7, 14, 28. To investigate how non-invasive constant microcurrent stimulation affects bone healing, immunohistochemical analysis of BMP-4 was performed at each point. After evaluation, the test results are as follows: Comparisons of immunohistochemical observation of BMP-4 in 7 days after tibial fracture show that there was shown to be a moderate positive reaction (++) on concentric circles of Harversian system and the interstitial lamella in the control group, while there was a very strong positive reaction (++++) on concentric circles of Harversian system and interstitial lamella in the experimental group. These results suggest that applying non-invasive constant microcurrent stimulation on fractured bone is helpful to bone healing.

■ Key Words : | Bone Morphogenetic Protein 4 | Microcurrent Stimulation | Tibia Fracture |

I. 서론

골유합은 다양한 성장인자, 분화인자, 호르몬 cytokine과 세포의 기질 성분을 포함한 여러 국소적, 전체적 조절 인자들의 조화로운 작용에 의해 이루어진다. 이 가운데 골형성단백질(bone morphogenetic protein; BMP)그룹이 골절치유 과정 중 세포 증식, 연골 형성, 골 형성의 일련의 과정에서 핵심적인 역할을 하는 것이 많은 연구 논문들에 의해 보고되었다[1][2].

골절치유 상황에서는 대부분의 BMP 그룹이 골 형성을 증진시키는 데 관여한다고 할 수 있다. 이 가운데 특히 BMP-2, 4, 7(OP-1)이 골 형성 과정에서 주로 작용한다고 보고되었다[3]. BMP 그룹은 골 형성 과정의 가장 초기에서부터 무기질화의 완성 단계까지 다양한 과정에 작용하는데 특히 치유의 초기 단계인 골절 후 2주까지 왕성한 발현을 나타낸다고 보고되었다[4][5][6].

골절치유를 위해 사용되고 있는 전기치료로는 초음파, 직류전류, 맥동전자기장, 전기장과 전자기장 등이 있다. 최근에 이르러서는 전체 전류량은 줄이고 전압은 높여서 치료효과를 극대화 시키는 미세전류를 이용한 전기자극이 점점 대중적인 치료 모달리티(modality)로 인식되고 있다[7]. 현재 임상에서 많이 사용 중인 미세전류 통전에 이용되는 침습식 전극과 반침습식 전극은 골절치료를 위해 정확한 위치를 설정할 수 있고 전류의 흐름을 정확하게 조절할 수 있다. 이 방법은 보통 금속성 내부고정과 함께 이용되고 있다. 그러나 전극의 삽입 또는 제거 시 수술이 필요하며 이때 감염의 위험성이 상당히 높을 뿐만 아니라 삽입된 전극이 깨어질 가능성 또한 높다.

따라서 본 연구는 토끼 경골 손상골절 후 음극전극과 양극전극 모두를 표면전극을 이용하여 피부 표면에 부착시키는 비침습식 미세직류전류를 적용할 때 골절치유 과정에서 나타나는 골유합을 촉진시키는 화학적 매개체 가운데 BMP-4의 발현을 면역조직화학적으로 관찰하여 비침습식 미세직류전류 자극이 골유합에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물

본 연구에서는 체중 2.5~3 kg 내외의 6개월령 뉴질랜드 옹성 토끼 24마리를 사용하였다. 실험 전 처치 후 실험군은 20~25 μ A 범위의 지속적인 미세직류전류를 비침습식으로 24시간 적용한 뒤 미세전류 적용 기간별로 각각 3일군(3마리), 7일군(3마리), 14일군(3마리) 및 28일군(3마리) 등으로 분류하였다. 대조군은 미세전류를 적용하지 않고 각각 3일군(3마리), 7일군(3마리), 14일군(3마리) 및 28일군(3마리) 등으로 무작위 배정하였다.

2. 실험방법

2.1 실험전 처치

실험동물을 케타민을 이용하여 마취시킨 후 우측 뒷다리 내측의 피부를 절개하고 경골에 붙어 있는 근막을 분리시킨 후 골절을 유발시킬 부위의 골막을 일정부분 제거한 뒤 경골 밑으로 핀셋을 집어넣어 골절시킬 부위를 결정하고 가는 전기절단기를 경골의 횡으로 관통시켜 완전골절을 유발시켰다. 수술찌꺼기를 제거하고 소동물용 7-hole plate을 골절된 경골 위에 부착시켜 경골의 굴곡 정도와 맞춘 다음 토끼의 경골 표본과 비교하여 정상 위치로 각도를 설정한 뒤 스크루(screw)를 박고 C-arm을 이용해 골절접합의 이상유무를 관찰한 뒤 근막과 피부를 봉합하였다. 완전 골절을 유발시킨 실험군은 전단력에 의한 과도한 가관절증(pseudoarthrosis)을 방지하기 위해 미세전류를 적용하지 않는 안쪽에 브레이스(brace)를 대어 고정시켰다.

2.2 미세전류 적용

전원은 9V의 어댑터를 사용하였고 저항기를 달아 저항의 변화에 영향을 받지 않고 지속적으로 20~25 μ A 범위의 일정한 출력강도를 갖는 미세전류기를 실험실에서 자체 제작하였다. 전극은 직경 1 cm의 Ag-AgCl 전극(Biopack, U.S.A.)을 사용하였다. 수술 후 마취에서 깨어난 직후부터 실험기간 동안 하루 24 시간 동안 지속적으로 미세직류전류를 비침습적으로 적용하였다. 음극전극은 골절 부위 인 경골 전면에 근육이 없는 부위의 피부 표면에 부착하고, 양극전극은 골절 부위에서 약간 떨어진 경골 후면의 비복근 부위에 부착하였다.

미세전류 적용기간 동안 날마다 전극 부착 부위에 주사기를 이용하여 전도젤을 주입하여 피부저항을 최소화하였다. 자극 기간 동안 2~3일 간격으로 전류의 강도를 확인하고 전극 부착 부위의 합병증 등의 변화를 확인하였다.

3. 조직학적 검사

3.1. 조직절편 제작

실험동물들은 각 해당시간에 ketamine hydrochloride와 xylazine hydrochloride를 체중 100 g 당 .15 ml 및 .05 ml 씩 섞어 카테터를 이용해 혈관 내 주사하여 마취시킨 다음 심장을 통해 4% paraformaldehyde-lysine-periodate(PLP)로 관류고정을 시행하였다. 골절 유발 후 각 해당 시간에 실험동물의 골절부위를 절제한 뒤 동일 고정액으로 후고정(4℃, overnight)을 시행하였다. 후고정 후 조직절편은 EDTA 용액에 침전시켜 탈회시켰다. 완전 탈회가 이루어진 것을 육안으로 확인한 후 동결보호(Cryoprotection, 20% sucrose, 4℃, overnight)를 거친 다음 통상적 방법으로 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 파라핀 포매한 뒤 미세절단기(Model Bright5040, Bright, U.S.A.)를 사용하여 10 μm 두께의 조직절편을 제작하였다.

3.2. BMP-4 분석을 위한 면역조직화학염색

시간경과에 따른 BMP-4의 발현 정도를 비교하기 위해 BMP-4에 대한 일차항체인 mouse anti-BPM IgG(Vector Lab, Inc., U.S.A.)를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 조직절편 위에 일차항체를 침적시켜 실온에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시켰는데 일차 항체의 희석은 1:500의 농도로 .1M PB에 1% normal goat serum과 .3% TritonX-100이 혼합된 것을 사용하였다. 조직절편을 실온에서 10분간 3회 .1M phosphate buffer(PB)로 세척한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector Lab, Inc., U.S.A.)에 1:25의 농도로 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 .1M PB로 15분간 3회 세척한 뒤 ABC(Avidin-Biotin Complex)(Vector Lab, Inc., U.S.A.) 용액에 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며 .3% 3',3'-diaminobenzidin(DAB)에 과산화수소수를 .005%되게 첨가하여 갈색반응을 실시하였다. 면역조직

화학염색이 끝난 조직들은 통상적으로 탈수, 투명화과정을 거친 뒤 PMM(permanent mounting media)인 Clarion(Biomedica, U.S.A.)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

4. 분석방법

미세전류 적용 후 적용 기간에 따른 실험군과 대조군과의 BMP-4발현위치 및 상대적 발현 정도를 비교하기 위해서 면역조직화학법을 적용한 후 광학현미경(Model BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

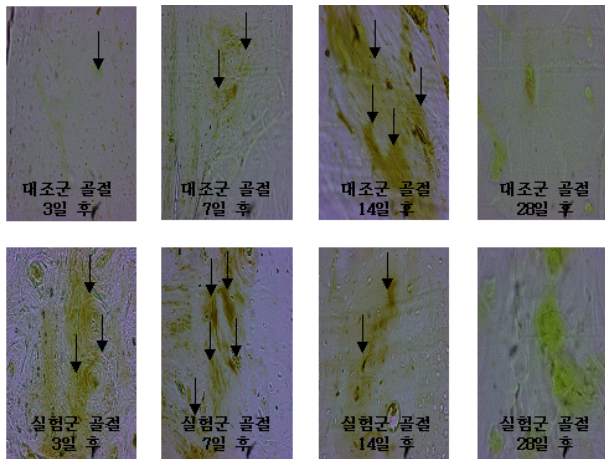
III. 결과

토끼의 경골 골절 후 미세직류전류자극에 의한 경골 내 BMP-4의 발현 변화를 면역조직화학적 방법을 이용해 비교 관찰하였다. 경골 골절 3일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)을 보였다. 경골 골절 7일 후 대조군은 하버씨계의 동심원과 간질층판을 중심으로 중등도의 갈색의 면역양성반응(++)을 보였으나 실험군의 경우 바깥층판을 포함하여 매우 강한 갈색의 면역양성반응(++++)을 보였다. 경골 골절 14일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판과 동심원을 중심으로 강한 갈색의 면역양성반응(+++)을 보였으며 실험군 또한 강한 면역양성반응(+++)을 보였다. 그 후 점차 감소하여 경골 골절 28일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)을 보였다(그림 1, 표 1).

표 1. BMP-4 면역반응성

	골절3일후	골절7일후	골절14일후	골절28일후
대조군	+	++	+++	+
실험군	++	++++	+++	++

+ : 약함 ++ : 중등도 +++ : 강함, ++++ : 매우 강함



▶▶ 그림 1. BMP-4 면역반응성(↓ : 발현부위)

IV. 고찰

골절 발생 후 골 유합을 주목적으로 하는 골절의 치료는 다양한 방법으로 발달되어왔다. 최근에는 미세조직학적으로 신생 골의 분화 및 이주 등을 포함한 분자 수준의 연구까지 이루어지고 있다. 이에 따른 골성장인자들의 발견 및 적용에 의해 골유합의 기전에 관한 연구도 획기적으로 진일보하고 있다[8].

Baranowski 등[9]은 각각 .015, .075 와 20 μ A의 일정한 강도의 직류를 공급하는 전기자극기를 이용하여 토끼 경골 골절 후 반침습법을 적용하였다. 다양한 강도의 미세전류를 적용한 다음 21일 경과 후 골수강 내와 피질골의 골밀도를 측정하고 전류강도가 증가함에 따라 지속적으로 증가하다가 약 20 μ A 강도에서 최대로 일어났다고 보고하였다.

본 실험에서 전류의 강도는 선행 연구 결과들을 바탕으로 하였으나 표면전극을 이용한 비침습법임을 고려하여 20~25 μ A를 적용하였다.

최근 in vivo 상에서 골형성을 보고한 연구들 중 IGF-I, PDGF, TGF-beta 및 BMP 등의 다양한 성장인자들의 존재 하에 조직재생을 자극하거나 억제한다는 연구자들에 의하여 성장인자들이 단독 혹은 특이세포표면 수용기들에 결합함으로써 세포 수 증식, 화학주성, 분화, 세포외 기질 합성 및 골 결손회복 조장에 효과적임을 입증하였다[10][11].

Onishi 등[12]은 쥐의 대퇴골 골절 후 외부 고정을 하지 않고 자연 치유 과정에서 BMP-2, 4의 발현 정도

를 연구한 논문에서 BMP가 골절 3일 후 골절 부위 근처의 비후된 골막에서 강하게 발현되다가 골절 7일 후 소주골이 새롭게 형성될 때까지 강하게 또는 중등도로 나타났으며, 그 후 직골이 층판골로 재형성 됨에 따라 점진적으로 감소하다가 28일 이후에는 대부분 사라지는 것을 보고하였다.

본 실험에서는 골형성 단백질인 BMP-4의 반응에 대한 결과 분석에서 실험군은 골절 7일 후 까지 대조군에 비해 강한 면역양성반응을 보였다. 특히 경골 골절 7일 후 실험군은 매우 강한 갈색의 면역양성반응(++++)을 보여, 중등도의 면역양성반응(++)을 보인 대조군에 비해 확인한 BMP-4의 발현을 나타내었다. 이는 골절 시 미세직류전류 자극의 적용은 골형성 단백질 중 골절부위의 가골 형성 및 회복에 강한 역할을 하는 BMP-4의 발현을 활성화 시켜 골절 초기의 회복에 효과적임을 보여주고 있다. 그러나 BMP가 골절 후 3일 후에 발현되기 시작하여 2주안에 거의 감소된다는 선행의 연구들과 본 실험의 결과인 미세직류전류자극이 토끼 경골의 골절치유에서 BMP가 4주까지 지속적으로 발현되는 것이 다소 상이점을 나타냈다[13][14][15][16]. 이는 지속적인 전류 강도의 차이로 인식되고 있지만 이에 대한 후속 연구가 필요하다고 본다.

V. 결론

골절 후 골 유합에 대한 미세직류전류 자극의 효과를 관찰하기 위하여 본 연구에서는 체중 2.5~3 kg내외의 6개월령 뉴질랜드 웅성 토끼 24마리를 대상으로 전기절단기를 이용하여 경골 골절 후 7-hole plate로 연결시킨 뒤 실험동물은 미세직류전류 자극을 적용한 실험군과 비적용군인 대조군으로 나누었고, 시간경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 3일, 7일, 14일 및 28일군으로 나누어 BMP-4에 대한 면역조직화학적 염색을 실행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

BMP-4의 발현은 비침습식 미세전류를 적용한 실험군과 자연치유군인 대조군 모두 시간이 경과함에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하다가 감소되었다. 그러나 실험군에서 초경골 골절 3일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)

을 보였다. 경골 골절 7일 후 대조군은 하버씨계의 동심원과 간질층판을 중심으로 중등도의 갈색의 면역양성 반응(++)을 보였으나 실험군의 경우 바깥층판을 포함하여 매우 강한 갈색의 면역양성반응(++++)을 보였다. 경골 골절 14일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판과 동심원을 중심으로 강한 갈색의 면역양성반응(+++)을 보였으며 실험군 또한 강한 면역양성반응(+++)을 보였다. 그 후 점차 감소하여 경골 골절 28일 후 대조군은 하버씨계의 간질층판을 중심으로 약한 갈색의 면역양성반응(+)을 보였으나 실험군의 경우 중등도의 면역양성반응(++)을 보였다.

위의 결과로 보면 골절 후 미세전류를 비침습적으로 적용할 때 치유과정 초기에 골형성단백질인 BMP-4의 발현을 증가시켜 골절 치유를 촉진시킴을 알 수 있다.

■ 참고 문헌 ■

- [1] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res*. 1995;13(3): 357-367.
- [2] Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(8):1219-1230.
- [3] Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, et al. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87-A(6):1367-1378.
- [4] Croteau S, Rauch F, Silvestri A, et al. Bone morphogenetic proteins in orthopedics: From basic science to clinical practice. *Orthopedics*. 1999;22(7):686-695.
- [5] Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, et al. Effects of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther*. 2006;13(17):1290-1299.
- [6] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The Role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(6):1032-1044.
- [7] 박래준. 경피신경전기자극과 미세전류자극이 정상인의 교감신경 긴장도에 미치는 영향. *대한물리치료학회지*, 1997;9(1):51-57.
- [8] Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, et al. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*. 1992;1(1):23-32.
- [9] Baranowski TJ Jr, Black J, Brighton CT, et al. Electrical osteogenesis by low direct current. *J Orthop Res*. 1983;1(2):120-128.
- [10] Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artif Organs*. 2001;25(3):201-208.
- [11] Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg*. 2003;14(1):108-116.
- [12] Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*. 1998;22(6):605-612.
- [13] Eckardt H, Christensen KS, Lind M, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*. 2005;36(4):489-494.
- [14] Kuo AC, Rodrigo JJ, Reddi AH, et al. Microfracture and bone morphogenetic protein 7(BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. *Osteoarthritis*

Cartilage. 2006;14(11):1126-1135.

- [15] Ronga M, Baldo F, Zappala G, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone non-union: An observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients. *Injury*. 2006;37Suppl 3:S51-S56.
- [16] Park J, Lutz R, Felszeghy E, et al. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials*. 2007;28(17):2772-2782.