

## 1 $\alpha$ , 25 Dihydroxycholecalciferol의 골다공증성 골절 치유효과 : 광학현미경 및 주사전자현미경적 관찰

배 춘 식

건국대학교 축산대학 수의학부 외과학교실

## Effects of 1 $\alpha$ , 25 Dihydroxycholecalciferol on Osteoporotic Fracture : Light Microscopic and Scanning Electron Microscopic Observation

Chun Sik Bae

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Konkuk University

(Received May 15, 1999)

### ABSTRACT

Vitamin D is one of important factors involved in the regulation of bone metabolism. In osteoporosis, the therapeutic effect of vitamin D on the healing process of fracture has still been controversial.

These studies were designed to understand the healing process of normal fibular fracture and the therapeutic effects of 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol on the osteoporotic fracture in rats.

The simple transverse fractures of rat fibulae were produced with a rotating diamond saw. The histological and ultrastructural changes of rats were observed.

The histological and ultrastructural studies revealed the healing of the fibular fracture in the 5th week after simple transverse fracture. The osteoporosis impaired more the healing of osteoporotic fibular fracture than normal non-osteoporotic fibular fracture. The healing process of osteoporotic fracture was facilitated by the treatment with 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol, however, was delayed more than the healing process of normal fracture.

These results suggest that 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol was effective for reducing the deleterious effects of osteoporosis in fracture healing.

**Key words** : Osteoporosis, Ovariectomy, Fracture, 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol

### 서 론

골다공증은 같은 성별이나 연령층에 비하여 골밀

도가 감소하고 골절의 감수성이 증가된 상태로 정의할 수 있으며 (Brunelli & Einhorn, 1998), 낮은 골밀도는 골다공증으로 진전될 수 있는 가장 중요한 위험인자로 인식되고 있다 (Hough, 1998).

\* Correspondence should be addressed to Dr. Chun Sik Bae, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Konkuk University. E-mail: surgery@kkucc.konkuk.ac.kr

Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

사람에 있어서 골다공증은 폐경후 골다공증, 노인성 골다공증 및 부신피질 호르몬 투여, 당뇨병, 임신, 수유, 음주 등에 따른 속발성 골다공증 등으로 분류되며 다양한 원인에 의해 발생하는데 (Gennari et al., 1998) 이 중, 폐경후 골다공증은 가장 흔한 유형의 하나로서 여성호르몬인 estrogen 결핍이 그 원인으로 생각되어지고 있다 (Ohta et al., 1992).

골다공증에 이환된 경우에는 가벼운 외상이나 충격에도 쉽게 뼈가 부러지게 되는데, 척추 압박골절과 고관절골절이 대표적인 예이다 (Brunelli & Einhorn, 1998).

골다공증성 골절의 예방과 치유를 위하여 작용기전이 서로 다른 약제들인 calcium, calcitonin, estrogen, bisphosphonate, vitamin D 등을 사용하였으나 (Kruger et al., 1998; Licata, 1997) 이들의 효과에 대해서는 일치하지 않았으며 오히려 상반되는 견해도 있었다.

Vitamin D는 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 신장의 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수를 증가시킴으로써 골흡수를 억제하는데 (Brandi, 1993) 이 약제의 효과에 대해서 상당한 치유효과가 있었다는 보고에 (Gallagher & Riggs, 1989; Gallagher et al., 1982) 반해서 치유효과가 전혀 없었다는 주장도 있어서 (Falch et al., 1987; Lindgren et al., 1984) vitamin D의 치료효과에 대한 논란은 아직도 끊이지 않으나 최근에는 vitamin D의 효과를 입증하는 보고가 많아지고 있다.

이에 저자는 랫트의 정상 골절의 치유과정을 이해하고, 양측 난소적출 후 골절의 치유과정과 난소적출 후 골절의 치유에 미치는  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol의 영향을 알아보려고 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군의 설정

정상 비골골절의 치유과정을 살펴보기 위해서는 12주령 암컷 *Sprague-Dawley* 랫트 ( $222.8 \pm 3.6$  g) 35마리를 비골의 골절을 유발한 후, 매주마다 7마리씩 배정하여 5주까지 골절의 치유과정을 관찰하였으며,  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol의 골다공증성 골절 치

유효과를 살펴보기 위해서는 12주령 암컷 *Sprague-Dawley* 랫트 ( $229.0 \pm 7.5$  g) 28마리를 양측 난소적출 후 7주에 비골의 골절을 유발하였다. 골절이 된 랫트는  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol 투여군과 대조군으로 나누고 각각 14마리씩 배치를 하였으며 각 군은 3주, 5주마다 7마리씩 배정하여 5주까지 골절의 치유과정을 관찰하였다. 각 군의 실험동물은 12시간의 명암주기가 교대로 유지되는 실내에서 사육하였다.

### 2. 난소적출 및 비골의 골절유발

마취는 ketamin hydrochloride (유한양행(주)) 15 mg/100 g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발하였다. 마취된 랫트는 난소를 노출시켜 난관을 silk사로 결찰한 후 난소를 적출하고 봉합을 하였으며, 비골의 골절유발을 위해서는 마취된 랫트의 우측 뒷다리의 비골을 노출시킨 후 회전하는 diamond disk를 이용하여 생리식염수를 떨어뜨려 주면서 횡골절을 유발하였다.

### 3. $1\alpha,25$ dihydroxycholecalciferol의 투여

$1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol (Sigma Chemical Co., USA)을 propylene glycol (Merck, Germany)에 녹인 후, 증류수에 희석하여 처음 2주일 동안은 20 ng, 나머지 기간은 10 ng을 피하주사를 하였다 (Lindgren et al., 1981).

### 4. 광학 및 주사전자현미경적 관찰

절취된 비골을 10% neutral formalin에 12시간 고정시키고, 수돗물에 수세한 후, 10% nitric acid로 12시간 동안 탈회하였다. 탈회된 조직은 흐르는 수돗물로 수세하고, 상승농도의 알코올로 탈수를 실시하고, xylene으로 1시간씩 3회 투명시켜, paraffin에 1시간씩 3회 침투를 실시한 다음 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직은 길이 방향으로  $5\mu\text{m}$  두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (HE)으로 염색하여 광학현미경으로 관찰·촬영하였다.

주사전자현미경 관찰을 위해서는 비골을 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3)에 희석한 2.5% glutaraldehyde (Merck, Germany) 용액으로 4시간 동안 실온에서 고정하고, 동일 완충액으로 15분씩 2회 세척 후, 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide (Mer-

ck, Germany) 용액으로 2시간 동안 후고정 하였다. 고정된 비골은 탈수를 한 후 HMDS (hexamethyldisilazane, Sigma Chemical Co., USA)로 15분씩 2회 치환하여 대기 중에서 건조하여 알루미늄 표본대에 붙여 ion coater (IB-5, Eiko)를 사용하여 20 nm 두께의 gold coating을 시행한 후 Hitachi S-450 주사전자현미경으로 20 kV의 가속전압하에서 관찰·촬영하였다.

## 결 과

정상 비골골절은 골절유발 후 1주에서는 골절단이 떨어져 있었고 결합조직이 골절편 사이의 공간을 채우고 있었다(Fig. 1b). 2주와 3주에서는 골절편 사이의 공간이 골화중인 연골과 신생골로 채워져 있었다(Fig. 1c, d). 4주에서는 골절단 사이의 공간이 신생골로 채워져 있었으며(Fig. 1e) 5주에서는 4주보다 성숙된 신생골이 골절단을 채우고 있어 완전한 유합이 이루어졌다(Fig. 1f).

랫트의 양측 난소적출에 의해서 인위적으로 골다공증을 유발하고 비골의 골절을 유발한 후 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군과 대조군의 골절 치유과정의 광학현미경과 주사전자현미경의 소견을 살펴보면 골절유발 후 3주에 실험군은 골절편의 사이가 대부분의 신생골과 일부의 연골조직으로 충만되어 있었으며(Fig. 2a), 대조군은 골절부위가 전체적으로 골화중인 연골조직으로 채워져 있었다(Fig. 2b). 골절유발 후 5주 실험군(Fig. 3a)에서는 골절 부위에 연골조직이 거의 없이 신생골로 채워져 있었으며, 대조군(Fig. 3b)에서는 신생골로 채워져 있었지만, 아직 골화가 진행되고 있는 중이었다.

골다공증을 유발하지 않은 정상 비골골절에 비하여 골절유발 후 3주의 대조군은 정상 비골골절의 1주와 2주 사이의 소견이었고, 골절유발 후 5주의 대조군은 정상 비골골절의 2주와 유사한 소견이었다. 골절유발 후 3주 동안 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군은 정상 비골골절의 3주와 4주의 중간 정도의 소견을 보여주었고, 골절유발 후 5주 동안 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군은 정상 비골골절의 4주의 소견과 유사하였다(Table 1).

**Table 1.** Comparison of histological and ultrastructural changes

Bone Tissue	FX	OF	OFD
connective tissue	1st week		
cartilage	2nd week	3rd week	
ossifying cartilage	2nd week, 3rd week	5th week	3rd week
newly formed bone	4th week		5th week
matured bone	5th week		

FX: normal fibular fracture, OF: osteoporotic fracture

OFD: osteoporotic fracture + 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol

## 고 찰

Hiltunen et al.(1993)에 의하면 마우스 경골 골절의 치유과정에서 조직학적으로 간엽조직의 양은 골절 후 5일과 7일에 최고였으며 가골의 연골의 면적은 골절 후 9일에 최고였는데 이것은 전체 가골면적의 46%에 달하였다.

본 실험에서도 정상 비골골절 후 1주에서는 골절단의 유합이 이루어지지 않았으며 골절편 사이의 공간은 결합조직이 채우고 있었으며, 2주와 3주에서는 골절편 사이에 주로 연골과 결합조직이 많았으며 4주에서 5주로 시간이 경과함에 따라 성숙한 신생골 조직으로 골절단이 채워져 있어 Hiltunen et al.(1993)과 유사한 경향을 보였다.

골다공증은 골량의 감소로 인하여 골절이 쉽게 일어날 수 있게된 상태를 말하며 남성과 여성 모두에서 일어나고 있으며 특히 여성에서는 폐경후에 많이 발생하고 있다(Li et al., 1997). 골다공증에 이환되면 골절의 발생이 증가되고 그 호발부위는 척추, 골반 및 대퇴골 등이다(Ziegler, 1998). 실험적으로 정상적인 골절의 치유과정을 살펴보기 위한 실험이나(Hiltunen et al., 1993; White et al., 1977), 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol이 골절의 치유과정에 미치는 영향을 살펴보기 위한 실험에서(Ömeroglu et al., 1997; Andreen & Larsson, 1984) 골절의 부위는 주로 대퇴골이나 경골이었으나 본 연구에서는 랫트의 비골에 골절을 유발한 후 정상상태와 난소적출 후 유발된 골다공증 상태에서 골절의 치유과정을 살펴본 결과, 골다공증 상태에서 비골의 골절은 정상상태의 골절에 비하여 치유속도가 느려서 난소적출 후 6주에 골절

을 유발하였을 때 골다공증은 대조군에 비하여 골절의 치유를 지연시켰다는 다른 연구자와 (Walsh et al., 1997; Hill et al., 1995) 유사한 경향을 보였다.

1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군은 조직형태학적검사 결과 시간적으로 정상상태의 비골의 치유과정과 유사한 소견을 나타내어 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 골다공증에 의한 골소실의 예방과 골절 발생의 빈도를 감소시켰다는 다른 연구자들(O'Brien, 1998; Gallagher & Riggs, 1989) 유사한 결과를 나타내어 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 골다공증으로 인하여 지연된 골절의 치료제로서 효과가 있는 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- Andreen O, Larsson SE: Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on fracture healing. Calcium, phosphate, and zinc in callus and serum. *Arch Orthop Trauma Surg* 103 : 257-262, 1984.
- Brandi ML: New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. *Am J Med* 95 (suppl 5A) : 69S-74S, 1993.
- Brunelli MP, Einhorn TA: Medical management of osteoporosis: fracture prevention. *Clin Orthop Rel Res* 348 : 15-21, 1998.
- Falch JA, Ødegaard OR, Finnanger AM, Matheson I: 1987. Postmenopausal osteoporosis: no effect of three years treatment with 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Acta Med Scand* 221(2) : 199-204, 1987.
- Gallagher JC, Riggs BL: 1989. Calcitriol for postmenopausal osteoporosis. *Ann Intern Med* 111(7) : 621, 1989.
- Gallagher JC, Jerpak CM, Jee WSS, Johnson KA, Deluca HF, Riggs BL: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: short- and long-term effects on bone and calcium metabolism in patients with postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(10) : 3325-3329, 1982.
- Gennari C, Martini G, Nuti R: Secondary osteoporosis, *Aging (Milano)* 10(3) : 214-224, 1998.
- Hill EL, Kraus K, Lapierre KP et al.: Ovariectomy impairs fracture healing after 21 days. *Trans Orthop Res Soc* 20 : 230, 1995.
- Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT: A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11(2) : 305-312, 1993.
- Hough S: Fast and slow bone losers. Relevance to the management of osteoporosis. *Drugs Aging* 12(Suppl 1) : 1-7, 1998.
- Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH: Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging (Milano)* 10(5) : 385-394, 1998.
- Li M, Shen Y, Wronski TJ: Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20 : 55-61, 1997.
- Licata AA: 1997. Bisphosphonate therapy, *Am. J. Med. Sci* 313(1) : 17-22
- Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB: Effects of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on bone tissue in the rabbit: studies on fracture healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 36 : 591-595, 1984.
- Lindgren JU, Narechania RG, Mcbeath AA, Lange TA, DeLuca HF: Effects of 1.25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and calcitonin on fracture healing in adult rats, *Clin Orthop Rel Res* 160 : 304-308, 1981.
- O'Brien KO: Combined calcium and vitamin D supplementation reduces bone loss and fracture incidence in older men and women. *Nutr Rev* 56 (5 Pt 1) : 148-150, 1998.
- Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S: Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner* 19 : 273-285, 1992.
- Ömeroğlu S, Öerdoğan D, mero lu H: Effects of single high-dose vitamin D<sub>3</sub> on fracture healing. An ultrastructural study in healthy guinea pigs. *Arch Orthop Trauma Surg* 116 : 37-40, 1997.
- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG: Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Rel Res* 342 : 218-227, 1997.
- White AA, Panjabi MM, Southwick WO: The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg* 59-A(2) : 188-192, 1977.
- Ziegler R: Drug treatment of osteoporosis. *Ther Umsch* 55(11) : 696-701, 1998.

### < 국문 초록 >

12주령 랫트의 정상 비골골절의 치유과정을 이해하고, 난소적출 후 비골골절의 치유과정과 난소적출 후 비

골골절의 치유에 미치는  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol의 영향을 알아보고자 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

비골의 골절은 골절유발 후 5주에 성숙된 신생골 조직으로 충만되어 조직형태학적으로 완전한 치유가 이루어졌다. 난소적출 후 골절의 치유는 정상골절의 치유보다 지연되었으나,  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol 투여 결과 골절유발 후 5주에 성숙된 신생골 조직으로 골절단이 충만되어 정상상태의 골절과 비슷하게 치유가 되었

다.

이상의 결과를 종합해보면 랫트의 난소를 적출하여 여성호르몬의 결핍을 유발하면 난소적출 후 7주에는 골다공증이 발생되고, 골다공증은 정상상태의 골절에 비하여 약 1주일 이상 골절의 치유를 지연시켰으며,  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol을 투여하였을 경우 정상상태의 골절치유와 비슷한 경과를 나타내어  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol은 골다공증성 골절의 치료에 있어서 효과 있는 치료제라는 결론을 내릴 수 있었다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Scanning electron micrographs of the diaphysis of rat fibulae; normal (a), 1 week (b), 2 weeks (c), 3 weeks (d), 4 weeks (e), and 5 weeks (f) after fracture. Medullary cavity (\* in a) and fractured bony edge (arrow in b) are marked. The gap between fractured bones is filled with soft tissue (connective tissue, ★ in b), with ossifying cartilage (\* in c and d) and newly formed bone, or mainly with newly formed bone (★ in e and f).
- Fig. 2.** Scanning electron micrographs of diaphysis of rat fibula administered  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol (a) and control(b) 3 weeks after osteoporotic fracture. The gap between fractured bone are mostly filled with newly formed bone with some cartilage(\* in a). In control, the same area is mostly filled with cartilage(\* in b) with connective tissues (star in b).
- Fig. 3.** Scanning electron micrographs of diaphysis of rat fibula administered  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol (a) and control (b) 5 weeks after osteoporotic fracture. In both samples, the fracture region is filled with newly formed bones.



