

손상된 토끼 굴건과 건초의 회복과정 중 생산된 성장인자들의 정량적 분석

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 국민건강보험공단 일산병원 정형외과

강호정 · 정현수 · 허만승 · 이대영 · 한수봉 · 성승용¹

Quantitative Analysis of Growth Factor Production in Rabbit Flexor Tendon and Tendon Sheath after Injury

Ho-Jung Kang, M.D., Hyon-Su Chong, M.D.,
Man-Seung Her, M.D., Dae-Young Lee, M.D.,
Soo-Bong Hahn, M.D., Seung-Yong Sung, M.D.¹

Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University,
College of Medicine, Seoul, Korea
Department of Orthopedic Surgery, National Health
Insurance Corporation Ilsan Hospital, Koyang, Korea¹

Purpose: Growth factors have some rolls in the healing of injured tissues, but the relationships are obscure. It is essential to isolate and identify the peptide growth factors responsible for the tissue response to injury. This is the purpose of our study.

Materials and Methods: In 12 rabbits, the flexor digitorum profundus tendons were partially divided. At each of four different time intervals following injury, three animals were sacrificed. The tissue segments were incubated. PDGF-AB, TGF- β_1 , TGF- β_2 , bFGF, and EGF were detected by ELISA technique.

Results: In 2nd day, there was a presence of PDGF-AB. TGF- β 's were detected from the tendons in the 4th day. A small EGF was detected form the tendons at day 4, and a moderate amount from tendon sheaths at day 18. Independent of time, only detectable quantities of bFGF were present in the uninjured tendons and tendon sheaths.

Conclusion: This is the first demonstration of detect-

ing and quantifying the in vivo synthesis of multiple growth factors using ELISA. These findings suggest that during the early stages of the healing process, the site of injury may produce considerable amount of growth factors, and that there is a time dependent sequential production of these growth factors.

Key Words: Growth factor, Tendon, Quantitative analysis

서론

지금까지 상처의 치유과정은 국소적인 생물학적 반응으로서 크게 염증기, 세포의 이동 및 분화기, 세포 외 기질의 생성 및 재형성의 3단계로 설명되어왔다. 상처 치유과정의 생물학적 반응에 대한 이해는 이런 일반적 이해에서 구체화되어 분자생물학적 측면에서 상처 조직에서 자가 및 측 분비를 통해 치유 과정을 조절하는 특정 펩타이드에 관심이 모아지고 있다¹. 많은 연구들이 뼈와 연부 조직의 치유과정에서 성장인자들의 역할에 대해 조사하였으며 손상 후 2 내지 3주간에 걸쳐 성장인자의 활동성이 의미 있게 변동한다는 것을 보고하였다². 이러한 결과들은 굴곡건의 초기 치유과정에서 성장인자들의 존재와 기능회복이나 건유착에 미치는 성장인자의 역할에 대한 궁금증을 갖게 하였다. 손상을 입은 굴곡건에서 기질대사와 세포증식에 큰 영향을 미치는 성장인자를 찾아내는 것은 굴건 조직의 회복과정 조절과 기능유지 및 유착 방지의 기전을 이해하는데 중요한 요소이다. 한편 굴곡건의 치유 과정이 지연되어 파열되거나 지나치게 유착 양상을 보여서 관절 강직을 유발시키는 것에 대해서도 성장인자 펩타이드의 적절한 자극이 결여되어 있다고 가정할 수 있다. 하지만 손상되지 않았거나 자연 치유되는 굴건에 있어서 성장인자들의 존재와 활동성에 대한 자료가 없는 상태이다. 따라서 이러한 건 손상의 환경 하에서

통신저자: 성승용

경기도 고양시 일산동구 백석1동 1232번지
국민건강보험공단 일산병원 정형외과
TEL: 031-900-0445 FAX: 031-900-0343
E-mail: sysung@nhimc.or.kr

성장인자들에 대한 정보가 반드시 필요하다 생각된다. 그리고 부가적으로 치유과정 동안 굴곡건과 긴밀하게 상호작용하는 건초의 손상에 대한 반응도 함께 관찰하고 고찰할 필요가 있다.

이번 연구의 목적은 우선 정상과 부분 손상된 굴곡건과 건초가 들어 있는 건초내에 존재하는 성장인자들을 정량적으로 측정하여 굴곡건의 치유 과정에서 시간적으로 어떠한 변화를 보이는지를 조사하고자 하는 것이다. 각각의 성장인자들을 검출 할 수 있는 효소면역측정법(ELISA)을 통하여 정상과 부분 손상된 건과 건초가 들어있는 관절막 안에서 각각의 성장인자들을 정량적으로 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 동물과 외과적 방법

12마리의 2.2~2.5 kg 뉴질랜드산 흰 토끼를 사용하여 무작위로 네 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 각각의 토끼는 외과적 술기를 시행할 때 ketamine/xylazine을 35/5 mg/kg 단위로 정맥 주사 한 뒤, 기도 삽관 후 halothane 흡입제를 이용하여 마취하였고 수술 부위에는 근위부에 손가락용 지혈대를 사용하였다. 수술은 오른쪽 앞발의 배측에 작은 수평 방향의 피부 절개를 시행한 후, 요측의 3개 지절의 중수지 관절의 근위부에서 굴건과 건초의 깊이까지 노출 하였다. 이후 건초를 절개한 후 심수지굴건을 서서히 견인 하였으며 11번 칼날을 이용하여 굴곡건의 약 50% 정도의 부분 절개를 시행하였다. 절개 후 건은 건초 안으로 다시 들어가게 한후에 건초를 6-0 나일론으로 봉합을 하고, 피부는 5-0 나일론을 이용하여 봉합하였다³⁻⁵. 수술을 시행한 사지는 바로 가능한 범위 안에서 능동적 관절운동 및 체중 부하를 할 수 있도록 허용하였다. 최초 수술 후 2일, 4일, 11일, 18일째에 각각 3마리씩의 토끼를 pentobarbital sodium을 120 mg/kg 정맥 주사하여 희생하였다.

2. 조직의 획득 및 배양

희생된 토끼로부터 양측 앞발 요측 세개의 지절의 중수지관절과 원위지절의 삽입부 사이에서 각각 심수지굴건과 건초를 무균적 방법을 통하여 획득하였다. 대조군으로 반대쪽 상지에서 손상되지 않은 정상의 굴건과 건초를 활막내에서 얻었다. 건과 건초들은 0.9% sodium chloride 용액을 이용하여 세척 후 24-2311 배양접시(Costar, Cambridge, MA)로 옮겨져 5 µg/ml 트랜스페린(transferrin), 1 mg/ml 우혈

청 알부민(serum albumin), 50 µg/ml 겐타마이신(gentamycin), 50 µg/ml 아스코르빈산(ascorbic acid)이 들어 있는 기질용액(MCDS 105; Sigma Chemical Co.)을 1 ml 첨가 후 섭씨 37도 5% CO₂ 상태에서 24 시간 동안 배양하였다³.

3. 면역측정법

각각의 용기에서 모아진 매질들은 다른 입자들을 제거하기 위하여 4°C, 800 g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 이렇게 처리된 매질들로부터 정량적 면역측정 키트(R&D system, Minneapolis, MN)를 이용하고 고형 상태 효소면역측정법을 통하여 platelet-derived growth factor AB (PDGF-AB), transforming growth factor beta 1,2 (TGF-β₁, TGF-β₂), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF)가 포함된 성장인자들을 검출하였다. 각각의 표본으로부터 200 µl 로 등분된 기질들은 특정 성장인자에 대한 항체로 표면이 덮인 용기에 더하여졌다. 그리고 2시간 동안 배양 후 각각의 용기는 세정을 한 뒤 과산화효소와 결합된 항체를 첨가 후 2시간 동안 다시 배양 후 세정을 하였다. 이후 기질용액 50 µl 를 각각의 용기에 다시 첨가하였다. 면역반응의 흡광도는 450 nm 파장의 효소면역 측정기(Biorad, Mississauga, Canada)를 이용하였으며 각각의 흡광도 로그 값은 점으로 로그/로그 방식의 종이에 표시하였다. 모든 검체는 세번씩 측정하였다.

4. 통계분석

통계적 유의성은 복수의 변수에 대한 비교를 위하여 MINITAB 응용프로그램(Minitab Inc, State College, PA)을 이용한 Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test를 이용하여 분석하였다. P-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. EGF

면역측정 결과, 수상 후 4일째의 건에서는 매우 낮은 농도인 9.6±11 pg/ml로 검출되었으며(p<0.001) 수상 후 18일째의 건초에서는 높은 농도인 평균 53.3±16.8 pg/ml로 검출되었다(p<0.001). 다른 실험군과 대조군에서는 검출되지 않았다 (Fig. 1, 2).

2. bFGF

항bFGF 항체로 처리된 배지에서 배양 결과, 손상 받거나 손상 받지 않은 건과 건초 모두에서 상당량의 bFGF가 검출되었다. 반대쪽의 손상 받지 않은 건에서는 83.6 ± 20.9 pg/ml로 측정되었으며 각각의 건초에서는 더 높은 204.1 ± 36.5 pg/ml로 측정되었다 ($p < 0.001$). 손상된 건과 건초에서는 더 많은 양이 측

정되었으나 건초의 경우 수상 후 시간대 별로 비교하였을 경우 유의한 차이를 보이지 못하였다($p = 0.308$). 하지만 건의 경우 수상의 4일째의 건에서 다른 시점에서 채취된 건에서의 값에 비해 bFGF의 생산(275 ± 106 pg/ml)은 증가의 정점을 이루고 있었다($p < 0.001$). bFGF 생산은 손상 후의 건과 건초 모두에서 3배 이상 증가 되어 있었으며 전체적으로 건보다는 건초에서 4배의 농도 증가를 보이고 있었다 (Fig. 3, 4).

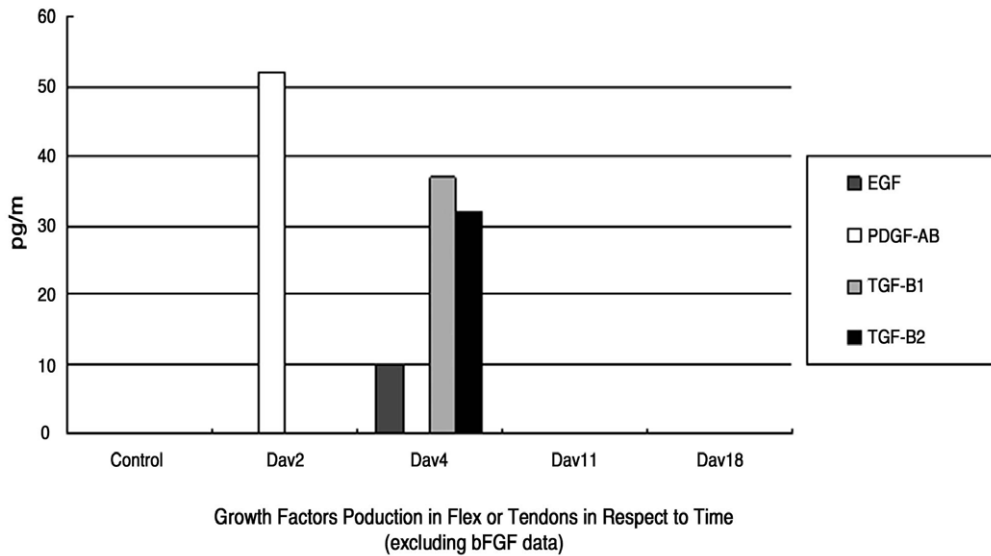


Fig. 1. Growth Factors Production in Flexor Tendons in respect to Time (excluding bFGF data): During the early stage (2 days) there was a presence of PDGF-AB, a small trace of EGF was detected at day 4 and TGF- β_1 and TGF- β_2 was detected in the 4 day post-injury period.

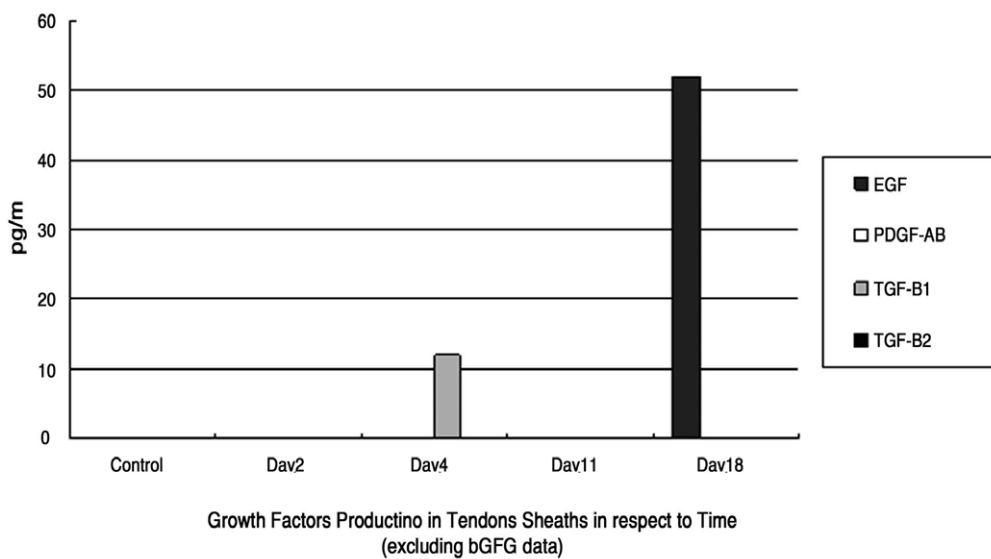


Fig. 2. Growth Factors Production in Tendon Sheaths in respect to Time (excluding bFGF data): High concentration of EGF was detected in the media conditioned with tendon sheaths from day 18.

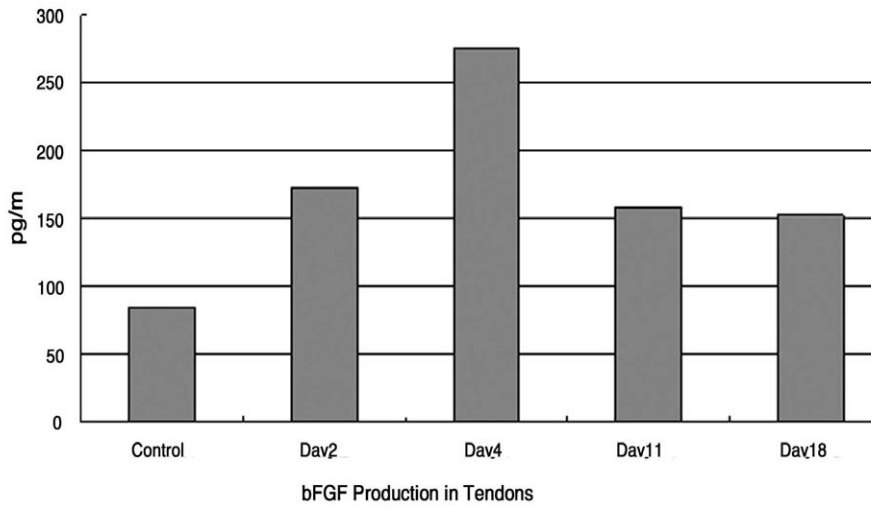


Fig. 3. bFGF Production in Tendons: There was statistically significant difference in bFGF production from the tendons in respect to time, with tendons harvested 4 days after the injury showing peak increase in the bFGF production (275 ± 106.7 pg/ml) in comparison to the tendons harvested in other time periods.

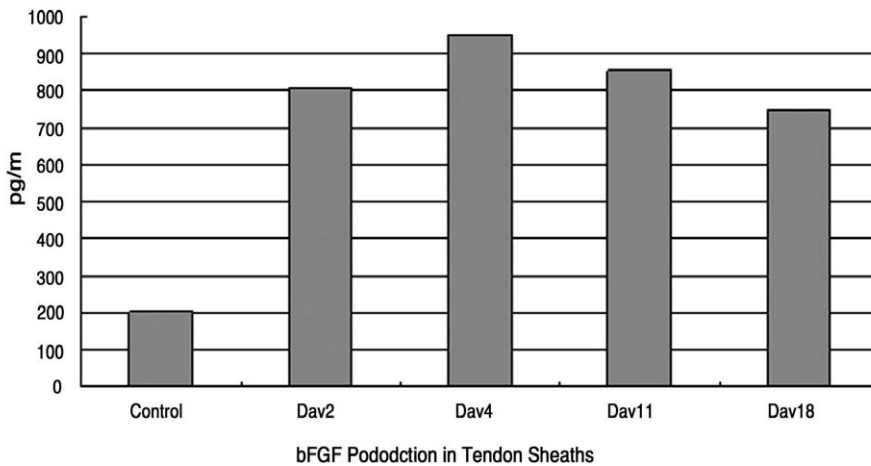


Fig. 4. bFGF Production in Tendon Sheaths: Tendon sheaths produced much more bFGF than the control side, but there was no significant variance in the bFGF production in respect to time from the tendon sheaths.

3. PDGF-AB

항PDGF-AB 항체가 들어 있는 배양액에서 배양 결과, 치유의 초기 단계인 수상 후 2일째의 건에서만 52.1 ± 31.3 pg/ml로 측정되었으며 같은 시기의 건초에서는 측정되지 않았다.

4. TGF- β_1 and TGF- β_2

TGF- β_1 은 수상 후 4일째의 건에서 36.2 ± 11.3 pg/ml로 측정되었으며 TGF- β_2 는 수상 후 4일째 채취된 9개의 건 중 4개에서 32.8 ± 2.8 pg/ml로 측정

되었다($p < 0.001$).

고 찰

생체에서 굴건의 치유 과정은 3단계로 삼출과 섬유성 유합, 섬유증식, 조직화와 성숙으로 나누어진다. 각각의 단계들은 세포와 체액의 복잡한 상호작용의 조합을 나타내는 것이다. 이러한 치유과정에 대한 이해를 위해서는 궁극적으로 조직의 손상에 대한 반응에 쓰이는 성장인자 펩타이드의 분리와 규명이 필수적이다. 많은 성장인자 펩타이드들은 상처의 치유 과정에서 각각의 역할이 있다. 하지만 본 연구에서는 건의

치유과정에 관여할 가능성이 높다고 생각되며 현 상태에서 생화학적으로 잘 분리되고 측정이 용이한 성장인자인 EGF, bFGF, PDGF-AB, TGF- β_1 , TGF- β_2 를 연구 대상으로 하였다.

건은 외부적 유착의 형성 없이 내재적인 치유 능력을 가지고 있다⁶⁻⁸. 수지건초 내부의 굴건 치유에 필요한 영양분은 활막액의 확산과 건에 분포하는 혈관을 통해서 공급된다. 특히 활막액을 통한 확산은 성장인자의 생산을 포함하여 더 많은 역할을 하는 것으로 추정된다⁹. 하지만 손상에 대한 성장인자의 분비에 있어서는 손상에 대한 반응으로 건초 자체의 생성능력도 고려하여야 한다¹. 우리는 이러한 요소를 최소화 하기 위해서 배측 윤상인대의 바로 근위부에서 건초에 평행한 날카로운 절개를 시행하였으며 건수초 바로 근위부에서 심수지 굴곡건을 견인하면서 50%의 연결을 남겨 두었다. 이러한 방식으로 건초 손상의 효과를 최소화 하면서 손상 입은 건에 비하여 상대적으로 손상 없는 건초 조직을 얻도록 노력하였다.

손상 모델의 건과 건초에서 일정한 시간 간격을 두고 시행한 효소면역측정법 결과 다양한 양의 EGF, bFGF, PDGF-AB, TGF- β_1 , TGF- β_2 가 검출되었다. 그리고 대조군으로 시행한 손상되지 않은 건과 건초에서는 bFGF가 분리되어 정량되었다. 수상 후의 기간에 관계없이 대조군의 건과 건초에서는 지속적으로 bFGF가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 상처 치유과정의 초기인 수상 후 2일째 채취한 건에서는 bFGF가 의미있게 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 치유 과정의 초기에 주변 조직뿐만 아니라 손상 받은 조직 자체에서 상당한 양의 성장인자를 생산함을 의미하며 그 생산의 정도가 손상 후 시간에 따라 변화함을 의미한다. 따라서 손상 후 시간에 따른 성장인자들의 생산과 그 양의 변화를 관찰하는 것이 필요하다.

아직까지 건의 치유에 있어서 성장인자들의 역할은 명확하지 않다. 수상 후 시간에 따라 연속적인 성장인자의 생산을 관찰한 결과 치유 과정의 초기 단계인 삼출 및 섬유성 유합의 시기에 bFGF와 PDGF-AB라는 성장인자가 생산됨을 유추 할 수 있다.

삼출 및 섬유성 유합은 수상 후 초기인 1일에서 5일까지 일어나고 이 기간 동안 절단된 건과 주변조직에 장액성 액체의 축적과 함께 부종이 관찰되며 섬유성 물질의 다발들이 손상된 부위를 덮고 응고된 부위에 혈액 세포들이 나타나기 시작한다. 이후 2일 동안 크고 불규칙적인 형태의 섬유 모세포가 몇 개씩 관찰된다. 이 과정에서 PDGF는 매우 강력한 화학적 유인물질이며 세포분열 유발물질이다^{11,12}. 다른 인자들이 존재하겠지만 PDGF는 섬유 모세포와 염증세포들의 화

학적 유인물질이자 세포분열 유발물질로서 기질의 재형성과 상처치유에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. bFGF는 혈관 내피세포에 대한 강력한 세포분열 유발 물질이며 혈관형성 촉진 기능이 있고 섬유 모세포에 대해서는 증식을 촉진하는 것으로 알려져 왔다¹³. 분비 유발 단계가 있는 대부분의 다른 성장인자들과는 달리 bFGF는 세포 외 기질에 미리 존재하고 있다가 손상 신호에 의해 바로 분비되기 시작한다¹⁴. 본 연구 결과에서 확인된 바와 같이 손상 후 치유의 초기 단계에서 이러한 성장인자들의 생산과 분비는 건 치유에 필요한 섬유 모세포의 증식과 이동을 유발하고 분열을 시키는 데 중요한 역할 한다.

삼출 및 섬유성 유합기의 후기에는 초기의 PDGF와 bFGF의 생산에 이어 EGF와 TGF- β 's의 생산의 작은 증가가 관찰되며 PDGF의 생산이 멈추는 것으로 관찰된다. 하지만 bFGF는 이 시기에 생산이 더욱 증가하는 것으로 보인다. 이러한 bFGF의 생산 증가와 함께 EGF, TGF- β 's의 생산은 삼출 및 섬유성 유합의 단계에서 섬유증식 단계로의 이행에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

섬유증식 단계는 수상 후 6일에 시작하여 16일까지 지속되며 세포 증식과 기질 형성을 통한 응고된 혈액의 조직화로 특징된다. 섬유모세포는 이 시기에 나타난다.

세포분열은 혈관 내부 조직에서도 관찰된다. 그리고 탐식세포는 괴사된 물질과 콜라겐 섬유를 흡수하여 건의 재형성을 한다. 수상 후 7일째부터는 혈관 신생의 징후가 관찰되며 10일째 이후에는 회복이 진행되고 있는 건의 말초 부위에서 소동맥이 흔히 관찰된다.

EGF는 상처 치유 중인 조직에 첨가하면 섬유 모세포의 이동과 콜라겐 생성의 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다^{16,17}. TGF- β 's는 세포외기질의 형성에 있어 중요한 매개체이며 세포외기질의 생성 촉진과 분해 억제에 역할을 한다. 그리고 TGF- β 는 실험실 환경에서 PDGF와 bFGF와 함께 있을 경우 섬유 모세포의 증식을 보조하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 성장요소들은 함께 존재할 경우 섬유 모세포의 분화와 이동뿐만 아니라 세포의 증식과 기질형성에 있어서도 상승효과를 나타낸다고 생각할 수 있다. 건 치유의 과정 중 섬유증식의 후기 단계에 EGF와 TGF- β 가 존재하지 않는다는 것은 이 성장 인자들이 bFGF가 섬유 모세포의 증식을 지속하게 하기 위한 촉매 작용을 한다고 여겨진다.

수상 후 16일 이후에는 조직화 및 성숙화가 진행된다. 주로 증식을 하고 있는 건 주변막에 의해 명확한 부골 형성과 함께 재생된 조직들이 나타나게 된다. 섬유 모세포는 건의 표면에 층으로 배열하게 되며 제 1

형 콜라겐은 제 3형에 비해 그 양과 밀도가 증가하게 되며 탄성 섬유도 존재하게 된다. 이 시기에 측정되는 성장인자는 다량의 FGF뿐이다. 하지만 소량의 건초 성장인자와 bFGF, EGF가 검출 될 수 있는 농도로 측정되었다. 따라서 건 손상만 있는 경우에 있어 주변 활막건초에서 bFGF와 EGF 같은 다량의 성장인자의 생산을 통해 치유 과정을 보조하는 효과에 대해서도 주목을 하여야 한다. 건초에 손상을 주지 않는 건 손상은 자주 일어나는 일은 아니지만 이러한 실험을 통해 손상된 조직에서 분비된 성장인자들이 주변 조직에게 회복 과정을 지지하도록 하는 촉분비 효과가 있다는 가정을 하게 해주었다.

결 론

본 실험에서 보여지듯이 건은 손상 후 복합적인 생물학적 반응이 가능한 조직이다. 그리고 결과를 통해 건의 치유 과정에서 복합적 역할을 하는 많은 성장인자들의 존재에 대한 정량적 근거를 제시하였다. 복잡한 건 치유 과정 중에서 보여진 성장인자들의 생성 및 생산량의 변화는 앞으로 진행될 건 손상의 회복에 대한 추가적 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되며 향후 다른 포유류에서의 실험을 통해 각 종에 대한 정량적 분석 및 시기적 성장인자의 발현을 조사하여 인간에서 있어서 건의 치유와 유착 예방을 할 수 있는 기초 연구의 기본이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

- McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clinical Plastic Surgery*. 1990;17:421-32.
- Besner G, Higashiyama S, Klagsbrun M. Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. *Cell Regulation*. 1990;1:811-9.
- Zhihe L, Alavi MZ, Moore S. The proliferation of neointimal smooth muscle cells cultured from rabbit aortic explants 15 weeks after de-endothelialization by a balloon catheter. *Int J Exp Pathol*. 1994;75:169-77.
- Hagberg L, Tengblad A, Gerdin B. Elimination of exogenously injected sodium-hyaluronate from rabbit flexor tendon sheaths. *J Orthop Res*. 1991;9:792-7.
- Hagberg L, Tengblad A, Gerdin B. Hyaluronic acid in flexor tendon sheath fluid after sheath reconstruction in rabbits : A comparison between tendon sheath transplantation and conventional two stage procedures. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1991;25:103-7.
- Manske PR, Gelberman RH, Vande Berg JS, Lesker PA. Intrinsic flexor tendon repair : A morphological study in vitro. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66A:385-96.
- Manske PR, Lesker PA, Gelberman RH, Rucinsky TE. Intrinsic restoration of the flexor tendon surface in the nonhuman primate. *J Hand Surg Am*. 1985;10A:632-7 .
- Mass DP, Tuel RJ. Participation of human superficialis flexor tendon segments in repair in vitro. *J Orthop Res*. 1990;8:21-34.
- Pledger WJ, Howe PH, Loeff EB. The regulation of cell proliferation by serum growth factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;397:s1-10.
- Abrahamsson SO. In Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. In: Abrahamsson SO, editor. *Tendon healing: Healing in vivo*. Sweden: KF-Sigma Lund;1991. p2-15.
- Grotendorst GR, Seppa HEJ, Kleinman HK. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:3669-72.
- Pierce GF, Mustoe TA, Altmann BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991;45:319-26.
- Davidson JM, Klagsbrun M, Hill KE, Buckley A, Sullivan R, Brewer PS et al. Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J Cell Biol*. 1985;100:1219-27.
- Braid A, Ling N. Fibroblast growth factors are present in the extracellular matrix produced by endothelial cells in vitro: implications for a role of heparinase-like enzymes in the neovascular response. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142:428-35.
- Gelberman RH, Khabie V, Cahill C. The revascularization of healing flexor tendons in the digital sheath. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73A:868-81.
- Gartner MH, Shearer JD, Bereiter DF, Mills CD, Caldwell MD. Wound fluid amino acid concentrations regulate the effect of epidermal growth factor on fibroblast replication. *Surgery*. 1991; 110:448-56.
- Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF in wound healing and repair. *J Cell Biochem*. 1991;45:346-52.