

부신피질 호르몬에 의해 진행되는 가토의 대퇴 골두 무혈성 괴사에서 Nitric Oxide 공여제의 효과

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

문성환·장준섭

- Abstract -

The Effect of Nitric Oxide Donor on Steroid-induced Avascular Necrosis of the Femoral Head in Rabbits

Seong Hwan Moon, Jun Seop Jahng

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University, College of Medicine Seoul, Korea

The steroid-induced avascular necrosis of femoral head results from loss of osteocyte in lacuna, fat embolism in end artery of subchondral bone, and subchondral collapse from secondary osteoporosis. Nitric oxide (NO) has diverse biologic effects on bone metabolism. The purposes of this study was to evaluate the protective effect of exogenously administered NO donor (nitroglycerine) on steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rabbits.

Seventy five Korean rabbits were used in this study. Group 1 received injection normal saline for 8 weeks. Group 2 had intramuscular injection of methylprednisolone. Group 3 underwent methylprednisolone injection and application of transdermal nitroglycerine releasing system daily for 8 weeks. Group 4 underwent same protocol with group except femoral head specimen were stored 96 hours in 4 degree celsius after sacrifice. After 8 weeks, Hematoxylin-eosin and oil red O stain of femoral head were performed. Emptiness percentage of osteocyte in lacunae, histomorphometry of trabecular bone, histomorphometry of fat cells, intramedullary change, and fat embolism in end artery were evaluated.

Emptiness percentage of lacunae in group 1, 2, 3, and 4 showed $11.9 \pm 4.2\%$, $28.5 \pm 4.0\%$, $20.3 \pm 5.1\%$, and $42.1 \pm 7.0\%$ ($p < 0.01$). The histomorphometric data of trabecular thickness, trabecular area percentage, and separation of trabeculae showed protective effect of NO donor on methylprednisolone induced osteoporosis. The histomorphometric data of fat cell showed no significant effect of NO donor on methylprednisolone induced fat cell change. In group 2 and 3, there were increased fat embolism in end artery of subchondral bone, and increased intramedullary cellular infiltration comparing with those of group 1.

In conclusion, although there was no significant effect of NO donor on fat cell histomorphometry, there were partial but significant protective effects of NO donor on steroid-induced avascular necrosis in terms of increased survival of osteocytes in lacunae and anti-resorptive effect.

Key Words: Avascular necrosis, Steroid, Nitric oxide, Histomorphometry

서 론

장기 이식에서 이식된 장기의 거부 반응의 억제와 자가 면역 질환의 치료에 장기간 고농도의 부신피질 호르몬의 사용이 많아지면서 이에 따른 대퇴 골두의 무혈성 괴사의 발생도 증가하고 있다^{1~3)}. 골의 무혈성 괴사는 이환된 부위에 혈행 장애의 결과로 일어나는 골 질환이다⁴⁾. 대퇴 골두의 무혈성 괴사의 원인으로서는 외상에 의한 대퇴 골두 혈행 장애에 의한 것과, 외상의 병력없이 알코올 중독, 잠수병 및 부신피질 호르몬 과다 투여 등에 의한 비외상성으로 나누어진다⁵⁾. 부신피질 호르몬 과다 투여로 인한 대퇴 골두의 무혈성 괴사는 주로 호르몬에 의한 혈액내 고지질혈증 (hyperlipidemia)과 이로 인한 지방 색전증 (fat embolism)에 의해 대퇴 골두의 종동맥 (end artery)⁶⁾이 폐색됨으로서 무혈성 괴사가 발생된다고 한다^{4,6~11,13)}. 부신피질 호르몬에 의한 무혈성 괴사와 동시에 호르몬에 의한 소주골의 골다공증의 심화로 반복된 생리적 체중 부하에도 견디지 못하고 미세 골절이 누적되어 무혈성 괴사에서 흔히 보는 연골하 골 봉괴를 일으키고^{4,12,13)} 골세포 (osteocyte)에 대한 부신피질 호르몬의 직접적인 세포 독성에 의해서도 대퇴 골두의 무혈성 괴사가 발생된다¹⁴⁾. 부신피질 호르몬은 배양된 골아세포 (osteoblast)의 증식 억제¹⁵⁾ 그리고 생체 내의 혈관 형성 능력도 저하시켰는데¹⁶⁾ 이들 작용도 부신피질 호르몬에 의한 골의 무혈성 괴사의 기전으로 설명될 수 있다. 특히 부신피질 호르몬은 현대 의학에서 광범위하게 사용되며 특정 분야에서는 장기간 과량의 부신피질 호르몬 치료가 필수적이고 이런 경우 대퇴 골두 무혈성 괴사의 발생은 삶의 질적인 문제로 보아 큰 문제가 아닐 수 없다.

Nitric oxide (NO)는 유리 활성기 (free radical)로서 분자량이 적어 자유롭게 확산이 가능하여 주위 세포에 직접적으로 다양한 기능적 변화를 일으킨다^{17,18)}. 골아세포는 다양한 자극에 반응하여 NO를 분비하여^{19,20)} 과골 세포의 증식 및 활성을 억제하고 저농도에서 골아세포의 증식을 유도하는 역할을 한다^{21,22)}. 자극에 의해 생성되었거나 외부에서 주입된 NO는 또한 혈관 확장 기능과 신생 혈관 형성작용도 가지고 있다²³⁾. 이러한 NO의 생리적 작용은 여러면에서 부신피질 호르몬에 의한

무혈성 괴사 유발 작용과 반대되는 생리적 작용을 가진다. 즉 골아세포의 증식 유도, 과골 세포의 숫자 및 활동도 감소로 부신피질 호르몬에 의한 직접적 세포 독성 및 골다공증 유발 효과를 상쇄할 수 있으며 호르몬에서 유래된 지방 색전증에 의한 허혈 상태 및 혈관 형성 장애 상태¹⁶⁾를 NO에 의한 혈관 확장 및 신생 혈관 형성작용으로 극복할 수 있으며 부신피질 호르몬에 의한 지방 색전증에 대해 항 동맥경화 기능²⁴⁾이 무혈성 괴사에 보호 효과를 나타내어 궁극적으로 NO가 부신피질 호르몬에 의한 대퇴 골두 무혈성 괴사에 보호적인 역할을 나타낼 것으로 추정된다.

본 연구의 목적은 생체 내에서 과도한 부신피질 호르몬으로 무혈성 괴사를 유발시키고 이와 동시에 NO를 체외에서 지속적으로 경피 투여하여 골세포의 생존성, 골소주의 조직학적 변화 및 지방세포의 조직학적 변화를 조사함으로서 부신피질 호르몬에 의한 골의 무혈성 괴사에서 NO의 보호 효과를 알아보는 것이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험 동물로는 체중 2.7~3.2 kg의 성숙한 (생후 약 4개월) 한국산 가토 75마리를 암수 구별없이 사용하였다. 실험 기간 중 각각의 가토는 동일한 온도와 습도를 유지한 동물 사육실 (연세대학교 의과대학) 내의 케이지에서 독립적으로 사육되었다. 실험 기간 동안 가토에 대한 사료와 물의 공급은 제한을 두지 않았다. 실험 동물은 다음과 같이 4개의 군으로 분류하였다.

제 1군: 10마리, 8주간 격일로 항생제 근육 주사와 일주일에 한번 체중 1 kg당 생리식염수 0.4 mg 근육 주사한 정상 대조군

제 2군: 30마리, 8주간 격일로 항생제 근육 주사와 methylprednisolone acetate suspension (Depo-Medrol®, Upjohn, Michigan, U.S.A.)을 체중 1 kg당 4.1 mg의 용량으로 일주일에 한번씩 근육 주사한 군

제 3군: 30마리, 8주간 격일로 항생제 근육 주사와 methylprednisolone acetate suspension을 체중 1 kg당 4.1 mg의 용량으로 일주일에 한번씩 근육 주사하고, nitroglycerine 16 mg을 24시간 동안 지속적으로 경피적으로 유리하는 patch (Deponit 5®, Schwarz Pharma, Monheim, Germany)를 매일 피부에 부착한 군

제 4군: 5마리, 제 1군과 같은 처치를 하고 8주간 사육 후 희생시키고 대퇴 골두를 적출하여 젖은 거즈에 싸서 96시간 4°C에서 보관한 군

2. 투약 방법

Methylprednisolone은 제 2, 3군 가토의 체중 1 kg 당 4.1 mg의 농도로 계산하여 일주일에 한번씩 8주간 양측 둔부 근육내에 번갈아 가면서 주사하였다. 제 1, 4군에서는 같은 용량의 생리 식염수를 매주 8주간 근육 주사하였다. 제 3군에 투여된 NO 공여제는 nitroglycerine patch (16 mg)를 사용하였다. 체모가 제거된 가토의 피부에 nitroglycerine patch를 매일 8주간 부착하였다. Methylprednisolone으로 인한 감염을 막기 위하여 항생제 cefotiam (Ceradoran[®])을 가토 체중 1 kg당 0.07 gm을 격일로 근육 주사하였다. 항생제 근육 주사는 제 1, 2, 3, 4군 공히 같은 용량으로 같은 횟수로 투여하였다.

3. 관찰 방법

각 실험군에서 8주의 실험 기간 동안 생존하지 못하고 도중 사망한 가토의 수로부터 가토의 치사율을 구하였고, 실험 시작 후 매주 각 군의 가토의 체중을 측정하였다. 실험 기간 8주까지 생존한 가토는 phenobarbital sodium (Entobar[®])의 치사량 투여로 희생시킨 후 양측 대퇴 골두를 적출하여 우측 대퇴 골두는 탈석회화 시킨 후 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하였고 좌측 대퇴 골두는 oil red O 염색⁶⁾을 실시하였다.

1) 골소강 공동화 비율의 측정

탈석회화 후 대퇴 골두는 관상면으로 절단하였으며 한 대퇴 골두당 4개의 관상 절단면이 나오도록 절단하였다. H-E 염색을 한 대퇴 골두의 시료는 광학 현미경 (Olympus BX40, Tokyo, Japan)에서 200배의 배율로 연골하 부위를 무작위로 10개의 현미경적 영역을 정한 다음 각 현미경 시야에서 골세포 염색이 안되는, 즉 골세포가 소실된 골소강 (lacuna)의 숫자를 구하고 이를 전체 골소강의 숫자로 나눈 백분율을 구하였다 (Figure 1). 골세포의 사멸의 정의는 골소강내 골세포 핵의 분절화 (fragmentation), 핵의 농축화 (pyknosis), 염색 불량에 의존하지 않았고 단지 골소강내에 골세포가 존재하지 않는 경우만 골세포의 사멸로 정의하였다²⁴⁾. 각 군간의 전체 골소강에 대한 골세포가 염색되는 골소강의 백분율을 비교하였다.

2) 골수강내 세포 침윤의 측정

H-E 염색을 한 대퇴 골두의 시료에서 광학 현미경 하에서 200배의 배율로 골수강 부위를 10개의 현미경적 영역을 무작위로 정한 다음 골수강내 염증세포의 침윤을 관찰하였다. 각 시야에서 염증세포의 침윤이 없는 경우를 grade 0, 염증세포가 세줄 이상 여섯줄 이하 두께로 침윤된 경우를 grade 1, 염증세포가 다량 침윤되어 골수강을 대치한 경우를 grade 2로 정의하고 판정 기준으로 정하였다.

3) 대퇴 골두 골소주의 구조적 조직계측

대퇴 골두 소주풀의 구조적 조직계측 (structural histomorphometry)을 위하여 H-E 염색을 한 대퇴 골두의 시료에서 광학 현미경에서 100배의 배율로 골수강 부위를 10개의 현미경적 영역을 무작위로 정한 다음 대퇴 골두 골소주의 두께 (trabecular thickness), 골소주의 면적 (trabecular area) 및 골소주 사이의 거리 (trabecular separation)를 영상 분석기 (Image Pro Plus for Window, Media cybernetics, Silver Spring, Maryland, U.S.A)를 이용하여 측정하고 각 군간 상기의 조직 계측치를 비교하였다 (Figure 2).

4) 골수강내 지방세포의 구조적 조직계측

Oil red O 염색한 대퇴 골두 시료로부터 영상 분석기를 이용하여 골수강내 지방세포의 평균 직경, 지방세포의 평균 면적, 200배로 확대된 현미경 시야 당 지방세포 수, 현미경 시야 전체 면적 및 골소주 면적을 영상 분석기 (Image Pro Plus for Window, Media cybernetics, Silver Spring, Maryland, U.S.A)를 이용하여 측정하였다 (Figure 3). 각 군의 지

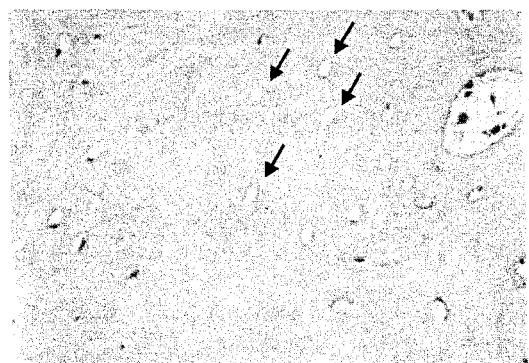


Figure 1. Empty lacunae (arrow) in Group 2 (methylprednisolone treated) (H-E stain after decalcification, original magnification x400).



Figure 2. Trabecular bone of femoral head. a: Group 1 (control) b: Group 2 (methylprednisolone treated) c: Group 3 (methylprednisolone+nitroglycerine patch treated). Marked loss of trabecular thickness and area in Group 2 and less marked bone resorption in Group 3 (H-E stain after decalcification H-E stain, original magnification x200).

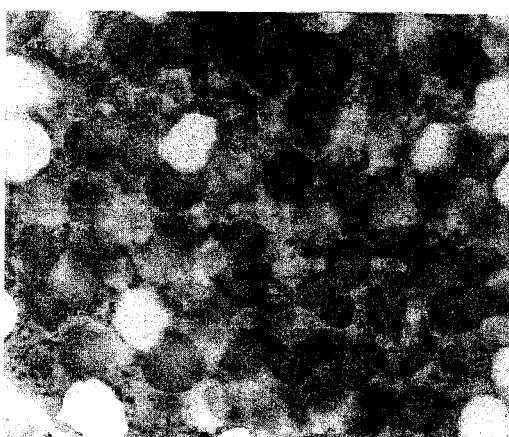


Figure 3. Intramedullary fat cells stained with oil red O in Group 2 (methylprednisolone treated). Fat cell morphometry (diameter, fat cell number, fat cell area) was performed with this stain (original magnification x400)

방세포의 평균 직경, 지방세포의 평균 면적, 혈미경 시야 당 지방세포 수, 지방세포의 면적 비율을 비교하였다.

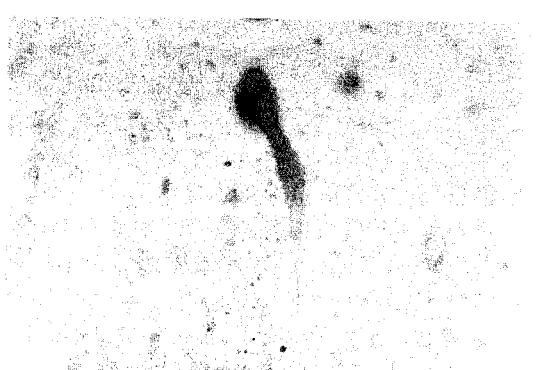


Figure 4. Fat embolism in end artery of subchondral bone of the femoral head in Group 2 (methylprednisolone treated) (oil red O stain, original magnification x400)

5) 연골하골의 종동맥내 지방 색전증의 측정

Oil red O 염색한 대퇴 골두 시료에서 연골하 부위의 종동맥의 혈관내 지방 색전 여부를 광학 혈미경하에서 판정하였다 (Figure 4). 판정 기준은 염색이 잘된 부위에서 무작위적으로 혈미경 시야를 정하고 200배의 배율하에서 종동맥내의 지방

Table 1. Comparison of histomorphometric data after 8 weeks of experiment

	Group 1 ¹ (n=10)	Group 2 ² (n=17)	Group 3 ³ (n=15)	Group 4 ⁴ (n=5)
Empty lacunae percent (%)*	11.9±4.2 ^{b,c,d}	28.5±4.0 ^{a,c,d}	20.3±5.1 ^{a,b,d}	42.1±7.0 ^{a,b,c}
Tr thickness (μm)*	117.1±42.5 ^{b,c}	29.5±14.2 ^{a,c}	60.1±13.8 ^{a,b}	
Tr area (%)*	56.6±10.5 ^{b,c}	29.1±11.3 ^{a,c}	40.3±8.3 ^{a,b}	
Tr separation (μm)*	90.4±13.9 ^{b,c}	207.5±36.9 ^{a,c}	159.3±29.2 ^{a,b}	
Fat cell diameter (μm)*	65.6±20.8 ^{b,c}	76.7±15.5 ^a	75.2±19.8 ^a	
Fat cell number*	20.6±3.5 ^{b,c}	17.1±2.3 ^a	18.3±2.8 ^a	
Fat cell area (%)*	34.4±8.4 ^{b,c}	39.5±9.2 ^a	40.7±6.7 ^a	
Fat embolism	0.6	2.5	2.1	
Cell infiltration	0.2	1.9	1.7	

Tr: Trabecular, n: Number of rabbits

1: Control group

2: Methylprednisolone injection for 8 weeks

3: Methylprednisolone+nitroglycerine patch for 8 weeks

4: Femoral head stored for 96 hours after sacrifice as a negative control group

*: One way ANOVA ($p<0.01$) and Tukey's honestly significant difference test ($p<0.05$)

a: Statistical difference with group 1

b: Statistical difference with group 2

c: Statistical difference with group 3

d: Statistical difference with group 4

색전증 존재 여부를 확인하여 10개의 시야에서 종동맥내 지방이 발견되지 않으면 grade 0, 10개의 현미경 시야에서 1개의 지방 색전증이 발견되면 grade 1, 5개의 시야에서 1개의 지방 색전증이 발견되면 grade 2, 1~2개의 시야에서 1개의 종동맥내 지방 색전증이 발견되면 grade 3으로 판정하였다. 각 군에서 이러한 판정 기준을 이용하여 연골하 부위의 종동맥내 지방 색전증 여부를 계량화하여 비교하였다.

4. 통계 방법

결과의 측정치는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 같은 군의 실험전 실험 후 체중 비교는 paired t-test, 실험 후 각 군의 체중 비교는 Student t-test, 각 군간의 사망률 차이 비교는 Fisher's exact test, 각 군간의 각종 실험 수치의 비교는 분산 분석 (analysis of variance) 그리고 각 군간의 다중 비교를 위해서는 Tukey's honestly significant difference test를 시행하였으며 p 값이 0.05 미만일 경우에 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 가토의 치사율

대조를 위해 항생제 및 생리 식염수만 투여한 제 1군에서 실험 기간 중 사망한 레는 없었다. methylprednisolone 처치군 (제 2군)은 대상군 30마리 중 13마리 (43%)가 실험 기간 8주를 채우지 못하고 사망하였고 methylprednisolone 및 nitroglycerine 처치군 (제 3군)은 30마리 중 15마리 (50%)가 실험 기간 중 사망하였다. 각 군간의 치사율의 차이를 검정하기 위해 Fisher's exact test를 시행하였고 치사율은 각 군간에 유의성을 나타내었다 ($p<0.05$).

2. 가토의 체중 변화

실험 전 제 1, 2, 3군 가토의 평균 체중은 각각 2.90 ± 0.13 (평균 ± 표준편차) kg, 2.90 ± 0.10 kg, 2.91 ± 0.15 kg으로서 각군의 유의한 차이는 없었다 ($p=0.452$). 실험 기간 8주가 경과한 후 생존한 가토의 체중을 비교하면 제 1, 2, 3군이 각각

3.14 ± 0.15 kg, 1.97 ± 0.12 kg, 1.88 ± 0.12 kg 으로 각 군간 체중의 차이가 있었으나 ($p<0.05$) 각 군의 다중 비교에서 제 2군과 제 3군간의 차이는 없었다.

3. 골소강의 공동화 비율

전체 골소강에 대하여 골세포를 소실한 골소강의 비율을 보면 제 1군은 $11.9 \pm 4.2\%$, 제 2군은 $28.5 \pm 4.0\%$, 제 3군은 $20.3 \pm 5.1\%$, 제 4군은 $42.1 \pm 7.0\%$ 이었다. 각 군의 골소강 공동화 비율은 통계적으로 의의있게 차이가 있었고 ($p<0.01$), 각 군간 다중 비교에서도 제 4, 2, 3, 1군 순으로 각 군간 서로 유의한 차이가 있었다 ($p<0.05$) (Table 1).

4. 골소주의 두께, 골소주의 면적 및 골소주 사이의 거리

골소주의 두께는 제 1, 2, 3군이 각각 117.1 ± 42.5 μm , 29.5 ± 14.2 μm , 60.1 ± 13.8 μm 이었고 현미경 시야 면적 ($20 \times 10^8 \text{ m}^2$)으로 나눈 골소주의 면적 백분율은 제 1, 2, 3군이 각각 $56.6 \pm 10.5\%$, $29.1 \pm 11.3\%$, $40.3 \pm 8.3\%$ 이었으며 골소주 사이의 거리는 제 1, 2, 3군이 각각 90.4 ± 13.9 μm , 207.5 ± 36.9 μm , 159.3 ± 29.2 μm 이었다. 제 1, 2, 3군의 골소주의 두께, 골소주의 면적 및 골소주 사이의 거리는 통계적으로 의의있게 차이가 있었고 ($p<0.01$), 각 군간 다중 비교에서도 제 2군과 제 3군간에 유의한 차이가 있었다 ($p<0.05$) (Table 1).

5. 지방세포 직경, 지방세포 수 및 지방세포 면적

지방세포의 직경은 제 1, 2, 3군이 각각 65.6 ± 20.8 μm , 76.7 ± 15.5 μm , 75.2 ± 19.8 μm 이었고 지방세포 수는 제 1, 2, 3군이 각각 20.6 ± 3.5 개, 17.1 ± 2.3 개, 18.3 ± 2.8 개이었다. 현미경 시야 당 지방세포 면적은 제 1, 2, 3군이 각각 $6.9 \pm 1.6 \times 10^8 \text{ m}^2$, $7.8 \pm 1.8 \times 10^8 \text{ m}^2$, $8.1 \pm 1.2 \times 10^8 \text{ m}^2$ 이었고 현미경 시야의 면적 ($20 \times 10^8 \text{ m}^2$)으로 나눈 백분율은 각각 $34.4 \pm 8.4\%$, $39.5 \pm 9.2\%$, $40.7 \pm 6.7\%$ 이었다. 제 1, 2, 3군의 지방세포 직경, 지방세포 수 및 지방세포 면적은 통계적으로 의의있게 차이가 있었고 ($p<0.01$), 각 군간 다중 비교에서는 제 2, 3군간에는 차이가 없었고 제 1, 3군간 및 제 1, 2군간에는 서로 유의한 차이가 있었다 ($p<0.05$) (Table 1).

6. 연골하 종동맥내의 지방 색전증

종동맥내의 지방 색전 유무는 제 1군은 grade 0.6, 제 2군은 grade 2.5, 제 3군은 grade 2.1이었다. 제 2, 3군의 종동맥내 지방 색전 정도는 대조군인 제 1군보다 증가되어 있으나 제 2, 3군 사이에서는 차이가 없었다 (Table 1).

7. 골수강내 세포의 침윤

염증세포의 침윤 정도는 제 1군은 grade 0.2, 제 2군은 grade 1.9, 제 3군은 grade 1.7였다. 제 2, 3군의 골수강내 세포 침윤 정도는 대조군인 제 1군 보다 증가되어 있으나 제 2, 3군간에서는 차이가 없었다 (Table 1).

고 찰

골의 무혈성 피사는 이환된 부위에 다양한 원인으로 골조직에 대한 혈행 장애의 결과로 일어나는 골 질환이⁹. 대퇴 골두에 발생하는 무혈성 피사는 대퇴 경부 골절이나 고관절 탈구 후에 생기는 외상성 대퇴 골두 무혈성 피사와 알콜 중독증, 겸상 적혈구 빙혈증 (sickle cell anemia), Gaucher 병, 부신피질 호르몬 과다 투여 등과 동반된 비외상성 무혈성 피사로 나눌수 있다¹⁰. 대퇴 골두의 무혈성 피사는 명백한 외상에 의해 대퇴 골두로 공급되는 혈관의 손상으로 대퇴 골두로의 혈행에 장애가 생겨 질환이 발생된다. 비외상성인 경우 특히 부신피질 호르몬 과다 투여로 인한 경우는 아직까지 정확한 발병 기전이 밝혀지지 않았다. 현재까지 보고된 실험적, 임상적 결과에서 부신피질 호르몬 과다 투여로 인한 대퇴 골두의 무혈성 피사는 주로 호르몬에 의한 고지질혈증과 이로 인한 지방 색전증에 의해 대퇴 골두의 종동맥이 폐색됨으로서 무혈성 피사가 발생한다고 한다^{4,6-11,13}. 부신피질 호르몬에 의한 무혈성 피사와 동시에 부신피질 호르몬에 의한 골다공증의 심화로 반복된 생리적 체중 부하에도 견디지 못하고 미세 골절이 누적되어 무혈성 피사에서 흔히 보는 연골하 골 봉괴를 일으키고^{4,12,13} 골아세포에 대한 부신피질 호르몬의 직접적인 세포 독성¹⁴과 혈관 생성 능력 저하에 의해¹⁵ 대퇴 골두의 무혈성 피사가 발생될 수 있다. 대퇴 골두에 생긴 무혈성 피사는 그 원인에 관계없이 진행된 경우는 그 치료에 어려움이 많다. 병의 진행 과정상 초기인 경우는 병의 진행을 막

고자 대퇴 골두 감압술, 혈관부착 자가골 이식술, 절골술, 체외 전자기장 조사 등을 시도하고 있으나^{25~28)} 그 효과는 지극히 제한되어 있으며 질병의 병인론적 예방 및 치료가 아닌 단지 대증적 치료의 일환으로 시도되고 있다. 대퇴 골두 무혈성 괴사가 진행된 경우는 상기의 대증적 요법은 소용이 없고 단지 인공 관절 치환술로 이환된 고관절의 기능을 대치시킬 수 있다²⁹⁾. 대퇴 골두 무혈성 괴사는 일단 진행되면 그 치료와 치료 결과의 예측이 어려우므로 고위험도군에서 대퇴 골두 무혈성 괴사의 예방은 중요한 문제로 대두된다. 특히 부신 피질 호르몬은 현대 의학에서 광범위하게 사용되고 있으며 특정 분야에서는 장기간 과량의 부신피질 호르몬 치료가 필수적이고 이런 경우 대퇴 골두 무혈성 괴사의 발생은 삶의 질적인 문제로 보아 큰 문제가 아닐 수 없다.

Nitroglycerine patch는 협심증 환자의 장기유지 요법으로 사용되는 것으로서 경피적으로 nitroglycerine을 일정량 24시간 동안 지속적 유리시킴으로서 혈중에 치료 용량의 nitroglycerine을 유지시키는 약물이다³⁰⁾. 인체 피부에 nitroglycerine patch 부착 후 피부를 통하여 혈중으로 유리되는 nitroglycerine 및 대사물을 gas chromatography / mass spectrometry법으로 측정하면 14시간 동안 500 pg/ml의 농도의 nitroglycerine이 혈중에 존재한다고 보고되었다³⁰⁾. 가토의 심근 조직에서 nitroglycerine에 의한 혈관 확장 작용은 nitroglycerine에서 생성된 NO에 의한 것이며³¹⁾ 혈관벽의 평활근 세포에서 nitroglycerine으로부터 NO가 시간이 지날수록 비례하여 유리됨이 증명되었다³²⁾. 본 연구에서는 인체에 사용하는 nitroglycerine patch를 가토에 적용하여 nitroglycerine을 혈액 속으로 유리시킴으로서 NO를 조직에 공급하는 방법을 사용하였다. 실험 동물에 NO 공여제를 투여하는 방법에는 구강내 설하 투여, 정맥 주사, 경피적 연고³³⁾ 및 경피적 patch³⁰⁾ 등이 있을 수 있다. 설하 투여 및 정맥주사로는 nitroglycerine의 짧은 시간으로 높은 혈중 농도에 도달할 수는 있으나 일정량의 농도를 수시간 이상 유지시킬 수는 없다. 어떤 치료적 용법으로 지속적으로 일정량의 nitroglycerine을 경피적으로 유리시켜 혈중 농도를 지속적으로 유지하기 위해서는 patch제제가 가장 유용함으로 본 연구에서도 patch를 사용하였다.

부신피질 호르몬에 의한 대퇴 골두의 무혈성 괴사의 발생은 임상적 혹은 실험적으로 많이 보

고되었다^{1~4,8~10,13,34)}. 대퇴 골두 무혈성 괴사 유도의 실험적 방법에는 주로 가토를 실험 동물로 사용하고 methylprednisolone, cortisone 등을 투여한 실험 모델이 확립되어 있다^{4,8~10,13,34)}. 실험 동물에서 대퇴 골두의 무혈성 괴사의 진단은 골소강의 공동화 (empty lacuna)의 비율이 정상 대조군보다 증가한 경우를 기준으로 하였다^{4,8~10,13,34)}. Methylprednisolone을 18주간 매주 근육 주사하고 각 주마다 가토를 회생시킨 후 골소강의 공동화 비율을 보면 실험 10주의 수치는 24 ± 2%이고 18주의 수치는 26 ± 2%였으며 정상 대조군은 10주에 12 ± 1%, 18주에 13 ± 3%로 보고되었다⁴⁾. 3~5주간 가토에게 매일 cortisone 근육 주사 후 적출한 대퇴 골두의 조직학 소견에서 정상 대조군은 10%, cortisone 투여군은 23%의 골소강 공동화 비율을 보여 통계적 의의있게 골소강 공동화 비율의 차이가 있었다¹³⁾. 또 다른 연구에 의하면 정상 대조군 14%, methylprednisolone 처치군은 20~58%의 골소강 공동화를 보인다고 보고하였으며⁹⁾ 정상 대조군 12%, 사망한 후 96시간 경과한 군은 50%, methylprednisolone 투여군은 39%의 골소강 공동화 비율을 보고하기도 하였다³⁴⁾. 이에 반하여 대조군과 부신피질 호르몬 처치군 사이에 조직학적으로 골소강의 공동화 비율은 차이가 없고 부신피질 호르몬 처치군에서 종동맥내 지방 색전증의 증가와 심한 골다공증만 있음을 보고한 경우도 있다⁹⁾. 본 연구에서는 골소강의 공동화 비율은 methylprednisolone 처치군의 경우는 28.5 ± 4.0%, 대조군은 11.9 ± 4.2%로서 기존의 보고된 가토 실험에 의한 비율과 비슷하였으며 methylprednisolone과 NO 공여제를 투여한 군은 20.3 ± 5.1%로서 골소강내 골세포의 생존성이 NO 공여제 투여군에서 증가함을 알수 있었다. 본 연구에서 부신피질 호르몬에 의한 대사 작용 및 전신 면역기능 저하로 부신피질 호르몬 처치군은 높은 치사율과 체중 저하를 보였으며 이러한 작용은 NO 공여제의 투여로도 호전되지 않았다. 부신피질 호르몬 및 NO 공여제 투여군의 치사율은 다소 높았으며 체중 변화에 통계적 의의는 없었으나 부신피질 호르몬 단독 투여군에 비해 체중이 감소된 경향을 보였다.

부신피질 호르몬으로 백서에 골다공증을 유발시키고 이를 조직계측학적으로 측정해보면 골소주의 두께 감소 및 면적 감소 등의 조직계측학적 변화가 생긴다고 보고되었다³⁵⁾. 부신피질 호르몬

에 의한 골다공증의 진행은 Jaffe 등⁹⁾은 방사선 사용으로 관찰하였고 Warner 등³⁴⁾은 H-E 염색에 의한 조직학적 관찰에서 조직계측학적 방법을 사용치 않고 육안적으로 골다공증이 진행됨을 보고하였다. NO는 골조직의 항흡수 작용을 발휘하는데 이는 난소 절제술을 시행한 백서에서 NO 공여제를 경피적으로 처치하였을 때 estrogen을 투여한 효과와 같은 골량의 증가가 있고 estrogen의 효과가 NO synthase 길항제인 N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)의 처치료 없어짐이 관찰되어 NO가 estrogen의 세포내 전달 물질일 가능성이 높다는 것에서 그 기전을 찾을 수 있다³⁵⁾. 이러한 부신피질 호르몬에 의한 골다공증에도 NO의 보호기능이 제시되었으며 본 연구에서는 피질골의 조직계측학적 측정은 시행하지 않았지만 골소주의 변화를 보면 부신피질 호르몬 투여군에서 골소주의 두께 감소와 골소주 면적 감소를 보였다. 즉 대조군에 비해 methylprednisolone 처치료가 골소주의 두께는 75%, 골소주 면적은 49% 감소되어 부신피질 호르몬에 의하여 심한 골다공증이 진행됨을 알수 있었으며 methylprednisolone과 NO 공여제를 처치한 군은 정상 대조군에 비해 골소주의 두께는 49%, 골소주의 면적은 29% 감소되어 methylprednisolone 단독 처치료보다는 골소주가 유의하게 유지되었으므로 NO 공여제의 골다공증 진행에 대한 보호 효과를 발견할 수 있었다.

부신피질 호르몬에 의해 야기되는 가토의 대퇴골두의 골다공증에서 보호기능을 하는 약물로는 현재까지 보고된 바로는 지질 강하제³⁶⁾, calcitonin³⁷⁾ 등이 있다. 본 연구의 결과로부터 NO 공여제도 부신피질 호르몬에 의해 야기되는 가토의 대퇴골두의 골다공증에서 부분적인 보호기능이 증명되었다.

Methylprednisolone으로 야기된 가토의 대퇴골두 무혈성 괴사에서 지방세포의 변화를 보면 부신피질 호르몬 처치료군은 지방세포의 숫자는 감소하고 각 지방세포의 직경은 증가하며 결과적으로 3차원적으로 추산된 지방세포의 부피는 24.8% 증가한다고 보고되었다¹⁰⁾. 본 연구에서도 부신피질 호르몬 투여군에서 지방세포의 숫자는 감소하였고 지방세포의 직경은 증가하였으며 전체 혈미경시야에 대한 지방세포의 면적비는 대조군에 비해 증가하였으나 골수강 면적에 대한 지방세포의 면적비는 감소하였다. 즉 골다공증의 진행으로 골수강 면적이 넓어지고 골수강내 염증성 세포의 침

윤 등으로 골수강내 지방세포의 비율은 감소되나 전체 혈미경 시야 즉 골소주 면적을 포함한 비율에서는 지방세포의 비율이 증가하였다. 지방세포의 직경, 면적 비율 등은 methylprednisolone만 투여한 군과 methylprednisolone과 NO 공여제를 투여한 군간의 차이는 없었다. 이는 NO 공여제가 골세포의 생존성과 골소주 유지에 유의한 영향을 미쳐 어느 정도 보호기능을 나타내지만 지방대사나 지방세포의 기능에는 큰 영향을 주지 않았다. 또한 본 연구의 결과로 NO 공여제의 부신피질 호르몬에 의한 무혈성 괴사에 대한 보호 효과의 기전으로 골아세포에 대한 직접적인 효과인지 혈관 확장 기능이나 신생 혈관형성 등 혈관 장애에 대한 회복 효과인지 구별하기는 힘드나 NO 공여제로 부신피질 호르몬에 의한 무혈성 괴사를 부분적으로 보호할 수 있으리라 생각된다.

결 론

체외에서 지속적으로 투여된 nitric oxide 공여제는 지방세포 형태계측 수치의 변화는 없었으나 골수강내 골세포의 생존성 증가와 골다공증 감소 등의 효과로 부신피질 호르몬에 의해 진행되는 대퇴골두 무혈성 괴사에 대한 부분적인 보호 효과를 나타내었다.

참 고 문 헌

- 1) Andresen J, Nielsen HR. Osteoporosis in renal transplant recipients. *Acta Orthop Scand* 52: 475-479. 1981
- 2) Elmstedt E. Avascular necrosis in the renal transplant patients: A discriminant analysis of 144 cases. *Clin Orthop* 158: 149-157, 1981
- 3) 한창동, 민병현, 김남현, 박기일, 김순일. 신장이식 환자에서 Prednisolone이 무혈성 골괴사에 미치는 영향. *대한정형외과학회지* 25: 876-886, 1990
- 4) Gold EW, Fox OR, Weissfeld S, Curtis PH. Corticosteroid-induced avascular necrosis: An experimental study in rabbits. *Clin Orthop* 135: 272-280, 1978
- 5) Chang CC, Greenspan A, Gershwin ME: Osteonecrosis. Current perspectives on pathogenesis and treatment. *Semin Arthritis Rheu* 23: 47-69,

1993

- 6) Jones JP, Sakovich L. *Fat embolism of bone. J Bone Joint Surg* 48A: 149-164, 1966
- 7) Fisher DE, Bickel WH, Holley KE. *Histologic demonstration of fat emboli in aseptic necrosis associated with hypercortisolism. Mayo Clin Proc* 44: 252-259, 1969
- 8) Fisher DE, Bickel WH, Holley KE, Ellefson RD. *Corticosteroid-induced aseptic necrosis II: Experimental study. Clin Orthop* 84: 200-206, 1972
- 9) Jaffe WL, Epstein M, Heyman N, Mankin HJ. *The effect of cortisone on femoral and humeral heads in rabbits: An experimental study. Clin Orthop* 82: 221-228 , 1972
- 10) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. *Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. J Bone Joint Surg* 59A: 729-735, 1977
- 11) Fisher DE. *The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid -induced avascular necrosis. Clin Orthop* 130: 68-80, 1978
- 12) Solomon L. *Drug induced arthropathy and necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg* 55B: 246-251, 1973
- 13) Cruess RL, Ross D, Crawshaw E. *The etiology of steroid induced avascular necrosis of bone: A laboratory and clinical study. Clin Orthop* 113: 178-183, 1975
- 14) Felsen DT, Anderson JJ. *A cross study evaluation between steroid dose and bolus steroid and avascular necrosis of bone. Lancet* 1: 902-906, 1987
- 15) Masuyama A, Ouchi Y, Sato F, Hosoi T, Nakamura T, Orimo H. *Characters of steroid hormone receptors in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. Calcif Tissue Int* 51: 376-381, 1992
- 16) Harada I. *The effect of glucocorticoids on angiogenesis in vitro. J Jpn Orthop Assoc* 66: 763-770, 1992
- 17) Evans CH, Stefanovic-Racic M, Lancaster J. *Nitric oxide and its role in orthopaedic disease. Clin Orthop* 312: 275-294, 1995
- 18) Osdoby PC, Nikols GA, Osdoby P. *Bone cell function, regulation and communication: A role for nitric oxide, J Cell Biochem* 57: 399-409, 1995
- 19) Ralston SH, Todd M, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. *Human osteoblast like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. Endocrinology* 135: 330-336, 1994
- 20) Riancho JA, Salas E, Zarabeitia T, Olmos JM, Amado JA, Fernandes-luna JL, Gonzales-Macias J. *Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. J Bone Miner Res* 10: 439-446, 1995
- 21) Evans DM, Ralston SH. *Nitric oxide and bone. J Bone Miner Res* 11: 300-305, 1996
- 22) Ralston SH, Grabowski PS. *Mechanism of cytokine induced bone resorption: Role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. Bone* 19: 29-33, 1996
- 23) Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest* 100: 3131-3139, 1997
- 24) Bult H. *Nitric oxide and atherosclerosis: Possible implications for therapy. Mol Med Today* 2: 510-518, 1996
- 25) Sugioka Y. *Transstrochanteric anterior rotational osteotomy in the treatment of osteonecrosis affecting the hip: A new osteotomy operation. Clin Orthop* 130: 191-202, 1978
- 26) Wang GJ, Dughman SS, Reger SI, Stamp WG. *The effect of core decompression on femoral head blood flow in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg* 67A: 121-124, 1985
- 27) Steinberg ME, Brighton CT, Corces A, Hayken GD, Steiberg DR, Tooze SE, Fallon M. *Osteonecrosis of the femoral head: Results of core decompression and grafting with and without electrical stimulation. Clin Orthop* 249: 199-208, 1989
- 28) Wang Y, Zhu S, Zhao D. *Vascularized iliac periosteal transfer for the treatment of avascular necrosis of the femoral head and a new evalua-*

- ation grading system. *Clin Med J* 109: 441-445, 1996
- 29) Phillips FM, Pottenger LA, Finn HA, Vandermolen J. *Cementless total hip arthroplasty in patients with steroid-induced avascular necrosis of the hip: A 62 months follow up study.* *Clin Orthop* 303: 147-154, 1991
- 30) Sun JX, Piraino AJ, Morgan JM, Joshi JC, Cipriano A, Chan K, Redalieu E. *Comparative pharmacokinetics and bioavailability of nitroglycerine and its metabolites from Transderm-Nitro, Nitrodisc, and Nitro-Dur II systems using a stable-isotope technique.* *J Clin Pharmacol* 35: 390-397, 1995
- 31) Mulsch A, Mordvintcev P, Bassenge E, Jung F, Clement B, Busse R. *In vivo spin trapping of glyceryl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessel and organ.* *Circulation* 92: 1876-1882, 1995
- 32) Weber A, Neuhaus T, Seul C, Dusing R, Schor K, Sachinidis A, Vetter H. *Biotransformation of glyceryl trinitrite by blood plates as compared vascular smooth muscle cells.* *Eur J Pharmacol* 309: 209-213, 1996
- 33) Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, Yallampalli C. *Nitric oxide donor alleviates ovariectomy induced bone loss.* *Bone* 18: 301-304, 1996
- 34) Warner JJP, Philip JH, Brodsky GL, Thornhill TS. *Studies of nontraumatic osteonecrosis: Manometric and histologic studies of the femoral head after chronic steroid treatment: An experimental study in rabbits.* *Clin Orthop* 225: 128-140, 1987
- 35) Nakamura H, Nitta T, Hoshino T, Koida M. *Gluocorticoid-induced osteopenia in rats: histomorphometrical and microarchitectural characterization and calcitonin effect.* *Biol Pharm Bull* 19: 217-219, 1996
- 36) Wang GJ, Chung KC, Shen WJ. *Lipid clearing agents in steroid-induced osteoporosis.* *J Formos Med Assoc* 94: 589-592, 1995