

초음파가 창상조직내 표피성장인자의 발현에 미치는 영향

대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공
남 기 원, 구 현 모, 김 석 범, 이 선 민
대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김 진 상

The Effect of Ultrasound on Epidermal Growth Factor Expression in Rat Wound Tissue

Nam, Ki-Won, P.T., M.S., Ku, Hyun-Mo, P.T., M.S.,
Kim, Suk-Bum, P.T., Lee, Sun-Min, P.T.

Major in Physical Therapy, Dept. of Rehabilitation Science, Graduate School,
Daegu University

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Daegu University

<Abstract>

This study was performed to investigate the effect of ultrasound irradiation on epidermal growth factor(EGF) expression in rat wound tissue. Skin wounds were created below 5mm to both sides of scapular inferior angle. The right wound was used experimental side and left was used control side. Ultrasound was irradiated pulse rate 20%, frequency 1MHz, intensity $0.5W/cm^2$ for 5 minutes during 3days. After sonication during 3 days, rats were sacrificed. The expression of epidermal growth factor evaluated immunohistochemistry on mouse anti-EGF. In the control side, a little expression of EGF was observed at epidermis and dermis. In the experimental side, A strong immunostaining was seen at epidermis and dermis.

This study suggests that ultrasound irradiation is effective on EGF expression in wound tissue.

I. 서 론

창상은 수축, 표피화, 교원질 합성, 신생혈관의 재생, 육아조직의 생성과 같은 과정을 거치면서 이루어진다(Buckley A 등, 1985). 또한 피부의 일부 부속기관이 남아있는 부분 결손 창상에서는 표피화가 상처치유의 가장 중요한 역할을 하게 되며, 피부의 지방조직까지 결손되는 피부 전층결손 창상에서는 주로 수축이 중요한 역할을 하게 된다(Brown 등, 1986).

이러한 복잡한 상처치유과정에서 성장인자들은 조직 재생과 재형성을 조절하는 생물학적 매개체로서 자연적으로 조직 내에서 발생한다(Clark과 Henson, 1988). 조직재생과 관련된 성장인자로는 PDGF(혈소판 유래 성장인자; platelet-derived growth factor), TGF- β (형질

변환 성장인자; transforming growth factor- β), EGF(표피성장인자; epidermal growth factor), FGF(섬유모세포 성장인자; fibroblast growth factor), IGF(인슐린양 성장인자; insulin-like growth factor) 등이 있으며(Terranova, 1993; Lynch, 1991; Giannobile, 1996), 이중 표피성장인자는 상처치유의 초기에 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGF-R)에 결합해 수용체의 티로신 키나제(tyrosin kinase)를 활성화시켜 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Parkar 등, 2000; Cohen 등, 1982).

상처치유와 관련된 물리치료적 접근에서 고압맥동직류자극(high-voltage pulsed galvanic stimulation; HVPGS)(Cruzz 등, 1989), 저강도 레이저(Converse 등, 2001; Simunovic 등, 2000), 초음파(Lowe 등, 2001; Robert 등, 1981), 극초단파(Kallistov, 2000; Korpan, 1994), 회전육과 하버드 탱크(Staley와 Richard, 1991; Burke 등, 1998)등이 사용되고 있으며 근래에 와서 저강도 레이저와 관련된 연구는 비교적 활발히 진행되고 있는 반면, 초음파나 극초단파와 상처치유에 관한 연구는 미흡한 현실이며, 형태학적인 변화에 대한 연구는 이루어지고 있으나 분자생물학적 측면에서의 연구 또한 미흡하다. 따라서 본 연구는 물리치료 분야에서 가장 빈번하게 사용되고 있는 치료도구 중의 하나인(Roebroek 등, 1998) 초음파를 이용하여, 상처치유의 초기 그 발현이 증가하여 치유를 촉진하는 표피성장인자의 발현 양상을 살펴봄으로서 초음파가 상처치유에 미치는 영향을 알아보하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험동물

여성 Sprague-Sawley계 흰쥐(체중 200~250g) 6마리를 실험대상으로 하였으며, 실험 기간중 물과 사료는 무제한으로 공급하였다. 사육실 온도는 25 ± 2 °C, 습도는 63 ± 5 %로 유지하였고, 일정한 조도와 광주기 및 암주기를 12시간으로 조절하였다.

2. 실험방법

1) 실험전 처치

염산케타민(Ketamine HCl, 유한양행)과 럽푼(Rompun, 바이엘코리아)을 1:1의 비율로 섞어 제조한 전신 마취제를 복강주사(0.4ml)하여 흰쥐를 마취한 후 견갑하각 등쪽부위를 삭모하였다. 상처유발은 오른쪽과 왼쪽의 양쪽 견갑하각 5mm 하방에서 가로, 세로 각각 5mm씩 외과용 가위를 이용하여 지방조직까지 전층결손 절제 창상을 동시에 시행하였으며, 좌, 우 창상 사이의 거리는 20mm의 간격을 두었고, 오른쪽을 실험군으로 왼쪽을 대조군으로 하였다. 창상 유발 후 감염을 막기위해 포비돈과 소독된 거즈를 이용하여 드레싱을 실시하였다.

2) 초음파 적용

초음파(Sonotens 501, DAEYANG MEDICAL CO, Korea) 조사는 창상 유발 하루 후부터 실시하였으며, 실험군은 주파수 1MHz, 조사강도 $0.5W/cm^2$, 맥동비 20%로 하여 하루 1회 5분간 적용하였고, 전도매질로는 초음파용 겔(Soung Heong Corp.)을 사용하였다. 대조군은

실험군과 같은 조건으로 초음파의 전원을 켜지 않은채 적용하였다. 초음파 적용은 3일 간 시행하였으며, 초음파 적용 후 매일 드레싱을 실시하였다.

3) 조직 절편 제작

조직 채취는 초음파 적용 3일 후 심장관류(0.9% NaCl)와 전고정(4% paraformaldehyde, pH 7.4)을 실시한 후 실험군과 대조군의 조직을 채취하였으며, 채취한 조직은 면역조직화학 검사를 위해 두시간 동안 후고정(4% paraformaldehyde, pH 7.4)을 실시하였다.

후고정 후 조직 절편 제작은 탈수, 청명, 파라핀 포매의 일반적인 제작과정에 따라 실시되었으며, 미세절단기(microtome, BRIGHT 5040)를 사용하여 10 μ m의 두께로 잘라 제작하였다.

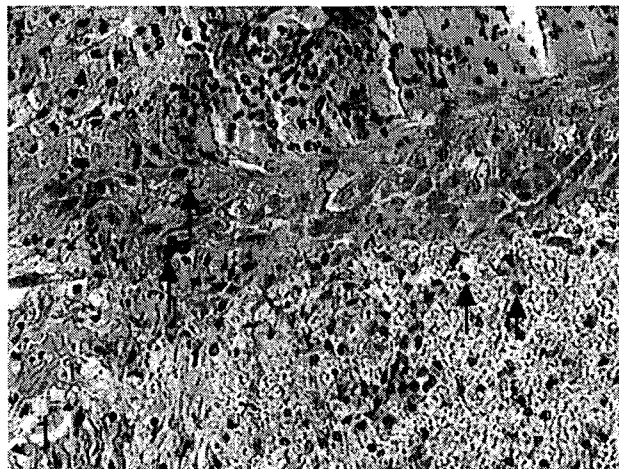
4) 면역조직화학법

제작된 조직 절편은 탈파라핀과 함수의 과정을 거친 후 메탄올 200ml에 H₂O₂ 1ml를 첨가해 만든 용액(0.5% H₂O₂ in methanol)에 30분 동안 침수시켜 내재적 과산화효소(endogenous peroxidase)를 제거하였다. 1차 항체(mouse anti-EGF, 1:50, sigma), 2차 항체(goat anti-mouse IgG, 1:25, sigma) 처리 후 Streptoavidin과 ABC(avidine-biotin peroxidase complex)를 각각 60분씩 실온에서 처리하였다. 이후 DAB(3'5'-diaminobenzidine)에 10분간 반응시켰으며, Cresyl violet acetate로 대조염색 후 탈수와 청명 과정을 거쳐 광학현미경적 관찰을 위해 봉입을 실시하였다.

III. 결과

1. 창상 3일 후 대조군에서 표피성장인자의 발현

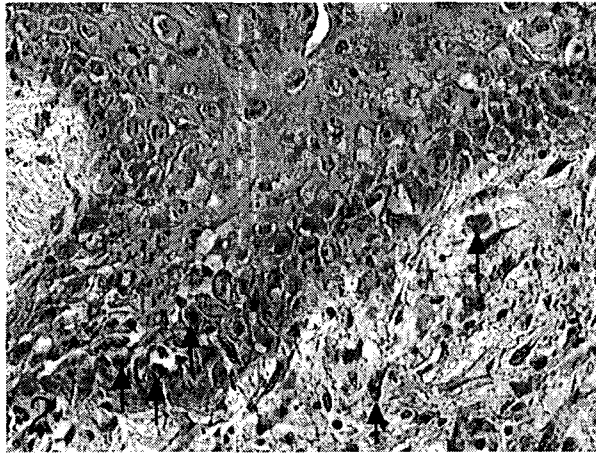
원위 창상 조직에 단순 드레싱만 실시하여 3일이 경과된 후 조직 내의 표피성장인자 항체에 대한 면역반응은 새롭게 형성되고 있는 표피와 진피층의 일부에서 관찰되었지만 미약하였다(Fig. 1).



<Fig. 1> A little expression of EGF was observed at epidermis and dermis(\times 200).

2. 창상 3일 후 실험군에서 표피성장인자의 발현

초음파가 창상 조직내의 표피성장인자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐에 창상을 유발한 후 3일간 초음파를 적용한 결과 새롭게 형성되고 있는 표피와 진피층 전체에서 표피성장인자의 항체에 대한 강한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 2).



<Fig. 2> A strong immunostaining was seen at epidermis and dermis($\times 200$).

VI. 고찰

창상은 환자의 의료비 부담을 가중시키고 재활과정을 지연시키는 주요한 요인중 하나이다. 또한 뇌혈관 손상이나 척수 손상 환자와 같은 중추신경계 손상 환자에 있어서 허혈성 피부 궤양은 가장 심각한 합병증 중의 하나라고 할 수 있다(McKinley 등, 2002; Wellard, 2001). 이러한 창상이나 궤양을 치료하는 방법으로 물리치료 도구가 다양하게 사용되고 있으며, 형태학적인 연구도 많이 이루어지고 있다.

고압맥동직류자극(high-voltage pulsed galvanic stimulation; HVPGS)과 상처치유에 관한 연구에서 Cruzz 등(1989)은 돼지의 화상 부위에 고압맥동직류자극을 실시하여 상처의 빠른 수축과 상처 부위의 섬유아세포가 증가함을 확인하였고, Mawson 등(1993)은 문헌적 고찰을 통해 전기자극이 피부의 혈류 증가와 상처의 치유를 촉진하며, 특히 고압맥동직류자극(75V, 10Hz)은 표피조직의 oxygen tension levels을 정상 범위로 회복시켜준다고 하였다.

극초단파와 관련된 연구에서 Korpan 등(1994)은 토끼의 감염창상과 비감염창상에 연속극초단파를 주파수 37 GHz, 강도 1 mW/cm²으로 30분 동안 일주일간 적용한 결과 극초단파 적용군에서 두 배 이상 상처 표면의 크기가 작아짐을 관찰하였고, Korpan 등(1995)은 복부 수술 후 저강도 연속극초단파를 적용하여 빠른 치유를 확인하였다.

초음파를 이용한 연구에서 Byl 등(1992)은 돼지의 표피에 3일 동안 초음파(1MHz, 0.5W/cm², 맥동비 20%, 적용시간 5분)를 적용한 결과 비만세포(mast cell)의 탈과립이 증가하였으며 콜라겐의 침착이 유도됨을 관찰하였고, 일주일 후 상처의 크기가 감소함을 육안으로도 확인하였다. 비만세포는 헤파린(heparin), 히스타민(histamine), 세로토닌(serotonin)을 분비하며, 헤파린은 상피세포의 이주(migration)와 신생혈관형성을 촉진하는 것으로 알려져

있다(Dyson 등, 1968). 또한 1993년 Byl 등은 초음파의 강도에 따른 상처 치유 효과를 알아보기 위해 고강도 초음파($1.5\text{W}/\text{cm}^2$, 연속파, 1MHz, 5분)와 저강도 초음파($0.5\text{W}/\text{cm}^2$, 순환주기 20%, 1MHz, 5분)를 돼지의 상처 부위에 적용하여 비교해 본 결과, 초음파 적용 5일 후 콜라겐의 소화나 가수분해에 의해 생성되는 하이드록시프롤린(hydroxyproline)이 두 군 모두에서 증가하였으나 저강도 초음파 군에서 더 많은 증가를 보였으며, 10일 적용군에서는 하이드록시프롤린과 상처의 크기 모두에서 저강도 초음파 군에서 유의한 차이를 보였다. 따라서 Byl 등은 상처 재생 초기에는 고강도와 저강도 초음파 모두를 적용할 수 있으며, 2주 이상 초음파를 적용할 경우 저강도 초음파가 콜라겐 침착과 상처 치유 촉진에 더 효과적이라고 제안하였다.

저강도 레이저도 최근 임상에서 상처 치유에 많이 사용하고 있으며, Simoes 등(2002)은 흰쥐에 직경 6mm의 화상을 유발하여 1047nm 네오디움(neodymium) 레이저를 $1.0\text{J}/\text{cm}^2$ 의 강도로 조사한 결과 실험군에서 더 빠른 치유를 확인하였다. 또한 Simunovic 등(2000)은 74명의 환자의 상처 부위에 헬륨-네온 레이저(HeNe laser, 632.8nm)와 다이오드 레이저(diode laser, 904nm)를 복합적으로 적용하여, 레이저 치료군에서 상처 치유의 유의한 증가를 확인하였으며 통증 감소와 기능 회복의 향상도 확인하였다.

수치료와 관련된 연구에서, Burke 등(1998)은 재활과정에서 심각한 문제를 발생시키는 욕창 환자 24명을 대상으로 드레싱과 더불어 전신욕(whirlpool)을 하루에 20분간 적용한 결과 드레싱만 적용한 군(18명) 보다 유의한 개선을 확인하였으며, : Juve Meeker(1998)는 복부 수술은 받은 환자 63명을 대상으로 실험군(31명)과 대조군(32명)을 나누어 수술 후 6시간이 경과된 후부터 실험군에 전신욕을 실시하여 상처 치유와 통증 감소에 대한 연구를 하였다. 전신욕은 하루에 두 번, 15분간, 3일 동안 실시 하였으며, 실험 결과 전신욕 적용군에서 상처 치유 뿐만아니라 통증 감소에서도 유의한 증가를 확인할 수 있었으며, 수술 후 전신욕을 적용함으로써 감각회복, 안락감, 합병증의 감소 및 환자의 조기 퇴원의 많은 잇점이 있다고 제안하였다.

이와 같이 상처 회복이나 조직 재생과 관련해서 물리치료적 도구를 이용한 연구들이 많이 이루어 지고 있으나, 위의 연구들은 상처의 크기 변화를 살펴봄으로서 조직의 형태학적인 면을 관찰하였다. 본 연구에서는 형태학적인 변화 보다는 상처 치유의 초기에 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 표피성장인자의 면역반응을 통해 초음파가 상처 치유에 미치는 영향을 보고자 하였다.

표피성장인자는 악하선(submaxillary gland), 눈선(lacrimal gland), 갑상선(thyroid gland), 신장, 췌장 등에서 분비되는 분자량 6kDa의 단백질로서(Van Setten 등, 1989; Ohashi 등, 1989), 분화된 상피세포들의 생성을 촉진하며(Cohen 등, 1963), 각질 형성세포의 분열을 촉진하고(Rhinwald 등, 1977), 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Parkar 등, 2000; Cohen 등, 1982). 또한 세포의 이주(migration)는 많은 생리적, 병리적 과정에 중요한 역할을 하는데(Chicoine과 Silbergeld, 1995), 표피성장인자는 이러한 세포 이주의 조절자 역할을 한다(Margaret 등, 1998).

이러한 표피성장인자가 상처 치유에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구들을 살펴보면, 박 등(1995)은 흰쥐의 피부에 전충결손 절제창상과 화상을 유발시켜 여기에 외용성 표피성장인자를 도포하여 3주간 관찰한 결과 표피성장인자를 도포한 군에서 상처 크기의 유의한 감소를 관찰하였고, 조직학적 소견으로도 신생진피, 혈관생성, 교원질의 성숙 및 재상피화의 증가를 보고하였다.

또한 김(2001)은 흰쥐의 상처 부위에 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저로 주파수 1000Hz, 파장 830nm, 10mW 강도로 10분간 1일 1회, 4일간 조사한 결과, 3일 이후에 표피성장인자에 대한 가장 강한 면역반응이 관찰됨으로 저장도 레이저가 상처 회복에 효과적임을 보고하였다. 이는 본 연구의 결과와 유사한 결과로서 추적 연구를 통해 상처 조직의 크기는 조사하지 않았지만 앞서 언급한 Simoes 등(2002)과 Simunovic 등(2000)이 확인한 상처 크기의 감소와 연관시켜 볼 때, 레이저가 상처 초기에 표피성장인자의 발현을 증가 시킴으로 인해 더 빠른 상처 치유를 보인다고 생각할 수 있을 것이다.

본 연구에서도 충분한 시간을 두고 상처의 크기를 측정해보지는 않았지만 초음파가 초기 상처 조직내에 표피성장인자의 발현을 증가시켰으며, 이로 인해 Byl 등(1992, 1993)의 연구에서와 마찬가지로 육안적인 상처 크기의 감소도 확인해 볼 수 있었으리라 여겨진다.

VII. 결 론

흰쥐의 창상 부위에 초음파를 적용하여 표피성장인자의 발현을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 흰쥐 창상 조직에 단순 드레싱만 실시하여 3일이 경과된 후 조직 내의 표피성장인자 항체에 대한 면역반응은 새롭게 형성되고 있는 표피와 진피층의 일부에서 관찰되었지만 미약하였다.

둘째, 초음파가 창상 조직내의 표피성장인자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐에 창상을 유발한 후 3일간 초음파를 적용한 결과 새롭게 형성되고 있는 표피와 진피층 전체에서 표피성장인자 항체에 대한 강한 면역반응이 관찰되었다.

따라서 초음파는 상처 치유의 초기에 발현하여 세포의 증식과 분화에 관여하는 표피성장인자의 발현을 증가시키고, 결과적으로 상처 치유를 촉진시키는 것으로 사료된다.

<참 고 문 헌>

Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD et al : Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair, Proc Natl Acad Sci U S A, 82(21):7340-7344, 1985.

Brown GL, Curtsinger L 3rd, Brightwell JR et al : Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor, J Exp Med., 163(5):1319-1324, 1986.

Clark RAF, Henson PM : The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York. 1988.

Giannobile WV : The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. J. Periodontol, 67, 543-553. 1996.

Lynch SE, De Castilla RG, Williams RC et al : The effect of short-term application of a combination of platelet derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. Periodontology, 62, 458-467, 1991.

Terranova VP : Biologically active factors in the treatment of periodontal disease, Curr. Opin. Periodontol., 129-135, 1993

Parkar MH, Kuru H, Giouzei M et al : Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells, Archives of Oral Biology, 46, 275-284, 2001.

Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C et al : A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. J Biol Chem. Feb 10;257(3):1523-1531. 1982.

Simunovic Z, Ivankovich AD, Depolo A : Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group, J Clin Laser Med Surg. Apr;18(2):67-73, 2000.

Converse GM 4th, Ries WR, Reinisch L : Comparison of wound healing using the CO2 laser at 10.6 microm and 9.55 microm, Laryngoscope, 111(7):1231-1236, 2001.

Lowe AS, Walker MD, Cowan R et al : Therapeutic ultrasound and wound closure: lack of healing effect on x-ray irradiated wounds in murine skin, Arch Phys Med Rehabil. 82(11):1507-1511, 2001.

Robert C, Shamberger MD, Thomas L et al : The effect of ultrasonic and thermal treatment on wound, Plastic and Reconstructive Surgery, 68(6):860-870, 1981.

Kallistov DB : Microwave therapy in gunshot and thermal injuries of soft tissues of the extremities, Vestn Khir Im I I Grek, 159(5):35-38, 2000.

Korpan NN, Resch KL, Kokoschinegg : Continuous microwave enhances the healing process of septic and aseptic wounds in rabbits, J Surg Res, 57(6):667-671, 1994.

Staley M, Richard R : Management of the acute burn wound: an overview, Adv Wound Care, 10(2):39-44, 1997.

Burke DT, Ho CH, Saucier MA et al : Effects of hydrotherapy on pressure ulcer healing, Am J Phys Med Rehabil, 77(5):394-398, 1998.

Roebroek ME, Dekker J, Oostendorp RAB : The use of therapeutic ultrasound in physical therapy: practice patterns in Dutch primary health care, *Physical Therapy*, 78:470-478, 1998.

Cruz NI, Bayron FE, Suarez AJ : Accelerated healing of full-thickness burns by the use of high-voltage pulsed galvanic stimulation in the pig, *Ann Plast Surg*, 23(1):49-55, 1989.

Mawson AR, Siddiqui FH, Biundo JJ : Enhancing host resistance to pressure ulcers: a new approach to prevention, *Pre Med*, 22(3):433-450, 1993.

Korpan NN, Resch KL, Kokoschneegg P : Continuous microwave enhances the healing process of septic and aseptic wounds in rabbits, *J Surg Res*, 57(6):667-671, 1994.

Dyson M, Pond JB, Joseph J, Warwick R : The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. *Clin Sci*, 35:273-285, 1968.

Byl NN, McKenzie AL, West JM et al : Low-dose ultrasound effects on wound healing: a controlled study with Yucatan pigs. *Arch Phys Med Rehabil*, 73(7):656-664, 1992.

Byl NN, McKenzie A, Wong T et al : Incisional wound healing: a controlled study of low and high dose ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther*, 19(5):619-628, 1993.

Simoes RM, Teixeira D, Maldonado EP et al : Effects of 1047-nm neodymium laser radiation on skin wound healing. *J Clin Laser Med Surg*, 20(1):37-40, 2002.

Simunovic Z, Ivankovich AD, Depolo A : Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. *J Clin Laser Med Surg*, 18(2):67-73, 2000.

Burke DT, Ho CH, Saucier MA et al : Effects of hydrotherapy on pressure ulcer healing. *Am J Phys Med Rehabil*, 77(5):394-398, 1998.

Van Setten GB, Viinikka L, Tervo T et al : Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefe's Arch Exp Ophthalmol*, 227:184-187, 1989.

Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y et al : Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30:1879-1882, 1989.

Cohen S, Elliott GA : The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol*, 40:1-5, 1963.

Rhinwald JG, Green H : Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human keratinocytes. *Nature*, 265:421-424, 1977.

박철중, 김조용, 이종욱 등 : 표피성장인자의 창상치유에 대한 효과. *대한피부과학회지*, 33(1):76-78, 1995.

김동현 : GaAlAs 레이저 조사가 흰쥐 창상부위의 상피세포성장인자 발현과 통증에 미치는 영향. 석사학위청구논문. 2001.

McKinley WO, Gittler MS, Kirshblum SC et al : Spinal cord injury medicine. 2. Medical complications after spinal cord injury: Identification and management. *Arch Phys Med Rehabil*, 83(3 Suppl 1):S58-64, 2002.

Wellard SJ : An Australian experience of managing pressure ulcers in persons with SCI. *SCI Nurs*, 18(1):11-17, 2001.

Ware MF, Wells A, Lauffenburger DA : Epidermal growth factor alters fibroblast migration speed and directional persistence reciprocally and in a matrix-dependent manner. *Journal of Cell Science*, 111:2423-2432, 1998.

Chicoine MR, Silbergeld DL : The in vitro motility of human gliomass increases with increasing grade of malignancy. *Cancer*, 75:290-299, 1995.