

토끼의 비골 골절에서 산화구리(CuO, copper oxide)의 골재생 효과

정윤정 · 이창훈* · 배일주** · 남 일*** · 정성목**** · 남치주**** · 서강문¹****

강원대학교 수의학과, *원자력병원, 세포생물학실험실
천지산 연구소(주), *프라마스(주)
****서울대학교 수의과대학

Bone Regeneration Effects of Copper Oxide on Fibular Fracture in Rabbits

Yun-Joung Joung, Chang-Hun Rhee*, Il-Ju Bae**, Il Nam***, Seong-Mok Jeong****,
Tchi-Chou Nam**** and Kang-Moon Seo¹****

Dept. of Veterinary Medicine, Kangwon National Univ., Chunchon
*Lab. of Cell Biology, Korea Cancer Hospital, Seoul
**Lab. of Chonjisan Institute, Seoul
***Lab. of Framas Co. Ltd., Asan
****College of Veterinary Medicine, Seoul National Univ., Seoul

Abstract : The bone regeneration effects of copper oxide on experimentally induced fibular fracture were examined in 36 New Zealand white male rabbits. They were divided into two groups: non-treated group (control group) and copper oxide treated group (treatment group). A fibular fracture was created by an osteotomy in the middle of the fibula and 62.5 mg/kg of copper oxide was orally administrated during 7 days after operation in the treatment group. Radiological findings, histopathological examinations and hematoserological findings were observed to evaluate the bone regeneration effects of copper oxide on fibula fracture during 9 weeks. In radiological findings, the area of bone regeneration at the fracture site of the treatment group was significantly wider from 3 weeks to 6 weeks after administration of copper oxide than those of the control group ($p < 0.05$). In histopathological examinations, fracture healing in treatment group was faster than in control group. Also, histopathological responses of thick bony trabeculae and new bone marrow formation were shown in the treatment group, whereas many fibrous tissues and cartilages were mainly observed in the control group. No specific effects of copper oxide on the body was found in hematological and serological test during experimental period. These results showed that the copper oxide had a potential therapeutic application in the treatment of fracture and bone trauma.

Key words : copper oxide, bone regeneration, fibular fracture, rabbit

서 론

구리는 정상적인 에너지대사에 관여하는 여러 효소계에 영향을 주어 뼈 및 연골조직의 발육과 유지에 필수적이며^{7,25}, 신체에서 면역기능을 활성화시켜 주는 광물질이다¹⁵. 구리 부족 시에는 골의 이상 외에도 적혈구수가 감소되고^{2,9,10,18} 대동맥과 뇌세포, 척추계의 신경전달시스템에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{6,19,33}.

동물에서 처음 실시된 구리 결핍에 대한 연구로 랫드에 구리가 없는 우유만을 투여했을 때 빈혈이 발생되었다¹². 그리고 구리가 결핍된 어미에서 태어난 신생동물이나 구리가 결핍된 초지에서 방목된 동물에서 사지 기형이나 사지 골격의 약화, 후구마비와 같은 골격계 질환이 발생되었다^{3,32,36}. 또한 구리 부족인 닭에서는 장골의 심각한 형성 부진이 나타났

다³¹. 이처럼 골과 결합조직의 생체 합성에 대한 구리의 필요성은 구리 부족 시 골격계 질환이나 보행 실조 등이 나타나며 이는 골 합성시 구리 의존성 효소에 의한 단계가 필수적이기 때문인 것으로 밝혀져 있다^{19,37}. 또한 Milachowski 등¹⁷은 토끼에서 골 치유를 위한 필수적인 요소로 구리를 비롯한 여러 미량 원소에 대해 보고한 바 있다.

사람에서도 구리 결핍 시에 영아, 유아 및 심지어 성인에서도 골의 재생과 조직 치유에 영향을 받는다⁷. 구리 결핍 증상을 보이는 영아의 방사선 소견에서 구루병과 같은 양상으로 사지 골격의 미만성 변화, 골다공증, 골간단의 cupping, 골막 융기 및 다발성 골절이 보였는데, 황산 구리(copper sulfate)를 투여한 결과 2주안에 정상 혈청 구리농도에 도달하였고 이러한 골의 변화가 개선되었다고 하였다¹. 타 연구에서도 골다공증과 관련된 증상이나 구루병과 유사한 골의 변화에서 구리의 투여로 증상이 개선되었다고 동일하게 보고한 바 있다^{14,39}. 이와 같이 구리는 골 및 결합조직의 대사에서 매우 중요한 광물질로, 골관절증, 골다공증 및 류마치스 관절염의 치유 과정에 중요한 요소가 된다⁷. 한편, 구리

¹Corresponding author.
E-mail : kmseo@snu.ac.kr

본 연구는 서울대학교 수의과학연구소의 일부 지원을 받았음.

는 골 재흡수능을 저해하는 기능이 있어, 골절, 류마치스 관절염 및 골육종과 같은 골질환에서 비정상적인 골 흡수 비율을 감소시키는 조절 기능이 있는 것으로 보고된 바 있는데 특히, 류마치스 관절염 환자에서 혈청 구리농도가 높게 나타나는 것은 골 흡수의 조절기능이 활성화된 영향으로 보고하였다³⁸. Okano²⁰는 골전도에 미치는 필수 미량 원소의 영향에 대한 연구에서 구리는 골아세포 기능과 파골세포 기능을 모두 억제하여 낮은 수준의 골전도를 유도한다고 하였다.

Dollwet과 Sorenson⁷은 이와 같이 구리가 골에 미치는 영향이 많으므로, 정형외과의는 골절 환자나 골 손상과 관련된 환자를 치료할 때 환자의 구리농도 측정을 고려해야 하며, 치료제에 구리를 첨가해야 할 것이라고 하였다.

골절 치유에 이용된 구리화합물로는 현재까지 황산구리까지 거의 유일하다. 본 연구에서는 황산구리 대신 산화구리를 이용하여 골절 치유결과를 검증하여 보았다. 실험적으로 비골 골절을 유발시켜 토끼에 산화구리를 투여한 후, 그 효과를 방사선학적, 조직병리학적, 혈액학적 및 혈청 화학적 검사들을 통해 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험군의 분류

본 연구에서는 6개월 이상 된 New Zealand white rabbit 36마리를 이용하였으며, 이들은 모두 3 kg 이상인 수컷이었다. 모든 동물은 실험 10일 전에 입식 시켜 환경에 적응시킨 후 임상적으로 건강한 동물을 대상으로 실험을 실시하였다. 사료(삼양사료)와 음수는 자유 급식시켰다.

실험군의 분류는 인위적으로 비골 골절 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 골절 유발 후 7일간 하루 한번 62.5 mg/kg의 산화 구리를 경구 투여한 처치군으로 구분하였으며, 실험동물의 배치는 대조군 17두, 처치군 19두로 하였다.

수술방법

모든 실험동물은 수술 전 우측 경골 및 비골 부위의 피부를 광범위하게 삭모하고, 세척과 소독을 실시하였다. 실험동물의 전신 마취는 ketamine(케타민®, 유한양행) 44 mg/kg과 xylazine(렘폰®, 바이엘) 3 mg/kg을 근육내로 병용 주사하여 유도하였다.

수술은 후지의 전외측으로 접근하여 피부를 절개한 후, 근육을 박리하여 비골의 골간 중심부위를 노출시켰다. 비골의 골간 중심부위를 Gigli's saw를 이용하여 인위적으로 횡골절을 유발하였다. 술 후 골편이 남지 않도록 생리식염수로 세척해 내고, 근막을 봉합한 후 피부봉합을 하였다.

수술 전과 수술 후 3일간 감염을 예방하기 위해 항생제(Cefazolin®, 종근당)를 하루 1회 근육주사 하였고, 수술부위는 포대로 보호하였다.

방사선학적 검사

방사선학적 검사는 수술 직후부터 수술 후 9주까지 매주

1회 실시하여 신생골 형성의 정도를 평가하였다. 방사선 촬영은 전후측 방향으로 하였으며, 62 kVp, 2.5 mAs(IME-12A®, Toshiba, Japan)의 조건으로 촬영하였다. 방사선 사진상에 나타난 신생골의 면적은 영상분석 프로그램(Image tool®, ver. 2.0, University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA)을 이용하여 측정하였다.

대조군과 처치군 간의 유의성을 검증하기 위하여 Mann Whitney test를 실시하였고, 유의도는 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

병리조직학적 검사

병리조직학적 검사를 위하여 수술 후 3주, 6주, 및 9주에 각각 5~6마리씩 안락사 시킨 후 비골 시료를 채취하여 육안 검사를 실시한 다음 시료를 10% buffered formalin(pH 7.6)에 46시간 동안 침지하여 고정시켰다. Plank-Rychlo 용액에 탈회시킨 후 5% Na₂SO₄에 12시간동안 침지한 후, 다시 10% buffered formalin에 고정하였다. 탈회가 완전히 끝난 시료는 골절선을 중심으로 양 골단이 포함되도록 예리한 칼날로 종절단하였다. 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매 한 후, 5 μm 두께로 절편하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 실시한 다음, 광학현미경 하에서 골 조직 재생의 정도를 확인하였다.

대조군과 처치군 간의 조직학적 차이를 알아보기 위해, 시기별로 골절 치유 단계를 다음과 같이 I, II, III, IV, V 및 VI 단계로 분류하였다.

- I 단계 : 골절이 된 이후 파골세포가 등장하고 연골 형성이 시작되는 염증 단계
- II 단계 : 골절선이 연골조직으로 융합되며, 골아세포에 의한 골형성이 시작되는 연성 가골 단계
- III 단계 : III단계와 IV단계 사이로 두 단계의 모습이 복합적으로 나타나는 단계
- IV 단계 : 연골 조직이 섬유골이나 미숙골로 변화되어 골절선이 골조직으로 융합되는 경성 가골 단계
- V 단계 : IV단계와 VI단계 사이로 두 단계의 모습이 복합적으로 나타나는 단계
- VI 단계 : 과다한 가골이 파골세포에 의해 흡수되고 골수강이 재생되는 재형성 단계

혈액학적 및 혈청 화학적 검사

모든 실험동물은 수술 전부터 술 후 6주까지 매주 5 ml씩 경정맥을 통하여 채혈하고, 5 ml 중 2 ml는 EDTA 처리를 하여 혈액검사에 이용하였으며, 3 ml는 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청 화학적 검사에 이용하였다.

혈액학적 검사로는 PCV, 총적혈구수, 총백혈구수를 측정하였고 혈청 화학적 검사로는 총 단백질 농도(TP), 섬유소원 농도, aspartate transferase(AST) 농도, alanine aminotransferase(ALT) 농도, blood urea nitrogen(BUN) 농도 및

creatinine 농도를 dry chemistry analyser (Ectachem DT60®, Johnson & Johnson, USA)를 이용하여 측정하였다. 골과 관련된 혈청 ALP를 알아보기 위해 Behr와 Barnert⁴의 방법을 이용하여 bone specific ALP를 측정하였으며, 측정 방법은 우선 혈청내 총 ALP를 측정한 후, 혈청 100 µl에 2% w/v Triton X-100 surfactant 용액 10 µl를 섞고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 혼합액을 0.5% w/v wheat germ lectin 용액 100 µl와 섞고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 2000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상청액으로 ALP를 측정 (non-bone specific ALP)하였다. 측정 후 희석을 교정하기 위해서 측정한 수치(non-bone specific ALP)에 2.1을 곱하고, 이 값을 총 ALP값에서 뺀 값을 bone specific ALP값으로 산출하였다.

결 과

방사선학적 소견

방사선 사진 상 재생된 가골의 양이나 가골의 밀도 차이가 수술 후 1주에는 대조군과 처치군 사이에 뚜렷하지 않았지만 수술 후 2주부터 뚜렷이 나타나기 시작했다. 처치군은 대조군에 비해 많은 양의 가골이 신생된 모습을 보였으며 가골의 밀도 또한 처치군에서 보다 견고한 모습을 나타내었다.

신생골의 면적을 측정한 결과 수술 후 3주부터 6주까지 대조군은 신생골의 면적이 평균 21.6±10.8 mm²에서 26.2±11.1 mm²로 증가하였으며, 처치군은 평균 31.4±12.9 mm²에서 42.7±12.0 mm²로 증가하여 이 기간동안 처치군에서 신생골의 면적이 유의성 있게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (p<0.05, Fig 1, 2).

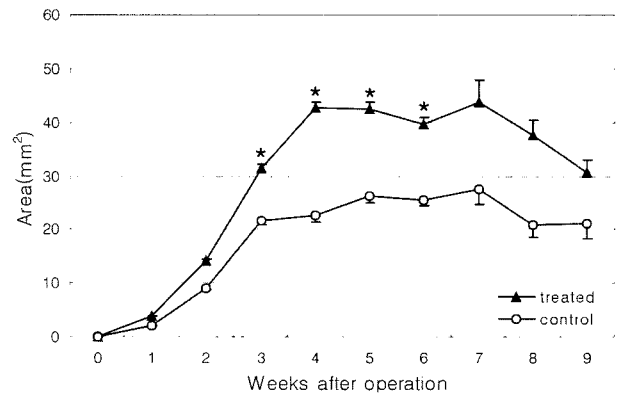


Fig 1. Callus size measured radiographically. The callus size (mean± SE) measured by image analysing program (Image tool®) from radiographs is shown for control (open circle) and copper oxide treatment (closed triangle) groups (*; p<0.05).

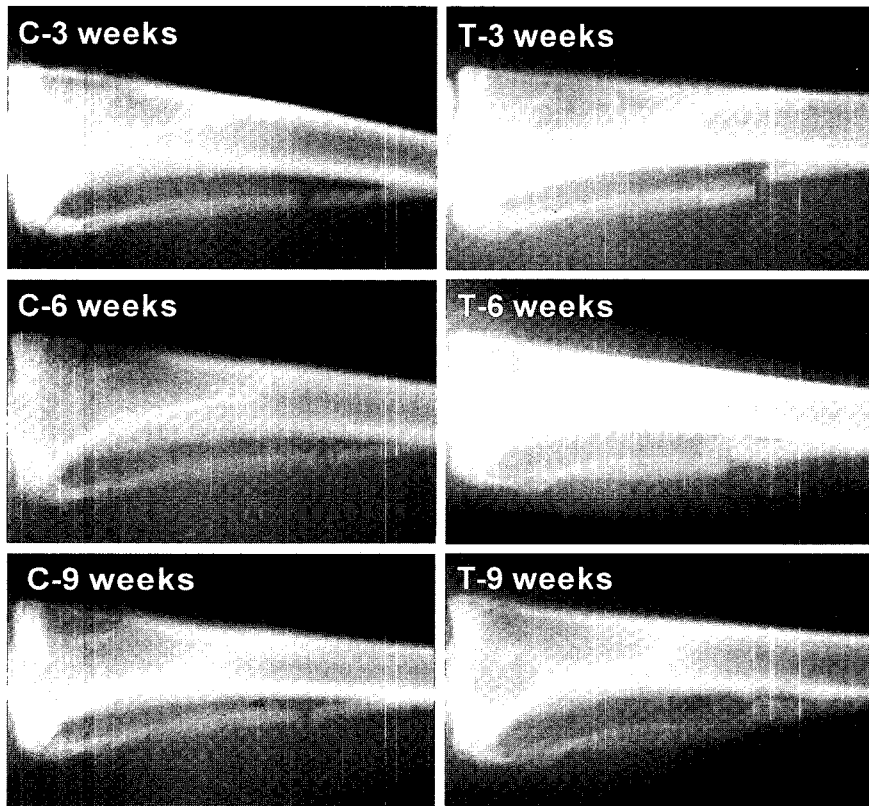


Fig 2. Radiographic healing of fractured fibula. Representative anterior-posterior radiographs of fibula following osteotomy in control (C-) and copper oxide treatment groups (T-). The fibula of treatment group shows a larger, more radiopaque callus than those of control group at the same time point. At 9 weeks, the defect in the callus of the fibula of treatment group is barely perceptible.

그러나 수술 후 7주 이후에서는 두 군간의 유의성 있는 차이가 확인되지 않았다.

병리조직학적 소견

산화구리의 골 재생 효과를 확인하기 위하여 시기별로 골절 치유 정도를 병리조직학적으로 분석한 결과, 수술 후 3주에 대조군에서는 총 5두 중 I단계에 속하는 개체가 1두(20%), II단계에 속하는 개체가 3두(60%), III단계에 속하는 개체가 1두(20%)인데 반하여, 처치군에서는 총 7두 중 II단계에 속하는 개체가 6두(85.7%), III단계에 속하는 개체가 1두(14.3%)로 처치군의 개체들이 전반적으로 골절치유가 빨리 시작되는 것을 알 수 있었다. 수술 후 6주에 대조군에서는 총 7두 중 II단계에 속하는 개체가 4두(57.1%), III단계에 속하는 개체가 2두(28.6%), IV단계에 속하는 개체가 1두(14.3%)인데 반하여, 처치군에서는 총 7두 중 IV단계에 속하는 개체가 2두(28.6%), V단계에 속하는 개체가 2두(28.6%),

VI단계에 속하는 개체가 3두(42.9%)로 처치군의 개체들이 전반적으로 골절치유가 빠르게 진행되었다. 수술 후 9주에도 대조군에서는 총 5두 중 II단계에 속하는 개체가 2두(40%), IV단계에 속하는 개체가 1두(20%), V단계에 속하는 개체가 2두(40%)인데 반하여, 처치군에서는 총 5두 중 IV단계에 속하는 개체가 2두(40%), VI단계에 속하는 개체가 3두(60%)로 처치군의 개체들이 전반적으로 골절치유 속도가 빨랐다 (Table 1).

전반적인 병리조직학적 변화로 수술 후 3주에 대조군은 골절선으로 연골조직이 자라 들어가는 양상을 보였고, 술 후 6주에도 골절선으로의 신생골 재생이 미약하였고, 연골조직으로 유합되어 있었다. 수술 후 9주에는 골절선에 신생골의 재생이 어느 정도 보이기 시작하였으나, 연골조직과 섬유세포로 매우 두껍게 채워져 있었다. 처치군에서는 수술 후 3주에는 연골 조직이 두껍게 골절선으로 자라 들어가 유합되어 있었으며, 수술 후 6주에는 골절선 안으로 다량의 신생골 및 신생 골수를 볼 수 있었으며, 연골조직이 신생골로 대체되어 있었다. 수술 후 9주에는 골의 remodelling 과정으로 정상조직보다도 두터운 골 소주를 발견할 수 있었고 골수가 재생되고 있어 대조군 보다 처치군에서 빠르고 많은 골 조직의 재생이 이루어진다는 것을 알 수 있었다(Fig 3).

Table 1. Histopathological grades of bone healing after copper oxide treatment in rabbits with fibular fracture

Weeks	Animal No.	Grade	
		Control group	Treatment group
3	1	II	II
	2	III	III
	3	I	II
	4	II	II
	5	II	II
	6	-	II
	7	-	II
6	8	II	VI
	9	II	IV
	10	II	V
	11	III	V
	12	IV	IV
	13	III	VI
	14	II	VI
9	15	IV	VI
	16	II	IV
	17	V	VI
	18	V	IV
	19	II	VI

Grade I: The inflammation stage to start forming cartilage and to enter the osteoclast cell after fracture.
 Grade II: The soft callus stage that the fracture line was filled by cartilaginous tissue and to start bone regeneration with osteoblast cell.
 Grade III: Mixed stage of grade II and grade IV.
 Grade IV: The hard callus stage that the fracture line was united by bony tissues and cartilaginous tissues was changed to the fibrous bone and immature bone.
 Grade V: Mixed stage of grade IV and grade VI.
 Grade VI: Remodelling stage that excessive callus was resorbed by osteoclast cell and bone marrows was newly formed.

혈액학적 소견

PCV 값의 변화. 대조군의 PCV 값은 실험 전 기간 동안

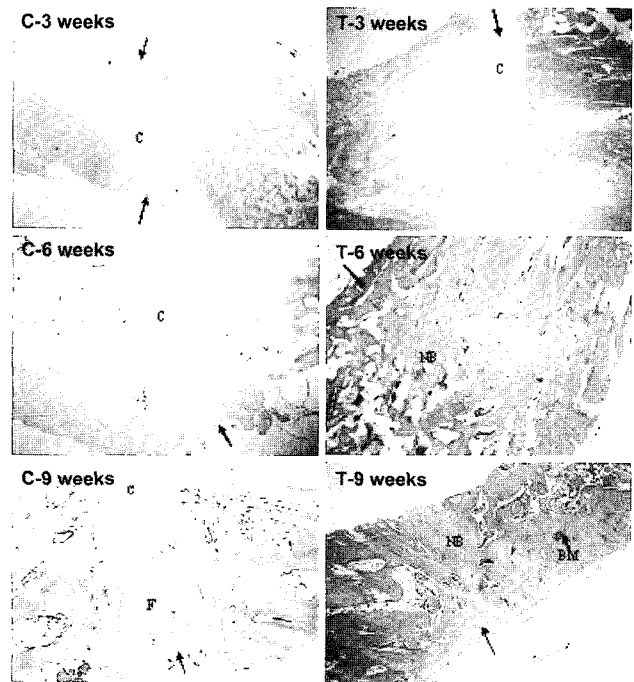


Fig 3. Representative histopathological appearance of fibula fracture following osteotomy in control (C-) and copper oxide treatment groups (T-). Arrows indicates the fracture line, the C represents the cartilage, the F explains the fibrous tissue, the NB indicates new bone, and the BM represents bone marrow.

평균 $40.0 \pm 3.3 \sim 45.6 \pm 2.4\%$ 의 수준으로 변동되어 토끼의 정상 범위인 34~50% 내에 포함되었다. 처치군의 PCV 값도 실험 전 기간 동안 평균 $35.0 \pm 5.3 \sim 43.5 \pm 2.1\%$ 사이로 정상 범위 내에서 변동되어 산화구리가 PCV 값에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다(Fig 4a).

백혈구수의 변화

대조군의 백혈구수는 실험 전 기간 동안 평균 $7.1 \pm 3.0 \sim 15.0 \pm 6.0 (\times 10^3/mm^3)$ 으로 변동되어 토끼의 정상 범위인 $5.0 \sim 15.0 (\times 10^3/mm^3)$ 내에 포함되었다. 처치군의 백혈구수 역시 $8.8 \pm 3.3 \sim 12.0 \pm 3.0 (\times 10^3/mm^3)$ 사이로 정상 범위 내에서 변동되어 산화구리가 백혈구수의 변동에 영향을 미치지 않

음을 알 수 있었다(Fig 4b).

적혈구수의 변화

대조군의 적혈구수는 실험 전 기간 동안 평균 $5.9 \pm 0.7 \sim 7.5 \pm 1.5 (\times 10^6/mm^3)$ 으로 토끼의 정상 적혈구수인 $5.0 \sim 8.0 (\times 10^6/mm^3)$ 내에 속했으며, 처치군의 적혈구수 또한 $5.4 \pm 0.6 \sim 7.7 \pm 1.4 (\times 10^6/mm^3)$ 사이로 정상 범위 내에 속해 산화구리가 적혈구수의 변동에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig 4c).

혈청 화학적 결과

혈청 총단백질 농도의 변화. 대조군의 혈청 총단백질 농도는 $7.3 \pm 0.3 \sim 7.8 \pm 0.4$ g/dl 사이의 변화를 나타내어 토끼의 정상 혈청 총단백질 농도인 5.4~7.9 g/dl에 속하며, 처치군의 혈청 총단백질 농도의 변화 역시 $7.0 \pm 0.4 \sim 7.8 \pm 0.4$ g/dl 사이로 정상 범위 내에 속하여 산화구리가 혈청 총단백질 농도의 변화에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig 5a).

섬유소원 농도의 변화. 토끼의 정상 섬유소원 농도는 0.12~0.3 g/dl인데, 대조군의 섬유소원 농도는 $0.25 \pm 0.03 \sim 0.54 \pm 0.07$ g/dl 사이로, 정상범위보다 높은 것으로 나타났다. 처치군의 섬유소원 농도 역시 $0.27 \pm 0.02 \sim 0.56 \pm 0.02$ g/dl 사이로 정상 범위보다는 높은 것으로 나타났으나 대조군과 변화량의 차이를 나타내지 않아 산화구리치치에 의한 변화는 아님을 알 수 있었다(Fig 5b).

AST 농도의 변화. 대조군의 AST 농도는 실험 전 기간 동안 평균 $18.14 \pm 12.7 \sim 23.4 \pm 15.6$ (IU/l) 사이로 토끼의 정상 범위인 5.0~99.0 (IU/l) 내에서 변동하였다. 처치군의 AST 농도 역시 실험 전 기간 동안 평균 $12.6 \pm 4.4 \sim 23.5 \pm 12.7$ (IU/l) 사이로 정상 범위 내에서 변동되어 산화구리가 AST 농도의 변동에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다(Fig 5c).

ALT 농도의 변화. 대조군의 ALT 농도는 실험 전 기간 동안 평균 $34.6 \pm 16.7 \sim 54.4 \pm 22.7$ (IU/l) 사이로 토끼의 정상 범위인 5.0~250.0 (IU/l) 내에서 변동하였다. 처치군 역시 $30.2 \pm 11.2 \sim 50.8 \pm 16.7$ (IU/l) 사이로 정상 범위 내에서 변동되어 산화구리가 ALT 농도의 변동에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다(Fig 5d).

BUN 농도의 변화. 대조군의 BUN 농도는 실험 전 기간 동안 $16.2 \pm 3.1 \sim 19.0 \pm 2.7$ mg/dl 사이로 토끼의 정상 범위인 12~25 mg/dl 내에서 변동하였고, 처치군의 BUN 농도도 $16.0 \pm 2.9 \sim 20.2 \pm 4.7$ mg/dl로 정상범위 내에서 변동하여 산화구리가 BUN 농도에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다(Fig 5e).

Creatinine 농도의 변화. 대조군의 creatinine 농도는 실험 전 기간 동안 $1.2 \pm 0.1 \sim 1.5 \pm 0.3$ mg/dl 사이로 토끼의 정상범위인 0.5~1.5 mg/dl 내에서 변동하였다. 처치군의 creatinine 농도 역시 실험 전 기간 동안 $1.3 \pm 0.2 \sim 1.5 \pm 0.8$ mg/dl로 정상 범위 내의 변동을 나타내어 산화구리가 creatinine 농도에 영향이 없음을 알 수 있었다(Fig 5f).

Bone specific ALP (BALP)농도의 변화. 대조군의 BALP

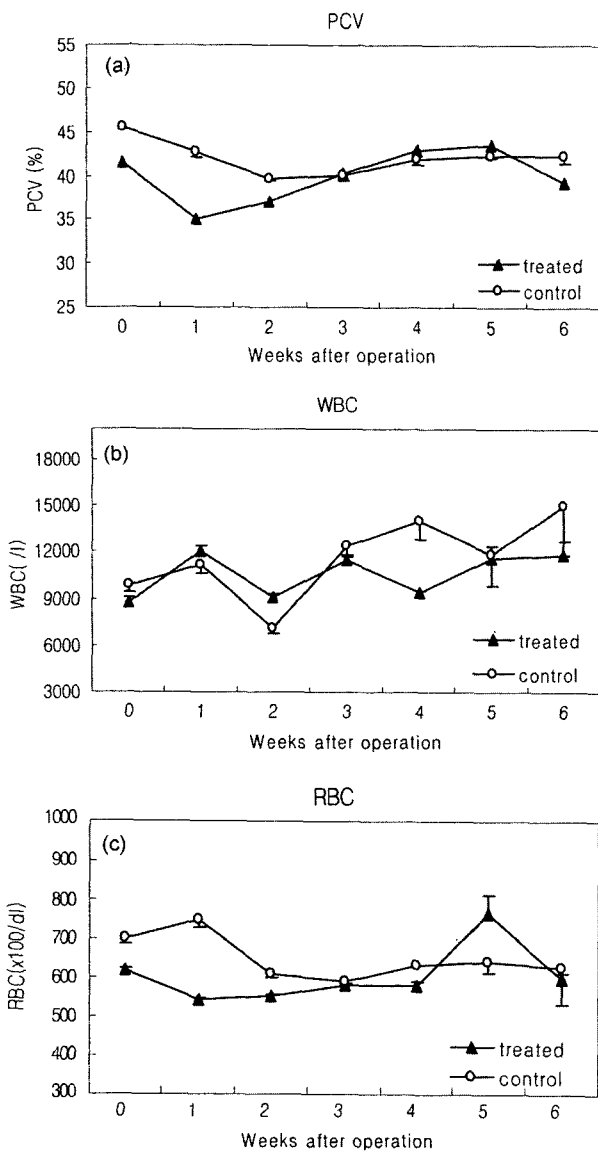


Fig 4. Hematological changes after administration of copper oxide in rabbits with fibula fracture. Graphs are shown for control (open circle) and treatment (closed triangle) groups (mean± S.E.).

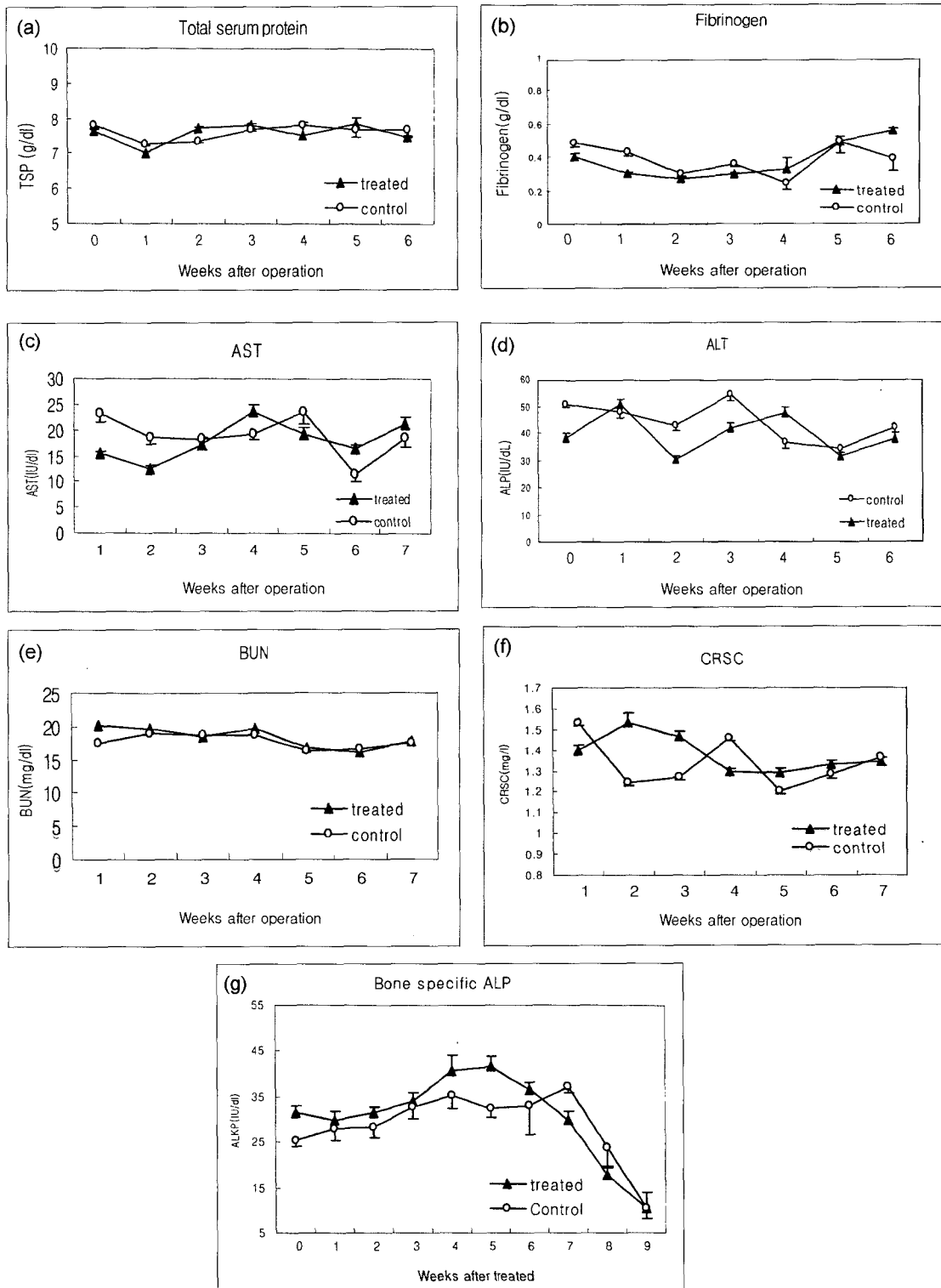


Fig 5. Serum biochemical changes after administration of copper oxide in rabbits with fibula fracture(mean± S.E.). Graphs are shown for control (open circle) and treatment (closed triangle) groups.

농도는 실험 전 기간 동안 평균 $10.2 \pm 5.8 \sim 37.3 \pm 5.0$ 사이의 변화를 나타내었으며, 처치군의 BALP 농도는 평균 $10.3 \pm 6.8 \sim 41.5 \pm 14.7$ 사이의 변화를 나타내었다. 대조군은 BALP

의 변화가 술 후 7주에 가장 높은 수치를 나타낸 반면, 처치군은 술 후 4, 5주에 가장 높은 수치를 나타내었으나 통계적 유의성은 발견할 수 없었다(Fig 5g).

고 찰

골절 유발은 다른 연구자들이 보고한 바와 같이^{8,23,35} 우측 비골을 인공 골절시켰는데 이는 경골^{16,28}이나 요골¹¹과 같은 다른 장골보다 Gigli's saw로 횡골절을 유발하기 용이하며 비골 골절시 경골의 고정효과로 별도의 고정장치가 필요치 않은 부위이기 때문에 실험적으로 선호되고 있는 골절 모델이다.

처치군에 투여한 산화구리의 용량은 62.5 mg/kg으로 정하였는데, 이중 순수한 구리의 용량은 49.9 mg/kg이었다. 이 용량은 황산구리를 사용한 다른 연구에서의 구리 용량인 15 mg/kg²⁶, 16 mg/kg³⁰ 또는 0.5 mg/kg²²에 비하여 많은 용량이었지만, 본 연구의 혈액학적 및 혈청 화학적 분석에서 생체에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 중독과 관련된 어떠한 증상도 나타나지 않았다. 타 연구의 구리 용량보다 본 연구의 구리 용량이 많았어도 독성작용을 관찰 할 수 없었던 이유는 실험 동물의 차이, 사용된 구리화합물의 차이 때문일 것으로 생각되며, 특히 산화구리 자체의 독성이 황산구리보다 적을 가능성이 큰 것으로 사료된다. 그러나 앞으로 산화구리에 대한 체계적인 급, 만성 독성검사가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

방사선 사진으로 영상분석장치를 통해 신생골의 면적을 측정 한 결과에서 산화구리를 경구 투여한 처치군에서 신생골의 면적이 수술 후 3주에서 6주까지 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였는데, 이는 Rico 등²⁷이 랫드에서 난소 절제로 유도된 골감소증에서 구리의 투여로 골의 형태나 밀도가 감소하지 않았다는 연구 결과와 같이 산화구리가 골 치유에 효과가 있음을 증명하는 것이다.

이러한 구리의 골 치유 기전은 골과 결합조직의 구성 성분인 콜라겐을 형성하는 마지막 단계를 매개하는 효소인 lysyl oxidase가 구리 의존성 효소이기 때문이라고 보고된 바 있다.^{3,7,21,24} 또한 처치군에서 수술 후 7주 이후 신생골의 면적이 줄어드는 것을 볼 수 있었는데, 이는 골절 치유의 마지막 단계인 remodelling 단계에서 비정상적으로 자란 가골이 재흡수되었기 때문이라 생각된다.

골 치유에 관여하는 골아세포는 구리 부족 시 민감하게 반응하여 골화작용을 감소시키는 것으로 알려져 있다³⁴. 본 연구에서도 대조군은 수술 후 9주까지도 골절선이 연골조직이나 섬유조직으로 채워져 있고 신생골이 미약하며 골수조직이 보이지 않는데 반해, 처치군은 수술 후 3주부터 대조군보다 빠른 골절치유를 보여 연골조직의 유합과 두터운 골소주가 발견되었고, 수술 후 6주에는 신생 혈관과 신생 골 조직이 대조군에 비해 뚜렷하게 많이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 수술 후 9주에는 거의 완벽한 골재생이 이루어지고 다량의 골수 조직이 신생되는 것으로 보아 산화구리가 골아세포의 형성을 촉진하여 골화작용에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 또한 대조군은 수술 후 6주까지도 주로 II단계의 골치유를 나타내는 반면, 처치군에서는 수술 후 6주에 주로 IV, VI단계의 골치유를 나타내는 것으로 보아 산화

구리가 골절치유 초기 단계부터 골 치유를 빠르게 진행될 수 있도록 영향을 준 것으로 생각된다.

혈액학적 검사 결과에서 두 군 모두 정상범위내의 변동만 나타내었을 뿐 다른 이상을 나타내지 않았는데 이는 산화구리가 생체에 혈액학적으로 어떠한 영향도 주지 않는 것이라 생각된다.

혈청 화학적 검사에서 골 전도의 marker로는 bone specific ALP(BALP), osteocalcin(BGP), pyridinoline(Pyd), deoxy-pyridinoline(Dpyd)등 여러 가지 효소가 밝혀져 있으나⁴⁰, 본 연구에서는 골 형성의 marker이며 측정이 용이한 BALP를 측정하였다^{4,29}. BALP를 측정한 결과 처치군에서는 대조군에 비해 빠른 시기인 수술 후 4, 5주에 가장 높은 수치를 나타낸 반면, 대조군에서는 수술 후 7주에 가장 높은 수치를 나타내어 산화구리가 정상 골 치유단계를 빠르게 일어날 수 있도록 촉진하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 방사선학적 및 병리조직학적 검사에서 대조군에 비해 조기에 신생골의 면적이 증가되었다는 점과 일치된 것이다. 한편, 본 연구에서는 산화구리를 일주일만 투여했는데, 만약 실험 전 기간 동안 투여했다면, 더 왕성한 신생골의 재생과 빠른 골절 치유가 있었을 것으로 판단된다.

Haas¹³는 구리 독성에 대한 고찰에서 생체에 약 100 mg의 구리가 축적되면, 전체 용량의 1/3이 간장과 뇌 조직에 높은 농도로 존재하게 되어 오심, 구토, 설사, 간손상, 치은염, 피부염, 피부 및 피모 탈색이 나타난다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 이러한 중독 증상이 나타나지 않았고, 간장 및 신장의 이상을 평가하기 위한 혈청 화학적 검사 결과 두 군 모두 정상 범위 내의 변동을 보여 산화구리 투여로 나타나는 독성 효과는 없는 것으로 생각된다.

이와 같이 산화구리는 골 재생을 촉진시켜, 골 치유를 빠르게 진행시키는 효과가 있고, 생체에 미치는 영향이 없는 것으로 보아 골절을 비롯한 골 관련 질환에 치료제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 산화구리의 골재생 효과를 알아보기 위하여 36두의 수컷 New Zealand white rabbit을 대상으로 인공적으로 비골 골절을 유발한 후 방사선학적 검사, 병리조직학적 검사, 혈액학적 및 혈청 화학적 검사를 실시하였다.

방사선학적 검사에서 신생골의 면적은 대조군에 비해 산화구리 처치군에서 수술 후 3주부터 수술 후 6주 사이에 유의성 있게 증가되었다($p < 0.05$).

골절 부위의 병리조직학적 검사에서는 대조군보다 처치군에서 빠른 골절 치유 단계를 나타내었다. 수술 후 9주의 대조군은 주로 섬유조직과 연골조직이 관찰된 반면, 처치군은 두터운 골소주 및 골수의 재생이 뚜렷이 관찰되었다.

혈액학적 및 혈청 화학적 검사에서 실험기간 동안 산화구리가 생체에 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과로 보아, 산화구리는 골절과 골 손상의 치유에

효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Allen TM, Manoli A 2nd, LaMont RL. Skeletal changes associated with copper deficiency. *Clin Orthop* 1982; 168: 206-210.
- Banno S, Niita M, Kikuchi M, Wakita A, Takada K, Mitomo Y, Niimi T, Yamamoto T. Anemia and neutropenia in elderly patients caused by copper deficiency for long-term enteral nutrition. *Rinsho Ketsueki* 1994; 35: 1276-1281.
- Baxter JH. Bone disorder in copper deficient puppies. *Am J Physiol* 1951; 167: 766.
- Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem* 1986; 32: 1960-1966.
- Carnes WH. Role of copper in connective tissue metabolism. *Fed Proc* 1971; 30: 995-1000.
- Danks DM. Copper deficiency in human. *Annu Rev Nutr* 1988; 8: 235-257.
- Dollwet HH, Sorenson JR. Roles of copper in bone maintenance and healing. *Biol. Trace Elem Res* 1988; 18: 39-48.
- Fini M, Aldini NN, Cane V, Zaffe D, Giavaresi G, Rocca M, Guzzardella GA, Giardino R. Effects of essential amino acids and lactose on bony fractures and defects in rabbits: a preliminary histomorphometric study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119: 39-45.
- Fleming CR, Hodges RE, Hurley LS. A prospective study of serum copper and zinc levels in patients receiving total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 70.
- Goodman JR, Dalman PR. Role of copper in iron localization in developing erythrocytes. *Blood* 1969; 34: 747.
- Guo F, Wang T, Chen A, Sun S, Li Z. Ovine calcined bone for the repair of radial defect in a rabbit model. *Tongji Med. Univ* 2000; 20: 242-245.
- Hart EB, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem CA. Iron nutrition. VII. Copper is a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J Biol Chem* 1928; 77: 797-812.
- Haas EM. www.natural-healing.co.kr/sup/mineral-copper.htm. 2001.
- Heller RM, Kirchner SG, O'Neill JA, Hough AJ, Howard L, Kramer SS, Green HL. Skeletal changes of copper deficiency in infants receiving prolonged total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1978; 92: 947-949.
- Heresi G, Castillo-Duran C, Munoz C, Arevalo M, Schlesinger L. Phagocytosis and immunoglobulins level in hypocupremic infants. *Nutr Res* 1985; 33: 1112-1118.
- Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res* 1998; 16: 654-659.
- Milachowski K, Moschinski D, Stawinoga B. The influence of the trace-elements copper and zinc on bone healing in rabbits. *Unfallheilkunde* 1981; 84: 168-174.
- O'Dell B.L. Biochemistry of copper. *Med. Clin. North Am.* 1976; 60: 687.
- O'Dell BL, Smith RM, King RA. Brain catecholamines and copper deficiency in lambs. *Fed Proc* 1974; 33: 668.
- Okano T. Effects of essential trace elements on bone turnover in relation to the osteoporosis. *Nippon Rinsho* 1996; 54: 148-154.
- Opsahl W, Zeronian H, Ellison M, Lewis D, Rucker RB, Riggins RS. Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon. *J Nutr* 1982; 112: 708-716.
- Pearce SG, Firth EC, Grace ND, Fennessy PF. Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine Vet J* 1998; 30: 211-218.
- Pienkowski D, Pollack SR, Brighton CT, Griffith NJ. Low-power electromagnetic stimulation of osteotomized rabbit fibulae. A randomized, blinded study. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 489-501.
- Piez KA. Cross-linking of collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 1968; 37: 547.
- Rasmussen H, Bordier P. The physiological and cellular basis of metabolic bone disease. Baltimore: Williams & Wilkins. 1974: 81.
- Rico H, Gomez-Raso N, Revilla M, Hernandez ER, Seco C, Paez E, Crespo E. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 90: 97-101.
- Rico H, Roca-Botran C, Hernandez ER, Seco C, Paez E, Valencia MJ, Villa LF. The effect of supplemental copper on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Menopause* 2000; 7: 413-416.
- Roermund PM, Hoekstra A, Visser WJ, Renooij W. Effect of direct current stimulation on bone growth after distraction epiphysiolysis of the rabbit tibia. *J Orthop Res* 1990; 8: 769-775.
- Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984; 30: 1182-1186.
- Rucker RB, Rucker BR, Mitchell AE, Chang TC, Clegg M, Kosonen T, Uriu-Adams JY, Tchapanian EH, Fishman M, Keen CL. Activation of chick tendon lysyl oxidase in response to dietary copper. *J Nutr* 1999; 129: 2143-2146.
- Rucker RB, Tinker D. Structure and metabolism of arterial elastin. *Int Rev Exp Pathol* 1977; 17: 1-47.
- Staley GP, van der Lugt JJ, Axsell G, Loock AH. Congenital skeletal malformation in Holstein calves associated with putative manganese deficiency. *J S Afr Vet Assoc* 1994; 65: 73-78.
- Stausak D, Mercer JF, Dieter HH, Strimmel W, Multhaup S. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson disease. *Brain Res Bull* 2001; 55: 175-185.
- Suttle NF, Angus KW, Nisbet DI, Field AC. Osteoporosis in copper depleted lambs. *J Com Path* 1972; 82: 93-97.
- Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Nishimatsu H, Shibamoto Y, Abe M, Yamamuro T. The effects of intraoperative radiotherapy on bone-healing ability in relation to different doses and postradiotherapy intervals. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 1147-1152.
- Tanaka Y, Hatano S, Nishi Y, Usui T. Nutritional copper deficiency in Japanese infant on formula. *J Pediatr* 1980; 96:

- 255-257.
37. Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition, 4th ed. New York: Academic Press. 1977: 185.
38. Wilson T, Katz JM, Gray DH. Inhibition of active bone resorption by copper. *Cal Tissue Int* 1981; 33: 35-39.
39. Wiss DA, Ledesma-Medina J. Skeletal changes in copper deficiency following prolonged total parenteral nutrition. *Orthopedics* 1980; 3: 969.
40. Yilmaz N, Ozaslan J. Biochemical bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 92-98.