

전이성 골암이 해면골의 구조적 특징과 골화 분포에 미치는 영향

Effect of metastatic bone tumor to structural characteristic and bone mineralization of trabecular bone

*박선욱^{1,2}, 전옥배^{1,2}, 고태용^{1,2}, 김지현^{1,2}, 김한성^{1,2}, 전경진³, #임도형³

*S. W. Park^{1,2}, O. H. Jeon^{1,2}, C. Y. Ko^{1,2}, C. H. Kim^{1,2}, H. S. Kim^{1,2}, K. J. Chun³, #D.H.Lim³(dli349@gmail.com)

¹ 연세대학교 의공학과, ²연세대학교 의료공학연구원, ³한국생산기술연구원 실버기술개발단

Key words : Metastatic bone tumor, Structural parameters, Bone mineralization, In-vivo micro-CT

1. 서론

전이성 골암은 유방암과 전립선암의 경우 70~80%, 폐암 말기의 경우 40%의 환자들에게서 발견되는 흔한 질병이다.¹ 전이성 골암은 신경압박증후군(nerve compression syndrome), 칼슘과 인혈증(hypercalcemia) 등과 같은 합병증을 유발하며 뼈의 파골세포(osteoclast)의 활동을 급격하게 증가시켜 뼈의 용해성 결손(osteolytic defect)을 야기하며, 이는 환자들에게 심각한 고통을 준다고 보고되고 있다.²

전이성 골암에 의한 뼈의 기계적 특성 약화는 2차적으로 골절 위험성을 증가시켜 환자의 신체 기능 및 운동성을 저하시키기 때문에 전이성 골암 연구의 주된 목표가 되고 있다.³ 따라서 전이성 골암으로 인한 뼈의 기계적 특성 변화를 정량적이고 정확하게 파악하여 골절을 예방하는 것은 매우 중요하다.

뼈의 기계적 특성은 뼈의 미세구조에 의한 강도뿐 아니라 골화 분포 정도에 따른 강도에 의해 결정된다.⁴ 그러나 지금까지의 전이성 골암으로 인한 뼈의 기계적 특성 변화에 대한 연구는 대부분 구조적 변화 분석을 통한 뼈의 강도를 간접적으로 예측하는데 초점을 맞추고 있다.⁵ 따라서 본 연구에서는 실험동물을 희생하지 않는 연속적인 추적 관찰의 방법으로 뼈의 미세구조 및 골화 분포 변화를 통합적으로 분석하여 골암으로 인한 뼈의 기계적 특성 변화를 정량적으로 예측하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 세포배양

본 연구에서는 골암 유발을 위하여 ATCC (the American Type Culture Collection, USA)로부터 분양 받은 W256 (Walker carcinoma 256 malignant breast cancer cell) 세포를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 농도의 인큐베이터에서 배양되었으며 90% ATCC 199 (GIBCO, USA)와 10% 말혈청(horse serum, LONZA, USA)으로 구성된 배지가 사용되었다. 배지는 3~4일 간격으로 교환되었고 세포가 70~80% 정도 배양접시 바닥에 부착(confluency)하였을 때 계대배양(subculture)하였다. 배양중인 세포에 인산완충용액(PBS, LONZA, USA)과 0.5% trypsin-EDTA (LONZA, USA) 처리를 하여 배양 접시로부터 분리하였다. 일정하고 정확한 암세포 주입을 위하여 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 계산하였다.

2.2 실험동물 준비

본 연구의 동물실험은 연세대학교 동물 보호 및 사용에 관한 지침과 법규에 따라 수행되었다(YWC-090608-1). 실험동물은 12주령 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 무게 약 250±7g) 12마리를 사용하였고 골암 유발군(TUMOR Group)과 대조군(SHAM Group)으로 각각 6마리씩 임의로 나누었다. 골암 유발을 위하여 실험동물의 오른쪽 대퇴골에 암세포 주입 수술(intraosseous injection)을 시행하였다.⁵ 먼저, 오른쪽 무릎관절의 피부와 근육을 세로 방향(longitudinal)으로 약 1.5cm 정도 절개하였다. 무릎인대의 손상을 피하기 위하여 무릎관절을 신장(extension)하여 무릎인대를 옆으로 이동시키고 대퇴골 용기사이페임(intercondylar notch)에 20G크기의 주사기 바늘을 이용하여 약 1cm의 깊이로 구멍을 뚫었다. 골암 유발군에는 400만개

의 암세포(W256)를 주입하고 대조군에는 식염수를 주입한 후에 구멍을 본왁스(bone wax, B.Braun, Germany)로 막았다. 마지막으로 이동시켰던 무릎인대를 원상태로 옮기고 근육과 피부를 차례로 봉합하였다. 실험동물은 온도와 습도(온도: 23°C±3°C, 습도: 50%±10%)가 유지되며 12시간 주기로 낮과 밤이 바뀌는 깨끗한 동물 사육실에서 사육되었다.

2.3 생체 내 미세단층촬영

생체 내 미세 단층촬영 시스템(Skyscan 1076, SKYSCAN N.V., Belgium)을 사용하여 골암에 의한 뼈의 구조적 특성 변화를 분석하였다. 암세포 주입 0주와 4주에 생체 내 미세단층촬영을 시행하였다. 촬영 이후, μ CT 단층 영상의 적층 과정을 통해 골암 유발 모델 해면골의 3차원 영상을 획득하였다.

2.4 구조적 해석

해면골의 뼈 체적비(BV/TV, bone volume fraction, %), 뼈 부피당 뼈의 표면적(BS/BV, bone surface to volume, 1/mm), 뼈 간 기둥 두께(Tb.Th, trabecular thickness, mm), 뼈 간 기둥간 거리(Tb.Sp, trabecular separation, mm), 뼈 간 개수(Tb.N, trabecular number, 1/mm), 해면골 패턴 요소(Tb.Pf, trabecular bone pattern factor, 1/mm), 구조적 모델 지수(SMI, structure model index)를 분석하였다.

2.5 골화 정도 분포 해석

해면골의 골화 정도를 구하기 위하여 BMD(bone mineral density)값이 알려진 팬텀(0.25g/cm³, 0.75g/cm³)을 사용하여 교정된 BMD를 구하였다. 구해진 BMD를 기반으로 CT-AN 1.9(SKYSCAN N.V., Belgium)을 이용하여 해면골의 X-ray 감약 계수 분포를 구하고 골화 정도의 구간별 분포를 정량적으로 분석하였다.

2.6 통계 처리 방법

0주에서 4주의 변화율에 대한 두 그룹의 차이를 비교하기 위하여 독립표본 T 검정(student T-test)을 수행하였으며 정규성을 벗어나는 경우 Mann-Whitney 검정을 시행하였다. 이때 모든 통계 분석에 사용된 유의 수준은 0.05로 설정하였으며(p<0.05), 상용 프로그램인 SPSS 17.0 (SPSS INC. USA)을 사용하여 분석하였다.

3. 결과

생체 내 미세단층촬영 시스템으로 촬영된 0주와 4주의 대퇴골 BMD와 구조적 파라미터(BV/TV, BS/BV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Pf, SMI)는 Fig. 1에 요약되었다. 대조군의 BMD, BV/TV, Tb.N는 유의하게 증가(34%, 48% 그리고 11%)하였으나 골암 유발군의 경우 유의하게 감소(26%, 11% 그리고 23%)하였다(p<0.05). 그리고 골암 유발군의 BS/BV, Tb.Sp, SMI는 각각 -16%, 38%, 2% 변화하였고 대조군은 각각 -33%, 12%, -16% 변화하여, 골암 유발군의 구조적 파라미터의 변화율이 대조군에 비해 크게 변화함을 확인하였다(p<0.05).

대퇴골 영상 정보를 적층하여 얻은 해면골의 3D 미세구조와 X-ray 감약 계수 분포는 Fig. 2와 같다. 대조군의 해면골은 골량이 증가하고 X-ray 감약 계수 분포도 전반적으로 높아지는

경향을 보인다. 반면, 골암 유발군의 해면골은 골량이 급격히 감소하고, 낮은 X-ray 감약 계수 분포를 보이는 해면골이 많이 사라진 것을 확인 할 수 있었다. 해면골의 골화 정도 분포의 정량적인 결과는 Fig. 3과 같다. 암세포 주입 4주 후, 대조군은 골화 정도가 낮은 부분(-0.3~ 0.1g/cm³)에 전체의 40%가 분포하지만, 골암 유발군의 경우 53%가 분포하였다. 또한 대조군은 골화 정도가 높은 부분(0.7~ 1.4g/cm³)에 12%가 분포하지만, 골암 유발군의 경우 7%가 분포하였다. 대조군의 골화 정도 분포는 골화 정도가 높은 구역에 많이 분포한 반면, 골암 유발군의 경우에는 골화 정도가 낮은 구역에 많이 분포하였다(p<0.05).

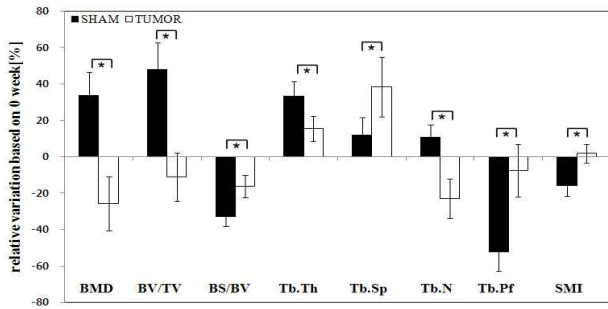


Fig. 1 Relative variations of BMD and structural parameters based on 0 week (* indicates significant difference, p<0.05)

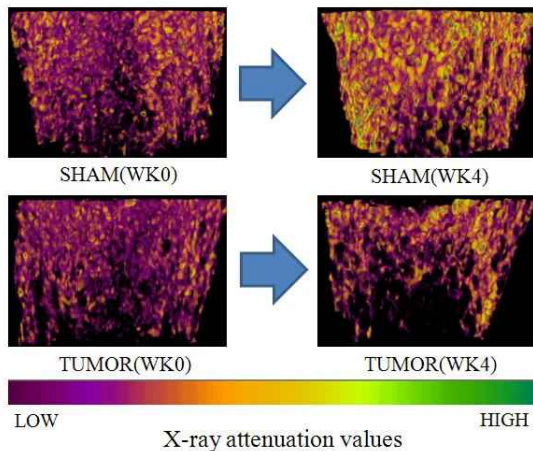


Fig. 2 Representative 3D microarchitecture with X-ray attenuation values map

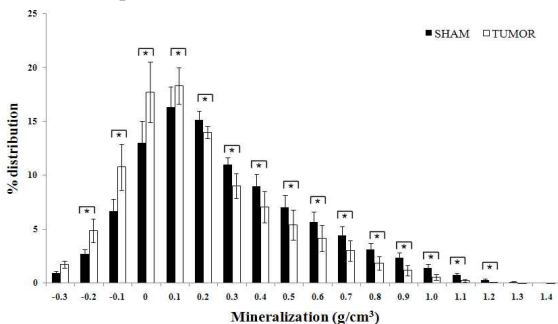


Fig. 3 Distribution of mineralization (mean±standard deviation) at week 4 (* indicates significant difference, p<0.05)

4. 결론

본 연구에서는 전이성 골암에 의한 해면골의 기계적 특성 변화를 확인하기 위하여 적합한 골암 유발 모델을 개발하였고, 생체 내 미세 단층촬영을 이용하여 실험동물을 희생하지 않는 비파괴적인 방법으로 연속적인 연구를 수행하였다. 그리고 전이성 골암에 의한 해면골의 특성을 평가하기 위하여 기존에 연구가 진행된 해면골의 구조적 특성뿐만 아니라 골화 분포 분석을 통한 통합적인 뼈의 기계적 특성 평가를 최초로 수행하였는데 본 연구의 의의가 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 구조적 파라미터의 결과는 전이성 골암에 의한 해면골의 미세구조가 파괴되어 구조적 특성이 약화되고 뼈의 골질 위험성이 증가하는 것을 보여준다. 이는 골암에 의한 뼈의 재형성(remodeling) 장애가 발생하여 뼈의 형태학적 특성의 약화로 인한 골질 위험성이 증가된다는 기존 연구와 유사한 결과이다.⁶ 골화 정도 분석 결과, 대조군의 해면골은 실험동물의 성장으로 인한 골화 진행으로 점점 더 강해지지만 골암 유발군의 해면골은 골화 진행에 장애가 발생한 것으로 판단된다. 뼈로 전이된 암세포는 뼈의 주변 미세환경에 부착하여 증식한다. 전이된 암에 의한 PTHrP (Parathyroid hormone-related protein)와 다른 여러 요인들의 기능 이상은 파골세포의 활동을 급격하게 증가시켜 뼈의 용해성 결손을 발생시킨다는 연구결과가 있다.⁷ 본 연구에서도 주입된 암세포에 의한 파골세포의 활동 증가에 의해 골손실이 증가하고 골질과 뼈의 미세구조가 파괴되어 위의 결과를 발생 시킨 것으로 사료된다.

본 연구는 뼈의 구조적인 능력에 큰 영향을 미치는 피질골의 특성 변화를 확인하지 못하였으며 실험동물의 개체 수가 적고 골암에 의한 생물학적 변화를 확인하지 못한 한계점을 지닌다. 또한 골암 유발을 양성자 단층촬영(PET, Positron Emission Tomography)이나 생물학적 표지자 등을 통해 보다 직접적인 방법으로 확인하지 못하였고, 방사선 영상법을 이용하여 골암으로 인하여 발생하는 현상을 통해 간접적으로 확인하였다는 한계점이 있다. 그러나 현재 연구는 실험동물을 희생하지 않고 장시간 추적 관찰하여 전이성 골암에 의한 해면골의 구조적 특성과 골화 분포 분석을 통한 통합적인 뼈의 기계적 특성 평가를 최초로 수행하였는데 의의가 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 골암의 진단 및 골질 위험성 예측에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 본 연구에서 사용된 생체 내 미세단층 촬영을 이용한 해면골의 정량적인 분석 방법론은 골다공증과 같은 다른 골질환에 의한 뼈의 기계적 특성 평가에 응용 가능할 것으로 생각된다.

후기

본 연구는 보건복지가족부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(A080920)

참고문헌

1. Stéphane Blouin, Michel Félix Baslé and Daniel Chappard, "Interactions between microenvironment and cancer cells in two animal models of bone metastasis", *BrJ Cancer*, 98, 809-815, 2008.
2. Prica Honore, Nancy M. Luger, Mary Ann C. Sabino, Matthew J. Schwei, Scott D. Rogers, David B. Mach, Patrick F. O'keefe, Margaret L. Ramnaraine, Denis R. Clohisy and Patrick W. Mantyh, "Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord", *NatMed*, 6, 521-528, 2000.
3. Taeyoung Lee, "Predicting failure load of the femur with simulated osteolytic defects using noninvasive imaging technique in a simplified load case", *AnnBiomedEng*, 35, 642-665, 2007.
4. NIH Consensus Development Panel, "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy", *JAMA*, 258, 785-795, 2001.
5. A.A. Kurth and R.Müller, "The effect of an osteolytic tumor on the three-dimensional trabecular bone morphology in an animal model", *Skeletal Radiol*, 30, 94-98, 2001.
6. Sarah A. Arrington, Joanne E. Schoonmaker, Timothy A. Damron, Kenneth A. Mann and Mathew J. Allen, "Temporal changes in bone mass and mechanical properties in a murine model of tumor osteolysis", *Bone*, 38, 359-367, 2006.
7. Sofia Fili, Maria Karalaki and Bernhard Schaller. Mechanism of bone metastasis: The role of osteoprotegerin and of the host-tissue micro-environment-related survival factors, *CancerLett*, 283,10-19, 2009.