

전이성 골암의 골절 위험성 예측

Prediction of Fracture Risk for Metastatic Bone Tumor

*박선욱¹, 전옥희¹, 손종상¹, 곽광용¹, 김한성¹, 김지현¹, 김영호¹, 김정성², #임도형³

*S. W. Park¹, O. H. Jeon¹, J. S. Son¹, C. Y. Ko¹, H. S. Kim¹, C. H. Kim¹, Y. H. Kim¹, J. S. Kim², #D. H. Lim(dli349@gmail.com)³

¹ 연세대학교 의공학과, ²(주)코렌텍 중앙기술연구소, ³한국생산기술연구원

Key words : Tumor metastasis, Fracture risk prediction, Failure load

1. 서론

뼈는 암이 쉽게 전이되는 곳 중의 하나이다. 유방암과 전립선암의 경우, 대략 65-75%의 환자에게서 전이성 골암이 발견되며, 뼈의 용해성 결손, 신경압박증후군(nerve compression syndrome), 칼슘과잉혈증(hypercalcemia) 등의 증상과 함께 심각한 고통을 야기 시키는 것으로 보고되고 있다.² 특히, 골암으로 인한 뼈의 용해성 결손은 2차적으로 뼈의 병리학적 골절을 야기 시켜 환자의 신체 기능 및 운동성을 저하 시키며, 심각한 경우 환자를 사망에 이르게 할 수 있는 것으로 보고되고 있다.³

현재, 골암은 그 위해성이 충분히 인지되고 있음에도 불구하고 기술적인 한계와 같은 여러 이유로 많은 연구가 진행되지 못하고 있다. 현재까지 골암은 X-ray 촬영 영상을 기반으로 진단 및 치료 효과를 판단하고 있다. 그러나 X-ray 영상 평가 방법은 종양의 유무 정도만 판단이 가능할 뿐 정밀도 높은 진단이 어렵고, 특히 골암의 임상적 특징인 골 용해성 결손에 의한 골절 위험성 예측이 불가능한 한계점을 가지고 있다. 따라서 정밀한 골암 진단 방법 및 골절 위험성 예측에 관한 연구가 절실히 요구되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 1) 골암 연구를 위하여 적합한 전이성 골암 유발 동물 모델을 개발하고, 2) 생체 내 미세단층촬영 시스템(μ CT)을 이용하여 골암에 의한 뼈의 용해성 결손을 확인하고, 3) 최종적으로 복합 빔 이론을 이용하여 뼈의 용해성 결손으로 인한 뼈의 골절 위험성을 예측하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 세포 배양

ATCC (the American Type Culture Collection, USA)로부터 W256 (Walker carcinosarcoma 256 malignant breast cancer cell)을 분양받아 DMSO (dimethyl sulfoxide)제거를 위해 2000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 이후, 세포와 세포배양액을 배양용 플라스크에 옮긴 후 CO₂와 공기가 공급되는 37°C의 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 세포가 자라는 양상을 관찰하면서 교체하고 세포가 충분히 자랐을 경우, 큰 플라스크에 옮기거나 2차배양(subculture)하였다. 현미경으로 세포 관찰 시, 세포가 90% confluency에 도달했을 때 배양중인 세포에 37°C의 PBS와 0.5% trypsin-EDTA 처리를 하여 세포를 플라스크 바닥에서 떨어뜨리고 세포 배양액을 넣고 피펫팅한 후 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 세포개수를 계산하였다. 골암 유발을 위하여 200만 마리, 800만 마리의 암세포를 사용하였다.

2.2 실험동물

본 연구의 동물실험은 연세대학교 동물 보호 및 사용에 관한 지침과 법규에 따라 수행되었다. 총 4마리의 Sprague Dawley 암컷 흰쥐를 사용하여 골암 유발 실험을 시행하였다. 첫 번째 동물은 12주령 쥐에 800만 개의 암세포를 주입하였고, 두 번째 동물은 23주령 쥐에 800만 마리, 세 번째 동물은 12주령 쥐에 200만 마리, 네 번째 동물은 23주령 쥐에 200만 마리의 암세포를 주입하였다. 실험동물은 온도와 습도(온도: 23° ± 3°C, 습도: 50°C ± 10%)가 유지되며 12시간 주기로 낮과 밤이 바뀌는 동물 사육실에서 사육되었다.

암세포 주입을 위하여 외과적 골암 유발 수술(the intra-osseous injection)을 시행하였다.⁴ 오른쪽 무릎관절의 피부와 근육을 세로 방향(longitudinal)으로 약 1.5cm정도 절개하였다. 무릎인대의 손상을 피하기 위하여 무릎관절을 신장(extension)하여 무릎인대를 옆으로 이동시키고 대퇴골의 용기 사이패임(intercondylar notch)에 20G 크기의 주사기바늘을 이용하여 약 1cm의 깊이로 구멍을 뚫었다. 준비된 암세포(W256)를 주입하고 구멍을 분왁스(bone wax)로 막았다. 이동시켰던 무릎인대를 원상태로 옮기고 근육과 피부를 차례로 봉합하였다.

2.3 생체 내 미세단층촬영 시스템 (μ CT)

생체 내 미세 단층촬영 시스템(Skyscan 1076, Skyscan, Belgium)을 사용하여 골암에 의한 뼈의 형태학적 특성을 분석하였다. 암세포 주입 0주와 4주에 생체 내 미세단층촬영을 시행하였다. 촬영 이후, μ CT 단층 영상의 적층 과정을 통해 골암 유발 모델의 해면골과 피질골의 3차원 영상을 획득하였다.

2.4 골절위험성 평가

μ CT 영상 정보를 기반으로 뼈의 강도 분석을 통한 골절 위험성을 예측하였다. 각 시편에 대해 획득한 μ CT 이미지를 기반으로 골밀도(ρ , bone mineral density)값을 산출하였다. 골밀도 측정을 위하여 밀도값이 알려진 0.25g/cm³, 0.75g/cm³ 팬텀 그리고 물을 기준으로 μ CT 각 영상의 x-ray 감약계수(HU)를 교정하였고 이 값을 겔보기 골밀도(ρ_{app} : apparent bone mineral density) 값으로 변환하였다.⁵ 겔보기 골밀도 값은 수식1과 수식2를 사용하여 해면골과 피질골에 따라 각각 탄성계수(elastic modulus)값으로 변환되었다.

$$E_{tra} = 0.82(\rho_{app})^2 + 0.07$$

(수식1) 해면골의 겔보기 골밀도를 탄성계수로 변환

$$E_{cor} = 21.91(\rho_{app}) - 23.5$$

(수식2) 피질골의 겔보기 골밀도를 탄성계수로 변환

수식3과 수식4를 이용하여 뼈의 각 단면에 대한 축강도(axial rigidity, EA)와 굽힘강도(bending rigidity, EI)를 계산하였다. 계산과정에서 뼈의 각 단면에 대한 강도는 각 픽셀에서의 단위 밀도들 간의 합으로 계산하였다. E_i는 겔보기 골밀도를 통해 구한 탄성계수이며 da는 μ CT 영상의 해상도를 통해 얻어지는 각 픽셀의 면적, x_i는 탄성계수(elastic modulus-weighted) 중심에서의 거리이다.

$$EA = \sum_A E_i(\rho_i) da$$

(수식3) 탄성계수와 각 픽셀의 면적을 통해 구한 축강도

$$EI = \sum_A \{E_i(\rho_i) * x_i^2\} da$$

(수식4) 탄성계수, 탄성계수 중심에서의 거리 그리고 각 픽셀의 면적을 통해 구한 굽힘강도

축강도와 굽힘강도를 기반으로 복합 빔 이론을 적용하여 수식5와 같이 뼈의 파손 하중(failure load)을 예측하고, 이를 통해 대퇴부에서의 하중 지탱 능력(load bearing capacity)을 분석하

였다.⁶ 이때 Keaveny 등의 연구결과를 인용하여 인장파손 변형률 (tensile failure strain) 1%를 적용하였다.⁷ Fz는 축에 대한 파손 하중(axial yield load), ε은 파손 변형률(failure strain), c는 굽힘 축에서 뼈의 바깥 선까지의 거리, d는모멘트 팔, θ는 μCT 각 영상 단면과 수직선 사이의 각도이다.

$$F_z = \frac{\varepsilon}{\frac{1}{EA} + \frac{d \cdot c \cdot (\sin \theta)}{EI}}$$

(수식5) 복합 빔 이론을 적용하여 구한 파손 하중

3. 결과

μCT 단층 영상을 재구성한 3차원 영상을 통해 골암에 의한 대퇴골의 해면골과 피질골에서의 골용해를 확인하였다. (Fig 1) 해면골에서 골밀도(BMD)는 41%, BV/TV (bone volume/total volume)는 58%, Tb.Th (trabecular thickness)는 15% 감소하였으며 BS/BV (bone surface/bone volume)는 44%, Tb.Sp는 54% 증가하였다. 피질골에서 BV (bone volume)은 27%, Cs.Th(cross-section thickness)는 61% 감소하였으며, BS/BV는 229% 증가하였다. 위와 같은 구조적 파라미터 분석 결과, 암세포를 주입한 대퇴골의 해면골과 피질골 모두에서 골암에 의한 골용해성 손실이 발생함을 확인하였다.

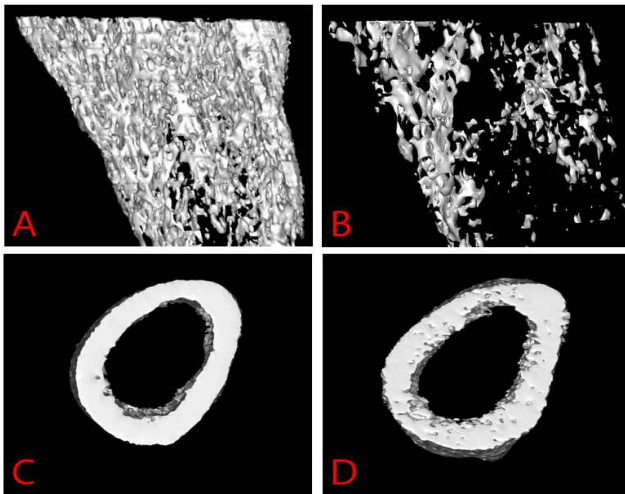


Fig. 1 Osteolytic effect by metastatic bone tumor (A:trabecular bone (week 0), B: trabecular bone (week 4), C:cortical bone (week 0), D: cortical bone (week 4))

골절위험성 예측 결과, 골암에 의한 골손실로 인해 암세포 주입 0주때 보다 4주때의 파손 하중이 감소하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이 암세포주입 전(week0)과 주입 후(week4)의 파손 강도의 변화률을 비교했을 때, 23주령 800만 마리의 암세포를 주입했을 때 파괴강도가 가장 많이 감소(약 69%)함을 알 수 있다.

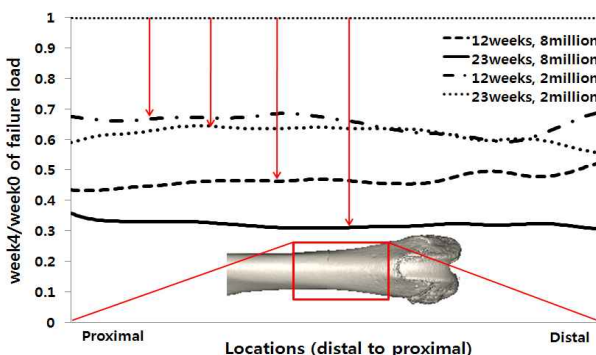


Fig. 2 Week 4 / week 0 of failure load according to locations

4. 결론

본 연구에서는 골암에 의하여 유발된 뼈의 질적, 양적 손실을 확인하였다. 또한 이와 같이 구조적으로 손실된 뼈의 기계적인 강도를 평가하기 위하여 복합 빔 이론을 적용하여 파손 하중을 구하였다. 암세포 주입 후 파손 하중이 급격하게 감소하여 골절 위험성이 증가함을 확인하였다.

본 연구에서 사용한 골절위험성 예측은 뼈의 기계학적 특성 평가를 위하여 기존에 사용해 왔던 유한요소해석에 비하여 시간과 노력이 적게 걸리는 장점이 있다. 또한 전체적인 강도뿐만 아니라 부분적인 강도를 평가할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구에서는 골암의 진단을 위하여 생체 내 미세단층촬영 시스템과 복합 빔 이론을 이용하여 뼈의 구조적인 특성 및 기계적인 특성 변화를 추적 관찰 할 수 있었다. 하지만 실험동물의 개체수가 적으며 골절위험성 평가에서 사용된 수식이 사람을 기반으로 만들어진 것이기 때문에 골절위험성의 경향만을 확인할 수 있었다. 향후 보완된 연구를 위하여 실험동물의 개체수를 증가시키고, 실제 뼈의 기계적 압축실험을 통한 골절위험성 예측의 보완이 필요하다.

후기

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

참고문헌

1. Stephane Blouin, Michel Felix Basle, and Daniel Chappard, "Interactions between microenvironment and cancer cells in two animal models of bone metastasis", Br J Cancer, 98(4), 809-815, 2008
2. Roodman GD, "Mechanism of bone metastasis", N Engl J Med, 350, 1655-64, 2004
3. Prisca Honore, Nancy M. Luger, et al., "Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord", Nature Medicine, volume 6, number 5, May, 2000
4. A.A. Kurth, and R. Muller, "The effect of an osteolytic tumor on the three-dimensional trabecular bone morphology in an animal model", Skeletal Radiol, 30, 94-98, 2001
5. Brian D. Synder, and Diana A. Hauser-Kara, "Predicting fracture through benign skeletal lesions with quantitative computed tomography", The Journal Of Bone & Joint Surgery, 88:55-70, 2006
6. Taeyong Lee, "Predicting failure load of the femur with simulated osteolytic defects using noninvasive imaging technique in a simplified load case", Annals of Biomedical Engineering, Vol.35, No. 4, April 2007
7. Keaveny, T. M., E. F. Wachtel, C. M. Ford, and W. C. Hayes, "Differences between the tensile and compressive strengths of bovine tibial trabecular bone depend on modulus, J. Biomech. 27:1137-1146, 1994