

시뮬레이터를 이용한 척추 추간판 변성의 실험적 유도 Experimental Induction of Disc Degeneration using Simulator

*우대곤¹, 김치훈¹, 박지형¹, 김지현¹, 김한성¹, #임도형²

*D. G. Woo¹, C. H. Kim¹, J. H. Park¹, C. H. Kim¹, H. S. Kim¹, #D. Lim (dli349@gmail.com)²

¹ 연세대학교 의공학부, ² 한국생산기술연구원

Key words : Biomechanics, Disc degeneration, Morphology, Simulator

1. 서론

요통은 전 세계 인구의 70% 정도는 한번쯤 경험해보거나 현재 겪고 있는 증상 중 하나이며, 현재 퇴행성 추간판 질환은 요통의 주요 발생 원인으로 대두되고 있다.¹

척추 추간판은 크게 수핵(nucleus pulposus), 윤상인대(annulus fibrosus)로 이루어져 있다. 추간판의 퇴행성 변화는 추간판 내 수핵에서 콜라겐 조직과 단백당(proteoglycan)의 합성을 저하시켜 추간판의 수분함량과 탄성력을 떨어뜨려 본 기능인 충격흡수와 유연성있게 움직일 수 있는 능력을 감퇴시키는 현상이다.² 또한 정적, 동적 압축하중과 척추뼈 부정합 등은 추간판의 퇴행성 변화를 촉진하는 대표적 원인들로 알려져 있다.^{3,4,5,6} 하지만 인체 내 척추의 물리적 특성을 고려해 보았을 때 그것이 원인이라고는 단정하기 어려운 실정이다. 추간판은 압축력에 대해 인체 무게의 10 배까지 버틸 수 있는 것으로 확인됨으로 압축하중 및 추간판과 근접 척추뼈 간의 부정합 뿐만 아니라 다른 원인 규명이 필요하다.¹ 이에 압축 및 전단력을 포함하는 복합하중이 척추뼈에 적용되었을 때를 고려하여 척추 추간판 변성의 가능성을 검토해 보아야 한다.⁵

본 실험은 생체역학적 제어 및 계측이 가능한 추간판 배양 시스템에 기본 척추운동분절을 적용하여 퇴행성 추간판 질환의 발생기전을 기계생물학 측면에서 분석해보고자 한다.

2. 실험방법

1. 시편획득

본 연구에는 성장기에 해당하는 6 주령 Sprague Dawley (SD) 쥐 (무게 약 270g) 3 마리를 사용하였다. 한 마리당 3 개의 척추운동분절(척추-추간판-척추) 시편을 안락사 후 획득하였으며 각 시편에서 연조직, 인대 등을 제거하고 식염수에 씻어내었다. 각 시편은 임의적으로 0 주 대조군 4 개 시편, 1 주 실험군 5 개 시편의 2 개 군으로 나누었다. 이 모든 과정은 무균상태에서 실시되며, 연세대학교 동물 보호 및 사용에 관한 가이드라인과 법규에 따라 수행되었다.

2. 생체역학적 추간판 배양 시스템

① 배양 시스템

전체 시스템의 크기는 쥐의 하나의 척추운동분절과 같은 작은 표본을 다룰 수 있어야 하며, CO₂ 인큐베이터(Sanyo, Japan) 속에 들어갈 정도로 설계 및 제작되었다. 재원은 생체 친화성 물질로써 경량성 금속인 알루미늄과 폴리카보네이트로 제작되었으며 사용하기 편하고 살균하기에 용이하다. 섭씨 37 도의 온도와 5.0%의 CO₂ 조건에서 100% 습도에 견딜 수 있도록 제작되었다(Fig. 1). 조성된 배지는 가장 일반적으로 사용되는 동물 세포 배양용 배지인 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 소혈청액 Fetal Bovine serum (FBS), 항생제와 비타민 성분 등으로 만들어진다.

② 제어 및 계측 시스템

생체역학적 추간판 배양 시스템은 압축하중과 전단하중이 종합적으로 적용될 수 있어야 한다. 컴퓨터와 기계간의 모든 통신모듈은 미국 내셔널 인스트루먼트사의 제품을 이용하였다. 압축하중 작동기와 전단하중 작동기를 각각 수직, 수평으로 배치하여 하나의 척추운동분절에 하중을 전달하게 된다(Fig. 1). 제어 및 계측 시스템을 완성하기 위해 하중 조절 알고리즘을 적용하였으며, LABVIEW 8.5 (NI Co., USA)를 이용하여 변위 및 하중의 변화를 추적 조사할 수 있었다.

③ 복합 하중조건

생체역학적 추간판 배양 시스템을 이용하여 쥐의 생활습관을 고려해 본 결과, 하루 중 12 시간은 활동시간으로 간주하여 복합하중을 부여하였고, 나머지 12 시간은 휴식을 취한다는 전제 하에 하중을 부여하지 않았다.

3. 조직학적 분석

SD 쥐 추간판의 구조적 변화를 분석하기 위해 포르말린 고정을 수행한 후 파라핀에 포매하는 통상적인 방법을 거쳐, 조직학적 방법을 사용하여 척추운동분절 시편을 광학 현미경으로 관찰하였다. 헤마톡실린과 에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색을 하였으며, 헤마톡실린은 세포의 핵을 염색하고 에오신은 세포의 세포질을 염색하는 가장 기본적인 염색 방법이다.

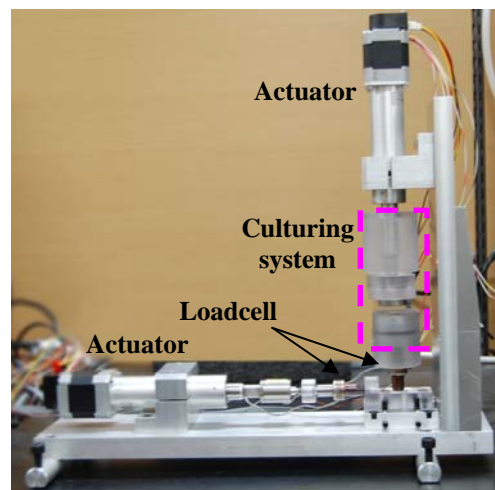
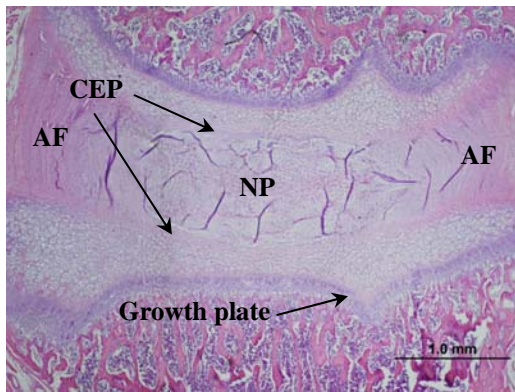


Fig. 1 Design of Simulator (Biomechanical disc culturing system).

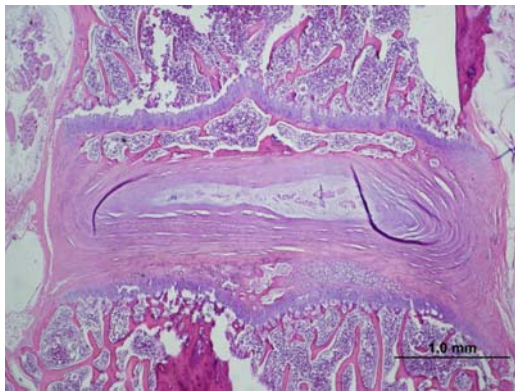
3. 결과

본 연구에서는 생체역학적 제어 및 계측이 가능한 추간판 배양 시스템을 완성하였으며, 생체 외 (in vitro) 조건에서 생체 내 (in vivo) 조건과 유사한 환경을 만들기

위해서 세포 배양용 배지를 조성하였다. 본 시스템과 기본 척추운동분절을 이용하여 쥐의 실제 생활습관을 고려하여 복합 하중조건 시스템을 구현하였다. 0 주 대조군에서는 성장기에 있는 SD 쥐의 건강한 상태의 추간판을 확인할 수 있었다. Fig. 2의 (A)에서와 같이 수핵, 종관, 윤상인대 부분의 경계부분을 확인할 수 있으며, 세포 내 핵과 막을 확인할 수 있었다. 복합하중을 가한 실험군에서는 0 주 대조군과 비교해 보았을 때 종관, 윤상인대 부분의 경계부분, 세포 내 핵과 막을 확인할 수 있었지만 수핵 부분에서 형태학적인 변성이 발생되는 것을 광학현미경으로 관찰할 수 있었다. 수핵과 윤상인대의 높이가 상대적으로 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2 (B)).



(A)



(B)

Fig. 2 Verification of disc degeneration in histological analysis (A) Normal (0 week), (B) Disc degeneration (1 week).

4. 토의 및 결론

본 연구의 생체역학적 배양시스템에서 SD 쥐의 척추운동분절에 가해진 부하의 크기는 쥐의 몸무게와 움직임이 있을 시 받는 복합하중이 고려되어 완성되었다. 추간판 변성이 일어날 것이라고 가정된 실험군에서 추간판의 전체적인 높이 변화와 수핵 부분의 변형이 관찰되었으며 이는 복합하중에 의한 수분함량의 손실 때문인 것으로 사료된다.^{7,8}

추간판 내의 물질대사에서 필수적 역할을 담당하는 단백질, 글루코스, 항체와 유전적 물질 등은 추간판과 종관사이의 맥관을 통해 이동이 이루어지며,^{9,10} 공급의 시기와 주기는 호르몬과 신경세포의 전달을 통해 이루어질 것이라 추측할 수 있다. 본 실험의 경우는 추간판과 그 인접

종관 두 개와 요추 일부만을 제외한 나머지는 모두 없애버리고(인대, 맥관 연결부위, 신경세포 등), 조성된 배지를 통한 생명유지 필수 물질들을 무조건적으로 공급하여 호르몬의 길항작용과 신경세포를 통한 피드백 조절을 무시하였기에 생체 내의 환경을 완전히 재현했다고 하기에는 한계점을 가지고 있다. 따라서 앞으로의 추간판에 대한 생체역학적 생체 외 (in vitro) 실험은 맥관관계와 미세 분자 수준의 물질이동 기전까지도 고려하여 생체 내 (in vivo)의 환경과 최대한 동일한 상태로 만들어 주어야 할 것으로 사료된다.

본 연구의 가정은 쥐 척추뼈를 이용하여 압축 및 전단 하중을 임의로 부여함으로써 복합하중에 의해 추간판 변성 현상이 촉진된다는 것이다. 본 실험은 생체역학적 제어 및 계측이 가능한 추간판 배양 시스템에 기본 척추운동분절을 적용하여 본 가정의 타당성을 제시하기 위한 연구로서의 의의 있다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Prem SR., "Development of the biomechanical disc culture system for study of mechanobiology," 2006.
2. Horner HA., and Urban JP., "Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc," *Spine*, 26, 2543-2549, 2001.
3. Adams MA., Freeman BJ., Morrison HP., Nelson IW., and Dolan P., "Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration," *Spine*, 25, 1625-1636, 2000.
4. Roughley PJ., "Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix," *Spine*, 20, 2691-2699, 2004.
5. Ferguson SJ., Ito K., and Nolte LP., "Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc," *J Biomech*, 37, 213-221, 2004.
6. Kroeber MW., Unglaub F., Wang H., Schmid C., Thomsen M., Nerlich A., and Richter W., "New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration," *Spine*, 27, 2684-2690, 2002.
7. Adams MA., McNally DS., and Dolan P., " 'Stress' Distributions Inside Intervertebral Discs," *J Bone Joint Surg*, 78-B, 965-972, 1996.
8. Korecki CL., MacLean JJ., and Iatridis JC., "Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system," *Eur Spine J*, 16(7), 1029-1037, 2007.
9. Urban JP., Smith S., and Fairbank JC., "Nutrition of the intervertebral disc," *Spine*, 29, 2700-2709, 2004.
10. Bibby SR., Jones DA., Ripley RM., and Urban JP., "Metabolism of the Intervertebral Disc: Effects of Low Levels of Oxygen, Glucose, and pH on Rates of Energy Metabolism of Bovine Nucleus Pulposus Cells," *Spine*, 30, 487-496, 2005.