

쥐의 비복근 섬유의 변화에 대한 형태학적 연구

한남대학교 이과대학 생물학과
허 양 훈
대전보건대학 물리치료과
최 재 청

A Morphological Study on the Changes in Rat's Gastrocnemius

Huh, Yang-Hoon, M.S.

Department of Biology, Han Nam University

Choi, Jae-Cheong, P.T., Ph.D.

Department of Physical Therapy, Taejon health sciences college

<Abstract>

Twelve Spraque-Dawley healthy male rats(average weight : 250g)were used to study the morphological changes of mitochondria, myofibril, muscle cell nucleus, triad. They were divided into 3 groups : normal daily activity (Group 1), 2 weeks immobilization (Group 2), 4 weeks immobilization (Group 3). Left ankle of Group 2 and 3 were immobilized with plaster cast in 65° plantarflexed position. The gastrocnemius were removed from 12 rats. Muscle fibers were observed electronmicroscopically by double staining with uranyl acetate and lead citrate. All the variables of Group 2 and 3 that selected in this study were significantly decreased when compared with control value ($p<.05$) but also muscle fibers showed extensive damage, characterized by irregularity of mitochondrias and wide separation of myofibrils, irregularity and thinness of myofilaments and abnormal shape of muscle cell nucleus and unclear triad.

Especially, sarcomere length of Group 3 were significantly decreased when compared with Group 2 ($p<.01$).

I. 서론

고정이란 의학적 목적을 위하여 신체의 일부분을 움직이지 않도록 하는 것을 말한다.

고정은 능동적인 고정과 수동적인 고정으로 나눌 수 있는데 능동적 고정은 환자 스스로 움직이지 않도록 하는 것을 말하며 수동적인 고정은 자신을 제외한 다른 여러 방법을 이용한 것이다(오정희 등 1990).

의학적 측면에서 움직임을 통제하거나 제한하는 일은 필수적인 치료 행위로 인정할 수 있다. 골절, 수술, 염증 등 많은 경우에 고정을 필요로 한다.

그러나 이러한 고정 기간이 길어지면 길어질수록 그 부작용도 심각하게 나타난다. 부작용 중 움직임을 제한하거나 통제하여 발생하는 근육 등 연부조직의 변화는 우려 할 만하다. 특히 고정된 부분과 관련된 근육의 조직학적, 형태학적 변화는 고정 기간이 지난후 또다른 문제를 야기한다. 일반적으로 구축 또는 무용성 위축이라 설명하는 문제들은 고정 기간이 지난후 관절의 운동성과 근력의 상실을 초래하는 것으로 인식되어 왔다. 그 결과 환자의 운동성에 큰 장애를 초래하게 된다.

Kotke 등(1982)은 구축이란 근육을 장기간 고정하면 유연성을 상실하고 짧아진 자세를 유지하게 되어 조직의 adaptive shortening (tightness)을 일으키는 것을 말한다고 하였으며 Sam Prien (1998)은 활동전위가 없는 근육의 짧아짐이며 액틴과 미오신이 짧아진 채 남아있는 것이라고 하였다.

위축이란 질병에 의해서 또는 사용하지 않아서 초래되는 근조직의 wasting 또는 상실을 말하며 다른 용어로는 muscle wasting, wasting, atrophy of the muscles 등이 있다.

또한 위축은 근육 크기의 감소에 의한 것으로 고정에 의한 무용성 위축과 신경 지배의 상실에 의한 것으로 나눌 수 있다(Sam prien, 1998).

근육을 장기간 동안 고정하면 근육 단백질과 미토콘드리아의 감소로 인하여 근 위축이 초래되며 짧아진 상태로 고정된 근육은 신장력에 대항하는 결합 조직의 양을 증가시키게 되고 근절의 흡수로 인하여 근절 수의 감소를 일으킨다고 하였다(Carolyn Kisner 등, 1996).

동물 실험에서 근위축과 구축을 유도하기 위하여 신경의 절단(Goldspink, 1977), 석고고정 및 관절편 고정(Fitts 등, 1989), 지체 현수(Hauschka 등, 1988 ; Templeton 등, 1988)등의 방법이 사용되었다.

Watanabe K(1990)는 당뇨 쥐의 연령별 근섬유의 형태

학적 변화를 섬유유종류에 따라 연구하였으며, Kauhanen-S 등(1996)은 토끼의 뒷다리를 서로 다른 기간 동안 고정한 후 각각 다리의 근육에 대하여 조직 병리학적 변화를 비교하였고, Jozsa-L 등(1993)은 3주 동안 쥐의 종아리 근육을 사용하지 못하도록 고정한 후 근 세포 핵 수의 변화를 조직학적으로 연구하였다.

Qin-L 등(1997)은 토끼의 뒷다리를 이용하여 고정 기간동안 또는 고정 후 표면 전기 자극(surface electrical stimulation) 이 근섬유 횡단면, 유형, 모세혈관의 공급 정도, 근육의 무게(wet weight) 등에 미치는 효과를 연구하였다.

David G. Greathouse 등(1986)은 쥐 골격근을 고정한 뒤 미토콘드리아, triad, 그리고 글리코겐의 양을 측정하였으며, G.J.Herbison 등(1978)은 근 섬유 위축의 정도에 대한 연구에서 근육의 무게와 단백질 양, 섬유의 조직 화학적 분석을 시도하였다.

이상의 선행연구들에서는 근육의 길이를 가능한 짧게 유지한 상태에서 고정하고 그 결과 나타나는 형태학적 변화를 연구한 것들이 보이지 않으며, 물리치료의 현장에서는 근육의 길이가 짧아짐으로 인한 구축과 위축이 많은 문제를 야기한다.

따라서 본 연구에서는 근 섬유의 길이를 짧게 고정하였을 때의 근 섬유의 변화를 연구하여 구축과 위축의 형태학적 이해를 위한 기초를 제공하고자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

연구 재료는 체중 250g 내외의 성숙한 Sprague-Dawley 계 흰쥐 수컷을 사용하였다. 사육실은 동일 조건(25℃, 습도 65%)을 유지하였으며 자연광 주기하에서 고품 사료(삼양배합사료, 한국)와 수돗물로 사육하였다. 실험군은 정상군, 2주 고정군, 4주 고정군으로 나누어 각각 4마리씩 총 12마리를 대상으로 하였으며 본 연구에서는 각 군에서 뚜렷한 변화를 보이는 표본을 선정하였다.

2. 연구 방법

1) 고정 방법

고정 2주군과 4주군은 좌측 뒷다리의 족관절 부위를 삭모한 뒤 탈지면으로 감고 저측골목 65° 자세에서 석고 붕대로 고정하였다.

2) 투과전자현미경 관찰

비복근의 근위부와 원위부의 전을 절단, 근육 전체를 적출하였으며 적출 즉시 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4°C, pH 7.2)로 전고정하고 1mm 정도로 세 절 하였다. 전고정이 완료된 조직은 인산완충용액(pH 7.2)으로 10분씩 3회 세척하고 이어 2% osmium tetroxide (OSO₄)에서 4시간 동안 후고정하였다. 고정이 완료된 재료는 상기 방법으로 다시 세척한 후 acetone 농도 구배 순으로 탈수하고 Epon-812 혼합액에 포매하여 60°C에서 36시간 동안 중합 반응을 시켰다. 포매된 재료는 ultramicrotome(LKB, 2088)으로 semithin section하여 광학현미경 하에서 검경한 후 초박 절편 부위를 선정하였다. 이후 초박 절편을 은색 제작하여 copper grid에 부착한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하고 vacuum evaporator(JEE-4X)에서 carbon coating한 후 투과전자현미경(JEOL, 100S)으로 80 kV에서 관찰하였다.

3) 형태 계측

근섬유의 미세 구조 변화 정도를 수량화 하기 위하여 종단면을 22,000 배로 확대한 사진상에 11×11 cm 크기의 격자를 그려 넣은 다음 투명 방안지를 부착하여 각 parameter 에 포함되는 방안(1×1mm)의 수를 실측하고 방안 한 개를 1/22 × 1/22 μm 로 환산하였다.

① 미토콘드리아의 면적

단위 면적당 미토콘드리아의 수를 센 다음 모든 미토콘드리아가 점유하고 있는 평면의 방안 수에 따라 산출하였다.

② 미토콘드리아의 체적

체적은 이미 산출된 면적에 절편의 두께(60nm)를 곱하여 구하였다.

③ 근절의 길이

근절의 길이는 Z 선과 Z 선 사이에 수직선을 긋고 방안의 수를 실측하여 환산하였다.

④ 근절의 폭

근절의 폭은 M 선의 폭을 측정하였다.

4) 자료 처리

추출된 자료는 SPSS/PC* 통계 프로그램을 이용하여 집단간 감소 폭에 대한 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석(ONEWAY ANOVA)을 실시하였으며, 유의성에 대하여 Duncan의 다중순위검정으로 사후 검정하였다. 통계치의 유의 수준은 α=0.05 로 설정하였다.

III. 결 과

1. 미세 구조 분석

비복근 섬유의 미세 구조는 정상군, 2주 고정군 그리고 4주 고정군에서 각각 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 관찰되었다. 정상군의 경우 골격근 섬유의 전형적인 구조를 나타내었다. 근원 섬유는 평행하게 배열되어 있으며 A대, I대, M선 그리고 Z선 등의 기본 구조가 잘 발달되어 있었다. 근원 섬유들 사이에는 Z선의 양측에 미토콘드리아, A대와 I대의 이행 부위에 삼초체(triad)가 각 근절에 두 개씩 존재하였으며 그 외 다수의 글리코겐 과립이 관찰되었다(Fig. 1A). 2주 고정군의 경우는 정상군에 비해 근원 섬유의 폭이 감소하였고 Z선과 근 필라멘트의 배열이 다소 불규칙하였으며 미토콘드리아의 존재 부위가 일정하지 않았고 그 크기가 작아졌고 글리코겐 과립의 수도 적었다(Fig. 1B). 4주 고정군의 경우는 근원 섬유의 배열이 파형이고 Z선이 불분명하며 극히 일부의 미토콘드리아와 글리코겐 과립이 관찰되었다(Fig. 1C).

고정군에서는 필라멘트 사이의 공간이 정상군에 비교하여 커진 것으로 나타났다.

핵의 구조도 실험군 간에 현저한 차이를 나타내었다. 정상군의 핵은 타원형으로, 핵막은 매끈하며 핵 내에는 염색질이 고르게 분포되었다(Fig. 2A).

2주 고정군의 핵은 가장자리가 돌기처럼 부풀거나 떨어져나가 성상형을 보이며 염색질의 분포도 느슨하였고(Fig. 2B), 4주 고정군의 핵은 형태적 변화가 매우 심하여 아메바형태를 보였다(Fig. 2C).

2. 형태 계측 분석

정상군과 2주 고정군, 4주 고정군의 미토콘드리아의 표면적, 미토콘드리아의 체적, 근절의 길이, 근절의 폭을 계측한 결과 모든 변인들이 정상군과 비교하여 고정 기간이 증가함에 따라 유의하게 감소 되었다(p<0.05) (표 1, 2).

특히 근절의 길이는 정상군과 2주 고정군, 정상군과 4주 고정군 사이에서 뿐 아니라 2주 고정군과 4주 고정군 사이에서도 유의하게 감소되었다.

또한 다른 변인들과 비교하여 근절 길이의 감소는 더욱 높은 유의 수준을 보였다(p<0.01) (표 1, 2).

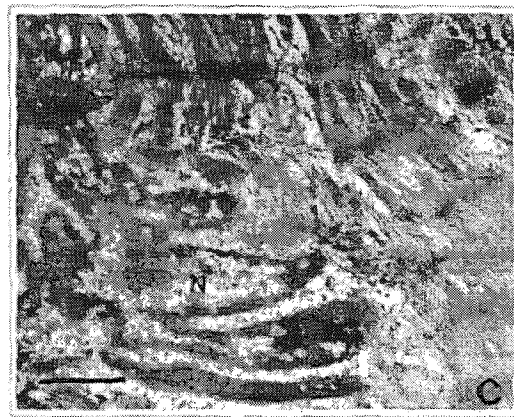
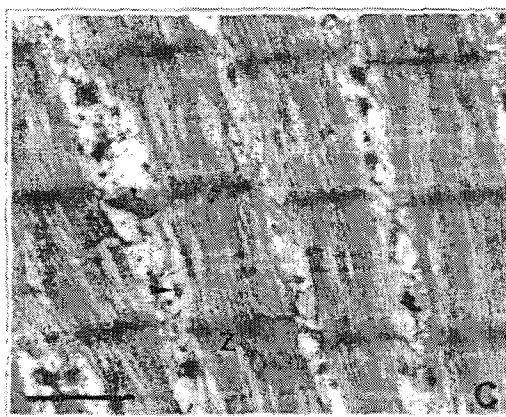
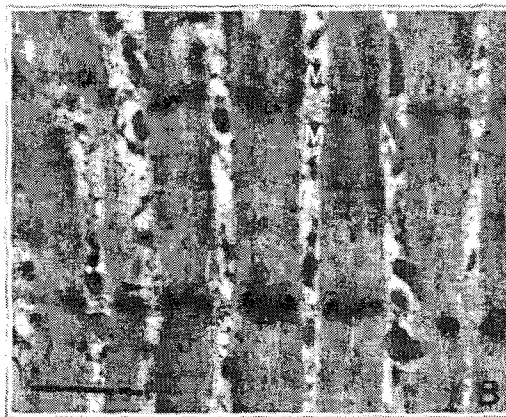
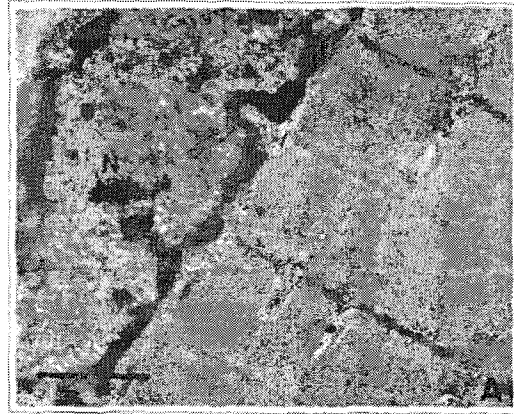
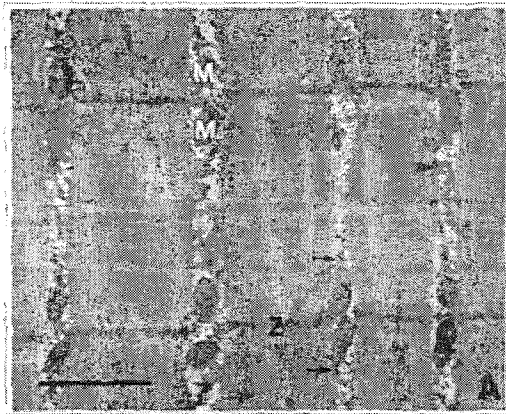


그림 1. 흰쥐 비복근 근원섬유의 전자현미경 사진 (Scale bars: 1 μ m). 정상군(A)은 전형적인 골격근 섬유 구조로 Z선(Z)의 양측에 미토콘드리아(M), A대와 I대의 이행 부위에 삼조체(→), 글리코겐 과립(▶)이 존재하며, 2주 고정군(B)과 4주 고정군(C)에서는 근원 섬유와 미세기관들의 변형이 관찰된다.

그림 2. 흰쥐 비복근 세포 핵의 전자현미경 사진 (Scale bars: 1 μ m). 정상군(A)의 핵(N)은 타원형을 보이는 반면, 2주 고정군(B)과 4주 고정군(C)에서는 각각 정상형과 아메바형으로 심한 변형을 나타낸다.

Table 1. Means and standard deviations for mitochondrial surface area, volume fraction, sarcomere length and Z disk width

Group	Mitochondrial surface area (μm^2)	Mitochondrial volume fraction (μm^3)	Sarcomere length (μm)	Z disk width (μm)
Normal	0.0593 \pm 0.0038	0.0036 \pm 0.0002	2.0567 \pm 0.0907	1.0833 \pm 0.1286
2 weeks	0.0357 \pm 0.0157	0.0021 \pm 0.0009	1.6233 \pm 0.2203	0.6567 \pm 0.1501
4 weeks	0.0223 \pm 0.0053	0.0013 \pm 0.0003	1.1700 \pm 0.1825	0.6867 \pm 0.1589

Table 2. Summary of ANOVA for mitochondrial surface area, volume fraction, sarcomere length and Z disk width

Source	df	SS	MS	F	p
Mitochondrial surface area	2	.0021	.0011	10.8913	.0101
Mitochondrial volume fraction	2	.0000	.0000	11.5233	.0088
Sarcomere length	2	1.1795	.5897	19.6432	.0023
Z disk width	2	.3403	.1701	7.9383	.0206

IV. 논 의

1. 미토콘드리아

본 연구에서는 2주 고정군의 경우 단위 면적당 평균 미토콘드리아의 수는 증가하지만 그 크기는 감소되었고 모양과 위치도 불규칙하였다.

4주 고정군에서는 약간의 미토콘드리아가 발견되었으나 비교군 모두에서 평균 표면적과 평균 체적은 유의하게 감소되었는데, 이것은 근 섬유에 대한 어떠한 형태의 것이든 자극의 부족으로 인한 적응(adaptation)의 변화로 생각된다.

David G. 등(1986)은 쥐의 대퇴사두근에 대한 연구에서 전기 자극에 의하여 단위 면적당 미토콘드리아의 수, 표면적, 체적이 증가한다고 하였는데, 이러한 결과는 Salmons S. 등(1981)의 지구력 운동이나 전기 자극에 의한 산소 요구의 증가 즉, 근 세포의 호흡의 요구가 증가함에 기인하여 미토콘드리아의 크기나 수가 증가한다는 연구 결과(Gollick PD et.al. 1969)와 일치되는데, 본 연구의 결과에서 그 크기가 감소한다는 것은 고정군에 대하여 산소가 요구되는 처치 즉, 근육의 활동을 허용하지 않았기 때문으로 생각된다.

2. 근원 섬유

정상군과 비교하여 고정군에서는 근질의 길이와 근질의 폭이 유의하게 감소하였으며 필라멘트의 배열도 불규

칙하게 변화하였다.

Z선은 불분명하고 필라멘트 사이의 공간이 정상군보다 더 커져 있었는데 이것은 필라멘트 사이의 단백질의 상실과 필라멘트 자체가 가늘어진 결과로 판단된다. 그 근거는 G.J. Herbison 등(1978)의 근형질 단백질보다는 근원 섬유 단백질의 상실이 더욱 크다는 연구를 들 수 있다. 또한 근원 섬유 사이의 글리코젠 양이 상당히 줄어든 것이 관찰되었는데 이러한 결과는 Watanabe K(1990)의 당노 쥐에 대한 연구에서 백근 섬유의 심한 손상은 위축과 근원 섬유 사이의 공간이 넓게 벌어지고 근 필라멘트가 가늘어지며 글리코젠이 침착되는 결과라는 연구와 일치하는 것으로 판단할 수 있다.

Kauhanen S. 등(1996)은 토끼를 대상으로 하는 연구에서 3일 동안의 고정 결과 근섬유의 직경이 15%, 2주 고정의 경우에는 56%, 4주 고정의 경우는 심한 섬유의 손상과 더불어 직경이 47%가 감소하였다고 하였는데, 본 연구 결과도 이와 비슷하게 나타나 고정시켜 근육의 활동을 제한하면 어떠한 근 섬유이든 유사한 변화가 일어날 것으로 사료된다.

3. 근 세포 핵

근 세포 핵은 본 연구에서는 그 수량보다는 형태학적 관찰을 하였는데 정상군의 핵이 타원형이며 가장자리가 매끈한 것과 비교하여 고정 기간이 증가함에 따라 형태가 불규칙하게 되었고 일부는 떨어져 나가 정상형으로 나타났다.

Jozsa-L 등(1993)은 근 세포 핵에 대한 조직학적 연구에서 3주 동안 고정된 결과 단위 핵 당 NOR(nucleolar organizer region : mRNA로 유전정보를 전사하는 DNA의 고리)의 수가 감소하는 것은 리보솜 단백질 합성 활동성의 지표(NOR)의 수가 감소하는 것이라고 하였는데 직접 비교는 불가능하며 의의를 부여할 수는 없지만, 고정은 핵의 조직학적 변화 뿐 아니라 본 연구의 결과와 같은 형태학적 변화도 나타날 것이라고 추정 할 수 있다.

V. 요약

본 연구는 실험용 쥐 12마리를 정상군, 2주 고정군, 4주 고정군에 각각 4마리씩 배정하고 석고 고정 기간 후 비복근의 절편을 취하여 투과전자현미경으로 형태학적 관찰을 한 결과를 다음과 같이 요약할 수 있다.

골격근을 짙은 위치로 일정 기간 고정하면 근질의 길이와 폭은 물론 삼조체, 글리코겐, 필라멘트 단백질, 미토콘드리아와 근 세포 핵의 모양까지도 심한 변화가 일어나기 때문에 구축과 위축의 개념에 근원 섬유와 조직, 형태학적 의의를 추가하여야 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

- 오정희, 박찬의, 이기용(1990). 임상운동학, 서울, 도서출판 대학서림.
- Carolyn K., Lynn A. Colby. Therapeutic exercise Foundations and techniques, ed 3, Philadelphia, F.A. Davis Co. 1996, p 148.
- David G. Greathouse, Arthur J. Nitz, Daniel H. Matulionis, Dean P. Carrier(1986). Effects of short-term electrical stimulation on the ultrastructure of rat skeletal muscles. American Physical Therapy Assn. 66(6), 946-953.
- Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, Timmerman RJ(1989) Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. Am J Physiol 256(Cell Physiol 25) : C1082-C1091.
- G.J. Herbison, M.M. Jaweed, J.F. Ditunno(1978). Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat, Arch Phys Med Rehabil 59, 301-305.
- Goldspink DF(1977) The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. J of Physiol Lond 264(1) : 267-82.
- Gollnick PD., King DW.(1969). Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. Am J Physiol 126:1502-1509.
- Hauschka EO, Roy RR, Edgerton VR(1988). Periodic weight support effects on rat soleus fibers after hindlimb suspension. J Physiol 65 : 1231-1237.
- Jozsa-L, Kannus-P, Jarvinen-M, Isola-J, Kvist-M, Lehto-M(1993). Atrophy and regeneration of rat calf muscles cause reversible changes in the number of nucleolar organizer regions. Evidence that also in nonproliferating cells the number of NORs is a marker of protein synthesis activity. Lab-Invest. 69(2) : 231-237.
- Kauhanen-S, Leivo-I, Pettila-M, Michelsson-JE(1996). Recovery of skeletal muscle after immobilization of rabbit hindlimb. A light microscopic study. APMIS 104(11) : 797-804.
- Kottke,FJ., Stillwell,GK., Lehmann,JF. Krusen's handbook of physical medicine and rehabilitation, ed 3, Philadelphia, WB Saunders, 1982, p 11.
- Qin-L, Appell-HJ, Chan-KM, Maffulli-N(1997). Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. Arch-Phys-Med-Rehabil. 78(5) : 512-517.
- Salmons S., Henriksson J.(1981). The adaptive response of skeletal muscle to increased use. Muscle Nerve, 4: 94-105.
- Sam Prien (1998) Muscle Physiology, <http://www.asft.edu/online-courses/ansc2401/lects20-21.ht>.
- Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, Dudenhoefter GA(1988). Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. J Appl Physiol 65 ; 1191-1195.
- Watanabe-K(1990). Histochemical and ultrastructural observations of limb muscle in spontaneous diabetic mice. Nippon-Seikeigeka-Gakkai-Zasshi 64(12): 1202-14.