

사지 연장술에서 Bromodeoxyuridine Monoclonal Antibody를 이용한 근섬유 분열의 추적

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

박희완 · 양규현 · 강동민

— Abstract —

Detection of the Proliferation of Muscle Fibers During Limb Lengthening by Monoclonal Antibody to Bromodeoxyuridine

Hui-Wan Park, M.D., Kyu-Hyun Yang, M.D., Dong-Min Kang, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Soft tissue related complications are quite frequent in limb lengthening. Muscle fibers may proliferate or regenerate after stretching injury over 10-20% of their original length. However, the cells which are engaged in this phenomenon are not confirmed yet. We chased the S-phase cells (phase for DNA replication) in the posterior leg muscles during limb lengthening by immunohistochemical technique.

We lengthened the tibiae of fifteen New Zealand white rabbits. We divided them into three groups and each group is consisted of five rabbits. In group 1, we lengthened the left tibiae by 10% of their original length, in Group 2, 20%, and in group, 3, 25%, respectively. At the end of lengthening posterior muscles of lengthened left side and of controlled right side were fixed and processed for immunohistochemical staining which could detect the incorporation of bromodeoxyuridine(BDU). Labelling index(LI:% of positively stained S-phase nuclei) of group 1 was zero. LI of groups for more than 20% lengthening (sum of group 2 and 3) was statistically significant.

In conclusion, nuclei around or within the muscle tissue are in S-phase during limb lengthening which means proliferation of the muscle fibers or of the certain cells that about the muscle fibers.

Key Words : Muscle, Proliferation, Limb lengthening, Immunohistochemistry

* 통신저자 : 박 희 완

영동우체국 사서함 1217, 서울

연세대학교 의과대학대학부속 영동세브란스병원 정형외과

* 본 논문은 연세대학교 의과대학 교수연구비로 실행되었음

서 론

사지연장술은 연골무형성증 등 선천적 원인에 의하여 발생하는 사지단축과 감염 및 외상에 따른 성장판손상으로 인하여 2차적으로 발생하는 사지부동의 치료로 1905년 Codivilla에 의해 처음 시도된 이래 Abott, Anderson, Wagner 등에 의하여 점차적으로 발전되어 왔으며, 근래에 와서 De Bastiani 등과 Ilizarov는 절골술후 일정기간의 휴지기를 거친 다음 점진적으로 가골을 연장시키는 방법으로 자가 골이식 없이 사지골을 연장시키는 방법을 개발하였다. 이로써 고식적인 방법에서의 골신연 한계치를 넘어설 수 있었으나 과도한 골연장술에서는 골조직의 재생보다는 주위 골격근이나 혈관, 신경 등의 인부조직에 과도한 신연력이 가해지면서 신경장애, 관절강직, 관절탈구 등 합병증이 자주 발생되며, 아직 극복되지 않은 과제로 남아있다^{1,5,8,12}. 관절탈구 및 강직 등의 주요 원인으로 근섬유의 신연제한이 지적되어 왔으며, 근섬유는 성장이 완료된 후에는 재생이 잘 되지않는 조직으로 알려져 왔다. 위성세포는 basal lamina아래에 존재하며, Murray와 Robbins는 이 세포가 파괴된 인접 근육세포에서 유리되는 인자에 의해 이동하여 재생과정을 밟으면서 근섬유의 재생에 결정적으로 기여한다고 주장하였다^{3,4,9,11}. Ilizarov의 연구에 의하면 근육은 본래의 길이의 10% 까지는 근섬유간의 활강작용에 의해 신연되며, 10% 이상 신연시에는 활강작용과 함께 근섬유의 증식이 일어난다고 하였다. 그러나 골연장술시 근육세포의 분열을 조직학적으로만 추정하였으며, 아직 확실하게 분열되는 세포를 추적하지는 못했다⁸. 이에 저자들은 immunohistochemical 기법을 이용하여 DNA가 증폭되는 S-phase 세포를 관찰함으로써 골연장술시 근육조직증식에 세포분열이 관여하는지를 추적하였다.

재료 및 방법

백색 성숙가토 15마리(몸무게 2.0-2.5kg)를 암수 구별없이 3군으로 나눠 각각 5마리씩 경골 골연장술을 실시하였으며, 토끼는 고행사료를 이용하여 동일 조건하에 동물실에서 사육하였다. 토끼를 pento-

barbital(Entobar, 삼진제약, 25 mg/kg) 정맥 마취후 각군의 토끼 좌측 하퇴부를 삭모하고 10% 배타딘 용액으로 소독한 후 좌측 경골에 mini-axial external fixator를 장착하였으며 절골부가 경골의 슬관절면에서 3cm 하방에 위치하도록 핀을 삽입하였다. 절골술은 제2번과 제3번 핀 사이에서 1.6mm drill bit를 이용하여 4개의 구멍을 만든 후 작은 bone cutter로 조금씩 절골하였으며, 절골후 외고정장치의 본체를 제거하여 경골과 비골이 완전히 절골되었는지 확인하였다. 절골술시에는 골막을 종절개하여 골막의 외상을 최소한으로 줄였으며, 절골후 다시 흡수 봉합사로 봉합하였다. 수술후 마취하에서 양측 경골의 전후 사진을 촬영하였으며 이때의 경골의 길이를 100%로 하여 경골의 신연율을 설정하였다. 수술후 7일간의 휴지기를 거친 다음 좌측 경골을 매 12시간마다 0.5mm씩 신연시켰으며 제1군은 원래 경골길이의 10%를, 제2군은 20%를, 그리고 제3군은 25%를 신연시키면서 매주 방사선촬영으로 확인한 후 희생시켰다(Fig. 1). 희생 60분전, 40분전 그리고 20분전에 bromodeoxyuridine(BDU,

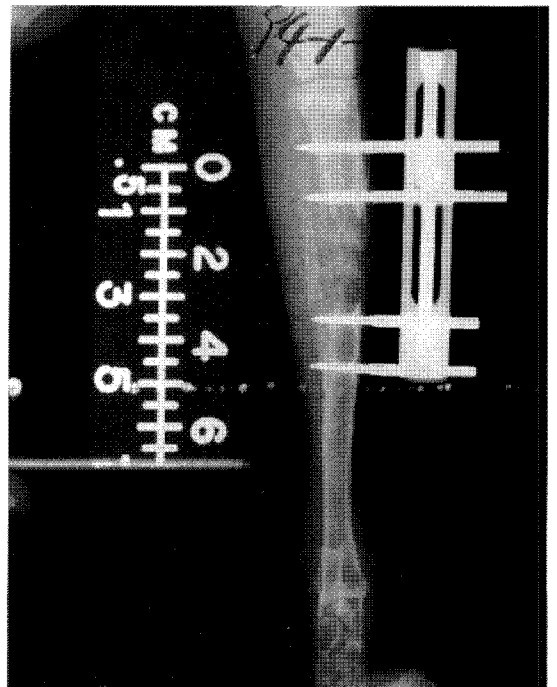


Fig. 1. Radiogram of the both tibiae during lengthening procedure.

DAKO PATTS, Copenhagen, Denmark) 10mg/kg을 정맥주사한 후 과량의 pentobarbital로 희생하여 양측 하퇴부를 절단하였다. 좌측의 실험군, 우측은 대조군으로하여 하퇴부 후방 심부근육인 가재미근을 노출시킨 후 전체를 포르마린으로 하루동안 고정시킨 다음 원위부 1/3을 시료로 채취하였다. 희생시 각 개체의 경부 입파절을 대조군으로 채취하였으며 하기과정을 동일하게 실시하였다. 시료는 파라핀으로 포매하였으며, 근육이 황으로 절단 되도록 절편을 작성하였고, 각 조직절편을 0.1% trypsin과 0.1% calcium chloride 용액에서 37℃로 30분간 predigestion을 실시한 후, DNA의 denaturation을 위하여 45분간 70℃에서 95% formamide와 0.15M trisodium citrate로 처리하고, 5분간 TBS buffer pH 7.6으로 3번 세척하였다. BDU monoclonal antibody(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)를 1:20으로 희석하여 절편을 처리한 후 three stage immunoperoxidase technique을 이용하여 BDU이 결합되어 착색되는 세포핵을 광학현미경으로 관찰하였다. 각 절편을 200배 시야에서 관찰한 후 세포 1000개당 BDU와 결합하여 착색된 세포핵(S-phase세포)을 labelling index(LI:착색된 세포핵을 %로 표시)로 정의하고 각군의 대조측과 비교하였다. 각군에서의 비교는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 검정하였으며, 군간의 비교는 Mann-Whitney검정을 이용하여 유의수준 0.05에서 판정하였다.

결 과

BDU의 투여와 세포내 결합과정이 잘 이루어진 것을 확인하기 위하여 양성 대조군(positive control)인 입파절 표본이 양성(Fig 2.)으로 염색된 토끼에서 채취된 근육조직을 검색하여 BDU를 포착했다고 인정되는 세포핵을 200배 시야에서 관찰하였다. 매 1000세포핵당 LI는 Table 1과 같이 나타났다. 세포핵의 수를 셀 때에는 미세혈관과 그 주위 연부조직 세포핵은 제외되었으며 근섬유와 밀접한 세포핵에 국한하였다. 10%를 연장한 제1군에서는 전혀 양성 세포핵을 확인할 수 없었다. 20%를 연장한 제2군의 실험측과 대조측의 LI의 차이는 평균 0.74%였고, 25%를 연장한 제3군의 실험측과 대조측의 LI의 차

Table 1.

	제1군		제2군		제3군	
	실험	대조	실험	대조	실험	대조
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0.5	0	0.1	0
4	0	0	0.6	0	0.3	0
5	0	0	3	0.4	1	0

제1군은 10%, 제2군은 20%, 그리고 제3군은 25%씩 경골을 점차적으로 신연시켰으며 bromodeoxyuridine이 결합된 하퇴후방근육의 핵을 200배 시야에서 관찰하여 labelling index를 측정하였다.

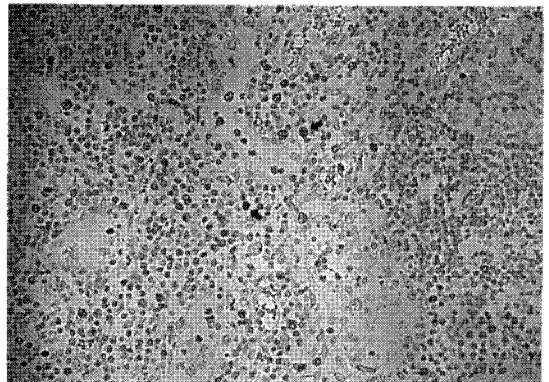


Fig. 2. Immunohistochemical staining for bromodeoxyuridine in cervical lymph node. Brown colored nuclei (arrow head) were positively stained S-phase cells. X 400.

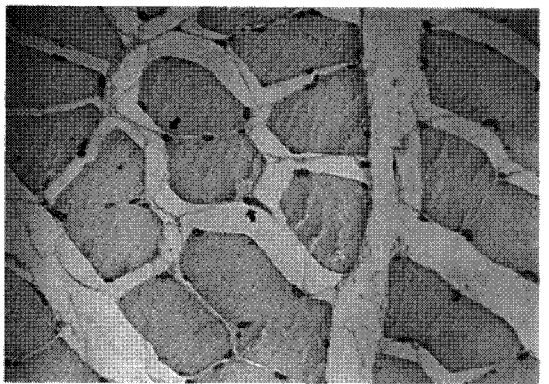


Fig. 3. Immunohistochemical staining for bromodeoxyuridine in lengthened posterior calf muscle. Brown colored positively stained nuclei (arrow head) were clearly visible. Shrinking of the cytoplasm was an artifact in the staining process. X 400.

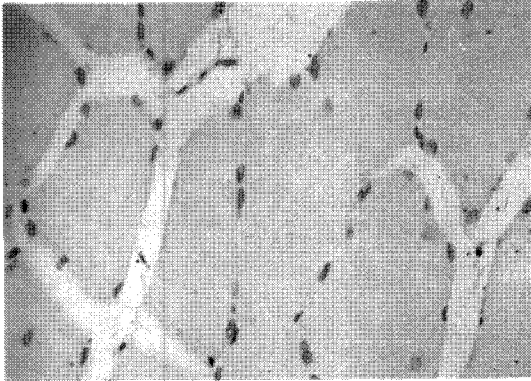


Fig. 4. Immunohistochemical staining for bromodeoxyuridine in control side X 400.

이는 평균 0.28%였으며, 제2, 3군의 평균치는 통계학적으로 서로 차이가 없었다(Fig 3, 4.). 제2군과 3군내에서 실험측과 대조측간의 LI의 차이는 유의하지 않게 나타났으나, 20% 이상을 연장시킨 토끼(제2군과 제3군의 합) 10마리를 Wilcoxon signed rank 검사로 분석한 결과 $p=0.014$ 로 유의하게 나타났다.

고 찰

출생후 근섬유의 정상발육은 뼈의 성장과 더불어 끊임없는 근육의 등장성 운동자극에 의해 근원섬유의 숫자가 늘어나는 것에 의한다고 하며 주로 근섬유의 끝부분인 근건이행부에서 활발히 일어나 새로운 근원섬유가 차례로 생성되면서 정상적으로 발육되어 이 근건이행부를 일명 근성장판이라고도 부른다. 일단 성장이 끝나면 근모세포들은 병합되어 근관을 형성하면서 근섬유의 새로운 생성은 중지되며 비활동성의 근위성세포로서 존재하게 된다^{2, 3, 11, 14, 17}. 그러나 손상이나 질병으로 근섬유가 파괴되면 남아 있는 정상적인 근섬유주위에 있는 근위성세포가 손상받은 부위로 이동되어 재생 과정을 밟게 된다고 하며, Murray와 Robbins는 이 과정이 파괴된 근섬유로부터 유리된 인자에 의해 유발된다고 하였고, Bishoff 등도 근세포 특이분열물질(muscle cell specific mitogen)에 의해 근위성세포가 선택적으로 자극 받아 증식되는 것으로 보고하였다. 점진적 사지연장술이나 정상발육은 점진적인 tension stress가 가해지는 상황에서 근육의 변화가 관찰된다는 공통점이 있지만 점진적 사지연장술에서는 일

정 비율이 넘으면서 근세포의 손상이 불가피하며, 이는 포식세포의 출현과 근육세포핵의 중앙이동으로 입증되는바, 근조직 길이의 변화는 새로운 근조직이 추가로 형성되는 것인지 혹은 손상된 근조직의 재생 과정에 의한 것인지 아니면 위 두기전의 복합작용인지는 확실하지가 않다^{1, 3, 8, 11}.

골연장시 근육의 변화는 골연장술의 방법에 따라 다양하며 개 경골을 1회 내지는 수회에 걸쳐 급격히 3-10% 연장시켰을 때 근육의 손상이 매우 심했다고 하며, Ilizarov의 연구에 의하면 점진적 골연장시 근육 본래의 길이의 10%까지는 근섬유간의 활강에 의해서, 그리고 10% 이상의 신연에서는 새로운 근육 조직이 형성된다고 하였으며, 이러한 변화는 전자현미경상 신연 14일째 미토콘드리아가 비대해지면서 많은 cristae를 형성하는 것이 주로 근섬유 양단에 관찰되었는데 이곳은 actin과 myosin이 새롭게 형성되어지는 곳으로 추정하고 있다. 또한 Ilizarov는 tension stress에 의하여 근육조직은 myofibril을 새롭게 형성할 뿐만 아니라 근육조직내의 위성세포에 의하여 새로운 조직도 만들어진다고 주장하였으며, 본 실험에서도 그의 학설을 뒷받침해주고 있다⁸.

본 실험에서는 10%만 연장시킨 제1군에서는 S-phase 세포를 추적할 수 없었으며, 20% 이상을 연장시킨 제2군과 제3군의 합계에서 통계학적으로 유의하게 S-phase 세포의 추적이 가능하였다. 이는 근육세포핵이나 세포질이 적은 인접한 세포가 분열한다는 것을 입증하는 것으로써 이 세포핵이 위성세포인지 여부는 아직 확인되지 않았으나, 그 위치로 보아 그 가능성은 높다.

BDU는 thymidine analogue로서 증식되는 DNA에 thymidine 대신 결합하며 BDU에 대한 monoclonal antibody로 추적이 가능하다. 이러한 immunohistochemical 방법은 기존의 동위원소 사용법에 비하여 처리가 간단하고 방사선 노출에 대한 위험도가 없기 때문에 많이 사용되고 있지만 각 과정에서 처리시간, 항체의 희석 농도에 따라 조직의 염색에 차이가 있기 때문에, 판정시 어려움이 동반되기도 한다. 또한 in vitro 염색시 tritiated-thymidine과 달리 조직내 침투가 약하여 표층만 염색되는 단점이 있기 때문에 실험목적에 따라 구분 사용되어야 한다. S-phase 세포를 추적하는 LI는 암조직에서 3.6-29.2% 인바 정상조직에서의 LI는

일부조직(골수, 임파절, 위장관계)을 제외하고는 극히 낮기 때문에 급변 실험에서도 큰 차이를 나타내지는 못했다. 예비 실험과정에서 LI가 너무 낮아 염색과정의 잘못인지 아니면 실제로 LI가 극히 낮게 나오는지를 구분하기 위하여 각개체의 임파선을 양성 대조군으로 사용하였으며 임파선의 핵이 뚜렷이 염색된 토끼의 근육조직 표본만 관찰하고 LI를 결정하여 위음성의 가능성을 배제하였다. 또한 LI를 높이기 위하여 BDU의 주입을 희생 60분전, 40분전, 20분전으로 3차례 실시하였으며, 예비실험시 실시한 1회 주입시보다 높은 LI를 얻을 수 있었다.^{6,7,10,13,16)}

결 론

토끼의 경골을 20% 이상 연장시킬 때 하퇴 후방 근육의 근육섬유분열 유무를 BDU와 이에 대응하는 monoclonal antibody를 이용하여 추적한 결과 근섬유주위에 분포하는 세포핵이 S-phase에 있음이 확인되었으며 골연장술에서 근육조직내 핵이 분열한다는 것을 뒷받침하였다. S-phase로 구분된 세포핵의 근원은 아직 정확히 알 수 없으나, 그 위치로 보아 근섬유핵 혹은 위성세포로 추정된다.

REFERENCES

- 1) 이덕용, 최인호, 정진업, 정필현, 김석준 : 가토에서 경골연장술이 근육에 미치는 영향. *대한정형외과학회지*, 28:1305-1319, 1993.
- 2) **Bischoff R** : Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anat Rec*, 182:215-236, 1975.
- 3) **Campion DR** : The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol*, 87:225-251, 1984.
- 4) **Church JCT** : Satellite cells and myogenesis: a study in the fruit bat web. *J Anat*, 105:419-438, 1969.
- 5) **De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L and Tribella G** : Limb lengthening by callus distraction (Callotaxis). *J Pediatr Orthop*, 7:129-134, 1987.
- 6) **Dolbeare F, Beisker W, Pallavicini MG** : Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis. *Cytometry*, 6:521-530, 1985.
- 7) **Gratzner HG** : Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218:474-475, 1982.
- 8) **Iizarov GA** : The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. Part 1. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clin Orthop*, 238:249-281, 1989.
- 9) **Lipton BH and Schultz E** : Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*, 205:1292-1294, 1979.
- 10) **Morstyn G, Hsu SM, Gratzner KH** : Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 72:1844-1850, 1983.
- 11) **Murray MA and Robbins N** : Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse. *Neuroscience*, 7:1817-1822, 1982.
- 12) **Paley D** : Current technique of limb lengthening. *J Pediatr Orthop*, 8:73-92.
- 13) **Raza A, Preisler HD, Mayers GL** : Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. *N Engl J Med*, 310:991, 1984.
- 14) **Snow MH** : Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. *Anat Rec*, 188:181-200, 1977.
- 15) **Stockdale FE and Holtzer H** : DNA synthesis and myogenesis. *Expl Cell Res*, 24:508-520, 1961.
- 16) **Tazzari PL, Gobbi M, Tassi C** : In situ staining of bromodeoxyuridine positive cell normal and neoplastic colony-forming units grown on plasma clots. *J Immunol Methods*, 113:215-219, 1988.
- 17) **William PE, and Goldspink G** : Longitudinal growth of striated muscle. *J Cell Sci*, 9:751-767, 1971.