

손상된 성장판부위에 배양 연골세포 이식에 대한 연구

가톨릭의과대학 강남성모병원 정형외과

옥 인 영 · 문 명 상

= Abstract =

Cultured Chondrocyte Transplantation in the Damaged Growth Plate

In-Young Ok, M.D. and Myung-Sang Moon, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Catholic University Medical College, Kang-Nam St. Mary's Hospital

The growth plate is responsible for longitudinal bone growth and is involved in 6-15% of children's fracture. Of these injuries, 25-35% have been reported to result in some shortening or deformity, but in only 10% are the deformities sufficiently severe to lead to functional problems. The problem of repair of a damaged growth plate in children has never been adequately solved.

The purpose of this study is to clarify that allograft of cultured chondrocytes can survive in the growth plate defect and can prevent the angular deformity by avoiding the formation of bone bridge.

The chondrocytes were obtained from the rib cartilage of rabbit weighing 500g. The chondrocytes were cultured by so-called micromass culture method. The rabbits were divided two groups; the group I in which medial proximal tibial growth plate was destroyed, and the group II in which the cultured chondrocytes were transplanted into the right medial proximal tibial physeal defect. Each group has 10 rabbits. The tibial growth was observed grossly, radiologically and histologically until 16 weeks after graft.

The angular deformity was observed from 3 weeks after operation and histologically the fusion of growth plate was observed in all of group I. In group II, there were no angular deformity and no fusion of growth plate in 7 out of 10 rabbits. Allografted cultured chondrocytes survived and produced matrix in the physeal defects.

Through this study it was inferred that allograft transplantation of cultured chondrocytes in the iatrogenic physeal defect is a useful method to keep the physeal growth without cessation. However, further studies will be necessary to prove that the longitudinal growth potential resides in the transplanted chondrocytes as growth plate cartilage.

Key Words: Chondrocyte transplantation, Culture, Growth plate.

서 론

소아골절의 6-15%는 성장판 손상을 동반하게 되는데, 장관골의 성장판 손상으로 인하여 초래되는 골단축(bone shortening) 및 굴곡변형(angulation deformity) 등은 임상적으로 여러가지 문제점을 야기시키는데 특히 하지의 경우 이러한 성장장애로 기인되는 문제들은 더욱 심

각하다. 성장판 손상후 성장장애를 일으키는 기전은 손상 성장판의 연골조직으로 치유되지 않고 골단(epiphysis)과 골간단(metaphysis)에서 자라 들어온 골조직으로 채워져 골성유합이 일어나 성장판의 조기 폐쇄가 초래 되기 때문인 것으로 알려져 있다.

성장판 손상으로 인한 조기 성장판 폐쇄에 대한 예방 및 적절한 치료에 대하여는 아직까지 해결되지 않은 문제이다.

저자들은 가토의 경골 근위부 내측 성장판을 인위적으로 파괴시킨군과 파괴시킨 부위에 가토의 늑골에서 채취하여 배양하여 얻은 연골세포를 이식하여 술후 일정기간동안 X-선 촬영을 시행하여 경골성장을 관찰하고 경골근위부 성장판을 채취하여 조직학적 소견을 관찰하여 배양된 연골세포가 손상된 성장판내에서 운명을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험동물로는 연골세포 채취를 위하여는 체중 500g 내외의 New Zealand 백색가토 5마리를 이용하였으며 성장판 손상을 위하여는 체중 1000g 내외의 New Zealand 백색가토 20마리를 각군 10마리씩 2군으로 나누어 우측하지를 실험측, 좌측하지를 대조측으로 하였다.

2. 연골세포 배양방법

체중 500g 내외의 New Zealand 백색가토를 도살한뒤 늑골 및 슬관절연골을 채취하여 멸균된 laminar flow hood내에서 무균조작하에 절편이 2-3mm조각으로 잘라 2.5% trypsin과 항생제를 첨가하여 실온 1시간 방치후 900units/ml의 collagenase와 HEPES로 처리하여 세포분리 한후 1mm²당 500개의 세포가 되게 flask에 inoculation시켜 배양액인 DMEM+10% FCS를 첨가하여 CO₂ incubator에서 하루밤을 지낸후 0.1% trypsin, 0.05% EDTA(pH 7.4)로 세포를 flask에서 부터 분리하여 배양액으로 세척한후 세포수를 세어 1ml당 2×10^7 개가 되게한후 flask에 1μl점적을 inoculate한후 5% CO₂ incubator에 3-4시간 보관후 배양액을 flood 시킨후 배양을 시작하여 2일에 한번씩 배양액을 갈아주며 2주간 배양하였다(Fig. 1).

3. 성장판 손상방법

체중이 1000g 내외되는 New Zealand 백색가토 20마리를 2군으로 나누어 우측하지는 실험측, 좌측하지를 대조측으로 하였다. 실험동물은 이각정맥에 Ketamin sulfate를 체중당 4mg 주입하여 마취시킨후 수술대위에 양와위로 고정시키고 슬관절부를 삭모하고 소독한후 피부를 중으로 절개하고 제1군은 경골 근위부 내측 성장판을 노출하여 길이 10mm, 폭 4mm, 깊이 2mm되게 제거하였으며, 제2군은 성장판을 제1

Fig. 1. Safranin O stained chondrocytes under micromass cultures.

군과 같이 제거한후 그곳에 배양된 연골세포를 이식하였다.

4. 손상된 성장판에 배양 연골세포 이식방법

2주간 배양된 연골세포는 Safranin O염색으로 연골세포가 배양됨을 확인하였고 배양된 세포는 무균조작으로 고무칼로 플라스크에 부착되어있는 세포를 제거하고 피펫으로 세포를 흡인하여 제2군인 경골근위부 내측 성장판을 손상시켜 block으로 제거된 부위에 연골세포를 이식한후 수술창을 봉합하였다.

5. 관찰방법

모든 실험동물은 하지를 고정함이 없이 자유롭게 사육하였으며 술후 감염을 막기 위하여 항생제를 술후 1주간 주사하고 경골 성장의 과정을 관찰하기 위하여 술후 3주, 6주, 12주, 16주까지 양측 경골을 전후향 X-선 촬영하여 우측 경골의 각변형을 좌측 경골 대조군과 비교하였으며 이식된 연골세포의 성장판 내에서의 역할을 확인하기 위하여 술후 16주에 가토를 도살하여 경골근위부를 육안적으로 관찰하고 난후 손상군의 성장판 부위와 연골 이식군의 이식연골세포를 관찰하기 위하여 Safranin O와 Hematoxyline-eosine염색을 시행하여 조직학적으로 관찰하였다.

성 적

1. 방사선학적 및 육안적 소견

제1군은 술후 3주부터 내번골곡 변형이 시작되었으며 술후 16주에는 평균 38.2°의 굴곡

Fig. 2-1. Gross findings of Group I in post operative 16th weeks. Growth arrest was shown on medial side of proximal tibial growth plate.

Fig. 2-2. Gross findings of Group II in post operative 16th weeks. Normal growth was shown on medial side of proximal tibial growth plate.

Fig. 3-1. X-ray findings of Group I in post operative 16th weeks. Growth arrest of medial side of right proximal tibia and genu varum deformity of right knee was shown.

변형을 나타내었다(Fig. 2-1, 3-1). 제2군에서는 내번 굴곡변형을 나타낸 예는 10마리중 3마리

Fig. 3-2. X-ray findings of Group II in post operative 16th weeks. Normal growth of medial side of right proximal tibia and normal alignment of right knee was shown.

였으며 나머지 7마리는 대조측과 차이없이 정상성장을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-2, 3-2).

Fig. 4-1. Histological findings of Group I in post operative 16th weeks. Bone bridge was formed on medial side of growth plate(H-E staining).

2. 조직학적 소견

제1군에서는 10마리 모두에서 경골 근위부 내측 성장판에 골 가교 형성으로 내측 성장판이 완전 융합된 소견을 나타내었다(Fig. 4-1). 제2군에서는 방사선상 골극 변형을 나타내지 않은 7마리에서는 성장판의 조기폐쇄 소견은 볼 수 없었으며 이식된 연골세포가 거부 반응을 일으키지 않아 생존함을 Safranin O염색을 통하여 증명할 수 있었다(Fig. 4-2). 또한 육안적 및 방사선 소견상 골극변형을 나타낸 3예에서는 손상된 성장판은 골형성으로 완전융합되어 있으며 이식된 연골세포는 성장판내에 있지 않고 경골 근위부 골간단 외측으로 이동되어 생존하고 있음을 관찰할 수 있었다.

고 안

소아의 장관골 골절의 6-15%에서 성장판 손상을 동반하게 되는데 이는 장관골의 길이 성장에 영향을 미치게 된다. 이들 성장판 손상예의 35%에서 골단축 및 골극변형을 초래케 되며 이로 인하여 보행장애 뿐만 아니라 후유증으로 정상인 보다 조기에 퇴행성 관절염을 초래케 된다. 성장판 손상후 성장 장애를 일으키는 기전은 Langenskiold⁶⁾, 이와 문¹⁾은 손상성장판이 연골조직으로 치유되지 않고 골단(epiphysis)과 골간단(metaphysis)에서 자라들어온 골조직으

로 채워져 골성융합이 일어나 성장판의 조기폐쇄가 일어나기 때문으로 알려져있다. 이와같이 성장장애가 나타나면 변형 교정을 위하여 변형된 하지의 절골술(osteotomy) 또는 골연장술(bone lengthening)이나 정상측 하지를 단축시키거나 성장을 억제시키는 수술등이 시행되어 왔으나 정상측의 정상 성장정도를 미리 예측하기 어려워 교정과다(over correction) 및 교정미달(under correction)이 되는 경우가 흔하고 이에 따라 여러번의 수술이 필요하게 되어 문제점이 항상 제기되어 왔다. 이와같은 성장판 손상으로 초래되는 문제점들을 해결하기 위하여 많은 학자들간의 노력이 있었다. 그러나 아직까지 손상된 성장판을 재생시키는 문제는 해결되지 않고 있다.

Campbell⁵⁾과 Nordendoft⁷⁾는 골단과 골간단 사이에 형성된 골 가교가 미세한 경우에는 잔존하는 성장판 연골의 성장력에 의하여 미세한 골 가교가 단절되어 성장장애를 초래하지 못하나 골 가교가 크거나 견고하면, 이로 인하여 조기에 성장판 폐쇄가 유도되어 성장장애가 일어난다. 따라서 Osterman⁹⁾, Bright⁴⁾, Langenskiold⁶⁾, Olin⁸⁾, 등은 성장판이 손상되었을때 손상부에 각종 물질을 삽입하여 골 가교가 형성되지 않도록 하거나 또는 극소화하여, 골성장 장애를 제거시키려 하였으며, 또한 부분적으로 골 가

교가 형성된 경우에는 수술적으로 골 가교를 제거하고 이 부위에 각종 물질을 삽입하여 성장판의 조기 폐쇄를 막아 골 성장을 유도하는 노력도 있었다.

Bright⁴⁾는 개실험에서 대퇴골 원위부 성장판을 파괴시킨후 골 가교 형성을 유도하는 성장판 폐쇄를 초래케한 부위에 다시 수술적으로 골 가교를 제거한 후 silicone rubber를 충전시켜 12주간 관찰한 결과 골 가교의 재형성이 일어나지 않았으며, 더이상 대퇴골 원위부의 골극변형을 초래하지 않았다고 보고하였다.

Simmons¹⁰⁾과 Nunnemacher¹⁰⁾는 골 가교의 형성에 가장 중요한 인자가 골단의 순환이라고 주장하였으며, Nordentoft⁷⁾는 실험을 통하여 골간단 부위의 부분적인 횡절제(transverse resection)를 가하여 골간단에서부터 골단으로 향하는 혈류를 차단시킨 결과 골 가교의 형성이 감소됨을 증명하였다. 위의 실험을 토대로 성장판 손상시 손상부위에 여러가지 물질을 충전시켜 골간단으로부터 골단으로의 혈류를 차단시켜 골가교의 형성을 방지시켜 골 성장억제를 막아 보려는 노력이 여러 사람들에 의하여 시도되었다.

이외에도 성장판 손상으로 인해 폐쇄된 성장판에 유리 자가성장판 연골을 이식하여 단순한 혈류 차단을 위한 역할뿐 아니라 성장판 연골에는 혈관이 없고 또한 신생혈관 형성에 길항하는 인자(antiangiogenesis factor)를 갖고 있어 이식된 성장판이 성장판 연골로서의 기능을 하여 손상된 성장판의 성장장애의 억제뿐 아니라 정상성장을 기대할 수 있다고 한다. 그러나 이식된 유리 성장판이 생존하려면 주변으로부터 영양분인 조직액의 확산(diffusion)이 있어야 연골세포가 생존할 수 있으므로, 이식된 연골 성장판은 얇을수록 그 성장기능을 발휘할 수 있다. 최근에는 미세혈관을 이용한 성장판 연골의 이식이 성공적으로 이루어지는 경우에는 이식 성장판 연골의 영양공급에는 문제가 없어 성장판 손상으로 인한 성장장애를 방지할 수 있는 가장 좋은 방법이라 할 수 있겠으나, 기술적으로 어려운 점이 많아 실용화 되지 못하고 있는 것이 현실정이다. 예를들면 공여부(donor site)의 선택문제로서, 장골골단(ilial apophysis)의 연골을 이용할 수 있다하더라도 결손부에 잘 들어 맞는 크기의 성장판을 만들기 어렵다. 그러므로 실제로 성장판 연골 이식의 성공율은 매우 낮다.

많은 학자들이 성장판의 변연부를 손상시킨

후 이 부위에 gelform, methylmetacrylate, bone wax, free muscle flap, fat등을 충전하여 골극변형의 회복을 관찰한바 그들은 이들 물질의 골성장 장애 억제 효과가 일시적이며 만족스럽지 못하였다고 하였다.

이와같이 성장판의 손상된 부위에 골가교 형성을 방지하기 위한 충전물 삽입술도 그 효과가 한계가 있고 또한 이들 충전물은 성장효과를 기대할수 없으나 손상부위가 적은 경우에는 생존하는 성장판의 계속적인 성장으로 인하여 변형없이 치유될수도 있으나 Bright⁴⁾의 주장은 손상 성장판의 부위가 30%이상인 경우에는 남아있는 성장판에서도 정상성장이 계속될수 없음을 증명하였다. 손상된 성장판에 골가교 형성을 방지하며 또한 정상성장이 일어날수 있는 방법으로 연골세포 이식의 가능성이 있음을 착안하여 저자는 토끼의 늑골 연골세포를 채취하여 2주간 고밀도 배양을 한 후 성장판 손상부위에 동종이식을 시행하였다. 연골세포 이식에 있어서 거부반응에 대한 문제가 대두될수 있는데 Bently와 Greer³⁾는 토끼의 관절연골 결손부위에 자가 성장판 연골 이식을 하여 성장하였음을 보고하면서 면역학적으로 거부반응은 없었다고 하였다.

이들은 면역 반응이 억제되었다는 중요한 관건은 이식편 세포에서 matrix의 형성에 있는데 연골세포가 성장하면 protein polysaccharid matrix가 형성된다. Amadio²⁾등은 bovine성장판 연골을 고밀도 연골세포 배양시에 chondroid matrix가 합성되며 15일간 배양으로 많은 양의 proteoglycan과 type II collagen의 합성됨을 보고하였고, Bently³⁾등은 토끼의 성장판 연골세포를 분리하여 고밀도 배양 10일 후 이들 세포들이 많은 proteoglycan matrix를 합성하며 이들이 면역반응을 방지할 수 있지 않나 하고 주장하고 있다.

본 연구는 특히 동종연골세포 이식이므로 면역반응이 더욱 문제가 되지 않을까 생각하여 고밀도 배양을 한후 이들을 이식하였는데 거부반응을 나타낸 경우는 한예도 없었다. 이들 연골세포는 이식되어 subchondral bone과 incorporate 되기 전에는 무혈성 단계이므로 이때는 조직액으로 만이 생존하게 된다. 그러므로 연골세포 이식에서의 면역반응에 의한 거부 반응은 큰 문제가 되지 않는것으로 사료된다. 본 실험에서 특이하게 발견된 사실은 성장판만 손상시킨 제1군은 10마리 모두에서 손상된 부위에 골가

교형성으로 인한 성장장애로 골극 변형을 나타내었고, 손상된 성장판에 동종연골세포 이식을 한 제2군에서는 10마리중 7마리에서 조직학적으로 이식된 연골세포의 생존이 Safranin O염색으로 증명될수 있었으며 X-선상으로도 성장판의 radiolucent line의 소견은 손상된 성장판 부위에서는 적었지만 X-선상이나 육안적으로 성장장애로 인한 골극 변형은 나타나지 않았다. 나머지 3예에서는 성장판 손상부위에 이식된 연골세포는 조직학적으로 발견될수 없으며 골가교가 형성되어 있고 이식된 연골세포는 주위의 골막 근처에서 생존하고 있음을 관찰할수 있었다. 이 사실은 연골세포 이식시 이들이 성장판 손상부위에 이식되지 못하고 주위로 흘러 나오거나 이식 기술의 문제점으로 정확한 장소에 이식되지 못한것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 배양된 연골세포의 동종이식에서 이식된 연골세포가 생존할수 있으며 또한 matrix를 생산할수 있고 나아가서 이들이 경골의 subchondral bone과 incorporate될수 있음을 확인할수 있었다. 이 방법은 성장판손상의 문제점을 해결할수 있는 좋은 방법의 기초가 될수 있다고 생각된다. 그러나 앞으로 이들 연골 세포의 성장력에 대하여는 더욱더 연구되어 규명되어야 할것이다.

결 론

가토의 경골 근위부 내측 성장판을 인위적으로 손상시킨후 방치한 제 I 군과 손상시킨 부위에 가토의 늑골에서 채취한 연골세포를 배양하여 얻은 연골세포를 동종이식한 제 II 군을 술후 육안적, 방사선학적 및 조직학적 관찰을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제1군은 방사선학적으로 술후 3주에서 골극변형이 시작되었으며 술후 16주에는 평균 38.2도의 골극변형을 나타내었고 조직학적으로는 파괴된 내측 성장판에 골형성으로 완전유합된 소견을 나타내었다.

2. 제2군에서는 육안적 및 방사선학적으로 골극변형을 나타내에는 10예중 3예였으며, 나머지 7예는 정상성장을 관찰할 수 있었고 조직학적으로는 성장판의 조기 폐쇄 소견은 볼수 없었으며 이식된 연골세포가 거부반응을 일으키지 않아 생존함을 Safranin O염색을 통해 증명할 수 있었다.

3. 이식된 연골세포는 손상된 성장판 부위에서 생존할수 있으며 또한 matrix를 생산할 수 있

고 나아가서 경골의 subchondral bone과 incorporate 될수 있음을 확인하였다.

4. 이식된 연골세포의 성장능력에 대하여는 향후 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCE

- 1) 이동식, 문명상: 어린 토끼에서 대퇴골 원위 성장판의 중심성 손상이 대퇴골 및 경골의 성장에 미치는 영향. 가톨릭대학 의학부 논문집. 36:621-628.
- 2) Amadio, P.C., Ehrlich, M.G., Nankin, H.J.: Matrix synthesis in high density cultures of bovine chondrocytes. *Connect Tissues Res.* 11:11-9, 1983.
- 3) Bently, G. and Greer, B.R.: Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature.* 230:385-388, 1971.
- 4) Bright, R.W.: Operative correction of partial epiphyseal plate closure by osseous bridge resection and silicone rubber implant: experimental study in dogs. *J. Bone and Joint Surg.* 56:655-664, 1974.
- 5) Campell, C.T., Grisolia, A. and Zanconato, G.: The effects produced in the cartilagenous epiphyseal plate of immature dogs by experimental surgical trauma. *J. Bone and Joint Surg.* 41A:1221-1242, 1956.
- 6) Langenskiold, A.: Surgical treatment of partial closure of the growth plate. *J. Pediatr Orthop.* 1:3-11, 1981.
- 7) Nordendoft, E.L.: Experimental epiphyseal injuries grading of trauma and attempts at treating traumatic epiphyseal arrest in animal. *Acta Orthop. Scand.* 40:176-192, 1969.
- 8) Olin, A., Creasman, C. and Shapiro, F.: Free physeal transplantation in the rabbit. *J. Bone and Joint Surg.* 66-A:5-20, 1984.
- 9) Osterman, K.: Operative elimination of partial premature epiphyseal closure. An experimental study. *Acta Orthop. Scand(Suppl)* 147:1-000, 1972.
- 10) Simmons, D.J. and Nunnemacher, R.F.: Growth of the rat epiphyseal cartilage plate following partial amputation. *Am. J. Anat.* 117:221-232, 1965.