

## 특발성 척추측만증 환자의 근육 및 혈소판의 수축성 단백질에 관한 연구

서울대학교 의과대학 정형외과학교실

석세일, 김용훈, 이춘기

### — Abstract —

#### **A Study on Contractile Proteins of Muscles and Platelets in Idiopathic Scoliosis Patients**

**Se-Il Suk, M.D., Yong-Hoon Kim, M.D. and Choon-Ki Lee, M.D.**

*Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine,  
Seoul National University*

There have been numerous hypotheses about the pathogenesis of idiopathic scoliosis, but it is still unclear. There are some reports that abnormalities of contractile proteins may play a role in the pathogenesis of idiopathic scoliosis.

The purpose of this report is to study the quantitative abnormalities of contractile proteins in muscles and nonactivated and activated platelets, and to determine whether or not the abnormalities in contractile proteins may play a role in the pathogenesis of idiopathic scoliosis.

The materials were 21 idiopathic scoliosis patients aged from 13 years to 28 years(average 19.2 years) and 20 persons aged from 17 years to 25 years(average 20.1 years) as a control group. The electrophoretic analysis(SDS-PAGE method) was done on platelets both unstimulated and stimulated with thrombin and also on proteins of paraspinal muscles and gluteus maximus of idiopathic scoliosis patient and paraspinal muscles of control group. The results are as follows.

1. The myosin/actin ratios of triton-insoluble fractions to paraspinal muscles in convex sides of main curvatures of scoliosis patients( $1.69 \pm 0.81$ ) were significantly decreased compared to those of concave sides( $2.55 \pm 1.28$ ), gluteus maximus muscles( $2.56 \pm 1.70$ ) and control group( $2.61 \pm 1.01$ ).

2. There were no significant differences between scoliosis group and control group in the

actin/myosin ratios of triton-insoluble fractions of the platelets both nonactivated and activated by thrombin.

In conclusion, abnormalities of contractile protein in paraspinal muscles of convex side may play a role in the pathogenesis of idiopathic scoliosis, rather than abnormalities of systemic contractile protein.

**Key Words** : Idiopathic Scoliosis, Muscle, Platelet, Actin, Myosin

## 서 론

특발성 척추측만증의 발생원인을 규명하기 위해 여러 방향의 연구가 진행되어 왔다. 그 예로 Wynne-Davis<sup>46)</sup>, Filho<sup>16)</sup>, Cowell등<sup>10)</sup>, Riseborough<sup>32)</sup>, Robin과 Cohen<sup>33)</sup>, Czeizel<sup>11)</sup> 등은 유전설을 주장하였으며 Wynne-Davies<sup>47)</sup> 는 다양한 인자에 의하여 유전하며 결체조직의 이상이 한 원인이라고 주장하였다. Bradford등<sup>2)</sup>은 특발성 척추측만증 환자들이 정상인보다 키가 크고 체중이 가벼우며 체형이 앓다고 하여 유전적 요인을 뒷받침하였다. Carter와 Haynes<sup>6)</sup> 는 요골에서 Cook<sup>9)</sup> 등은 대퇴골두에서 각각 골밀도를 조사한 결과 환자군에서 유의하게 떨어져 있어 골조송증이 한 원인이라고 하였다. 그외에도 Binns<sup>1)</sup>는 관절의 비정상적인 이완이, Kawabata<sup>26)</sup>는 성장력이, Yamada등<sup>48)</sup>은 뇌간에서의 체위반사 조절기능의 이상이 원인이라고 주장하였다.

Fidler와 Jowett<sup>15)</sup>은 척추 주만곡 부위의 척부의 multifidus 근육이 요부의 것보다 저속 연속(slow twitch) 근섬유 -제1형 근섬유-가 증가되어 있으나 그 길이는 단축되어 있어 특발성 척추측만증의 원인 국소적인 척추근육의 이상이라고 하였다. Kaplan등<sup>25)</sup>은 척추 근육의 생검검사에서 근육이 집단 위축(grouped atrophy)등의 신경병적인 변화를 보이는 것으로 보아 척추 주만곡 부위의 척부에서 척수 신경근에 의한 병적 변화가 원인이라고 하였다. Bylund등<sup>5)</sup>과 Chiu<sup>7)</sup>도 척추 주만곡부의 척부 근육에서 제1형 근섬유가 상대적으로 증가되어 있으며 신경병적인 변화가 나타나 이것이 원인일 것이라고 하였다. 그러나 Dickson<sup>12)</sup>은 이러한 신경근육적 변화가 원인적인 것이 아니고 부수적인 것이라고 주장하였다.

Ponseti등<sup>31)</sup>은 특발성 척추측만증 환자에서 척추수핵의 당단백(glycosaminoglycan)이 감소되어 있는 것으로 보아 척추 추간판의 점탄력성의 변화가 원인일 수 있다고 하였다.

Francis등<sup>20)</sup>, Vuschell등<sup>3)</sup>, Benn등<sup>45)</sup>은 특발성 척추측만증 환자에서 전신적인 교원단백의 안정도가 떨어져 있어 이것이 원인이라고 추정하였고, Shapiro등<sup>36)</sup>도 교원단백중 alpha 2 chain과 procollagen에 이상이 있다고 하였다. Uden등<sup>42, 43)</sup>은 특발성 및 마비성 척추측만증 환자에서 대조군보다 유의하게 출혈시간이 연장된 것을 보고함으로써 척추측만증의 발병기전에 전신적인 교원단백의 이상이 작용한다고 주장하였다. 이들은 척추측만증 환자에게 교원단백의 혈소판 응고능력과 출혈시간을 측정한 결과 특발성 및 마비성 척추측만증 환자에서는 출혈시간이 증가되어 있었으나 선천성 척추측만증에서는 정상범위였고, 특발성 척추측만증 환자에서 출혈시간은 환자의 연령이나 측만 정도와는 관계가 없다고 하였으며 따라서 교원단백의 이상이 특발성 뿐만 아니라 다른 종류의 척추측만증의 원인으로서는도 중요한 역할을 할 것이라고 하였다.

한편, Yarom등<sup>50, 51)</sup>은 특발성 척추측만증은 근육병변이 원인이라고 주장하였고, 근이영양증 환자 및 척추측만증 환자에서 혈소판의 이상을 보고하였으며 특히 특발성 척추측만증 환자의 골격근 및 혈소판내에 칼슘치가 증가해 있다고 하였다. 혈소판은 근육과 분자 무게 및 크기가 거의 같은 수축성 단백질인 actin과 myosin을 가지고 있으며, 이는 근육의 actin과 myosin과는 달리 척추측만증 변형에 영향을 받지 않으므로 근육의 기본적인 결함을 알아보는 데 좋은 재료가 될 수 있다고 하였다. 그리고 혈소판 및 근육의 단백질 수축에 필수적인 세포내 칼슘치가 특발성 척추측만증 환자에서 증가해 있는데 이

는 수축성 단백질의 이상을 시사한다고 보고하였다.

Floman등<sup>17)</sup>과 Sabato등<sup>34)</sup>은 특발성 척추측만증 환자에서 혈소판 응괴검사를 시행한 결과 아데노신 이인산이나 epinephrine으로 자극하였을 때 혈소판 응괴력에 장애가 있다고 하였고, Peleg등<sup>29, 30)</sup>은 특발성 척추측만증 환자의 혈소판에서의 myosin의 구조적 변화가 있으며 아울러 ATPase 특이적 활동성이 떨어져 있다고 하였다.

한편 Kahmann등<sup>24)</sup>은 특발성 척추측만증 환자에서 혈소판의 형태와 기능에 관한 연구를 한 결과 기능면에서 epinephrine에 대한 응괴 및 분비에 경미한 감소가 있었던 것 이외에는 대조군과 유의한 차이가 없었다고 하였고 석등<sup>40)</sup>의 실험에서도 같은 결과를 보여 이전의 연구결과와 대조적인 결과를 발표하였다. 또한 Enslein과 Chan<sup>3)</sup>은 특발성 척추측만증 환자에서 혈소판의 응괴는 떨어져 있으나 다른 만성적인 정형외과적 질환에서도 나타나고 있어 큰 의미는 없다고 하였다.

이러한 최근의 연구 결과를 볼 때 특발성 척추측만증 환자에서의 근육의 수축성 단백질의 이상 유무를 알기 위한 혈소판의 수축성 단백질의 기능 및 형태에 관한 연구에서는 극히 상이한 연구 결과가 보고되고 있다. 또한 저자의 견해로는 Yarom<sup>50, 51)</sup>등이 주장한 바와 같이 전신적인 수축성 단백질의 이상이 있다면 그 결과가 척추에만 나타나는 점과 특발성 척추측만증 환자의 다양한 형태에 대해서는 해석이 곤란할 것으로 사료된다. 또한 Fidler<sup>15)</sup>등은 척추 철부의 근육이 다른 부위의 근육에 비해 제1형 근섬유가 증가되어 있어 국소적인 근육의 이상이 특발성 척추측만증의 원인이라고 하였으며, Neville과 Harrold<sup>28)</sup>에 의하면 Duchenne 근이영양증 환자에서는 골격근 자체의 단백질의 이상이 있다고 하였고, 아울러 뇌성마비 후유증이나 소아마비 후유증에서는 근육의 약화가 있는 곳에 척추측만증이 나타나고, 석등<sup>40)</sup>의 실험에 의해 가토의 척추 신경의 전근 및 후근 절제술로 척추측만증을 유발할 수 있으며 이를 척추 근육의 약화에 의한 것으로 해석한다면 척추 근육 자체의 어떤 이상이 있을 것으로 생각된다.

## 연구 목적

특발성 척추측만증의 발생원인이 수축성 단백질의

이상 유무에 기인한 것인지를 규명하기 위하여 환자군의 척추의 주만곡부의 요부 및 철부의 부척추근과 정상적인 대둔근의 근육을 채취하고 대조군에서는 부척추근을 채취한 후 이를 정량분석하여 수축성 단백질의 주요 부분인 actin과 myosin의 구성비를 구하였다. 아울러 전신적인 수축성 단백질의 이상유무를 알기 위해 환자군과 대조군에서 정맥혈을 채취하여 혈소판을 분리정제한 후 이들 비활성화 혈소판과 이들을 thrombin으로 활성화시킨 혈소판에서 각각 actin과 myosin을 정량분석한 후 그 구성비를 구하여 특발성 척추측만증 환자와 정상 대조군을 비교하기로 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1) 연구대상

환자군으로는 1990년 1월부터 1991년 4월까지 서울대학교병원 정형외과에서 수술을 시행받은 40° 이상의 만곡을 가진 특발성 척추측만증 환자들중 21명을 대상으로 하였으며, 이들의 주만곡부 측만각은 평균 55.0도 (40-112도)이었고, 남자가 12명, 여자가 9명이었으며, 연령분포는 최소 13세에서 최고 28세로 평균연령은 19.2세였다. 대조군으로는 같은 기간 중 동 병원 정형외과에서 개방적 추간판 제거술을 시행받은 요추 추간판 탈출증 환자 10명과 척추 후방고정술을 시행받은 흉요추골절 환자 2명 및 정상 자원자 8명 등 총 20명을 대상으로 하였으며 남자가 13명 여자가 7명이었고, 연령분포는 최소 17세에서 최고 25세로 평균연령은 20.1세였다. 두 군사이에는 연령 및 성별 분포에서 유의한 차이는 없었다.

### 가) 골격내 수축성 단백질의 분석

환자군의 경우 특발성 척추측만증 환자 14명을 대상으로 하였으며, 이들의 주만곡부 측만각은 평균

**Table 1.** Myosin/actin ratios of skeletal muscles taken from scoliosis group and control group.

Group	Site	Myosin/actin ratio (Mean ± SD)
Scoliosis (n=14)	Paraspinal, convex	1.69 ± 0.81
	Paraspinal, concave	2.55 ± 1.28
	Gluteus maximus	2.56 ± 1.70
Control (n=12)	Paraspinal	2.61 ± 1.01

56.4도 (40-112도)이었고, 남자가 8명, 여자가 6명이었으며, 연령분포는 최소 14세에서 최고 28세로 평균연령은 19.4세였다(Table 1, 2). 대조군은 개방적 추간판 제거술을 시행받은 요추 추간판 탈출증 환자 10명과 척추 후방고정술을 시행받은 흉요추골절 환자 2명 등 총 12명을 대상으로 하였다. 이 중 남자가 9명 여자가 3명이었고, 연령분포는 최소 17세에서 최고 25세로 평균연령은 20.2세였다(Table 3).

#### 나) 혈소판내 수축성 단백질의 분석

환자군의 경우 특발성 척추측만증 환자 15명을 대상으로 하였으며, 이들의 주만곡부 측만각은 평균 52.6도 (40-74도)이었고, 남자가 9명, 여자가 6명

**Table 2.** Statistical significance of myosin/actin ratios by paired t-test within scoliosis group and between scoliosis and control group.

	Site			p-value
Within scoliosis	convex	vs	concave	0.005
	convex	vs	gluteus	0.072
	concave	vs	gluteus	0.977
Between scoliosis & control	convex	vs	control	0.024
	concave	vs	control	0.896
	gluteus	vs	control	0.977

**Table 3.** Comparison of myosin/actin ratios of platelets between scoliosis and control group.

		Scoliosis (n = 15)	Control (n = 11)	p-value
Myosi/actin ratio	Nonactivated	1.11 ± 0.40	1.00 ± 0.45	0.529
	1 min. activated	1.03 ± 0.43	0.84 ± 0.22	0.176
	20 min. activated	1.03 ± 0.38	0.95 ± 0.43	0.628
Actin amount ratio	1 min./ 0 min.	0.932 ± 0.193	0.961 ± 0.079	0.600
	20 min./ 0 min.	0.898 ± 0.217	0.852 ± 0.107	0.484
Myosin amount ratio	1 min./ 0 min.	0.845 ± 0.164	0.861 ± 0.170	0.806
	20 min./ 0 min.	0.835 ± 0.215	0.818 ± 0.160	0.815

**Table 4.** Pearson correlation coefficients (R), R2, and P-values for correlation between myosin/actin ratios of paraspinal muscles taken from the convex sides of scoliosis patients and the suggested causative factors.

	R	R2	p-value
Age	0.455	0.207	0.102
Cobb' s angles of main curve	-0.153	0.023	0.602
Apex of main curve	0.348	0.121	0.223
Duration between onset and biopsy	0.314	0.099	0.274
Duration between biopsy and experiment	-0.333	0.110	0.245

이었으며, 연령분포는 최소 13세에서 최고 24세로 평균연령은 18.7세였다(Table 4). 대조군은 개방적 추간판 제거술을 시행받은 요추 추간판 탈출증 환자 2명과 척추 후방고정술을 시행받은 흉요추골절 환자 1명 및 정상 자원자 8명 등 총 11명을 대상으로 하였다. 이 중 남자가 7명 여자가 4명이었고, 연령분포는 최소 17세에서 최고 23세로 평균연령은 19.8세였다(Table 5).

## 2) 연구방법

### 가) 골격근내 수축성 단백질의 분석

(1) 골격근으로부터 근원섬유(myofibril)의 분리  
Solaro등이 심장 근원 섬유의 분리에 이용한 방법을 인용하였다. 특발성 척추측만증환자의 경우 교정 수술시에 주만곡부위의 양측 부척추근과 골이식시에 대둔근을 각각 1cm×1cm×1cm 씩을 채취하였으며 대조군의 경우 수술부위의 부척추근을 같은 크기로 채취하여 즉시 생리적 식염수로 세척한 후 Sorvall Omnimixer에서 작은 조각으로 잘랐다. 작은 조각의 근육은 4배 용적의 용액(10mM imidazole, pH 7.0, 0.3M sucrose 용액)을 넣고 균등화하였다. 이 균등질(homogenate) 17300g에서 20분간 원심분리하였다. 잘게 잘린 근육조각(pel-

lets)을 원래의 균등질의 용적과 동량의 표준완충액(60mM 염화칼륨, 30mM imidazole, pH 7.0 2mM 염화마그네슘)으로 부유시켰다. 이 부유액을 다시 균등화하고난 후, 750g에서 15분간 원심분리하였다. 다시 근육조각을 부유시키고, 균등화한후 원심분리하는 조작을 동일하게 4번 반복하였다. 이때 얻어진 밝은 갈색의 균등질이 근원섬유이다.

#### (2) 근원섬유의 정제

근원섬유를 2mM enthyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA)를 포함하는 표준완충액에 부유시킨 후 750g 에서 15분간 원심분리하였다. 이 근원섬유를 8배 용적의 1% Triton X-100(이하 TX-100으로 칭한다)을 포함하는 표준완충액으로 부유시켰다. 이 부유액을 균등화한 후 750g 에서 15분간 원심분리하였다. TX-100 처리를 동일하게 한번 더 반복한 후, 근육조각을 8배용적의 표준완충액으로 4회 세척하였다. 정제된 근원섬유는 10-15mg/ml의 농도로 표준 완충액에 부유시켰다.

#### (3) 젤 전기영동 분석(Gel electrophoretic analysis)

위에서 얻은 근원섬유를 10% acrylamide resolving gel과 4% acrylamide stacking gel을 사용하여 Laemmli 방법에 따라 SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyamide gel electrophoresis)를 시행한 후 Coomassie brilliant blue로 염색하였다. Digital autoradiographic syste(Amersham Co.)을 이용하여 각성분의 농도를 구한 후 단백질의 상대적인 양을 결정하였다. 이때 세 환자의 세가지 근육과 대조군의 한가지 근육, 총 10가지 근원섬유를 한 판에서 실험하였다.

결과의 분석은 actin과 myosin의 상대적 비를 구하여 비교하기로 하였는 바, 아직 actin과 myosin의 상대적 비를 구함으로써 근육이나 혈소판의 기능을 판별한 실험례는 보고된 바가 없고 또한 그 정상 범위에 대해서도 아직 밝혀진 것은 없으나, 이는 실험 과정에서 비뚤림을 최대한 방지하면서 정확한 실험치를 얻기 위함이었다.

### 나) 혈소판내 수축성 단백질의 분석

#### (1) 혈소판의 분리

환자 및 대조군으로부터 정맥혈을 얻어 ACD 용

액(85mM sodium citrate, 111mM 포도당, 71mM citric acid)과 5:1의 용적비로 혼합하였다. 이 혼합액을 160g 에서 20분간 원심분리하여 플라 스틱 피펫을 이용하여 연막(buffy coat)이 섞이지 않도록 조심하여 혈소판 풍부혈장을 분리하였다. 이 혈소판 풍부혈장을 730g 에서 10분간 원심분리하여 혈소판을 얻은 후, 0.12M 염화나트륨, 13mM trisodium citrate, 30mM 포도당, pH 7.0을 포함하는 용액을 원래의 혈장과 같은 용적을 취하여 혈소판을 부유시켰다. 이 부유액을 730g에서 10분간 원심분리하여 혈소판을 얻었다. 이 과정을 한번 더 반복한 후 혈소판을 154mM 염화나트륨, 10mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 7.4를 포함하는 용액으로 세척하였다. 마지막으로 얻은 혈소판을 138mM 염화나트륨, 2.9mM 염화칼륨, 12mM 이탄산나트륨, 0.36mM 인산나트륨, 5.5mM 포도당, 1mM EDTA, pH 7.4 를 포함하는 용액에 혈소판의 농도가  $5 \times 10^8$ /ml가 되도록 부유시켰다.

#### (2) 혈소판내 단백질의 분리

혈소판 부유액을 0.1 unit/ml의 thrombin으로 실온에서 각각 1분, 20분씩 활성화시켰다. 세척된 혈소판과 thrombin으로 활성화한 부유액에 동일용적의 TX-100(2% Triton X-100(Sigma), 10mM EGTA, 0.1M Tris, pH 7.4, 0.2NIH unit/ml hirudin)으로 5분간 처리하였다. TX-100 에 불용성인 분획을 8,730g 에서 4분간 원심분리하여 2%(v/v) 2-mercaptoethanol을 포함하는 2%(w/v) SDS(sodium dodecylsulfate) 용액과 혼합하여 100°C 에서 10분간 항온배양하여 완전히 용해시켰다.

#### (3) 젤 전기영동 분석 (Gel electrophoretic analysis)

위에서 얻은 세척된 혈소판과 각각 1분, 20분씩 thrombin으로 활성화시킨 혈소판에서 얻은 Coomassie brilliant blue로 염색하여 digital autoradio-graphic system(Amersham Co.)을 이용하여 세명에서 각각 비활성화, 1분간 활성화, 20분간 활성화된 혈소판, 총 9가지를 한 판에서 실험하였다.

- 1 : paraspinal muscle of convex side in scoliosis patient
- 2 : paraspinal muscle of concave side in scoliosis patient
- 3 : gluteus maximus muscle in scoliosis patient
- 4 : paraspinal muscle in control group

**Fig. 1.** An illustration of electrophoreiss of tritoninsoluble fraction of proteins in skeletal muscles (ACT : actin, MYO : myosin)

- 1 : nonactivated in scoliosis patient
- 2 : 1 min. activated in scoliosis patient
- 3 : 20 min. activated in scoliosis patient
- 4 : nonactivated in control group
- 5 : 1 min. activated in control group
- 6 : 20 min. activated in control group

**Fig. 2.** An illustration of electrophoreiss of tritoninsoluble fraction of proteins in platelets (ABT : actin binding protein, ACT : actin, MYO : myosin).

## 연구 성적

### 1) 환자군과 대조군간의 근육내 myosin/actin 비의 비교

척추측만증환자 14명과 대조군 12명으로부터 얻은 근육으로부터 분리한 근원섬유에 전기영동을 시행하여 Coomassie brilliant blue로 염색한후 myosin과 actin의 농도를 구하였다(Fig. 1). 이때 염색과정에서 각각의 판(plate)에 따라 염색의 정도가 달라져, 여러개의 판에서 구한 myosin과 actin의 양을 직접 비교한다는 것은 의미가 없었다. 그러나 같은 환자의 myosin과 actin은 같은 판에서 측정하였기 때문에 이 두 단백질의 양의 비를 구함으로써 근육내 주요 수축성 단백질의 구성을 추정하기로 하고, 환자군의 각 부위(주만곡의 요부와 척부 및 대둔근)의 근육과 대조군의 부척추근의 myosin/actin 비를 얻었다(Table 1). 환자군의 척추 주만곡 부위의 척부 부척추근의 myosin/actin 비는  $1.69 \pm 0.81$ , 요부 부척추근에서는  $2.55 \pm 1.28$ , 대둔근에서는  $2.56 \pm 1.70$  이었고 대조군의 부척추근은  $2.61 \pm 1.01$  이었다.

환자군내에서는 각 부위별 myosin/actin 비를 paired t-test로 비교하였는바 주만곡의 척부의

myosin/actin 비가 다른부위에 비하여 의미있게 감소되어 있었다( $p < 0.01$ ). 또한 환자군의 각 부위와 대조군의 myosin/actin 비를 paired t-test로 비교한 결과 역시 환자군의 주만곡의 척부에서 myosin/actin 비가 의미있게 감소되어 있었다( $p < 0.05$ ). 따라서 척추측만증 환자의 주만곡의 척부는 다른부위나 대조군에 비하여 myosin/actin 비가 의미있게 감소되어 있음을 알 수 있었다(Table 2).

### 2) 환자군과 대조군간의 혈소판내 myosin/actin 비의 비교

척추측만증 환자 15명과 대조군 11명으로부터 얻은 정맥혈내의 비활성 혈소판과 0.1 unit/ml의 thrombin으로 각각 1분, 20분씩 활성화시킨 혈소판에서 Triton 불용성 분획을 분리, 정제한 후 단백을 전기영동하여 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 myosin과 actin의 농도를 구하였다(Fig. 2). 환자군과 대조군에서 비활성 혈소판의 myosin/actin 비는  $1.11 \pm 0.40$  과  $1.00 \pm 0.45$  이었고, 1분간 활성화시킨 혈소판에서는  $1.03 \pm 0.43$ 과  $0.84 \pm 0.22$ 이었으며 20분간 활성화시킨 혈소판에서는  $1.03 \pm 0.38$ 과  $0.95 \pm 0.43$  이었다. 이들을 independent t-test로 비교한 결과 두 군사이에는 유

의한 차이가 없었다(Table 3). 따라서 척추측만증 환자의 혈소판내의 주요 수축성 단백질 Triton 불용성 분획의 myosin/actin 비는 비활성상태나 활성화 상태 모두에서 대조군과 차이가 없음을 알 수 있었다.

### 3) Thrombin 활성화 과정중 혈소판내 수축성 단백질의 변화에 대한 환자군과 대조군간의 비교

척추측만증 환자 15명과 대조군 11명으로부터 얻은 정맥혈내의 비활성 혈소판과 0.1unit/ml의 thrombin으로 각각 1분, 20분씩 활성화시킨 혈소판에서 Triton 불용성분획을 분리, 정제한 후 단백을 전기영동하여 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 myosin과 actin의 농도를 구하였다. 환자군과 대조군에서 수축성 단백질(myosin과 actin)의 비활성상태에서의 비율과 활성화상태에서의 비율을 비교함으로써 thrombin으로 활성화시키는 과정중의 Triton 불용성 수축성 단백질의 양적변화를 보고자 하였다.

환자군과 대조군에서 혈소판 활성화에 의한 actin 및 myosin의 양적변화, 즉 비 활성화 혈소판내의 수축성 단백질의 양에 대한 활성화 혈소판내의 수축성 단백질의 양의 비를 구하고 이에 대해 p-value를 구한 결과 두가지 수축성 단백질 모두 1분 또는 20분간 활성화한 경우 환자군과 대조군간에 유의한 차이가 없음을 보여주고 있다(Table 3). 따라서 척추측만증 환자의 혈소판의 활성화 과정 중 혈소판내 주요 수축성 단백질 중 Triton 불용성 분획의 양적변화는 대조군과 차이가 없음을 알 수 있었다.

## 고 찰

척추측만증의 원인으로는 마비성, 선천성 등 일부 알려진 것도 있으나, 상당수에서 원인을 알 수 없어서 특발성으로 분류하고 있다. 특발성 척추측만증의 원인 및 병인에 대해서는 여러 방향에서의 연구가 진행되어 왔으나, 아직 그 원인 및 병인에 대해서는 확실한 정설이 없다. 이에 저자는 특발성 척추측만증의 한 원인으로 대두되고 있는 수축성 단백질의 이상여부를 규명하여 보기로 하였다.

우선 전신적인 수축성 단백질의 이상을 알기 위하여는 근육내의 수축성 단백질과 그 크기와 성분이 비슷하고 채취가 간편하여 대체적인 실험방법으로 많이

이용되고 있는 혈소판내의 수축성 단백을 분석하기로 하였다. 또한 특발성 척추측만증의 원인이 국소적인 근육내의 이상에 기인하는 것인가를 알기 위하여 환자군 및 대조군에서 근육을 채취하여 수축성 단백을 분석하기로 하였다.

혈소판내의 수축성 단백을 분리 정제하는 방법에 대해서는 Yarom등<sup>49)</sup>과 Peleg등<sup>29)</sup>을 포함한 많은 저자들의 발표가 있어서 이를 따라 실행하는 데는 어려움이 없었으나 근육내의 수축성 단백을 분리 정제하는 방법은 아직 골격근에 대한 실험레가 없어서 Solaro등<sup>39)</sup>이 심근(cardiac muscle)에서 근원섬유를 추출하는 방법을 원용하기로 하였다. Solaro등은 심근원섬유(cardiac myofibril)를 1 % Triton X-100으로 처리하여 추출함으로써 사립체(mitochondria), 근초(sarcolemma) 및 근장망(sarcoplasmic reticulum)의 막에서의 오염을 방지할 수 있으며 또한 Triton X-100으로 처리하였을 때 수축성 단백질은 영향을 받지 않으므로 믿을만한 방법이라고 하였다.

수축성 단백을 정제한 후 이를 SDS-PAGE법으로 전기영동한 후 각 성분의 함량을 보기 위하여 Coomassie brilliant blue로 염색하여 이를 digital autoradiographic system으로 측정하였는 바, 이 과정에서의 문제점으로 각 판마다의 염색 정도에 따라 그 수치가 다르게 나온다는 것이었다. 이를 해소하기 위해 한 환자에 대한 것은 모두 한 판에서 실험하고 그 절대치를 비교하기 보다는 수축성 단백질의 주요 성분인 myosin과 actin의 성분비를 구함으로써 실험에서의 비뚤림을 방지하고자 하였다. 대조군은 환자군과 성별 및 연령에서 유사한 대상을 선택함으로써 성별 및 연령 증가에 따른 자연적인 변화에 대한 비뚤림을 방지하고자 하였다.

혈소판은 근세포와 구조적으로 매우 유사한 수축성 단백질인 myosin과 actin을 다량 함유하고 있으며 이 수축성 단백질은 특히 응고된 혈소판의 압축과 섬유소 혈병수축에 중요한 역할을 하고 있다(Cohen 등<sup>8)</sup>, van Deurs and Behnke<sup>44)</sup>. Actin은 혈소판 내에서 가장 양이 많은 단백질로 총단백질양중 약15%를 차지하고 있으며, 비활성 혈소판내의 총 actin량의 40%가 중합체(polymer)인 필라멘트형으로 존재하게 되며 이 필라멘트는 느슨한 망상구조를 형성하여 활성 혈소판의 세포막하에 위치하게 된다. 혈

소판이 활성화되면 수축성 단백질에 급속한 변화가 오게 된다. Thrombin으로 활성화할 경우 수초내에 중합체형의 actin인 필라멘트형의 actin양이 증가하기 시작하여 약 15초 후에는 총 actin양중 70-80%가 필라멘트형으로 존재하게 되며 약 20초 후에는 필라멘트형 actin양이 고평부에 도달하게 된다. 이러한 actin 단성체의 중합반응은 actin결합 단백질(actin-binding protein) 등의 단백질을 핵으로 하여 이루어진다. 이 활성화 단백질내의 actin 필라멘트는 이제서 견고한 망상구조를 형성하여 세포내과립 주위에 견고한 환을 형성하여 과립내 함유물의 부비과정에 관여하게 되며 actin 필라멘트의 속(bundle)이 filopodia내에 형성되어 섬유소 혈병 수축에 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 혈소판의 활성화과정에서 actin결합 단백질과 myosin은 actin 필라멘트의 구조적 변화를 유도하게 되는 바 actin결합 단백질은 actin 필라멘트간의 교차결합을 유도하게 된다. Myosin은 혈소판내 총단백질의 1-2%를 차지하고 있으며 이는 골격근내의 myosin에 비하여 상대적으로 적은 양이다. 혈소판이 활성화되면 myosin은 급속히 인산화되어 actin 필라멘트와 결합하여 세포내과립의 분비작용에 필요한 수축반응을 일으키게 된다.

본 논문에서 혈소판의 검사에 이용한 실험은 비활성 혈소판 또는 thrombin으로 활성화한 혈소판내의 Triton 불용성인 필라멘트형의 단백질들을 분리하여 그 양을 검사함으로써 혈소판내의 수축성 단백질들을 검사하기 위한 것이다. 이 방법은 혈소판의 활성화과정에서 actin 필라멘트와 결합하게 되는 수축성 단백질들, 즉 actin결합 단백질과 myosin의 양을 측정하는데 유용한 방법이다(Feinstein등<sup>14</sup>, Jennings 등<sup>22</sup>). 비활성 혈소판 내의 Triton 불용성 단백질은 다량의 actin과 소량의 actin결합 단백질, myosin, 그리고 아직까지 그 정체가 확인되지 않은 분자량 31000의 단백질로 이루어져있다. Thrombin으로 혈소판을 활성화하면 Triton 불용성 actin의 양은 점차 증가하게 되는데 이는 DNase I inhibition assay(Fox and Phillips<sup>18</sup>)에서 측정할 수 있는 actin의 중합반응과 일치한다. Triton 불용성 actin결합 단백질과 myosin역시 혈소판의 활성화과정에서 그 양이 증가하게 된다. Actin결합 단백질의 경우 비활성 혈소판에서는 총량의 5%가, 활성화 혈소판

혈소판에서는 25%가 Triton 불용성이고 myosin의 경우 비활성 혈소판에서는 총량의 40%가 Triton 불용성이다가 활성화후 30-60초만에 거의 100% Triton 불용성으로 변화하게 되며 차차 Triton 불용성형의 양이 감소하여 60%까지 감소하게 된다. 본 실험에서 비활성화 혈소판에서의 myosin/actin 비가 Fox의 보고에 비해 많이 나타난 것도 혈소판 처리과정에서 혈소판이 일부 활성화된 것에 기인하는 것으로 사료된다. Actin결합 단백질이나 myosin 모두 그 자체가 Triton 불용성이지는 않으나 actin과 결합함으로써 Triton 불용성으로 변화하게 되다(Fox와 Phillips<sup>18</sup>). 따라서 본 실험에서 측정하게 되는 actin의 양은 활성화되어 중합체를 형성한 actin의 양이며 또한 myosin의 양은 활성화되어 actin과 결합한 myosin의 양이다. 따라서 환자군과 대조군에서 thrombin으로 활성화시킨 혈소판내의 actin과 myosin의 양을 비교함으로써 혈소판의 활성화과정에서의 각 단백질의 활동성을 확인할 수 있는 것이다.

본 실험에서 정상으로 간주된 환자군의 척추의 요부 및 대둔근과 대조군의 부척추근에서의 myosin/actin 비는 평균 2.55-2.61:1로 이는 Maruyama가 가토의 골격근 실험에서 보고한 myosin 58mg/g:actin 20mg/g 과 유사한 소견을 보여 본 실험의 신빙도를 높여주었다.

전신적인 수축성 단백질의 이상을 알기 위해 혈소판내의 myosin과 actin의 구성비를 구한 결과 환자군과 대조군 사이에 유의할만한 차이가 없었으며 또한 혈소판의 활성화 과정중의 수축성 단백질의 변화가 있는가를 보기위해 thrombin으로 활성화시킨 후 각각 1분과 20분 후의 myosin과 actin의 구성비를 구한 결과에서도 환자군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다. 비록 이것이 Yarom등이나 Peleg등이 제시한 기능적 차이에 대한 절대적인 반증이 될 수는 없으나 이들의 실험에 나타난 사소한 기능적 차이가 특발성 척추측만증을 유발할 수 있을 정도인가에 대해 의문을 갖게하며 아울러 전신적인 수축성 단백질의 이상으로 인해 특발성 척추측만증이 유발된다면 이러한 병변이 척추에서만 국한되어서 나타나는 점과 척추에서도 다양한 발현 연령과 발현 부위에 대해서는 설명이 불가능해진다. 또한 Kahmann 등<sup>24</sup>과 석돈<sup>40</sup>에 의하면 두 군사이에 기능적인 면에



유의한 차이가 없다고 하여 저자들의 견해와 일치하는 면을 보였다.

국소적인 수축성 단백질의 이상을 알기 위한 근육에서의 myosin과 actin의 구성비를 구하는 실험에서는 환자군의 주만곡부의 철부에서만 myosin/actin 비가 유의하게 감소되어 있었다. 이에 완전한 의미를 부여하기 위하여는 Yarom등이 지적한 바와 같이 이러한 변화가 특발성 척추측만증의 원인이 아니고 결과일 수도 있으므로 이에 대한 반증이 필요할 것이다. 척추측만증 환자의 주만곡부의 철부에서 myosin/actin 비가 감소한 것이 위양성이 아닌가를 확인하기 위하여 저자는 환자의 성별 및 연령, 주만곡의 Cobb각, 근육 채취부위(주만곡 부위)의 척추상의 레벨, 증상의 발견 후 수술 및 근육생검까지의 기간, 수술 후 실제 실험까지의 기간에 따른 myosin/actin 비를 분석하여 보았다(Table 4). 환자의 성별은 myosin/actin비에 영향을 주지 않고 있었으며(p-value 0.925), 환자의 연령, 주만곡의 Cobb각 및 근육채취부위(주만곡의 첨부:apex)의 척추상의 레벨등의 상관계수(Pearson correlation coefficient)를 구한 결과 이들은 myosin/actin 비에 영향을 주지 않고 있어(각각 p-value 0.102, 0.602, 0.223) 이들에 의한 위양성은 아님을 알 수 있었다(Table 4). 즉 이 변화가 연령에 따른 자연적인 변화 또는 척추측만증의 변형이 심할수록 나타나는 것은 아니라고 할 수 있다. 만일 증상의 발견 후 수술까지의 기간이 갈수록 myosin/actin 비가 감소한다면 myosin/actin 비의 감소는 측만증의 원인이기 보다는 결과일 가능성이 클 것이다. 그러나 증상의 발견 후 수술까지의 기간도 myosin/actin비에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(p-value 0.274; Table 4). 수술 후 실제 실험까지는 채취한 근육을 영하 80°C의 냉동상태로 보관하였는 바 만약 이 기간이 길수록 myosin/actin 비의 감소가 심하다면 냉동보관 과정중의 근육의 변성이 myosin/actin 비의 감소의 원인일 가능성이 클 것이다. 그러나 이 기간 또한 myosin/actin 비에는 별 영향을 주지 못하였다(p-value 0.245; Table 4). 따라서 이상의 검토가 가능한 모든 요인을 비교하였는 바 특발성 척추측만증 환자의 철부 부척추근에서만 myosin/actin 비가 의미있게 감소된 것은 이러한 변화가 척추변형의 결과일 가능성을 어느정도 배제하고 있다. 물론

이상의 검토 가능한 요인외의 다른 요인에 의할 수도 있어 완전한 배제는 불가능하나 이상의 결과를 볼 때 이러한 변화는 특발성 척추측만증의 결과이기 보다는 그 원인일 가능성이 많다. 또한 Jokl과 Konstadt<sup>23)</sup>에 의하면 가토를 이용한 실험에서 골격근이 이완되거나 정상인 상태로 고정하였을 때는 대조군과는 차이가 없고 오히려 골격근을 수축하여 고정하였을 때 근육의 기능이나 단백질의 성분에 변화가 온다고 하여 장기간 이완 상태, 즉 척추측만증의 주만곡 부의 철부에는 이차적 변화가 없을 것을 시사하였다. 또한 Fidler등<sup>15)</sup>이 보고한 철부 부척추근의 제1형 근섬유가 증가된 것과 연관을 찾기 위해서는 제1형 근섬유와 기타 근섬유간의 myosin과 actin의 구성비에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 수축성 단백질의 이상이 특발성 척추측만증의 발생 원인이 될 수 있으나, Yarom등<sup>5)</sup>이 주장한 전신적인 수축성 단백질의 이상이기 보다는 척추 주만골 부위의 철부의 부척추근의 이상에 기인하는 것으로 사료된다. 즉, 부척추근의 이상이 그 부위의 근련의 약화를 초래하여 정상적인 힘을 갖고 있는 반대편-요부-이 수축되고 이에 따라 철부가 이완됨으로써 척추측만증이 발생된다는 것이다. 이를 뒷받침하는 소견으로는 소아마비 후유증등의 마비성 척추측만증에서는 척추의 철부의 근력약화가 그 원인이 된다는 점과 아울러 기존적으로 동물에서 척추측만증을 유발시키는 실험들중 결과적으로 철부의 근력약화를 초래하는 실험에서 성공하는 경우가 많은 것을 들 수 있다. 그 예로 Silva<sup>38)</sup>는 원숭이에서 늑간 신경, 늑횡 인대, 척추 기립근등을 절제하여 실험적 척추측만증을 만들었으며 석등<sup>41)</sup>은 가토에서 전근 및 후근 절제술로 전례에서 척추측만증을 만들었다. 이상의 가설이 사실일 경우 척추의 부척추근에서만 이상이 나타나며 척추내에서도 여러가지 형태로 나타나는 것에 대해서는 확실한 결론을 내릴 수는 없으나 아마도 다른 저자들이 제시한 유전적 인자나 기타 다양한 요인에 의할 것으로 생각된다.

## 총괄 및 결론

특발성 척추측만증 환자에서 수축성 단백질의 이상 유무와 이것이 전신적인 것인지 국소적인 것인지를 확인하기 위하여, 특발성 척추측만증 환자군과 정상 대조군의 근육과 비활성 혈소판 및 thrombin으로 활성화시킨 혈소판에서 수축성 단백을 분리정제하여 이를 정량분석한 후 myosin과 actin의 구성비를 구함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 척추측만증 환자의 주만곡의 철부의 부척추근은 같은 환자의 주만곡의 요부나 대둔근 및 대조군의 부척추근에 비하여 myosin/actin 비가 의미있게 감소되어 있었다.

2. 척추측만증 환자의 혈소판내의 주요 수축성 단백질 중 myosin과 actin의 구성비는 비활성상태나 활성화상태 모두에서 대조군과 차이가 없었다.

이는 특발성 척추측만증의 발병기전이 전신적인 수축성 단백질의 이상이기보다는 국소적인 척추 주만곡 부위의 철부 근육의 이상에 기인할 것이라는 점을 시사하고 있다. 그러나 이것이 다른 요인에 의한 위양성일 가능성이 있어 이에 대한 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Binns, M. : *Joint laxity in idiopathic adolescent scoliosis*. *J. Bone and Joint Surg.*, 70-B : 420-422, 1988.
- 2) Bradford, D.S., Noreen, H., Hallgren, H.M. et al : *Histocompatibility determinants in idiopathic scoliosis*. *Clin. Orthop.*, 123 : 261-265, 1977.
- 3) Bushell, G.R., Ghosh, P., Taylor, T.K.F., et al : *The collagen of the intervertebral disc in adolescent idiopathic scoliosis*. *J. Bone and Joint Surg.*, 61-B : 501-508, 1979.
- 4) Bushell, G.R., Ghosh, P., Taylor, T.K.F. : *Collagen defect in idiopathic scoliosis*. *Lancet*, ii : 94-95, 1978.
- 5) Bylund, P., Jansson, E., Dahlberg, E. et al : *Muscle fiber types in thoracic erector spinae muscles. Fiber types in idiopathic and other*

- forms of scoliosis*. *Clin. Orthop.*, 214 : 222-228, 1987.
- 6) Carter, O.D., Haynes, S.G. : *Prevalence rates for scoliosis in US adults; results from the first National Health and Nutrition Examination Survey*. *Int. J. Epidemiol.*, 16:537-544, 1987.
- 7) Chiu, J.C. : *Morphologic studies on the erector spinae muscle in sixty consecutive scoliotic patients*. *Nippon Sei. Ga. Zass.*, 62 : 1163-1175, 1988.
- 8) Cohen, I., Gerrard, J.M., White, J.G. : *Ultrastructure of clots during isometric contraction*. *J. Cell Biol.*, 93 : 775-787, 1982.
- 9) Cook, S.D., Harding, A.F., Morgan, E.L. et al : *Trabecular bone mineral density in idiopathic scoliosis*. *J. Pediatr. Orthop.*, 7 : 168-174, 1987.
- 10) Cowell, H.R., MacEwen, G.D. : *Familial Incidence of idiopathic scoliosis*. *J. Bone and Joint Surg.*, 54-B : 765, 1972.
- 11) Czeizel, A., Bellyei, A., Barta, O. et al : *Genetics of adolescent idiopathic scoliosis*. *J. Medical Genet.*, 15 : 424-427, 1978.
- 12) Dickson, R.A. : *The etiology of spinal deformities*. *Lancet*, 1(8595) : 1151-1155, 1988.
- 13) Enslein, K., Chan, D.P. : *Multiparameter pilot study of adolescent idiopathic scoliosis*. *Spine*, 12 : 978-982, 1987.
- 14) Feinstein, M.B., Egan, J.J., Opas, E.E. : *Reversal of thrombin-induced myosin phosphorylation and the assembly of cytoskeletal structures in platelets by the adenylate cyclase stimulants prostaglandin D2 and forskolin*. *J. Biol. Chem.*, 258 : 1260-1267, 1983.
- 15) Fidler, M.W., Jowett, R.I. : *Muscle Imbalance In the etiology of scoliosis*. *J. Bone and joint Surg.*, 58-B : 200-201, 1976.
- 16) Filho, N.A., Thompson, M. : *Genetic studies in scoliosis*. *J. Bone and Joint Surg.*, 53-A199, 1971.
- 17) Floman, Y., Liebergall, M., Robin, C.C. et al : *Abnormalities of aggregation, thromboxane A2 production, and 14C serotonin release in platelets with idiopathic scoliosis*. *Spine*, 8 : 236-241, 1983.

- 18) Fox, J.E.B., Phillips, D.R. : *Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets.* *J. Biol. Chem.*, 257 : 4120-4126, 1982.
- 19) Fox, J.E.B. : *Platelet contractile proteins.* *Biochemistry of platelets, Orlando, Academic Press*, 115-157, 1986.
- 20) Francis, M.J.O., Sanderson, M.C., Smith, R. : *Skin collagen in idiopathic adolescent scoliosis and Marfan's syndrome.* *Clin. Sci. Mol. Med.*, 51 : 467-474, 1976.
- 21) Francis, M.J.O., Smith, R., Sanderson, M.C. : *Collagen abnormalities in idiopathic adolescent scoliosis.* *Calcif. Tissue. Res.*, 22 (Suppl) ; 381-384, 1977.
- 22) Jennings, L.K., Fox, J.E.B., Edwards, H.H. et al : *Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation.* *J. Biol. Chem.*, 256 : 6927-6932, 1981.
- 23) Jokl, P., Konstadt, S. : *The effect of limb immobilization on muscle function and protein composition.* *Clin. Orthop.*, 174 : 222-229, 1983.
- 24) Kahmann, R.D., Rao, G.H., White, J.G. et al : *Platelet Function in adolescent idiopathic scoliosis.* *Scoliosis*, #52, 1988.
- 25) Kaplan, P.E., Sahgal, B., Hughes, R. et al : *Neuropathy in thoracic scoliosis.* *Acta Orthop. Scand.*, 51 : 263-266, 1980.
- 26) Kawabata, H., Ono, K., Seguchi, Y. et al : *Idiopathic scoliosis and growth - a biomechanical consideration.* *Nippon Sei. Ga. Zasshi*, 62 : 161-170, 1988.
- 27) Maruyama, K. : *Regulatory Proteins, Contractile proteins and muscle.* Edited by K. Laki, New York, Marcel Dekker, 289-310, 1971.
- 28) Neville, H.E., Harrold, S. : *Muscles & Nerve. Protein degradation in cultured skeletal muscle from Duchenne muscular dystrophy patients.* 8 : 253-257, 1985.
- 29) Peleg, I., Eldor, A., Kahane, I. et al : *Altered structural and functional properties of myosins, from platelets of idiopathic scoliosis patients.* *J. Orthop. Res.*, 7 : 260-265, 1989.
- 30) Peleg, I., Kahane, I., Eldor, A. et al : *Structural Properties of myosin from the particulate fraction of human blood platelets.* *J. Biol. Chem.*, 258 : 9290-9295, 1983.
- 31) Ponseti, I.B., Pedrini, V., Wynnes-Davies, R. et al : *Pathogenesis of scoliosis.* *Clin. Orthop.*, 120-268-280, 1976.
- 32) Riseborough, E., Wynne-Davies, R. : *A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts.* *J. Bone and Joint Surg.*, 55-A : 974-982, 1973.
- 33) Robin, G.C., Cohen, T. : *Familial scoliosis.* *J. Bone and Joint Surg.*, 57-B : 146-147, 1973.
- 34) Sabato, S., Rotman, A., Robin, G.C. et al : *Platelet aggregation abnormalities in idiopathic scoliosis.* *J. Pediatr. Orthop.*, 558-563, 1985.
- 35) Sahlstrand, T. : *Equilibrium factors in adolescent idiopathic scoliosis.* Thesis, University of Gothenburg, 1977.
- 36) Shapiro, J.R., Burn, V.E., Chipman, S.D. et al : *Osteoporosis and familial idiopathic scoliosis : association with an abnormal alpha 2(I) collagen.* *Connect Tissue Res.*, 21 : 117-123, 1989.
- 37) Shohat, M., Shohat, J., Nitzan, M. et al : *Growth and ethnicity in scoliosis.* *Acta Orthop. Scand.*, 59 : 310-313, 1988.
- 38) Silva, J.F. : *Experimental scoliosis in monkeys.* IN *proceedings of the eleventh congress of SICOT.* Imprimerie des sciences, Brussels, 305, 1969.
- 39) Solaro, R.J., Pang, D.C., Briggs, F.N. : *The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100.* *Biochem. Biophys. Acta*, 245 : 259-262, 1971.
- 40) Suk, S.I., Kim, I.K., Lee, C.K. : *Study of platelet function in idiopathic scoliosis.* Ph. D. paper in Seoul Nat'l Univ. 1989.
- 41) Suk, S.I., Song, H.S., Lee, C.K. : *Scoliosis induced by anterior and posterior rhizotomy.* *Spine*, 14 : 692-697, 1989.
- 42) Uden, A., Nilsson, I.M., Willner, S. : *Collagen - induced platelet aggregation and bleeding time in adolescent idiopathic scoliosis.* *Acta Orthop. Scand.*, 51 : 773-777, 1980.
- 43) Uden, A., Nilsson, I.M., Willner, S. : *Bleeding time and scoliosis.* *Acta Orthop. Scand.*, 53 : 73-

77, 1982.

- 44) Van Deurs, B., Behnke, O. : *Membrane structure of nonactivated and activated human blood platelets as revealed by freeze-fracture : Evidence for particle redistribution during platelet contraction.* *J. Cell Biol.* , 87 : 209-218, 1980.
- 45) Venn, G., Mehta, M.H., Mason, R.M. : *Solubility of spinal ligament collagen in idiopathic and secondary scoliosis.* *Clin. Orthop.* , 177 : 294-301, 1983.
- 46) Wynne-Davies, R. : *Familial idiopathic scoliosis.* *J. Bone and Joint Surg.* , 50-B : 24-30, 1968.
- 47) Wynne-Davies, R. : *Infantile idiopathic scoliosis.* *J. Bone and Joint Surg.* , 57-B : 138-141, 1975.
- 48) Yamada, K., Yamamoto, H., Nakagawa, Y. et al : *Etiology of idiopathic scoliosis.* *Clin. Orthop.* , 184 : 50-57, 1984.
- 49) Yarom, R., Muhlrad, A., Hodges, A. et al : *Platelet pathology in patients with idiopathic scoliosis.* *Lab. Invest.* , 43 : 208-216, 1980.
- 50) Yarom, R., Myer, S., More, R. et al : *Platelet abnormalities in muscular dystrophy.* *Thromb. Haemost.* , 31 : 155-162, 1983.
- 51) Yarom, R., Robin, G.C. : *Studies on spinal and peripheral muscles from patients with idiopathic scoliosis.* *Spine* , 4 : 12-21, 1979.