

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0066352  
(43) 공개일자 2016년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/483 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0170617  
(22) 출원일자 2014년12월02일  
심사청구일자 2014년12월02일

(71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)  
(72) 발명자  
최혁  
서울시 성동구 성수이로 137, 107-1104 (성수동2가, 성수아이파크아파트)  
황민호  
서울특별시 관악구 광신길 225, 501호 (신림동)  
(74) 대리인  
특허법인남춘  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

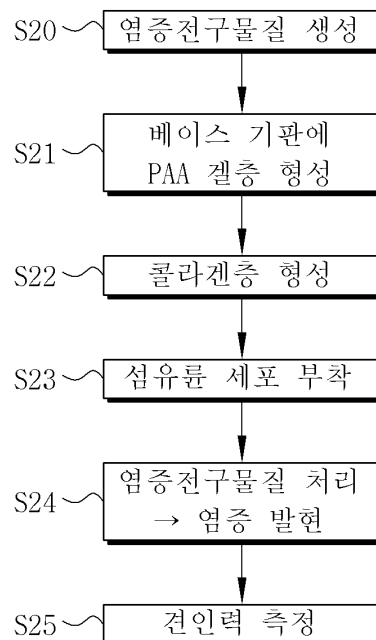
(54) 발명의 명칭 **추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법**

### (57) 요약

본 발명은 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 관한 것으로, (a) 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 단계와; (b) 베이스 기관 상에 마이크로 형광 비드가 포함된 PAA 겔 (Polyacrylamide gel)로 구성된 PAA 겔층을 형성하는 단계와; (c) 상기 PAA 겔층 상에 타입 1 콜라겐(Type 1

(뒷면에 계속)

**대표도** - 도2



collagen)으로 구성된 콜라겐층을 형성하는 단계와; (d) 상기 콜라겐층에 섬유원 세포를 부착하는 단계와; (e) 상기 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 상기 섬유원 세포에 처리하여 상기 섬유원 세포에서의 염증을 발현시키는 단계와; (f) 상기 섬유원 세포에서 발현된 염증에 의한 상기 마이크로 형광 비드의 움직임에 기초하여, 상기 섬유원 세포의 견인력을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이에 따라, 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로부터 발생하는 추간판 염증에서 섬유원 세포와 세포외 기질, 또는 추간판 세포 간에 나타나는 견인력(Traction force)의 변화 양상을 측정할 수 있다.

(72) 발명자

**박용두**

서울특별시 성북구 보국문로30길 15, 107동 202호  
(정릉동, 대우아파트)

**장환석**

서울특별시 강동구 양재대로87길 18, 703호 (성내동, 메이저아파트)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 있어서,

- (a) 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 단계와;
- (b) 베이스 기관 상에 마이크로 형광 비드가 포함된 PAA 겔(Polyacrylamide gel)로 구성된 PAA 겔층을 형성하는 단계와;
- (c) 상기 PAA 겔층 상에 타입 1 콜라겐(Type 1 collagen)으로 구성된 콜라겐층을 형성하는 단계와;
- (d) 상기 콜라겐층에 섬유륜 세포를 부착하는 단계와;
- (e) 상기 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 상기 섬유륜 세포에 처리하여 상기 섬유륜 세포에서의 염증을 발현시키는 단계와;
- (f) 상기 섬유륜 세포에서 발현된 염증에 의한 상기 마이크로 형광 비드의 움직임에 기초하여, 상기 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계는

- (a1) 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 단계와;
- (a2) 상기 (a1) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 단계와;
- (a3) 상기 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)에 포함된 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 추출하여 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (a2) 단계는

- (a21) 상기 (a1) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양하는 단계와,
  - (a22) 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 측정하는 단계와,
  - (a23) 상기 (a22) 단계에서의 측정 결과에 기초하여, 상기 상호 상이한 시간 중 상기 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 분비하는 최적의 시간을 결정하는 단계를 포함하며;
- 상기 (a2) 단계에서는 상기 (a23) 단계에서 결정된 최적의 시간을 상기 배양시간으로 하여 수행되는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (a21) 단계에서 상기 상호 상이한 시간은 24시간, 48시간 및 72 시간을 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 5

제2항에 있어서,

상기 (a2) 단계에서 상기 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련되는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 PAA 겔(Polyacrylamide gel)의 내부 응력은 6kPa 정도를 갖도록 마련되고,

상기 마이크로 형광 비드의 직경은 0.5  $\mu\text{m}$  정도를 갖도록 마련되는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (f) 단계에서는

상기 마이크로 형광 비드의 초기 위치로부터의 움직임 벡터에 기초하여 산출되는 가속도와, 상기 마이크로 형광 비드의 질량에 기초하여 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (f) 단계에서는 ELISA(enzyme-linked immunospecific assay) 기법을 통해 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 발현 정도를 정량화하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로부터 발생하는 추간판 염증에서 섬유륜 세포와 세포외 기질, 또는 추간판 세포 간에 나타나는 견인력(Traction force)의 변화 양상을 측정할 수 있는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0001]

- [0002] 일반적으로 요통은 전체 인구의 대략 80%에서 한번은 겪게 되는 흔한 질환이다. 요통의 원인은 나이에 따라 조금씩 다르게 나타난다. 예를 들어, 20대 내지 30대의 요통 원인은 허리 근육의 이상으로 인한 요추 염좌나 디스크 질환이 나타나고, 60대 이후에는 골다공증과 관절염이 오면서 디스크 질환 등으로 나타난다. 여기서, 디스크는 추간판이라고도 한다. 추간판은 등골뼈 사이에서 충격을 흡수하는 탄력적인 구조를 가진다.
- [0003] 도 1에는 정상 추간판의 해부학적 구조를 개략적으로 도식화한 도면이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 정상 추간판(Intervertebral disc ; IVD)은 디스크 안쪽에 존재하는 젤리틴성의 수핵(Nucleus pulposus ; NP)과, 수핵 바깥쪽으로 존재하는 섬유륜(Annulus fibrosus ; AF)으로 나누어진다. 또한, 섬유륜 조직 바깥쪽 3분의 1지점까지 유리 신경 말단(Free nerve ending)이 존재한다.
- [0004] 수핵은 타입 2 콜라겐(Type 2 collagen) 물질을 다량 함유하고 있고, 섬유륜에는 타입 1 콜라겐(Type 1 collagen) 물질이 높은 농도로 포함되어 있다. 이러한 콜라겐 네트워크는 추간판에 외부로부터 오는 충격에 대해 완충 작용을 하며, 수핵에 70~80% 존재하는 수분은 추간체의 높이를 유지하고, 움직임의 유연성을 제공한다.
- [0005] 그러나, 지속적인 외부자극, 노화 및 과부하에 의하여 유전자 및 전사인자 발현의 변화가 나타나고, 이러한 변화는 추간판 구조물에서 구성성분의 변화를 가져온다. 추가적으로 추간판을 이루고 있는 세포들 사이에서의 이화작용(catabolic) 및 동화작용(anabolic) 활성의 불균형이 나타나게 되고, 번역 후 단백질(posttranslational protein)의 발현 변화가 발생하며, 추간판의 형태학적 변화를 가져오게 된다.
- [0006] 이러한 생화학적 변화는 섬유륜 및 수핵 조직이 외부로부터 전해오는 충격에 대해 완충 역할을 제대로 할 수 없도록 변화하고, 해당 조직이 손상되거나 파열된다. 조직이 손상되면 이를 회복하기 위한 기전으로 대식세포 매개 염증 반응이 나타나게 되고, 이러한 반응은 추가적으로 섬유륜 세포에서 세포외 기질 효소(extracellular matrix enzyme ; ECM enzyme) 발현의 불균형을 형성하게 됨으로써 정상적인 추간판의 상태를 유지할 수 없게 된다.
- [0007] 세포외 기질 효소(ECM enzyme)에는 아연 의존 효소(zinc-dependent enzymes)에 속하면서 세포외 기질을 분해하는 역할을 가지는 기질 분해 효소(matrix metalloproteinases ; MMPs)가 있으며, 이에 대응하여 기질 분해 효소의 억제 역할을 수행하는 금속성 단백질분해효소 억제 인자(tissue inhibitor of metalloproteinase : TIMPs) 계열의 효소가 존재한다. 정상상태에서 상기 효소들은 일정한 균형을 유지하며, 지속적으로 추간판 미세 환경의 균형 유지에 관여한다.
- [0008] 그러나 앞서 설명된 염증 반응으로부터 생성되는 IL-1beta 및 TNF-alpha와 같은 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)은 섬유륜 세포로부터 상대적으로 많은 양의 기질 분해 효소를 분비하게 하고, 이는 결국 추간판 퇴행으로 나타나게 한다. 이러한 효소에 의한 기질 분해는 세포 및 세포간 접착을 붕괴 시킬 수 있으며, 또한 세포와 세포외 기질간의 상호작용도 약화시킬 수 있다.
- [0009] 그러나 이러한 퇴행과정의 정확한 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. Jun Li, Chen Liu, Qianping Guo, Huilin Yang 및 Bin Li의 논문 "Regional Variations in the Cellular, Biochemical, and Biomechanical Characteristics of Rabbit Annulus Fibrosus"(PLOS ONE, 2014. 03. 12.) 등과 같은 일부 논문에서 추간판의 견인력을 측정하는 연구가 진행되었으나, 그 기전을 명확히 밝혀내지는 못하고 있으며, 따라서 추간판의 퇴행과정의 기전을 정확히 이해하기 위해서는 실제 섬유륜 세포의 손상 이후 나타나는 염증과정과 관련한 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 불균형적 발현이 세포-세포외 기질 및 세포-세포 사이의 접착하고 있는 힘인 견인력(traction force)에 어떠한 영향을 미치는지에 관해 연구할 필요성이 요구되고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 따라서, 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로 부터 발생하는 추간판 염증에서 섬유륜 세포와 세포외 기질, 또는 추간판 세포 간에 나타나는 견인력(Traction force)의 변화 양상을 측정할 수 있는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.
- [0011] 또한, 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로 부터 발생하는 추간판 염증에서 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 발현을 정량화할 수 있는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법을 제공하는데 또 다른 목적

이 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적은 본 발명에 따라, 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 있어서, (a) 염증 전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 단계와; (b) 베이스 기관 상에 마이크로 형광 비드가 포함된 PAA 겔(Polyacrylamide gel)로 구성된 PAA 겔층을 형성하는 단계와; (c) 상기 PAA 겔층 상에 타입 1 콜라겐(Type 1 collagen)으로 구성된 콜라겐층을 형성하는 단계와; (d) 상기 콜라겐층에 섬유륜 세포를 부착하는 단계와; (e) 상기 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 상기 섬유륜 세포에 처리하여 상기 섬유륜 세포에서의 염증을 발현시키는 단계와; (f) 상기 섬유륜 세포에서 발현된 염증에 의한 상기 마이크로 형광 비드의 움직임에 기초하여, 상기 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법에 의해서 달성된다.
- [0013] 여기서, 상기 (a) 단계는 (a1) 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 단계와; (a2) 상기 (a1) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 단계와; (a3) 상기 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)에 포함된 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 추출하여 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 상기 (a2) 단계는 (a21) 상기 (a1) 단계에서 생성된 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양하는 단계와, (a22) 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 상기 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 측정하는 단계와, (a23) 상기 (a22) 단계에서의 측정 결과에 기초하여, 상기 상호 상이한 시간 중 상기 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 분비하는 최적의 시간을 결정하는 단계를 포함하며; 상기 (a2) 단계에서는 상기 (a23) 단계에서 결정된 최적의 시간을 상기 배양시간으로 하여 수행될 수 있다.
- [0015] 그리고, 상기 (a21) 단계에서 상기 상호 상이한 시간은 24시간, 48시간 및 72 시간을 포함할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 (a2) 단계에서 상기 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련될 수 있다.
- [0017] 그리고, 상기 PAA 겔(Polyacrylamide gel)의 내부 응력은 6kPa 정도를 갖도록 마련되고, 상기 마이크로 형광 비드의 직경은 0.5  $\mu\text{m}$  정도를 갖도록 마련될 수 있다.
- [0018] 그리고, 상기 (f) 단계에서는 상기 마이크로 형광 비드의 초기 위치로부터의 움직임 벡터에 기초하여 산출되는 가속도와, 상기 마이크로 형광 비드의 질량에 기초하여 섬유륜 세포의 견인력을 측정할 수 있다.
- [0019] 그리고, 상기 (f) 단계에서는 ELISA(enzyme-linked immunospecific assay) 기법을 통해 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 발현 정도를 정량화하는 단계를 더 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0020] 상기와 같은 구성에 따라, 본 발명에 따르면 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로부터 발생하는 추간판 염증에서 섬유륜 세포와 세포의 기질, 또는 추간판 세포 간에 나타나는 견인력(Traction force)의 변화 양상을 측정할 수 있는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법이 제공된다.
- [0021] 또한, 추간판의 퇴행 과정 등의 원인으로부터 발생하는 추간판 염증에서 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 발현을 ELISA(enzyme-linked immunospecific assay) 기법을 통해 정량화할 수 있게 된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 정상 추간판의 해부학적 구조를 개략적으로 도식화한 도면이고,  
 도 2는 추간판의 염증 발현시 섬유륜 세포의 견인력을 측정하는 방법을 설명하기 위한 도면이고,

도 3은 중간판의 염증 발현시 섬유류 세포의 견인력을 측정하는 방법에서 섬유류 조직의 세포와 기질의 미세 환경을 묘사한 도면이고,

도 4는 본 발명에 따른 중간판의 염증 발현시 섬유류 세포의 견인력을 측정하는 방법에서 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 추출하는 과정을 설명하기 위한 도면이고,

도 5는 본 발명에 따른 중간판 염증 모델을 생성하는 방법에서 상이한 배양시간에서 분비되는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 측정된 그래프를 나타낸 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하에서는 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명에 따른 실시예들에 대해 상세히 설명한다.
- [0024] 도 2는 중간판의 염증 발현시 섬유류 세포의 견인력을 측정하는 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- [0025] 먼저, 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성한다(S20). 본 발명에서는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)인 IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$ 와 같은 각각의 인자를 독립적으로 사용하지 않고, 실제 인체에서 나타나는 미세 환경 자체를 묘사하여, 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하는 것을 예로 한다. 이와 같이 생성된 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 이용하여, 도 3에 도시된 바와 같이, 섬유류 조직의 세포와 기질의 미세 환경에 처리한다.
- [0026] 이하에서는 도 4 및 도 5를 참조하여 본 발명에 따른 중간판의 염증 발현시 섬유류 세포의 견인력을 측정하는 방법에서 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 추출하는 과정에 대해 상세히 설명한다.
- [0027] 먼저, 중간판에서 발생하는 염증을 포사하기 위해 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성한다(S40). 본 발명에서는 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 기 설정된 처리 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성한다.
- [0028] 여기서, 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)로는 THP-1 세포, U937 세포 및 raw 264.7 세포 중 어느 하나가 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 THP-1 세포가 적용되는 것을 예로 하며, 휴먼 단핵세포주(Human monocyte cell line)에 PMA(Phorbol myristate acetate)를 48 시간 동안 처리하여 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 생성하는 것을 예로 한다.
- [0029] 이와 같은 과정을 통해 생성된 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)는 다양한 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)과 염증매개물질(Inflammatory mediator)인 사이토카인(Cytokine)의 발현이 가능한 상태가 된다.
- [0030] 그런 다음, 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 이용하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성한다(S41). 본 발명에서는 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 배양배지에서 기 설정된 배양시간 동안 배양하여 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하는 것을 예로 한다. 이 때, 배양배지는 DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련되는 것을 예로 한다.
- [0031] 본 발명에서는 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성을 위한 배양시간을 실험을 통해 최적으로 구할 수 있다. 보다 구체적으로 설명하면, 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)를 복수의 배양배지에 상호 상이한 시간동안 배양한다. 여기서, 배양배지는, 상술한 바와 같이, DMEM/F12에 1% FBS와 1% P/S가 첨가되어 마련될 수 있다.
- [0032] 그런 다음, 해당 시간 동안 각각의 배양배지에서 마크로파지 유사 세포(Macrophage like cell)가 분비하는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 측정한다. 본 발명에서는 배양시간으로 24시간, 48시간 및 72시간이 적용되는 것을 예로 한다.
- [0033] 도 5는 본 발명에 따른 중간판의 염증 발현시 섬유류 세포의 견인력을 측정하는 방법에서 상이한 배양시간에서 분비되는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 측정된 그래프를 나타낸 도면이다.
- [0034] 도 5의 (a)는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)인 IL-1 $\beta$ 의 농도를 나타낸 도면으로, 24시간(MCM24), 48시간(MCM48), 72시간(MCM72)에서 IL-1 $\beta$ 의 농도가 시간에 따라 다소 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 5의 (b)는 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)인 TNF- $\alpha$ 의 농도를 나타낸 도면으로, 24시간(MCM24), 48시간(MCM48), 72시간(MCM72)에서 TNF- $\alpha$ 의 농도가 시간에 따라 다소 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0035] 이에, 본 발명에서는 도 5에 도시된 그래프에 기초하여, 24시간(MCM24) 또는 48시간(MCM48)으로 염증전구물질

(pro-inflammatory mediator)을 분비하는 최적의 배양시간으로 결정하는 것을 예로 한다.

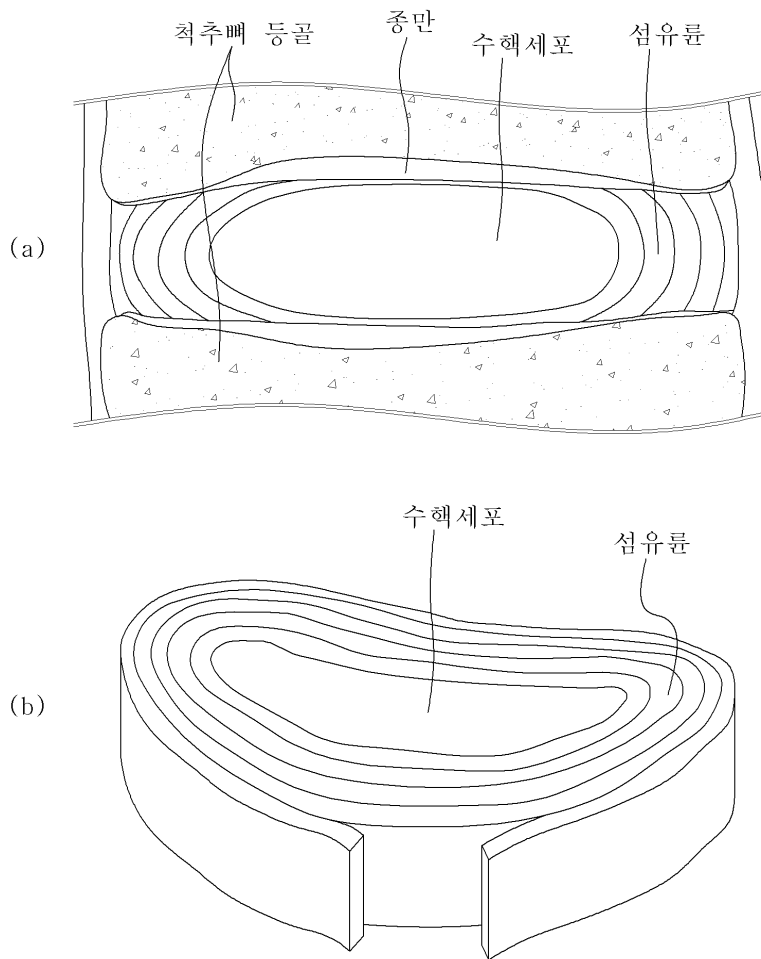
- [0036] 상기와 같이 최적의 배양시간이 결정되면, 해당 배양시간으로 도 4의 S40 및 S41 단계를 거쳐, 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)를 생성하고, 배양시간이 경과되면 마크로파지 조정 배지(Macrophage conditioned medium)에 포함된 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 추출하여(S42) 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 생성하게 된다.
- [0037] 다시, 도 2를 참조하여 설명하면, 상기와 같은 과정을 통해 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)의 생성이 완료되면, 도 3에 도시된 바와 같이, 섬유류 조직의 세포와 기질의 미세 환경을 모사하기 위한 과정이 진행된다.
- [0038] 먼저, 베이스 기관(10) 상에 마이크로 형광 비드가 포함된 PAA 겔(Polyacrylamide gel)로 구성된 PAA 겔층(20)을 형성한다(S21). 여기서, 베이스 기관(10)은 후술할 견인력의 측정 과정에서 현미경을 통해 PAA 겔층(20)의 관찰이 가능하도록 투명한 재질, 예컨대 유리 기관이 사용되는 것을 예로 한다.
- [0039] 본 발명에서는 PAA 겔(Polyacrylamide gel)의 내부 응력은 6kPa 정도를 갖도록 마련되는 것을 예로 한다. 내부 응력이 상대적으로 낮은 경우 PAA 겔(Polyacrylamide gel) 내부에 첨가되는 마이크로 형광 비드가 일정 질량 및 면적을 가지기 때문에 PAA 겔층(20) 아래로 가라앉는 경우가 발생할 수 있다.
- [0040] 반면, 내부 응력이 상대적으로 클 경우 PAA 겔층(20)이 너무 단단하게 고정되는 현상을 나타낸다. 두 경우 모두 마이크로 형광 비드의 원활한 움직임을 방해하는 요소로 마이크로 형광 비드가 견인력에 의해 움직임이 발생할 수 있도록 PAA 겔(Polyacrylamide gel)의 내부 응력은 6kPa 정도를 갖도록 마련되는 것을 예로 한다.
- [0041] 또한, 본 발명에서는 마이크로 형광 비드의 직경은 추간판 세포의 크기를 고려하여, 0.5  $\mu\text{m}$  정도를 갖도록 마련되는 것을 예로 하며, 최적의 형광 이미지를 획득하기 위해, 레드 형광 카르복시산염계 비드(red fluorescent carboxylate-modified bead)를 사용하는 것을 예로 한다.
- [0042] 상기와 같이, 베이스 기관(10) 상에 PAA 겔층(20)이 형성되면, PAA 겔층(20) 상에 타입 1 콜라겐(Type 1 collagen)으로 구성된 콜라겐층(30)을 형성하여(S22), 섬유류 조직의 세포와 기질(extracellular matrix)의 미세 환경을 모사하게 된다.
- [0043] 그런 다음, 섬유류 세포(도 3의 40 참조)를 콜라겐층(30)에 부착한다(S23). 그리고, S20 단계에서 생성된 염증전구물질(pro-inflammatory mediator)을 섬유류 세포에 처리하여(도 3의 50 참조) 염증을 발현시킨다(S24). 이를 통해 섬유류 세포에서의 세포와 기질 효소(ECM enzyme)의 발현이 가능하게 된다.
- [0044] 상기 과정을 통해 섬유류 세포에서 발현된 염증, 즉 세포와 기질 효소(ECM enzyme)의 발현에 의한 마이크로 형광 비드의 움직임에 기초하여, 섬유류 세포의 견인력을 측정하게 된다(S25).
- [0045] 여기서, 섬유류 세포의 견인력 측정은 마이크로 형광 비드의 초기 위치로부터의 움직임 벡터에 기초하여 산출되는 가속도, 마이크로 형광 비드의 질량에 기초하여 측정하게 된다.
- [0046] 보다 구체적으로 설명하면, 섬유류 세포의 움직임은 섬유류 세포에 염증 전구물질을 통한 염증환경이 조성되면, 섬유류 세포들의 이동이 빨라지고 많아지는 경향성을 나타낸다. 이와 같은 섬유류 세포의 움직임에 의해, 콜라겐과의 수축(contraction)과 확장(expansion)이 반복하면서, PAA 겔(Polyacrylamide gel) 안에 포함되어 있는 마이크로 형광 비드도 함께 움직이게 된다.
- [0047] 이와 같은 마이크로 형광 비드의 움직임과 관련하여, 초기의 마이크로 형광 비드의 위치, 즉 초기 위치로부터 섬유류 세포의 움직임에 의해 야기된 마이크로 형광 비드의 움직임 벡터를 산출하게 된다.
- [0048] 여기서, 마이크로 형광 비드의 움직임은 시간대별로 3차원 좌표계에서 불연속적인 움직임을 보이는데, 마이크로 형광 비드의 표점을 DFFT(DIGITAL FAST FOURIER TRANSFORM)을 통하여 함수로 나타낼 수 있다.
- [0049] 이러한 함수를 미분하게 되면 마이크로 형광 비드의 가속도가 산출 가능하게 되고, 이 때 세포와 세포 사이에는 밖으로 나갈려는 힘이나, 서로 밀어내려는 힘이 발생하게 되고, 힘 벡터의 합으로 견인력의 표현이 가능하게 된다.
- [0050] 즉, 마이크로 형광 비드가 시간에 따라 이동한 거리를 확인하면 속도와 가속도를 구할 수 있고, 마이크로 형광 비드의 질량을 이용하여 힘, 즉 견인력의 측정이 가능하게 된다.
- [0051] 한편, 본 발명에서는 상기와 같은 과정을 거친 후, 세포와 기질 효소(ECM enzyme)가 발현된 샘플을

ELISA(enzyme-linked immunospecific assay) 기법을 통해 관찰하여, 세포외 기질 효소(ECM enzyme)의 발현 정도를 정량화할 수 있다. 여기서, 정량화되는 세포외 기질 효소(ECM enzyme)로는 MMP-1, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2 등이 포함될 수 있다.

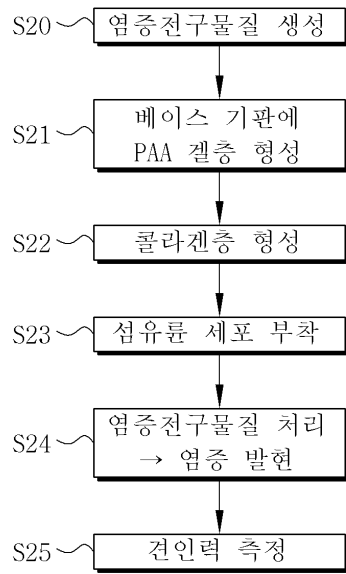
[0052] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이다.

## 도면

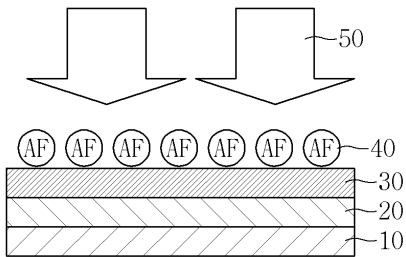
### 도면1



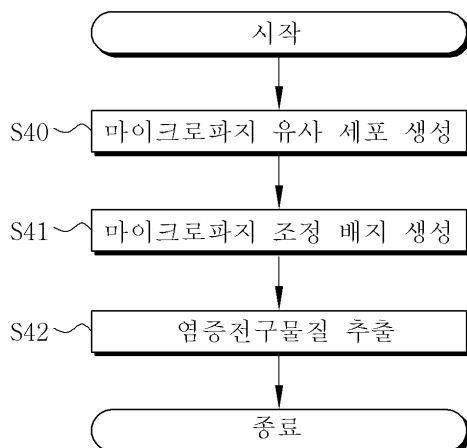
도면2



도면3



도면4



도면5

