대한척추외과학회지 제 9 권 제 2 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 9, No. 2, pp 70~77, 2002

가토의 추간판 세포 삼차원 배양에서 교원질 농도변화에 따른 추간판 세포의 기질 생성반응

박홍준 · 한수봉* · 문성환* · 김 향* · 이환모* · 정영기 · 유정한 · 박용욱 · 김남현*

한림대학교 의과대학 정형외과학교실, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실*

The Effect of Extracellular Collagen on Synthesis of Extracellular Matrix in a 3-Dimensional Culture of Intervertebral Disc Cells

Hong Jun Park, M.D., Soo Bong Hahn, M.D.*, Seong-Hwan Moon, M.D.*, Hyang Kim, B.S.*, Hwan-Mo Lee, M.D.*, Yung Khee Chung, M.D, Jung Han Yoo, M.D., Yong Wook Park, M.D., and Nam Hyun Kim, M.D.*

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

– Abstract –

Study Design : In-vitro experimental study

Objectives : To determine the proteoglycan synthesis of the rabbit nucleus pulposus cells in various concentration of extracellular collagen type I and II under the stimulation of TGF-β.

Summary of Literature Review : Therapeutic effect of growth factor and gene therapy can be altered by composition of extracellular matrix. However, the effect of extracellular collagen types I and II on synthetic activity of intervertebral disc cells is not thoroughly studied before.

Materials and Methods : The nucleus pulposus cells were isolated and cultured from 10 skeletally mature rabbits. Cultures were trypsinized and incorporated into alginate beads with different concentration of extracellular collagen type I and II (0.5%, 1.0% and 1.5%). Those cultures with TGF-β (10 ng/ml) served stimulated condition of matrix synthesis. Newly synthesized proteoglycans were assessed by ^{35}S-sulfate incorporation using chromatography on Sephadex G-25 in PD-10 columns. Scintillation count was normalized with DNA content by Hoechst dye method.

Results : In basal condition, difference in proteoglycan synthesis in given concentration of extracellular collagen type I and II were statistically insignificant. In stimulated condition with TGF-β, difference in proteoglycan synthesis in given concentration of extracellular collagen type I and II was also statistically insignificant. However, cultures in stimulated condition with TGF-β showed increased amount of newly synthesized proteoglycans compared to those of basal condition regardless of the concentration of extracellular collagen type I and II ($p < 0.05$).

Conclusion : Anabolic response of rabbit nucleus pulposus cells is relatively insensitive to extracellular matrix composition, which facilitates application of gene therapy in various conditions of disc degeneration.

Key Words : Extracellular collagen, Proteoglycan, Nucleus pulposus cell, TGF-β

Address reprint requests to
Seong-Hwan Moon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-dong, Soedaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel : 82-2-361-5649, Fax : 82-2-363-1139, E-mail : shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 부분적으로 2001년도 연세대학교 학술 연구비 (2001-01-07), Stryker Pacific, 연세대학교 의과대학 BK-21에 의하여 지원되었음.

서 론

퇴행성 추간판 질환은 요통의 원인 중 많은 부분을 차지하며 이로 인한 의료비 및 환자의 고통은 증가하고 있다[1,5]. 퇴행성 추간판 질환은 추간판 내 단백다당 (proteoglycan)의 점진적인 감소로 추간판 내 수분압이 저하되고 이로 인하여 추간판의 생역학에 변화가 발생하며, 전반적인 척추의 퇴행을 일으키게 된다[6,7,8,21]. 이로 인하여 다양한 임상증상 즉 추간판 내장증, 추간판 탈출증, 척수증, 신경근 병변, 척추관 협착증 등을 야기한다[6-8]. 퇴행성 변화를 겪게 되는 추간판의 미세 구조와 구성 성분의 변화는 해부학적인 구조변화에 선행해서 발생하며, 단백다당의 구조와 구성비의 변화, 수분 함량의 변화 등이 항상 선행되는 것으로 알려져 있다[6,8,12,15,21]. 추간판의 퇴행성 변화를 자세히 살펴보면 단백다당의 농도 감소, 교원질 농도의 증가, 교원질의 분자 구조의 변화 및 변성이 초래되는 등의 일련의 과정을 거치게 된다[6,7,33]. 따라서, 추간판의 기질에서 발생되는 이러한 변화를 억제하고 이러한 과정을 변경시키는 것이 퇴행성 추간판 질환을 정복하는 방법으로 사료된다. 과거에 관절 연골의 치유에 대해서는 외과적 수술로 치료해 가는 것을 치유의 기본으로 생각하고 근자에도 자가 골막 이식 방법 등과 같은 치료를 시도하였으나 그 결과가 만족스럽지 못했다[30]. 따라서, 내부에서의 잠재된 능력으로부터의 치유가 일어난다면 전자의 경우보다 훨씬 생물학적으로 완전한 치유가 가능할 것이다.

토끼의 관절 연골에 인공적으로 열상을 유발시키면 이 부위에서 세포의 증식이 일시적으로 일어나고 손상 부위에서는 DNA와 단백다당의 생성이 증가되므로, 손상 부위에서의 내인적 치유의 가능성이 있음을 점차적으로 인지하게 되었다[24]. 척추 추간판의 경우에도 이 같은 논리는 적용이 되는데, 추간판의 퇴행성 질환으로 인해 척추 유합 수술을 받은 환자의 상당수에서 조차 요통을 지속적으로 호소하고 있다는 사실만으로도[20], 퇴행성 추간판 질환을 단순하게 고식적 치료법으로 수핵 제거술, 추간판 제거술, 척추 유합술 같은 비교적 침습적인 외적인 접근 방법으로 치료하기 보다는 생물학적 방법을 이용한 내적 접근 방법으로 추간판 원래의 상태로 회복, 재생하는 것이 더 생물학적인 치유 방법으로 시도되고 있다[28,29].

최근에는 연골과 세포외 기질의 대사 작용에 관계되는 세포간의 정보 전달 peptide인 cytokine에 대한 연구가 활발한데, transforming growth factor-β1 (TGF-β1) 과 insulin-like growth factor-I은 모두 단백다당의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다는 것이 관절 연골의 체외 배양에서 이미 밝혀졌으며, cytokine들이 상호 상승 작용을 일으켜서 연골 세포의 단백다당 합성을 조절한다는 것이 알려져 있다[22,36,38]. 그런데, Ingber와 Folkman[14]은 혈관생성 (angiogenesis)의 체외 실험에서 세포외 기질의 조건이 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 혈관 세포의 증식과 성장 유형을 조정하는 역할을 오히려 조절한다고 하면서, 세포외 기질의 역학적 변화에 따라서 혈관 내피 세포는 bFGF에 의해 증식, 분화, 퇴화의 과정을 거칠 수 있으며, 이는 세포가 세포외 기질을 형성하고 또한 그 물질에 의해 영향을 받는다는 소위 " 역동적 상호 의존성 (dynamic reciprocity) "의 개념을 도입하게 되었다[27].

최근에는 이러한 세포외 기질과 cytokine에 관한 연구가 관절 연골에서 많이 발표된 바 있으며[31,32], 추간판 세포에서의 기질과 세포간의 상호 작용에 대한 연구는 Interleukin 등에 관한 연구가 일부 발표되었으나[34,35], TGF-β에 관한 연구는 퇴행성 추간판 질환의 임상적 심각성에도 불구하고 관절 연골 세포나 골 세포 집단에 비교하면 연구 업적이 미약한 상태이다[18,28,29].

추간판의 퇴행이 진행될수록 제 1형 교원질의 생성이 많아진다는 보고가 있으며[2], 이는 추간판 기질의 역학적 성질 뿐만이 아니라 추간판 세포의 조절 기능에도 영향을 미치는 것으로서, 이렇게 변화된 조절 기능이 추간판 퇴행의 악화에 기여할 수도 있다[34,35]. 또한 TGF-β1은 연골 기질을 유지하고 보수하는 기능을 하며, 이러한 cytokine의 기능이 상실된 경우에도 역시 퇴행성 변화를 초래 한다.

이 연구의 목적은 여러 가지 조건을 달리한 세포외 교원질이 추간판 세포의 기질 생성에 미치는 영향을 규명하는데 있으며, 이를 통해서 추간판의 퇴행성 변화에서 추간판 세포에 대한 세포외 기질의 효과를 설명할 수 있을 것으로 기대된다.

연구대상 및 방법

1. 토끼의 추간판 수핵 세포의 분리 및 일차 배양

12-16주 정도 자란 New Zealand white rabbit (3 ~ 3.5 Kg) 10마리를 적정량의 sodium pentobarbital (Euthanasia B solution)을 투여하여 희생시킨 후, 토끼의 척추로부터 요추 또는 흉요추 추간판의 연속적인 4개의 분절을 분리해 낸다. 분리해 낸 추간판 조직을 멸균 식염수로 한 차례 헹구어 낸 다음, 조직을 수핵 (nucleus pulposus)과 섬유륜 (annulus fibrosus)으로 따로 분리해 낸다. 수핵 부분의 조직을 잘게 잘라낸 후, 0.4% pronase (protease from Streptomyces griseus)에 1시간 동안 효소 반응을 한다. 곧

이어 앞서 반응시킨 조직에 0.025% collagenase type XI (Clostridium histolyticum)와 0.004% deoxyribonuclease II type IV (DNase II)를 첨가하여 37℃에서 16시간 반응시킨다. 효소반응 후, 분리된 세포를 Dulbecco 's modified Eagle medium(DMEM)과 Ham 's F12 medium가 1:1로 섞인 배지(DMEM/F12)를 이용하여 씻어 낸다. 분리된 세포들을 haemocytometer를 이용하여 세포 수를 센 다음, 10% FBS, 25 μg/ml ascorbate(vitamin C), 1% penicillin-streptomycin, 1% nystatin이 첨가된 DMEM/F12 배지로 세포를 5 × 10^5 cells/ml의 밀도가 되게 하여, culture flask에서 37℃, 5% CO_2 배양기에 배양하며 매일 배지를 교환해 준다.

2. 교원질 혼합 및 Alginate bead 배양

제 1형 및 제 2형 교원질(R&D, MN)을 0.5M acetic acid(30 mg/ml)에 희석하여 준비한다. 준비한 교원질을 몇 시간 동안 상온에 방치해 둔 다음, 다시 4℃에서 16시간 동안 보관해 둔다. 준비된 교원질을 37℃에서 몇 분 동안 데운 다음, 멸균된 10N NaOH를 적정량 첨가하여 중화 시킨다. 제 2형 교원질 (3 g/ml stock concentration)을 농도를 증가 시켜가며, alginate solution과 혼합한다. 교원질의 최종 농도는 0%, 0.5%, 1.0% 그리고 1.5%가 되게 한다. 추간판 수핵 세포는 2 × 106 cells/ml의 밀도로 1.2% alginate (교원질과 이미 섞인 상태)와 혼합한다. 혼합한 세포들을 즉시 주사기 (19-gauge needle)을 이용하여, 102 mM $CaCl_2$ 용액에 한 방울씩 떨어뜨린다. 이때 용액은 세포와 alginate가 고루 섞여 bead를 형성할 수 있게 가볍게 교반 상태를 유지해 준다. beads가 응고되도록 15분 동안 방치해 둔다. bead가 응고 되면, 상층의 $CaCl_2$용액을 버린다. beads를 0.15M NaCl용액으로 3차례 씻어 낸 다음, 기본 배지 (25 μg/ml ascorbate (vitamine C), 1% penicillin-streptomycin, 1% nystatin이 첨가된 DMEM/F12 배지)로 한차례 다시 씻어 낸다. DNA와 단백다당 합성을 측정하기 위해 beads를 well당 10개씩 들어 갈 수 있도록 하여 기본 배지로 희석하여 12-well culture plate에 적용한다. 추간판 세포는 3일 동안 37℃, 5% CO_2 상태에서 배양하며, 기본 배지만 첨가한 그룹과 TGF-β1(10 ng/ml) (R&D, MN)을 첨가한 그룹으로 분리하여 배양한다.

3. Hoechst 33258 형광 염색 방법을 이용한 DNA 합성 측정

배양한 세포를 0.1M NaH2PO4, 5mM EDTA, 5mM cysteine HCl 용액에 125 μg/ml papain이 들어 있는 용액으로 60℃에서 16시간 동안 효소 반응을 시킨다. 반응시킨 용액을 -70℃에 보관해 둔다. Hoechst 33258 형광 염색 물질은 0.01M Tris, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl용액으로 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 미리 준비해 둔다. -70℃에 보관해 두었던 농도를 알 수 없는 배양 세포의 DNA 용액 2 μl와 2 ml의 Hoechst 33258 형광 염색 용액을 섞어 반응시킨 후, 형광도를 측정한다. 표준 농도 곡선을 만들기 위해 농도를 미리 알고 있는 calf thymus DNA를 이용하여 농도를 알 수 없는 배양 세포의 DNA 용액과 동일한 방법으로 형광도를 측정한다. 형광도 측정은 Luminescence spectrometer (LS 50B; Perkin Elmer)를 이용하며, 흡광도 458 nm와 발광도 356 nm에서 측정한다.

4. 새로 생성된 단백다당 측정

3일간의 세포 배양 후에 배지를 5 μCi/ml 의 [^{35}S]sulfate가 첨가되어 있는 기본 배지로 바꾸어 4시간 동안 배양한다. 배양한 배지를 모아서, -70℃에 보관한다. 세포를 싸고 있던 bead를 3배 부피의 55mM sodium citrate, 150 mM NaCl을 첨가하여 37℃에서 15분간 반응시켜 녹인다. 분리된 세포에 다시 protease inhibitor(10 mM EDTA, 0.1 M 6-aminohexanoic acid, 5mM benzamidine hydrochloride, 10mM N-ethylmaleimide, 0.5 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride)가 첨가된 동일한 양의 4M guanidine hydrochloride, 50 mM sodium acetate (pH 5.8) 용액을 첨가하여, 4℃에서 24시간 동안 반응시킨다. 미리 분리해 둔 배지와 세포 추출물을 Sephadex G-25 chromatography (PD-10 column)를 이용하여 재정제한 후, βscintillation counting을통해새로이합성된단백다당의양을측정한다 .

5. 통계 분석

위와 같은 실험을 3회에 걸쳐서 반복하여 결과를 얻었으며, 모든 자료는 대조군 (교원질이 포함되지 않은 상태로 배양되고 TGF-β 자극을 주지 않은 군)에 대한 백분율로서 평균 ±표준편차로 표시하고, SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL)를 사용하여 처리하였다. One-way Analysis of variance 및 Fisher 's protected LSD post-hoc test로 실험군을 비교하였으며, 통계적 유의 수준은 $p<0.05$로 정의하였다.

결 과

1. 토끼 추간판 세포의 배양

토끼의 추간판에서 collagenase를 이용하여 추간판 수핵 세포를 분리하였으며, 90% 이상 살아 있는 세포를 얻어서 이를 배양 용기에 넣고 배양하였으며 배양 3일이 경과한 이후에는 일부에서는 배양 용기의 바닥에 붙는 것을 볼 수 있었다. 적당한 배양으로 세포가 충분히 얻어지도록 한 후에 3차원 배양을 하기 위하여 교원질의 농도를 증가 시켜가며, alginate solution과 혼합하였으며, 세포와 alginate가 고루 섞여 bead를 형성하였다.

2. 제 1형 교원질이 단백다당의 합성에 미치는 영향

TGF-β1 10 ng/ml을 투여하였을 때는 투여하지 않은 군에 비해 단백다당의 합성율이 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나, 제 1형 교원질의 농도의 증가(0, 0.5, 1. 1.5%)는 단백다당의 합성율에는 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

3. 제 2형 교원질이 단백다당의 합성에 미치는 영향

TGF-β1 10 ng/ml을 투여하였을 때는 투여하지 않은 군에 비해 3배 정도 단백다당의 합성율이 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나, 제 2형 교원질의 농도의 증가(0, 0.5, 1, 1.5%)는 단백다당의 합성율에는 영향을 주지 않았다 (Fig. 2).

고 찰

노화가 진행되면서 척추 추간판의 크기나 형태에 많은 변화가 발생하는데, 추간판 높이의 감소, 섬유륜의 높이의 감소와 함께 척추체 연골단 (cartilagenous end plate)의 경화 등이 나타난다[1,5,6]. 신체 골격의 형성에 이

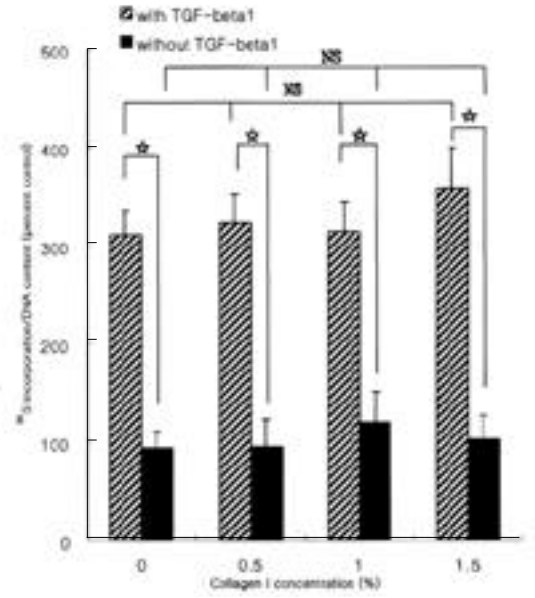

Fig. 1. The effect of type I collagen on the synthesis of proteoglycan by rabbit disc cells encapsulated in alginate beads. Incorporation of 35S-sulfate into disc cells cultured in basal medium or in medium supplemented with transforming growth factor-β1 (TGF-β1) was measured. Data represent mean ± SD of three experiments performed in triplicate. The values of Y-axis were content of newly synthesized proteoglycan, which was divided by the amount of deoxyribonucleic acid. Rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate beads, treated by TGF-β1 (10 ng/ml) showed 3 fold increase in newly synthesized proteoglycan compared to basal condition ($p<0.05$), while increased concentration of extracellular type I collagen failed to affect proteoglycan synthesis ($p>0.05$). *: $p<0.05$, NS: statistically non-significant.

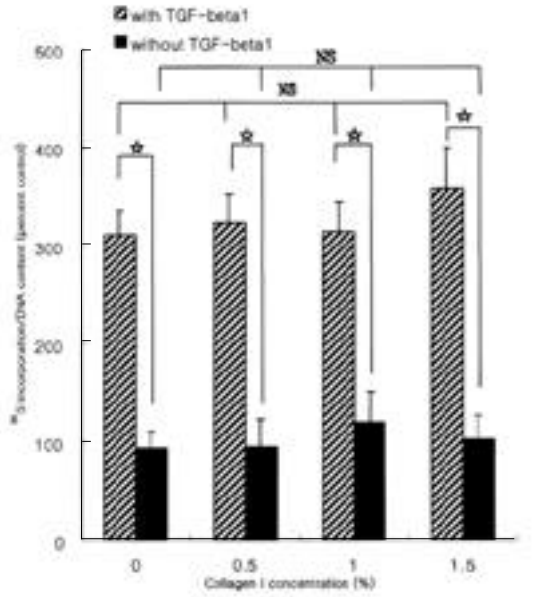

Fig. 2. The effect of type II collagen on the synthesis of proteoglycan by rabbit disc cells encapsulated in alginate beads. Incorporation of 35S-sulfate into disc cells cultured in basal medium or in medium supplemented with transforming growth factor-β1 (TGF-β1) was measured. Data represent mean ± SD of three experiments performed in triplicate. The values of Y-axis were content of newly synthesized proteoglycan, which was divided by the amount of deoxyribonucleic acid. Rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate beads, treated by TGF-β1 (10 ng/ml) showed 3 fold increase in newly synthesized proteoglycan compared to basal condition ($p<0.05$), while increased concentration of extracellular type II collagen failed to affect proteoglycan synthesis ($p>0.05$). *: $p<0.05$, NS: statistically non-significant.

어서 나타나는 이러한 변화는 개개인이나 혹은 한 사람에 있어서도 척추의 여러 부위에 따라서 다르게 나타나는데, 이러한 척추 추간판의 노화에는 외형적 구조의 변화보다는 미세 조직의 변화와 구성 성분의 변화가 먼저 선행하게 된다[6]. 이는 단백다당의 구성비와 농도 그리고 수분 함량의 변화가 특징적이며, 특히 20세 이후에는 추간판 중에서 수핵에서의 변화가 두드러지게 된다. 퇴행성 수핵에서는 단백다당과 수분의 감소, 그리고 생존 세포 수의 감소가 확연히 나타나며, 이러한 변화는 단백다당의 분절화 (fragmentation)및 교원질과 비교원성 단백질의 농도 증가를 수반하게 된다[6,8]. 최근에는 이러한 노화의 진행 과정을 변화시키기 위한 여러 가지 연구가 시도되고 있으나[9,28,29], 아직까지 완전한 해결 방안은 없는 상태이다. 흔히 이러한 퇴행성 변화를 치료함에 있어서 특별히 척추의 불안정성을 제거하기 위해서는 척추 유합술이 행해져야 한다. 그러나, 결과적으로는 유합된 척추 분절의 상하에 인접한 운동 분절에 더 많은 하중이 전해지게 되므로 이 분절부분에서의 퇴행성 변화를 더욱 악화시키는 결과를 초래하게 되며, 척추 유합 수술을 받은 환자의 약 절반은 요통을 지속적으로 호소하고 있다는 사실만으로도 퇴행성 추간판 질환을 보다 비침습적인 내인적 접근법으로 치료해야만 하는 당위성이 있다고 할 수 있다[20]. 즉, 수핵 세포를 표현형이 잘 유지되도록 배양하고, 이를 퇴행성 변화를 보이는 추간판에 최적의 매개체를 이용하여 이식함으로써 추간판을 재생의 과정으로 유도하는 것이 효과적이고 지속적인 치료법이 될 수 있을 것이다[9, 29].

수핵 세포의 단층 배양 시에 연골 세포 표현형을 가능한 유지하게 하기 위해서 배양 조건을 여러 가지로 달리하기도 하는데, 수핵 세포는 pH 7.0에서, 섬유륜 세포의 경우에는 pH 7.0 ~ 7.6 에서 최적의 세포 분열을 관찰할 수 있다[13]. 그러나, 수핵 세포의 연골양 세포를 포함한 연골 세포에서 시험관 단층 배양을 시행할 경우에는 3주 이상이 경과되면 연골 세포의 표현형이 소실되는 역분화 과정이 발생되며, 연골 세포 표현형의 지표인 제2형 교원질이 발견되지 않는다[4,17]. 따라서, 이를 방지하기 위한 노력이 많은 학자들에 의해 현재까지 경주되어 왔는데, 생체와 유사한 환경인 3차원 배양 조건을 만들기 위해서 agarose gel, biodegradable polymer, collagen gel, alginate bead 등을 이용하여 왔다[4,10,13,16,17,23,39,40].

연골 세포는 특별히 병적인 이상이 없는 한 세포외 기질의 항상성을 유지하고 기능적인 관절면을 유지하기 위하여 주로 세가지 경로를 통해서 외부의 정보를 인식한다고 하며, 이들은 기계적 신호, 가용성 전달체, 그리고 세포외 기질과의 상호 작용에 의해서 이루어 진다[32].

본 실험에서는 단백다당과 세포증식에 성장 인자가 미치는 영향에 대해서 실험하였는데, 성장 인자로는 TGF-β1을 사용하였다. 일반적으로 TGF-β는 심장, 뇌, 연골을 비롯한 인체의 대부분의 기관에서의 항상성 유지에 관계되는데, 이는 손상된 부위를 치유하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 척추 동물에서는 4 종류, 인간에서는 3 종류의 isoform (TGF-β1,2 and 3)이 알려져 있고, 인체의 거의 모든 종류의 세포에 작용하는 매우 다양한 기능의 cytokine이다. 특히, 척추 추간판에서의 TGF-β는 단백다당의 중심 단백 (core protein)과 교원질의 분해에 관여하는 matrix metalloproteinase (MMP)의 합성을 억제하며, 또한 MMP의 endogenous inhibitor의 생성을 촉진하며, plasminogen activator의 생산을 억제하고, plasminogen activator inhibitor type 1의 합성을 증가시켜서 단백다당의 항상성 유지함으로써, 세포의 이화작용을 억제한다. 연골 세포에서는 세포의 증식을 촉진하고, 연골 세포의 표현형의 발현, 즉 2형 교원질의 생산과 단백다당의 표현을 증가시키는 것 뿐만 아니라 연골 세포의 표현형의 안정화에도 기여하는 것으로 알려져 있다[3,25,26].

또한, 본 연구에서는 단층 배양법을 사용하지 않고 삼차원 배양법을 사용하였는데, 이는 단층 배양법에서는 세포와 세포간의 상호 작용만이 가능하나, 삼차원 배양법은 세포와 세포, 세포와 기질간의 상호 작용이 모두 가능하기 때문에 추간판 세포가 세포외 기질의 형성을 하는데 더 좋은 환경을 제공하기 때문이다[11].

Qi 와 Scully[32]는 관절 연골 세포를 삼차원 배양하면서 alginate bead에 제 1형 및 제 2형 교원질을 처리하고, TGF-β1을 선택적으로 투여하면서 시간 경과에 따른 DNA와 단백다당의 변화를 관찰하였는데, 제1형 교원질에서 배양할 경우에는 TGF-β1은 연골 세포의 증식과 단백다당의 합성을 억제하였으며, 제2형 교원질에서 배양할 경우에 TGF-β1은 연골 세포의 증식과 단백다당의 합성을 증가시켰다고 보고하였다. 이는 세포외 기질의 성분 변화에 따라서 성장 인자의 역할이 변할 수 있다는 결과를 보였으며, 본 실험에서는 기저 상태 및 TGF-β1 자극 상태에서 제 1, 2형 교원질의 세포외 농도에 관계없이 일정한 단백다당의 생성을 관찰할 수 있었다.

이와 같이 Qi 와 Scully[32]가 관찰했던 관절 연골과 기질과의 상호 작용과 달리 본 연구에서 추간판 수핵 세포가 서로 다른 반응을 보인 것은 첫째로, 두 세포간에 형태나 역할이 유사하다 하더라도 여러 가지의 성장 인자에 대해서 서로 다른 반응을 보인다는 점이다. IGF-I는 성장 호르몬의 작용을 중개하고, 관절 연골 세포에 대해서는 단백다당의 합성에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22,25]. 그러나, 척추의 추간판 세포에서 이 성장 인자의 영향은 TGF-β1이나 epidermal growth factor와 비교

해 볼 때 세포의 증식이나 분화가 미미하다는 주장이 있다[19,37].

둘째는 두 조직은 발생 기원이 전혀 다르다는 점이다. 즉, 추간판의 수핵 세포 중에는 신경 외배엽에서 기원한 세포가 많이 존재하는 반면에 관절의 연골 세포는 중배엽인 간엽 조직 (mesenchyme)에서 기원하므로, 발생학적으로 다른 세포 군으로 이루어져 있다는 점이다. 본 연구에서는 추간판 세포를 구성하는 연골양 세포 (chondrocyte-like cell)와 척색 세포 (notochordal cell)을 따로 분리하여 배양하지는 않았다는 제약이 있으나, 발생학적으로 다른 세포이기에 관절의 연골 세포와는 상이한 결과를 보인 것으로 생각된다.

세 번째 이유로는 실험 대상이 서로 다르다는 점도 어느 정도는 관계되리라 사료된다. 즉, 본 연구는 가토를 사용하였으나, Qi 와 Scully[32]의 경우는 송아지를 실험 재료로 사용하였다.

네 번째 이유로는 세포의 삼차원 배양을 하는데 있어서, 추간판 세포와 교원질이 integrin이라는 receptor를 통해서 세포와 기질간에 상호 작용을 하게 되어 있는데, 배양의 기간이 3일로 비교적 짧았으므로, 추간판 세포와 교원질 사이에서 integrin을 경유한 충분한 양의 정보 전달이 이루어지지 않았을 가능성이 있다.

마지막으로 각 군의 표본수가 비교적 적었고, 단백다당의 양 (quantity)으로 결과를 측정하였으며, 단백다당의 응괴 (aggregate)의 크기와 같은 단백다당의 질 (quality)에 대한 검사는 하지 않았다는데 본 연구의 한계가 있으며, 이러한 본 연구의 한계점은 이후에 많은 실험과 연구로써 극복이 되어야 할 것이다.

결 론

유전자 치료의 유용성에 대한 가능성이 최근에 대두되고 있다. 그러나, 이러한 유전자 치료의 효과가 퇴행성 변화로 인해 초래된 세포외 기질의 변화 때문에 시술자가 원하는 표적 기관에서 소기의 목적을 달성하치 못할 수도 있다. 본 연구의 결과를 미루어 보아, 추간판 세포는 세포외 기질인 교원질의 농도에 무관하게 단백다당을 생성하며, TGF-β에 의해 세포외 기질인 단백다당의 합성이 촉진이 되었으며, 이러한 결과는 개개인의 혹은 부위별로 여러 가지 다른 조건에서 추간판의 유전자 치료를 시행함에 있어서, 추간판 세포가 세포외 기질의 변화와 무관하게 일정한 단백다당을 합성하므로, 향후에 추간판 퇴행의 유전자 치료에 있어서 다양한 조건에서도 유전자 치료법이 가능할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) **Anderson JAD** : *Back pain and occupation. In: Jayson MIV ed. The lumbar Spine and Back Pain.3rd ed. London, Chirchill Livingstone: 2-36,1987.*

2) **Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al** : *The human lumbar vertebral disc: evidence of changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. J Clin Invest, 98:996-1003,1996.*

3) **Ballock RT, Heydemann A, Izumi T and Reddi AH** : *Regulation of the expression of the type-II collagen gene in periosteum-derived cells by three members of the transforming growth factor-beta superfamily. J Orthop Res, 15:463-467,1997.*

4) **Benya PD and Shaffer JD** : *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 30:215-224,1982.*

5) **Borenstein D** : *Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheumatol, 4:226-232,1992.*

6) **Buckwalter JA** : *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 20:1307-1314,1995.*

7) **Buckwalter JA, Pedrini-Mille A, Pedrini V and Tudisco C** : *Proteoglycans of human infant intervertebral disc: electron microscopic and biochemical studies. J Bone Joint Surg, 67-A:284-294,1985.*

8) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, McNeill TW and Huckman MD** : *Discs degenerate before facets. Spine, 15:111-113,1990.*

9) **Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic E and Shapiro IM** : *Bioactive glass serves as a substrate for maintenance of phenotype of nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. J Biomed Mater Res,51:596-604,2000.*

10) **Gruber HE, Fisher EC Jr, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G and Hanley EN Jr** : *Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-β. Exp Cell Res, 235:13-21,1997.*

11) **Hayes AJ, Benjamin A and Ralphs JR** : *Role of actin stress fibers in the development of the Intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. Dev Dyn, 215:179-189,1999.*

12) **Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Horton WC and Carr K** : *Analysis of chondroitin sulfate in the lumbar intervertebral discs at two different stages of degeneration*

as assayed by discogram. J Spinal Disord, 10:47-54,1997.

13) **Ichimura K, Tsuji H, Matsui H and Makiyama N** : *Cell culture of the Intervertebral disc of rats: factors influenc - ing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis. J Spinal Disord, 4:428-436,1991.*

14) **Ingber DE and Folkman J** : *Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. J Cell Biol, 109:317-330,1989.*

15) **Inkinen RI, Lammi MJ, Lehmonen S, Puustjarvi K, Kaapa E and Tammi MI** : *Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. J Rheumatol, 25:506-514,1998.*

16) **Itay S, Abramovici A and Nevo Z** : *Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. Clin Orthop, 220:284-303,1987.*

17) **Kim BS and Jahng JS** : *Change of the effect of TGF-β on physeal chondrocytes according to culture methods in vitro. J of Korean Orthop Assoc, 34:849-857,1999.*

18) **Konttinen YT, Kemppinen P, Li TF, et al** : *Transform - ing and epidermal growth factors in degenerated interver - tebral discs. J Bone Joint Surg, 81-B:1058-1063,1999.*

19) **Lee JW and Kim NH** : *Change of type I and type II col - lagen biosynthesis by growth factors in cultured cells iso - lated from rabbit intervertebral disc. J of Korean Orthop Assoc, 33:1867-1882,1998.*

20) **Lehmann TR, Spratt KF, Tozzi JE, et al** : *Long-term follow-up of lower lumbar fusion patients. Spine, 12:97-104,1987.*

21) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210,1981.*

22) **Luyten FP, Hascall VC, Nisseley SP, Morales TI and Reddi AH** : *Insulin-like growth factors maintain steady state metabolism of proteoglycans in bovine articular car - tilage explants. Arch Biochem Biophys, 267:416-425,1988.*

23) **Maldonado BA and Oegema TR Jr** : *Initial characteri - zation of the metabolism of intervertebral disc cells encap - sulated in microspheres. J Orthop Res, 10:677-690,1992.*

24) **Mankin HJ** : *Localization of tritiated thymidine in articu - lar cartilage of rabbits. J Bone Joint Surg, 44-A:688 - 698,1962.*

25) **Morales TI** : *Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-1 restore proteoglycan metabo - lism of bovine articular cartilage after depletion by retinoic acid. Arch Biochem Biophys, 315:190-198,1994.*

26) **Morales TI and Roberts AB** : *Transforming growth fac - tor beta regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. J Biol Chem, 263:12828-12831,1988.*

27) **Mosher DF** : *Physiology of thrombospondin. Annu Rev Med, 41:85-97,1990.*

28) **Nishida K, Gilbertson LG, Robbins PD, Evans CH and Kang JD** : *Potential applications of gene therapy to the treatment of intervertebral disc disorders. Clin Orthop, 379 Suppl:234-241,2000.*

29) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al** : *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. Spine, 24:2419-2425,1999.*

30) **O 'Driscoll SW, Keeley FW and Salter RB** : *Durability of regenerated articular cartilage produced by free auto - genous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. a follow-up report at one year. J Bone Joint Surg, 70-A:595-606,1988.*

31) **Qi WN and Scully SP** : *Effect of type II collagen in chon - drocyte response to TGF-β regulation. Exp Cell Res, 241:142-150,1998.*

32) **Qi WN and Scully SP** : *Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-beta1. J Orthop Res, 15:483-490,1997.*

33) **Robinson D, Mirovsky Y, Halperin N, Evron Z and Nevo Z** : *Changes in proteoglycans of intervertebral disc in diabetic patients: a possible cause of increased back pain. Spine, 23:849-856,1998.*

34) **Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M and Shimomura Y** : *The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrosus cells cultured in vitro. Spine, 13:1284-1290,1988.*

35) **Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T and Shimomura Y** : *The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation. J Rheumatol, (Suppl 18)16:32-34,1989.*

36) **Sporn MB and Roberts AB** : *Transforming growth fac - tor-β recent progress and new challenges. J Cell Biol, 119:1017-1021,1992.*

37) **Thompson JP, Oegema TR and Bradford DS** : *Stimula - tion of mature canine intervertebral disc by growth fac - tors. Spine, 16:253-260,1991.*

38) **Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D and Doctrow SR** : *Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. J Bone Joint Surg, 75-A:177-189,1993.*

39) **Vacanti CA, Langer R, Schloo B and Vacanti JP** : *Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast Reconstr Surg, 88:753-759,1991.*

40) **Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, et al** : *Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. J Bone Joint Surg, 71-B:74-80,1989.*

국 문 초 록

연구계획 : 시험관내 실험 연구

연구목적 : 토끼의 추간판 세포를 alginate bead를 이용한 3차원 배양 시에 transforming growth factor β1과 제 1형 및 제 2형 교원질이 추간판 세포의 기질 생성에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

대상 및 방법 : 성장이 끝난 10마리의 토끼에서 추간판 조직을 채취하여 수핵 세포를 시험관에서 일차 배양하였다. 제 1형 교원질과 제 2형 교원질 농도를 각각 0.5%, 1.0%, 1.5%로 변화시키면서 alginate solution과 혼합하였으며, TGF-β1 (10 ng/ml)의 투여군과 투여하지 않은 군으로 구분하여, alginate bead에서 3차원 배양을 시행하여, 추간판 세포의 단백다당의 합성율을 측정하였다. 새로 생성된 단백다당의 측정은 ^{35}S-sulfate incorporation 방법을 이용하여 측정하였으며, Hoechst 형광염색법을이용한 DNA의양으로서추간판세포에대한표준화를시행하여합성율을측정하였다 .

결과 : 추간판 세포를 제 1형 및 2형 교원질을 이용하여 3차원 배양 시에 TGF-β1을 투여하였을 때는 성장 인자를 투여하지 않은 군에 비해 단백다당의 합성율이 증가하였으며 ($p < 0.05$), 제 1형 교원질과 제 2형 교원질 농도의 증가는 단백다당의 합성율에 영향을 주지 않았다.

결론 : 본 연구의 결과는 개개인의 혹은 부위별로 여러 가지 다른 조건에서 추간판의 유전자 치료를 시행함에 있어서, 추간판 세포가 세포외 기질의 변화와 무관하게 일정한 단백다당을 합성하므로, 향후에 추간판의 유전자 치료에 있어서 다양한 퇴행 상태에서도 유전자 치료법이 가능할 것으로 사료된다.

색인단어 : 세포외 기질, 당단백, 수핵 세포, TGF-β1

※ 통신저자 : 문 성 환
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel : 82-2-361-5649, Fax : 82-2-363-1139, E-mail : shmoon@yumc.yonsei.ac.kr