

요추 후관절 활액막액이 척추  
황색인대의 비대화와 골화에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

박 시 영

요추 후관절 활액막액이 척추  
황색 인대의 비대화와 골화에  
미치는 영향

지도교수 이 환 모

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2006 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 시 영

# 박시영의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006 년 12 월 일

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 정형외과 의사로서, 학문을 연구하는 학자로서 모범을 보여주시고 깊은 애정과 자상한 지도로 이끌어 주신 이환모 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 본 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 문성환 교수님, 김동준 교수님, 임승길 교수님, 윤도흠 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 정형외과 전공의 및 전임의 과정을 거치며 애정 어린 가르침과 지도를 해주신 연세대학교 정형외과학 교실의 모든 교수님들께도 감사를 드립니다.

언제나 변함없이 저를 후원해 주시고 사랑해 주시는 양가 부모님들께도 감사를 드리며 논문 완성의 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 마지막으로 언제나 곁에서 힘이 되어준 사랑스러운 아내 경윤과 이 세상 그 무엇과도 바꿀 수 없는 사랑스런 아들 현수와 딸 서정에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀 .

## <차례>

국문요약.....	1
I. 서론 .....	4
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 방사선학적 평가.....	6
2. 연구재료 .....	7
3. 연구방법 .....	7
III. 결과 .....	14
1. 방사선학적 평가 .....	14
2. Alamarblue assay 를 통한 세포독성 및 증식 .....	18
3. 골형성 전사인자인 Dlx5, Runx2, osterix, 그리고 osteocalcin 의 mRNA 발현 .....	19
4. 제 1 형, 3 형, 5 형, 11 형 교원질의 mRNA 발현 .....	21
5. 활액막액 처리에 의한 인간 황색 인대 세포의 Osteocalcin 단백질 발현.....	23
6. 활액막액 처리에 의한 인간 황색 인대 세포의 ALP 염색 .....	24
IV. 고찰 .....	25
V. 결론 .....	31
참고문헌.....	32
영문요약.....	38

## 그림 차례

그림 1. Results of sum of Grogan's score.....	15
그림 2. Correlation between sum of Grogan's score and ligamentum flavum thickness .....	17
그림 3. Correlation between thickness of ligamentum flavum and disc height .....	18
그림 4. The results of alamarblue assay for cytotoxicity and cellular metabolism .....	19
그림 5. RT-PCR products of osteogenic transcription factors, collagens and osteocalcin.....	20
그림 6. mRNA expression of Dlx5, Runx2, osterix, osteocalcin. ....	21
그림 7. mRNA expression of collagens. ....	22
그림 8. Expression of osteocalcin protein. ....	23
그림 9. Expression of alkaline phosphatase.....	24

## 표 차례

표 1. Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA .....	10
표 2. PCR conditions .....	11
표 3. Demographic data .....	16

## 국문요약

### 요추 후관절 활액막액이 척추 황색인대의 비대화와 골화에 미치는 영향

요추 척추관 협착증에서 흔히 동반하는 후관절의 퇴행성 변화가 황색인대의 변화와 관계 있는지 방사선학적으로 알아보고, 시험관내에서 분리 배양한 황색인대 세포를 요추 척추관 협착증 환자의 후관절에서 얻은 활액막액으로 자극하였을 때, 후관절의 활액막액이 황색인대 세포의 증식, 교원질 생성 및 골형성에 어떤 영향을 끼치는 지에 대하여 알아보려고 하였다.

60 세에서 70 세 사이의 요추부 통증으로 척추 자기공명 영상검사를 시행한 80 명의 환자에서 제 4-5 요추 후관절의 퇴행성 변화 정도와 추간판의 퇴행성 변화 정도, 추간판의 높이, 황색인대의 두께를 측정하여 그 연관성을 비교 분석하였다. 또한 요추 척추관 협착증 환자의 수술 시 얻은 황색인대와 후관절의 활액막액을 배양하였다. 활액막 상층액을 처리하여 황색인대 세포를 배양한 실험군과, 처리하지 않은 대조군으로 나누어 실험하였다. 세포의 대사 활성 및 생존력을 확인하기 위해 alamarblue assay 를 실시하였고, 골형성 관련 유전자 및 osteocalcin, 그리고 교원질 유전자의 변화를 확인하고자 RT-PCR 을 통하여 분석하였다. 골형성 능력을 알아보기 위해 alkaline phosphatase 염색을 실시하였고, western blot 을 이용하여 osteocalcin 단백질 발현 정도를 알아보았다.



방사선학적으로 후관절의 퇴행변화가 심할수록 척추 황색인대의 두께가 증가됨을 알 수 있었다. ( $p < 0.05$ )

Aalamarblue assay 를 한 결과, 황색인대 세포에 활액막액이 무독성인 것을 확인하였으며, 실험군에서 골형성 전사인자인 Dlx5, Runx2, 그리고 osterix 의 mRNA 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, osteocalcin 과 교원질의 mRNA 의 발현 역시 급격한 증가를 보였고, alkaline phosphatase 염색을 통해 골화가 진행되는 것을 확인할 수 있었고 western blot 을 통해 골형성 표지자인 osteocalcin 단백질의 발현이 증가함을 알 수 있었다.

즉 척추 후관절의 퇴행성 변화가 심할수록 척추 황색인대가 비대해지는 것을 방사선학적으로 알 수 있었으며, 요추 척추관 협착증 환자로부터 추출한 요추 후관절의 활액막 상층액은 황색인대 세포의 증식 및 골형성 인자 발현과 교원질 발현을 증가시켰다. 따라서 척추 후관절의 퇴행 변화는 황색인대의 비후 및 골화에 중요한 영향을 끼치는 것으로 생각된다.

---

**핵심되는말:** 척추협착증, 황색인대, 척추 후관절, 비후, 골화

요추 후관절 활액막액이 척추 황색인대의 비대화와 골화에  
미치는 영향

<지도교수 : 이 환 모>

연세대학교 대학원 의학과

박 시 영

## I. 서론

요추 척추관 협착증은 중앙의 척추관, 신경근이 주행하는 후관절의 전 내측이 있는 신경근관 또는 추간공이 좁아지면서 신경에 압박이 오고, 물리적 화학적 변화를 일으켜 요통이나 하지에 여러 가지 복합된 신경증상을 일으키는 질환이다.<sup>1</sup> 요추 척추관 협착증의 주요 병인으로는 돌출된 추간판, 후관절의 퇴행성 비대, 그리고 황색인대의 섬유화에 따른 비대화 등을 들 수 있다.<sup>2,3</sup>

이 중 후관절은 초차 연골로 둘러 싸여진 활액막 관절로서 척추의 각 분절에 2 개씩 존재하며, 각각의 움직임은 극히 적지만 복합운동을 하기 때문에 전체적으로 상당한 운동 범위를 보인다. 후관절의 활액막은 통증에 예민한 조직이며, 척추에 가해지는 하중의 1/4 정도가 후관절로 전달된다.<sup>4,5</sup> 따라서 나이가 들면서 요추 후관절에도 퇴행성 변화가 오게 되며, 프로스타글란딘이나 그 외의 많은 염증성 사이토카인들이 퇴행성 변화가 있는 후관절에서 분비됨이 증명되었다.<sup>6-8</sup> 최근 류마치스성 관절염에서처럼 퇴행성 관절염에서도 관절 활막의 염증성 변화로 인해 증상이 유발되고, 이로 인하여 관절의 연골이나 관절 활액막의 염증성 변화가 통증을 유발시키고 또한 관절 및 주위 구조에 손상을 주는 것이 보고되었다.<sup>9-13</sup> 즉 척추 후관절의 퇴행성 변화와 같은 물리적인 영향

이외에도 염증성 물질로 인한 화학적 영향이 퇴행성 요추 질환의 발병에 영향을 미칠 수 있다. 또한 퇴행성 변화가 심해지면 척추 후관절에서 분비되는 염증성 사이토카인들이 인접한 황색인대의 퇴행성 변화에 영향을 끼칠 수도 있다.

퇴행 변화가 된 추간관이 황색인대의 비후 및 골화에 영향을 끼친다는 보고는 있지만, 퇴행 및 비대화된 척추 후관절과 황색인대의 비후 및 골화 간의 관계에 대한 연구는 없었다.<sup>14,15</sup>

따라서 본 연구에서는 자기공명 영상을 이용하여 방사선학적으로 척추 후관절의 퇴행성 변화와 황색인대의 변화와의 관계를 알아보고, 시험관내에서 분리 배양한 요추 척추관 협착증 환자의 황색인대 세포를 요추 척추관 협착증 환자의 후관절에서 얻은 활액막액으로 자극시켰을 때, 시간에 따라 활액막액이 황색인대 세포의 증식, 교원질 생성 및 골형성에 어떤 영향을 끼치는 지 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 방사선학적 평가

60세에서 70세 사이의 요추부 통증으로 척추 자기공명 영상검사를 시행한 척추 전방 전위증 및 다 분절의 척추 추간판의 퇴행성 변화가 없는 총 80명의 환자에서 제4-5요추 후관절의 퇴행성 변화 정도를 Grogan등에 의한 방법<sup>16</sup>으로 연골 소실 정도, 연골 하골의 경화 정도, 골 극의 형성 정도에 따라 각 4군으로 분류한 후, 그 합한 점수와 자기공명 영상에서 추간판의 퇴행성 변화 정도<sup>17,18</sup>, 추간판의 높이, 비후된 척추 황색인대의 두께를 측정하여 그 연관성을 비교 분석하였다. 평균 나이는 64.3세였고 남자 32명 여자 48명이었다. 추간판의 퇴행성 변화 정도는 Thompson 등에 의한 방법으로 5군으로 나누었고, 추간판의 높이는 측정 오차를 줄이기 위하여 제3-4 요추간의 추간판 높이와 제5 요추 제1 천추간의 추간판 높이를 측정하여 이 평균 값과 측정한 제4-5 요추간 추간판 높이의 백분율로 계산하였다. 척추 황색인대의 두께는 자기 공명 영상에서 제4-5요추간의 중간 부분에서 좌,우의 가장 두꺼운 부분을 측정하였다.

## 2. 연구 재료

요추 척추관 협착증으로 감압술을 시행 받았던 10 명의 환자에게서 수술 시 퇴행 비대화된 척추 황색인대를 얻었고, 또한 요추 척추관 협착증으로 감압술을 시행 받은 20 명의 환자에서 퇴행된 척추 후관절 활액막액을 채취하였다.

## 3. 연구 방법

### 가) 척추 황색 인대 세포 배양

채취된 황색 인대 조직을 멸균된 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)로 한차례 닦아서 환자의 혈액 성분을 제거한 후, 5%의 우태아 혈청 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)이 들어 있는 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM) 에서 미세 가위를 이용하여 조직을 잘게 자른 후 조직 단편을 250U/ml 의 제 1A 형 collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 함유된 DMEM 배지에서 2 시간 동안 효소 처리하여 황색 인대 조직을 5%의 우태아 혈청이 들어 있는 배지로 두 차례 씻어 낸 후, 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)이 들어 있는 DMEM 배지로 교반하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 나) 척추 후관절의 활액막 조직 배양

채취된 후관절의 활액막 조직을 일정량의 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 들어있는 튜브에 넣어 그 수치의 차이를 이용해 무게를 확인한 후, 200mg/ml 의 농도로 0.1% 우태아혈청이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium 과 Hams F-12 medium (DMEM/F-12)을 처리한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3 일간 배양 후 각각의 상층액을 모아 원심분리기로 상층액만 모은 후, 우태아혈청과 10mM Glycerophosphate 가 함유된  $\alpha$ -MEM 배지 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 상층액을 1:1 의 비율로 혼합한 후, 황색인대 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 다) Alamarblue assay 를 통한 세포 증식 반응 측정

배양된 황색 인대 세포의 대사활성을 감지하기 위한 10% Alamarblue 용액 (Serotec, Oxford, UK)을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하면서 배양 기간 (1 일, 2 일, 3 일)에 따라 분광광도계를 사용하여 570 nm 과 600nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 황색 인대 세포의 증식 및 활액막 상층액의 독성 여부를 분석하였다.

## 라) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction을 이용한 mRNA 발현 검사

RNeasy mini kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA)를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 황색 인대 세포의 RNA 1  $\mu\text{g}$ 와 oligo cellulose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1  $\mu\text{l}$  와 3 차 증류수를 혼합하여 50  $\mu\text{l}$ 으로 혼합한 후, AccuPower RT-premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 넣어 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 하였다. 42°C에서 60 분, 94°C에서 5 분간 반응하여 cDNA 를 합성하고, 합성한 cDNA 를 에탄올로 정제하여, 최종 부피 20  $\mu\text{l}$ 를 만들어, 이중 각각의 cDNA 1  $\mu\text{l}$ 를 취하여, sense primer 와 antisense primer, 3 차 증류수를 혼합하여 10  $\mu\text{l}$ 의 반응용액을 만들어 Sapphire PCR-premix (Sapphire bioscience, Redfern, Australia)에 넣고, RT-PCR 을 시행하였다. PCR 생성물은 2% agrose 젤에서 전기영동을 통해 각 유전자의 발현을 검출하고, RT-PCR 에 대한 대조군으로 GAPDH 를 사용하며 각각의 발현 정도를 비교 분석하였다. (Table 1,2)



**Table 1.** Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA

Gene	Sequence (5'→3')	Length	Size(bp)
Dlx5	TGA CAG GAG TGT TTG ACA GA	20	378 bp
	TGA TAC TGG TAG GGG TTG AG	20	
Runx2	AGA TGG GAC TGT GGT TAC TG	20	321 bp
	GTA GCT ACT TGG GGA GGA TT	20	
Osterix	CCT TTA CAA GCA CTA ATG GG	20	367 bp
	CAC CAT GGA GTA GGA GTG TT	20	
Osteocalcin	CAC TCC TCG CCC TAT TGG CC	20	237 bp
	GCC AAC TCG TCA CAG TCC GG	20	
Collagen type I	CCT GTC TGC TTC CTG TTA AC	20	182 bp
	AGA GAT GAA TGC AAA GGA AA	20	
Collagen type III	CTG CCA TCC TGA ACT CAA GAG TGG	24	447 bp
	CCA TCC TCC AGA ACT GTG TAG G	22	
Collagen type V	GGA TGA GGA GGT GTT TGA	18	345 bp
	GCC CCT TCA CTG GTT TCA	18	
Collagen type XI	GCT GAA AGT GTA ACA GAG GG	20	452 bp
	GGT TCT CCT TTC TGT CCT TT	20	
Beta actin	GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG	20	238 bp
	AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA	20	

**Table 2.** PCR conditions

Primer	Conditions						
	Denaturation		Annealing		Polymerization		Cycles
Dlx5	94°C	5sec	58°C	5sec	72°C	30sec	35
Runx2	94°C	5sec	58°C	5sec	72°C	30sec	35
Osterix	94°C	5sec	55°C	5sec	72°C	30sec	30
Osteocalcin	94°C	5sec	60°C	5sec	72°C	30sec	30
Collagen type I	94°C	5sec	48°C	5sec	72°C	30sec	25
Collagen type III	94°C	30sec	54°C	30sec	72°C	1min	30
Collagen type V	94°C	30sec	60°C	30sec	72°C	1min	35
Collagen type XI	94°C	30sec	54°C	30sec	72°C	1min	40
Beta-actin	94°C	5sec	53°C	5sec	72°C	30sec	24

#### **마) Western Blot analysis를 이용한 osteocalcin 발현 검사**

Lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, protease inhibitor mixture) (Sigma, St Louis, MO, USA)를 이용하여 세포 용해물을 만들고 이를 10% tricine-SDS gel을 이용하여 분리, 전이하여, osteocalcin를 분석하기 위해 1×TBST with 5% 탈지유에 blotted membrane을 rabbit anti-osteocalcin antibody (1:10,000 dilution) (Chemicon international, Temecula, CA, USA)에 1시간 노출시켰다. 막은 1×TBST으로 세척 후 secondary antibody (1:10,000 dilution of goat anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase conjugated) (Chemicon international, Temecula, CA, USA)에 노출시키고 상온에서 45분간 보관한 후 Immuno-reactive bands는 1×TBST로 3번 세척 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### **바) Alkaline phosphatase 염색**

황색 인대 세포를 citrate buffered acetone (Sigma, St Louis, MO, USA)이 들어 있는 고정액을 사용하여 30 초 동안 고정시킨 후, 증류수로 45 초 동안 씻어 내고 미리 준비해 둔 alkaline-dye

mixture (Sigma, St Louis, MO, USA)를 적용하여, 상온에서 빛을 차단 한 채 30 분 동안 반응시킨 후 세포를 2 분 동안 증류수로 씻어낸 후 Mayer's Hematoxylin 용액에서 10 분간 반응시켜 관찰하였다.

### **사) 비교실험**

황색 인대 세포에 0.1% 우태아혈청, 10mM  $\beta$ -Glycero phosphate 이 함유된  $\alpha$ -MEM, 그리고 활액막 조직 상층액을 1:1 로 혼합한 용액을 각각 처리하여 배양한 총 30 레의 배양군에서 세포 증식 반응 및 골형성 전사 인자 (Runx2, Dlx5, Osterix)와 제 1 형, 3 형, 5 형, 11 형 교원질, 그리고 osteocalcin 에 대한 mRNA 발현을 측정하였으며, Alkaline phosphatase 염색 및 Western Blot 을 이용한 osteocalcin 발현 검사를 하였다. 한편, 활액막 조직 상층액 대신 우태아혈청이 함유되지 않은 DMEM/F-12 를 동량 처리한 30 레의 황색 인대 세포를 대조군으로 정하였다.

### **아) 통계**

위와 같은 실험 시행하여 결과를 얻었으며, SPSS (SPSS Inc. Chicago IL)를 이용하여 처리하였다. One-way Analysis of variance 및 Fisher's protected LSD post-hoc test로 실험군간 비교하였다.

방사선학적인 평가의 통계 분석은 linear regression analysis를 이용하여 각 변수 사이의 상관 관계를 조사하였다. 통계 방법의 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 정하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. 방사선학적 평가

Grogan등에 의한 분류 방법으로 시행한 제4-5요추간의 후관 절의 퇴행 변화 정도는 3점에서 퇴행성 변화의 정도가 가장 심한 12점까지 측정 되었다. (Figure 1) 척추 황색인대의 두께는 좌측이  $5.1 \pm 1.8\text{mm}$ , 우측이  $5.3 \pm 1.9\text{mm}$ 였고 이 두 군간의 통계학적인 차이는 보이지 않았다. ( $p > 0.05$ ) 제4-5 요추간 추간판 높이는 주변 추간판 높이에 비하여 평균  $78 \pm 12.6\%$ 였으며, 퇴행성 변화 정도는 제1군이 6례, 제2군이 20례, 제3군이 32례, 제4군이 17례, 제5군이 5례였다. (Table 3)

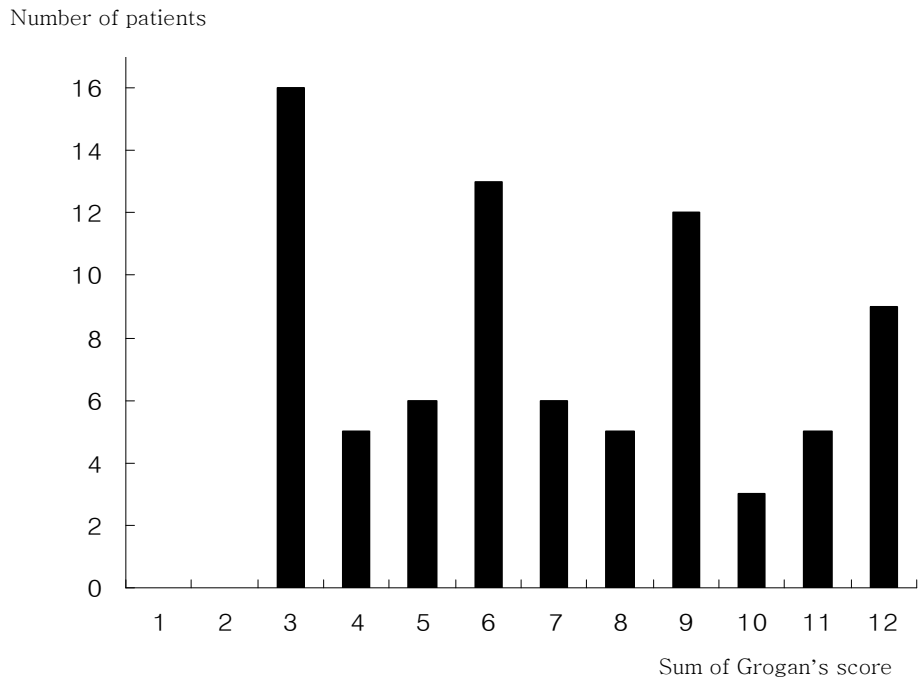


Figure 1. Results of sum of Grogan's score

For the evaluation of facet joint degeneration, the degree of articular cartilage degeneration, subchondral bone sclerosis and osteophyte formation was scored into four grades according to the classification proposed by Grogan et al. Grade 1 indicates normal, and grade 4 indicated severe degeneration.

**Table 3.** Demographic data

Number of patients		80
Age (years old)		64.3±2.7
Sex (Male:Female)		32:48
Thickness of LF*(mm)	<i>Left</i>	5.1±1.8
	<i>Right</i>	5.3±1.9
Disc height (%)		78±12.6
Disc degeneration**	Grade	Number of patients
	I	6
	II	20
	III	32
	IV	17
	V	5

\* : Ligamentum flavum

\*\* : Disc degeneration was classified into five grades according to Thompson's criterion using T2 weighted sagittal images.

Linear regression analysis상 Grogan 점수의 합이 높으면 높을수록, 즉 후관절의 퇴행 변화가 심할수록 척추 황색인대의 두께가 증가되었다. ( $p < 0.05$ ) (Figure 2) 또한 Grogan 점수가 높을 수록, 척추 추간판의 퇴행성 변화 정도가 심해지는 양상을 보였으나, 추간판 높이의 감소가 심한 제 V군을 제외하면 특이한 상관관계를 보이지 않았다. ( $p > 0.05$ ) 또한 추간판 높이가 인접 추간판 높이에 비하여 감소할수록 척추 황색인대가 비대화되었다. ( $p < 0.05$ ) (Figure 3)

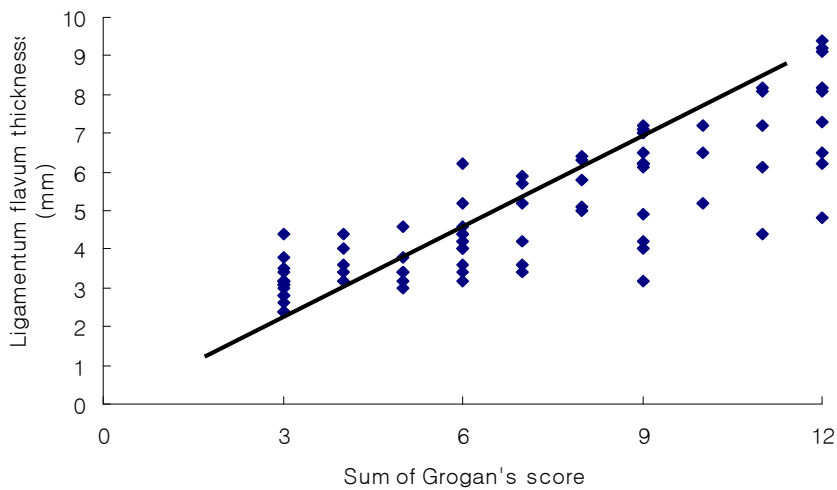


Figure 2. Correlation between sum of Grogan's score and ligamentum flavum thickness.

Linear regression analysis reveals positive correlation of sum of Grogan's score to ligamentum flavum thickness

$$\text{Ligamentum flavum thickness} = 0.71 \times \text{sum of Grogan's score} - 0.002$$

$$R^2 = 0.71 \quad (p < 0.05)$$



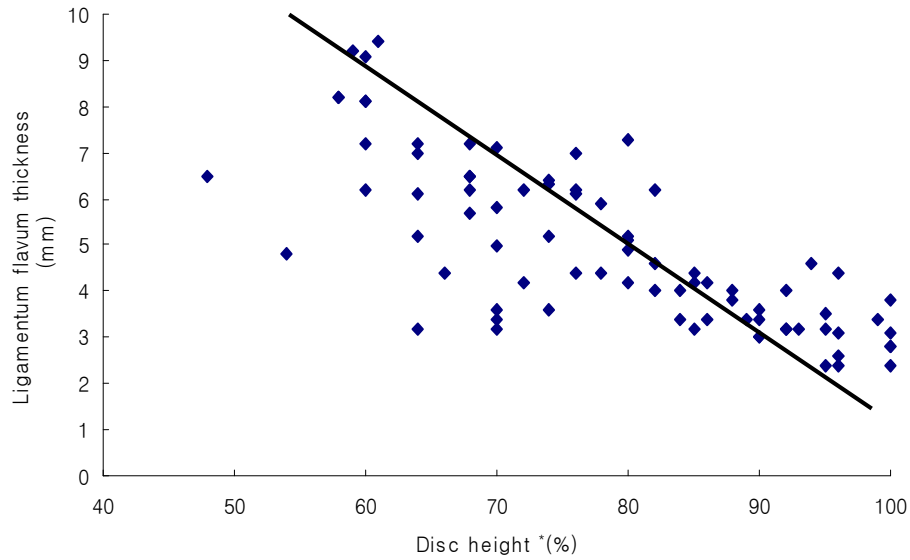


Figure 3. Correlation between thickness of ligamentum flavum and disc height

Linear regression analysis reveals negative correlation of disc height(%) to ligamentum flavum thickness.

$$\text{Ligamentum flavum thickness} = -0.10 \times \text{disc height}(\%) + 13.02$$

$$R^2 = 0.58 \quad (p < 0.05)$$

## 2. Alamarblue assay를 통한 세포 독성 및 세포 증식

Alamarblue solution을 통해 시간에 따른 세포의 독성 및 증식을 알아본 결과, 활액막 조직 상층액을 처리한 황색인대 세포는 대

조군보다 약 10% 높은 세포 대사활성을 보였다. ( $p < 0.05$ ) 또한 세포를 배양한 시간이 지남에 따라 두 군에서 모두 세포의 대사 활성이 급격하게 증가하였다. (Figure 4)

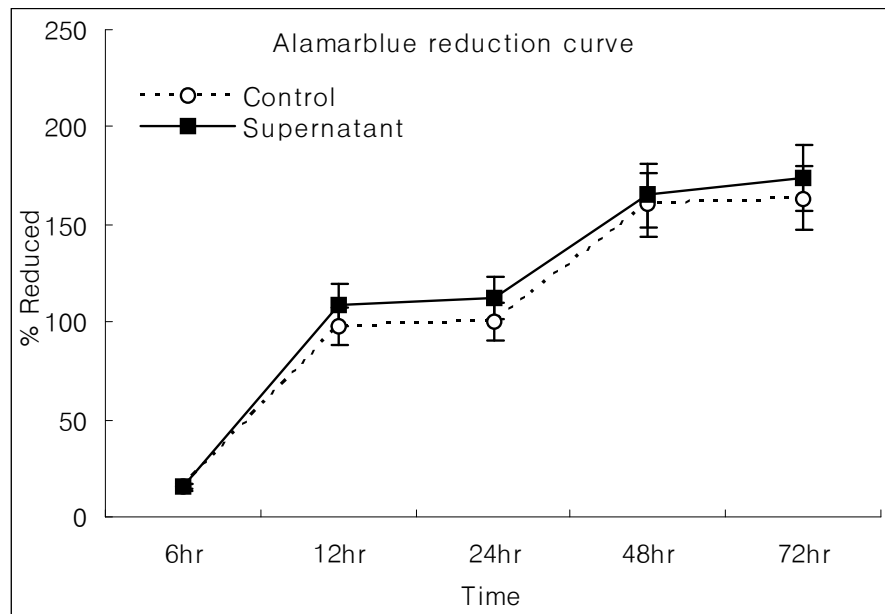


Figure 4. The results of alamarblue assay for cytotoxicity and cellular metabolism.

Supernatant group's cellular metabolism is larger than control's. ( $p < 0.05$ )

Control : cultured ligamentum flavum cell + culture media mixture

Supernatant : cultured ligamentum flavum cell + synovium supernatant

### 3. 골형성 전사인자인 Dlx5, Runx2, osterix, osteocalcin의 mRNA 발현

활액막 조직 상층액을 처리한 황색인대 세포 실험군은 대조군에 비해 더 높은 Dlx5, Runx2, osterix 의 mRNA 의 발현

증가를 보였다. 특히 배양한 지 6 시간 후의 실험군의 경우, 1 시간 후에 비해 Dlx5, Runx2, osterix 의 발현이 증가 되는 양상을 보였다. 또한 6 시간 이후에 시간이 지날수록 대조군은 골형성 전사인자들의 발현이 줄어드는 반면에, 실험군은 꾸준히 증가하였다. 역시 골형성 표현인자인 osteocalcin mRNA 발현의 경우도 대조군에 비해 높은 발현 증가를 하였으며, 시간이 지남에 따라 많은 발현이 증가하였다. (Figure 5.6)

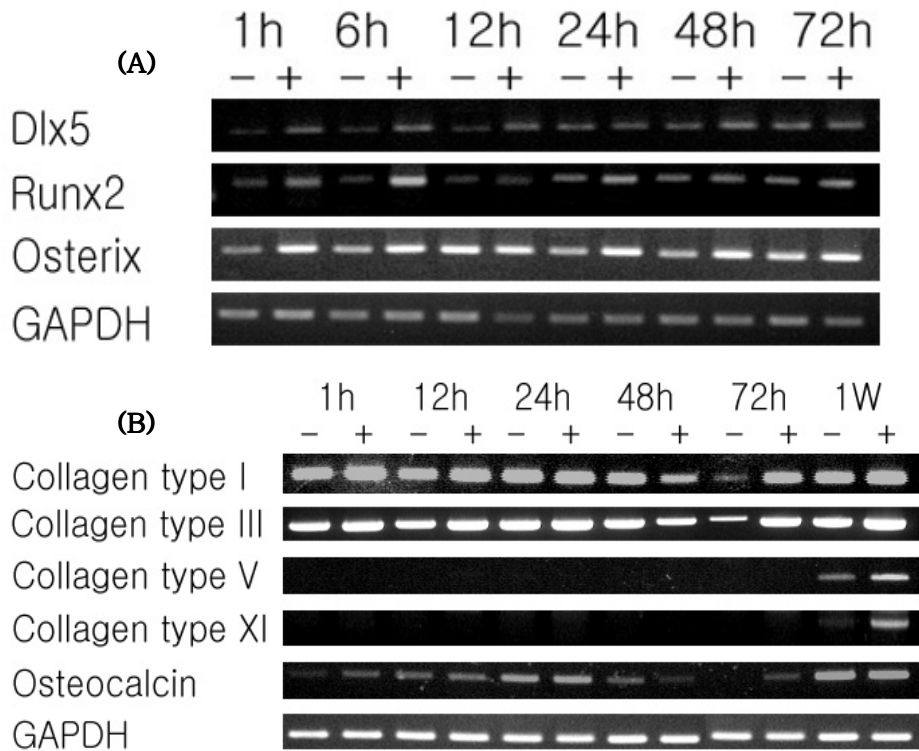
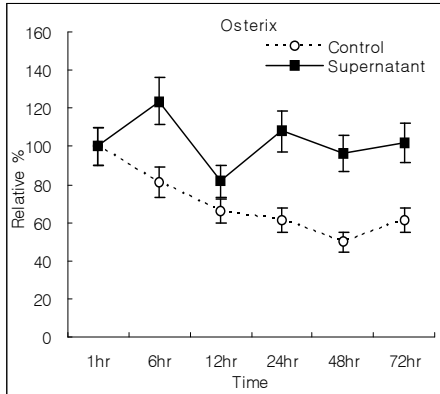
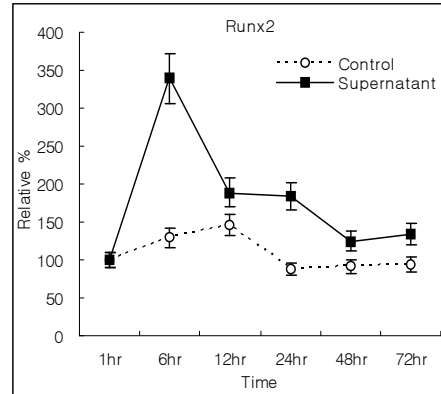


Figure 5. RT-PCR products of osteogenic transcription factors, collagens and osteocalcin. (A) mRNA of Dlx5, Runx2, Osterix. (B) mRNA of collagen I, III, V, XI and Osteocalcin.

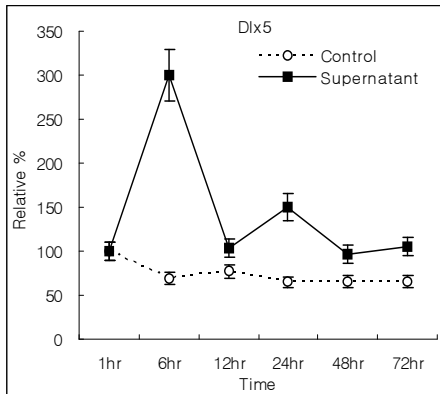
A) Osterix



B) Runx2



C) Dlx5



D) Osteocalcin

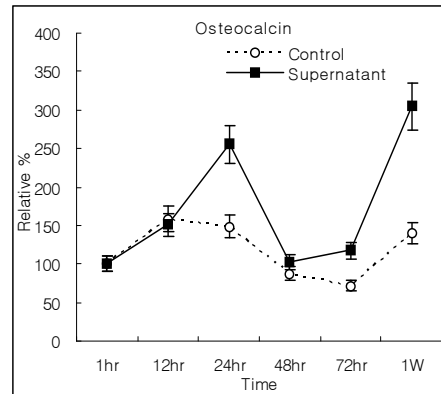


Figure 6. mRNA expression of Dlx5, Runx2, osterix, osteocalcin

#### 4. 제 1형, 3형, 5형, 11형 교원질의 mRNA 발현

활액막 조직 상층액을 처리한 황색인대 세포 실험군은 대조군에 비해 제 1형, 3형, 5형, 그리고 11형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였다. 제 1형, 3형 교원질의 경우 대조군에 비해

꾸준한 발현 증가 하였으며, 48 시간 및 1 주일째에서 활발한 증가를 보였다. 특히 제 5 형 교원질은 1 주일째에서 6200%의 가장 높은 증가율을 보였으며, 제 11 형 교원질은 배양 초기에 꾸준한 증가율을 보이다가 1 주일째에는 급속히 발현이 증가하였다. (Figure 5,7)

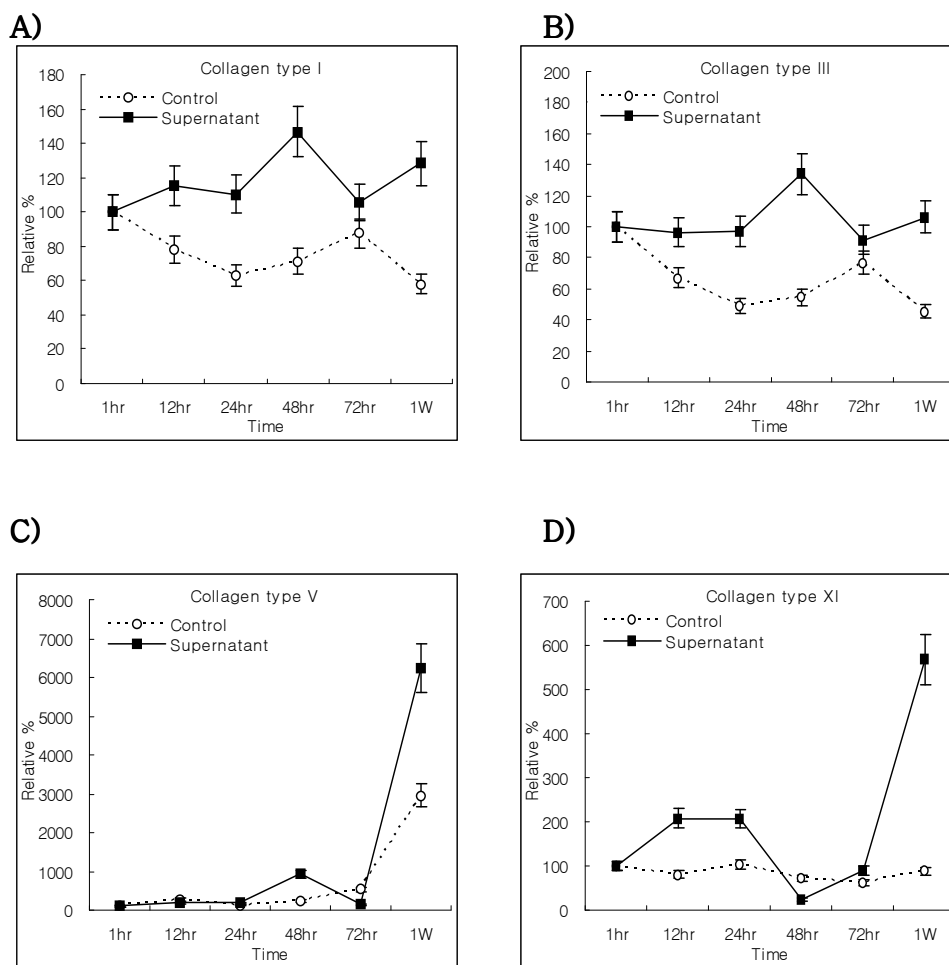


Figure 7. mRNA expression of collagens

## 5. 활액막액 처리에 의한 인간 황색 인대 세포의 Osteocalcin 단백질 발현

Osteocalcin 단백질 발현을 검증하기 위해 배양한 지 2 주일 후에 Western Blot analysis 를 시행한 결과, 16kDa 의 osteocalcin 이 검출되었다. 황색 인대 세포에 배지의 혼합액만 처리한 대조군을 음성대조군으로, 세포에 활액막액 상층액과 배지의 혼합액에 BMP-2 (100ng/ml)을 처리한 배양군을 양성대조군으로 설정하였다. 음성대조군에서 osteocalcin 발현이 미미하게 발견되었으나 양성대조군 및 실험군에서는 많은 양의 osteocalcin 이 검출되었다. (Figure 8)

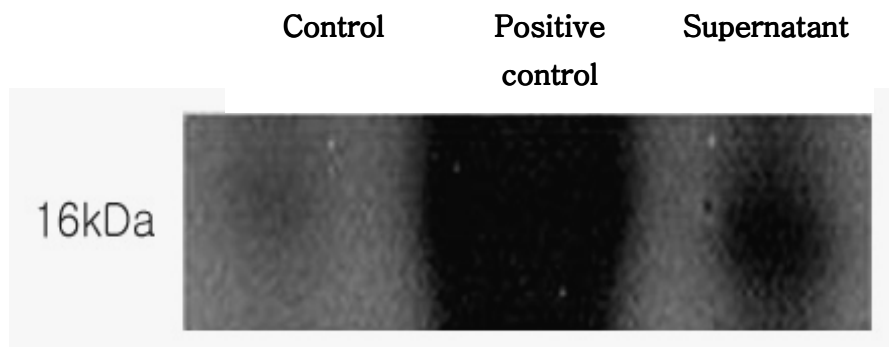


Figure 8. Expression of osteocalcin protein

Expression was detected by Western blot analysis.

Control : ligamentum flavum cell with culture media mixture.

Supernatant : ligamentum flavum cell with synovial supernatant.

Positive control : ligamentum flavum cell with BMP-2 (100ng/ml).

## 6. 활액막액 처리에 의한 인간 황색 인대 세포의 alkaline phosphatase 염색

황색 인대 세포에 활액막액을 처리하고 1 주일 후 초기 골형성 표현인자의 생성 여부를 확인하고자 alkaline phosphatase 염색을 실시한 결과, alkaline phosphatase 발현이 된 것을 관찰 할 수 있었다. 대조군에서는 골형성 인자가 관찰되지 않았으나 활액막액을 처리한 세포 배양군에서는 명백한 골형성 표현인자가 생성된 것을 확인할 수 있었다. (Figure 9)

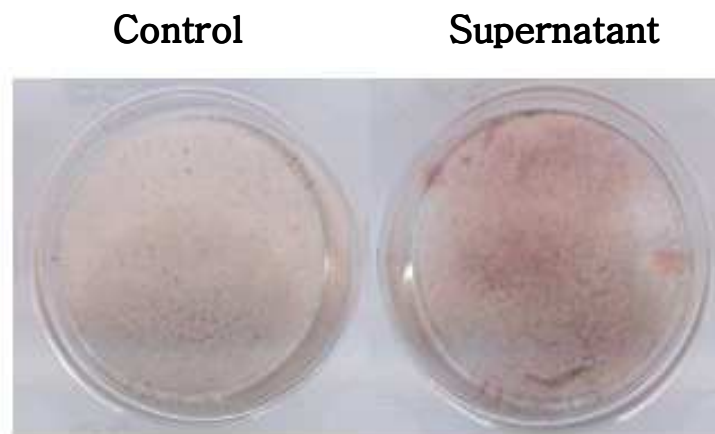


Figure 9. Expression of alkaline phosphatase

Control : Ligamentum flavum cell culture with culture media mixture.

Supernatant : Ligamentum flavum cell culture + Synovium supernatant.

Ligamentum flavum cell culture with synovium supernatant for 1 week shows positive alkaline phosphatase stain.

## IV. 고찰

척추 황색인대는 탄력성이 있는 인대구조로서 연령이 증가하면서 탄성섬유가 감소하고 내부 섬유의 변화와 교원질 섬유가 증가하게 된다.<sup>19-21</sup> 이런 변화는 요추 척추관 협착증 환자의 황색인대에서 관찰되는 현상으로 비대화된 황색인대에 의하여 척추관내 신경들이 눌러 여러 가지 임상적인 증상이 발생한다.

척추 황색인대의 비대화에서 관찰되는 소견은 섬유 연골성 변화뿐만 아니라 석회화 침착, 교원질의 퇴행성 변화 및 증가, 탄성섬유의 퇴행성 변화, 인대의 섬유 아세포의 연골성 변형, 골화 등이 있다.<sup>14,15,19,22</sup> 이런 인대의 비대화 및 골화에는 많은 전신적, 국소적인 요인이 관여하며, 특히 지속적인 물리적인 자극 및 인접한 해부학적인 구조 등에 의해 분비되는 물질에 의하여 발생한다고 알려져 있다.<sup>23,24</sup>

척추 황색인대의 골화는 요추 척추관 협착증 환자에서 흔히 관찰할 수 있는 현상으로 이는 황색인대의 퇴행변화에 의한 비대화의 마지막 단계이거나 또 다른 병리학적인 변화라 생각되고 있다. 퇴행성 변화가 있는 황색인대 세포 자체에 Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)가 척추관 협착증 환자에서 많아져



있고, 증가된 TGF- $\beta$ 1와 황색인대의 비대화가 연관되며, TGF- $\beta$ 1에 의한 matrix metalloproteinases (MMPs)와 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)의 증가된 발현이 큰 영향을 줄 것이라 알려져 있다.<sup>13,25</sup> 또한 퇴행성 변화가 있는 황색인대 세포에 Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)나 Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)를 실험적으로 추가를 하게 되면 황색인대내의 전구세포를 자극하여 연골 성분을 생성한 후 골화를 유발시키며, 이런 결과로 인하여 퇴행성 황색인대 자체가 골화를 유발할 수 있는 성질이 있다.<sup>23,26</sup>

본 연구에서 시행한 방사선학적인 평가에서는 척추 후관절의 퇴행성 변화가 심해지고 척추 추간판의 높이가 감소할수록 척추 황색인대의 두께가 증가하는 결과를 보였다. 이는 척추 추간판의 높이가 줄어들수록 황색인대의 높이가 감소되어 두께가 증가하였다고 생각할 수 있다. 또한 추간판의 높이 감소가 후관절의 관절면 압박을 유발하여, 하중을 받는 경우, 접촉 부위 압력이 증가하여 퇴행변화를 심하게 조장할 수 있음을 알 수 있다. 척추 추간판의 높이가 증가되면 역시 척추 후관절의 높이가 증가하여 하중의 부과 시 압력이 균등하게 분포하며, 이는 반대로 높이의 감소 시 하중의 압력이 증가하여 그 퇴행변화가 가중될 수 있다.<sup>27</sup> 또한 지속적인 물리적인 하중 자극에 의해 황색인대의

비대화가 발생할 수 있으며, 이런 지속적인 하중이 후관절의 퇴행변화와도 연관이 있다고 알려져 있다.<sup>24,28</sup>

해부학적으로 척추의 후방에 위치한 척추 후관절은 슬관절과 같은 활액막 관절구조이므로 슬관절과 유사하게 퇴행성 관절염을 유발할 수 있고 이에 의해 많은 염증성 물질, 즉 IL-1 $\alpha$ , IL-6, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  등이 분비된다.<sup>6-8,29</sup> 저자들은 척추 후관절의 퇴행변화가 심해지면 이런 염증성 물질이 후관절과 인접해 있는 황색인대에 어떤 영향을 미치는지 연구한 결과, 골화를 유발함을 알 수 있는 골형성 전사인자인 Dlx5, Runx2, Osterix mRNA 발현이 증가함을 알 수 있었다. 골화의 발생시 골형성 전사인자의 발현에는 시간적인 차이가 존재하였는데, Dlx5, Runx2의 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 초기에 증가하였다가 시간이 지남에 따라 Osterix의 mRNA의 표현이 같이 증가되는 소견을 관찰할 수 있었다. 이는 골형성 과정에서 중간엽 줄기세포에서 전구 조골세포로의 분화에 Dlx5와 Runx2가 관여를 하게 되고, 그 이후 과정에서 osterix가 관여하여 이 같은 결과를 보였다고 생각 된다.<sup>30,31</sup> 실험군에서는 6시간이 지난 후 세가지 골형성 전사인자의 mRNA 표현이 모두 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 또한 골형성 표현인자인 osteocalcin의 mRNA도 대조군에 비하여 높은 발현 정도를 보였으며, 실험군에서 1주일 지남에 따라 초기 1시간 배양 때 보다 약

300%의 발현 증가를 보여, 이는 활액막 상층액에 의하여 퇴행성 황색인대 세포의 골화가 유도된다고 생각할 수 있다.

활액막 상층액을 처리한 실험군에서 관찰할 수 있는 교원질의 mRNA표현양의 증가소견은 황색인대의 비후 및 골화를 의미하는 것이다. 제 1형, 3형 교원질의 mRNA는 인대의 섬유화를 표현하는 것이며, 제 5형 및 11형 교원질 mRNA는 인대의 골화를 의미하는 것으로 본 실험에서 보이는 활액막 상층액이 첨가된 황색인대 세포 배양군에서 모든 1,3,5,11형의 교원질의 mRNA 증가소견은 퇴행성 후관절에서 분비된 염증성 물질이 척추 강 내에 존재하는 황색 인대에 작용하여 황색인대의 섬유화 및 골화를 유발하여 결국 황색인대의 비대화와 골을 생성할 수 있음을 보여주는 결과라 생각된다.<sup>14,32,33</sup>

본 실험에서 활액막 상층액을 처리한 황색인대 세포 배양에서 osteocalcin 단백질 및 alkaline phosphatase 염색에서 대조군에 비하여 많은 양의 osteocalcin 단백질이 western blot analysis 에서 검출되었고, alkaline phosphatase 염색에서도 실험군에서 강한 양성 소견을 보여 활액막 상층액을 처리한 황색인대 세포 배양에서 골화가 유발됨을 증명할 수 있었다. 골형성의 완전히 증명하기 위해서는 장기 배양 후 골형성 결절을 염색하는 von Kossa 염색이 필요하나 본 연구에서는

장기배양에서 의미 있는 염색 결과를 보이지 않았는데 이는 활액막의 골형성 능이 bone morphogenetic protein-2 같은 강력한 골형성 인자에 비해서는 아주 약한 골형성 능력을 보임으로 실험 기간 중에 의미 있는 골 결절은 형성하지 않았다고 추정된다.

본 연구의 결과로 기존의 반복적 기계적 신연에 의한 transforming growth factor beta-1 발현, 퇴행된 추간판 조직에서 발현하는 염증성 사이토카인에 의한 자극, 추간판 간격감소로 인한 황색인대의 겹침(buckling) 현상 등에 추가하여 퇴행된 척추 후관절에서 분비되는 염증성 활액막액도 척추 황색인대의 비후와 골화에 중요한 기전임을 알 수 있다.

이상의 연구들과 본 연구의 결과를 종합하면 척추 황색인대 비대화 및 골화는 단순히 인대 자체의 변성 퇴화, 일생에 걸친 반복적 신연에 의한 성장인자(transforming growth factor-beta1) 발현에 의한 비후, 퇴행된 추간판의 추간판 간격 감소로 인한 후방구조물 황색인대의 겹침 현상, 퇴행된 추간판 조직에서 발현되는 염증성 사이토카인들에 의한 비후 및 골화, 그리고 본 연구에서 증명된 퇴행된 척추 후관절에서 분비되는 염증성 활액막에 의한 비후 및 골화로 종합될 수 있다. 기술된 모든 기전이 황색인대의 교원질 형성을 촉진시켜 섬유화를 이루는 최종

과정을 거치게 되어 있으므로 치료적 의미로 국소적으로 교원질화의 방해를 유도할 수 있다면 노화 및 퇴행성 변화로 진행되는 황색인대의 비후를 부분적으로 막을 수 있을 것이며 이는 침습적 수술을 피할 수 있는 방법이 될 수도 있다. 현재 가장 유망한 항 섬유화 인자는 relaxin<sup>34</sup> 으로 추정되며 이와 관련한 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구의 의의는 문헌상 최초로 퇴행된 척추 활액막으로부터 나온 활액막액이 척추 황색인대의 골화 및 섬유화에 영향을 끼친다는 사실을 분자생물학적 그리고 조직 면역학적 기법을 동원하여 골성 인자 및 교원질 mRNA 의 발현, 골성 표현형의 발현, 그리고 alkaline phosphatase 발현 등을 통해 증명하였다는 것이다. 그럼에도 불구하고 본 연구의 제한점도 있는데 이는 척추 후관절 활액막액을 활액막의 조직배양에서 추출 하였으므로 생체내의 환경을 반영할 수 없다는 점, 정상 활액막액을 대조군으로 실험하지 못한 점과 해부학적으로 척추 후관절과 황색인대가 인접한 구조이기는 하나 직접적으로 척추 후관절 활액막액이 황색인대 조직에 전체적으로 침투하여 세포 증식 및 섬유화를 야기한다고 실제 조직에서 증명하기가 어렵다는 점이다.

## V. 결론

방사선학적으로 척추 후관절의 퇴행성 변화가 심할수록 척추 황색인대가 비대화 되었다. 퇴행성 척추협착증 환자로부터 추출한 요추 후관절의 활액막 조직의 상층액은 척추 황색인대 세포의 세포 증식 및 골형성 인자 (osteocalcin, Dlx5, Runx2, osterix mRNA expressions, positive ALP stain, osteocalcin protein expression) 발현과 교원질 (제 1 형, 3 형, 5 형, 11 형 교원질 mRNA) 발현의 증가에 영향을 주었다. 따라서 이전 연구에서 밝혀진 퇴행된 추간판과 함께 척추 후관절의 퇴행변화는 황색인대의 비대화 및 골화에 중요한 영향을 끼친다고 생각할 수 있다.

## 참고문헌

1. **Kirkaldy WH, Paine KWE, Cauchoix J, McIvor G.** Lumbar spinal stenosis. Clin Orthop 1974;99:30-50.
2. **Helms CA.** CT of the lumbar spine : stenosis and arthrosis. Comput Radiol 1982;6:359-369.
3. **Naylor A.** Factors in the development of the spinal stenosis syndrome. J Bone Joint Surg (Br) 1979;61:306-309.
4. **Bogduk N, Engel R.** The menisci of the lumbar zygapophyseal joints : a review of their anatomy and clinical significances. Spine 1984;9:454-460.
5. **Fujiwara A, Lim TH, Howard SA, Tanaka NT.** The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine. Spine 2000;25:3036-3044.
6. **Dolye AJ, Merrilees M.** Synovial cysts of the lumbar facet joints in a symptomatic population. Spine 2004;29(8):874-878.
7. **Willburger FE.** Prostaglandin released from lumbar disc and facet joint tissue. Spine 1994;19:2068-2070.
8. **Igarashi A, Kikuchi S, Konno S, Olmarker K.** Inflammatory

cytokines related from the facet joint tissue in degenerative lumbar spinal disorders. *Spine* 2004;29:2091–2095.

9. **Fernandes JC, Martel Pelletier J, Pelletier JP.** Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999;15:694–703.
10. **Wittenberg RH.** In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissues, cartilage and bone in degenerative joints disease. *Arthritis Rheum* 1993;36:1444–1450.
11. **Ghomley RK.** Low back pain with special reference to the articular facets with presentation of an operative procedure. *JAMA* 1933;101:1773–1777.
12. **Tanno I, Murakami G, Oguma H, Sato SI.** Morphometry of the lumbar zygapo -physeal facet capsule and cartilage with special reference to degenerative osteoarthritic change: An anatomical study using fresh cadavers of elderly Japanese and Korean subjects. *J Orthop Sci* 2004;9:468–477.
13. **Park JB, Lee JK, Park SJ, Riew KD.** Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Joint*



Surg(Am) 2006;87:2750-2757.

14. **Specchia N, Pagnotta A, Gigante A, Logroscino G, Toesca A.** Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spinal stenosis. *J Orthop Res*, 2001;19:294-300.
15. **Okuda T, Baba I, Fujimoto Y.** The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease. *Spine*, 2004;29:1689-1697.
16. **Grogan J, Nowicki BH, Schmidt TH, Haughton VM.** Lumbar facet joint tropism does not accelerate degeneration of the facet joints. *Am J Neuroradiol* 1997;18:1325-1329.
17. **Thomson JP, Pearce RH, Schechter MT.** Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine* 1990;15:411-415.
18. **Pfirrmann CW, Metdorf A, Zanetti M.** Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2001;26:1873-1878.
19. **Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, Perugia D, Demartino C.** Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. *Spine* 1994;8:917-922.
20. **Ramsy R.** The anatomy of the ligamentum flavum. *Clin*

Orthop 1966;44:129-140.

21. **Schrader P, Grob D, Rahn BA.** Histology of ligamentum flavum in patients with degenerative lumbar spinal stenosis. Eur Spine J 1999;8:323-328.
22. **Furasawa N, Baba H, Maezawa Y, Alchids K, Wada M, Imura S, et al.** Calcium crystal deposition in the ligamentum flavum of the lumbar spine. Clin Exp Rheumatol 1997;15:641-647.
23. **Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K.** Expression and localization of bone morphogenic proteins and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. Bone 1997;21:23-30.
24. **Nakatani T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K, Kurosaka M.** Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- $\beta$ 1. J Orthop Res 2002;20:1380-1386.
25. **Park JB, Chang H, Lee JK.** Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. Spine 2001;26:492-495.

26. **Ono K, Yonenobu K, Miyamoto S, Okada K.** Pathology of ossification of the posterior longitudinal ligament and ligamentum flavum. *Clin Orthop* 1999;359:18-26.
27. **Liu J, Ebrheim NA, Haman SP, Shafiq Q, Karkare N, Biyani A, et al.** Effect of the increase in the height of lumbar disc space on facet joint articulation area in sagittal plane. *Spine* 2006;31:198-202.
28. **Fukuyama S, Nakamura T, Lekeda T, Takagi K.** The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum. *J Spinal Disord* 1995;8:126-130.
29. **Kang JD, Helga I, Geogescu, Lori M, Maja S, William F, et al.** Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin 6, and prostaglandin E2. *Spine* 1996;21:271-277.
30. **Ryoo HM, Hoffmann T, Beumer B, Frenkel DA, Towler GS, Stein JL, et al.** Stage specific expression of *Dlx5* during osteoblast differentiation: Involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1997;11:1681-1694.
31. **Lee MH, Kwon TG, Park HS, Eozney JM, Ryoo HM.** BMP-2

induced osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Bioph Res Co* 2003;309:689-694.

32. **Yamazaki M, Moriya H, Goto S, Saitoh Y, Arai K, Nagai Y.**

Increased type 11 collagen expression in the spinal hyperostotic mouse. *Calcif Tissue Int* 1991;48:182-189.

33. **Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, Tamaki T, Tanaka T.**

Hypertrophic ligament flavum in lumbar spinal canal stenosis. *Spine* 1992;17:1353-1360.

34. **Sherwood OD.** Relaxin's physiologic roles and other diverse actions. *Endocrine Rev* 2004;25:205-234.

Abstract

**The effects of synovial fluid of lumbar facet joint on  
hypertrophy and ossification of ligamentum flavum**

**Si-Young Park**

*Department of Medicine  
The Graduate school, Yonsei University*

(Directed by Professor Hwan-Mo Lee)

Hypertrophy or ossification of ligamentum flavum is caused by genetics, aging, repetitive stretching, and various local factors including cytokines. It is well known that degenerative facet joint synovium spontaneously produces inflammatory cytokines and catabolic enzymes like knee joint. Therefore degenerated facet joint synovial fluid might render important mechanism of hypertrophy and ossification of ligamentum flavum, which is one of pathomechanisms of spinal stenosis. Our study was performed to evaluate the effect of degenerated facet joint synovial fluid on ligamentum flavum cells

radiographically and biochemically and to identify the role of degenerated facet joint synovial fluid in the pathogenesis of ligamentum flavum hypertrophy and ossification.

Magnetic resonance images of lumbar spine in eighty patients with seventh decade who had lower back pain, were reviewed to check correlation between the degree of facet joint degeneration and ligamentum flavum hypertrophy and the grade of disc degeneration and disc height.

Interlaminar portion of the ligamentum flavum and synovial fluid of degenerated facet joint were collected during surgical procedures with spinal stenosis. Ligamentum flavum cells were cultured. For comparable study, specimens were divided into two groups. In experimental group(30), synovial supernatant was added to ligamentum flavum cells. In the control group(30), only ligamentum flavum cells were used. Cytotoxicity was analyzed by alamarblue assay. The mRNA expression of *Dlx5*, *Runx2*, *Osterix*, *osteocalcin* were calculated via RT-PCR. The mRNA expression of type I, III, V and XI collagen were performed by RT-PCR and measured with densitometry. Alkaline phosphatase stain for biochemical assay

and western blotting for osteocalcin protein expression were performed.

Radiographically, the facet joint degeneration was positively correlated with the thickness of ligamentum flavum.

Biochemically, there was no cytotoxicity in LF cells treated with facet joint synovial supernatants. There were significant increase in mRNA expression of Dlx5, Runx2, osterix, osteocalcin, type I, III, V and XI collagen in ligamentum flavum cultures with synovial supernatant. LF cell culture with synovial supernatant demonstrated strong positive stains for alkaline phosphatase and increased expression of osteocalcin protein compared with the control group.

Degenerated facet joint synovial fluid might provide an important pathomechanisms in hypertrophy and ossification of the ligamentum flavum. Degenerated facet joint synovial fluid can influence ligamentum flavum via inflammatory cytokines and cause hypertrophy and ossification of the ligamentum flavum, making spinal stenosis.

---

Key words: spinal stenosis, ligamentum flavum, facet joint, synovium, hypertrophy, ossification