

Microarray 및 Real-Time  
RT-PCR을 이용한 후경골 건증  
관련 유전자 발현 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

최 윤 락

Microarray 및 Real-Time  
RT-PCR을 이용한 후경골 건증  
관련 유전자 발현 분석

지도 한 수 봉 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 윤 락

# 최윤락의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

## 감사의 글

석사 과정을 마치고 입학한 박사 과정을 통과의례 정도로 생각한 면이 있었습니다. 하지만 학기가 하나하나 지날수록 연구와 논문에 대한 두려움이 커져갔던 것이 사실입니다. 특히 임상에 치중했던 그동안의 연구와는 달리 실험실 환경은 더욱 생소했습니다. 이러한 혼란스러움 속에서 시작된 연구 및 논문 작성에 있어 방향을 잃지 않도록 지침과 교훈을 아끼지 않으셨던 한수봉 지도교수님과 이진우 교수님께 이 글을 빌어 무한한 감사를 드리고 싶습니다. 앞으로 항상 첫발을 내딛는다는 생각으로 배움과 연구에 정진할 것을 약속드립니다. 그리고 논문 작성 과정에서 많은 조언을 아끼지 않으신 연세대학교 의과대학 양우익 교수님과 김명희 교수님, 최승일 교수님께도 은혜의 마음을 전하고 싶습니다. 또한 실험과정에서 어려움에 봉착할 때 마다 자신의 일처럼 도움을 아끼지 않은 연구실 박민성 군과 아주대학교 한승환 교수님께도 감사드립니다.

저를 낳으시고 항상 헌신적인 사랑과 보살핌으로 현재를 있게 하신 부모님과 든든한 후원자이신 장인, 장모님께 감사드리고 싶습니다. 마지막으로 항상 부족한 남편을 최고라고 여기며 묵묵히 뜻을 따라주고 많은 뒷받침과 희생을 감내해 온 사랑스런 아내와 이제 막한 마디 두 마디 말을 배워가며 천사와 같은 미소로 하루의 고단함을 잊게 해주는 딸 지안이에게 고마움을 전하고 싶습니다.

저자 씀

## <차례>

국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 연구대상 .....	6
2. Total RNA 추출 .....	7
3. Oligomer microarray를 이용한 유전자 발현 분석 .....	7
4. Oligomer microarray data 분석 .....	8
5. Real-time RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 검증 .....	9
III. 결과 .....	3
1. Oligomer microarray 결과 .....	13
2. Real-time RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 검증 .....	18
IV. 고찰 .....	21
V. 결론 .....	30
참고문헌 .....	31
영문 요약 .....	40

## 그림 차례

Figure 1. A schematic flow diagram of the pathogenesis in posterior tibial tendinosis .....	29
---------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 표 차례

Table 1. Primer sequences for real-time reverse transcription -polymerase chain reaction .....	11
Table 2. Total numbers of differentially expressed genes (DEGs) in tendinosis tendons compared with normal tendons .....	14
Table 3. Functional grouping of the 200 ranked up regulated DEGs in tendinosis case 1 .....	14
Table 4. Functional grouping of the 200 ranked up regulated DEGs in tendinosis case 2 .....	15
Table 5. Functional grouping of the 200 ranked down regulated DEGs in tendinosis case 1 .....	16
Table 6. Functional grouping of the 200 ranked down regulated DEGs in tendinosis case 2 .....	17
Table 7. Difference in gene expression between tendinosis tissue and normal tendon with real-time RT-PCR .....	20

## 국문 요약

### Microarray 및 Real-Time RT-PCR을 이용한 후경골 건증 관련 유전자 발현 분석

후경골 건 기능장애는 성인의 족부 동통 및 기능 이상의 흔한 원인으로, 식생활의 서구화와 비만 인구와 당뇨 및 고혈압 환자의 증가로 인해 국내에서도 발생 빈도가 증가하고 있다.

본 연구에서는 Johnson's 분류 제 2기로 진단되어 수술을 받은 총 11예의 22검체(후경골 건증 건과 정상 장족지 굴건)를 대상으로 하였으며, oligomer microarray방법을 이용하여 유의한 발현 변화를 보이는 질병 관련 유전자를 발굴하고, 이 결과와 현재까지 보고된 자료를 바탕으로 건증 발생과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자들의 mRNA 발현을 real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 기법을 이용하여 확인하였다.

수술을 통해 얻은 조직은 RNAlater에 담근 후 액체질소로 급냉동시켜 -80°C에 보관하였으며, RNeasy mini kit을 이용하여 total RNA 추출 및 정제하였다. Oligomer microarray는 2예, 4개의 검체에서 추출한 total RNA를 Human Genome U133A 2.0 Gene-Chip (Affymetrix)을 이용하여 분석하였으며, 정상 건과 비교해 지수 함수로 두 배 이상 발현의 변화를 보인 유의 발현 유전자(differentially expressed gene, DEG)를 선별하였고, 발현이 증가, 또는 감소한 상위 200개의 유전자를 Biological Networks Gene Ontology (BiNGO) Bioinformatics program을 이용하여 생물학적 연관성에 따라 분류하였다. 나머지 9예, 18개의 검체에서 추출한 total RNA는 real-time RT-PCR을 통한 특정 mRNA의 발현분석에 이용하였다.

Oligomer microarray결과에서는 *matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -9, -11, -13, -14, -15, -19, matrix metalloendopeptidase, a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) -12, IL-2, -11, -13R, fibroblast growth factor-2, insulin-like growth factor-1, heat shock protein 70 (Hsp70), collagen type I alpha 1 (COL1A1), COL3A1* 유전자의 발현이

유의하게 증가하였으며, *MMP-3*, *-10*, *-17*, *-27*, *tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -3*, *-4*, *IL-6R*, *-7*, *-8*, *-16*, *vascular endothelial growth factor*, *decorin* 유전자의 발현은 유의하게 감소하였다. BiNGO Bioinformatics program을 이용한 분류에 의하면, 공통적으로 metalloendopeptidase와 metallopeptidase 활성 및 세포외 기질 관련 유전자 군의 발현이 증가하였고, 세포외 영역 관련 유전자군의 발현이 공통적으로 감소하였다.

Real-time RT-PCR결과에서는 *MMP-1*, *-2*, *-3*, *-8*, *-9*, *-10*, *-11*, *-13*, *ADAM with thrombospondin modifs (ADAMTS) -4*, *TIMP-1*, *-2*, *-4*, *IL-4R*, *-6*, *-6R*, *-8*, *-13*, *caspase-8*, *Hsp70*, *poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)*의 mRNA가 결과가 나온 예의 과반수 이상에서 정상 건과 비교 두 배 이상의 발현 변화를 보였으며, 이들 중 *IL-6*과 *caspase-8*, *Hsp70*, *PARP*를 제외한 나머지는 발현이 주로 증가하는 경향을 보였다. 이외에도 *COL3A1*은 발현이 주로 증가하였으며, *decorin*은 발현이 주로 감소하였다. 통계 분석에서는 *MMP-1*, *-11*, *TIMP-1*, *-2*, *-4* 및 *caspase-8*의 발현이 정상 건에 비해 의미 있는 변화를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

이러한 결과는 장기적으로 가해진 부하로 인해 유발된 후경골 건증에서 MMP, 염증성 사이토카인, 스트레스 및 세포사멸 관련 유전자 복합적으로 발현됨을 의미하고, 이는 세포외 기질의 분해 및 교원질 구성의 변화와 인장강도의 감소와 같은 물리적 성질의 변화와 관련이 있는 것으로 사료된다. 그러나 유전자의 mRNA 발현을 실제 기능의 단위인 단백질의 발현으로 해석하기에는 무리가 있기 때문에 추후 Western blot 등의 방법을 이용한 단백질 발현 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

---

핵심 되는 말 : 후경골 건증, oligomer microarray, real-time RT-PCR, 유의 발현 유전자, matrix metalloproteinase (MMP), 사이토카인, 세포사멸



# Microarray 및 Real-Time RT-PCR을 이용한 후경골 건증 관련 유전자 발현 분석

<지도교수 한수봉>

연세대학교 대학원 의학과

최 윤 략

## I. 서론

후경골 건 기능장애는 성인의 족부 동통 및 기능 이상의 흔한 원인이다<sup>1</sup>. 후경골 건 병변의 유병율은 현재까지 잘 알려져 있지 않지만, 이는 성인의 후천성 평편족의 가장 흔한 원인이며<sup>2</sup>, 서양에서는 많은 중년 여성이 후경골 건병변(tendinopathy)으로 고통을 받고 있다고 한다<sup>3</sup>. 이는 하지에 발생하는 슬개 건염이나 아킬레스 건염과는 달리, 특징적으로 장시간 앉아서 생활하는 중년 이상의 여성에게 주로 발생하고<sup>1,4-6</sup>, 비만, 고혈압, 당뇨병과 같은 성인병과의 연관성도 제시되고 있다<sup>7</sup>. 최근 들어 식생활의 서구화와 성인병의 증가로 인해 우리나라에서도 후경골 건병변이 증가하고 있는 추세이다.

후경골 건 기능장애는 과거 염증 반응의 결과로 여겨졌으나, 조직학적으로 대식세포와 같은 염증세포는 없이 섬유아세포 증식과 뮤신 변성, 신생혈관형성으로 특징지어지는 소견을 보여 염증에 관련된 임상적 또는 조직학적 특징은 관찰되지 않는다고 하였다<sup>8</sup>. 이러한 조직학적 변화는 건증(tendinosis)의 특징적 소견이며<sup>8,9</sup>, 결과적으로 교원질 다발의 선상 배열의 파괴와 건 조직의 치유반응을 저하시키는 것으로 여겨지고 있다<sup>10</sup>.

건병변은 심한 통증을 동반하고, 염증세포가 발견되지 않으며, 저조한 치유반응으로 특징지어지는 건의 질환으로, 이 중 하나인 건증

은 염증의 임상적 또는 조직학적 증상이 없는 건 조직의 퇴행성 질환의 기술에 사용되는 용어이며<sup>11,12</sup>, 건병변에서 발견되는 비정상적인 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)의 병리학적 특징을 보인다<sup>13</sup>. 건증은 조직의 치유반응이 없이 과도한 건의 사용과 과도한 기계적 부하로 인하여 일어나며, 이로 인해 제 1형 교원질 파괴, 세포외 기질의 감소, 단백다당(glycosaminoglycan)의 증가 및 건 세포의 세포사멸이 일어남으로써 건 조직이 손상되고 건증이 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>. 그러나 현재까지 진행되어 온 많은 연구에도 불구하고, 아직 분자생물학적 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있다<sup>13,15</sup>.

몇몇 연구자들은 건병변 발생과 밀접한 연관성이 있는 유발 인자로 혈관 내피세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 혈관신생에 초점을 맞추고 있다. 특히 젊은 운동선수들에게서 비정상 혈관신생(angiogenesis)은 슬개 건의 건증 발생에 민감한 영향을 끼쳤으며<sup>14,16</sup>, 아킬레스 건의 건증이나 파열 환자의 조직에서 VEGF의 발현이 증가된다는 보고들이 있다<sup>17-19</sup>. 또한, 저산소 조건, 주기적 부하 조건 등에서의 건 세포 배양을 통해, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)의 매개로 건 세포에서 VEGF가 과발현되고, 이는 matrix metalloproteinase (MMP) 발현은 증가시키고 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)의 발현은 억제시킨다는 증거들도 제시되고 있다<sup>18-22</sup>. 이를 근거로 건의 저혈관성 부위에서 과부하나 과사용의 결과로 HIF-1이 생성되고, 이는 VEGF의 발현을 유발하며, 이를 통해 MMP의 활성증가와 건증이 발생한다는 가설이 제시된 바 있다<sup>23</sup>.

이외에도 건 세포의 배양 조건하에서 IL-1 $\beta$ 나 기계적 자극을 가함으로써, IL-1 $\beta$ , IL-6, cyclooxygenases (COX-1, COX-2), prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE-2) 및 다양한 MMP 등의 발현이 유의하게 증가하였다는 보고들이 있다<sup>23-26</sup>. 이는 건 세포의 자극을 통해 생성되는 염증 매개 물질이 기질분해효소의 발현 증가로 이어지는 분자생물학적 기전이 존재함을 암시한다.

최근 들어서 파열된 극상 건 조직에서 과도하게 증가된 세포사멸이 관찰됨으로써<sup>27</sup>, 세포사멸과 건병변과의 연관성에 관심이 모아지

고 있다. Molloy 등<sup>28</sup>은 쥐의 과사용 극상 건에서 글루탐산 신호전달계의 활성화 조절에 관여하는 여러 유전자의 발현이 증가, 또는 감소함을 밝혔으며, 이 글루탐산이 건 섬유아세포의 세포사멸을 유발시킨다고 보고하였다. Arnoczky 등<sup>29</sup>은 건 섬유아세포에 주기적인 부하를 가하여 세포사멸을 유발하는 stress-activated protein kinase (SAPK)의 활성이 증가함 확인하였다. 이와 같은 결과를 근거로 장기간 지속되는 건의 과부하가 SAPK를 활성화시키고, 결국 세포사멸을 유발하며, 증가된 세포사멸은 교원질을 약화시켜 쉽게 건이 파열된다는 가설이 제시되었다<sup>30</sup>. 그러나 이들 연구에서는 건증 유발에 관련이 있는 것으로 알려진 MMP와 염증성 사이토카인 등과 같은 다른 후보 유전자에 대해 언급되지 않았다.

현재까지 진행되어 온 유전자 발현 및 조절에 대한 연구는 특정 유전자의 발현에만 국한되어 있었다. 또한, 대부분의 연구가 배양된 정상 건 세포에 생화학적, 물리적 외부 자극을 가한 후 변화를 관찰한 것이기 때문에 인체에서 발생된 건증을 설명하는데 한계가 있다<sup>31,32</sup>. 이러한 수많은 연구에도 불구하고 후경골 건증의 인체 조직을 이용한 분자생물학적 연구는 시도된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 환자의 수술 중 획득한 후경골 건증 건과 정상 장족지 굴건을 대상으로 연구를 계획하였으며, 동시에 2만개 이상의 유전자 발현 분석이 가능한 oligomer microarray 방법을 이용하여 건증에서 정상 건과 비교, 유의한 발현 변화를 보이는 질병 관련 유전자를 발굴하고, 이 결과와 현재까지 보고된 자료를 바탕으로 건증 발생과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자들의 발현을 real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 기법을 이용하여 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

후경골 건의 비대 및 신장으로 인한 기능 이상으로 중족부 종아치의 함몰과 전족부 외전, 후족부 외반 등의 변형이 있으나 도수 교정이 가능하여, Johnson's 분류<sup>1</sup> 제 2기로 진단되어 장족지 굴건 이진술(flexor digitorum longus tendon transfer)의 적응증이 되어 수술을 시행 받은 환자 중 본 실험에 검체 사용을 허락한 경우를 대상으로 하였다. 이들 중 일부 스포츠 손상이 원인인 경우나 병변 부위에 감염의 과거력이 있는 경우, 3개월 이상 스테로이드를 복용하였거나 병변 부위 스테로이드 국소 주사의 경력이 있는 경우, 당뇨병이나 전신 염증 관절염, 교원질 관련 유전자 질환을 동반하여 본 연구의 목적에 부합되지 않는 경우를 제외한, 총 11예에서 획득한 검체를 대상으로 하였다. 대상 환자 중 여자가 9예, 남자가 2예였으며, 평균 연령은 41.2세(범위, 34-87세), 평균 유병 기간은 23.3개월(범위, 8-72개월)이었다.

수술은 척추 또는 전신 마취 하에서 진행하였다. 족부의 내측에서 후경골 건을 따라 족관절 내과에서 주상골을 지나 내측 설상골 하부까지 절개를 하고, 후경골 건을 노출시켰다. 건증이 확인된 후경골 건은 근건 경계부위부터 거주상 관절부위까지 제거하였고, 남은 후경골 근의 원위부를 장족지 굴근과 봉합하였다. 주상골 결절의 후경골 건 부착부를 원위부로 젖히고, 스프링 인대 복합체를 절개 및 전진시켰다. 족관절 내과 부위에서 장족지 굴건을 확인하고, 이를 따라 원위부로 추적하여 Master Knot of Henry를 절개하고 최대한 원위부에서 절단하였다. 후경골 건의 건초가 깨끗하면 장족지 굴건을 이 건초 내로 위치시켰고, 그렇지 않으면 장족지 굴건의 건초 내에 그대로 두었다. 드릴을 이용하여 주상골의 상부에서 하부로 구멍을 내고, 장족지 굴건은 하부에서 상부로 빼낸 후 제거 가능한 건의 원위부 일부를 제거하였다. 족부를 최대한 회외전 시키고, 장족지 굴건을 충분히 당긴 후 주위 조직과 후경골 건의 남은 부분을 이용하여 고정시켰다. 피부 봉합 후 족부를 회외전 자세에서 부목고정하고 수술을 마쳤다. 수술 후 얻어진 후경골 건증 조직을 실험군으로, 채취한 정상 장족지 굴건을 대조군

으로 이용하였다.

수술을 통해 얻은 조직은 즉시 Dulbecco's phosphate buffered saline (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 충분히 세척하여 혈액 등의 오염을 제거하였고, 조직을 5 x 5 mm 미만의 크기로 절제하여, 15 ml conical transport tube에 넣고, RNase로부터 RNA의 파괴를 막기 위해 RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 담가 4°C에서 48시간 처리한 후 RNAlater를 제거하고 액체질소로 급냉동시켜 -80°C에서 보관하였다.

## 2. Total RNA 추출

500 mg의 건증 또는 정상 건 조직을 각각 액체질소가 담긴 멸균된 막자사발과 막자를 이용하여 최대한 잘게 부숴다. 잘게 부순 조직은 homogenizer glass tube로 옮긴 후, TRIZOL<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 5 ml을 넣고 4°C에서 homogenizer (Glas-Col, Terre Haute, IN, USA)를 이용하여 곱게 갈았다. 다음으로 0.2 ml의 chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 15초간 곱게 섞어 준 후 상온, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액에 0.5 ml의 isopropanol을 첨가한 후 곱게 섞어 상온에서 10분간 방치한 다음 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 75% ethanol 1 ml를 첨가하여 12,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 버렸다. 이렇게 얻은 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 분리 및 정제하였으며, 분광광도계를 이용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 total RNA를 정량한 후 -20°C에 보관하였다.

## 3. Oligomer microarray를 이용한 유전자 발현 분석

총 11예 중, 2예에서 획득한 각각 2개의 건증 및 정상 건 조직에서 추출한 total RNA를 총 22,277개의 gene이 표현되어 있으며, 99.9%의 재현성을 보이는 Human Genome U133A 2.0 Gene-Chip

(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 이는 건증 조직과 정상 건 조직에서 추출한 total RNA 5  $\mu$ g을 표지한 후, total RNA sample로부터 probe 합성과 hybridization, detection, scanning을 Affymetrix사의 표준 protocol에 따라 진행하는 과정이다. 간단히 과정을 기술하면, total RNA로부터 One-Cycle cDNA Kit (Affymetrix)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Single stranded cDNA는 Superscript II reverse transcriptase와 T7-(dT)<sub>24</sub> primer (Affymetrix)를 이용해 42 °C에서 1시간 동안 반응시켜 합성하였고, double stranded cDNA는 DNA ligase과 DNA polymerase I, RNase H를 이용해 16°C에서 2시간동안 반응시켜 합성하였다. 이후 gap filling을 위해 T4 DNA polymerase와 16°C에서 5분 동안 반응시키고, Sample Cleanup Module (Affymetrix)로 처리하였으며, 이 ds-cDNA를 in vitro transcription (IVT)에 이용하였다. cDNA를 biotin-labeled CTP와 UTP 존재 하에 GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix)로 전사시킨 다음, Sample Cleanup Module (Affymetrix)로 처리하였고, 이후 10-15  $\mu$ g의 labeled cRNA는 fragmentation buffer (Affymetrix)로 35 bp에서 200 bp의 크기로 분절시켰다. 이 분절된 cRNA는 Affymetrix 표준 protocol에 따라 Human Genome U133A 2.0 gene chip (Affymetrix)과 hybridization시켰다. 이후 array들은 25°C에서 GeneChip Fluidics Station 450와 non-stringent wash buffer로 처리한 다음, 50°C에서 stringent wash buffer로 처리하였다. 세척이 끝나면 streptavidin R-phycoerythrin으로 염색하였고, 그 강도를 GeneChip scanner 3000 (Affymetrix)을 이용하여 기록 후 GeneChip Operating Software (Affymetrix)를 통해 분석하였다.

#### 4. Oligomer microarray data 분석

Raw signal data의 plotting과 이의 정규화(normalization)를 위해 GenePlex software (Affymetrix)의 기본 정규화 알고리즘인 Global scaling을 적용하였다. 정상 건과 비교해 지수 함수로 두 배 이상 발현이 증가, 또는 감소한 전체 유전자를 유의 발현 유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)로 선별하였으며, 이들 중 발현이 증가, 또는

감소된 상위 200개의 유전자만을 선택하여 이들의 생물학적 연관성을 BiNGO Bioinformatics program (Affymetrix)으로 분류하였다. 주석 (annotation) 데이터 정보로 UG : Human #184, SP: Release 48.0(09/12/2005), Gene: 8/30/2005, GO: 8/26/2005, KEGG: March/2005, OMIM: May/2005를 이용하였다.

## 5. Real-time RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 검증

총 11예 중, 나머지 9예에서 획득한 각각 9개(총 18개의 표본)의 건증 및 정상 건 조직으로부터 추출한 total RNA를 이용하여, oligomer microarray로부터 얻은 결과를 참고로, 현재까지 건증 발현과 연관된 것으로 알려진 유전자들의 mRNA 발현을 Alfredson<sup>33</sup>이 기술한 real-time RT-PCR 방법으로, iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System과 software (Bio-Rad, Hercules, PA, USA)을 이용하여 정량적 검증을 하였다.

추출한 total RNA 중 1  $\mu\text{g}$ 을 moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, IN, USA), oligo(dT) primer을 포함하고 있는 master mix 50  $\mu\text{l}$ 와 혼합한 다음, 25°C에서 10분, 48°C에서 30분, 95°C에서 5분 동안 역전사반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 이후 이에 반응하는 forward primer 및 reverse primer와 그 사이에 결합할 수 있는 target-specific DNA probe를 Primer Express<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 이용하여 디자인하고, 이 probe의 5' end에는 VIC<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) 형광 염료를, 3' end에는 quencher 형광 염료인 6-carboxy-tetramethyl rhodamine (TAMRA<sup>TM</sup>, Applied Biosystems)을 부착시켰다. PCR 반응을 위해 20  $\mu\text{l}$  부피의 96-well로 구성된 ICycler iQ PCR Plates (Bio-Rad)를 이용하였으며, 정량하고자 하는 각 mRNA에 마다 3개의 well에 반응 시켜, 이 발현 값의 평균치를 결과에 사용하였다. 각 well에 2  $\times$  TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) 10  $\mu\text{l}$ 와 각각 300 nM의 forward primer와 reverse primer, 100 nM의 probe, 1

$\mu\text{l}$ 의 cDNA를 넣고, 50°C에서 2분, 95°C 15분 동안 초기 incubation 후에 각 주기(cycle)마다 95°C에서 15초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안의 denaturation, annealing, extension 과정을 40-50회 반복하여 시행하였다. 각 주기의 PCR extension 단계에서, 형광 부착된 probe가 *Taq* DNA polymerase의 5' nuclease의 작용으로 분리되면서 처음 존재하던 RNA양에 비례하는 신호를 내게 되는데, 이 상대적 신호는 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System과 software (Bio-Rad)를 이용하여 측정하였다. 각각의 primer에 대한 real-time PCR의 조건을 최적화하였고 internal control 유전자로 *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*를 사용하였다.

현재까지 보고된 자료와 oligomer microarray 결과를 바탕으로 건증과 관련된 mRNA 발현을 검증한 유전자들의 primer와 probe의 염기서열을 정리하였다(Table 1).

각 환자의 후경골 건증 건에서의 질병 관련 유전자의 발현 정도는 정상 건 조직에서의 발현 정도에 대한 비로 환산하여 분석하였으며, 정상 건 조직과 비교하여 2배 이상의 발현 변화를 보이는 것을 유의한 발현 변화로 판단하였다. 또한 건증 건 조직과 정상 건 조직에서 발현된 각 유전자의 mRNA 절대값을 이용하여 통계 분석을 하였으며, 이를 위해 비모수적 방법인 One-Sided Wilcoxon's Signed Rank test ( $p$ -value < 0.05)를 이용하였다.



Table 1. Primer and probe sequences for real-time RT-PCR

Gene	Primer/Probe	Oligonucleotide sequence
<b>Metalloproteinase family</b>		
<i>MMP-1</i>	Forward	5'-GATGGACCTGGAGGAAATCTTG-3'
	Reverse	5'-TGAGCATCCCCTCCAATACC-3'
	Probe	5'-TCATGCTTTTCAACCAGGCC-3'
<i>MMP-2</i>	Forward	5'-GCCCAAGAATAGATGCTGACTGT-3'
	Reverse	5'-GAGGGTTGGTGGGATTGGA-3'
	Probe	5'-CTCCTCCAGGCGCCCT-3'
<i>MMP-3</i>	Forward	5'-CCTGGTACCCACGGAACCT-3'
	Reverse	5'-GGACAAAGCAGGATCACAGTTG-3'
	Probe	5'-CCCTCCAGAACCTGGGACGCC-3'
<i>MMP-8</i>	Forward	5'-GACCAACACCTCCGCAAATT-3'
	Reverse	5'-GAGCGAGCCCCAAAGAATG-3'
	Probe	5'-CAACTTGTTTCTTGTTGCTGCTC-3'
<i>MMP-9</i>	Forward	5'-GGACGATGCCTGCAACGT-3'
	Reverse	5'-ACAAATACAGCTGGTTCCCAATC-3'
	Probe	5'-TCTTCGACGCCATCGCGG-3'
<i>MMP-10</i>	Forward	5'-GATGCATCTTGCATTCTTGTTG-3'
	Reverse	5'-GCTGCCCACTCAGAGGATA-3'
	Probe	5'-TTGTGTCTGCCAGTCTGCTCTG-3'
<i>MMP-11</i>	Forward	5'-CAGCCAAGGCCCTGATGT-3'
	Reverse	5'-AGTCATCTGGGCTGAGACTCAGT-3'
	Probe	5'-CGCCTTCTACACCTTTCGCTACC-3'
<i>MMP-13</i>	Forward	5'-TGGCATTGCTGACATCATGA-3'
	Reverse	5'-GCCAGAGGGCCCATCAA-3'
	Probe	5'-CTTTTGGAAATTAAGGAGCATGG -CGACTTCTAC-3'
<i>ADAMTS-4</i>	Forward	5'-ACTGGTGGTGGCAGATGACA-3'
	Reverse	5'-TCACTGTTAGCAGGTAGCGCTTT-3'
	Probe	5'-TGGCCGCATTCCACGGTGC-3'
<b>Tissue inhibitors of metalloproteinase family</b>		
<i>TIMP-1</i>	Forward	5'-CACTGATGGTGGGTGGATGA-3'
	Reverse	5'-AGCGGGTGCGGAAACC-3'
	Probe	5'-ATGCATCCAGGAAGCCTGGAGG-3'
<i>TIMP-2</i>	Forward	5'-AAGCCTCCAAGGGTTTCGA-3'
	Reverse	5'-GAGTGTTTTTATTCATGCTGTTTCCA-3'
	Probe	5'-TGGTCCAGCTCTGACATCCCTT-3'
<i>TIMP-3</i>	Forward	5'-AACTTGGGTGAAGGCTGAGTGT-3'
	Reverse	5'-CCTCACCAAGGCCTAACAGATG-3'
	Probe	5'-AAGTTTCCCTGCGGAGTCGATAAA-3'
<i>TIMP-4</i>	Forward	5'-GATGGTATATCCTTGCATGTACAGT-3'
	Reverse	5'-TCCTGCCAGTCAGCTGTTT-3'
	Probe	5'-TCAGAAGGTGGTTTGACAGCATCA-3'

Inflammatory cytokines		
<i>COX-1</i>	Forward	5'-CCACCGGCGTCAAAGTATTT-3'
	Reverse	5'-TGCAGCAGATCATTTTCATATTGC-3'
	Probe	5'-CTGACTCGCCACACTCCACGGA-3'
<i>COX-2</i>	Forward	5'-GCTGTCCCCACATTAGGCTTAA-3'
	Reverse	5'-GCGGTGAAAGTGGTTTGGTT-3'
	Probe	5'-ACAGATGCAATTCCCGGACGTC-3'
<i>IL-4R</i>	Forward	5'-TTGGGCACCTCGACTTGTG-3'
	Reverse	5'-GGACAGTCTGCTGCAGAAGCT-3'
	Probe	5'-ACGAGTTGTTGGCTGCTCCCT-3'
<i>IL-6</i>	Forward	5'-CCAGGAGCCCAGCTATGAAC-3'
	Reverse	5'-CCCAGGGAGAAGGCAACTG-3'
	Probe	5'-TTCTCCACAAGCGCCTTCGG-3'
<i>IL-6R</i>	Forward	5'-GCGAAAGGATGAAAGTGACCAT-3'
	Reverse	5'-AGACAAGCCCAGCAATGAAAA-3'
	Probe	5'-CGGTTTTCCAGGTTTAAGCTGTTACTGTCTTCA-3'
<i>IL-8</i>	Forward	5'-GGAAGAAACCACCGGAAGGA-3'
	Reverse	5'-AGAGCCACGGCCAGCTT-3'
	Probe	5'-CCATCTCACTGTGTGTAACATGACTTC-3'
<i>IL-13R</i>	Forward	5'-TGCTTGCTATCGGATGCTT-3'
	Reverse	5'-CTCGGTGTCTGAAGATGAAGTACAG-3'
	Probe	5'-TATACCTTTCTGATAAGCACAAACATTTG-3'
Apoptosis related genes		
<i>Caspase-1</i>	Forward	5'-CAAGAATATGCCTGTTCCCTGTGAT-3'
	Reverse	5'-TGGCTGCTCAAATGAAAATCG-3'
	Probe	5'-TGGAGGAAATTTTCCGCAAGGT-3'
<i>Caspase-3</i>	Forward	5'-TGAGCCTGAGCAGAGACATGA-3'
	Reverse	5'-CCTTCCTGCGTGGTCCAT-3'
	Probe	5'-CAGCCTGTTCCATGAAGGCAGAG-3'
<i>Caspase-8</i>	Forward	5'-ATCGCCAGCACCAAGTC-3'
	Reverse	5'-GAAGGCGCACCCAAGATG-3'
	Probe	5'-AGGCTTTCGGTTTCTTTGCC-3'
<i>Hsp27</i>	Forward	5'-TCCCTGGATGTCAACCACTTC-3'
	Reverse	5'-TCTCCACCACGCCATCCT-3'
	Probe	5'-CCGGACGAGCTGACGGTCAAGA-3'
<i>Hsp70</i>	Forward	5'-CAAGAAATTGATGAGTGCAAATGC-3'
	Reverse	5'-GTTCCAGATACATCAACATCATTCATAA-3'
	Probe	5'-AGATCTCCCTTTGAGCATTGAATGT-3'
<i>PARP</i>	Forward	5'-GCCAGTTAACAGGCAATTGAAGT-3'
	Reverse	5'-GGCTGGTGGACTGCTGAGA-3'
	Probe	5'-TATGCATACTCCACATCAGTTCCCTTC-3'
Extracellular matrix related genes		
<i>COL3A1</i>	Forward	5'-TCTTGGTCAGTCCTATGCGGATA-3'
	Reverse	5'-CGGATCCTGAGTCACAGACACA-3'
	Probe	5'-AGATGTCTGGAAGCCAGAACCATGCC-3'
<i>Decorin</i>	Forward	5'-GCCAGAAAAAATGCCAAAAA-3'
	Reverse	5'-TCGCACTTTGGTGATCTCATTTC-3'
	Probe	5'-TCTTCAGGAGCTGCGTGCCCATG-3'

### III. 결과

#### 1. Oligomer microarray 결과

총 11례 중 2명의 환자에서 획득된 각각의 건증 조직과 정상 건 조직으로 Human Genome U133A 2.0 Gene-Chip (Affymetrix)을 이용하여 발현된 모든 유전자 목록을 획득하였다. 정상 건과 비교해 지수 함수로 두 배 이상 발현이 증가, 또는 감소한 DEGs와 이들 중 유전정보를 가지고 있는 유전자를 선별하였다(Table 2). 상위 200개의 발현 증가 유전자들 중 유전정보가 알려진 것은 각각 179, 167개였으며, 상위 200개의 발현 감소 유전자들 중에서는 각각 175, 185개였다. 이들 유전자 목록에는 MMP와 TIMP 유전자들과 염증성 cytokine 유전자들, 그리고 세포사멸과 연관된 유전자들이 다수 포함되어 있었다. 특히 *matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -9, -11, -13, -14, -15, -19, matrix metalloendopeptidase, a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) -12, IL-2, -11, -13R, fibroblast growth factor-2, insulin-like growth factor-1, heat shock protein 70 (Hsp70), collagen type I alpha 1 (COL1A1), COL3A1* 유전자의 발현이 유의하게 증가하였으며, *MMP-3, -10, -17, -27, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -3, -4, IL-6R, -7, -8, -16, vascular endothelial growth factor (VEGF), decorin* 유전자의 발현은 유의하게 감소하였다.

BiNGO Bioinformatics program (Affymetrix)를 이용한 생물학적 연관성에 따른 분류에 의하면, 두 환자의 건증 조직에서 공통적으로 metalloendopeptidase와 metallopeptidase 활성 및 세포의 기질 관련 유전자 군의 발현이 증가하였고(Table 3, 4), 세포외 영역 관련 유전자군의 발현이 공통적으로 감소하였다(Table 5, 6). 또한 특징적으로 인체의 발생과 연관이 있는 유전자들의 발현이 정상 건에 비유리한 변화를 보였다(Table 3, 5, 6).

Table 2. Total numbers of differentially expressed genes(DEGs) in tendinosis tendons compared with normal tendons

	Total Number of DEGs	
	Up Regulated/ Known Info.	Down Regulated/ Known Info.
Case 1	2684 / 2303	2270 / 1974
Case 2	1745 / 1488	1424 / 1254

Table 3. Functional grouping of the 200 ranked up regulated DEGs in tendinosis case 1

GOC	Rank	P-value	GO ID	GO Term	c	k
BP	1	2.79E-06	GO:0007275	development	2416	45
BP	2	1.41E-05	GO:0048628	myoblast maturation	6	4
BP	3	1.41E-05	GO:0007520	myoblast fusion	6	4
BP	4	1.41E-05	GO:0048627	myoblast development	6	4
BP	5	7.08E-05	GO:0048513	organ development	1123	25
CC	1	7.98E-15	GO:0005578	extracellular matrix (sensu Metazoa)	542	21
CC	2	1.07E-15	GO:0031012	extracellular matrix	545	21
CC	3	8.03E-08	GO:0005576	extracellular organ	1592	31
CC	4	0.000550078	GO:0016020	membrane	5931	75
CC	5	0.00111482	GO:0005583	fibrillar collagen	23	4
MF	1	2.63E-05	GO:0004222	metalloendopeptidase activity	132	9
MF	2	3.83E-05	GO:0008237	metallopeptidase activity	225	11
MF	3	5.52E-05	GO:0030246	carbohydrate binding	336	13
MF	4	0.000701895	GO:0008201	heparin binding	118	7
MF	5	0.000848356	GO:0005007	fibroblast growth factor receptor activity	21	4

GOC : gene ontology category

C : number of total probes having given gene ontology in all genes

K : number of total probes having given gene ontology in DEGs

BP : biological process

CC : cellular components

MF : molecular function

Table 4. Functional grouping of the 200 ranked up regulated DEGs in tendinosis case 2

GOC	Rank	P-value	GO ID	GO Term	c	k
BP	1	2.86E-06	GO:0006817	phosphate transport	122	10
BP	2	3.27E-05	GO:0015698	inorganic anion transport	206	11
BP	3	4.43E-05	GO:0000270	peptidoglycan metabolism	21	5
BP	4	7.98E-05	GO:0007155	cell adhesion	919	23
BP	5	0.000180486	GO:0006820	anion transport	253	11
CC	1	1.06E-15	GO:0005578	extracellular matrix (sensu Mentazoa)	542	32
CC	2	2.07E-15	GO:0031012	extracellular matrix	545	32
CC	3	4.59E-08	GO:0005576	extracellular region	1592	40
CC	4	3.67E-07	GO:0005581	collagen	70	9
CC	5	6.46E-05	GO:0005583	fibrillar collagen	23	5
MF	1	5.81E-09	GO:0004222	metalloendopeptidase activity	132	13
MF	2	4.07E-08	GO:0008237	metallopeptidase activity	225	15
MF	3	2.69E-06	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	155	11
MF	4	0.000482914	GO:0004175	endopeptidase activity	454	14
MF	5	0.000551364	GO:0008270	zinc ion binding	1575	30

GOC : gene ontology category

C : number of total probes having given gene ontology in all genes

K : number of total probes having given gene ontology in DEGs

BP : biological process

CC : cellular components

MF : molecular function

Table 5. Functional grouping of the 200 ranked down regulated DEGs in tendinosis case 1

GOC	Rank	P-value	GO ID	GO Term	c	k
BP	1	4.81E-09	GO:0007275	development	2416	53
BP	2	7.75E-06	GO:0009653	morphogenesis	1267	30
BP	3	0.00010082	GO:0001501	skeletal development	195	10
BP	4	0.000128692	GO:0006112	energy reserve metabolism	52	6
BP	5	0.000379608	GO:0048513	organ development	1123	24
CC	1	7.41E-09	GO:0005576	extracellular region	1592	41
CC	2	3.64E-07	GO:0005615	extracellular space	669	23
CC	3	0.000488235	GO:0030017	sarcomere	39	5
CC	4	0.000649683	GO:0005578	extracellular matrix (sensu Metazoa)	542	15
CC	5	0.000649943	GO:0030016	myofibril	42	5
MF	1	0.000185881	GO:0004896	hematopoietin/interferon-class (D200-domain) receptor activity	88	7
MF	2	0.000525408	GO:0030346	protein phosphatase 2B binding	4	3
MF	3	0.00369433	GO:0016491	oxidoreductase activity	797	17
MF	4	0.00379615	GO:0043121	neurotrophin binding	10	3
MF	5	0.00403569	GO:0005198	structural molecule activity	1030	20

GOC : gene ontology category

C : number of total probes having given gene ontology in all genes

K : number of total probes having given gene ontology in DEGs

BP : biological process

CC : cellular components

MF : molecular function

Table 6. Functional grouping of the 200 ranked down regulated DEGs in tendinosis case 2

GOC	Rank	P-value	GO ID	GO Term	c	k
BP	1	1.01E-07	GO:0007275	development	2416	53
BP	2	3.01E-06	GO:0009653	morphogenesis	1267	32
BP	3	0.00013024	GO:0001501	cell adhesion	919	23
BP	4	0.000760911	GO:0006112	response to external stimulus	1331	27
BP	5	0.000834192	GO:0048513	organ development	1123	24
CC	0	below 2.2204E-016	GO:0005576	extracellular region	1592	56
CC	1	3.02E-09	GO:0005615	extracellular space	669	27
CC	2	2.55E-08	GO:0005578	extracellular matrix (sensu Metazoa)	542	23
CC	3	2.82E-08	GO:0031012	extracellular matrix	545	23
CC	4	9.65E-06	GO:0001527	microfibril	5	4
CC	5	9.65E-06	GO:0043205	fibril	5	4
MF	1	0.000167314	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	155	9
MF	2	0.000251012	GO:0004896	hematopoietin/interferon -class (D200-domain) receptor activity	88	7
MF	3	0.00344145	GO:0008083	growth factor activity	247	9
MF	4	0.00528849	GO:0005539	glycosaminoglycan binding	159	7
MF	5	0.00611289	GO:0005102	receptor binding	866	18

GOC : gene ontology category

C : number of total probes having given gene ontology in all genes

K : number of total probes having given gene ontology in DEGs

BP : biological process

CC : cellular components

MF : molecular function

## 2. Real-time RT-PCR을 이용한 특정 mRNA 발현 검증

현재까지 건증의 발생과 연관이 있는 것으로 보고된 MMP 계열 유전자와 TIMP 계열 유전자, 염증 사이토카인 유전자, 세포사멸 관련 유전자, 그리고 세포외 기질 관련 유전자의 mRNA 발현을 9명의 환자에서 획득한 건증 조직과 정상 건 조직에서 real-time RT-PCR기법을 이용하여 정량적으로 측정하였다. 이들 결과를 정상 조직에서의 mRNA 발현 정도의 비로 환산하여 분석하였으며, 정상 건 조직과 비교하여 2배 이상의 발현 변화를 보이는 것을 유의한 발현 변화로 판단하였다.

MMP 계열 유전자들 중 *MMP-1*은 8예 중 6예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 5예는 발현이 증가하였다. *MMP-2*는 8예 중 4예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 3예에서 발현 증가를 나타냈다. *MMP-3*은 8예 중 6예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 4예에서 발현 증가를 보였다. *MMP-9*는 8예 중 5예에서 유의한 발현 변화가 나타났으며, 이 중 4예에서 발현 증가를 보였다. *MMP-10*은 8예 중 7예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 4예에서 발현 증가를 보였다. *MMP-11*은 8예 중 1예를 제외한 7예에서 유의한 발현 증가를 보였다. *MMP-13*은 8예 중 7예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 5예에서 발현 증가를 보였다. *ADAMTS-4*는 8예 중 5예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 4예에서 발현 증가를 나타냈다(Table 7).

TIMP 계열 유전자들 중 *TIMP-1*은 8예 중 7예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 5예에서 유의한 발현 증가를 보였다. *TIMP-2*는 8예 중 4예에서 유의한 발현 증가를 보였으며, *TIMP-3*은 8예 중 2예에서 의미있는 발현 변화를 나타냈다. *TIMP-4*는 7예 중 6예에서 유의한 발현 증가를 나타냈다(Table 7).

염증 관련 사이토카인 유전자들 중 *COX-1*은 8예 중 3예에서 의미있는 발현 변화를 보였으며, *COX-2*는 7예 중 2예에서 유의한 발현 변화를 나타냈다. *IL-4R*은 7예 중 5예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 3예에서 발현 증가를 보였다. *IL-6*은 8예 중 6예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 5예 발현 감소를 나타냈다. *IL-6R*은 8예 중 7예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 5예에서 유의한 발현 증가를 보였다. *IL-8*은 8예 모두에서 유의한 발현 증가를 보였다. *IL-13R*은 7예 중 5예에서 유의하게 발현이 증가



하였다(Table 7).

세포사멸 관련 유전자들 중 *caspase-1*은 8예 중 3예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이들 모두 발현이 감소하였다. *Caspase-3*은 8예 중 3예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이들 모두 발현 증가하였다. *Caspase-8*은 8예 중 4예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 2예에서 발현 증가를 보였다. *Hsp27*은 8예 중 3예에서 유의한 발현 변화를 나타냈고, 이 중 2예에서 발현이 증가하였다. *Hsp70*은 8예 중 5예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 3예에서 발현 감소를 보였다. *Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)*는 8예 중 6예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 4예에서 발현이 감소하였다(Table 7).

세포외 기질 관련 유전자들 중 *COL3A1*은 8예 중 6예에서 유의한 발현 변화를 보였고, 이 중 4예에서 발현이 증가하였다. *Decorin*은 8예 중 4예에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 이 중 3예에서 발현 감소를 보였다(Table 7).

이 결과들을 정리하면, *MMP-8, -10, -11, -13, TIMP-1, -4, IL-4R, -6R, -8* 유전자는 건증 건의 80% 이상에서, *MMP-1, -2, -3, -9, ADAMTS-4, TIMP-2, IL-6, -13R, caspase-8, Hsp70, PARP, COL3A1, decorin*은 건증 건의 50% 이상에서 유의한 발현 변화를 보였으며, 나머지 *TIMP-3, COX-1, -2, caspase-1, -3, Hsp27* 유전자는 건증 건의 50% 미만에서 유의한 발현 변화를 보였다.

각 유전자에 대한 발현 절대 값을 이용한 통계 분석에서는 *MMP-1, -11, TIMP-1, -2, -4, IL-8, caspase-8* 유전자의 발현이 정상 건 조직에 비해 통계적으로 의미 있는 변화를 보인 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

Table 7. Difference in gene expression between tendinosis tissue and normal tendon with real-time RT-PCR

	Case1	Case2	Case3	Case4	Case5	Case6	Case7	Case8	Case9
<i>MMP-1</i>	4.51	154.34	20.02	1.74	5.68	1.30		-4.08	31.85
<i>MMP-2</i>	1.48	4.14		-11.26	1.32	1.28	-1.69	2.08	5.40
<i>MMP-3</i>	3.80	10.78	-2.00	29.31	-6.03	-1.54		7.19	1.01
<i>MMP-8</i>						-47.85		5.35	-15.97
<i>MMP-9</i>	8.84	18.68		1.23	-1.20	-2.52	4.23	16.22	-1.58
<i>MMP-10</i>	4.45	103.73	16.15	27.54	-66.67	-16.45		-1.83	-558.24
<i>MMP-11</i>	6.35	16.19	3.27	8.40	24890.94	5.75		-10.71	10.70
<i>MMP-13</i>	-1.91	12.24	19.45	36.34	1302.14	-11.24		-83.33	146.36
<i>ADAMTS-4</i>	8.65	13.36		-1.92	-1.02	-3.79	2.66	1.13	6.68
<i>TIMP1</i>	4.14	2.50	1.86	4.11	4.94	-2.37		-2.99	8.65
<i>TIMP2</i>	1.77	2.25	-1.08	3.12	3.42	1.53		-1.25	5.13
<i>TIMP3</i>	1.18	1.27		1.22	3.87	-1.04	-1.82	-4.77	-1.80
<i>TIMP4</i>	5.67	12.61	7.23	3.15		4.02		1.02	19.74
<i>COX-1</i>	1.27	1.32	-2.01	1.30	3.74	-5.02		1.30	1.99
<i>COX-2</i>	1.67	6.67	-1.81	2.18		-1.95		-1.22	1.84
<i>IL-4R</i>	6.81	7.16		-2.89		-102.04		1.03	51.86
<i>IL-6</i>	-2.62	-1.46		-128.21	-23.81	-10000	-16.84	-1.42	5.26
<i>IL-6R</i>	3.41	7.36		2.96	-1.62	-2.22	2.04	-3.78	3.00
<i>IL-8</i>	3.36	121.38	10.73	48.28	3.30	3.88		2.55	11.47
<i>IL-13R</i>	1.87	48.28		21.86	2.99	22.11	4.27	-1.31	
<i>Caspase-1</i>	-3.19	1.57		-1.36	1.77	-2.13	1.13	-2.01	1.36
<i>Caspase-3</i>	4.61	14.19		-1.10	1.33	1.07	1.30	1.36	5.84
<i>Caspase-8</i>	3.46	1.29		1.62	1.35	-24.45	1.55	-4.20	2.17
<i>Hsp27</i>	1.09	-1.43		2.08	2.42	-1.84	-1.84	-3.03	1.70
<i>Hsp70</i>	2.31	5.18		-5.05	1.69	1.05	-9.74	-2.90	1.38
<i>PARP</i>	-2.42	39.22		-28.17	1.78	1.02	-3.78	-2.08	317.37
<i>COL3A1</i>	2.26	10.41	4.24	1.17	-1.02	5.15		-4.70	9.17
<i>Decorin</i>	1.12	-18.87		-1.59	-1.02	1.13	2.73	-10.41	-2.55

Note: Negative numbers denote lower and positive numbers denote higher gene expression in tendinosis tissue, compared to normal tendon. Gene expression differences are presented as ratios between tendinosis tissue and normal tendon.

#### IV. 고찰

건은 근육을 뼈에 부착시키는 조직으로써, 강한 장력에 견디도록 인대와 매우 비슷한 구조를 하고 있으며, 또한 뛰어난 유연성을 지닌 조직이다. 건의 구조, 성분 그리고 기질의 조직화는 건 조직의 물리적인 특성을 유지하는 데 매우 중요하다. 건은 주로 건 세포와 가늘고 긴 형태의 교원질 분자들로 구성된 원섬유(fibril), 원섬유들로 구성된 교원질섬유(fiber), 다수의 교원질섬유가 모여진 섬유다발(fiber bundle)로 이루어진다. 섬유다발들은 각각 건내 결합조직섬유(endotenon)에 의해 싸여 있으며, 가장 외부는 상건막(epitenon)이 싸고 있다<sup>34</sup>. 이렇게 구성된 건은 건주위조직에 따라, 아킬레스 건과 같은 활막이 존재하지 않는 건과 후경골 건과 같이 활막에 싸여있는 건으로 구분된다. 교원질 중에서는 제 1형 교원질이 건 조직의 60%이상을 차지하며, 총 교원질의 95%이상을 구성한다. 그 외에도 몇몇 다른 형태의 교원질(제 3형, 제 4형, 제 6형, 제 12형, 제 14형 등)과 프로테오글리칸(proteoglycan), 당단백질(glycoprotein)로 구성되어 있다<sup>35,36</sup>. 그러나 역학적 부하가 가해지면, 그에 반응하여 대사뿐만 아니라 구조적, 역학적인 변화를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>35</sup>. 이러한 변화의 중심에 세포외 기질 내에 존재하는 건 세포와 건 섬유아세포가 있다.

본 연구의 대상이 된 후경골 근은 하퇴부 근위 1/3의 경골 후외측, 비골 후내측 및 골간 막에서 기시한다. 후경골 건은 경골의 중앙부에서 나타나기 시작하여 족근 관절 내과의 근위부까지 근 섬유를 받는다. 이 건은 족근 관절 내과의 후방에서 장족지 굴건의 전방에 위치하며, 굴건 지지대의 심부에 위치한다. 이 후 원통형의 건은 삼각 인대의 외측을 지나면서 납작해지며, 배측 종주상 인대의 하방을 지나는 부위에는 섬유연골성 종자골이 존재한다. 이 건은 족저부에서 여러 갈래로 나뉘어 주상골의 결절과 종주상 관절 하방의 관절막, 세 개의 설상골, 입방골, 그리고 제 2, 3, 4 중족골의 기저부에 부착된다<sup>36</sup>. 활막은 족근 관절 내과의 근위 약 5.5 cm에서 시작하여 굴근 지지대의 심부를 지나 주상골 결절의 건 부착부까지 존재한다.

활막에 싸여 있는 건임에도 mesotenon이 존재하지 않아 근위부에서는 후경골 동맥의 가치를 통해, 원위부에서는 골 부착부에서 족배 동맥의 가치를 통해 혈액 공급을 받는다. 이러한 해부학적 특징으로 인해 주상골 결절의 근위 약 4 cm에서부터 14 mm 범위의 저혈성(hypovascular)영역이 존재한다<sup>37</sup>. 또한 이 부위는 기능적인 면에서 활강 건인 후경골 건이 족근 관절 내과에 의해 접촉부위에는 압력을, 그 반대편에는 긴장력이 작용하게 되기 때문에, 건의 단면상이 두 힘의 이행부에 전단력이 발생하는 부위와 일치하며<sup>23</sup>, 병변이 가장 흔하게 발견되는 부위이기도 하다.

후경골 건은 후족부의 강한 내번과 전족부의 내회전이 주된 기능이며, 이차적으로 족근 관절을 족저 굴곡시키는 기능을 한다<sup>38</sup>. 이는 보행 중 몸을 앞으로 전진시키기 위한 준비 과정으로, 거골하 관절의 내번을 일으켜 발이 경직된 지렛대(rigid lever)로 작용하게 한다. 이는 입각기 말에 후경골 건이 수축하여, 아킬레스 건 수축으로 발생한 힘이 중족골 두를 작용점으로 하여 발전체를 들어 올릴 수 있게 함을 의미한다<sup>39</sup>. 그러나 후경골 건의 기능이 어떠한 이유로 상실되면 아킬레스 건의 수축으로 발생한 힘이 중족부, 특히 거주상관절에 작용하게 됨으로써, 발전체를 들어 올리지 못하고 중족부의 외번을 일으킨다. 보행 중 발생하는 이러한 반복적인 생역학적 변화는 중족부의 함몰, 전족부의 외전, 후족부의 외반으로 특징지어지는 평편족을 유발시키게 된다<sup>4,6,32,36</sup>.

최근 개발된 여러 기술들로 질병 발생과 연관된 유전자의 발현 연구를 가능하게 되었다. 특히 oligomer microarray의 개발로 짧은 시간에 수많은 유전자의 발현 여부를 동시에 측정이 가능하게 되었으며, real-time RT-PCR 기법을 통해 특정 유전자의 mRNA 발현을 좀 더 정확하게 정량화할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 이 두 기법을 이용하여 후경골 건증 조직에서 정상 건 조직과 비교하여 유의한 발현 변화를 보이는 유전자를 알아보려고 하였다.

건의 생역학적 성질은 세포외 기질의 영향을 받으며, 정상적으로 세포외 기질은 합성과 분해의 동적 평형상태를 유지하고 있다<sup>39</sup>. 이들 세포외 기질의 분해는 기본적으로 단백 분해 효소들에 의해 매개되

어지며, 이들은 세포내의 유전자 전사나, 이를 통한 단백질 합성, 또는 단백질 분해 효소 억제인자들에 의해 조절된다. Metalloproteinase 집단은 세포외 단백질 분해에 직접적 연관이 있는 것으로 알려져 왔으며, 이들 집단에는 MMP 계열 이외에도 a disintegrin and metalloproteinase (ADAM), ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) 계열이 포함된다<sup>40-42</sup>. 본 연구에서 oligomer microarray로 선별된 DEG 중 발현이 증가, 또는 감소한 상위 200개 유전자에서 유전 정보가 알려진 유전자들의 생물학적 기능에 따른 분류에 의하면(Table 3, 5), 두 환자의 건증 조직에서 공통적으로 metalloendopeptidase와 metallopeptidase 관련 유전자의 발현이 증가하였으며, 이는 건증 발생에 있어 이들의 발현이 중요한 역할을 한다는 사실을 의미한다.

MMP 계열의 효소들은 세포외 기질 구성요소들에 대한 분해능이 있으며, 건의 성형(remodelling)에도 관계하는 것으로 되어 있다<sup>40-42</sup>. 여기에는 23개의 서로 다른 아형이 존재하며, MMP-1, -2, -8, -13, -14 등은 교원질 분해능이 있다. ADAM 계열에는 30개 이상의 아형이 존재하며, 단백질 분해뿐만 아니라 세포의 신호 전달에도 연관이 있는 것으로 알려져 있다<sup>43,44</sup>. ADAMTS 계열에는 19개의 아형이 존재하며, N-terminal procollagen propeptidase (ADAMTS-2, -3, -14)과 aggrecanase (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15)등이 있다. 이들은 관절염 연골의 초기 분해와 건 기질의 교체에 관여한다고 한다<sup>45-47</sup>. Aggrecanase들은 aggrecan의 C-terminal의 특정 부위를 분해하여 글루탐산 잔여물을 만드는 과정을 통해 기능을 발휘하며, 일부의 aggrecanase는 versican이나 brevican과 같은 유사 단백질에 대한 분해능도 있는 것으로 알려져 있다<sup>48-51</sup>. 이중 ADAMTS-4는 연골의 oligomeric matrix protein과 fibromodulin, decorin의 분해도 가능하다<sup>52,53</sup>. TIMP 계열은 일반적으로 기능과 정도의 차이는 있지만 MMP 계열 효소들을 생리학적으로 억제하는 4개의 아형이 존재한다<sup>54</sup>. 상대적으로 ADAM 및 ADAMTS 계열 효소에 대한 반응은 제한적이다<sup>55-57</sup>.

본 연구에서는 건증 조직뿐만 아니라 정상 건 조직에서도 MMP, TIMP, ADAM, ADAMTS 계열의 유전자 발현이 확인되었으며, 이

는 이들 효소가 정상 건 조직의 세포외 기질 생성과 분해의 평형 상태의 유지에 필요함을 의미한다. Oligomer microarray 결과에서는 건증 조직에서 *MMP-1*, *-2*, *-9*, *-11*, *-13*, *-14*, *ADAM-12*, *TIMP-2* 유전자의 발현이 정상 건 조직에 비해 유의한 발현 증가를 보였으며, *MMP-3*, *-10*, *-17*, *-27*, *TIMP-4* 유전자는 유의하게 발현이 감소하였다. Real-time RT-PCR 결과에서는 이와는 다소 차이를 보였으나, *MMP-1*, *-9*, *-11*, *-13*은 과반수이상에서 유의한 발현 증가를 보여 microarray 결과와 일치했다. 반면 *MMP-3*, *-10*, *TIMP-1*, *-2*, *-4*는 microarray 결과와 달리 과반수이상에서 유의한 발현 감소를 보였다. 또한 microarray에서는 유의한 발현 변화를 보이지 않았던 *ADAMTS-4*는 과반수이상에서 유의한 발현 증가를 보였다. 그러나 여러 MMP와 TIMP 유전자 사이에 역의 상관관계는 없었다. 이러한 결과는 후정골 건증의 발생에 있어서 MMP, ADAM, ADAMTS 및 TIMP 유전자의 발현 변화가 각 환자에 있어서 정도의 차이는 있지만 밀접하게 관련되어 있음을 의미한다.

건 손상에 있어서 염증 관련 요소 또한 존재하는데, IL-1 $\beta$ 와 같이 염증 반응 중 나타나는 사이토카인은 latent MMPs의 발현을 증가시키며, 이는 여러 효소와 사이토카인, reagent와 반응하여 활성화된다<sup>58</sup>. IL-1 $\beta$ 는 강력한 염증 사이토카인으로써, COX-2, IL-6, MMP-1, -3와 같은 다른 염증 매개 물질의 발현을 증가시킨다<sup>59</sup>. 생체 내에서 정상 건 조직에 주기적인 자극을 가했을 때, 건 세포로부터 PGE<sub>2</sub>와 IL-1 $\beta$ , IL-6이 분비된다는 보고도 있다<sup>15</sup>. 본 연구의 oligomer microarray 결과에서 *IL-2*, *-11*, *-13R* 유전자의 유의한 발현 증가와 *IL-6R*, *-7*, *-8*, *-16* 유전자의 유의한 발현 감소를 보였다. Real-time RT-PCR 결과에서는 *IL-4R*, *-6*, *-6R*, *-8*, *-13R* 유전자가 건증의 과반수이상에서 유의한 발현 변화를 보였다. 이렇게 건증 조직에서 여러 사이토카인의 발현이 유의하게 변화된 것은 건증 발현 과정에서 이들의 발현 및 활동이 존재한다는 것을 의미한다.

최근 들어서 회전근개 건병변 환자의 과열된 극상 건 조직에서 과도하게 증가된 세포사멸이 관찰됨으로써<sup>27</sup>, 세포사멸과 건병변과의 연관성에 관심이 모아지고 있다. 세포사멸은 괴사와 달리 다세포 생

물의 정상 발육과 성체의 세포 교체를 통해 항상성을 유지시키는 중추적인 과정이다<sup>60</sup>. 세포사멸 과정에서 세포는 급속히 수축하여 세포간의 접촉이 소실되고, 세포내에서는 고밀도의 염색질 응축과 핵의 분절화, 세포질의 농포화 과정을 거쳐 세포 자체가 분절화되며, 결국에는 다수의 세포사멸체를 형성하게 된다. 세포사멸체들은 주위의 세포나 대식세포에 의해 신속히 포식되기 때문에 염증 반응은 유발되지 않는다. 또한 nuclear DNA의 nucleosome 사이의 분절은 세포사멸의 생화학적 특징으로 알려져 있다<sup>61</sup>. 세포사멸에는 cysteine proteinase의 한 계열인 caspase가 필수적이다<sup>62</sup>. Caspase는 구조에 따라 14개의 아형이 존재하며 주요 기능에 따라 크게 사이토카인 처리 효소인 caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14와 세포사멸 관련 효소인 caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10로 나뉜다. 세포사멸 관련 효소들은 세포사멸의 초기에 세포사멸 개시(initiator) 역할을 하는 caspase-2, -8, -9과 세포사멸 실행(effector) 역할을 하는 caspase-3, -6, -7로 분류된다<sup>63-66</sup>. 세포사멸 스트레스에 의한 세포사멸은 세포 표면의 사멸 수용체 경로(death receptor-mediated pathway)나 미토콘드리아 경로(mitochondrial death pathway)를 통해 이루어진다. 이 두 경로 모두 결국에는 세포사멸 실행 caspase를 활성화함으로써 세포사멸이 이루어진다<sup>67</sup>. 사멸 수용체 경로에 의한 세포사멸은 TNF- $\alpha$ , Fas ligand [FasL] /Apo1L/CD95L, Trail/Apo2L, Apo3L와 같은 ligand가 TNFR-1 (TNF receptor-1)이나 Fas수용체에 결합하여 세포사멸 유발 신호 복합체(Death Inducing Signal Complex, DISC)가 형성되면, 이들 수용체의 세포사멸 영역(death domains, DDs)에서 procaspase-8을 caspase-8으로 활성화시키고, 이어서 caspase-3이 활성화되어 세포사멸이 일어나게 된다<sup>68-70</sup>. 미토콘드리아 경로에 의한 세포사멸은 사멸 신호에 의해 미토콘드리아의 막 전위(membrane potential)가 소실됨으로써 막 투과성이 증가하고, 이로 인해 cytochrome c와 Sma/Diablo와 같은 세포사멸 유발 인자들이 세포질로 이동하게 된다. Cytochrome c는 Apaf-1 (Apoptotic proteinase activation factor-1)과 결합하여 apoptosome을 형성하여 procaspase-9을 caspase-9으로 활성화시키

며, 이는 다시 caspase-3의 활성화를 통해 세포사멸이 일어나게 된다<sup>67,70-72</sup>. 본 연구에서는 세포사멸 실행 caspase인 *caspase-3*에 대한 real-time RT-PCR결과에서 유의한 발현 변화를 보인 3예 모두에서 유전자의 발현이 증가하였으며, 개시 caspase인 *caspase-8*은 과반수이상에서 유의한 발현 변화를 보였다. 이와 같은 결과는 정도의 차이는 있지만, 후경골 건증의 발생에 있어 세포사멸이 연관되어 있음을 의미한다.

세포는 스트레스 상황에서 heat shock protein (Hsp), PARP와 같은 스트레스 반응 단백질을 발현하여 세포 손상을 최소화하고 세포사멸을 조절하고자 한다. 가장 대표적인 스트레스 반응 단백질인 Hsp는 세포사멸 유도 단백질과는 구별되는, 표면적으로는 상반되는 기능을 보이는 단백질로 분자량, 아미노산의 배열 및 그 기능에 따라 Hsp90, Hsp70, Hsp60, sHsp, Hsp10 군으로 분류된다<sup>73</sup>. 이 중 Hsp70은 주로 세포사멸 억제 기능을 하며, 이는 세포질에 존재하는 Bax의 미토콘드리아 내부로의 이동 억제<sup>74,75</sup>, Apaf-1과 직접 상호작용을 통한 apoptosome 복합체 형성 억제<sup>76,77</sup>, caspase에 의한 세포질 phospholipase A2의 활성화 억제<sup>78</sup>와 같은 다양한 방법으로 세포사멸을 방해한다. 이외에도 Hsp70은 JNK, NF- $\kappa$ B, Akt 신호전달 체계의 조절에도 관여한다<sup>79</sup>. Hsp27은 small Hsp군에 속하며 세포사멸을 억제하는데, 이는 세포내 산화환원 반응의 평형과 미토콘드리아 막의 안정성을 유지, 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 이동의 제한 및 이미 이동된 cytochrome c의 Apaf-1으로부터 고립을 통한 apoptosome 복합체 형성의 방해를 통해 기능을 발휘한다<sup>80,81</sup>. 또한 caspase-9과 같은 세포사멸 개시 caspase의 활성 억제를 통한 기전도 밝혀진 바 있다<sup>82</sup>. 또한 poly(ADP-ribosylation)은 스트레스 상황에서 세포내 genome의 integrity를 유지하는데 필수적인 반응이다<sup>83</sup>. 일단 DNA 손상되면 PARP가 활성화되어 손상된 DNA 부위에 결합하고 이후 연쇄적으로 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)와 반응하면서 poly(ADP-ribose)를 형성한다<sup>84</sup>. 따라서 PARP는 스트레스 반응 단백질의 일종이라 하겠다. 정상적으로 poly(ADP-ribose)은 곧 poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)



의 가수분해로 세포내에서는 일시적으로 존재하게 된다<sup>84</sup>. 중등도 이하의 스트레스에서는 이 반응을 통한 전사 조절로 손상된 세포의 회복에 기여하지만, 과도한 스트레스에서는 PARP가 과활성화되고, 결과적으로 poly(ADP-ribose)가 세포내에 과축적되어 세포사멸이 일어나게 된다<sup>85</sup>. 또한 PARP는 apoptosis-inducing factor-1 (AIF-1) 을 미토콘드리아에서 세포질로 이동시켜 caspase-independent 세포사멸 경로의 활성화에도 관여한다<sup>86</sup>.

본 연구에서는 oligomer microarray에서 후경골 건증 조직에서 *Hsp70* 의 유의한 발현 증가를 보였으며, real-time RT-PCR에서는 과반수 이상에서 *Hsp70*, *PARP* 유전자의 유의한 발현 변화를 보였다. 이는 후경골 건증의 발생 과정에서 건 세포가 능동적으로 건증 유발 스트레스에 반응하여 세포사멸 과정에 관여하였음을 의미한다.

이외에도 oligomer microarray로 선별된 유의 발현 유전자 상위 200개 유전자들의 생물학적 연관성에 따른 분류에 의하면, 인체의 발생과 연관이 있는 유전자들의 발현이 의미 있는 변화를 보였다. 이는 인체 발생 시 작용하는 기전들이 건증의 발생에 있어서 재현됨을 의미한다.

일단 건 손상이 일어나면 초기 치유과정에서 제 3형 교원질의 함량이 증가하며, 이는 병적인 소견으로<sup>87</sup>, 제 3형 교원질은 무작위로 직경이 작은 섬유를 형성하고, 이러한 저밀도의 교원질은 인장강도의 감소로 이어져 정상 생리적 부하에 의해서도 건 파열 및 기능 소실이 가능하게 된다고 한다<sup>88</sup>. 본 연구의 세포외 기질 관련 유전자의 발현 결과를 보면, 우선 microarray에서 *COL1A1*과 *COL3A1* 유전자가 유의하게 발현이 증가하였고, *decorin* 유전자는 유의하게 발현이 감소하였다. Real-time RT-PCR에서는 *COL3A1*과 *decorin* 유전자가 과반수이상에서 발현 변화를 보였으며, 특히 *COL3A1*은 유의한 발현 변화를 보인 6예 중 5예에서 발현이 증가하였다. 반면 *decorin*은 유의한 발현 변화를 보인 4예 중 3예에서 발현이 감소하였다. 이는 후경골 건증에서 발견되는 교원질 및 세포외 기질의 구성 변화와 일치한다.

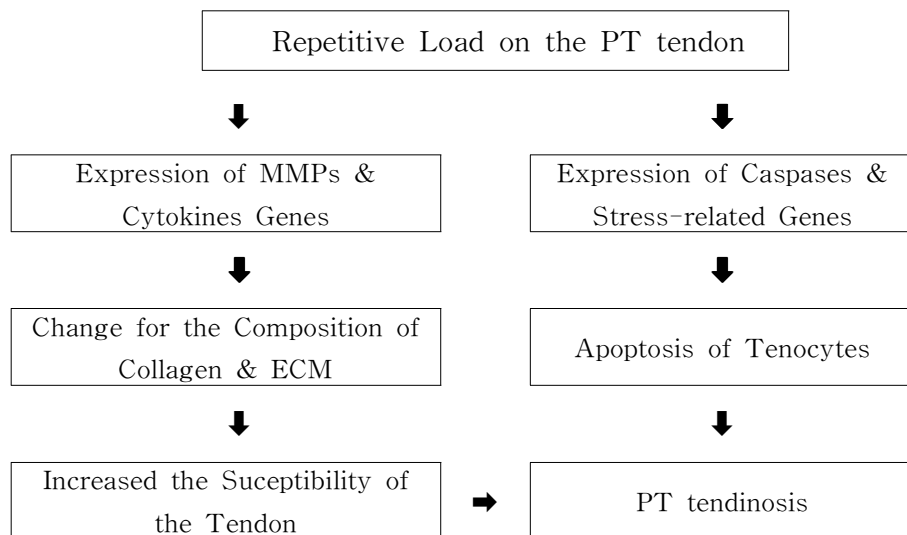
본 연구 결과에서 각 환자의 건증 조직에서 MMP와 TIMP 뿐만 아니라 염증 사이토카인 및 세포사멸과 세포외 기질 관련 유전자들의 mRNA 발현 양상이 서로 일치하지 않은 것은 각 유전자의 발현

및 작용이 각 개체에 따라 특이적이거나, 각 환자가 임상적으로 같은 John's 분류상 2기로 분류되었더라도 분자 생물학적으로 넓은 건증 스펙트럼의 서로 다른 위치에 존재하였음을 의미한다.

본 연구는 후경골 건증 환자의 인체 표본을 대상으로 matched pair 연구를 진행한 최초의 시도로 최신 기법인 oligomer microarray 와 real-time RT-PCR을 이용하여 현재까지 건증 발생에 관련이 있다고 알려진 MMP, 염증 사이토카인, 세포사멸, 스트레스 반응 단백질에 대해 총체적으로 검증하였다. 연구 결과를 정리하면, 후경골 건에 장기적으로 가해진 부하에 의해 염증 사이토카인과 MMP의 발현이 변화한다. 이는 제 1형 교원질이 주된 구성 성분인 세포외 기질의 교원질 구성에 있어서 제 3형 교원질의 증가와 같은 변화를 가져오고, 이러한 변화는 건의 인장강도의 감소와 같은 물리적 성질의 변화와 건의 비후 및 신장, 또는 미세 파열과 같은 외형 및 기능의 변화를 유발한다. 이와 함께 건의 주된 세포 성분인 건 세포에서는 건증 유발 자극에 의해 Hsps와 PARP와 같은 스트레스 반응 단백질의 발현 변화를 유발하고 세포사멸 경로의 자극이 일어나게 된다. 이와 같은 결과는 후경골 건증의 발생에 있어서 MMP, 염증 사이토카인, 세포사멸 등에 관여하는 여러 유전자의 발현이 복합적으로 작용함을 의미한다(Fig. 1).

본 연구에서는 개체간 유전자 발현차이를 극복하기 위해 matched-pair sample을 사용하였으며, 정상 대조군으로 장족지 굴건을 획득하여 사용하였다. 그러나 정상 후경골 건과 장족지 굴건 사이의 유전자 발현의 차이가 없음을 증명하지는 못한 한계를 갖는다. 그러나 이 두 건 모두 활막에 싸여 있는 환경에 존재하기 때문에 이러한 문제점을 어느 정도 극복할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 유전자의 mRNA 발현 정도를 실제 기능을 갖는 단백질의 발현으로 해석하기에는 무리가 있기 때문에 추후 Western blot 등의 단백질 발현에 대한 연구가 진행되어야 한다.

Figure 1. A Schematic Flow Diagram of the Pathogenesis for Posterior Tibial Tendinosis.



## V. 결론

본 연구는 후경골 건증 환자의 인체 표본을 대상으로 matched pair 연구를 진행한 최초의 시도로 최신 기법인 oligomer microarray 와 real-time RT-PCR을 이용하여 현재까지 건증 발생에 관련이 있다고 알려진 MMP, 염증 사이토카인, 세포사멸, 스트레스 반응 단백질에 대해 총체적으로 검증하였다. 결과에서 이들 대상 유전자들이 다양하게 발현이 증가 또는 감소하였으며, 이는 후경골 건증의 발생에 있어 이들 유전자가 관계하는 여러 분자생물학적 기전이 복합적으로 작용한다는 것을 의미한다. 이 연구는 향후 건증의 분자생물학적 발병 기전을 밝히는데 기여할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Johnson KA, Strom DE. Tibialis posterior tendon dysfunction. Clin Orthop 1989;239:196-206.
2. Keenan MA, Peabody TD, Gronley JK, Perry J. Valgus deformities of the feet and characteristics of gait in patients who have rheumatoid arthritis. J Bone Joint Surg 1991;73(A): 237-47.
3. Myerson M, Solomon G, Shereff M. Posterior tibial tendon dysfunction: its association with seronegative inflammatory disease. Foot Ankle 1989;9:219-25.
4. Funk DA, Cass JR, Johnson KA. Acquired flat foot secondary to posterior tibial tendon pathology. J Bone Joint Surg 1986; 68(A):95-102.
5. Kettelkamp DB, Alexander HH. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendon. J Bone Joint Surg 1969;51(A):759-64.
6. Mann RA, Thompson FM. Rupture of the posterior tibial tendon causing flat foot. J Bone Joint Surg 1985;67(A):556-61.
7. Holmes GB, Mann RA. Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. Foot Ankle 1992;2:70-9.
8. Mosier SM, Pomeroy G, Manoli A. Pathoanatomy and etiology of posterior tibial tendon dysfunction. Clin Orthop 1999;(365): 12-22.
9. Delmi M, Kurt AM, Meyer JM, Hoffmeyer P. Calcification of the tibialis posterior tendon: a case report and literature review. Foot Ankle Int 1995;16:792-5.
10. Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. Clin Sports Med 1992;11:533-78.
11. Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon condition: Time to change a confusing terminology. Arthroscopy 1998;14: 840-3.

12. Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implication for clinical management. *Sports Med* 1999;27:393-408.
13. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg* 2005;87(A):187-202.
14. Cook JL, Malliaras P, De Luca J, Ptasznik R, Morris ME, Goldie P. Neovascularization and pain in abnormal patella tendons of active jumping athletes. *Clin J Sport Med* 2004;14:296-9.
15. Wang JH, Iosifidis MI, Fu FH. Biomechanical basis for tendinopathy. *Clin Orthop* 2006;443: 320-32.
16. Lian O, Dahl J, Ackermann PW, Frihaen F, Engebretsen L, Bahr R. Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patella tendinopathy. *Am J Sports Med* 2006;34:1801-8.
17. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) is expressed in fetal and ruptured tendons. *Virchows Arch* 2001;439:579-85.
18. Petersen W, Pufe T, Kurz B, Mentlein R, Tillmann B. Angiogenesis in fetal tendon development: spatial and temporal expression of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF). *Anat Embryol* 2002;205:263-70.
19. Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res* 2004;22:847-53.
20. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 1998;83:832-40,

21. Sato Y, Abe M, Tanaka K, Iwasaka C, Oda N, Kanno S, et al. Signal transduction and transcriptional regulation of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2000;476:109-15.
22. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Tsokos M, Mentlein R. Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in DEGenerative Achilles tendons. *Clin Orthop* 2004;420:286-91.
23. Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of DEGenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:211-22.
24. Tsuzaki M, Bynum D, Almekinders L, Yang X, Faber J, Banes AJ. ATP modulates load-inducible IL-1 beta, COX 2 and MMP-3 gene expression in human tendon cells. *J Cell Biochem* 2003;89:556-62.
25. Skutek M, van Griensven M, Qeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003;44:128-33.
26. Wang JH, Li Z, Yang G, Khan M. Repetitively stretched tendon fibroblasts produce inflammatory mediators. *Clin Orthop* 2004;422:243-50.
27. Yuan J, Murrell GA, Wei AQ, et al. Apoptosis in rotator cuff tendinopathy. *J Orthop Res* 2002;20:1372-9.
28. Molloy TJ, Kemp MW, Wang Y, Murrell GAC. Microarray analysis of the tendinopathic rat supraspinatus tendon: glutamate signaling and its potential role in tendon DEGenerative. *A ppl Physiol* 2006;101:1702-9.
29. Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K, Schuler P, Morse P. Activation of stress-activated protein kinases (SAPK) in tendon cells following cyclic strain: the effects of strain frequency, strain magnitude, and cytosolic calcium. *J Orthop Res* 2002;20:947-52.

30. Murrell GA. Understanding tendinopathies. *Br J Sports Med* 2002;36:392-3.
31. Almekinders LC, Banes AJ, Ballenger CA. Effects of repetitive motion on human fibroblasts. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25:603-7.
32. Almekinders LC, Baynes AJ, Bracey LW. An in vitro investigation into the effects of repetitive motion and nonsteroidal antiinflammatory medication on human tendon fibroblasts. *Am J Sports Med* 1995;23:119-23.
33. Alfredson H, Lorentzon M, Backman S, Backman A, Lerner UH. cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis. *J Orthop Res* 2003;21: 970-5.
34. Jazsa LG, Kannus P. Human tendons: anatomy, physiology, and pathology. Champaign, IL: Human Kinetics; 1997.
35. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev* 2004;84:649-98.
36. Johnson KA. Tibialis posterior tendon rupture. *Clin Orthop* 1983;177:140-7.
37. Frey C, Shereff M, Greenidge N. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg* 1990;72(A):884-8.
38. Mueller TJ. Acquired flatfoot secondary to tibialis posterior dysfunction: Biomechanical aspects. *J Foot Surg* 1991;30:2-11.
39. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy: a molecular perspective. *Rheumatology* 2004;43:131-42.
40. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
41. Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998;4:130-7.



42. Riley GP, Curry V, DEGsroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 2002;21:185-95.
43. Killar L, White J, Black R, Peschon J. Adamalysins: a family of metzincins including TNFconverting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:442-52.
44. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000;16:83-7.
45. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan DEGsradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002;277:22201-8.
46. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J* 2000;350:181-8.
47. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:160-9.
48. Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, Flannery CR. Catabolism of aggrecan in cartilage explants: identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* 1991;266:8683-5.
49. Nakamura H, Fujii Y, Inoki I, Sugimoto K, Tanzawa K, Matsuki H, et al. Brevican is DEGsraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J Biol Chem* 2000;275:38885-90.
50. Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, et al. Versican V1 proteolysis in 840 JONES ET AL human aorta in vivo occurs

at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2001;276:13372-8.

51. Somerville RP, Longpre JM, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, et al. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem* 2003;278:9503-13.
52. Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegard D, Hollander AP. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biol* 2003;22:267-78.
53. Kashiwagi M, Enghild JJ, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, et al. Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem* 2004;279:10109-19.
54. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-27.
55. Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, et al. TNF converting enzyme is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998;435:39-44.
56. Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, et al. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 2000;473:275-9.
57. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 2001;276:12501-4.
58. Ries D, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:345-55.

59. Newton RC, Covington M. The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cell Immunol* 1987;110:338-49.
60. Ranganath RM, Nagashree NH. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 2001;202:159-242.
61. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
62. Aggawal BB, Bhardwaj U, Takada Y. The regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitam Horm* 2004;67:453-83.
63. Alnmri ES, Livingston DJ, Nicholson DW. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171-4.
64. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997;22:388-93.
65. Sadowski DK, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M. Caspases—their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock out studies. *Arch Immunol Ther Exp* 2002;50(1):19-34.
66. Rupinder SK, Gurpret AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 2007;46:383-93.
67. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
68. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
69. Screaton G, Xu XN. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* 2000;12:316-22.
70. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev cell Dev Biol* 2005;21:35-56.

71. Zou H, Li Y, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Bio Chem* 1999;274:11549-56.
72. Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:487-97.
73. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007;32:595-610.
74. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 2004;11:390-402.
75. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280:38729-39.
76. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2:469-75.
77. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000;2:476-83.
78. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 1998;17:6124-34.
79. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007;32:595-610.
80. Bruey J M, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin S A, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000;2:645-52.

81. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 2001;9:195-201.
82. Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, et al. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 2000;19:1975-81.
83. Jacobson MK, Jacobson EL. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem Sci* 1999;24:415-7.
84. Ame JC, Jacobson EL, Jacobson MK. ADP-ribose polymer metabolism. In: de Murcia G, Shall S editors. *From DNA Damage and Stress Signaling to Cell Death: Poly-ADP-ribosylation Reactions*. New York: Oxford university Press; 2000. p.1-34.
85. Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005;52:5-14.
86. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297:259-63.
87. Williams IF, McCullagh KG, Silver IA. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 1984;12:211-22.
88. Lapiere CM, Nussgens G, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* 1977;5:21-9.

## Abstract

### Analysis of Altered Gene Expression using Microarray and Real-Time RT-PCR in Posterior Tibialis Tendinosis

Yun Rak Choi

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

The posterior tibialis tendon dysfunction is a common cause of foot pain and dysfunction in adults, and the incidence have increased in accordance with the popularity of hypertension, diabetes mellitus, and obesity in domestic population.

The objective of this study is to characterize the altered gene expressions in matched pairs of normal and PT tendinosis tissue acquired from the corrective operation, flexor digitorum longus tendon transfer, using oligomer microarray and real-time RT-PCR in 11 patients with Johnson's stage 2 PTTD.

At the time of surgery, paired samples of posterior tibial/FDL tendons were treated with RNAlater. Prepared samples were frozen with liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until performing RNA extraction. Total RNA was extracted using TRIZOL<sup>®</sup> Reagent and the RNeasy Mini kit.

Gene expression profiles in 2 patients were examined using Human Genome U133A 2.0 Gene-Chip array (Affymetrix). The differentially expressed genes (DEGs) were selected on the basis of two fold in log scale when compared to normal data. Also, up to 200 ranked up and down regulated DEGs were grouped according to their functional relationships using a Biological Networks Gene Ontology (BiNGO) Bioinformatics program. Total RNA isolated from

another 9 patients was assayed by real-time RT-PCR for mRNA of matrix-degrading enzymes, inflammatory cytokines and apoptosis-related factors.

Oligomer microarray showed many up regulated DEGs, especially for *matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -9, -11, -13, -14, -15, -19, matrix metalloendopeptidase, a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) -12, IL-2, -11, -13R, fibroblast growth factor-2, insulin-like growth factor-1, heat shock protein 70 (Hsp70), collagen type I alpha 1 (COL1A1), and COL3A1* in tendinosis tissue. However, *MMP-3, -10, -17, -27, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -3, -4, IL-6R, -7, -8, -16, vascular endothelial growth factor,* and *decorin* genes were differentially down regulated. Using a BiNGO Bioinformatics program, the metalloendopeptidase, metalloproteinase activity related genes were dominantly up regulated in tendinosis tissue and extracellular matrix related genes were down regulated. Real-time RT-PCR showed a significant increased expression of each mRNA for *MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -11, -13, ADAMTS-4, TIMP-1, -2, -4, IL-4R, -6R, -8, -13,* and *COL3A1*, however, expression of each mRNA for *IL-6, caspase-8, Hsp70, PARP,* and *decorin* decreased significantly in a majority of tendinosis samples with meaningful changes compared with normal tendon tissue. In these genes, statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences in mRNA expression included *MMP-1, -11, TIMP-1, -2, -4,* and *caspase-8*.

Our results support that repetitive load with long duration changes the expression of many cytokines, MMP, stress and apoptosis-related genes in the tendinosis. These changes seems to be responsible for the change of biomechanical properties in the PT tendon and apoptosis of tenocyte in the PT tendinosis.

---

Key Words : posterior tibial tendinosis, oligomer microarray, real-time RT-PCR, differentially expressed genes, MMP, cytokine, apoptosis