

탈회골기질에 의해 유도되는
인간 황색 인대 세포의 골 유도능

연세대학교 대학원

의과학과

이 정 욱

탈회골기질에 의해 유도되는
인간 황색 인대 세포의 골 유도능

지도교수 문 성 환

이 논문을 석 사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

이 정 욱

이정옥 의 석사 학위논문 을 인준 함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

처음 계획과 달리 오랜 시간에 걸쳐 석사학위 실험을 하게 되었습니다. 예상치 못했던 많은 고비와 어려움이 있었지만 내게 주어지고 원했던 일이므로 반드시 끝을 보겠다는 생각으로 열심히 노력하였습니다. 늘 새로운 아이디어와 제가 실험에 매진할 수 있도록 저를 채찍질 해 주셨던 문성환 선생님께 정말 무어라 감사의 말씀을 드려야 할지 모르겠습니다. 또한 연구원 시절부터 석사학위 동안 아무것도 모르는 저에게 석사 논문 실험을 할 수 있도록 지도해준 김향 누나와 회사에 입사해 바쁘고 힘들 텐데 실험에 어려움이 있을 때마다 도와준 광일이 형, 언혜 누나 그리고 함께 생활하며 석사 기간을 함께하며 도움을 주고 격려의 말을 함께 해준 창근이 형, 미란이 에게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 또한 학부 졸업 후 찾아 뵙지 못했지만 제가 석사 학위를 할 수 있도록 발판을 마련해 주신 여러 교수님들께도 진심으로 감사 드립니다. 또한 실험에 어려움이 있을 때 도와준 치과대학의 석, 박사 통합과정을 밟고 있는 친구 혜진이 에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 지금의 제가 있기까지 묵묵히 28여 년간을 지켜봐 주시고 저를 응원해주셨던 저의 엄마, 워낙 무뚝뚝하셔서 말없이 응원해 주셨던 저의 아버지, 그리고 하나뿐인 동생 정환이 에게도 지금 이 기회를 빌어 정말 감사하고 사랑한다는 말씀 드리고 싶습니다. 지금의 이 석사 학위 논문을 마치는 것이 제 학문의 끝은 아니라고 생각합니다. 앞으로 더 많은 조언들 부탁 드리며 이곳에 미쳐 이름이 오르지 못한 많은 분들께도 감사의 말씀 드립니다.

<차례>

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법	6
1. 연구재료.....	6
2. 연구방법.....	7
가. 인간 황색 인대 세포의 일차 배양.....	7
나. 인간 황색 인대 세포의 분화.....	7
다. 인간 황색 인대 세포의 증식.....	8
라. 세포 표현형 측정.....	8
마. Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	9
바. 누드마우스를 통한 생체내 실험.....	10
사. Hematoxylin and eosin 염색.....	10
아. von Kossa 염색.....	10
자. 통계 분석.....	11
III. 결과	13
IV. 고찰	26
V. 결론	28
참고문헌.....	29
영문요약.....	32

그림 차례

그림 1. 탈회골기질 처리 후, 인간 황색 인대세포의 증식능 검사	14
그림 2. 탈회골기질 처리 후, 인간 황색 인대세포의 골성 인자 발현	16
그림 3. 탈회골기질 처리 후, 인간 황색 인대세포의 Alkaline phosphatase 염색	18
그림 4. 탈회골기질 처리 후, 인간 황색 인대세포의 von Kossa 염색.....	20
그림 5. 누드마우스에 인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 인간 황색 인대 조직과 탈회골기질의 혼합물을 이식한 28일후 H&E염색.....	22
그림 6. 누드마우스에 인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 인간 황색 인대 조직 과 탈회골기질의 혼합물을 이식한 28일후 von Kossa염색.....	24

<국문요약>

탈회골기질에 의해 유도되는 인간 황색 인대 세포의 골 유도능

황색 인대의 비후 혹은 골화에 의해 척추관 협착증이 일어 날 수 있다는 사실로 보아 인간 척추 황색 인대의 골 형성 잠재력을 간접적으로 유추할 수 있다. 최근에는 시험관 내에서 퇴행된 황색 인대 세포가 조골 세포 표현형을 자발적으로 나타낸다는 점이 입증되었다. 탈회골기질 (demineralized bone matrix: DBM)은 골 이식 물질로 연구되고 있으며 BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), BMP-4, BMP-7 과 같은 BMP 종류와 Transforming growth factor-beta1, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor 와 같은 여러 성장 인자들을 포함하는 물질이다. 탈회골기질에 함유된 고유의 성장 인자들의 생물학적인 활성은 골 유도를 위해 필수적인 요소들이다. 여러 동물 실험들을 통해 탈회골기질에 의한 골 형성 능에 대한 많은 연구가 수행되었지만 탈회골기질의 작용에 의한 황색 인대 세포의 골 형성능에 대한 자세한 연구는 아직까지 시행되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 탈회골기질에 의한 퇴행된 황색 인대 세포의 골 형성능을 증명하고자 하였다. 퇴행되고 비후한 황색 인대는 척추관 협착증 환자로부터 외과적 척추 감압술시 채취하였다. 효소 소화법으로 황색 인대의 섬유세포-유사세포를 분리하였다. 탈회골기질은 Regeneration (RegenerationTM Technologies, INC, Alachua, FL, USA) 사의 제품을 사용하였으며, RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) 의 방법으로 collagen I, Dlx 5, osterix, Msx-2, osteocalcin 유전자의 mRNA 발현량이 측정되었고 Cyquant assay에 의한 세포 증식능 평가, alkaline phosphatase (ALP) 염색, von Kossa 염색, 동물

실험을 통한 von Kossa 염색 과 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 탈회골기질을 투여한 조건에서 퇴행된 황색 인대 세포가 골 형성 인자인 collagen I, ALP, 미네랄 침착이 관찰되었으며 이를 ALP 와 von Kossa 염색과 RT-PCR을 통해 골 형성능을 확인 하였다. 탈회골기질은 퇴행된 황색 인대 세포에서 골 형성능을 증가시키며, 이는 탈회골기질을 통해 퇴행, 비후된 황색 인대를 척추 유합술에서 자가골의 대체물로서 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

핵심되는 말: 탈회골기질 (Demineralized Bone Matrix: DBM),
인간 황색 인대 (ligamentum flavum), 골 형성능 (osteogenic potential)

탈회골기질에 의해 유도되는 인간 황색 인대 세포의 골 유도능

<지도교수 문성환>

연세대학교 대학원 의과학과

이 정 옥

I. 서론

현재 자가골 및 동종골이 척추 유합술에 널리 이용되고 있지만 골 채취와 연관된 합병증은 물론 골 채취량의 한계 및 골 채취를 위한 추가적인 수술이 필요하다는 점과 동종골 이식에 따른 면역반응, 감염, 골 유합율의 감소와 같은 단점으로 인해 새로운 골 이식 재료의 소개가 절실하다. 골 형성 촉진을 위한 대체체로서 bone morphogenetic protein (BMP), 탈회골기질 (DBM: demineralized bone matrix) 등이 소개되고 있다^{1,2}. 특히 탈회골기질은 정형외과와 치과에서 골 대체물로서 널리 사용되는 물질이다^{3,4}. 사람의 피질골로부터 얻어진 탈회골기질은 산 추출 방법에 의해 미네랄 및 무기물은

제거하고 골 형성을 유도하는 성장 인자, 구조적인 단백질인 교원질 그리고 다른 유기물질을 함유 하고 있다^{5,6,7}. 이 방법을 통해 피질골이 함유하고 있는 단백질들을 가수 분해하고 TGF- β 1 (Transforming growth factor - β 1) 나 다른 성장 인자들의 활성을 증가시키는 방법으로 알려져 있다. 탈회골기질은 파우더의 형태, 기공을 가지고 있는 지지체의 형태, 또는 다른 운반체와 혼합된 형태 등 여러 가지 형태로 사용하고 있으며 골을 재생시키는 효과를 가지고 있다^{8,9,10}. 또한 탈회골기질은 골 이식 (bone graft) 대체 물질로 연구되고 있으며 BMP-2, BMP-4, BMP-7 과 같은 BMP단백질들과 TGF- β , PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) 와 같은 여러 성장 인자들을 포함하는 물질이다^{11,12,13,14}. 탈회골기질에 함유된 고유의 성장 인자들의 생물학적인 활성은 골 유도를 위해 필수적인 요소들이다.

한편, 인간 척추 황색 인대의 골 형성 잠재력에 대해서는 현재 황색 인대의 비후 혹은 골화에 의해서 척추관 협착증이 일어날 수 있다는 병인 연구에서 증명되었다^{15,16,17,18}. 골화된 황색 인대 조직을 면역형태생화학적 염색법으로 조사한 결과, 골화된 황색 인대 조직에서 TGF- β 1 와 BMP가 조직에서 발현되고 골화된 황색 인대 위치한 곳이 뼈와 인접한 곳이라는 점에서 TGF- β superfamily 와 이러한 질환이 밀접한 관계가 있음을 제시하였다¹⁵. 퇴행 비후된 척추 황색 인대로부터 섬유성 세포를 분리 배양하여 퇴행된 척추 황색 인대 세포가 자발적으로 골성 표현형을 발현하며 특히 부갑상선 호르몬에 대한 반응도가 증가함이 증명됨으로써 퇴행, 비후된 황색 인대가 척추 인대 골화 등의 병인에 기여한다고 보고되었다^{19,20,21,22}. 또한 BMP-2와 AdBMP-2에 의한 황색인대의 골 형성능에 대한 연구도 본 연구실에 의해 보고되었다^{20,21}. 이러한 연구는 단순히 척추 황색

인대의 골 형성능에 대한 검증에서만 그치는 것이 아니라 임상적으로도 이러한 비후된 황색 인대를 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 척추관 협착증의 수술 중에는 광범위한 척추 감압술 및 척추 유합술을 많이 시행하는데 이에 많은 양의 척추 황색 인대의 제거 및 자가 장골 이식술 등이 필수적이다. 만일 생화학적, 분자 생물학적 조작으로 인해 척추 황색 인대의 골화 능력이 비약적으로 향상 될 수 있다면 제거된 황색 인대를 골 이식 대체물로 이용할 수 있으므로 자가골 채취량을 상당량 줄일 수 있고 동일한 자가골 채취로도 척추 유합율을 이룰 수 있을 것이다. 퇴행 비후된 인간 황색 인대 세포에 대한 탈회골기질의 골 형성능의 향상에 대한 연구는 아직 평가되지 않았으며 우리는 인간 황색 인대 세포의 탈회골기질에 의한 골 유도능을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

연구 재료로는 2006년 12월 척추관 협착증으로 수술을 받은 3명의 환자로부터 얻은 척추 황색 인대 조직을 사용하였다. 조직을 채취한 환자의 연령은 평균 64.6세 이며, 모든 조직은 수술실에서 곧바로 배양 배지에 담겨 실험실로 옮겨 일차 배양을 실시 하였다.

F-12 [F-12 (ham) nutrient mixture, Gibco BRL, Scotland, UK], DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco BRL, Scotland, UK), Trypsin/EDTA (trypsin / ethylenediaminetetracetic acid), D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco BRL, Scotland, UK), 항생제들은 Gibco BRL (Gibco BRL, Scotland, UK)사의 시약을 사용하였고, 우태아 혈청은 Gibco (Gibco-BRL, Grand Island, NY)의 제품을 사용하였다. Oligo d(T)₁₆ primer, proliferation test에 필요한 Cyquant assay kit 는 Invitrogen (Invitrogen, Groningen, Netherland), AccuPower RT Premix, AccuPower PCR Premix 와 인간 Msx2, Dlx5, osterix, collagen I, osteocalcin 의 primer는 Bioneer (Bioneer, 대전, 한국)의 시약을 각각 사용하였다. 또 탈회골기질 주입시 사용한 cell insert는 SPL (Spl, 한국)의 제품을 사용하였고 ALP (alkaline phosphatase) 와 von Kossa 염색에 필요한 Fast Blue RR1, Naphthol AS-MX Phosphate, Citrate working solution, silver nitrate, sodium thiosulfate 등은 모두 Sigma (St Louis, MO, USA)의 시약을 사용하였다.

2. 연구방법

가. 인간 황색 인대 세포의 일차 배양

인간의 황색 인대 조직을 멸균된 D-PBS로 한차례 세척하여 환자의 혈액 성분을 제거한 후, 5%의 우태아 혈청이 들어 있는 F-12 배지에서 미세 가위를 이용하여 조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 황색 인대 조직 단편을 250U/ml의 제 1A형 collagenase (Sigma, St, Louis, MO, USA)가 함유된 F-12 배지에서 1시간 30분 동안 효소 처리하였다. 효소 처리한 황색 인대 조직을 5%의 우태아 혈청이 들어 있는 배지로 두 차례 씻어 낸 후, 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 들어 있는 DMEM-HG 배지로 교반하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한번씩 교환하였다. 계대수가 2일 때 trypsin / EDTA (Sigma, St, Louis, MO, USA) 효소 처리법으로 인간 황색 인대 세포를 수집하여 액체 질소에 냉동 보관하였다.

나. 인간 황색 인대 세포의 분화

인간 황색 인대 세포를 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)과 ALP, von Kossa 염색을 위해 1×10^5 / 6well-plate, Cyquant assay를 위해 2×10^4 / 24well-plate 에 DMEM-HG배지와 함께 배양하였다. 세포 부착 24시간 후에 α -MEM (minimum essential medium alpha medium, Gibco BRL, Scotland, UK) 배지에 1% 우태아 혈청과 10mM β -glycerophosphate (Sigma, St, Louis, MO, USA), 0.2mM ascorbic acid (Gibco BRL, Scotland, UK), 10^{-8} M dexamethasone (Sigma, St, Louis, MO, USA) 이 함유되어 있는 골 유도 배지로 교체하였다. 탈회골기질

(RegenerationTM Technologies, INC, Alachua, FL, USA)은 무게를 달아 1% 우태아 혈청이 들어있는 골 유도 배지와 혼합하였으며 각 분석을 위해 24well-plate에 각 5mg/ 1ml씩 투여하였으며 6well-plate에 25mg의 양으로 3ml씩 투여하였다. 탈회골기질을 투여하고 3일, 7일간 배양하여 Cyquant assay (Invitrogen Eugene, OR, USA) 와 RT-PCR을 실시하였으며 14일 후에는 ALP 염색, 28일 후에는 von Kossa 염색을 각각 시행 하였다.

다. 인간 황색 인대 세포의 증식

인간 황색 인대 세포의 증식을 측정하기 위해 24 well-plate에 well 당 2×10^4 세포를 3개의 복수 균으로 배양하였다. Cyquant assay 의 측정은 제조자의 지침서에 따라 수행되었다. 배양된 세포는 세척 후 -70°C에서 냉동하였다. 측정의 날에 먼저 20X Cell-lysis buffer와 Cyquant Green 저장 용액에 증류수를 혼합하여 Cyquant GR dye / cell-lysis buffer를 제조하였다. 그 다음 냉동시켜놓은 시료를 상온에서 녹인 후 만들어 놓은 Cyquant GR dye / cell lysis buffer를 200 μ l 넣어주고 상온에서 2~5분간 반응 시킨 후 fluorescence microplate reader에서 480nm excitation, 520 nm emission의 조건에서 측정하였다.

라. 세포 표현형 측정 (Dlx 5, osterix, Msx-2, collagen I and osteocalcin mRNA발현)

배양한 황색 인대 세포를 RNeasy mini kit (QIAGEN, GmbH, Hiden, German)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA 1 μ g 에 Oligo- d(T)₁₆ primer 2.5 mM (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) 을 첨가하여 70°C 에서 5분간 annealing 시킨 후, RT premix (Bioneer, 대전, 한국)를

이용하여 42℃ 에서 1시간, 95℃에서 5분, 4℃ 에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 μl를 각각의 primer 10pmol/ μl씩 을 첨가하여 최종부피가 20 μl가 되도록 한 후 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR 반응은 94℃에서 5초간, 43~62℃에서 5초간 (β -actin 53℃, Msx2 43℃, osterix 55℃, Dlx5 58℃, collagen I 48℃, Osteocalcin 62℃), 72℃에서 30초간 25~38회 반복하여 수행하였다. RT-PCR 산물은 ethidium bromide를 사용하여 2% agarose gel에서 표현을 분석하였으며 유전자 발현 정도를 TINA program (Ray test, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 정량 분석하였다.

마. Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

ALP 염색은 황색 인대 세포를 citrate buffered acetone (Sigma, St Louis, MO, USA) 이 들어 있는 고정액으로 30초 동안 고정시킨 후, 증류수로 45초 동안 씻어 내고 미리 준비해 둔 alkaline-dye mixture(Sigma, St Louis, MO, USA)를 각 well에 적용하였다. 상온에서 빛을 차단 한 채 약 30분 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포를 2분 동안 증류수로 씻어낸 후 Mayer's Hematoxylin 용액에서 10분간 반응시켰다. 다시 한번 증류수로 1분간 씻어내어 관찰하였다. von Kossa 염색은 배양한 세포를 증류수로 한차례 씻어 내고, 3%의 새로 준비한 silver nitrate 용액을 적용하여 상온에서 빛을 차단 한 채 30분 동안 반응시켰다. 증류수로 한차례 씻어 내고 증류수가 있는 상태에서 불빛에 노출시켰다. 2시간이 지나 색을 확인하고 증류수를 제거한 후, 관찰 하였다.

바. 누드마우스를 통한 생체내 실험

탈회골기질 입자의 골 유도능이 누드마우스를 통해 테스트 되었다. 1) 인간 황색 인대 조직, 2) 탈회골기질, 그리고 3) 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물이 각각 누드마우스의 표피 아래 부분에 마리당 3군데씩 이식되었으며 각 그룹당 4마리의 누드마우스를 사용하였다. 이식물들은 이식 28일 후에 각각 회수 되었으며 24시간 동안 10% neutral buffered formalin 용액에서 고정되었고 microtome으로 절단되어 슬라이드로 제작되었으며 그 후에 H&E 와 von Kossa 염색법으로 염색하였다.

사. Hematoxylin and eosin 염색

인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 탈회골기질과 과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 이식한 누드마우스에서 얻어진 슬라이드는 xylene 과 100, 95, 80% 에탄올로 deparaffinize, rehydrate 되었으며 hematoxylin 용액에 의해 3분 동안 염색 하였고 증류수로 세척 후 Eosin 용액으로 30초간 염색 된 후 탈수화 되어 Vecta Mount 용액 (Vector, Burlingame CA, USA) 에 의해 고정시켰다.

아. von Kossa 염색

인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 이식한 누드마우스에서 얻어진 슬라이드는 xylene 과 100, 95, 80% 에탄올로 deparaffinize, rehydrate 되었으며 3%의 새로 준비한 silver nitrate 용액을 적용하여 상온에서 빛을 차단 한 채 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 증류수로 한차례 씻어 내고 증류수가

있는 상태에서 불빛에 노출시켰다. 2시간이 지난 후 색을 확인하고 증류수를 제거한 후, Vecta mount 용액 (Vector, Burlingame, CA, USA) 에 의해 고정 한 후 관찰 하였다.

자. 통계 분석

자료는 SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 정리하였으며 One way ANOVA 및 t-test로 실험군 간을 비교하였다. 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

Table 1. Sequence of The RT-PCR Primers Used

Human Primer		Sequence (5' →3')	Size(bp)
β-actin	FW	GGA GGT GAA GGT CGG AGT C	238
	RV	AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA	
collagen I	FW	CCT GTC TGC TTC CTG TTA AC	177
	RV	AGA GAT GAA TGC AAA GGA AA	
osterix	FW	CCT TTA CAA GCA CTA ATG GG	277
	RV	CAC CAT GGA GTA GGA GTG TT	
Msx-2	FW	CAA GTC GGA AAA TTC AGA AG	266
	RV	TTC TGG AAC CAG ATT TTG AC	
Dlx5	FW	TGA CAG GAG TGT TTG ACA GA	225
	RV	TGA TAC TGG TAG GGG TTG AG	
osteocalin	FW	CAC TCC TCG CCC TAT TGG CC	299
	RV	GCC AAC TCG TCA CAG TCC GG	

Fw : Forward**Rv : Reverse**

III. 결과

1. 인간 황색 인대 세포의 일차 배양

인간 황색 인대 세포는 일차 배양한 시기로부터 약 3~7일 정도 지나면 배양용기의 바닥에 붙어 증식하기 시작하였으며, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사하였다.

2. 인간 황색 인대 세포의 증식

인간 황색 인대 세포는 배양 후 3일, 7일에 세포를 수집하여 Cyquant assay로 측정하였다. 3일과 7일을 비교 하였을 때 7일 배양한 그룹에서 세포의 증식이 활발하였으며 탈회골기질 없이 골 유도 배지만 투여해준 대조군보다 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 세포의 증식이 활발하였다. 이를 통해 탈회골기질이 세포에 대한 세포 독성을 가지고 있지 않으며 오히려 세포가 증식을 활발하게 하는 것을 관찰 할 수 있었다(그림 1).

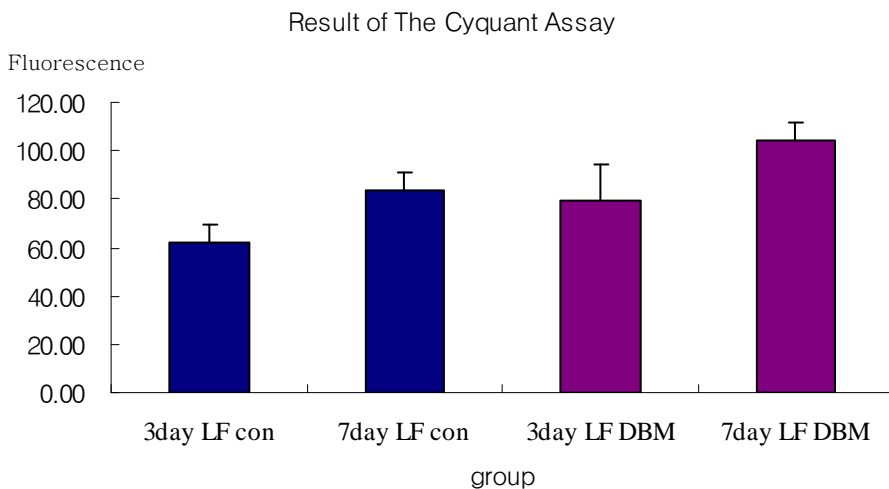


그림 1. 인간 황색 인대 세포의 탈회골기질에 의한 세포 증식능 및 세포독성 평가. 24well-plate에 well 당 2×10^4 세포의 황색 인간 세포를 배양하고 골 유도 배지만 투여해준 그룹과 골 유도 배지와 5mg /ml의 탈회골기질을 투여해준 그룹의 세포성장을 3일, 7일 배양 후 Cyquant assay를 통해 비교하였다. 탈회골기질을 투여 해준 그룹에서 3일과 7일 각각 더 증가된 세포 증식을 나타내었고 이를 미루어 탈회골기질에 의한 세포 독성이 없음을 나타내었다*($p < 0.05$).

3. 탈회골기질에 의한 인간 황색 인대 세포의 골성 표현 인자 발현

인간 황색 인대 세포에 탈회골기질을 처리한 후 *osterix*, *Dlx5*, *Msx-2*, *collagen I*, *osteocalcin* 의 mRNA 발현이 각각 측정 되었다. *Runx-2*의 작용을 억제하고 세포 사멸을 유도 하는 *Msx-2*는 3일과 7일 모두 탈회골기질을 투여 해준 그룹에서 감소 하였으며 조골세포 분화 과정 중 *osteo-progenitor cell* 에서 미성숙 조골세포로 진행될 때 발현되는 초기 인자인 *Dlx5*와 *osterix* 는 3일과 7일 모두 비슷한 경향으로 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 약간 감소하였다. 성체 조골세포에서 발현되는 *osteocalcin*은 모든 그룹에서 차이를 나타내지 않았지만 *osteo-progenitor cell*에서 성체 조골세포까지 발현되는 *collagen I*은 3일과 7일 모두 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 크게 증가하는 소견을 보였다(그림 2).

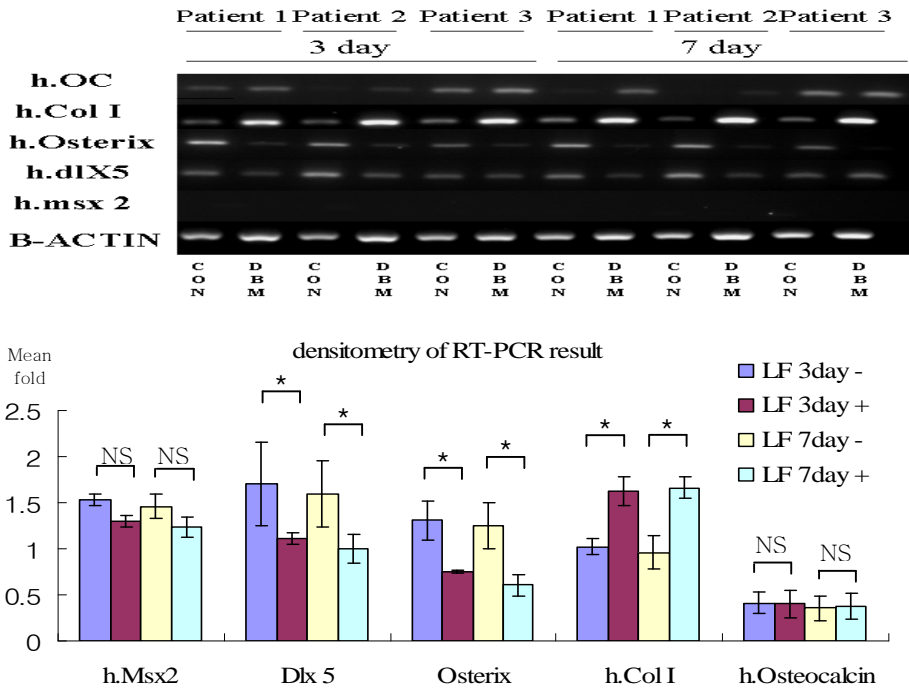
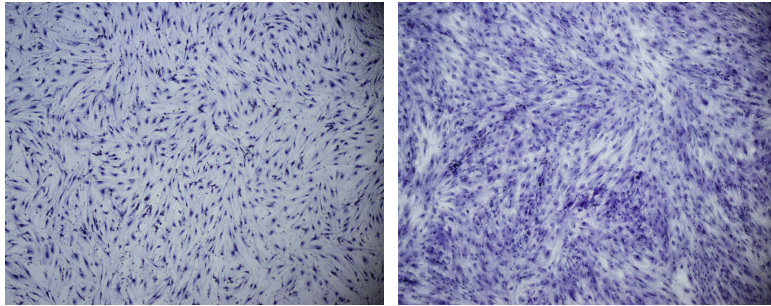


그림 2. 인간 황색 인대 세포의 탈회골기질에 대한 RT-PCR 결과. 6well-plate에 well 당 1×10^5 세포의 황색 인간 세포와 골유도 배지만을 투여해준 그룹과 cell insert를 통해 25mg /3ml의 탈회골기질을 투여해준 그룹을 3일, 7일 배양 후 골성 표현 인자에 대한 RT-PCR을 실시하였다. Runx-2의 작용을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 Msx-2의 발현은 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 약간 감소하였고 골유도 세포로의 분화 단계중 초기 단계에 발현하는 Dlx-5와 osterix의 발현은 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 약간 감소하였다. 또한 osteocalcin의 발현은 모든 그룹에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 하지만 osteo-progenitor cell에서 성체 조골세포까지 발현되는 collagen I은 3일과 7일 모두 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 약 50%정도 많이 발현하는 소견을 보였다. LF: Ligamentum flavum, +: 탈회골기질 투여군, -: 탈회골기질 미투여 대조군 *(p<0.05)

4. 탈회골기질의 인간 황색 인대 세포에 대한 골 형성 활성도 측정

4-1 Alkaline phosphatase 염색 결과

인간 황색 인대 세포에 골 유도 배지만 투여해준 그룹과 cell insert를 통해 골 유도 배지와 탈회골기질을 함께 투여해준 그룹으로 나누어 2주간 배양한 후 염색을 실시한 결과 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 대조군에 비해 ALP의 활성도가 증가되었다(그림 3).



(가) (나)

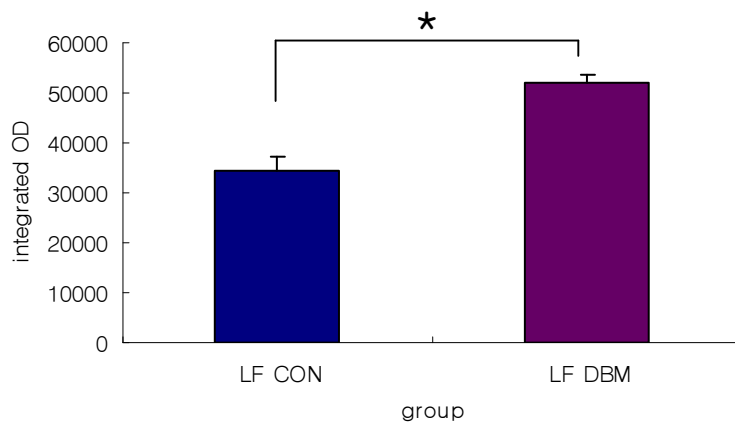
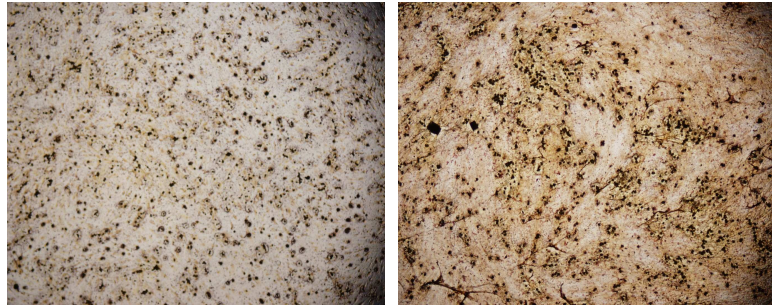


그림 3. Alkaline phosphatase 염색을 이용한 인간 황색 인대 세포의 골 형성능 검사. (가) LF control, (나) LF DBM. 인간 황색 인대 세포에 골유도 배지만 투여해준 그룹과 cell insert를 통해 골 유도 배지와 탈회골기질을 함께 투여해준 그룹으로 나누어 2주간 배양한 후 ALP 염색을 실시한 결과 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 대조군에 비해 ALP positive 표현인자가 많이 발현 되었다. *($p < 0.05$)

4-2 von Kossa 염색 결과

인간 황색 인대 세포에 골 유도 배지만 투여해준 그룹과 cell insert를 통해 골 유도 배지와 탈회골기질을 함께 투여해준 그룹으로 나누어 4주간 배양한 후 von Kossa 염색을 실시한 결과 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 대조군에 비해 von Kossa 양성 표현인자의 활성도가 증가되었다(그림 4).



(가)

(나)

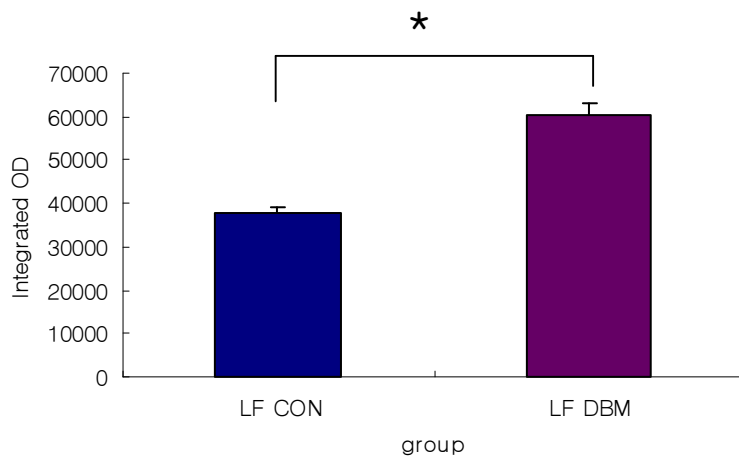


그림 4. von Kossa 염색을 이용한 인간 황색 인대 세포의 골 형성능 검사. (가) LF control, (나) LF DBM. 인간 황색 인대 세포에 골 유도 배지만 투여해준 그룹과 cell insert를 통해 골 유도 배지와 탈회골기질을 함께 투여해준 그룹으로 나누어 4주간 배양한 후 von Kossa 염색을 실시한 결과 탈회골기질을 투여해준 그룹에서 대조군에 비해 von Kossa 양성 표현인자인 미네랄이 침착되었다. *($p < 0.05$)

5. 탈회골기질 이식에 의한 누드마우스에서의 골 유도능 평가

누드마우스에 인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 각각 이식하고 28일 후에 조직을 추출하여 슬라이드 제작 후 H&E, von Kossa 염색을 실시하였다. 각 염색을 실시 한 결과 인간 황색 인대 조직만을 이식한 군과 비교하였을때 탈회골기질, 탈회골기질 과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 이식한 군의 경우 골 형성 초기에 나타나는 세포의 clot 형성과 중간엽 세포가 나타났으며 초기 연골 생성을 관찰 할 수 있었다.

5-1 H&E 염색 결과

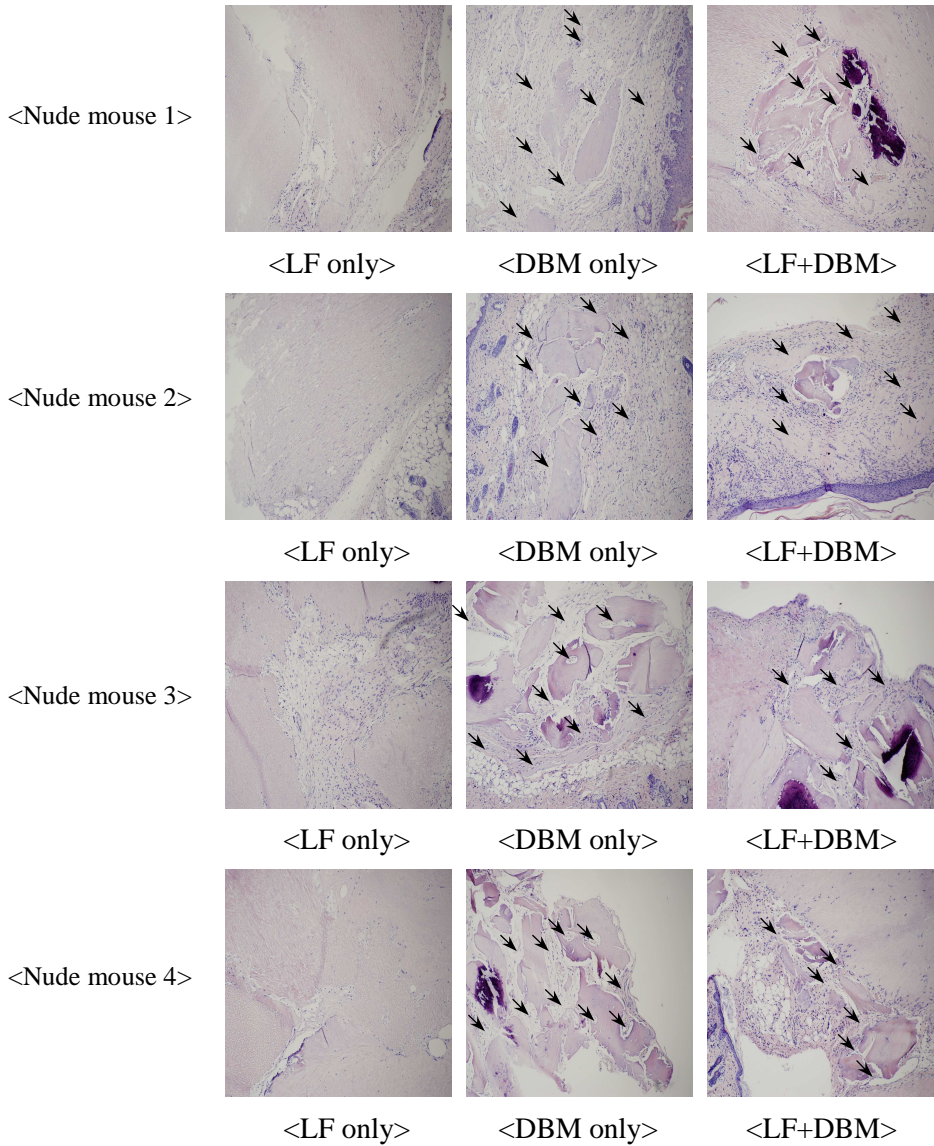


그림 5-1. H & E 염색결과. 누드마우스 4마리에 인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 각각 이식한다음 28일 후에 조직을 채취하여 슬라이드를 만든 후 H&E 염색을 시행하였다. 인간 황색 인대 조직과 비교하여 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 이식한 군의 경우 골

형성 초기에 나타나는 clot 형성과 중간엽 세포가 나타났으며 초기 연골 생성을 관찰 할 수 있었다. (▼: 중간엽 세포의 clot 형성과 초기 연골생성으로 추측 되는 부분, LF only: Ligamentum flavum tissue only, DBM only: demineralized bone matrix only, LF + DBM: Ligamentum flavum tissue + demineralized bone matrix)

5-2 von Kossa 염색 결과

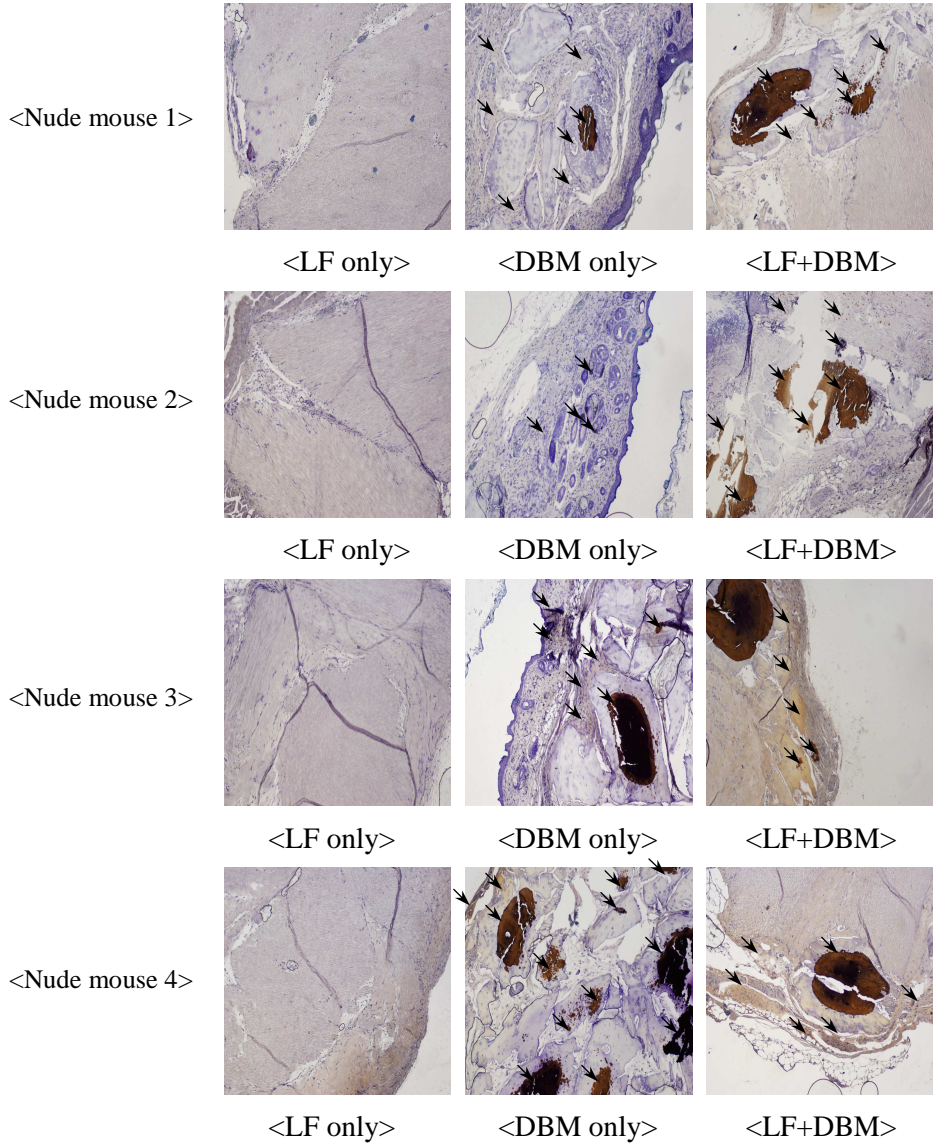


그림 5-2. von Kossa 염색결과. nude마우스 4마리에 인간 황색 인대 조직, 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 각각 이식한다음 28일 후에 조직을 채취하여 슬라이드를 만든 후 von

Kossa 염색을 시행하였다. 인간 황색 인대 조직만을 이식한 군과 비교하여 탈회골기질, 탈회골기질과 인간 황색 인대 조직의 혼합물을 이식한 군의 경우 von Kossa 염색에서 미네랄 침착을 나타내는 dark brown color가 많이 발견되었음을 관찰 할 수 있었다.

(\blacktriangledown: 중간엽 세포의 clot 형성과 초기 연골생성으로 추측 되는 부분, LF only: Ligamentum flavum tissue only, DBM only: demineralized bone matrix only, LF + DBM: Ligamentum flavum tissue + demineralized bone matrix)

IV. 고찰

현재 척추 유합술을 위한 물질로 자가골이 널리 이용되고 있다. 자가골은 골 형성 세포와 해면골이라는 골 전도 물질 및 골 형성 단백질과 같은 골 유도 물질을 가진 가장 이상적인 골 이식재이나 골 채취와 관련된 합병증은 물론 골 채취량의 한계 및 골 채취를 위한 추가적인 수술을 요한다는 단점이 있다. 이러한 이유로 탈회골기질은 자가 골 이식의 대체제로 임상적으로 사용되고 있다¹. 이를 바탕으로 본 실험에서는 퇴행 비후된 황색 인대 세포에 탈회골기질을 첨가하여 배양하는 과정에서 세포의 골 형성 능력을 알아보았다. 본 연구의 목적이 골 형성도를 알아보는 것이므로, 실험 과정에서 세포가 사멸되지 않고 잘 유지되면서 증식되는지 여부를 확인하는 것이 1차적으로 중요하다. 세포 증식 검사로는 Cyquant assay를 시행하였다. Cyquant assay를 통해 본 실험의 전체 과정 동안 시간이 흐름에 따라 세포 독성 없이 세포가 사멸되지 않고 증식되는 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 탈회골기질의 첨가에도 같은 결과를 보임으로써, 세포 증식 과정에 탈회골기질이 독성으로 작용하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 골 형성 정도를 알아보기 위해 RT-PCR과 ALP, von Kossa 염색법을 실시하였다. 본 실험에서 3일 및 7일에 시행한 RT-PCR의 결과에서는 collagen I의 발현만이 의미있게 증가하였고 나머지 인자의 발현은 차이가 매우 미미하였다. 그러나 collagen I을 제외한 나머지는 모두 기질 무기질화 단계에서 측정되는 인자들로서 7일까지의 발현이 짧았을 것으로 판단된다. 또한 골 형성 초기에 풍부한 세포막 부착 효소이며 이의 증가는 조직학적으로 골 형성의 증가와 밀접한 상관관계가 있음이 밝혀진 ALP는 탈회골기질에 의해 의미 있게 증가함을 확인하였고, 석회화된 세포의 기질에 특이적인

염색법인 von Kossa 염색의 결과 또한 탈회골기질에 의해 황색 인대 세포에 미네랄 침착이 증가함을 확인하였다. 누드마우스를 통한 동물 실험에 있어서 탈회골기질, 탈회골기질과 황색 인대 조직의 혼합물 그룹에서 세포 clot 형성과 중간엽 세포가 관찰 되었으며 초기 연골 생성을 관찰 할 수 있었다. 본 연구에서는 이전의 연구와는 차별화 되게 퇴행 비후된 척추 황색 인대 세포 자체의 자발적 골 형성의^{18,19} 증명에만 그치지 않고 외부에서 연골화 및 골화에 중요한 역할을 하는 여러 성장 인자들을 함유하는 탈회골기질을 투여함으로써 황색 인대의 골화 능력이 비약적으로 향상되는지를 증명하였다. 비록 탈회골기질이 피질골 제공인의 연령이나 성별에 따라 골 유도 능력의 차이가 있다는 연구가 최근에 보고되고 있지만 본 실험에서는 이를 위해 사용한 탈회골기질을 골 유도의 중요 인자인 BMP-2의 양을 정량 분석하여 탈회골기질을 선별하고 이를 바탕으로 실험을 진행하여 탈회골기질에 의한 골 유도능 향상을 증명하였다^{23,24}. 결론적으로 본 실험에서는 조골 세포 유사성을 가지지 않은 황색 인대를 골 형성능을 가진 탈회골기질로 자극함으로써 골 형성능의 향상을 확인하였다. 이를 바탕으로 황색 인대 세포의 자발적인 강력한 골화가 유도된다면 척추관 협착증에서 필수적으로 제거되는 비후된 황색 인대 조직을 재활용하여 자가골 이식량을 줄이는 기반을 마련 할 수 있으리라 생각된다. 또한 이러한 검증은 최근 중간엽 줄기 세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 시점에서 섬유세포-유사세포인 황색 인대 세포를 조골세포-유사세포로 전이 시킬 수 있는 한 인자로서의 탈회골기질의 골 형성능을 재 증명하였다 할 수 있으며, 앞으로 진행할 실험에서는 이러한 전이 과정의 기전을 증명하는 기회를 갖고자 한다.

V. 결론

척추관 협착증 환자의 황색 인대 조직으로부터 세포를 분리하였으며 이 세포와 탈회골기질을 이용한 골 유도능 실험을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 유추하였다.

1. 탈회골기질이 인간 황색 인대 세포에 독성을 나타내지 않으며 세포 증식에 긍정적인 영향을 나타냄을 확인하였다.

2. 환자의 황색 인대 세포에서의 골화 정도는 약간의 차등은 있었으나, 탈회골기질을 인간 황색 인대 세포에 처리하면 황색 인대 세포의 골화가 촉진됨을 시험관 내에서의 누드마우스를 통한 동물 실험에서 확인 하였다.

이상의 결과는 인간 황색 인대 세포에 여러 골 형성 인자를 가지고 있는 탈회골기질을 처리함으로써 인간 황색 인대 세포의 골 형성능을 비약적으로 향상 시킬 수 있으며, 임상적인 관점에서도 비후된 황색 인대 조직을 재활용 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

VI. 참고문헌

1. Brett Peterson, Peter G, Whang, Robert Iglesias, Jeff C, Wang, Jay R. Leberman. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. *J. Bone Joint Surg. AM.* 86: 2243-2250, 2004.
2. Reddi. AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical application. *J. Bone Joint Surg. AM.* 83 : 1-6, 2001.
3. Russell JL, Block JE. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of precessing techniques and study methodology. *Orthopedics* 1999; 22(5):524-31, quiz 532-3
4. Urist MR. A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Calcif Tissue Res Suppl* 1970:98-101.
5. Sampath TK, Reddi AH. Distribution of bone inductive proteins in mineralized and demineralized extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:949-54.
6. Somerman M, Hewitt AT, Varner HH, Schiffmann E, Termine J, Reddi AH. Identification of a bone matrix-derived chemotactic factor. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 481-5.
7. Strates BS, Urist MR. Origin of the inductive signal in implants of normal and lathyritic bone matrix. *Clin Orthop* 1969;66: 226-40.
8. Callen DP, Salkeld SL, Scarborough N. Histologic analysis of implant sites after grafting with demineralized bone matrix putty and sheets. *Implant Dent* 2000;9 (1):36-44.
9. Martin Jr GJ, Boden SD, Titus L, Scarborough NL. New formulations of Demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine* 1999; 24(7):637-45.
10. Rabie AB, Chay SH, Wong AM. Healing of autogenous intra-membranous bone in the presence and absence of homologous demineralized intramembranous bone. *AM J Orthod Dentofacial Orthop* 2000; 117(3):288-97.
11. Bo Han, Zhi Yang, Marcel Nimni. Effects of moisture and temperature on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 855-861.

12. Sampath TK, Reddi AH. Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. *J Cell Biol* 1984;98:2192-7.
13. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
14. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop* 1967;53:243-83.
15. Hayashi K, Ishidou Y and Yonemori K: expression and localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone*, 21:23-30, 1997.
16. Hoshi K, Amizuka N, Sakou T, Kurokawa T and Ozawa H: Fibroblasts of spinal ligaments pathologically differentiate into chondrocytes induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2: morphological examinations for ossification of spinal ligaments. *Bone*, 21:155-62, 1997.
17. Satio H, Mimatsu K, Sato K and Hashizume Y. Histopathologic and morphometric study of spinal cord lesion in a chronic cord compression model using bone morphogenetic protein in rabbits. *Spine*, 17:1368-74, 1992.
18. Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, Tamaki T and Tanaka T: Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *Spine*, 17:1353-60, 1992.
19. Specchia N, Pagnotta A, Gigante A, Logroscino G, and Toesca A : Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis. *J Orthop Res*, 19:294-300, 2001.
20. Moon SH, Kim H, Kwon EH, Won JH, Kim HS, Hahn SB, et al.: Osteogenesis by transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA in ligamentum flavum cells: Approach toward tissue engineering. *J Kor Spine Surg*, 9:263-269, 2002.
21. Yang IH, Kim H, Kwon UH et al: De Novo osteogenesis from human ligamentum flavum by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *Spine*, 24:2749-2754, 2005.
22. Mimatsu K, Kishi S, and Hashizume Y.: Experimental chronic compression on the spinal cord of the rabbit by ectopic bone formation in the ligamentum flavum with bone morphogenetic protein. *Spinal Cord*, 35:740-6, 1997.
23. Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoff K, Haggard W.: Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics*, 1:160-5, 2004

24. Hyun W, Bae, Zhao L, Linda E, Kanim M, Pamela B, et al: Intersubject variability and intrasubject variability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine*, 31:1299-1306, 2006

<영문요약>

Abstract

**Osteogenic induction of the human ligamentum flavum by
demineralized bone matrix**

Jung wook Lee

**Brain Korea 21 Project for Medical Science
The Graduate School, Yonsei University**

(Directed by Associate Professor Seong-Hwan Moon)

Many attempts have been made to apply demineralized bone matrix(DBM) for bone regeneration. It has been reported that DBM derived from human tissues induces bone formation and spinal fusion, and that DBM is widely used as a bone graft substitutes in orthopaedic and dental surgery. In addition, Ligamentum flavum (LF) was reported to have osteogenic potential with stimulation for bone morphogenetic protein-2 which is also included in DBM. Although many potential studies for osteogenesis by DBM have been evaluated, osteogenesis of human LF by DBM has not yet been found. In this study, we elucidated the effect of DBM on osteogenesis of human LF. Experimental group (human LF cell culture) was incubated in media solution containing 5mg/ml DBM for 3day, 7day, 14day and 28day, and control group was incubated in media which have no DBM. To assess proliferation rate, we performed Cyquant assay. To assess osteoinductivity, we performed RT-PCR of osteogenic marker gene and von Kossa, alkaline phosphatase (ALP) staining after incubating LF with DBM. DBM, LF and mixture of DBM and LF was implanted to nude mouse. After 28days, H&E, von

Kossa were performed. Human LF cell cultured with DBM showed increased proliferation without cytotoxicity compared to control group. The expression of collagen type I demonstrated upregulation, but early osteogenic factors decreased. However, result of ALP and von Kossa was shown that experimental group, LF by adding the DBM, showed positive osteogenic induction compared to control group without DBM. We proved that human LF cells cultured with DBM showed increase in proliferation and upregulation of osteogenic phenotypes. Given osteogenic potential of human LF with DBM can be used for carrier for DBM and bone graft substitute in spinal surgery. The application of mixture DBM and LF will likely be useful in the clinical reconstruction of bone.

Key Words: Ligamentum flavum, Osteogenic potential, demineralized bone matrix (DBM)