v-myc 전이에 의한 인체 이개 연골 세포주의 확립 및 특성 규명

연세대학교 대학원
의과학사업단
정 재 호

v-myc 전이에 의한 인체 이개 연골 세포주의 확립 및 특성 규명

지도교수 박 병 윤

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
정 재 호

정재호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없이 세심한 지도와 격려를 아끼지 않으신 박병윤 교수님께 진심으로 감사드립니다. 많은 조언과 도움을 주신 김주항 교수님, 박명철 교수님, 유대현 교수님과 묵인희 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 또한 연구의 방향과 진행에 많은 도움을 주신 김승업 소장님과 이명애 교수님, 방정희, 홍현석 연구원 및 연구실 모든 분들께 감사드립니다.

성형외과학을 전공하면서 이제까지 항상 최선의 지도를 받을 수 있도록 격려해 주시고 이끌어 주시는 교실의 교수님 여러분들께도 깊은 감사를 드리며 여러 동료와 후배들과도 기쁨을 나누고 싶습니다.

시종일관 사랑으로 보살펴주시고 지원해 주시는 아버지, 어머니께 이 논문을 바치며, 늘 뒤에서 잔잔히 지켜주고 계시는 장인, 장모님께 감사드립니다. 항상 사랑과 격려로써 힘이 되어준 사랑하는 아내, 그리고 사랑스런 딸 유진이와 기쁨을 함께 하고자 합니다.

저자 씀.

차 례

그림차례

국문 요약

v-myc 전이에 의한 인체 이개 연골 세포주의 확립 및 특성 규명

연골의 조직공학술을 이루는 범주는 세포배양, 중합체, 세포 성장 인자 및 세포외기질, 재생된 조직의 혈류 공급 등으로 완성된다. 연골 조직의 재건에서 조직공학술은 기존의 자가 연골 조직 이식에 따른 공여부에 후유증을 최소화할 수 있으며, 수혜부에 적합한 특성의 조직을 쉽게 조각하여 사용한다는 점에서 이상적인 재건 방법이라 하겠다. 그러나 연골 세포의 경우, 연골 조직 특유의 지지력과 탄력성을 유지시켜 주기 위해서는, 세포 배양에 따른 연골 세포 특유의 표현형 유지와 연골 세포에서 형성되는 세포외기질 및 신생 연골 조직의 특성을 유지시켜 주는 것이 가장 중요한 과제라 하겠다. 그러나, 연골 세포는 생체에서 나오는 순간부터 연골 세포 특유의 콜라겐 II 단백질 표현형을 소실하기 시작하여, 8주 후에는 콜라겐 II 단백질이 발현되지 않는다. 그러므로, 충분한 연골 세포수의 확보가 어렵고, 큰 신생 연골 조직의 대치에 제약이 된다. 본 연구에서는 이러한 제약을 극복하고자, 인체 이개 연골 세포에 murine retrovirus vector를 이용하여 *v-myc* 유전자를 이식하고 인체 이개 연골 세포주를 만든 후, *v-myc* 유전자의 이식을 확인하기 위하여, *v-myc* 유전자에 의해 생성되는 세포내 Myc 단백질의 발현을 조사하였다. 또한 연골 세포주가 연골 세포 특유의 표현형을 유지하는지 알아보기 위하여 콜라겐 II의 mRNA 및 콜라겐 II 단백질의 존재를 확인하였고, 세포주의 증식 정도는 이배가 시간을 측정하여 일차 배양한 연골 세포와 비교하였다.

v-myc 유전자가 이식된 인체 이개 연골 세포주는 모든 세포에서 Myc 단백질이 발현되는 것으로 관찰되어 *v-myc* 유전자의 이식을 확인할 수 있었다. 연골 세포주는 연골 세포의 표현형 유지에 가장 중요한 콜라겐 II mRNA와 콜라겐 II 단백질의 발현이 8개월까지 지속적으로 유지되었으며, 세포증식 능력도 향상되어 일차 배양한 연골 세포보다 4배 가량 빠른 양상을 보였다.

인체에서 기원한 이개 연골 세포주를 확립하였으며, *v-myc*이 암을 유발할

수 있는 유전자이므로 이 연골 세포주를 직접 인체에 사용할 수는 없을 것으로 생각한다. 그러나, 지속적으로 콜라겐 II 단백질이 발현되며, 연골 세포로의 표현형이 유지되므로, 연골 조직공학술의 훌륭한 재료로 사용될 수 있을 것이다. 또한 연골 세포주의 증식이 빠르고 세포외기질을 충분히 얻을 수 있다면 생체 물질로써 인체 조직공학술에 사용할 수 있을 것으로 기대한다.

핵심되는 말: 조직공학술, 연골 세포, 콜라겐 II 단백질, 세포의 표현형, 세포외기질, *v-myc*, retrovirus

v-myc 전이에 의한 인체 이개 연골 세포주의 확립 및 특성 규명

<지도교수 박병윤>
연세대학교 대학원 의과학사업단
정 재 호

Ⅰ. 서 론

조직 공학술은 독립된 세포를 배양하고 중합체 구조물에 부착시켜 기능을 유지하는 생체의 한 부분을 재생하여, 궁극적으로 기능을 가진 새로운 조직을 만들어내는 것이다.[1] 조직 공학술을 이용하면 소량의 자가 연골을 이용하여 연골을 재생하여 두개안면기형 및 근골격 조직의 결손 및 변형에 이용할 수 있으며, 이는 다른 인공삽입물이나 동종 이식에 따른 부작용을 없앨수 있고, 많은 조직이 요구되는 자가조직의 이식도 가능케 할 수 있다.[2] 이미 1994년 Brittberg 등은 무릎 연골의 손상 부위에 자가 관절 연골 세포를 배양, 이식하여 연골 조직의 재생에 성공한 후, 이 수술 방법은 현재 미국이나 유럽의 여러 나라에서 혁신적인 수술법으로 인정받아 점차 널리 보급되고 있다.[3] 그러나 두개안면의 기형이나 조직 결손 특히 귀나 코의 조직 결손시에는 조직 고유의 형태를 유지시켜야 하며, 코의 비익은 유리 연골(hyaline cartilage), 귀는 탄성 연골(elastic cartilage)로 이루어져 있어, 조직 특유의 지지력과 탄력성을 유지시켜 주는 것이 중요하다. 이를 위해서 세포의 배양에 따른 표현형의 유지와 연골 세포에서 형성되는 세포외 기질 및 조직의 형태를 유지시켜 주고 배양된 세포들이 부착하여 생체내에서 자랄 수 있는 생체 물질인 중합체(polymer)의 연구가 선행되어 왔다.[4-12] 연골에 의해 대치되어야 할 인체의 조직 결손 및 선천성 기형 특히 소이증에 대한 재건술은 점차로 증가하고 있으며, 그에 대한 연구도 많은 진전을 보았다. 실제로 현재에 사용되는 연골의 대치 방법은 자가 연골을 주로 사용한다. 그러나, 이는 공여부의 후유증을 남기며, 소이증의 재건에 주로 사용되는 늑연골은 섬유 연골

(fibrocartilage)과 유리 연골로써 실제의 이개 연골과는 물리적, 기질적 특성이 다르며, 필요한 수혜부에 맞추기 위한 크기 및 모양의 조각 또한 쉽지 않은 단점이 있다. 조직 공학술을 이용하면, 공여부의 손상을 최소화할 수 있고, 같은 특성의 조직을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 물론 조직 공학술을 이루는 범주인 세포 배양, 중합체, 세포 성장 인자 및 세포외 기질, 재생된 조직의 혈류 공급 등에 있어서, 어떤 부분도 확실히 정립된 것은 현재까지는 없다. 세포 배양만 하더라도, 소이증 환자에서의 연골만으로는 원래 정상의 귀 모양을 만들기 위한 세포수의 확보가 어렵다고 하며,[13] 중합체도 각각의 장단점 등이 발표되면서, 새로운 이상적인 중합체의 연구 또한 의공학 분야에서 진행 중이다.[7-12,14-18]

사람의 이개 탄성 연골 세포는 생체내에서 외부에 노출되는 순간부터 그 표현형 및 세포외 기질 생성이 시간대에 따른 변화를 보이며, 8주 정도 후에는 세포가 역분화(dedifferentiation) 되어 섬유아 세포처럼 변화하며 콜라겐 II 단백질의 발현이 안되어 연골 세포로서의 표현형을 잃게 된다. 결국 원하는 조직, 연골의 형성이 불가능해진다.[6,19,20] 그러므로, 인체 이개 연골 세포를 조직 공학술로 이용하려는 생화학적, 분자생물학적 연구에 많은 제약이 따른다. 이런 한계를 극복하기 위하여 다양한 인체 연골 세포주(human chondrocytic cell line)가 개발되어 왔다. 대부분은 연골육종(chondrosarcoma)에서 분리된 종양 세포주이다.[21] 그 외에는 쥐의 유리 연골에 *v-myc*과 *v-raf* oncogenes을 이식(transfection) 시켰거나,[22,23] *v-myc* 만을 조류의 배아 연골(embryo chondrocyte)에 전이시킨 세포주가 보고되어 있으며,[24] large T antigen에 의한 인체 관절 연골세포주(adult human articular chondrocyte cell line) 등이 있다.[25,26] 그렇지만, 지금까지 보고된 연골 세포주는 대부분 유리 연골에서 기원한 것이며, 또는 동물에서 기원한 세포가 대부분이다. 그러므로 두개 안면부의 기형 중 하나인 소이증의 치료에서나 미용목적으로 사용되는 융비술에 이개의 연골을 사용한다는 것을 고려할 때, 탄성 연골에 대한 기본 분자생물학적, 생화학적인 자료를 얻기 위

해서, 또는 세포외기질을 직접 임상에 사용할 수 있는 가능성의 여부에 대한 연구를 위하여, 인체에서 기원한 불멸의 탄성 연골 세포주가 있다면 많은 도움이 될 것이다.

정상의 세포를 불멸의 세포주로 만드는 방법 중 하나로 retrovius를 vector로 oncogene을 이식시키는 방법이 있다.[22] Viral oncogene인 *v-myc* 은 척추동물의 cellular gene (*c-myc*)에 상동하는 구조를 가지며 avian myelocytomatosis virus에 상주하고, retrovirus 등에 의해 정상세포 핵내의 DNA로 옮겨져 기능을 나타낼수 있다.[27-29]

본 연구에서는 인체 이개 연골 세포(human adult auricular chondrocyte)에 murine retrovirus를 vector로 *v-myc* 유전자를 전이시켜, 연골 세포에 *v-myc*의 이식을 면역세포화학(immunocytochemistry) 검사와, *v-myc* 유전자에 의해 발현된 Myc 단백질의 발현으로 확인하였다. 또한 연골 세포주의 확립 후, 세포주의 이배가 시간(doubling time) 및 연골 세포의 표현형을 결정짓는데 가장 중요한 콜라겐 II 단백질의 발현을 조사하였다.

인체 이개 연골 세포주(human adult auricular chondrocyte cell line)가 확립되고, 특성화 작업이 이루어진다고, 이 세포주를 직접 인체에 사용할 수는 없으리라 생각된다. 그러나, 인체의 탄성 연골에서 기원한 세포주이고, 지속적으로 콜라겐 II 단백질이 발현되며, 연골의 표현형을 유지한다면, 이개 탄성 연골의 분자 생물학적, 생화학적 자료를 얻기 용이할 것이다. 또한 이 세포주의 증식이 빠르고 세포외기질 생성이 왕성하다면, 생성된 세포외 기질을 조직 공학술에 scaffold로 사용할 수 있는 가능성을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.[4)5)11)]

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 인체 이개 연골의 분리 및 배양

인체의 이개 연골은 아주대학교 성형외과에서 융비술을 시행받은 18세 환자에서 채취된 이개 연골 조직을 사용하였다. 환자에게는 본인의 조직을 사용한다는 동의서를 받았다. 조직은 phosphate-buffered saline(PBS)에 냉장 보관하였다가, 연골막을 제거함으로써, 섬유아세포의 배양을 방지하였다. 연골은 현미경하에서 3-5mm^3의 크기로 잘게 썰고, PBS로 세척한 후 0.25% collagenase(Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., USA)로 37。c에서 12시간 가량 처리한 후, 5% 우혈청과 5% 마혈청이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에 suspension시켰다. 배양액에는 gentamycin 25mg/1L와 amphotericin B 2.5mg/lL를 포함시켰다. 세포수와 생존 여부는 hemocytometer와 trypan blue vital dye를 이용하여 측정하였다. 세포들을 100mm petri dish에 옮긴 후 37。c에서 배양하였다. 세포 배양액은 3, 4일마다 교환하며, 세포들은 2주마다 주기적으로 trypsin 처리를 하여 계대배양하였다.

나. *v-myc*을 포함한 retoviral vector

실험에서 사용한 retroviral vector는 스스로 복제(replication)는 못하지만 세포내로의 감염력을 지니고 있으며,[28)30)] *avian myc* (*v-myc*) 유전자와 neomycin에 저항력을 보이는 aminoglycoside phosphotransferase를 coding하도록 제작되어졌다(그림 1.). *v-myc*은 세포의 불멸화를 유도할 수 있으며, p-100 *gag-myc* 융합 단백질로 avian virus genome에서 분리한 것이다.[31)]

myc 유전자는 avian cellular DNA에 존재하는 MC29(avian myelocytomatosis virus strain) provirus의 클론(clone)을 BamHI로 자른 후, 전체의 *myc* 유전자를 포함하며, *gag*, *env* 유전자의 sequence를 일부 포함하는 pBR322a2.3-kilobase(kb) fragment의 subcloning을 통해서 얻었다.[32)]

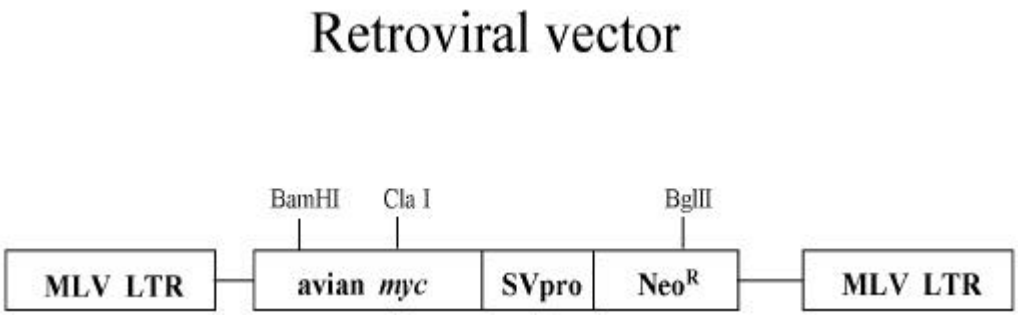


그림 1. Retroviral vector의 모식도. MLV LTR(murine leukemia virus long terminal repeat), avian *myc*(viral *myc* gene), SVpro(Simian virus promoter), NeoR(neomycin resistant gene), BamHI; Cla I; BgIII: restriction enzymes

2. 실험 방법

가. 일차 배양된 연골 세포의 연골 세포주로의 전환(transformation)

(1) 이개 연골 세포에 *v-myc* 유전자 이식

이개 연골 세포를 일차 배양한 후, 3-4주에 걸쳐 증식시키고, 6 well plate에 70-80% 정도 세포를 증식시켰다. 연골 세포내로의 *v-myc* 전이가 용이하도록 diethylaminoethyl(DEAE)-dextran 25 μg/ml를 포함한 배양액에 37。C에

서 1시간 배양하였다. *v-myc*이 포함된 retrovirus를 생산하는 AM cell line의 배양액으로 2일간 연골 세포를 처리하여 *v-myc*을 포함하는 retrovirus로 감염시켰다. 유전자 전이 이후 neomycin analogue인 geniticin418(G418)이 100μg/ml, 200μg/ml, 300μg/ml, 400μg/ml로 처리된 각각의 배양액내에서 연골 세포를 10일간 배양하여, 고농도의 G418에 저항력을 보이며 생존하는 세포들을 선택하였다.

(2) Myc 단백질의 면역세포화학 검사

*v-myc*의 전이로 전환된 연골 세포를 작은 커버슬립에서 배양한 후 4% 파라포름알데하이드 중에서 5분간 실온에서 고정한 뒤, PBS로 두 번 씻고 챔버로 옮겼다. 비면역 혈청으로 10% 마혈청을 PBS에 100배로 희석하여 커버슬립에 올려놓고 30분간 실온에서 반응시켰다. 커버슬립에서 비면역 혈청을 씻어내지 않고 가볍게 부로팅을 하여 버리고, 1:200 일차 anti-Myc 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 올려 놓고 실온에서 24시간 반응시켰다. 커버슬립을 PBS로 세 번 5분 간격으로 씻은 후 biotin 표식 인자를 함유한 이차 anti-mouse Ab(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 100 배로 희석하여 30분간 실온에서 반응 시켰다. 아비딘 액과 페록시다제 결합 바이오틴액의 혼합액을 커버슬립에 올려놓고 30분간 실온에서 반응시켰다. 커버슬립을 PBS로 3번 5분간 씻은 후 DAB(3, 3-diaminobenzidine tetrahydroxychloride)반응을 10분간 시행하였다. 탈수, 투철, 퍼마운트 봉입을 한 뒤, 세포내 *v-myc*의 이식에 의해 생성된 Myc 단백질의 발현 여부를 면역세포화학 검사로 확인하였다.

(3) Myc 단백질의 western immunoblotting 분석

(가) 세포질 및 세포막 단백질 분획

연골 세포주가 직경 10cm 용기에 confluent한 상태에서 배양액을 제거하고, PBS로 1회 세척한 후 세포를 수거하였다. 여기서 얻은 세포들을 4。C, 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 세포 pellet을 취하였다. EBC buffer(120mM NaCl, 0.5% NP-40, 40mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA)를 세포에 가하고 4。C에서 15분간 단백질을 용출해 내고, 원심 분리하여 상층액을 모았다. 단백질 양은 Bio-Rad assay를 통하여 추출된 단백질의 농도로 계산하였다.

(나) 단백질의 전기 영동 및 western immunoblotting 분석

실험 조건에 따라 동량(50 μg)의 단백질을 sodium dodecyl-sulfate(SDS)와 β-mercaptoethanol이 포함된 5X SDS 전기 영동 완충 용액(250 mM Tris-Cl [pH 6.8], 500 mM DTT, 1% SDS, 0.1% bromophenol blue, 30% glycerol)에 각각 혼합하여 100。C에서 5분간 처리하였다. 다음 Laemmli의 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다.[33] 전기 영동이 끝난 gel과 nitrocellulose(NC) membrane을 완충 용액(25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1,4% glycine, 20% methanol)으로 평형시킨 다음, western blot용 cassette에 완충 용액에 적신 dacron sponge와 여과지 2매를 올려 놓고 이 위에 gel을 놓았다. 다시 그 위에 NC membrane을 놓고 여과지와 dacron sponge, cassette의 순서로 올려 놓고 western blot chamber로 옮긴 다음, 완충 용액을 cassette 내의 membrane이 충분히 잠기도록 채우고 150 mA로 하룻밤 동안 4。C에서 단백질을 전이하였다. Ponceau S 용액(Sigma Biochemical Co., St. Louis, Missouri, USA)을 사용하여 NC membrane 상에 일차 배양 연골 세포와 연골 세포주의 단백질 전이를 확인하였고, 단백질이 전이된 NC membrane의

immunostaining을 다음과 같이 시행하였다. NC membrane을 5% 탈지 분유가 함유된 Tris-buffered saline with tween 20(TBST) 완충용액(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 담가 흔들면서 1시간 방치하여 비특이적 반응을 차단한 후 용액을 버리고, Myc 단백질에 대한 일차 항체(rabbit polyclonal antibody against a recombinant protein corresponding to amino acids 1-262 mapping at the amino terminus of c-Myc of human origin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이천배 희석한 5% 탈지 분유가 함유된 TBST 완충 용액에 4。C에서 18시간 동안 담가 반응시켰다. 이 membrane을 15분씩 2회, 5분씩 3회 TBST 완충 용액으로 세척한 다음, 다시 TBST 완충용액에 이차 anti-rabbit IgG horsrradish peroxidase conjugated antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 3,000배 희석한 용액에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 위와 같이 세척하고 enhanced chemiluminescence 시약(Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)인 용액 1과 용액 2의 1:1 혼합액 2 ml을 membrane 전체에 얹은 후 1분간 방치하였다. 혼합액을 제거한 후 membrane을 비닐로 싸고 Las-1,000(Fuji, Tokyo, Japan)으로 현상하였다.

나. 이배가시간 측정(Growth rate evaluation)

*v-myc*이 전이된 연골 세포주를 계대 배양한 후 6개월, 7개월, 8개월에 세포주를 6-well plate에 4×10^4 cells/well씩 넣고, 5% 우혈청과 5% 마혈청이 포함된 DMEM 배양액에 배양하였다. 정해진 시간(5일)내에 세포들을 trypsin 처리하여 coulter count를 이용하여 counting하였다. 일차 배양한 연골 세포도 같은 방법으로 배양 4주, 5주, 6주에 같은 방법으로 시행하였다.

Doubling time = $(t-t_0)\log 2 / (\log N - \log N_0)$

t, t_0 : given time

N : Cell number at t

N_0 : Cell number at t_0

다. 콜라겐 II 단백질의 발현

(1) **면역세포화학 검사**

*v-myc*의 전이로 전환된 연골 세포를 작은 커버슬립에서 배양한 후 4% 파라포름알데하이드 중에서 5분간 실온에서 고정한 뒤, PBS로 두 번 씻고 챔버로 옮겼다. 비면역 혈청으로 10% 마혈청을 PBS에 100배로 희석하여 커버슬립에 올려놓고 30분간 실온에서 반응시켰다. 커버슬립에서 비면역 혈청을 씻어내지 않고 가볍게 부로팅을 하여 버리고, 1:200 mouse anti-human collagen typeII monoclonal antibody(Chemicon, Temecula, CA, USA)을 올려 놓고 실온에서 24시간 반응시켰다. 커버슬립을 PBS로 세 번 5분 간격으로 씻은 후 biotin 표지 1:100 이차 anti- mouse Ab(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 실온에서 반응 시켰다. 아비딘 액과 페록시다제 결합 바이오틴액의 혼합액을 커버슬립에 올려놓고 30분간 실온에서 반응시켰다. 커버슬립을 PBS로 3번 5분간 씻은 후 DAB 반응을 10분간 시행하였다. 탈수, 투철, 퍼마운트 봉입을 한 뒤, 세포내 *v-myc*이 이식된 연골 세포주에서 콜라겐 II 단백질의 발현을 면역세포화학 검사로 확인하였다.

(2) 콜라겐 II mRNA의 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 검사

(가) 연골 세포주로부터 RNA의 분리

연골 세포주가 직경 10cm 용기에 confluent한 상태에서 denaturating solution(guanidium thiocyanate, 0.75M sodium citrate〔pH 7.0〕, 10% N-lauroylsarkosyl, diethylpyrocarbonate treated ddH_2O) 50ml에 β-mercaptoethanol 350μl로 세포들을 균질화 시키고, phenol로 단백질과 DNA를 추출해낸 후, isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켰다. Ethanol을 이용하여 세척한 후 RNA pellet을 건조시켰고, diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 탈이온수에 용해하여 260 nm에서 흡광도를 측정, RNA 양을 정량하였다.[34)]

(나) 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR) 검사

역전사는 template RNA 1μg, random hexamer 1μℓ, RNase-free water로 10μℓ로 만들어 70。C에서 5분간 숙성시켰다. 실온이 되면 얼음 용기에서 reverse transcription(RT) reaction buffer(5X) 4μℓ, deoxynucleotide trophosphate(10mM each) 2μℓ, AMV reverse transcriptase 1.5μℓ(15U), RNase-free water 2.5μℓ를 첨가하여 최종 20μℓ를 만들어 42。C에서 60분간 숙성한 후 94。C에서 5분간 처리하여 생성된 cDNA를 4。C에 보관하였다. PCR은 5μℓ의 cDNA, 0.2μℓ Taq polymerase(5U/λ), 4μℓ dNTP(2.5mM each), 5μℓ 10X RT buffer, 4μℓ Mg^{2+}(25mM)에 각각의 primer(20pmol/λ) 1μℓ 씩을 넣어 50μℓ PCR 반응 용액으로 PCR을 시행하였다. 본 실험에서 사용한 PCR primer는 GenoTech(〔주〕 제노텍, Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였고, 콜라겐 II primer의 염기 서열은 다음과 같으며 base pair는 218이었다. 대조군으로 사용한 콜라겐 I primer의 염기 서열은 아래와 같으며 base pair는 217이었고, 섬유아 세포와 일차 배양 후 3주, 6주된 각각의 사람 이개 연골 세포의 RT-PCR을 시행하였다.

Human collagen type II :

Forward primer 5' GCATCGACATGTCCGCCTTTGC 3'

Reverse primer 5' GGCAGAGTTTCAGGTCTCTGC 3'

Human collagen type I :

Forward primer 5' CCCCTGGATTGGCTGGAC 3'

Reverse primer 5' GGGACCAGCAGGACCAGTCT 3'

PCR의 조건은 35 cycle 이상 시행하였고, annealing temperature는 55 。C로 하였다.

(3) 콜라겐 II 단백질의 western immunoblotting 분석

(가) 세포질 및 세포막 단백질 분획

연골 세포주가 10cm 용기에 confluent한 상태에서 배양액을 제거하고, PBS로 1회 세척한 후 세포를 수거하였다. 여기서 얻은 세포들을 4。C, 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 세포 pellet을 취하였다. EBC buffer(120mM NaCl, 0.5% NP-40, 40mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA)를 세포에 가하고 4。C에서 15분간 단백질을 용출해 내고, 원심 분리하여 상층액을 모았다. 단백질 양은 Bio-Rad assay를 통하여 추출된 단백질의 농도로 계산하였다.

(나) 단백질의 전기 영동 및 western immunoblotting 분석

실험 조건에 따라 일차 배양한 연골 세포, 연골 세포주, 섬유아 세포로부터 기원한 동량(50 μg)의 단백질을 SDS와 β-mercaptoethanol이 포함된 5X SDS 전기 영동 완충 용액(250 mM Tris-Cl, pH 6.8, 500 mM DTT, 1% SDS,

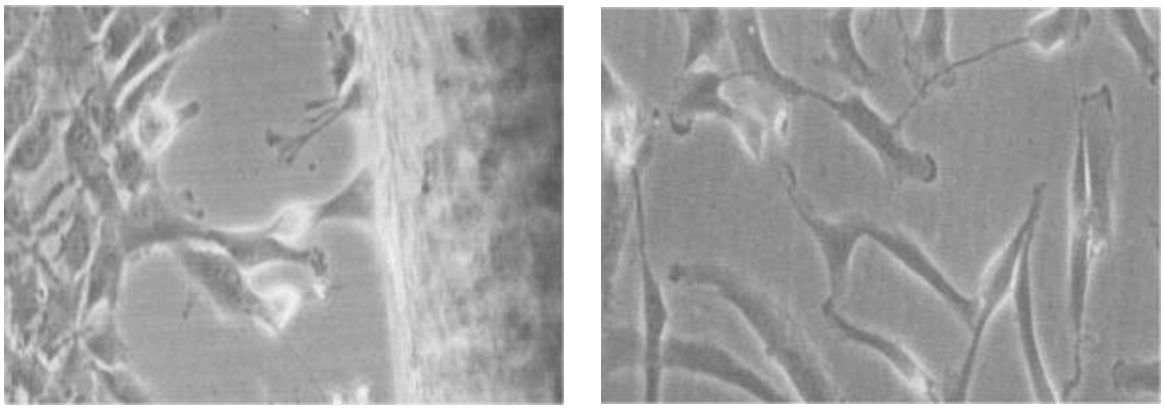
0.1% bromophenol blue, 30% glycerol)에 각각 혼합하여 100。C에서 5분간 처리하였다. 다음 Laemmli의 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다.[33] 전기 영동이 끝난 gel과 nitrocellulose(NC) membrane을 완충용액(25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1,4% glycine, 20% methanol)으로 평형시킨 다음, western blot용 cassette에 완충 용액으로 적신 dacron sponge와 여과지 2매를 올려 놓고 이 위에 gel을 놓았다. 다시 그 위에 NC membrane을 놓고 여과지와 dacron sponge, cassette의 순서로 올려 놓고 western blot chamber로 옮긴 다음, 완충 용액을 cassette 내의 membrane이 충분히 잠기도록 채우고 150 mA로 하룻밤 동안 4。C에서 각각의 단백질을 전이하였다.

Ponceau S 용액(Sigma Biochemical Co., St. Louis, Missouri, USA)을 사용하여 NC membrane 상에 일차 배양한 연골 세포, 연골 세포주, 섬유아 세포로부터 기원한 단백질 전이를 확인하였고, 단백질이 전이된 NC membrane의 immunostaining을 다음과 같이 시행하였다. NC membrane을 5% 탈지 분유가 함유된 TBST 완충용액(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 담가 흔들면서 1시간 방치하여 비특이적 반응을 차단한 후 용액을 버리고, 인체 콜라겐 II에 대한 일차 항체(rabbit anti-human collagen type II polyclonal antibody, AB761; Chemicon, Temecula, CA, USA)를 이천배 희석한 5% 탈지 분유가 함유된 TBST 완충 용액에 4。C에서 18시간 동안 담가 반응시켰다. 이 membrane을 15분씩 2회, 5분씩 3회 TBST 완충 용액으로 세척한 다음, 다시 TBST 완충용액에 이차 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 3,000배 희석한 용액에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 위와 같이 세척하고 enhanced chemiluminescence 시약(Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)인 용액 1과 용액 2의 1:1 혼합액 2 ml을 membrane 전체에 얹은 후 1분간 방치하였다. 혼합액을 제거한 후 membrane을 비닐로 싸고 Las-1,000(Fuji, Tokyo, Japan)으로 현상하였다.

III. 결 과

1. 인체 이개 연골 세포의 배양

일차 배양된 인체 이개 연골 세포는 계대 배양 6주에 대부분이 형태학적으로 비교적 끝이 날카로운 spindle 모양를 지녔으며, 배양 조건 및 시간에 따라 형태는 일정하지 않았다(그림 2.).



a. b.

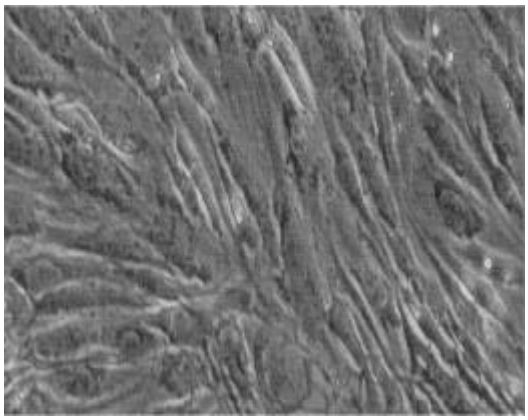
그림 2. 일차 배양한 연골 세포. a는 일차 배양 2주에 사람 이개 연골 세포로써 연골 조직으로부터 세포의 이동을 관찰할 수있었으며, b는 일차 배양 6주에 사람 이개 연골 세포로써 방사형 모양이 비교적 균일한 것을 관찰할 수있었다.

2. 일차 배양된 연골 세포의 전환(transformation)

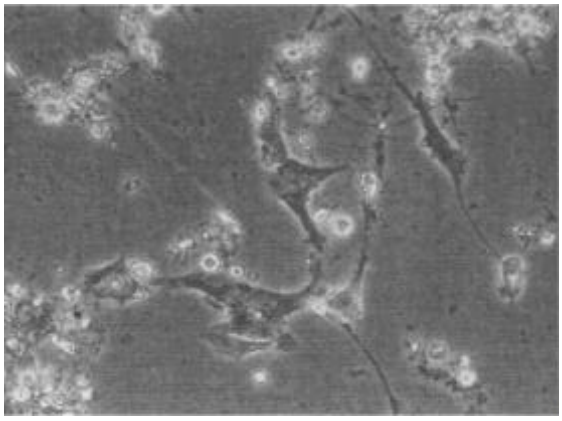
가. 이개 연골 세포에 *v-myc* 유전자 이식 및 이식된 세포의 선택

G418에 의한 세포 선택은 10일에 걸쳐 이루어졌으며, 최종 세포 선택 농도

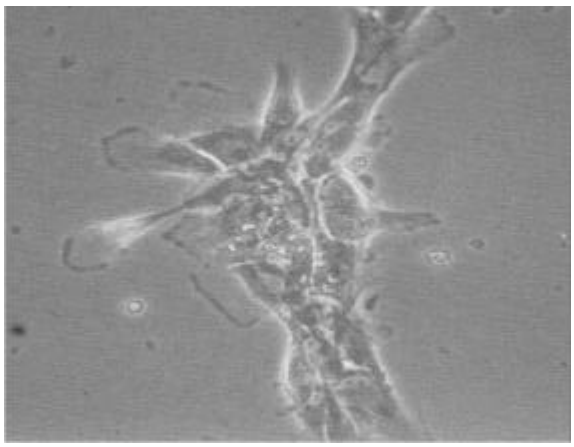
는 220 ㎍/㎕였다. G418이 100 ㎍/㎕에서부터, 세포가 죽기 시작해서 240 ㎍/㎕에서는 모든 세포가 사멸하였다. *v-myc* 유전자가 이식되지 않고 일차 배양 연골 세포인 대조군은 G418를 투여하지 않은 상태에서 10일 간에 걸쳐 별다른 변화없이 생존하였다. G418에 의하여 *v-myc* 유전자가 이식되지 않은 연골 세포는 사멸하였고, *v-myc* 유전자가 이식되어 생존한 세포들은 배양 10일에 계대 배양하였고, 13일에 선택된 세포의 클론(clone)을 관찰하였다(그림 3.).



a.



b.

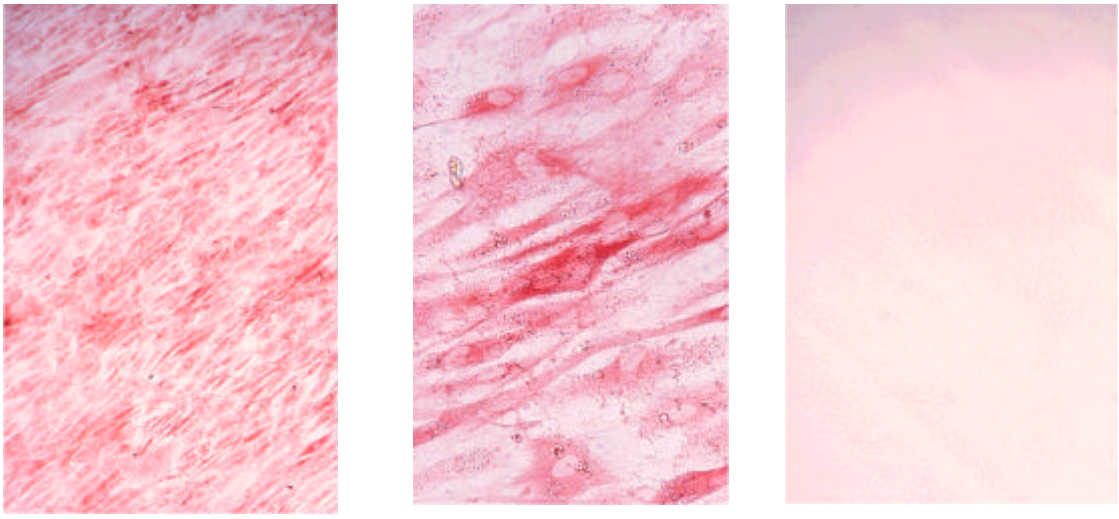


c.

그림 3. G418에 의한 *v-myc* 유전자가 이식된 연골 세포의 선택. a는 일차 배양된 연골 세포로 G418에 노출되지 않고 모든 세포가 생존해있으며, b는 세포 선택 8일째로 G418에 내성이 있는 세포만이 생존한 상태이며, c는 G418에 노출시킨 후 10일째부터 일반배지로 교체한 후 13일째 선택된 세포에 의해 클론이 형성된 것을 보여준다.

나. Myc 단백질의 면역세포화학 검사

v-myc 유전자의 이식 후 형성된 세포주에 *v-myc*에 의해 생성된 Myc 단백질에 대한 면역세포화학 검사를 통해 모든 세포에서 Myc 단백질의 존재를 확인할 수 있었고, 대조군인 일차 배양한 연골 세포에서는 Myc 단백질의 발현이 관찰되지 않았다(그림 4.).



a. b. c.

그림 4. Myc 단백질에 대한 면역화학검사. a와 b는 *v-myc* 유전자 이식된 연골 세포주로 Myc 단백질이 모든 세포에 강하게 발현되는 것을 보여주며, c는 대조군으로 일차 배양된 연골세포이며, Myc 단백질의 발현이 나타나지 않았다(a. x50, b. x200, c. x50).

다. Myc **단백질의** western immunoblotting **분석**

v-myc **유전자가 이식된 연골세포주에서는** 80kDa**에서** Myc **단백질이 발현되었으나, 일차 배양한 연골세포에서는 발현되지 않았다**(**그림** 5.).

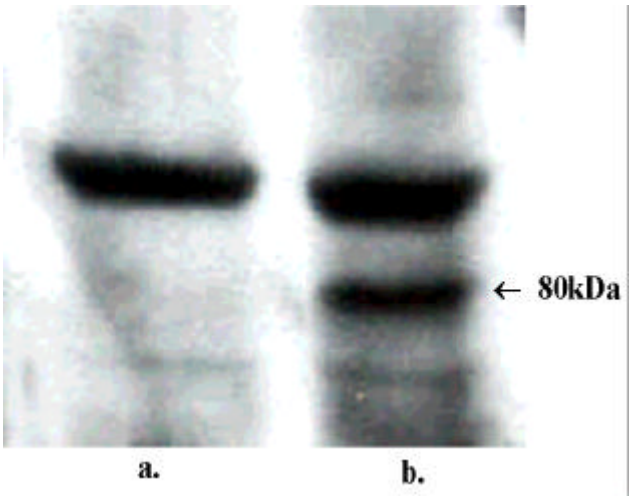


그림 5. Myc **단백질의** western immunoblotting **분석**. a: **일차 배양한 연골세포**, b: *v-myc* **유전자가 이식된 연골세포주**

3. *v-myc* **유전자가 이식된 세포주의 이배가시간**(doubling time)

v-myc **유전자가 이식된 세포주의 이배가시간**(doubling time)**은** *v-myc* **유전자 이식 후** 6**개월된 세포주에서** 42**시간,** 7**개월된 세포주에서** 46**시간,** 8**개월된 세포주에서** 42**시간 이었고, 일차 배양된 연골 세포는 이배가시간이** 4**주된 연골세포에서** 170**시간,** 5**주된 연골세포에서** 198**시간,** 6**주된 연골세포에서** 180**시간이었다**.

4. *v-myc* 유전자가 이식된 세포주에서 콜라겐 II 단백질의 발현

가. 콜라겐 II의 면역세포화학염색

v-myc 유전자가 이식된 세포주의 콜라겐 II의 면역세포화학염색 검사에서 세포주는 미약한 양성 반응을 보였다(그림 6.).

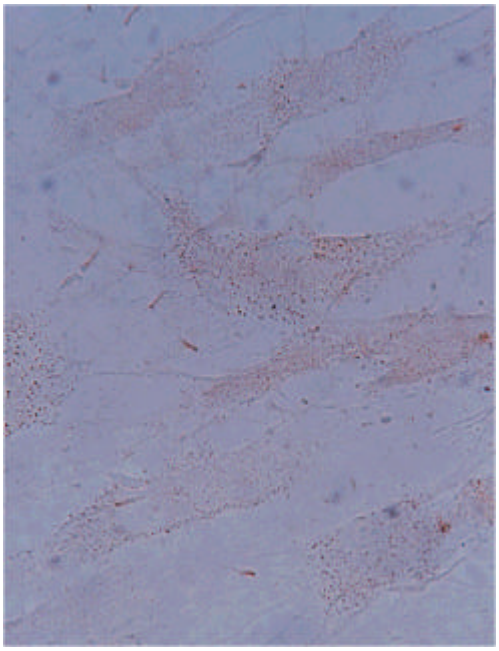


그림 6. *v-myc* 유전자가 이식된 연골세포주에서 콜라겐 II 단백질에 대한 면역화학검사. *v-myc* 유전자가 이식된 연골세포주에서 콜라겐 II 단백질에 대한 면역화학검사에서 콜라겐 II 단백질이 약하게 발현되었다(x 200).

나. 콜라겐 II mRNA의 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR) 검사

연골 세포의 특성을 규명할 수 있는 콜라겐 II mRNA는 사람이개 연골세포에서 *v-myc* 유전자가 이식된 후 8개월에도 218bp에서 발현되었으며, 일차 배양 후 3주된 사람이개 연골세포에서도 콜라겐 II mRNA의 발현이 확인되었다. *v-myc* 유전자가 이식된 후 8개월된 사람이개 연골세포는 콜라겐 I의 mRNA의 발현은 없었다(그림 7.).

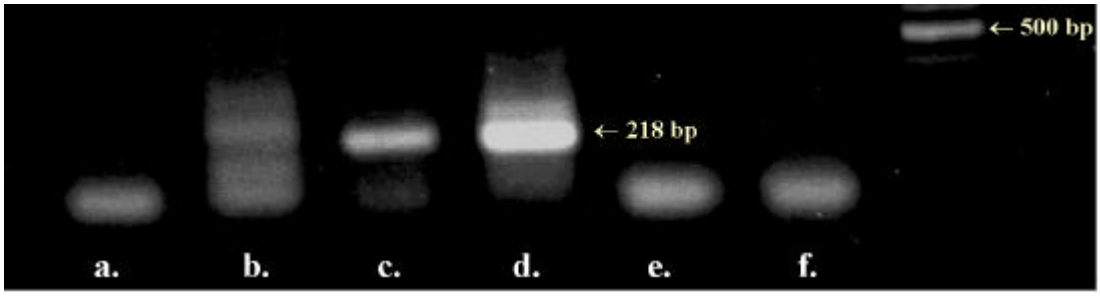


그림 7. *v-myc* 유전자가 이식된 연골 세포주에서 콜라겐 II mRNA의 발현. a는 *v-myc* 유전자가 이식된 후 8개월 된 사람이개 연골세포주, b는 섬유아세포로 콜라겐 I mRNA는 섬유아 세포에서만 237bp에서 발현되고 있다. c는 *v-myc* 유전자가 이식된 후 8개월 된 사람이개 연골세포주로 대조군 d는 일차 배양 후 3주된 사람이개 연골세포에서와 같이 218bp에서 콜라겐 II mRNA의 존재를 확인 할 수 있었다. e는 일차 배양 후 15주된 사람이개 연골세포이며, f는 섬유아세포로 콜라겐 II mRNA의 발현은 없었으며, primer dimer에 의한 band만 나타났다.

다. 콜라겐 II의 western immunoblotting 분석

v-myc 유전자가 이식된 후 8개월 된 사람이개 연골세포주에서 175 kDa의 콜라겐 II 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다. 일차 배양 후 3주된 사람이개 연골세포와 연골 조직에서도 같은 크기의 콜라겐 II 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다(그림 8.).

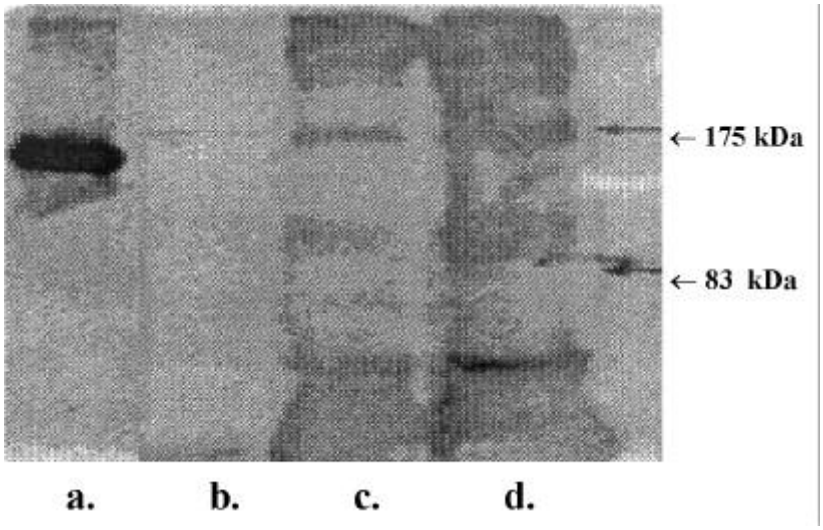


그림 8. *v-myc* 유전자가 이식된 연골 세포주에서 콜라겐 II 단백질의 발현. a는 사람이개 연골조직으로 175 kDa에서 콜라겐 II 단백질의 발현이 뚜렷하였으며, b는 섬유아세포로 콜라겐 II 단백질의 발현이 없었다. c는 일차 배양 후 3주된 사람이개 연골세포로 콜라겐 II 단백질의 발현이 175 kDa에서 나타났으며,d는 *v-myc* 유전자가 이식된 후 8개월 된 사람이개 연골세포주로 a,d에서와 같이 콜라겐 II 단백질의 존재를 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 고 찰

현재까지 연골 조직의 조직공학술에 의한 재건에 관한 연구는 (1)연골 세포만을 사용하거나 적합한 생체물질을 같이 사용하는 방법[2)3),7)-10)] (2)연골 세포로의 분화가 가능한 골수간 세포(marrow derived stromal cells), 골막 세포, 연골막 세포에 의한 방법[35)-40)] (3)생체물질만을 사용하거나 성장인자를 같이 사용하는 방법[39)] (4)세포를 통한 유전자 이식을 통하여 조직의 재생을 유도하거나, 유전자를 변형한 연골 세포를 이용하는 방법[21)-26),39)] 등이다. 결국 충분한 세포수와 이 세포들이 기능적인 세포외기질을 형성하여 연골로의 기능을 유지하는 것이 필수적이며, 이런 연골 조직은 충분히 분화된 연골 세포(fully differentiated chondrocytes), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 유전자 변형세포(gene transduced cells) 등으로 가능하다.

Quetela등은 연골 세포를 일차 배양하여 transforming growth factor-β와 basic fibroblast growth factor를 투여함으로써 연골 세포의 증식 및 분화를 조사한 결과 증식력이 상기 요소들을 첨가했을 때 이배 정도 증가된 결과를 보였다.[41)] 그러나, 일차 배양된 이개 연골 세포의 이배가 시간은 빠르게 했지만 세포의 표현형을 계속적으로 유지시키는데는 역시 시간적인 한계가 있었다.[13)22)41)42)] 반면 *v-myc*에 의해 형성된 이개 연골 세포주는 일차 배양된 연골 세포보다 네 배가 빠른 이배가 시간을 보였으며, 성장 인자를 첨가한 일차 배양 세포보다도 이배 가량 빠른 결과를 나타내는 것이다. 또한 지속적으로 콜라겐 II 단백질을 분비함으로써 연골 세포로의 표현형을 본 실험에서는 8개월까지도 유지한 결과를 나타냈다.

본 실험에서 연골 세포를 일차 배양하였을 때, 세포의 형태는 spindle 모양 및 상피 세포와 같은 모양을 나타냈으며(그림 3), *v-myc* 유전자가 이식된 후에도 연골 세포주는 균일하고 일차 배양한 세포와 같은 형태를 유지했다(그림 4,5). Rodriguez 등에 의하면 분화가 완료된 일차 배양 연골 세포의 세포 형태

는 균일하고 fibroblast와 형태가 유사하다는 것은 본 실험 결과와 일치한다.[22] 그러나, Gionti등은 조류의 배아에서 연골 세포로 분화하는 lineage의 세포를 일차 배양하였을 때, 상피 세포 형태 뿐만 아니라 배양액에 부유하는 연골 세포군을 확인하였으며, 이는 줄기 세포의 한 분화 과정에서 얻은 세포군들의 배양 결과로 설명했다.[24] 또한 Gionti등은 조류의 배아에서 얻은 연골 세포들 중 상피 세포모양의 연골세포에 avian myelocytomatosis virus로 *v-myc* 유전자를 이식하여 세포주를 만들었으며, 이는 본 실험 결과와 같이 *v-myc*유전자 이식 전후에 세포 모양을 일정히 유지했으며, 생성된 연골 세포주를 일년 육개월까지 추적하여 표현형을 조사한 결과 콜라겐 II 단백질을 지속적으로 발현하였고, proteoglycan과같은 세포외 기질도 지속적으로 분비했고, 이배가 시간도 19시간에서 20시간이었다.[24] 이배가 시간은 같은 유전자를 사용하여 인체 연골 세포주를 만든 본 실험 결과에서보다도 두배나 빠른 양상을 보였다. 이는 일차 배양 세포의 기원에 있어 배아세포와 조직으로 분화된 연골 세포의 차이점에 기인한 것으로 생각되어진다. 왜냐하면 Villa등에 의해 신경 줄기 세포에 *v-myc* 유전자를 이식하여 신경 줄기 세포주의 이배가 시간은 40시간인 점을 고려해 볼 때, *v-myc* 유전자가 세포내에 이식되어 세포의 증식 및 분화에 관여하지만 유전자의 이식 당시 세포의 분화 시기 및 세포의 나이가 이배가 시간을 결정한다는 Land 등의 결과와 상응하는 결과로 생각되어진다.[43]

조직 공학술의 궁극적인 목표라면, 소이증에서와 같이 적은 연골 조직으로 큰 조직을 만들 고자하는 것이다. 이를 위해 본 실험에서는 표현형을 유지하는 일차 배양 연골 세포를 계속 빠른 증식이 가능하고 표현형 유지가 되는 연골 세포주를 만들기 위해 *v-myc* 유전자 이식의 방법을 선택했다. *v-myc* 유전자는 avian acute leukemia virus로부터 최초 발견되었으며, *myc*은 *my*elo*c*ytomatosis에서 유래한 이름이다. 포유류에 상존하는 c-myc은 세포핵내에 존재하며, *myc* 유전자군에 의해 발현되는 Myc 단백질도 주로 핵내에 존재한다고한다. 그러나 이번 실험에서 나타난 연골 세포주는 세포핵보다는 세포질에 Myc 단백질의 발현이 뚜렷함을 나타냈다. 이는 세포가 고정될 때의 세포내 상태가 어떠했냐에 따라 다를수 있다고 생각하며, 같은 *v-myc* 유전자가

이식된 신경 줄기 세포주라 하더라도, 면역화학세포 검사에서 핵내 또는 세포질에 염색이 진하게 보일 수 있다고 한다. 본 실험에서 Myc 단백질의 western immunoblotting 검사에서는 핵과 세포질의 분획 없이 조사한 것이라, Myc 단백질의 핵과 세포질 내에서의 정량적인 차이점은 밝힐 수 없었지만, 추후 연구를 진행해 보아야 할 부분으로 생각한다. 면역화학검사도 세포주가 본 실험에서와 같이 confluent한 경우가 아니고, 증식이 활발한 시기에 염색 시기를 택하여 결과를 비교해 본다면 이번 실험 결과와 다른 양상을 나타낼 수도 있다고 생각된다.[27)-31)]

현재까지 보고된 연골 세포주로 연골육종(chondrosarcoma)에서 분리된 종양 세포주는 암세포로서, 세포 형태는 연골 세포의 모양을 유지하지만, 세포간의 contact inhibition이 상실됨으로써, 배양하면서 세포들이 confluent해지면, 증식력이 떨어지면서 종괴(nodule)를 형성한다고한다. 이 종괴에서 콜라겐 II 단백질을 발현하며, 생체내에서는 연골육종을 다시 형성하며, 이는 유리 연골에서 기원한 것으로 이개 탄성 연골과의 차이점이 있다고 하겠다.[35)]

Horton 등이 쥐의 유리 연골에 *υ-myc*과 *v-raf* oncogenes을 이식한 경우는 세포주의 세포 형태도 다변형(polygonal) 형태였으며, 콜라겐 II 단백질의 발현이 없었고, 콜라겐 II mRNA 발현도 미미하였다. 그 외에 link-protein, proteoglycan 등과 같은 연골 세포외 기질의 발현은 왕성한 것으로 나타났으나, 연골 세포의 표현형은 유지하지 못하는 것이었다. [22)23)]

Matagawa의 large T antigen에 의한 transgenic mouse에서 기원한 관절 유리 연골 세포주는 배양 온도 조건에 따라 분화와 증식이 유도되며, 연골 세포의 표현형도 잘 유지된다고 한다. 그러나, large T antigen의 연골 세포내 이식이 용이치 않고, 연골 세포의 콜라겐 X을 주로 분비함으로써 관절 연골의 노화 연구에 주로 이용되고 있다.[19)24)] 본 연구에서 목적하는 이개 탄성 연골의 빠른 증식을 유도하는데는 *υ-myc* 유전자가 적합하였던 것으로 생각되며, retroviral vector는 양 끝에 murine leukemia virus long repeat terminal(MLV LRT)을 가짐으로써 포유류 세포의 관통이 강력하다는 장점이 있었다.[20)30)]

Land 등에 의하면, *υ-myc* 유전자가 oncogene이긴하지만, 섬유아 세포를 종

양 세포로 발전시키려면 *ras* 유전자가 동시에 같이 작용하여야 하며, *myc* 유전자 단독으로는 암을 유발할 수 없다고 보고하였다.[43] 이런 결과만으로 *v-myc* 유전자의 이식에 의해 생성된 연골 세포주를 직접 인체에 사용하는 것은 불가능할 것으로 생각된다. 향후 *v-myc*으로 확립된 연골 세포주를 동물에 주입하여, *myc* 유전자의 발현 여부 및 암조직으로의 전환 여부도 확인해야할 것으로 생각한다.

끝없이 빨리 증식하면서 연골 세포로써 표현형을 유지하는 사람의 이개 연골 세포주를 이용하여, 생성된 세포외기질을 연골 조직공학술의 scaffold로 사용할 수 있을 것으로 생각되며,[44-48] 연골 세포주에 대한 elastin, aggrecan, link-protein과 같은 세포외기질의 특성화 작업을 진행하면서, 삼차원 배양 혹은 생체내에서 연골 조직의 재생이 가능해진다면, 생성된 연골 조직의 동결 건조(lyophilization)와 γ-irradiation 등의 처치 후, 조직 대치물로 인체에 사용 가능하리라 생각한다.

Ⅴ. 결 론

인체 이개 연골 세포에 retrovirus vector로 υ-*myc* 유전자를 이식하여 생성된 연골 세포주를 확립하고, 이 세포주가 연골 세포로써의 표현형을 유지하는지 알기 위해 콜라겐 Ⅱ mRNA와 콜라겐 Ⅱ 단백질의 발현 여부 및 이배가 시간을 일차 배양 세포와 비교하여 보았다.

1. υ-*myc* 유전자가 이식된 연골 세포주는 면역세포화학 검사상 Myc 단백질이 모든 υ-*myc* 유전자 이식 세포에서 양성반응을 보였으며, western immunoblotting 검사에서는 Myc 단백질이 80kDa에서 발현되어, υ-*myc* 유전자의 연골 세포내 이식을 확인할 수 있었다.

2. υ-*myc* 유전자가 이식된 연골 세포주는 일차 배양 연골 세포보다 4배 가량 빠른 이배가 시간을 나타냈다.

3. 대조군으로 일차 배양 연골 세포는 배양 15주에 콜라겐Ⅱ mRNA와 콜라겐 Ⅱ 단백질의 발현이 관찰되지 않았지만, υ-*myc* 유전자가 이식된 연골 세포주는 배양 8개월까지도 콜라겐 Ⅱ mRNA와 콜라겐 Ⅱ단백질의 발현이 확인되었다.

이상의 실험결과로, 인체 이개 연골 세포에 υ-*myc* 유전자를 이식하여 Myc 단백질을 발현하며, 연골 세포의 표현형인 콜라겐 Ⅱ mRNA와 콜라겐 Ⅱ 단백질의 발현을 배양 8개월까지 지속하며, 이배가 시간도 항진된 인체 이개 연골 세포주를 확립하였다.

참고 문헌

1. Vacanti JP. Beyond transplantation. Arch Surg 1988;123:545-9.

2. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. Plast Reconstr Surg 1999;103:1809-18.

3. Brittberg M, Lindahl A, Nisson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994;331(14):889-95.

4. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays 1995;17(12):1039-48.

5. Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. J Cell Biochem 1998;71(3):313-27.

6. Madsen K, Mark K, Menxel M, Friberg V. Analysis of collagen types synthesized by rabbit ear cartilage chondrocytes in vivo and in vitro. Biochem J 1984;221:189-96.

7. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanual J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res 1993;27(1):11-23.

8. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. J Biomech Eng 1991;113(2):143-51.

9. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. Plast Reconstr Surg 1991;88:753-9.

10. Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Moaney D, Upton J, Puelacher WC, et al. Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. Plast Reconstr Surg 1994;94:233-40.

11. Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. Clinics in Plastic Surgery 1994;21(3):445-62.

12. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. Plast Reconstr Surg 1997;100:297-304.

13. Saddeh PB, Brent B, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Ting V, Gittes GK, et al. Human cartilage engineering : chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. Ann Plast Surg 1999;42:509-13.

14. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP, Vacanti CA. Injectable cartilage. Plast Reconstr Surg 1995;96:1390-400.

15. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De Novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. Plast Reconstr Surg 1996;97:168-80.

16. Sims CD, Burtler PEM, Casanova R, Lee BT, Randolph MA, Lee A, et al. Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrates. Plast Reconstr surg 1996;98:843-50.

17. Sims CD, Butler PEM, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Vacanti CA. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. Plast Reconstr Surg 1998;101:1580-5.

18. Vacanti CA, Paige KT, Kim WS. Experimental tracheal replacement using tissue engineered cartilage. J Pediatr Surg 1994;29:201-5.

19. Rodriguez A, Cao YL, Ibarro C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. Plast Reconstr Surg 1999;103:1111-9.

20. Ma PX, Langer R. Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage. J Biomed Mater Res 1999;44(2):217-21.

21. Takigawa M, Jajima K, Pan HO, Enomoto M, Kinoshita A, Suzuki F, et al. Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. Cancer Res 1989;15;49(14):3996-4002.

22. Horton WE, Cleveland J, Rapp V, Nemuth G, Bolander M, Doege K, et al. An established rat cell line expressing chondrocyte properties. Exp Cell Res 1988;178:457-68.

23. Oxford JT, Doege KJ, Horton WE, Morris NP. Characterization of type II and type XI collagen synthesis by an immortalized rat chondrocyte cell line(IRC) having a low level of type II collagen mRNA expression. Exp Cell Res 1994;213:28-36.

24. Gionti E, Pontarelli G, Cancedda R. Avian myelocytamatosis virus immortalizeds differentiated quail chondrocytes. Proc Natl Acad Sci 1985;82(9):2756-60.

25. Mataga N, Tamura M, Yanai N, Shinomura T, Kimata K, Obinata M, et al. Establishment of a novel choncrocyte-like cell line derived from transgenic mice harboring the temperature-sensitive simian virus 40 large T-natigen gene. J Bone Miner Res 1996;11(11):1646-54.

26. Oyajob BO, Frazer A, Hollander AP, Graveley RM, Xu C, Houghton A, et al. Expression of type x collagen and matrix calcification in three-dimensional cultures of immortalized temperature-sensitive chondrocytes derived from adult human articular cartilage. J Bone Miner Res 1998;13(3):432-42.

27. Persson H, Hennighausen L, Taub R, DeGrado W, Leder P. Antibodies to human c-myc oncogene product: evidence of an evolutionarily conserred protein induced during cell proliferation. Science 1984;225:687-93.

28. Ryder EF, Snyder EY, Cepko CL. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated onconege transfer. J Neurobio 1990;21(2):356-75.

29. Shen-ong GLC, Keath EJ, Piccol SP, Cole MD. Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas. Cell 1982;31:443-52.

30. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Willis AM, Billinghurst LL. Engraftable human neural stem cells respon to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. Nat Biotechnol 1998;16;1033-9.

31. Villa A, Snyder EY, Vescovi A, Martinez-Serano A. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. Exp Neurol 2000;161:67-84.

32. Faverra RD, Gelmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gallo RC, et al. Cloning and characterization of different human sequences related to the *onc* gene(*v-myc*) of avian myelocytomatosis virus(MC29). Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:6497-501.

33. Ossipow V, Laemmli UK, Schiber U. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 1993;21(25):6040-1.

34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem 1987;162:156-59.

35. Cheah KSE, Stoker NG, Griffin JR, Grosveld FG, Solomon E. Identification and characterization of the human type II collagen gene(COL2A1). Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:2555-9.

36. Osch GJ, Veen SW, Buma P, Verwoerd-Verhoef HL. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. Matrix Biol 1998;17(6):413-24.

37. Mcdougall S, Fu Y, Lowe GN, Williams A, Polendo R, Benya PD, et al. Surface adhesion-mediated regulation of chondrocyte-specific gene expression in the nontransformed RCJ 3.1c5.18 Rat chondrocyte cell line. J Bone Miner Res 1996;11(8):1130-8.

38. Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. J Bone Miner Res 1997;12(10):1657-63.

39. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE. Cartilage tissue engineering:current limitations and solutions. Clin Orthop 1999;367S:S176-85.

40. Pittenger MF, Nackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal atem cell. Science 1999;284:143-7.

41. Quatela VC, Sherris DA, Rosier RN. The human auricular chondrocyte: response to growth factors. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119:32-7.

42. Bujia J, Pitzke P, Kastenbauer E, Wilmes E, Hammer C. Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar. Eur Arch Otorhinolaryngol 1996;253:336-40.

43. Land H, Chen AC, Morgenstern JP, Parada LF, Weinberg RA. Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. Mol Cell Biol 1986;6:1917-25.

44. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260:920-6.

45. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. Clin Plast Surg 1990;17(3):421-32.

46. Perka C, Spitzer R, Lindenhayn K, Sittinger M, Schultz O. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants J Biomed Mater Res 2000;49:305-11.

47. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone and Joint Surg 1994;76:579-92.

48. Gross AE, Langer F, McDermott AGP, Pritzker KPH. Fresh small-fragment osteochondral allografts. Long-term follow-up study on first 100 cases. Clin Orthop 1985;197:96-102.

Abstracts

Establishment and Characterization of Human Adult Auricular Chondrocyte Cell Line Using Retrovirus Vector Mediated *v-myc* Transfer

Jaiho Chung

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

(Directed by Professor Beyoung Yun Park)

Tissue engineering is the process of creating functional biologic protheses by suspending dissociated cells into biodegradable polymer scaffolds, which ultimately leads to new tissue formation. The goal of tissue engineering can be viewed from two perspectives depending on the type of tissue involved. In the structural tissue, tissue regeneration remains the primary goal whereas, in the functional tissue, organ substitution from allogenic or xenogenic cells remains the ultimate objective. The three main technical factors involved in tissue engineering are : (1) cell technology (2) construct technology(scaffold) (3) integration into living systems(immune acceptance). The successful use of tissue engineering techniques to form new cartilage from a small number of autologous chondrocytes will allow the reconstruction of craniofacial and other musculoskeletal tissue deformities, without the complications associated with prosthetic materials, allografts, or large autografts. I know from primary culture studies of cartilage that cultured chondrocytes maintain the cellular phenotype upto only 8 weeks in culture, producing collagen type Ⅱ. Collagen type Ⅱ is not only a marker of differentiated chondrocytes but also a prereguisite for a

mechanically functional collagen network.

The purpose of these studies was establishment of human auricular chondrocyte cell line using retrovirus mediated *v-myc* transfer and characterization of human auricular chondrocyte cell line by type II collagen mRNA expression using RT-PCR and collagen type II expression by western immunoblotting to prove the maintenance of persistent chondrocyte phenotype. Also, I evaluated the growth rate of chondrocyte cell line to measure the cellular proliferative potency.

I have established the human auricular chondrocyte cell line integrated *v-myc* and confirmed by *v-myc* transduced Myc protein expression by immunocytochemistry and immunoblotting study. Also, growth rate of established human auricular chondrocyte cell line increased 4 folds times faster than primarily cultured human auricular chondrocyte. The established human auricular chondrocyte had type II collagen mRNA and collagen type II expression upto 8 months in culture, so that means maintenance of chondrocyte phenotype.

I have established immortalized human chondrocyte cell line using retroviral vector mediated *v-myc* transfer and confirmed that cell line maintained cellular phenotype after 8 week upto 8 months in culture. By this cell lines, I hope to make human extracellular matrix polymer as scaffolds.

Key words : tissue engineering, chondrocyte, collagen type II, celluar phenotype, extracellular matrix, *v-myc*, retroviral vector