

배양된 사람 추간반 세포에서
Matrix Metalloproteinase-3의 생성과
추간반 퇴행성 변화의 관계

연세대학교 대학원

의과학과

김 공 년

배양된 사람 추간반 세포에서
Matrix Metalloproteinase-3의 생성과
추간반 퇴행성 변화의 관계

지도 윤 도 흠 부교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 공 년

김공년의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

논문을 작성하기까지 자상한 지도와 격려로 이끌어 주신 윤도흠 교수님께 심심한 감사를 드립니다. 논문 심사 중 수고로움을 아끼지 않고 훌륭한 지도를 마다하지 않으신 한수봉 교수님, 정현철 교수님, 조용은 교수님, 장진우 교수님께도 진심으로 감사 드립니다. 또한 척추 신경외과에 눈을 뜨게 해 주시고 항상 지도, 편달을 해 주신 은사 김영수 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 논문을 완성하기까지 격려와 성원을 보내 주신 연세대학교 신경외과 교수님들에게 감사의 마음을 드리며, 연구를 위해 도와주신 박정은 선생님, 조윤희 선생님께도 감사의 말씀을 전합니다.

오늘이 있기까지 무한한 사랑으로 돌보아주신 부모님과 장인어르신, 장모님 그리고 착하고 사랑스런 아내 혜정, 귀여운 신일이와 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 연구 대상	6
2. 조직 채취, 조직 배양 및 세포 배양	7
3. 면역학적 분석 및 조직화학적 검사	8
4. 자료 분석 및 통계처리	9
III. 결과	11
1. 환자군의 특성	11
2. MMP-3 농도와 양성 세포비율의 차이 (조직 배양)	12
3. MMP-3 농도와 양성 세포비율의 차이 (세포 배양)	13
4. TIMP-1 농도와 양성 세포비율의 차이 (조직 배양)	15
5. TIMP-1 농도와 양성 세포비율의 차이 (세포 배양)	16
6. 추간반 탈출 정도에 따른 MMP-3 농도와 양성 세포비율의 차이 ..	17
IV. 고찰	18
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	26

그림 차례

그림 1. Thompson의 분류에 따른 추간반 퇴행의 정도	7
그림 2. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 농도의 차이	12
그림 3. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 양성 세포의 비율	13
그림 4. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 농도의 차이	14
그림 5. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 양성 세포의 비율	14
그림 6. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 농도와 양성 세포의 비율	15
그림 7. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 농도와 양성 세포의 비율	16
그림 8. 추간반 탈출 정도와 MMP-3 분비량과 양성 세포의 비율	17

표 차례

표 1. 실험 환자군의 특성	11
-----------------------	----

국문요약

배양된 사람 추간반 세포에서 Matrix Metalloproteinase-3의 생성과 추간반 퇴행성 변화의 관계

추간반의 퇴행성 변화의 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 추간반의 퇴행성 변화에는 생역학적 요소와 생화학요소가 관여한다고 알려져 있으며 최근 생화학적 요소에 중요 부분인 단백 분해 효소의 역할에 대해 활발한 연구가 진행되고 있다. 단백 분해 효소는 추간반의 주요 구성 성분인 기질의 core protein과 collagen을 분해시켜 퇴행성 변화를 일으킨다고 알려져 있다. Matrix metalloproteinase(MMP)는 이러한 단백 분해 효소 중의 하나로 추간반 조직에서 분비가 확인된 후 관심을 받고 있으며 이 중 Matrix metalloproteinase-3(MMP-3)이 여러 MMP의 전구체를 활성화시키며 넓은 기질 특이도를 가지고 골 관절염 연골의 proteoglycan의 분해에 관여한다고 증명된 바 있다. 그러나 아직 퇴행성 변화와의 직접적인 관계는 논란이 있으며 그 조절기전은 불명확하다. 본 연구에서는 추간반의 퇴행성 질환으로 수술 받은 환자의 추간반 조직(수핵부)을 이용하여 퇴행의 정도와 MMP-3의 분비와 상관 관계가 있는지 알아보고 MMP-3의 억제 인자인 Tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)과 추간반의 퇴행도와의 관계를 알아보았다. 조직 배양과 세포 배양한 결과를 비교하여 추간반 세포의 역할을 규명해 보고자하였고 추간반 탈출의 유형과 MMP-3과 관계가 있는지 알아보았다.

수술을 시행한 환자의 추간반 퇴행의 정도를 자기 공명 영상에서 Thomson의 분류에 따라 분류하였다. 수술 시 가능하면 추간반 수핵부만을 떼어냈고 실험실에서 두 부분으로 나누어 조직배양과 세포배양을 시행하였

다. 수핵부 추간반 조직을 일정한 크기로 나누어 배양 배지에서 48시간 배양 후 조직표본과 배양배지를 얻었다. 세포배양은 조직을 잘게 부순 후 효소 처리하여 추간반 세포를 분리한 다음 세포 배양하여 세포와 배양배지를 얻었다. 조직 표본과 세포 표본은 MMP-3과 TIMP-1 단클론 항체를 이용하여 면역화학적 방법으로 염색 후 양성세포비율을 구했고 배양 배지에서 효소결합면역흡착검사 방법으로 MMP-3과 TIMP-1의 농도를 측정하였다.

조직 배양 결과 MMP-3의 농도와 양성세포 비율은 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 증가하다가 퇴행의 정도가 가장 심한 군에서는 감소하는 양상을 보였다. 이와는 반대로 세포 배양 결과 MMP-3의 농도와 양성 세포의 비율은 퇴행의 정도가 증가할수록 감소하는 양상을 보였다. 조직 배양과 세포 배양 모두에서 퇴행의 정도와 TIMP-1의 농도와 양성 세포 비율은 유의한 차이를 보이지 않았다. 추간반 탈출 유형과 MMP-3 농도와 양성 세포비율은 유의한 차이가 없었다.

결론적으로 조직 배양 결과, 추간반의 퇴행의 정도와 MMP-3의 분비량과는 밀접한 관계가 있으며 MMP-3은 추간반의 퇴행성 변화의 초기 또는 중기에 관여할 것으로 판단된다. 세포 배양의 결과, 퇴행의 정도가 증가할수록 MMP-3의 분비량이 감소한 것은 추간반 세포의 MMP-3 분비는 세포의 환경과 밀접한 관계가 있으며 향후 MMP-3 분비의 조절 인자에 대해서는 연구가 필요할 것이다. TIMP-1과 퇴행의 정도와는 무관하며 추간반의 탈출 유형과 MMP-3의 분비량도 무관하다고 판단된다.

핵심 되는 말 : 추간반, 퇴행성 변화, matrix metalloproteinase-3,
tissue inhibitor of metalloproteinase-1, 조직 배양,
세포 배양

배양된 사람 추간반 세포에서 Matrix Metalloproteinase-3의 생성과 추간반 퇴행성 변화의 관계

<지도 윤 도 흠 부교수>

연세대학교 대학원

의과학과

김 궁 년

I. 서 론

요통은 인간이 가진 통증 중에서 가장 빈도가 높으며, 원인 또한 다양하여
염좌, 퇴행성 척추증, 척추 불안정증, 추간반 탈출증, 골다공증등 다양한 원
인으로 발생한다. 그러나 요통의 정확한 발생 기전에 대해서는 확실히 밝혀
져 있지 않다. 외상이외의 요통의 발생원인으로 척추의 퇴행성 변화가 주원
인으로 알려져 있으며^{1,2,3,4} 척추 퇴행성 변화의 시작은 추간반의 퇴행에서
시작된다. 추간반의 퇴행성 변화는 10대 후반에 시작된다고 증명된바 있듯
이⁵ 자연적 노화 현상이다. 이러한 노화에 따른 자연적인 추간반의 퇴화현상
을 병적인 것으로 볼 것인가에 대해서는 논란의 여지가 있다. 자기공명영상
이 척추 질환의 진단에 보편적인 방법으로 이용되면서 추간반의 퇴행성 변
화가 나이의 증가에 따른 변화임이 보다 분명해 졌다. 그러나 한편으로 요
통이 있는 환자에서 특정한 추간반만이 퇴행성 변화가 있는 것이 확인됨으

로서 요통의 발생이 추간반의 퇴행성 변화와 관련됨이 밝혀졌고, 추간반 탈출증이 있는 부위의 추간반은 대부분 자기공명영상에서 퇴행성 변화의 지표인 T2 강조영상에서 신호강도가 감소되어 나타난다.^{3,4} 따라서 추간반의 퇴행성 변화는 노화에 따른 자연적 현상이나 이것이 직간접 적으로 요통의 발생에 관여하는 병적인 변화이기도 하다.

추간반의 구성은 수핵과 이것을 감싸고 있는 치밀한 섬유조직인 섬유륜, 그리고 이 구조를 추체와 연결 시켜주는 연골판으로 구성되는데 퇴행성 변화는 세 부분 모두에서 일어난다. 수핵의 퇴행성 변화의 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않은 상태이다. 지금까지의 연구 결과 수핵 기질의 파괴로 주요 구성성분인 물과 proteoglycan의 감소, proteoglycan의 응집력의 저하가 수핵의 퇴행성 변화의 중요 부분으로 밝혀져있다.^{6,7,8} 이러한 변화는 다른 연골 조직의 퇴화 현상에서 관찰되는 결과와 비슷하며 이 과정에는 여러 종류의 단백 분해 효소가 관여한다. 단백 분해 효소 중 matrix metalloproteinase(MMP)는 중성 pH에서 높은 효소능을 가지며 proteoglycan, gelatin, fibrinogen, laminin 등 여러 종류의 세포 외 기질의 분해에 관여한다고 알려져 있다.⁹ 이 중 matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)은 여러 MMP의 전구체를 활성화시키며 넓은 기질 특이도를 가지고 골관절염 연골의 proteoglycan의 분해에 관여한다고 증명된 바 있다.⁹ 추간반은 무혈관 구조로서 다른 체액과도 접하지 않기 때문에 추간반 기질의 분해에 관여하는 효소가 추간반 조직 자체에서 분비될 것으로 추정되어 왔다. 최근 Kang 등^{10,11}과 Liu 등¹²의 연구에 의하면 추간반 배양 조직에서 MMP-3의 전구체와 면역학적으로 일치하는 물질이 분비된다고 증명되었다. 또한 Nemoto 등¹³은 퇴행성 변화를 보이는 추간반의 세포배양 실험에서 MMP-3이 퇴행성 변화가 없는 추간반 조직에 비해 분비가 증가됨을 면역화학적 방법을 이용하여 증명하였다. 그러나 추간반의 퇴행의 정도와

MMP-3의 분비량과의 관계는 논란의 여지가 있어 Nemoto등¹³은 퇴행의 초기에 분비량이 증가된다고 하였고 Kanemoto등¹⁴은 퇴행의 정도가 심할수록 증가된다는 상반된 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 퇴행성 추간반 질환으로 수술을 시행한 환자의 추간반 조직을 이용하여 MMP-3이 추간반의 퇴행의 정도에 따라 어떤 변화를 보이는지를 관찰하고 환자의 임상 양상(추간반 탈출 유형)과 비교하여 임상적 의미가 있는지 확인하였다. MMP-3의 조절 인자로 알려진 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)^{9,14}의 분비량도 함께 측정하여 퇴행의 정도와 관련이 있는지 확인하였다. 또한 조직 배양 뿐 아니라 추간반 세포를 분리 배양하여 MMP-3의 분비에 추간반 세포가 어떤 영향을 미치며 세포의 환경이 변화 시에 이 효소의 분비능이 어떤 차이를 보이는지 알아보았다. 이 연구 결과는 추간반 퇴행성 변화의 생화학적 요인 중 단백 분해 효소의 역할을 명확히 하고 향후 이 효소의 조절 기전을 밝힘으로서 퇴행성 추간반 질환의 치료에 필요한 기초 연구가 될 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

퇴행성 요추간반 탈출증이 있어 추간반 제거술 또는 후방 추체간 융합술을 시행한 환자 36명을 대상으로 하였다. 전방전위증, 척추분리증 등 불안정증이 주요 소견인 환자는 제외하였다. 이들 환자의 자기공명영상에서 추간반의 퇴행의 정도를 Thompson의 분류¹⁵에 따라 분류하였다(그림1). 추간반이 탈출된 양상을 수술 소견에 따라 돌출형(protrusion), 방출형(extrusion), 분리형(sequestration)으로 분류하였다¹⁶.

2. 조직 채취, 조직 배양 및 세포 배양

수술실에서 수술 소견 상 추간반의 탈출 유형을 확인 후 추간반 조직을 얻어 실험실로 보냈다. 추간반 조직을 얻을 때 가능한 한 조각으로 얻고 수핵 부분만을 분리해서 얻었다. 얻어진 조직은 즉시 실험실로 보낸 후 두 부분으로 분리하여 조직 배양과 세포배양을 시행하였다. 조직 배양은 추간반 조직을 5 x5 x5 mm 크기로 절제하여 세 조각을 24-well cluster plate(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.)에 넣고 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Nissui, Tokyo, Japan)에서 48시간동안 배양한 후에 배지를 영하 20도에서 동결시켰고, 조직은 면역학적 염색을 위해 10% formalin에 24시간 고정 후 paraffin block으로 만들었다.

추간반 퇴행도	수핵부
1	전체적으로 균등한 고신호 강도와 섬유륜부와 명확한 경계가 있음
2	수핵의 검은 줄이 수핵부 중심에서 섬유륜부 까지 나타남
3	신호강도가 감소하여 갈색으로 변하며 수핵부 내에 얼룩모양이 생김
4	갈색부분이 감소하고 검은색 부분이 증가
5	추간반의 높이가 줄어들고 전반적으로 검은색으로 변함

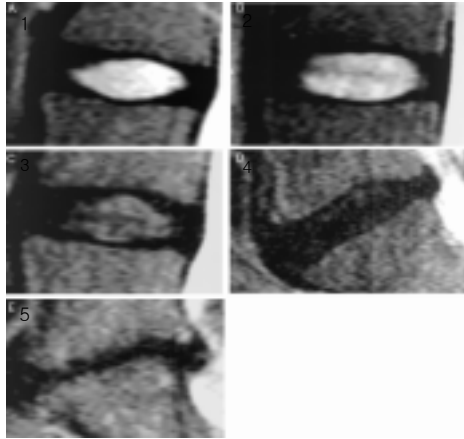


그림 1. Thompson의 분류에 따른 추간반 퇴행의 정도(수핵부).

한 부분은 세포 배양을 위해 조직을 잘게 부순 후 hyaluronidase(10mg/20ml in RPMI, Sigma, St. Louis, MD, USA)를 실온에서 3분간, trypsin(20mg/10ml in RPMI Sigma, St. Louis, MD, USA)을 37도에서 30분간, collagenase(20mg/10ml in RPMI Sigma, St. Louis, MD, USA)를 37도에서 1시간 15분간 순서대로 처리한 후 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Nissui, Tokyo, Japan)배지로 세척하고 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 일차 배양하였다. 배양 후 3일 또는 4일째 세포에 수가 충분해지면 hemocytometer를 이용하여 일정한 수(5×10^4 /ml)의 세포를 분리하여 DMEM 배지에 이차 배양하였다. 48시간 동안 배양한 후에 배양 배지는 영하 20도에서 동결하였고 세포는 면역화학 염색을 시행하였다. 배양 온도는 섭씨 37도를 유지하며 5% CO₂와 air를 공급하였다. 일차 배양 후 배양된 세포가 수핵 세포임을 확인하기 위해 세포의 일부분을 제2형 교원질에 대한 단클론 항체를 이용한 면역 염색을 하여 양성 반응이 보인 것을 확인하였다.

3. 면역학적 분석 및 조직화학적 검사

가. 배양 배지의 면역학적 분석

배지 내의 MMP-3과 TIMP-1의 농도를 효소결합면역흡착검사 방법을 이용하여 구하였다.¹⁷ 배지를 단클론 항체가 부착된 polystyrene bead에서 실온으로 60분간 배양하였다. polystyrene bead를 Na-phosphate buffer로 3회 희석한 후 다시 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine과 hydrogen peroxide에서 30분간 배양하였다. 반응이 멈춘 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 MMP-3과 TIMP-1의 농도를 산출하였다.

나. 면역조직화학적 검사

조직 배양 후 배지를 제거한 조직을 실온에서 1 μ M monensin으로 처리한 후 섭씨 4도에서 periodate-lysine-paraformaldehyde로 24시간 동안 고정한 다음 파라핀에 포맷시켰다. 이 조직 표본을 50 μ m 두께로 절편을 만들었다. 임의로 5개의 절편을 정하여 MMP-3 단클론 항체와 TIMP-1 단클론 항체를 일차항체로 이용하여 avidin-biotin-complex 방법으로 면역염색을 시행하였고 hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 광학 현미경을 이용하여 표본의 5군데를 무작위로 설정하여 150배율에서 양성 세포의 비율을 구했다. 표본은 양성 세포의 비율에 따라 점수화 하였다(<25%:1, 25-50%:2, 50-75%:3, >75% 4점). 세포 배양을 한 표본도 배지를 제거하고 세포를 분리하여 같은 방법으로 면역조직화학적 검사를 시행하였다.

4. 자료 분석 및 통계처리

가. 방사선과 전문의 2명이 Thompson의 분류에 따라 대상 환자 추간반 조직의 퇴행의 정도에 따라 등급별로 분류하였다.

나. 조직 배양과 세포배양에서 얻은 배지에서 퇴행의 정도에 따른 그룹간의 MMP-3, TIMP-1의 농도에 차이가 있는지 확인하였다.

다. 추간반 조직과 세포 배양에서 얻은 세포로 면역화학적 염색을 시행하여 MMP-3, TIMP-1 양성 세포 비율을 구하여 각 그룹간에 차이가 있는지 확인하였다.

라. 수술 소견(추간반 탈출의 유형)에 따라 MMP-3의 농도 및 면역화학적 검사상의 양성 세포 비율에 차이가 있는지 확인하였다.

마. 통계학적 분석은 one-way ANOVA 이용하여 분석하였다. 검정 시 유의수준은 p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 환자군의 특성

퇴행성 요추간반 질환으로 수술을 시행한 36명의 환자 중 추간반 탈출증은 28례였으며 퇴행성 척추증은 8례였다. 환자의 연령은 21세부터 74세까지였으며 평균 연령은 46.5세였다(표1).

Thompson의 분류에 의해 추간반의 퇴행의 정도에 따른 분류에 의하면 Grade 2가 6례, Grade 3이 11례, Grade 4가 11례, Grade 5가 8례였다(표1). 추간반 탈출증 환자 28례 중 돌출형이 12례, 방출형이 12례, 분리형이 4례이었다.

표 1. 실험 환자군의 특성

Thompson's grade	환자 수	나이	남녀 비(남:여)
Grade 2	6	36.4	2:4
Grade 3	11	45.3	4:7
Grade 4	11	47.1	3:8
Grade 5	8	50.3	5:3
Total	36	46.5	14:22

2. 추간반 퇴행 정도에 따른 MMP-3 농도와 양성 세포비율의 차이 (조직 배양)

조직 배양에서 MMP-3의 평균 농도는 퇴행도 Grade 2인 군에서 0.31 ± 0.1 , Grade 3은 0.62 ± 0.23 , Grade 4는 0.80 ± 0.13 , Grade 5는 $0.39 \pm 0.20 \mu\text{g/ml/mg}$ 이었다. MMP-3의 농도는 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 증가하다가 퇴행의 정도가 가장 심한 군에서는 감소하는 양상을 보였다(그림 2). MMP-3의 양성 세포 비율은 Grade 2인 군에서 1.85 ± 0.12 , Grade 3은 3.20 ± 0.18 , Grade 4는 3.72 ± 0.20 , Grade 5는 2.10 ± 0.11 점이었다. 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 증가하다가 퇴행의 정도가 가장 심한 군에서는 감소하는 양상을 보였다(그림 3-a).

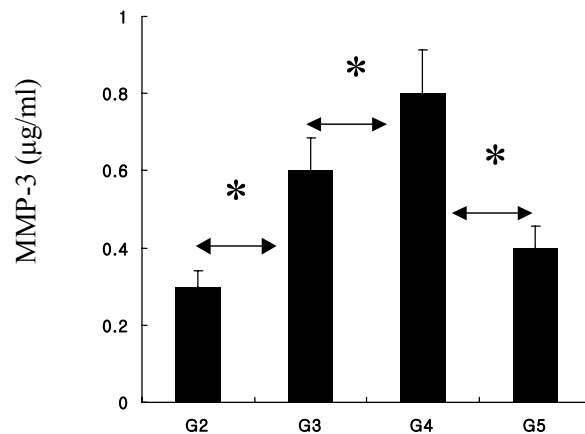


그림 2. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 농도의 차이. MMP-3의 농도는 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 증가하다가 퇴행의 정도가 가장 심한 군에서는 감소하는 양상을 보였다.(* $p < 0.05$, G: Thompson's grade)

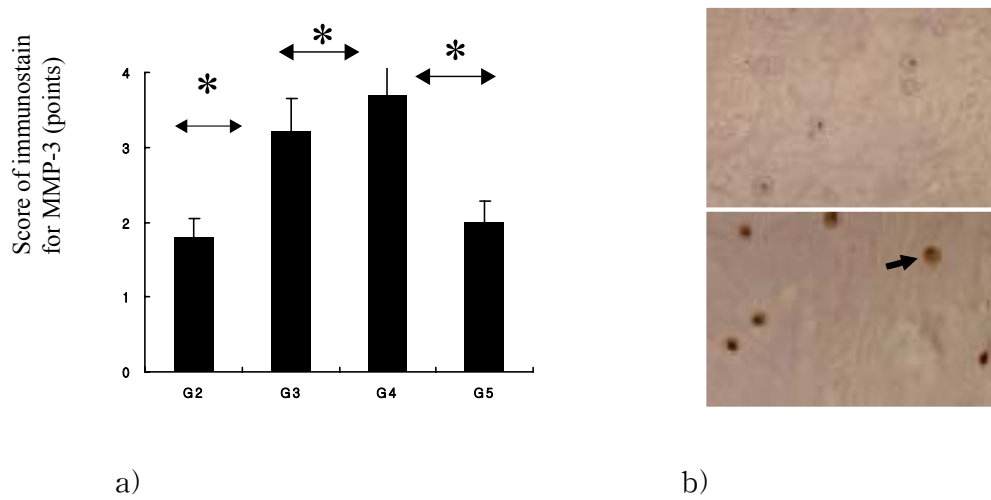


그림 3-a). 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 양성 세포의 비율. MMP-3 양성 세포의 비율은 퇴행의 정도가 증가할 수록 통계학적으로 유의하게 증가하다가 퇴행의 정도가 가장 심한 군에서는 감소하는 양상을 보였다. (* $p < 0.05$ G: Thompson's grade)

3-b) 조직의 면역화학적 검사 소견. MMP-3 단클론 항체에 대한 양성 세포(arrow, light microscope 150X)

3. 추간반 퇴행 정도에 따른 MMP-3 농도와 MMP-3 양성 세포비율의 차이 (세포 배양)

세포 배양 배지에서 MMP-3의 평균 농도는 Grade 2에서 0.81 ± 0.12 , Grade 3에서 0.52 ± 0.14 , Grade 4에서 0.30 ± 0.09 , Grade 5에서 $0.19 \pm 0.10 \mu\text{g/ml/mg}$ 이었다. 양성 세포의 비율은 Grade 2에서 2.50 ± 0.23 Grade 3에서 1.22 ± 0.11 , Grade 4에서 1.02 ± 0.10 Grade 5에서 0.52 ± 0.13 점이었다. 퇴행의 정도가 증가할 수록 평균 농도와 양성세포 비율은 유의하게 감소하는 양상을 보였다 (그림 4, 5-a).

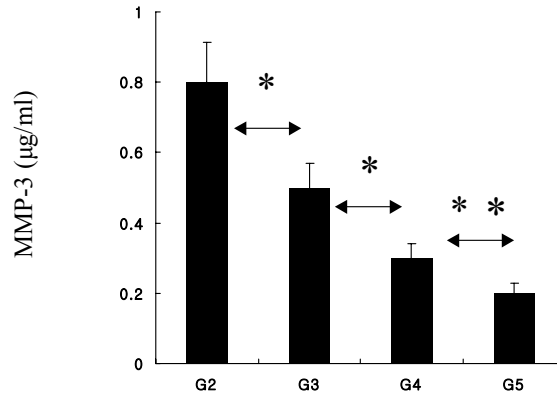


그림 4. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 농도의 차이. MMP-3의 농도는 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 감소하였다. (* $p < 0.05$, ** $p > 0.05$, G: Thompson's grade)

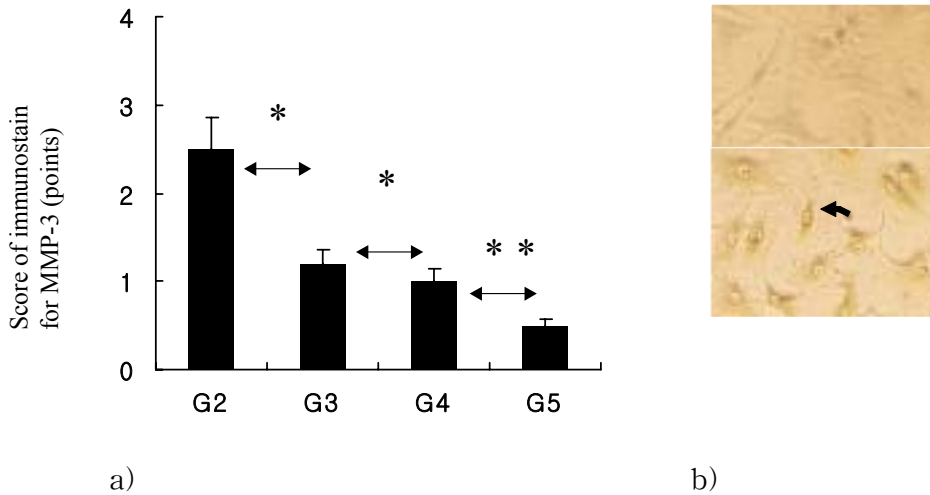


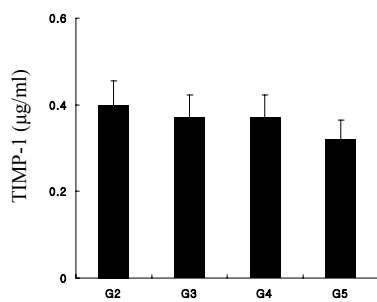
그림 5-a). 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 MMP-3 양성 세포의 비율. MMP-3 양성 세포의 비율은 퇴행의 정도가 증가할수록 통계학적으로 유의하게 감소하는 양상을 보였다. (* $p < 0.05$, ** $p > 0.05$, G: Thompson's grade)

5-b) 배양 세포의 면역화학적 검사 소견. MMP-3 단클론 항체에 대한

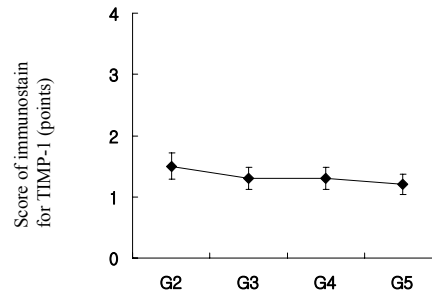
양성세포(arrow, light microscope 150X)

4. 추간반 퇴행 정도에 따른 TIMP-1 농도와 양성 세포비율의 차이 (조직 배양)

조직 배양 결과 Grade 2에서 0.40 ± 0.05 , Grade 3에서 0.37 ± 0.03 , Grade 4에서 0.37 ± 0.02 , Grade 5에서 $0.32 \pm 0.02 \mu\text{g/ml/mg}$ 이었다. 양성 세포 비율은 Grade 2에서 1.5 ± 0.1 Grade 3에서 1.3 ± 0.15 , Grade 4에서 1.3 ± 0.1 , Grade 5에서 1.2 ± 0.1 점이었다. 퇴행의 정도가 증가할수록 TIMP-1의 농도와 양성 세포 비율은 약간 감소하는 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(그림 6-a, 6-b).



a)



b)

그림 6-a. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 농도 차이.($p > 0.05$, G: Thompson's grade)

그림 6-b. 조직 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 양성 세포의 비율.($p > 0.05$, G: Thompson's grade)

퇴행의 정도가 증가할수록 TIMP-1의 농도와 양성 세포 비율은 약간 감소하는 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

5. 추간반 퇴행 정도에 따른 TIMP-1 농도와 양성 세포비율의 차이 (세포 배양)

세포 배양 결과 Grade 2에서 0.24 ± 0.04 , Grade 3에서 0.25 ± 0.03 , Grade 4에서 0.27 ± 0.03 , Grade 5에서 $0.27 \pm 0.02 \mu\text{g/ml/mg}$ 이었다. 양성 세포 비율은 Grade 2에서 1.2 ± 0.15 Grade 3에서 1.3 ± 0.15 , Grade 4에서 1.4 ± 0.1 , Grade 5에서 1.4 ± 0.1 점이었다. 퇴행의 정도가 증가할수록 TIMP-1의 농도와 양성 세포 비율은 약간 증가하는 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(그림 7-a, 7-b).

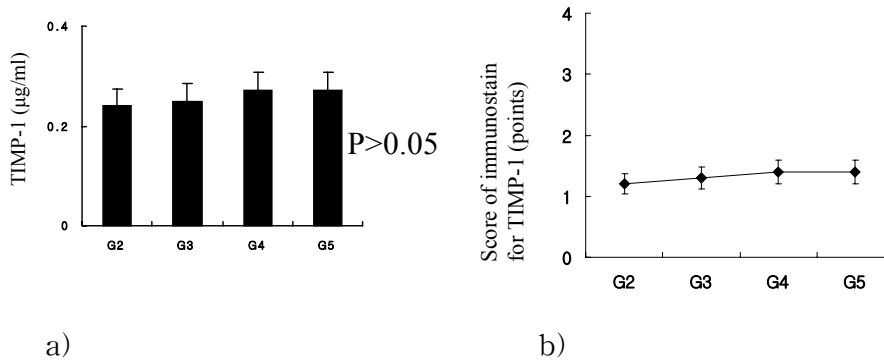


그림 7-a. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 농도 차이. ($p > 0.05$, G: Thompson's grade)

7-b. 세포 배양 배지에서 추간반의 퇴행의 정도에 따른 TIMP-1 양성 세포의 비율. ($p > 0.05$, G: Thompson's grade)

MRI 상 퇴행의 정도가 증가할수록 TIMP-1의 농도와 양성 세포 비율은 약간 증가하는 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

6. 추간반 탈출 유형에 따른 MMP-3 농도와 양성 세포비율의 차이

추간반 탈출 유형과 MMP-3 농도 및 양성 세포 비율을 조사한 결과 돌출형(protrusion type)은 $0.35 \pm 0.12 \mu\text{g/ml/mg}$, 1.3 \pm 0.2점이었고 방출형(extrusion type)은 $0.36 \pm 0.10 \mu\text{g/ml/mg}$, 1.3 \pm 0.15점이었고 분리형(sequestration type)은 $0.40 \pm 0.12 \mu\text{g/ml/mg}$, 1.5 \pm 0.2점이었다. 분리형의 경우 약간 증가한 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(그림 8-a, 8-b).

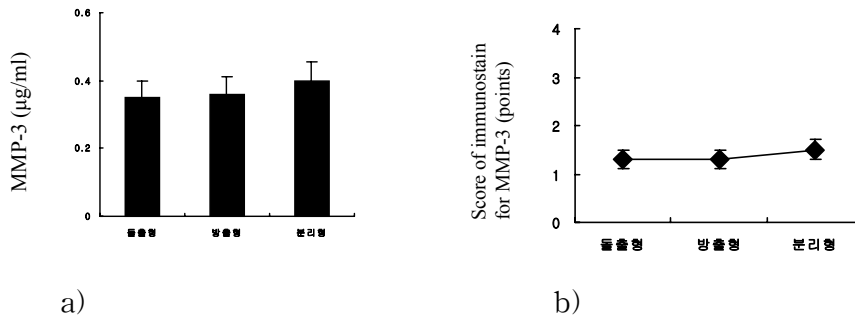


그림 8-a. 추간반 탈출 형태와 MMP-3 분비량.($p > 0.05$)

8-b. 추간반 탈출 정도와 MMP-3 양성 세포 비율.($p > 0.05$)

분리형에서 MMP-3의 농도와 양성세포 비율이 약간 증가한 소견을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

IV. 고 찰

과거 추간반의 퇴행성 변화는 생체 역학적 관점에서 주로 이루어져왔다. 그러나 최근의 연구에서는 생체 역학적인 요소와 함께 생화학적 요소의 중요성이 대두되고 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. Kang 등^{10,11}은 추간반 조직에서 다양한 생화학적 물질들이 생성됨을 확인하였고 Liu 등¹²은 추간반 세포의 배양에서 MMP-3이 유리됨을 관찰하였다. 따라서 이런 생화학적 요소에 관계되는 단백 분해 효소의 역할이 추간반의 퇴행성 변화에 어떤 역할을 할 것인가가 중요한 연구과제로 대두되었다. 또한 추간반의 퇴행성 변화는 연골을 포함한 관절의 퇴행성 변화와 유사한 점을 가지고 있어 관절의 퇴행성 변화에 관계되는 단백 분해 효소가 중요 관심사가 되었다. 본 연구도 관절의 기질 분해에 중요역할을 한다고 알려진 MMP가 추간반의 퇴행성 변화와 어떤 관련이 있는지 알아 본 연구이다. 여러 종류의 MMP들 중에서 MMP-3은 여러 MMP의 전구체를 활성화시키며 넓은 기질 특이도를 가지고 골 관절염 연골의 proteoglycan의 분해에 관여한다고 증명된 바 있다.³ MMP-3과 추간반의 퇴행성 변화와 관련된 연구에서 퇴행성 변화가 있는 추간반 조직과 정상 추간반 조직을 비교했을 때 퇴행성 변화가 있는 추간반 조직에서 MMP-3의 분비가 증가한다는 보고가 있었다.¹³ 또한 면역화학적 방법을 이용한 실험에서 추간반의 퇴행의 정도와 MMP-3 양성 세포를 비교할 때 퇴행의 정도가 증가할수록 MMP-3 양성 세포의 비율이 증가한다는 보고도 있었다.¹⁴ 그러나 다른 실험에서는 퇴행의 초기 단계에서만 이 효소가 증가한다고 보고되기도 하였다.¹³ 본 연구에서는 수술 시에 얻은 추간반 조직에서 추간반의 퇴행의 정도가 증가할수록 MMP-3의 분비량도 증가하고 면역화학적 염색 상 MMP-3 양성 세포의 비율도 증가하였다. 이

것은 추간반의 퇴행성 변화와 MMP-3의 분비량과는 밀접한 관계가 있음을 시사한 결과로 판단된다. 본 연구에서 퇴행의 정도가 아주 심한 경우 (Thomson grade 5)는 오히려 MMP-3의 분비량도 감소하고 양성 세포의 비율도 줄어들었는데 이는 퇴행의 정도가 심해지면 추간반 세포 자체의 수도 감소하고 효소의 분비능도 저하된 결과로 판단되나 이의 증명을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다. 또한 그간의 연구 결과는 추간반 조직을 배양한 실험으로서 추간반의 구성 성분인 수핵부와 섬유륜부를 모두 포함 될 수 있어 서로 구성 세포에서 차이가 있는 두 조직을 이용하였기에 결과 해석에 차이가 있을 수 있다. 수핵부만 분리했다해도 퇴행성 변화가 진행되면 수핵부와 섬유륜부와의 경계가 모호해지며 상처 조직이나 신생 혈관의 침윤을 배제할 수가 없다. 따라서 본 연구에서는 수핵부만을 이용한 조직 배양과 수핵 세포만을 배양한 세포 배양을 비교하여 결과를 비교해 봄으로써 MMP-3과 추간반의 퇴행도와와의 관계를 더욱 분명히 하고 MMP-3 분비에서 추간반 세포의 역할을 규명하고자 하였다. 세포 배양의 결과는 오히려 퇴행도가 심할수록 MMP-3의 분비가 감소하는 결과를 확인 할 수 있었으며 이는 조직 배양의 결과와는 상반된 결과이다. 이 결과는 두 가지로 해석할 수 있다. 하나는 추간반의 MMP-3의 분비가 수핵 세포 자체의 분비 증가에 기인했기보다는 추간반의 퇴행성 변화와 이로 인해 야기된 상처 조직의 형성 및 신생 혈관의 형성이 일어나고 이들의 구성 성분이 되는 섬유모세포에서 분비된 것일 수 있다. 또 하나의 해석은 조직 배양은 수술 후 즉시 실험실에서 배양을 시작했으므로 생체 내에서의 상태를 반영할 수 있으나 세포 배양의 경우는 생체와는 다른 환경에서 수핵 세포가 배양되었기 때문일 것으로 추측할 수 있다. 즉 수핵 세포에서 MMP-3의 분비능은 세포가 처한 환경적 요인과 밀접한 관계가 있다는 것이다. 추간반 조직의 면역화학적 염색에서 양성 세포율을 구할 때 퇴행도가 증가할수록 수핵 세포(연

골양세포)에서 양성세포의 비율이 높게 나타난 점을 고려할 때 후자의 해석이 타당할 것으로 생각된다. 또한 생체 내에서 추간반의 퇴행성 변화를 일으킬 때 수핵 세포 주위의 환경이 세포의 생존 환경을 악화시키고 이때 단백질 분해 효소의 분비가 증가한다는 연구 결과가 있으며⁷ 추간반 조직에 압력을 가한 경우 MMP-3의 분비가 증가한다는¹⁸ 결과에 비추어 보더라도 후자의 해석이 타당할 것으로 판단된다. 세포 배양 시에 생체와 비슷한 환경 즉 세포의 생존 환경을 악화시킨 상황에서 MMP-3의 분비량을 측정한다면 보다 명확한 결론을 얻을 수 있을 것이며 이 후의 연구 과제가 될 것이다. MMP-3의 억제 인자로 알려진 TIMP-1은 29.5 kDa의 sialoglycoprotein으로 활성화된 MMP-3과 결합하여 불활성화 시키는 기능을 한다⁷. 퇴행성 추간반 질환에서 TIMP-1에 대한 연구는 퇴행성 추간반 조직에서 TIMP-1의 발현율이 증가되고 정상 조직에서는 TIMP-1의 발현이 없거나 미약하다는 보고가 있었다.¹⁴ 퇴행성 추간반 질환에서는 MMP-3과 TIMP-1의 불균형이 퇴행성 변화를 유발 또는 촉진되는 것이 아닌가 추측되어졌다.¹⁴ 본 연구에서는 조직 배양에서 TIMP-1의 발현이 많이 나타났으나 퇴행의 정도와는 유의한 차이가 없었다. MMP-3과 추간반 탈출 유형에 대한 연구는 추간반 탈출의 정도가 심할수록 MMP-3의 분비가 증가한다는 보고가 있었으나¹⁴ 본 연구에서는 분리형의 경우 약간 증가된 소견을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 이런 차이를 보인 것은 아마도 과거의 연구는 추간반이 탈출된 조직을 이용하였고 본 연구에서는 탈출된 부분이 아니라 추간반의 내부 수핵부를 이용하였기 때문에 나타난 차이로 판단된다. 추간반이 탈출된 부위는 주위에 염증성 변화를 동반하고 이때 주위에 모여든 대식세포에서도 MMP-3이 분비된 결과로 추측된다. 또한 대식세포에서 분비된 MMP-3은 탈출된 추간반 조직의 분해에도 일부 관여해서 탈출된 추간반의 재흡수 현상의 한 원인으로 설명될 수도 있다.

추간반의 퇴행성 변화의 생화학적 기전은 아직 명확히 밝혀져있지 않은 상태이다. 그러나 본 연구에서 다루어진 단백 분해 효소가 이 생화학적 기전에 밀접히 관계된다는 사실은 명확해졌다. 향후 MMP-3 만이 아니라 다른 종류의 MMP가 어떤 역할을 하는지는 더 연구가 필요하며 그 조절기전과 생역학적인 측면까지 고려한다면 퇴행성 추간반 질환의 새로운 치료법 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

IV 결 론

퇴행성 요추간반 질환 환자의 수술 시 얻은 추간반 조직으로 조직 배양과 세포 배양을 시행하여 추간반 퇴행의 정도와 MMP-3, TIMP-1의 농도 및 면역화학 검사상의 양성 세포 비율을 비교, 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 조직 배양 결과 추간반의 퇴행 정도가 증가할수록 MMP-3의 농도와 양성세포 비율은 증가 하다가 퇴행의 정도가 아주 심해지면 다시 감소하였다.
2. 세포 배양 결과 추간반의 퇴행 정도가 증가할수록 MMP-3의 농도와 양성세포 비율은 감소하였다.
3. 조직 배양과 세포배양 결과 퇴행의 정도와 TIMP-1의 농도와 양성세포 비율은 유의한 차이를 보이지 않았다.
4. 추간반 탈출 유형과 MMP-3 농도와 양성 세포비율은 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과를 분석하면 조직 배양 결과 추간반의 퇴행의 정도와 MMP-3의 분비량과는 밀접한 관계가 있으며 MMP-3은 추간반의 퇴행성 변화의 초기 또는 중기에 관여할 것으로 판단된다. 세포 배양의 결과 퇴행의 정도가 증가할수록 MMP-3의 분비량이 감소한 것은 추간반 세포의 MMP-3 분비는 세포의 환경과 밀접한 관계가 있으며 향후 MMP-3 분비의 조절 인자에 대해서는 연구가 필요할 것이다. TIMP-1과 퇴행의 정도와는 무관하며 추간반의 탈출 유형과 MMP-3의 분비량과도 무관하다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Davidson EA, Woodhall B. Biochemical alterations in herniated intervertebral discs. *J Biol Chem* 1959;234:2951-54.
2. Helinovaara M. Occupations and risk of herniated lumbar intervertebral disc or sciatica leading to hospitalization. *J Chronic Dis* 1987;3:259-64.
3. Holm S, Urban J. The intervertebral disc; Factors contributing to its nutrition and matrix turn over. In: Helminen HJ, editor. *Joint Loading*. Bristol: Wright; 1980. p. 187-226.
4. Kelsey JL, Githens PB, O'Connor T. Acute prolapsed lumbar intervertebral disc: An epidemiologic study with special reference to driving automobiles and cigarette smoking. *Spine* 1984;9:608-13.
5. Nerlich A, Schleicher E, Boos N. Immunohistologic marker for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 1997;22:2781-95.
6. Lyons G, Jones E, Quinn FE. Changes in the protein-polysaccharide fractions of nucleus pulposus from human intervertebral disc with age and disc herniation. *J Lab Clin Med* 1966;68:930-39.
7. Pearce RH, Grimmer BS. Degeneration and the chemical composition of the human intervertebral disc. *Proc Orthop Res Soc* 1986;32:211.

8. Stevens R, Ryvar R, Robertson W, O'Brien J, Beard H. Biological changes in the annulus fibrosus in patients with low-back pain. *Spine* 1982;7:223-33.
9. Goupille P, Jayson M, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine* 1998;23:1612-26.
10. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF III, Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1995;20:2373-78.
11. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF III, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1996;21:271-77.
12. Liu J, Roughly PJ, Mort JS. Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degradation. *J Orthop Res* 1991;9:568-75.
13. Nemoto O, Yamagishi M, Yamada H, Kikuchi T, Takaishi H. Matrix metalloproteinase-3 production by human degenerated intervertebral disc. *Spine* 1997;6:493-98.
14. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human

- intervertebral discs. *Spine* 1996;21:1-8.
15. Eyre D, Benya P, Buckwalter J, Frymoyer JW, Gordon SL. Part B. Basic science perspectives. In: *New Perspectives in Low Back Pain*. Park Ridge, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons, 1989:147-207.
 16. Ohshima H, Hirano N, Osada R, Matsui H, Tsuji H. Morphologic variation of lumbar posterior longitudinal ligament and the modality of disc herniation. *Spine* 1993;18:2408-11.
 17. Obata K, Iwata K, Okada Y, Kohrin Y, Ohuchi E, Yoshida S. A one step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 3(stromelysin-1) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1992;211:59-72.
 18. Handa T, Ishihara H, Ohshima H, Osada R, Tsuiji H, Obata K. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 1997;27:1085-91

Abstract

Degenerative change of intervertebral disc and production of matrix metalloproteinase-3 in cultured human disc cell

Keung-Nyun Kim

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Do Heum Yoon)

The pathophysiology of intervertebral disc degeneration is complex and not yet fully understood. It was believed that degeneration of intervertebral disc is resulted not only from biomechanical factors but also from biochemical factors. Recently, the role of proteinase which causes in disc degeneration is been investigated. It is established that various proteinases involve in matrix degradation of intervertebral disc. Matrix metalloproteinase(MMP) is one of proteinases which cause in the degradation of matrix and collagen. It was confirmed from various studies that MMP was formed in intervertebral disc. Among of them, matrix metalloproteinase-3(MMP-3) is known to be capable of degrading many components of extracellular matrix. However the relationship between intervertebral disc degeneration and the MMP-3 production from disc cell is not clearly defined, and the controlling mechanism of MMP-3 production is not yet clearly revealed. To determine the relationship between intervertebral disc degeneration and MMP-3 production from disc cell, human disc tissues and cells obtained during the operation of degenerative disc disease were cultured. The levels of MMP-3 and

TIMP-1(antagonist of MMP-3) released in the medium were measured with the use of an enzyme immunoassay. Immunohistologic staining was also performed in tissue and cell culture specimen. The degree of disc degeneration was classified 5 grades according to Thompson's classification. The levels of MMP-3, TIMP-1 and their positive cell ratio on immunohistochemical study were compared between each grade. The relationship between three types of disc herniation and MMP-3 production was also investigated. As a results, the level of immunoreactive MMP-3 and the immunoreactive cell ratio were increased as degeneration advanced, but were decreased in severely degenerated disc (grade 5 by Thompson's classification) on the tissue culture system. But on the cell culture system, the level of immunoreactive MMP-3 and immunoreactive cell ratio were decreased as degeneration advanced. The level of immunoreactive TIMP-1 and immunoreactive cell ratio were not different significantly on both culture systems. There is no significant difference between the types of disc herniation and MMP-3 production.

In conclusion, the degree of disc degeneration is significantly correlated with the MMP-3 production in disc tissue and MMP-3 may involve in initial or intermediate phase of disc degeneration. The result of this study suggest that the production of MMP-3 in disc cell may be affected by cellular environment. Further study is recommended for clarifying the regulation of MMP-3 production in disc cell. The relationship between the production of TIMP-1 and the degree of disc degeneration is not clear.

Key Words: intervertebral disc, degeneration, matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, tissue culture, cell culture