BMP-2에 대한 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응

연세대학교 대학원

의 학 과

한 경 진

BMP-2에 대한 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응

지도교수 한 수 봉

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002 년 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
한 경 진

한경진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2002 년 월 일

감사의 글

실험과 논문의 완성까지 많은 시간이 지나갔지만 항상 너그럽게 지켜보아 주시고 격려해 주시고 아낌없는 지도 편달을 해주신 한수봉 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 연구 기간 중 많은 도움과 격려를 베풀어 주신 강응식 교수님, 정기양 교수님께도 깊은 사의를 표합니다. 특히 실질적으로 실험과 자료 정리에 많은 도움을 준 문성환 교수에게 진심으로 고마움을 표하고자 합니다. 또한 아주대학교 정형외과학교실의 강신영 교수님, 김병석 교수님, 민병현 교수님, 원예연 교수님, 전창훈 교수님과 교실 비서인 류미선 양에게도 깊은 감사를 드립니다.

오늘의 제가 있기까지 항상 아낌없는 도움과 조언을 해주신 어머니, 장인, 장모님 그리고 늘 옆에서 함께 한 아내와 사랑스러운 저희 딸(유빈)과 함께 이 기쁨을 같이 하고 싶습니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례 ---------- 1

국문요약 ---------- 3

I. 서 론 ---------- 5

II. 재료 및 방법 ---------- 7

1. 추간판 세포 배양 ---------- 7

2. 추간판 세포 삼차원 배양 ---------- 7

3. 인간 재조합 BMP-2 (rhBMP-2) 생산 ---------- 8

4. 당단백 생성 측정 ---------- 8

5. aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질, osteocalcin mRNA 발현 검사 ---------- 8

6. 실험군 ---------- 9

7. 통계 ---------- 9

III. 결 과 ---------- 10

1. rhBMP-2에 의한 추간판 세포의 당단백 생성 ---------- 10

2. rhBMP-2에 의한 추간판 세포의 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질, osteocalcin mRNA 발현 ---------- 10

3. rhBMP-2에 의한 추간판 세포의 배양기간에 따른 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질, osteocalcin mRNA 발현 ---------- 10

IV. 고 찰 ---------- 11

V. 결 론 ---------- 13

참고문헌 ---------- 14

영문요약 ---------- 19

그림 차례

그림 1. Dose response curve of rhBMP-2 on newly synthesized proteoglycan, measured by incorpoaration S^{35}. rhBMP-2 with a dose of 1500ng/ml showed 250% increase of newly synthesized proteoglycan compared to control. ---------- 21

그림 2. Dose response of rhBMP-2 on mRNA expression of aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin. Aggrecan, collagen type I, collagen type II mRNA expression was dose dependent to concentration of rhBMP-2. Osteocalin mRNA expression was not upregulated compared to control in given dose of rhBMP-2. ---------- 22

그림 3. Densitometric analysis of dose response of rhBMP-2 on mRNA expression of aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin. Aggrecan, collagen type I, collagen type II mRNA expression was dose dependent to concentration of rhBMP-2. Osteocalin mRNA expression was not upregulated compared to control in given dose of rhBMP-2. ---------- 23

그림 4. Aggrecan, collagen type I, and collagen type II mRNA expression on culture duration. Decrease in mRNA expression of collagen type I and collagen type II was observed with increase in culture duration. Aggrecan mRNA was maintained throughout given culture period. 24

표 차례

표 1. cDNA primer sequence, product size, and annealing temperature of β-actin, aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin. 25

국문 요약

BMP-2에 대한 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응

성장 인자 및 유전자 전달체로서 바이러스가 소개되면서 추간판 조직의 기질 생성을 자극하기 위한 치료적 유전자 전달이 가능해졌다. BMP-2는 관절 연골 혹은 성장판 연골에서 연골 분화, 표현형 유지의 중요한 인자로 알려져 있으며 주로 골유합 내지는 척추 유합을 유도하는 성장 인자로 실험 및 임상에서 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 BMP-2를 제조하고 제조된 BMP-2를 인간의 추간판 세포에 투여함으로서 BMP-2에 의한 인간 추간판 세포의 생물학적 기질 생성 특히 연골성 기질 생성 반응을 알아보았다.

추간판 술식을 시행한 6명의 환자에서 수술중 추간판 수핵부 조직을 채취하여 고형화된 alginate gel-세포 방울 내에서 삼차원적으로 배양하고 진핵 세포 유전자 발현 plasmid DNA인 pcDNA3.1/hygro vector를 이용하여 인간 BMP-2A의 유전자를 재조합한 후 여러 농도의 rhBMP-2를 추간판 세포에 투여하고 새로 생성된 당단백을 측정하였을 때 대조군의 당단백 생성에 비해 50ng/ml부터 의미 있는 당단백 생성 증가가 관찰되며, 300ng/ml 농도에서는 50%, 1000ng/ml 농도에서는 100%, 1500ng/ml 농도에서는 250%의 당단백 생성 증가가 관찰되었다.

Aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질 mRNA 발현을 RT-PCR 산물의 densitometry로 분석하면 rhBMP-2의 농도에 비례해서 각 유전자의 mRNA 발현은 증가하였다. 제 I형 교원질 mRNA는 rhBMP-2 100ng/ml 농도의 경우 대조군에 비해 70%의 발현 증가가 있었고 제 2형 교원질 mRNA의 경우는 같은 농도의 rhBMP-2에서 50%의 발현 증가가 있었다. 특히 aggrecan mRNA는 대조군에 비해 rhBMP-2 1500ng/ml의 농도에서는 400%의 발현 증가가 있었다. 이에 반해서 osteocalcin mRNA의 발현은 rhBMP-2의 농도에 관계없이 대조군과 비교해 차이가 없었다.

여러 농도의 rhBMP-2를 추간판 세포 배양군에 투여하고 3일, 7일, 11일간 배양 후 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질의 발현을 측정하면 초기 3일간은 강하게 발현되나 배양 기간이 경과할수록 발현의 강도는 감소하였다. Aggrecan mRNA는 제 1형 교원질, 제 2형 교원질에 비해 배양 기간이 길어져도 발현을 비교적 높게 유지하였다.

이상의 결과로 미루어 rhBMP-2는 인간의 추간판에서 골형성 보다는 당단백과 추간판 기질 생성을 효과적으로 유도하므로 rhBMP-2를 이용한 치료적 유전자 전달이 인간의 퇴행성 추간판 질환의 치료에 유용한 방법임을 시사한다.

핵심되는 말 : 인간 추간판 세포, BMP-2, 당단백, aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질, osteocalcin

BMP-2에 대한 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응

<지도교수 **한 수 봉**>

연세대학교 대학원 의학과

한 경 진

I. 서 론

퇴행성 추간판 질환의 병인론은 아직 완전히 밝혀진 것은 아니지만 대체적으로는 추간판내 당단백의 점진적 감소에 의한 수분압 감소에 기인한다고 알려져 있다.[1,2,3,4,5] 생물학적으로 중요한 단백질의 유전자의 염기서열이 밝혀지고 이러한 유전자의 조작 및 바이러스 재조합 기술의 발전으로 이제는 체세포로 유전자를 전달하여 생물학적 효과를 기대하는 치료법이 각광을 받고 있다.[6,7,8,9] 유전자 치료는 처음에는 유전적 질환이나 말기 암 등의 치료 방법으로 시도되었으나 최근에는 유전적 질환이나 치사성 질환보다는 오히려 대사성 질환, 퇴행성 질환, 외상성 질환의 치료에 더 활발하게 이용되고 있다.[7,8,10,11,12,13,14,15,16] 유전자 치료는 외부에서 원하는 유전자를 바이러스 등의 매개체를 이용해서 세포내로 전달하여 강제로 지속적으로 유전자를 발현하게 하고 원하는 산물을 내인적으로 생산하게 하여 생물학적 효과를 지속적으로 얻는 치료 개념이다. 유전자 치료의 경우는 한번의 유전자 전달로도 수주에서 수개월 혹은 일년간 유전자 발현을 유지하여 만성 경과를 취하는 질환에 특히 그 강점을 발휘하는 세련된 약물 공급기전이다.

최근 아데노바이러스를 이용한 표식유전자를 정상 동물의 추간판에 전달하여 장기적으로 유전자가 발현됨이 보고되었고[17] 또한 transforming growth factor-ß1 (TGF-ß1)의 유전자를 토끼의 추간판 세포에 전달하여 생체 내에서 치료 유전자의 발현 및 발현된 TGF-ß1에 의해 생체내 추간판에서 기질 생성이 증가됨이 보고되었다.[18] 이와 더불어 배양된 인간의 추간판 세포에서 아데노바이러스를 이용한 표식 유전자 전달에 대한 감수성과[19] 치료적 유전자 전달에 대한 생물학적 반응도 보고되었다.[20] 이러한 유전자 치료의 임상 적용에

있어 전달 유전자의 선택은 우선 결정되어야 할 사항이며 효과적인 치료적 유전자의 전달에 의해서만 유효한 추간판의 기질 생성 반응을 유도할 수 있을 것이다.

추간판 퇴행의 치료목적으로 유전자 전달법을 이용하려면 먼저 가장 효과있는 성장 인자 유전자의 선택이 필수이다. 이제까지 추간판 세포의 기질 생성을 자극할 수 있는 성장 인자들로는 TGF-ß1, Insulin like growth factor-1, Osteogenic protein-1, Fibroblast growth factor, Epidermal growth factor 등이 보고되었으나[21,22,23,24] Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)의 가능성은 자세히 연구되지 않았다. BMP-2는 주로 골유합 내지는 척추 유합을 유도하는 성장 인자로 실험 및 임상에서 사용되고 있으며 그 유용성은 널리 보고되어 있다.[25,26,27,28,29] 그리고 BMP-2는 관절 연골 혹은 성장판 연골에서 연골 분화, 표현형 유지의 중요한 인자로 알려져 있으며[30,31,32] 특히 관절 연골에서 유전자 전달법으로 BMP-2 유전자를 전달하였을 때 증가된 기질 생성 반응이 보고되었다.[33] 이에 반해서 추간판 세포 혹은 조직에서 BMP-2의 효과는 아데노바이러스를 사용하여 BMP-2 유전자를 추간판 세포에 전달하였을 때 증가된 당단백 (proteoglycan) 생성효과를 보고한 것 이외에는[34,35] 자세히 연구되지 않았다. 본 연구의 가정으로는 BMP-2가 비록 골형성 유도 인자이나 관절 연골에서 기질 생산이 증가된 결과로 미루어 추간판 세포와 같이 고도로 분화된 세포에서는 골형성 보다는 본래의 기질 구성 성분인 당단백 제 2형 교원질의 생산을 증가시키리라는 것이다.

그리하여 본 연구의 목적은 BMP-2를 제조하고 제조된 BMP-2를 인간의 추간판 세포에 투여함으로서 BMP-2에 의한 인간 추간판 세포의 기질 생성 특히 연골성 기질 생성 반응 등의 생물학적 반응을 규명하는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 추간판 세포 배양

추간판 술식을 시행한 6명의 환자 (23세-45세)에서 수술중 추간판 수핵부 조직을 채취하고 채취된 추간판 조직은 순차적 효소적 소화법으로 조직에서 분리하였다. 이를 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썰고 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY), 0.2% trypsin 0.1% EDTA (Calbiochem, La Jolla, CA)를 포함한 Hams F-12 medium and Dulbeccos Modified Eagle Medium (F12/DMEM, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 37℃에서 60분간 소화시켰다. F12/DMEM으로 세척 후 상기의 효소 용액에서 clostridial collagenase type II (Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제 2의 효소용액으로 역시 37℃에서 4시간 정도 소화시켰다. 분리된 추간판 세포는 F12/DMEM으로 세척 후 Nylon 여과지 (pore size 75 μm)를 사용하여 부유 조직을 제거하였다. 세포 생존성 검사 및 세포 밀도를 계산한 후 5 x 105 세포/ml의 밀도로 24 well plate (Falcon, Franklin Lakes, NJ)에서 배양한다. 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin (all antibiotics from GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 함유한 F12/DMEM을 사용하고 추간판 세포는 3 주간 37℃ 및 5%의 CO2 하에서 배양하였다.

2. 추간판 세포 3차원 배양

0.15M NaCl용액에 1.2%의 low viscosity alginate gel (Kelco, Chicago, IL)을 상온에서 서서히 녹인 후 Trypsin으로 유리된 추간판 세포를 mililiter당 백만개의 비율로 alginate gel에 균등히 섞는다. 22 gauge 주사바늘을 통해 102mM $CaCl_2$ 용액에 alginate gel 및 세포 혼합물을 방울 방울 떨어뜨려 순간적으로 굳힌다. 고형화된 algiante gel-세포 방울을 $CaCl_2$ 용액에 10분 정도 배양하여 완전한 polymerization을 유도하였다. 0.15M NaCl 용액에 세척한 후 F12/DMEM 배양액에 3번 세척한다. Alginate bead는 24 well culture plate에 10개씩 넣고 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin을 함유한

F12/DMEM을 사용하여 48시간 37℃ 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

3. 인간 재조합 BMP-2 (rhBMP-2) 생산

진핵 세포 유전자 발현 plasmid DNA인 pcDNA3.1/hygro vector를 이용하여 인간 BMP-2A의 유전자를 재조합 한 후, Chinese hamster ovary(CHO-K1)세포에 lipofectamine (Gibco BRL)을 이용하여 재조합 유전자 pcDNA3.1/hygro/BMP-2A를 전이시켰다. 전이된 CHO-K1세포를 hygromycin이 들어 있는 배지로 두달 간 배양하여 완전 전이 세포(CHO-K1/BMP-2A)를 얻는다. 분리한 세포에서 배지로 분비되어 나오는 인간 재조합 BMP-2A를 수집, Heparin sepharose A Chromatography를 통해 동정한 후, YM10 막을 통한 고농축 법으로 농축하여 세포 배양에 사용할 수 있도록 멸균하고 사용 용량에 맞게 나누어서 -70℃에 보관하였다.

4. 당단백 생성 측정

각 실험군 배양에서 기저 상태 및 조작 후 방사선 동위원소 ^{35}S(20μCi/ml)를 포함한 배양액 (serumless medium, Newman-Typell)으로 교체하고 4시간 추가 배양 후 상층액을 분리 보관하고 alginate beads는 Na Citrate를 37℃에서 처리하여 gel을 녹인 후 HCl Guanitidine으로 4℃에서 당단백 분리를 48시간 시행하였다. 방사선 동위원소로 표식되는 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 통과시켜 순차적으로 scintillation mixture (Ultima Gold, Packard, Meriden, CT)를 첨가하여 PD-10 column으로 유출되는 용액을 채취한 후 제 2, 3, 4 용액의 scintillation 활성을 측정하여 새로이 생성된 당단백의 농도를 구하였다.

5. aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin mRNA 발현 검사

Alginate bead 내에서 배양한 추간판 세포를 분리하기 위해, 28mM EDTA / 0.15M NaCl로 chelation을 시킨다. 용액이 들어 있는 상태에서 10분간 반응시킨 후, D-PBS 용액으로 세척 후 총 RNA는 TRIzol reagent (Life Technologies)를 이용하여 분리하였다.

추간판 세포의 총 RNA 1㎍에 Oligo d(T)16 primer 2.5μM, dNTP mixture 20mM, 10x buffer 2㎕, 20U/㎕ RNase inhibitor, 25mM MgCl2 용액 4㎕, MuLV Reverse transcriptase 2.5U/㎕를 전체 20㎕가 되게 혼합하여, 42℃에서 30분, 95℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성한 후 에탄올로 정제하여, 최종 부피를 20㎕로 만들었다.

20㎕ 중 3㎕를 취하여 aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin의 sense primer 와 antisense primer(Table 1) 각각 10pmole, 25mM MgCl2 1㎕, 10x PCR buffer 2.5㎕, dNTP mixture 20mM, Taq polymerase 2.5u와 혼합하며, PCR 반응 조건은 ① 94℃ 2분 ② 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분 ③ 72℃ 3분으로 하였다.

6. 실험군

BMP-2의 농도 반응을 보기 위하여 다양한 농도의 rhBMP-2 (2.5, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000ng/ml)를 각 배양군에 투여하고 이에 대한 당단백 생성 및 aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin mRNA 발현을 측정하였다. rhBMP-2 (50, 100, 1000ng/ml) 를 처치한 추간판 세포 배양군에서 배양 기간에 따른 aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin mRNA 발현을 측정하였다. 생리식염수를 투여한 추간판 세포 배양군을 대조군으로 삼았으며 RT-PCR에 대한 대조군으로 β-actin을 사용하여 각 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다.

7. 통계

자료는 SPSS (SPSS, Chicago, IL)를 사용하여 정리하였고 각군의 비교는 t-test 및 ANOVA를 이용하였으며 통계적 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다.

III. 결　과

1. rhBMP-2의 의한 추간판 세포의 당단백 생성

여러 농도의 rhBMP-2 (2.5, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, and 2000ng/ml)를 추간판 세포에 투여하고 새로 생성된 당단백을 측정하였을 때 대조군의 당단백 생성에 비해 50ng/ml부터 의미 있는 당단백 생성 증가가 관찰되며, 300ng/ml 농도에서는 50%, 1000ng/ml 농도에서는 100%, 1500ng/ml 농도에서는 250%의 당단백 생성 증가 관찰되었다 ($p<0.05$) (그림 1).

2. rhBMP-2에 의한 추간판 세포의 aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin mRNA 발현

Aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석하면 rhBMP-2의 농도에 비례해서 각 유전자의 mRNA 발현은 증가하였다 (그림 2). 특히 aggrecan mRNA는 대조군에 비해 1500ng/ml의 rhBMP-2 농도에서는 400%의 발현증가가 있었다. Densitometry로 분석한 결과에서도 제I형 교원질 mRNA는 대조군에 비해 rhBMP-2 100ng/ml 농도의 경우 대조군에 비해 70%의 발현 증가가 있었고 제2형 교원질 mRNA의 경우는 같은 농도의 rhBMP-2에서 50%의 발현 증가가 있었다. 이에 반해서 osteocalcin mRNA발현은 rhBMP-2의 농도에 관계없이 대조군과 비교해 차이가 없었다 (그림 3).

3. rhBMP-2로 처리된 추간판 세포에서 배양기간에 따른 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 II형 교원질, osteocalcin mRNA 발현

여러 농도의 rhBMP-2 (50, 100, 1000ng/ml)를 추간판 세포 배양군에 투여하고 3일, 7일, 11일간 배양 후 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질의 발현을 측정하며 초기 3일간은 강하게 발현되나 배양 기간이 경과할수록 발현의 강도는 감소하였다. Aggrecan mRNA는 제 1형 교원질, 제 2형 교원질에 비해 배양기간이 길어져도 발현을 비교적 높게 유지하였다 (그림 4).

IV. 고 찰

골형성단백 (bone morphogenetic protein : BMP)은 배아 발생기 조직 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 성인 세포에서의 기능도 다양하게 알려져 있다. 연골은 연골세포와 이에 의해 생성되는 기질로 이루어져 있으며 수상된 연골 세포는 제한된 재생 능력을 지니고 있어서 이를 개선하고자 하는 많은 노력이 있어 왔다.

인체내에서의 추간판 섬유 연골 세포의 증식 또한 매우 제한적이나 이 연골 세포를 추출하여 배양할 경우 특정 조건에서는 정상적인 세포의 경우 자유롭게 증식하는 특성을 지닌다.[36] 그러나 이러한 배양 과정중 특별한 조건을 갖추지 않은 경우 연골 세포의 과다 증식 및 연골 세포 표현형의 재분화가 일어나고 제 2형 교원질의 생성보다는 제 1형 교원질의 생성이 더 증가하게 된다. 이는 특히 단층 배양의 경우 더 그러할 수 있으며 배양 방법을 다르게 하여 agarose나 alginate beads로 추간판 세포를 포착하여 삼차원적 배양을 유도할 경우 추간판 연골 세포의 표현형이 보다 균일하게 지속적으로 유지될 수 있다.[30, 36, 37]

rhBMP-2는 추간판 연골 세포로 부터의 정상적인 기질 생성을 지속적으로 항진시킬 수 있는데 대조군과 비교하여 같은 농도하에 배양 3일 까지는 증가하나 그 이후로는 감소하는 경향을 보인다. 더욱이 삼차원적 배양 조건에서는 그 표현형이 더 오래 지속되며 특히 고농도의 rhBMP-2 투여시에는 제 1형 교원질 보다는 제 2형 교원질 생성이 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

추간판 연골 세포의 기질 성분인 aggrecan의 경우도 rhBMP-2의 농도 증가에 비례하여 그 생성이 증가하는 경향을 보이고 배양 기간이 지속되더라도 기질 생성이 유지됨을 보였다. 이는 rhBMP-2 투여시 추간판 연골 세포의 특성에 맞는 기질 생성이 발생하는 것을 보이는 것이다.

삼차원적 배양 조건하에서는 rhBMP-2가 투여된 관절 연골 세포군은 원형의 세포형태를 유지할 수 있으며 당단백이 풍부한 기질체를 지속적으로 생성하게 된다.[38, 39] 또한 삼차원적 배양하에서는 rhBMP-2에 의해 연골 세포의 표현형이 유지될 수 있는데 특히 제 1형 교원질 보다는 제 2형 교원질이 지속적으로 생성됨으로서 연골 세포에 적합한 환경을 형성하게 된다. 단층 배양의 경우 2주 이상의 배양 기간에서는 제 2형 교원질과 aggrecan의 생성이 급격히 감소

하고 제 1형 교원질의 생성이 증가하게 된다. 이는 연골 세포의 표현형의 감소와 일치하는 현상이다.[36, 40]

그러나 장기적인 삼차원적 배양하에서는 제 1형 교원질의 생성은 감소하고 제 2형 교원질과 aggrecan의 생성은 지속되는데 이는 연골 세포의 밀도가 증가하여 상호 상승작용으로 인해 연골 세포의 표현형이 유지되는 것과 밀접한 관계가 있다.[30]

여러 보고에서도 배양 기간 3일 후에도 rhBMP-2 투여시에는 제 2형 교원질과 aggrecan의 생성이 증가함이 나타났고 이의 임상 적용에 큰 의미가 있음을 시사하고 있다.[41, 42, 43, 44]

또한 배양중 골성 분화 인자인 osteocalcin의 생성은 일어나지 않았으며 이는 rhBMP-2의 투여시 추간판 연골 세포군의 골성 분화를 일으키지 않고 추간판 연골 세포의 연골성 기질 생성만 유발하는 것을 의미하는 것이다.

본 연구의 단점으로는 시험관내 연구이므로 추간판 세포의 rhBMP-2에 대한 생체내의 상황을 재현할 수 없다는 점과 주로 해부학적 구분에 의해 수핵 세포만 연구 대상으로 하였으므로 전이 구간의 세포 및 섬유륜 세포에 대한 포괄적인 결과는 포함되지 않았다. 이런 단점은 향 후 시행될 생체내 연구 및 위치에 따른 추간판 세포(섬유륜, 전이 지대, 수핵)의 각각의 반응에 대한 연구로 보완될 것이다.

본 연구의 결과로 rhBMP-2는 추간판 변성을 예방 혹은 치료할 수 있는 선택 가능한 성장 인자임이 분자생물학적 연구 기법으로 증명되었으므로 향후 시행될 실험 동물을 이용한 추간판 변성의 생물학적 치료법에서 TGF-β1, IGF-1 등의 성장 인자와 더불어 효율적인 성장 인자 혹은 성장 인자 유전자로서 역할을 할 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구의 결과에서 삼차원적 추간판 연골 세포 배양시 rhBMP-2를 투여할 경우 추간판 연골 세포의 표현형이 유지되었고 rhBMP-2의 용량에 비례하여 당단백 생성이 증가되었으며 연골성 기질 (aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질)의 생성이 증가되었다. 투여된 농도군에서 rhBMP-2에 의한 추간판 연골 세포의 골성 인자 (osteocalcin)의 생성도 없었다. 이는 rhBMP-2가 추간판 연골 세포의 표현형을 유지시키면서 기질 생성을 유발할 수 있는 안전한 성장 인자로서 추간판의 퇴행성 기질 감소 질환의 임상적 치료에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995;20:1307-14.
2. Hardingham TE, Adams P. A method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral discs. Biochem J 1976;159:143-7.
3. Lipson SJ, Muir H. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine 1981;6:194-210.
4. Melrose J, Ghosh P, Taylor TKF, et al. A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibosus. J Orthop Res 1992;10:665-76.
5. Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res 1987;5:198-205.
6. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. J Bone Joint Surg Am 1995;77:1103-14.
7. Evans CH, Robbins PD. Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop 1999;367: S410-8.
8. Evans CH, Robbins PD. Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. Rheum Dis Clin North Am 1999;25:333-44.
9. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther 1998;80:35-47.
10. Barr E, Leiden JM. Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. Science 1991;254:1507-9.
11. Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM, Blau HM. Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. Science 1991;254:1509-12.
12. Moullier P, Bohl D, Heard JM, Danos O. Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically

modified skin fibroblasts. Nat Genet 1993;4:154-9.

13. Naffakh N, Henri A, Villeval JL, et al. Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblast. Pro Natl Acad Sci 1995;92:3194-8.
14. Day CS, Bosch P, Kasemkijwattana C, Menetrey J, Moreland MS, Fu FH, et al. Use of muscle cells to mediate gene transfer to the bone defect. Tissue Eng 1999;5:119-25.
15. Gerich TG, Kang R, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Gene transfer to the patellar tendon. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 1997;5:118-23.
16. Herndon JH, Robbins PD, Evans CH. Arthritis: is the cure in your genes? J Bone Joint Surg Am 1999;81:152-7.
17. Nishida K, Kang JD, Suh J-K, Robbins PD, Evans CH, Gilbertson LG. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: Implication for the treatment of intervertebral disc degeneration. Spine 21998;3:2437-43.
18. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon S-H, Suh J-K, Vogt MT, Robbins PD, Evans CH. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β1 encoding gene. Spine 1999;24:2419-25.
19. Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, Knaub MA, Muzzonigro T, Robbins PD, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer. Spine 2000;25:2573-79.
20. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, Hall RA, Robbins PD, Kang JD. Cocktail therapeutic gene transfer to human intervertebral disc cells cultured in three-dimensional alginate beads. Proceedings of North American Spine Society, New Orleans, 2000.
21. Gruber HE, Fisher EC, Desani B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN. Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-b1. Exp Cell

Res 1997;235:13-21.
22. Osada R, Oshima H, Ishihara H, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insuline-like growth factors-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orhtop Res 1996;14:690-9.
23. Takegami K, Matuda K, Kumano F, An H, Chiba K, Pankaj D, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced chemonucleolysis. 45th Annual Meeting 1999; Trans Orthop Res Soc, 201.
24. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth facors. Spine 1991;16:253-60.
25. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rhBMP-2 in interbodyfusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: A preliminary report. Spine 2000;25(3):376-81.
26. David SM, Gruber HE, Meyer RA Jr, Murakami T, Tabor OB, Howard BA, et al. Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine. A comparison of three dosages and two carriers. Spine 1999;24(19):1973-9
27. Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, Hashizume H, Yoshida M, Sakata R. Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. Spine 1999;24(18):1863-70
28. Martin GJ Jr, Boden SD, Marone MA, Marone MA, Moskovitz PA. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: important lessons learned regarding dose, carrier, and safety. J Spinal Disord 1999;12(3):179-86.
29. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A. The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate

anterior interbody fusion model. Spine 1999;24(7):629-36

30. Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinat human bone morphogenic proteon-2 maintain the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. J Orthop Res 1996;14:937-945.
31. Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro. J Bone Miner Res 2000;15:166-174.
32. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Golderberg VM, Yoo JU, et al. BMP-2 induction and TGF-b1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. J Cell Biochem 2001;81:284-294
33. Smith P, Shuler FD, Georgescu HI, Ghivizzani SC, Johnstone B, Ninibizi C, et al. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes. Arthritis Rheum 2000;43:1156-64.
34. Moon SH, Kang JD, Nishida K, Gilbertson LG, Niyibizi C, Smith PN, Knaub MA, Robbins PD, Evan CH. Human cervical intervertebral disc cell are susceptible to adenovirus-mediated gene therapy: Therapeutic gene transfer. Proceedings of Cervical Spine Research Society, Seattle WA, 1999.
35. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, Hall RA, Robbins PD, Kang JD. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail. Proceedings of Orthopaedic Research Society, SanFrancisco, 2001.
36. Hering TM, Kollar J, Huynh TD, Varelas JB, Sandell LJ. Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. Arch Biochem Biophys 1994;314:90-8.
37. Luyten FP, Chen P. Paralkar V, Reddi AH. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-β1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. Exp Cell Res 1994;210:224-9.

38. Aydelotte MB, Schleyerbach R, Zeck BJ, Kuettner KE. Articular chondrocytes cultured in agarose gel for study of chondrocytic chondrolysis. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC, editors. Articular Cartilage Biochemistry. New York: Raven Press; 1986. p. 235-56.
39. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Science 1994;170:17-27.
40. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules in retained on long-term culture of human articular chondrocytes. J Cell Sci 1995;108:1991-9.
41. Aston JE, Bentley G. Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. J Bone Joint Surg [Br] 1986;68:29-35.
42. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knees with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994;331:889-95.
43. Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti W. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. Am J Sports Med. 1994;22:485-8.
44. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. J Bone Joint Surg [Br] 1989;71:74-80.

Abstract

Matrix Synthesis of Human Intervertebral Disc Cells in Response to Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2

Kyeong-Jin Han

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

Recent advancements in molecular biology, recombinant DNA technology and the cloning of genes, have enabled scientists to obtain sufficient amounts of pure gene products for experimental and clinical use. The introduction of the growth factor and gene transfer virus makes the therapeutic gene transfer to promote the production of the matrix of intervertebral disc chondrocytes possible. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) has been known to be an important factor in differentiation and maintenance of phenotype of the chondrocytes of the articular cartilage or physeal plate. BMP-2 is also used as a growth factor to induce vertebral bone union or vertebral fusion *in vitro* or in clinical treatments.

The author reproduced and added BMP-2 into the human intervertebral disc chondrocytes *in vitro* and analyzed the reactional production of the biological matrix, especially the matrix from the human intervertebral disc chondrocytes.
The intervertebral disc cells were harvested from the surgical patients for the degenerative vertebral disease. The cells were cultured in 3-dimensional alginate-gel beads and different doses of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) was added.

The amounts of aggrecan from the human intervertebral disc chondrocytes

increased significantly from the minimum dose (50ng/ml) of rhBMP-2, by 50% with 300ng/ml, by 100% with 1000ng/ml and by 250% with 1500ng/ml compared to the control culture.

The effect of rhBMP-2 on mRNA expression for aggrecan, collagen type-I and collagen type-II was also increased proportional to the different doses of rhBMP-2 compared to the control culture. The expression of mRNA for collagen type-I increased by 70% in culture treated with rhBMP-2 and collagen type-II by 50%. Especially, the expression of mRNA increased by 400% with 1500ng/ml of rhBMP-2. In contrast, The expression of mRNA for osteocalcin was similar to that of the control culture regardless of the amounts of rhBMP-2.

The results of separate dose-response for chondrocyte aggrecan, collagen type-I and collagen type-II were assesed after 3, 7 and 11 days of culture. The expression of mRNA for chondrocyte aggrecan, collagen type-I and collagen type-II after 3 days in culture demonstrated nearly maximal synthesis and decreased thereafter. Aggrecan mRNA expression was maintained higher than collagen mRNA expression even though the time elapsed.

The results of this study show that rhBMP-2 promoted the phenotype of human inververtebral disc chondrocyte in 3-dimensional cell culture. Synthesis of normal chonndrocyte matrix components was increased in culture treated with rhBMP-2 but rhBMP-2 did not induce differentiation to a hypertrophic phenotype and osteocalcin synthesis. This characteristics may show a potential usefulness of rhBMP-2 in treatment of the degenerative human vertebral disease or osteoarthritis.

Key words : human vertebral disc chondrocyte, BMP-2, aggrecan, collagen type-I, collagen type-II, osteocalcin.

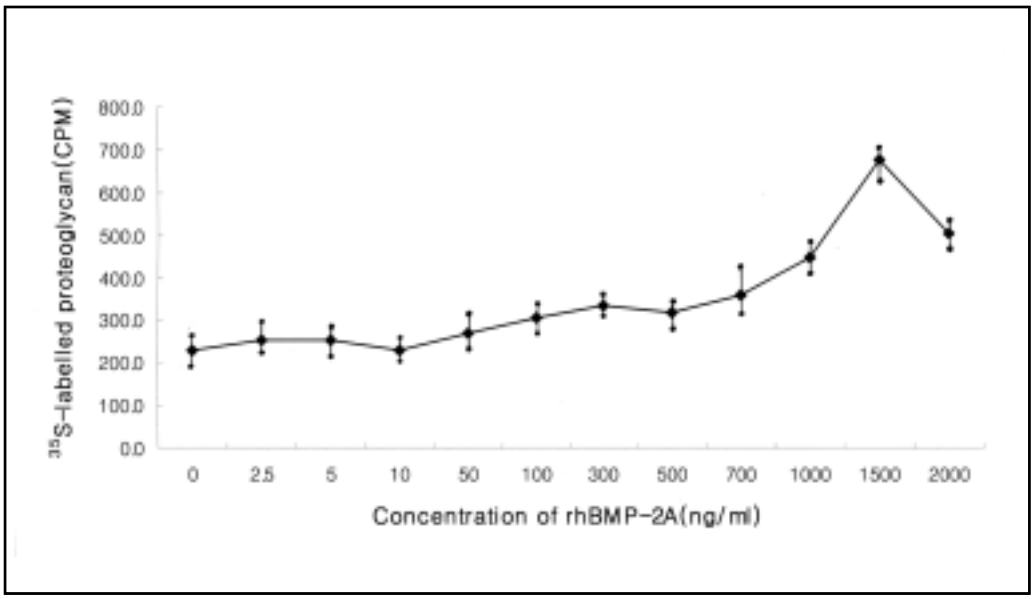


Figure 1. Dose response curve of rhBMP-2 on newly synthesized proteoglycan, measured by incorpoaration S35. rhBMP-2 with a dose of 1500ng/ml showed 250% increase of newly synthesized proteoglycan compared to control.

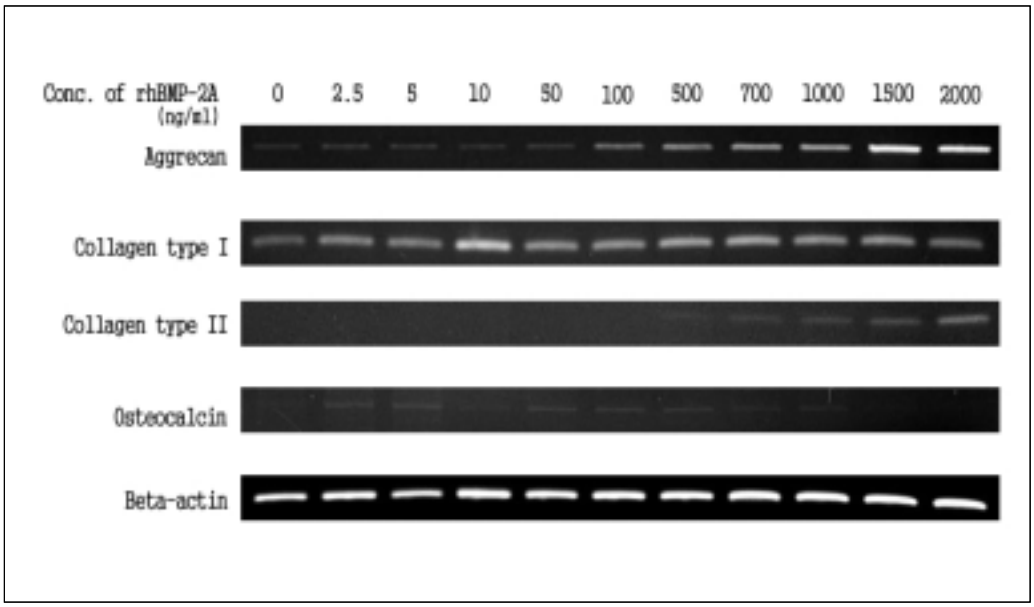
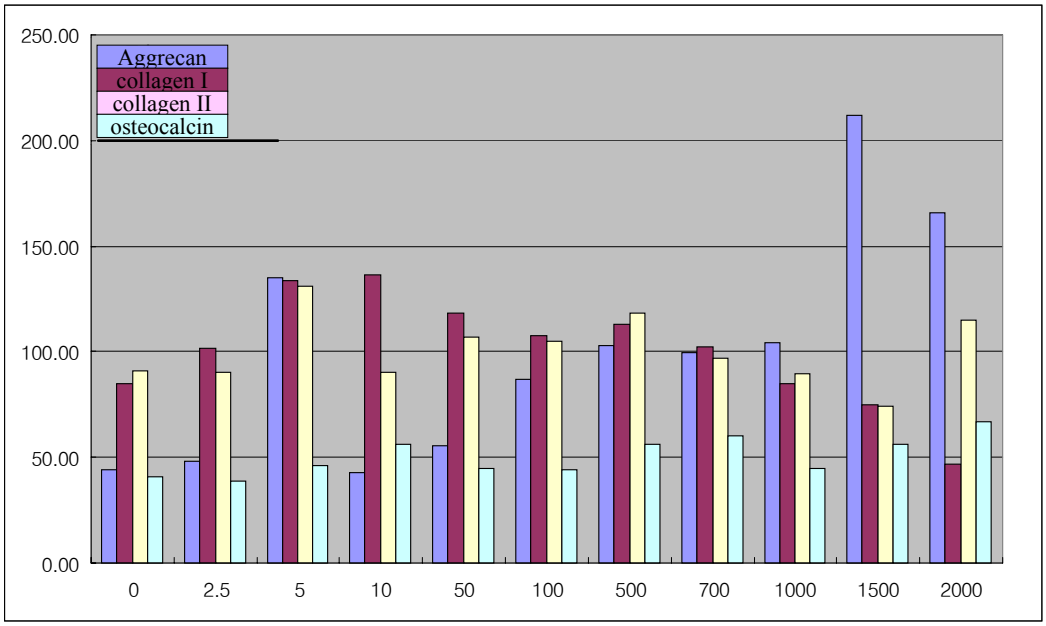


Figure 2. Dose response of rhBMP-2 on mRNA expression of aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin. Aggrecan, collagen type I, collagen type II mRNA expression was dose dependent to concentration of rhBMP-2. Osteocalin mRNA expression was not upregulated compared to control in given dose of rhBMP-2.



rhBMP-2(ng/ml)

Figure 3. Densitometric analysis of dose response of rhBMP-2 on mRNA expression of aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin. Aggrecan, collagen type I, collagen type II mRNA expression was dose dependent to concentration of rhBMP-2.Osteocalin mRNA expression was not upregulated compared to control in given dose of rhBMP-2.

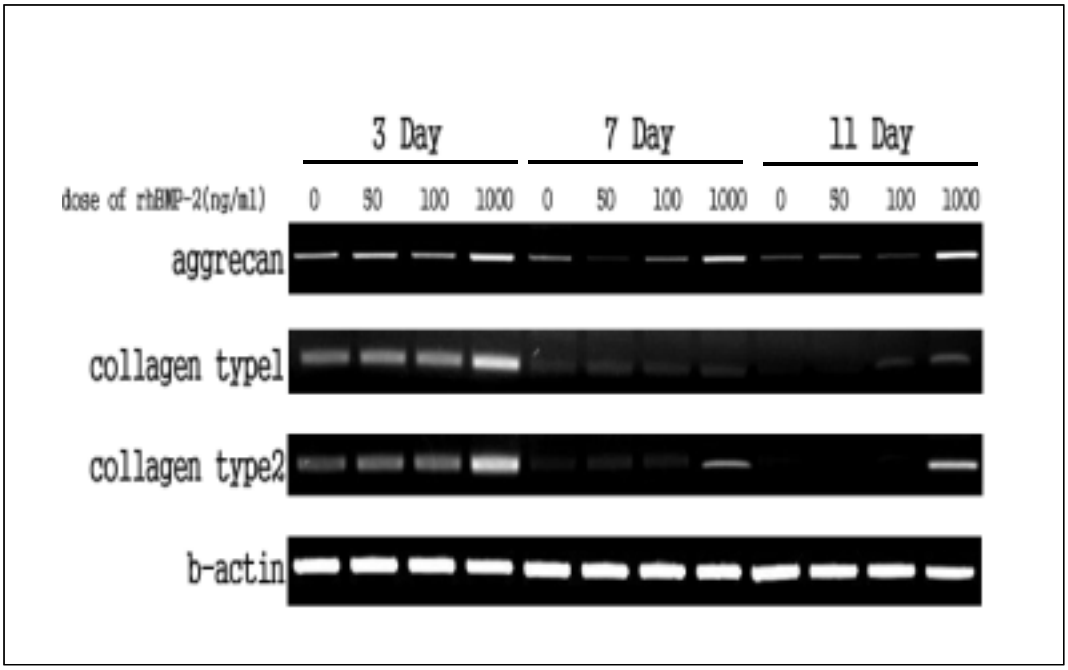


Figure 4. Aggrecan, collagen type I, and collagen type II mRNA expression on culture duration. Decrease in mRNA expression of collagen type I and collagen type II was observed with increase in culture duration. Aggrecan mRNA was maintained throughout given culture period.

Table 1. cDNA primer sequence, product size, and annealing temperature of β-actin, aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin.

Target cDNA primer sequence(5→3)	product size(bp)	Annealing temperature(℃)
β-actin		
GGCGGACTGTGACTTAGTTG	238	50
AAACAACAATGTGCAATCAA		
Aggrecan		
GAATCTAGCAGTGAGACGTC	541	47
CTGCAGCAGTTGATTCTGAT		
Collagen type Iα		
TGGAGAGTACTGGATTGACC	296	50
AGTGGTAGGTGATGTTCTGG		
Collagen type II		
TGGAGACTACTGGATTGACC	413	50
CAGTGTACGTGAACCTGCTA		
Osteocalcin		
CGAGAGCCCTCACA	312	50
AGAGCGACACCCTAGAC		