대한척추외과학회지 제 8 권 제 1 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 8, No. 1, pp 1~7, 2001

아데노바이러스를 이용한 치료적 유전자 전달: 인간 추간판 세포에서의 기질 생성

문성환 · 박문수 · 박진오 · 이환모 · 서영진 · 김남현 · 강응식

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

Adenovirus-Mediated Therapeutic Gene Transfer: Matrix Synthesis of Human Intervertebral Disc Cells

Seong-Hwan Moon, M.D., Moon-Soo Park, M.D., Jin-Oh Park, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D., Young Jin Seo, M.D., Nam-Hyun Kim, M.D., Eung-Shick Kang, M.D

Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Study Design : In vitro experiment to determine the matrix synthesis of human intervertebral disc (IVD) cell to adenovirus-mediated therapeutic gene transfer.

Objectives : To elucidate proteoglycan and collagen synthesis of human IVD cells in vitro to adenovirus-mediated transfer of cDNA of transforming growth factor-beta 1(TGF-β).

Summary of Literature Review : Sophisticated method to delivery of growth factors, in continuous manner, is the genetic modification of disc cells through gene transfer. Confirming susceptibility of human IVD cell to adenovirus, anabolic response of human IVD cells to therapeutic gene transfer should be next step.

Materials and Methods : IVD tissue was obtained from fourteen patients with grade III, IV degeneration. Isolation and culture of disc cells were performed. Disc cells were treated with either Ad/TGF-β exogenous TGF-β. Control cultures were treated with either saline or Ad/luciferase. Newly synthesized proteoglycans were assessed by ^{35}S-sulfate incorporation using chromatography on Sepadex G-25 in PD-10 columns. Uptake of ^{3}H proline was used to measure synthesis of collagen and noncollagen protein.

Results : Culture treated with Ad/TGF-β showed 3 fold increase in proteoglycan synthesis ($p<0.05$), culture with exogenous TGF-β failed to demonstrate increase in proteoglycan synthesis. In collagen and noncollagen synthesis, cultures with Ad/TGF-β and exogenous TGF-β showed similar 3.7 fold increase in collagen and 2.7 fold increase in noncollagen synthesis comparing control ($p<0.05$).

Conclusion : Adenovirus-mediated gene transfer appears to be an efficient technique for modulating biologic activity of human intervertebral disc cells in terms of matrix synthesis.

Key Words : Gene Transfer, Ad/TGF-β, Proteoglycan, Collagen

Address reprint requests to
Seong-Hwan Moon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-dong, Soedaemun-gu, Seoul, 120-752, Korea
Tel : 82-2-361-5649, Fax : 82-2-363-1139, E-mail : shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

* 이 논문은 2000년 연세대학교 학술연구비에 의하여 지원되었음.

서 론

척추 추간판의 퇴행성 변화와 이에 연관된 척추의 질환들(추간판 탈출증, 척추관 협착증, 퇴행성 척추증 등)은 환자에게 심대한 고통을 끼치며 이로 인한 의료비용도 나날이 증가하고 있다[1, 3]. 척추 추간판의 퇴행성 변화는 부분적으로 점진적인 당단백(proteoglycan)과 2형 교원질(type II collagen)의 감소에 의한 수핵(nucleus pulposus) 내의 수분 분압 감소에 기인하며[5,15] 결과적으로 척추 후관절 및 척추체에 전반적인 퇴행성 변화를 일으키게 된다[6].

현재까지 척추 추간판의 퇴행성 질환의 치료로는 주로 퇴행된 추간판을 수술적 기법으로 제거하여 신경증상을 호전시켰는데 이런 수술 방법에 관련된 척추의 불안정성은 골이식으로 이환된 척추부위를 강제로 유합하는 치료일색이었다. 즉 척추 추간판의 퇴행성 변화를 예방한다든지 퇴행성 변화를 역행시켜 추간판을 정상에 가깝게 회복시킨다든지 하는 근원적인 치료는 시행되지 않았다. 이와는 대조적으로 여러 종류의 성장인자들(transforming growth factor-β1, osteogenic protein-1, insulin like growth factor-1)을 시험관내의 추간판 조직에 주입하여 기질의 생성을 자극한 실험들이 시도되었다[23,29,30]. 이러한 성장인자들의 기질 생성능력은 추간판 변성에 가능한 치료법으로 제시되기도 하였으나 성장인자는 일회의 주입 및 도포로 지속적인 치료효과를 기대하기는 어렵다. 한편 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[9].

최근 아데노바이러스를 이용한 표식유전자를 정상 동물의 추간판에 전달하여 장기적으로 유전자가 발현됨이 보고되었고[22] 또한 transforming growth factor-β1(TGF-β1)의 유전자를 가토의 추간판 세포에 전달하여 생체 내에서 치료 유전자의 발현 및 발현된 TGF-β1에 의한 생체내 추간판의 기질 생성의 증가가 보고되었다[21]. 이와 병행하여 시험관에서 배양된 인간의 추간판 세포에 아데노바이러스를 이용한 표식 유전자를 전달하여 아데노바이러스에 대한 인간 추간판 세포의 감수성도 보고되었는데[19,20] 그 다음 연구로 인간의 추간판 세포에 치료적 유전자를 전달하고 이에 대한 생물학적 반응은 밝힐 필요가 있다. 특히 외부 주입된 성장인자(TGF-β1)와 유전자 치료법으로 내부적으로 발현된 성장인자의 생물학적 효과를 비교하여 유전자 전달법의 유용성을 증명할 필요가 있다.

그리하여 본 연구의 목적은 아데노바이러스를 매개체로 사용하여 배양된 인간의 추간판 세포를 유전적으로 조작하고 치료적 유전자를 발현시킨 것과 외부에서 직접 주입된 성장인자에 의한 당단백과 교원질 생성 등 추간판 세포의 생물학적 효과를 밝히는 것이다.

연구 대상 및 방법

1) 추간판 조직 체취 및 배양

요추 및 경추 추간판 탈출증, 경추 척수증, 요추 척추관 협착증 등의 척추 질환으로 수술을 시행한 예에서 추간판 조직을 채취하였다. 척추관내로 탈출된 추간판 조직은 엄격히 제외하고 역시 척추 연골판 조직도 육안으로 제외하였으며 추간판의 수핵 및 내측 섬유륜 부위의 조직만을 채취하였다. 채취된 추간판 조직은 수술전 자기공명영상 검사상 퇴행정도[10]를 분류하여 퇴행정도에 따른 생물학적 반응의 영향을 없애기 위해 grade III, IV의 퇴행된 추간판 14례를 대상으로 하였다.

채취된 추간판 조직은 혈액 및 체액을 제거하기 위해 Geys balanced salt solution(GBSS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)으로 세척한 후 통상 채취후 20분내에 수술실에서 실험실로 옮겼다. 추간판 세포는 순차적 효소적 소화법으로 조직에서 분리하였다[7]. 순차적 효소적 소화법을 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썬 다음 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY), 0.2% pronase(Calbiochem, La Jolla, CA), 0.004% deoxyribonuclease II type IV(DNAse, Sigma, St. Louis, MO)를 포함한 Hams F-12 medium and Dulbeccos Modified Eagle Medium(F12/DMEM, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 37°C에서 60분간 소화시켰다. F12/DMEM으로 세척 후 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II(Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제 2의 효소용액으로 역시 37°C에서 12시간 정도 소화시켰다. 분리된 추간판 세포는 F12/DMEM으로 세척후 nylon 여과지(pore size 75 um)를 사용하여 부유 조직을 제거하고 세포 생존성 검사[17] 및 세포밀도를 계산한 후 5×10^5 세포/ml의 밀도로 24 well plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ)에서 배양하였다. 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin(all antibiotics from GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 함유한 F12/DMEM을 사용하였다. 추간판 세포는 3주간 37°C 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

2) 아데노바이러스 재조합

E1 및 E3 유전자부분이 결여돼 성장이 제한된 제5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식

유전자로 luciferase 치료 유전자로 TGF-β1 유전자가 재조합되었다. 재조합된 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되었다. 재조합된 아데노바이러스는 human embryonic kidney 293 cell에서 증식되었다[18,25,31].

추간판 세포의 치료적 생물학적 효과를 알기 위해서는 아데노바이러스-TGF-β1(Ad/TGF-β1)을 사용하였고 바이러스 대조군으로는 아데노바이러스-luciferase(Ad/luciferase)를 사용하였다. 아데노바이러스의 농도는 원칙적으로 multiplicity of infection(MOI)를 사용하였고 MOI라 함은 세포당 plaque forming unit(PFU)로 정의하였다.

3) 시험관내 아데노바이러스 감염 술식 및 실험군

3주간 배양된 추간판 세포에서 배양액을 제거후 GBSS로 세 번 세척 후 여러 농도의 아데노바이러스를 포함한 GBSS를 첨가하고 37℃에서 60분간 감염시켰다. 그 이후 실험 성격에 따라 결정되는 배양액을 첨가 후 추가 배양하였다. 아데노바이러스 첨가 전 및 첨가 후, 혹은 추가 배양 후 세포 생존성 검사 및 평균 세포수를 측정하였다.

표식 유전자 실험에서 구한 100% 감염을 달성할 수 있는 아데노바이러스의 농도(150MOI)[19]를 참고하여 150 MOI의 Ad/TGF-β1를 추간판 세포에 감염시켰고 외부에서 주입되는 TGF-β1 의 농도는 최적의 생물학적 반응을 보이는 2 ng/ml로 정하였다. 제 1군은 생리 식염수 대조군, 제 2군은 외부에서 주입된 TGF-β1(2 ng/ml)군, 제 3군은 Ad/luciferase로 바이러스 대조군, 제 4군은 Ad/TGF-β1을 감염시킨 군으로 구분하였다.

4) 유전자 발현의 측정

Luciferase 측정

Firefly luciferase 유전자의 발현은 luminometer를 이용한 표준 luciferase 측정법[24,26]으로 정량적으로 분석하였다.

TGF-β1 측정

전달된 유전자(TGF-β1)의 발현 및 외부에서 주입된 TGF-β1(R&D system, Minneapolis, MN)의 잔류 농도를 측정하기 위해 세포 배양액을 체취하여 산을 이용하여 활성화 시킨 후 활성 및 비활성 TGF-β1 총량을 Enzyme linked immunosorbent assay 법으로(R&D system, Minneapolis, MN) 측정하였다.

5) 기질 생성 측정

당단백 생성 측정

치료적 유전자 실험 군에서 유전자 전달 후 2일만에 배양액을 채취하여 상기의 TGF-β1측정에 사용하고 세포배양에는 방사선동위원소 ^{35}S를 포함한 배양액(serumless medium, Newman-Tytell)으로 교체하고 4시간 추가 배양 후 8M guanidine hydrochloride, 20 mM EDTA 그리고 proteinase inhibitors 혼합액으로 세포 배양에 첨가하여 4°C에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다. 방사선동위원소로 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[2].

교원질 생성 측정

치료적 유전자 실험 군에서 유전자 전달 후 2일만에 배양액을 채취하여 상기의 TGF-β1측정에 사용하고 세포배양에는 방사선동위원소 ^{3}H-proline(50 Ci/ml)(New England Nuclear, Boston MA), 500ug/ml βaminoproprionitrile(Sigma, St. Louis, MO), 50ug/ml L-ascorbic acid를 포함한 배양액(serumless medium, Newman-Tytell)으로 교체하여 24시간 배양한 후 상층액을 제거하고 세포는 3번의 동결 및 해동의 반복으로 세포를 파괴시킨다. 상층액과 파괴된 세포를 96시간 증류수에 투석시켜 유리된 ^{3}H-proline을 제거한다. 투석된 세포 및 배양액을 collagenase(Worthington Biochemical, Freehold, NJ) 소화시킨 후 50% trichloroacetate로 처리하여 소화안된 단백질을 분리시키고 나머지는 4°C에서 60분간 12000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 scintillation 측정법으로 분석하였다.

6) 통계

자료는 SPSS(SPSS Inc. Chicago IL)를 이용하여 처리하였으며 One-way Analysis of variance 및 Fisher's protected LSD post-hoc test로 실험군간 비교하였다. 통계 방법의 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다

결 과

1) 추간판 세포의 분리 및 생존성

추간판 조직으로부터 분리된 추간판 세포의 숫자는 4×10^{6}/g 이었고 추간판 세포는 10^{6}/ml 농도로 배양하였을 때 3주에 시험관내에서 포화 상태를 이루었다. 초기 순차적 효소 분리 후의 세포생존성은 Trypan blue exclu-

sion test상 95~100%였고 유전자 전달 술식 이후에도 생존성은 90~95%를 유지하였다. 본 실험에서 사용된 아데노바이러스 농도 150MOI는 높은 세포 생존성을 볼 때 세포독성이 없음을 알 수 있다.

2) 배양액내의 TGF-β1 농도 변화

Ad/TGF-β1으로 감염된 배양에서 TGF-β1의 농도가 감염 18시간 후에는 4.5±1.1 ng/ml로 증가되어 있었고 배양 4일까지 6.5±1.4 ng/ml으로 높이 유지되었다. 이에 반해서 대조군(생리 식염수 처리군, Ad/luciferase 처리군)은 0.05 ng/ml 이하의 무시할만한 TGF-β1 농도를 보였다.

3) 새로 생성된 당단백

배양 이틀 후 분석한 새로 생성된 당단백은 Ad/TGF-β1으로 감염된 배양에서 대조군(생리 식염수 처리군)에 비해 약 세배의 증가를 보였다($p<0.05$, Fig. 1). 외부에서 TGF-β1를 주입한 배양 군에서는 대조군에 비해 의미 있는 당단백 생성 증가는 없었다($p=0.07$). 아데노바이러스 대조군으로 설정된 Ad/luciferase로 감염된 대조군에서는 생리식염수 처리군과 비교해 의미 있는 당단백 생성 증가는 없었다($p=0.63$).

4) 교원질 및 비교원질 단백 생성

Ad/TGF-β1로 감염된 배양군과 TGF-β1(2 ng/ml)으로 처리된 배양군에서는 생리식염수 처리군에 비해 3.7배의 교원질성 단백 생성증가와 2.7배의 비교원질성 단백증가를 볼 수 있었다($p<0.05$, Fig. 2). Ad/luciferase로 감염된 대조군에서는 생리식염수 처리군과 비교해 의미 있는 교원질 및 비교원질성 단백의 생성증가는 없었다($p=0.53$).

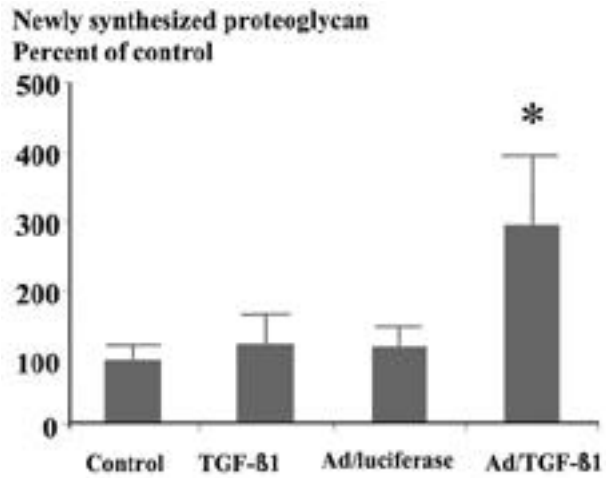

Fig. 1. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells transduced by adenovirus-TGF β1 construct(150 MOI) showed 3 fold increase in newly synthesized proteoglycan compared to those treated with normal saline*($p<0.05$), while culture treated by TGF-β1(2 ng/ml) showed no increase in newly synthesized proteoglycan compared to those treated with normal saline($p=0.07$).

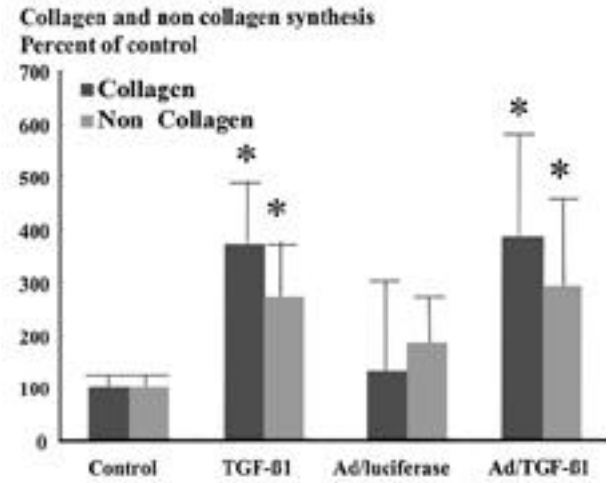

Fig. 2. Content of newly synthesized collagen and noncollagen as assayed by incorporation of ^{3}H-proline. Human intervertebral disc cells transduced by adenovirus-TGF β1 construct(150 MOI) and thoses treated by TGF-β1(2 ng/ml) showed 3.5 fold increase in collahen synthesis and 2.5 fold increase in noncollagen synthesis*($p<0.05$).

고 찰

추간판의 정상적인 기능은 추간판을 구성하는 교원질 및 당단백의 상태에 관련이 있다[15]. 이러한 의미로 교원질 및 당단백의 생성 자극은 추간판 변성의 치료 및 예방에 중요하다. 본 연구에서 저자들은 치료적 유전자(TGF-β1 encoding gene)를 인간의 추간판 세포에 아데노바이러스를 사용하여 전달하고 기질 생성 반응, 특히 당단백, 교원질 생성을 측정함으로서 치료적 유전자 전달의 생물학적 반응을 시험관내에서 연구하였다.

치료적 유전자가 재조합된 아데노바이러스의 당단백 생성에 미치는 농도 반응 곡선을 보면 10 MOI의 바이러스 농도에서 기질 생성 반응을 보이기 시작하여 25 MOI에서 고원화(plateau)되어 300 MOI 까지 증가된 당단백 생성반응을 보였다. 이러한 결과는 생물적으로 활발한 아데노바이러스의 농도(10MOI)는 100% 감염을 일으키

는 농도(150 MOI)에 비해서는 낮으며 이는 단층 배양에서 유전자 산물을 고농도로 발현시킬 필요는 없으며 단지 단기간의 배양일 경우 적절한 양의 유전자 발현으로도 효과적인 기질 생성을 유도할 수 있음을 알려준다. 이러한 사실은 실제 생체내에서 적용하기에는 무리가 있는데 이는 추간판 변성과 같은 만성경과를 취하는 질환의 경우 저농도의 바이러스로는 장기간 유전자 발현을 유도하기에는 무리가 있기 때문이다.

추간판 세포의 당단백 생성에 있어 외부에서 주입된 TGF-β1의 효과는 다분히 논쟁의 소지가 있다. Siegel 등[27]은 토끼의 추간판 세포의 단층 배양에서 TGF-β1이 당단백을 생성시키지 않음을 보고하였다. 이에 반해 Thompson 등[30]은 개의 추간판 조직을 조직 배양했을 때 TGF-β1의 주입으로 효과적인 당단백 생성 증가를 증명하였으며 Gruber 등[12]은 인간의 추간판 세포를 algiante gel을 이용하여 3차원적으로 배양하였을 때 TGF-β1에 의한 증가된 당단백 생성을 보고하였다. 이러한 상반되는 반응은 추간판 세포의 경우는 배양 환경에 따라 세포의 표현형이 변화되고 표현형에 따라 TGF-β1에 대한 반응성이 달라진다고 생각할 수 있다. 단층 배양에 있어 TGF-β1가 당단백 생성에 영향을 못 미치는 이유는 구형의 추간판 세포가 단층 배양으로 세포가 평면화됨으로 추간판 세포의 고유의 표현형이 퇴화(dedifferentiation)되어 구형의 세포 형태를 잘 유지하는 조직 배양이나 3차원 배양과는 다르게 TGF-β1의 생물학적 반응이 감소되었다고 볼 수 있다[12-14].

본 연구에서 비록 외부에서 주입된 TGF-β1는 당단백 생성 증가의 효과를 나타내지는 못했지만 TGF-β1 encoding gene을 재조합한 아데노바이러스로 감염되어 TGF-β1를 내인적으로 생산하는 배양에서는 단층 배양임에도 불구하고 생리식염수 대조군에 비해 3배 증가된 당단백 생성증가를 보였다. 이러한 결과는 유전자 전달법으로 내인적으로 생산된 TGF-β1가 외부 주입된 TGF-β1보다 월등히 높은 효과를 발휘함을 알 수 있다. 이에 반해서 교원질 생성의 경우는 유전자 전달법 및 외부에서 주입한 경우에 차이 없이 같이 증가된 교원질 생성반응을 보였다.

바이러스의 감염 자체가 전달된 유전자에 의한 생물학적 반응에 영향을 미칠 수도 있음으로 이런 효과를 알아보기 위해 기질 생성 효과가 없는 luciferase 유전자를 전달했는데 이 배양에서는 생리 식염수로 처리한 대조군과 비교해서 기질 생성 반응의 증가는 관찰되지 않았다. 이는 아데노바이러스의 세포내 감염 및 유전자 발현 과정 자체는 당단백 생성이라는 기질 생성 반응에는 전혀 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

본 연구의 제한점은 추간판 조직이 어느 정도의 퇴행성 변화를 가지고 있고 육안적으로 탈출된 조직과 원래의 수핵 조직을 구분하였음으로 어느 정도는 섬유륜 및 이행부위의 세포도 배양되었을 가능성이 있는 것이다. 그러나 이 단점은 유전자 치료의 임상적 적용성을 생각하면 장점으로 변화 될 수 있다. 즉 추간판내 유전자 치료가 정상 추간판 조직보다는 어느 정도 퇴행이 진행된 추간판에서 적용될 것을 고려하면 퇴행이 진행된 추간판 세포 특히 수핵, 이행지대, 섬유륜 세포에서도 강력한 기질 생성 반응을 보였다는 것은 향후 추간판내 유전자 치료의 임상 적용성을 한층 높여주는 결과라 하겠다.

결 론

인간의 추간판 세포를 이용한 시험관내 연구에서 치료적 유전자 전달법이 효과적이고 지속적인 기질 생성 반응을 보였으며 이는 퇴행성 추간판 질환 치료에 유전자 전달법의 적용을 한발 앞당기는데 도움을 줄 것이다.

REFERENCES

1) **Anderson JAD** : *Back pain and occupation. The lumbar Spine and Back Pain. Third Edition, Edited by MIV Jayson. London. Churchill Livingstone 1987. PP2-36*
2) **Aydelotte MB, Greenhill RR and Kuettner KE** : *Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. Connect Tiss Res, 18:223-234, 1988.*
3) **Borenstein D** : *Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheumatol, 4:226-232, 1992.*
4) **Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al** : *Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-β. Ann. Surg, 208:788-794, 1988.*
5) **Buckwalter JA** : *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 20:1307-1314, 1995.*
6) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, et al** : *Discs degenerate before facets. Spine, 15:111-113, 1990.*
7) **Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, et al** : *Identification of heterogenous cell populations in normal human intervertebral disc. J Anat, 186:43-53, 1995.*
8) **Chiba K, Andersson GBJ, Masuda K, et al** : *Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. Spine, 22:2885-2893, 1997.*
9) **Evans CH and Robbins PD** : *Possible orthopaedic appli -*

cations of gene therapy. J Bone Joint Surg(Am), 77:1103-1113, 1995.

10) **Eyre D, Benya P, Buckwalter J, et al** : *Intervertebral disc: Part B. Basic science perspective. In New Perspectives in Low Back Pain. Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 147-207, 1989.*

11) **Graham FL and Eb Ajvd** : *A new technique for assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virol, 52:456-467, 1973.*

12) **Gruber HE, Fisher EC, Desani B, et al** : *Human inter - vertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-b1. Exp Cell Res, 235:13-21, 1997.*

13) **Guo J, Jourdian GW, McCallum DK** : *Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Conn Tiss Res, 19:277-97, 1989.*

14) **Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, et al** : *Pheno - typic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci, 107:17-27, 1994.*

15) **Hutton WC, Toribatake Y, Elmer WA et al** : *The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo. Spine, 23:2524-2537, 1998.*

16) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210, 1981.*

17) **Maldonado BA and Oegema TR** : *Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. J Orthop Res, 10:677-690, 1992.*

18) **Mittereder N, March KL and Trapnell BC** : *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol, 70:7498-7509, 1996.*

19) **Moon S-H, Gilbertson LG, Nishida K, et al** : *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by ade - novirus-mediated gene transfer: Implications for the clini - cal management of intervertebral disc disorder. Spine 25:2573-2579, 2000.*

20) **Moon S-H, Kang JD, Nishida K, et al** : *Human cervical intervertebral disc cells are susceptible to adenovirus-mediated gene therapy. Proceedings of Cervical Spine Research Society, 1999.*

21) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al** : *Modulation of biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factors 1 encoding gene. Spine, 24:2419-2425, 1999.*

22) **Nishida K, Kang JD, Suh J-K, et al** : *Adenovirus-mediat - ed gene transfer to nucleus pulposus cells: Implication for the treatment of intervertebral disc degeneration. Spine, 23:2437-2443, 1998.*

23) **Osada R, Oshima H, Ishihara H, et al** : *Autocrine/parac-rine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insuline-like growth factors-1 on proteo - glycan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orhtop Res, 14:690-699, 1996.*

24) **Price J, Turner D, Cepko C** : *Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. Proc Natl Acad Sci, 84:156-160, 1987.*

25) **Robbins PD and Ghivizzani SC** : *Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther, 80:35-47, 1998.*

26) **Sanes JR, Rubenstein JLR, Nicholas JF** : *Use of a recom - binant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. EMBO J, 5:5133-5142, 1986.*

27) **Siegel JA, Lonner BS, Grande DA, James T** : *The effect of transforming growth factor-beta on intervertebral disc tissue. Proceedings of ISSLS, 213A, Kona Hawaii, 1999.*

28) **Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, et al** : *Effect of growth factors in vivo. Am J Pathol, 129:601-613, 1987.*

29) **Takemi K, Kumano F, An H, et al** : *Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chon - droitinase ABC-induced chemonucleolysis. Tranc Orthop Res Soc, 201, 1999.*

30) **Thompson JP, Oegema TR Jr and Bradford DS** : *Stim - ulation of mature cannine intervertebral disc by growth factors. Spine, 16:253-260, 1991.*

31) **Yeh P and Perricaudet M** : *Advances in adenoviral vec - tors: from genetic engineering to their biology. FASEB Journal, 11:615-623, 1997.*

국 문 초 록

연구계획 : 아데노바이러스를 매개체로 하여 치료적 유전자를 배양된 인간의 추간판 세포에 전달하여 기질 생성반응을 시험관내에서 연구하였다.

연구목적 : 성장인자의 유전자를 아데노바이러스를 매게체로 인간의 추간판 세포에 전달하여 치료적 유전자를 발현시킨 것과 외부에서 직접 주입된 성장인자에 의한 당단백과 교원질 생성을 시험관내에서 밝히고자 하였다.

연구대상 및 방법 : 인간 추간판 세포를 14명의 환자에서 채취하여 분리 및 배양하였다. 추간판 세포에 Ad/TGF-β1을 감염시키거나 외부에서 TGF-β1을 주입하였다. 대조군으로서 생리 식염수 또는 Ad/luciferase을 감염시킨 군을 사용하였다. 생성된 당단백의 농도는 방사선 동위원소 ^{35}S를 포함한 배양액에서 추가배양후에 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column에 통과시켜 측정하였다. 교원질 및 비교원질의 생성은 방사선 동위원소 ^{3}H-proline을 이용하여 측정하였다.

결과 : Ad/TGF-β1를 이용한 배양에서는 당단백 생성이 3배 이상 나타났으며($p<0.05$), 외부 주입된 TGF-β1 배양의 경우, 당단백 생성의 증가를 볼수 없었다. 교원질및 비교원질성 단백 합성의 경우, Ad/TGF-β1과 외부 주입 TGF-β1 배양에 있어서 대조군에 비해 각각 3.7배와 2.7배의 증가를 보였다($p<0.05$).

결론 : 아데노바이러스를 매개체로 한 치료적 유전자 전달법이 인간의 추간판 세포에서 효과적인 기질 생성반응을 보였다.

색인단어 : 유전자 전달, Ad/TGF-β1, 당단백, 교원질

※ 통신저자 : 문 성 환
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel : 82-2-361-5649, Fax : 82-2-363-1139, E-mail : shmoon@yumc.yonsei.ac.kr