대한척추외과학회지 제 8 권 제 4 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 8, No. 4, pp 447~454, 2001

인간 추간판 세포의 기질 생성
- 유전자 전달법, 외부 투입된 성장인자, 배양 기간별, 배양 기법 등에 따른 기질생성의 변화 -

문성환 · 박문수 · 이환모 · 강응식 · 김남현
Lars G. Gilbertson*, James D. Kang*

연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh*

Matrix Synthesis of Human Intervertebral Disc Cells
– Effect of Gene Transfer, Exogenous Growth Factor, Incubation Period, and Culture Methods –

Seong-Hwan Moon, M.D., Moon-Soo Park, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D., Eung-Shick Kang, M.D., Nam-Hyun Kim, M.D., Lars G. Gilbertson, Ph.D.*, James D. Kang M.D.*

Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
*Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, PA**

– Abstract –

Study Design : In vitro experiment to determine the matrix synthesis of intervertebral disc (IVD) cell to various biologic interventions and conditions.

Objectives : To elucidate biologic responses in terms of matrix synthesis of human IVD cells in vitro to various factors i.e. concentration of adenoviral vector and exogenous growth factor, duration of incubation, and type of culture methods.

Summary of Literature Review : Sophisticated method to delivery of growth factors, in continuous manner, is the genetic modification of disc cells through gene transfer. Direct comparison of gene transfer and exogenous growth factor on matrix synthesis has not been reported.

Materials and Methods : IVD tissue was obtained from twenty three patients. Isolation and preparation of disc cells in monolayer (2 D) and alginate beads (3 D) culture were performed. Disc cells in 2 D and 3 D were treated with either Ad/TGF-ß1 or exogenous TGF-ß1. Control cultures were treated with either saline or Ad/luciferase. Matrix synthesis (newly synthesized proteoglycan) was measured in various conditions (concentration of adenoviral vector and exogenous growth factor, duration of incubation, and type of culture methods). Newly synthesized proteoglycan were analyzed using chromatography on Sephadex G-25 in PD-10 columns after S35-sulfate incorporation.

Results : Ad/TGF-ß1 showed increase in proteoglycan synthesis (plateau at 75 MOI) in 3 D culture, (plateau at 25 MOI) in 2 D culture. In 3 D culture, Ad/TGF-ß1 showed significant increase in proteoglycan synthesis on day 1, 2, and 3 of incubation. In 2 D culture, Ad/TGF-ß1 showed significant increase in proteoglycan synthesis on day 2 of incubation with significant loss of anabolic effect on day 3. In 3 D culture, exogenous TGF-ß1 showed increase in proteoglycan synthesis (plateau at 2 ng/ml) while in 2 D culture, there is no synthetic response to exogenous TGF-ß1.

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

Conclusion : Therapeutic gene transfer provided sustained and increased anabolic responses than exogenous growth factor.

Key Words : Gene Therapy, TGF-ß1, Monolayer culture, 3 Dimensional culture, Proteoglycan

서 론

퇴행성 추간판 질환으로 인한 의료비 및 환자의 고통은 증가하고 있다[1,5]. 퇴행성 추간판 질환은 실험적으로 밝혀진 바로는 추간판내 당단백(proteoglycan)의 감소로 추간판의 생역학에 변화가 오게됨으로[7,8,17] 척추의 퇴행성 변화를 일으켜 다양한 임상증상을 야기한다. 퇴행성 추간판 질환의 치료에는 주로 보존적 요법 내지는 이환된 추간판을 제거하거나 주위 척추를 골유합시키는 수술적 요법 등이 행해졌다. 이러한 치료법은 병인에 기초한 근원적인 치료라고 보기는 힘들며 단지 증상 호전을 위한 고식적인 방법이었다. 이와는 대조적으로 실험적 접근으로 추간판 조직에 치료농도의 성장인자를 주입하여 기질 생성을 유도하는 생물학적 방법이 소개되어 추간판 변성의 가능한 치료방법으로 제시되었다[24,28,29]. 성장인자의 생물학적 효과는 여러 종류의 조직에서 조직 재생의 기전으로의 유용성이 검증되었으나[3,4,6] 외부 주입된 성장인자는 짧은 생물학적 반감기를 가지며[27,30] 초기 과 용량 투여로 인한 전신 독성을 야기 시킬 수 있으므로 만성적 경과를 취하는 질환일 경우에는 임상적으로 이용하기에 무리가 있다. 그렇기 때문에 치료적 혹은 예방적으로 기질 생성을 자극하는 성장인자의 효과적, 지속적인 전달 방법의 개발이 필요로 하였다.

아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용하여 실험동물에서 표식 유전자 및 치료적 유전자 전달과[22,23] 인간의 추간판 세포 배양에서 표식 및 치료적 유전자 전달[20,21]의 효과가 보고되었는데 이러한 연구 결과는 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용한 유전자 치료법이 추간판의 기질 생성이라는 생물학적 반응을 지속적으로 일으켜 기질 재생의 기전이 될 수 있음을 시사한다. 그럼에도 불구하고 유전자 전달 및 외부 투입된 성장인자의 생물학적 효과를 시험관내에서 비교한 연구는 없었다.

그리하여 본 연구의 목적은 인간의 추간판 세포를 분리 배양 후 유전자 전달체 농도, 외부 투입된 성장인자 농도, 배양 기간, 배양 기법(단층 및 3차원적 배양)과 같은 여러 조건하에서 기질 생성반응이 어떠한지를 알아보아 최적의 기질 생성 조건을 알아보는 것이다.

연구 대상 및 방법

1. 아데노바이러스 재조합

E1 및 E3 유전자부분이 결여돼 성장이 제한된 제 5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식 유전자로 luciferase, 치료 유전자로 TGF-β1 유전자를 재조합하였다. 모든 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되게 하였다. 재조합된 아데노바이러스는 human embryonic kidney 293 cell에서 증식시켰다[13,19,31]. 기질 생성의 치료적 효과를 알기 위해서는 아데노바이러스-TGF-β1(Ad/TGF-β1) 사용하였다. 아데노바이러스의 농도는 Multiplicity of infection(MOI)와 plaque forming unit(PFU)를 사용하였는데 MOI는 세포당 PFU, 1 PFU는 100 virus particles로 정의하였다.

2. 인간의 추간판 세포 분리 및 단층 배양

추간판 탈출증, 척추관 협착증 등의 추간판 술식이 행해진 23명의 환자에서 경추 및 요추부 추간판을 채취하였다. 추간판의 퇴행 정도는 수술전 자기공명영상을 이용하여 Eyre 등[12]이 보고한 방법으로 분류하였다. 추간판 조직 채취시 탈출 및 격리된 추간판은 제외하였고 원래의 추간판 공간에서 채취한 조직만 사용하였다. 채취된 추간판 조직은 혈액 및 체액을 제거하기 위해 Geys balanced salt solution(GBSS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)으로 세척한 후 통상 채취 후 즉시 수술실에서 실험실로 옮겼다. 추간판 세포는 순차적 효소적 소화법으로 조직에서 분리하였다[9]. 순차적 효소적 소화법을 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썰고 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℃에서 60분간 소화시킨다. F12/DMEM으로 세척 후 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II(Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제 2의 효소용액으로 역시 37℃에서 12시간 정도 소화시킨다. 분리된 추간판 세포는 F12/DMEM으로 세척후 Nylon 여과지(pore size 75

um)를 사용하여 부유 조직을 제거한다. 세포 생존성 검사[18] 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℃ 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

3. 아데노바이러스 감염 술식

3주간 배양된 추간판 세포에서 배양액을 제거한 다음 GBSS로 세 번 세척 후 여러 농도의 아데노바이러스를 포함한 GBSS를 첨가하고 37℃에서 60분간 감염시켰다. 아데노바이러스 첨가 전 및 첨가 후, 혹은 추가 배양 후 세포 생존성 검사 및 평균 세포수를 측정하였다.

4. 추간판 세포 3차원적 배양

0.15M NaCl용액에 1.2%의 low viscosity alginate gel (Kelco, Chicago, IL)를 상온에서 서서히 녹인 후 Trypsin으로 유리된 추간판 세포를 mililiter당 백만개의 비율로 alginate gel에 균등히 섞었다. 22 gauge 주사바늘을 통해 102 mM $CaCl_2$ 용액에 alginate gel 및 세포 혼합물을 방울 방울 떨어뜨려 순간적으로 굳게 하였다. 고형화된 algiante gel-세포 방울을 $CaCl_2$ 용액에 10분 정도 배양하여 완전한 polymerization을 유도하였다. 0.15M NaCl 용액에 세척하고 F12/DMEM 배양액에 3번 세척한 후 alginate bead는 24 well culture plate각 well에 10개씩 넣고 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin을 함유한 F12/DMEM을 사용하여 48시간 37℃ 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

5. 실험 조건

치료적 유전자를 전달하는 아데노바이러스 농도에 따른 기질 생성 반응의 농도반응곡선을 알기 위해 10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 MOI의 Ad/TGF-β1와 바이러스 대조군으로 같은 농도의 Ad/luciferase로 추간판 세포를 감염시킨 후 배양 2일 후 당단백 생성을 측정하였다.

외부에서 투입된 TGF-β1에 의한 기질 생성 반응의 농도반응곡선을 알기 위해 2, 10, 50 ng/ml의 TGF-β1를 추간판 세포 배양에 투여하고 배양 2일 후 당단백 생성을 측정하였다.

바이러스 농도와 외부 투입된 성장인자의 농도 반응곡선에서 최적의 농도를 산출하고 이 농도를 이용하여 추간판의 퇴행 정도에 따른 당단백 생성 반응을 조사하고, 단층 배양 및 3차원 배양의 조건에서 배양 1, 2, 3일 후의 당단백 생성반응을 측정하였다.

모든 실험에서 생리 식염수로 처리한 배양은 전체 대조군으로 활용하였다. 모든 측정치는 배양 후의 세포수로 정상화하였다.

6. 새로 생성된 당단백

인간의 추간판 세포 배양에 35S-Sulfate(20uCi/ml)를 함유한 Newman-Tytell medium으로 배양 조건을 바꾼 후 4시간 추가 배양하고 0.15M NaCl로 세척 후 55 mM sodium citrate로 alginate bead를 용해시킨 다음 8 M guanidine hydrochloride, 20 mM EDTA, proteinase inhibitors 혼합액을 첨가 후 4℃에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다[2]. 200 ul의 소화액을 Sephadex G-25 PD-10 column을 이용한 Chromatogaphy법으로 용출시켰다. 1 ml의 용출액에 6ml의 scintillation mixture(Ultima Gold, Packard, Meriden, CT)를 첨가하여 12시간 안정시킨 후 liquid scintillation counter (Packard #1900 TR, Meriden, CT)를 사용하여 새로이 생성된 당단백을 정량하였다.

7. 자료정리 및 통계

모든 자료는 평균±표준편자로 표시하였으며 SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL)를 사용하여 자료를 처리하였다. 분산분석과 Fisher's protected LSD 사후 검정을 이용하였으며 통계적 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다.

결 과

단층 배양에 있어서 바이러스, 성장인자 농도에 대한 당단백 생성 단층 배양에서 여러 농도의 Ad/TGF-β1로 감염시킨 후 당단백 생성을 측정하면 10MOI의 아데노바이러스로도 당단백 생성 효과가 나타나며 25MOI의 아데노바이러스 농도에서 고원화(plateau) 되는 당단백 생성 증가가 있었다(Fig. 1). 바이러스 농도를 계속 증가시켜도 의의 있는 당단백 생성 증대 효과는 없었다. 외부에서 주입된 TGF-β1는 투여된 전 농도에서 의의 있는 당단백 생성은 없었다(Fig. 2). 단층 배양된 인간의 추간판 세포는 치료적 유전자 전달에는 기질 생성 반응을 보였지만 외부 투여된 TGF-β1에 대해서는 기질 생성 반응이 없었다.

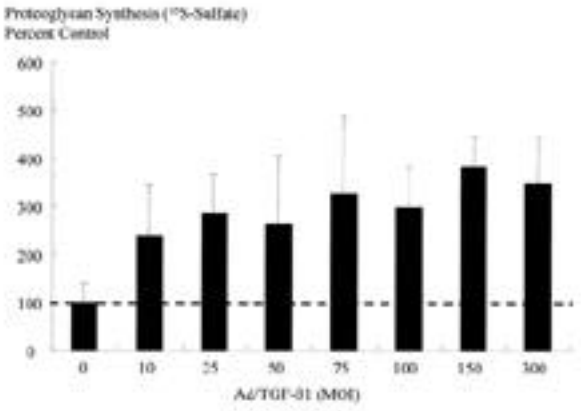

Fig. 1. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells in monolayer culture transduced by adenovirus-TGFß1 construct (10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 MOI) showed increase in newly synthesized proteoglycan ($p<0.05$) with a plateau response with an MOI of 75 compared to those treated with normal saline.

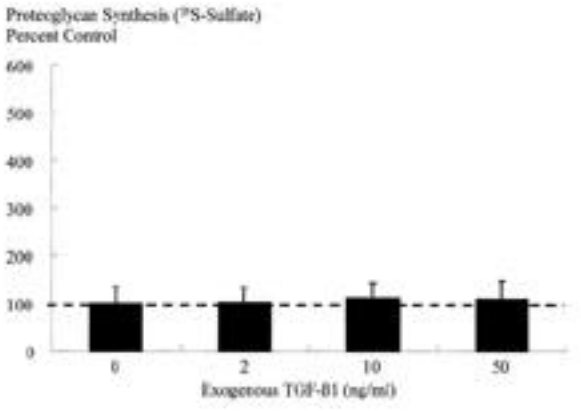

Fig. 2. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells in monolayer culture treated by TGF-ß1 (2, 10, 50 ng/ml) showed no increase in newly synthesized proteoglycan compared to those treated with normal saline.

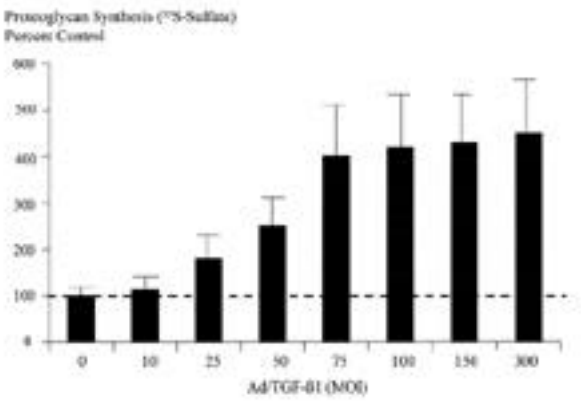

Fig. 3. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells transduced by adenovirus-TGFß1 construct (10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 MOI), cultured in 3 dimensional alginate beads, showed increase in newly synthesized proteoglycan with a plateau response with an MOI of 75 compared to those treated with normal saline ($p<0.05$).

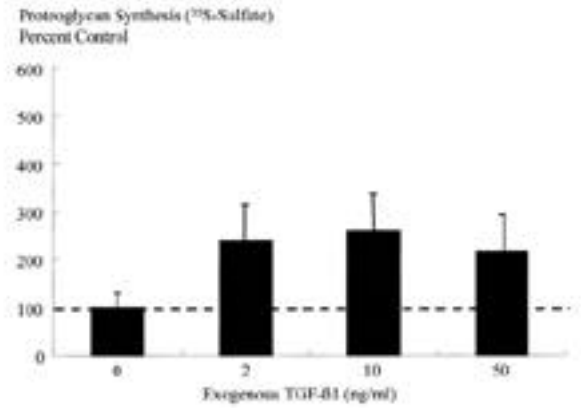

Fig. 4. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells in 3 dimensional culture treated by TGF-ß1 (2, 10, 50 ng/ml) showed significant increase in newly synthesized proteoglycan compared to those treated with normal saline ($p<0.05$).

1. 3차원적 배양에 있어 바이러스, 성장인자 농도에 대한 당단백 생성

Alginate bead를 이용한 3차원적 배양에 있어서는 25 MOI의 Ad/TGF-β에서부터 당단백 생성 효과가 관찰되었으며 75MOI의 Ad/TGF-β부터 고원화 되는 당단백 생성 반응을 보였다. 75MOI의 Ad/TGF-β에서 대조군에 비해 295% 증가된 기질 생성반응을 볼 수 있었다(Fig. 3). 외부 투입된 TGF-β는 2 ng/ml의 농도에서 대조군에 비해 130%증가된 기질 생성 반응이 있었다(Fig. 4). 3차원적으로 배양된 인간의 추간판 세포는 외부 투여된 TGF-β 그리고 Ad/TGF-β에서 공히 의의있는 기질 생성 반응이 관찰되었는데 치료적 유전자 전달군에서 더 효율

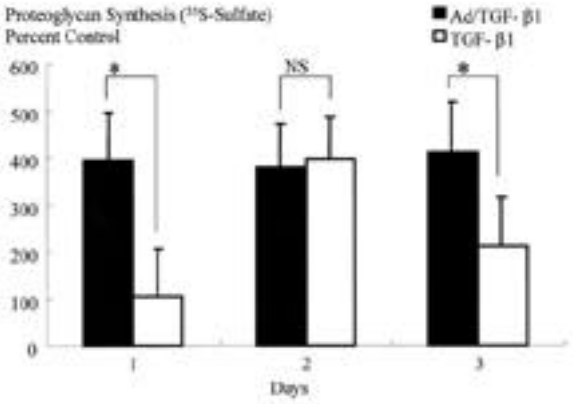

Fig. 5. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of 35S-sulfate. Human intervertebral disc cells transduced by adenovirus-TGFß1 construct with an MOI of 75, cultured in 3 dimensional alginate beads, showed increase in newly synthesized proteoglycan in day 1, 2, and 3 without recognizable loss of anabolic effect. Disc cells culture in monolayer showed strong anabolic effect on day 2 with significant loss of anabolic effect on day 3.

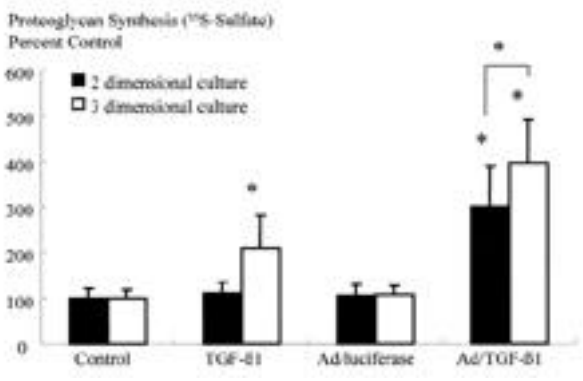

Fig. 6. Human intervertbral disc cells cultured in monolyaer and alginate beads with therapeutic gene transfer (TGF-ß1 gene) showed robust increase in proteoglycan synthesis compared to exogenous TGF-ß1 ($p<0.05$). Transduction with adenovirus-luciferase construct showed no difference in proteoglycan synthesis compared to normal saline control.

적인 기질 생성 반응이 있었다.

2. 배양 기간에 따른 당단백 생성

Alginate beads를 이용한 3차원적 배양에서 배양 기간에 따른 기질 생성 반응을 보면 치료적 유전자 전달군(Ad/TGF-β1, 75 MOI)에서는 1일째부터 당단백 생성 증가 효과가 있었으며 이 효과는 3일째까지 유지되었다. 이에 반해 외부 투여된 TGF-β1(2 ng/ml)는 배양 1일째는 유의하게 증가된 당단백 생성 반응을 볼 수 없었고 2일째는 유의한 당단백 생성 증가가 있었으나 이 효과는 3일째 배양에서는 감소되었다(Fig. 5). 즉 치료적 유전자 전달군이 더 효율적이고 지속적인 생물학적 반응을 보였고 외부 투여된 성장인자는 일시적인 반응만 보였다.

3. 배양 방법에 따른 당단백 생성

단층 배양 및 3차원적 배양에서 생리 식염수로 처리한 대조군, TGF-β1(2ng/ml), Ad/luciferase(75 MOI), Ad/TGF-β1(75 MOI) 등을 처리한 군을 비교하면 Ad/luciferase는 기질 생성 반응이 생리 식염수 대조군과 차이가 없으므로 아데노바이러스 감염 자체는 전혀 기질 생성 반응과는 무관함을 증명할 수 있었고 단층 배양에서는 기질 생성 효과가 없었던 TGF-β1가 3차원적 배양에서는 효과가 있었다($p<0.05$). 같은 치료적 유전자를 전달한 경우에는 3차원적 배양군에서 30%의 의의 있는 기질 생성 반응의 증가가 있었다($p<0.05$)(Fig. 6).

고 찰

유전자 치료법은 원하는 유전자를 추간판 세포내로 전달하여 지속적, 내인적 유전자를 발현하게 하여 원하는 생물학적 효과를 얻는 세련된 약물 전달 방법으로 각광 받고 있다. 세포가 생산하는 최종 산물(유전자 발현 산물)은 결국 외부에서 전달된 유전자에 의해서만 생산됨으로 이론적으로 원하는 유전자를 선택하면 원하는 생물학적 효과를 기대할 수 있게된다. 외부에서 유전자적으로 조작된 세포는 일종의 단백질 생산 공장의 역할을 하여 자기자신뿐만 아니라 주위에 유전자적 조작이 안된 세포에도 영향을 미치게 된다[11,25].

인간의 추간판 세포의 대사 연구에서 특히 기질 생성 반응 연구는 단층 배양법보다는 3차원 배양법이 우수함이 보고되었다[10,18]. 추간판 세포에서 TGF-β1의 기질 생성 반응은 아직 논쟁의 여지가 있다. 가토의 추간판 세포를 단층 배양한 다음 TGF-β1를 투여해도 당단백 생성 증가와 같은 기질 생성 반응이 관찰되지 않았는데[26] 이는 아마 단층 배양에 의해서 추간판 세포의 표현 형질 에 변화가 생겨 추간판 세포 대표적인 기질인 당단백의 생성 반응이 감소된 것이라 유추된다[14-16]. 이에 반해서 개의 추간

판 조직 배양에서는 TGF-β1는 효과적인 기질(당단백 및 교원질) 생성 반응을 보였다[29]. 인간의 추간판 세포를 3차원적으로 배양 후 TGF-β1를 투여한 경우 역시 세포 분열의 증가 및 세포주위 기질의 증가된 침착이 보고되었는데 이는 추간판 세포의 표현 형질을 결정하는 배양 방법에 따라 투여된 성장인자의 효과가 변할 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 단층 배양의 경우 과량의 TGF-β1을 투여했음에도 증가된 당단백 생성 반응은 관찰되지 않았지만 같은 단층 배양임에도 아데노바이러스를 이용한 치료적 유전자(TGF-β1 유전자)를 전달한 배양에서는 의의 있는 당단백 생성 반응이 있었다. 75 MOI의 아데노바이러스로 감염 시켰을 때 배양액내 유리되는 치료적 유전자 산물(TGF-β1)의 농도는 3 ng/ml 정도로 측정되는데 이는 외부 투여된 성장인자의 최대 농도 50 ng/ml에 비해서는 상당히 낮아 TGF-β1농도에 의한 단순 비교로 생물학적 반응을 설명할 수는 없고 단지 유전자 전달에 의한 TGF-β1 수용체의 동시 발현 증가, 내인적으로 생산된 TGF-β1 우수한 생활용성, 순간적 고농도 자극에 의한 수용체 포화를 피하는 지속적으로 생산되는 성장인자에 의한 효율적인 생물학적 반응 등이 고려 될 수 있다. 시험관내 실험이기는 하지만 외부 투여된 성장인자 보다는 유전자 전달법에 의해 내인적으로 지속적으로 생성되는 성장인자에 의한 생물학적 효과가 더 우수함이 증명되었다.

단층 배양 및 3차원적 배양에서 바이러스 농도에 의한 당단백 생성은 선형적인 관계를 보이지 않고 어느 정도의 농도에서 고원화되는 반응을 보였는데 이는 임상적 응용에 있어 시사하는 바가 크다. 즉 바이러스 농도를 높여도 반드시 기질 생성반응의 증가로 연관되지 않고 단지 세포 독성 및 전신 반응 등의 부작용이 생길 수 있음으로 적절한 바이러스 농도를 아는 것은 필수적이다. 그렇다고 바이러스 농도만 줄이면 결국 세포내로 전달된 유전자의 총량이 감소함으로 장기간 유전자 발현을 필요로 하는 경우에는 그 치료목적을 달성하기 어려운 면도 고려되어야한다. 그러므로 최대 생물학적 반응을 보이고 세포독성이 없으면서 장기간 유전자를 발현할 수 있는 바이러스 농도를 알아야 하는데 300MOI로 감염시킨 배양에서 가끔 세포 박리 및 생존율 저하가 관찰되었기 때문에 본 연구에서 제시할 수 있는 농도는 100~200MOI 정도 일 것이다.

3차원 배양을 한 경우 유전자 전달군이 모든 농도의 TGF-β1 투여군보다 높은 기질 생성 반응을 보였다. 이는 단층 배양에서도 증명된 바와 같이 유전자 전달법이 기질 생성에 효과적임을 시사한다. 유전자 전달법의 지속적 생물학적 반응을 증명하기 위해 인간의 추간판 세포를 3차원적으로 배양하고 여기에 유전자 전달 및 성장인자를 투여하고 1, 2, 3일 배양하고 각 배양 기간별로 당단백 생성을 보면 유전자 전달한 경우는 지속적으로 증가된 생성 반응이 있었으나 외부 투여된 성장인자의 경우는 배양 2일째 최대 반응이 있고 3일째는 급격히 감소되는 양상을 보여 성장인자의 외부투여는 일시적 반응을 일으키지만 유전자 전달군처럼 지속적인 반응을 일으키지는 못함을 알 수 있다.

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 결과를 요약하면 단층 배양보다는 3차원 배양이 더 효율적인 기질 생성 반응이 있었고 유전자 전달군이 성장인자를 외부 투여한 군보다 지속적으로 증가된 기질 생성 반응을 보였다.

결 론

시험관내 연구에서 치료적 유전자 전달법이 효과적이고 지속적인 기질 생성반응을 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) **Boden SD, Schimandle JH and Hutton WC** : *1995 Volvo Award in basic sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. Spine, 20:2633-2644, 1995.*
4) **Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, et al** : *1995 Volvo Award in basic sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part I: Biology of spinal fusion. Spine, 20:2626-2632, 1995.*
5) **Borenstein D** : *Epidemiology, etiology, diagnostic evalua-*

tion, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheuma - tol, 4:226-232, 1992.

6) **Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al** : *Accelera - tion of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-. Ann. Surg, 208:788-794, 1988.*
7) **Buckwalter JA** : *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 20:1307-1314, 1995.*
8) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, et al** : *Discs degenerate before facets. Spine, 15:111-113, 1990.*
9) **Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, et al** : *Identifica - tion of heterogenous cell populations in normal human intervertebral disc. J Anat, 186:43-53, 1995.*
10) **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.*
11) **Evans CH and Robbins PD** : *Possible orthopaedic appli - cations of gene therapy. J Bone Joint Surg(Am), 77:1103-1113, 1995.*
12) **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.*
13) **Graham FL and Eb Ajvd** : *A new technique for assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virol, 52:456-467, 1973.*
14) **Guo J, Jourdian GW, McCallum DK** : *Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Conn Tiss Res, 19:277-97, 1989.*
15) **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.*
16) **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.*
17) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210, 1981.*
18) **Maldonado BA and Oegema TR**: *Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. J Orthop Res, 10:677-690, 1992.*
19) **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.*
20) **Moon S-H, Kang JD, Nishida K, et al** : *Human cervical intervertebral disc cells are susceptible to adenovirus-medi - ated gene therapy. Proceedings of Cervical Spine Research Society, 1999..*
21) **Moon S-H, Nishida K, Kang JD, et al** : *Human interver - tebral disc cells are genetically modifiable in-vitro by ade - novirus-mediated gene transfer: Implications for the treat - ment of degenerative disc disease. Proceedings of North American Spine Society, 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) **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.*
24) **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 proteo - glycan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orhtop Res, 14:690-699, 1996.*
25) **Robbins PD and Ghivizzani SC** : *Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther, 80:35-47, 1998.*
26) **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.*
27) **Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, et al** : *Effect of growth factors in vivo. Am J Pathol, 129:601-613, 1987.*
28) **Takemi K, Kumano F, An H, et al** : *Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annu - lus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced chemonucleolysis. Tranc Orthop Res Soc, 201, 1999.*
29) **Thompson JP, Oegema TR Jr and Bradford DS** : *Stim - ulation of mature cannine intervertebral disc by growth factors. Spine, 16:253-260, 1991.*
30) **Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, et al** : *Recombinant latent transforming growth factor ß1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth fac - tor ß1, and a different tissue distribution. J Clin Invest, 86:1976-1984, 1990.*
31) **Yeh P and Perricaudet M** : *Advances in adenoviral vec - tors: from genetic engineering to their biology. FASEB Jour - nal, 11:615-623, 1997.*

국 문 초 록

연구계획 : 인간의 추간판 세포를 이용하여 여러 생물학적 상황하에서 기질 생성 반응을 알기 위해 시험관내 실험적 연구를 시행하였다.

연구목적 : 유전자 전달에 이용된 아데노바이러스 농도, 외부 투여된 성장인자 농도, 배양 방법, 배양 기간 등이 인간의 추간판 세포의 기질 생성에 어떠한 효과를 미치는지 알기 위해 연구를 진행하였다.

연구대상 및 방법 : 23명의 추간판 술식을 시행한 환자에서 추간판 세포를 채취 분리 후 단층 배양 및 3차원적 배양을 시행하였다. 다양한 농도의 Ad/TGF-β1와 TGF-β1를 처리하여 기질 생성 반응을 보았다. 당단백 생성은 35S-sulfate을 이용한 Sephadex G-25 PD-10 column chromatography법으로 측정하였다.

결과 : 단층(25 MOI) 및 3차원적 배양(75 MOI)에서 일정 바이러스 농도로 고원화되는 기질 생성 반응이 있었다. 3차원 배양에서는 치료적 유전자 전달로 지속적이고 효율적인 기질 생성반응이 있었으나 외부 투입된 성장인자(TGF-β1)는 일시적인 반응만 있었다. 외부 투입된 TGF-β1는 3차원 배양에서는 기질 생성효과를 발휘하였으니 단층 배양의 경우는 기질 생성 반응이 대조군과 차이가 없었다.

결론 : 치료적 유전자 전달법은 외부 투여된 성장인자에 비해 지속적이고 효율적인 기질 생성 반응을 보였다.

색인단어 : 유전자 치료, TGF-β1, 단층 배양, 3차원적 배양, 당단백

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