대한척추외과학회지 제 7 권 제 4 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 7, No. 4, pp 507~513, 2000

추간판내 유전자 치료
- 퇴행성 추간판 질환에 있어 치료적 의의 -

문성환 · 박문수 · 강용호* · 김형중 · 이환모 · 김남현
Lars G. Gilbertson** · James D. Kang**

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

Intradiscal Gene Therapy
- Therapeutic Implications in Degenerative Disc Disease -

Seong-Hwan Moon, M.D., Moon-Soo Park, M.D., Yong-Ho Kang, M.D.*, Hyung-Jung Kim, M.D., Hwan-Mo Lee, 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, College of Medicine, Konyang University, Taejeon, Korea**
*Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, PA***

– Abstract –

Study Design : In vitro and in vivo studies to determine the anabolic effects of intervertebral disc (IVD) to adenovirus-mediated therapeutic gene transfer.

Objectives : To quantify the anabolic effect of human IVD cells in vitro and rabbit IVD in vivo to therapeutic gene transfer.

Summary of Literature Review : An alternative possibility to delivery of growth factors, in continuous manner, is the genetic modification of disc cells through gene transfer. Contemplating to extend this approach to treatment of disc degeneration, it is necessary to demonstrate anabolic effect of human IVD cells and rabbit disc to therapeutic gene transfer.

Materials and Methods : In vitro: IVD tissue was obtained from twelve patients. IVD cells were then isolated, cultured, and transduced with Ad/TGF-β. Genetically modified disc cells were incorporated into alginate beads and cultured. In vivo: Fifteen skeletally mature New Zealand white rabbit were used. 15ul of saline containing Ad/TGF-β were injected into the nucleus pulposus of the disc in six rabbits. All rabbits were sacrificed 6 weeks after surgery. Nucleus pulposus tissues were harvested, weighted, and cultured. Conditioned medium of alginate bead and rabbit disc tissue cultures were subjected to ELISA to detect TGF-β production. Newly synthesized proteoglycan were analyzed using chromatography on Sephadex G-25 in PD-10 columns after S35-sulfate incorporation.

Results : Concentration of TGF-β increased over time in alginate beads cultures transduced with Ad/TGF-β. At 6 weeks nucleus pulposus tissue from the disc injected with Ad/TGF-β exhibited 200% ($p<0.05$) increase in TGF-β production. There was statistically significant 290% increase in newly synthesized proteoglycan in alginate cultures transduced with Ad/TGF-β ($p<0.05$) compared to control. At 6 weeks nucleus pulposus tissue from the disc injected with Ad/TGF-β exhibited 85%

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

increase in proteoglycan synthesis ($p<0.05$) over that of intact control.
Conclusion : In this study, we observed the robust upregulation of proteoglycan synthesis in gene transferred disc cells in vitro and in vivo - indicating good prospects for biologic effects of therapeutic gene therapy in the disc using adenovirus-mediated approach.

Key Words : Gene Therapy, Proteoglycan, Disc Degeneration, TGF-β

서 론

퇴행성 추간판 질환은 요통의 원인 중 25%를 차지하며 이로 인한 의료비 및 환자의 고통은 증가하고 있다[1,5]. 퇴행성 추간판 질환은 이론적으로는 추간판내 당단백(proteoglycan)의 감소로 추간판의 생역학에 변화가 오게 됨으로[7,8,14] 척추의 퇴행성 변화를 일으키게 되는데 이로 인하여 다양한 임상증상 즉 추간판 내장증, 추간판 탈출증, 척수증, 신경근 병변, 척추관 협착증을 야기한다.

성장인자는 추간판의 기질을 생성시키는 효과가 있음이 보고되었는데 이는 성장인자의 투여가 추간판의 변성에서 기질 생성을 자극함으로서 치료적으로 이용할 수 있음을 암시한다[19, 22, 23]. 1990년대 초부터 임상적으로 적용되고 있는 유전자 치료는 외부에서 필요로 하는 유전자를 전달체(vector)를 사용하여 목표조직에 전달하여 유전자 조작된 목표조직이 원하는 유전자 산물을 지속적으로 그리고 내인적으로 생산하게 하는 방법이다[11, 20]. 저자들은 이러한 유전자 전달법을 이용하여 가토의 추간판 조직에 표식 유전자 및 치료적 유전자의 전달을 보고하였으나[17, 18] 3차원적으로 배양된 인간의 추간판 세포의 치료적 유전자 전달의 효과 및 실험동물 추간판의 치료적 유전자 전달의 장기 추시된 효과는 아직 연구되지 않았다.

그리하여 본 연구에서는 첫째, 3차원적으로 배양된 인간의 추간판 세포에 치료적 유전자를 전달하고 기질 생성 반응을 알아보고, 둘째, 가토의 추간판에 치료적 유전자를 전달하고 6주간 추시 후 유전자 전달에 의한 기질 생성 반응을 알아보는 것이다.

연구대상 및 방법

1. 아데노바이러스 재조합

E1 및 E3 유전자부분이 결여돼 성장이 제한된 제5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식 유전자로 luciferase, 치료 유전자로 TGF-β1 유전자를 재조합하였다. 모든 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되게 재조합 되었다. 재조합된 아데노바이러스는 human embryonic kidney 293 cell에서 증식시켰다[13, 16, 25]. 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 PFU이고 1 PFU는 100 virus particles로 정의하였다.

2. 인간의 추간판 세포를 이용한 시험관내 실험

추간판 탈출증, 척추관 협착증 등의 추간판 술식이 행해진 12명의 환자에서 경추 및 요추부 추간판을 채취하였다. 추간판의 퇴행 정도는 수술전 자기공명영상을 이용하여 Eyre등[12]이 보고한 방법으로 분류하였다. 본 연구에서는 추간판 퇴행에 따른 효과를 없애기 위해 퇴행 3, 4기의 추간판 조직만 이용하였다. 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。C에서 60분간 소화 시킨다. F12/DMEM으로 세척 후 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II(Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제2의 효소용액으로 역시 37。C에서 12시간 정도 소화시킨다. 분리된 추간판 세포는 F12/DMEM으로 세척후 Nylon 여과지(pore size 75㎛)를 사용하여 부유 조직을 제거한다. 세포 생존성 검사[15] 및 세포밀도를 계산한 후 $5x10^5$ 세포/㎖의 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. 3주간 배양된 추간판 세포에서 배양액을 제거한 다음 GBSS로 세 번 세척 후 총 농도 75MOI를 이루는 적절한 조합의 아데노바이러스를 포함한 GBSS를 첨가하고 37。C에서 60분간 감염시켰다. 아데노바이러스 첨가 전 및 첨가 후, 혹은 추가 배양 후 세포 생존성 검사[15] 및 평균 세포수를 측정하였다. 0.15M NaCl 용액에 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 102mM $CaCl_2$ 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 세척한후 alginate bead는 24well culture plate각 well에 10개씩 넣고 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin을 함유한 F12/DMEM을 사용하여 48시간 37。C 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

3. 가토를 이용한 생체내 실험

15마리의 성숙한 가토(체중 4~5kg)를 사용하였으며 전신마취하에 좌측 후복막 도달법으로 가토의 추간판을 노출시켰다. 6마리의 가토에게는 Ad/TGF-β1($6x10^6$ PFU)을 포함한 15ul 생리식염수용액을 28gauge 주사기로 노출된 제 2~3, 3~4, 4~5요추 추간판에 주입하였다. 추간판내 수핵부위에 정확히 주입되었는지를 확인하기 위해서는 수핵내 양 압력으로 주사기가 뒤로 반등하는 현상을 이용하였다. 4마리의 가토에는 바이러스 대조군으로서 Ad/luciferase($6x10^6$ PFU)를 포함한 15㎕의 생리식염수를 주입하였다. 나머지 5마리의 가토에는 바이러스를 함유하지 않은 15㎕의 생리식염수만을 추간판에 주입하였다. 수술 후 가토는 사육장에서(4000 sq.cm) 자유롭게 사육되었다. 수술 후 6주에 ketamine(25.0 ㎎/㎏) 근육주사와 sodium phenobarbital(1.2g/㎏) 정맥주사로 희생되었다. 무균적 조작으로 추간판을 채취하고 정량 후 혈청을 함유하지 않은 Newman-Tytell medium에 배양하였다.

4. TGF-β1 농도 측정(전달 유전자 발현)

TGF-β1농도는 배양된 인간 추간판 세포와 가토 수핵조직의 상층액으로부터 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)(R&D system, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정하였다. 모든 시료는 HCl을 사용하여 활성화되어 TGF-β1 전체농도(활성현 및 비활성형)을 측정하였다.

5. 새로 생성된 당단백

인간의 추간판 세포 배양에 ^{35}S-Sulfate(20uCi/㎖)를 함유한 Newman-Tytell medium으로 배양 조건을 바꾼 후 4시간 추가 배양하고 0.15M NaCl로 세척 후 55mM sodium citrate로 alginate bead를 용해시킨 다음 8M guanidine hydrochloride, 20mM EDTA, proteinase inhibitors 혼합액을 첨가 후 4 ℃에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다[2].

가토의 수핵조직 배양을 역시 ^{35}S-Sulfate(10uCi/㎖)를 함유한 Newman-Tytell medium으로 배양 조건을 바꾼 후 48시간 추가 배양하고 0.1m/l phosphate buffer(pH = 5.7), 0.005M EDTA, 0.005M cyteine HCl, 28ug/㎖ papain(Sigma, St. Louis, MO) 상태 하에서 48시간 동안 소화시켰다. 200㎕의 소화액을 Sephadex G-25 PD-10 column을 이용한 Chromatogaphy법으로 용출시켰다. 1㎖의 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.

6. 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

1. 인간 추간판 세포의 생물학적 반응

세포분리, 유전자 전달, 3차원 배양 등의 술식에서도 추간판 세포는 높은 생존율을 보였다(90-95%). 유전자 전달 후 3차원 배양이 시작 될 때 유전자 발현(TGF-β1농도)은 대조군과 같이 거의 측정이 안되었으나 시간이 경과함에 따라 유전자 발현은 증가되어 배양 2일째 3.12 ± 0.28 ng/㎖에 달하였다(Fig. 1). 생리식염수 대조군 및 바이러스 대조군(Ad/luciferase) 배양의 경우는 0.05ng/㎖ 이하의 TGF-β1 농도를 보였다.

배양 2일째 치료적 유전자로 조작된 배양군에서는 대

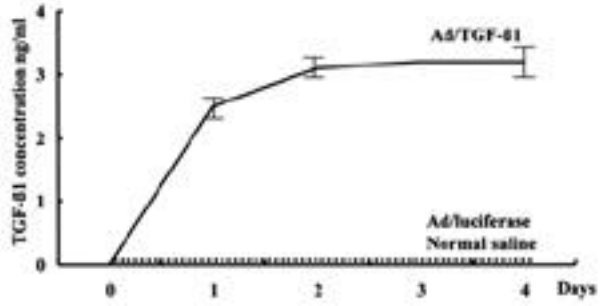

Fig. 1. Concentration of TGF-β1 in supernatant of human intervertebral disc cell cultures, treated with normal saline, adenovirus-luciferase construct(75MOI), and adenovirus-TGF β1 construct(75MOI). Cultures transduced with adenovirus-TGF β1 construct exhibited robust increase in TGF-β1 concentration while control cultures showed negligible amount TGF-β1 concentration.

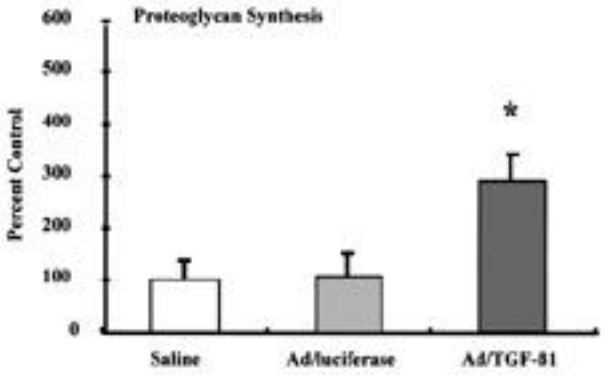

Fig. 2. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of ^{35}S-sulfate. Cultures transduced by adenovirus-TGF β1 construct showed 290% increase in newly synthesized proteoglycan($p<0.05$) compared to those treated with normal saline and adenovirus-luciferase construct.

조군에 비해 290%의 당단백생성 증가가 있었고($p<0.05$) 바이러스 대조군(Ad/luciferase)는 생리식염수군과 당단백 생성에 있어 의의 있는 차이는 없었다(Fig. 2).

2. 가토의 추간판 조직의 생물학적 반응

모든 가토는 수술적 처치에 합병증 없이 생존하였으며 수술 6주 후 희생시에 적출된 추간판의 육안적 소견에서 아무 술식이 가해지지 않은 제 1-2요추 추간판과 같은 소견을 보였으며 조직학적으로도 신생 혈관 형성, 세포침윤 등 염증반응의 소견은 없었다.

치료적 유전자가 전달된 수핵 조직배양에서 생성된 TGF-β1는 대조군에 비해 200%의 증가를 보였고($p<0.05$) 바이러스 대조군(Ad/luciferase)과 생리 식염주 주입군은 TGF-β1농도는 의의 있는 차이는 없었다(Fig. 3).

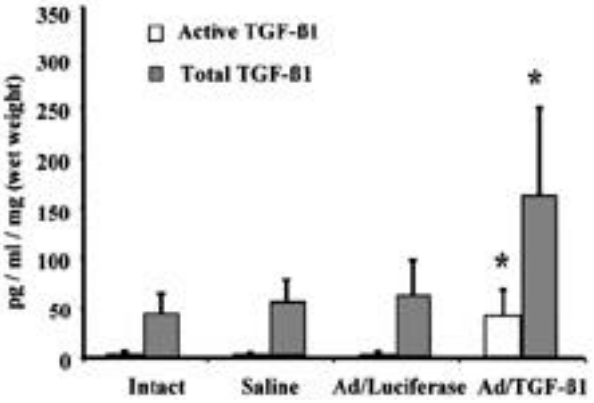

Fig. 3. Concentration of TGF-β1 in supernatant of rabbit intervertebral disc tissue cultures, injected with normal saline, adenovirus-luciferase construct, and adenovirus-TGF β1 construct 6 weeks before. Disc tissues transduced with adenovirus-TGF β1 construct exhibited robust increase in TGF-β1 concentration compared to control tissues.

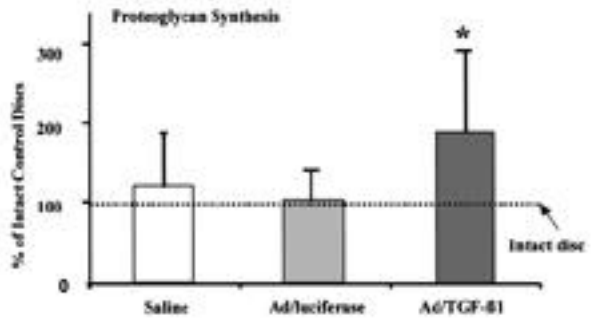

Fig. 4. Content of newly synthesized proteoglycan as assayed by incorporation of ^{35}S-sulfate. Rabbit intervertebral disc tissue transduced by adenovirus-TGF β1 construct showed 85% increase in newly synthesized proteoglycan($p<0.05$) compared to those treated with normal saline and adenovirus-luciferase construct.

치료적 유전자가 전달된 가토의 수핵 조직 배양에서는 대조군에 비해 85%의 당단백 생산 증가가 있었고($p<0.05$) 바이러스 대조군(Ad/luciferase)과 생리 식염주 주입군에서 당단백 생성에 있어 의의 있는 차이는 없었다(Fig. 4).

고 찰

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 증

상 호전을 위한 고식적인 방법이었다. 이와는 대조적으로 실험적 접근으로 추간판 조직에 치료농도의 성장인자를 주입하여 기질 생성을 유도하는 생물학적 방법이 소개되어 추간판 변성의 가능한 치료방법으로 제시되었다[19, 22, 23]. 성장인자의 생물학적 효과는 여러 종류의 조직에서 조직 재생의 기전으로의 유용성이 검증되었으나[3,4,6] 외부 주입된 성장인자는 특징적으로 짧은 생물학적 반감기를 가지며[21,24] 이로 인하여 만성적 경과를 취하는 질환일 경우에는 임상적으로 이용하기에 무리가 있다. 즉 조직내 치료적 농도를 지속적으로 유지하기 위해서는 지속적으로 침습적인 방법을 이용하여 성장인자를 주입하여야하는데 이는 임상적으로 불가능한 방법이다. 이러한 이유로 치료적 혹은 예방적으로 기질 생성을 자극하는 성장인자의 효과적, 지속적인 전달 방법의 개발이 필요로 하였다.

유전자 치료법은 원하는 유전자를 추간판 세포내로 전달하여 지속적, 내인적 유전자를 발현하게하여 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.

본 연구에서는 외부에서 TGF-β1 유전자를 인간의 추간판 세포 및 가토의 추간판 조직에 전달하여 과연 전달 유전자가 발현되는지 그리고 발현된 유전자 산물로 기질생성과 같은 생물학적 효과가 있는지를 알아보았다. 아데노바이러스를 이용하여 외부 투입된 유전자는 성공적으로 인간의 추간판 세포 및 가토의 추간판 조직에 전달되었으며 전달된 유전자는 효율적으로 유전자 발현 산물을 생산하였고 이로 인하여 3차원적으로 배양된 인간의 추간판 세포 및 생체내의 가토 추간판 조직은 의의 있게 당단백 생성증가를 보였다. 이러한 연구 결과로 아데노바이러스를 이용한 치료적 유전자 전달법이 퇴행성 추간판 질환에서 기질을 재생시키는 효과적인 치료 기전임을 알 수 있다. 본 연구의 중요성은 다음과 같이 요약될 수 있다. 첫째, 인간의 추간판 세포가 아데노바이러스를 이용한 치료적 유전자 전달에 효과적인 기질 생성증가 반응을 보였는데 이는 인간 추간판 세포를 이용한 점이나 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달임을 감안하면 처음으로 시도되었고 증명되었다는 것이다. 둘째, 인간의 추간판 세포의 대사 연구에서 특히 기질 생성반응 연구는 단층 배양법보다는 3차원 배양법이 우수함이 수차례 보고되었는데[10,15] 본 연구에서도 유전자 전달이라는 세련된 방법의 효과를 alginate gel을 이용한 3차원 배양상태에서 증명하였으므로 그 의의는 크다고 하겠다. 셋째, 생체내 현상은 시험관내 실험에 비해서 포괄적이고 궁극적인 생물학적 반응을 일으키는데 이런 면을 고려하면 치료적 유전자를 가토의 추간판에 주입하고 6주간 사육 후 추간판의 기질 생성반응을 증명한 생체내 연구의 가치는 높게 평가될 수 있겠다. 본 연구의 제한점도 간과되어서는 안 된다. 첫째, 치료적 유전자로서 TGF-β1만 사용하였는데 이는 복잡하고 상호 보완적인 생체내 기질 생성반응을 고려하면 부족한 점이 많다. 이를 극복하기 위해서는 향후 연구에서는 다중 치료적 유전자 전달의 생물학적 반응이 다루어져야 하겠다. 둘째, 본 연구에서는 가토의 정상 추간판을 유전자 전달 목표 조직으로 선택하였는데 이는 향후 임상적으로 유전자 전달법이 추간판 퇴행의 치료에 적용된다고 생각하면 본 연구의 결과는 아직 타당성 증명에 불과하게 된다. 비록 추간판 변성 혹은 퇴행의 실험동물 모델이 제시되기는 했지만[14] 그 효용성을 볼 때 대표적 질환 모델로 인정하기에는 무리가 있다. 그리하여 새로운 추간판 변성의 질환 모델이 필요하며 이런 모델이 계발된다면 이를 이용한 유전자 전달의 치료적 효과를 궁극적으로 증명할 수 있을 것이다.

결 론

인간의 추간판 세포를 이용한 시험관내 실험 및 가토를 이용한 생체 실험의 결과로 볼 때 아데노바이러스를 전달체로 이용한 추간판내 유전자 치료법은 퇴행성 추간판 질환의 치료 및 예방에 임상적으로 적용 가능한 기전을 제공한다.

REFERENCES

1) **Anderson JAD** : *Back pain and occupation. The lumbar Spine and Back Pain. Third Edition, Edited by MIV Jayson. London. Chirchill 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 evaluation, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheumatol, 4:226-232, 1992.*

6) **Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al** : *Acceleration 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** : *Identification 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 applications 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) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210, 1981.*

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

16) **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.*

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

18) **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.*

19) **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, 14:690-699, 1996.*

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

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

22) **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 chondroitinase ABC-induced chemonucleolysis. Tranc Orthop Res Soc, 201, 1999.*

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

24) **Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, et al** : *Recombinant latent transforming growth factor 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor 1, and a different tissue distribution. J Clin Invest, 86:1976-1984, 1990.*

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

국 문 초 록

연구 계획 : 인간의 추간판 세포와 가토의 추간판 조직을 이용하여 시험관내 및 생체내 실험적 연구를 시행하였다.
목 적 : 3차원적으로 배양된 인간의 추간판 세포와 생체내의 가토의 추간판에 치료적 유전자를 전달하고 기질 생성 효과가 있는지를 알아보는 것이다.
대상 및 방법: 12례의 추간판 술식에서 채취된 추간판 조직에서 세포를 유리하고 이를 3차원적으로 배양한 후 Ad/TGF-β1으로 감염시켰다. 15마리의 가토를 사용하여 전방 도달법으로 추간판을 노출시키고 Ad/TGF-β1을 주입한 다음 6주 후 희생시켰다. 배양액의 TGF-β1농도는 ELISA법으로 측정하였고 새로이 생성된 당단백은 35S-sulfate을 이용한 Sephadex G-25 PD-10 column chromatography법으로 측정하였다.
결 과 : Ad/TGF-β1로 감염된 인간의 추간판 세포에서 TGF-β1생성은 증가하였고 Ad/TGF-β1로 감염된 가토의 추간판 조직은 대조군에 비해 200%의 TGF-β1생성 증가가 있었다. Ad/TGF-β1로 감염된 인간의 추간판 세포에서 290%의 당단백 생성 증가가 있었고($p<0.05$) Ad/TGF-β1로 감염된 가토의 추간판 조직은 대조군에 비해 85%의 당단백 생성 증가가 있었다($p<0.05$).
결 론 : 시험관 및생체내 실험에서 유전자 전달군은 대조군에 비해 의의 있는 당단백 생성 증가가 있었는데 이는 아데노바이러스를 이용한 추간판내 유전자 전달법이 추간판 퇴행의치료와 예방에 적용가능한 접근법임을 시사한다.

색인단어 : 유전자 치료, 당단백, 추간판 퇴행, TGF-β1

※ 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