

## 시험관내 배양된 추간판 세포에서 성장인자가 제 1형 및 제 2형 교원질 합성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

이 진 우 · 김 남 현

### — Abstract —

### Change of Type I and Type II Collagen Biosynthesis by Growth Factors in Cultured Cells Isolated from Rabbit Intervertebral Disc

Jin Woo Lee, M.D. and Nam Hyun Kim, M.D.

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

Growth factors influencing the function of chondrocytes are insulin-like growth factor I(IGF-I), basic fibroblast growth factor(bFGF), transforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1), and epidermal growth factor(EGF). To find out the role of four kinds of growth factors in the biosynthesis of type I and II collagen represented as the phenotype of the disc cells, we cultured the disc cells isolated from rabbit intervertebral discs primarily and then checked cell proliferation, the expression of type I and II procollagen mRNA, and the immunohistochemical stains with type I and II collagen antibodies during in vitro culture in the maintenance medium containing low serum concentration with adding four kinds of growth factors. The results are as follows. FBS(10% Fetal bovine serum) group showed the highest cell proliferation potential. EGF and TGF groups showed remarkable cell proliferation, but there was no significant difference in IGF and FGF groups comparing to control group. A partial clone that encodes the rabbit type II procollagen C-propeptide region(RbCol2A1) was successfully isolated by reverse transcription-polymerase chain reaction using total RNA extracted from articular chondrocytes of rabbits. The identity of the cDNA clone was confirmed by DNA sequencing of the polymerase chain reaction products. A comparison of human  $\alpha$ 1(II) cDNA sequence showed high sequence homology(83.6%). Type I procollagen mRNA expressed highly in EGF group. FGF, IGF,

---

\* 통신저자 : 이 진 우

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

Tel : 02) 361-5640, Fax : 02) 363-1139

\* 본 연구는 연세대학교 의과대학 강사 연구비의 지원으로 이루어졌음(과제번호 1997-20).

and TGF groups showed no significant expression comparing to control group. FBS group showed lower expression than control group. Type II procollagen expression was increased with passage of time, so at Day 10 it was the highest in all groups. Control group showed the highest expression among 6 experimental groups. The expression of type II procollagen in FGF and TGF groups was slightly lower than that of control. EGF and IGF groups showed markedly decreased expression comparing to control group. That in FBS group was the lowest, so it was three times lower than control group. In immunohistochemical stains with type I collagen, there was no difference among control, FBS, and EGF groups. FGF, IGF, and TGF groups showed increased positivity on stain comparing to control group, but the positivity didn't exceed 10%. For type II collagen, EGF and FGF groups showed decreased positivity, but there was no significant difference in FBS, IGF, and TGF groups comparing to control group. On the basis of this study, it may be concluded that TGF- $\beta$ 1 showed the possibility of regeneration or delay the degeneration process of the intervertebral disc through the contribution to the stimulatory effects of cell proliferation and the synthesis of type II collagen. For the clinical use of this, more studies about the combination effects with FBS or other kinds of growth factors and finding out the ideal concentration about TGF- $\beta$ 1 will be needed.

**Key Words :** Disc cell, Degeneration of intervertebral disc, Type I collagen, Type II collagen, Northern blot hybridization, Immunohistochemical stain

## 서 론

추간판은 척추의 굴곡과 신전을 담당하는 후관절과 함께 척추간 관절을 이루는 3개 관절 복합체 중의 하나이다. 추간판은 섬유륜(anulus fibrosus)과 수핵(nucleus pulposus)으로 구성되어 있으며, 척추에 가해지는 압박력, 회전력 및 긴장력에 저항하는 기능을 가지고 있고, 그 기능은 추간판의 구조와 밀접한 관계가 있다. 정상 추간판의 생역학적 기능은 섬유륜의 동심원 구조에 포함된 수핵의 복합 구조에 의해서 일어난다. 수핵은 단백다당(proteoglycan)과 제 2, 9, 11형 교원질(collagen)로 구성되어 있고, 섬유륜은 제 1형 및 제 2형 교원질의 독특한 배열로 이루어져 있으며, 내측 섬유륜은 순수한 제 2형 교원질로 이루어져 있지만 외측으로 갈수록 제 1형 교원질이 풍부해지고, 또한 단백다당도 점진적으로 감소한다<sup>9)</sup>. 추간판내에는 여러군의 세포가 존재하는데 섬유륜에는 주로 제 1형 및 제 2형 교원질을 분비하는 섬유아양 세포(fibroblast-like cell)가 주종을 이루며, 수핵내에는 제 2형 교원질만을 분비하는 연골세포양 세포(chondrocyte-like cell)로 이루어 지며, 소량의 척색 세포가 존재한다<sup>11)</sup>. 즉 추간판의 주된 구성 물질은 제 1형 및

제 2형 교원질과 단백다당이며, 소량의 제 5, 6, 9, 11형 교원질이 존재한다. 따라서 추간판 세포의 표현형(phenotype)은 교원질과 단백다당으로 표현된다고 할 수 있다<sup>9,24)</sup>.

생후 추간판은 혈관이 없어져 무혈성 조직으로 변화되어 주위조직으로부터 확산에 의해서만 영양공급을 받게된다. 추간판의 퇴행성 변화는 노화에 따라 서서히 진행되어, 다양한 척추질환을 야기시키며 결국 노년기에는 척추의 퇴행성 변화가 생긴다<sup>10,23)</sup>. 사람은 50-70%가 일생중 한 번 이상의 척추동통을 경험하게 되고 이중 5-10%는 3개월 이상 지속되는 만성 척추질환으로 이행된다<sup>23,28)</sup>. 추간판의 퇴행성 변화는 여러 가지 요인, 즉 세포내 영양공급의 감소, 추간판내 살아있는 세포수의 감소, 추간판 세포의 노화(cell senescence), 기질 단백의 전사후 변화(post-translational protein modification), 변성된 기질단백의 축적, 기질의 피로 부전(fatigue failure) 등에 의하여 생기며, 이들 중 추간판내의 영양 공급 감소가 가장 중요한 역할을 한다고 한다<sup>10,37)</sup>. 조직학적으로는 구형의 연골세포양 세포(spherical chondrocyte-like cell)의 감소와 길어 진 모양의 섬유아 세포(elongated fibroblast-like cell)가 증가하며, 섬유륜의 균열이 발생하고, 단백다당과 수분의 감소, 비교원

질성 단백질의 증가를 관찰할 수 있다<sup>10,18</sup>. 또한 퇴행성 변화의 초기에는 제 2형 교원질의 유전자 표현이 일시적으로 증가되었다가 이후에는 감소하는 현상이 생기게 된다<sup>42</sup>. 그리고 퇴행성 변화가 없는 젊은 사람의 경우에는 제 1형 교원질이 제 2형 교원질보다 약 1/1,000배 정도 적다고 하나 퇴행성 변화의 진행과 함께 제 1형 교원질의 비율이 증가하여 상대적으로 그 비율은 1/10배 정도가 된다고 한다<sup>2,14</sup>.

이러한 추간판의 변성을 방지 혹은 재생시킬 수 있는 방법의 개발은 추간판 변성의 기존 치료 개념을 변화시킬 수 있는 획기적인 것으로 현재 여러 가지 연구가 진행되고 있다. 즉 대표적인 방법으로는 정상 수핵 조직을 효소(chymopapain 혹은 chondroitinase ABC)로 처리하여 새로운 조직의 재생을 얻고자 하는 방법으로 이는 오래된 기질을 제거함으로써 세포의 분열을 촉진시켜 새로운 기질의 형성을 시도하고자 하는 것이다<sup>1,6,25,34</sup>. 그러나 이러한 시도는 추간판내에 살아있는 세포의 수가 제한되어 있고 변성된 조직의 재생을 막는 기계적 요소가 남아있는 문제가 있다. 최근에 가장 가능성이 높은 방법으로 제시되는 것은 변성된 추간판 조직의 제거와 함께 인공기질(artificial matrix)을 삽입하거나, 성장 인자를 주입한다거나, 간질 세포(mesenchymal cell) 혹은 연골 세포를 이식하는 방법들이 있다<sup>16</sup>. 이들 중 성장인자는 특히 관절연골의 재생에서 획기적인 결과를 나타내는데, 이는 연골 세포의 증식과 간질 생산을 자극하여 조직재생에 관여하는 것이다<sup>17,20,26</sup>. 관절연골 세포에 영향을 미치는 성장인자로는 insulin-like growth factor I (IGF-I), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), epidermal growth factor (EGF) 등이 알려져 있다<sup>4,17,12,22,27,48</sup>. 이 중 TGF- $\beta_1$ 이 가장 큰 영향을 미치는 것으로, 실험동물의 부분 연골 손상 모델에서 TGF- $\beta_1$ 을 적용함으로써 연골의 재생을 얻었다는 보고가 있으며<sup>20</sup>, 이는 연골세포의 증식과 함께 제 2형 교원질의 생산 증가 및 단백다당의 생산 증가를 유발시키기 때문이라고 한다. 그러나 추간판 세포에 대한 성장인자의 작용에 대한 보고는 미미한 상태이며<sup>40,44</sup>, 여러 가지 성장인자의

작용에 의한 추간판 세포의 증식, 교원질 합성 및 단백다당의 합성에 대한 포괄적인 자료는 아직 없다. 이렇게 추간판에 대한 연구가 미미한 이유로는 추간판은 무혈성 조직이므로 그 유용성에 대한 평가가 저하되어 있기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 점은 성장인자의 직접 주입, 생물학적 전달자(biologic carrier)에 의한 주입 혹은 추간판 세포의 시험관내 배양을 통한 성장인자의 노출 후 이식을 통하는 방법 등을 이용하면 이러한 단점을 극복할 수 있을 것으로 생각된다<sup>12,16</sup>.

이 연구에서는 추간판 세포의 표현형으로 대별되는 제 1형 및 제 2형 교원질의 합성에 있어서 4가지 성장인자의 역할을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

New Zealand White strain 토끼(몸무게 2 kg 이상, 생후 20주 이상) 30마리를 암수 구별없이 사용하였다.

### 2. 실험방법

토끼의 추간판을 적출하여 추간판 세포를 분리한 후 시험관내에서 배양하여, 네가지 성장인자 (EGF, bFGF, IGF-I, TGF- $\beta_1$ )를 투여하며, 시간 경과에 따라 제 1형 및 제 2형 교원질의 합성변화를 관찰함으로써 추간판 재생을 위한 성장인자의 역할에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다. 그리고 실험은 다음과 같이 6개군으로 나누어 실시하였다.

- 1 군: 대조군으로 유지 배지에서 배양한 군
- 2 군: 10% 우태혈청(fetal bovine serum, Hyclone, Logan, Utah, USA)이 함유된 배지에서 세포를 배양한 군
- 3 군: 유지 배지에 EGF(Boehringer-Mannheim)를 10ng/ml가 되도록 투여하여 세포를 배양한 군
- 4 군: 유지 배지에 bFGF(Boehringer-Mannheim)를 10ng/ml가 되도록 투여하여 세포를 배양한 군
- 5 군: 유지 배지에 IGF-I (Boehringer-Mannheim)을 10ng/ml가 되도록 투여

## 하여 세포를 배양한 군

6 군: 유지 배지에 TGF- $\beta_1$ (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 10ng/ml가 되도록 투여하여 세포를 배양한 군

아래의 모든 과정을 3회 반복하였으며, 실험을 통하여 얻어진 자료는 ANOVA with repeated measure를 통하여 통계적 검정하였다.

### 가. 추간판 세포의 분리 및 배양

추간판 세포의 분리 및 배양은 Brittberg 등<sup>7,8)</sup>의 방법을 변형하여 다음과 같이 분리하였다. 실험동물을 회생시킨 후 복부절개를 통하여 적출한 척추에서 각 추간판 주위의 연부 조직을 제거한 후, 각 추간판의 근위 종판(end plate)을 따라 절개를 넣은 다음 추간판 사이를 벌리고 상, 하 척추체의 종판 연골이 포함되지 않도록 조심하면서 수핵과 이행부(transitional zone)의 조직을 채취하였는데, 수술용 칼을 이용하여 수핵부에서부터 이와 구별되는 구조인 섬유류의 방사형 섬유질이 관찰되기전 부분까지를 채취하였다. 채취된 추간판 조직은 petri dish로 옮긴 후 Dulbecco's modified essential medium(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 약 1×1mm 크기의 작은 절편으로 자른 다음 3차례 DMEM으로 세척하였다. 추간판 조직의 절편을 무균병에 옮기고 10ml의 DMEM에 Collagenase A(1mg/ml, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) 와 DNase I(0.1mg/ml, Boehringer-Mannheim)을 넣은 후 상온에서 3시간 동안 금속봉을 이용하여 천천히 흔들어 주면서 기질을 소화시켰다. 그리고 용액을 취하여 DMEM으로 3회 세척한 후 나일론망(Nylon mesh, 100μm, Spectrum, Houston, Texas, USA)으로 걸려내어 소화되지 않은 추간판 조직을 제거한 다음 trypan blue를 이용하여 생체염색을 실시하고 살아있는 세포수를 hemocytometer로 측정하였다. 1×10<sup>6</sup>개의 세포가 되도록 조절하여 10%의 우태혈청, penicillin과 streptomycin(100U/ml, Gibco BRL)이 포함된 DMEM과 함께 75cm<sup>2</sup> 배양용기에 넣어 37°C,

5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양을 실시하였다.

배양 7일째 배양 용기에 세포가 가득차면 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL)로 처리하여 배양용기에서 세포를 분리한 후 hemocytometer로 세포수를 측정한 다음 1×10<sup>6</sup>개의 세포를 100mm 배양 plate에 분주한 후 10% 우태혈청이 함유된 DMEM에서 2-3일간 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 0.5% 우태혈청, 0.2% Bovine serum albumin(BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA), Insulin-Transferrin-Selenium-X(Gibco BRL)와 항생제가 첨가된 DMEM의 유지 배지(maintenace medium)에서 serum deprivation을 24시간 실시한 후 6개군으로 나누어 실험을 실시하였으며, 배양 1일, 5일 및 10일에 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 떼어낸 다음 분석에 이용하였다. 배지는 2일에 한 번 교환하였으며 배지 교환시 각군의 해당 성장인자는 계속 공급하였고, 분리한 세포는 -70°C에서 보관하였다. 일부 세포는 6-well plate에 동수로 분주하고 위에서 기술한 바와 같이 6개군으로 나누어 배양을 실시하면서 시간 경과에 따른 세포의 증식능을 측정하기 위하여 1일, 5일 및 10일에 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

### 나. 제 1형 및 제 2형 교원질 cDNA의 합성

토끼의 제 1형 및 제 2형 교원질 cDNA를 합성하기 위하여 토끼의 심부 굴곡건(flexor digitorum profundus)에서 분리 배양한 섬유아세포와, 토끼의 관절연골에서 분리 배양한 관절연골 세포의 total RNA로부터 역전사-중합효소연쇄반응을 다음과 같이 시행하였다.

성숙 토끼의 족부에서 심부 굴곡건의 활액막내부분(intrasynovial portion)과 슬관절의 관절연골을 채취하여 추간판 세포의 분리 배양과 동일한 방법(실험2. 가.)으로 섬유아 세포와 관절연골 세포를 분리 배양하였다. 심부굴곡건의 경우 3시간 동안 기질을 소화시켰으며, 관절연골의 경우 5시간 소화시켰다. 직경 100mm의 배양접시에 약 90%로 분포할 때까지 배양한 후 total RNA분리에 사용하였다. cDNA 합성에 사용될 토끼의 total RNA는 High Pure RNA isolation

kit(Boehringer-Mannheim)를 사용하여 배양한 섬유아 세포 및 관절연골 세포로부터 분리하였다. 세포배양 접시에 배양한 세포를 phosphate buffered saline(PBS: 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) 약 20ml로 3회 세척하고, trypsin-EDTA를 처리하여 바닥으로부터 세포를 떼어 미소원침관으로 옮겼다. 미소원침기에서 4,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 세포 침전물을 얻었다. 각각의 세포를 회수하여 -70℃에 보관하였으며 모든 세포가 준비되면 동시에 RNA 분리를 진행하였다. 분리된 RNA용액은 spectrophotometer를 사용하여 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 유출액 내의 total RNA를 정량하였다. 분리된 total RNA는 가능한 한 즉시 실험에 사용하였으며, 다음 실험에 사용하기 위하여 -70℃에 보관하였다.

토끼의 제 1형 및 제 2형 교원질 cDNA의 염기서열 중 일부분을 증폭하기 위하여 기존의 보고된 cDNA 염기서열 일부에 해당하는 각각의 oligonucleotide를 합성하였다. 제 1형 교원질의 경우, Inoue 및 Okazaki<sup>21)</sup>가 보고한 cDNA 염기서열(GenBank accession No. D49399) 중 10번 염기로부터 37번 염기까지의 부위(5' GGA GAG AAA GGT CCC TCT GGA GAG GCT G 3')를 sense primer로 합성하였으며 (RbCol1A2S), 1,554번 염기로부터 1,581번 염기의 역방향에 해당하는 서열을 antisense primer(RbCol1A2AS; 5' TTA TTT GAA ACA GAC TGG GCC AAC GTC C 3')로 합성하였다. 제2형 교원질의 경우, 기존에 보고되어 있는 토끼의 제 2형 교원질 mRNA의 염기서열이 짧아<sup>31,43)</sup> 토끼와 가장 유사한 염기서열을 보이는 GenBank accession No. U62528인 Equus caballus의 제2형 교원질 mRNA의 염기서열 중 3,370번 염기로부터 3,397번 염기까지의 부위(5' CCT GCT GGT CCT TCT GGC CCT AGA GGT C 3')를 sense primer로 합성하였으며 (ECol2A1S), 4,341번 염기로부터 4,468번 염기의 역방향에 해당하는 서열을 antisense primer(ECol2A1AS; 5' TTA CAA GAA GCA GAC GGG CCC TAT GTC C

3')로 합성하였다.

제 1형 교원질에 해당하는 첫 번째 가닥의 cDNA는 실험 2. 나. (2)의 방법으로 분리한 섬유아 세포 total RNA를 template로 사용하였다. 섬유아 세포 total RNA 1μg 및 100ng의 random primer를 섞은 후 최종 용량이 12μl가 되도록 중류수를 가한 다음 70℃에서 10분간 가온하였다. 가온 후 즉시 얼음물에 담가 식히고 다시 상온에서 10분간 방치하여 random primer가 annealing되도록 하였다. 반응이 끝난 후 2 units의 E. coli RNase H를 첨가한 후 37℃에서 20분간 반응시켜 template로 사용되었던 RNA를 분해하였다. 중합반응에 사용되지 않은 primer와 dNTP를 제거하고 DNA를 유출시킨 후 원심분리하여 유출되는 용액을 다음 실험에 사용하였다. 제 2형 교원질에 해당하는 첫 번째 가닥의 cDNA는 미리 분리한 관절연골 세포 total RNA를 template로 사용하였으며 제1형 교원질과 동일한 방법으로 합성하였다.

각각 합성된 첫 번째 가닥의 cDNA 용액 5μl에 20 pmole의 sense primer와 20 pmole의 antisense primer를 첨가한 후 1 unit의 Taq polymerase(Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)가 함유된 PCR 반응액(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0)을 첨가하여 최종부피가 50μl가 되게하고 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 첨가한 primer는 제 1형 교원질의 경우 RbCol1A2S 및 RbCol1A2AS이고, 제 2형 교원질의 경우 ECol2A1S 및 ECol2A1AS이었다. 중합효소 연쇄반응의 온도변화 주기는 일차로 94℃에서 5분간 변성시킨 후 94℃에서 30초 동안 변성, 52℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분간의 합성과정을 30회 반복하였다. 최종으로 72℃에서 10분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5μl를 취하여 1% (w/v) agarose gel 전기영동을 시행하고, 나머지 용액은 QIAquick PCR purification kit를 사용하여 중합반응에 사용되지 않은 primer와 dNTP를 제거하여 증폭된 DNA를 분리하였다.

각각의 증폭된 산물을 plasmid vector인 pT7-Blue(R) T vector(Novagen, Madison, WI, USA)에 T4 DNA ligase를 사용하여 결합

**Fig. 1.** The agarose gel electrophoresis for confirming the subclone. The plasmid vector digested with restriction enzyme and cDNA inserts of type I and II collagen(RbCol1A2 and RbCol2A1) were electrophoresed with 0.8% agarose gel. The 1.6 kbp insert for type I collagen and 1.0 kbp for type II were observed both in plasmid and inserts, so we could confirm the subcloning of cDNA inserts of type I and II collagen.(M: marker, P: plasmid, I: insert)

시켰다<sup>36)</sup>. 결합된 DNA는 10 $\mu$ l를 추가 정제과정을 거치지 않고 직접 박테리아의 형질전환에 사용하였으며, 37°C 배양기내에서 16시간까지 배양한 후 형질변형된 colony를 얻었다. 형질변형된 colony를 1.5ml의 LB배지에 접종하여 37°C에서 15시간 동안 진탕배양한 후 alkali lysis 방법<sup>36)</sup>을 변형하여 plasmid의 소량분리를 시행하였다. 소량분리를 통하여 얻어진 DNA 용액 1  $\mu$ l를 취하여 제한효소 5 units으로 37°C에서 2시간 이상 처리하고 0.8% (w/v) agarose gel에 전기영동하여 subclone을 확인하였으며, 역전사-중합효소 연쇄반응의 산물은 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)의 T7 sequencing kit를 사용하여 Sanger 등<sup>38)</sup>의 방법으로 염기서열을 결정하였다.

제 1형 교원질의 경우 2개의  $\alpha$  1 chain과 1개의  $\alpha$  2 chain으로 구성되는데 이 중 그 cDNA 서열이 알려져 있는  $\alpha$  2 chain의 염기 서열을 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응으로 10번 염기

로부터 1,581번 염기까지 약 1.6kb 크기의 cDNA probe를 합성하였다. 제 2형 교원질은 3 가닥의  $\alpha$  1 chain으로 구성되어 있는데<sup>39)</sup>, 이번 연구에 사용한 토끼의 경우 mRNA 염기서열이 3' 쪽의 일부 염기 서열만이 밝혀져 있다<sup>31,43)</sup>. 따라서 종특이적인(species-specific) cDNA probe의 합성과 Nothern blot hybridization의 효율성을 높이기 위하여 기존에 보고되어 있는 토끼의 제 2형 교원질 mRNA의 염기 서열중 3,370번 염기에서 4,368번 염기까지의 염기서열을 이용하여 1.0 kb 크기의 cDNA를 합성하였다. 합성된 제 1형 및 제 2형 cDNA probe를 pT7-Blue(R) T vector에 T4 DNA ligase를 사용하여 결합시켰으며, 결합시킨 plasmid vector를 E. coli에 형질전환시켰다. 형질전환된 E. coli를 충분히 배양한 다음 plasmid를 분리하여 제한효소로 처리하고 0.8% (w/v) agarose gel에 전기 영동을 실시하여 plasmid내에 원하는 cDNA가 잘 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

#### 다. 제1형 및 제2형 교원질에 대한 mRNA 분석 (Nothern blot hybridization)

Total RNA의 분리는 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 냉동 보관된 세포로부터 분리하였다. 분리된 total RNA용액은 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 분리된 total RNA는 가능한 한 즉시 실험에 사용하였으며 다음 실험에 사용하기 위하여 -70°C에 보관하였다. 분리된 total RNA의 formaldehyde agarose gel 전기영동은 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 시행하였다. 각 실험군의 total RNA 6 $\mu$ g을 취하여 재증류수로 6 $\mu$ l가 되도록 한 다음 10×FGRB 2.5  $\mu$ l, formaldehyde 4  $\mu$ l, formamide 12.5  $\mu$ l를 첨가하고 65°C에서 5분간 처리한 후 열음에 식히고 formaldehyde gel loading 완충용액(50% glycerol, 0.1mg/ml bromophenol blue)을 2.5  $\mu$ l를 첨가하여 well에 가하였다. 전기영동은 1×FGRB에서 100 Volt의 일정한 전압하에서 2시간 동안 시행하였다. 전기영동이 끝나면 nylon membrane (Amersham)에 Nothern blot을 시행하였다.

Nylon membrane을 gel로부터 떼어내서 6×SSC로 nylon membrane에 붙어 있는 gel을 제거하고 상온에서 1시간이상 건조시켰다. 건조된 membrane은 UV cross linker(Hoefer)에서 120,000μJ로 RNA를 membrane에 고정시킨 후 hybridization을 시행하였다.

RNA가 transfer된 nylon membrane을 42℃로 유지한 prehybridization 용액[5×SSC, 50% formamide, 5x Denhardt's 용액, 100μg/ml, 0.1% SDS]에 넣고 30분간 prehybridization 시켰다. 미리 준비된 제 1형 및 제 2형 교원질의 cDNA probe와 내부 표준화를 위하여 사용할  $\beta$ -actin의 probe에 방사선 동위원소인 [ $^{32}$ P]를 표시하기 위하여 redi-Prime labeling kit(Amersham)를 이용하여 random primer labeling을 실시하였다. 표지된 probe를 prehybridization 용액에 첨가하여 20시간 동안 42℃에서 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 후 nylon membrane을 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 10분씩 상온에서 3회 세척을 실시하고, 0.2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 68℃에서 10분씩 3회 세척을 실시하였다. Nylon membrane을 비닐랩으로 싸서 BAS cassette에 넣어 1시간 동안 방치시킨후 BAS-2500 phosphimager(Fuji, Tokyo, Japan)를 이용하여 방사능을 측정하였으며, 이후 X-ray 필름에 -70℃에서 24시간 노출시켜 현상하였다.

#### 라. 제 1형 및 2형 교원질에 대한 면역화학 염색

토끼의 추간판에서 분리한 추간판 세포를 7일간 배양한 후 chamber slide(Nunc, Naperville, IL, USA)에 분주한 다음 위에서 기술한 바와 같이 6개군으로 나누어 배양을 실시하면서 배양 1일, 5일 및 10일에 면역화학염색을 실시하였다.

먼저 PBS로 세척한 다음 차가운 acetone 용액으로 7-8분 고정을 실시하고 다시 PBS로 세척하였다. Blocking 항체로 처리후 30분간 방치하였다가 PBS로 세척한 다음 제 1형 및 2형 교원질에 대한 항체(affinity purified goat anti-type I or II collagen antibody, Sourthern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA)

로 37℃에서 1시간동안 반응을 실시하였다. PBS로 세척을 실시한 다음 비특이 peroxidase(nonspecific peoxidase)의 blocking을 위해 PBS에 녹인 0.3% 과산화수소수( $H_2O_2$ )로 30분간 처리하였다. 다시 PBS로 세척 후 biotinylated anti-goat IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 10분간 반응시키고 PBS로 5분간 세척한 다음 peroxidase labelled streptavidin으로 10분간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척하고 chromogen(AEC, DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 투여하고 15분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였으며, 이후 다시 세척하고 coverslip을 덮어 현미경으로 관찰하였다. 정량화를 위하여 3군데의 고배율(400 $\times$ ) 시야에서 염색에 음성을 보인 세포에 대한 양성을 보이는 세포의 백분율을 구하여 각 군 별로 비교분석하였다.

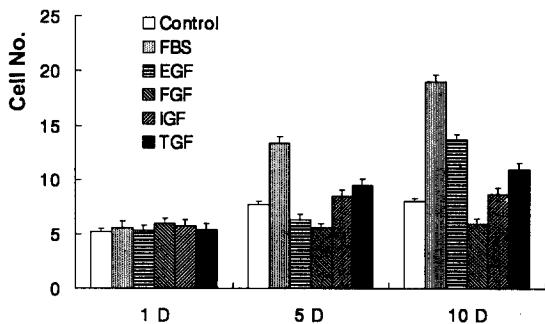
## 결 과

### 1. 추간판 세포의 배양과 증식능

토끼의 추간판에서 collagenase를 이용하여 추간판 세포를 분리한 결과 90%이상 살아있는 세포를 얻을 수 있었고, 이들 세포를 배양용기에 넣고 24-48시간 배양하면 추간판 세포가 배양용기 바닥에 붙는 것을 볼 수 있었는데, 다각형(polygonal)이며 크기가 작은 연골세포양 세포가 주종을 이루었고, 세포의 크기가 크고 일정한 모양이 없는 notochordal 세포를 관찰할 수 있었으며, 비교적 크지 않으며 길쭉한 모양의 섬유아세포도 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

추간판 세포의 증식능은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 우태혈청 투여군(2군)에서 가장 현저한 세포의 증식을 관찰할 수 있었으며, EGF 투여군(3군)이 그 다음으로 빠른 증식을 보였고, 그 다음으로 TGF- $\beta_1$  투여군(6군)과 IGF-I(5군)이 빠른 증식을 보였다. 대조군(제 1군)의 경우 전 실험 기간 동안에 미미한 세포증식을 보였으며, bFGF(4군)군에서 통계적으로 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 이상의 결과로 볼 때 대조군에서 사용한 것과 같은 우태혈청이 매우 적게 함유된 유지배지는 세포 증식의 효과를 최소화하므로 여러 가지 성장인

**Fig. 2.** Microscopic findings of in vitro cultured cells isolated from intervertebral disc of rabbit(x400). The small polygonal-shaped chondrocyte-like cells(A) were mainly observed. the large amorphous notochordal cells(B) and long fibroblast-like cells(C) were observed in small numbers.



**Fig. 3.** The results of cell proliferation. After in vitro culture of disc cells until confluence, the cells were distributed into 6 well plate with same cell concentration( $1 \times 10^5/\text{well}$ ) and cultured with each condition. At Day 1, Day 5, and Day 10, the cell counting was done with hemocytometer. FBS showed the highest stimulatory effect on cell proliferation(\* $p<0.05$ ). (FBS: Fetal bovine serum, EGF: Epidermal growth factor, FGF: basic fibroblast growth factor, IGF: Insulin like growth factor-I, TGF: Transforming growth factor- $\beta_1$ ) \*ANOVA with repeated measure.

자에 의한 효과를 알아볼 수 있는 배지라고 생각된다. 이러한 조건에서 추간판 세포의 경우 EGF 와 TGF- $\beta_1$ 이 유의한 증식효과를 보였으며, IGF-

I과 bFGF는 대조군과 비교하여 유의한 증식의 효과는 보이지 않았음을 알 수 있었다.

### 2. 제 1형 및 제 2형 교원질 cDNA의 합성

합성된 cDNA는 염기서열을 결정하였으며, 제 1형 교원질은 이미 보고되어 있는 염기서열<sup>21)</sup>과 일치함을 확인하였고, 제 2형 교원질은 이미 보고되어 있는 토끼의 제 2형 교원질의 염기서열<sup>31,43)</sup>과 비교해본 결과 5'쪽의 206개의 염기가 과거에 보고되지 않은 새로운 염기서열임이 밝혀졌으며, 이 새로운 염기서열 206개는 Genbank (accession No. AF050170)에 등록하였다. 또한 새로이 밝혀진 206개의 제 2형 교원질 mRNA의 염기서열이 다른 종의 염기 서열들과 유사한지를 검색하였으며, 그 결과 사람의 제 2형 교원질 mRNA의 염기서열<sup>3,41)</sup>과 유사성을 보였으며, 사람의 3287번 염기에서 3492번 염기 (Genbank accession No. X16468)에 해당되었고, 그 일치율은 83.6%였다 (Fig. 4).

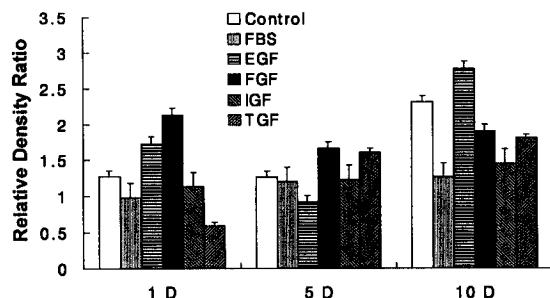
### 3. 시간 경과에 따른 제 1형 및 제 2형 교원질 mRNA의 변화

분리된 total RNA를 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 실시하고 각각의 준비된

Rabbit:	1	CCCCCGGCCCTGCGTCCCTCTGGCAAAGACGGCGCCAATGGAATCCCAGGACCCATCG	60
Human:	3287	CTCCTGGCCCCGTCGGTCCCTCTGGCAAAGATGGTGCTAATGGAATCCCCTGGCCCCATTG	3346
Rabbit:	61	GGCCCCCGGTCCCCGCGACGTTCAAGCGAAACTGGCCCTGCTGGTCTCTGGAAATC	120
Human:	3347	GGCCTCTGGTCCCCGTGGACGATCAGGCAGAACCGGCCCTGCTGGTCTCTGGAAATC	3406
Rabbit:	121	CCGGACCCCTGGACCTCCAGGACCCCCGGGGCATCGACATGTCGCCCTTGCTG	180
Human:	3407	CTGGACCCCTGGTCTCCAGGCCCCCTGGCATCGACATGTCGCCCTTGCTG	3466
Rabbit:	181	GCCTAGGCCAGAGAGAGAAGGGCCC	206
Human:	3467	GCTTAGGCCCGAGAGAGAAGGGCCC	3492

**Fig. 4.** A newly cloned cDNA sequence of type II procollagen C-propeptide region(RbCol2A1). The identity of the cDNA clone was confirmed by DNA sequencing of the polymerase chain reaction products. A comparison of human  $\alpha$  1(II) cDNA sequence showed high sequence homology(83.6%). This newly cloned 206 DNA sequence was registered in GenBank and we could get accession number AF050170.

**Fig. 5.** The results of Northern blot hybridization. The total RNA extracted from each group was electrophoresed with 1% formaldehyde agarose gel. For internal standardization,  $\beta$ -actin was also hybridized. The expression of type I procollagen mRNA was very weak and that of type II procollagen mRNA was promoted with the passage of time.

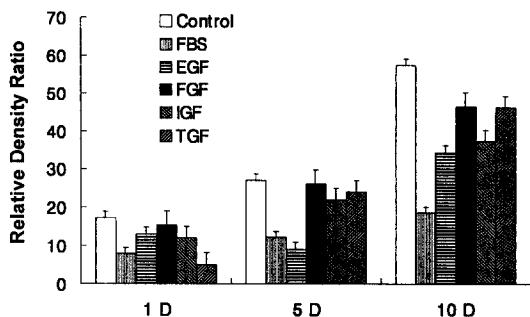


**Fig. 6.** Densitometric analysis of type I procollagen mRNA expression. Standardization by  $\beta$ -actin was done. EGF group showed the highest expression at Day 10(\*p<0.05). \*ANOVA with repeated measure.

cDNA probe (RbCol1A2, RbCol2A1,  $\beta$ -actin)를 이용하여 hybridization을 실시한 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이를 각각의  $\beta$ -actin 값으로 표준화하여 각 군간의 차이를 비교하였다(Fig. 6, 7). 먼저 대조군은 저 우태혈청을 함유한 유지 배지내에서 제 1형 교원질의 mRNA 표현은 1일과 5일 사이에는 별다른 변화가 없다가 10일째에는 증가하는 경향을 보였으며, 제 2형 교원질의 표현은 시간이 경과함에 따라 현저히 증가되는 양상을 보였다. 10% 우태혈청 투여군의 경우 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 mRNA의 표현에 변화가 없었으며, 제 2형 교원질의 mRNA는 시간이 경과함에 따라 그 표현의 증가가 미미하였다. EGF 투여군의 경우 제 1형 교원질은 배양 1일에서 5일사이에 감소하였다가 배양 10일째에 증가하였으며, 제 2형 교원질의 경우 배양 5일까지 감소하다가 10일째에 증가하였다. bFGF 투여군의 경우 제 1형 교원질은 시간 경

과에 따라 감소한 후 별다른 변화가 없었으며, 제 2형 교원질의 경우 시간 경과에 따라 유의하게 증가하였다. IGF-I 투여군에서는 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 차이가 없었으며, 제 2형 교원질은 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. TGF- $\beta_1$  투여군에서 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 점차 그 표현이 증가하였으며, 제 2형 교원질은 시간 경과에 따라 현저히 증가하였다.

제 1형 교원질의 경우 Fig. 5에서 볼 수 있는 것과 같이 모든 군에서 mRNA의 표현이 뚜렷하게 band의 형태로 나타난 군은 없었으며,  $\beta$ -actin으로 표준화한 Fig. 6에서 보는 바와 같이 배양 10일째에 EGF 투여군에서 그 표현이 가장 현저히 증가하였으며, 우태혈청 투여군에서는 시



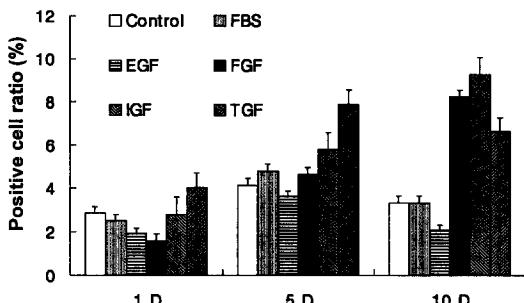
**Fig. 7.** Densitometric analysis of type II procollagen mRNA expression. Standardization by  $\beta$ -actin was done. Control group(maintenance medium only) showed the highest expression at Day 10(\* $p<0.05$ ). TGF and FGF groups showed slight decreased expression, but markedly increased expression comparing to other growth factor groups(\* $p<0.05$ ). \*ANOVA with repeated measure.

간 경과에 따라 아무런 변화가 없음을 알 수 있었다. 제 2형 교원질의 경우 모든 군에서 시간이 경과함에 따라 mRNA 표현이 증가하였으며, 대조군에서 가장 유의하게 증가하였고 그 다음으로 bFGF, TGF- $\beta_1$ , IGF-I, EGF 및 우태혈청 투여군의 순서로 증가함을 관찰할 수 있었다.

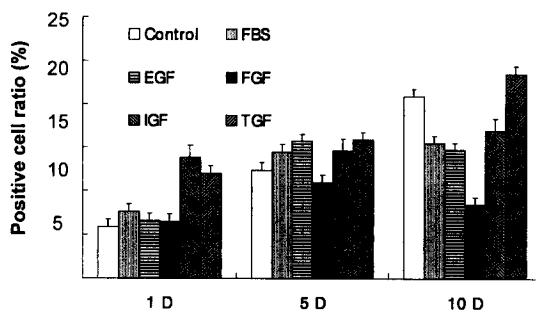
#### 4. 제 1형 및 제 2형 교원질에 대한 면역화학 염색

제 1형 교원질의 항체에 양성을 보이는 세포는 크기가 크고, 길어져 있는 모양을 보이거나 일정한 모양이 없었으며, 제 2형 교원질에 대한 항체는 세포의 크기가 작고 다각형 모양의 세포에서 양성을 보임을 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 먼저 제 1형 교원질의 경우에는 대체적으로 시간 경과에 따라 양성율이 증가하였으나 증가율은 경미하

**Fig. 8.** Microscopic findings of disc cells after immunohistochemical stains. Disc cells cultured under each condition were stained with type I and II collagen antibodies. Type I collagen antibody was positive in the large amorphous cells(A) and type II collagen antibody was positive in the small polygonal cells(B).



**Fig. 9.** Quantitative analysis of immunohistochemical stain to type I collagen antibody. Type I collagen antibody was diluted into 1:50 and used in stains. The results were quantified by counting the positive cells in 3 high power field ( $\times 400$ ). (\*p<0.05) \*ANOVA with repeated measure.



**Fig. 10.** Quantitative analysis of immunohistochemical stain to type II collagen antibody. Type II collagen antibody was diluted into 1:50 and used in stains. The results were quantified by counting the positive cells in 3 high power field ( $\times 400$ ). (\*p<0.05) \*ANOVA with repeated measure.

였으며, IGF 투여군에서 양성을 유의하게 높았다(Fig. 9). 제 2형 교원질의 경우에서도 시간 경과에 따라 점차 증가하였고, IGF 투여군에서 가장 높은 양성을 보여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 10). 각 군별로 살펴보면 먼저 대조군에서 제 1형 교원질은 5일째에 증가하였다가 감소하였고, 제 2형 교원질은 시간 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으나, 그 증가율은 크지 않았다. 우태혈청 투여군에서 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 차이가 없었으며, 제 2형 교원질은 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. EGF 투여군은 제 1형 교원질은 배양 5일째에 증가하였다가 감소하였고, 제 2형 교원

질은 배양 1일과 5일 사이에 증가하였다가 10일째에는 별다른 변화가 없었다. FGF 투여군에서는 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 증가하였고, 제 2형 교원질은 증가하였다가 감소하는 양상을 보였다. IGF 투여군에서는 제 1형 교원질은 시간 경과에 따라 점차 증가하였으며, 제 2형 교원질은 배양 1일, 5일에는 변화가 없다가 10일째에 증가하였다. TGF- $\beta$  투여군에서는 제 1형 교원질은 5일까지는 증가하다가 10일째에는 변화가 없었으며, 제 2형 교원질은 시간 경과에 따라 점차 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다.

## 고 칠

토끼의 관절연골 세포에서 분리한 total RNA를 이용하여 역전사-중합효소 반응을 통하여 얻어진 토끼의 제 2형 procollagen C propeptide를 전사하는 부분적인 cDNA clone(RbCol2A1)을 성공적으로 분리할 수 있었으며, 중합효소연쇄 반응에서 얻은 산물의 염기서열을 결정하여 확인하였다. 이는 지금까지 문헌에 보고되고, Genbank에 등록되어있는 토끼의 제 2형 procollagen의 염기 서열<sup>[31,43]</sup>과 비교하여 C-terminal쪽으로 새로운 206개의 염기서열을 밝혀낼 수 있었다. 이를 사람의 제 2형 교원질의 염기서열<sup>[3,41]</sup>과 비교한 결과 매우 높은 유사성이 있음을 알 수 있었다. 또한 새로이 합성한 cDNA probe를 이용하여 셀유아 세포와 관절연골 세포에서 추출한 total RNA로 Northern blot hybridization을 실시한 결과 적은 양의 total RNA에서도 매우 특이하게 반응하는 것을 확인할 수 있었으며, 종 특이적인 cDNA probe임을 확인할 수 있었고, 제 1형 교원질과의 염기서열의 유사성이나 교차반응은 관찰할 수 없었다.

성장인자는 세포의 분열, 세포분화와 세포의 기질의 합성을 증가시킬 수 있는 분자량이 매우 작은 단백질로 알려져 있으며, 이러한 성장인자는 자연적으로 추출하거나 직접 화학적으로 합성하거나 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 합성할 수 있다. 쉽게 구할 수 있는 성장인자를 이용하여 관절연골 세포와 반응시킴으로써 세포의 분열과 세포의 기질의 생합성을 조절하는 연구가 활발히

진행되고 있다. 이러한 분야에서의 연구는 관절연골과 성장판 연골의 정상적인 생리 현상과 재생과정에 대한 이해를 증진시켰다<sup>12, 26, 27)</sup>. 따라서 성장인자에 의한 추간판 세포의 반응도 추간판의 정상적인 생리현상과 재생과정을 이해하는데 많은 도움을 줄 것으로 생각할 수 있다.

따라서 이번 연구에서는 추간판 세포의 대표적인 표현형인 제 2형 교원질에 초점을 맞추어 성장인자에 대한 반응을 알기 위하여 추간판의 대표적인 성분을 이루는 제 1형 및 제 2형 교원질의 생합성의 변화를 관찰하고자 하였다. 그러나 추간판 세포를 시험관내에서 배양을 하면 관절연골에서 관찰할 수 있었던 계대배양에 따른 표현형의 변화(dedifferentiation process)가 생기고, 연골세포의 분화된 기능을 유지하는데 세포의 기질이 중요하게 작용한다는 것이 밝혀져 있는 상태이므로<sup>4, 5, 29, 35, 46)</sup> 이를 극복하고자 일차배양한 세포에서 연골세포의 표현형이 유지되고 있음을 확인한 후 실험에 사용하였다. 또한 추간판 세포의 배양에서는 혈청의 농도를 최소화함으로써 혈청에 포함되어 있는 조절할 수 없는 여러 가지 요소들을 제한하여 각각의 성장인자에 의한 효과를 파악하고자 하였다. 가장 이상적인 것은 혈청이 없는 배지에 추간판 세포를 배양하면서 성장인자를 투여함으로써 그 효과를 정확히 파악할 수 있을 것으로 생각되어, 예비실험을 통하여 혈청이 없는 배지에서 배양하여 본 결과 추간판 세포가 시간이 경과함에 따라 사멸되었으므로, 배양의 조건을 0.5%의 혈청과 삼투압 조절을 위해 BSA를, free radical의 제거를 위해서는 selenium 등을 첨가하여 최적의 유지배지의 조성을 만들어 사용하였으며, 유지배지 상태에서는 추간판 세포의 증식이 최소화되지만 사멸하지는 않는 것을 확인한 후, 실험을 실시하여 추간판 세포에 대한 성장인자의 효과를 평가할 수 있었다.

먼저 대조군의 경우 증식은 최소화되어 있음을 확인할 수 있었으나 제 1형 및 제 2형 교원질의 mRNA 표현은 시간이 경과함에 따라 증가됨을 관찰할 수 있었고, 특히 제 2형 교원질은 다른 성장인자와 비교하여 그 표현이 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다. 이것은 증식을 최소화하는 유지배지에서는 몇몇 종류의 세포는 분화가 촉진

된다는 보고<sup>15, 30, 39)</sup>에서와 같이 추간판 세포에서도 분화가 촉진됨을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 면역화학 염색에서도 유사한 결과를 보였다. 우태혈청 투여군의 경우 대조군과 비교하여 세포의 증식은 현저히 증가하였으나, 교원질 mRNA 표현은 제 1형과 제 2형 모두에서 오히려 감소하였다. 면역화학염색의 경우도 대조군과 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 이는 시험관내 배양시 세포의 증식이 빠를 경우 상대적으로 세포의 기질의 합성은 오히려 감소하게 되는데<sup>15, 30, 39)</sup>, 우태혈청 투여군의 경우도 이에 해당된다고 할 수 있다.

EGF는 초창기에 발견된 세포활성을 조절하는 물질로 알려져 있다. 조직배양에서 EGF에 대한 추간판의 반응은 연골조직과는 달리 세포증식의 효과보다는 생합성의 기능을 더욱 크게 자극한다고 보고하였다<sup>44)</sup>. 그러나 이것은 EGF가 연골조직에서는 주로 증식 작용에 관여하여 연골세포의 역분화(dedifferentiation)을 막는 작용을 한다고 보고한 것<sup>4)</sup>과는 상이한 결과이다. 또한 O'Keefe 와 Pledger<sup>33)</sup>는 추간판의 성장조절은 관절연골과는 다를 가능성이 있음을 시사하였으나, 본 연구에서 세포배양을 통하여 살펴본 결과 Benya 등<sup>4)</sup>이 보고한 바와 같이 추간판 세포에서도 증식에 주로 관계하며, 세포의 기질의 합성에는 별다른 효과가 없음을 알 수 있었다. 이는 Thompson 등<sup>44)</sup>이 언급한 조직 배양과 세포배양상의 여러 가지 차이점, 즉 세포 분포의 상이함(heterogeneity), 세포의 표현형과 수용체에 대한 세포분리과정중 소화효소 등에 의한 효과 및 세포의 기질에 의한 세포 조절의 소실 등에서 기인된 결과라고 생각된다. 따라서 세포배양의 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법으로 연구를 진행하여 그 결과를 비교하여야 보다 정확한 EGF의 효과를 정의할 수 있을 것으로 생각된다.

bFGF는 주로 중배엽 기원 조직의 mitogen으로 알려져 있다. 관절연골조직에서는 증식의 효과가 생합성의 기능보다 큰 것으로 보고되고<sup>27)</sup> 있으나 논란의 여지가 있으며, 추간판 조직에서는 추간판 탈출시 혈관의 생성(angiogenesis)을 유도하며, 추간판이 탈출되어 퇴행성 변화를 일으킨 조직에서 더욱 많은 양으로 발견된다고 하여 추간판의 흡수를 촉진시키는 역할을 한다고 하였다

<sup>13, 32, 45)</sup>. 또한 FGF는 수핵보다는 섬유류 부위에서 보다 큰 작용을 하여, 섬유아 세포의 증식과 세포의 기질의 합성을 증가시킨다고 하며, 연골세포양 세포에 대해서는 그 효과가 3배정도 적다고 하였다<sup>44)</sup>. 따라서 본 연구에서는 수핵 및 이행부에서 분리한 추간판 세포에 대해서 증식 및 교원질 합성에 대하여 관찰하였으나 대조군과 비교하여 차이가 없어 그 효과가 없음을 알 수 있었다.

IGF-I은 성장 호르몬의 작용을 중개하며, 연골 재생을 자극하고, insulin과 유사한 작용을한다고 한다. 관절연골 조직에서 연골세포는 IGF에 대한 수용체를 가지고 있어 세포배양에서 세포의 표현형을 유지케하고, 현저한 증식 및 세포의 기질의 합성을 자극하는 효과를 갖는다고 한다<sup>19, 27)</sup>. 그러나 Thompson등<sup>44)</sup>의 보고에 의하면 성인의 추간판 조직에서 IGF-I은 증식 및 생합성 자극이 미미하다고 하였는데, 이는 수용체의 부족과 같은 조직의 상이성 때문이라고 설명하였다. 본 실험에서 세포배양을 통하여 살펴본 결과 세포증식에 대해서는 대조군보다 증가하였으나 유의한 차이는 없었으며, 제 1형 교원질의 mRNA 표현은 대조군과 차이가 없었고, 제 2형 교원질의 경우 대조군보다 오히려 감소되어 있음을 알 수 있었다. 면역조직화학 염색에서도 유사한 결과를 보여 결론적으로 IGF는 추간판 세포에서 별다른 효과가 없음을 알 수 있었다.

TGF- $\beta_1$ 은 성장과 표현형의 중요한 조절자로 알려져 있으며, 많은 종류의 세포가 그 수용체를 가지고 있음이 밝혀졌다<sup>47)</sup>. TGF- $\beta$ 는 세포 주화성(cytotaxis), 연골 유도, pasminogen activator 표현의 억제, 연골에서 세포의 기질합성의 조절등 매우 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>12, 22, 35)</sup>. 연골세포에서도 증식과 세포의 기질의 합성을 증가시킨다고 하나 혈청이 없는 상태에서 배양을 실시할 경우 증식은 증가시키나 세포의 기질의 합성에 대해서는 논란의 여지가 있다. 이번 연구에서는 증식에 대하여는 우태혈청 투여군과 EGF투여군 다음으로 높은 세포증식능이 있었으며, Northern blot hybridization으로 살펴본 교원질의 생합성에 대해서는 EGF와는 달리 제 2형 교원질 mRNA의 표현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. 즉 세포의 증식과 제 2

형 교원질의 합성 증가의 효과를 모두 관찰할 수 있었다. 이는 이미 보고되어 있는 추간판 세포에 대한 TGF- $\beta_1$ 의 효과와도 유사한 결과<sup>16, 40)</sup>로, 관절연골의 재생에 TGF- $\beta_1$ 가 사용되는 것과 같이 추간판의 재생에도 사용될 수 있는 가능성을 보여 준다고 할 수 있다.

## 결 론

이상의 결과를 종합하여 볼 때 세포증식의 측면에서는 우태혈청, EGF, TGF- $\beta_1$ 가 좋은 결과를 나타냈고, 교원질의 생합성 측면에서는 대조군, FGF, TGF- $\beta_1$ 가 좋은 결과를 보여, 두가지 측면에서 볼 때 TGF- $\beta_1$ 가 가장 이상적으로 추간판 세포에 적용될 수 있는 성장인자로 생각된다. 이의 임상적 이용을 위해서는 여러 가지 성장인자, 우태혈청 등과의 복합투여에 대한 반응, 이상적 농도 파악 등 여러 가지 후속되는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

이 논문을 작성함에 있어 실험 지도를 하여 주신 정형외과학교실 이환모 교수님, 약리학교실의 양우익 교수님과 관동의대 박상욱 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

## REFERENCES

- 1) Ando T, Kato F, Mimatsu K, and Iwata H : Effect of chondroitinase ABC on degenerative intervertebral discs. *Clin Orthop*, 318:214-221, 1995.
- 2) Antoniou J, Goudsouzian NM, Heathfield TF, Winterbottom N, Steffen T, Poole R, Aebi M, and Alini M : The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration. *Spine*, 21:1153-1161, 1996.
- 3) Baldwin CT, Reginato AM, Smith C, Jimenez SA, and Prockop DJ : Structure of cDNA clones coding for human type II procollagen.

- The alpha 1(II) chain is more similar to the alpha 1(I) chain than two other alpha chains of fibrillar collagens. *Biochem J*, 262: 521-528, 1987
- 4) **Benya PD, Brown PD, and Padilla S** : Re-expression of the differentiated chondrocyte phenotype requires a plasma/serum factor not replaceable by TGF- $\beta$  or PDGF and blocked by EGF. *Proceedings of the Orthopaedic Research Society*, Atlanta, Georgia, 1988, p 248.
  - 5) **Benya PD and Shaffer JD** : Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gel. *Cell*, 30:215-224, 1982.
  - 6) **Bradford DS, Oegema TR, Cooper KM, Wakano K, and Chao EY** : Chymopapain, chemonucleolysis, and nucleus pulposus regeneration. A biochemical and biomechanical study. *Spine*, 9:135-147, 1984.
  - 7) **Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, and Peterson L** : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331:889-895, 1994.
  - 8) **Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, and Peterson L** : Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop*, 326:270-283, 1996.
  - 9) **Buckwalter JA** : Fine structural studies of the human intervertebral disc. In: White AA, Gordon SL, 1st ed. *Idiopathic Low Back Pain*. St. Louis: CV Mosby, 1982:108-143.
  - 10) **Buckwalter JA** : Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine*, 20:1307-1314, 1995.
  - 11) **Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, and Oegema TR** : Identification of heterogenous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anatomy*, 186:43-53, 1995.
  - 12) **Coutts RD, Sah RL, and Amiel D** : Effect of growth factors on cartilage repair. *ICL*, 46:487-494, 1997.
  - 13) **Doita M, Kanatani T, Harada T, and Mizuno K** : Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine*, 21:235-241, 1996.
  - 14) **Eyre DR and Muir H** : Quantitative analysis of types I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. *Biochim Biophys Acta*, 429:29-42, 1977.
  - 15) **Freshney RI** : Maintenance of the culture: cell lines, In: Freshney IR, 3rd ed. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*, New York, Wiley-Liss Inc, 1994, 149-159.
  - 16) **Gruber HE, Desai TA, Fisher C, and Hanley EN** : Transforming growth factor- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) regulates proliferation and proteoglycan gene expression in diseased human intervertebral disc cells. *J Bone Mineral Res*, 11(S):S300, 1996.
  - 17) **Guerne PA, Sublet A, and Lotz M** : Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 158:476-484, 1994.
  - 18) **Heathfield TF, Goudsouzian NM, Antoniou J, Aebi M, and Alini M** : Collagen and proteoglycan biosynthesis in cells isolated from intervertebral disc tissues of different ages. *Trans Orthop Res Soc*, 149-25, 1997.
  - 19) **Hiraki Y, Inoue H, Kato Y, Fukuya M, and Suzuki F** : Combined effects of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes. *Mol Cell Biochem*, 76:185-193, 1987.
  - 20) **Hunziker EB and Rosenberg LC** : Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg*, 78A:721-733, 1996.
  - 21) **Inoue S and Okazaki T** : Alpha 2 type I collagen gene expression in the rabbit knee ligaments: variations during the newborn development and in the adult age. *Biomed Res*, 16:219-227, 1995.
  - 22) **Jahng JS, Lee JW, Han CD, Kim SJ, and Yoo NC** : Transforming growth factor- $\beta_1$  responsiveness of human articular chondrocytes in vitro: normal versus osteoarthritis. *Yonsei Med J*, 38:40-51, 1997.
  - 23) Juergen K: Natural course and prognosis of intervertebral disc diseases. *Spine*, 20: 635-639, 1995.
  - 24) **Kaapa E, Han X, Holm S, Peltonen J, Takala T, and Vanharanta H** : Collagen synthesis and type I, III, IV, and VI collagens in a animal model of disc degeneration. *Spine*, 20:59-67, 1995.
  - 25) **Kato F, Mimatsu K, Kawakami N, and Miura T** : Changes seen on magnetic resonance

- imaging in the intervertebral space after chemonucleolysis - a hypothesis concerning regeneration of the disc after chemonucleolysis. *Neuroradiology*, 34:267-270, 1992.
- 26) **Kato Y and Gospodarowicz D** : Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J Cell Biol*, 100:486-495, 1985.
- 27) **Kato Y, Hiraki Y, and Inoue H** : Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur J Biochem*, 129:685-690, 1983.
- 28) **Kirkpatrick JS** : Oh, my aching back-evaluation and surgical treatment of lumbar spine disorders. *Southern Medical J* 89(10):935-939, 1996
- 29) **Maldonado BA and Oegema TR Jr** : Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res*, 10(5):677-690, 1992.
- 30) **Maltese WA and Volpe IJ** : Induction of an oligodendroglial enzyme in C-6 glioma cells maintained at high density or in serum-free medium. *J Cell Physiol*, 101:459-470, 1979.
- 31) **Metsaranta M, Kujala UM, Pelliniemi L, Osterman H, Aho H, and Vuorio E** : Evidence of insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Matrix Biol*, 15:39-47, 1996.
- 32) **Nagano T, Yonenobu K, Miyamoto S, and Tohyama M** : Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral disc. *Spine*, 18:1972-1978, 1995.
- 33) **O'Keefe EJ and Pledger WJ** : A model of cell cycle control. *Mol Cell Endocrinol*, 31:167-186, 1983.
- 34) **Patt S, Brock M, Mayer HM, Schreiner C and Pedretti L** : Nucleus pulposus regeneration after chemonucleolysis with chymopapain? *Spine*, 18: 227-231, 1993.
- 35) **Qi WN and Scully SP** : Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor- $\beta_1$ . *J Orthop Res*, 15:483-490, 1997.
- 36) **Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T** : *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp1.21-1.72.
- 37) **Sandra LL, Howard GW, Jeffrey SB, Karl RF, William AE, and Thomas OG** : P31 nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence that canine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells differ in principal organophosphorus biomolecules. *Spine*, 20: 2278-2282, 1995.
- 38) **Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR** : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467, 1977.
- 39) **Schosboe A, Thorbek P, Hertz L, and Krogsbaa-Larsen P** : Effects of GABA analogues of restricted conformation on GABA transport in astrocytes and brain cortex slices and on GABA receptor binding. *J Neurochem*, 33:181, 1979.
- 40) **Song KJ** : Biologic effect of TGF- $\beta_1$  on human intervertebral disc by cell culture system. *J Korean Orthop Assoc*, 30:1489-1495, 1995.
- 41) **Su MW, Lee B, Ramirez, Machado M, and Horton W** : Nucleotide sequence of the full length cDNA encoding for human type II procollagen. *Nucleic Acids Res*, 17:9473, 1989.
- 42) **Takaishi H, Nemoto O, Shiota M, Kikuchi T, Yamada, H, Yamagishi M, and Yabe Y** : Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc. *J Orthop Res*, 15:528-538, 1997.
- 43) **Takahashi H, Yamada H, and Yabe Y** : Preferential expression of alternatively spliced transcript of type II procollagen in the rabbit notochordal remnant and developing fibrocartilages. *Biochim Biophys Acta*, 1350:253-258, 1997.
- 44) **Thompson JP, Oegema TR, and Bradford DS** : Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine*, 16:253-260, 1991.
- 45) **Tolonen J, Gronblad M, Virri J, Seitsalo S, Rytomaa T, and Karaharju E** : Basic fibroblast growth factor immunoreactivity in blood vessels and cells of disc herniations. *Spine*, 20:271-276, 1995.
- 46) **Von der Mark K, Gauss V, Von der Mark H, and Muller P** : Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267:531-532, 1977.
- 47) **Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris**

- CC, and Sporn MB** : Distribution and modulation of the cell receptor for transforming growth factor- $\beta$ . *J Cell Biol*, 105:965-975, 1987.
- 48) **Watanabe N, Rosenfeld RG, Hintz RL, Dollar LA, and Smith RL** : Charaterization of a specific insulin-like growth factor-I/somato-
-