

무혈성 괴사에 이환된 대퇴골두 연골세포의 세포외 기질 mRNA 발현

정환용 · 이우석 · 김상범 · 배인탁 · 박원기

건양대학교 의과대학 정형외과학교실

목적: 대퇴골두 무혈성 괴사의 관절 연골세포에서 제 2형 교원질, aggrecan, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), pigmented epithelium-derived factor (PEDF) mRNAs의 발현 정도를 분석하였다.

대상 및 방법: 대퇴골두 무혈성 괴사로 인공 고관절 전치환술을 시행한 환자의 대퇴골두 관절연골에서 분리 배양한 연골세포를 삼차원 배양하여 제 2형 교원질, aggrecan, VEGF-A mRNA, PEDF mRNA 발현을 실시간 중합효소 연쇄반응법(Real-time PCR)으로 측정하였다.

결과: 대퇴골두 무혈성 괴사군의 관절 연골세포에서 제 2형 교원질과 aggrecan mRNA의 발현은 감소하였다($p < 0.05$). VEGF-A mRNA와 PEDF mRNA의 발현은 정상 연골에 비해 차이가 없었다($p > 0.05$).

결론: 무혈성 괴사에 이환된 대퇴골두 연골세포의 연골 기질 형성 능력이 떨어져 있었다.

색인 단어: 대퇴골두 무혈성 괴사, 연골세포, 제 2형 교원질, Aggrecan, VEGF-A, PEDF

서론

대퇴골두 무혈성 괴사는 골조직에 허혈성 변화라는 측면에서 대퇴골두의 골의 변화와 골조직의 재생에 대한 연구가 대부분이었다^{1,9}. 관절연골에 대해서도 비구측 관절연골의 퇴행성 변화에 대한 연구가 있었으나 대퇴골두 관절연골에 대한 연구는 적었다^{5,8,20}. 대퇴골두를 보존하는 술식은 여러 가지 방법이 소개되었지만 결과는 만족스럽지 못했으며, 대퇴골두가 성공적으로 유지되어도 관절연골의 퇴행성 변화가 발생할 수 있다^{1,9,10}. 일반적으로 관절연골은 혈관이 존재하지 않아 대퇴골두의 골괴사가 발생하여도 관절연골은 비교적 잘 유지되는 것으로 알려져 있는데, Magnussen 등¹⁰은 대퇴골두 무혈성 괴사의 대퇴골두의 붕괴 후 관절연골의 퇴행성 변화에 대한 방사선학적, 조직학적 연구에서 관절연골은 붕괴 후에도 정상적인 연골 상태를 유지한다고 보고하였다. 그러나 관절 연골세포

의 상태와 제 2형 교원질이나 단백다당 등 기질합성에서는 어떤 변화가 있는지에 대해서는 알려진 바가 없었다.

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)는 혈관형성(angiogenesis)에 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있으며, 이를 억제하는 pigment epithelium-derived factor (PEDF)와 균형에 의해 혈관형성이 조절되고 있는 것으로 보고되고 있다⁹. VEGF는 성장기 연골의 혈관형성에 관여하지만, 성인의 정상 관절에서는 발현되지 않는다. 골관절염의 진행된 경우에 관절염의 진행에 관여할 것이라는 점 외에는 그 역할에 대한 연구는 적었다^{4,16,17}. 골조직에서 VEGF-A와 PEDF에 대한 연구는 골조직의 재생이라는 측면에서 많은 연구가 있었으나 대퇴골두 무혈성 괴사의 관절연골에서는 어떻게 발현되는가에 대해선 알려진 바가 없다^{6,13-15}.

따라서 본 연구에서는 대퇴골두 무혈성 괴사의 연골세포를 채취하고 체외 배양을 시행하여, 연골세포의 기질형성 능력을 보여주는 제 2형 교원질과 aggrecan mRNA, 혈관형성과 관절염의 진행에 중요한 역할을 하는 VEGF-A와 PEDF mRNA의 발현정도를 분석하고자 하였다.

투고일: 2008년 8월 13일

1차수정일: 2008년 8월 19일

2차수정일: 2008년 9월 8일

제재확정일: 2008년 11월 24일

※ 통신저자: 이우석

대전광역시 서구 가수원동 685
건양대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL: 82-42-600-6903
FAX: 82-42-545-2373
E-mail: wsleeos@kyuh.co.kr

* 본 논문은 2005년도 건양대학교 명곡 학술연구비에 지원을 받았음.

대상 및 방법

1. 대상

실험군은 대퇴골두 무혈성 괴사(ARCO stage III)로 인

공 고관절 전치환술을 시행한 3명의 환자로, 모두 남자였고, 평균연령은 52(43~58)세 였으며, 다른 질환이나 약물 복용(steroid, immune depressant drug)의 기왕력이 없는 알코올 기인성 대퇴골두 무혈성 괴사를 대상으로 하였다. 대조군은 대퇴골 경부와 골두 골절로 수술을 시행한 환자 중에서 실험군과 연령과 성별이 부합되게 선정하였다.

2. 연골세포의 분리 및 단층 배양

수술시 대퇴골두에서 괴사된 부위의 관절 연골만을 채취하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 4회 세척을 실시한 다음 2×2 mm 크기로 잘게 잘랐다. 잘게 잘라진 시료에 collagenase (Roche, Indianapolis, IN, USA) 4 ml을 2 mg/ml을 넣고 금속병으로 천천히 흔들면서

37°C 로 맞춰진 수조에서 20시간 소화를 시킨 후 원심분리하여 상층액은 제거하였다. 분리된 연골세포를 2회 세척 후 10% 우태혈청이 함유된 Dulbecco's modified essential medium (DMEM)으로 25 cm² 배양용기에서 일차배양(5% CO₂, 37°C incubator)을 하고, 배양액은 2 일마다 교체하였다. 배양된 연골세포는 2회 계대배양하여 증식 후 저장하였다. 연골세포의 표현형 확인을 위하여 제 2형 교원질의 발현을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time RCR)로 확인하였다.

3. 연골세포의 삼차원 배양

분리 배양한 1×10⁵ cell/ml 연골세포를 alginic acid와

Table 1. Primers used for RT-PCR analysis

Primer	Sequences	Forward Reverse	Amplicon size (pb)
β -Actin	5'-AAGGTGACAGCAGTCGGTTGG-3' 5'-GGCAAGGGACTTCCTGTAACAATG-3'		452
Type I collagen	5'-CCTCCTGGCTCTCCTGGT-3' 5'-AGGGAGACCGTTGAGTCCAT-3'		525
Type II collagen	5'-AGAGGGCAATAGCAGGTTCA-3' 5'-GCGTGAGGTCTTCTGTGACC-3'		545
Aggrecan	5'-TCACCAGTGAGGACCTCGT-3' 5'-GGCGGTAGTGGA AGACGAC-3'		492
VEGF-A	5'-TCTTCAAGCCATCCTGTGTG-3' 5'-GGTGAGGTTTGATCCGCATA-3'		615
PEDF	5'-ACGCTATGGCT TGGATTCAG-3' 5'-GGTCAAATTCTGGGTCACCTTC-3'		420

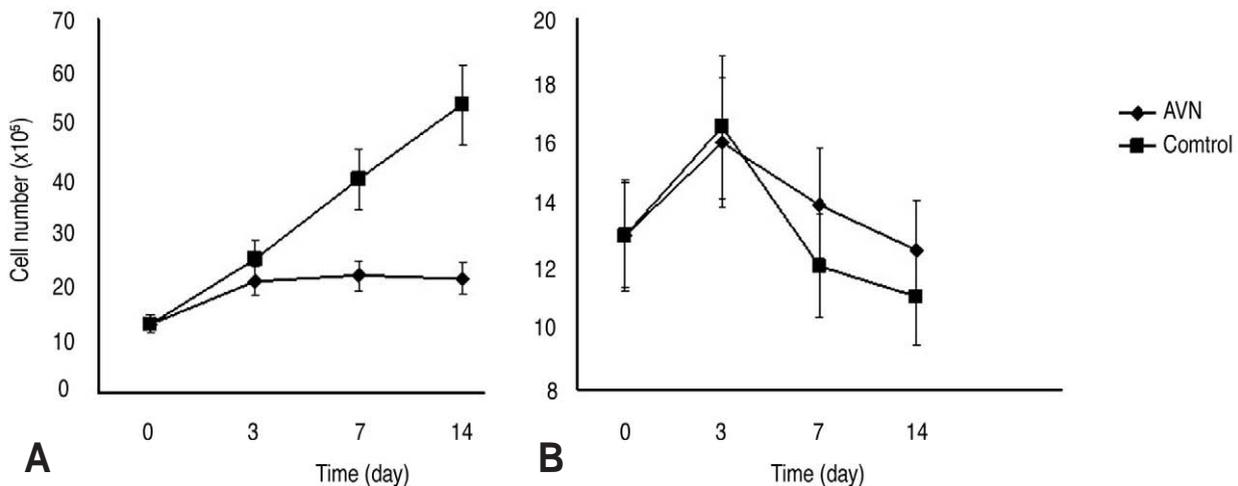


Fig. 1. (A) In monolayer culture, number of chondrocytes increased gradually in control group. In contrast, the number of AVN chondrocytes increased minimally at day 3 and maintained. (B) In 3-dimensional culture, number of chondrocytes showed early increase at day 3 followed by a decrease at day 7. There was no difference between AVN (avascular necrosis) group and control group.

잘 섞어주고 102 mM CaCl₂를 처리한 6 well plate에 각각 분주하였다. CaCl₂를 제거하고 0.15M NaCl로 4회 세척하였다. 배양액을 투여한 후 3일마다 배양액을 교체하면서 3차원 배양을 시행하였다. 배양 7일째 세포와 배양액을 분리하고, 대조군에서도 동일하게 시행하였다. 각각의 분리된 세포와 배양액에서 세포수, 제1형 교원질, 제2형 교원질, aggrecan, VEGF-A, PEDF mRNA를 실시간 중합효소 연쇄반응으로 측정하였다. 각 군의 연골세포와 동일 군내에서 연골세포의 배양과 실시간 중합효소 연쇄반응은 동시에 시행하였다. 세포증식률은 3차원 배양에서 분리된 Bead에 55 mM Sodium citrate를 넣고 상온에서 15분 처리 후 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 55 mM Sodium citrate넣고 2회 반복하여 연골세포를 얻었다. 배양 3, 7, 14일에 일부 세포를 분리하여 0.4% trypan blue로 처리 후 혈구계로 각 군의 세포수를 측정하였다. 또한 별도의 단층 배양을 시행하여 각 군의 세포수를 측정하였다.

4. RNA 분리와 cDNA 합성

배양 7일째에 실험군과 대조군의 연골세포를 분리한 후 TRIzol (Invitrogen, Penrose, Auckland, New Zealand)을 사용하여 total RNA를 분리한 후 spectrophotometer로 RNA 정량하였다. 분리한 total RNA 1ug을 합성하기 위해 SuperSCRIPT First-Strand Synthesis RT-PCR KIT (Invitrogen, Penrose, Auckland, New Zealand)을 사용하였으며, RNA, oligo(dT), dNTPs를 넣고 65°C에서 5분, 10X RT Buffer, 25Mm MgCl₂, 0.1M DTT, RNaseOUT, SuperScript를 넣고 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 한 후 RNase H를 넣고 37°C에서 20분 반응하여 cDNA를 합성하였다.

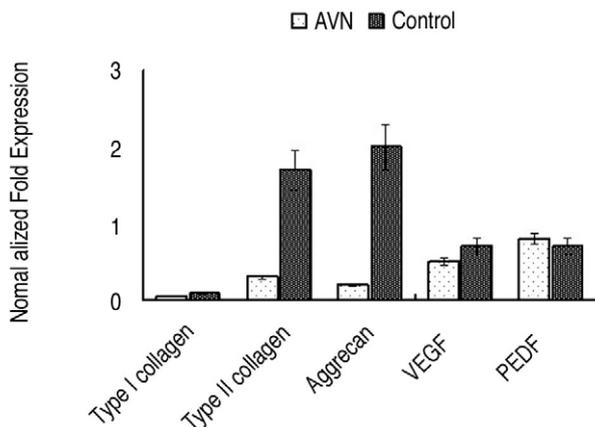


Fig. 2. Real-time PCR analysis of mRNAs of type I collagen, type II collagen, aggrecan, VEGF, and PEDF. The expression of type II collagen mRNA and aggrecan mRNA in AVN group is less than that of control group ($p < 0.05$). The expression of VEGF mRNA and PEDF mRNA in AVN group is same as that of control group ($p > 0.05$).

5. 실시간 중합효소 연쇄반응

제 1형 교원질, 제 2형 교원질, aggrecan, VEGF-A, PEDF, β -actin의 forward primer, reverse primer는 Table 1과 같이 제작하였으며, 실시간 중합효소 연쇄반응은 희석된 cDNA 5 ul와 10 pmol의 forward, reverse primer를 각각 1ul, iQ SYBER Green Supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) 10 ul를 넣고 Nuclease-free water 3ul로 총 용량 20ul로 맞춘 후 IQ5 Real time 기기 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 95°C에서 15초, 56°C에서 15초, 72°C에서 15초의 과정을 55cycle 수행하였으며, 결과는 Bio-Rad iQ5 소프트웨어로 확인하였다. 제1형 교원질, 제2형 교원질, aggrecan, VEGF-A, PEDF mRNA의 농도는 표준곡선에 의해 각각 산출하고 β -actin에 대한 상대치로 비교하였다(Fig. 2).

6. 통계학적인 분석

통계학적 분석은 BIO-PROFIL Bio-1D (VILBER LOURMAT, FRANCE)를 이용하여 분석하였다. 본 실험은 각 군의 각각3개의 관절연골에서 3회 반복하여 실험하였으며, 실험군과 대조군간의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였다. 검정시 유의수준은 p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 연골세포의 증식률

단층배양에서는 피사군의 세포수는 일정하게 유지되었으나, 대조군에서는 지속적으로 증가하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1A). 3차원 배양에서는 피사군과 대조군에서 배양 3일째까지 세포수가 지속적으로 증가하였으나 이후에는 일정하게 유지되었으며 양군 간에 차이는 없었다 ($p > 0.05$) (Fig. 1B).

2. 제1형 교원질, 제2형 교원질, aggrecan에 대한 mRNA의 발현

제 1형 교원질은 양 군간에 차이가 없이 소량 발현하였으며, 피사군에서 제2형 교원질과 aggrecan mRNA의 발현은 대조군에 비해 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 2).

3. VEGF-A와 PEDF에 대한 mRNA의 발현

피사군에서 VEGF-A mRNA 발현은 대조군보다 적게 발현하였고, PEDF mRNA의 발현은 많게 발현되었으나 통계학적인 차이는 없었다($p > 0.05$) (Fig. 2).

고 찰

대퇴골두 무혈성 괴사에서 골두의 붕괴 이전에는 대퇴골두를 보존하는 술식을 사용하며, 경우에 따라서 붕괴 초기에도 대퇴골두의 회복을 유도하려는 시도들이 있었다^{1,9)}. 그러나 붕괴 후 대퇴골두 관절연골에는 어떤 변화가 생기는 지에 대한 연구는 적었으며, 이전의 연구는 비구측 관절연골의 변화나 방사선학적 혹은 조직학적인 변화만을 관찰함으로써 연골세포와 기질형성능의 변화에 대한 연구는 없었다^{2,5,8,11,12,20)}. 관절연골은 혈관을 통한 영양공급보다는 관절액을 통한 영양공급이 이루어져 대퇴골두의 괴사가 진행되어도 관절연골의 상태는 잘 유지되는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서 골괴사군에서는 골관절염 환자에 비해 제 2형 교원질과 aggrecan의 형성능력이 있지만 정상 관절연골보다 감소되어 있었다. 골두를 보존하는 술식이 이루어진다면 붕괴가 있어도 관절연골의 기능을 유지할 수 있을지는 추가적인 연구가 필요하다.

성장기 뼈의 내연골 골화 과정이나 성장관에서 연골화 골에 신생혈관 형성이 관찰되지만 성인관절 연골은 혈관이 없는 조직이다³⁾. 골관절염이나 류마티드 관절염과 같은 병적인 상태에서는 손상된 관절 연골에 혈관을 포함하는 육아조직이 관찰된다^{17,18,19)}. 최근에 혈관생성에 중요한 인자로 알려진 VEGF와 억제인자인 PEDF가 골조직을 포함한 근골격계에서도 생성되는 것으로 밝혀지면서 연골조직에서 이 둘 인자의 발현과 역할에 대해 연구되고 있다^{6,21)}. VEGF는 사람에게 있어서 생리적이거나 병적인 혈관형성에 있어서 주된 인자로 알려져 있으며, 저산소증이나 허혈성 변화에 반응하여 혈관형성의 중요한 매개인자로 작용한다¹³⁾. 최소한 8개 이상의 아형(A, B, C, D, E, F, placental growth factor)이 발견되었으며, 이중 VEGF-A가 성장기와 성인시기에 혈관형성에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{3,16)}. VEGF 수용체는 현재까지 3가지(VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)가 발견되었는데, 성인 혈관에서는 VEGFR-2가 주된 VEGF의 수용체로 작용하는 것으로 보고 있다¹⁶⁾. 혈관 형성 균형을 이루기 위해서는 VEGF-A와 같은 혈관 형성을 촉진인자와 더불어 억제 인자가 필요한데, PEDF가 그 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 이들 인자는 안과 영역에서 각막과 망막의 혈관형성 문제와 중앙에서 신생혈관 형성 측면에서 많이 연구되었으나, 근골격계에서는 이 둘 인자가 발현된다는 정도의 연구에 머물렀다^{14,15,16)}. 저자 등은 골아세포에서 알코올이 VEGF와 PEDF의 발현에 영향을 줄 수 있음을 보고한 바 있으며, Kim 등⁸⁾은 VEGF의 유전적 변이가 골괴사와 관련이 있다고 하였고, 최근에는 VEGF가 치료의 방법으로 이용되고 있다⁷⁾. 그러나 관절 연골에서는 관절염 환자의 연골세포에서 VEGF에 대한 발현에 대한 발표는 있었으나 대퇴골두 무혈성 괴사의 관절연골에서 VEGF와

PEDF의 발현에 대한 연구는 없었다.

골관절염의 발생과 진행에서 VEGF의 역할에 대한 명확한 기전을 알려져 있지 않지만 혈관형성능력에 의한 골극형성, metalloproteinase, interleukin-1, -6을 매개하여 기질 파괴를 유도할 것으로 보고 있다¹³⁾. 관절연골에서 VEGF의 발현을 촉진하는 원인으로는 저산소증, 기계적인 자극, 염증인자 등이 알려져 있으며, 골괴사 환자에서는 이들 인자들의 복합적인 작용으로 VEGF-A/PEDF 비의 불균형을 유발할 것으로 추측된다¹³⁾. 본 연구에서는 괴사군의 연골세포에서 VEGF-A가 대조군에 비해 유의한 발현 증가가 없는 것으로 보아 대퇴 골두 무혈성 괴사의 허혈성 변화가 관절연골의 VEGF와 PEDF 발현에 영향을 미치지 않은 것으로 판단되었다.

본 연구는 대퇴골두 무혈성 괴사에서 골조직과 연골조직의 변화를 규명하기 위한 일련의 실험 과정으로, 대퇴골두 무혈성 괴사의 연골세포에서 기질 형성 능력의 감소와 VEGF, PEDF의 발현을 확인하였다는 의미는 있으나 이러한 변화가 어떠한 과정으로 유도되는지, 관절연골에 어떻게 영향을 미치는 지에 대해서는 규명하지 못한 한계가 있어 추가적인 연구가 필요하다.

결 론

대퇴골두 무혈성 괴사의 대퇴골두 연골세포 배양에서 연골세포의 세포외 기질의 발현 능력이 정상 연골세포에 비해 감소되어 있었으며, 대퇴 골두의 붕괴와 허혈성 변화와 관련성에 대한 규명이 필요하다.

REFERENCES

- 1) Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y and Gersh ME: Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum*, 32: 94-124, 2002.
- 2) Ayrat X, Dougados M, Listrat V, Bonvarlet JP, Simonnet J and Armor B: Arthroscopic evaluation of chondropathy in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*, 23: 698-706, 1996.
- 3) Barnstable CJ and Tombran-Tink J: Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodelling in the bone. *BBRC*, 316: 573-519, 2004.
- 4) Enomoto H, Inoki I, Komiya K et al.: Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*, 162: 171-181, 2003.
- 5) Im GI, Kim DY, Shin JH, Cho WH and Lee CJ: Degeneration of the acetabular cartilage in osteonecrosis of the femoral head: histopathologic examination of 15 hips. *Acta Orthop Scand*, 71: 28-30, 2000.
- 6) Inoue K, Masudo-Hongo K, Okamoto M and Nishioka

- K:** *Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. rheumatol Int, 26: 93-98, 2005.*
- 7) **Katsube K, Bishop AT, Simari RD, Yla-Herttuala S and Friedrich PF:** *Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. J Orthop Res, 23: 469-474, 2005.*
 - 8) **Kim TH, Hong JM, Lee JY et al.:** *Promoter polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene is associated with an osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. Osteoarthritis Cartilage, 16: 287-291, 2008.*
 - 9) **Lyne CJ and Hungerford DS:** *Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment. Curr Opin Rheumatol, 16: 443-449, 2004.*
 - 10) **Magnussen RA, Guilak F and Vail TP:** *Articular cartilage degeneration in post-collapse osteonecrosis of the femoral head. Radiographic staging, macroscopic grading, and histologic changes. J Bone Joint Surg, 87-A: 1272-1277, 2005.*
 - 11) **Magnussen RA, Guilak F and Vail TP:** *Cartilage degeneration in post-collapse cases of osteonecrosis of the human femoral head: altered mechanical properties in tension, compression, and shear. J Orthop Res, 23: 576-583, 2005.*
 - 12) **McCarthy J, Puri L, Barsoum W, Lee JA, Laker M and Cooke P:** *Articular cartilage changes in avascular necrosis: an arthroscopic evaluation. Clin Orthop Relat Res, 406: 64-70, 2003.*
 - 13) **Murata M, Yudoh K and Masuko K:** *The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage. how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? Osteoarthritis Cartilage, 16: 279-286, 2008.*
 - 14) **Pfander D, Kortje D, Zimmermann R et al.:** *Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. Ann Rheum Dis, 60: 1070-1073, 2001.*
 - 15) **Pufe T, Harde V, Petersen W, Goldring MB, Tillmann B and Mentlein R:** *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. J Pathol, 202: 367-374, 2004.*
 - 16) **Pufe T, Kurz B, Petersen W et al.:** *The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system. Ann Anat, 187: 461-472, 2005.*
 - 17) **Pufe T, Lemke A, Kruz B et al.:** *Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. 164: 185-192, 2004.*
 - 18) **Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Frizziero L, Facchini A and Meliconi R:** *Vascular endothelial growth factor activities on osteoarthritic chondrocytes. Clin Exp Rheumatol, 23: 487-493, 2005.*
 - 19) **Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM and Roach HI:** *Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. J Orthop Sci, 8: 849-857, 2003.*
 - 20) **Steinberg ME, Corces A and Fallon M:** *Acetabular involvement in osteonecrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg, 81A: 60-65, 1999.*
 - 21) **Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M et al.:** *Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. Histochem Cell Biol, 123: 275-281, 2005.*

ABSTRACT

The Expression of Extracellular Matrix mRNA in the Chondrocytes of the Femoral Head Affected by Avascular Necrosis

**Whan-Young Chung, M.D., Woo-Suk Lee, M.D., Sang-Bum Kim, M.D.,
In-Tak Bae, M.D., Won-Ki Park, M.D.**

Department of Orthopaedic Surgery, Konyang University College of Medicine, Daejeon, Korea

Purpose: The aim of this study was to evaluate the expression of type II collagen, aggrecan, VEGF-A and PEDF mRNAs in the human chondrocytes derived from the articular cartilage of the femoral heads with avascular necrosis (AVN).

Materials and Methods: We cultured human chondrocytes that were primarily derived from the articular cartilage of femoral heads with AVN. We evaluated the mRNA expression of type II collagen, aggrecan, VEGF-A and PEDF.

Results: The chondrocytes of the AVN group showed decreased expressions of type II collagen mRNA and aggrecan mRNA ($p < 0.05$). The expression of VEGF-A mRNA and PEDF mRNA in the AVN group was the same as that of the normal group ($p > 0.05$).

Conclusion: The cartilage matrix's formation ability was found to be decreased in the chondrocytes of the femoral heads affected by AVN.

Key Words: Avascular necrosis, Chondrocytes, Type II collagen, Aggrecan, VEGF-A, PEDF