

동결견 관절낭 조직의 유전자 발현

Gene Expression in the Capsule Tissue of the Frozen Shoulder

김정만 • 김양수 • 지중훈* • 이재영 • 유현호 • 이윤경

가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원, *대전성모병원 정형외과학교실

목적: 동결견 환자의 관절낭 조직에서 세포의 기질 및 유착분자의 유전자 발현양상을 알아본다.

대상 및 방법: 본원에서 수술받은 20명의 환자에서 회전근 간격의 관절낭 조직을 수술 중에 채취하였다(동결견 환자 15명, 대조군 환자 5명). Oligo array technique을 이용하여 세포의 기질과 유착분자 유전자의 발현을 분석하였다.

결과: 동결견 환자의 관절낭조직에서 여러 세포의 기질과 유착분자들의 유전자들이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 특히 두 배 이상 증가한 유전자들은 다음과 같다. 세포의 기질 유전자중에 Collagen V $\alpha 1/\alpha 3$, VI $\alpha 2/\alpha 3$, VIII $\alpha 1/\alpha 2$, XII $\alpha 1$, XV $\alpha 1$, XVIII $\alpha 1$ 및 CD 44, connective tissue growth factor (CTGF), matrix metalloproteinase (MMP)-9/14, osteonectin, versican, hyaluronan synthase (HAS)-1, extra-cellular matrix (ECM)-1, secreted phosphoprotein (SSP)-1, tenascin C (TNC), thrombospondin 2/4가 있으며, 세포유착분자 유전자로는 catenin $\alpha 1$, selectin p, integrin $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 5$ 과 laminin $\alpha 4$, $\alpha 5$ 들이 동결견 환자에서 두 배 이상 유의하게 증가하였다.

결론: 본 연구에서 여러 세포의 기질 단백질과 유착분자들의 유전자 발현이 동결견 환자에서 유의하게 증가하였다.

색인단어: 동결견, Oligo-array, 세포의 기질, 유착분자

서론

동결견은 건관절의 동통과 운동제한을 가져오는 흔한 질환이다. 일반적으로 동결견의 병태생리학적 과정은 활액막의 염증반응에 따른 관절낭의 섬유화가 기본적인 발병 기전으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 이러한 활액막의 염증반응은 혈관 투과성, 세포의 이동과 분화에 영향을 주는 여러 가지 사이토카인 및 성장인자에 의해 조절된다.^{2,4,5-7)} 지금까지의 보고에 의하면 TGF (transforming growth factor)- β , PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial cell growth factor)-1, vimentin같은 염증성 사이토카인이 동결견의 발생과 관련이 있음이 보고되었으나,^{2,6,7)} 그동안의 연구들은 한 두 가지 유전자에 국한되어 그 기능과 연관성을 확인하

려는 연구가 대부분이었다. 또한 동결견에 있어서 염증성 사이토카인의 발현 여부는 여전히 논란의 여지가 있다. Rodeo 등²⁾에 따르면 동결견에서 TGF- β 와 PDGF가 증가되어 있으며 이는 지속적인 자극을 통해 관절낭의 섬유화를 유발한다고 보고하였으나, Bunker와 Anthony⁸⁾는 TGF- β 와 PDGF를 발현시키는 유전자는 증상이 없는 대조군에서도 나타나고 있다고 보고하였다. 이렇듯 동결견에서 염증 사이토카인 및 관련 인자들에 대한 보고는 많지 않으며 그 역할 또한 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

이에 저자들은 동결견 환자의 관절와 상완 관절에서 활액막에 염증반응이 존재하며, 이는 동결견의 증상발현에 역할을 할 것이라고 가정하였다. 이를 검증하기 위해 동결견 환자의 관절낭 조직을 채취하여 유전자배열기술(gene array technique)을 통해 염증과 조직 섬유화 관련 유전자, 즉 세포외 기질(extracellular matrix) 및 유착분자(adhesion molecule) 유전자의 발현을 조사하였다. 동결견 발생의 기본 병태생리에 대한 이해는 이 흔한 질환을 이해하는데 매우 중요할 뿐만 아니라 새로운 치료제의 개발에 있어서 중요한 초석을 마련하는 과정이 될 것이다.

접수일 2009년 6월 14일 게재확정일 2009년 12월 10일

교신저자 김양수

서울시 서초구 반포동 505, 가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 정형외과학교실

TEL 02-2258-6117, FAX 02-535-9834

E-mail kysos@catholic.ac.kr

*본 연구는 2006년 가톨릭대학교 성의장학금 연구기금으로 진행되었음.

대상 및 방법

본 연구에서는 동결건을 다음과 같은 진단기준에 따라 정의하였다. 첫째, 증상은 점진적으로 나타나며, 둘째, 건관절 운동범위는 능동적, 수동적 범위에서 모두 제한되어 있어야 한다. 셋째, 수동적 운동 범위는 건측에 비해 50% 미만이며, 넷째, 야간통이 동반되어야 한다.⁹⁾ 건관절의 강직을 가져올 수 있는 회전근 개 파열, 골절이 동반된 경우, 장기간 고정 등에 따른 이차성 동결건은 본 연구에서 제외하였다.

총 20명의 환자를 대상으로 시행하였으며 환자는 두 군으로 나누었다. 동결건 환자는 15명이었고, 정상 대조군은 5명이었다. 실험군에 포함된 15명의 질환이환 기간은 수술 전 평균 7.8개월(4-13개월)이었으며, 15명 중 14명이 당뇨병으로 진단을 받았으며 그 외에 갑상선 질환이나 다른 내분비 질환, 신체 장기이상 등의 동반된 질환은 없었다. 실험군 15명 모두의 건관절 운동범위(굴곡, 외회전, 내회전)는 건측에 비하여 50% 미만으로 감소되어 있었다. 대조군은 건관절 전방 불안정성 2명과 상완골 근위부 골절로 수술을 시행한 환자 3명을 대상으로 하였으며 이들 골절환자는 이전에 건관절 병력이 없었던 환자들이다.

관절낭 조직은 동결건 환자와 대조군 모두에서 회전근 간격에서(20 mg) 채취하였다. 대조군 중 전방 불안정성 2예에서는 실험군과 동일한 방법으로 관절경 수술 중 회전근 간격에서 관절낭 조직을 채취하였으며, 나머지 골절 3예에서는 관절경적 정복과정 중 극상근과 견갑하근 사이의 이두근 장건을 따라서 따로 절개를 하여 회전근 간격의 관절낭 조직을 채취하였다. 관절낭 조직에서 세포외 기질과 유착 분자들의 유전자 발현을 Oligo-array technique을 이용하여 검사하였다. 연구방법은 본원의 연구윤리심의위원회(Institutional Review Board)의 검증을 받았으며 환자에게 동의(informed consent)를 구한 후 시행되었다.

1. 세포외 기질과 유착분자의 유전자 발현 검사를 위한 RNA 추출 및 Oligo-array 분석

관절낭 조직은 수술 중 채취하여 TRIzol (Invitrogen, Rockville, MD)을 이용하여 RNA 추출한 후 정량한 1 ug RNA를 가지고 Superscript TM First-strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 cDNA를 만들었다. GEMatrix[®] Series (Bioscience Corporation, Fredrick, MD)를 이용해 세포외 기질과 유착 분자를 검출하였다. 260 nm/280 nm 비율이 1.7 이상인 순도가 높은 RNA를 사용하였으며 만들어진 cDNA에 Biotinylated-UTP를 표지하여 RNA로 다시 증폭, 증폭시킨 RNA는 다시 정제(Purification)하여 Hybridization Array 반응막(membrane)과 혼성화시켰다. 혼성 후 반응막은 차단용액(Blocking Solution Q, SuperArray)를 이용하여 비특이적 반응을 차단하였으며, Alkaline phosphate-conjugated streptavidin과 반응시킨 후 CDP Star 화

학발광 매질(chemiluminescent substrate)을 이용하여 표지 하고, Kodak Bioman light film (Rochester, NY, USA)에 노출시켜 이미지를 스캔하였다. ScanAlyze와 GEMatrix TM Analyzer version 2.5 (Esien, Stanford University)를 이용하여 분석하였다. Microarray blot Image는 웹상의 GEMatrix expression Analysis suite를 통해 변환되었다. 표준화를 위하여 β -2-microglobulin (B2M)과 β -actin (ACTB)을 세포에 고루 발현되는 유전자(house keeping gene)로 사용하여 각 유전자들을 정량하였다.

2. 통계학적 분석

Student t-test와 Mann-Whitney nonparametric U test를 이용해 동결건 환자군과 대조군 간의 유전자 발현양을 비교하였다. p값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

동결건 환자군과 대조군 간의 세포 외 기질 및 유착 분자의 발현양을 microarray blot 상에서 확인하였다(Fig. 1). 그림에서 각각의 점은 해당 유전자의 발현을 의미한다. 본 연구에서 사용한 GEMatrix[®] Series는 collagen (콜라겐), 세포유착분자, 세포 외 기질 등 114개의 유전자와 14개의 control gene (Blank, housekeeping gene)를 합하여 총 128개의 유전자를 포함하고 있다. Table 1은 콜라겐 유전자, Table 2는 세포유착분자, Table 3은 세포 외 기질 유전자 중 대조군과 비교하여 동결건 환자군에서 유의하게 증가된 유전자들을 나타낸 것이다. 이들은 β -2-microglobulin (B2M)과 β -actin (ACTB)을 기준으로 표준화(standardization), 상대정량 후 두 house keeping genes에서 모두 유의한 차이를 보이는 유전자들이다($p < 0.05$).

콜라겐 유전자 중에서 collagen V α 1과 α 3, VI α 2와 α 3, VIII α 1과 α 2, XII α 1, XV α 1, XVIII α 1이 대조군보다 동결건 환자군에서 두 배 이상 증가되었다($p < 0.05$, Table 1). 세포외 성장, 부착과 관련한 유전자들로 catenin α 1, selectin p, integrin α 3, β 2, β 4, β 5와 laminin α 4, α 5가 동결건 환자군에서 대조군보다 통계적으로 두 배 이상 유의하게 증가되었다($p < 0.05$, Table 2). 세포 외 기질 단백질 중에서 CD 44, connective tissue growth factor (CTGF), matrix metalloproteinase (MMP)-9와 14, osteonectin, versican, hyaluronan synthase (HAS)-1, extra-cellular matrix (ECM)-1, secreted phosphoprotein (SSP)-1, tenascin C (TNC)들이 대조군에 비해 동결건 환자군에서 두 배 이상 증가하였고, 그 밖에도 thrombospondin 2와 4가 동결건 환자군에서 대조군보다 두 배 이상 통계적으로 유의하게 증가되었다($p < 0.05$, Table 3). MMP 유전자와 관련하여 MMP 7, 9, 14, 15 유전자, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 2와 3 유전자가 동결건 환자군에서 대조군보다 유의하게 증가되었다($p < 0.05$). 반면, ITG- α 7과 ITG- α 11,

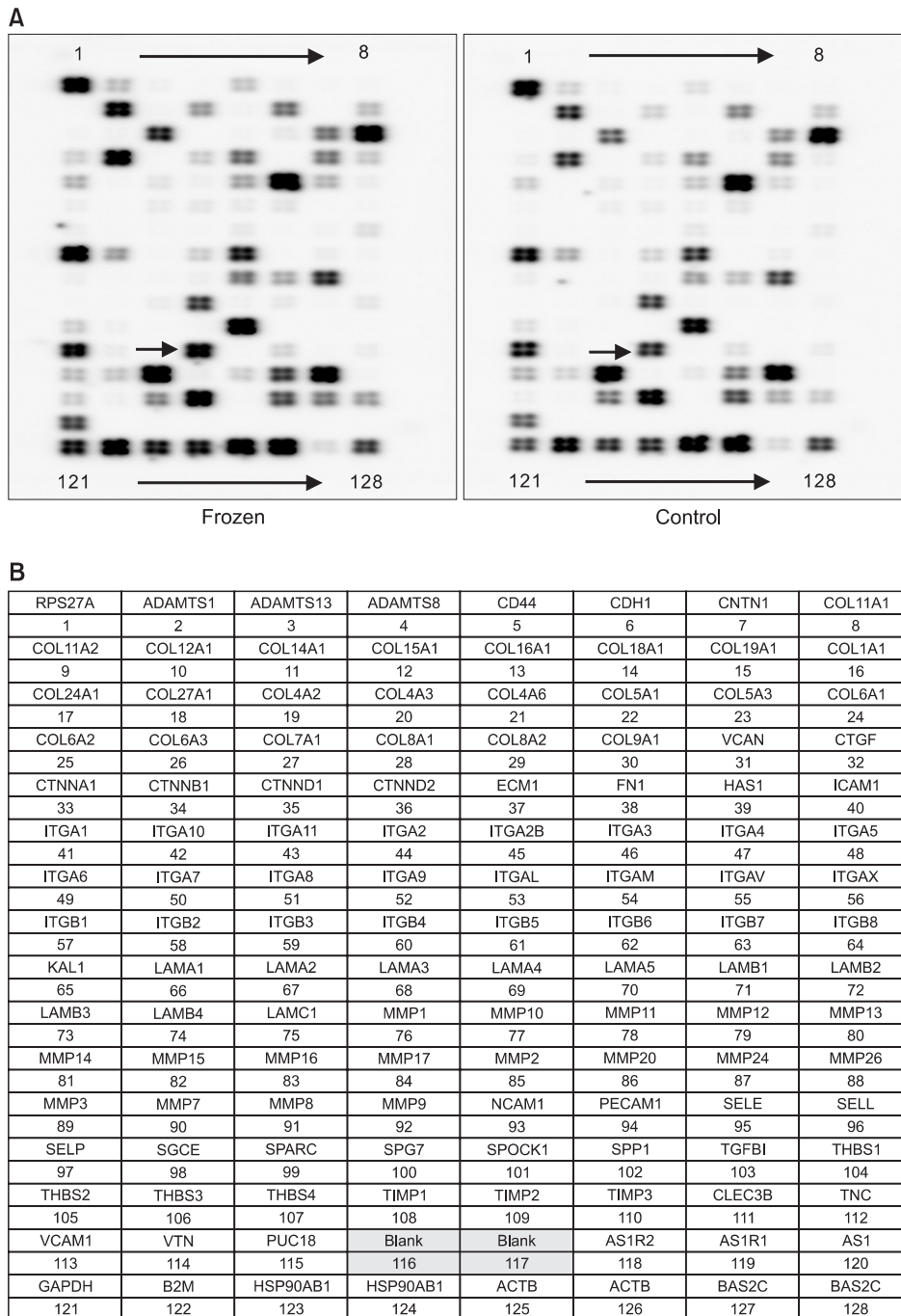


Figure 1. Representative examples of microarray blots of human ECM and adhesion molecules from capsule tissue of the frozen shoulder patient and control. (A) Each spot on the microarray membrane represents the expression of an individual gene. For example, the red arrow indicate the MMP-9 gene on the membrane, which is expressed as dark black dot on the frozen shoulder compared with gray dot on the control shoulder. (B) The map of 128 genes on the membrane of GEMatrix® Series for Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules (Bioscience Corporation, Fredrick, MD). β -2-microglobulin (B2M) and β -actin (ACTB) gene are considered as a control genes, which should have the same expression on both membranes.

콜라겐 type IX 와 XI은 대조군에 비하여 동결견 환자에서 증가하지 않았다. 하지만 이들의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다 ($p > 0.05$).

고 찰

동결견은 초기에는 관절운동의 제한 없이 통증을 시작으로 하여 점진적으로 견관절의 능동적, 수동적 움직임의 제한을 유발하는 형태로서,¹⁰⁾ 동결견의 관절낭은 치밀한 섬유화가 특징이다.

Bunker와 Anthony⁸⁾는 관절낭의 병리학적 소견으로 활액막에서 섬유모세포가 활발히 증식하고 염증반응은 활액막을 침범하지 않은 것으로 보고한 바 있지만, Uittlucht 등¹¹⁾은 동결견의 관절경 소견으로 관절 내 유착이나 퇴행성 변화가 없는 혈관성 활액막염이라 보고하였고, Ogilvie-Harries와 Myerthall¹²⁾은 회전 간격이 염증조직과 단단한 반흔조직으로 가득 차고, 상완 이두건까지 확대되어있는 소견을 보고하였다. 동결견에서 보이는 이러한 소견들은 동결견의 기본적인 병리는 활액막 조직의 염증반응에 의한 것으로 여겨지게 하고 있다. 이러한 활액막의 염증성 변화와 함께

Table 1. Collagens List of Up-regulated Genes in Capsular Specimen from the Patients with Frozen Shoulder ($p<0.05$)

Symbol	GeneBank asscession#	Gene name	Density ratio
Col 4A2	NM_001846	Collagen, type IV, alpha 2	1.8
Col 5A1	NM_000093	Collagen, type V, alpha 1	2.1
Col 5A3	NM_015719	Collagen, type V, alpha 3	4.3
Col 6A2	NM_001849	Collagen, type VI, alpha 2	3.2
Col 6A3	NM_004369	Collagen, type VI, alpha 3	2.1
Col 8A1	NM_001850	Collagen, type VIII, alpha 1	2.6
Col 8A2	NM_005202	Collagen, type VIII, alpha 2	4.2
Col 12A1	NM_004370	Collagen, type XII, alpha 1	2.2
Col 15A1	NM_001855	Collagen, type XV, alpha 1	2.7
Col 18A1	NM_030582	Collagen, type XVIII, alpha 1	2.9
Col 27A1	NM_032888	Collagen, type XXVII, alpha 1	1.4

섬유모세포와 근 섬유모세포의 증식으로 인해 콜라겐 섬유가 합성되고 회전근 간격 및 오구상완인대의 구축과 함께 견관절의 움직임에 제한이 발생한다.^{13,14)} 이번 연구에 따르면 여러 종류의 콜라겐 중에서 기저막의 주요구성 성분들과 결합조직의 세포 사이를 채우고 있는 세포간질조직의 구성성분들의 유전자들이 증가되었으며, type IV $\alpha 2$, V $\alpha 1$ 과 $\alpha 3$, VI $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$, VIII $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$, XII $\alpha 1$, XV $\alpha 1$, XVIII $\alpha 1$, XXVII $\alpha 1$ 이 동결건 환자에게서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 콜라겐은 세포외 기질 단백질의 일종으로 조직의 구조를 유지하고, 세포의 부착, 화학주성, 이동에 중요한 역할을 한다. 콜라겐 type IV, XV, XVIII은 혈관생성을 방해하는 것으로 알려져 있으며, type XV은 방사선에 의한 섬유화나 신장 섬유화 같은 섬유화가 이루어지는 상태에서 높게 측정된다.¹⁵⁾ 콜라겐 type VIII $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ 의 유전자 변형은 피부 결합조직의 변형을 가져오며 혈관생성을 방해한다. 따라서 이러한 콜라겐 유전자들은 동결건 관절낭의 섬유화를 촉진시키며 신생 혈관생성을 방해하는 작용을 하는 것으로 생각된다. 세포외 기질 단백질 중에서 단백질분해효소 MMPs 유전자들 중 기저막의 주요 구성성분의 Collagen 및 Fibronectin, laminin, proteoglycans 성분 분해와 연관되어 있는 MMP7, MMP9 증가되었으며 단백질 분해효소 억제효소인 TIMPs 중 세포외기질과 결합이 많은 TIMP3는 더 많은 증가를 보였다. MMP-9, veriscan, HAS-1, ECM-1, SPP-1, TNC는 대조군에 비해 동결건 환자에게서 그 유전자 발현이 두 배 이상 증가했다. 동결건 환자의 경과를 보면 이러한 인자들이 반흔 형성을 지속적으로 자극하며 조직 재형성을 막는 것으로 알려져 있으며, 특히 MMPs는 이러한 조직 재형성 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ MMPs의 발현은 세포호르몬과 여러 성장인자에 의해 엄격하게 통제되며 이들의 기능은 TIMP-1, TIMP-2 같은 인자에 의해 방해를 받는다. Bunker 등¹⁶⁾은 동결건 환자에게

Table 2. Cell Adhesion Molecules List of Up-regulated Genes in Capsular Specimen from the Patients with Frozen Shoulder ($p<0.05$)

Symbol	GeneBank asscession#	Gene name	Density ratio
CTNNA1	NM_001903	Catenin, alpha 1, 102 kDa	2.6
CTNND1	NM_001331	Catenin, delta 1	1.7
ICAM1	NM_000201	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	1.3
ITGA2	NM_002203	Integrin, alpha 2	1.9
ITGA2B	NM_000419	Integrin, alpha 2b	1.5
ITGA3	NM_002204	Integrin, alpha 3	2.1
ITGA5	NM_002205	Integrin, alpha 5	1.2
ITGA6	NM_000210	Integrin, alpha 6	1.5
ITGB2	NM_000211	Integrin, beta 2	2.4
ITGB4	NM_000213	Integrin, beta 4	2.4
ITGB5	NM_002213	Integrin, beta 5	2.2
ITGB8	NM_002214	Integrin, beta 8	1.2
LAMB1	NM_002291	Laminin, beta 1	1.8
LAMB2	NM_002292	Laminin, beta 2 (laminin S)	1.2
LAMA2	NM_000426	Laminin, alpha 2	1.2
LAMA4	NM_002290	Laminin, alpha 4	2.5
LAMA5	NM_005560	Laminin, alpha 5	3.7
LAMC1	NM_002293	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	1.3
PECAM1	NM_000442	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	1.7
SELL	NM_000655	Selectin L	1.7
SELP	NM_003005	Selectin P	2.0
SGCE	NM_003919	Sarcoglycan, epsilon	1.9
SPG7	NM_003119	Spastic paraplegia 7, paraplegin	1.6
VCAM1	NM_001078	Vascular cell adhesion molecule 1	1.9

서 MMP-14는 발현되지 않았으며 MMP-2, TIMP-1이 증가되어 있다고 보고하였으나 이번 연구에서 MMP-14, MMP-2와 TIMP-1 모두 동결건에서 증가하였으나 MMP-2와 TIMP-1의 증가는 통계적 유의성이 없었다. 타 연구에서 TIMP-1이 동결건 환자에게서 증가되어 있었던 것과 대조적으로 우리 연구에서는 TIMP-2, TIMP-3가 대조군에 비해 동결건 환자에게서 매우 증가되어 있었다. Bunker 등¹⁶⁾에 따르면 동결건 환자에게서 TIMP-1의 증가로 인해 섬유화의 재형성이 방해 받는다고 설명하였으나, 본 연구에서 동결건 환자의 TIMP-1이 증가하지 않는 것으로 보아 동결건 환자 관절낭 조직에서 어느 정도의 섬유화 재형성이 진행되는 것으로 생각할 수 있다. 본 실험에서 thrombospondin (THBS) type 1-4가 동결건 환자에서 유의하게 증가하였다. THBS은 조직의 재형성에 관여하는 당단백으로서 세포의 부착, 분화 및 증

Table 3. Extracellular Matrix Proteins List of Up-regulated Genes in Capsular Specimen from the Patients with Frozen Shoulder ($p < 0.05$)

Symbol	GeneBank accession#	Gene name	Density ratio
CD44	NM_000610	CD44 molecule	2.9
CTGF	NM_001901	Connective tissue growth factor	2.1
ECM1	NM_004425	Extracellular matrix protein 1	3.1
HAS1	NM_001523	Hyaluronan synthase 1	3.0
MMP7	NM_002423	Matrix metalloproteinase 7	1.5
MMP9	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9	4.6
MMP14	NM_004995	Matrix metalloproteinase 14	2.6
MMP15	NM_002428	Matrix metalloproteinase 15	1.5
TIMP2	NM_003255	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	1.2
TIMP3	NM_000362	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	1.6
SPP1	NM_000582	Secreted phosphoprotein 1	3.4
SPOCK1	NM_004598	Sparc/osteonectin	2.2
THBS1	NM_003246	Thrombospondin 1	1.3
THBS2	NM_003247	Thrombospondin 2	2.2
THBS3	NM_007112	Thrombospondin 3	1.5
THBS4	NM_003248	Thrombospondin 4	3.0
TNC	NM_002160	Tenascin C (hexabrachion)	3.3
TNA	NM_003278	Tetranectin	1.8
VCAN	NM_004385	Versican	3.1

식 등에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 특히 THBS type 4의 발현이 대조군에 비하여 동결견에서 세배 가까이 증가하였는데, 최근 보고에 의하면 THBS type 4는 화상환자의 과대상흔(hypertrophic scar) 조직에서 발현이 증가하여 조직의 섬유화와 재형성에 기여한다고 하였다.¹⁸⁾ 따라서 이러한 세포의 기질 단백질의 증가된 발현은 동결견 관절낭의 섬유화와 깊은 연관이 있을 것으로 생각된다. Bensadoun 등¹⁹⁾에 따르면 versican은 근 섬유모세포와 관련이 있으며 초기 콜라겐 합성에서 중요한 역할을 한다. Versican이 hyaluronan receptor CD44에 결합하고,²⁰⁾ 종양의 악성화와 관련이 있는 것으로 알려진 SPP1 (OPN)은 동결견 환자에서 CD44 발현을 조절하므로,²¹⁾ CD44, HAS1, SPP의 증가는 만성 염증에 의한 콜라겐 합성에 의한 것일 수 있다. 특히 versican은 염증에 의한 섬유화의 초기 지표가 될 수 있다.

본 연구에서 여러 가지 T세포 활성화 및 염증과 관련 있는 유전자들, 콜라겐, integrin, laminin과 같은 세포 유착 유전자들이 동결견 환자에서 유의하게 증가되었다. Integrin은 세포 외 기질로의 세포 부착을 조절하며,²²⁾ laminin은 세포부착, 분화, 이동, 신호, 성장, 전이 등에 다양하게 관여한다.²³⁾ 이러한 integrin과 laminin의 작용이 동결견 환자의 관절낭 조직의 특징적인 변화인 관절낭 섬유화, 비후, 구축 등의 조직학적인 변화를 초래하는데 한 역할을

할 것으로 여겨진다.⁸⁾ 한편, 본 연구에서 통계학적으로 유의하지 않지만 ITG- $\alpha 7$ 과 ITG- $\alpha 11$, 콜라겐 type IX 와 XI은 대조군에 비하여 동결견 환자에서 증가하지 않았다($p > 0.05$). ITG- $\alpha 7$ 은 골격근의 myogenic differentiation (근육 분화)에 관여하며,²⁴⁾ ITG- $\alpha 11$ 은 성체 자궁근과 심장근의 발육, 형태 유지에 필수적인 것으로 알려져 있으므로²⁵⁾ 주로 이들 integrin들의 기능은 근육의 형성과 이의 유지와 관계가 있다고 생각할 수 있다. 따라서 관절의 활액막이나 인대 등의 병리적 변화로 발생하는 동결견의 병인과는 무관한 것으로 사료된다. 또한 콜라겐 XI은 연골 세포에서 주로 생성되어 연골기질을 형성하는데 중요한 역할을 하며, 콜라겐 IX은 연골의 fibrils (섬유)의 형성에 중요한 인자로 알려져 있다.²⁶⁾ 이들 콜라겐들은 주로 연골의 형성과 대사에 관여하는 인자들로서 역시 동결견의 병리와는 직접적인 관계가 없는 인자들이다.

본 실험의 결과, 동결견 환자에서 여러 세포의 기질 단백질과 유착분자 유전자가 새로이 발견되었지만, 이 연구에도 몇 가지 한계가 있다. 첫째, 본 실험에 사용된 생검조직이 가지는 한계이다. 즉, 동결견 환자와 비교를 위한 대조군으로서 견관절 불안정성 환자와 상완골 근위부 골절이 있는 환자를 선택한 점과 동결견 환자 대부분이 당뇨병을 기저질환으로 가지고 있다는 점이다. 대조군의 경우, 이러한 조직이 완벽한 정상 대조군을 반영할 수는 없다는 점에서 한계가 있지만, 앞선 연구에서도 이러한 환자들의 조직을 이용하였으며,^{27,28)} 상완골 근위부 골절 환자 중 수술 전에 견관절 장애가 있었던 환자들은 본 연구에서 제외하였기 때문에 이들의 관절낭 조직에 다른 병리소견은 없을 것으로 생각하였다. 동결견 환자의 경우, 당뇨병으로 인한 염증성 변화가 결과에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있다. 둘째, 동결견 환자에서 채취한 관절낭 조직 중 mRNA의 총량이 너무 적어서 분석하기 어려운 경우가 있었다. 수술 중 환자의 관절낭 조직을 충분히 채취하는 일은 그리 쉬운 일이 아니다. 양이 적은 관절낭에서 충분한 양의 mRNA를 얻지 못했을 경우, 우리는 GEArray Amplolabeling-LPR kit protocol을 이용하여 cDNA 증폭을 시행하고, 이를 통해 분석을 위한 충분한 cDNA를 얻을 수 있었다. GEArray TMQ Series Kit를 이용한 oligoarray technique은 많은 유전자를 동시에 검색할 수 있는 새롭고도 유용한 방법이다. 셋째, 이 연구에서 관절낭 조직은 회전근 간격, 즉 회전근 개 중 극상견과 견갑하견 사이에서만 채취하였다. 따라서 이 연구의 결과는 전체 관절 와 상완 관절(glenohumeral joint) 중에서 회전근 간격의 관절낭 조직의 특징을 반영한 결과이다. 이러한 실험결과는 견관절 전체의 병리학적인 변화를 대변한다고 보기 어려운 측면이 있다. 그러나, 많은 저자들은 동결견 환자의 관절 내 주된 병변으로 회전근 간격에 활액막 충혈과 혈관 용모성 활액막염 소견을 보고하고 있으며,^{7,8,14)} 기존의 많은 연구에서도 조직학적 소견은 회전근 간격의 관절낭 조직에 국한되어 있다.^{2,12,13)} Wiley²⁹⁾에 따르면 동결견 환자의 관절경 소견은 유사한 형태의 이두근 주변의 첩포

성 혈관 반응을 보이며 회전근 간격도 유사 소견을 보인다고 보고하였다. 본 연구에서도 동결견 환자의 관절경 소견에서 유사한 관절낭 소견을 볼 수 있었는데, 회전근 간격에서 혈관 육아조직과 붉은 색의 용모성 활액막염이 그것이다. 따라서, 이 부위에서 생검이 이루어져 실험을 진행하였다. 닷째, 실험군 15명에 비하여 대조군 5명은 표본 크기가 너무 작고 두 군 간에 차이가 많아서 통계학적 분석에 신뢰도의 제한이 있을 수 있다. 대조군으로 사용된 환자는 견관절 불안정성 환자와 골절환자들로서 모두 회전근 간격에 병적 소견이 없는 환자들이다. 실험을 위한 조직체취시 환자들의 동의를 얻는 과정에서 병적소견이 없는 정상 조직을 생검해야 하는 현실적 제한이 가장 큰 원인이며, 골절환자의 경우 이전에 동결견을 의심할 만한 병력이 없는 환자들을 대상으로 대조군을 선택해야 하기 때문에 표본 크기가 작아졌다. 이번 연구로 동결견 관절낭의 조직학적 변화 기전을 모두 밝히는 데는 한계가 있다. 본 연구에서 다루어진 여러 유전자뿐 만 아니라 동결견의 병태생리와 관련된 다른 유전자에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 새로이 발견된 이러한 특정한 물질이 동결견의 병태생리를 밝히는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨지며 동결견의 추가 연구에 기본적인 정보를 제공하였다고 생각한다. 또한, 이 연구는 동결견 관절낭에 microarray 기술을 통하여 관련 유전자를 동시에 검색하는 시도하여 의미있는 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구의 결과가 향후 동결견 질환의 병태 생리학에 대한 연구에 기초적인 정보 제공과 방향타 역할을 할 수 있으리라 기대해 본다.

결론적으로 저자들은 GEArray series을 이용한 microarray technique을 통하여 동결견 환자에서 여러 콜라겐 유전자, 세포 유착 분자, 그리고 세포의 기질 단백질 유전자가 유의하게 증가되어있는 사실을 발견하였다. 이 연구는 동결견의 기본적인 병리가 활액막의 염증반응임을 밝혔고, 이는 국소 염증 반응과 관련된 여러 단백질과 유착 분자 유전자가 증가되어 있는 것을 통하여 입증하였다. 또한 본 연구에서 사용한 microarray 기술은 단시간에 많은 양의 유전자를 검색하는 기법으로서 동결견뿐만 아니라 여러 다른 질환의 연구에 그 활용도가 높다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Ramage SC, Urban NH, Jiranek WA, Maiti A, Beckman MJ. Expression of RANKL in osteolytic membranes: association with fibroblastic cell markers. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89: 841-8.
2. Rodeo SA, Hannafin JA, Tom J, Warren RF, Wickiewicz TL. Immunolocalization of cytokines and their receptors in adhesive capsulitis of the shoulder. *J Orthop Res.* 1997;15:427-36.
3. Simmonds FA. Shoulder pain with particular reference to the frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Am.* 1949;31B:426-32.
4. Hannafin JA, Chiaia TA. Adhesive capsulitis. A treatment approach. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;372:95-109.
5. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994;331:1286-92.
6. Kilian O, Pfeil U, Wenisch S, Heiss C, Kraus R, Schnettler R. Enhanced alpha1(I) mRNA expression in frozen shoulder and Dupuytren tissue. *Eur J Med Res.* 2007;12:585-90.
7. Van der Zee E, Everts V, Hoeben K, Beertsen W. Cytokines modulate phagocytosis and intracellular digestion of collagen fibrils by fibroblasts in rabbit periosteal explants. Inverse effects on procollagenase production and collagen phagocytosis. *J Cell Sci.* 1995;108:3307-15.
8. Bunker TD, Anthony PP. The pathology of frozen shoulder. A Dupuytren-like disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77:677-83.
9. Tauro JC. Stiffness and rotator cuff tears: incidence, arthroscopic findings, and treatment results. *Arthroscopy.* 2006;22: 581-6.
10. Grey RG. The natural history of "idiopathic" frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Am.* 1978;60:564.
11. Uitvlugt G, Detrisac DA, Johnson LL, Austin MD, Johnson C. Arthroscopic observations before and after manipulation of frozen shoulder. *Arthroscopy.* 1993;9:181-5.
12. Ogilvie-Harris DJ, Myerthall S. The diabetic frozen shoulder: arthroscopic release. *Arthroscopy.* 1997;13:1-8.
13. Ko JY, Wang FS, Huang HY, Wang CJ, Tseng SL, Hsu C. Increased IL-1 beta expression and myofibroblast recruitment in subacromial bursa is associated with rotator cuff lesions with shoulder stiffness. *J Orthop Res.* 2008;26:1090-7.
14. Meliconi R, Pulsatelli L, Melchiorri C, et al. Synovial expression of cell adhesion molecules in polymyalgia rheumatic. *Clin Exp Immunol.* 1997;107: 494-500.
15. Pushpakom SP, Herrick AL, Kumar S, Worthington J. Polymorphisms in COL15 gene are not associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2008;35:251-3.
16. Bunker TD, Reilly J, Baird KS, Hamblen DL. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82:768-73.
17. Kyriakides TR, Maclauchlan S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:215-25.
18. Paddock HN, Schultz GS, Baker HV, et al. Analysis of gene expression patterns in human postburn hypertrophic scars. *J*

- Burn Care Rehabil. 2003;24:371-7.
19. Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycans in granulomatous lung diseases. *Eur Respir J.* 1997;10:2731-7.
 20. Khan SA, Cook AC, Kappil M. Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22:663-73.
 21. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992;6:2397-404.
 22. Kurokawa A, Nagata M, Kitamura N, et al. Diagnostic value of integrin alpha3, beta4, and beta5 gene expression levels for the clinical outcome of tongue squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2008;112:1272-81.
 23. DeHahn KC, Gonzales M, Gonzalez AM, et al. The alpha4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. *Exp Cell Res.* 2004;294:281-9.
 24. Li J, Rao H, Burkin D, Kaufman SJ, Wu C. The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with alpha7beta1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. *Dev Biol.* 2003;261:209-19.
 25. Velling T, Kusche-Gullberg M, Sejersen T, Gullberg D. cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem.* 1999;274:25735-42.
 26. Blaschke UK, Eikenberry EF, Hulmes DJ, Galla HJ, Bruckner P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J Biol Chem.* 2000;275:10370-8.
 27. Neer CS 2nd, Satterlee CC, Dalsey RM, Flatow EL. The anatomy and potential effects of contracture of the coracohumeral ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;280:182-5.
 28. Sattar MA, Luqman WA. Periarthritis: another duration-related complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1985;8:507-10.
 29. Wiley AM. Arthroscopic appearance of frozen shoulder. *Arthroscopy.* 1991;7:138-43.

Gene Expression in the Capsule Tissue of the Frozen Shoulder

Jung-Man Kim, M.D., Yang-Soo Kim, M.D., Jong-Hun Ji, M.D.*, Jae-Young Lee, M.D., Hyun-Ho Yoo, M.D.,
and Youn-Kyoung Lee, M.S.

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul St. Mary's Hospital,

**Daejeon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose: To investigate the overall expression of extracellular matrix (ECM) and adhesion molecule genes using a gene array technique in the joint capsule of a frozen shoulder.

Materials and Methods: Tissues from 20 human shoulder joint capsules were harvested intraoperatively from patients (15 primary frozen shoulders, 5 controls) in our hospital. The RNA was isolated from the capsule tissue and the gene expression of ECM and adhesion molecules was analyzed using an oligo-array technique.

Results: The expression of several genes of the ECM and cell adhesion molecules was significantly higher in the capsule tissue from patients with a frozen shoulder than the controls. The gene expression of the collagen V $\alpha 1/\alpha 3$, VI $\alpha 2/\alpha 3$, VIII $\alpha 1/\alpha 2$, XV $\alpha 1$, XVIII $\alpha 1$ and ECM proteins including CD 44, connective tissue growth factor (CTGF), matrix metalloproteinase (MMP)-9/14, osteonectin, versican, hyaluronan synthase (HAS)-1, extra-cellular matrix (ECM)-1, secreted phosphoprotein (SSP)-1, tenascin C (TNC), thrombospondin 2/4 was two times higher in the frozen shoulder than the control. Several cell adhesion molecules genes including catenin $\alpha 1$, selectin p, integrin $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 5$ and laminin $\alpha 4$, $\alpha 5$ were also two times higher in the in the patients with a frozen shoulder than the control.

Conclusion: The gene expression of several ECM proteins and adhesion molecules is significantly higher in patients with frozen shoulder.

Key words: frozen shoulder, oligo-array, extracellular matrix, adhesion molecule

Received June 14, 2009 **Accepted** December 10, 2009

Correspondence to: Yang-Soo Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea

TEL: +82-2-2258-6117 **FAX:** +82-2-535-9834 **E-mail:** kysoos@catholic.ac.kr