

골관절염 연골세포에서 진행성당화종말생성물에 의한 기질단백분해효소 발현의 증가

울산대학교 의과대학 서울아산병원 알레르기 류마티스내과학교실, 아산생명공학 연구소*

나성수 · 최인영* · 문세환* · 김용길 · 문희범 · 유 빈 · 이창근

= Abstract =

Advanced Glycation End Products Increase Matrix Metalloproteinases in Human Osteoarthritic Chondrocytes

Seong-Su Nah, In-Young Choi*, Se Hwan Mun*, Yong Gil Kim,
Hee-Bom Moon, Bin Yoo, Chang-Keun Lee

*Division of Allergy and Rheumatology, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Institute for Life Science*, Seoul, Korea*

Objective: Although increased expression of receptor for advanced glycation end products (AGE) in osteoarthritis (OA) has been reported, little is known concerning the role of AGEs in the pathogenesis of OA. This study was undertaken to determine the effect of AGEs on the regulation of matrix metalloproteinase (MMP) expressions and activities in human OA chondrocytes

Methods: OA chondrocytes were treated with increasing doses of AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA). The expressions of MMPs were determined by both enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot analysis. The activities of MMPs were evaluated by both gelatin and casein zymography assays. In addition, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was employed to investigate the DNA binding activity of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) by AGE-BSA treatment.

Results: The productions of MMP-1, -3, and -13 were significantly elevated by AGE-BSA in a dose dependent manner. The elevated activities of MMP-1, -3, and -13, and TNF- α by AGE-BSA were also observed. DNA binding activity of NF- κ B was markedly increased by

< 접수일 : 2006년 10월 26일, 심사통과일 : 2006년 12월 18일 >

※ 통신저자 : 이 창 근

서울시 송파구 풍납동 388-1

울산대학교 의과대학 서울아산병원 알레르기 류마티스내과

Tel : (02) 3010-3284, Fax : (02) 3010-6969, E-mail : cklee@amc.seoul.kr

본 논문은 한국학술진흥재단(KRF-2006-003-E00120)의 지원으로 수행되었음.

AGE-BSA treatment implicating possible involvement of NF- κ B mediated pathway in the AGE-BSA induced MMP-1, -3, and -13, and TNF- α productions in OA chondrocytes. Taken together, this study demonstrates the stimulatory effect of AGE-BSA on the productions of MMPs and TNF- α and suggests the possible involvement of NF- κ B mediated pathway in OA chondrocytes.

Conclusion: These results suggest that AGE may play a role in pathogenesis of OA.

Key Words: Advanced glycation end products, Matrix metalloproteinase, Chondrocyte, Osteoarthritis

서 론

골관절염은 노인 인구에서 가장 흔한 질환이며 통증과 만성장애를 일으키는 원인 중의 하나이다. 비록 연령 증가에 따른 관절 연골의 변화가 골관절염의 중요한 원인으로 추정되지만 연령의 증가가 어떠한 기전으로 골관절염의 위험인자로 작용하는지는 아직 잘 알려져 있지 않다 (1). 분자 생물학적인 관점에서 골관절염은 시토카인, 기질단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 그것의 억제제의 불균형에 의해 발생한다는 특징을 가지고, 이것의 변화는 결국 연골 파괴를 일으키게 된다 (2). 특히 연골은 type II 콜라겐과 aggrecan을 포함하는 프로테오글리칸 등과 같은 물질로 둘러싸여 있는데 aggrecan은 관절 내에서 중요한 역할을 한다 (3). 기질단백분해효소는 type II 콜라겐을 분해할 수 있는 효소이기에 연골 파괴에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

기질단백분해효소는 아연, 칼슘과 관계 있는 촉매효소의 종류이다. 이들이 활성화되면 골관절염에서 연골의 기질을 분해한다고 밝혀져 있다 (4). 이 효소의 3가지 유형은 세포 표면의 기질 변화를 조절한다고 알려져 있는데 첫 번째는 아교질분해효소이다. 아교질분해효소-1이라고도 불리는 기질단백분해효소-1은 세포 표면 기질의 변화 시 콜라겐 섬유를 분해하는 중요한 역할을 하기 때문에 콜라겐 분해가 발생하는 곳에서 생물학적인 과정에 있어 넓게 관여한다. 아교질분해효소-3라 불리는 기질단백분해효소-13은 골관절염에서 aggrecan과 type II 콜라겐의 분해에 관여한다 (5). 기질단백분해효소-13이 연골에서 특히 과도하게 많이 분비될 경우에 골관절염이 발생함은

쥐 실험을 통해 밝혀져 있다 (6). 두 번째 유형인 스트로멜리신은 프로테오글리칸과 type IX 콜라겐을 분해하는데 스트로멜리신-1이라 불리는 기질단백분해효소-3가 여기에 속한다. Aggrecan의 interglobular domain (IGD)이 활성화된 기질단백분해효소-3에 특히 민감하다는 것은 알려져 있다 (7). Aggrecan의 분해가 연골 조직의 파괴에 중요하지만 관절 조직의 궁극적인 파괴는 연골 콜라겐의 분해에 의한다. 따라서 type II 콜라겐을 분해하는 기질단백분해효소-1, 13과 type IX 콜라겐을 분해하는 기질단백분해효소-3가 연골 조직의 파괴에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 세 번째 유형인 젤라틴분해효소에는 기질단백분해효소-2가 있고 콜라겐을 변형시키는 것으로 알려져 있다 (8).

진행성당화종말생성물은 단백질의 무효소성 당화의 결과로 생성되며 나이가 증가함에 따라 대사에 의해 잘 제거되지 않는 단백질에 축적된다 (9). 그러므로 반감기가 매우 긴 노화된 인간 연골에서 진행성당화종말생성물이 많이 축적됨이 밝혀졌는데, 특히 다른 조직에 비해 연골에 진행성당화종말생성물의 한 종류인 pentosidine이 많이 축적되며, 그 밖에도 다양한 종류의 진행성당화종말생성물(N-carboxymethyllysine (CML), N-carboxyethyllysine (CEL))이 연골에 축적되어 있는 것이 관찰되었다 (10,11). 또한 나이가 들면 연골 내 콜라겐의 변형이 발생하며 이는 대부분 진행성당화종말생성물 축적의 결과라는 보고가 있다 (12). 그러므로 연령 증가에 따른 진행성당화종말생성물 축적이 콜라겐에 영향을 끼치고 외부 요인에 의한 손상된다고 추측되고 있다. 실제로 관절 내 S100B가 인간의 연골세포에서 발현되는 진행성당화종말생성물의 수용체인 receptor for AGE

(RAGE)의 신호 전달 경로를 통해 세포 내 nuclear factor kappa B (NF- κ B)를 활성화시키고 이로 인해 여러 가지 전 염증 시토카인과 활성산소 등이 생성된다고 보고되었다 (13). 이러한 전 염증 시토카인과 활성산소에 의해 연골 기질의 분해와 염증이 발생하고 연골 파괴가 진행된다.

그러므로 이번 연구에서는 인간의 골관절염 연골 세포에서 기질단백분해효소와 전 염증 시토카인의 발현에 대한 진행성당화종말생성물의 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

자극 물질로 쓰인 BSA와 결합시킨 진행성당화종말 생성물은 MBL (Nagoya, Japan)로부터, bovine serum albumin (BSA)은 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 기질단백분해효소(MMP) 측정을 위한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit과 anti-MMP antibodies는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였고, second antibody인 alkaline phosphatase-conjugated antibody는 Chemicon (Temecula, CA, USA)으로부터 구입하였다. 종양괴사인자- α 와 인터루킨-1 β 측정을 위한 ELISA kit는 BIOSOURCE (Camarillo, CA, USA)로부터 구입하였다. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) 실험에 쓰인 anti-p50, p65 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였고, 세포 생존을 측정을 위한 cell proliferation kit II (XTT kit)은 Roche (Karlsruhe, Germany)로부터 구입하였다. Zymography 실험을 위한 겔과 developing buffer는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 세포 배양 실험을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

2. 연골세포의 분리과 배양

무릎 연골은 20명의 골관절염 환자(평균 연령 68세, 59~76세)에게서 인공 관절로의 대체 수술 과정에서 얻었다. 수술 후 연골을 잘게 잘라 1 mg/mL collagenase를 10% FBS가 함유된 DMEM (292 μ g/mL

L-glutamine, 100 U/mL penicillin-streptomycin)에 넣고 37°C horizontal shaker에서 16시간 동안 녹였다. 이후 녹인 세포는 70 μ m nylon filter에서 세포만 걸러 centrifugation과 collagenase-free medium으로 세척과정을 거쳐 분리하였다. 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM (292 μ g/mL L-glutamine, 100 U/mL penicillin-streptomycin)에서 배양되었다. 배양 6일 후 연골세포는 FBS가 함유되지 않은 DMEM에서 1시간 동안 배양된 후 자극 물질이 처리되었다

3. Immunocytochemistry

Chamber slides에서 배양된 세포를 cold 4% formaldehyde로 고정된 뒤 cold phosphate buffered saline (PBS)로 2번 washing하였다. 실험을 위해 DAKO LSAB 2 kit은 DAKO (Glostrup, Denmark)로부터 구입하였고, anti-human collagen I, anti-human collagen II antibodies는 Chemicon (Temecula, CA, USA)으로부터 구입하였다. 발색 시약인 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate/Nitro Blue tetrazolium (BCIP/NBT) liquid substrate는 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

4. 세포 생존율 측정

96 well microplate에서 배양된 세포는 cell proliferation kit II (XTT kit)를 이용하여 OD값을 측정하였다. 측정된 값을 아무것도 처리하지 않은 군의 값으로 나누어 백분율로 표시하였다.

5. Zymography

자극 물질로 배양 후 각 배양액을 모아 같은 양을 젤라틴과 카세인 겔을 사용해 SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 겔은 renaturing buffer (2.5% Tiron X-100)에 넣어 1시간 동안 실온에서 배양시킨 후 developing buffer에서 30분 동안 배양하였다. 겔은 이후 새로운 developing buffer에 넣어 37°C에서 overnight 동안 배양시켰다. 배양 후 겔은 0.05% coomassie blue R-250로 2시간 동안 염색하고, coomassie blue R-250 destaining solution에서 10분 동안 탈 염색하였다.

6. Western blot

자극 물질로 배양 후 각 배양액을 모아 같은 양을 SDS-PAGE로 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. Membrane은 5% (w/v) skim milk가 함유된 TBST buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20]에 넣어 실온에서 1시간 blocking하였다. Blocked membrane은 primary antibody를 넣은 TBST에 넣고 4°C에서 overnight 동안 불었다. TBST로 10분씩 3번 세척한 membrane은 실온에서 second antibody인 alkaline phosphatase-conjugated antibody를 1시간 반응시켰다. TBST로 10분씩 3번 세척 후 protein band는 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate/Nitro Blue tetrazolium (BCIP/NBT) liquid substrate로 발색시켰다.

7. Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)

자극 물질로 배양 후 각 배양액에서 기질단백분해 효소-1, 3, 13과 중양피사인자- α 의 양은 ELISA kit를 사용해 측정하였다.

8. Electrophoresis Mobility Shift Assays (EMSA)

Nuclear extracts (단백질 5 μ g)는 binding mixture [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 4% glycerol, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.05 mg/mL poly (did)]에서 배양하였다. Supershift analysis을 위해 nuclear extracts (단백질 5 μ g)와 각각의 anti-p50, p65 antibody 10 μ L는 binding mixture를 넣기 전에 실온에서 10분, 얼음에서 30분, 실온에서 10분 배양하였다. 각 sample에는 radiolabeled [γ - 32 P] ATP (Amersham Biosciences; Pittsburgh, PA, USA)와 T4 polynucleotide kinase (Promega; Madison, WI, USA)를 이용하여 만든 cDNA probes를 넣고 실온에서 20분 배양시켰다. 그 다음 각 sample은 0.5X TBE [45 mM Tris-HCl (pH 8.0), 45 mM boric acid, 1 mM EDTA]를 이용하여 6% polyacrylamide gel로 전기영동 하였다. 전기영동 후 겔은 건조과정을 거쳐 film으로 현상하였다.

9. 통계 처리

본 실험의 유의성 검증을 위한 통계 처리는 SPSS

를 이용하였고, 모든 자료는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 골관절염 연골세포에서 type I, II 콜라겐 발현 여부 확인

인간의 연골세포는 배양하는 동안 형태의 변화를 보인다. 깨끗하게 분리된 인간의 연골세포는 중심에 위치하지 않은 하나의 핵을 가지며 구형에서 다각형까지 다양한 모양을 가진다. 단층 세포 배양 후 시간이 지나면 연골세포는 길고 섬유아세포와 비슷한 모양으로 탈분화하게 되는데 이때 type II 콜라겐은 type I 콜라겐으로, aggrecan은 작은 분자 질량을 가진 프로테오글리칸으로 바뀌게 된다. 단층 세포 배양 시 연골세포는 type II 콜라겐과 aggrecan의 발현을 멈추지만 type I 콜라겐의 발현은 계속되어 길고 섬유아세포와 비슷한 모양으로 변하게 되며, 정상인의 연골세포를 단층 세포 배양 시 21일째 type II 콜라겐은 type I 콜라겐으로 변화할 수 있다 (14,15). 이 연구에서는 골관절염 환자의 연골세포로 실험을 하였기 때문에 7일 배양 후 콜라겐의 변화를 immunocytochemistry 방법으로 확인해 보았다. 세포 핵은 hematoxylin blue로 염색하였고 콜라겐은 BCIP/NBT 시약으로 염색하였다. 그 결과 7일 동안 단층 세포 배양된 연골세포에서 type I 콜라겐 발현은 확인할 수 없었지만 세포 내의 type II 콜라겐 발현을 확인하였다(그림 1A). 그러므로 이 실험 결과를 바탕으로 앞으로의 모든 실험은 배양 7일 이전 연골세포로 수행하였다.

2. 진행성당화종말생성물이 골관절염 연골세포 생존율에 미치는 영향

인간의 골관절염 연골세포에서 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물이 세포에 독성을 끼치지 않음을 증명하기 위해 XTT를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. 5일 배양한 인간의 연골세포에 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 농도별(100, 200, 400, 600 μ g/mL)로 처리하였다. 실험 결과 BSA와 반응시킨 진행성당화종말생성물 100 μ g/mL에서 600 μ g/mL의 농도에서 측정된 세포 생존율은 처리하지 않은

군과 차이가 없음을 확인하였다(그림 1B). 이 실험 결과로 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물의 각 농도가 연골세포에 대한 세포 독성이 없음을 확인하였다.

3. 골관절염 연골세포에서 진행성당화종말생성물에 의한 NF- κ B와 종양괴사인자- α 의 발현

진행성당화종말생성물이 인간의 골관절염 연골세포에서 세포 내 전염증시토카인의 발현에 관여하는

NF- κ B를 활성화시키는지 알아보기 위하여 5일 배양한 연골세포에 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 24시간 처리한 후 nuclear protein을 분리하여 EMSA를 수행하였다. 그 결과 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리한 연골세포에서 NF- κ B가 농도에 비례하여 발현되었음을 확인하였다. Super-shift를 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물 400 μ g/mL에서 표준으로 시행하였으며 p50과 p65가 super-shift됨을 확인하였다(그림 2A).

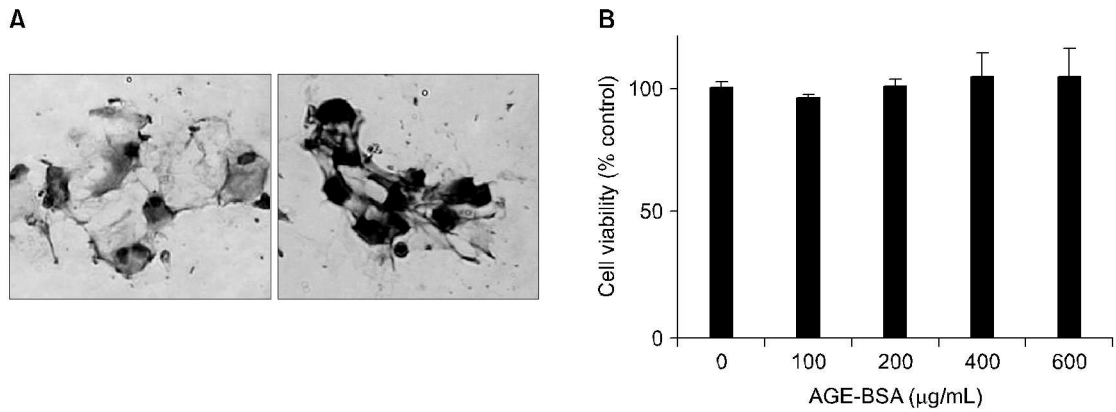


Fig. 1. Immunocytochemical staining for type I and II collagen in monolayer-cultured osteoarthritis (OA) chondrocytes. Spherical or polygonal cells containing a single eccentric nucleus were observed. Type II (right panel), but not type I (left panel), collagen was detected in OA chondrocytes 7 days after primary culture (A). The effect of advanced glycation end product bovine serum albumin (AGE-BSA) on the viability of OA chondrocytes (B).

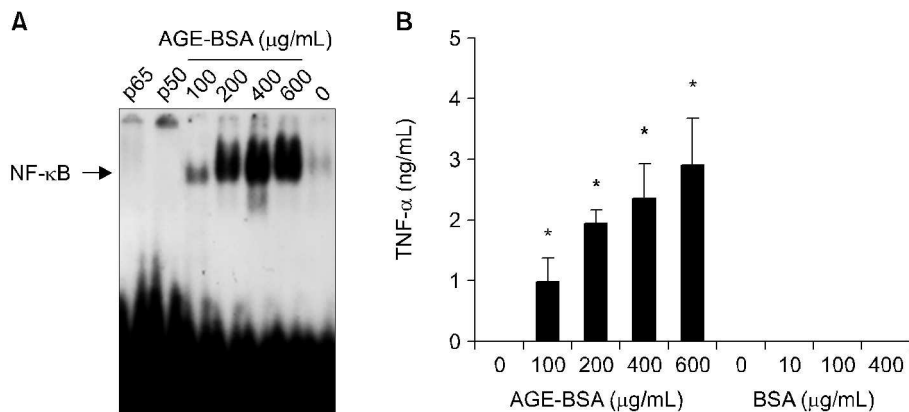


Fig. 2. Induction of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (A), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression by advanced glycation end product bovine serum albumin (AGE-BSA) in human osteoarthritis (OA) chondrocytes (B). n=4, *p<0.05 compared with none and AGE-BSA or BSA treatment.

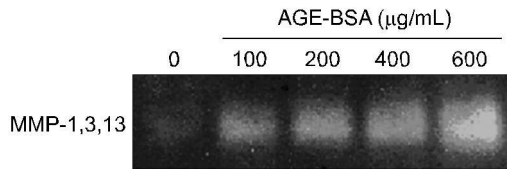


Fig. 3. Functional assay with zymography on matrix metalloproteinase (MMPs) activity by advanced glycation end products (AGE) in human osteoarthritis (OA) chondrocytes. As MMP-1, 3, and 13 could be expressed in casein gels and have similar size, they were represented like one band.

또한 전 염증 시토카인인 종양괴사인자- α 와 인터루킨-1 β 가 생성되는지 알아보기 위하여 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 24시간 처리한 배양액으로 ELISA를 수행하였다. 그 결과 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 100 μ g/mL부터 발현이 증가하였고 600 μ g/mL에서는 약 5배 발현하는 것을 확인하였다. 반면, 인터루킨-1 β 는 발현되지 않았다(데이터 제시 않음). 또한 진행성당화종말생성물에 BSA가 결합되어있는 물질로 자극하였기 때문에 진행성당화종말생성물만으로 종양괴사인자- α 가 자극되었다는 것을 증명하기 위하여 BSA를 농도별(0, 10, 100, 400 μ g/mL)로 처리하여 같은 실험

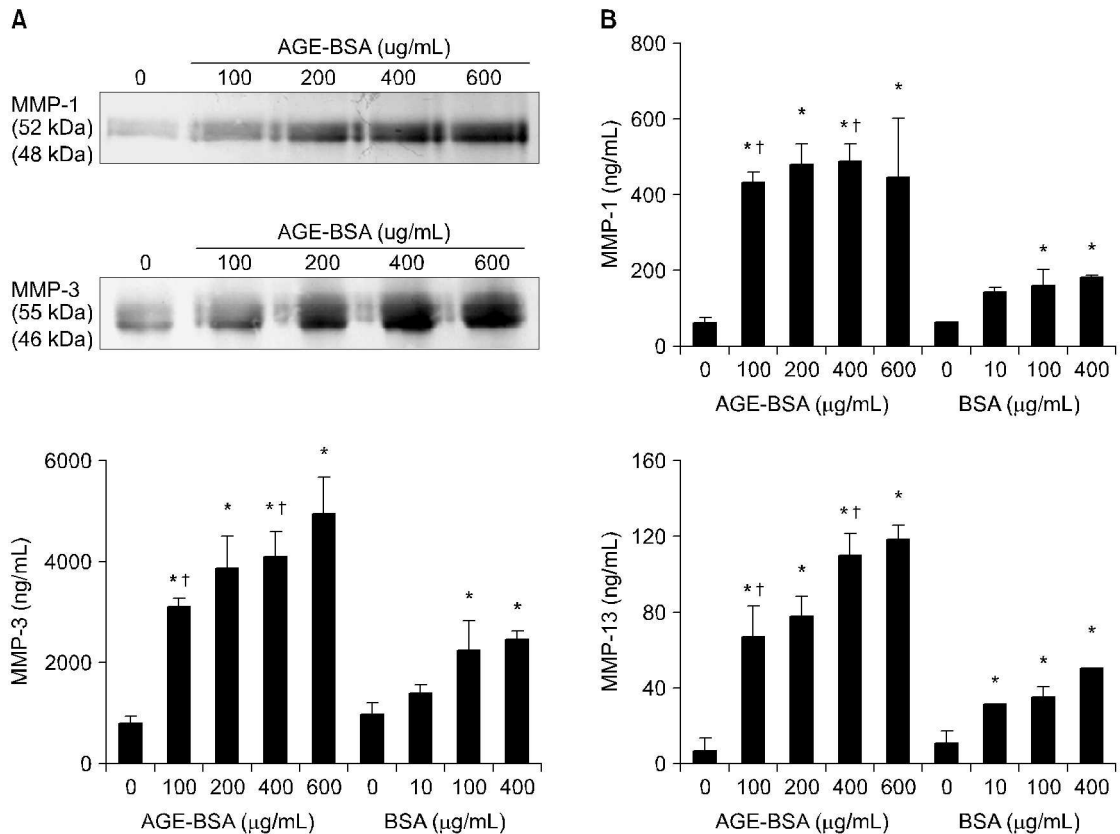


Fig. 4. Induction of expression of matrix metalloproteinases (MMPs)-1, -3, and -13, by advanced glycation end product bovine serum albumin (AGE-BSA). The expression levels of MMP-1, -3, and -13 were also analyzed by Western-blot assays (A). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) performed for productions of MMP-1 (upper panel), MMP-3 (middle panel), and MMP-13 (lower panel) (B). Results are representative of duplicate experiments. $n=6$, $*p<0.05$, compared with none and AGE-BSA or BSA treatment. $^{\dagger}p<0.05$, compared with same dose of BSA.

을 수행하였다. 그러나 BSA는 종양괴사인자- α 를 자극하지 않았다(그림 2B). 그러므로 전 염증 시토카인의 한 종류인 종양괴사인자- α 가 진행성당화종말생성물에 의해 활성됨을 확인하였다.

4. 골관절염 연골세포에서 진행성당화종말생성물에 의한 기질단백분해효소-1, 3와 13의 발현

기질단백분해효소와 진행성당화종말생성물이 어떠한 관계가 있는지 알아보기 위하여 골관절염 연골세포에 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 농도별(0, 10, 100, 400 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 세포에서 발현되는 기질단백분해효소를 zymography, western blot과 ELISA 방법으로 측정하였다. 또한 BSA의 기질단백분해효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 BSA를 농도별(0, 10, 100, 400 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 같은 실험을 수행하였다.

먼저 기질단백분해효소의 활성을 측정하기 위해 zymography를 수행하였다. Zymography를 위한 겔의 종류에는 카세인 겔과 젤라틴 겔이 있는데 카세인 겔은 기질단백분해효소-1, 3와 13을 확인에 사용되고 젤라틴 겔은 기질단백분해효소-2, 9 확인 시 사용한다. 실험 결과 진행성당화종말생성물에 의해 골관절염 연골세포에서 기질단백분해효소-1, 3와 13이 활성됨을 확인하였다(그림 3). 반면 기질단백분해효소-2와 9는 활성되지 않았으며, 기질단백분해효소-1, 3와 13이 측정 위치가 비슷하여 겔상에서는 구분되지 않았다(기질단백분해효소-1은 55 kD, 기질단백분해효소-3는 57 kD, 기질단백분해효소-13은 60 kD).

Western blot (그림 4A)과 ELISA 결과 콜라겐 섬유를 분해하는 기질단백분해효소-1은 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 부터 편평기를 이루었고, 프로테오글리칸과 type IX 콜라겐을 분해하는 기질단백분해효소-3는 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 부터 발현이 증가하여 200 $\mu\text{g/mL}$ 때 편평기를 이루었다. BSA를 처리하였을 때도 기질단백분해효소-1, 3의 발현이 확인되었지만, 이보다 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 기질단백분해효소-1은 약 3배 정도, 기질단백분해효소-3는 약 2배 정도 발현됨을 확인하였다. 그러므로 BSA에 의한 영향이 아닌 진행성당화종말생성물에 의해

기질단백분해효소-1과 3가 발현됨을 확인하였다(그림 3B). AGE-BSA Aggrecan과 type II 콜라겐의 분해에 관여하는 기질단백분해효소-13은 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 부터 발현이 증가하여 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때 편평기를 이루었다. BSA를 처리하였을 때는 10 $\mu\text{g/mL}$ 부터 발현됨이 확인되었지만, 이보다 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물을 처리하였을 때 약 2배 정도 발현됨을 확인하였다. 그러므로 BSA에 의한 영향이 아닌 진행성당화종말생성물에 의해 기질단백분해효소-13이 발현됨을 확인하였다(그림 3B). 기질단백분해효소-13은 발현양이 적어 western blot으로 확인할 수 없었고, 기질단백분해효소-2와 9는 발현되지 않았다(그림 제시하지 않음). 기질단백분해효소-1, 3와 13 중 발현양이 가장 많은 것은 기질단백분해효소-3였다.

고 찰

이 연구의 목적은 진행성당화종말생성물의 이화작용 효과, 특히 골관절염 연골세포에서 기질단백분해효소-1, 3, 13과 종양괴사인자- α 의 발현 정도를 알아보기 위한 것이었다. 본 연구를 통해 BSA와 결합시킨 진행성당화종말생성물이 기질단백분해효소-1, 3, 13과 종양괴사인자- α 의 생성을 증가시킨다는 것을 보았다.

이전의 다른 연구는 지방산이 없는 BSA으로부터 생성된 진행성당화종말생성물 복합체나 pentosidine, CML 같은 특정 진행성당화종말생성물을 사용했다. 본 연구에서 사용된 진행성당화종말생성물은 BSA이 결합되어 있는 진행성당화종말생성물이고 이것은 상업적으로 구입 가능한 것이었다. 이것은 무균상태에서 BSA과 글라이콜알데하이드를 반응시켜 투석과 정제 과정을 거쳐 생성한 것으로 최종 BSA이 결합되어 있는 진행성당화종말생성물은 pentosidine, CML, 그리고 다른 종류의 진행성당화종말생성물을 포함하고 있는 복합체이다 (15). 그러므로 본 연구의 결과는 특정 진행성당화종말생성물에 국한되기보다는 진행성당화종말생성물 복합체에 의한 결과라는 점에서 생체현상과 가까운 것이라 할 수 있을 것이다.

지금까지 당뇨 및 다른 질병과 관련되어 있는 진

행성당화종말생성물의 기능에 관해서는 많은 연구가 있을 뿐 아니라 잠재적인 치료 표적으로서의 가능성을 연구 중이다. 진행성당화종말생성물은 혈관 평활근 세포와 포식세포에서 각각 기질단백분해효소-2, 9의 생합성을 유도한다 (16). 고혈당증은 미토겐 활성화 단백 키나아제(MAPK) 신호전달 과정을 통해 진행성당화종말생성물의 축적을 증가시키고 죽상동맥 경화의 축진을 유도한다 (17). 진행성당화종말생성물은 또한 혈관의 기능장애로서, 사람의 배꼽 정맥 내피세포(umbilical vein endothelial cells)에서의 종양괴사인자- α 분비를 촉진한다 (18). 진행성당화종말생성물 수용체의 활성화는 내피, 단핵세포, 포식세포와 림프구에서 염증반응과 연결되어 있는 중요한 신호전달을 자극하여 다양한 염증 관련 유전자를 활성화시킨다 (19). 또한 extracellular-signal-regulated kinase (ERK)와 RAGE의 직접 결합을 통한 ERK 신호전달 활성화와 p38, SAPK/JNK MAPK의 활성화는 밝혀져 있다 (20). 게다가 rho-GTPase, phosphoinositol-3-kinase, Janus kinase/signal transducer와 JAK/STAT pathway가 진행성당화종말생성물 수용체 신호전달과 관련이 있다. 이러한 많은 신호전달 연쇄반응은 결국은 NF- κ B의 활성을 일으킨다 (21,22).

골관절염에 대한 진행성당화종말생성물 최초의 생체 내 실험은 인공적으로 슬관절의 불안정을 유도한 개 모델에서 진행성당화종말생성물이 증가한다는 소견이었다 (1). 진행성당화종말생성물의 축적은 관절 연골의 유연성을 감소시키고, 기계적인 손상에 더 예민해진다고 하였으며 (23), 연골세포에서의 프로테오글리칸과 콜라겐의 합성을 감소시키는 것으로 알려져 있었다 (24). 이후 골관절염 환자에서 분리한 연골세포에서 RAGE의 발현을 확인하였으며 (25), RAGE의 활성화는 기질단백분해효소-1의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (26). 본 연구에서는 BSA이 결합되어 있는 진행성당화종말생성물로 연골세포를 직접 자극하였을 때 골관절염의 병태생리에 중요한 작용을 하는 기질단백분해효소-1, 3, 13과 종양괴사인자- α 의 발현이 증가함을 최초로 밝힌 것이다. 본 연구에서 사용된 검체는 골관절염 환자 연골에서 주로 병변이 없는 부분에서 채취하였으므로 정상적인 노화의 연골과 유사하지만, 진행성당화종말생성물에 의한 이러한 연골세포의 반응이 골관절염 병태

생리 자체의 영향을 받을 수 있는 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 그러므로 이러한 결과를 류마티스관절염 환자나 정상인의 연골에 모두 적용할 수는 없을 것이다.

또한 본 연구에서 비록 BSA가 기질단백분해효소-1, 3, 13을 증가시키긴 하지만 증가폭은 BSA이 결합되어 있는 진행성당화종말생성물에서 보여지는 것보다 현저하게 작다. 게다가 종양괴사인자- α 의 농도는 BSA를 처리하였을 때는 증가하지 않는다. 이 결과는 BSA의 효과가 중요하지 않다는 다른 연구들과 일치한다 (26). 결과적으로, 진행성당화종말생성물의 축적이 골관절염의 발병기전에서 중요한 이화작용을 한다는 것을 제시한다. 골관절염의 잠재적인 치료 전략으로서의 진행성당화종말생성물에 의한 신호전달 과정과 수용체-배위자 상호작용의 상세한 연구를 향후 필요로 할 것이다.

결 론

이번 연구를 통해 처음으로 골관절염 연골세포에 진행성당화종말생성물이 기질단백분해효소-1, 3, 13과 종양괴사인자- α 의 발현을 증가시켰다. 더욱이 이는 용량 의존적인 상관관계를 보이며, 아울러 NF- κ B의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 그러므로 골관절염의 발생에 진행성당화종말생성물이 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 이는 골관절염의 생성의 방지와 치료의 주요 대상이 될 수 있는 가능성이 있음을 알게 되었다.

앞으로의 연구에서는 진행성당화종말생성물의 종류인 CML이나 pentosidine 각각의 기질단백분해효소, 종양괴사인자- α 와 NF- κ B에 대한 영향을 알아보고, 진행성당화종말생성물에 의한 기질단백분해효소 발현 기전과 신호전달 체계에 대해서도 향후 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

- 1) DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, Jacobs KM, Van El B, Van Roermund PM, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis is. *Arthritis Rheum* 2004;50:1207-15.

- 2) Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insight. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann intern Med* 2000;133:635-46.
- 3) Swnolt L, Senolt L, Braun M, Olejarova M, Forejtova S, Gatterova J, et al. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 2005;64:886-90.
- 4) Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage: biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 1995; 17:1039-48.
- 5) DeGroot J, Verzijl N, Wenting-Van Wijk MJ, Bank RA, Lafeber FP, Bijlsma JW, et al. Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products. *Arthritis Rheum* 2001;44:2562-71.
- 6) Vincenti MR, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenases (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res Ther* 2002;4:157-64.
- 7) Martel-pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:25-9.
- 8) Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001;107:35-44.
- 9) Flannery CR, Lark MW, Sandy JD. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *J Biol Chem* 1992;267:1008-14.
- 10) Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000;275:39027-31.
- 11) DeGroot J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4: 301-5.
- 12) Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 2000;350:381-7.
- 13) Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, et al. Cross-linking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46: 114-23.
- 14) Veilleux NH, Yannas IV, Spector M. Effect of passage number and collagen type on the proliferative, biosynthetic, and contractile activity of adult canine articular chondrocytes in type I and II collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro. *Tissue Eng* 2004;10:119-27.
- 15) Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vecsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86: 286-95.
- 16) Farboud B, Aotaki-Keen A, Miyata T, Hjelmeland LM, Handa JT. Development of a polyclonal antibody with broad epitope specificity for advanced glycation endproducts and localization of these epitopes in Bruch's membrane of the aging eye. *Mol Vis* 1999; 5:11.
- 17) Cipollone F, Iezzi A, Fazio M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, et al. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation* 2003;108:1070-7.
- 18) Federici M, Giustizieri ML, Scarponi C, Girolomoni G, Albanesi C. Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 2002;169:434-42.
- 19) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.
- 20) Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 2001;50:1495-504.
- 21) Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999;

- 274:19919-24.
- 22) Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 2001;81:102-13.
- 23) DeGroot J, Verzijl N, Budde M, Bijlsma JW, Lefebvre FP, TeKoppele JM. Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes. *Exp Cell Res* 2001;266:303-10.
- 24) DeGroot J, Verzijl N, Jacobs KM, Budde M, Bank RA, Bijlsma JW, et al. Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:720-6.
- 25) Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im HJ, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2376-85.
- 26) Steenvoorden MM, Huizinga TW, Verzijl N, Bank RA, Roodman HK, Luning HA, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54:253-63.
-