대한척추외과학회지 제 9 권 제 3 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 9, No. 3, pp 172~177, 2002

요추부 추간 판에서 제 4형 교원질의 면역학적 발현

전창훈 · 문지호 · 강용호*

아주대학교 의과대학 정형외과학교실, 건양대학교 의과대학 정형외과학교실*

Immuno-expression of Type IV Collagen in the Intervertebral Disc

Chang Hoon Jeon, M.D., Ji-Ho Moon, M.D. and Yong Ho Kang, M.D.*

Department of Orthopedic Surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea
*Department of Orthopedic Surgery, Konyang University College of Medicine, Taejon, Korea**

– Abstract –

Study Design : In vitro studies using human intervertebral disc for the localization of the type IV collagen.
Objective : 1) To study the distribution pattern and immunoexpression of type 4 collagen in the intervertebral disc, 2) To study the function of type IV collagen in the intervertebral disc.
Summary of Back Ground : The correlations of degeneration changes and collagens in the dics have not been determined. The reports for type IV collagen were few. So far, the histologic analysis for the expression of type IV collagen in the intervertebral disc has not been done. There was no report to study the function of the type IV collagen in the intervertebral disc.
Methods : Fifty-four disc blocks obtained during anterior interbody fusion of the lumbar spine were used to observe the expression pattern of the type IV collagen with immunochemical stain. For the observation of the myxomatous degeneration in the intervertebral disc, the alcian blue stain with periodic acid-schilff was done. For the control group, 22 neonate intervertebral disc blocks were obtained at autopsy.
Results : The immunoreactions for type IV collagen were associated blood vessels in the anulus fibrosus in the disc. There was no statistical significant difference of the type IV collagen expression between the control and disease groups. Myxomatous degenerations were observed as the irregular form in the degenerative intervertebral disc.
Conclusion : The immunoreactions for the type IV collagen were observed in the intervertebral discs and associated with the formation of the blood vessels, especially in anulus fibrosus.

Key Words : Intervertebral disc, Type IV collagen, Blood vessel

Address reprint requests to
Chang-Hoon Jeon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Ajou University School of Medicine
San5, Wonchon-dong, Paldal-gu, Suwon 442-721, Korea
Tel : 82-331-219-5220, Fax : 82-331-219-5229, E-mail : chjeon@ajou.ac.kr

서 론

사람의 추간 판 조직은 고도로 특성화된 복합적인 구조로 구성되어 있다. 이 추간 판의 구성 중 구조적인 역할은 교원질(collagen)이 주된 역할을 하며 주로 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11형 교원질이 구성 성분을 이루고 있다고 알려져 있다[2,3,6].

추간 판 조직의 부위에 따라서 교원질의 구성 성분도 다르게 보고되고 있으며, 추간 판의 퇴행성 변화에 따라 교원질의 구성도 변화가 있으나[1], 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 분포 형태 및 기능에 대해서는 보고된 논문이 매우 적었다. 본 연구에서는 첫째, 퇴행성 추간 판 조직에서 제 4형 교원질이 분포 및 발현 형태를 연구하였으며, 둘째, 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 기능에 대하여 연구하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

퇴행성 추간 판 질환으로 전방 추체 유합술을 시행받은 환자 54명의 추간 판 조직을 질환군으로 하였다. 연구대상인 퇴행성 추간 판 질환은 추간 판 내장증 12례, 협부형 척추 전방 전위증 24례, 불안정성이 동반된 척수강내 협착증 18례 이였다.

수술 중 조직의 채취는 추간 판을 블록(block)으로 채취하였으며, 그 채취 부위는 제 3-4, 제 4-5 요추 간에서는 전체 추간 판의 측면에서, 제 5 요추-제 1 천추간 추간 판은 추간 판의 전면에서 채취하였다. 모든 조직학적 검사는 수핵과 섬유륜이 포함된 추간 판 조직에서 실시하였다.

대조군으로는 정상 추간 판 조직을 얻을 수 없어 부검시 채취한 신생아의 추간 판 22례를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

연구대상이 된 추간 판 조직 전례를 일반적인 변화를 관찰하기 위해 Hemotoxylin-eosin 염색을 일차적으로 실시하였고, 퇴행성 변화의 관찰을 위해 PAS(periodic aciid-Schiff) 반응을 이용한 alcian blue 염색 및 제 4형 교원질 항체를 이용한 면역 염색을 실시하였다.

모든 추간 판 조직은 적출 즉시 -70℃로 급냉하여 보관하였다.

3. 조직학적 관찰

1) 면역 조직화학 염색

조직절편을 30분에서 60분간 56℃~60℃ 항온기에서 가온시켜 조직을 슬라이드에 잘 부착시킨 후 60℃ 항온기에서 충분히 건조시켰다. 이 후 Xylene으로 10분간 3회에 걸쳐 탈파라핀 시키고 증류수로 세척하였다. 내재성 peroxidase를 억제하고자 3% 과산화수소(H_2O_2)와 Methanol을 섞은 용액으로 10분에서 15분간 처리한 후 증류수로 3분간 세척하였다. Phosphate buffered solution(PBS)으로 5분간 3회에 걸쳐 세척한 후, 비특이성 반응을 억제하고자 정상 Goat 혈청으로 20분에서 30분간 처리한 후 1차 항체로 실온에서 1시간에서 2시간 정도 감작시켰다. 이후 PBS로 5분간 3회에 걸쳐 세척하였다. 2차 항체로 20분에서 30분간 반응한 후 5분씩 3회에 걸쳐 PBS로 세척하였다. Labelled serum으로 20분간 처치 후 PBS로 세척하였다. AEC (3amino-9-Ethyl-Carbazone) 용액으로 처리한 후 다시 PBS로 세척하였다. Hematoxylin과 Eosine 염색법으로 대조 염색을 실시하였다. 제 4형 교원질의 발현에 대해서는 제 4형 교원질 항체(Dako patts. Copenhagen®, Denmark)를 이용하여 1:50의 농도로 면역 염색을 실시하였다.

2) 조직학적 관찰

Hematoxylin-eosin 염색한 추간 판 조직에서 섬유륜의 각 층의 구성도 및 섬유화(fibrosis), 수핵의 퇴행성 변화, 혈관의 존재 유무로 관찰한다. Alcian-blue 염색에서는 acid musin이 PAS-positive 반응을 보이기에 추간 판의 부위에 따른 교원질의 점액종성 변화(myxomatous degeneration)를 관찰한다.

제 4형 교원질 항체를 이용한 면역 염색에서는 적색으로 관찰되는 세포 및 조직에 한해 양성으로 판독하였다.

4. 결과 분석

질환군과 대조군으로 나누어 추간 판 조직내의 각 부위에 따라 점액종성 변화의 정도, 혈관형성, 제 4형 교원질의 발현의 차이를 검증하였다. 통계학적 차이는 각 지표에 따라 Log-linear model을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. 조직 화학적 염색 판독 결과

질환군의 Hematoxylin-eosin 염색상 전례에서 혈관 형성은 주로 섬유륜의 바깥 1/2층에서 관찰되었고, 섬유륜의 퇴행성 변화는 관찰되는 추간 판 조직 표본의 부위에 따라 불균등하게 관찰되었으며, 수핵에서는 혈관 형성이 관찰되지 않았기에 섬유화 및 수핵의 괴사 등이 간헐적으로 관찰되었다. 질환군에서 관찰되는 점액종성 변화는 혈관에서 관찰되는 부위와는 관계없이 불균일하게 관찰되었다(Fig. 1). 대조군의 추간판 조직에서 섬유륜에서 혈관이 관찰되었으며, PAS 반응을 이용한 alcin-blue 염색에서는 산성 점액다당(acid mucopolysaccharide)을 함유한 섬유가 섬유륜 및 수핵에서 관찰되었으나, 균일하게 분포하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2). 질환군의 추간 판 조직에서 관찰되는 점액종성 변화는 대조군에서는 관찰되지 않았으며, 대조군의 추간 판 조직에서 섬유륜내에서 섬유모세포 및 연골세포 등과 비슷한 형태의 세포들이 관찰되었다. 제 4형 교원질을 이용한 면역염색상 제 4형 교원질의 발현은 모든 질환군(Fig. 3) 및 대조군(Fig. 4)의 섬유륜에서 관찰되었고, 특히 혈관이 관찰되는 부위에서 발현되었다.

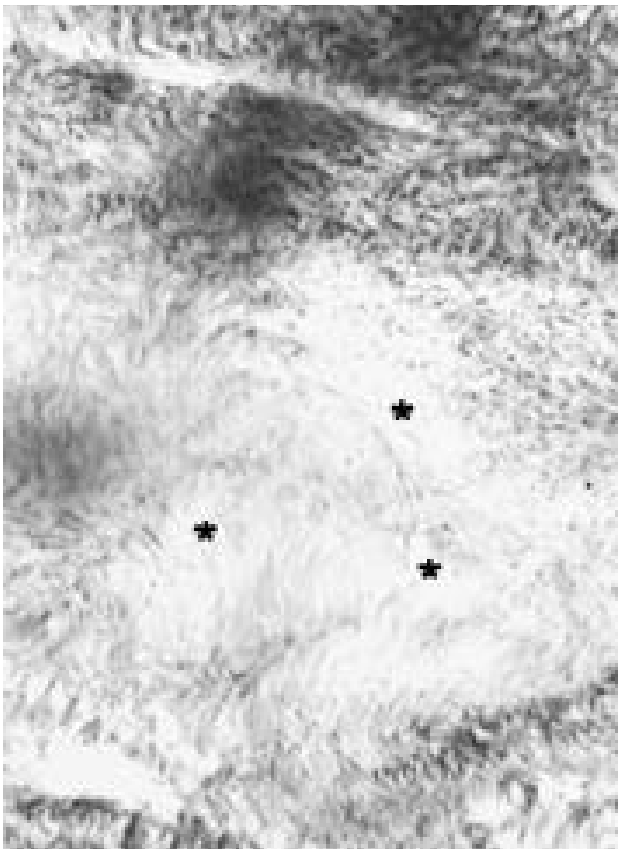

Fig. 1. The myxomatous degenerations(*) in the degenerative intervertebral disc were observed in irregular form (× 200).

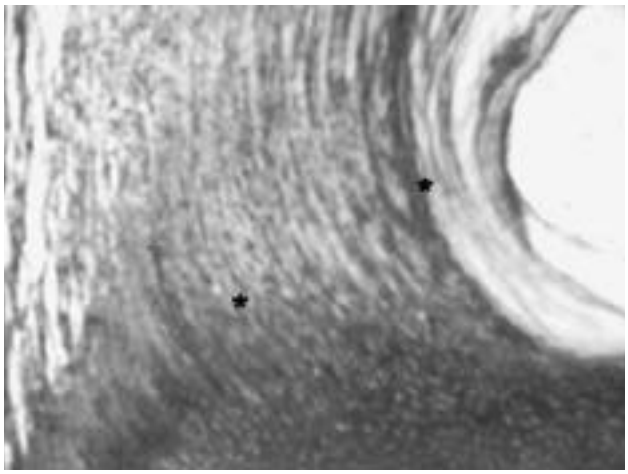

Fig. 2. Extracellular matrix fibers were seen with regular form(*) in the neonate disc (×200).

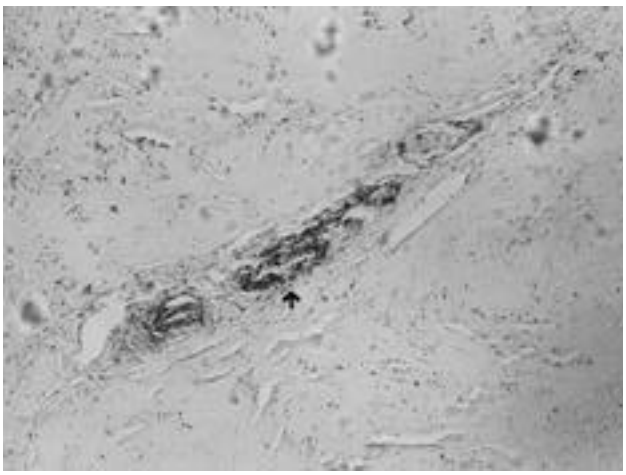

Fig. 3. Blood vessels associated with the type IV collagen was observed in anulus fibrosus (× 100).

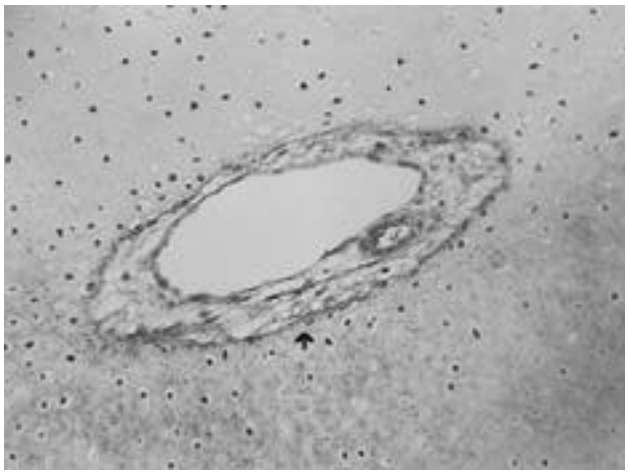

Fig. 4. Type IV Collagen was expressed with blood vessels in neonate disc (× 200).

Table 1. The immunoexpression of type IV collagen.

	Type IV collagen	
	+	-
Neonate	22	0
Internal disc derangement	12	0
Isthmic spondylolisthesis	24	0
Spinal stenosis with instability	18	0

(P > 0.05, P* > 0.05)

Table 2. The results of alcin-blue in the intervertebral disc.

	Myxomatous degeneration	
	+	-
Neonate	0	22
Internal disc derangement	12	0
Isthmic spondylolisthesis	26	0
Spinal stenosis with instability	18	0

(P < 0.05)

2. 통계학적 검색

질환군과 대조군 사이의 제 4형 교원질의 발현의 차이는 없었다(Table 1, p>0.05). 질환군 사이의 제 4형 교원질의 발현의 차이점은 없었다(p>0.05). 질환군 사이에서는 점액종성 변화가 전례에서 관찰되었으나 불균일하게 관찰되었고 이런 변화를 객관적으로 평가할 수 있는 기준이 없어 질환군 사이에서 점액종성 변화에 대한 통계학적 검증은 실시할 수 없었다(Table 2).

고 찰

추간 판 조직은 3개의 다른 구조적 특성을 가지고 있으며, 각각은 수핵과 내측 및 외측 섬유륜으로 나누며, 각각의 위치에 따라서 교원질의 구성 성분이 다르게 이루어지고 있다. 교원질은 추간 판, 건, 인대, 심장 valve, 내장 등에 존재하며, crimping이라는 형태로 존재한다. 이런 crimp 형태는 이런 조직들의 기계적 반응에 중요한 구성 요소로 작용한다[4]. 이런 조직들에 부하가 작용하게 되면 교원질의 crimp 형태가 점차적으로 펴지게 되며, 교원질의 점차적인 신장이 이루어지게 된다[4]. 추간 판 조직의 구성 성분 중 교원질을 구조적인 면에서 매우 중요한 역할을 하며, 7종의 교원질이 구성 성분으로 알려져 있다[2,3,6]. 이런 교원질은 추간 판의 부위 및 퇴행성 변화에 따라서 그 구성비가 변한다. 제 1형 및 제 2형 교원질은 섬유륜과 수핵을 구성하는 주된 교원질로 알려져 있으며[7]. 섬유륜에서 제 2형 교원질보다는 제 1형 교원질이 주된 교원질이며, 수핵에서는 제 2형 교원질이 주된 교원질로 알려져 있다[2].

섬유륜의 부위별 교원질의 구성 변화는 후방 추간 판 섬유륜의 바깥층으로 갈수록 제 1 형 및 2형 교원질의 구성비가 증가하며, 또한 전방 추간 판 섬유륜의 바깥층으로 갈수록 제 1형 대 제 2형 교원질의 구성비가 감소하는 것으로 알려져 있다[5]. 퇴행성 변화에 따른 교원질 구성의 변화는 정상 추간 판에서는 퇴행성 변화로 보이는 추간 판 조직에서보다 제 1형 교원질의 합성이 수핵과 섬유에서 모두 증가되는 것으로 보고되고 있다[8]. 제 3, 5, 6, 9, 11형의 교원질로 추간 판을 구성하고 있는 교원질로 알려져 있으나 퇴행성 변화에 따른 정확한 변화 양상은 보고되고 있지 않다[1].

제 4형 교원질은 기저막(basement membrane)을 구성하는 주된 교원질로 추간 판 조직에서는 거의 연구된 것이 없으나 Nerlich 등[10]과 Kaapa 등[9]이 혈관 형성과 관계가 있거나 손상된 추간 판 조직에서 발견된다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 제 4형 교원질의 존재는 주로 섬유륜의 외측 1/2에서 분포하는 혈관의 구성 성분의 형태로 관찰되었으며, 이미 존재하는 혈관이 구성 성분과 관련이 있었다. 제 4형 교원질의 발현은 대조군과 질환군의 추간 판 조직 전례에서 관찰되었고, 혈관 형성중 미세 혈관 보다 큰 혈관의 형성에 관여하는 양상으로 관찰되었다. 이 외에도 제 4형 교원질의 변화 양상은 추간 판의 퇴행성 변화와는 관련이 없었으며, 분포 양상도 변화가 없었다. 본 연구의 결과는 이제까지 제 4형 교원질이 혈관 형성과 관련이 있다는 Nerlich 등[10]과 Kaapa 등[9]의 보고와 결과는 같으나, 이들이 손상된 추간 판에서만 관찰된다는 결과와는 달리 신생아의 추간 판의 혈관에서도 제 4형 교원질의 발현이 관찰되었다. 이 결과로 보아 제 4형의 교원질은 추간 판 조직의 손상의 유무나 퇴행성 변화와는 관련이 없으며, 추간 판 조직내의 혈관 형성에 관여하는 주된 교원질로 생각된다.

결 론

본 연구에서 추간 판 조직에서 관찰되는 제 4형 교원질의 존재는 주로 섬유륜의 외측 1/2에서 분포하는 혈관의 구성 성분의 형태로 관찰되었으며, 제 4형 교원질의 변화 양상은 추간 판의 퇴행성 변화와는 관련이 없었으며, 분포 양상도 변화가 없었다. 또한 신생아의 추간 판에서도 제 4형 교원질의 발현이 혈관 형성과 관련되어 관찰되었다. 이 결과로 보아 제 4형의 교원질은 추간 판 조직의 손상의 유무나 퇴행성 변화와는 관련이 없으며,

추간 판 조직내의 혈관 형성에 관여하는 주된 교원질로 사료된다.

REFERENCES

1) **Ahmed MU, Thorepe SR and Baynes JW** : *Identification of N (carboxymethyl)-lysine as a degradation product of fructose lysine in glycated protein. J Biol Chem, 261:4889-4894, 1986.*
2) **Beard HK, Ryvar R, Brown R and Muir H** : *Immunochemical localization of collagen types and proteoglycan in pig intervertebral discs. Immunology, 41:491-501, 1980.*
3) **Beard HK, Roberts S and O'Brien JP** : *Immunofluorescent staining for collagen and proteoglycan in normal and scoliotic intervertebral discs. J Bone Joint Surg, 63B:529-534, 1981.*
4) **Berkovitz B** : *Collagen crimping in the intra-articular disc and articular surfaces of the human temporomandibular joint. Arch Oral Biol, 45:749-756, 2000.*
5) **Brickley-Parsons D and Glimcher MJ** : *Is the chemistry of collagen in intervertebral discs an expression of Wolff's law? A study of the human lumbar spine. Spine, 9:148-163, 1984.*
6) **Eyre DR** : *Collagens of the disc. In:Chosh P, ed. The Biology of the Intervertebral Disc. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 171-188, 1988.*
7) **Ghosh P, Bushelll GR, Taylor TFK and Akeson WH** : *Collagens, elastins and noncollagenous protein of the intervertebral disc. Clin Orthop, 129, 124-132, 1977.*
8) **Herbert CM, Lindberg KA, Jayson MIV, et al** : *Changes in the collagen of human intervertebral discs during ageing and degenerative disc disease. J Mol Med, 1:79-91, 1975.*
9) **Kaapa E, Holm S, Han X, Takala T, Kovanen V and Vanharanta H** : *Collagens in the injured porcine intervertebral disc. J Orthop Res, 12:93-102, 1994.*
10) **Nerlich AG, Boos N, Wiest I and Aebi M** : *Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. Vichows Archv, 432(1):67-76, 1998.*

국 문 초 록

연구 계획 : 퇴행성 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 발현 형태 및 기능에 대하여 연구하고자 한다.
연구 목적 : 첫째, 퇴행성 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 분포 및 발현 형태에 대하여 연구한다. 둘째, 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 기능에 대하여 연구한다.
대상 및 방법 : 퇴행성 추간 판 질환으로 전방 추체 유합술을 시행받은 54명의 환자에서 적출한 추간 판 조직을 대상으로 하였다. 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 발현 및 추간 판의 퇴행성 변화의 관찰을 위해 점액종성 변형을 관찰하였다. 대조군으로는 부검시 채취한 신생아의 추간 판 조직 22례를 대상으로 하였다.
결과 : 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 발현은 섬유륜에서 관찰되었고, 혈관 형성과 관련이 있었다. 대조군과 질환군 사이에서 제 4형 교원질의 발현의 차이점은 없었다. 점액종성 변형은 퇴행성 추간 판 조직에서 불균등하게 관찰되었다.
결론 : 추간 판 조직에서 제 4형 교원질의 발현은 섬유륜에서 주로 관찰되었고, 혈관 형성과 관련이 있었다.

색인단어 : 추간 판 조직, 제 4형 교원질, 혈관 형성.

※ **통신저자 :** 전 창 훈
수원시 팔달구 원천동 산 5번지
아주대학교 의과대학 정형외과학실
Tel : 82-331-219-5220, Fax : 82-331-219-5229, E-mail : chjeon@ajou.ac.kr