대한척추외과학회지 제 12 권 제 2 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 12, No. 2, pp 91~100, 2005

Dexamethasone과 Transforming Growth Factor-Beta 1에 의한 인간 추간판 세포의 표현형 유지 및 기질 생성

표나실[#] · 권언혜 · 문성환 · 김 향 · 이광일 · 전지애 · 김기택[#] · 김학선 · 이환모

경희대학교 의과대학 정형외과학교실[#], 연세대학교 의과대학 정형외과학교실

Phenotypical Stability and Matrix Synthesis of Human Intervertebral Disc Cells in Response to Dexamethasone and Transforming Growth Factor-β1

Na-Sil Pyo, M.D.[#], Un-Hye Kwon, B.Sc., Seong-Hwan Moon, M.D., Hyang Kim, M.Sc., Kwang-il Lee, B.Sc., Ji-Ae Jun, B.Sc., Ki-Tack Kim, M.D.[#], Hak-Sun Kim, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Kyung Hee University Hospital[#],
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Study Design: An in vitro experiment.

Objectives: To evaluate the mRNA expressions of matrix components, and analyze the cellular proliferation and proteoglycan synthesis of human intervertebral disc cells in response to dexamethasone and TGF-β1

Summary of Literature Review: Corticosteroids are responsible for the regulation of a diverse range of biological processes through modulation of the expression of target genes. The direct injection of methylprednisolone to the intervertebral disc (IVD) has been shown to cause degeneration and calcification of the disc in rabbits. Systemic administration of hydrocortisone induced degeneration of notochordal cells, which accelerated the aging process of the disc in mice. Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) is known as a potent agent for the proliferation, differentiation and matrix synthesis of IVD.

Materials and Methods: IVD cells were isolated from ten patients, and subsequently cultured. Various doses of dexamethasone (DEX) and/or TGF-β1 were administered to the IVD cultures. DNA and proteoglycan syntheses were measured by the incorporation of [3H]-thymidine and [35S]-sulfate, respectively. RT-PCRs were performed for the expressions of aggrecan, collagen types I and II, and osteocalcin mRNA.

Results: Cultures with DEX showed increased cellular proliferation and decreased proteoglycan synthesis ($p<0.05$). TGF-β1 potentiated the proliferative effect of DEX, but failed to stimulate proteoglycan synthesis in the cultures containing DEX. There were no recognizable changes in the mRNA expressions of aggrecan, collagen types I and II, and osteocalcin in response to DEX and TGF-β1.

Conclusions: DEX demonstrated a proliferative effect on human IVD cells, with the combination of DEX and TGF-β1 showing potentiation of the proliferative effect, while at high doses(100 and 1000nM, the DEX was shown to down-regulate the proteoglycan synthesis. Caution should be exercised in the use of corticosteroid in the therapeutic approaches for the treatment of disc disease or in the regenerative matrix of the IVD.

Key Words: Dexamethasone, Intervertebral disc (IVD), TGF-β1, Proteoglycan

Address reprint requests to
Hwan-Mo Lee, M.D.
Department of orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
＃134 Shinchon-dong, Soedaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: 82-2-361-5648, Fax: 82-2-363-1139, E-mail: hwanlee@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

부신피질호르몬(corticosteroid)은 강력한 항소염 및 면역억제 효과를 가지므로 기도 질환, 자가 면역질환, 장기 이식환자, 피부 질환, 속 치료에 광범위하게 이용되고 있다[1,2,3,4]. 특히 정형외과 영역에서는 급성 또는 만성 관절염 및 건초염(tenosynovitis)에서 염증 증상의 호전을 위해 관절 내 혹은 인대 주위에 부신피질호르몬을 주사하기도 한다[5,6]. 부신피질호르몬의 관절 연골 세포에 대한 효과에 대해서는 많은 연구가 진행되었으며, 부신피질호르몬의 투여가 matrix metalloproteinase를 감소시키고[7] 동통을 감소시키며, 관절 연골로의 분화를 촉진, 관절 연골 기질을 유지시켜 임상적으로 관절 내 장기 주사에도 해부학적 퇴행이나 증상의 악화는 없다고 하지만[6, 8,9] 한편으로는 관절 연골 표현형 발현을 억제하고[10] 과도한 부신피질 호르몬의 투여는 원래의 관절염 경과에 상관없이 관절 연골을 손상시킨다는 보고도 있었다[11,12]. 부신피질호르몬에 의한 관절 연골의 변화로는 Safranin O 염색도의 감소, 연골세포 괴사, 세포 수와 당단백, 교원질의 감소, 골 연골 결손 재생의 지연 등이 있었으며[13,14], 이러한 상반되는 생물학적 효과는 부신피질호르몬의 농도, 세포의 분화 상태, 세포의 종류, 배양 상태 등에 영향을 받아 나타나게 된다고 알려져 있다[15].

쥐에서 hydrocortisone을 전신 투여하고 추간판의 수핵부(nucleus pulposus)를 전자현미경으로 관찰하면 척삭세포(notochordal cell)의 변성이 일어나고 이러한 변화는 수핵부의 변연부에서 시작하여 고농도의 hydrocortisone을 투여할수록 수핵부의 중간 부까지 변화가 일어나 결국은 추간판의 변성 및 조기퇴행을 일으킨다[16]. Methylprednisolone acetate를 직접 토끼의 추간판에 주사하면 수핵부 및 내측 섬유륜 부위에서 기질 변성의 소견이 있으며 부분적으로 석회화 소견이 관찰된다[17]. 직접적인 추간판 조직에 대한 효과는 아니지만 탈출된 추간판 조직에 부신피질 호르몬을 투여하면 자가 흡수 반응이 지연된다는 보고도 있었다[18].

Transforming Growth Factor-beta 1(TGF-β1)은 조직의 성장, 분화, 기질 생성, 면역 반응 등 다양한 생물학적 반응을 조절하는 기능을 가지고 있으며 특히 척추 추간판 조직에서는 강력한 기질 재생능력으로 추간판 퇴행 혹은 변성에서 치료적 성장인자로 제시되었으며[19,20] 실제적으로 유전자치료에서치료적 유전자로 이용되기도하였다[21,22].

부신피질호르몬의 생물학적 효과는 지질 친화성을 가진 호르몬이 세포막을 쉽게 통과하여 세포내의 수용체와 결합하여 핵 내로 이동하고 목표 유전자의 glucocorticoid response element와 결합하여 목표 유전자들의 발현을 조절함으로서 나타난다[23,24]. 이와는 대조적으로 기존의 발현조절인자인 AP1, NF-KB, Oct1, Oct2, C/EBPb, Stat5와도 상호 작용하여 목표 유전자 발현을 조절하기도 한다[5]. TGF-β1은 세포막 수용체를 경유하여 세포 내 신호 전달물질 Smad를 경유하여 목표 유전자 발현을 조절함으로서 생물학적 반응을 일으킨다[26,27]. 최근 연구에서 부신피질호르몬과 TGF-β1이 세포내 신호전달과정에서 상호 작용이 있다고 보고 되었는데 이 과정을 자세히 보면 TGF-β1에 의한 fibronectin, 교원질, matrix metalloproteinase의 발현 증가가 부신피질호르몬에 의해 발현이 억제 되고[7,25,28,29] glucocorticoid receptor가 TGF-β1에 의해 자극되는 plasminogen activator inhibitor-1 유전자 발현을 억제하며 TGF-β1 세포내 신호 전달의 중요 인자인 Smad 3, 4의 활성화를 억제한다고 하였다[25]. 이에 반해 TGF-α가 부신피질호르몬에 의한 gap junction 자극과 fascin의 발현저하를 회복시킨다는 보고도 있다[30].

척추 추간판의 변성은 주로 당단백 및 제 II형 교원질의 감소로 추간판 내 수분 압의 저하로 나타나고 이로 인하여 척추의 전반적인 퇴행이 일어나게 되며[31,32,33,34], 일단 추간판 변성 및 퇴행이 진행되면 생역학적으로 척추 운동 분절의 불안정을 초래하여 결국은 균열된 섬유륜(anulus fibrosus)과 변성된 추간판 조직이 정상 생역학적 힘을 견디지 못하고 척수강 내로 탈출하며 이로 인하여 요통 및 신경 증상을 일으키고 만성인 경우는 척추체 및 후관절의 퇴행성 변화에 의한 퇴행성 척추증 및 척추관 협착증 등의 다양한 임상 양상을 보이게 된다[35]. 이러한 척추 추간판 변성에서 치료적 접근법으로서 TGF-β1이 기질 재생의 목적으로 사용되어지며 부신피질호르몬 역시 관절 연골세포에서 보고 된 바와 같이 추간판의 표현형 유지 및 기질 보호 효과를 가질 수도 있다. 그리하여 본 연구에서는 인간의 추간판 세포에서 부신피질호르몬의 세포 증식, 기질 생성, 연골성 표현형 발현 등 생물학적 효과를 실험적으로 알아보고 이미 탁월한 기질 재생능력을 가진 치료적 성장 인자로 보고 된 TGF-β1을 동시 투여하여 TGF-β1의 기질 재생 효과가 부신피질호르몬으로 변화가 있는 지를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 추간판 세포 배양

추간판 술식을 시행한 10명의 환자 (28세~48세)에서 추간판의 수핵 및 내측 섬유륜 부위의 조직만을 채취하였다. 통상 채취 후 20분 내에 수술실에서 실험실로 옮긴 후 채취된 추간판 조직으로부터 혈액 및 체액을 제거하기 위해 Dulbecco's Phosphate-buffered saline (D-PBS, Invitrogen, Grand Island, NY)으로 세척, 순차적 효소 소화법으로 조직에서 분리하였다. 이를 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썬 다음 5% 우태아 혈청(FBS, JRH BIOSCINCES, Lenexa, KS)과 1% v/v penicillin/streptomycin (all antibiotics from Invitrogen, Grand Island, NY)이 함유된 Ham's F-12 medium (Invitrogen, Grand Island, NY)에 0.2% pronase (Sigma, St. Louis, MO), 0.004% deoxyribonuclease Ⅱtype Ⅳ (DNase, Sigma, St. Louis, MO)를 첨가한 제1의 효소용액을 이용하여 37℃에서 60분간 소화시켰다. 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II (Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제 2의 효소용액으로 역시 37 ℃에서 2~3시간 정도 소화시켰다. 분리된 추간판 세포는 Dulbeccos Modified Eagle Medium; Nutrient Mixture F-12 (Ham) (DMEM/F12, Invitrogen, Grand Island, NY)으로 세척, Nylon 여과지 (pore size 75 um)를 사용하여 부유 조직을 제거한 후 25 cm^2-EasyFlask™ (NUNC, Rockilde, Denmark)에서 배양하였다. 세포 배양액은 10% FBS, 25 ug/ml ascorbic acid, 1% v/v penicillin/streptomycin (all antibiotics from Invitrogen, Grand Island, NY)을 함유한 DMEM/F12 배양액을 사용하였다. 추간판 세포는 3주간 5%의 CO_2를 포함한 37 ℃ 습윤 배양기에서 계대 배양하였고 3일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체하였다.

2. 실험군

인간 추간판 세포에 대한 dexamethasone의 효과를 알기 위한 실험에서는 추간판 세포에 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 dexamethasone을 처리한 후 3일간 배양 한 것을 실험군으로 정하였으며 인간 추간판 세포에 대한 dexamethasone과 TGF-β1의 상호 효과를 알기위한 실험에서는 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 dexamethasone과 10 ng/ml TGF-β1을 동시에 처리한 군을 실험군으로 정하였다. 생리 식염수만 처리한 군을 이 두 실험의 대조군으로 사용하였다.

3. 세포 생존 분석

MTT stock 용액(5 mg MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)/ml)을 미리 만들어 0.45 ㎛ syringe filter로 filtration해 놓고 working 용액은 1:5(MTT stock용액: 배양액)로 하여 사용하였다. Dexamethasone과 TGF-β1을 처리한(단독 혹은 동시에) 추간판 세포를 새로운 기본 배지로 교체해 주고 50 ㎕ MTT working 용액을 첨가하였다. 알루미늄 호일로 plate를 싸서 빛을 차단한 후 37 ℃에서 4시간동안 반응시켰다. 상층액을 조심해서 걷어낸 다음 DMSO (Dimethy sulfoxide, sigma, D-5879)를 200 ㎕ 첨가하여 10분 동안 rotator에서 혼합시켰다. spectrophotometer를 사용하여 570 nm의 파장에서 Absorbance를 측정하였다.

4. DNA 생성([3H]-Thymidine incorporation)

세포 증식 반응을 알아보기 위하여 DNA 생성을 측정하였다. 추가 배양 후 배양액을 [methyl-3H]thymidine (Amersham pharmacia, Uppsala, sweden) 5 ㎍Ci/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포를 PBS로 씻어내고, trypsin/EDTA 효소처리법을 통해 세포만을 분리, cell harvester를 이용하여 Glass microfiber filter (Whatman, Maidstone, England)에 세포만을 흡착시켰다 . D-PBS로 수차례 세척하여 unbounded [methyl-3H]thymidine을 완전히 제거하고 16시간동안 상온에서 membrane을 완전히 말린 다음 이 membrane을 scintillation vial에 담아 Liquid scintillation cocktail 용액 (Beckman, Fullerton,CA)을 3 ml 첨가하고 상온에서 16시간이상 방치하여 DNA가 노출되도록 하였다. βscintillation counter (Packard, Downers Grove, IL)를 이용하여 DNA 양을 측정하였다.

5. 당단백 생성 측정([35S]-sulfate incorporation)

각 실험군 배양에서 기저 상태 및 조작 후 배양액을 [35S]-sulfate (Amersham pharmacia, Uppsala, Sweden) 20 ㎍Ci/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하고 4시간 추가 배양하였다. 배양액을 제거한 후 8M guanidine hydrochloride, 20 mM EDTA, 그리고 proteinase inhibitors의 혼합액을 세포에 첨가하여 4 ℃에서 48시간동안 당단백을 추출하였다. 방사선 동위원소로 표식되는 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 통과시켜 순차적으로 용출한 후, Liquid scintillation cocktail 용액 (Beckman, Fullerton, CA)을 6 ml 첨가하여 16시간 상온에서 방치하였다. 제 2, 3, 4번째의 용출 용액만을 βscintillation counter (Packard, Downers Grove, IL)로 측정하여 새로이 생성된 당단백의 양을 알아보았다.

6. 세포 표현형 측정(Aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질 mRNA 발현)

Total RNA는 RNeasy mini kit (QIAGEN, Maryland, USA)을 이용하여 분리하였으며 분리된 총 RNA 1ug에 Oligo d(T) 16 primer 2.5 uM (Invitrogen, Grand Island, NY)를 첨가하여 70 ℃에서 5분간 annealing시킨 후 RTpremix (Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 42 ℃에서 1시간, 95 ℃에서 5분, 4 ℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1 ul에 각각의 primer 10 pmol/ul 씩을 첨가하여 최종 부피가 20 ul가 되도록 한 후 PCR premix (Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 aggrecan, 제 I형 교원질, 제 II형 교원질, βactin 유전자에 대한 PCR을 실시하였다.(Table 1, 2) RT-PCR에 대한 internal control로 βactin을 사용하였으며 유전자 발현 정도는 TINA program을 이용하여 비교 분석하였다.

7. 통계

자료는 SPSS (SPSS, Chicago, IL)를 사용하여 정리하였고 각 군의 비교는 t-test 및 ANOVA를 이용하였고 통계적 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다.

결 과

1. 세포 생존 검사

인간의 추간판 세포에 다양한 농도로 dexamethasone (0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)을 처리하여도 세포의 생존율은 대조군과 차이가 없었으며 dexamethasone과 TGF-β1 (10 ng/ml)을 동시에 처리하여도 세포 생존율에는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 따라서 dexamethasone과 TGF-β1 (10 ng/ml)은 인간 추간판 세포에 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

2. Dexamethasone에 의한 추간판 세포의 DNA 생성

Dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000nM)을 처리한 실험군에서의 DNA 생성을 분석해보면 저농도 (0.1, 1 nM)의 dexamethasone을 처리한 추간판 세포에서는 대조군과 차이가 없었으나($p=0.09$) 고농도 (10, 100, 1000 nM)의 dexamethasone을 처리한 실험군에서는 통계적으로 의의

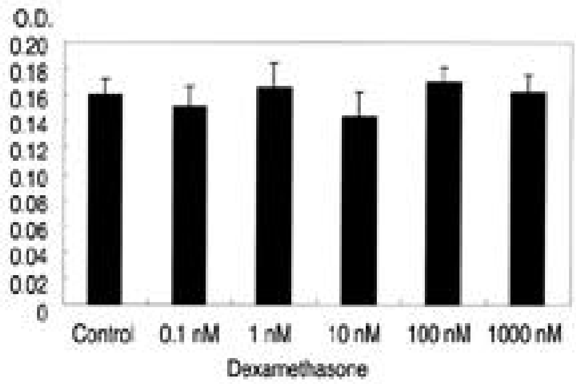

Fig. 1. Survival of intervertebral disc cells with various concentration of dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000nM). There is no significant cytotoxicity of dexamethasone with dexamethasone compared to control.

Table 1. Sequences of the RT-PCR Primers Used

Primer	Sequence	Length	Size (bp)
βactin	5'-GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG-3' 5'-AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA-3'	20 20	238
Aggrecan	5'-GAA TCT AGC AGT GAG ACG TC-3' 5'-CTG CAG CAG TTG ATT CTG AT-3'	20 20	541
Collagen type Ⅰ	5'-CCT GTC TGC TTC CTG TTA AC-3' 5'-AGA GAT GAA TGC AAA GGA AA-3'	20 20	182
Collagen type Ⅱ	5'-CAG GAC CAA AGG GAC AGA AA-3' 5'-TTG GTC CTT GCA TTA CTC CC-3'	20 20	328

Table 2. PCR Conditions

Primer	Conditions Cycle			
	Denaturation	Annealing	Polymerization	cycles
βactin	94 ℃ 5 sec	53 ℃ 5 sec	72 ℃ 30 sec	24
Aggrecan	94 ℃ 5 sec	47 ℃ 5 sec	72 ℃ 30 sec	26
Collagen type Ⅰ	94 ℃ 5 sec	48 ℃ 5 sec	72 ℃ 30 sec	21
Collagen type Ⅱ	94 ℃ 5 sec	48 ℃ 5 sec	72 ℃ 30 sec	40

있게 증가하기 시작하여 100 nM에서는 90%, 1000 nM에서는 약 80%정도 DNA 생성이 증가함을 알 수 있었다 ($p<0.05$)(Fig. 2). 이는 dexamethasone이 단독으로 인간 추간판 세포의 증식을 자극할 수 있음을 증명하였다.

3. Dexamethasone과 TGF-β1에 의한 추간판 세포의 DNA 생성

생리 식염수만 처리한 군과 dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)과 TGF-β1 (10 ng/ml)을 동시에 처리한 실험군에서 각각 DNA 생성을 분석해보면 dexamethasone의 농도가 1 nM에서부터 대조군에 비해 통계적으로 의의 있게 DNA 생성이 105% 증가하여 10 nM 농도에서는 80%, 100 nM 농도에서는 180%, 1000 nM 농도에서는 185%의 DNA 생성 증가가 있었다($p<0.05$) (Fig. 2). 특히 100, 1000 nM dexamethasone과 10ng/ml의 TGF-β1 동시 처리는 무려 180%, 185%의 DNA 생성 자극효과가 있었다. Dexamethasone의 농도가 100, 1000 nM에 이르면 DNA 생성 효과는 어느 정도 고원화되는 경향이 있으며, 이러한 dexamethasone 농도에 의한 고원화 현상은 TGF-β1의 투여로도 변화가 없었다.

4. Dexamethasone에 의한 추간판 세포의 당단백 생성

Dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)을 처리한 실험군에서 당단백 생성을 분석해보면 0.1, 1 nM 농도의 dexamethasone을 처리한 실험군이 대조군에 비해 당단백 생성이 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 의의는 없었고 10 nM의 dexamethasone을 투여하였을 때 추간판 세포의 당단백 생성은 대조군에 비해 약 35% 감소하였으며 100 nM에서는 40%, 1000 nM에서는 40%의 당단백 생성 감소가 있었다($p<0.05$)(Fig. 3).

5. Dexamethasone과 TGF-β1에 의한 추간판 세포의 당단백 생성

생리 식염수만 처리한 군과 dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)과 TGF-β1 (10 ng/ml)을 동시에 처리한 실험군에서 각각 당단백 생성을 분석해보면 TGF-β1 (10 ng/ml)을 처리하였을 때 약간의 당단백 생성자극이 있었으나 이러한 효과는 1nM의 dexamethasone의 농도에서 소멸되어 당단백 생성이 30% 감소하고 10, 100, 1000 nM의 dexamethasone에서는 대조군에 비해 각각 15%, 40%, 50%의 당단백 생성 감소가 있었다($p<0.05$)(Fig. 3).

6. Dexamethasone에 의한 세포 표현형 발현

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction으로 연골성 세포 표현형인 aggrecan과 제 I 형 교원질, 제 II형 교원질의 mRNA 발현을 분석해보면 dexamethasone을

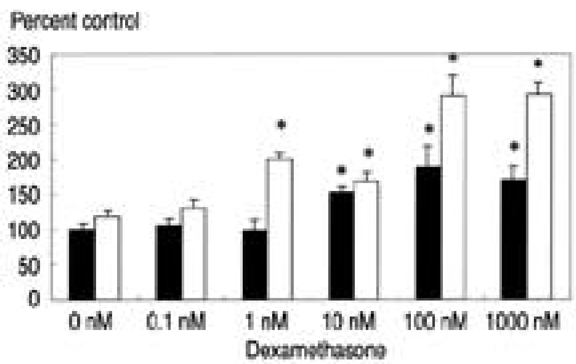

Fig. 2. [3H]-thymidine incorporation with various dose of dexamethasone and TGF-β1(10 ng/ml). White bar denotes culture with TGF-β1. Dexamethasone with a concentration of 10 nM, 100 nM, and 1000 nM renders increased DNA synthesis compared to control($p<0.05$). Culture with dexamethasone and TGF-β1(10 ng/ml) showed increased DNA synthesis from the 1nM of dexamethasone and also demonstrated synergistic effect in DNA synthesis. * $p<0.05$

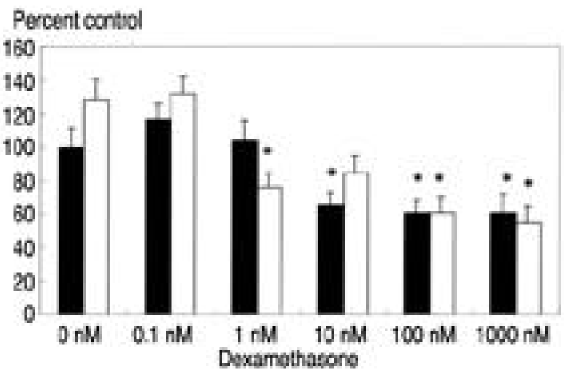

Fig. 3. [35S]-sulfate incorporation with various dose of dexamethasone and TGF-β1(10 ng/ml). White bar denotes culture with TGF-β1. Dexamethasone with a concentration of 10 nM, 100 nM, and 1000 nM renders decreased proteoglycan synthesis compared to control ($p<0.05$). Culture with dexamethasone and TGF-β1(10 ng/ml) showed further decrease in proteoglycan synthesis at 1nM of dexamethasone. * $p<0.05$

농도별(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)로 다르게 처리하여도 세포 표현형의 발현에는 아무런 영향을 주지 못함을 알 수 있었다(Fig. 4).

7. Dexamethasone과 TGF-β1에 의한 세포 표현형 발현

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction으로 연골성 세포 표현형인 aggrecan과 제 I 형 교원질, 제 II형 교원질의 mRNA 발현을 분석해보면 dexamethasone(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)과 TGF-β1(10 ng/ml)을 동시에 처리하였을 때 제 I형, 제 II형 교원질의 mRNA 발현은 대조군과 차이가 없었으나 aggrecan mRNA 발현만은 대조군에 비해 50~60% 감소되었다. TGF-β1에 의한 aggrecan mRNA 발현 감소는 dexamethasone의 농도에는 무관하게 일정하게 나타났다(Fig. 5).

고 찰

부신피질호르몬은 다양한 생물학적 반응을 일으키며 현대의학에서는 합병증을 감수하면서도 다양한 영역에서 필수 불가결하게 사용되고 있다[2,3]. 인체 조직에 대한 부신피질호르몬의 생물학적 반응과 세포내 기전은 광범위하게 연구되었으나[7,23,24,25,26,27,28,29,30], 척추 추간판에서의 부신피질호르몬 효과에 대해서는 그리 많은 연구가 진행되지 않았다[16,17].

본 연구에서는 인간의 추간판 세포를 분리 배양하고 dexamethasone을 농도별로 처리한 후 생물학적 반응을 알아보았으며 TGF-β1을 추가로 처리하여 dexamethasone의 효과가 항진 혹은 억제 되는지를 알아보았다. 본 연구의 결과를 보면 인간의 추간판 세포에서 dexamethasone은 세포 독성을 일으키지는 않았으며 10nM의 농도부터 DNA 생성 증가가 관찰되며 100 nM의 농도에서는 무려 100%의 DNA 생성 증가가 있었다. 이는 일정 농도 이상의 dexamethasone이 인간의 추간판 세포에 세포 증식 반응을 일으키며 이런 세포 증식 효과는 TGF-β1의 투여로 더욱 항진되었다. 더욱이 TGF-β1 투여군에서는 저농도의 dexamethasone(1 nM) 에서도 세포 증식 반응이 나타났으며 100 nM의 dexamethasone에서는 dexamethasone 단독 투여보다 2배 높은 세포증식 (DNA생성) 반응이 있었다. 이는 세포 증식 반응에 있어서 dexamethasone과 TGF-β1이 상승 작용의 세포내 신호전달기전에 영향을 미친 것으로 유추되며 이는 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Dexamethasone에 의한 추간판 세포의 당단백 생성 효과는 저 농도에서는 아무런 변화가 없었으나 10 nM이상의 농도에서는 대조군에 비해 무려 40%의 생성 감소가 있었다. 이는 dexamethasone이 세포 증식 효과는 있지만 개개 세포의 기질 생성에는 오히려 악영향을 미친다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 전신 투여된 부신피질호르몬의 추간판 조직에 대한 효과를 예측할 수 있었다. 즉 고농도의 부신피질 호르몬은 추간판의 기질 생성을 억제하여 조기 변성을 야기할 가능성도 있다고 생각된다. TGF-β1과 동시에 dexamethasone을 투여하여도 dexamethasone의 기질 생성 억제 반응은 호전되지 않았는데 이는 dexamethasone과 TGF-β1의 상호 상승적인 세포 증식 효과에 의한 것이라고 생각되어진다. 즉 정상 조직은 세포 분열 시에는 기질 생성 반응이 감소되며 세포 분열이 끝난 후에야 원래 세포의 표현 형질에 맞는 기질을

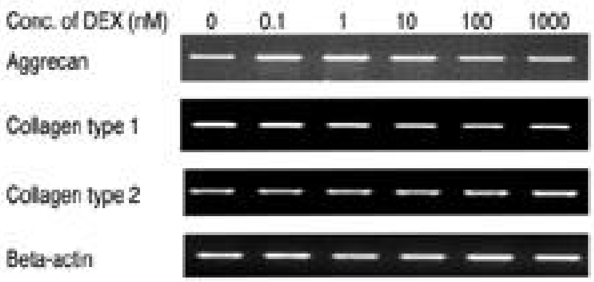

Fig. 4. Expression of aggrecan, type I collagen, and type II collagen mRNA measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Cultures with various dose of dexamethasone showed no significant changes in the expression of aggrecan, type I collagen and type II collagen mRNA expression. Densitometric date was normalized by β-actin.

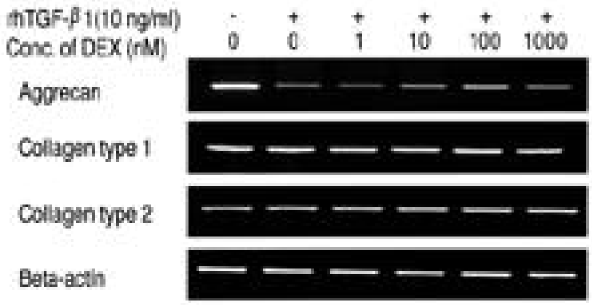

Fig. 5. Expression of aggrecan, type I collagen, and type II collagen mRNA measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Cultures with various dose of dexamethasone and with TGF-β1(10 ng/ml) showed down-regulation of aggrecan mRNA expression while unchanged pattern in type I collagen and type II collagen mRNA expression. Densitometric date was normalized by β-actin.

생산함을 고려하면 본 연구의 세포 증식 효과와 기질 생성효과의 반비례는 설명될 수 있을 것이다.

연골세포에 대한 부신피질 호르몬의 효과 연구를 크게 나누어 보면 첫째, 관절보호 효과 측면에서의 결과로 부신피질호르몬의 투여가 matrix metalloproteinase와 동통을 감소시키고[7], 관절 연골로의 분화를 촉진, 관절 연골 기질을 유지시켜 임상적으로 관절 내 장기 주사에도 해부학적 퇴행이나 증상의 악화는 없다는 연구 결과이며[6,8,7,9], 두 번째는 이와 대조적으로 부신피질호르몬이 관절 연골 표현형 발현을 억제하고[10] 과도한 부신피질호르몬의 투여는 원래의 관절염 경과에 상관없이 관절 연골을 손상시키며[11,12] 관절 연골의 Safranin O 염색도 감소, 연골세포 괴사, 세포수 감소, 당단백 감소, 교원질 감소, 골연골 결손, 재생 지연 등을 가져온다는 결과이다[13,14]. 이러한 관절연골에 대한 부신피질호르몬의 상반되는 생물학적 효과는 부신피질호르몬의 농도, 세포의 분화 상태, 세포의 종류, 배양 상태 등에 영향을 받아 나타나게 된다[15]. 본 연구에서 증명된 바와 같이 추간판 세포의 경우 부신피질호르몬은 연골성 표현형을 유지하고 세포 증식은 유도하나 기질 생성 자체는 고농도에서 억제시킴을 알 수 있었다. 그리고 이러한 작용은 전술한 부신피질호르몬의 세포내 신호전달과정의 복잡성을 고려하면 분명히 다른 생물학적 조작과 연관하여 다양하게 나타날 수 있을 것이다.

추간판의 정상적인 기능은 추간판을 구성하는 교원질 및 당단백의 상태에 관련이 있으며 당단백 생성 감소, 제 II형 교원질의 감소로 추간판 내 수분 분압이 감소되어 전형적인 척추 추간판의 변성 혹은 퇴행이 일어난다[31,32,33,34]. 이러한 의미로 교원질 및 당단백 등 기질 생성 자극은 추간판 퇴행의 치료 및 예방에 중요한 기전을 제공한다. 추간판 조직에 성장인자 투여 혹은 성장인자 유전자 전달 등의 생물학적 조작법은 추간판 기질 생성을 증가시킬 수 있다[21,22]. 이러한 추간판의 퇴행 과정 및 기질 재생 시도에서 부신피질호르몬이 관여하리라 사료된다. 본 연구 결과로 유추해보면 전신적인 부신피질호르몬의 농도가 추간판의 기질 생성에 영향을 미칠 수 있으며 부신피질 과잉상태를 보이는 특수한 질환들(Cushing syndrome, Cushing disease, renal allograft) 에서는 추간판 퇴행이 조기 진행될 것이라고도 생각할 수 있다. Dexamethasone에 의한 추간판 세포의 증식 효과는 실험실 연구 및 추간판 세포 이식 치료에서 유용하리라 사료된다. 즉 추간판 변성 및 퇴행의 치료로서 사용되어 질 수 있는 추간판 세포 이식[36,37,38,39] 및 유전자 치료[21,22,40,41] 의 가능성을 고려하면 부신피질호르몬의 유용성은 강조되어 질 수 있다. 자가 추간판 세포를 분리 배양하고 이 때 dexamethasone 단독 혹은 TGF-β1과 동시에 투여하여 추간판 세포의 표현형을 유지하면서 세포 증식을 유도하여 세포를 시험관에서 증폭시킨 후 추간판 내 재이식하는 것이 가능해질 것이다. 유전자 치료를 이용하면 이 과정은 더욱 효율적으로 진행될 수 있을 것이다. 즉 자가 추간판 세포를 분리하고 dexamethasone 자극 하에 증폭 배양하고 이후 유전자 전달로 추간판 세포를 유전적으로 조작한 후 추간판에 재이식하면 dexamethasone에 의한 세포 증식 및 표현형 유지능력을 이용하면서 유전자 전달에 의한 조직 내 기질 생성 자극 효과를 극대화할 수 있으리라고 사료된다. 아직은 괄목할만한 성과는 없지만 조직 공학적 입장에서 추간판 세포를 배양하고 기질 생성을 자극하여 체외에서 추간판 조직을 생산하고 이를 적절한 영양 공급 환경 하에 재이식 할 수 있다면 이는 이상적인 조직 대체 혹은 조직 재생이 될 수 있다. 이러한 의미로 인위적인 지지체를 고안하고 여기에다 추간판 세포를 이식한 후 초기 단계에는 본 실험에서 증명된 세포 증식 효과를 띤 dexamethasone를 투여하여 세포 증식을 유도하고 지지체내 충분한 세포수가 달성되면 dexamethasone를 중단하고 세포 기질 생성을 자극할만한 다른 생물학적 자극을 가함으로서 효과적인 인공 추간판의 조직 공학적 생산이 가능할 수도 있을 것이다. 그러나 본 연구 결과에서와 같이 dexamethasone은 기질 생성 자극 효과는 전혀 없고 오히려 당단백 합성을 억제함을 보아서는 추간판 기질 재생과 동통 완화를 목적으로 추간판 내 부신피질 호르몬의 주사[42,43]는 지양되어야 할 것이다.

본 연구에서는 추간판 세포를 단층 배양하고 여기에 dexamethasone과 TGF-β1을 투여한 후 생물학적 상호 작용을 조사하였는데 이는 추간판 세포의 특수성을 고려하면 문제점으로 지적될 수 있다. 즉 추간판 세포의 연골성 세포는 3차원 배양 혹은 조직 배양일 때 원래의 표현형질을 발현하며 외부자극에 대하여도 생체 내와 유사한 반응을 일으킨다. 그러므로 본 실험의 결과를 생체내의 결과로 유추해석하기보다는 좀더 세련된 실험고안이 필요하리라고 사료된다. 또한 세포 증식 그리고 기질 생성 반응으로 dexamethasone과 TGF-β1의 상호 작용을 증명하였지만 이를 세포내 신호 전달과정에서 알아봐야 비로소 완전한 연구라고 사료된다.

본 연구에서 보강되어야할 부분은 향후 연구에서 추간판의 표현 형질을 잘 보전한다는 3차원 배양에서 dexamethasone의 효과를 검정할 필요가 있으며 또한 실험동물에서 부신피질호르몬의 전신 혹은 국소 투여 후 추간판의 변화를 연구해야 할 것이며 dexamethasone과 TGF-β1의 DNA 생성 효과 및 기질 생성 감소 효과를 세포내 신호전달 과정에서 연구가 필요하다고 생각되어진다.

결 론

1. Dexamethasone은 인간의 추간판 세포에서 DNA 생성을 자극하였으며 이 효과는 TGF-β1을 동시처리 하였을 때 더욱 증가하였다.

2. 고농도의 dexamethasone은 인간 추간판 세포에서 당단백 생성 억제 효과가 있었으며 TGF-β1의 투여로도 이 효과는 역전되지 않았다.

3. Dexamethasone에 의한 인간 추간판 세포의 연골성 표현형(aggrecan, 제 I형, 제 II형 교원질)에 대한 발현 증가는 나타나지 않았다.

4. TGF-β1은 인간 추간판 세포의 aggrecan mRNA 발현을 감소시켰으나 제 I형, 제 II형 교원질 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

따라서 Dexamethasone이 세포증식에는 뛰어난 효과가 있으나 기질 생성은 자극시키지 못하므로 인간 추간판 기질 재생을 목적으로 사용할 경우 Dexamethasone으로 세포증식을 유도한 후 세포 기질 생성을 자극할 만한 다른 생물학적 자극을 가함으로서 효과적인 추간판 재생을 기대할 수 있을 것이다.

참고문헌

1) **Behrend F, Kemppainen RJ**: *Glucocorticoid therapy, pharmacology, indications, and complications. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1997; 27:187-213.*

2) **Gotti E, Perico N, Perna A, et al**: *Renal transplantation: can we reduce calcineurin inhibitor/stop steroids? Evidence based on protocol biopsy findings. J Am Soc Nephrol 2003; 14:755-766.*

3) **Parameswaran K, Leigh R, O'Byrne PM, et al**: *Clinical models to compare the safety and efficacy of inhaled corticosteroids in patients with asthma. Can Respir J 2003; 10:27-34.*

4) **Young AL, Rao SK, Cheng LL, Wong AK, Leung AT, Lam DS**: *Combined intravenous pulse methylprednisolone and oral cyclosporine A in the treatment of corneal graft rejection: 5 year experience, Eye 2002; 16:304-308.*

5) **Grassi W, Farina A, Filippucci E, Cervini C**: *Intralesional therapy in carpal tunnel syndrome: a sonographic-guided approach. Clin Exp Rheumatol 2002; 20:73-76.*

6) **Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R, et al**: *Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2003; 48:370-377.*

7) **Pelletier JP, Mineau F, Raynauld JP, Woessner JR, Gunjasmith Z, Martel-Pelletier J**: *Intraarticular injection with methylpredisolone acetate reduce osteoarthritic lesion in parallel with chondrocyte stromelisin synthesis in experimental osteoarthritis. Arthritis Rheuma 1994; 37:414-423.*

8) **Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE**: *Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone marrow derived clonal cell population, effect of dexamethasone. J Cell Biol 1988; 106:2139-2151.*

9) **Takano T, Takigawa M, Suzuki F**: *Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. J Biochem 1985; 97:1093-1100.*

10) **Silbermann M, Maor G**: *Receptor mediated glucocorticoid inhibition of cell proliferation in mouse growth cartilage in vivo. Acta Endocriolo 1985; 108:343-350.*

11) **Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Mast W, Chase SW**: *Experimentally induced corticosteroid arthropathy. Arthitis Rheuma 1970; 13:263-277.*

12) **Salter RB, Gross A, Hall JH**: *Hydrocortisone arthropathy, an experimental investigation. Can Med J 1967; 97:374-377.*

13) **Chunekamrai S, Knook LP, Lust G, Maylin GA**: *Changes in articular cartilage after intraarticular injections of methyl-prednisolone acetate into equine joints. Am J Vet Res 1989; 50:1733-1741.*

14) **Trotter GW, McIlwraith CW, Yovich JV, et al**: *Effects of intraarticular administeration of methylpredinisolone acetate on normal equine articular catilage. Am J Vet Res 1991; 52:83-87.*

15) **Tressler RH and Salmon WD**: *Glucocorticoid inhibition of sulfate incorporation by cartilage of normal rat. Endocrinology 1975; 96:898-902.*

16) **Higuchi M, Abe K**: *Ultrastructure of the nucleus pulposus in the intervertebral disc after systemic administration of hydrocortisone in mice. Spine 1985; 10:638-643.*

17) **Aoki M, Kato F, Minmatsu K, Iwata H**: *Histologic changes in intervertebral disc after intradiscal injections of methylprednisolone acatate in rabbits. Spine 1997; 22:127-131.*

18) **Minamida A, Tamaki T, Hashizume H, Yoshida M, Kawakami M, Hayashi N**: *Effects of steroid and*

lipopolysaccharide on spontaneous resorption of herniated intervertebral disc, an experimental study in the rabbit. Spine 1998; 23:870-876.

19) **Gruber HE, Fisher EC, Desani B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN**: *Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-b1. Exp Cell Res 1997; 235:13-21.*

20) **Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS**: *Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. Spine 1991; 16:253-260.*

21) **Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, Hall RA, Robbins PD, Kang JD**: *Cocktail therapeutic gene transfer to human intervertebral disc cells cultured in three-dimensional alginate beads. Proceedings of North American Spine Society, New Orleans, 2000.*

22) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al**: *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β1 encoding gene. Spine 1999; 24:2419-2425.*

23) **Cutroneo KR**: *Relationship between glucocorticoid-mediated early decrease of protein synthesis and the steady state decrease of glucocorticoid receptor and TGF-b activator protein. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34:194-203.*

24) **Karin M**: *New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? Cell 1998; 93:487-490.*

25) **Song CZ, Tian X, Gelehert TD**: *Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor beta signalling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. Pro Natl Acad Sci 1999; 96:1776-1781.*

26) **Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P**: *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature 1997; 4;390(6659):465-471.*

27) **Massague J, Blain SW, Lo RS**: *TGF-βsignaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 2000; 103:295-309.*

28) **Guller S, Wonzniak R, Kong L, Lockwood CJ**: *Opposing actions of transforming growth factor-beta and glucocorticoids in the regulation of fibronectin expression in the human placenta. J Clin Endocrinol Metabol 80:3272-3278.*

29) **Slavin J, Unemori E, Hunt T Amento E**: *Transforming growth factor beta (TGF-beta) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. Growth factor 1994; 11:205-213.*

30) **Guan Y, Woo PL, Rubenstein NM, Firestone GL**: *Transforming growth factor alpha abrogates the glucocorticoid stimulation of tight junction formation and reverse the steroid induced downregulation of fascin in rat mammary epithelial tumor cells by a Ras-dependent pathway. Exp Cell Res 2002; 273:1-11.*

31) **Hardingham TE, Adams P. A**: *method for the determination of hyaluronate in the presence of other glycosaminoglycans and its application to human intervertebral discs. Biochem J 1976; 159:143-147.*

32) **Lipson SJ, Muir H**: *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine 1981; 6:194-210.*

33) **Melrose J, Ghosh P, Taylor TKF, et al.**: *A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibrosus. J Orthop Res 1992; 10:665-676.*

34) **Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME**: *Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res 1987; 5:198-205.*

35) **Buckwalter JA**: *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995; 20:1307-1314.*

36) **Ganey TM, Meisel HJ**: *A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation. Eur Spine J 2002; 2:S206-214.*

37) **Gruber HE, Hanley EN Jr**: *Recent advances in disc cell biology. Spine 2003; 28:186-193.*

38) **Gruber HE, Johnson TL, Leslie K, et al**: *Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using Psammomys obesus, the sand rat. Spine 2002; 27:1626-1633.*

39) **Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al**: *An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. Spine 2003; 28:548-553.*

40) **Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, et al**: *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer. Spine 2000; 25:2573-2579.*

41) **Nishida K, Kang JD, Suh J-K, Robbins PD, Evans CH, Gilbertson LG**: *Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: Implication for the treatment of intervertebral disc degeneration. Spine 1998; 3:2437-2443.*

42) **Ito S, Usui H, Maruyama K, Muro T**: *Roentgenographic evaluation of ossification and calcification of the lumbar*

spinal canal after intradiscal betamethasone injection. J Spinal Disord 2001; 14:434-438.

43) **Simmons JW, McMillin JN, Emery SF, Kimmich SJ**: *Intradiscal steroids. A prospective double-blind clinical trial. Spine 1992; 17:S172-175.*

국 문 초 록

연구계획: 실험자 연구

연구목적: 부신피질호르몬은 표적유전자의 발현을 조절함으로써 다양한 생물학적 반응을 일으킨다고 알려져 있다. Methylprednisolone acetate를 직접 토끼의 추간판에 주사하면 수핵부에서 기질 변성 소견이 있으며 부분적으로 석회화 소견이 관찰된다. 쥐에 hydrocortisone을 전신투여 하면 척삭세포의 변성이 일어나 결국은 추간판의 변성 및 조기 퇴행을 일으킨다는 보고가 있다. 또한 본 연구에서 사용한 TGF-β1은 조직의 성장, 분화, 기질생성, 면역 반응 등 다양한 생물학적 반응을 조절하는 기능을 가진다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 부신피질호르몬인 dexamethasone과 TGF-β1에 의한 인간 추간판 세포의 생물학적 반응을 알아보았다.

대상 및 방법: 10명의 환자로부터 인간 추간판 세포를 분리, 배양하였으며, 배양한 추간판 세포에 다양한 농도별로 dexamethasone을 처리하고, 이와 동시에 TGF-β1도 처리해 보았다. 세포 독성은 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay로 알아보았으며 DNA생성과 당단백 생성은 각각 [3H]-thymidine incorporation, [35S]-sulfate incorporation으로 분석하였다. 연골성 표현형인 aggrecan, 제 I 형 교원질, 제II형 교원질 mRNA 발현은 RT-PCR에 의한 densitometric assay로 분석하였다.

결과: Dexamethasone은 인간 추간판 세포에서 DNA 생성을 자극하였으며 이 효과는 TGF-β1에 의해 더욱 증가함을 나타내었다. 그러나 당단백의 생성은 감소함을 나타내었고 이는 TGF-β1에 의해 역전되지 않았으며 연골성 표현형의 발현은 유지시킴을 알 수 있었다.

결론: Dexamethasone이 세포증식에는 뛰어난 효과가 있으나 기질 생성은 자극시키지 못하므로 인간 추간판 기질 재생을 목적으로 사용할 경우 Dexamethasone으로 세포증식을 유도한 후 세포 기질 생성을 자극할 만한 다른 생물학적 자극을 가함으로서 효과적인 추간판 재생을 기대할 수 있을 것이다.

색인단어: Dexamethasone, 추간판, TGF-β1, 당단백, 기질생성

※ **통신저자 :** 이 환 모
서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel: 82-2-361-5648 Fax: 82-2-363-1139 E-mail:hwanlee@yumc.yonsei.ac.kr