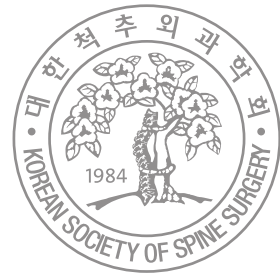


Journal of Korean Society of Spine Surgery



Adequate Serial Monolayer Passage Number of Human Intervertebral Disc Cells for Cell Therapy -Growth and Phenotype of Cells-

Yong Chan Kim, M.D., Ki Bok Kim, M.D., Moon Soo Park, M.D., Seok Woo Kim, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2010 Mar;17(2):57-65.

Originally published online June 30, 2010;

doi: 10.4184/jkss.2010.17.2.57

Korean Society of Spine Surgery

Department of Orthopaedic Surgery, Ewha Womans University College of Medicine

#911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul, 158-710, Korea Tel: 82-2-2646-6808 Fax: 82-2-2646-6804

©Copyright 2010 Korean Society of Spine Surgery

pISSN 2093-4378 eISSN 2093-4386

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://www.krspine.org/DOLx.php?id=10.4184/jkss.2010.17.2.57>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Adequate Serial Monolayer Passage Number of Human Intervertebral Disc Cells for Cell Therapy -Growth and Phenotype of Cells-

Yong Chan Kim, M.D., Ki Bok Kim, M.D., Moon Soo Park, M.D., Seok Woo Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Hallym University

Study Design: This is an in-vitro experimental study

Objectives: We wanted to analyze the changes in the growth and phenotype of human degenerative intervertebral disc cells depending on the frequency of subculture in an in vitro monolayer culture system.

Summary of the Literature Review: A subculture of disc cells is needed to obtain an adequate amount of disc cells for cell therapy, tissue engineering and analysis of the biological characteristics of degenerative disc cells

Materials and Methods: The obtained intervertebral discs were divided into the nucleus pulposus (NP) and the annulus fibrosus (AF). The AF and NP cells were cultured in a monolayer manner, respectively. At each subculture time, we analyzed the morphological changes, the adhesion rate, the proliferation rate and the viability. The expressions of types I and II collagen and proteoglycan were analyzed at the mRNA gene level.

Results: Both the AF and NP cells gradually showed a fibroblast-like spindle shape while undergoing subculture. The adhesion rate was higher at the second and third times of subculture. The cell proliferation was the highest at the second subculture time. The viability was markedly lower prior to the subculture. On RT-PCR, the type II collagen expression was gradually decreased in the NP cells. In the AF cells, Type II collagen was not expressed from the second time of subculture. The expression of proteoglycan was gradually decreased in both.

Conclusions: Following the 3rd subculture, the degenerative disc cells had completely changed their original growth and phenotypic characteristics. Therefore, we believe that it is not desirable for us to do passage cultures more than three times for cell therapy.

Key words: Intervertebral disc, Degenerative change, Phenotype, Subculture

서론

만성 요통은 인류가 앓고 있는 가장 흔한 질병으로서 그 중요한 원인 중의 하나가 추간판의 퇴행성 변화이다.¹⁾ 추간판은 노령화, 비틀림과 같은 비정상적인 역학적 힘과 과도한 체중부하 등에 의하여 퇴행성 변화를 일으키게 된다. 추간판 퇴행성 변화는 병리학적으로 수핵 세포수의 감소 및 세포 외 기질 분비 능력의 저하로 수핵 부분의 단백 다당 및 수분 함량이 감소되어 추간판의 탄력성이 떨어진다.²⁾ 현재, 퇴행성 척추간판 질환의 치료는 보존적인 치료방법으로 호전이 없을 때, 수술적인 치료방법을 요하게 되는데 수술적인 치료방법에는 추간판 제거술^{3,4)} 후궁절제술,⁵⁾ 척추체간 융합술^{6,7)} 등이 있다. 최근에 정상적인 추간판의 기능을 대체할 수 있도록 디자인된 인공디스크가 임상적으로 사용되고 있지만 그 적응증이 제한적이고 장기적인 추시 결과가 없는 상황이다.⁸⁾ 또한 이러한 수술적인 치료는 추간판의 정상적인 해부학적 구조를 파괴하고 정상적인 생리, 생물학적인 환경을 제공하지 못하기에 여러 가지 합병증이 따른다. 이에 생물학

Received: January 25, 2010

Revised: April 22, 2010

Accepted: June 1, 2010

Published Online: June 30, 2010

Corresponding author: Seok Woo Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Hallym University Sacred Heart Hospital
896, Pyeongchon-dong, Dongan-gu, Anyang, Gyeonggi-do 431-070, Korea

TEL: 82-31-380-6000, **FAX:** 82-31-380-6008

E-mail: swkim@hallym.or.kr

"This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited."

본 논문은 2006년도 한림대학교의료원 학술연구비 보조에 의한 것임

적인 방법으로 퇴행성 변화를 일으킨 추간판을 재생시키려는 많은 방법들이 시도되고 있는데 그 중 세포치료와 조직공학적인 방법이 최근에 많이 연구되고 있다.⁹⁻¹²⁾

현재, 관절연골 결손 시 자가연골세포 이식술이^{13,14)} 광범위하게 이용되고 있으며 이에 따른 관절연골세포에 대한 세포생물학적 기초연구도 매우 활발히 연구되고 있다. 관절 연골세포를 체외에서 일정한 양의 세포수로 증식시키려면 체외 단층 배양하면서 계대 배양을 거쳐야 하는데 관절연골세포는 계대 배양의 횟수가 증가함에 따라서 고유의 성질을 잃어버리는 단점이 있다. 즉 계대 배양을 거칠수록 세포 외 기질의 분비 능력이 떨어지며 특히 고유의 성질인 제 2형 교원질 생성 능력이 떨어지는 반면에 제 1형 교원질 생성이 증가하는 탈분화현상(dedifferentiation)을 일으킨다.^{15,16)}

추간판 조직 수핵 부분의 세포 밀도는 4000 세포/mm³, 섬유륜 부분은 9000 세포/mm³ 정도로 매우 적게 보고되고 있다.¹⁷⁾ 이에 퇴행성 추간판의 생물학적 치료에 있어서 일정한 양의 세포 수를 확보하는 것이 우선이며,¹⁸⁾ 최근에 추간판 세포도 체외 단층 계대 배양을 하면 표현형이 소실되다가 3차원적 배양을 시행하게 되면 다시 고유의 표현형을 되찾을 수 있다는 보고가 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 그러나 대부분은 동물세포의 연구결과이며 사람의 추간판 세포에서 계대 배양에 횟수에 따라서 세포의 성질이 과연 어떻게 변하는지에 대한 상세한 연구결과와는 미미한 상황이다. 특히 임상적으로 세포치료나 조직공학적인 방법에서 건강한 사람의 추간판 세포는 얻기가 힘들며 대부분은 이미 퇴행성 변화를 일으킨 세포를 사용하는 수 밖에 없다. 이에 본 연구에서는 퇴행성 추간판 세포를 섬유륜 부분과 수핵 부분으로 나누어서 체외에서 단층 계대 배양하면서 계대 배양의 횟수가 증가함에 따라서 세포의 성장 및 표현형이 어떻게 변하는지에 대해서 연구하고자 한다.

대상 및 방법

1. 추간판 조직의 채취

자기공명영상 상 Thompson Grade III 또는 IV 퇴행성 변화를 보인 환자로 수술 후에 실험이 가능하였던 6명의 환자에서 추간판 제거술을 시행 받을 시 추간판 조직을 획득하였다. 수술실에서 획득한 추간판 조직은 생리식염수로 충분히 세척하여 조직주위에 붙은 혈액과 체액을 제거하고 섬유륜 부분과 수핵 부분으로 나누어서 (Fig. 1) 무균 상태로 실험실로 옮겼다. 섬유륜 세포와 수핵 세포의 오염을 방지하기 위하여 섬유륜과 수핵 사이의 이행부위는 본 실험에 포함시키지 않았다.

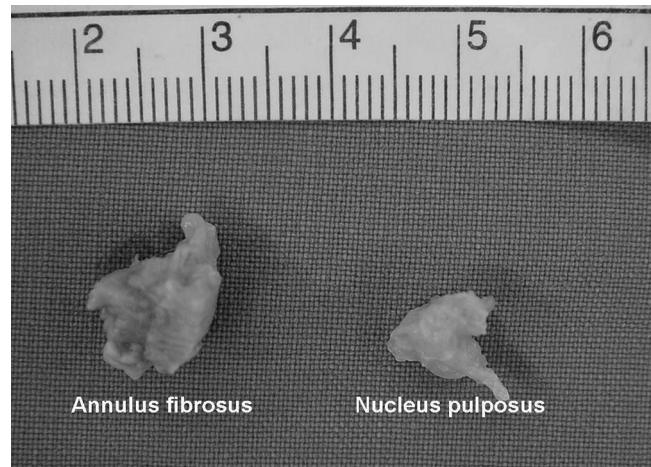


Fig. 1. Digital image of the obtained AF and NP tissue from degenerated intervertebral disc.

2. 추간판 세포의 분리 및 배양

실험실로 옮겨진 추간판 조직을 다시 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, New York, NY)을 포함한 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 충분히 세척하고 멸균된 수술용 칼로 수핵 조직과 섬유륜 조직을 잘게 잘랐다. 잘게 잘린 섬유륜 조직은 0.2% 제 1형 및 2형 교원질 분해효소(Collagenase, Worthington Biochemical Co. NJ)가 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, New York, NY) 용액, 수핵 조직은 0.2% 제 2형 교원질 분해효소가 함유된 DMEM 용액에 넣어서 5% CO₂, 37° C 세포 배양기내에서 4시간 동안 충분히 소화시켜 세포를 획득하였다. 이렇게 획득한 세포는 1.5x10⁵cells/cm² 농도로 세포배양 접시에 접종하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, New York, NY), 1% antibiotic-antimycotic가 포함된 DMEM용액을 사용하였다. 세포 배양액은 세포가 배양 접시에 부착되기 전 까지 약 2주까지는 교환하지 않고 침부만 하였고, 세포가 부착된 다음부터는 2일에 한번 씩 교환하여 주었다.

3. 세포의 계대 배양

세포가 증식하여 배양 접시 면적의 70~80%를 채우게 되면 계대 배양을 시행하였다. 세포 배양액을 흡입기로 흡입하고 멸균된 PBS용액으로 세 번 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, New York, NY) 용액으로 10분간 처리하여 세포를 배양접시로부터 분리시키고 세포와 배양액의 혼합물을 수거하여 1200rpm에서 10분간 원심분리 하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 두 개 군으로 나누어서 한 군은 세포분석에 사용하였고 다른 한 군은 다음 번의 계대 배양에 사용하였다. 매번 계대

배양 시의 조건은 모두 동일하게 하였으며 총 세 번의 계대 배양을 시행하였다.

4. 세포 형태학 관찰

세포의 형태학은 염색을 거치지 않고 세포가 배양접시에 부착된 상태로 직접 광학현미경 (Nikon E600, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 관찰 시간은 세포가 모두 배양 접시에 부착된 다음 2일 후로 일정하게 하였다.

5. 세포의 부착율, 생존율 및 증식율

세포의 부착율은 시간에 따라서 배양액에 부유되어 있는 세포를 회수하여 세포 수를 counting하여 부착된 세포 수가 전체 세포 수에서 차지하는 비율로 계산하였다.

$$\text{부착율} = \frac{\text{전체 세포수} - \text{부착되지 않은 세포수}}{\text{전체 세포수}} \times 100\%$$

세포의 증식율은 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, New York, NY)로 5% CO₂ 37° C 세포 배양기내에서 10분 동안 처리하여 세포 배양 접시에 붙은 세포를 분리시킨 후, 시간에 따라서 세포 수를 counting 하는 방법으로 계산하였다.

생존율은 세포를 trypan blue dye (Gibco, New York, NY) 염색법으로 전체 세포 수에서 살아있는 세포의 비율로 계산하였다. 세포의 생존율은 세포의 계대 배양을 거치는 시점에서 계산하였다. 각각의 측정치는 1회의 측정으로 6명의 측정치의 평균값으로 처리하였다.

6. 유전자 발현

1) 전체 RNA 분리 및 RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction)

계대 배양 하기 전 회수 한 일부 세포는 Trizol reagent (RNA extraction Kit, Gibco-BRL)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 얻어진 RNA는 spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Ultrospec 21009, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 총 RNA를

AMV reverse transcriptase (BMS)를 이용하여 cDNA를 만들었다. 합성된 cDNA는 유전자 특이 primer 를 이용하여 PCR반응을 통해 증폭시켰다 (Table 1). PCR 반응은 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8.3), 2 mM dNTP (2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP) 그리고 Taq. DNA polymerase (5 units/ μ l) 혼합액에 주형으로 합성된 cDNA와 유전자 특이 primer를 이용하여 증폭시켰다. 이렇게 증폭된 PCR 생성물을 1.5% TAE agarose gel에 전기영동한 후, 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide에 염색하여 확인하였다. 본 실험에서 유전자 발현은 GAPDH에 대한 정량적인 상대치를 측정하지 못하였으며 Table 1에 기술한 유전자의 발현 여부만 관찰하였다.

7. 생화학적 분석

계대 배양에 따른 세포의 세포 외 기질의 분비 능력을 정량화하기 위하여 생화학적 분석을 시행하였다. 총 교원질 함량은 개량된 Tullberg-Reinert method²¹⁾을 사용하였다. 세포 배양액을 200 μ l를 96- well plate에 넣고 37°C에서 말린 후 Sirius red dye 용액(pH 3.5, Sigma, St Louis, MO) 200 μ l와 1 시간 동안 반응시켰다. 세포 배양액과 Sirius red dye 복합물은 550nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 단백질 함량은 1,9-dimethyl-methylene blue (DMB) colorimetric method²²⁾를 사용하였다. 세포 배양액 100 μ l를 DMB 용액 200 μ l와 반응시킨 후, 525 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 교원질과 단백질 함량은 전체 세포수로 표준화하였다. 생화학적 분석 역시 1회의 측정으로 6명 측정치의 평균값으로 처리하였다.

8. 통계학적 처리

실험에서 얻어진 정량적인 결과는 모두 Mann-Whitney U test (independent t-test, SPSS)를 이용하여 통계학적인 처리를 시행하였으며, P<0.05일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

Table 1. The sequence of primers and reaction temperatures used in the RT-PCR

Gene	Primer sequence	Reaction temperatures (°C)
Type I collagen	5'-CCACCAATCACCTGCGTACAGAAC-3'	56
	5'-GGCACGGAAATTCCTCCGGTTGAT-3'	
Type II collagen	5'-GACCCCATGCAGTACATGCGGGCC-3'	56
	5'-GACGGTCTTGCCCCACTTACCGG-3'	
Aggrecan	5'-GCCTTGAGCAGTTACCTTC-3'	56
	5'-CTCTTCTACGGGGACAGCAG-3'	
GAPDH	5'-GGTCATGAGTCCTTCACGAT-3'	56
	5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'	

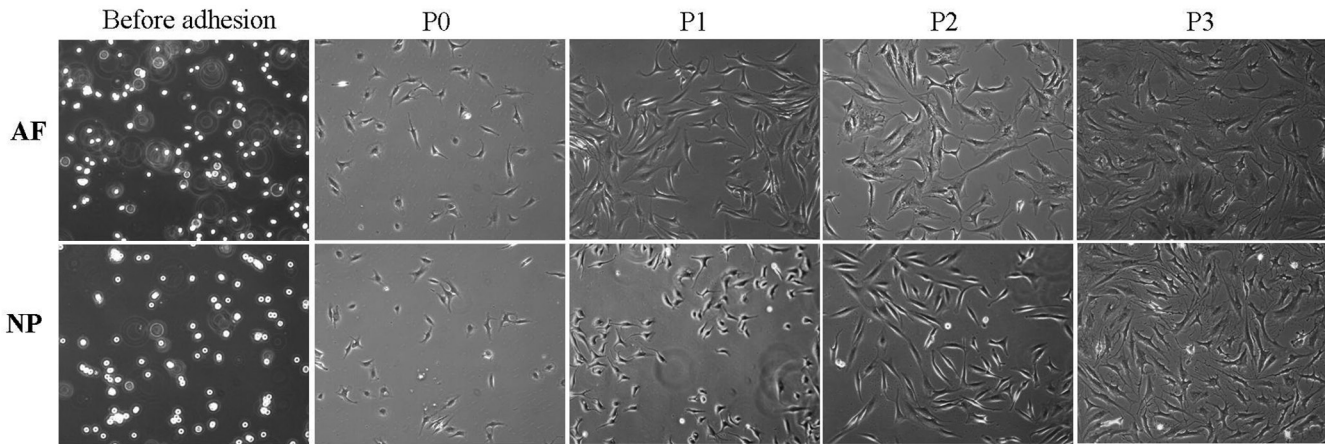


Fig. 2 The morphology of the AF cells and NP cells grown in the monolayer culture system. (x100)

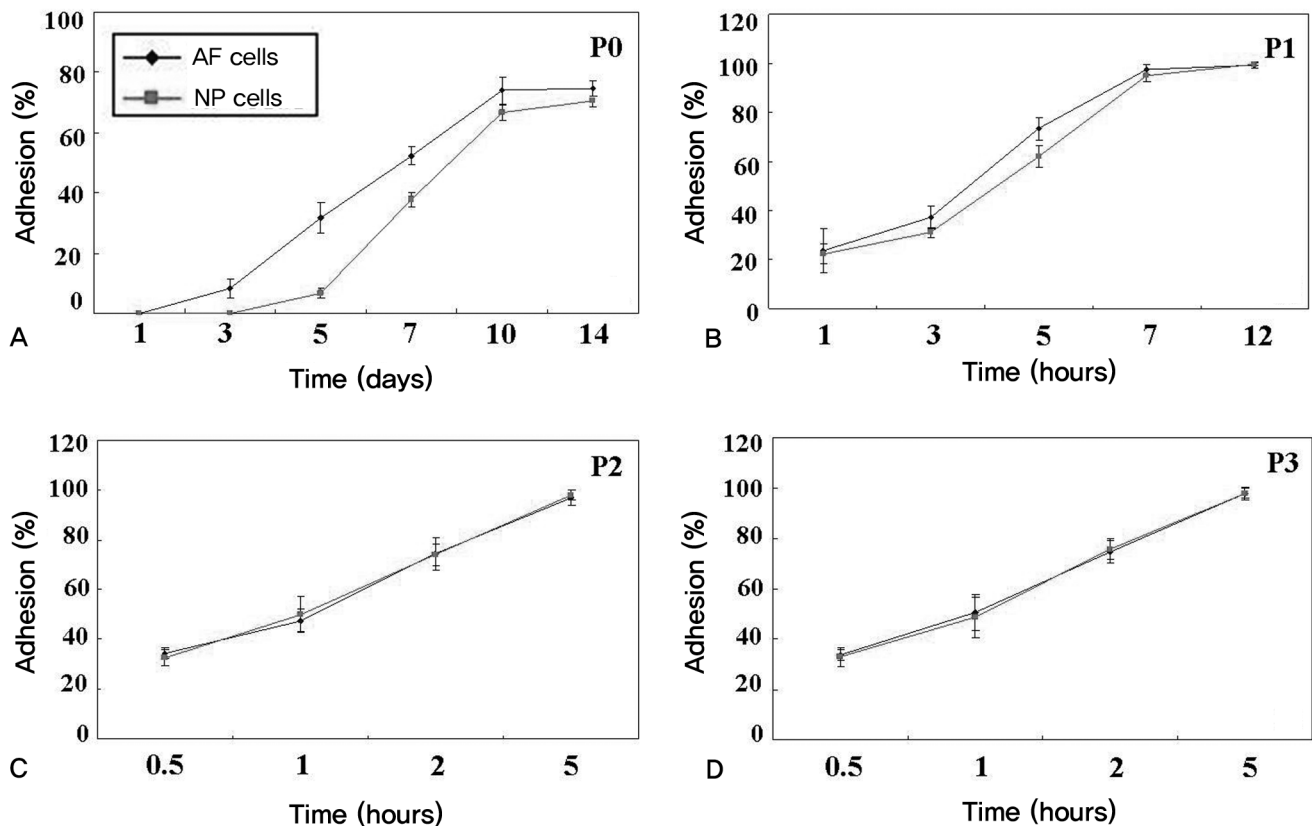


Fig. 3 The adhesion ratio of the AF cells and NP cells at different passage number. (A) P0, (B) P1, (C) P2, (D) P3.

결과

1. 형태학적 결과

조직에서 분리한 배양 접시에 부착되기 전 까지 섬유륜 및 수

핵 세포들은 모두 원형을 나타냈으며, 1차 계대 배양을 거치기 전까지는 불규칙한 다각형의 불규칙한 모양을 나타내고 있었다. 섬유륜 및 수핵 세포들은 계대 배양을 거치면서 점차적으로 방추형인 섬유모세포 모양으로 변화하였으며, 이러한 변화는 섬유륜 세포에서 더 빨리 진행되었다(Fig. 2).

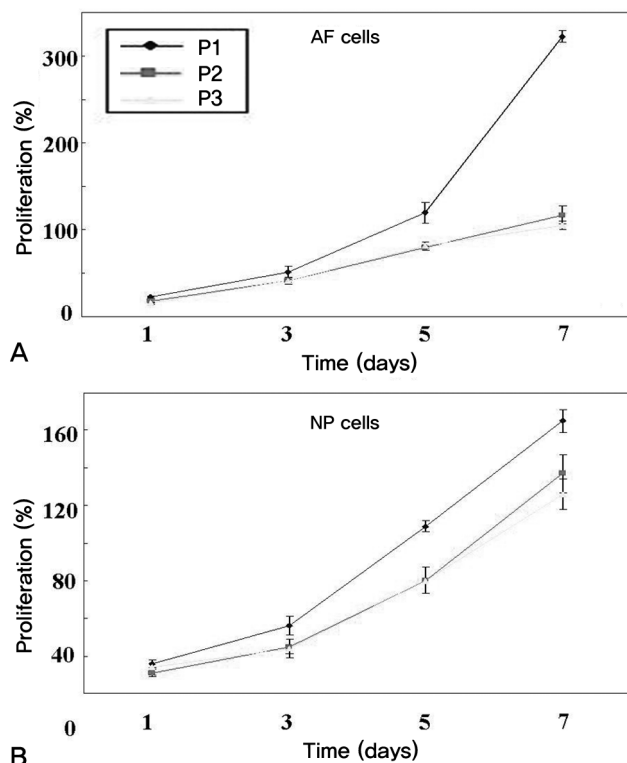


Fig. 4. Proliferation (%) of the AF cells and NP cells at different passage number. (A) AF cells, (B) NP cells.

2. 세포의 부착율

1차 계대 배양을 거치기 전에는 매우 낮았으며 1일 째는 0%로 거의 부착이 되지 않았으며 3일 째 약 $8.3 \pm 3.2\%$ 로 나타났다. 10일째, 섬유류와 수핵 세포에서 각각 $74.7 \pm 2.5\%$ 와 $70.7 \pm 2.1\%$ 를 나타내었고, 14일째 부착율은 10일째와 비슷하였으며 더 증가하지는 않았다. 1차 계대 배양을 거치면 세포의 부착율은 현저히 증가함을 볼 수 있었으며, 2, 3차 계대 배양에서는 5시간 만에 거의 100%의 부착율을 보였다. 부착율은 2, 3차 계대 배양에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 ($P < 0.05$), 1차와 2차 계대 배양 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 또한 부착율은 섬유류 세포 및 수핵 세포 지간에 계대 배양 전에는 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 ($P < 0.05$), 계대 배양을 거치고 나서는 큰 차이를 보이지 않았다 ($P < 0.05$) (Fig. 3).

3. 세포의 증식

세포의 증식은 1차 계대 배양에서 제일 높았으며 섬유류 세포에서 수핵 세포보다 더 좋은 증식율을 보였으나($P < 0.05$), 2, 3차 계대 배양에서는 수핵 세포와 섬유류 세포, 및 계대 배양의 횟수

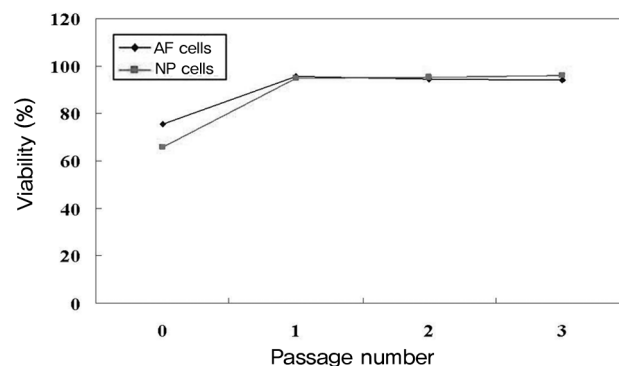


Fig. 5. Viability of the AF cells and NP cells at different passage number.

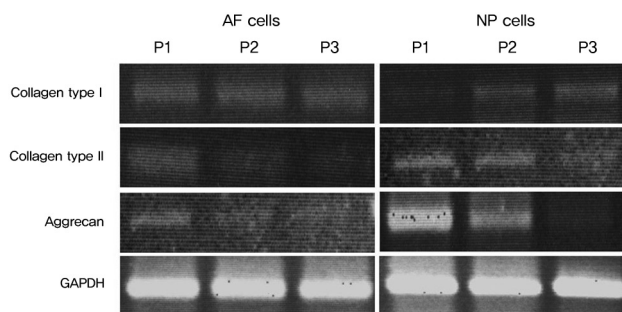


Fig. 6. The mRNA expression of AF cells and NP cells at different passage number.

에 따라서 유의한 차이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$) (Fig. 4).

4. 세포의 생존율

세포의 생존율은 계대 배양에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며 섬유류 및 수핵 세포 사이에서도 큰 차이는 없었으며 약 95%의 높은 생존율을 보였다($P > 0.05$). 하지만 1차 계대 배양을 거치기 전 세포의 생존율은 낮았으며 수핵 $65.7 \pm 4.1\%$, 섬유류 세포는 $75.3 \pm 6.1\%$ 로 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 5).

5. 유전자 발현

섬유류 세포는 계대 배양의 횟수에 따라서 제 1형 교원질의 발현은 큰 차이를 보이지 않았으며 제 2형 교원질과 aggrecan 유전자는 1차 계대 배양에서는 발현이 되었으나 2, 3차 계대 배양에서는 발현되지 않았다. 수핵 세포에서는 1차 계대 배양에서 제 1형 교원질이 발현되지 않았으나 2, 3차 계대 배양에서 점차 증가하였으며 제 2형 교원질과 aggrecan은 제 2차 계대 배양까지는 발현되었으나 3차 계대 배양에서는 발현되지 않았다 (Fig. 6).

6. 교원질 및 단백당 함량

총 교원질 함량은 계대 배양의 횟수에 따라서 점차적으로 감

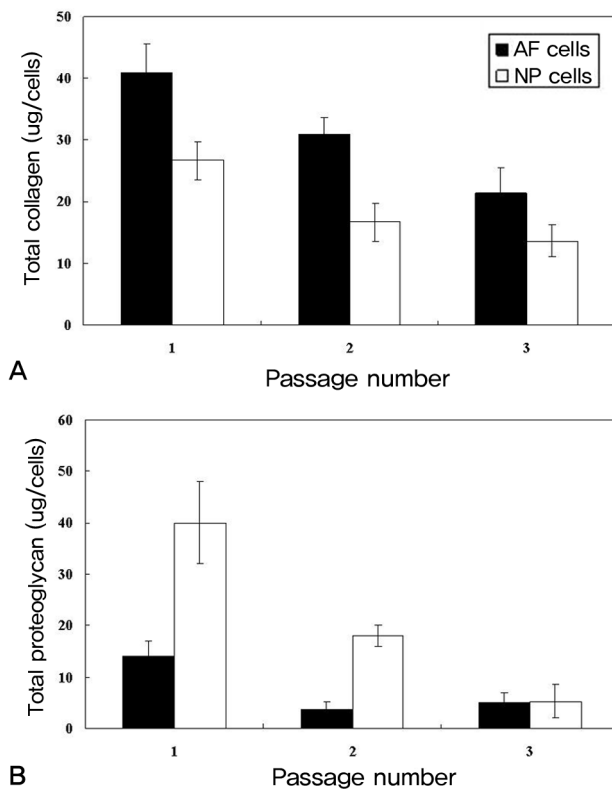


Fig 7. Measurement of the total collagen (A) and proteoglycan (B) in the culture medium of different passage number.

소하는 경향을 보였으며($P < 0.05$) 수핵 세포에서는 2차 계대 배양과 3차 계대 배양에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 단백 다당 함량은 수핵 세포에서 1차 계대 배양에서는 높은 함량을 보였으나 2차 계대 배양부터 현저히 감소하였으며, 3차 계대 배양에서는 매우 적은 함량을 보였다($P < 0.05$). 섬유륜 세포는 1차 계대 배양 때부터 단백 다당의 함량이 매우 적게 측정되었고, 2차, 3차 계대 배양에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$)(Fig. 7).

고찰

최근에 조직공학 및 세포치료 등 생물학적 치료방법이 활성화되면서 퇴행성 추간판의 치료에서도 이러한 치료법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 슬관절 자가 연골세포 이식술은 Brittberg 등¹⁴⁾가 보고한 후, 현재 보편화된 수술법으로 발전하였지만 척추 분야에서는 Ganey과 Meisel¹⁰⁾이 급성 외상성 추간판 탈출 환자에서 적출한 추간판 조직에서 분리한 세포를 체외에서 배양, 증식 시킨 후 다시 추간판에 이식하여 추간판이 재생되는 것을 자기공명 영상을 통하여 확인하였다. 그러나 아직까지 이러한 추간판 세포 이식술에 대한 임상결과 발표는 매우 적으며

대부분이 체외 혹은 동물실험 단계에 있다.

본 실험에서는 자기공명영상 상 Thompson Grade III 또는 IV의 퇴행성 변화를 보이는 총 6명의 추간판에서 획득한 추간판 세포를 체외에서 단층 배양하면서 성장 및 표현형의 특징을 관찰하였다. 6명의 추간판 세포는 배양 횟수에 따라서 비슷한 양상을 보였으며 모든 정량적 분석은 통계학적 처리를 시행하였다. 추간판 세포는 체외의 단층 배양에서 배양 횟수가 증가함에 따라서 고유의 표현형은 점차 소실되며 세포의 성장도 떨어지는 경향을 보였으며, 특히 3차 계대 배양에서 현저하였다.

Chou 등¹⁸⁾은 양의 추간판 섬유륜 세포를 내측 및 외측 부위로 나누고 계대 배양의 횟수에 따라서 표현형이 어떻게 변하는지에 대해서 연구한 결과, 2차 계대 배양까지는 계대 배양을 거치지 않은 세포와 큰 차이를 보이지 않았으나 3차 계대 배양부터는 제2형 교원질의 발현이 현저히 감소됨을 발견하고, 6차 계대 배양에서는 내측 및 외측 부위의 세포 지간에 큰 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 3차 계대 배양에서 제2형 교원질과 단백 다당의 표현형이 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 이는 Chou 등¹⁸⁾이 사용한 세포는 양의 정상적인 추간판에서 추출한 반면, 본 실험에 이용된 세포는 사람의 퇴행성 변화를 일으킨 추간판에서 획득한 것으로 일정한 차이를 보일 것으로 사료된다.

세포의 모양도 세포의 탈분화 과정에서 선명한 변화를 일으킨다. 관절연골세포는 계대 배양을 거치면서 탈분화 되면서 점차적으로 방추형인 섬유모세포 모양으로 변한다.¹⁵⁾ 본 실험에서도 세포의 모양은 처음의 다각형 모양에서 점차적으로 방추형인 섬유모세포 모양으로 변화되는 것을 볼 수 있었으며 이러한 변화는 섬유륜 세포에서 더 선명하였다. 이는 섬유륜 세포가 더 빨리 탈분화 된다고 보다는 섬유륜 부분은 수핵 부분과 달리 섬유성 연골로서 일부분의 섬유세포의 성질을 띄고 있기 때문이라고 생각된다.

추간판 조직은 세포 수가 적고 임상적으로 자가 추간판 세포를 사용하려면 병변이 있는 적은 양의 추간판 조직을 적출할 수밖에 없기에 보다 많은 세포를 얻으려면 대부분 체외 단층 배양을 거쳐야 하는데, 단층 배양을 하는 과정에 중요시 할 것이 세포의 부착 능력이다. 본 실험의 결과로부터 추간판 세포는 계대 배양을 거치면서 부착율이 증가하였으나 갓 분리한 추간판 세포가 배양 접시에 부착하는 능력이 현저히 떨어져 있음을 알 수 있었다. 계대 배양을 거치기 전 세포의 부착능력이 떨어지는 원인에 대해서는 본 연구에서 규명할 수는 없었으나 세포의 부착에는 integrin α , β 등이 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며,^{23,24)} 아마도 계대 배양을 거치면서 이러한 수용체들이 발현이 증가한 것으로 추측된다. 관절연골 세포에서 세포의 부착율

을 증가시키기 위하여 배양접시에 교원질을 코팅하거나 integrin receptor 발현을 증가시키는 방법^{25,26)}들이 사용되고 있는데 추간판 세포의 부착 능력을 증가시키기 위해서는 이러한 방법들이 고안되어야 한다고 사료된다. 본 실험에서 1, 2, 3차 계대 배양에서 높은 생존율을 보였으나 1차 계대 배양을 거치기 전에는 현저히 낮은 생존율을 나타내었다. 대부분의 세포들은 생존을 위해서는 배양 접시에 부착되어야 하는데 1차 계대 배양을 거치기 전에는 매우 낮은 부착율을 보이기 때문에 계대 배양을 거치기 전 세포의 생존율도 따라서 떨어지는 것으로 이해할 수가 있다. 세포의 증식은 제 1차 계대 배양에서 가장 우수한 것으로 나타났다. 계대 배양을 거치기 전에는 증식을 측정하지 못하였다. 이러한 이유로 1차 계대 배양을 거치기 전에는 세포의 부착율이 많이 떨어져 있고, 70% 정도의 생존율을 보이고 있었기에 정확한 증식을 계산하기에는 어려움이 있었다.

정상적인 추간판은 섬유륜 부분에서는 교원질이 마른 무게의 80%, 단백 다당이 20%인 반면 수핵 부분에서는 단백 다당이 80%, 교원질 20% 차지한다.^{27,28)} 섬유륜 부분에서는 제 1형 교원질 대부분이고 수핵에서는 제 2형 교원질이 대부분이다. 계대 배양의 횟수에 따라서 수핵 세포는 제 2형 교원질과 단백 다당의 유전자 발현이 현저히 떨어지며 특히 3차 계대 배양에서는 거의 발현이 되지 않았으며 제 1형 교원질 발현이 증가하였다. 반면 섬유륜 세포는 제 2형 교원질과 단백 다당의 발현은 감소하였으나 제 1형 교원질의 발현은 큰 변화를 일으키지 않았다. 이는 생화학적인 정량 검사를 통하여 확인하였으며 이는 추간판 세포는 계대 배양의 횟수에 따라서 관절연골 세포처럼 탈 분화 현상을 일으킴을 알 수 있었다. 수핵 세포의 제 2형 유전자 발현이 감소하고 제 1형 유전자 발현이 증가하기에 2, 3차 계대 배양에서 총 교원질 함량은 통계학적으로 큰 차이를 보이지 않는 것으로 생각된다.

단층 배양에서 세포의 표현형을 잃어버리는 단점을 극복하고자 최근에는 pellet,²⁹⁾ alginate,²⁰⁾ 혹은 고분자 화합물³⁰⁾을 이용한 삼차원적인 배양을 많이 시행하고 있다. 이러한 삼차원적인 배양은 단층 배양에서 소실되었던 추간판 세포의 표현형을 되찾을 수 있었으며 세포의 기질의 합성도 증가함을 나타냈다. 그러나 3차원적인 배양은 세포의 증식에는 매우 제한적이므로 치료의 목적으로 사용하기에는 일정한 단점을 가지고 있다.

본 실험에서 계대 배양을 거치기 전 세포의 유전자 발현, 및 세포외 기질의 생성 등을 측정하여 대조군으로 하여야 하였으나, 퇴행성 변화를 일으킨 적은 양의 추간판 조직에서 분리하였기에 이러한 분석에 이용할만한 세포 수를 얻기가 불가능하여 시행하지 못하였다. 또한 추간판 세포는 퇴행성 변화를 일으킨 정도에 따라서 체외 단층 배양 할 때 성장이나 표현형의 발현에

서 차이가 있을 것으로 사료되며 이러한 퇴행성 변화에 따른 표현형의 결과는 앞으로 더 진행해야 할 연구라고 생각된다. 정상적인 추간판 조직의 획득이 어려워 정상적인 섬유륜 세포와 수핵 세포의 계대 배양 횟수에 따른 표현형의 변화를 대조군으로 하여 비교 분석하지 못한 점도 본 논문의 제한점이라고 사료된다.

결론

퇴행성 변화를 일으킨 추간판의 섬유륜 및 수핵 세포는 체외에서 계대 배양의 횟수가 증가함에 따라서 점차적으로 고유의 표현형을 잃어버리며 3차 계대 배양에서는 추간판 세포의 특유의 성질인 제 2형 교원질과 단백 다당의 유전자 발현이 되지 않았다. 이에 추간판의 퇴행성 변화의 세포치료에 있어서 체외에서 단층 배양 시 3번 이상의 계대 배양을 거치지 않는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 또한 적은 횟수의 계대 배양으로 많은 양의 세포를 얻고, 또한 세포의 증식이나 생존율 및 세포 외 기질의 합성 증가를 위해서는 성장인자나 기계적인 자극을 이용한 방법을 고려해야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:120-30.
2. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Jeziorska M, Hoyland JA. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy. *J Pathol*. 2002;196:374-9.
3. Hoppenfeld S. Percutaneous removal of herniated lumbar discs. 50 cases with ten-year follow-up periods. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;238:92-7.
4. Yeung AT, Tsou PM. Posterolateral endoscopic excision for lumbar disc herniation: Surgical technique, outcome, and complications in 307 consecutive cases. *Spine*. 2002;27:722-31.
5. White AH, von Rogov P, Zucherman J, Heiden D. Lumbar laminectomy for herniated disc: a prospective controlled comparison with internal fixation fusion. *Spine*. 1987;12:305-7.
6. Eie N. Comparison of the results in patients operated upon for ruptured lumbar discs with and without spinal fusion. *Acta Neurochir*. 1978;41:107-13.
7. Eie N, Solgaard T, Kleppe H. The knee-elbow position in lumbar disc surgery: a review of complications. *Spine*.

- 1983;8:897–900.
8. Freeman BJ, Davenport J. Total disc replacement in the lumbar spine: a systematic review of the literature. *Eur Spine J.* 2006;15:439–47.
9. An HS, Thonar EJ, Masuda K. Biological repair of intervertebral disc. *Spine.* 2003;28:86–92.
10. Ganey TM, Meisel HJ. A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation. *Eur Spine J.* 2002;11:206–14.
11. Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, Swaim W, Shapiro IM. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;411:305–14.
12. Yoon ST. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Spine J.* 2005;5:280–6.
13. Baums MH, Heidrich G, Schultz W, Steckel H, Kahl E, Klinger HM. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:303–8.
14. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331: 889–95.
15. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982;30:215–24.
16. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol.* 1998;176:303–13.
17. Bayliss MT, Johnstone B, O'Brien JP. 1988 Volvo award in basic science. Proteoglycan synthesis in the human intervertebral disc. Variation with age, region and pathology. *Spine.* 1988;13:972–81.
18. Chou AI, Bansal A, Miller GJ, Nicoll SB. The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner annulus fibrosus cells. *Spine.* 2006;31:1875–81.
19. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Grunder T. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine.* 2005;30: 2743–48.
20. Wang JY, Baer AE, Kraus VB, Setton LA. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. *Spine.* 2001; 26:1747–51.
21. Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 1999;112:271–6.
22. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883:173–7.
23. Loeser RF, Sadiev S, Tan L, Goldring MB. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000;8:96–105.
24. Wang H, Kandel RA. Chondrocytes attach to hyaline or calcified cartilage and bone. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12:56–64.
25. Hong Y, Gao C, Xie Y, Gong Y, Shen J. Collagen-coated polylactide microspheres as chondrocyte microcarriers. *Biomaterials.* 2005;26:6305–13.
26. Yashiki S, Umegaki R, Kino-Oka M, Taya M. Evaluation of attachment and growth of anchorage-dependent cells on culture surfaces with type I collagen coating. *J Biosci Bioeng.* 2001;92:385–8.
27. Eyre DR, Muir H. Quantitative analysis of types I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. *Biochim Biophys Acta.* 1977;492:29–42.
28. Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography, and pathology. *Spine.* 1995;20:674–84.
29. Lee JY, Hall R, Pelinkovic D et al. New use of a three-dimensional pellet culture system for human intervertebral disc cells: initial characterization and potential use for tissue engineering. *Spine.* 2001;26: 2316–22.
30. Sato M, Asazuma T, Ishihara M et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. *J Biomed Mater Res A.* 2003;64:248–56.

세포 치료를 위한 인간 추간판 세포의 적절한 체외 계대 배양 횟수-세포의 성장 및 표현형-

김용찬 • 김기복 • 박문수 • 김석우
한림대학교 의과대학 정형외과학교실

연구 계획: 시험관 실험적 연구

목적: 사람의 퇴행성 추간판 세포를 체외에서 배양하면서 계대 배양의 횟수에 따른 성장 및 표현형의 변화를 분석하고자 한다.

선행문헌의 요약: 세포 치료, 조직공학 및 추간판 세포의 생물학적 특성의 분석을 위해서는 퇴행성 추간판 세포의 계대 배양을 거쳐 많은 양의 세포를 획득하여야 한다.

대상 및 방법: 적출된 추간판 조직을 수핵과 섬유륜 부분으로 나누어서 단층 배양하였다. 계대 배양을 거치면서 세포의 형태 변화, 부착율, 증식율 및 생존율 분석을 진행하였다. 또한 RT-PCR 검사를 시행하여 제 1, 2형 교원질 (type I, II collagen) 및 단백당 (proteoglycan) mRNA 발현을 유전자 수준에서 분석하였다.

결과: 세포의 모양은 수핵 및 섬유륜 세포 모두 점차적으로 방추형인 섬유모세포 모양을 나타냈으며, 부착율은 2차 및 3차 계대 배양에서 상대적으로 증가하였고, 증식율은 2차 계대 배양에서 가장 우수했으며, 세포의 생존율은 배양을 거치기 전에는 현저히 낮았다. RT-PCR 분석 상 수핵 세포의 제2형 교원질 발현은 점차적으로 감소하는 양상을 보였으며, 섬유륜 세포의 제 2형 교원질은 2차 계대 배양 시부터 발현이 되지 않았다. 단백 다당의 발현은 수핵 및 섬유륜 세포 모두에서 점차 감소하는 양상을 보였다.

결론: 퇴행성 변화를 일으킨 추간판의 섬유륜 및 수핵 세포는 체외에서 계대 배양의 횟수가 3차 계대 배양에서는 고유의 성장과 표현형을 잃어버렸다. 이에 세포치료에 있어서 체외에서 단층 배양 시 3번 이상의 계대 배양을 거치지 않는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

색인 단어: 추간판, 퇴행성 변화, 표현형, 계대 배양

약칭 제목: 세포치료를 위한 추간판의 계대배양