

Generation of Proinflammatory Mediator of Intervertebral Disc Cells by Nicotine Stimulation

Hyoungh-Yeon Seo, M.D., Ju-Hyun Yun, Do-Youn Kim, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2014 Jun;21(2):84-89.

Originally published online June 30, 2014;

<http://dx.doi.org/10.4184/jkss.2014.21.2.84>

Korean Society of Spine Surgery

Department of Orthopedic Surgery, Inha University School of Medicine

#7-206, 3rd ST. Sinheung-Dong, Jung-Gu, Incheon, 400-711, Korea Tel: 82-32-890-3044 Fax: 82-32-890-3467

©Copyright 2014 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/DOIx.php?id=10.4184/jkss.2014.21.2.84>

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.

Generation of Proinflammatory Mediator of Intervertebral Disc Cells by Nicotine Stimulation

Hyoung-Yeon Seo, M.D., Ju-Hyun Yun, Do-Youn Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Chonnam National University Hospital, Gwangju, Korea

Study Design: Experimental investigation in vitro.

Objectives: To evaluate the relationship between the degeneration of intervertebral disc cells, and low back pain induced by degeneration of intervertebral disc cells and increases in use of proinflammatory mediators via nicotine stimulation.

Summary of Literature Review: Smoking is a leading cause of degeneration of intervertebral disc cells and low back pain. According to the existing literature, nicotine, one of the main ingredients in cigarettes, causes the degeneration of intervertebral disc cells including decrease of glycoprotein through generation of carboxy-hemoglobin, vasoconstriction, and disability of fibrinolysis and changes of metabolism of nucleus pulposus cells.

Materials and Methods: Annulus fibrosus of intervertebral disc and knee joint cartilage were collected from pigs; these cells were acquired by gradual enzyme decomposition. Using Trypan blue, concentration and survival rate of cells were examined; cells were inserted on alginate beads for tertiary cultivation. Nicotine was then applied at 0, 50, 100, 200 and 300 nM, respectively, and the samples were cultivated for three, six and nine days, respectively. After collecting culture fluid, it was measured for interleukin(IL)-1 β , IL-6 and IL-8 with the ELISA Test. DNA of cells used for cultivation was quantitated and the amount of the resulting proinflammatory mediator was normalized. The results were then compared with the result of same study on cartilage of porcine knee joints.

Results: For changes of the inflammatory mediator based on the concentration of nicotine, in nicotine stimulation with low concentration of 50 nM and the control group, there was no significant change, while transient increases of inflammatory mediator showed in nicotine stimulation with concentrations of 100, 200 nM, respectively. There was not a significant increase of IL-1 β observed in all nicotine stimulation groups; these were the same results in porcine cartilage study. The level of IL-6 in 200, 300 nM nicotine concentration showed significant increases, respectively. The level of IL-8 in high dose nicotine stimulation groups also showed significant increases of DNA on the sixth day. And in porcine cartilage study group, significant changes were observed in 200, 300 nM, but the absolute value was lower than that of annulus fibrous cells group.

Conclusion: Inflammatory mediators such as IL-6 and IL-8 increased as the result of tertiary cultivation of annulus fibrosus cells of porcine intervertebral disc and nicotine stimulation. It is believed that the cells of the disc annulus are more sensitive than articular chondrocytes to nicotine stimulation. This may be the focus of future long-term studies effects of nicotine other inflammatory cytokines

Key Words: Intervertebral disc, Annulus fibrosus, Proinflammatory mediator, Nicotine

서론

요통에 있어서 추간판의 퇴행이 선행되는 일반적인 사실로 알려져 있지만, 추간판 퇴행이 곧바로 요통의 필수 요소라고 볼 수는 없다.¹⁾ 퇴행이 있는 척추에서 그리 심한 요통을 호소하지 않는 경우도 흔하기 때문이다.²⁾ 추간판 in vitro 퇴행 모델에 관한 선행 연구들이 있어왔지만,³⁻⁵⁾ 이러한 퇴행 모델이 요부 통증의 직접적인 원인임을 시사하는 연구는 많지 않다.

또한, 추간판의 퇴행을 유도하는 많은 선행연구에서 흡연의 해로운 효과에 대해 말하고 있었으며,⁶⁻⁸⁾ 척추외과 영역에서도 요통을 호소하는 많은 이가 흡연자이며, 이런 임상적인 사실에 기초하여 흡연이나 흡연의 주성분인 니코틴이 추간판 퇴행의 원

Received: February 18, 2014

Revised: March 27, 2014

Accepted: Junn 13, 2014

Published Online: June 30, 2014

Corresponding author: Do-Youn Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery Chonnam National University Hospital
8 Hak Dong, Gwangju, 501-757, Korea

TEL: +82-62-220-6336, **FAX:** +82-62-225-7794

E-mail: doyoun@gmail.com

"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."

*이 논문은 전남대학교병원 학술연구비(CRI 09031-1)에 의하여 연구되었음.

인을 제공할 것이라는 임상 연구들이 있다.⁹⁻¹¹⁾

따라서, 저자들은 실험실적으로 흡연의 주성분이 되는 니코틴을 돼지 추간판의 섬유륜 세포에 자극하여 퇴행을 유도하고, 통증의 원인이 될 것으로 생각되는 proinflammatory mediator들이 증가하는지 알아보고자 하였으며, 이를 돼지 관절연골세포를 이용한 같은 실험의 결과와 비교해 보고자 한다.

대상 및 방법

1. 추간판 섬유륜 세포의 분리와 Alginate bead를 이용한 삼차배양

생후 5~6개월(약 115 Kg, 뉴햄프셔, 잡종)의 도살된 돼지로부터 무균적으로 척추와 슬관절을 적출하여 단시간내에 실험실로 운반하였으며, 흉요추부의 추간판으로부터 섬유륜 조직을, 슬관절로부터 관절연골을 분리해낸 다음 각각을 멸균 식염수로 수차례 행구었다. 분리해낸 조직을 10번 나이프를 이용하여 잘게 잘라내어 0.2% pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 1시간 동안 효소 반응을 시켰다. 곧이어 0.025% collagenase type I 용액에 37°C에서 약 6시간 반응시켰다. 효소반응 후 걸러서 분리해낸 세포를 Ham's F12 배양액으로 씻어 내고 Trypan blue를 이용하여 세포농도와 생존율을 검사하였다.

각각의 추간판 섬유륜 세포와 관절연골 세포를 5×10^6 cells/ml의 밀도로 만든 후 같은 양의 4% alginate와 혼합하였다. 혼합된 세포들을 즉시 주사기(19-gauge needle)를 이용하여 102 mM CaCl_2 용액에 한 방울씩 떨어뜨려 bead를 만들었으며 한 bead당 약 4×10^4 cells이 되도록 하였다. bead가 응고되도록 4°C에 약 5분간 방치해 둔 후 bead가 응고되면 신속히 CaCl_2 용액을 버리고 PBS용액으로 수차례 행구었다. 1% penicillin-streptomycin, 1% fungizone과 10% FBS가 첨가된 DMEM/Ham's F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배양액에 bead를 37°C, 5% CO_2 상태에서 24시간 배양하였다.

2. 세포의 니코틴 자극

Alginate bead를 24시간 배양후 24 well plate에 한 well 당 bead 4개(1.6×10^5 cells)를 분주하고, serum free DMEM/Ham's F12 배양액에서 12시간 cell starvation시킨 다음, 니코틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 50, 100, 200, 300 nM의 농도로 처리한 뒤 3, 6, 9일간 배양하였다. 대조군으로는 니코틴 처리 대신에 phosphate buffer saline (PBS)를 동일한 조건으로 처리 후 배양하였다.

각 날짜에 따라 배양액을 회수하여 1.5 ml tube에 모은 뒤 ELISA 검사를 위하여 -70°C에 저장하였고 bead는 회수하여 Deoxyribonucleic acid (DNA)와 Glycosaminoglycan (GAG) 정

량화 검사에 이용하였다.

니코틴 자극후 alginate bead를 회수하여 50mM sodium citrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.15M NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 30 mM EDTA (Amresco, Solon, OH, USA), pH6 buffer를 100 ul/beads 넣은 후 10분간 4°C에 shaking 상태로 incubation한 뒤 4°C, 7000 rpm 조건으로 5분간 원심분리 후 cell pellet을 만들었다.

원심 분리 후 만들어진 cell pellet에 미리 준비한 papain buffer를 100 ul/beads 넣은 후 60°C에서 2시간 30분 incubation한 뒤 4°C, 12000 rpm에서 1분간 원심분리 후 DNA와 GAG 정량을 하였다.

PicoGreen dsDNA assay kit (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 DNA를 정량하였으며, 1,9-dimethylmethyle blue (DMB) colorimetric assay의 방법으로 GAG를 정량하여 구해진 DNA 값으로 GAG치를 정상화하였다.

4. ELISA 검사

Interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-8의 생성을 알아보기 위하여 니코틴 자극후 회수된 배양액으로 ELISA 검사(Duoset system, R&D, MN, USA)를 시행하였다. 구해진 각각의 측정치는 위에서 구한 DNA 값으로 정상화하였다.

5. 통계 분석

실험의 모든 단계를 3회 반복하여 평균치를 얻었으며, 측정된 DNA, GAG, IL치는 one-way ANOVA test로 검증하였고, 유의치는 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. DNA 정량 (Fig. 1)

세포의 증식의 지표가 되는 DNA content는 니코틴을 자극하지 않은 대조군과 50 nM로 자극한 군에서는 시간에 따라 DNA치가 증가하였지만 유의한 차이는 보이지 않았다.

100 nM와 200 nM로 자극한 군에서는 3일째 유의한 증가를 보였으나, 6일째부터는 DNA량이 다시 감소하였고, 300 nM의 니코틴 자극군에서는 DNA량의 변화가 없이 0일째와 비슷한 수준으로 정량되었다.

2. GAG 정량 (Fig. 2)

대조군과 50 nM로 자극한 군에서는 GAG량은 시간에 따른 유의한 변화를 보이지 않았고, 100, 200, 300 nM의 니코틴 자극군에서는 6일째에 유의한 GAG량의 감소를 보였으며, 9일째가

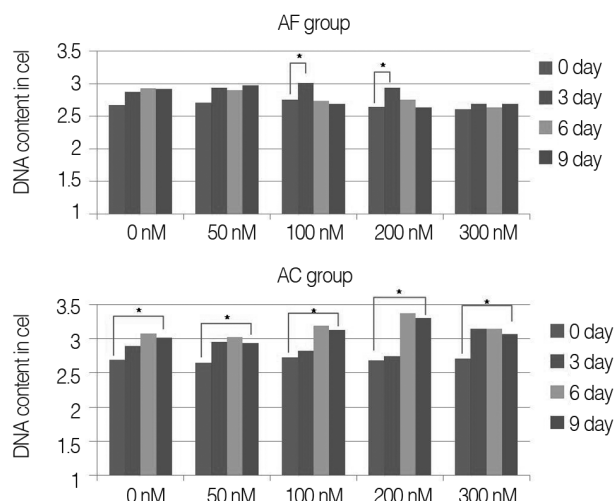


Fig. 1. DNA contents of alginate bead constructs with porcine annulus fibrosus cells (AF group) and porcine knee joint cartilage cells (AC group), cultured for up to 9 days.

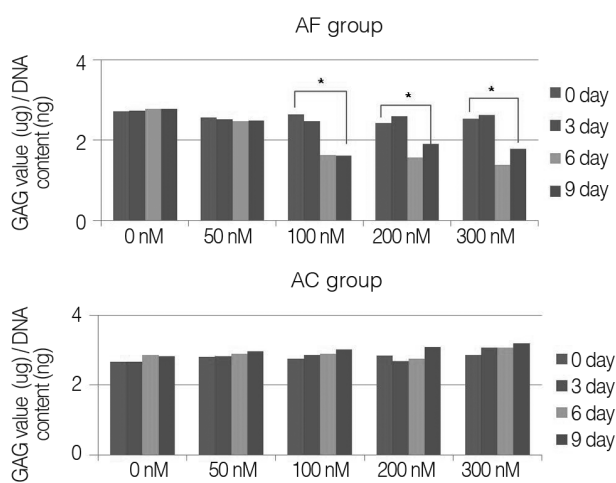


Fig. 2. GAG contents of alginate bead constructs with porcine annulus fibrosus cells (AF group) and porcine knee joint cartilage cells (AC group), cultured for up to 9 days.

지 비슷한 수준으로 유지되었다.

관절연골세포를 이용한 실험에서는 모든 군에서 니코틴 자극에도 비슷한 수준의 GAG량이 정량되었다.

3. Interleukin 정량 (Fig. 3, 4, 5)

IL-1 β 측정치는 모든 군에서 시간 및 니코틴 농도에 따른 유의한 증가가 관찰되지 않았으며, 관절연골세포 실험군에서도 같은 결과를 보였다.

IL-6 정량에서는 대조군과 저농도 자극군에서는 시간에 따른 유의한 변화가 없었지만, 200, 300 nM의 고농도 자극군에서는 6일째에 유의한 증가를 보였으며, 9일째까지 유지되었다. 관절

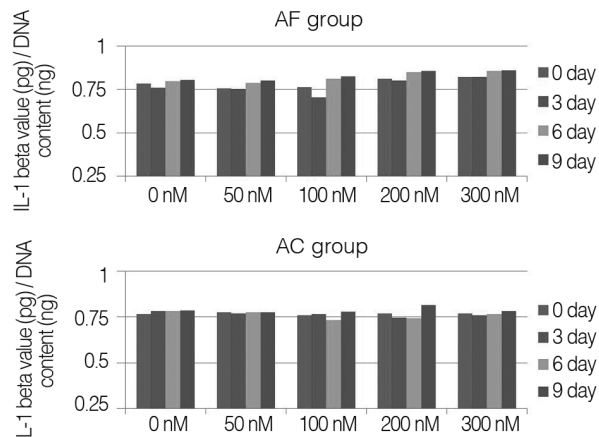


Fig. 3. Measured IL-1 β in cultured media with porcine annulus fibrosus cells (AF group) and porcine knee joint cartilage cells (AC group), seeded alginate bead constructs.

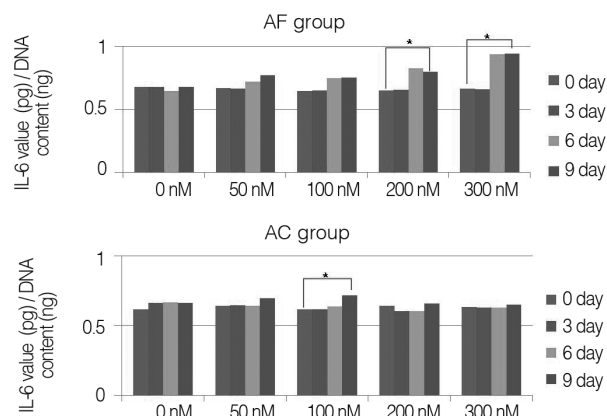


Fig. 4. Measured IL-6 in cultured media porcine annulus fibrosus cells (AF group) and porcine knee joint cartilage cells (AC group), seeded alginate bead constructs.

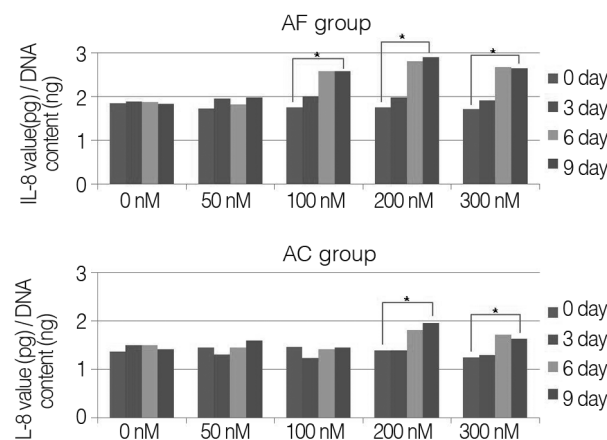


Fig. 5. Measured IL-8 in cultured media porcine annulus fibrosus cells (AF group) and porcine knee joint cartilage cells (AC group), seeded alginate bead constructs.

연골세포 실험군에서는 100 nM 자극군 외에 전체적으로 유의한 IL-6치의 변화는 없었다.

IL-8 정량에서도 대조군과 50 nM로 자극한 군에서는 유의한 변화가 없었고, 100, 200, 300 nM의 니코틴 자극군에서는 6일째에 유의한 증가가 관찰되었다. 관절연골세포를 이용한 실험군에서도, 200, 300 nM 자극군에서 유의한 변화가 관찰되었지만, 그 절대값은 섬유류세포 실험군에 비해 낮았다.

고찰

여러 가지 방법으로 추간판 퇴행을 유발하는 많은 선행 연구 보고가 있다.³⁻⁵⁾ 그러나 이러한 추간판 퇴행이 실제 임상적으로 요통을 유발할 것으로 추정할 수 있는 실험실적 연구는 흔하지 않다. 즉 현실적으로 추간판 퇴행이 있다고 해서 모두 요통을 호소하지는 않기 때문에, 이러한 실험실적 퇴행이 실제적인 요통과 관련이 있는지 밝히는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

많은 원인 인자중에서도 흡연이나 흡연의 주성분인 니코틴은 이미 추간판 퇴행을 유발함이 밝혀져 있으며,⁹⁻¹¹⁾ 임상적으로도 흡연자에서 요통이 더 많이 발생함을 밝힌 역학조사가 있다.^{12,13)} 따라서 저자들은 니코틴 자극에 의해 퇴행이 유발된 추간판 세포에서 실제 요통의 원인이 될 것으로 생각되는 proinflammatory mediator 들이 증가하는지 증명해 보고자 하였다.

흡연자의 니코틴 혈장치는 보통의 흡연자가 약 50 nM에서 심한 흡연자는 약 300 nM에 이르는 것으로 보고되어,^{14,15)} 본 연구에서는 이 범위내의 니코틴 농도를 택하였다.

DNA량은 세포증식의 지표가 되므로 각 실험단계에서 DNA량을 구하여 세포증식 정도를 확인하고, 구하여진 실험측정치를 DNA량으로 정상화하였다. 100, 200 nM의 니코틴 자극군에서는 실험 6일째에 DNA가 감소하였는데, 실험군의 세포들이 니코틴 자극에 의해 증식이 활발해지지 않음을 의미한다고 생각된다. 대조군에서는 지속적으로 DNA량이 증가할 것으로 기대되었으나 이런 변화가 관찰되지 않은 이유로는 배양조건이나 특히 3차 배양에서 alginate bead의 중간부분의 세포들이 배양액과의 접촉이 원활치 않아 활발한 증식을 하지 못하였을 것으로 생각된다. 결과적으로 니코틴 농도가 증가함에 따라 세포의 증식이 억제되고 있음을 알 수 있었다.

GAG량은 세포의 대사와 합성의 정도를 반영한다. 니코틴 100 nM 이상의 농도 자극군에서 6일째부터 GAG량이 유의한 감소를 보여, 추간판 세포에 니코틴이 영향을 끼치고 있음을 알 수가 있었다. 이러한 변화는 관절연골세포를 이용한 실험에서는 관찰되지 않았는데, 이는 관절연골세포가 추간판 세포보다는 니

코틴 자극에 더 저항성을 가지고 있는 것에서 기인한다고 생각된다.

IL-1 β 는 prostaglandin에 의한 nociceptor 자극을 통해 통증 효과를 갖는 신경독성 cytokine으로 추간판 병변에서 통증을 유발하는 것으로 증명이 되어 있으며,¹⁶⁾ 관절연골을 이용한 연구에서도 단백질 합성 방해, Nitric oxide (NO) 생성, 기질 분해와도 관련이 있는 것으로 되어 있는 inflammatory mediator이다.¹⁷⁾ 이러한 특성으로 볼 때 본 연구에서도 IL-1 β 의 증가가 기대되었으나 니코틴 자극 후에도 유의한 증가는 관찰되지 않았다.

IL-6는 추간판 퇴행과 통증에 연관이 있으며, 인간과 설치류 추간판을 이용한 연구에서 추간판 세포에 의해 분비됨이 확인되었고, 특히 IL-1 β 의 자극에 의해 그 분비가 증가한다.^{18,19)} 본 연구에서는 니코틴 자극후에 유의한 증가를 확인할 수 있었다.

IL-8는 여러가지 비콜라겐 단백질이나 metalloproteinase분비 억제제를 통해 기질의 성숙에도 관계하지만, nociceptor 자극을 통한 통증에도 관계를 한다.²⁰⁻²²⁾ 본 연구에서는 섬유류 세포의 니코틴 자극 후에 대조군에 비해 유의한 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 proinflammatory mediator의 변화는 관절연골세포를 이용한 같은 실험에서는 저명하지 않아서, 추간판 세포가 관절연골세포보다 니코틴 자극에 더 민감한 반응을 보인다고 생각되었다.

본 연구의 제한점으로는 퇴행과 cytokine 생성에 더 민감할 것으로 생각되는 수핵세포 대신 섬유류 세포를 이용하였다는 점과 proinflammatory mediator 중 통증과 더 관련이 있는 NO, Prostaglandin E2, Tumor necrosis factor- α 등을 측정하지 못하였다는 점, 그리고 가능한 한 오랫동안 니코틴을 자극하지 못하고, 9일째까지 니코틴을 자극하였다는 점을 들 수가 있다.

결론

돼지 추간판의 섬유류 세포를 삼차배양하여 니코틴으로 자극한 결과, 고농도 니코틴 자극군에서 관절연골세포에서 관찰되지 않는 GAG량 감소를 확인하였다. 또한 섬유류 세포 고농도 니코틴 자극군에서 IL-6, IL-8과 같은 inflammatory mediator 등의 증가를 확인할 수 있었으며, 이는 관절연골세포 실험군에서는 관찰되지 않거나 낮은 수준이었다. 이러한 결과는 추간판 섬유류 세포가 니코틴 자극에 대한 cytokine 생산에 있어 관절연골세포보다 더 민감한 것으로 생각되며, 앞으로 니코틴의 장기효과 및 다른 cytokine들에 대한 연구의 기초가 될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Mooney V. Presidential Address International Society for the Study of the Lumbar Spine, Dallas, 1986: Where is the pain coming from? *Spine (Phila Pa 1976)*. 1987;12:754–9.
2. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20:1307–14.
3. Kepler CK, Markova DZ, Dibra F, et al. Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38:873–80.
4. He B, Wang YH, Yang J, Peng FL, Li F. Normal and degenerated rabbit nucleus pulposus cells in in vitro cultures: A biological comparison. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2013;33:228–33.
5. Chan SC, Bürki A, Bonél HM, Benneker LM, Gantenbein-Ritter B. Papain-induced in vitro disc degeneration model for the study of injectable nucleus pulposus therapy. *Spine J*. 2013;13:273–83.
6. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med*. 1988;319:1318–30.
7. Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Histological changes in intervertebral discs after smoking and cessation: experimental study using a rat passive smoking model. *J Orthop Sci*. 2006;11:191–7.
8. Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayashi K, Uematsu Y, Iwahashi M. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J Orthop Sci*. 2004;9:135–41.
9. Akmal M, Kesani A, Anand B, Singh A, Wiseman M, Goodship A. Effect of nicotine on spinal disc cells: a cellular mechanism for disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29:568–75.
10. Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayashi K, Uematsu Y. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27:1396–401.
11. Uematsu Y, Matuzaki H, Iwahashi M. Effects of nicotine on the intervertebral disc: an experimental study in rabbits. *J Orthop Sci*. 2001;6:177–82.
12. Shimia M, Babaei-Ghazani A, Sadat BE, Habibi B, Habibzadeh A. Risk factors of recurrent lumbar disk herniation. *Asian J Neurosurg*. 2013;8:93–6.
13. Haugen AJ, Brox JI, Grøvle L, et al. Prognostic factors for non-success in patients with sciatica and disc herniation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13:183.
14. Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J*. 1980;5:972–6.
15. Herning RI, Jones RT, Benowitz NL, Mines AH. How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin Pharmacol Ther*. 1983;33:84–90.
16. Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, Motegi M, Okada Y, Kakiuchi T. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21:218–24.
17. Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R119.
18. Rand N, Reichert F, Floman Y, Rotshenker S. Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukins-1-beta, -6, and -10 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cell culture. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22:2598–601.
19. Burke JG, G Watson RW, Conhyea D, et al. Human nucleus pulposus can respond to a pro-inflammatory stimulus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28:2685–93.
20. Sachs D, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*. 2002;96:89–97.
21. Cui GB, An JZ, Zhang N, Zhao MG, Liu SB, Yi J. Elevated interleukin-8 enhances prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. *Mol Pain*. 2012;8:11.
22. Takada T, Nishida K, Maeno K, et al. Intervertebral disc and macrophage interaction induces mechanical hyperalgesia and cytokine production in a herniated disc model in rats. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2601–10.

니코틴 자극에 의한 추간판 세포의 Proinflammatory Mediator의 생성

서형연 • 윤주현 • 김도연

전남대학교 의과대학 정형외과학교실

연구 계획: 니코틴 자극에 의한 추간판 세포내 proinflammatory mediators 측정을 통한 실험 연구

목적: 니코틴 자극에 의해 추간판 세포의 퇴행을 유도하고, 요통의 원인이 될 것으로 생각되는 proinflammatory mediator들이 증가함을 관찰함으로써 추간판 퇴행과 요통의 연관관계를 알아보고자 한다.

선행문헌의 요약: 흡연은 추간판 퇴행과 요통의 원인중의 하나이다. 흡연의 주된 화학물인 니코틴은 carboxy-hemoglobin의 생성, 혈관수축, 섬유소 용해 기전의 장애, 수핵세포의 대사변화 등의 기전을 통해 추간판의 단백다당을 감소시키는 등 추간판을 퇴행시킴을 밝힌 연구들이 있다.

대상 및 방법: 돼지 추간판의 섬유륜과 슬관절 연골을 채취하였고, pronase와 collagenase P를 이용한 순차적 효소분해를 통해 추간판 섬유륜 세포와 관절 연골세포를 획득하였다. Trypan blue를 이용하여 세포농도와 생존율을 검사한 후 알지네이트비드에 세포를 심어 삼차 배양하였으며, 니코틴을 각각 0, 50, 100, 200, 300 nM을 처리하여 3, 6, 9일간 배양하였다.

배양액을 모아 ELISA 검사법으로 interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-8을 측정하였고, 배양에 사용된 세포의 DNA를 정량하여, 생성된 proinflammatory mediator의 양을 정상화하였다. 돼지 슬관절 연골에서의 같은 실험의 결과와 비교하였다.

결과: 니코틴 농도에 따른 inflammatory mediator 변화를 살펴보면, DNA치는 대조군과 저농도 50 nM 니코틴 자극에서 의미있는 변화를 보이지 않았으며, 100, 200 nM의 니코틴 자극에서 일시적인 증가만이 관찰되었다.

IL-1 β 는 모든 군에서 유의한 증가가 관찰되지 않았으며, 이는 관절연골세포 실험군에서도 동일하였다. IL-6는 대조군과 저농도 자극군에서 유의한 변화가 없었으나, 200, 300 nM 자극군에서 유의한 증가를 보였으며, IL-8은 100, 200, 300 nM 니코틴 자극군에서 6일째에 유의한 증가가 관찰되었다. 관절연골세포를 이용한 실험군에서도, 200, 300 nM 자극군에서 유의한 변화가 관찰되었지만, 그 절대값은 섬유륜세포 실험군에 비해 낮았다.

결론: 돼지 추간판의 섬유륜 세포를 삼차배양하여 니코틴으로 자극한 결과, IL-6, IL-8 등 inflammatory mediator 등이 관절연골세포 시험군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 이는 추간판 섬유륜 세포가 니코틴 자극에 대하여 관절연골세포보다 더 민감한 것으로 생각되며, 다른 cytokine에 대한 실험과 니코틴의 장기 효과에 대한 연구의 기초가 될 수 있을 것으로 생각된다.

색인 단어: 추간판, 섬유륜, proinflammatory mediator, 니코틴

약칭 제목: 니코틴 자극과 섬유륜내 염증 매개체의 생성