

## Variations in Matrix Metalloproteinase Expression by Disc Location in Patients with Sequestered Lumbar Disc Herniation

Young-Yul Kim, M.D., Dojoon Park, M.D., Kee-Won Rhyu, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2015 Dec;22(4):160-164.

Originally published online December 31, 2015;

<http://dx.doi.org/10.4184/jkss.2015.22.4.160>

**Korean Society of Spine Surgery**

Department of Orthopedic Surgery, Gangnam Severance Spine Hospital, Yonsei University College of Medicine,  
211 Eunju-ro, Gangnam-gu, Seoul, 06273, Korea Tel: 82-2-2019-3413 Fax: 82-2-573-5393

©Copyright 2015 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.2015.22.4.160>

---

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.

# Variations in Matrix Metalloproteinase Expression by Disc Location in Patients with Sequestered Lumbar Disc Herniation

Young-Yul Kim, M.D.\*, Dojoon Park, M.D., Kee-Won Rhyu, M.D.

Dept. of Orthopedic Surgery, St. Vincent's Hospital and Daejeon St. Mary's Hospital\*, College of Medicine, The Catholic University of Korea

**Study Design:** In vivo study

**Objectives:** To evaluate variations in matrix metalloproteinase (MMP) expression levels according to the disc location in patients with sequestered lumbar disc herniation.

**Summary of Literature Review:** MMPs are considered to be the major catabolic enzymes in the intervertebral disc. MMPs have been known to be the primary mediators of extracellular matrix (ECM) degradation, to play major roles in disc degeneration by changing the collagens and the extracellular matrix, and to be involved in the processes of apoptosis and autolysis of herniated disc materials by inducing inflammatory cytokines.

**Materials and Methods:** The sequestered and contained disc materials were removed from seven patients with sequestered lumbar disc herniations. The materials from the contained discs were classified into group 1 and those of the sequestered discs into group 2. Immunohistochemistry tests were conducted for the tissues of both groups. The expression levels of MMP-1, 3, and 13 were checked using a fluorescence microscope. The amount of expression of each MMP was calculated using the percentage of expressed cells and analyzed statistically.

**Results:** In the histological study, increased expression of MMP-1, 3, and 13 was found in group 2. In the statistical analysis after the quantification of MMP expression, the expression of all MMPs was found to have increased significantly in group 2 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** The increased expression of MMP-1, 3, and 13 indicated that the inflammation and degeneration processes, and the spontaneous resorption by the surrounding tissues were more active in the sequestered disc group than in the contained disc group.

**Key Words:** Matrix metalloproteinase (MMP), Lumbar, Herniated nucleus pulposus, Sequestered herniation

## 서론

Matrix metalloproteinase(MMP)는 아연 의존형 단백효소군에 속해있는 효소로 추간판의 중요한 분해효소이며 현재까지 인체에서 24가지의 MMP가 확인되었다.<sup>1-3)</sup> MMP는 기질의 특이성, 단백질 구조, 세포내 위치에 따라 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMP, 기타 형의 6가지 군으로 구별된다.<sup>1)</sup> Collagenases (MMP-1, -8, -13, -18)는 섬유성 콜라겐에 작용하고, Gelatinases (MMP-2, -9)는 변질된 collagens, gelatins, laminins을 분해한다. Stromelysins (MMP-3, -10, -11)은 proteoglycans, gelatins, collagens, 및 MMP 전구체 등을 분해하며, Matrilysins (MMP-7, -26)은 aggrecan, 성장인자, cytokines을 포함한 세포외 기질을 분해한다. membrane-type MMPs (MMP-14 - 17, -24, -25)는 원형질막에 위치하고

세포내 신호전달체계에 영향을 미치며 다른 MMP들을 활성화시킨다.<sup>4)</sup> 나머지 MMPs (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27, -28)는 조직 기질의 항상성 유지 및 회복에 영향을 미친다고 알려져 있다.<sup>5)</sup>

MMP는 세포외 기질 분해의 일차적인 매개체로서 정상적인 조직의 리모델링과 병리학적인 조직의 파괴를 가능하게 하는 역

**Received:** October 19, 2015

**Revised:** October 20, 20145

**Accepted:** November 19, 2015

**Published Online:** December 31, 2015

**Corresponding author:** Kee-Won Rhyu, M.D.

Dept. of Orthopedic Surgery, St. Vincent's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 93 Jungbu-daero, Paldal-gu, Suwon, Korea. 442-723

**TEL:** +82-31-249-7186, **FAX:** +82-31-254-7186

**E-mail:** kwrhyu@catholic.ac.kr

할을 하며, 추간판을 구성하고 있는 교원질 및 세포의 기질의 변화에 관여하여 추간판의 퇴행성 변화를 일으키는 중요 인자로 알려져 있다. 또한 MMP 발현과 활동에 대한 조절장애와 추간판 탈출증이나 골관절염 등의 질환에서 발견되는 병적인 기질분해와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>5,6)</sup>

그 동안의 연구들은 추간판 탈출증 환자의 추간판이나 인위적으로 퇴행성 변화가 유발된 동물의 추간판을 대상으로 이루어졌다. 그러나 동일한 탈출 추간판 중에서도 조직의 위치나 주위 환경에 따라 MMP의 발현에 차이가 있을 것이며 그 차이에 대한 임상적 의미도 있을 것이다. 이에 본 저자들은 격리형 추간판 탈출증 환자에서, 수술 당시 섬유륜 내부에 잔존한 추간판과 외부로 격리형으로 탈출된 추간판 조직을 이용하여 조직의 위치에 따른 MMP 발현의 차이와 그 의미를 알아보고자 한다.

## 대상 및 방법

요추부 격리형 추간판 탈출증에 대해 수술을 시행받고 최소 1년 이상의 추시가 가능했던 7명의 환자를 대상으로 본 연구를 시행하였다. 환자는 남자가 3명, 여자가 4명이었고 평균연령은 51.9세(39~66세)였다. 최초 내원 당시의 증상지속 기간은 평균 1.1개월(0.5~2개월)이었다. 추간판 탈출부위는 제 4~5요추간이 4예, 부위는 제 5요추-제 1천추간이 2예, 제 3~4요추간이 1예였다. 모든 환자는 1~4주간의 보존적 치료에도 증상의 호전이 없거나 신경학적 증상이 심해져서 고식적인 관혈적 추간판 제거술을 시행받았다. 수술 시에 적출한 추간판 조직 중, 수술 당시에 섬유륜 내에 위치하여 기구를 이용한 수술적 조작으로 적출한 내재형 추간판 조직을 제 1군, 원래의 추간판과 완전히 분리된 상태로 탈출되어 경막외 공간에 위치한 격리형 추간판 조직을 제 2군으로 나누었다.

각군의 추간판 조직을 얼음을 채우고 1% penicillin/streptomycin (Gibco, NY, USA)을 Phosphated Buffered Saline (PBS: Hyclone, Utah, USA) 용액에 담궈다가 10% formaldehyde 용액을 이용하여 고정하였다. 각 군의 추간판 조직을 파라핀 용액에 넣어 고정시키고 조직의 중심부를 기준으로 절단면을 만들었다. 절단면을 기준으로 2~4  $\mu\text{m}$  두께로 각 조직 당 5장, 각 군

당 35장의 조직 표본 슬라이드를 만들었다. 각 조직 슬라이드에 0.3% hydrogen peroxidase (Green pham, Korea)를 30분간 가하고 추가적으로 20분간 blocking reagent (Ultra V block: ScyTek Laboratories, USA)를 처리하였다. 각 조직에 1:100으로 희석한 MMP-1, -3, -13 항체(Santa cruz Biotechnology, USA)를 추가하고 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음으로 goat anti-mouse IgG-FITC (Santa cruz Biotechnology, USA)를 처리한 뒤 암실에서 1시간 동안 유지한 뒤 세척하였다.

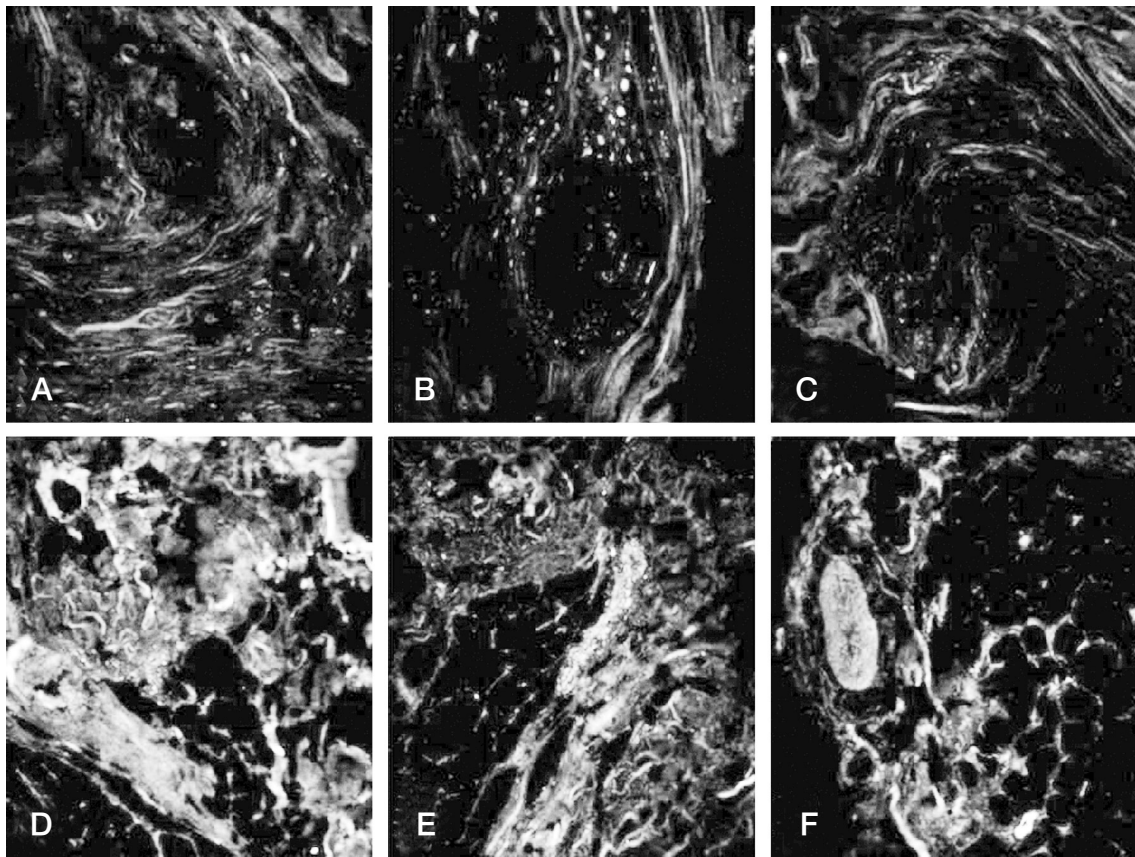
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (Vector Laboratories, Inc., USA)를 이용하여 조직형광검사를 위한 표본을 제작하였다. Confocal laser scanning microscopy (CM1850: LEICA, Mannheim, Germany)를 이용하여 각 군에서 MMP-1, -3, -13의 발현량을 정량적으로 측정하였다. 참고 픽셀은 슬라이드 표본의 100 배율에서 측정된 전체 픽셀수로 정하였고, 형광 강도가 50% 이상인 경우를 양성 픽셀로 정하였다. 다음으로 참고 픽셀 수에 대한 양성 픽셀 수를 % 값으로 구하여 MMP의 정량 발현값을 구하였다. 이후 Paired t-test를 이용하여 각 군의 MMP 발현값을 통계학적으로 비교 분석하였다( $p < 0.05$ ).

## 결과

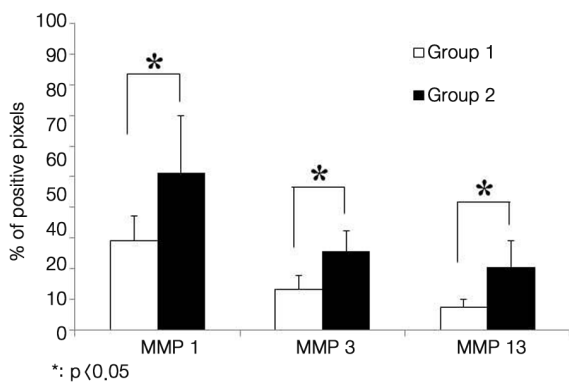
조직학적 결과, 면역조직생화학 염색 상 제 2군에서 제 1군보다 MMP-1, 3, 13의 발현에 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 1). 각 군에 대한 MMP의 발현을 정량화한 결과, MMP-1, 3 및 13의 양성 픽셀 수는 제 1군에서 각각  $118,934 \pm 30,951$  개,  $54,174 \pm 18,761$  개,  $29,994 \pm 11,575$  개였다. 제 2군에서는 각각  $209,502 \pm 76,289$  개,  $103,834 \pm 28,686$  개,  $83,231 \pm 35,184$  개였다. 통계학적 검사 결과 각 군간의 p값은 각각 0.002, 0.020, 0.006으로 의미있는 차이가 있었다. 100배 고배율 표본의 기준 픽셀 수인 408,581 개에 대한 양성 픽셀 수의 비율은 제 1군에서 각각  $29.11 \pm 7.98\%$ ,  $13.26 \pm 4.59\%$ ,  $7.34 \pm 2.83\%$ 였다. 제 2군에서는 각각  $51.28 \pm 18.67\%$ ,  $25.41 \pm 7.02\%$ ,  $20.37 \pm 8.61\%$ 였다(Table 1). 통계학적 검사 결과 각 군간의 p값은 각각 0.002, 0.020, 0.006으로 제 2군에서 제 1군보다 모든 MMP의 발현이 의미있게 증가하였다(Fig. 2).

**Table 1.** The Qualified Expressions of MMPs were Calculated by the Percentages of Positive Pixels to the Reference Pixels

	Group 1		Group 2		P-values
	No. of positive pixels	% of positive pixels	No. of positive pixels	% of positive pixels	Paired t-test
MMP-1	118,934 $\pm$ 30,951	29.11 $\pm$ 7.98	209,502 $\pm$ 76,289	51.28 $\pm$ 18.67	0.002
MMP-3	54,174 $\pm$ 18,761	13.26 $\pm$ 4.59	103,834 $\pm$ 28,686	25.41 $\pm$ 7.02	0.020
MMP-13	29,994 $\pm$ 11,575	7.34 $\pm$ 2.83	83,231 $\pm$ 35,184	20.37 $\pm$ 8.61	0.006



**Fig. 1.** Results of immunohistochemistry for specimens (100 $\times$ ). The bright areas indicate the increased fluorescence intensity for the expression of each MMP. The expression of MMP-1 (A), -3 (B), and -13 (C) in group 1 was observed. In group 2, the expression of MMP-1 (D), MMP-3 (E), and MMP-13 (F) was increased much more than that of group 1.



**Fig. 2.** Variation in MMP expression in each group. Positive pixels indicate increased fluorescence intensity of more than 50%. The quantified expression of MMPs was calculated using the percentage of positive pixels with respect to the reference pixels.

## 고찰

그 동안의 연구에서 MMP 등은 퇴행 및 비퇴행 추간판에서 발견되었다고 보고되었다. 이 중 비퇴행 추간판에서 발현하는 것으로 알려진 MMP들은 MMP-2, -7, -8, -9, 및 -10로 정상적인 조직의 회복과 리모델링 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들의 발현은 면역조직학적 분석을 통해서 확인할 수 있으며, 청소년기나 청년기의 추간판에서는 소량이 발현되나 성인에서는 발현량이 증가하는 것으로 보고되고 있다.<sup>7-13)</sup> 또한, 추간판 퇴행과 MMP 발현과의 관계에 대해서는, MMP-1, -2, -3, -7, -9의 발현량 증가와 추간판 퇴행의 정도와 의미있는 상관관계가 있다고 보고되고 있다.<sup>7,11-13)</sup> Le Maitre 등<sup>9,14)</sup>은 MMP-7과 -13은 퇴행 수핵과 섬유륜에서 상당히 높게 발현하였고, MMP-1과 -3은 심하게 퇴행된 수핵에서 발현이 의미있게 증가하였으며 MMP-7과 13은 수핵 퇴행의 초기단계에서 발현이 크게 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서는 MMP-1, -3 및 -13을 대상으로 하였다. 그 이유는 MMP-1, -3 및 -13은 정상



적인 성인 추간판에서는 발현하지 않으며 퇴행 추간판에서 발현이 증가한다고 보고되고 있어<sup>7,9,11)</sup> 추간판 퇴행과의 연관성을 추정할 수 있고, MMP-3은 추간판 탈출증에서 탈출 수핵의 자연 소실 기전에도 관여하는 것으로 알려져 있으므로<sup>15-18)</sup> 추간판 조직의 위치에 따른 MMP 발현의 차이도 확실하게 알 수 있으며 자가흡수 과정과 MMP 발현과의 연관성도 알아볼 수 있기 때문이었다.

본 연구는 기존의 연구들과 달리 격리형 추간판 탈출증 환자에서 적출한 격리 추간판 조직과 섬유륜내에 남아있는 내재 추간판 조직을 실험 대상으로 하였다. 통상적으로 판단하여도 격리 추간판의 조직은 조직의 모든 표면이 혈행에 노출되어 있으며, 자가면역에 의한 추간판 자가흡수 반응도 일어나므로 내재 추간판 조직보다 퇴행성 변화를 비롯한 조직의 변화가 더욱 심하게 일어날 것이라고 예상할 수 있으며 따라서 MMP의 발현에도 주 조직 사이에 차이가 있을 수 있다고 추정할 수 있다. 본 연구 결과, 격리 추간판 조직에서 MMP-1, -3 및 -13의 발현이 모두 의미있게 증가하였는데, 이는 격리 추간판 조직에서 내재 조직보다 퇴행성 변화가 더욱 활발하며, 특히 자가흡수 기전도 더욱 활발하게 일어나고 있다는 것을 추정할 수 있는 근거가 될 수 있다.

그 간의 연구들을 종합하면 MMP가 추간판의 세포외 기질의 퇴행에 중요한 역할을 한다는 명백한 증거는 없다. 그러나, 기존의 연구와 본 연구 결과를 바탕으로, 추간판 조직의 탈출 위치나 주위 조직환경에 따라 MMP들의 발현에 차이가 있어서 격리 추간판 조직에서 퇴행성 변화가 더욱 심했음을 알게 되었고, 주위의 조직에 대한 노출이 클수록 탈출된 추간판의 자가흡수도 더욱 활발하게 일어날 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

본 연구의 단점으로, 첫째는 연구대상의 수가 너무 적다는 것이다. 이는 본 연구의 가장 큰 단점으로, 연구대상의 수가 적음으로 해서 환자의 나이, 성별, 질환의 이환 기간, 환자의 통증 정도 등 중요한 임상 인자들과 MMP 발현과의 상관관계를 통계학적으로 분석할 수 없었으며 단순 현상 관찰에 그칠 수 밖에 없었다. 격리형 추간판 탈출증 자체가 흔한 상병은 아니지만 보다 많은 환자를 대상으로 연구를 시행한다면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 둘째는 연구대상인 MMP의 종류가 적다는 것이다, 현실적으로 모든 MMP들을 대상으로 연구를 할 수는 없겠지만 보다 많은 MMP들을 대상으로 한 연구가 필요하다. 셋째는 MMP 발현에 대한보다 구체적인 의미와 작용기전을 밝히지 못하고 단순히 발현의 차이만을 확인했다는 것이다. 그러나, 단순한 탈출 추간판이나 실험적으로 유도된 퇴행 추간판이 아니라, 동일한 환자의 신체 내에서 주위 조직환경이 상이한 두 가지의 추간판 조직의 MMP의 발현을 비교 관찰했다는 것에도 나름의 의미가 있을 것이다. 향후 위의 문제점들을 극복

한 추가적인 연구를 시행하여 보다 정확한 결과와 임상적인 의미를 밝히는 연구가 필요할 것이다.

## 결론

탈출 추간판의 위치와 주위 환경에 따라 MMP들의 발현에 차이가 있음을 알게 되었다. 즉, 격리 수핵조직에서 MMP-1, 3, 13이 의미있게 증가하는 것은 수핵 탈출 후 주위 세포조직에 의해 염증 및 퇴행과정이 활성화된 것을 의미하며, 특히 MMP-3이 의미있게 증가하는 것은 주위 조직에 의한 격리 수핵의 자가흡수가 섬유륜내 수핵보다 더 활발하게 일어나는 것을 의미한다고 추정할 수 있었다.

## REFERENCES

1. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-39.
2. Cawston T, Carrere S, Catterall J, et al. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *No-vartis Found Symp*. 2001;234:205-18.
3. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69:562-73.
4. Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MTMMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol*. 2001;53:187-202.
5. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:534-40.
6. Vo NV, Hartman RA, Yurube T, et al. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J*. 2013;23:331-41.
7. Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, et al. 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degeneration and resorption. *Eur Spine J*. 2002;11:308-20.
8. Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN Jr. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc: implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem*.

- 2005;80:157–62.
9. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol.* 2004;204:47–54.
  10. Richardson SM, Doyle P, Minogue BM, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R126.
  11. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000;25:3005–13.
  12. Bachmeier BE, Nerlich A, Mittermaier N, et al. Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration. *Eur Spine J.* 2009;18:1573–86.
  13. Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, et al. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1997;22:2877–84.
  14. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression. *Biotech Histochem.* 2006;81:125–31.
  15. Tsarouhas A, Soufla G, Katonis P, et al. Transcript levels of major MMPs and ADAMTS-4 in relation to the clinico-pathological profile of patients with lumbar disc herniation. *Eur Spine J.* 2011;20:781–90.
  16. Genevay S, Finckh A, Mezin F, et al. Influence of cytokine inhibitors on concentration and activity of MMP-1 and MMP-3 in disc herniation. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R169.
  17. Haro H, Komori H, Kato T, et al. Experimental studies on the effects of recombinant human matrix metalloproteinases on herniated disc tissues—how to facilitate the natural resorption process of herniated discs. *J Orthop Res.* 2005;23:412–9.
  18. Kato T, Haro H, Komori H, et al. Sequential dynamics of inflammatory cytokine, angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous resorption of the herniated disc. *J Orthop Res.* 2004;22:895–900.

## 격리형 추간판 탈출증에서 수핵 조직의 위치에 따른 Matrix Metalloproteinase 발현정도의 차이

김영율\* · 박도준 · 유기원

가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원, 대전성모병원 정형외과학교실\*

**연구 계획:** 실험실내 생체연구

**목적:** 격리형 추간판 탈출증 환자에서, 섬유륜 내부의 수핵과 외부로 격리된 수핵 조직을 이용하여 수핵 조직의 위치에 따른 MMP 발현의 차이와 그 의미를 알아보고자 한다.

**선행 문헌의 요약:** Matrix metalloproteinase (MMP)는 아연 의존형 단백질효소로 추간판의 중요한 분해효소이다, MMP는 추간판을 구성하고 있는 교원질 및 세포외 기질의 변화에 관여하여 추간판의 퇴행성 변화를 일으키는 중요 인자로 알려져 있다.

**대상 및 방법:** 7예의 신경증상을 동반한 격리형 추간판 탈출증 환자에 대해, 수핵 제거술 시에 섬유륜 내부의 수핵과 외부로 격리된 수핵을 제거하였다. 섬유륜내 수핵조직을 제 1군, 격리된 수핵을 제 2군으로 정하여 각 군의 수핵조직에 대해 면역조직화학 검사를 시행하여 MMP-1, 3, 13의 발현을 측정하였다. 발현 측정은 일차로 형광현미경 검사를 시행하여 발현정도를 비교하였고, 조직검사에서 각 MMP의 발현이 양성으로 보이는 세포의 수를 측정하여 정량화한 뒤 각 군간의 차이를 통계학적으로 분석하였다.

**결과:** 조직검사 결과 제 2군에서 제 1군보다 MMP-1, 3, 13의 발현에 증가하는 것이 확인되었다. 각 군에 대한 MMP의 발현을 정량화하여 통계적으로 분석한 결과, 제 2군에서 제 1군보다 모든 MMP의 발현이 의미있게 증가하였다( $p < 0.05$ ).

**결론:** 격리 수핵조직에서 MMP-1, 3, 13이 의미있게 증가하는 것은 수핵 탈출 후 주위 세포조직에 의해 염증 및 퇴행과정과 격리 수핵의 자가흡수가 섬유륜내 수핵보다 더 활발하게 일어나는 것을 의미한다.

**색인 단어:** Matrix metalloproteinase (MMP), 요추, 추간판 탈출증, 격리형 탈출

**약칭 제목:** 격리형 요추간판 탈출증에서 MMP의 발현