

소 태아 혈청이 연골의 Proteoglycan 합성에 미치는 영향

고신대학교 의학부 정형외과학교실

김홍준 · 김재도

고신대학교 의학부 병리학교실

김영옥 · 허만하

Effect of serum on biosynthesis of proteoglycan of human articular cartilage in culture.

Heung June Kim · Jae Do Kim

Department of Orthopedic Surgery, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

Young Ok Kim · Man-Ha Huh

Department of Pathology, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

= Abstract =

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue that covers the ends of long bones within the synovial joint cavity. It contains no blood vessels, no nerve fibers, and no lymphatics, accordingly it is nourished from the synovial fluid by diffusion.

Articular cartilage is composed of an extracellular matrix(ECM), collagen and proteoglycan. A small number of specific cells, chondrocytes, are embedded in the matrix. They are influenced by the alteration of components in synovial fluid which is derived from serum.

To examine the effect of serum on biosynthesis of proteoglycan, this experiment was performed using human articular cartilages which were obtained from the patients who were operated due to various diseases. The human articular cartilages were incubated in 3 kinds of media : DMEM without fetal calf serum(FCS) (control), DMEM containing 1 % FCS, and DMEM containing 20 % FCS. The synthesized proteoglycan, incorporated with labeled S³⁵ sulfate, was extracted through PD-10 column after digestion by papain and measured the uptake of [35S] sulfate labeled proteoglycan by scintillation counter.

To examine whether difference in concentration of fetal calf serum is reflected in staining intensity of immunohistochemistry for proteoglycan (avidin-biotin peroxidase complex), immunohistochemical staining was performed.

The results were as followings :

- 1) Biosyntheses of proteoglycan in 1% and 20% FCS were increased 1.77 times and 2.27 respectively comparing with the control group.
- 2) In FCS groups, biosynthesis of proteoglycan in 20% FCS was 1.29 times higher than that in 1% FCS.
- 3) No difference in staining intensity for proteoglycan in the variable concentrations of fetal calf serum was seen.

The above results suggest that the compositional alteration of synovial fluid due to various factors influence the synthesis of the ECM in the articular cartilage and immunohistochemical staining is not sensitive enough to differentiate the quantitative difference of antigen.

Key Words : Proteoglycan, fetal calf serum, immunohistochemistry

서 론

관절연골은 무혈관조직으로 드물게 산재한 연골세포와 세포외 기질로 구성되어 있는데 세포외 기질은 연골로서의 틀을 유지하게 하는 collagen과 관절을 통한 압력부하를 분배하거나 조직 강성과 탄성을 유지하는데 필요한 교원질 섬유망에 종창 압력으로 작용하는 proteoglycan으로 되어 있다.

관절 연골에는 혈관과 림프관이 없으므로 영양 공급은 혈청과 관절내 활막액의 확산에 의해 이루어진다. 그리고 연골세포들은 능동적으로 proteoglycan의 생합성과 대사를 조절하는데 관여하여 정상적으로 합성과 분해는 평형을 이루어 세포주위 기질에서 proteoglycan이 일정한 수준을 유지하도록 해준다. 그러나 연골세포가 영양공급이나 기계적 또는 호르몬의 다양한 자극을 받게 되면 연골세포에 의해 조절되는 proteoglycan의 신진대사에 변화가 일어날 수 있으며 이들의 국소적 농도가 감소되거나 혹은 증가되어 결체조직의 물리적 특성이 변화하게 된다.^{4, 5)}

일반적으로 관절 활막액은 혈청의 투석에 의해 조절되며 관절연골의 영양 공급은 이러한 활막액에 의해 주로 이루어진다. 이에 저자는 인간의 관절 연골에서 Proteoglycan을 생합성하고 대사하는데 영향을 미칠 수 있는 혈청내의 인자에 대해 알고자 하여, 관절 연골을 소 태아 혈청(fetal calf serum)이 포함된 배양액과 포함되지 않은 배양액에서 배양하여 혈청이 연골기질 중 proteoglycan의 합성에 미치는 영향에 대해 생화학적으로 조사하고자 하였다.

또한 소 태아 혈청 농도의 차이에 따른 proteoglycan 합성량의 양적 차이가 면역 조직화학적 염색 강도의 차이로 발현하는지의 여부를 살펴보기 위해 proteoglycan 면역조직화학적 검사를 시행하였고, 아울러 proteoglycan의 정성적 염색을 위하여 safranin-O 염색을 시행하고, 혈청농도와와의 관련 여부를 살펴 보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험재료로는 다음과 같은 재료들을 사용하

였다. 관절 연골은 성인의 관절성형수술시 채취한 것으로 슬관절 및 고관절의 연골이었고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), MEN nonessential amino acid, gentamicin, ascorbic acid, fetal calf serum (FCS) 등은 Gibco 회사에서, papain은 Sigma 회사에서¹⁵⁾, PD-10 column은 Pharmacia 회사에서, guanidine hydroxychloride, cesium chloride는 Research plus 회사에서 각각 구입하여 사용하였다. 면역병리 염색을 위한 proteoglycan 항체 (clone 1-B-5/C5)는 ICN Biochemicals(USA) 회사에서 구입하였다.

2. 실험방법

수술시 채취한 환자의 전층의 관절 연골을 0.5×0.5cm 크기의 절편으로 자른후 DMEM이 든 Plate 용기에 넣어 Laminar hood내에서 3~4번 정도 media로 세척하였다. 세척한 관절 연골을 배양병에 약 8개씩 넣고, 각각의 group인 20% FCS-DMEM, 1% FCS-DMEM과 DMEM군(대조군)에 4.5ml내지 5ml의 각각의 배양액을 넣은 후 배양병의 뚜껑을 약간 느슨하게 개방한 후, 섭씨 37도로 유지된 배양 incubator속에 넣어 배양시켰다.⁶⁾ 배양액 교환은 매일 하였으며, 격일로 vitamin C가 함유된 배양액으로 교환하였다. 배양 6일째 신선한 배양액으로 각각 교체하고, 1시간이 경과한후, S³⁵ 방사능이 20~30uCi/ml씩 함유된 배양액으로 다시 교체시켜 4시간 동안 레이블(label)시켰다. 그후 S³⁵가 함유된 배양액을 제거하고 DMEM 배양액으로 3~4회씩 세척한 후, 관절 연골을 각 연골군의 무게를 측정후 파파인 1ml씩 넣어 섭씨 60도로 유지된 shaking incubator에 넣어 12시간 동안 digestion시켰다. Digestion된 관절연골을 PD-10 column에 여과시키기 위해서, 관절연골액 표본 125ul에 8 mole guanidine HCl 125ul를 섞어 각군의 250ul의 표본을 2개씩 준비하였다. PD-10 column은 PD-10 buffer로 3번정도 세척한 후, Scintillation vial 위에 PD-10 column을 장치

한 후 첫번 vial에는 250ul의 표본액을 PD-10 column에 여과시키고, 다음에는 250ul의 PD-10 buffer를 3회에 걸쳐 여과시키고, 두번째에서 여덟번째 Vial에는 PD-10 buffer 용액 500ul씩 1회씩 여과시켰다. 여과된 액에 75% 알콜 0.5ml씩과 Scintillation fluid 5ml씩 첨가하여 Scintillation Counter에 넣어 1 vial에 2분씩 소요되도록 하여 방사능을 측정하였다.

3. 조직화학적 검색(특수 염색과 면역조직화학적 검색)

성인의 관절 성형 수술시 채취한 관절 연골 조직과 1%, 20% 소 태아 혈청이 첨가된 관절 연골 조직을 10% 중성 완화 포르말린과 5% nitric acid에 4시간 고정후 파라핀에 포매하고, safranin-O 특수염색과 proteoglycan 항체를 사용하여 avidin-biotin peroxidase complex (ABC)법으로 면역조직화학적 검색을 시행하였다. 이미 선택된 파라핀 포매 블록을 4~5μm의 두께로 박절하고, 60℃ 이하의 온도에서 건조시킨 후 xylene에서 탈파라핀 과정을 거친 다음 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서대로 1분씩 방치하여 흡수시켰고, 흐르는 수도물에 수세하였다. 이들을 메탄올-과산화수소용액(100% methanol 200ml+30% H₂O₂ 5ml)에 2분간 처리하여 세포내의 내인성 과산화효소의 활성화를 저지시킨 다음 인산완충용액(PBS)으로 3회 수세하였다. 비특이적인 배경염색을 방지하기 위하여 정상산양혈청을 가한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 일차항체를 도포하여 40분간 방치한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. Peroxidase labelled streptavidin을 20분간 도포하여 표시한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. 기질인 H₂O₂-aminoethyl carbazole 용액을 도포 후 20분 동안 처리한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. Mayer's hematoxylin으로 1분동안 처리하여 대조염색한 후 인산완충용액과 흐르는 수도물로 수세하였다. Geltol 봉입제로 덮개유리를 유리 슬라이드에 부착시켰다.

결 과

실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Proteoglycan 합성은 대조군에 비해 소 태아 혈청이 1% 포함된 실험군에서 1.77배, 20% 포함된 군에서 2.27배 증가되었다.(Table 1., Fig 1)

2. 소 태아 혈청의 농도에 따른 proteoglycan 합성의 성적을 비교하면 20% 포함된 실험군에서 1% 포함된 군보다 1.29배 증가되었다.(Table 1., Fig 1).
3. 소 태아 혈청 농도차이에 따른 proteoglycan의 면역조직화학적 염색강도의 차이는 관찰되지 않았다.(Fig 2, 3)

Table 1. Rate of proteoglycan biosynthesis in culture media

Case	Diagnosis	Count per minute/mg. cartilage wet weight		
		Control(*)	1% FCS Group(*)	20% FCS Group(*)
1(F/63)	Osteoarthritis Hip	197.25(1)	350.67(1.77) (1)	485.87(2.46) (1.38)
2(F/29)	Osteoarthritis Knee	201.45(1)	228.43(1.13) (1)	281.22(1.39) (1.23)
3(F/51)	Osteoarthritis Knee	230.63(1)	414.25(1.79) (1)	539.65(2.33) (1.30)
4(F/12)	Osteosarcoma Femur	432.43(1)	850.25(1.96) (1)	1067.93(2.46) (1.32)
5(M/30)	Avascular necrosis Hip	130.25(1)	280.45(2.15) (1)	351.37(2.69) (1.25)
6(M/30)	Avascular necrosis Hip	405.21(1)	745.58(1.82) (1)	952.24(2.34) (1.27)
Mean rate		(1)	(1.77) (1)	(2.27) (1.29)

* : synthetic rate

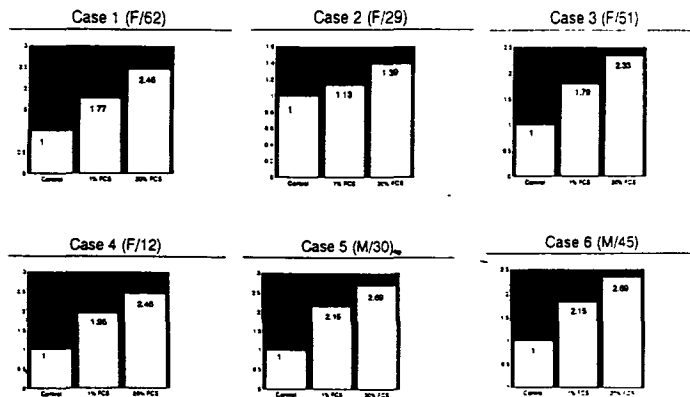


Fig. 1. Rate of proteoglycan biosynthesis in culture media



Fig. 2. Safranin O staining for proteoglycan
(1% FCS group, X200)

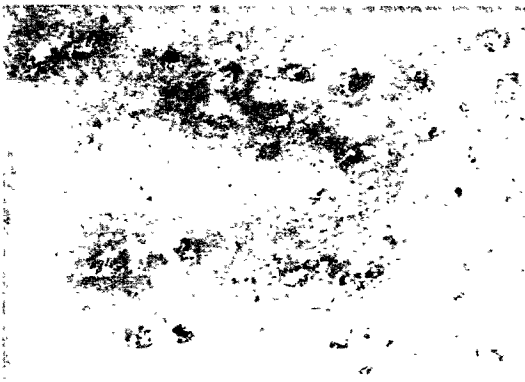


Fig. 3. Immunohistochemical reaction for proteoglycan(1% FCS group, X 200)

고 안

세포와 기질의 주성분인 collagen과 proteoglycan은 관절 연골의 조직 강성과 탄성을 유지하며, 관절에 가해지는 압력을 분산시키며 이 두 양상은 연골 세포에 의해 합성되어지고 파괴된다. 이 연골 세포는 주로 혈청의 투석에 의해 생성되는 활막액에 의해 영양 공급을 받는데 정상에서는 proteoglycan의 생합성과 대사가 평형을 이루어 일정한 수준을 유지하고 있다. 그러나 proteoglycan의 합성은 연골 세포에 가해지는 혈청내의 여러 인자에 의해 자극되

어질 수 있으며, 이들 혈청내의 인자에 대한 정확한 본질은 알려져 있지 않지만, 여러 호르몬과 성장인자들이 연구되어져 왔었다. Insulin⁸; calcitonin, parathyroid hormone, thyroxine^{11, 17, 19}; somatomedin including insuline-like growth factor^{2, 9, 19, 20} and Multiplication-stimulating activity¹¹. 그와 fibroblast growth factor¹⁰, chondrocyte growth factor^{2, 3}, cartilage-derived factor¹², platelet lysate¹³, connective tissue-activating peptides¹⁴와 같은 성장인자들이 이에 속하고, 이들중 단지 somatomedin과 insulin만이 관절연골에서 기질 성분의 생합성을 증가시킨다는 사실이 보고되어 있다.^{3, 9, 19, 20}

Sandy¹⁶ 등은 연골 세포들은 혈청의 존재와 무관하게 세포의 기질로부터 proteoglycan의 많은 소실에 대한 보상 작용으로 proteoglycan의 합성율이 증가되었다고 주장했다 그러나 Hascall 등⁷의 보고에 의하면, 혈청이 없는 배지에서 관절 연골을 배양하였을 경우에 proteoglycan의 순 소실에 대한 보상 작용으로 proteoglycan의 합성률이 증가되지 않기 때문에 혈청내의 어떤 인자들이 요구된다고 하였으며, 소 태아 혈청내에서 관절 연골을 5~6일간 배양하였을 때, proteoglycan의 합성이 2~3배 증가되었으며 이후 최소 14일 동안 합성률이 높게 유지되었다고 하였다. 반면에 혈청이 포함되지 않은 배지에서 배양하였을 경우에는 proteoglycan의 합성률이 첫날에 거의 30%~50%까지 감소되었고, 조직내에 남아 있는 proteoglycan의 양도 거의 일정하게 감소되었다고 하였다.

저자의 실험에서는 소 태아 혈청이 포함되어 있는 배지에서 관절 연골 세포를 배양한 군에서 소 태아 혈청이 포함되어 있지 않은 배지에서 배양한 대조군에 비해 proteoglycan의 합성률이, 1% FCS군에서는 1.77배, 20% FCS군에서는 2.77배로 증가되어 혈청이 관절 연골의 proteoglycan 합성에 영향을 미치는 인자로 사료되었다.

Hascall 등⁷⁾은 또한 proteoglycan의 생성에 대한 소 태아 혈청의 영향은 가역적이라고 하였는데 그들의 연구에 의하면, 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지에서 배양한 것에 비해 혈청이 포함된 배지로 바꾸었을 때 2~3일 지난뒤에는 혈청이 포함된 DMEM배지에서 배양한 수준으로 proteoglycan의 생성이 증가하였으며, 반대로 혈청이 포함된 DMEM배지에서 혈청이 포함되지 않은 배지로 바꾸었을 때 proteoglycan 합성은 12시간에서 16시간 정체후 2~3일 지난뒤에 혈청없이 배양한 수준으로 감소하였다고 보고한 바 있으나, 저자들의 실험방법은 이와 상이하하여 그 결과를 비교할 수 없었다.

결 론

1. Proteoglycan 합성은 대조군에 비해 소 태아 혈청이 1% 포함된 실험군에서 1.77배 20% 포함된 군에서 2.27배 증가되었다.
2. 소 태아 혈청의 농도에 따른 proteoglycan 합성의 성적을 비교하면 20% 포함된 실험군에서 1% 포함된 군보다 1.29배 증가되었다.
3. 소 태아 혈청의 농도에 따른 proteoglycan 염색 강도의 차이는 인정되지 않았다.

이상의 실험결과로 미루어 보아 활막액의 성분의 변화가 관절연골의 합성 및 재생에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 정상적인 성분을 가진 활막액의 양을 관절에 유지하는 것이 관절연골의 퇴행성 변화를 막을 수 있는 한 방법이란 사실을 확인하였다. 아울러 현재 널리 사용되고 있는 면역조직화학적 방법(avidin-biotin peroxidase complex)은 소 태아 혈청의 농도의 차이에 따른 proteoglycan 항원의 양적 차이를 구별할 수 있을만큼 예민하지 못하다는 사실을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Choi, Y. C., Morris, G. M., and Sokoloff, L. : Effect of platelet lysate on growth and sulfated glycosaminoglycan synthesis in articular chondrocyte cultures, *Arthritis Rheum*, 23 : 220~224, 1980.
2. Corvol, M. T., Malesud, C. J., and Sokoloff, L. : A pituitary growth-promoting factor for articular chondrocytes in monolayer culture, *Endocrinology* 90 : 262~271, 1972.
3. Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., Van Der Brande, J. L., and Van Wyck, J. J. : Somatomedin : proposed designation for sulphation factor, *Nature(London)*, 235 : 107~109, 1972.
4. Dingle, J. T., Sakatvala, J., Heinbry, R., Tyler, J., Fell, H. B., and Jubb, R. : A cartilage catabolic factor from synovium, *Biochem. J.*, 184 : 177~180, 1979.
5. Fell, H. B., and Jubb, R. W. : The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture, *Arthritis Rheum.*, 20 : 1359~1371, 1977.
6. Handley, C. J., and Lowther, D. A. : Extracellular matrix metabolism by chondrocytes. III. Modulation of proteoglycan synthesis by extracellular levels of proteoglycan in cartilage cells in culture, *Biochem. Biophys. Acta* 500 : 132~139, 1977.
7. Hascall V. C., Handley, D. J., Mcquillan : The Effect of Serum on Biosynthesis of Proteoglycans by Bovine Articular Cartilage in Culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 224, No.1, July 1 : 206~223, 1983.
8. Hill, D. J., and Milner, R. D. S. : Increased

- somatomedin and cartilage metabolic activity in rabbit fetuses injected with insulin in utero, *Diabetologia* 19 : 143~147, 1980.
9. Jennings, J. F., Freeman, D., and Galrland, J. T. J. : Stimulation of chick embryo cartilage sulfate and thymidine uptake : comparison of human serum, purified somatomedins, and other growth factors, *Clin Endocrinol. Met.* 51 : 1166-1170, 1984.
10. Jones, K. L., and Addison, J. : Pituitary fibroblast growth factor as a stimulator of growth in cultured rabbit articular chondrocytes., *Endocrinology*, 97 : 359~365, 1975.
11. Kato, Y., Nasu, N., Takase, T., Daikuhara, Y., and Suzuki, F. : A serum-free medium supplemented with multiplication-stimulating activity (MSA) supports both proliferation and differentiation of chondrocytes in primary culture, *Exp. Cell. Res.* 125 : 167~74, 1980.
12. Kato, Y., Nomura, Y., Daikuhara, Y., Nasu, N., Tsuji, M., Asada, A., and Suzuki, F. : Cartilage-derived factor (CDF) I. Stimulation of proteoglycan synthesis in rat and rabbit costal chondrocytes in culture, *Exp. Cell Res.*, 130 : 73~81, 1980.
13. Malesud, C. J., and Sokoloff, L. : The effect of chondrocyte growth factor on membrane transport by articular chondrocytes in monolayer culture, *Connect tissue Res.* 6 : 1~9, 1978.
14. Myers, S. L., and Castor, C. W. : Connective tissue activation. XV. Stimulation of glycosaminoglycan and DNA synthesis by a polymorphonuclear leukocyte factor, *Arthritis Rheum*, 23 : 556~563, 1980.
15. Nakazawa, K., and Suzuki, S. : Purification of Keratan Sulfate-endogalactosidase and its action on keratan sulfates of different origin, *J. Biol. Chem.*, 250 : 912~197, 1975.
16. Sandy, J. B., Brown, H. L. G., and Lowther, D. A. : Control of proteoglycan synthesis. Studies on the activation of synthesis observed during culture of articular cartilages, *Biochem. J.* 188 : 119~13042, 1980.
17. Suzuki, F., Yoneda, T., and Shimomura, Y. : Calcitonin and parathyroid-hormone stimulation of acid mucopolysaccharide synthesis in cultured chondrocytes isolated from growth cartilage, *FEBS Lett.*, 70 : 155~158, 1976.
18. Takigawa, M., Takano, T., and Suzuki, F. : Effects of parathyroid hormone and cyclic AMP analogues on the activity of ornithine decarboxylase and expression of the differentiated phenotype of chondrocytes in culture, *Cell Physiol*, 106 : 259~268, 1981.
19. Van Wyck, J. J., Underwood, L. E., Hintz, R. L., Glemmons, D. R., Voina, S. J., and Weaver, R. P. : The somatomedins : a family of insulin-like hormones under growth hormone control, *Rec. Progr. Horm. Res.* 30 : 259~264, 1974.
20. Zapf, J., Schoenle, E., and Froesch, E. R. : Insulin-like growth factors I and II : some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum, *Eur. J. biochem.* 87 : 285~296, 1978.