

인체 골관절염의 관절연골에서 Matrix Metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, Nitrotyrosine 발현과 세포자멸사

진소영 · 강성수¹ · 이동화 · 임수재²
윤여현³ · 이병일²

순천향대학병원 해부병리과
안산중앙병원 정형외과
²순천향대학병원 정형외과
³이화여자대학교 의과대학 정형외과

Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 Nitrotyrosine and Apoptosis in Articular Cartilage of Human Osteoarthritis

So-Young Jin, Seong Su Kang¹, Dong Wha Lee, Soo Jae Yim², Yeo Hon Yun³ and Byung Ill Lee²

Department of Anatomic Pathology, Soonchunhyang University Hospital, Departments of Orthopaedic Surgery, ¹Ansan Jungang Hospital, ²Soonchunhyang University Hospital, and ³Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and 3 are the most important degradating enzymes of the chondroid matrix. Chondrocytes may undergo apoptosis under various stimuli including nitric oxide (NO). We studied the expression rate and zone of MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine, a marker of NO release, and apoptosis in the articular cartilage of human osteoarthritis. **Methods :** To investigate the role of nitrotyrosine and apoptosis in the degradation of the chondroid matrix in human osteoarthritis, immunohistochemistry was done for MMP-1, MMP-3, and nitrotyrosine; and the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method was performed for apoptosis using a total of 93 articular cartilages from 12 femoral heads and 17 knees obtained from total joint arthroplasty and 7 normal articular cartilages. **Results :** In the normal control group, the expression rates for MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine, and apoptosis were very low; and their expression zones were confined to the superficial layer of the articular cartilage. Their expression rates were low in the early stage of osteoarthritis and were moderate to high in the late stage ($p < 0.05$). Their expression zones were confined to the superficial layer of the articular cartilage in the early stage of osteoarthritis and were expressed throughout the whole layer in the late stage and those of MMP-3 and nitrotyrosine were statistically significant ($p < 0.05$). Their expression rates and zones were significantly correlated with the grade of osteoarthritis ($p < 0.05$). **Conclusion :** The expression rate and zone of apoptosis and nitrotyrosine correlated well with those of MMP-1 and MMP-3. Therefore, NO and apoptosis may be related to the progression of human osteoarthritis.

Key Words : Human, Osteoarthritis, Interstitial collagenase, Nitric oxide, Apoptosis

접 수 : 2001년 2월 13일
게재승인 : 2001년 6월 1일

책임저자 : 진 소 영
우 140-743 서울시 용산구 한남동 657-58
순천향대학병원 해부병리과
전화: 02-709-9424
Fax: 02-790-5820
E-mail: jin0924@hosp.sch.ac.kr

서 론

골관절염은 가장 흔한 관절염으로 일반인에게서 60대나 70대가 되면 약 60% 이상에서 이환된다.¹ 골관절염은 일차성 골관절염과 이차성 골관절염으로 나눌 수 있는데 이차성 골관절염은 크게 관절 손상, 연골기질의 이상, 연골하골의 변형 등에 의해 유발되는 것으로 분류할 수 있다. 그러나 아직까지 일차성 골관절염의 정확한 원인 및 병인에 대해서는 알려져 있지 않다. 골

관절염에서 초래되는 관절연골의 가장 기본적인 변화는 연골세포의 대사 이상으로 인해 연골기질의 생성과 분해 사이의 균형이 깨어져서 형성 장애를 초래하는 것이다.²

관절연골은 골 표면을 덮고 있으면서 관절이 움직일 때 골이 서로 맞닿아 생길 수 있는 마찰을 줄여 준다. 관절연골은 세포 성분으로 연골세포가 있으나 극소수이고 거의 대부분(98-99%)은 연골기질로 이루어져 있다. 연골기질의 주성분은 제II형 교원질, 단백당당(protoglycan), 물, 기타 단백, 당단백 등으로 구

성되어 있다.² 골관절염에서는 이러한 성분들이 여러 가지 원인에 의해 분해되는데, 그 중에는 matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), plasmin activator 및 plasmin activator inhibitor 계, cathepsin B 및 D 등 여러 가지 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다.

MMP에는 여러 종류가 있으나 이 중 주된 작용을 하는 것이 MMP-1 (collagenase)과 MMP-3 (stromelysin)이며 MMP에 억제 작용을 하는 것이 TIMP이다. MMP와 그 억제제인 TIMP는 교원질 및 단백당과 같은 세포외기질 성분을 분해시키는 아연 의존성 효소로서 골관절염의 병인에 중요한 역할을 한다.² 최근의 연구 보고에 따르면 관절염의 연골 추출물을 이용한 실험에서 정상에 비해 관절염의 경우 MMP 농도 및 TIMP 농도가 모두 증가하였으나, TIMP의 농도에 비해 MMP의 농도가 훨씬 높게 증가하여 상대적인 MMP의 과다생성이 골관절염에서의 연골분해와 관련이 있다고 한다.³⁻⁵

Blanco 등⁶은 부검 시 얻은 연골세포 배양액에서 nitric oxide (NO)에 노출시켰을 때 세포자멸사(apoptosis)가 초래되었음을 관찰하였으며, Hashimoto 등⁷은 인체 슬관절 관절연골세포의 배양액에서 Fas 항체로 처리한 후 세포자멸사가 일어나는 것을 유세포측정기와 전자현미경으로 확인하였다. Farrell 등⁸은 골관절염과 류마티드 관절염 환자의 활액 내에서 고농도의 NO를 검출하였으며, Amin 등^{9,10}은 골관절염 시 연골은 특정한 자극이 없어도 자연적으로 NO를 생성할 수 있다고 하였다. 이와 같은 NO는 활막에서도 생성되지만 주된 기원은 연골세포이다.^{11,12}

NO는 골관절염 연골세포 배양액 내에서 연골세포의 교원질과 단백당의 합성을 억제시키고 세포자멸사를 증가시킨다고 하였으며,¹⁰ 인체¹³와 실험동물¹³⁻¹⁵로부터 얻은 연골조직에서는 NO의 농도에 비례하여 MMP 생성을 촉진하였다고 하였다. 그러나 NO는 반감기가 몇 초밖에 되지 않으므로 인체 내에서 불안정하여 검출이 용이하지 않으나, nitrotyrosine이라는 안정된 대사물로 변환되어 쉽게 검출할 수 있기 때문에 이를 NO와 과산화물 라디칼의 표지자로 이용할 수 있다.¹⁶

Hashimoto 등¹⁷은 토끼의 전십자인대를 절단하여 유발시킨 골관절염에서 NO 생성의 표지자인 nitrotyrosine 발현 정도와 세포자멸사가 관련 있음을 밝혔다. 그러므로 골관절염에서 연골기질 분해와 직접적으로 관련 있는 MMP 생성의 변화를 NO 및 세포자멸사의 변화와 비교하여 본다면, 골관절염에서의 NO와 세포자멸사의 역할을 간접적으로 추정할 수 있으리라 생각한다. 최근 세포자멸사 및 NO에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 대부분의 연구가 동물실험 또는 연골세포배양을 이용한 연구이며, 인체의 골관절염 관절연골 조직에서 세포자멸사 및 NO 발현을 관찰한 연구는 없다. 또한 인체의 골관절염 관절연골을 이용하여 MMP^{18,19} 또는 TIMP¹⁸의 변화를 관절연골의 층에 따라 조사한 연구는 있으나 MMP의 변화와 세포자멸사 및 NO 변화와의 상관성을 조사한 연구는 없다.

따라서 본 연구자는 인체의 골관절염의 관절연골에서 골관절

염의 등급에 따라 MMP-1, MMP-3의 발현을 및 발현 부위를 조사하고 이러한 변화와 nitrotyrosine 및 세포자멸사의 발현을 및 발현 부위를 비교하여, 인체 골관절염의 진행에 nitrotyrosine 축적과 세포자멸사가 미치는 역할을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

연구대상

고관절치환술을 시행한 12명의 환자로부터 얻은 대퇴골두 12예 및 슬관절치환술을 시행한 15명의 환자로부터 얻은 슬관절 조직 17예(2명은 양측 치환술을 시행)를 연구대상으로 하였다. 슬관절연골 관절연골은 한 환자로부터 대퇴골 및 경골의 내측 및 외측 관절면을 포함하여 육안적으로 골관절염의 정도가 다른 3-4 부위를 채취하여 총 93예를 검색하였다. 대조군은 교통사고로 하지절단 시 얻은 36세 남자의 관절연골 1예와 관절치환술 시 육안적으로 정상인 관절연골 부위를 채취해 조직 표본을 만들어 조직학적으로 정상임을 확인한 6예로 총 7예를 사용하였다(Fig. 1). 육안으로 정상 연골처럼 보였더라도 조직학적으로 이상이 있으면 대조군에서 제외하였다. 각 예당 3-4개의 표본을 채취한 뒤 가장 대표적인 표본 1개씩을 선택하여 골관절염군 관절연골과 동일한 염색을 시행하였다.

골관절염 환자의 남녀비는 1:2였으며 평균 연령은 60.5세(44-84세)였다.

연구방법

광학현미경적 소견

관절연골조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 5% 질산용액에서 1-2일간 탈회한 다음 파라핀에 포매하여 실험에 사용하였다.

파라핀 블록을 4 μ m로 박절하여 연속절편을 얻은 뒤 1장은 HE 염색을 시행하여 관절연골의 광학현미경적 소견을 관찰하고, 1장은 safranin O 염색을 시행하여 연골기질의 이염색이나 분해 정도를 관찰하여 골관절염의 정도를 변형된 Mankin의 등급체계¹⁹에 따라 점수화한 후(Table 1), 총 점수에 따라 골관절염 정도를 1등급부터 4등급까지 네 등급으로 나누었다.

면역조직화학염색

MMP-1 및 MMP-3 염색

파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 연속 박절하여 얻은 조직을 probe on plus 슬라이드(Fisher, U.S.A.)에 부착하여 실험에 사용하였다. 오븐에서 일부 파라핀을 녹인 후 xylene으

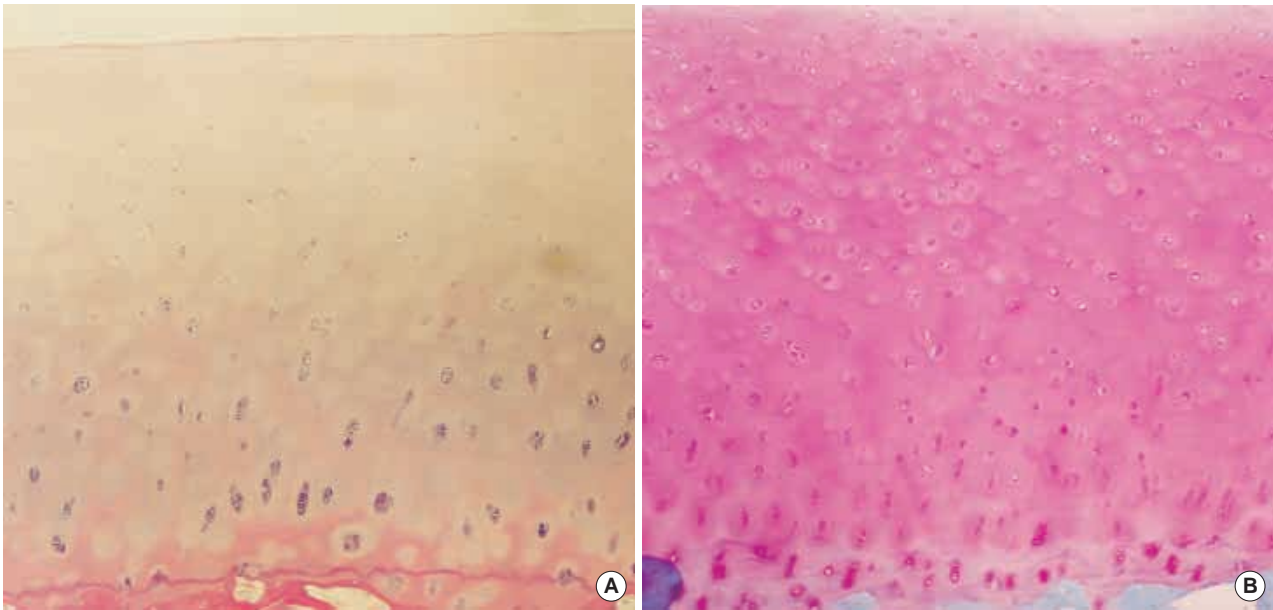


Fig. 1. Microscopic findings of normal articular cartilage: Intact surface and ordered arrangement of cartilage columns is seen with preserved chondroid matrix (A, HE; B, safranin O).

로 파라핀을 완전히 제거하였다. 계열 알코올로 흡수시킨 후 조직 내 항원의 재현성을 높이기 위하여 retrieve-all buffer 용액 (Signet, MA, U.S.A.)에 넣고 마이크로웨이브 오븐(Pelco, U.S.A.)로 온도를 90°C로 일정하게 유지시켜 10분간 처리하였

다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화 수소용액에서 10분간 처리하고 PBS 완충액으로 세척하였다. 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 3% 정상 면양 혈청으로 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 가볍게 턴 후 일차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차 항체로는 anti-human mouse monoclonal MMP-1 antibody (Oncogene, MA, U.S.A.) 및 anti-human mouse monoclonal MMP-3 antibody (Oncogene, MA, U.S.A.)를 각각 1:100으로 희석하여 사용하였다. PBS 완충액으로 세척한 후 이차 항체인 streptavidin biotin complex를 떨어뜨려 15분간 상온에서 반응시킨 후 PBS 완충액으로 세척하였다. 이후 streptavidin peroxidase를 가하여 15분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하였다. 발색은 amino-ethyl carbazole (AEC)로 3-5분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하여 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 Crystal mount®(Biomedica, CA, U.S.A.)로 봉입하였다. 양성 대조 표본은 유방암 및 류마티드성 관절염 조직을 사용하였으며 음성 대조표본은 일차 항체 대신 PBS 완충액으로 대체하여 염색하였다. 염색 표본을 검색하여 양성인 연골세포가 0%이면 음성, 1-30%이면 경도, 31-50%이면 중등도, 50% 이상이면 고도로 등급을 나누었으며 경도는 1점, 중등도는 2점, 고도는 3점으로 표시하였다.

Table 1. Histologic/histochemical grading of osteoarthritis*

Category	Score [†]
Structure	
Normal	0
Surface irregularities	1
Pannus and surface irregularities	2
Clefts to transitional zone	3
Clefts to radial zone	4
Clefts to calcified zone	5
Complete disorganization	6
Cells	
Normal	0
Diffuse hypercellularity	1
Cloning	2
Hypocellularity	3
Safranin O staining	
Normal	0
Slight reduction	1
Moderate reduction	2
Severe reduction	3
No dye noted	4
Total	0-13

*: Modified from Mankin's grading system¹⁹ for osteoarthritic articular cartilage; [†]: Osteoarthritis grade 1: sum of score 1-4

grade 2: 5-7

grade 3: 8-10

grade 4: 11-13

Nitrotyrosine 염색

파라핀 블록을 4 μm의 두께로 박절한 후 크실렌으로 파라핀을 제거하고 일련의 계열 알코올로 흡수하여 사용하였다. 고정과 파라핀 포매과정 중에 감추어져 있을 항원을 노출시키기 위

Table 2. Expression rate of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, nitrotyrosine, and apoptosis in the articular cartilage of osteoarthritis

Grade of osteoarthritis	MMP-1*			MMP-3*			Nitrotyrosine*			Apoptosis*						
	Exp. rate (%)	Grade [†]			Exp. rate (%)	Grade [†]			Exp. rate (%)	Grade [†]						
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
0 (n=7)	14.3	1	0	0	14.3	1	0	0	28.6	1	1	0	28.6	2	0	0
1 (n=32)	53.1	15	2	0	53.1	16	1	0	62.5	14	6	0	53.1	14	3	0
2 (n=20)	80.0	11	4	1	50.0	8	2	0	70.0	5	8	1	55.0	5	5	1
3 (n=25)	84.0	8	6	7	88.0	11	5	6	84.0	5	10	6	80.0	7	6	7
4 (n=16)	100.0	5	5	6	93.8	7	5	3	100.0	4	5	7	87.5	5	4	5

*: $p < 0.05$; †: Criteria of grading. 1 (mild)=1-30%, 2 (moderate)=31-50%, 3 (severe)=>51%; ‡: Criteria of grading. 1 (mild)=6-30%, 2 (moderate)=31-60%, 3 (severe)=>61%. Exp. rate: Overall expression rate.

해 염색 전에 retrieve-all buffer 용액에서 10분간 90°C를 유지시켜 가열하였다. 일차 항체로는 anti-human mouse polyclonal α -nitrotyrosine[®] (Upstate biotechnology, New York, U.S.A.)을 5-10 μ g/mL 농도로 희석하여 사용하였으며 약 2시간 이상 실온에서 반응시켰다. AEC로 발색하였으며 Mayer's hematoxylin으로 1초간 약하게 대조염색을 시행한 후 Crystal mount[®]로 봉입하여 관찰하였다. 양성 대조표본은 급성 간질성 폐렴 폐조직 및 급성 충수돌기염 조직을 이용하였으며 음성 대조표본은 일차 항체 대신 PBS 완충액으로 대체하여 염색하였다. 연골세포 및 연골기질에 갈색으로 염색되는 경우 양성으로 해석하였다. 염색된 부위가 없거나 양성으로 염색된 부위가 5% 미만이면 음성으로 해석하였다. 5% 이상 염색된 경우 염색된 정도에 따라 6-30% 미만이면 경도, 30-60%이면 중등도, 60% 이상이면 고도로 나누었으며 경도를 1점, 중등도를 2점, 고도를 3점으로 표시하였다.

세포자멸사 염색

세포자멸사를 관찰하기 위해 파라핀 블록을 4 μ m의 두께로 박절한 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 계열 알코올로 함수하였다. Proteinase K로 37°C에서 15분간 처리한 다음 증류수로 함수한 후, 내인성 과산화효소 활성을 제거하기 위해 3% 과산화수소용액으로 10분간 처리하여 증류수로 함수하여 PBS 완충액으로 세척하였다. 다음의 과정은 ApoTag[®] Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen, NY, U.S.A.)로 실험하였다. 약 15분간 이가 양이온(Cr^{++})을 포함한 equilibration buffer로 전처리한 후 TdT 혼합용액을 슬라이드당 55 μ L 씩 분주하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 그 다음 Stop buffer로 15분간 효소작용을 비활성화시킨 후 PBS 완충액으로 세척하였다. 약 30분간 degoxigenin conjugate 용액과 반응시킨 후 PBS 완충액으로 세척하고 diethyl aminobenzidine (DAB)으로 발색하였다. 대조염색은 methyl green으로 약하게 염색하고 Crystal mount[®]로 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 양성 대조표본은 편도선 조직을 사용하였으며 음성 대조표본은 TdT 혼합용액 대신 equilibration buffer로 대체하여 사용하였

다. 양성으로 염색된 연골세포가 전체 연골세포 중 0%이면 음성, 1-30%이면 경도, 31-50%이면 중등도, 50% 이상이면 고도로 등급을 나누었으며 경도는 1점, 중등도는 2점, 고도는 3점으로 표시하였다.

통계학적 분석

통계처리는 카이제곱 검정을 이용하였으며 p 값은 0.05 미만일 때 유의한 것으로 평가하였다.

결 과

MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine 발현율과 세포자멸사

(Table 2)

MMP-1

골관절염의 등급에 따른 MMP-1에 대한 연골세포의 발현율은 정상 관절연골군은 7예 중 1예(14.3%)만이 경도의 양성 반응을 보였다. 골관절염 1등급군에서는 전체적인 발현율이 53.1% (17/32)로서 발현을 한 17예 중 15예가 경도로 발현하였으며, 골관절염 2등급군에서는 발현율이 80.0%로 증가하였으나 20예 중 11예가 경도였다. 골관절염 3등급군은 발현율이 84.0% (21/25)였으며 발현을 한 21예 중 6예가 중등도, 7예가 고도였다. 골관절염 4등급군에서는 16예 전 예에서 양성이었으며 5예가 경도, 5예가 중등도, 6예가 고도였다. 관절염의 초기에는 발현율이 낮고 경도로 발현하다가 골관절염이 진행함에 따라 의의 있게 발현율이 증가하고 중등도 및 고도로 발현하였다 ($p < 0.05$).

MMP-3

골관절염의 등급에 따른 MMP-3에 대한 발현율은 정상 관절연골군에서는 7예 중 1예(14.3%)에서만 표층의 소수의 연골세포에 경도로 발현하였다. 골관절염 1등급군에서는 전체적인 발

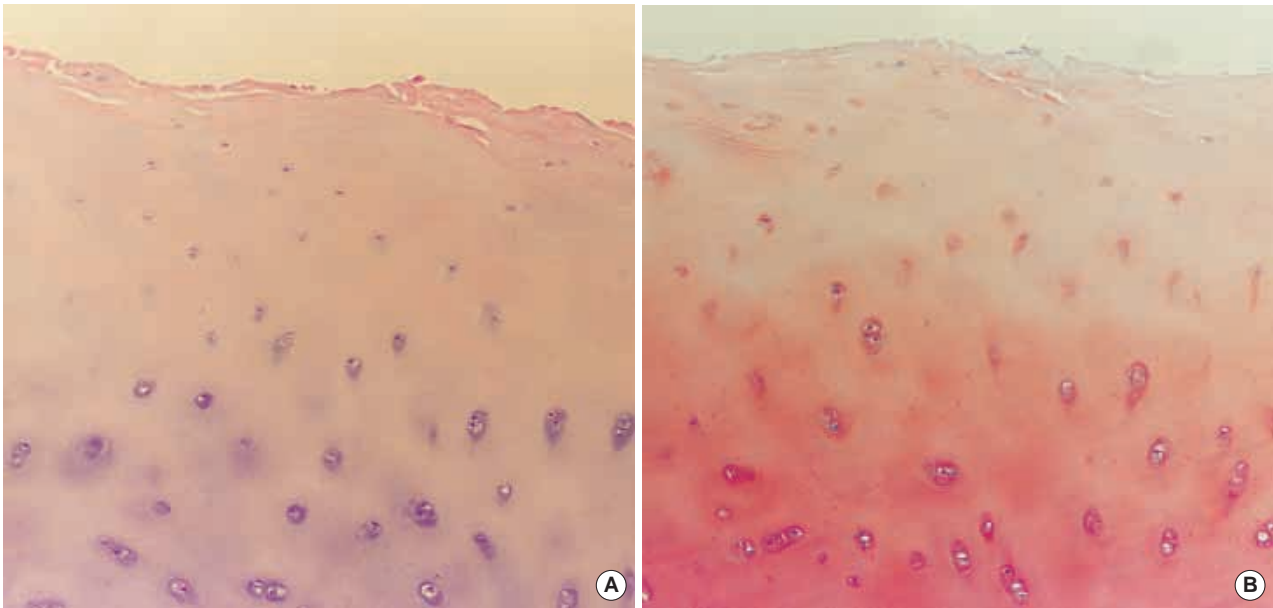


Fig. 2. Microscopic findings of articular cartilage in the early stage of osteoarthritis: Surface irregularity and fibrillation is seen (A: HE) with slight reduction of chondroid matrix (B: safranin O).

현율이 53.1% (17/32)로서 발현을 한 17예 중 16예가 경도로 발현하였다. 골관절염 2등급군에서는 발현율이 50.0% (10/20)로서 발현을 한 10예 중 8예가 경도로 발현하였다. 골관절염 3등급군에서는 발현율이 88.0% (22/25)로서 발현을 한 22예 중 11예가 경도, 5예가 중등도, 6예가 고도였다. 골관절염 4등급군에서는 발현율이 93.8% (15/16)로서 발현을 한 16예 중 7예가 경도, 5예가 중등도, 3예가 고도였다. 골관절염의 초기에는 경도로 발현하다가 골관절염의 정도가 심해짐에 따라 발현율도 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$).

Nitrotyrosine

골관절염의 등급에 따른 nitrotyrosine의 발현율의 차이는 정상 관절연골군은 14.3% (1/7)에서 경도, 14.3% (1/7)에서 중등도로 발현하였다. 골관절염 1등급군에서는 발현율이 62.5% (20/32)였으며 발현을 한 20예 중 14예가 경도인 반면, 골관절염 2등급군에서는 발현율이 70.0% (14/20)였으며 발현을 한 14예 중 8예가 중등도였다. 골관절염 3등급군에서는 발현율이 84.0% (21/25)로서 발현을 한 21예 중 10예가 중등도, 6예가 고도였으며, 골관절염 4등급군에서는 16예 모두 발현하였으며 이중 5예가 중등도, 7예가 고도였다. 골관절염의 초기에는 발현율이 낮고 경도로 발현하다가 골관절염이 진행함에 따라 중등도 및 고도로 발현율이 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$).

세포자멸사

골관절염 등급에 따른 세포자멸사 양성률은 정상 관절연골군에서는 28.6% (2/7)에서 약하게 소수의 연골세포 핵에 양성인

었다. 골관절염 1등급군에서는 53.1% (17/32)에서 양성이었으며 양성인 17예 중 14예가 경도였다. 골관절염 2등급군에서는 양성률이 55.0% (11/20)로서 양성인 11예 중 5예가 경도, 5예가 중등도였다. 골관절염 3등급군에서는 양성률이 80.0% (20/25)로 양성인 20예 중 7예가 경도, 6예가 중등도, 7예가 고도였다. 골관절염 4등급군에서는 양성률이 87.5% (14/16)로 양성인 14예 중 5예가 경도, 4예가 중등도, 5예가 고도였다. 골관절염의 정도가 증가할수록 세포자멸사 양성률은 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$).

MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine 및 세포자멸사의 발현 부위 (Table 3)

MMP-1

골관절염의 등급에 따른 MMP-1의 발현 부위는 정상 관절연골군에서는 소수의 연골세포가 표층에서만 양성으로 염색되었

Table 3. Expression zone of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, nitrotyrosine and apoptosis in the articular cartilage of osteoarthritis

Grade of osteoarthritis	MMP-1*		MMP-3		Nitrotyrosine*		Apoptosis	
	S	W (%)	S	W (%)	S	W (%)	S	W (%)
0	1	0	1	0	2	0	2	0
1	15	2 (11.8)	13	4 (23.5)	19	1 (5.0)	15	2 (11.8)
2	7	9 (56.2)	6	4 (40.0)	9	5 (35.7)	7	4 (36.4)
3	10	11 (52.4)	10	12 (54.5)	10	11 (52.4)	10	10 (50.0)
4	3	13 (81.3)	4	11 (73.3)	2	14 (87.5)	4	10 (71.4)

S: Superficial zone; W: Whole zone. *: $p < 0.05$.

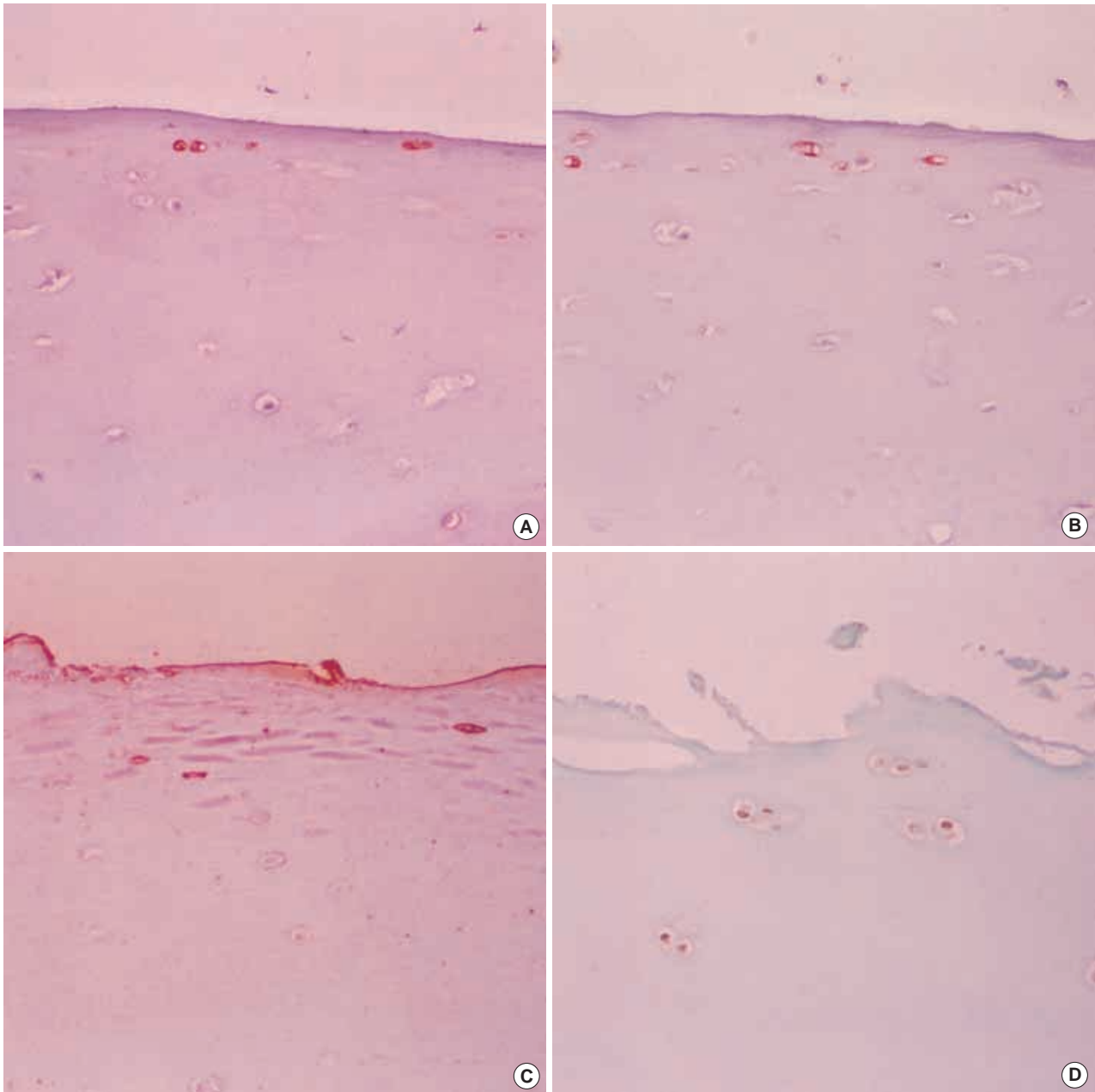


Fig. 3. Immunohistochemical findings of articular cartilage in the early stage of osteoarthritis: A few positive condrocytes are noted in the superficial layer for matrix metalloproteinase (MMP)-1 (A: ABC), MMP-3 (B: ABC), nitrotyrosine (C: ABC), and apoptosis (D: TUNEL). ABC: avidin-biotin complex method, TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling method.

다. 골관절염 1등급군에서는 88.2% (15/17)가 표층에서 발현하였으며, 골관절염 2등급군에서는 43.8% (7/16)가 표층에서 발현한 반면 56.2% (9/16)는 표층부터 심층까지 발현하였다. 골관절염 3등급군은 47.6% (10/21)가 표층에서 발현하였으며 52.4% (11/21)가 전 층에서 발현하였다. 골관절염 4등급군에서는 81.3% (13/16)가 전 층에서 발현하였다. 골관절염의 초기에는 표층에서 발현하다가 골관절염의 정도가 심해질수록 전 층에

서 발현하였으며 통계학적으로 유의성이 있었다($p < 0.05$) (Fig. 2-5).

MMP-3

골관절염의 등급에 따른 MMP-3의 발현 부위는 정상 연골군 1예에서는 표층에 국한하여 발현하였다. 골관절염 1등급군에서는 76.5% (13/17)가 표층에 국한하여 발현하였으며 골관절염 2등

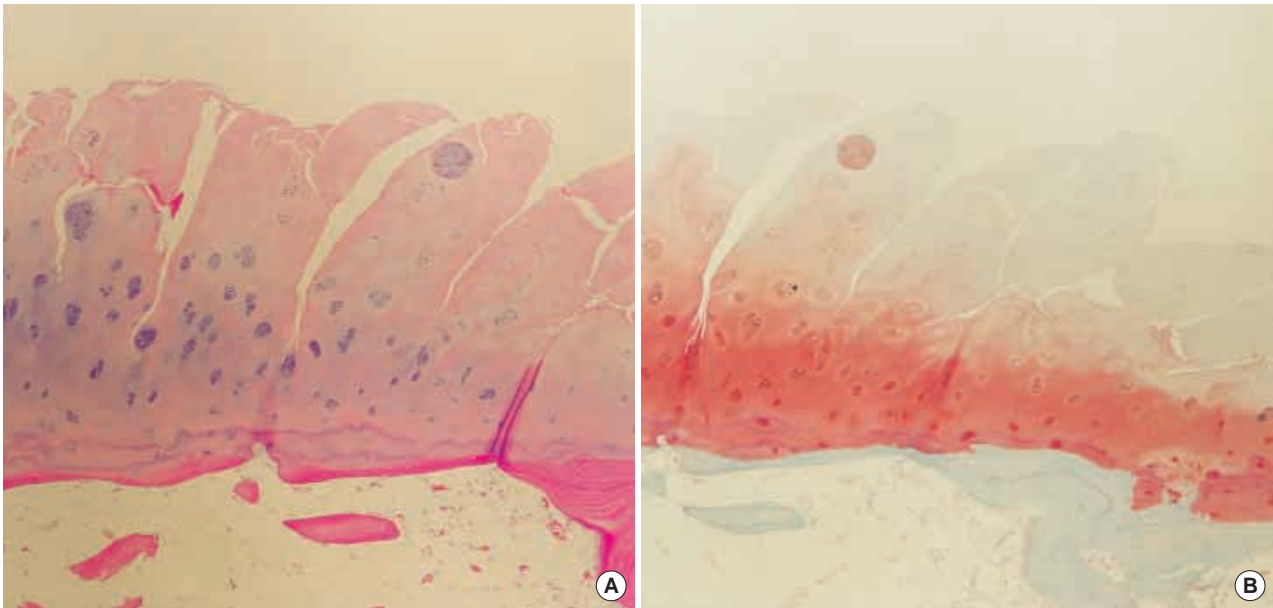


Fig. 4. Microscopic findings of articular cartilage in the late stage of osteoarthritis: Fissuring and loss of articular cartilage is seen (A: HE) with marked reduction of chondroid matrix (B: safranin O).

급군에서는 60.0% (6/10)가 표층에서 발현하였고 40% (4/10)에서는 표층부터 심층까지 전 층에서 발현하였다. 골관절염 3등급군에서는 45.5% (10/22)가 표층에서 발현하였으며 54.5% (12/22)가 전 층에서 발현하였다. 골관절염 4등급군에서는 73.3% (11/15)가 전 층에서 발현하였다. 골관절염의 초기에는 표층에 국한하다가 골관절염의 정도가 심해짐에 따라 발현 부위가 전 층으로 발현이 증가하는 경향이 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(Fig. 2-5).

Nitrotyrosine

골관절염의 등급에 따른 nitrotyrosine 발현 부위는 정상 관절연골군에서는 2예 모두 표층에서 약하게 발현하였다. 골관절염 1등급군에서는 95.0% (19/20)가 표층에 국한하여 발현한 반면 골관절염 2등급군에서는 64.3% (9/14)가 표층에서 발현하였으나 35.7% (5/14)는 표층부터 심층까지 전 층에서 발현하였다. 골관절염 3등급군에서는 47.6% (10/21)가 표층에서, 52.4% (11/21)가 전 층에서 발현하여 표층과 전 층에서 유사하게 발현한 반면 골관절염 4등급군에서는 87.5% (14/16)가 전 층에서 발현하였다. 골관절염의 초기에는 발현이 표층에 국한하다가 골관절염이 진행함에 따라 전 층에서 발현하였으며 통계학적으로 유의성이 있었다($p < 0.05$) (Fig. 2-5).

세포자멸사

골관절염 등급에 따른 세포자멸사 발현 부위는 정상 관절연골군에서는 표층에만 국한하였다. 골관절염 1등급군에서는 88.2% (15/17)가 주로 표층에 국한하였으나 골관절염 2등급군에서는

63.6% (7/11)가 표층에서 양성이었다. 골관절염 3등급군에서는 발현한 20예 중 10예는 표층에 국한하였으나 10예는 표층부터 심층까지 전층에서 양성이었으며, 골관절염 4등급군에서는 71.4% (10/14)가 전층에서 양성이었다. 골관절염의 초기에는 표층에서 발현한 반면 골관절염이 진행함에 따라 전 층에서 세포자멸사 양성 세포를 관찰할 수 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(Fig. 2-5).

MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine 발현 및 세포자멸사의 상관관계

골관절염의 정도가 심해짐에 따라 MMP-1 및 MMP-3의 발현율과 nitrotyrosine 발현율 및 세포자멸사 양성률은 비례하여 증가하였다. 발현 부위도 MMP-1와 MMP-3가 골관절염 초기에는 표층에 국한하여 발현하였으나 골관절염이 진행함에 따라 전 층에 걸쳐 발현하였다. 이러한 소견은 nitrotyrosine 발현 부위 및 세포자멸사 양성 부위의 변화와 서로 의미있는 상관성이 있었다($p < 0.05$).

고찰

MMP는 정상적으로 성장 시 또는 골손상 후 수복 시 재형성에 관여하는 효소이나, 관절염에서는 염증 반응에 의한 관절의 파괴에 관여한다.² MMP-1은 주로 교원질을 분해시키며, MMP-3은 단백다당을 분해시키고 잠재성 MMP-1을 활성화시

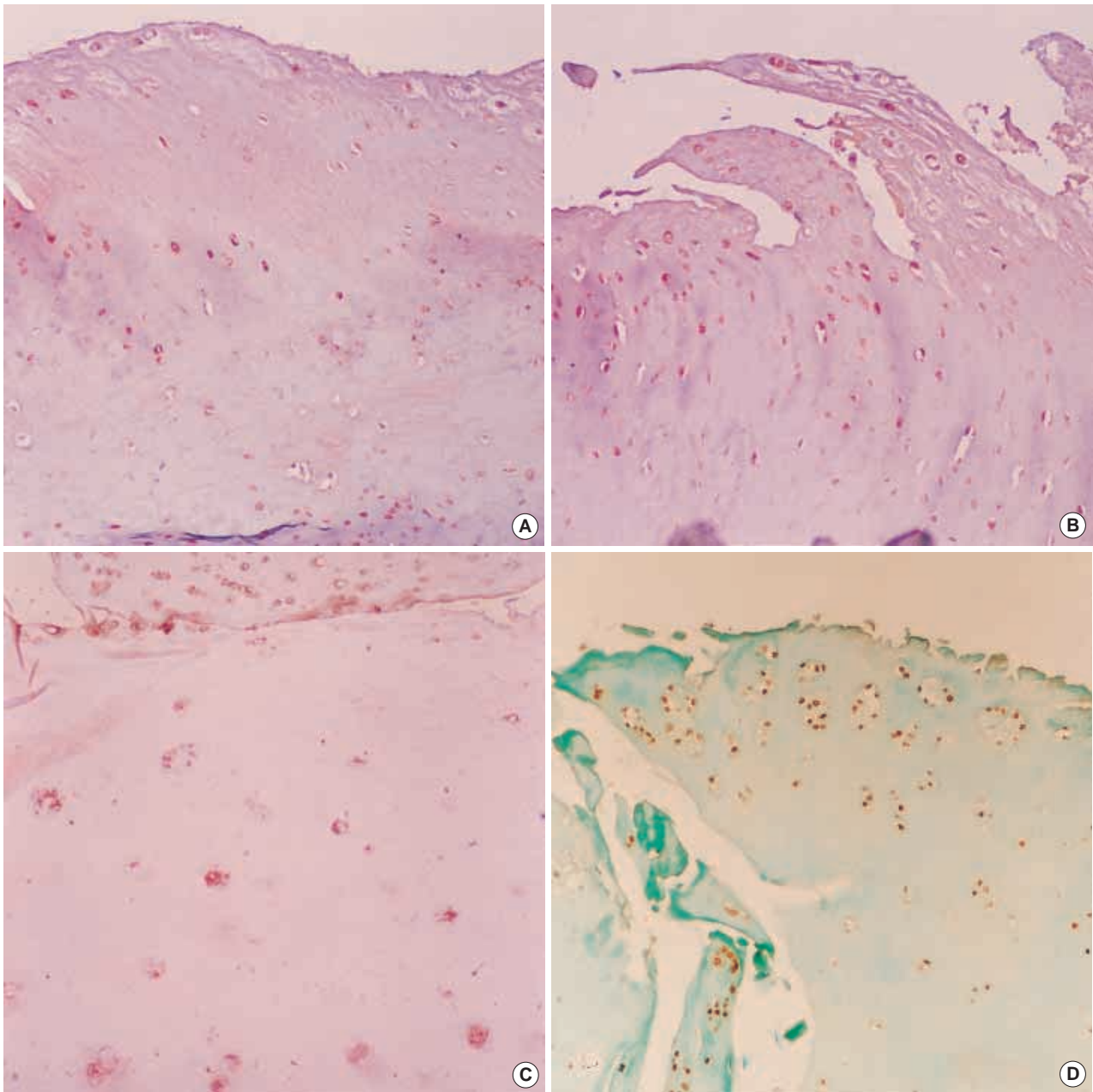


Fig. 5. Immunohistochemical findings of articular cartilage in the late stage of osteoarthritis: A number of positive chondrocytes are noted throughout the whole layer for matrix metalloproteinase (MMP)-1 (A: ABC), MMP-3 (B: ABC), nitrotyrosine (C: ABC), and apoptosis (D: TUNEL). ABC: avidin-biotin complex method, TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling method.

김으로써 교원질과 단백다당을 분해시켜 관절연골 연골기질의 원섬유화(fibrillation), 미란, 균열을 초래한다. 이와같이 골관절염 시 MMP 생성은 매우 증가하는 데 반해 TIMP는 적게 증가함으로써 상대적인 MMP의 과다생성으로 인해 정상적인 균형이 깨어지게 된다.^{4,5} 본 연구에서 MMP-1 및 MMP-3의 발현율을 보면 관절염의 초기에는 소수 세포들이 발현한 반면 골관절염의 정도가 심해질수록 골관절염의 정도와 비례하여 발현

율이 증가함을 볼 수 있었다($p < 0.05$). Pelletier 등²¹은 골관절염 시 MMP-3이 정상보다 증가하였으며 이러한 증가 정도는 연골 손상의 정도와 비례하였다고 하였다. Okada 등²²도 관절연골 및 활막 모두에서 골관절염의 정도가 심할수록 MMP-3이 증가하였다고 하여 본 연구결과와 일치하였다.

본 연구에서 MMP-1과 MMP-3의 발현 부위를 보면 관절염 초기에는 표층에 국한하여 나타나다가 관절염의 정도가 심해질

수록 전 층으로 발현이 확대되었다. 관절연골에서의 MMP의 발현 부위를 연구한 보고에 따르면 Pelletier 등²¹은 관절연골의 전 층에서 강하게 염색되었다고 하였다. 그러나 Walter 등¹⁸은 MMP-1과 MMP-3 및 TIMP-1이 내측 관절면의 표층에서 강하게 염색되었다고 하면서 골관절염 초기에는 Mankin 등²⁰의 단순한 조직형태학적 등급보다는 연골 손상 정도를 알 수 있는 연골기질 분해효소의 염색 정도를 추가한 등급체계가 더 정확하다고 하였다. Freemont 등¹⁹은 MMP-1, 3 및 9에 대한 in situ hybridization 연구에서 정상일 경우 MMP 신호 강도가 없었으나 골관절염 관절연골에서는 MMP-1 유전자가 표층에서 가장 강하게 발현하였으며 MMP-3 및 MMP-9 mRNA는 심층에서 발현하였다고 하였다. 또한 MMP-9는 이차성 관절염 초기에 발현하고 MMP-3은 관절염 초기와 말기에 모두 발현이 증가하였으며 말기에 좀 더 발현이 강하였다고 하였다. 본 연구 결과는 Walter 등¹⁸ 결과와 유사하였는데 이와 같이 연구자마다 관찰 결과가 다른 것은 서로 다른 시기의 관절염을 대상으로 연구한 때문이라고 생각한다.

NO가 인체에 미치는 독성은 과산화물과 반응하여 생성한 강력한 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)가 지질 과산화작용, 단백질의 sulfhydryl oxidation, 방향성 아미노산에 대한 니트르화를 초래하여 나타나며, 세포배양 실험이나²³ 실험동물을 이용한 연구에서²⁴ 모두 세포독성이 있다고 알려져 있다. Hayashi 등²⁵은 관절연골의 표층 즉 활액과 접하는 경계부에 위치한 세포는 여러 자극 및 염증성 관절질환에 가장 먼저 노출이 되는 부위이므로 표층과 심층은 NO 생성, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 활성도 등의 차이가 있다고 하였다. 표층과 심층의 차이는 통상적인 활액 연구나 조직배양 연구로는 부위별 차이를 정확히 알 수 없으며 조직구조학적 연구를 통해서만 알 수 있다. 인체 골관절염 관절연골의 조직표본을 이용한 본 연구에서는, 관절염 초기에는 nitrotyrosine이 표층에 국한하여 소수의 연골세포에서 발현한 반면 골관절염의 등급이 높아질수록 전층에 걸쳐 발현하였다. 실험동물²⁶ 및 세포배양 실험²⁵ 결과에 따르면 표층 연골세포가 심층보다 NO 생성을 많이 한다고 하여 본 연구 결과와 동물이나 세포배양을 이용한 실험 결과는 동일하였다.

연골은 여러 가지 자극에 의해 세포자멸사가 일어날 수 있다.^{6,7} 그러나 연골은 혈관이 없는 조직이므로 단핵성 탐식구도 없어서 세포자멸사체를 제거할 뚜렷한 기전이 없다. 따라서 세포자멸사가 유발되면 세포자멸사체가 그대로 남아 기질 성분을 분해시키는 것으로 알려져 있다.²⁶ 본 연구에서는 수는 적었으나 정상에서도 관절연골 표층에 국한하여 세포자멸사를 관찰할 수 있었으며 골관절염군에서는 골관절염의 등급이 높아질수록 세포자멸사율도 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$). 또한 골관절염 초기에는 표층에 국한하였으나 골관절염 등급이 높아질수록 표층 외에도 심층에서도 나타나 관절연골의 전 층에서 세포자멸사를 관찰할 수 있었고, 특히 연골세포가 군집을 형성한 부위에서 더욱 잘 관찰할 수 있었다. Hashimoto 등²⁶은 토끼의 전십자인대를

절단하여 유발한 실험적 골관절염 연구에서 활막뿐 아니라 관절연골의 tidemark 인접 부위 및 열공 내 증식하고 있는 연골세포에서도 세포자멸사를 관찰하였다고 하였다.

본 연구에서 nitrotyrosine 발현율과 세포자멸사율은 골관절염의 등급이 높아질수록 서로 비례하여 증가하였으며, 발현 부위도 초기에는 소수의 세포들이 표층에서 주로 발현하다가 골관절염이 진행할수록 다수의 세포들이 표층부터 심층까지 연골 전 층에서 발현하였다. Hashimoto 등²⁶은 토끼의 전십자인대를 절단하여 유발한 실험적 골관절염에서 세포자멸사와 nitrotyrosine 축적을 보고하였는데, 연골 손상 후 초기부터 연골세포에서 세포자멸사와 NO 생성을 관찰할 수 있으며 그 정도는 연골과괴 정도와 비례하였다고 하였다. 이들은 실험적 골관절염으로부터 얻은 조직 배양에서도 정상보다 고농도의 nitrite를 얻었으며 NO 생성과 비례하여 nitrotyrosine이 축적되었다고 하였다. 또한 Kaur와 Halliwell²⁷도 류마티드 관절염 환자로부터 얻은 혈청과 활액을 이용한 실험에서 세포자멸사 정도와 비례하여 nitrotyrosine 축적을 관찰할 수 있었다고 하여 이들의 연구 결과와 본 연구 결과는 유사하였다.

본 연구에서 nitrotyrosine 및 세포자멸사의 발현율과 발현 부위를 MMP-1 및 MMP-3의 발현율 및 발현 부위와 비교해 보면, MMP-1, MMP-3, nitrotyrosine, 세포자멸사 모두 관절염 초기에는 소수의 세포가 표층에서 발현한 반면 골관절염이 진행함에 따라 다수의 연골세포가 연골의 전 층에 걸쳐 발현하여 관절염의 등급이 높아질수록 발현율의 증가도 비례하였으며 발현 부위도 일치함을 알 수 있었다($p < 0.05$). Tanaka 등²⁸도 토끼의 전십자인대를 절단하여 실험적으로 유발한 골관절염에서 연골세포가 소실되면 주변 연골 기질이 파괴되고 superoxide anion과 NO 합성이 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 이들은 또한 인체 골관절염의 관절연골 조직추출물에서 MMP-3은 증가하고 TIMP-1 mRNA가 감소된 것을 Northern blot으로 확인하였다.

골관절염의 관절연골 연골세포에서 세포자멸사가 먼저 일어나 nitrotyrosine을 유리하는지 또는 nitrotyrosine이 먼저 축적되어 연골세포의 세포자멸사를 유발하는지에 관해서는 논란이 있으며,^{6,7,17,26} 실험동물에서 유발한 실험적 골관절염에서는 nitrotyrosine이 유리되어 연골세포의 세포자멸사를 유발한다는 의견이 있으나 아직 확실하지 않다. 본 연구 결과로 세포자멸사와 nitrotyrosine이 밀접한 관련이 있으리라는 추측할 수 있으나, 세포자멸사 유발과 nitrotyrosine 축적 중 어느 것이 먼저 시작되어 연골세포로부터 MMP-1 및 MMP-3의 생성을 증가시켜 연골기질의 분해가 일어나는지는 본 연구 결과로는 알 수 없었다. 이러한 인과관계는 골관절염의 초기부터 연속적으로 연골조직을 얻어 시기에 따른 변화를 관찰해야 알 수 있으리라 생각한다. 그러나 인체 골관절염의 초기 연골조직을 얻는 것이 현실적으로 어려워 본 연구자는 관절전치환술로 얻은 관절연골로 연구하였기 때문에 골관절염의 초기 관절연골 조직은 얻지 못하여 본 연구에 한계점이 있다고 생각한다. 그러나 인체 관절연골

을 이용한 타 연구들^{17,19,25}도 슬관절전치환술에서 얻은 조직으로 연구를 하였다.

골관절염에서 NO 생성을 억제시켜 골관절염에 미치는 영향을 연구한 보고에 따르면 NO 합성 억제물질인 N-iminoethyl-L-Lysine (L-NIL)을 첨가함으로써 실험적 골관절염에서 MMP 및 IL-1 생성뿐만 아니라 연골 병변의 진행도 줄일 수 있었다고 하였다.^{29,30} Tanaka 등²⁸은 연골손상 후 연골막으로 국소적인 연골 결손 부위를 덮어주어 superoxide anion과 NO 생성을 억제시켰다고 하였다. 따라서 앞으로 골관절염 초기에 NO 생성을 억제시킬 수 있는 방법을 개발하여 인체에 적용시킨다면 골관절염을 예방하거나 진행을 지연시킬 수 있으리라고 하였다.²⁸⁻³⁰

본 연구 결과를 요약하면 인체의 골관절염에서 골관절염의 등급이 높아질수록 MMP-1 및 MMP-3의 발현율이 증가하고 표층에서 전 층으로 발현 부위가 확대되었으며, 이러한 변화는 nitrotyrosine 및 세포자멸사 발현율과 발현 부위와 비례하는 의미 있는 상관관계가 있는 것으로 생각되고 nitrotyrosine 축적과 세포자멸사의 증가는 골관절염의 진행과 관련이 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구과정중 연골조직의 면역조직화학염색과 TUNEL 염색에 도움을 준 김미선 수석병리사에게 감사드립니다.

참고문헌

- Felson D. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 1988; 10: 1-28.
- Kraus VB. Pathogenesis and treatment of osteoarthritis. *Med Clinics North Am* 1997; 81: 85-112.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994; 70: 807-15.
- Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 1991; 27(Suppl): 99-101.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritis cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-85.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75-85.
- Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1749-55.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219-22.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, *et al*. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995; 182: 2097-102.
- Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1988; 10: 263-8.
- Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 398-405.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, *et al*. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147: 3915-20.
- Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 15-21.
- Stefanovic-Racic M, Morales TI, Taskiran D, McIntyre LA, Evans CH. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ culture. *J Immunol* 1996; 156: 1213-20.
- Stefanovic-Racic M, Mollers MO, Miller LA, Evans CH. Nitric oxide and proteoglycan turnover in rabbit articular cartilage. *J Orthop Res* 1997; 15: 442-9.
- Kennedy LJ, Moore K Jr, Caulfield JL, Tannenbaum SR, Dedon PC. Quantification of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 386-92.
- Hashimoto S, Takahashi K, Ochs RL, Coutts RD, Amiel D, Lotz M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2123-31.
- Walter H, Kawashima A, Nebelung W, Neumann W, Roessner A. Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation. *Pathol Res Pract* 1988; 194: 73-81.
- Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 542-9.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 1971; 53A: 523-37.

21. Pelletier JP, Faure MP, Di Battista JA, Wilhelm S, Visco D, Mantel-Pelletier J. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1 and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. *Am J Pathol* 1993; 142: 95-105.
22. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, *et al.* Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest* 1992; 66: 680-91.
23. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 16487-90.
24. Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 1114-21.
25. Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y, Jasin HE. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 261-9.
26. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1266-74.
27. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350: 9-12.
28. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: A review. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27: 392-9.
29. Pelletier J-P, Jovanovic D, Fernandes JC, *et al.* Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1275-86.
30. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, *et al.* Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999; 26: 2002-14.