

Gene Chip을 이용한 돼지의 퇴행성 관절염의 활막세포 기작 연구

이정수 · Baatartsogt. O · 임희경 · 조인희⁴ · 소현경 · 李官浩⁵ · 김은국³ ·
이종하³ · 황수연² · 최강덕¹

한경대학교 유전정보연구소, ¹ 한경대학교 응용생명과학부,
² 한경대학교 생물정보통신전문대학원, ³ 경희대학교 경희의료원,
⁴ Osstem Implant R&D Center, ⁵ 中國吉林省 延邊大學 農學院

서 론

퇴행성 관절염이란 관절의 퇴행성 질환으로 관절의 연골과 골격의 노화에 따른 퇴행성 병변으로 전체 양돈사육장에서 발생하는 가축 도폐사의 13%를 차지하는 주요 질병으로 꼽힌다. 현재 관절염이 걸린 돼지는 주로 폐사시키거나 스테로이드 및 항생제 주사로 치료하는데 전자의 경우 사육 비용의 손실이, 그리고 후자의 경우 잔류 약물이 인체에 미치는 부작용이 문제가 되어진다.

관절염이 일어나는 정확한 기전은 아직까지 잘 규명되어 있지 않으나 일반적으로 cytokine, chemokine을 비롯한 여러 가지 조절 물질들 사이의 미묘한 균형이 깨어지는 일이 주된 요인으로 추정되고 있다. 사람의 경우, 염증이 일어난 관절 조직에서 활막 세포(synovial fibroblast)는 여러 염증성 사이토카인들을 분비하기도 하며 또 한편 이들 cytokine의 target 세포로 이들의 자극에 대하여 정상인의 그것과 다른 증식 및 활성화 반응을 보이는 등, 다양한 측면에서 관절염증의 유발에 기여하는 것으로 보여진다 (Frye *et al.*, 1996; Pathol Oncol Res 2:157). 이러한 활막 세포의 역할은 이제까지 주로 관절 단백질을 표적으로 하는 자가면역질환, 즉 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)에서 연구되어져 왔으나, 최근 들어서는 관절의 마모 및 과도한 체중 때문에 일어나는 퇴행성 관절염(osteoarthritis)에서도 활막세포의 역할이 중요시 되고 있다. 따라서 활막세포 활성화 경로를 DNA Microarray chip을 이용하여 세포 및 분자 수준에서 밝혀 이를 차단할 수 있는 자연물질(natural product)를 선별함으로써 항생제나 스테로이드를 사용하지 않고 돼지의 관절염을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있는 방법을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

Gene chip을 이용하여 정상 활막세포와 퇴행성 관절 활막세포에서 각각 발현이 증가하거나 감소하는 유전자의 분석을 통해 질환의 기전을 구명하고 각 질환별 지표 유전자 선별하려 한다. 데이터는 암컷 Yorkshire와 수컷 Landrace의 교배잡으로 체중은 6.6kg이었으며, 이 교배잡의

왼쪽 뒷다리 슬관절에 십자인대를 파열하여 관절염을 유발하였다. 8주간 성장을 시킨 후 정상 슬관절의 활막세포(그림 1, 그림 2)와 관절염이 유발된 슬관절의 활막세포(그림 3, 그림 4)를 분리하여 2주간 세포배양 후 Trizol로 RNA를 isolation시켜 total RNA를 추출한 후 affymetrix Gene chip을 제작하였고 Geneplex 소프트웨어의 GCOS, Global scaling normalization을 수행하여 데이터를 분석하였다.

그림 5는 gene chip을 Global scaling normalization을 수행 전후의 MA plot이다.



그림 1. 정상 활막조직

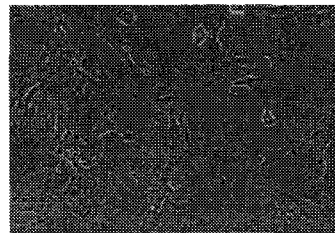


그림 2. 정상 활막세포

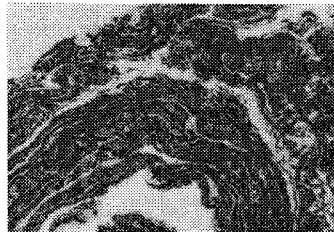


그림 3. 관절염 유발 활막 조직

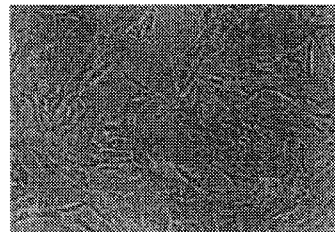


그림 4. 관절염유발 활막 세포

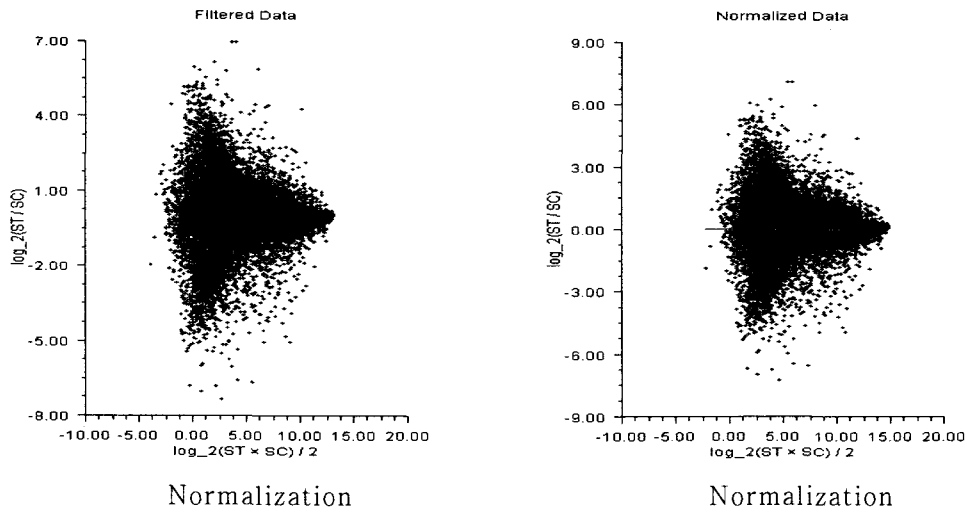


그림 5. M-A plot

결과 및 고찰

표 1과 표 2에서와 같이 unknown 유전자 962개를 포함하여 유전자 발현이 증가된 유전자는 총 1,059개 였으며, unknown 유전자 564개를 포함하여 유전자 발현이 증가된 유전자는 총 639개를 얻었다. 이 중 spike control로 사용된 Lysine의 최대 intensity로 제한하여 발현이 증가된 유전자와 감소된 유전자를 각각 454개와 300개를 획득하였다.

표 1. 관절염 유발 활막세포에서 발현이 증가하는 유전자

Accession No.	Gene symbol	Gene title	M
NP_998900	P14ARF	p14ARF protein	4.158922
NP_999101	RNASE4	RNase PL3	3.289289
NP_001005348	TEGT	testis enhanced gene transcript	2.989667
NP_999411	CES3	carboxylesterase	2.6459007
NP_999072	PECAM1	type I transmembrane endothelial adhesion molecule	2.4638867
NP_999366	GPX1	cytosolic glutathione peroxidase	2.3009233
NP_001012299	SCG2	secretogranin II	2.2319632
NP_999493	GATA-6	transcription factor GATA-6	2.0858102
NP_999194	IL1A	interleukin 1-alpha	1.9332285
NP_999233	FUT1	alpha-1,2-fucosyltransferase	1.9090176
NP_999517	ATP2B1	plasma membrane Ca ²⁺ pump (PMCA1b)	1.7822027
NP_999497	GNB2L1	G-beta like protein	1.6056294
NP_999470	STEAP	six transmembrane endothelial antigen of PAEC	1.499444
NP_999143	B2M	beta 2-microglobulin	1.4565334
NP_999468	OAS1	2'-5' oligoadenylate synthetase	1.3068638
NP_001004028	HAPLN1	link protein precursor (AA -15 to 339)	1.281414
NP_999015	LOC396850	glutathione S-transferase	1.2564473
NP_999293	PPP3CA	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1.2260399
NP_998913	TNNT1	troponin T slow type isoform sTnT1	1.1021376
NP_999004	FAS	Fas receptor	1.0984783

표 2. 관절염 유발 활막세포에서 발현이 감소하는 유전자

Accession No.	Gene Symbol	Gene Title	M
NP_999387	CD86	CD86 protein	-4.7464027
NP_999112	E4	Epididymal secretory protein E4	-3.9855905
NP_999281	MGP	matrix Gla protein	-3.8336582
NP_999226	MX2	Mx protein	-3.3885155
NP_999312	PMAIP1	TN3	-2.586649
NP_001005152	FGL2	fibrinogen-like protein 2	-2.5109892
NP_999446	FH	complement regulator factor H	-2.3556423
NP_999564	IL6	interleukin 6	-1.8651371
NP_001006591	P2RY2	purinergic receptor P2Y2	-1.7252359
NP_999138	HSP90	90-kDa heat shock protein	-1.7167645
NP_999422	DPPIV	dipeptidyl peptidase IV	-1.631917
NP_999100	LMP7	proteasome subunit LMP7	-1.5650167
NP_999409	PCPA1	carboxypeptidase A1 precursor	-1.4782248
NP_999421	IGF1	insulin-like growth factor	-1.3491077
NP_999448	PLTP	plasma phospholipid transfer protein	-1.3183489
NP_999524	NLN	soluble angiotensin-binding protein	-1.1555166
NP_999300	IL-7	interleukin-7	-1.1408339
NP_001001540	GP38K	38 kDa heparin-binding glycoprotein	-1.1303463
NP_999162	IL18	interleukin-18	-1.089757
NP_999132	SCARB1	scavenger receptor class B member 1	-1.0876169

요 약

관절염이 일어나는 정확한 기전은 아직까지 잘 규명되어 있지 않으나 일반적으로 cytokine, chemokine을 비롯한 여러 가지 조절 물질들 사이의 미묘한 균형이 깨어지는 일이 주된 요인으로 추정되고 있다. 사람의 경우 염증이 일어난 관절 조직에서 활막 세포(synovial fibroblast)는 여러 염증성 사이토카인들을 분비하기도 하며 또 한편 이들 cytokine의 target 세포로 이들의 자극에 대하여 정상인의 그것과 다른 증식 및 활성화 반응을 보이는 등, 다양한 측면에서 관절염증의 유발에 기여하는 것으로 보여진다. 따라서 활막세포 활성화 경로를 DNA Microarray

chip을 이용하여 세포 및 분자 수준에서 밝혀 이를 차단할 수 있는 자연물질(natural product)를 선별함으로써 항생제나 스테로이드를 사용하지 않고 돼지의 관절염을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있는 방법을 모색하고자 한다. 6.6kg의 암컷 Yorkshire와 수컷 Landrace의 교배잡으로 왼쪽 뒷다리 슬관절에 십자인대를 파열하여 관절염을 유발하고 8주간 성장을 시킨 후 정상 슬관절과 관절염이 유발된 슬관절의 활막세포로부터 total RNA를 추출한 후 affymetrix Gene chip을 제작하여 Geneplex 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다. 분석 결과 unknown 유전자 962개를 포함하여 유전자 발현이 증가된 유전자는 총 1,059개였으며, unknown 유전자 564개를 포함하여 유전자 발현이 증가된 유전자는 총 639개를 얻었다.

이러한 돼지 관절염에서의 활막세포에 의한 유전적 발현 양상으로부터 molecular function, biological process, pathway 등을 이용하여 관절염 지표를 작성할 수 있다.

참고문헌

1. Hwang, Douk Ho *et al.* An Immunocytochemical Study on the Development of Synovio-cytes in the Knee Joint of Mouse. The Seoul Journal of Medicine, Vol. 31, No. 3, 1990.
2. 高秉勇 *et al.* The Influence of Hemarthrosis on the Articular Cartilage and Synovium. 연세의대논문집, Vol. 15, No. 1, 1982.