

말의 활액 및 혈청 분석을 통한 관절질환의 생화학적 예측 인자

배종환 · 김갑수* · 유영춘** · 이희영*** · 이경복^{1*}

건양대학교 의과대학 생화학교실, *카프로 바이오텍
건양대학교 의과대학 미생물학교실, *약리학 교실

The Investigation of Synovial Fluid and Serum for Biochemical Markers of Joint Diseases in the Horse

Jong Hwan Bae, Kabsu Kim*, Yung Choon Yoo**, Hoi Young Lee*** and Kyung Bok Lee^{1*}

Department of Biochemistry, College of medicine, Konyang University, Nonsan, Chungnam 320-711
*Capro Biotech Co., Ltd, 406 Biotechnology Innovation Center, 198-53 HooPyung-Dong, Chuncheon 200-200, Korea,
Department of Microbiology, *Department of Pharmacology, College of medicine,
Konyang University, Nonsan, Chungnam 320-711

Abstract : The joint diseases including osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) are common in the horse. Many studies have been performed to develop biochemical markers reflecting the abnormalities of cartilage and synovial membrane. However, no specific, sensitive and clinically well established assay systems have been yet available to characterize the severity of joint diseases. Indeed, radiography is still doctor's best choice of assessing joint damage in OA/RA. This review focuses on biochemical molecules such as proteoglycan, collagen, matrix metalloproteinases (MMPs), lectin and cytokine to assess their potential value for not only predicting stage of joint disease but also monitoring treatment efficacy.

Key words : Horse, Arthritis, Joint disease, Diagnostics, Biochemical factors

서 론

육상선수과 마찬가지로 Equine Sports에서도 관절질환을 포함한 운동기질환의 중요성은 두 번 강조하여도 부족함이 없다. 골관절염을 포함한 관절관련 질환은 운동질환 말의 조기 도태원인 중 1위를 차지하며, 말의 전체 도태원인에 있어서도 산통(colic) 다음으로 심각한 문제점으로 지적되고 있다¹. 또한 국내 경주마 도태원인의 1위를 차지하는 만큼 관절관련 질환은 산업적인 측면 뿐만 아니라 경제적인 측면에서도 중요한 연구의 목표가 되고 있다. 파행없이 (clear horse) 최적의 능력을 발휘할 수 있는 말을 보유한다는 것은 마주, 트레이너, 기수 등은 물론 경마 관람자에 이르기까지 말과 관련된 사람이면 누구나가 갖는 소망이며 최고의 꿈일 것이다.

경주마의 출생후부터의 성장단계별 트레이닝 프로그램을 보면, 말은 언제든지 관절에 상처를 받을 수 있는 위험에 노출되어 있음을 알 수 있다. 4-5주를 주기로 반복되는 장제는 말의 균형을 유지하는 데 있어서나 골관절염을 유발하는데 있어 가장 중요한 원인을 제공하고 있다². 임상적으로 관절 초기의 미미한 상처(microtraumata)를 관찰하고 진단, 치료한다는 것은 그다지 쉬운 일이 아닐 것이며, 전문가의 눈에도 미미한 파행을 관찰하는데는 그 한계가 있을 수밖에 없을 것

이다. 행동의 특성상 관절의 손상이 잦은 경주마의 관절에 손상이 일어나는 경우, 활액(synovial fluid, SF)안에서는 여러 생체분자들에 의해 대단히 복잡한 기전을 통해 많은 변화가 일어나게 되며(Fig 1의 모식도 참조), 이러한 관절질환의 발생에 관련된 생물학적 기전과 생화학적 현상들을 잘 이해하고 분석할 수 있는 수단이 존재한다면 말의 관절질환에 대해 더욱 더 많은 것을 이해할 수 있으며 관절염의 예방 및 치료에도 유효할 것이다. 하지만 말 관절질환의 발병원인, 발병기전, 그리고 시술 후의 예후 예측 등에 관해서는 아직까지 일관된 이론이나 정보가 알려져 있지 않은 실정이다. 골관절염(osteoarthritis, OA)이나 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 질환의 병기 판정을 위한 표준화된 등급 시스템이 있지만³, 이러한 변수를 정량화 한다는 것은 여전히 어려운 문제로 남아있다. 관절질환에 있어서 적혈구 침강 속도(erythrocyte sedimentation rate) 및 C-reactive protein(CRP)등은 일반적인 염증 진행에 관한 유용한 정보를 제공한다. 하지만 이러한 생화학적 지표는 관절질환에 특이적인 것이 아니며, 연골 손상과의 상관 관계가 매우 낮다. 이러한 이유로 OA나 RA에 있어서 연골손상의 판단의 최상의 방법은 여전히 방사선 진단으로 여겨진다. 그러나 이 방법은 감도 및 정확도가 떨어져, 관절 손상의 조기 진단 및 예방을 목적으로 한 치료효과의 관찰에 효과적이지 못하므로, 연골, 활낭, 뼈 조직등의 비정상성을 검출 할 수 있는 특이적이고 감도가 좋은 생화학적 지표는 OA 및 RA의 연구 및 진단에 매우 유용할 것이다.

¹Corresponding author.

E-mail : kyunglee@ktytis.konyang.ac.kr

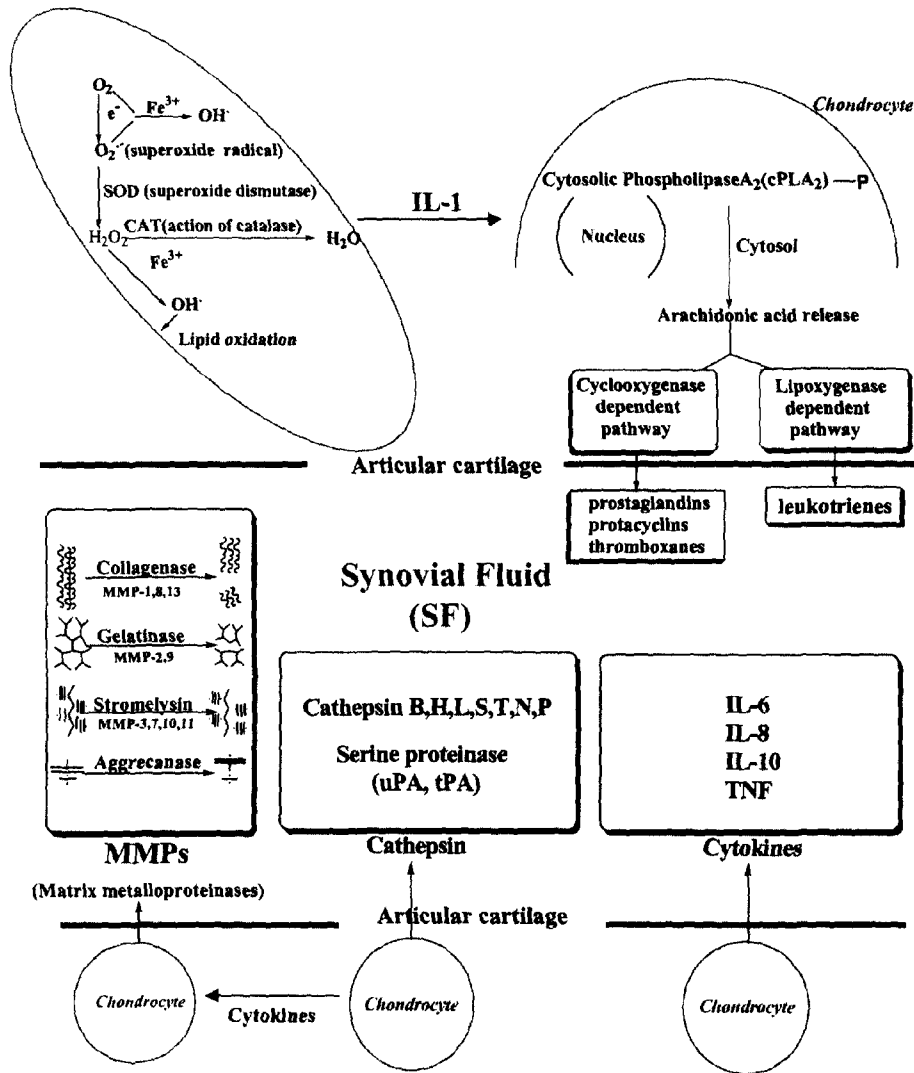


Fig 1. Schematic picture of cells and mediators related to the pathogenesis of joint diseases.

이 논문에서는 말의 연골손상에 의해 초래되는 골관절염의 발병원인과 발병기전에 관련된 여러 생체분자들의 화학적 및 생화학적 변화를 기술하고, 또한 이들 분자를 정량·정성 할 수 있는 생화학적 또는 면역학적 분석법에 관하여 서술한다. 특히 glycosaminoglycan, matrix metalloproteinases(MMPs)와 tissue inhibitors of the metalloproteinases(TIMPs), lectin, cytokine 등의 물질을 중심으로, 이 물질들의 생성과정과 관절질환과의 상관관계를 설명하고, 이 물질들의 측정방법에 관하여 기술한다. 사람의 경우는 RA에 관한 내용이 주종을 이루고 있으나 OA에 관한 연구는 전자에 비해 매우 빈약한 만큼, 말 OA에 대한 체계적인 이해는 사람 OA의 치료와 예후에도 도움이 될 것으로 기대된다. 관절 연골은 파괴되고 또 생성이 된다. 생성되는 것 보다 파괴되는 연골이 더 많으면 충격을 흡수하는 관절 연골의 양이 줄거나 없어져 관절사이의 뼈와 뼈가 닿는 상태가 되어 극심한 고통을 가져오게 되어 관절염을 앓게된다. 이러한 관절염을 진단하고 예방하기

위한 연구는 그 내용과 분야가 매우 세분화되어 있으며 연구가 매우 활발하다. 관절염에 관한 연구는 각 국에서 활발히 이루어지고 있으며 이에 대한 치료제를 개발하고 있다. 연구과정과 결과를 얻기 위해 관절에 관한 많은 이해가 필요하고 그에 관한 원인 분석이 필요하다. 여기서는 이러한 연구를 위한 관절내에서 일어나는 인자들의 특성을 알아보려고 한다.

관절질환과 관련한 생화학적 인자

Proteoglycan

관절염은 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis, RA)과 골관절염(osteoarthritis, OA)으로 분류할 수 있다. RA는 몸속의 면역성에 이상이 생겨서 여러 가지 백혈구들이 자신의 몸을 스스로 공격하기 때문에 생기는 병이라고 할 수 있다. OA이라고도 불리는 퇴행성 관절염은 관절을 구성하는 여러 가지 성분 중에서 연골과 주위 골에 퇴행 변화가 나타나서

생기는 관절염으로 진행과정에서 관절면은 얇아지고 연골은 연화된다. 관절연골은 proteoglycans과 collagen으로 구성되어 있으며 proteoglycans(PGs)은 조직이 부하를 견딜 수 있게 하고 collagen은 신장력을 갖게 하여 비틀림에 견딜 수 있게 한다. 연골내의 연골세포는 활발한 세포 분열을 일으키고 대사적으로 매우 활발하여, collagen과 PGs를 만들어낸다⁴. Proteoglycan은 거대분자들의 복합체로서 각각은 core 단백질을 포함하고 한 개 또는 그 이상의 glycosaminoglycan (GAG)이 공유결합을 하고 있다. GAG는 이당류의 반복되는 선형 다당류로서 1개의 hexosamine과 또다른 carboxylated, sulfated ester가 연속되어져 있다. Proteoglycan을 이루는 GAG의 종류에는 chondroitin sulfate(CS), keratan sulfate (KS), Hyaluronic acid(HA)등이 있다. 이러한 분자들은 척추 동물과 무척추동물의 세포 안, 세포표면, 세포외 기질에서 찾을 수 있으며 세포와 세포, 세포외 기질 간의 상호작용에 중요한 역할을 하며 정상적인 것과 병적인 것 사이에 일어나는 세포의 인식, 전이, 성장요인의 조절, 지방대사에 관계하고 있다⁵. 관절염을 앓고 있는 관절에서는 collagen과 proteoglycan의 손실이 발생하여 활액(synovial fluid, SF)에서는 proteoglycan의 구성물질인 KS, CS 그리고 단량체인 core 단백질이 증가한다⁶. 말의 관절질환을 알아보기 위한 방법으로 SF와 혈청내의 sulfated-glycosaminoglycan (GAG) 정량을 할 수 있으며 이 때 1,9-Dimethylmethylene blue (DMMB) assay를 이용한다⁷.

1,9-Dimethyl-methylen blue(DMMB) assay를 이용한 glycosaminoglycan 정량: 1,9-Dimethyl-methylene blue (DMMB) assay는 조직이나 SF내의 sulfated GAG인 chondroitin-6-sulfate(C6S), chondroitin-4-sulfate(C4S), keratan sulfate(KS)등을 정량하는 방법으로 값이 저렴하며 간단하고 빠른 방법으로 미량도 측정 가능한 아주 고감도의 유용한 방법이다. 이 실험방법은 0.2 µg(glycosaminoglycan/tube) 양을 측정할 만큼 매우 감도가 좋으며 SF의 papain처리된 단백질 또는 당단백질의 방해를 제거할 수 있다. Sulfate-glycosaminoglycan과 DMMB의 흡착이 일어날 때 옅고 현상이 일어나며 이 complex는 약간 불안정하여 흡광도 영역인 525 nm에서 측정할 때 15초 이내에 값을 측정하여야 한다⁷. 이러한 불편은 kit개발로 많은 개선이 이루어져있다^{8,9}.

Hyaluronic acid 정량: SF의 주요 구성성분인 HA는 unsulfated-GAG로서 β(1-4)N-acetylglucosamine과 β(1-3)glucuronic acid로서 구성되어 있으며, 고분자로서 분자량은 $4 \times 10^3 \sim 8 \times 10^6$ 이다. 특성은 산화적 손상의 조절, 연골의 proteoglycan방출의 억제, 관절 연골내의 aggrecan과 고분자의 형성, 염증성 세포들의 증식, 식세포의 반응조절 및 운할 역할 등의 다양한 기능을 지니는 점성을 갖는 물질이다. HA 정량에는 비색법을 사용 측정하나⁹, HPLC를 사용하여 SF에서의 전체 HA의 농도를 측정하는 방법이 보고되어 있다¹⁰. 관절에 질병이 있는 SF에서의 HA는 저농도를 보이고 total concentration($C_{\text{adi-HA}}$)과 점성이 낮은 것으로 관찰되었다¹¹.

혈청 및 SF에서의 HA농도의 측정은 OA 및 RA 질환의

표지인자로서의 개발가능성이 상당히 높은 것으로 간주되고 있으며 HA의 유용성을 확인하기 위해서는 보다 더 체계적이고 광범위한 연구가 요구되어진다¹².

Chondroitin sulfate and Keratan sulfate 정량: SF 구성물질인 CS와 KS의 정량이 관절질환을 측정하는 marker가 될 수도 있다. CS를 측정하기 위한 방법으로 chondroitinase ABC 이용하여 생성된 불포화 이당류인 ΔC4S, ΔC6S는 관절 질환의 상태를 판별 할 수 있는 좋은 방법으로 OA, RA의 경우를 비교할 수 있다. RA에서는 ΔC4S가 정상인 것과 비교할 때 증가하는 값을 보인다¹³. OA, RA의 경우 GAG농도, KS epitope 5D4, ΔC6S, ΔC6S:ΔC4S 값이 정상인 것보다 낮은 값을 보이고 ΔC4S의 값은 정상인 것보다 높은 값을 보인다. CS의 이성체인 C6S와 C4S의 비율을 보면 초기 OA 경우는 말기 OA 보다 높은 값을 보인다^{14,15}. 평균 분자량이 55,000인 KS를 정량하기 위해 keratanase를 사용하여 KS를 분해한 후, 역상 HPLC 상에서 분석한다¹⁶. 대부분의 연구에서 혈청의 KS는 aggrecan의 파괴의 지표로서 간주되어 지고 있다¹⁷⁻¹⁹.

요약하면, cartilage proteoglycan에 대한 몇몇의 항체와 검색법들이 개발되었지만, 연구결과가 항상 일치하지는 않으므로 이들의 검출이 성숙한 aggrecan의 파괴를 의미하는 가하는 것은 아직 명확하지 않다. 연구결과와 불일치는 병기에 따른 차이점과도 관련되어 있다고 여겨진다.

Collagen

분자량이 약 10만인 collagen은 폴리펩타이드 사슬이 3개가 모여 나선구조로 이루어진 고분자 단백질이다. collagen은 동물의 몸 속에 가장 많이 들어 있는 섬유상의 단백질로서 뼈를 구성한다. 뼈에 있는 collagen의 양은 20%를 차지한다. Collagen은 glycine(Gly)이 전체의 약 1/3을 차지하며, 나머지 2/3중의 약 1/3은 proline(Pro) 또는 hydroxyproline(Hyp)으로 구성되어 있다. Hyp은 collagen이외의 단백질에서는 거의 볼 수 없으며, peptide중에 들어가 있는 Pro만이 수산화 되어 Hyp으로 되는 점을 착안하여 Hyp을 정량함으로써 collagen의 정량이 가능한 것이다. 현 측정 방법에는 kit 사용이 보편화 되어있다²⁰. collagen의 기능은 세포의 접착제, 세포기능의 활성화, 세포의 증식작용, 지혈작용, 면역의 강화와 같은 역할을 한다.

세포외 기질 물질로서는 collagen과 proteoglycan이 주를 이룬다. 각각의 collagen type과 그에 따른 특성은 다음과 같다. Collagen의 type I은 뼈와 피부의 주요 성분이며 collagen type I의 손상이 일어나는 때는 뼈가 끊임없이 변화하며 칼슘을 이동시키는 경우이다^{21,22}. RA/OA 환자의 경우 collagen type I이 cytokine인 Interleukin(IL-1), IL-6, tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등을 유도한다²³. Collagen의 type II는 연골의 주성분이며 소수의 collagen type IX, collagen type XI가 연골을 이루고 있다. 이러한 성분들이 물을 조직안으로 흡수하여 부풀게 하여 연골이 압력에 견딜 수 있도록 한다²⁴. 연골의 파괴로 collagen fragment,

proteoglycan의 방출이 이뤄지며, collagen type II fragment가 OA/RA의 경우에 병리학적으로 중요한 부분을 차지하고 있다. 혈액과 소변에서의 collagen type II fragment의 관찰은 관절염을 앓고 있는 동안 collagen type II 손실을 의미하며 더 나아가 병의 진행정도를 알 수 있는 하나의 방법이 된다²⁵. OA나 RA의 환자경우 Moskowitz등²⁶은 혈청에서 Garnero등²⁷은 소변에서 collagen type II fragment가 증가하는 것으로 보고하였다.

요약하면, type II collagen은 연골에 특이적이며 가장 풍부한 단백질이기 때문에 SF, 혈청 및 소변에서의 type II fragment의 측정은 OA나 RA에 있어서의 연골 파괴정도를 측정할 수 있는 유망한 생화학적 지표이나 최근까지 많은 연구가 진행되지는 않았다.

MMPs와 TIMPs

Matrix metalloproteinases(MMPs)는 상처치유(wound healing), 태아생성(embryogenesis), 맥관형성(angiogenesis), 그리고 암세포 전이(tumor metastasis)와 같은 여러가지 병태생리학적 현상에 깊이 관련되어 있다²⁸. 이 단백질 분해효소는 기저막(basal membrane)과 연결세포(connective tissue)를 분해하고 세포의 기질(extracellular matrix)의 항상성(homeostasis) 유지에 필수적인 역할을 한다. MMP의 발현이나 활성화에 어떤 변화가 오게 되면 multiple sclerosis, Alzheimer's disease, 암과 같은 병이 나타나며 활성화 되면 연골의 구성물질을 파괴한다. Plasminogen의 단백질 분해로부터 시작되는 MMP의 활성화 과정은 proMMP로부터 활성화된 MMP를 생산하게 하며 이러한 복잡한 단계는 특별한 활성화 물질과 억제제에 의하여 조절되어지고 있다. MMP는 세포의 기질 구조를 깨고 세포의 이동, 암세포의 성장, 그리고 맥관형성에 영향을 줌으로써 암의 발생에 기여하고 있다. 따라서 이 단백질 분해효소는 세포의 분화와 성장과 같은 기초적인 과정에 영향을 끼침으로써 세포와 기질의 관계에 아주 중요한 역할을 수행하고 있다.

MMP는 아연에 의존적인 peptide 분해효로써 MMPs의 공통된 성질은 ① 아미노산의 공통된 sequence를 갖고 있다. ② 불활성인 proenzyme의 형태로 분비된다. ③ 단백질 분해효소에 의해 활성화 된다. ④ 활성부위 중앙에 Zn을 포함하고 Zn과 Ca은 그들의 구조를 안정화시키기 위해 필요하다. ⑤ 활성화된 MMPs는 TIMPs에 의해 중성 pH조건에서 활성이 억제된다. 또한 Ca은 세포의 기질의 구성성분을 파괴하고 활성화시키는데 필요하다. 현재 최소한 18개가 밝혀져 있으며 구조와 기질에 대한 특이성에 따라 크게 5종으로 분류할 수 있다²⁹. 즉 collagenase(MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases(MMP-2, MMP-9), stromelysins(MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12), membrane type(MT)-MMPs(MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP), 그리고 이에 속하지 않는 MMP(MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24) 등으로 분류할 수 있다.

MMP는 유전자 발현과 단백질 활성의 차원에서 아주 잘

조절되고 있다. 보통 MMP는 아주 적은 양으로 발현되다가 cytokines(IL-4, IL-10), growth factors(EGF, TGF- α , bFGF, TGF- β 1), 그리고 세포와 세포, 혹은 세포와 기저와의 상호작용에 의하여 발현이 증가된다. 대부분의 MMP는 활성을 갖지 않는 전구체(zymogen)의 형태로 준비되는데 이 전구체는 다른 단백질 분해효소에 의하여 cystein residue와 촉매부분(catalytic site) 사이의 공유결합이 깨짐으로써 촉매부분과 기질이 반응하게 된다. MMP의 단백질 분해작용은 α 2-macro-globuline과 α 1-antiprotease와 같은 비특이적 단백질 분해 억제제나 특이성을 갖는 tissue inhibitors of the metalloproteinases(TIMPs)에 의하여 억제된다³⁰. TIMPs는 현재 4종류(TIMP-1, -2, -3, 그리고 -4)가 알려져 있는데 활성화된 MMP의 효소작용을 억제함과 동시에 MMP의 활성화 단계도 저해하는 두가지 억제작용을 갖고 있다.

관절의 질환에서 연골의 손상을 결정하는 것으로 MMPs와 TIMPs는 중요한 역할을 하며 MMP와 TIMP 사이의 균형이 깨져 MMP가 많이 생산됨으로써 OA에서의 연골 혹은 RA에서의 SF세포를 분해한다고 알려져 있다³¹. 여러가지 사실에서 MMP가 연결세포의 병태생리학적 현상에 깊이 관여하는 것으로 보고되어, 1990년 MacNaul등³²은 활액세포가 collagenase와 stromelysin을 분비한다고 하였고, Brinckerhoff³³는 MMP mRNA와 단백질이 관절조직에 존재함을 증명하였다. MMP는 동물의 관절손상에서 발견되었으며 1994년에 Ellis등³⁴은 MMP 억제제를 사용함으로써 연골의 파괴를 예방할 수 있었다. 연골과 활액세포의 파괴에 관여한다고 알려진 MMP로는 간질 collagenase(MMP-1, -8, -13), stromelysin(MMP-3), 그리고 gelatinase B(MMP-9) 등이 있다. 이러한 효소들은 aggrecan의 Asn³⁴¹과 Phe³⁴² 사이를 절단한다고 알려져 있다. 요약하면, 관절 파괴 질환(OA/RA)에서의 MMP양의 측정이 임상적으로 병의 진단 지표, 혹은 예후 예측인자로서의 유용한가 아닌가 한 것은 아직 명확하지 않으며, MMP의 어떤 형태가 (active, proenzyme, 혹은 complexed to TIMP) 임상적으로 가장 관련이 있는지 밝혀져야 한다.

Lectin

Lectin은 글리코실레이트(glycosylate)물질과 특이적인 관련성을 갖는 식물성 단백질군이다. 혈청 단백질의 경우 대부분의 단백질이 한 개 이상의 oligosaccharide glycan을 부착한 상태로 존재하며, N-glycan은 포유류의 혈청 단백질에서 종종 발견되기도 한다. 혈청 단백질의 glycan은 대부분(혹은 극히 일부의 경우) heterogenous한 상태로 존재하며, 이러한 이유로 혈청 단백질의 complex-type glycan과 다른 당단백질을 분리하는데는 정교한 기술이 필요하다. 그러나 일반적으로 glycan 구조를 식별하는데는 lectin affinity chromatography을 이용할 수 있으며, 보다 더 좋은 방법으로는 affinity-immunoelectrophoresis(AIE)에 의한 방법이 있다. 이러한 방법들은 당단백질을 직접적으로 식별할 수 있는 방법이다. 당결합 단백질인 lectin을 이용하면 이 lectin

에 의해 특이적으로 인식되는 glycan 구조를 식별할 수 있다³⁵. 다당류는 거의 모든 막 단백질 및 혈청 단백질에 부착되어 있으며, 질병이 발생한 경우 이 다당류의 구성에는 많은 변화가 생긴다. 예를 들면 RA인 경우 IgG의 Fc 위치에 붙어있는 다당류의 비환원 말단 부분의 galactose가 감소하는 것으로 알려져 있다. 질병과 IgG 부착성 당분자 발현과의 상관관계를 조사하기 위해서는 혈청에서 IgG를 분리하여 여기에 부착된 당류의 분석을 행할 필요가 있다. 한 예로서 유년기 환자에서 혈청을 분리한 후 IgG를 정제한 후, galactose, GlcNAc, fucose 등의 당분자에 특이성을 나타내는 lectin인 RCA I, BSA II, UEA I를 이용하여 발현량(부착량)을 측정하였다. 그 결과 유년기 만성 관절환자의 IgG에서는 galactose와 GlcNAc의 발현량의 차이는 관찰되지 않았으나, fucose의 경우는 2.4배 정도 증가하는 것으로 나타났다³⁶.

병리학적인 관점에서 보았을 때 류마티스는 IgG의 glycosylation과 관련성이 높은 것으로 알려져 있으며, 이 때문에 많은 연구에서 IgG분자에 부착된 galactose의 발현량을 지표로 하여 조사가 행해져 왔다. 하지만 최근에는 galactose 보다는 fucose가 조사의 주된 표적으로 바뀌고 있다. Fucose의 양은 UEA I lectin을 이용한 blotting법에 의해 간단히 정량할 수 있으며, RA에서는 IgG중의 fucose량이 정상인 보다 증가하는 것으로 보고되어 있다³⁷. 다당류는 미량이지만 하나 IgG 분자에도 존재하고 있는 만큼 (IgG분자의 2-3%), 이들 다당류에 의한 glycosylation의 변화와 병리학적인 관점에서의 질병과의 관련성에 대해서도 검토되어야 한다. 즉 IgG의 Asn-297 잔기에 부착하는 다당류의 구조에는 36종류가 있으며, 정상 IgG의 경우에는 이들 다당류중 6가지의 주요 glycan이 60% 이상을 차지한다. 더욱이 IgG의 15-30%는 Fab 위치에 다당류가 N-linked 되어 있는 것으로 보고되어 있다. Glycoform은 galactose 잔기가 있는 수(0, 1, 2)에 따라 G0, G1, G2로 표시한다. IgG의 Fc에 부착된 oligosacchride는 HPLC를 이용하여 분리할 수 있다³⁸.

Cytokines

OA 환자에서는 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 와 같은 cytokine의 농도가 SF중에서 증가하며³⁹, 환자의 활액세포와 연골세포내에는 MMP-1, MMP-7, stromelysin-1과 같은 효소의 농도가 상승하게 된다. Cytokine은 섬유아세포, 내피세포, 외피세포에 의해 분비되며, 손상을 입은 활막세포, 단핵세포, synoviocytes type A, type B 등은 많은 양의 cytokine을 생산한다. Helper T세포(Th)는 IL-2, IL-6, IL-8, INF- γ 와 같은 cytokine을 분비하며, 이러한 cytokine들이 세포증식을 비롯한 다양한 기능을 조절하게 된다. 이들 cytokine의 분비 및 균형이 관절염과 관계가 있을 수 있는 것으로 추정된다. Th1 세포는 IL-2와 INF- γ 를 생산하며, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 생산한다⁴⁰.

IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), 그리고 Th에서 분비되는 IFN- γ 는 혈관 내피세포에서 더 많은 T세포 침윤을

유도하며, T세포는 다시 cytokine을 분비하여 각질형성세포의 증식과 T세포 침윤을 더욱 심화시킨다. RA인 경우, 증상이 완화될 때 IFN- γ 의 감소와 IL-4 및 IL-10의 증가와 같은 cytokine분비의 변화가 관찰되는 것으로 알려져 있다. 한편 IL-4를 관절의 SF에 직접 주사한 경우에는 염증유발에 관여하는 proinflammatory cytokine의 생성을 억제한다는 보고도 있다. cytokine은 주로 혈액에 존재하여 면역기능을 조절하는 가용성 분자이나, IL-1과 TNF- α 와 같은 cytokine은 연골의 proteoglycan aggrecan의 분리에 관여하기도 한다. 혈청과 SF 안의 IL-6와 sIL-6은 연골조직의 파괴에 관여하며⁴¹, 관절에서 세포파괴는 주로 collagenase에 의해 진행되므로 collagenase활성을 억제하는 저해제의 개발과 더불어 관절질환의 유발에 관여하는 cytokine의 작용기전을 규명하여 그 기전을 조절할 수 있는 수단을 찾는 작업이 중요하다고 할 수 있다.

결론 및 고찰

공식적인 말경기(horse sports)의 역사는 기원전 689년으로 거슬러 올라가며, 그 후로부터 말의 파행을 진단하는 다양한 방법과 기술이 발달하였고, 말과 관련된 수의사는 이러한 파행 진단법(lameness test)을 숙지하여 일상적인 진료의 중요한 일부분이 되어왔다. 이러한 파행진단기술과 방사선 진단법, 관절내시경, 또한 최근에 발달된 영상 진단법등의 이용으로 보다 정확하고 빠른 진단기술이 축적되어 활용되고 있지만, 이러한 진단법은 이미 파행을 나타내는 말의 파행부위와 약간의 진행정도를 알 수는 있지만 극도로 경미한 파행이나, 전임상단계(preclinical lameness sign)의 연골의 손상은 속수무책이라는 것을 잘 알고있을 것이다. 경주마의 경우 일반적으로 다른 승마용 말의 경우와는 달리 체성숙이 완전히 도달되지 않은 상태에서 훈련이 시작되기 때문에 상대적으로 관절질환에 이환될 높은 위험에 처하여 있게된다. 그러므로 경주마의 훈련과정은 세심한 관찰을 요하게 된다. 이러한 문제점을 해결하여 보다 더 안심하고 최적의 트레이닝 프로그램을 수행하기 위하여 보다 간편하고, 정확한 Hand Indicator가 절대적으로 필요 할 것이다. 특히 퇴행성관절염의 가장 빈번한 원인인 연골의 미미한 상처에 의해 특이적으로 발현하는 분자들을 혈액 및 활액에서 정확하게 검출할 수 있는 방법의 개발은 극히 시급한 과제라 할 수 있다. 이러한 면에서 본고에서 서술한 HA, GAG, Collagen, MMP, TIMP, Lectins 그리고 Cytokine 등과 같은 관절질환에 관련한 생체분자의 발현량 또는 효소활성을 혈청 및 활액중에서 정확하게 정량·분석함으로써 골관절염으로의 진행여부는 물론 질환의 중도(severity)를 미리 진단할 수 있으며, 나아가 퇴행성골관절염(arthropathia deformans)으로의 진행을 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 한편 이러한 생화학적인 진단을 통해 관절질환을 나타내는 말을 빠른 시기에 식별함으로써 경주마가 집중적인 육성 훈련후에 퇴행성관절염으로 인하여 불용처리됨으로서 발생하는 경제적 및 시간적 손실을 최소화할 수 있으며, 또한 골관절염의 소인이 있는 말을 이용강

도가 낮은 레저승마용 말로 전환함으로써 자원의 효율적인 이용으로 국가경제에도 도움이 될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Hillyer MH, Taylor FG, French NP. A Cross-sectional study of colic in horses on thoroughbred training premises in the British Isles in 1997. *Equine Vet J* 2001 ; 33:380-385.
- Hernandez J, Hawkins DL. Training failure among yearling horses. *Am J Vet Res* 2001 ; 62:1418-22.
- Christley RM, Hodgson DR, Evans DL. Cardiorespiratory responses to exercise in horses with different grades of idiopathic laryngeal hemiplegia. *Equine Vet J* 1997 ; 29:6-10.
- Robert GP, Raymond DA, Eugene B. Harrison's principles of internal medicine, 10th ed, MacGraw-Hill Pub 1983; 1999-2001.
- Aldilson CF, Claudio CW, Luiz EN. Sulfated glycosaminoglycan from ovary of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001; 31:31-40.
- Frisbie DD, Ray CS, Ionescu M. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horse. *Am J Vet Res* 1999; 60:306-309.
- Richard WF, David JB, Alan JB. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883:173-177.
- Iozzo RV. Perlecan : A gem of a proteoglycan. *Matrix Biol* 1994; 14:203-208.
- Jan LP, Alicia LB, Heidi M. Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluid as a maker of joint disease. *Can J Vet Res* 1995; 59:205-212.
- Noriko M, Itsuhiko M. Quantitation hyaluronic acid and chondroitin sulphates in rabbit synovial fluid by high performance liquid chromatography of oligosaccharides enzymatically derived thereof. *Chem Pharm Bull* 1990; 38:769-773.
- Barbara MP, Helmut G, Rudiger K. Assay of synovial fluid parameters : hyaluronan concentration as a potential maker for joint diseases. *Clin Chim Acta* 1997; 266:117-128.
- Manicourt DH, Poilvache P, Nzeusseu. Serum levels of hyaluronan, antigenic keratan sulfate, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 change predictability in rheumatoid arthritis patients who have begun activity after a night of bed rest. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1861-1869.
- Etsuji S, Masayuki M, Misao O. Analysis of synovial fluid components of hydrarthrosis in long-term hemodialysis patients. *J Orthop Sci* 1999; 4:171-175.
- Sharif M, Osborne DJ, Meadows K. The relevance of chondroitin and keratan sulphate makers in normal and arthritic synovial fluid. *Brit J Rheumatol* 1996; 35:951-957.
- Harumoto Y, Satoshi M, Hiraku H. Levels of chndroitin sulfate isomers in synovial fluid of patients with hip osteoarthritis. *J Orthop Sci* 1999; 4:250-254.
- Michael P, Clarrisa W, Edward P. Structure of keratan sulfate from *bonefish* (*Albula sp.*) larvae deduced from NMR spectroscopy of keratanase-derived oligosaccharides. *Carbohydr Res* 1998; 309:117-124.
- Bleasel JF, Poole AR, Heinegard D. Changes in serum cartilage marker levels indicate altered cartilage metabolism in families with the osteoarthritis-related type II collagen gene COL2I mutation. *Arthritis Rheum* 1999; 42:39-45.
- Thonar EJ-MA, Lenz ME, Kintworth GK. Quantification of keratan sulfate levels in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 1985; 28:1367-1376.
- Sweet MBE, Coelho A, Schnitzer TJ. Serum keratan sulfate levels on osatearthritis patients. *Arthritis Rheum* 1988; 31:648-652.
- Deyl Z. Separation methods for the study of collagen and treatment of collagen disorders. *J Chromatography* 1989; 488:161-197.
- Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001; 32:251-260.
- John SM, David JB. Molecules in focus Cathepsin B. *Int. J Biochem Cell Biol* 1997; 29:715-720.
- Kee-Ching GJ, Ming-Tsung L, Joung-Liang L. Collagen induces cytokine production by synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Letters* 1995; 45:13-17.
- Tim C. Matrix metalloproteinases and TIMPs : properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998; 3:130-137.
- James TD, Caryl LL, Nestor BN. Analysis of collagen-cleavage of type II collagen using a neopeptide ELISA. *J Immunol Methods* 2001; 247:25-34.
- Moskowitz RW, Holderbaum D, Atley LM. Type II collagen C-telopeptide 2B4 epitope is a marker for cartilage degradation in familial osteoarthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 1998; 41:S352.
- Garnero P, Gineyts E, Christgau S. Urinary type II collagen C-telopeptide breakdown products as a marker of cartilage degradation in rheumatoid rthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 1999; 42:S128.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta, LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:541-573.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis, *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43:S42-51.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31:34-45.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84:678-685.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990; 265:17238-17245.
- Brinckerhoff CE. Joint destruction in arthritis: metalloproteinases in the spotlight. *Arthritis Rheum* 1991; 34:1073-1075.
- Ellis AJ, Curry VA, Powell EK. The prevention of collagen breakdown in bovine nasal cartilage by TIMP, TIMP-2 and a low molecular weight synthetic inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201:94-101.

35. Fermin L, Maria AA, Andres P. Lectin affinity immunoelectrophoresis of serum glycoproteins. *J Chromatography* 1995; 698:107-122.
36. Mirna F, Gordan L, Ivan G. Fucosylation and galactosylation of IgG heavy chains differ between acute and remission phases of juvenile chronic arthritis. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:99-102.
37. Ivan G, Gordana M, Jerka D. Fucosylation of IgG Heavy Chains is increased in Rheumatoid Arthritis. *Clinical Biochem* 1999; 32:605-608.
38. Francoise HR, Elizabeth FH, Pauline MR. Quantitation of the oligosaccharides of human serum IgG from patients with rheumatoid arthritis : a critical evaluation of different methods. *J Immunol Methods* 1998; 213:113-130.
39. Landesberg R, Takeuchi E, Puzas JE. Differential activation by cytokines of mitogen - activated protein kinases in bovine temporomandibular-joint disc cells. *Arch Oral Biology* 1999; 44:41-48.
40. Steiner G, Tohidast AM, Witzmann G. Cytokine production by synovial Tcells in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology* 1999; 38:202-213.
41. Carl RF, Chris BL, Clare EH. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biology* 2000; 19:549-553.