대 한 골 관 절 종 양 학 회 지
J. of Korean Bone & Joint Tumor Soc.
Volume 9, Number 2, December, 2003

근골격계 종양의 종류에 따른 케모카인 유전자의 발현

영남대학교 의과대학 미생물학교실, 백정형외과의원*, 정형외과학교실**

김희선 · 백원진* · 이원재 · 신덕섭****

목적: 근골격계 종양의 종류에 따른 케모카인 발현 양상을 보고, 원발성 골육종과 재발된 골육종, 골육종의 항암화학요법 전과 후의 발현 차이가 있는지를 조사하고자 한다.

대상 및 방법: 종양조직을 얻을 수 있었던 원발성 양성 및 악성 근골격계 종양 10예, 재발된 골육종 1예, 화학요법 후의 골육종 1예 및 정상조직의 대조군 1예를 대상으로 하였다. RNA를 분리한 다음, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)과 RNase protection assay (RPA)를 이용하여 싸이토카인과 케모카인의 발현을 조사하였다. 각각의 종양간에 발현도 차이가 있는지를 알기 위하여 SPSS를 사용한 Fisher's exact test를 이용하여 통계적 처리를 하였다.

결과: IL-8과 TNF-α는 모든 조직에서 발현되었고, IFN-γ는 2예 외에 모두 발현하였으며, RANTES의 경우 연부조직 종양 5예, 골종양 4예에서, GRO-α는 연부조직 종양 1예, 골종양 2예에서 발현되었고, MCP-1과 IP-10의 경우 악성 골종양군에서는 2예만, 나머지에서는 모두 발현되는 다양한 양상을 보였다. 원발성 골육종에 비해 재발된 골육종 조직에서의 발현은 IFN-γ를 제외하고, 전반적으로 발현도가 훨씬 강하였으며, 모든 종류의 케모카인 및 사이토카인들이 발현되었다. 화학요법 후에는 RANTES와 IFN-β만이 발현되었으며, TGFβ isoform 중 TGFβ1 유전자의 발현만 관찰되었다.

결론: 대상의 수가 적어 통계적 분석을 통한 정확한 자료의 제시는 불가능하였으나, 연부조직 종양과 골종양에 있어 일부 케모카인 및 사이토카인의 발현 차이가 있음을 확인하였고, 골육종의 경우 IFN-γ 및 TGF-β isoform의 발현 분석이 종양의 재발과 치료 후 변화에 대한 지표에 응용될 가능성이 있음을 제시하였다.

서 론

케모카인(chemotactic cytokine, chemokine)은 사이토카인 계의 한 군으로 현재 약 50여종이 알려져 있다. 케모카인이라는 이름에서 알 수 있듯이 이들은 조직의 염증 반응 동안 염증 부위에 적절한 면역 세포들을 끌어들이는 화학 주성적 역할이 주된 기능으로 알려졌고 계속된 연구 결과, 화학 주성의 역할 이외에 다른 사이토카인처럼, 종류에 따라 다

※통신저자: 신 덕 섭
대구시 남구 대명동 317-1
영남대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel: 053) 620-3646, Fax: 053) 628-4020, E-mail: shinds@med.yu.ac.kr

양한 기능을 가지는 것으로 밝혀졌다[13,14]. 케모카인의 분류는 구조에 따라 CC, CXC, CX_3C 및 C 의 네 가지로 나누게 되는데 케모카인과 관련된 종양의 연구보고는 CXC 계 케모카인에 관한 것이 많으며 특히 non-small cell lung cancer에서의 신생 혈관의 형성에 관련된 CXC 케모카인에 대한 연구는 상당히 체계적이다. CXC 케모카인 경우 신생혈관을 억제하는 군(PF4, IP-10, Mig, SDF-1)과 신생혈관을 촉진하는 군(IL-8, GRO-α, ENA 78, GCP-2)으로 나누고 이들 두 군들의 유전자의 구조적 차이를 밝혀 종양 발생에 있어 신생 혈관 형성에 대한 케모카인의 역할을 제시하였다[1,2,6,11,18,23]. 근골격계 종양들이 발현하는 사이토카인이나 케모카인에 대한 연구는 일부 종양의 세포주를 이용하여 시행되고 있는 정도로 다른 종양을 대상으로 한 사이토카인의 연구에 비해 상당히 미흡한 실정이다[22,24,26].

이에 저자들은 근골격계 종양의 종류에 따른 다양한 종류의 사이토카인 및 케모카인 발현을 탐색하여 전반적인 CC 및 CXC 케모카인의 발현양상을 보고, 골육종의 경우 원발성 골육종과 재발된 골육종, 항암화학요법 전과 후의 케모카인의 발현도 차이가 있는지를 조사하여 케모카인의 발현도 변화에 대한 기초 정보를 얻고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 대상 환자

2000년 2월부터 2001년 7월까지 본원에서 종양조직을 얻을 수 있었던 원발성 양성 및 악성 근골격계 종양 10예, 재발 된 골육종 1예, 항암화학요법 후의 골육종 1예 및 정상조직의 대조군 1예를 대상으로 하였다(Table 1).

2. 실험 재료

종양조직으로부터 total RNA의 분리를 위해 Trizol (Gibco/BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD)을 사용하였다. RNase protection assay(RPA)는 RiboQuant multi-probe ribonuclease protection assay system(Pharmingen, San Diego)과 동일한 회사의 lymphotactin(Ltn), RANTES, IP-10, MIP-1β, MIP-α, MCP-1, IL-8, 및 I-309의 8종 template DNA로 구성된 hck-5 probe 및 TNF-β, LTβ, TNF-α, IFN-γ, IFN-β, TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3의 8종 사이토카인 template DNA로 구성된 hck-3 set를 사용하여 실시하였다. 케모카인 유전자 발현을 관찰하기 위한 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)은 RNA PCR kit(N808-0017 Perkin Elmer USA)를 사용하였고 RT-PCR에 사용된 케모카인 primer들은 바이오니아사 (충북 청원군)로부터 주문, 구입하였다. 사용된 10종류의 사이토카인 및 케모카인 primer sequences는 (Table 2)와 같다. 그 외 일반 시약들은

Table 1. The diagnostic Distribution of patients.

	Benign	Malignant
Soft tissue Tumor	Schwannoma Lymph node hyperplasia Angiolipoma	MPNST Synovial Sarcoma Extra skeletal Ewing's Sarcoma Liposarcoma
Bone Tumor	Giant Cell Tumor	Mesenchymal Chondrosarcoma Osteosarcoma Osteosarcoma (recurrent) Osteosarcoma (post-chemothrapy)

Table 2. Primers and PCR Conditions

PCR Product	Primers Sequences (5',3')	Cycles	Anneal Temperature(℃)
β-actin	CGGGAAATCGTGCGTGACAT GAACTTTGGGGGATGCTCGG	35	60
MCP-1	CCAATTCTCAAACTGAAGCTCGCAC GTTAGCTGCCAGATTCTTGGGTTGTG	35	60
RANTES	ATGAAGGTCTCCGCGGCACGCC CTAGCTCATCTCCAAAGAGTTG	35	60
MIP-1α	GAATCATGCAGGTCTCCAC GAGGGGTCCAGAAGCTTCG	35	62
MIP-1β	ACCATGAAGCTCTGCGTGACTG GACCTGGAACTGAACTGAGCTGC	35	62
IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTCTC	35	60
IP-10	GGAACCTCCAGTCTCAGCACC GCGTACGGTTCTAGAGAGAGGTAC	31	59
GRO-α	ACTGAACTGCGCGTGCCAGTG GGCATGTTGCAGGCTCCTCA	35	60
TNF-α	CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	40	55
IFN-γ	GGTTCTCTTGGCTGTTACTGCC GTTGGACATTCAAGTCAGTTACCGA	40	55
IFN-β	CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC CCAGGCACAGTGACTGTACTCCTT	35	60

시판 특급 순수 시약들을 사용하였다.

3. 실험 방법

1) RNA의 분리

질소 탱크에 보관된 조직을 드라이 아이스를 이용하여 냉동 유지상태에서 가루가 될 때까지 빠른 시간 내에 으깬 뒤 이를 tirzol 용액 1 ml 들어 있는 1.5 ml 멸균 튜브에 옮겨 trizol과 잘 섞은 후 100 μl의 클로로포름을 넣고 15 분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4℃에서 12,000 rpm으로 15 분간 원심 분리하여 윗층을 조심스럽게 취한 뒤 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 10 분간 정치시킨 후 원심 분리하여 얻어진 침전물은 에탄올로 세척한 후에 공기 중에서 말린 뒤 0.1% DEPC가 첨가된 증류수에 녹여서 이중 2 μl를 취하여 DEPC에 500 배 희석하여 흡광기를 이용하여 농도를 정한 후 RT-PCR 및 RPA의 시료로 사용하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chainreaction; RT-PCR)

PCR 시험관에 농도가 100 ng/μl의 RNA 3 μl, MgCl2(25 mM) 4 μl, 10×PCR buffer 2 μl, dNTP 각각 2 μl씩 8 μl, RNase inhibitor 1 μℓ, reverse transcriptase(M-MLVRT : RAV-2) 1μl, oligo[dT] 1 μl가 혼합된 RT 시료 17 μl를 넣고 그

Table 3. Summary of chemokine and cytokine expression in soft tissue and bone tumor

		CC chemokine		CXC chemokine			Cytokine	
		MCP-1	RANTES	IL-8	IP-10	GRO-α	TNF-α	IFN-γ
Soft tissue tumor	Benign	3/3	2/3	3/3	3/3	1/2	3/3	3/3
	Malignant	4/4	3/4	4/4	4/4	1/2	4/4	3/4
Bone tumor	Benign	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
	Malignant	2/4	3/4	4/4	2/4	1/4	4/4	3/4

위에 mineral oil을 중첩시킨 후 42℃에서 15 분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그후 99℃에서 5 분간, 5℃에서 5 분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화 시킨 다음 PCR을 실시하였다. PCR master mixture는 MgCl2 (25 mM) 4 μl, 10×PCR buffer 8 μl 그리고 Taq polymerase 0.5 μl와 멸균 증류수를 혼합하여 전체 78μl가 되도록 하였다. 여기에 각각 20 μM 의 sense primer와 antisense primer를 1 μl 첨가하여 PCR을 실시 하였다. 처음의 thermal cycling 단계는 MIP-1α와 MIP-1β의 경우 94℃에서 45 초 동안의 불활성화 단계, 62℃에서 1 분 동안 결합 반응 단계와 72℃에서 1 분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 35회의 thermal cycling을 실시하였고 β-actin, IL-8, MCP-1, IFN-β, RANTES, GRO-α의 경우 95℃에서 15 초 동안의 불활성화 단계, 60℃에서 30 초 동안 결합 반응 단계와 72℃에서 1 분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 35회의 thermal cycling을 실시하였고, TNF-α와 IFN-γ의 경우 94℃에서 1 분 동안의 불활성화 단계, 55℃에서 1 분 동안 결합 반응 단계와 72℃에서 1 분 30 초 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 40회의 thermal cycling을 실시하였고, IP-10의 경우 94℃에서 45 초 동안의 불활성화 단계, 59℃에서 1 분 동안 결합 반응 단계와 72℃에서 1 분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 31회의 thermal cycling을 실시한 뒤 별도로 72℃에서 10 분 동안 더 핵산 중합 반응을 실시하여 부분적으로 신장된 산물을 완전한 가닥으로 완성시켜 주는 단계로 하였다. 증폭된 상보 DNA는 8% polyacrymaide gel상에서 1배 농도의 TAE buffer로 150 volt에서 50분간 전기 영동시켰다. EtBr(0.5 μg/μl)에 20분 염색 후 나타나는 띠(band)를 관찰하였다. DNA marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

3) RNase protection assay (RPA)

위에 제시한 8종 케모카인과 8종의 사이토카인 mRNA 발현을 분석하기 위하여 RPA 시약을 구입한 회사에서 제시한 RiboQuant 실험 방법에 따라 실행하였다. 먼저 probe 합성을 위하여 [α^{32}P] UTP 10 ul, GACU pool 1 μl, DTT 2 μl, 5X transcription buffer 4 μl, RPA template set(hck-5) 1 μl, RNasin 1 μl, T7 polymerase 1 μl를 혼합하여 37℃, 1 시간 정치후 2 μl DNase를 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤 20 mM EDTA 26 μl, Tris-saturated phenol 25 μl, chloroform:isoamylalchol (50:1) 25 μl, Yeast tRNA 2 μl chloroform:isoamyl alcohol (50:1)와 반응시켜 원심분리하여 다시 위층을 취하고 50ul 4M ammonium acetate, 250 μl ice cold 100% 에탄올을 가하여 -70℃에서 30분간 방치한 뒤 다시 원심분리 후 그 침전물을 100 μl의 냉각된 90% 에탄올로 한번 씻은 후 공기 중에 말렸다. 그 후 50 μl hybridization buffer로 다시 침전물을 녹인 뒤 scintillation counter로 CPM을 측정하여 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 분리된 total RNA를 완전히 건조시킨 뒤 hybridization buffer 8 μl로 녹인 뒤 위의 준비된 probe을 2 μl 첨가하여 섞은 후 mineral oil을 중첩하고 90℃ 에 둔 뒤 곧바로 56℃에서 12 16 시간 정치시켰다. 준비된 probe과

RNA 혼합물을 15분 동안 37℃에 노출 후 RNase cocktail 100 μl를 oil 층 아래 넣은 뒤 10 초 동안 원심 분리 후 30℃ 45분간 정치시키는 동안 390 μl proteinase K buffer, 30 μl proteinase K, 20μl yeast tRNA로 구성된 혼합하여 proteinase K cocktail을 만들어 새 튜브에 18 μl씩 분주하고 RNase digest를 oil이 섞이지 않게 조심스럽게 취하여 proteinase cocktail이 있는 튜브로 옮긴 뒤 vortex후 15 분간 37℃에 둔 뒤 65 μl tris-saturated phenol, 65 μl chloroform: isoamyl alcohol(50:1)을 첨가 후 조심스럽게 위층을 취하여 새 튜브에 옮긴 뒤 120 μl 4M ammonium acetate, 650 μl ice cold 100% 에탄올을 넣고 원심분리 하여 위층을 제거한 뒤 여기에 냉각된 90% 에탄올로 씻은 후 공기 중에 침전물을 말렸다. 말린 침전 시료는 5 μl 1X loading buffer로 녹인 뒤 전기 영동의 시료로 사용하였다. 8% acryamide / 8 M urea로 구성된 전기영동 겔의 각 well에 1000-2000 cpm 활성도의 probe size marker와 각각의 시료를 넣은 뒤 250 V에서 약 2시간 30분동안 전기 영동을 실시하였다. 그 후 겔을 조심스럽게 필터종이에 부착시킨 뒤 1시간 동안 진공 건조시키고 완전히 말린 후 이를 -70℃ 에서 X-ray 필름에 적정시간 노출시켜 결과를 관찰하였다.

4. 통계의 처리

양성 연부조직종양군, 양성 골종양군, 악성 연부조직종양군 및 악성 골종양군간의 각각 케모카인의 발현도 차이가 있는지, 양성 종양군과 악성 종양군간의 차이가 있는지 그리고 연부조직 종양군과 골종양군과의 차이가 있는지를 알기위하여 SPSS를 사용한 Fisher's exact test를 이용하여 통계적 처리를 하였다.

결 과

1. 연부조직 종양과 골종양 조직에서의 케모카인 및 사이토카인의 발현 양상

연부조직 종양 7예와 골종양 5예의 조직으로부터 total RNA를 분리 후 RT-PCR을 시행하여 CC 케모카인에 속하는 MCP-1, RANTES, CXC 케모카인의 IL-8, IP-10, GRO-α 및 사이토카인 TNF-α와 IFN-γ의 총 7 종류의 유전자 발현 양상을 관찰하였다. 케모카인 IL-8과 사이토카인 TNF-α의 경우 종양의 종류와 관계없이 모든 대상의 조직에서 그 유전자 발현이 관찰되었고 IFN-γ의 경우 양성 연부조직 종양군과 양성 골종양군에서는 모든 예에서 발현되었고, 악성 연부조직 종양군과 악성 골종양군에서는 각각 4예 중 3예 (75%)에서 발현하였다. RANTES의 경우 연부조직의 종양 7예 중 5예, 골종양 5예 중 4예에서 유전자가 발현되고 GRO-α의 경우 연부조직 종양 2예 중 1예, 골종양 5예 중 2예에서 유전자 발현이 관찰되어 종양의 종류에 따른 이들 유전자들의 발현은 유의성이 없었다. 그러

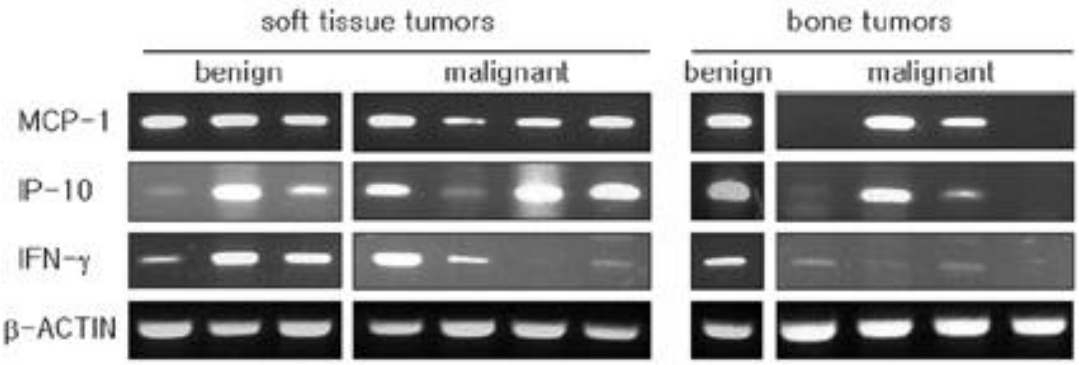

Fig. 1. Expression of MCP-1, IP-10 and IFN-g mRNA in the tissues of various soft tissue and bone tumors. Total RNA was isolated from tumor tissues, and RT-PCR was performed with primers indicated as described in materials and methods.

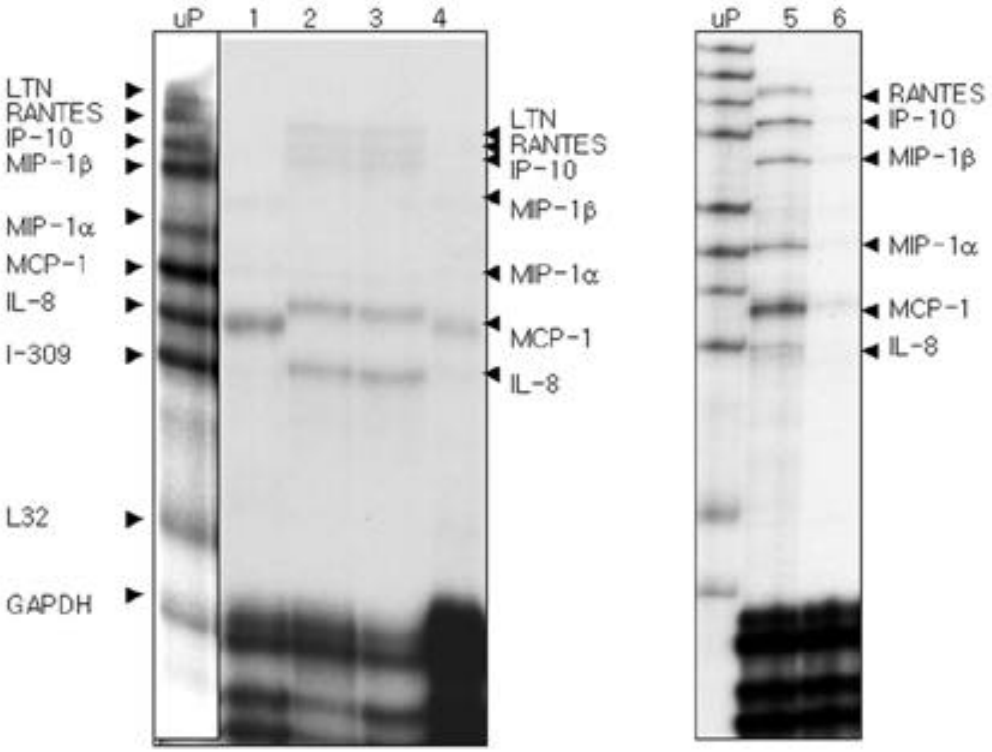

Fig. 2. Chemokine mRNA expression in various soft tissue and bone tumor tissues. Total RNA was isolated and analysed by Rnase protection assay. No.1: Schwannoma No.2: Mesenchymal chondrosarcoma No.3: MPNST, No.4: Synovial sarcoma, No.5: Giantcell tumor, No.6: Extra skeletal Ewing's sarcoma, uP: unprotected probe.

나 MCP-1과 IP-10의 경우 양성 연부조직 종양군, 양성 골종양군 및 악성 연부조직 종양군에서는 모두 발현되었으나, 악성 골종양군에서는 2예(50%)만이 발현되었다(Table 3). 이들의 결과를 통하여 연부조직 종양과 골종양에서 유전자 발현의 차이를 보이는 MCP-1, IP-10 및 IFN-γ의 발현도를 비교한 결과, Fig. 1.에서 관찰되듯이 MCP-1의 경우 골종양 중 일부 악성종양을 제외한 다른 대상 조직에서는 뚜렷한 발현도가 관찰되지만 간엽성 연골육종(mesenchymal chondrosarcoma)과 골육종 각 1 예에서는 MCP-1의 발현은 관찰되지 않았다. IP-10의 경우 발현도의 차이는 있지만, 모든 연부조직 종양에서 유전자 발현이 가능하였으나 골종양의 악성종양의 경우 MCP-1의 발현이 음성이었던 동일한 조직에서 역시 IP-10의 유전자 발현을 관찰할 수 없었다. IFN-γ의 경우 연부조직의 악성종양 1예(유잉육종)에서 비록 유전자 발현이 관찰되지 않았고 다른 1예 (지방육종)의 경우 미약한 발현도를 보였으나 전반적으로 연부 조직 종양의 발현도에 비해 골종양의 IFN-γ 발현도는 상당히 약하게 나타났다.

2. RPA를 이용한 연부조직 종양 및 골종양의 케모카인 및 사이토카인의 발현 양상

Lymphotactin(LTN), RANTES, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, IL-8, 및 I-309의 8종 케모카인과 TNF-α, TNF-β, LTβ, IFN-β, IFN-γ, TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3의 8종 사이토카인 유전자 발현을 각각 동시에 관찰할 수 있는 RPA법을 이용하여 일부 연부조직 종양 및 골종양의 케모카인 및 사이토카인 발현 양상을 관찰하였다. 케모카인 발현양상을 보면 MIP-1α, MIP-1β의 경우 유전자 발현도가 거대세포종(giant cell tumor)을 제외하고 상당히 미약하나 발현되는 것을 관찰할 수

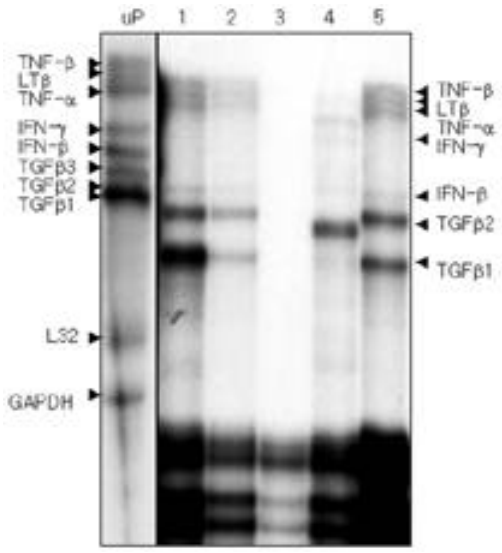

Fig. 3. Cytokine mRNA expression in soft tissue and bone tumor specimens. Total RNA was isolated and analysed by Rnase protection assay. No.1:Giant cell tumor No.2: Schwannoma, No.3: Mesenchymal chondrosarcoma, No.4: MPNST, No.5: Synovial sarcoma, uP: unprotected probe.

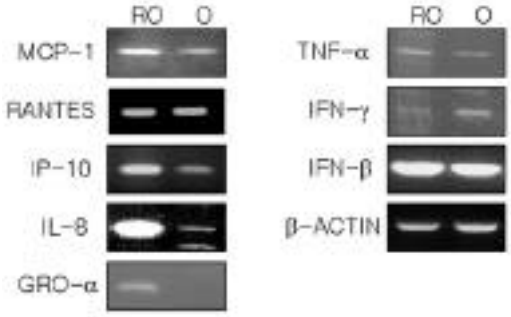

Fig. 4. Expression of cytokine and chemokine mRNAs in the tissues of primary osteosarcoma and recurrent osteosarcoma. Total RNA was isolated from bone tumor tissues, and RT-PCR was performed with primers indicated. RO: recurrent osteosarcoma, O: primary osteosarcoma.

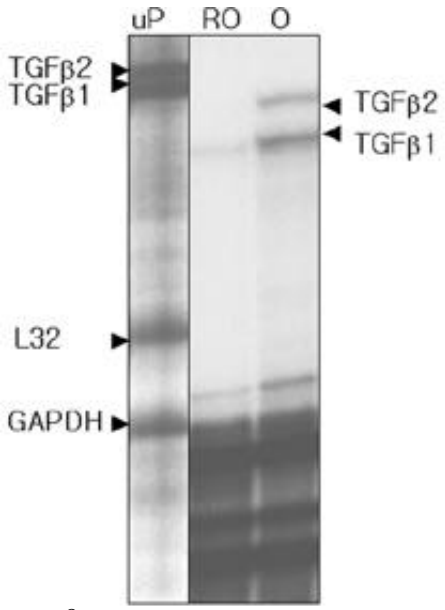

Fig. 5. TGF-βisoform mRNAs expression in the tissues of primary and recurrent osteosarcoma. Total RNA was isolated and analysed by Rnase protection assay. RO: recurrent osteosarcoma, O: primary osteosarcoma uP: unprotected probe.

있었다. 신경초종(schwannoma)과 활액막육종(synovial sarcoma)의 경우 케모카인의 발현은 유사한 양상을 띄었으며 MCP-1의 발현이 다른 케모카인에 비해 강하게 나타났다. 간엽성 연골육종와 말초신경 악성종양 (Malignant peripheral nerve sheath tumor) 또한 유사한 발현 양상을 보였으며 이들은 다른 케모카인에 비해 IL-8을 상대적으로 강하게 발현하였다. 거대세포종의 경우 MCP-1이 가장 강하게 발현되면서 다른 종양들에 비해 다른 케모카인 들도 뚜렷하게 발현되었다(Fig. 2). 사이토카인의 유전자 발현 양상을 분석해보면 간엽성 연골육종과 말초신경 악성종양의 경우를 제외하고는 TGFβisoform 중, TGFβ, TGFβ의 강한 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

3. 원발성 골육종과 재발된 골육종 조직에서의 케모카인 및 사이토카인의 발현 양상

원발성 골육종 조직과 치료 후 재발된 조직에서의 케모카인 및 사이토카인의 유전자 발현양상을 비교하였다. 원발성 골육종에 비해 재발된 골육종 조직에서의 케모카인 및 사이토카인의 발현은 IFN-γ를 제외하고, 전반적으로 그 발현도가 훨씬 강하였으며 또한 실험된 모든 종류의 케모카인 및 사이토카인들이 발현되었다. 원발성 골육종의 경우 IFN-β를 제

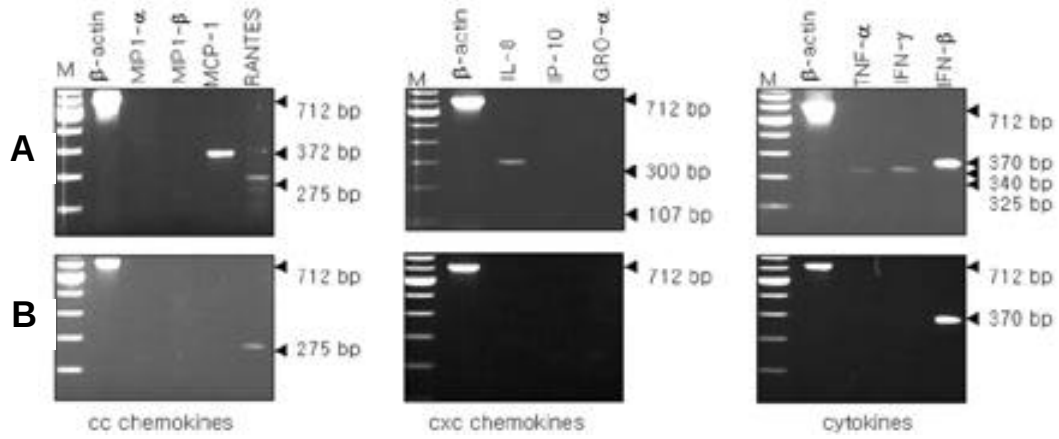

Fig. 6. Expression of cytokine and chemokine mRNAs in the tissues of osteosarcoma. Total RNA was isolated from tumor tissues, and RT-PCR was performed with primers indicated. **A**: tissue obtained from primary osteosarcoma **B**: tissue obtained after chemotherapy in same patient.

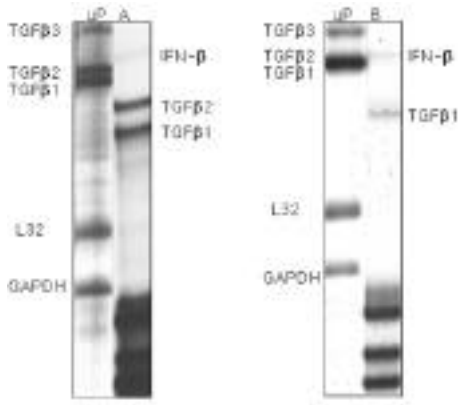

Fig. 7. TGF-βisoform mRNA expression in the tissues of osteosarcoma. Total RNA was isolated and analysed by Rnase protection assay. A: tissue obtained from primary osteosarcoma B: tissue obtained after chemotherapy in same patient. uP: unprotected probe.

외하고 전반적인 발현도는 극히 약하였고, GRO-α와 RANTES는 아예 관찰되지 않았다. 그러나 IFN-γ유전자의 경우 다른 유전자들과는 달리 원발성 골육종에 비해 재발된 골육종 조직에서 더 약하게 관찰되었다(Fig. 4). TGFβisoform의 발현 양상으로 원발성 골육종 조직은 TGFβ, TGFβ, 및 TGFβ의 3종 isoform 중 TGFβ, TGFβ가 뚜렷하게 발현되었으나, 재발된 골육종 조직의 경우 TGFβ만이 관찰되고, 발현도 또한 원발성 골육종 조직에 비해 상당히 떨어졌다(Fig. 5).

4. 항암화학요법 후 골육종의 케모카인 및 사이토카인 유전자 발현

골육종의 경우 동일환자를 대상으로 항암화학요법 전 과 후의 종양 조직을 취하여 케모카인 및 사이토카인의 발현을 RT-PCR법과 RPA법으로 분석 비교하였다. 항암화학요법 전에 취한 종양의 조직 경우 MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10, TNF-α, IFN-γ 및 IFN-β의 유전자 발현이 관찰된 반면 치료 후의 같은 부위에서 취한 조직의 경우 RANTES와 IFN-β를 제외한 나머지 케모카인 및 사이토카인의 발현되지 않았다(Fig. 6). RPA를 통한 TGFβisoform의 발현 변화도 관찰하였는데, 치료 전의 조직은 TGFβ를 제외한 TGFβ, 및 TGFβ의 유전자 발현에 확인된 반면 치료후의 조직에서는 TGFβ유전자의 발현만 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

종양 조직으로 부터의 사이토카인 발현에 대한 연구는 이미 많은 연구자들에 의해 진행되어 왔으나, 근골격계 종양에 대한 연구는 다른 종류의 종양에 비해 다소 부진하였다. 특히 본 연구와 같이 다양한 종류의 양성 및 악성 근골격계 종양환자의 종양 조

직을 직접 실험대상으로 하고, 관찰하고자 하는 대상의 케모카인 및 사이토카인을 다수 선정하여 동시 관찰한 예는 찾을 수 없었고, 관련 연구들은[21,22,24,26] 대부분이 세포주를 이용한 in vitro 실험이었다. 본 실험에서 분석된 케모카인 및 사이토카인은 총 10종으로 케모카인 7종, 사이토카인 3종이였고, 7종의 케모카인 중 CC 케모카인으로 MIP-1α, MIP-1β, MCP-1 및 RANTES를, CXC 케모카인은 IL-8, IP-10 및 GRO-α, 그외 사이토카인은 TNF-α, IFN-γ 및 IFN-β의 유전자 발현을 분석하였다. 본 실험에 이용된 케모카인 및 사이토카인들은 그 생리적 작용이나 체내 염증, 면역반응 및 방어 기전에 대부분 그 기능이 밝혀지고 정립된 상태의 종류들이며, 다른 종양 연구에서도 다양하게 분석된 것들이나 골종양을 이용한 이들에 대한 자료는 여전히 불충분하기에 기존의 종양 조직들과 좋은 비교의 대상이 될 수 있어 선택하였다. 특히 사이토카인 계의 경우, TNF-α는 가장 활발하게 연구된 대표적 호염증성 사이토카인 중 하나로 종양 조직 괴사 인자로 알려져 있고, IFN-γ는 면역 반응시 Th1 및 자연살세포에서 분비되어 세포성 면역 반응을 증폭시키고, 대식세포의 활성화를 초래하는 대표적 면역 매개물질이며, IFN-β의 경우 다른 사이토카인 들과는 달리, 자극을 받지 않는 정상 휴식기의 세포에서 세포내 유전자 발현이 항상 유지되는 대표적 사이토카인으로[3,8] 알려져 있어, 이들 각각의 유전자 발현 양상 또한 궁금하였다. 본 연구를 실시하기에 앞서 정상인의 조직에서의 10종의 케모카인 및 사이토카인의 유전자 발현 양상을 관찰해 보았다. 정상인의 경우 IL-8과 IFN-β의 유전자 발현을 제외한 다른 모든 유전자들은 관찰되지 않아 연부조직 종양 및 골종양에서의 유전자 발현 양상과는 확연히 달랐다. 연부조직 종양 및 골종양의 경우 종양의 종류에 따라 다소 발현도의 차이는 있었으나 MCP-1, IP-10 및 IFN-γ를 제외하고는 유전자 발현 유무에 있어 큰 차이를 나타내지 못했다. MCP-1의 경우 다양한 염증 면역 반응에서 단핵구와 T 세포의 교통을 통제하는 대표적 인자로써 특히 기억 $CD4^+$ 세포에 대한 화학 주성을 담당하며 $CD4^+$ 림프구에서 Th1, Th2로 분화하는데 관여하는 것으로 알려진 케모카인이나[5,10,7] 종양의 형성이나 종양의 진행에 관한 MCP-1와의 관계에 대한 구체적인 연구 보고나 정립된 내용은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 그에 반해 IP-10은 CXC 케모카인에 속하면서 호중구의 교통을 조절하기 보다는 단핵구의 교통 조절에 일익을 담당하고 이들의 생산에는 IFN-γ의 조절을 받고 있는 것으로 알려진 대표적 케모카인으로[15-17] 종양 형성 과정 시 신생 혈관을 억제시킨다는 다수의 연구 보고에 따라 종양 발생에 있어 억제 효과를 가지는 케모카인군 중 하나로 알려진 대표적 케모카인이다. 본 연구의 연부조직의 종양의 경우 이들 두 케모카인의 발현이 모두 발현된 반면, 악성 골종양의 경우 일부는 발현을 관찰할 수 없었고, 골육종에서도 결과의 차이를 보였으나, 대상 종양의 수가 너무 적어 어떠한 통계적 의의를 찾을 수는 없었다. 위에 언급되었듯이 IFN-γ에 의해 유도되는 IP-10의 성향에 따라 IFN-γ의 발현도에 따른 IP-10 유전자 발현도의 관계를 분석해 보았지만 큰 의미를 찾을 수 없어, 이는 근골격계 종양시 체내의 IP-10의 발현을 유도하는 것은 IFN-γ이외의 다른 인자들에 의해 좌우되는 것이 아닌가 추측되었다. 또한 IFN-γ의 발현이 연부조직 종양들에 비해 골종양에서 상당히 약하거나 음성적으로 나타나, 좀더 많은 대상을 확보하여 IFN-γ와 골종양간의 상호 작용기전에 대한 추후의 연구를 하는 것이 요구되었다. RPA를 이용한 8종 케모카인 유전자 발현 양상을 보면 MIP-1α와 MIP-1β의 발현 역시 관찰되었다. 대상 조직의 수가 너무 적어 이들 종양과 케모카인 발현양상 간의 관계 분석은 불가능 하지만 본 실험의 RPA 연구 결과 악성 골 종양인 간엽성 연골육종과 악성 연부조직 종양인 말초신경 악성종양, 그리고 양성 연부조직 종양인 신경초종과 악성 연부 조직 종양인 활액막 육종의 경우 8종 케모카인의 발현 양상이 각각 동일하게 나타나, 많은 조직을 대상으로 한 이들 종양간의 케모카인 발현 분석 연구는 의의가 있을 것으로 추측되었다. 8종 사이토카인의 발현을 관찰한 RPA의 경우 TNF-α나 IFN-γ, IFN-β의 발현 외에서 TNF-β, LTβ의 발현도 관찰되었으며 특히 종양의 종류에 관계없이 이들에 비해 TGFβ isoform들이 위에 언급된 사이토카인들 보다 강하게 발현됨으로써 대상 조직의 수를 많이 확보하여 TGFβ isoform의 발현 양상의 분석을 시도하면 관련 골종양과 TGFβ의 관계 정립에 유용한 자료가 될 수 있을 것으로 생각 되었다. 비록 동일인은 아니나 골육종의 경우 재발된

상태와 원발성 골육종 조직에서의 케모카인 및 사이토카인 유전자 발현을 비교 분석한 결과, 원발성 조직에 비해 재발된 조직에서, IFN-γ를 제외한 모든 유전자에서의 강한 발현이 관찰됨에 따라 재발 시 체내 케모카인 및 사이토카인의 상호관계가 상당히 달라진다는 것을 추측할 수 있었으며 IFN-γ의 경우 세포성 면역 반응의 증폭과 대식세포의 활성화와 같이 면역 반응의 활성화를 담당하는 사이토카인으로써의 중요성과 비록 연구의 방향을 다르나, nude mouse에 골육종을 이식한 뒤 IFN-γ와 IFN-β의 항종양 효과를 관찰한 Gomi등[9] 의 연구 결과를 참고로 할 때, 골육종 치료 후 재발하는 경우 임상적 증상이 원발성일 때 보다 심하고 병리조직학적으로도 세포조직의 악성도가 더 높아지며 예후가 나빠지는 현상과의 관련을 추측할 수 있으며 골육종 치료에 있어 IFN-γ역할이 기대되었다. 따라서 동일한 유형의 많은 조직을 확보하여, 골육종의 재발에 있어 IFN-γ의 관련성을 분석하는 작업은, 골육종과 사이토카인 상호관계 중 IFN-γ 역할 정립에 유용한 자료가 될 것으로 생각된다. 또한 동일인을 대상으로 한 항암화학요법 전, 후의 케모카인 및 사이토카인의 발현 변화를 분석시, 치료 전에 비해 치료 후 RANTES 및 IFN-β를 제외한 모든 케모카인 및 사이토카인 유전자 발현이 음성으로 나타났다. 이 환자의 경우 항암화학요법 후 광범위 종양 적출수술을 하였고, 종양 세포의 괴사 정도를 보기 위해 시행하는 조직학적 구축(mapping)에서 90%이상의 괴사를 보였었다. 이는 골종양 치료의 판정에도 케모카인 및 사이토카인의 발현 분석이 응용될 가능성이 있음을 시사하였다. 종양과 TGFβ발현과 관계된 연구보고는 다수[12,19,20,25] 있으나 TGFβisoform 발현의 체계적 분석을 행한 연구는 매우 미흡한 가운데 대장암을 이용한 Bellone등[4] 의 연구 보고에 따르면 암환자의 경우 정상인에 비해 TGFβ, TGFβ2의 생성은 TGFβ에 비해 두드러진다고 보고하였다. 본 연구의 골육종 경우 비록 한 환자의 조직의 결과이기는 하나 TGFβ1 및 TGFβ2의 발현만을 관찰할 수 있었으며 치료 후나 재발된 조직의 경우 TGFβ1 유전자 발현만 관찰되어 골육종 경우 TGFβisoform 발현 분석은 IFN-γ와 함께 치료 또는 예후의 판정에 응용 가능한 지표로써의 가능성을 시사하였다. 연부조직 종양과 골종양에서의 케모카인 및 사이토카인 유전자 발현 분석을 시도한 본 연구는 비록 연구 대상의 종양 조직 표본의 수가 적어 통계적 분석을 통한 정확한 자료의 제시는 불가능하였으나 연부조직 종양과 골종양에 있어 일부 케모카인 및 사이토카인의 발현 차이를 확인하고 골육종의 경우 IFN-γ 및 TGF-βisoform의 발현 분석이 치료 및 예후 지표에 응용될 가능성이 있음을 관찰하였다. 따라서 본 연구는 아직까지 정립되지 못한 연부조직 종양과 골 종양에서의 케모카인 및 사이토카인 상호관계 정립에 있어 유용한 기초 자료가 될 것으로 생각하는 바이다.

결 론

다양한 근골격계 종양의 케모카인 및 사이토카인 발현 형태를 조사한 본 연구는 대상의 수가 적어 통계적 분석을 통한 정확한 자료의 제시는 불가능하였으나, 연부조직 종양과 골종양에 있어 일부 케모카인 및 사이토카인의 발현 차이가 있음을 확인하였고, 골육종의 경우 IFN-γ 및 TGF-βisoform의 발현 분석이 종양의 재발과 치료 후 변화에 대한 지표에 응용될 가능성이 있음을 제시하였다.

REFERENCES

1) **Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, et al**: Interferon-γ-Inducible Protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med*, 184(3): 981-992, 1996.
2) **Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Strieter RM**: In vitro and in vivo systems to assess the role of C-X-C chemokines in the regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol*, 288: 190-220, 1997.
3) **Belardelli F, Gessani S, Proietti E, et al**: Studies on the expression of spontaneous and induced interferons in mouse peritoneal macrophages by means of monoclonal antibodies to mouse interferons. *J Gen Virol*, 68: 2203-2212, 1987.
4) **Bellone G, Carbone A, Tibaudi D, et al**: Differential expression of transforming growth factors-β1, -β2 and -β3 in human colon carcinoma. *Eur J Cancer*, 37: 224-233, 2001.
5) **Bottazzi B, Colotta F, Sica A, Nobili N, Mantova**

-ni A: A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and actvating factor(MCP-1/MCAF). *Int J Cancer*, 45: 795-797, 1990.

6) **Caroline AH**: Chemokines in disease: biology and clinical research. New jersey, *Humana Press*: 3-53, 1999.
7) **Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA**: Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3652-3656, 1994.
8) **Gessani S, Di Marzio P, Rizza P, Belardelli F, Baglioni C**: Posttranscriptional regulation of interferon mRNA levels in peritoneal macrophages. *Am Sci Microbiol*, 65(2): 989-991, 1991.
9) **Gomi K, Oka T, Morimoto M**: Antitumor effect of human recombinant interferon-gamma and -beta against human osteosarcoma transplanted into nude mice. *J Pharmacobiodyn*, 9(11): 879-88, 1986.
10) **Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ**: Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science*, 245: 1490-1493, 1989.
11) **Hansell P, Maione TE, Borgstrom P**: Selective binding of platelet factor 4 to regions of active ango -genesis in vivo. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 2): H829-H836, 1995.
12) **Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, et al**: Genetic change in transforming growth factor- β(TGF- β) receptor type Ⅰ gene correlates with insensitivity to TGF- β1 in human prostrate cancer cells. *Cancer Res*, 56: 44-48, 1996.
13) **Kim CH, Broxmeyer HE**: Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J leukoc Biol*, 65: 6-13, 1999.
14) **Luster AD**: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Jounal of Medicine*, 338(7): 436-445, 1998.
15) **Luster AD, Ravetch JV**: Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol*, 7: 3723-3731, 1987.
16) **Luster AD, Ravetch JV**: Biochemical characterization of a γinterferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*, 166: 1084-1097, 1987.
17) **Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV**: γ-Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 315: 672-676, 1985.
18) **Maione TE, Gray GS, Hunt AJ, Sharpe RJ**: Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res*, 51(8): 2077-2083, 1991.
19) **Matsushita M, Matsuzaki K, Date M, et al**: Down-regulation of TGF-beta receptors in human colorectal cancer: implications for cancer development. *Br J Cancer*, 80: 194-205, 1999.
20) **Oft M, Heider KH, Beug H**: TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*, 8: 1243-1252, 1998.
21) **Paoletti S, Borzi RM, Mazzetti I, et al**: Human osteosarcoma cells release matrix degrading enzymes in response to chemokine activation. *Int J Oncol*, 18(1): 11-6, 2001.
22) **Sanceau J, Hiscott J, Delattre O, Wietzerbin J**: IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene*, 19(30): 3372-83, 2000.
23) **Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, et al**: Inhibition of interleukin 8 attenuate angiogenesis in human bronchogenic carcinoma. *J Exp Med*, 179: 1409-1415, 1994.
24) **Taichman RS, Reilly MJ, Matthews LS**: Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein 1alpha in response to interleukin 1beta and tumour necrosis factor alpha stimulation in vitro. *Br J Haematol*, 108(2): 275-83, 2000.
25) **Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, et al**: Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta*, 1137: 189-196, 1992.
26) **Zheng MH, Fan Y, Smith A, Wysocki S, Papadimitriou JM, Wood DJ**: Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: possible involvement in $CD68^+$ macrophage-like cell migration. *J Cell Biochem*, 70(1): 121-9, 1998.

Abstract

The Expression of Chemokine mRNAs in Musculoskeletal Tumors

Hee Sun Kim, M.D., Won Jin Baik, M.D.*, Won Jae Lee, M.D., Duk Seop Shin, M.D.****

*Department of Microbiology and Orthopaedic Surgery**, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea*
Baik Orthopedic Clinic, Ulsan, Korea*

Purpose: The current study was designed to investigate the expression pattern of chemokine in musculoskeletal tumors, and between primary osteosarcoma and recurred, and post-chemotherapy one.

Materials and methods: Ten primary soft tissue and bone tumors, one primary, one recurred, one post-chemotherapy osteosarcoma, and one normal control patients were included in the current study. RT-PCR and RPA were used for the investigation of the expression of cytokines and chemokines. Fisher's exact test in SPSS was used for the statistical analysis.

Results: IL-8 and TNF-α were expressed in all tumor tissues, IFN-γ was in all except two cases, RANTES was in 5 soft tissue tumors and 4 bone tumors, GRO-α was in one soft tissue tumor and 2 bone tumors, and MCP-1 and IP-10 were in two bone tumors and in all the other group. In recurred osteosarcoma all the cytokines and chemokines were expressed, and the degree of the expression was stronger than the primary, except IFN-γ. After chemotherapy, RANTES, IFN-β and TGF β among the TGF βisoforms were expressed.

Conclusion: There were differences in the expression of cytokines and chemokines in some different bone and soft tissue tumors, even though it was impossible to support this statistically due to small numbers of cases. The expression pattern of IFN-γ and TGF-βisoform in osteosarcoma could be used for the study of tumor recurrence and the changes after chemotherapy.

Address reprint requests to
Duk Seop Shin, M.D.
Department of Orthopedic Surgery, Yeungnam University Hospital
#317-1 Daemyung-dong, Nam-gu,Daegu, 705-035, Korea
TEL: 82-53-620-3646, FAX: 82-53-628-4020, E-mail: shinds@med.yu.ac.kr