

근골격계 종양에서 사이토카인 발현의 분석

영남대학교 의과대학 정형외과학교실 · 미생물학교실*
이준한 · 곽은석 · 손욱진 · 김희선* · 신덕섭

The Analysis of the Cytokine Expression in Musculoskeletal Tumors

Joon Han Lee, Eun Seok Kwak, Oog Jin Shon, Hee Sun Kim*, Duk Seop Shin

*Department of Orthopaedic Surgery and Department of Microbiology**
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

—Abstract—

The cytokines are the hormone-like proteins, which are produced in the mononuclear cells. They have many roles, such as immune mediators, cell differentiations, angiogenesis. The chemokines have chemotactic effects which control the host immune response.

There were few reports about the cytokines associated with musculoskeletal tumors. From late 1980s, the cytokine studies of bone tumors such as osteosarcoma were started, but most studies for benign and malignant musculoskeletal tumors were left to be explored.

To evaluate the characteristics of the cytokines in variable musculoskeletal tumors, tissues were obtained from the seven patients who visited the Yeungnam University hospital from February to July 2000. They were lipoma (1 case), parosteal osteoma (1 case), enchondroma (2 cases), pigmented villonodular synovitis (1 case), ganglion (1 case), and metastatic squamous cell carcinoma (1 case). The gene expression of the cytokines were analyzed by RNase protection assay (RPA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

The lipoma and parosteal osteoma expressed MIP-1 β , and IP-10 genes. The two enchondromas showed different results, one expressed all of MIP-1 α , MIP-1 β and IP-10 genes but the other expressed none of above. The pigmented villonodular synovitis strongly expressed MIP-1 α and IP-10 when compared with the other cases. The ganglion did not express all of the chemokines mentioned above. And the metastatic squamous cell carcinoma expressed all of the chemokines and especially IP-10 was highly expressed.

Even though this study has only a few cases, these results provide a basis for the cytokine mediating network study in musculoskeletal tumors.

Key Words: Cytokine, Musculoskeletal Tumors

서 론

사이토카인(cytokine)은 주로 림프구(lymphocytes)나 단핵구(monocytes)와 같은 면역 세포에서 생성되는 호르몬양 단백질로 다양한 기능을 가지는데, 그 중에서도 면역작용 매개 물질로서 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1). 케모카인(chemokine)은 특정세포에 대하여 화학주성을 가지는 사이토카인의 한 부류로 정의되며, 분자의 아미노산 구조에 따라 CXC, CC, C 및 CX3C 케모카인으로 분류된다. CXC 케모카인은 두 개의 시스테인 기(C, cysteine 기) 사이에 다른 아미노산 구조를 포함한 것으로 주로 다형핵 백혈구의 화학주성에 관여하고, CC 케모카인은 두개의 시스테인 기를 가진 것으로 림프구, 단핵구, 호산구 및 호염기구에 화학주성을 가지고 있다. 현재 알려져 있는 케모카인은 IP (interferon γ inducible protein)-10, MIP (macrophage inhibitory protein)-1 α , MIP (macrophage inhibitory protein)-1 β , MCP (monocyte chemotactic protein)-1, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), GRO (growth related peptide)- α 등 약 50여 종이 있다.

흔한 종양인 위암이나 유방암과 같은 것에 대하여는 이미 혈중 혹은 종양조직 내에서의 사이토카인 발현에 대한 연구가 많이 진행되어 있어서, 이들 종양에서 사이토카인의 역할은 상당부분 알려져 있으며, 사이토카인 조절망

(cytokine mediating network)에 관한 연구도 진행되었으며, 이를 치료의 단계에도 이용하고 있다.

하지만, 근골격계 종양에 대한 사이토카인의 연구는 미개척 분야로 골육종(osteosarcoma)과 같은 대표적인 골종양에 대한 연구가 1980년대 후반에서부터 시작되고 있으나(2,3), 대부분의 양성종양과 흔치 않은 악성종양에 대한 연구는 거의 전무한 상태에 있다.

이에 이 논문에서는 임상에서 자주 접하는 다양한 양성 및 악성의 근골격계 종양에서의 케모카인의 발현 양상을 관찰하여 종양의 분류 혹은 종류에 따른 케모카인의 발현 특성을 분석 하고자하였다.

대상 및 방법

연구 대상

2000년 2월에서 2000년 7월 사이 영남대학교 의료원에서 종양 적출술을 실시한 환자 7명의 근 골격계 종양조직을 대상으로 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)과 RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA)을 이용하여 케모카인 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10의 유전자 발현을 관찰하였다.

RNA 분리를 위하여 TEL-TEST사(TX, USA)의 RNAzol B를 사용하였으며, 케모카인 유전자 발현을 관찰하기 위한 RT-PCR은 RNA

PCR kit (N808-0017 Perkin Elmer, USA)를 사용하였고 RPA는 RiboQuant (Pharmingen, USA)의 multi-probe RNase protection assay system을 이용하였으며, 이때 lymphotactin, RANTES, IP-10, MIP- α , MIP- β , MCP-1, IL-8, 및 I-309의 8종류 케모카인 발현 유무를 관찰할 수 있는 hck-5 template set을 사용하였다. RT-PCR에 사용된 케모카인 primer들은 바이오니아사(충북 청원군)로부터 구입하였다. 사용된 케모카인 primer 염기서열은 다음과 같다.

MIP-1 α (97 bp)의 경우, sense는 5'-CTC TGC ACC ATG GCT CTC TGC AAC-3' 이고, antisense로는 5'-TGT GGA ATC TGC CGG GAG GTG TAG-3' 이다. MIP-1 β (89 bp)의 경우 sense는 5'-CTC CTC ATG CTA GTA GCT GCC TTC-3' 이며, antisense는 5'-GGT GTA AGA AAA GCA GCA GGC GGT-3' 이다. 그리고, IP-10 (10 bp)의 경우에는 sense는 5'-GGA ACC TCC AGT CTC AGC ACC-3' 이며, antisense는 5'-GCG TAC GGT TCT AGA GAG AGG TAC-3' 이다. Loading 대조군으로 사용된 β -actin (712 bp)의 sense는 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3' 이고, antisense는 5'-GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC-3' 이다. 그 외 일반 시약들은 시판 특급 순수 시약들을 사용하였다.

연구 방법

환자로부터의 조직의 분리 및 운반, 보관

수술실에서 조직이 분리되면 즉시 아이스박스에 담아 -70°C 질소 탱크에 보관하여 여러 시료가 모이면 함께 실험에 착수하였다.

RNA의 분리

RNA의 분리는 RNA zol B (TEL-TEST, USA)법을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, -70°C에 보관된 조직을 아이스를 이용하여 냉동 유지 상태에서 가루가 될 때까지 빠른 시간 내에 으갠 뒤 이를 RNA zol B가 1 ml 들어 있는 1.5 ml 멸균 튜브에 옮겨 RNA zol B와 잘 섞은 후 100 μ l의 클로로포름을 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다.

그 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 뒤 같은 양의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분간 정치시킨 후 원심 분리하여 얻어진 침전물은 에탄올로 세척한 후에 공기 중에서 말린 뒤 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 첨가된 증류수에 녹여서 이중 2 μ l를 취하여 DEPC에 500배 희석하여 흡광기를 이용하여 농도를 측정한 후 RT-PCR 및 RPA의 시료로 사용하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

PCR 시험관에 농도가 100 ng/ μ l의 RNA 3 μ l, MgCl₂ 1 μ g/ml, 10 \times PCR buffer 2 μ l, dNTP 각각 2 μ l씩 8 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase (M-MLVRT; RAV-2) 1 μ l, oligo {dT} 1 μ l가 혼합된 RT 시료 17 μ l를 넣고 그 위에 mineral oil을 중첩 시킨 후 42°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그 후 99°C에서 5분간, 5°C에서 5분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화시킨 다음 PCR을 실시하였다. PCR master mixture는 MgCl₂ 4 μ g/ml, 10 \times PCR buffer 8 μ l 그리고 Taq polymerase 0.5 μ l와 멸균 증류수를 혼합시켜 전체 78 μ l가 되도록 하였다. 여기에 각각 20 μ M의 sense primer와 antisense primer를 1 μ l 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR은

thermal cycler (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 실시하였으며, 처음의 thermal cycling 단계는 MIP-1 α 와 MIP-1 β 의 경우 94°C에서 45초 동안의 불활성화 단계, 62°C에서 1분 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 증합 단계로 구성되어 35회의 thermal cycling을 실시하였고 β -actin과 IP-10의 경우 94°C에서 45초 동안의 불활성화 단계, 59°C에서 1분 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 증합 단계로 구성되어 31회의 thermal cycling을 실시한 뒤 별도로 72°C에서 10분 동안 더 핵산 증합 반응을 실시하여 부분적으로 신장된 산물을 완전한 가닥으로 완성시켜 주는 단계로 하였다.

증폭된 상보 DNA는 8% polyacrylamide gel 상에서 1배 농도의 TAE buffer로 150 volt에서 50분간 전기 영동 시켰다. EtBr (ethidium bromide) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 20분 염색 후 나타나는 띠(band)를 관찰하였다. DNA marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

RNase protection Assay (RPA)

RiboQuant에서 제시한 RPA 실험 방법에 따라 RPA를 실행하였다. 먼저 probe 합성을 위하여 [α -32P] UTP 10 μl , 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 μl 를 혼합하여 37°C, 1시간 정치후 DNase 2 μl 를 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤 20 mM EDTA 26 μl , Tris-saturated phenol 25 μl , chloroform; isoamyl alcohol (50:1) 25 μl , Yeast tRNA 2 μl 를 넣어 혼합, 원심분리 후 위층을 새 멸균 튜브에 옮긴다. 여기에 50 μl 의 chloroform; isoamyl alcohol (50:1)를 첨가 후 원심분리하여 다시 위층을

취하고 4 M ammonium acetate 50 μl , ice cold 100% 에탄올 250 μl 를 첨가하여 -70°C에서 30분간 방치한다. 다시 원심분리 후 침전물을 100 μl 의 냉각된 90% 에탄올로 한번 씻은 후 공기 중에 말렸다. 그 후 50 μl 의 hybridization buffer로 침전물을 녹인 뒤 scintillation counter로 CPM을 측정하여 사용 전 까지 -20°C에 보관하였다.

분리된 total RNA를 hybridization buffer 8 μl 로 녹인 뒤 위의 준비된 probe를 2 μl 첨가하여 섞은 후 mineral oil을 증첩하고 90°C에 둔 뒤 곧바로 56°C에서 12-16시간 정치시켰다. 준비된 probe와 RNA 혼합물에 RNase cocktail 100 μl 를 oil 아래 층으로 넣은 뒤 10초 동안 원심분리 후 30°C에서 45분간 정치시킨다. 그 동안 proteinase K buffer 390 μl , proteinase K 30 μl , yeast tRNA 20 μl 로 구성된 proteinase K cocktail을 만들어 새 튜브에 18 μl 씩 분주하고 RNase digest를 oil이 섞이지 않게 조심스럽게 취하여 proteinase cocktail이 있는 튜브로 옮긴 뒤 vortex후 37°C에서 15분간 정치한다. 65 μl 의 Tris-saturated phenol과, 65 μl 의 chloroform; isoamyl alcohol (50:1)을 첨가 후 원심분리한 다음 조심스럽게 위층을 취하여 새 튜브에 옮긴 뒤 4 M ammonium acetate 120 μl , ice cold 100% 에탄올 650 μl 를 넣고 -70°C에 30분간 정치한다. 그 후 원심 분리하여 용액을 제거한 뒤 냉각된 90% 에탄올로 씻은 후 공기 중에 침전물을 말렸다.

말린 침전 시료는 5 μl 1X loading buffer로 녹인 뒤 전기영동의 시료로 사용하였다. 8% acrylamide/8 M urea로 구성된 전기영동 겔의 각 well에 1000-2000 cpm/g 활성도의 probe size marker와 각각의 시료를 넣은 뒤 250 V

에서 약 2시간 30분 동안 전기영동을 실시하였다. 그 후 겔을 조심스럽게 필터종이에 부착시킨 뒤 1시간 동안 진공 건조시키고 완전히 말린 후 이를 -70°C에서 X-ray 필름에 적정시간 노출시켜 결과를 관찰하였다.

성 적

환자의 평균 연령은 48.9세로 13세에서 64세까지의 분포를 보였으며, 이 중 남자가 3명, 여자가 4명이었다. 사용한 적출 종양의 원 종양은 조직학적 확진을 받았으며, 환자의 병명은 지방종(lipoma) 1예, 방골성 골종(parosteal osteoma) 1예, 내연골종(enchondroma) 2예, 색소용모결절성 활막염(pigmented villonodular synovitis) 1예, 결절종(ganglion) 1예였으며, 전이성 편평세포암 (metastatic squamous cell carcinoma)이 1예가 각각 있었다(Table 1). 각

종양의 적출 부위는 Table 1과 같다.

이 환자들의 적출 종양조직에서 RT-PCR 분석을 통한 케모카인 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10의 발현 양상은 Table 2 및 Fig. 1과 같다. 지방종의 경우는 MIP-1 α 는 발현하지 않았고, MIP-1 β 와 IP-10이 발현하였으며, 방골성 골종의 경우도 같은 결과를 얻었다.

내연골종의 경우 두 환자에게서 각기 다른 결과를 볼 수 있었는데, 62세 여자 환자의 족부 제 4근위 지골에서 얻은 조직에서는 상기의 케모카인 모두를 관찰할 수 있었으나 13세 남자 환자의 수부 제 4 근위 지골에서 얻은 조직에서는 상기한 모든 케모카인이 발현하지 않았다. 색소용모결절성 활막염의 경우 MIP-1 α 와 IP-10이 타 종양에 비하여 강한 발현을 보이며 이외 MIP-1 β 도 나타났다. 결절종의 조직은 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10이 전혀 발현되지 않았고, 전이성 편평세포암의 경우는 상기한

Table 1. Characteristics of patients and tumor locations

Patients	Age/Sex	Disease	Locations
P1	46/F	Lipoma	Thigh
P2	53/F	Parosteal osteoma	Thigh
P3	62/F	Enchondroma	4th toe proximal phalange
P4	13/M	Enchondroma	4th finger proximal phalange
P5	47/F	Pigmented villonodular synovitis	Wrist soft tissue
P6	57/M	Ganglion	Popliteal area
P7	64/M	Metastatic squamous cell carcinoma	Acetabulum

Table 2. Patterns of chemokine mRNAs shown by RT-PCR analysis

Chemokine	Patients						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
MIP-1 α	-	-	+	-	++	-	+
MIP-1 β	+	+	+	-	+	-	+
IP-10	+	+	+	-	++	-	++

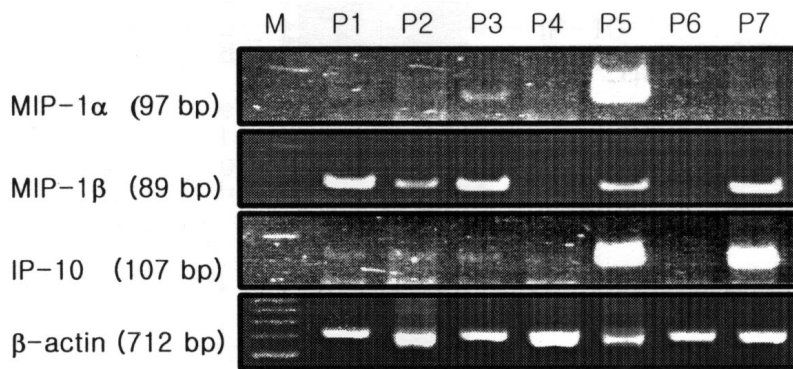


Fig. 1. mRNA expression of chemokines in bone tumor tissues shown by RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from bone tumor tissues, and RT-PCR was performed with primers which were described in materials and methods. M; 100 bp DNA ladder.

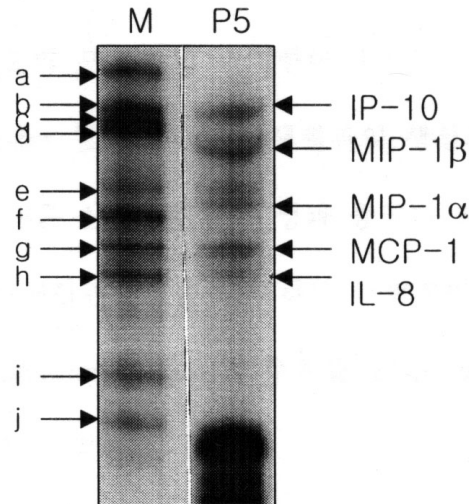


Fig. 2. Patterns of chemokine mRNAs in tumor tissue from P5 shown by RPA analysis. RPA was performed with total cellular RNA, extracted from frozen tissue and multiprobe template set described in materials and methods.

M; probe set (hck-5) as size markers	a; lymphotaxin
b; RANTES,	c; IP-10
d; MIP-1β	e; MIP-1α
f; MCP-1	g; IL-8
h; I-309	i; L32
j; GAPDH	

케모카인이 모두 발현하였고, 특히 IP-10의 강한 발현성을 보였다. 발현도를 비교하여 보면, 색소 용모결절성 활막염의 경우에는 다른 환자의 적출 종양에 비해 MIP-1 α , IP-10이 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 색소용모결절성활막염 조직을 lymphotax- in (LTN), RANTES, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8, 그리고 I-309의 총 8종 케모카인의 발현도 관찰이 가능한 RPA를 실시한 결과는 Fig. 2와 같이 IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β 이외에도, MCP-1와 IL-8가 발현됨을 관찰할 수 있다.

고 찰

사이토카인(cytokine)은 면역작용 매개 물질로서 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 케모카인(chemokine)은 특정세포에 대하여 화학주성을 가지는 사이토카인의 한 부류로 정의되며 약 50여 종류가 밝혀져 있다.

MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 CC 케모카인으로 숙주 방어기전(염증작용)시 일차적으로 단핵세포들에게 주된 화학주성으로 작용하여 단핵구나 림프구를 염증부위로 불러 모으는 대표적 케모카인이다. 이 케모카인이 결핍된 경우 염증반응에 불완전한 단핵구들의 순환이 초래된다. MIP-1 α 의 경우에는 조혈모세포의 증식 억제, 알레르기성 염증 반응, HIV-inhibitory property에 관여할 것으로 추측하고 있으며(4), 최근 연구결과에 의하면 초기 조혈세포의 분화를 제한하여, 혈액 생성에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(5,6). 또한, MIP-1 α , MIP-1 β 는 간 이식 후 이식 거부에 강하게 발현되어 이식 손상, 즉 T 세포 매개 이식 손상에 작용할 것으로 추측하고 있다(7). 한편 MIP-1 α 와 MIP-1 β

는 모세포 복제를 선택적으로 정지시키는 특성이 있어 악성 종양에 대한 항암 화학요법의 부가물로 개발 되어왔다. MIP-1 α 는 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 다양한 여러 자극에 의해서 골수장 기질세포의 미세 환경 안의 세포에서 만들어진다. IL-1 β 와 TNF- α 는 human osteoblast-like cell과 골육종 세포를 자극하여 MIP-1 α mRNA 발현을 과도하게 빠르게 하고 많은 양의 단백을 생성하는 특성이 있으나, 정상적인 기본상태에서는 MIP-1 α mRNA와 단백질은 검출되지는 않는다. human osteoblast-like cell은 조혈전구 물질의 초기 표현형을 유지하고, 조혈작용을 보조하기 위해서 조골모세포와 조혈세포가 밀접하게 연관된 부위에서 MIP-1 α 를 만들어 내는 것으로 생각되어진다(8,9).

C-X-C 케모카인 IP-10(10-12)은 케모카인 platelet factor-4(12,13)와 함께 IFN- γ 가 강한 발현 유도 인자로 알려져 있으면서 주로 T 세포, 단핵구에 선택적으로 작용하는 특성이 있다. IP-10와 PF-4는 신생혈관생성 정체 효과가 있어 종양 형성 억제 작용을 한다고 알려져 있다. 이때, 신생혈관생성을 억제하는 근원적인 기전은 특정 케모카인이 내피세포의 황산 헤파란(heparan sulfate)기 부위를 TGF- α 등과 같은 다른 성장 인자로 대체하는 능력과 관련이 있다(12). 이외의 신생혈관생성을 정체시키는 케모카인으로는 Mig 등이 있고, 촉진하는 케모카인으로는 GRO- α , ENA-78, IL-8 등이 있으며, IL-8은 호중구에 선택적으로 작용하는 특성으로 급성 염증성 감염에 대한 연구대상이 되었다. 그 외에도 MCP-1, 2, 그리고 3은 신경교종(glioma)과 골육종(osteosarcoma)의 세포로부터 분리하였고(14,15), RANTES는 주로 알레르기성 염증반응에서 많이 연구 되어왔다.

많은 케모카인들이 종양세포로부터 생성되고 인체 종양 내에 존재하지만(16), 종양생물학에서의 케모카인의 역할은 전부 알려져 있지 않다.

이 연구에서 특징적인 케모카인의 발현을 보인 색소 용모결절성 활막염은 30에서 40대에 호발하며, 남녀가 비슷하게 발생된다. 주로 큰 관절에 호발하거나 작은 관절, 건초나 점액낭에서도 발생된다. 슬관절, 고관절과 같은 하지에서 호발하며 활막을 침범하며, 수부나 완관절과 같은 상지에서 발생하는 경우에는 건활막(tenosynovium)을 침범한다. 병리조직 소견상 활액막에 용모결절성 모양을 가지며, 활액막하 조직에 조직구(histocyte)가 많이 있고, 이 조직구의 일부는 혈철소를 함유하고 있으며, 다핵성 거대 세포와 지방 함유 대식 세포가 있다. 색소 용모결절성 활막염은 다핵 거대 세포를 가진 과혈관 증식성 활막을 특징으로 하며 관절면 연골을 파괴하고 관절주변의 골조직에 미란을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 골 파괴 작용이 바로 사이토카인에 의해 조절되는 것으로 알려졌다(17).

연구의 시작에는 다양한 근골격계 종양에서 발현되는 케모카인 유전자를 분석하여 각 종양의 발현 양상을 비교, 분석하려 하였다. 그러나, 제한적인 증례의 수집으로 인하여 본 연구에서 얻은 자료만으로 각 종양의 특징적인 케모카인 유전자 발현을 대표한다고 하기에는 무리가 있었다. 하지만, 본 연구를 통해 관찰한 몇 가지 근골격계 종양의 유전자 발현은 종양에 따라 타 종양에 비하여 대별되는 매우 뚜렷한 발현양상의 차이를 보이고 있다. 특히, 색소 용모결절성 활막염과 전이성 편평 세포암은 타 종양에 비하여 특징적인 케모카인 발현을

보이는데 이 두 종양 모두 골조직에 매우 공격적인 임상 양상을 보인다.

두 종양에서 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10 특히 공통적으로 IP-10 유전자의 강한 발현을 관찰할 수 있는데, 이들 케모카인이 골파괴와 연관이 있을 것으로 추측하고 있다.

이 연구의 결과가 비록 근골격계 종양의 케모카인 발현을 대표하는 충분한 자료를 제공하지는 못하지만 앞으로 더 많은 연구가 이루어지면 현재까지 알려진 케모카인의 기능에 대한 이해를 보다 넓힐 수 있을 것이며, 바꾸어서 근골격계 종양의 특징에 대한 이해에도 도움을 줄 수 있을 것이다. 나아가 이들의 연관성에 관한 보다 많은 연구가 이루어져 유전자를 이용한 근골격계 종양의 치료 및 임상적응에 도움을 줄 것으로 기대한다.

결 론

케모카인은 사이토카인의 한 부류로 염증반응 시 다양한 면역세포를 염증부위에 불러들이는 화학 주성의 기능 이외에 다양한 면역작용을 하는 일종의 면역매개 물질로 알려져 있다. 하지만, 근골격계 종양에 대한 케모카인의 연구는 일천한 편이며 골육종과 같은 대표적인 골종양에 대한 연구가 1980년대 후반에서부터 시작되고 있다.

2000년 2월에서 2000년 7월 사이에 영남대학교 의료원에서 종양 적출술을 실시한 환자의 적출 종양조직으로 골종양에서의 케모카인 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10의 유전자 발현을 관찰하여 근골격계 종양의 종류에 따른 케모카인의 특성을 분석하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 지방종의 경우는 MIP-1 α 유전자는 발현

하지 않았고, MIP-1 β 와 IP-10 유전자는 발현하였다.

2. 방골성 골종의 경우도 MIP-1 α 유전자는 발현하지 않았고, MIP-1 β 와 IP-10 유전자는 발현하였다.

3. 내연골종의 경우 두 환자에서 각기 다른 결과를 볼 수 있었는데, 62세 여자 환자의 족부 제 4근위 지골에서 얻은 조직에서는 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10 유전자 모두를 관찰할 수 있었으나 13세 남자 환자의 수부 제 4 근위 지골에서 얻은 조직에서는 상기한 모든 케모카인이 발현하지 않았다.

4. 색소용모결절성활막염의 경우 MIP-1 α 와 IP-10 유전자는 타 종양에 비하여 강한 발현을 보이며 이외 MIP-1 β 유전자도 나타났다. LTN, RANTES, IP-10, MIP- α MIP-1 β , MCP-1, IL-8, 그리고 I-309의 총 8종 케모카인의 발현도를 관찰하는 RPA를 실시한 결과 이 환자의 경우 IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 및 IL-8의 5종의 유전자 발현을 관찰할 수 있었다.

5. 결절종의 조직은 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10 유전자는 전혀 발현되지 않았다.

6. 전이성 편평세포암종의 경우는 MIP-1 α , MIP-1 β 및 IP-10 유전자가 모두 발현하였고, 특히 IP-10 유전자의 강한 발현성을 보였다.

이 연구에서 근골격계 종양의 케모카인의 발현 양상에 대한 다양한 정보를 얻을 수 있었고, 이 연구를 통하여 얻은 결과는 향후 이들을 이용한 사이토카인 조절망을 정립하는데 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 나아가서는 치료 및 진단에 필요한 케모카인 연구에 기초 자료가 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Luster AD: Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7): 436-445, 1998.
2. Kleinerman ES: Biologic therapy for osteosarcoma using liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Hematol Oncol Clin North Am* 9(4): 927-938, 1995.
3. Lisignoli G, Toneguzzi S, Cattini L, Pozzi C, Facchini A: Different expression pattern of cytokine receptors by human osteosarcoma cell lines. *Int J Oncol* 12(4): 899-903, 1998.
4. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, Shi YP, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V: Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4): 631-636, 2003.
5. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL: Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57: 752-762, 1995.
6. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SI, Harlow LA, Di Pietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-1801, 1992.
7. Adams DH, Hubscher S, Fear J, Johnston J, Shaw S, Afford S: Hepatic expression

- of macrophage inflammatory protein-1 alpha and macrophage inflammatory protein-1 beta after liver transplantation. *Transplantation* 61(5): 817-825, 1996.
8. Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G: Bisphosphonate inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27(1): 38-41, 1998.
 9. Taichman RS, Reilly MJ, Matthews LS: Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein-1 alpha in response to interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha stimulation in vitro. *Br J Haematol* 108(2): 275-283, 2000.
 10. Luster AD, Leder P: IP-10, a -C-X-C-chemokine, elicits a potent thymus dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178: 1057-1065, 1993.
 11. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G: Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182(1): 155-162, 1995.
 12. Luster AD, Greenberg SM, Leder P: The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 182: 219-231, 1995.
 13. Sharpe RJ, Byers HR, Scott CF, Bauer SI, Maione TE: Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst* 82: 848-853, 1990.
 14. Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G: Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 176: 59-65, 1992.
 15. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ: Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 169: 1449-1459, 1989.
 16. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD: Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157: 5613-5626, 1996.
 17. O'Keefe RJ, Rosier RN, Teot LA, Stewart JM, Hicks DG: Cytokine and matrix metalloproteinase expression in pigmented villonodular synovitis may mediate bone and cartilage destruction. *Iowa Orthop J* 18: 26-34, 1998.