[UCI]I804:24011-200000236536

2008년 8월

석사학위 논문

근골격계 질환에 효과가 있는 골수 내 Cytokine의 분석

조선대학교 대학원

의 학 과

송 근 상

근골격계 질환에 효과가 있는 골수 내 Cytokine의 분석

Analysis of the Cytokine in the Bone Marrow on the Effect of Musculoskeletal Disorders

2008년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

송 근 상

근골격계 질환에 효과가 있는 골수 내 Cytokine의 분석

지도교수 하 상 호

이 논문을 의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2008년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

송 근 상

송근상의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수 이 상 홍

위원 조선 대학교 교수 유 재 원

위원 조선 대학교 교수 하 상 호

2008년 5월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ---------- 1

서론 ---------- 2

연구대상 및 방법---------- 3

결과 ---------- 5

고찰 ---------- 6

결론 ---------- 10

참고문헌---------- 11

표목차

Table 1. 단핵세포 동정 후 1일, 7일째 분비한 사이토카인 ---------- 15

Table 2. 골수혈액에서 단핵세포의 분리(피콜-중첩과 비교) ---------- 16

Table 3. 골수혈액에서 얻은 혈장내 사이토카인 함유량(피콜-중첩과 비교)---------- 17

표목차

Fig. 1. 채취 당일 검사한 헤파린 처리후 검사한 값과 피콜 방식으로 얻어진 결과치 ---------- 18

Fig. 2. 단핵구에서 1일, 7일째 측정한 cytokine 값------ 19

ABSTRACT

Analysis of the Cytokine in the Bone Marrow on the Effect of Musculoskeletal Disorders

Kun Sang Song
Advisor : Prof. Ha Sang-Ho M.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Purpose: Cytokines involve in both inflammatory and healing mechanism. The authors wanted to evaluate the changing nature of cytokines and thereby appropriate time for using bone marrow derived monuclear cells(BM-MNC) to acquire best effect.

Materials and Methods: Bone marrow was aspirate from patients who consented to the procedure. Cytokines from plasma layer acquired from 30 minutes of centrifugation at 1,820 rpm was analyzed. Cytokines were evaluated after abstraction of mononuclear cells using ficoll method. The cytokines evaluated were Eotaxin, GM-CSF, IFN r, IL-1 a, IL-1 b IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1a, RANTES, TNF-a.

Results: High level of IP-10, IL-12 p40, RANTES were detected after centrifugation. Additionally, high level of IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MIP-1a were noticed 1, 7days following culture.

Conclusion: Mononuclear cells derived from bone marrow has high activity character and change in cytokine was observed after simple culture. Our results show that bone marrow derived mononuclear cells immediately after centrifugation of bone marrow is most effective.

Key Words : Bone marrow, Cytokine, RANTES, IP-10, IL-12 P40

서 론

장골에서 유래된 혈액의 치유 능력은 잘 알려진 사실이다. 외상과염과 회전근개 파열 봉합 후 치유 촉진을 위해 장골에서 채취한 골수를 주입하여 치료 효과를 얻었고, 이의 과학적 근거를 마련하고 치유 효과를 높일 수 있는 시점을 찾고자 하여, 이때 주입한 각 골수에서 사이토카인(Cytokine)과 케모카인(Chemokine)을 분석하였다.

사이토카인과 케모카인은 생체 변화에 중요한 역할을 하며 염증 변화 및 치유 기전에 관여하게 된다. 본 연구자들은 골수 추출물의 사이토카인 및 케모카인을 정량적으로 분석하고, 배양된 골수유래 단핵세포에서 시간차에 따른 변화를 관찰하고 평가하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 자가 골수로부터 단핵세포 및 혈장의 분리

내원한 환자들 (n=8)로부터 동의서를 얻은 후, iliac bone 으로부터 15 ml 내지 20 ml 가량의 골수 혈액을 채취하였다. 얻어진 골수 혈액 (BM aspirates)를 동일한 양으로 나누어 하나는 1,820 rpm의 속도로 실온에서 30분간 원심하여 상층에 분리된 혈장일부와 세포 펠렛층의 일부를 수확해 PBS로 2회 세척한 다음, 얻어진 단핵세포의 수를 측정하였고 다른 하나는 골수 혈액의 1/2정도 볼륨의 Ficoll에 중첩(loading)하여, 이를 1,820 rpm의 속도로 실온에서 30분간 원심하여, 중간의 단핵세포층을 따로 회수하여 이를 2회 세척한 다음, 얻어진 단핵세포의 수를 측정해 위의 두 방법을 통해 수확된 단핵세포의 수를 비교하였다. 단핵 세포수의 측정은 5% acetic acid와 1:1로 섞어 5분간 반응시켜서 RBC를 제거한 후, 단핵세포 (mononuclear cells)의 수를 hemacytometer로 측정하였다. 각각의 골수 혈액으로부터 얻어진 단핵세포의 수는 다음과 같다(Table 1).

2. 분리한 혈장의 사이토카인 성분 분석

내원한 환자들 (n=8)로부터 동의서를 얻은 후, iliac bone으로부터 15 ml 내지 20 ml 가량의 골수 혈액을 채취하였다. 얻어진 골수 혈액 (BM aspirates)를 동일한 양으로 나누어 하나는 1,820 rpm의 속도로 실온에서 30분간 원심하여 상층에 분리된 혈장을 수확하고, 다른 하나는 골수 혈액의 1/2정도 볼륨의 Ficoll에 중첩(loading)한 다음, 이를 1,820 rpm의 속도로 실온에서 30분간 원심하여, 상층의 혈장을 수확하였다. 각각의 방법을 통해 수확된 혈장을 5분의 1로 희석하고, Luminex-200 (MAP™ Technology)를 이용하여 혈장 속에 포함된 사이토카인의 성분을 분석, 비교하였다. Luminex-200을 이용한 사이토카인 분석은 다음과 같이 실시한다. 간단히 요약하면, 96 well 필터 플레이트에 2배수로 연속해서 희석한 기준(standard) 버퍼와 5분의 1로 희석한 혈장을 각 well에 50 ul씩 첨가한 후, 잘 섞이게 흔들어 준 다음, 비드(bead)가 포함된 버퍼를 25 ul씩 첨가하여 호일로 싸서 상온에서 2시간 동안 200 rpm으로 교반하였다. 1차 반응이 끝난 다음, 진공 장치를 이용해 버퍼를 제거 하고, 사이토카

인 분석 버퍼를 이용해 필터 플레이트를 씻어주었다. 이 필터 플레이트에 2차 반응 물질인 바이오틴(biotin) 버퍼를 25 ul씩 첨가하여, 호일로 싸서 상온에서 1시간 30분 동안 200 rpm에서 교반하였고, 마지막으로 사이토카인 분석 버퍼와 streptavidin-phycoerythrin 버퍼를 1:12.5로 희석 한 용액을 25 ul씩 넣고 이를 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 필터 플레이트를 beadview 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각각의 방법에 의해 얻어진 혈장액 속에 포함된 사이토카인의 함유량은 다음과 같다(Table 2, 표에 나타낸 혈장 내 사이토카인 함유량은 5분의 1로 희석된 양을 의미한다, Fig. 1).

3. 단핵세포 동정 후 배양

동의서를 받은 환자에서 골수 혈액을 채취하고 헤파린 처리 후 1,820 rpm으로 30분간 원심분리 후 얻어낸 혈장층에서 사이토카인 분석하고 피콜 방식을 통하여 단핵세포를 동정한 후 1일, 7일 후 분비한 사이토카인을 평가하였다. 이때 검사한 사이토카인은 Eotaxin, GM-CSF, IFN r, IL-1 a, IL-1 b IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1a, RANTES, TNF-a 이었다.

결 과

원심분리 만을 시행한 경우 IP-10, IL-12 p40, RANTES가 높은 수치를 보였지만 배양 1, 7일 후에는 추가적으로 IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a가 높은 수치를 보였다(Table 3, Fig. 2).

이러한 결과는 연령과 성별에 관련이 없었으며, 헤파린 처리군과 피콜 방식으로 채취한 당일 군에서는 동일한 결과를 관찰 할 수 있었다. 이때 헤파린 처리군은 1,820rpm으로 원심 분리한 후 얻어진 혈장에서 채취한 값으로 약제를 사용하여 분리하는 피콜 방식과 유사한 결과를 얻은 것은 초기 사이토카인의 성분이 양군이 유사함을 의미한다.

반면 배양된 단핵 세포에서 검사한 사이토카인의 수치 중 IL-6, IL-8, MCP-1 등은 시간 경과에 따라 증가 양상을 보여준 반면 RANTES와 MIP-1a는 시간 경과에 따라 감소의 형태를 보여주고 있었다(Table 3).

고 찰

정형외과적 치료에서 자가 장골 골 이식(autogenous iliac bone graft)은 골 유합을 위한 최선의 방법으로서 골 형성능(osteogenic), 골 유도능(osteoinductive), 골 전도능(osteoconductive)이 가장 뛰어나다[40]. 실제로 장골의 골수 내에는 다양한 분화능을 지닌 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)가 존재하고 있고[35], 수 많은 연구에서 자가 장골 내의 골수가 인체의 병적 상태에 대한 치료적 효과를 갖고 있음이 알려져 있으며, 이 중 자가골 골수 단핵세포(autologous BM-MNC)와 사이토카인(Cytokine) 그리고 케모카인(Chemokine)이 치료적 효과에 관여하게 된다[6,8,15,20,21,23,28,33].

RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)는 섬유모세포(fibroblast)[26,36], 상피세포(epithelial cell)[18,26,41]와 내피세포(endothelial cell)[10,32], 활성화된 T-세포(activated T-cell)[34] 그리고 대식세포(macrophage)[13]에서 생산되는 CC chemokine 의 일종이며, RANTES의 발현은 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1ß (IL-1ß) 그리고 interferon-r(IFN-r)[18,22,26,32,36,41]에 의해 유도될 수 있다. 또한 T 세포, 단핵세포(monocyte), 호산구(eosinophil) 그리고 호염구(basophil)를 활성화시키는 강력한 화학유도물질이다[1,39].

골에 대한 연구에서 RANTES는 류마토이드 관절염, 골관절염, 골수염, 외상후 반응 등에 있어 병적인 진행에 연관된다는 보고[27,47]가 있으며, 염증 유도 cytokine인 TNF-α, IFN-r,IL-1 등이 비조혈세포(nonhematopoietic cell)에서의 RANTES 발현을 현저하게 상승 조절(Up-regulation)시켜 host의 tissue damage를 초래한다는 보고도 있다[7,9,25,37].

그러나 RANTES는 파골세포와 조골세포 사이에서 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있으며, PI3K 경로를 통해서 조골세포의 이동에 관여하고 있고, 조골세포의 apoptosis에 저항하는 역할을 하고 있으며 이는 골형성에 도움이 되는 것으로 보인다.[48].

Forsberg 등[15]은 심각한 사지의 창상에서 분비되는 표지자를 연구함으로써 창상 치유와 관련된 사이토카인 및 케모카인에 대하여 연구하여 창상이 치유될 것인지 봉

합이 터져 벌어지게(dehiscence)될 것인지 예측하였다. 창상의 유출액을 분석한 후 6주간 추시 관찰하여, 창상 치유 여부와 비교 분석하였다. 분석한 사이토카인과 케모카인은 Procalcitonin, Eotaxin, granulocyte macrophage colony stimulating factor, IFN-r, IL-1,2,3,4,5,6,7,8,10,12,13,15, IFN-r inducible protein-10(IP-10), Monocyte chemotactic protein-1(MCP-1), Macropahge inflammatory protein-1α(MIP-1α), RANTES, TNF-α 이다. 창상 유출액 분석상 Procalcitonin의 증가, RANTES의 감소, IL-13의 감소가 창상 봉합, 치유 실패와 연관이 있었고, Procalcitonin 농도가 220 pg/ml 미만, IL-13의 농도가 12 pg/ml 이상, RANTES의 농도가 1000 pg/ml 이상인 경우는 치유에 실패하지 않았다.

창상 치유에 관련하여 혈청과 창상에서 각각의 사이토카인 및 케모카인의 정량적 분석하여 서로 다른 결과[15]를 보이고 있으며, 이는 병변 또는 치료의 효과를 얻고자 하는 부위에서의 사이토카인 및 케모카인의 상태가 중요함을 대변해 줌과 동시에, 치료 효과가 있는 사이토카인 및 케모카인을 병변에 직접 주입하는 방법이 치료 효과가 더 클 것임을 시사한다.

병변의 치유를 위해서 병변에 혈류량을 증가시키고 신생 혈관 형성을 촉진하여 치료의 효과를 증대하는 것은 중요한 일이다. 특히 허혈 상태로 인한 병적인 상태의 지속은 치료가 더디게 되므로, 자가 골수 세포와 사이토카인 그리고 케모카인의 투여를 통하여 좋은 혈류 상태를 유지하고 신생 혈관을 촉진하여 치료적 효과를 증대할 수 있겠다[5,11,14,15,21,23]. 자가 골수 단핵 세포에는 내피 전구 세포(endothelial progenitor cell)이 존재하며 이는 nitric oxide의 분비를 통해 신생 혈관 촉진과 성숙한 내피 세포의 재생을 촉진하게 된다[4]. 혈관 확장을 통한 혈류량의 증가와 신생 혈관의 촉진에 nitric oxide가 중요한 역할을 하고 있지만, nitric oxide의 농도가 과도하게 높은 경우는 RANTES의 형성을 촉진하기 위하여 TNF-α의 농도가 상승하더라도 RANTES의 형성을 억제할 수 있다[16].

IP-10의 주화성에 대한 특성(chemotactic property)은 T-cell에 Ca 이온을 유입하는데 유도작용[29]을 하며, monocyte의 주화성[42], endothelial cell의 증식억제[30], 혈관 신생[2,3], hematopoietic progenitor에 의한 colony 형성의 억제[38], natural killer cell의 주화성 및 세포내 Ca 이동[31], 그리고 lymphocyte 주화성[42-44] 등이 있다.

이러한 IP-10(interferon-r-inducible protein-10)의 lymphocyte에 대한 주화성은 창상 치료에 중요한 역할을 하고 있다. 이는 B형 간염과 같은 만성 바이러스성 감염에서는 세포 손상을 유발하는 것으로 알려져 있으나[45], 수상 후 창상 연구에서, 면역 염색을 통한 검사상, IP-10 및 MIG 의 수치가 상승됨을 확인 할 수 있었다[12].

IL-12의 subunit인 P40은 치상세포(dendritic cell)에서 분비되며 폐렴(pneumonia)과 건선(psoriasis)과 같은 감염성 알러지성 질환의 면역에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 반면 C형 간염에서는 세포 매개 면역에 관여하여 자가 또는 interferon의 메커니즘과 연계하여 바이러스 감염 세포를 치료하는데 역할을 하고 있다[19,49]. 또한 다발성 외상 후에 IL-12의 상승이 관찰되고 있으며, 패혈증 및 다발성 장기 기능 부전으로 사망한 경우 IL-12가 감소함이 보고되고 있다[24,46]. 본 연구에서 증가된 IL-12 p40의 의미는 손상된 세포 조직의 재건과 동시에 재형성에 관여하는 것으로 보인다.

한편 염증 매개 사이토카인인 Monocyte Chemotactic Protein-1(MCP-1/JE)과 macrophage Inflammatory Protein-1α(MIP-1α)의 배양 시 증가는, 치료적 효과를 기대하는 사이토카인만을 획득하고자 하는데 있어 원하지 않은 결과라고 할 수 있으며, 이러한 염증 매개 사이토카인이 증가된 상태의 혈장 성분의 투여는 치료적 효과를 반감시킬 수도 있을 것이라고 생각된다.

위에서 기술된 사이토카인 및 케모카인은 신체의 특정 부위에서, 조직 소실과 동시에 생성의 작용을 가지고 있다. 이는 골의 항상성에서도 골 파괴와 형성의 조화 속에서 건강한 치유가 이루어 짐과 같은 현상으로 볼 수 있다.

치료적 효과를 위해서 단순한 조직 치유 및 형성 능력 만을 가진 인위적 치료 방식 보다는 조화를 가진 자가 골수 세포가 조직의 항상성 유지에 도움이 될 것이며 과도한 조직의 형성이나 자연사(apoptosis)를 부적절하게 방어하여 발암 요인을 유발하는 폐해를 예방할 수 있을 것으로 보인다. Sodium salicylate를 이용한 골수 세포에서의 chemokine 유전자 발현 연구에서, MCP-1/JE 와 IP-10 mRNA의 발현을 저해시키는 결과[17]를 얻음으로써 특정한 조작을 통한 특정 인자의 발현 조절이 가능함을 알 수 있다. 따라서 본 연구의 가치는 조직의 치유 기전에 관여할 수 있는 장골 골수 혈장과 얻어진 단핵 세포의 항상성의 기능을 평가함에 있다.

본 연구에서 Mononuclear cell 을 동정하고, 각 배양 시기별 사이토카인과 케모카인의 구성물을 조사함으로써, 임상 적용 및 병변에 주입하는 시점을 파악 할 수 있고, 유해한 사이토카인 및 케모카인의 효과로 인한 부작용을 최대한 줄이며, 치료적 효과를 얻기위한 것은 중요한 일이라 할 수 있다.

단핵구를 배양시 사이토카인과 케모카인의 성상 변화는 배양액의 상태, 자극 요인 및 첨가제에 따라 다양한 결과를 유발하며 심지어 자가 면역을 유발할 수도 있다. 따라서 현재의 연구 단계에서는 수술 당시에 원심분리를 시행한 상층액과 단핵구 층만을 포함하는 것이 혈색소 독성에 의한 염증 변화를 유발하지 않고 투여할 수 있어 안전할 수 있다.

본 연구의 결과에서 자극 요인이 없는 상태에서는 염증성 사이토카인의 수치가 증가함을 관찰할 수 있었으며, 이는 물리적, 생화학적 자극이 상존하는 생체내 환경과는 차이가 있는 것으로 보인다.

이러한 결과에서, 처치를 시행하지 않은 추출 후 즉시 얻어낸 골수 혈장액이 가장 안전하고 효과적인 투여 방식으로 보인다.

향후 특수한 배양 방법의 개발로 치료에 이득이 되는 효과를 보이는 것을 증가시키고, 사이토카인 및 케모카인에 의한 조직 청소 및 재건의 동시 기능을 파악하고 조절하게 됨으로써 과도한 염증 유발 물질, 자연사를 막고 치유를 도모할 수 있는 연구가 필요하다.

결 론

현재 연구에서는 수술 당시 채취한 혈장에서 면역학적으로 생화학적으로 안전한 치료방식으로 보이며 골수 유래 단핵세포는 활성도를 가진 세포로서 단순한 배양 시간에 따라서도 사이토카인과 케모카인의 변화를 관찰할 수 있었으며 효과적인 치료 능력을 가진 단핵구의 투여의 시기 및 배양 조건에 대한 추가적인 연구와 동시배양 (Co-culture) 연구를 시행하여 과학적 근거를 마련할 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

1. **Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al:** *RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. Journal of Immunology, 150: 3442-3448, 1993.*
2. **Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al:** *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. Journal of Experimental Medicine, 182: 155-162, 1995.*
3. **Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, et al:** *Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. Journal of Experimental Medicine, 184: 981-992, 1996.*
4. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al:** *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 275: 964-967, 1997.*
5. **Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, et al:** *Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell injection in patients with refractory angina pectoris and chronic myocardial ischemia: twelve-month follow-up results. Am Heart J, 152: 684 e611-686, 2006.*
6. **Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R:** *Cytokine gene expression in a murine wound healing model. Cytokine, 31: 429-438, 2005.*
7. **Casola A, Henderson A, Liu T, Garofalo RP, Brasier AR:** *Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation. American Journal of Physiology - Lung Cellular & Molecular Physiology, 283: L1280-L1290, 2002.*
8. **Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G:** *Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells, 24: 2052-2059, 2006.*
9. **Deckers JG, Van Der Woude FJ, Van Der Kooij SW, Daha MR:** *Synergistic effect of IL-1alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha on RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. Journal of the American Society of Nephrology, 9: 194-202, 1998.*
10. **Devergne O, Marfaing-Koka A, Schall TJ, et al:** *Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells.[erratum appears in J Exp Med 1994 Aug 1;180(2):775]. Journal of Experimental Medicine, 179: 1689-1694, 1994.*
11. **Dohmann HF, Perin EC, Takiya CM, et al:** *Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings. Circulation, 112: 521-526, 2005.*
12. **Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R:** *Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing.*

Am J Pathol, 153: 1849-1860, 1998.

13. **Fattal-German M, Le Roy Ladurie F, Cerrina J, Lecerf F, Berrih-Aknin S:** *Expression and modulation of ICAM-1, TNF-alpha and RANTES in human alveolar macrophages from lung-transplant recipients in vitro. Transplant Immunology, 6: 183-192, 1998.*
14. **Fealy S, Adler RS, Drakos MC, et al:** *Patterns of vascular and anatomical response after rotator cuff repair. Am J Sports Med, 34: 120-127, 2006.*
15. **Forsberg JA, Elster EA, Andersen RC, et al:** *Correlation of procalcitonin and cytokine expression with dehiscence of wartime extremity wounds. J Bone Joint Surg Am, 90: 580-588, 2008.*
16. **Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J:** *Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. Biochemical Journal, 347 Pt 1: 265-273, 2000.*
17. **Gautam SC, Pindolia KR, Noth CJ, Janakiraman N, Xu YX, Chapman RA:** *Chemokine gene expression in bone marrow stromal cells: downregulation with sodium salicylate. Blood, 86: 2541-2550, 1995.*
18. **Heeger P, Wolf G, Meyers C, et al:** *Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine Rantes. Kidney International, 41: 220-225, 1992.*
19. **Hegazy D, Thurairajah P, Metzner M, et al:** *Interleukin 12B gene polymorphism and apparent resistance to hepatitis C virus infection. Clin Exp Immunol, 2008.*
20. **Hernandez P, Cortina L, Artaza H, et al:** *Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. Atherosclerosis, 2006.*
21. **Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al:** *Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. Circulation, 109: 1215-1218, 2004.*
22. **Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Corrion LA, et al:** *Donor-derived TNF-alpha regulates pulmonary chemokine expression and the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. Blood, 104: 586-593, 2004.*
23. **Izawa H, Kondo T, Usui A, et al:** *Clinical protocol for angiogenesis by intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with severe coronary artery disease: TACT-NAGOYA-HEART. Circ J, 70: 1180-1183, 2006.*
24. **Koller M, David A, Hahn MP, Muhr G:** *[Liberation of interleukin 12 (IL12) after trauma and polytrauma]. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, Freisetzung von Interleukin-12 (IL-12) nach Trauma und Polytrauma.: 115: 453-456, 1998.*
25. **Koyama S, Sato E, Nomura H, et al:** *Monocyte chemotactic factors released from type II pneumocyte-like cells in response to TNF-alpha and IL-1alpha. European Respiratory Journal, 13: 820-828, 1999.*

26. **Kwon OJ, Jose PJ, Robbins RA, Schall TJ, Williams TJ, Barnes PJ:** *Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology, 12: 488-496, 1995.*
27. **Lisignoli G, Toneguzzi S, Grassi F, et al:** *Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts. Cytokine, 20: 231-238, 2002.*
28. **Liu Y, Guo J, Zhang P, et al:** *Bone marrow mononuclear cell transplantation into heart elevates the expression of angiogenic factors. Microvasc Res, 68: 156-160, 2004.*
29. **Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD:** *Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. Journal of Immunology, 156: 932-938, 1996.*
30. **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. Journal of Experimental Medicine, 182: 219-231, 1995.*
31. **Maghazachi AA, Skalhegg BS, Rolstad B, Al-Aoukaty A:** *Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. FASEB Journal, 11: 765-774, 1997.*
32. **Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, et al:** *Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. Journal of Immunology, 154: 1870-1878, 1995.*
33. **Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, et al:** *Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. DNA Res, 13: 169-183, 2006.*
34. **Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM:** *Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. Journal of Immunology, 151: 2601-2612, 1993.*
35. **Pountos I, Giannoudis PV:** *Biology of mesenchymal stem cells. Injury, 36 Suppl 3: S8-S12, 2005.*
36. **Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ, McColl SR:** *Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. Journal of Biological Chemistry, 268: 5834-5839, 1993.*
37. **Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, et al:** *Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. Journal of Immunology, 164: 427-435, 2000.*
38. **Sarris AH, Broxmeyer HE, Wirthmueller U, et al:** *Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of*

early human hematopoietic progenitors. Journal of Experimental Medicine, 178: 1127-1132, 1993.

39. **Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV:** *Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature, 347: 669-671, 1990.*
40. **Simion M, Fontana F:** *Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. Minerva Stomatologica, 53: 191-206, 2004.*
41. **Stellato C, Beck LA, Gorgone GA, et al:** *Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. Journal of Immunology, 155: 410-418, 1995.*
42. **Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, et al:** *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. Journal of Experimental Medicine, 177: 1809-1814, 1993.*
43. **Taub DD, Longo DL, Murphy WJ:** *Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. Blood, 87: 1423-1431, 1996.*
44. **Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ:** *Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. Journal of Immunology, 156: 2095-2103, 1996.*
45. **Wang J, Zhao JH, Wang PP, Xiang GJ:** *Expression of CXC chemokine IP-10 in patients with chronic hepatitis B. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 7: 45-50, 2008.*
46. **Wick M, Kollig E, Walz M, Muhr G, Koller M:** *[Does liberation of interleukin-12 correlate with the clinical course of polytraumatized patients?]. Chirurg, Korreliert die Freisetzung von Interleukin-12 mit dem klinischen Verlauf des polytraumatisierten Patienten?: 71: 1126-1131, 2000.*
47. **Wright KM, Friedland JS:** *Differential regulation of chemokine secretion in tuberculous and staphylococcal osteomyelitis. Journal of Bone & Mineral Research, 17: 1680-1690, 2002.*
48. **Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, et al:** *Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. Endocrinology, 146: 2324-2335, 2005.*
49. **Yin LM, Zhu WF, Wei L, et al:** *Association of interleukin-12 p40 gene 3'-untranslated region polymorphism and outcome of HCV infection. World J Gastroenterol, 10: 2330-2333, 2004.*

Table 1. 골수혈액에서 단핵세포의 분리(피콜-중첩과 비교).

Case no.	Age	Sex	BM aspirate (volume) --> Total MNC no.(x10^6 cells)	
			w/ Ficoll	w/o Ficoll
1	70	Male	6 ml --> 2.18	6 ml --> 5.36
2	48	Female	6 ml --> 1.68	6 ml --> 4.56
3	47	Male	6 ml --> 14.24	6 ml --> 12.32
4	ND	Male	10 ml --> 30.08	10 ml --> 26.24
5	77	Female	8 ml --> 29.12	8 ml --> 20.48
6	35	Male	8 ml --> 12.58	8 ml --> 29.12
7	58	Male	8 ml --> 25.92	8 ml --> 30.72
8	40	Male	8 ml --> 9.92	8 ml --> 62.72

Table 2. 골수혈액에서 얻은 혈장내 사이토카인 함유량(피콜-중첩과 비교).

Cytokines from hBM derived Serum (1,820 rpm/ 30 min)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	eotaxin	GM-CSF	IFN r	IL-10	IL-12(P40)	IL-12(P70)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-8	IP-10	MCP-1	MIP-1α	RANTES	TNA α
No Ficoll	164.98	18.68	79.88	15.39	1288.75	32.39	21.14	54.28	51.24	36.39	1056.50	167.50	214.09	1127.50	32.38
Ficoll	167.13	18.43	81.06	14.40	1310.00	35.35	18.93	62.84	47.25	40.81	1038.50	171.63	239.75	1149.00	32.29

Table 3. 단핵세포 동정 후 1일, 7일째 분비한 사이토카인

Type	Eotaxin	GM-CSF	IFN r	IL-1 a	IL-1 b	IL-10	IL-12(p40)	IL-12(p70)
day 1	205.4	30.9	93.7	132.3	55.4	196.6	435.4	23.5
day 7	90.3	42.9	149.4	353.1	44.5	207.1	335.8	24.8
Type	IL-13	IL-15	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
day 1	16	50.6	31.6	18.1	30.1	17.8	12576.3	56.4
day 7	31.6	58	148	35.1	36.3	39.8	19579.6	49.8
Type	IL-8	IP-10	MCP-1	MIP-1a	RANTES	TNF-a		
day 1	18248.8	15618.8	19420.1	9981.4	18499.9	33.8		
day 7	18833.5	18883.3	19782.5	3340.8	13853	38		

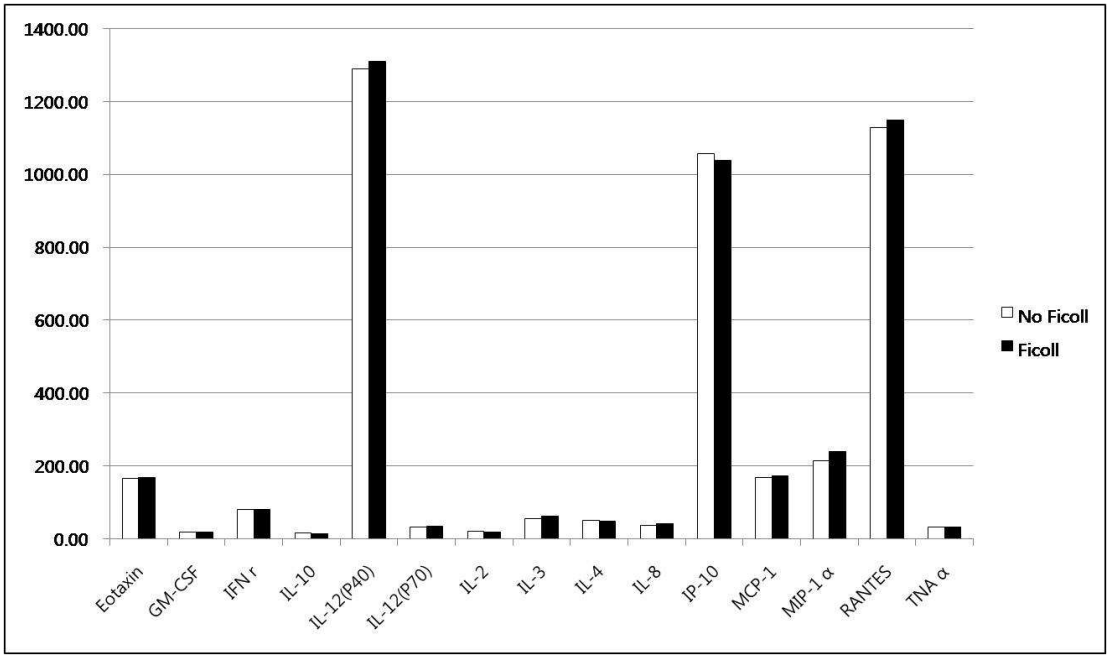

Fig. 1. 채취 당일 검사한 헤파린 처리후 검사한 값과 피콜 방식으로 얻어진 결과치

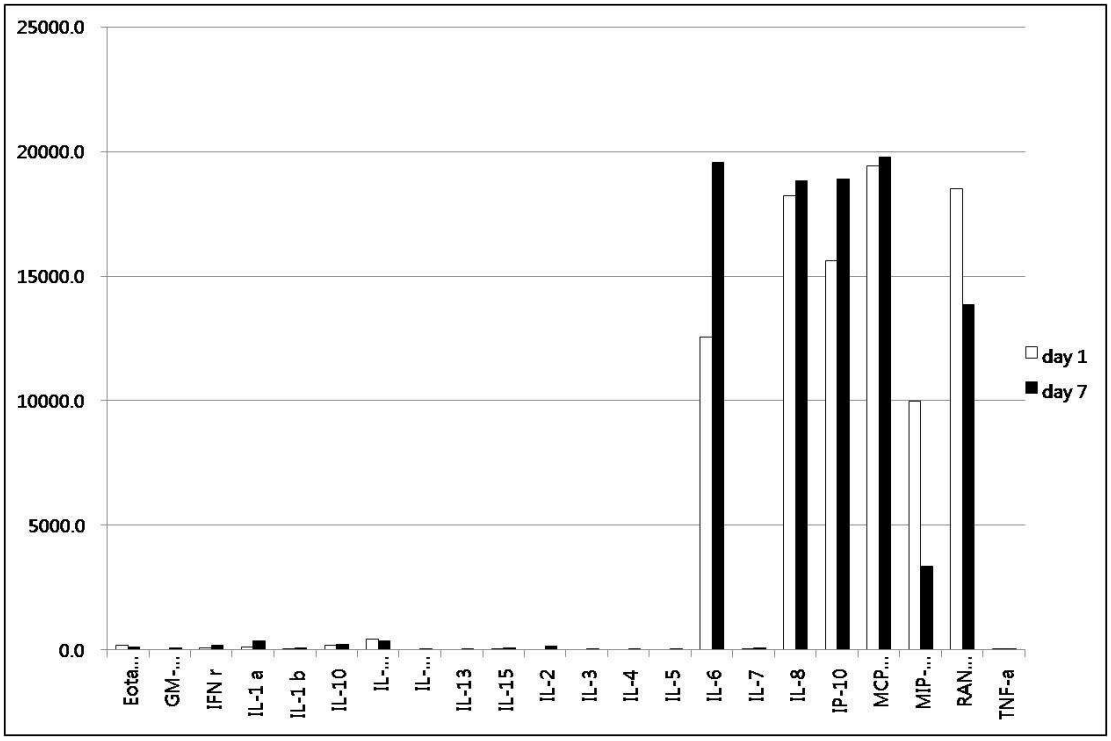

Fig. 2. 단핵구에서 1일, 7일째 측정한 cytokine 값.

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20067621	과 정	석사
성 명	한글: 송근상 한문 : 宋根鍋 영문 Kun Sang Song				
주 소	광주시 북구 문흥동 공간@ 102-707				
연락처	E-MAIL : kakayan@hanmail.net				
논문제목	한글 : 근골격계 질환에 효과가 있는 골수내 Cytokine의 분석 영어 : Analysis of the Cytokine in the Bone Marrow on the Effect of Musculoskeletal Disorders				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2008 년 8 월 일

저작자: 송 근 상 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하