

악관절환자에서 Synovial fluid에 대한 단백질체 분석에 관한 연구

변은선¹ · 김태우¹ · 김상균² · 박태일² · 박준우² · 윤필영³ · 김영균³ · 채창훈⁴

¹서울대학교 치과대학 교정학교실, ²한림대학교 의과대학 구강악안면외과학교실,
³분당서울대학교병원 치과 구강악안면외과, ⁴나노큐어텍 나노-바이오 퓨전 부설연구소

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:113-118)

THE ANALYSIS OF SYNOVIAL FLUID BY PROTEOMICS FROM TMD

Eun-Sun Byun¹, Tae-Woo Kim¹, Sang-Gyun Kim², Tae-Il Park², Jun-Woo Park², Pil-Young Yun³,
Young-Kyun Kim³, Chang-Hoon Chae⁴

¹Dept. of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University

²Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University

³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Section of Dentistry, Seoul National University Bundang Hospital

⁴Institute of Nano-Bio Fusion Technology, NanoCureTech Inc.

Temporomandibular joint disorder (TMD) can induce severe pain but, its pathogenic mechanisms remain poorly understood. In this study, we analyzed proteomes of human synovial fluid in the superior joint space in the patients with TMD, which is obtained during the treatment arthrocentesis. We've got this result that one of the spots was consistently down-regulated in synovial fluid of patients with TMD from analysis of protein pattern. Its molecular weight was estimated to be 33 kDa. Synoviolin was identified in our proteomics analysis of LC/MS/MS. This protein was recently reported as one of the proteins that might affect rheumatoid arthritis (RA). Synoviolin that might be associated with RA was detected in synovial fluid of patients with TMD.

We can conclude that synoviolin might be involved not only in the pathogenesis of RA but also in TMD. In result, synoviolin might be involved in the pathogenesis of TMD and can be candidates as new therapeutic targets of TMD or early detection biomarkers.

Key words: Temporomandibular joint disorder (TMD), Proteomics, Synoviolin

I. 서 론

악관절은 구조적으로 턱의 기능과 구강의 움직임과 함께 매우 중요한 역할을 담당한다^{1,3}. 악관절은 다른 관절과 마찬가지로 두 뼈의 중간 사이에 디스크가 있고, 그 주위에는 활액체가 채워져 있으며, 다른 관절과 달리 우리 몸 안에서 양측이 쌍을 이뤄 운동하는 유일한 관절이다^{4,5}. 이러한 기능적, 구조적인 역할 때문에 악관절의 손상 및 기능의 후퇴는 일상 생활을 하는데 있어서 많은 불편함을 초래할 수 있다⁶. 이러한 악관절 질환은 심리적 스트레스, 외상, 교합의 부조화, 이갈이, 자세불량, 나쁜 습관, 긴장, 우울과 같은 복합적인 원인에 의해서 발생된다고 알려져 있으며, 최근에는 관절강 내에 존재하는 박테리아성 원인물질에 의해서도 발생될 수도 있다는 보고도 있다⁷⁻¹⁰.

악관절 세정술(arthrocentesis)은 악관절 질환 중에 악관절 내장 증 치료법의 하나로 사용되고 있다¹¹. 하지만 이것은 근본적인 치료라기보다는 염증성 활액을 세척시켜 증상을 완화시킨다고 알려져 있다¹². 이러한 치료과정에서 스테로이드 약물의 주입을 통한 치료가 복합적으로 이루어지며, 이러한 복합치료가 환자의 통증과 염증을 완화시킨다고 알려져 있다¹³. 그러나 이러한 반복적인 약물치료는 여러 부작용의 원인이 되기도 한다¹⁴. 또한 이러한 부작용을 대신하기 위해서 히알루론산(hyaluronic acid)을 대체 주입하여 스테로이드와 유사한 효과를 야기시킬 수 있다는 보고도 있다¹⁵. 류마티스 관절염과 같은 관절 구조적으로 비슷한 질환에 대한 최신 연구결과를 통하여 악관절질환과의 연관성 여부를 찾아 볼 수 있다. 최근에 류마티스 관절염의 원인 중 하나로 추정되는 단백질이 동정되었다¹⁶. 이 단백질은 synoviolin이라는 단백질인데, 활액체의 염증을 유발시키며, 관절염에 비정상적으로 많이 발현되는 특징을 가지고 있다. 이와 같은 synoviolin 단백질이 과다 발현되면 관절을 파괴하는 활막세포가 과다 성장하면서, 류마티스 관절염이 악화되는 결과를 가져올 수 있다고 보고하고 있다. 또한 보고에 의하면 synoviolin 단백질의 감소를 인위적으로 조절하면, 활막세포의 증식을 차단해 관절염의 진행을 막는 것이 가능하다는

채 창 훈

134-020 서울시 강동구 천호동 155-3번지
나노큐어텍

Chang-Hoon Chae

Institute of Nano-Bio Fusion Technology, NanoCureTech Inc,
#204, 155-3, Cheonho-dong, Gangdong-gu, Seoul, 134-020, Korea
Tel: +82-2-474-8222 Fax: +82-2-474-8212
E-mail: avemar@dreamwiz.com

것을 알 수 있었다고 하였다⁷⁾.

본 연구는 악관절 질환의 발병 원인에 대한 연구를 통하여 효과적인 치료방법을 찾아보고자 한다. 이와 같은 연구를 위하여, 악관절 질환을 가진 환자들의 활액체를 이용하였으며, 단백질을 이용한 실험기법을 사용하여 악관절 질환 환자의 생체 내에서 발현되는 단백질의 종류를 알아 보았다. 또한 류마티스 관절염에서 과다 발현되는 synoviolin이 악관절질환에서도 과다 발현이 되는지를 알아보았다.

II. 실험 및 방법

1. 연구대상

신체 외상에 의한 하악골 골절 및 악관절의 직접적인 장애와 임상증상이 없는 악관절내장증으로 입원한 여자 환자 8명을 대상으로 실험하였다. 활액의 채취방법은 악관절세정술 시에 이측두신경 침윤 마취를 시행한 후 상관절강에 23gauge 주사침을 적절히 삽입하고, 2cc 생리식염수를 주입한 후 잘 섞일 수 있도록 한 후 다시 1.5cc의 혼합액을 혈액의 추출없이 혼합액만을 추출하였다. 추출된 혼합액은 -20°C에서 바로 급냉시켜 실험을 실시하기 위하여 보관하였다. IRB 승인을 받았으며 환자 동의서도 받았다.

2. SDS-PAGE 전기영동 분석

환자의 혼합액의 단백질 농도를 알아보기 위하여 단백질 정량을 실시하였다. 단백질은 BroadFord assay방법을 실시하여 단백질의 농도를 분석하였다. 분석된 일정량의 단백질을 95°C에서 20분 동안 열을 가해서 변성을 유도하였다. 여기에 loading buffer(0.1M Tris-HCl pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS-, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue)를 처리하였다.

50Voltage에서 30분동안 전류를 흘려보낸 다음 100Voltage에서 1시간 30분 동안 전류를 흘려보내 단백질의 분리를 실시하였다. 전기영동이 끝난 다음 단백질이 분리된 gel을 0.3% Coomassie brilliant blue 250을 이용하여 염색을 실시하였다.

3. 2-D Electrophoresis & MALDI-TOF 분석

단백질을 분석하기 위한 방법중의 하나로 시료에 대한 미량 정성 및 정량 분석에 적합한 장비가 LC/MS/MS이다. 이온화된 시료를 질량과 하전량과의 비에 따라 분리시키고, 얻어진 질량 스펙트럼을 해석함으로써 분자의 질량 및 구조를 확인할 수 있다. 활액에 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 원심분리를 실시하였다. SDS loading 버퍼를 사용하여 혼합한 다음 12.5% SDS-PAGE gel을 사용하여 100Voltage에서 2D 전기영동을 실시하였다. 균질화시킨 다음 C18겔판을 이용하여 단백질만을 추출하였다. 그런 다음 LC/MS/MS을 이용한 peptide sequencing을 실시하여 Amino acid sequence를 얻을 수 있었다.

III. 결 과

1. Synovial fluid의 전기영동 분석

환자의 샘플에서 얻은 활액을 이용한 전기영동실험으로 정상활액과 비정상활액과의 단백질의 상관성을 보기 위하여 total 단백질의 전기영동을 실시하였다. 이를 위하여 실험방법에 서술된 것처럼 단백질의 denaturation을 유도한 후 단백질의 패턴을 조사하였다. Fig. 1에서 보듯이 정상군과 비정상군의 단백질 패턴에는 큰 차이가 없었지만 실험그룹에서 특이하게 33 kDa 단백질의 패턴이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 단백질의 패턴의 감소는 실험에 참가한 8명 전부 감소된 것을 확인할 수 있었다.

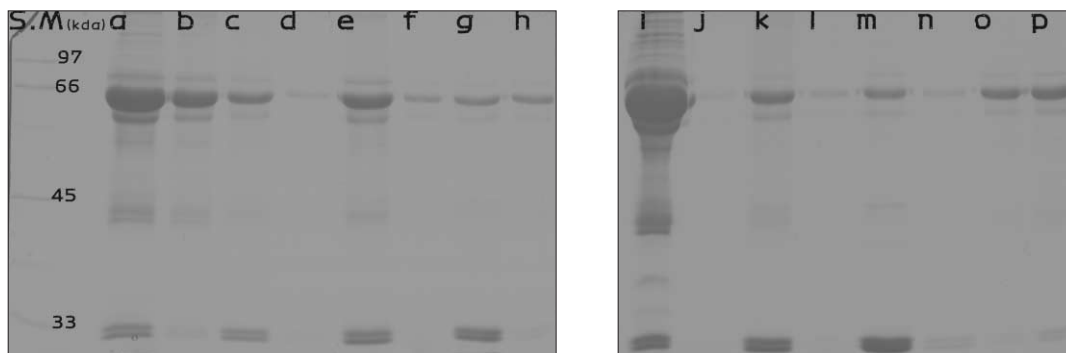


Fig. 1. 12.5% SDS-PAGE Gel Electrophoresis. This gel is 12.5% Gel Electrophoresis with Coomassie brilliant blue 250 staining. SM: size marker, a,c,e,g,i,k,m,o: control synovial fluid sample. b,d,f,h,j,l,n,p: experiment synovial fluid sample.

2. 단백질 분석

환자의 샘플에 대한 단백질 분석을 실시하여 차이를 확인하였으며, 단백질이 특히 많이 발현된 Albumin을 제거하기 위하여 Albumin제거 column을 사용하여 Albumin을 제거한 다음 실험을 실시하였다. Fig. 2의 그림 a는 Albumin 제거 전 사진이며, 그림 b는 Albumin이 제거된 뒤의 사진이다. 이와 같이 Albumin이 제거된 활액 샘플을 사용하여 LC/MS/MS을 실시하였다. Fig. 3에서 a는 정상활액 샘플에 대한 사진이며, b는 약관절질환 샘플로서 그래프상에서 큰 차이를 볼 수 없었다. 단백질 분석 결과를 이용하여 얻어진 peptide sequence를 이용하여 정상활액

의 단백질을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한 비정상 활액의 단백질을 확인하기 위해서 얻어진 peptide sequence를 이용하여 단백질을 동정할 수 있었다(Table 2).

정상그룹에서 발현된 단백질은 Transcriptional activator SRCAP, HUMETMAGA, Spermatogenesis and centriole associated 1, Positive cofactor 2 glutamine/Q-rich-associated protein과 같은 단백질이 동정되었으며, 실험그룹에서는 발현된 단백질은 Synovialin 1, isoform b, Synovialin, Ubiquitin specific protease 32, Positive cofactor 2 glutamine/Q-rich-associated protein이 동정되었다. Positive cofactor 2 glutamine/Q-rich-associated protein은 양쪽 그룹 모두에서 발현이 되었다.

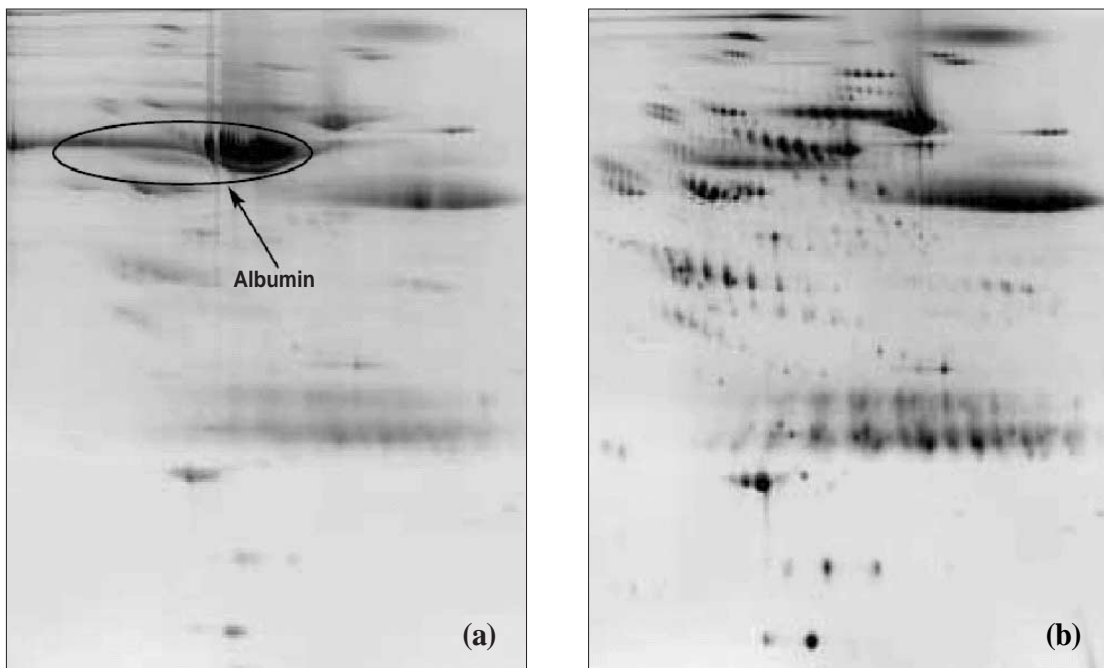


Fig. 2. 2-DE protein pattern.
(a): untreated gel, (b): Removed Albumin gel.

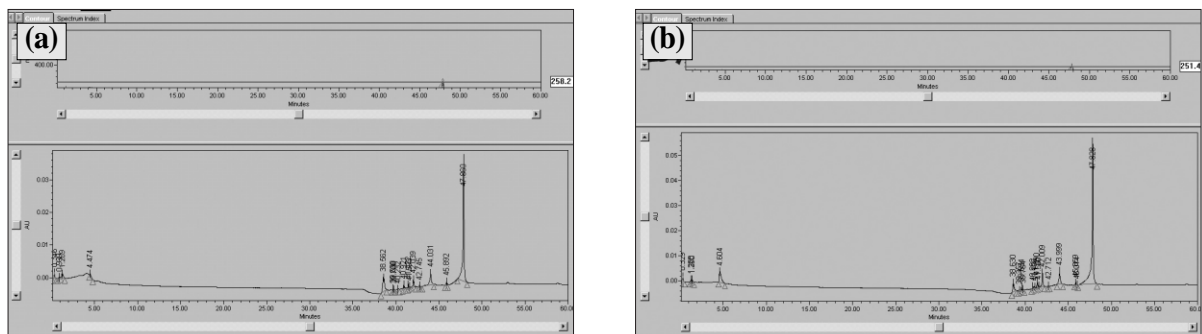


Fig. 3. The analysis of LC/MS/MS chromatography data.
(a): control group, (b): experiment group.

Table 1. The analysis of peptide sequence from control group

No	Acc. No	Gene Name	Mass	Matched peptides
1	Q9Y5L9	Transcriptional activator SRCAP	315449	ERVPRPAPRPRPTASAPAAIPALVPVVSAPVPISAPNPITILPV HILSPPPPSQIPPCSSPACTPPPACTPPPAHTPPPAQTCLVTPSSP LLLGPPSVPIASVTNLPLGLRPEAELCAQALASPESLELASVA SSETSSLSLVP
2	AAB59612	HUMETMAGA	30984	SSVPSSTEKNAVSMTSSVLSHSPGSGSSTTQGGQDVTLPATEP ASGSAATWGQDVTSPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAP GSTAPPAQGVTSAPETRPPPSTAPPAHGVTSAPDNRPALAST APPVHNVTASAGSASGSASTLVHNGTSAR
3	Q76KD6	Spermatogenesis and centriole associatedl	62370	QNGVFLPPSPA VANERVLEEVGIMALAPLAEMLSLQPSAT PGSLMSPLTGTLSTLLSGPAPTSQSSPLTSFLTSPHAGPLTGTLA SSLGLPSTGTLTPSSLVAGPVAMSQSSPLIAPVMGTVAVLSLSP LLSSTATPPGVS
4	PCQAP	Positive cofactor 2 glutamine/ Q-rich-associated protein	86699	SQASVSDPMNALQSLTGGPAAGAAGIGMPPRGPGQSLGGMG SLGAMGQPMNSLGGQPPPGTSGMAPHSMAVVSTATPQTQLQL QQVALQQQQQQQQFQQQQQAALQQQQQQQQQQFQAQQS AMQQQFQAVVQQQQQLQQQQQQQHLIK

Table 2. The analysis of peptide sequence from experiment group

No	Acc. No	Gene Name	Mass	Matched peptides
1	Q8N6E8	Synoviolin 1, isoform b	67640	ASLPAQSPPPPEPADQGPPPAHPHPPLLPQPPNFPQGLLPPFP PGMFPLWPPMGFPFPVPPPPSSGEAVAPPSTSAALSRPSGA ATTTAAGTSATAASATASGPGSGSAPEAGPAPGFPPPPWM GMPLPPFAFPMPVPPAGFAGLTPEELRALEGH
2	Q86TM6	Synoviolin	67568	ASLPAQSPPPPEPADQGPPPAHPHPPLLPQPPNFPQGLLPPFP PGMFPLWPPMGFPFPVPPPPSSGEAVAPPSTSAALSRPSGA ATTTAAGTSATAASATASGPGSGSAPEAGPAPGFPPPPWM GMPLPPFAFPMPVPPAGFA
3	Q86WP5	Ubiquitin specific protease 32	2905	NKDMSWPEEMSFIANSSK
4	PCQAP	Positive cofactor 2 glutamine/ Q-rich-associated protein	86699	SQASVSDPMNALQSLTGGPAAGAAGIGMPPRGPGQSLGGMG GSLGAMGQPMNSLGGQPPPGTSGMAPHSMAVVSTATPQTQL QLQQ

IV. 결론 및 토의

악관절 질환의 원인은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으며, 복합적인 원인 및 스트레스, 외상, 심리적 원인 등에 의해서 발병한다고만 알려져 있다¹⁾. 이렇듯 악관절질환은 명확한 원인 규명이 되지 않은 질환이기에 치료법 및 약물요법도 다양하게 시도되고 있다. 치료법 중에는 악관절세정술과 같이 활액을 세정해주는 방법도 있으며, 약물요법으로는 스테로이드 약물 치료를 하고 있다. 악관절 세정술 및 약물요법 모두 질병의 근본적인 발병 원인을 제거해주는 것은 아니지만 통증을 경감시키고, 질병의 진행을 차단하는 효과는 있다^{13,14)}.

악관절 질환의 경우도 다른 질환과 마찬가지로 유전자의 원인 이상 및 특정 단백질의 비정상적인 발현에 의한 질환의 발병에서 원인을 찾으려는 노력이 많이 되고 있다. 이번 실험에서는 Table 1, 2에서 볼 수 있듯이 악관절 질환을 가진 환자에서 특정 단백질인 synoviolin이 비정상적으로 많이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다. Synoviolin은 류마티스 관절염의 원인 중 하나로 추정되는 단백질이라고 보고되고 있는데, synoviolin이 과발현되면 관절을 파괴하는 활막세포가 과다 성장과 분비되면서, 류마티스 관절염을 파괴하는 사이토카인의 발현을 증가시키는 결과를 가져오는 것으로 보고가 되고 있다¹⁸⁾. 그로 인해서 osteoclast 및 protease의 과발현을 통하여 뼈와 연골의 손상을 가져오기도 한다. 동물실험을 통하여서도 synoviolin이 과다 발현되도록 인위적으로 조절하면, 관절염증이 유발된다는 사실이 확인되었다^{19,20)}. 또한 synoviolin의 발현을 인위적으로 낮게 조절하면, 관절염이 유도된 마우스에서 관절염의 발생이 늦추어진다는 사실을 통하여 synoviolin이 류마티스 관절염의 중요한 인자라는 것을 밝히고 있다²¹⁻²⁴⁾. 또한 synoviolin이 처음으로 발견된 2003년 이후 류마티스 관절염에서는 많이 연구가 진전되어 류마티스 관절염에서 현재까지 밝혀진 관절염 원인유전자 중의 하나라는 것이 밝혀졌다. 그러나 구조적으로 비슷한 관절에서 발생하는 악관절질환에서는 아직까지 그 상관관계를 찾을 수 있는 보고 논문이 없었다.

결론적으로 악관절질환을 가진 환자에서 얻은 활액체 샘플에서 synoviolin을 포함한 다양한 종류의 단백질이 검출되었으며, 특히 33kDa에서 특이하게 감소되는 단백질을 발견할 수 있었다. 또한 환자의 샘플에서 Albumin의 다량검출을 제거하기 위하여 Albumin을 제거한 후 실험을 실시하였는데, LC/MS/MS를 통한 peptide sequence에서 synoviolin이 과발현되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 특이한 것은 synovial fluid의 전체 단백질에서 감소되는 단백질이 있는 반면 synoviolin과 같이 증가된 단백질도 있어 악관절질환의 발병에 많은 단백질이 관여하는 것으로 사료된다. 대조군 그룹과 실험군 그룹 모두에서 발견된 Positive cofactor 2 glutamine/Q-rich-associated protein에 대한 연구도 지속적으로 필요하다고 사료된다. 이번 실험에서는 환자의 샘플 수가 많지 않아 이번 결과만 가지고는 synoviolin이 악관절 질환에 어떤 역할을 하는지를 명확히 밝히기에 한계가 있었다. 그러므로 향후 악관절질환의 원인에 대해 악관절에서 syn-

oviolin의 기능 및 구조에 대한 연구가 이루어져야 하며, 악관절 질환과 synoviolin 유전자와의 상관관계를 밝히는 연구가 좀더 필요하다.

1. Synovial fluid 안에 존재하는 여러 가지 단백질을 확인할 수 있었다.
2. 특이하게 33kDa에서 감소되는 단백질을 확인할 수 있었다.
3. 류마티스 관절염에서 과발현되어 류마티스관절염 원인 중 하나로 추정되는 단백질인 synoviolin이 악관절질환의 환자 샘플에서도 과 발현하는 것을 확인할 수 있었다.
4. 악관절에 존재하는 synoviolin의 기능과 역할에 대한 연구 및 synovial fluid내에 존재하는 다른 많은 단백질에 대한 연구가 앞으로도 지속되어야 된다고 사료된다.

참고문헌

1. Poveda Roda R, Díaz Fernández JM, Hernández Bazán S, Jiménez Soriano Y, Margaix M, Sarrion G: A review of temporomandibular joint disease (TMJD). Part II: Clinical and radiological semiology. Morbidity processes. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2008;13(2):E102-9.
2. Li Z, Li ZB, Li JR: Surgical management of posttraumatic temporomandibular joint ankylosis by functional restoration with disk repositioning in children. Plast Reconstr Surg 2007 Apr 1;119(4):1311-6.
3. Mah J: Histochemistry of the foetal human temporomandibular joint articular disc. Eur J Orthod 2004 Aug;26(4):359-65.
4. Stamm T, Hohoff A, Van Meegen A, Meyer U: On the three-dimensional physiological position of the temporomandibular joint. J Orofac Orthop 2004 Jul;65(4):280-9. Review. English, German.
5. Uyanik JM, Murphy E: Evaluation and management of TMDs, Part 1. History, epidemiology, classification, anatomy, and patient evaluation. Dent Today 2003 Oct;22(10):140-5.
6. Desmons S, Graux F, Atassi M, Libersa P, Dupas PH: The lateral pterygoid muscle, a heterogeneous unit implicated in temporomandibular disorder: a literature review. Cranio 2007 Oct;25(4):283-91. Review.
7. Ellis E, Throckmorton GS: Treatment of mandibular condylar process fractures: biological considerations. J Oral Maxillofac Surg 2005 Jan;63(1):115-34. Review.
8. Politi M, Toro C, Cian R, Costa F, Robiony M: The deep subfascial approach to the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg 2004 Sep;62(9):1097-102.
9. Lafrenière CM, Lamontagne M, el-Sawy R: The role of the lateral pterygoid muscles in TMJ disorders during static conditions. Cranio. 1997 Jan;15(1):38-52.
10. Kim SJ et al.: The presence of bacteria in the synovial fluid of the temporomandibular joint and clinical significance: preliminary study. J Oral maxillofac Surg 2002;60:1156-1161.
11. Wiesend M, Kanehl S, Esser E: [Arthrocentesis--a highly efficient therapy for acute TMJ arthropathy]. Mund Kiefer Gesichtschir 2006 Sep;10(5):341-6.
12. Ethunandan M, Wilson AW: Temporomandibular joint arthrocentesis--more questions than answers? J Oral Maxillofac Surg 2006 Jun;64(6):952-5.
13. Yura S, Totsuka Y: Relationship between effectiveness of arthrocentesis under sufficient pressure and conditions of the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg 2005 Feb;63(2):225-8.
14. Trieger N, Hoffman CH, Rodriguez E: The effect of arthrocentesis of the temporomandibular joint in patients with rheumatoid arthritis. J Oral Maxillofac Surg 1999 May;57(5):537-40.
15. Jae-Jin Kim: The effect of intra-articular injection of hyaluronic acid after arthrocentesis in treatment of internal derangements of the TMJ.

- J Kor Oral Maxillofac Surg 2006 Oct;032(05):453-457.
16. Amano T, Yamasaki S, et al.: Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes Dev* 17: 2436-2449.
 17. Naoko Yagishita. et al.: Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2005;Vol. 280, No. 9, Issue of March 4, pp. 7909-7916.
 18. Satoshi Yamasaki. et al.: Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *The EMBO Journal* (2007) 26, 113-122.
 19. Kaneyuki Tsuchimochi. et al.: Identification of a Crucial Site for Synoviolin Expression. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Aug. 2005, Vol. 25, No. 16.p. 7344-7356.
 20. Myew-Ling Toh, Hubert Marotte, Jean-Luc Blond, Umar Jhumka, Assia Eljaafari, Bruno Mougin, and Pierre Miossec: Overexpression of Synoviolin in Peripheral Blood and Synoviocytes From Rheumatoid Arthritis Patients and Continued Elevation in Nonresponders to Infliximab Treatment. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. Vol. 54, No. 7, July 2006, pp 2109-2118.
 21. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima. Rheumatoid arthritis as a hyperendoplasmic reticulum-associated degradation disease. *Arthritis Research & Therapy* 2005, 7:181-186.
 22. Kusuki Nishioka, et al.: Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic. *Genes & Dev*. 2003;17:2436-2449.
 23. Beixue Gao, Karen Calhoun and Deyu Fang: The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8:R172.
 24. Cecilia P Chung, Annette Oeser, Ingrid Avalos, Tebeb Gebretsadik, Ayumi Shintani, Paolo Raggi, Tuulikki Sokka, Theodore Pincus1 and C Michael Stein: Utility of the Framingham risk score to predict the presence of coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8:R186.