

가토 슬관절의 골연골 결손시 하이알루론산을 처리한 연골 세포 이식후 조직-형태학적 결과

김재도, 손정환, 장재호, 구자욱, 김태진, 유경식

고신대학교 의학부 정형외과학교실

Chondrocyte Transplantation with Hyaluronic Acid for Osteochondral Defect in the Rabbit's Patella

Jae Do Kim, Jung Hwan Son, Jae Ho Jang, Ja Wook Koo, Tae Jin Kim, Kyung Sik Yoo

Department of Orthopaedic Surgery, Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea

Abstract

Background Regeneration of the damaged joint with osteochondral defects is an area of great interest because of the limited potential of defect articular cartilage healing. Recently, hyaluronic acid treated culture method was paid on attention for its advantage, increasing the number of chondrocytes and thus improving the quality of chondrocyte transplantation. The objective of this in vivo study was to determine the effect of chondrocyte transplantation with hyaluronic acid on the ability of regeneration. **Methods** Suspensions of rabbit articular chondrocyte were prepared from primary, high-density monolayer cultures for 2 weeks. After 14 days of culture, the cells were isolated by trypsinization and transplanted into chondral defects with an autogenous periosteal patch and hyaluronic acid. Articular cartilages were histologically examined at 4 weeks, 8 weeks after autogenic and allogenic chondrocyte transplantation with hyaluronic acid. **Results** Grafted defects were filled with cartilage in gross findings at 8 weeks. At 8 weeks, allogenic and autogenic chondrocyte transplantation significantly increased the amount of newly formed cartilage compared to that of only periosteal patch covered cartilage. Repaired tissue consisted of differentiated chondrocytes and hyaline cartilage. **Conclusion** These results suggest that hyaluronic acid provides a suitable environment for differentiation of chondrocytes and matrix production. Allogenic and autologous chondrocyte transplantation with hyaluronic acid may be clinically useful application in osteochondral defect of damaged joints.

Key Words: Hyaluronic acid, Chondrocyte transplantation, Osteochondral defect

서론

관절 연골조직은 고도로 분화된 조직이어서 재생능력이 제한되어 있기 때문에 관절연골의 손상은 퇴행성 관절염을 유도하여 관절기능 장애를 초래한다. 관절기능 손상이 심한 경우 관절 유합술 및 인공관절 전치환술을 시행할 수 있지만, 인공관절의 수명은 제한되어 있어서 젊은 사람의 관절연골 손상은 정형외과에서 큰 문제가 되었다. 따라서 원래의 관절 연골과 동일한 조직으로 재생시키기 위하여 최근 골막 이식술 및 연골

세포의 배양 및 이식술에 대한 보고가 국내외에서 증가하고 있다.^{1,2-4)}

자가 연골세포 이식술의 성공의 중요한 요소는 첫째 이식된 연골세포가 수여 연골조직에 부착할 수 있는 능력과 둘째 이식된 연골세포가 연골기질을 형성하는 능력이다. 자가 연골세포의 이식은 두 번의 수술을 해야하며, 작은 부위의 공여조직에서 충분한 양의 연골세포를 얻기가 기술적으로 어렵다는 단점이 있다.

Kawasaki 등⁵⁾은 하이알루론산을 처리한 배지에서 연골세포를 배양하여 연골세포수의 증식 및 황산 콘드로이틴 합성이 증가하였다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 하이알루론산을 처리한 동종 연골세포 이식술

교신저자 김 재 도
TEL. 051-240-6500 · FAX: 051-241-5458
E-mail. jdkim@ns.kosinmed.or.kr

과 자가 연골 세포 이식술이 조직학적으로 기존의 이식술에 비하여 더 효과적인 연골 재생이 유도되는지를 관찰하여서 향후 임상적으로 적용될 수 있는 가능성을 제시하려 한다.

재료 및 방법

1. 연골세포의 분리 및 배양

연골 세포의 분리는 장의찬 등²⁾의 방법을 이용하여 동종 연골 이식세포는 체중이 1kg의 미성숙한 다른 가토의 슬관절에서 얻었으며 자가 이식군의 경우는 반대편 슬관절에서 채취하였다. 채취한 연골조직을 petri dish로 옮긴 후 Dubecco's modified essential medium (DMEM)에서 1x 1cm 크기의 절편으로 자른 다음 DMEM으로 3회 세척을 실시하였다. 연골조직의 절편을 무균의 세포배양 용기에 옮긴 후 10 ml DMEM에 2 mg의 collagenase를 넣은 후 37°C 세포 배양기에서 3 시간 동안 기질을 소화시킨 후 상층용액을 취하여 3회 세척한 다음 소화되지 않은 연골조직을 제거한 후 trypan blue를 이용하여 살아있는 세포수를 측정한 다음 1×10^6 개의 세포가 되도록 조절하여 10% 우태혈청 (Fetal bovine serum) (Hyclone, Utah, USA)과 penicillin과 streptomycin이 포함된 DMEM용액에 배양을 실시하였다. 배양액을 일주일에 2회 교환하였으며, 2주간 배양한 후 trypsin을 이용하여 배양용기에서 떼어낸 후 3회 세척을 실시하고 미세 용기에 옮겨서 20%의 우태혈청이 함유된 20 ul의 DMEM용액에 혼합하여 이식을 위한 세포용액을 준비하였다.

2. 동종연골 세포의 이식

연골 결손을 만든 후 골막으로 봉합만 시행한 8개의 슬관절을 대조군으로 설정하였고, 동종 연골세포 이식군은 연골 결손을 만든 후 0.1 mg의 하이알루론산을 처리한 동종 연골세포 이식을 실시한 후 골막으로 봉합한 8개의 슬관절으로, 하이알루론산을 처리한 자가 연골세포 이식군은 연골 결손을 만든 후 0.1 mg의 하이알 유론산을 처리하여 자가 연골세포 이식을 실시한 후 골막으로 봉합한 8개의 슬관절을 대상으로 하였다.

가토를 Ketamin(ketamine hydrochloride, Yuhan Pharm Co., Seoul, Korea)과 Rumpun(xylazine hydrochloride, Bayer Korea Pharm Co., Seoul, Korea)을 이용한 전신



Fig. 1. Granulation tissues filled the chondral defect which was covered by periosteal patch with chondrocyte without HA at 8 weeks (control group). The newly formed tissue was white-red and somewhat depressed, and the margin was discernible.



Fig. 2. The chondral defect was filled with whitish cartilages 8 weeks after autogenous chondrocyte transplantation (with hyaluronic acid). The tissue became almost smooth, although it was still white and the margin was discernible.

마취하에서 슬관절 전내방 도달법을 이용하여 슬개골을 외측으로 탈구한 후 슬개골에 3.5 mm Drill bit를 이용하여 3.5 mm x 3.5 mm의 원형 구멍을 연골 하골 부위까지 전층 연골 결손을 만든다. 연골 결손 부위에 미세 현미경하에 동일 개체의 대퇴골 내측부에서 채취

한 골막 피판을 Nylon 8.0 봉합사로 봉합을 실시한 후 microsyringe를 이용하여 연골세포를 주입하고 하이알루론산을 이용하여 공간을 채웠다. 관절막을 Dexon 4.0 봉합사로 봉합한 후 피부를 봉합하고 potadine 도포후 수술을 마쳤다.

3. 조직학적 검사

연골세포 이식 후 각 군에 4마리씩 4주, 8주에 슬관절을 노출시켜 육안 및 형태학적 변화를 관찰한 후 조직 검사를 시행하였다. 먼저 육안적 변화로는 관절면의 함몰 정도, 재생 조직과 정상 주위 조직과의 관계, 연골의 퇴행성 변화 유무를 관찰하였다. 조직학적 검사로는 슬개골의 연골 부위를 절제하여 10% buffered formalin에 고정시키고 탈 석회화 과정을 거친 후 조직 절편을 만들어 hematoxyline-eosin(H-E) 염색 후 결과를 판정하는데, 관절연골의 상태, 관절면의 재생조직이 초자연골로 재생되었는지 여부, 재생조직 주위의 염증세포 침윤유무를 관찰하였다. 이식 조직의 성공 여부는 초자연골로 재생되고 재생조직의 관절면이 평탄하여 주위 관절면과 같은 높이에 있고 염증 반응이 적은 경우에 성공으로 판정하였다.

결과

1. 육안적 소견

대조군 및 실험군 모두에서 슬관절의 활액 및 활액막에는 별다른 특이 소견이 없었다. 술후 4주째 대조군의 경우 이식부위가 빨간 육아조직으로 덮여 있었으며 주위 관절면보다 함몰되어 있었다. 8주째에도 이식 부위 색깔은 별 변화가 없었으나 관절부위 함몰은 소실되어 주위 관절면과 비슷한 소견을 보였고 이식 부위의 주위로 관절면이 불규칙하였다. 대퇴 슬개골의 퇴행성 변화 및 관절염 소견은 보이지 않았다. 하이알루론산을 처리한 동종 이식군에서는 술후 4주째 이식 부위가 흰색으로 변하였으며 관절면의 함몰은 없었고 8주째에도 특이한 변화는 없었다. 하이알루론산을 처리한 자가 이식군에서도 술후 4주째 관절면 함몰 없이 이식 부위가 흰색으로 변하여 동종 이식군과 비슷한 소견을 보였으나 술후 8주째에는 정상 관절과 비슷하

게 흰색으로 변한 이식 부위가 점차 주위 관절면과 비슷하게 변하였으나 주위 조직과 구별은 가능하였다.

2. 조직학적 소견

대조군의 경우 이식 4주째 주위 관절면에 비해 함몰되어 있었으며 섬유조직으로 쌓여있었다. 8주째에도 약간의 함몰이 보이며 미성숙 연골세포가 산재해 있었고 주위 조직으로 부터 섬유조직의 증식은 관찰되었으나 초자연골 및 기질은 보이지 않았다(Fig. 3). 동종 연골세포 이식군의 경우 술후 4주째 연골 세포들이 무리 지어 증식된 연골세포 섬(cartilage island)이 관찰되었고 연골세포는 골소강(lacuna)에 둘러 쌓여 있고 핵과 세포질이 풍부한 미성숙 연골세포로 구성되었다. 한편 기질 형성은 풍부하지 못하였으나 주위 조직에서 증식된 섬유조직으로 부분적으로 연결된 소견을 보였다(Fig. 4). 술후 8주째 연골세포 섬은 소실되었고 표면에는 미성숙연골이 대부분이었으나 심층부로 갈수록 성숙된 연골세포들로 점차 중배열 양상을 보였다. 주위조직과는 비교적 섬유조직들로 연결이 잘된 소견을 보였고 초자연골의 기질 형성도 풍부하였다(Fig.5). 자가 연골세포 이식군에서 술후 4주째 동종 연골세포 이식군과 별 차이를 보이지 않았으나(Fig. 6) 술후 8주째 주위 조직과 연결이 잘되어 연결부위가 주위 조직과 구별이 잘 안되었으며 표면의 연골세포들은 핵과

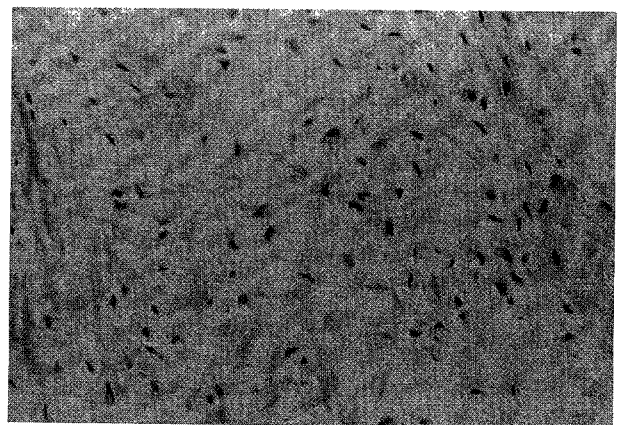


Fig. 3. Immature mesenchymal tissue filled the chondral defect which was covered by periosteal patch with chondrocyte without HA at 8 weeks(without hyaluronic acid). The defect was still fibrous tissue, and articular surface was somewhat depressed in most cases(H&E stainig x 200)

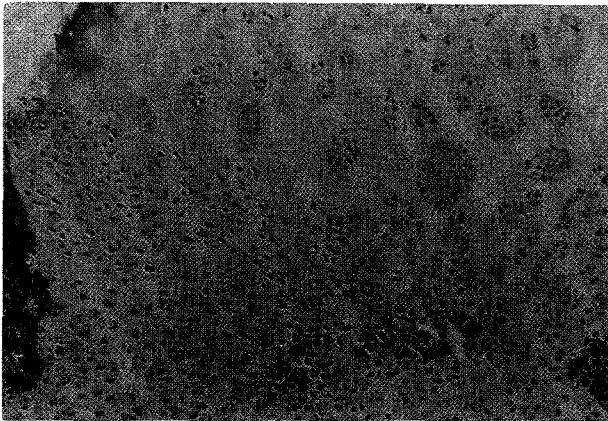


Fig. 4. The chondral defect was filled with immature chondrocytes and hyaline like cartilages 4 weeks after allogenic chondrocyte transplantation (with hyaluronic acid). There were numerous cartilage islands on chondral defect. The newly formed tissue was well bonded to the normal cartilage (H&E staining x 200).



Fig. 5. The articular cartilage was covered with hyaline like cartilage with columnar distribution of chondrocytes 8 weeks after allogenic chondrocyte transplantation (with hyaluronic acid). The surface was smooth, and there was no inflammatory cell infiltration at the periphery. The surface was covered by hyaline cartilage which showed a columnar distribution of chondrocytes as in normal articular cartilage (H&E staining x 200).

세포질이 풍부한 미성숙 연골세포들이 대부분이었고 심층 부분은 성숙된 연골세포들로 주위 관절의 연골세포들과 비슷한 배열 양상을 보였다(Fig. 7).

고찰

관절연골의 결손은 정상 초자연골 조직이 아닌 섬유



Fig. 6. The chondral defect was mostly filled with hyaline cartilage with a columnar distribution 4 weeks after autogenous chondrocyte transplantation (H&E staining x 200). The chondral junction of the reparative tissue was well bonded to normal cartilage. The surface was covered by hyaline cartilage which showed a columnar distribution of chondrocytes as in normal articular cartilage.



Fig. 7. The articular surface was covered with hyaline cartilage with hypertrophic chondrocytes 8 weeks after autogenous chondrocyte transplantation. The matrix was deep purple color and was relatively well differentiated. The chondral junction of reparative tissue became somewhat obscure and the reparative tissue was similar arrangement with that of the surrounding normal tissue (H&E staining x 200).

성 연골조직으로 대체되어 치유되지만 생역학적인 측면에서 섬유성 연골조직은 좋지 않은 것으로 알려져 있다.²²⁾ 그동안 연골 세포의 배양에 대한 연구가 많이 진행되었고 배양된 연골세포로 골 관절염등에서 발생한 결손을 채우려는 시도가 있었다. 그러나 이식한 세

포를 유지할 수 있는 매개체의 효율성은 생체 적합성, 세포 독성, 생분해력 및 연골하골과 연골에 부착 정도에 의하여 결정된다고 보고되고 있다. 현재 매개체로는 콜라겐 젤, 하이알유론산 과 섬유소 아교 등이 동물 실험으로 이용되고 있는데, 콜라겐 젤의 경우 연골세포의 분화와 관계되는 2 alpha chain이 소실되고 연골세포를 장기간 배양시 연골합성이 줄어드는 점이 문제가 된다.^{4,6)} 섬유소 아교의 경우 연골세포에 독성을 미칠 수 있다고 하였다.^{7,8)} 연골세포를 단독으로 이식한 경우 보다 골막으로 봉합하거나 운반체를 이용하여 이식할 경우 좋은 치료결과가 보고되었고 이 운반체가 3차원적인 생물학적 기질을 형성하고 면역세포가 이식된 연골세포에 직접 접촉할 수 없어 면역학적 거부반응을 억제하는 장점이 있다.⁹⁻¹⁴⁾

1999년 Kawasaki 등¹³⁾은 하이알 유론산을 처리하여 연골세포를 배양하고 이식한 결과 배양된 연골세포의 수가 증가하였으며 이식후 좋은 결과를 보고하였는데, in vitro에서 하이알유론산을 처리한후 3차원 방법으로 배양을 시도하여 Glycosaminoglycan과 제2형 콜라겐의 합성 및 연골세포의 증식에 도움이 된다는 결과를 발표하였다. 하이알유론산이 다양한 실험에서 연골세포의 증식, 이동 및 분화에 직접적인 영향을 가지며 또한 3차원적인 배양환경도 제공하여 연골세포를 고정하고 이식된 연골세포의 생존 및 성장에 도움을 주며 기질을 형성하는데 필요한 환경도 제공할 것이라는 연구 보고가 있어서 이를 임상에 적용하기 전에 가토를 대상으로 본 연구를 시행하였다.

이은우등¹⁾의 연구에 따르면 연골세포 배양 매개체로서 섬유소 아교를 이용한 연골세포를 배양 이식한 경우 12-16주에 초자양 연골이 재생되고 부분적으로 연골하골이 형성되는 소견이 보여 골 연골 결손을 치료하는데 유용하다고 보고하였다. 장의찬등²⁾은 가토 슬관절의 연골 결손에 배양된 자가 및 동종연골세포를 이식후 섬유소 아교(fibrin glue)를 채운후 골막피판을 봉합한 결과 술후 약 8주에 연골세포군(cluster)이 보였고 6개월째 연골세포가 종열배열을 하면서 주위 정상 연골과 비슷하였다는 실험결과를 발표하였다.

본 연구결과에서 하이알유론산을 처리한 동종 및 자가연골이식군에서 술후 8주째 육안적으로 대조군에서 관찰된 관절 함몰 및 관절면 불규칙 소견 없이 비교적 주위관절면과 비슷하게 재생되었음을 알 수 있었고 조직학적으로도 술후 4주째 여러개의 미성숙된 연골세

포가 무리지어 세포군을 형성하였으나 기질 형성은 풍부하지 않았다. 술후 8주째 동종 및 자가 연골세포 이식군 모두에서 이러한 연골세포군들은 흩어져 종열상태로 배열되었으며 기질 형성이 풍부하였고 초자양 연골이 비후가 관찰되었으며 하부에 연골내 골화 및 주위조직과 잘 연결된 소견이 보였다. 자가연골이식의 경우 동종연골이식과 거의 비슷한 결과를 보였지만 술후 8주째 이식된 부위의 종열로 배열된 세포와 연골기질이 자가연골이식의 경우에 좀더 주위 정상조직과 연결이 잘 된 것을 알 수 있었다. 이는 하이알유론산을 처리한 후 동종 및 자가 연골세포를 이식한 경우 이은우와¹⁾ 장의찬등의²⁾ 연구보다 약 2배정도 빠른 관절면 회복 및 연골재생을 보였다. 이는 Kawasaki등¹³⁾의 연구 보고서처럼 하이알 유론산이 연골 세포가 성장할 수 있는 3차원적인 배양환경을 제공할 뿐만 아니라 연골세포의 증식에 도움을 주며 기질형성을 촉진하여 연골세포의 이동 및 분화에 직접적으로 영향을 준다는 사실을 뒷받침하는 결과라 할 수 있겠다.

이상의 결과에서 골연골 결손시 하이알 유론산을 처리하여 자가 및 동종연골세포를 이식한 결과 기존에 보고된 연구결과보다 빠른 연골 재생을 통한 관절면 회복이 가능하였다. 자가연골 이식의 경우 동종연골이식 보다 주위 조직과 잘 연결되고 융합된 소견을 보여 동종 연골 이식보다 더 좋을 것으로 판단되어지나 공여부의 제한 및 2번의 수술을 해야하는데 대한 고비용 등의 문제점이 있을 것으로 보인다.

결론

관절 연골 결손시 관절 연골을 재생하기 위하여 하이알유론산을 처리한 동종 및 자가 연골세포를 이식하여 이미 보고된 하이알유론산을 처리하지 않은 연구보고와 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 배양된 연골세포를 하이알 유론산을 처리하여 이식한 결과 8주째 연골세포가 성숙되기 시작하였고 초자양 연골로 구성된 풍부한 기질을 형성하며 주위조직과 연결이 잘된 소견을 보였는데 이 결과는 이 와 장등이 8주에서 16주 사이에 본 연구와 비슷한 연골 재생 및 증식을 얻었다는 결과와 비교해 볼때 빠른 경과를 보였다. 이는 하이알 유론산이 이식한 연골세포의 분화및 증식과 재생에 직접적으로 영향을 준결과라 하겠다. 동종연골

세포 이식군과 자가 연골세포이식군과는 차이를 보이지 않았다. 따라서 관절연골 결손시 하이알 유론산을 처리한 자가및 동종 연골세포이식이 추후 임상적으로 유용할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 이은우, 강수용, 장의찬, 이상엽 : 조직 야교를 이용하여 hydroxyapatite에 부착된 연골 세포의 배양. 대한슬관절 학회지 7:91-96, 1995
2. 장의찬, 정상인, 전재명, 이은우 : 배양된 가토 연골세포에 대한 recombinant interleukin-1 beta의 작용 증상의대 지 17:215-227, 1992
3. 하영준, 장의찬, 강수용, 이은우, 정상인 : Fibrin glue를 이용한 가토 연골세포의 배양. 증상의 대지 20:1-14, 1995
4. 한수봉, 한대용, 김남현, 박병문 : 연골막과 골막이식에 의한 관절 연골의 재생에 관한 실험적 연구. 대한정형외 과학회지 25:621-632, 1990
5. Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M : Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embeded in collagen gels. J Cellular Physiology 179:142-148, 1999
6. Grande PA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M : The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. J Orthop Res 7:208-218, 1989
7. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K : Chondrocytes embeded in collagen gels maintain cartilage phenotype during longterm cultures. Clin Orthop 186:231-239, 1983
8. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A : Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embeded in collagen gel. J Bone Joint Surg 71:74-80, 1989
9. Bentley G, Smith AU, Mukerjee R : Isolated epiphyseal chondrocyte allografts into joint surfaces. An experimental study in rabbits. Ann Rheum Dis 37:449-458, 1978
10. Chesterman PJ, Smith AU : Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocyte. An experimental study in rabbits. J Bone Joint Surg 50:184-197, 1968
11. Coutts RD, Woo SL-Y, Amiel D : Rib perichondral autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. Clin Orthop 275:263-273, 1989
12. Heyner S : The significance of the inter cellular matrix in survival of cartilage allografts. Transplantation 8-5:666-677, 1969
13. Langer F, Gross AE : Immunogenicity of allograft articular cartilage. J Bone Joint Surg 56-A:292-304, 1974
14. Stevenson S, Dannucci GA, Sharkey NA : The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue Ag-matched and mismatched osteochondral allograft in dog. J Bone Joint Surg 71-A:1297-1307, 1989
15. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ : Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. J Orthop Res 10:745-758, 1992
16. Hakkanson I, Venge P : The combined action of hyaluronic acid and fibronectin stimulates neutrophil migration. J Immunol 2735-2739, 1985
17. Iwatu II : Phamarcologic and cliniccal aspects of intraarticular injection of hyaluronate. Clin Orthop 291:289-290, 1993
18. Larsen NE, Lombard KM, Paren EG : Effect of yllan on cartilage and chondrocyte culture. J Orthop Res 10:23-32, 1991
19. Shimazu A, Jikko A, Iwamoto M : Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines. Arthritis Rheum 36:247-253, 1993
20. Toole HP, Gross, J : The extracellular matrix of the regenerating new limb: synthesis and removal of hyaluronate prior in defferentiation. Dev Biol 25:57-77, 1971
21. Yoneda M, Shimizu S, Nishi Y : Hyaluronic acid-dependent changes in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conductive to cell proliferation. J Cell Sci 90:275-286, 1988
22. Homminga GN, van der Linden TJ, Rouwenhorst EA, Drukker J : Repair of articular defect by perichondral grafts: Experiments in the rabbit. Acta Orthop Scand 60:326-329, 1989