

제2형 콜라겐 유도에 의한 쥐의 관절염에서 고용량 Methotrexate 정맥내 투여 치료의 효과

손정환, 박 웅

고신대학교 의과대학 정형외과학교실

The Effect of Intravenous High Dose Methotrexate in Type II Collagen Induced Arthritis in Rats

Jung Hwan Son, Woong Park

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

Abstract

Background: Methotrexate comes under the third group of medicine in a treatment of rheumatoid arthritis. The present study examines the effect of intravenous high dose methotrexate for the treatment of type II collagen arthritis. **Materials and methods:** In this study, healthy rats between 16 and 20 weeks of age and 300 gm in average weight were divided into 6 groups. Each group comprised of 5 rats. Only collagen was injected in the control group, while, methotrexate 50mg, 30mg, 20mg, 15mg, and 10mg was given intravenously 1 week after collagen administration in five experimental groups. To determine the effect of high dose methotrexate, a histopathologic results were investigated through a biopsy at right knee joint of the rats on the 3rd, 7th, 14th, 28th, 42th and 56th day after the high dose methotrexate injection. **Results:** Compared with the control group, the groups injected with high dose MTX had a reduced arthritis index, and as the dosage of MTX increased, the reduction of the arthritis index was more prominent. In histopathological test, the experimental group injected with 20mg, 30mg, and 50mg of MTX had distinctive effects, compared to the control group, as dosage chronologically ($p < 0.05$). **Conclusion:** The intravenous injection of high dose MTX was proved effective for the treatment of rheumatoid arthritis and also, it seems to be effective clinically.

Key words : Type II collagen induced arthritis, High dose methotrexate, Intravenous injection

서론

최근 노인 인구의 증가와 더불어 류마티스 관절염은 계속 증가하는 추세이어서 그 원인이나 발생 기전 및 병태 생리학적 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 아직도 뚜렷이 규명된 바가 없으므로 현재까지 예방법이

나 질환의 발생을 근치시킬수 있는 방법은 없다. 그리고 류마티스 관절염은 교원성 질환의 일종으로 관절의 활막에 염증을 일으키는 다발성이며, 만성적인 염증성 질환이다.¹⁾ 쥐에서 제2형 콜라겐을 이용한 만성 관절염 유도의 도입은 1977년 Trentham 등에 의해 최초로 시도되었고,¹⁾ 수많은 종류의 동물 및 생체 실험을 통하여 항관절염 제제의 새로운 발견 및 개발이 시도되고 있다.

Methotrexate (MTX)는 저용량 경구투여로 류마티스 관절염의 치료에 널리 사용되는 약제로 항염산작용 등

교신저자 손정환
TEL : 051-990-6467 · FAX : 051-243-0181
E-mail : jhson@ns.kosinmed.or.kr

의 효과를 보여 관절염 치료에서 disease modifying antirheumatic drug (DMARD)으로 1950년대부터 류마티스 관절염 및 건선(psoriasis)의 치료제로 사용되어 왔으며,²⁾ 또한 고용량 정맥내 투여는 악성 종양의 치료제로 항대사제(antimetabolite)로 활발히 사용 중인 약제이다.³⁾ 또한 치료에 불응성인 류마티스 관절염의 치료에 있어 고용량의 MTX를 정맥내 투여로 효과가 있다는 보고가 있다.⁴⁾ 본 연구에서는 쥐에서 제2형 콜라겐 유도에 의한 관절염을 유발시켜 골종양 환자에서 항암 화학 요법의 일환으로 사용되는 단위 체표면적당 같은 용량의 고용량 MTX를 단 1회 정맥내 투여 후에 관절염의 치료 효과를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 관절염의 유도

생후 16주에서 20주 사이의 평균 300g의 건강한 쥐를 대상으로 실험하였다. 그리고 우형 제2형 콜라겐(bovine type II collagen, Sigma-Aldrich Co. Germany)를 이용하여 4°C에서 0.5몰(mol)의 아세트산에 콜라겐을 녹인 후 3000rpm에서 20분간 원심분리를 실시하여 상층에 있는 콜라겐 용액을 채취하여 5 mg/ml의 농도로 1ml씩 쥐의 꼬리 기저부(tail base)를 통하여 주사하여 관절염을 유발하였다.

2. 치료 약제의 투여

실험방법에 따라 5마리를 한 군으로 정하여 콜라겐만 투여한 대조군과 실험군으로 고용량 MTX 50mg, 30mg, 20mg, 15mg, 10mg을 정맥내 투여하여 각각의 군으로 정하여 모두 6군으로 나누었다. 제2형 콜라겐 투여 2주째에 고용량 MTX를 정맥내 투여하였다. 이후 임상적으로 골종양 환자 치료와 마찬가지로 염산대사 길항제의 독성 경감 및 골수 억제, 간기능 이상 감소를 위해 염산 활성형인 Nyrin® (Leucovorin United Pharm. Co. Korea) 5mg을 3일간 투여하였으며, 정맥 및 복강을 통하여 충분한 수분 공급을 실시하였다.

3. 관절염 지수(arthritis index)를 이용한 관절염의 평가

콜라겐의 주사 후 10주 동안 각각의 후족부(hind paw)에서 collagen 투여 후 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 10주에 각각 관절 주위의 부종이나 발적 같은 임상적인 관절염의 증상에 대하여 관찰하였으며, Sugita 등의 점수 계산법을 이용하여 평가하였다(0=증상 없음. 1=한 개 관절 포함. 2=두개 또는 그이상의 관절 포함하거나 홍반이나 부종).⁵⁾ 그래서 각각의 후족부에서 합산된 점수를 관절염 지수(arthritis index)로 정하였으며, 최저 0점에서 최고 8점으로 정하였다.

4. 약제의 부작용 및 경과 관찰

MTX의 간독성 및 체내에서 작용 효과, 그리고 골수 억제 작용의 유무를 관찰하기 위하여 쥐의 몸무게, 변의 상태, 활동성, 사망률을 확인하였고, 골육종 환자에서와 동일한 방법으로 약제투여 직후, 24시간, 48시간후에 쥐 꼬리혈관(median tail vein)에서 3cc정도로 채취한 혈액을 원심분리를 통하여 혈청만을 분리한 뒤에 Fluoro Polarization Immuno Essay (TDX Flx. Ebbott USA)를 이용하여 혈중의 MTX의 농도를 측정하였다. 또한 백혈구 감소, 골수 재생 부전(aplasia) 등에 의한 쥐의 사망을 예방하기 위해 GM-CSF 제제인 leucostim® (Dong-A Pharm. Korea)을 사용 하였다.

5. 조직 병리학적 관찰 및 관절염의 반정량적 분석

콜라겐 투여에 의한 관절염 유도 후 치료제로 고용량 MTX를 정맥내로 투여한 후 3일, 1주, 2주, 4주, 6주, 8주째에 각각의 군에서 관절염의 치료 효과를 보기 위해 우측 슬관절 조직 생검을 시행하였으며 조직을 포르말린에 담겼다가 파라핀에 고정시킨 후 5 micron 간격으로 잘라서 hematoxyline-eosin 염색을 실시하였다. 이후 각 군별, 시기별로 연부조직 부종, 관절강 협소, 연골 침식, 판누스 형성, 골탈염(demineralization)으로 나누어 조직 병리학적인 치료 효과를 비교, 분석하였다.

슬관절의 미세 현미경적 분석의 일환으로 Joosten의 병리조직학적 등급체계에 따라 5개의 범주 즉, 연부조직 부종, 관절강 협소, 연골 침식, 판누스 형성, 골탈염(demineralization)로 구분하였고 또한 각각을 병변 없음(0점), 최소(1점), 경도(2점), 중등도(3점), 고도(4점)로 세분하여 평가하였다.³⁾

6. 통계적 분석

고용량 MTX를 정맥내 투여한 치료 효과를 판정하기 위해 통계분석 방법으로 반복 자료를 위한 분산분석으로 repeated measure ANOVA method를 사용하였으며, 군간을 비교하기 위한 분산분석으로 Post Hoc test의 multiple comparison을 이용하여, $p < 0.05$ 일때를 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 관절염의 유도후 관절염 지수의 분석

쥐의 콜라겐 제2형 유도에 의한 관절염은 인간의 관절염과 비슷한 양상으로 부종 및 홍반 같은 동일한 임상 경과와 심각성을 보였다. 후족부 관절 주위의 부종 및 홍반 같은 관절염 증상의 발현은 주사 후 평균 7-8일째 부터 시작되었으며, 실험 2주째 가장 심한 관절염이 유발되었으며, 이때에 관절염의 치료를 시작하였다. 제2형 콜라겐 투여 후 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 10주에 각각 쥐의 후족부에서 관절염의 임상적 경과를 관찰하였는데, 고용량 MTX를 정맥내 투여하기 직전인 실험 2주째에 모든 군에서 평균적으로 7점에 가까운 관절염 지수를 나타내었다. 고용량 MTX를 정맥내 투여한 후 1주일부터 대조군에 비하여 MTX 투여군에서 후족부에 나타난 부종, 홍반등의 관절염의 임상 경과가 감소되는 양상을 보였으며, 모든 군에서 용량에 비례하여 MTX 투여후 1-2주 사이에 호전되는 변화가 크게 나타났으며, 실험기간 동안 관절염 지수가 지속적으로 조금씩 감소되는 양상을 보였다(Fig. 1).

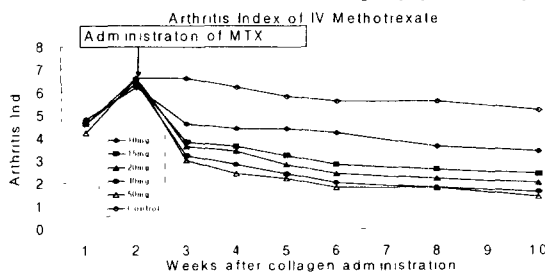


Fig. 1A. Arthritis indices of hind paw of rats
The signs of arthritis such as erythema and swelling developed at 7-8 days after collagen injection and continues till 10 weeks

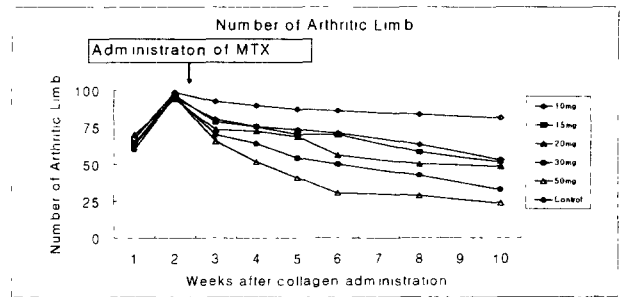


Fig. 1B. Number of arthritic limb (%) of rats
The numbers of arthritic limbs slowly decreases till 10 weeks

2. 고용량 methotrexate 정맥내 투여의 부작용

MTX를 장기간 사용하거나 고용량의 단기간내의 pulse 치료 용량에서 임상적으로 생길 수 있는 합병증으로는 간독성, 신장 기능 이상, 혈액학적 이상, 호흡기계 이상 등의 다양한 합병증이 있으나 그중에서 간독성이 가장 문제가 된다. 그러나 본 실험에서는 Nyrin[®] 사용 및 충분한 수분 공급으로 인하여 실험 도중 사망하는 경우는 일어나지 않았으나 고용량 MTX를 정맥내 투여한 후에 1-2주간 쥐들의 식욕 부진 및 운동력 저하만이 나타났다, 황달 소견이나, 사망은 나타나지 않았다. 또한 지속적인 경과 관찰 중 약제에 의한 식욕 부진, 출혈성 설사, 점진적인 체중 감소 등은 관찰되지 않았다.

3. Methotrexate의 혈중 농도

임상적으로 골육종 환자에서와 같이 고용량 MTX의 체내 치료 효과를 추측하기 위해 MTX의 혈중 농도를 측정하였다. MTX 용량에 따라 측정된 직후 농도가 약제가 고용량일수록 측정값이 높은 양상을 보여 활발한 체내 대사를 추측할 수 있었고 약제 투여 24시간, 48시간 이 지나서는 다른 군들과 비슷한 양상으로 저농도로 유지되었다 (Fig. 2).

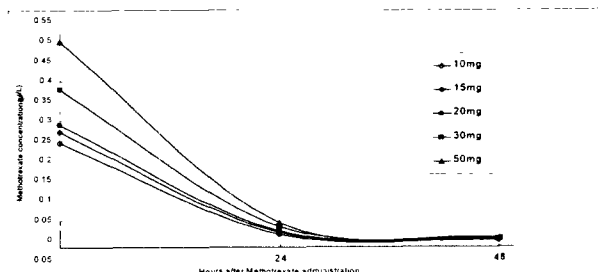


Fig. 2. Methotrexate concentrations at 0, 24, 48 hours after intravenous high dose MTX injection Blood levels were similar at 24 hours regardless of dosage

4. 조직병리학적 평가

대조군은 실험 기간동안 모든 조직 병리학적인 점수가 4점 가까이 유지 되었으나, 고용량 MTX를 정맥내 투여한 군들에서는 투여 후 1주째부터 연부조직 부종, 관절강 협소, 연골 침식, pannus 형성, 골탈염(bone demineralization) 소견이 실험기간 지속적으로 감소하는 소견을 나타내었으며, 골탈염 소견 비교에서는 대조군과는 차이가 있었으나, 각 군들간의 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 4). 그러나 연부조직 부종, 관절강 협소, 연골 침식, pannus 형성에서는 MTX의 용량이 20mg, 30mg, 50mg을 사용했을 때 대조군 및 다른군(10mg, 15mg)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소 시켰다($p<0.05$) (Fig. 3, 5, 6, 7).

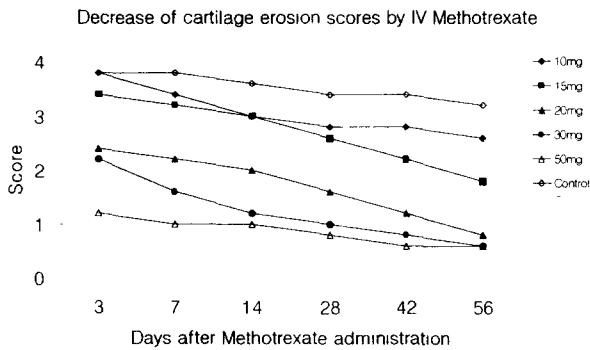


Fig. 3. Histopathologic changes of the cartilage erosion by IV methotrexate
Cartilage erosion was slowly reduced between 3 days to 8 weeks after methotrexate administration in 15, 20, 30, 50mg groups. (* $p<0.05$)

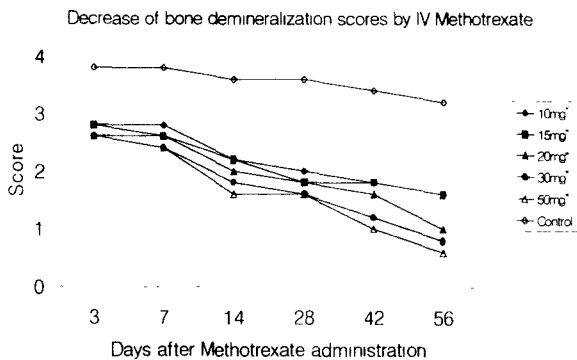


Fig. 4. Histopathologic changes of the bone demineralization by IV methotrexate
Bone demineralization was slowly reduced between 3 days to 8 weeks after methotrexate administration in 10, 15, 20, 30, 50mg groups. (* $p<0.05$)

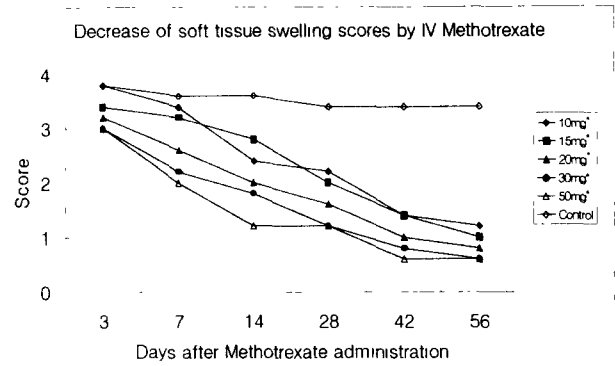


Fig. 5. Histopathologic changes of the soft tissue swelling by IV methotrexate
Soft tissue swelling was slowly reduced between 3 days to 8 weeks after methotrexate administration in 10, 15, 20, 30, 50mg groups. (* $p<0.05$)

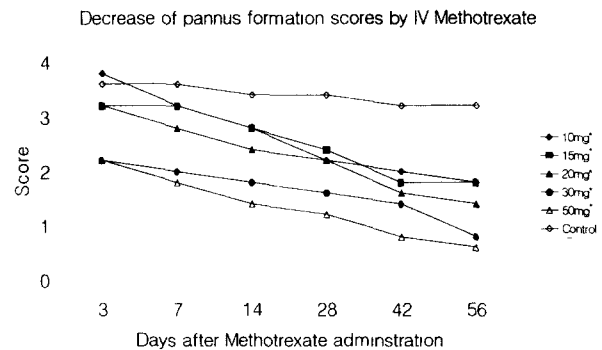


Fig. 6. Histopathologic changes of the pannus formation by IV methotrexate
Pannus formation was slowly reduced between 3 days to 8 weeks after methotrexate administration in 10, 15, 20, 30, 50mg groups. (* $p<0.05$)

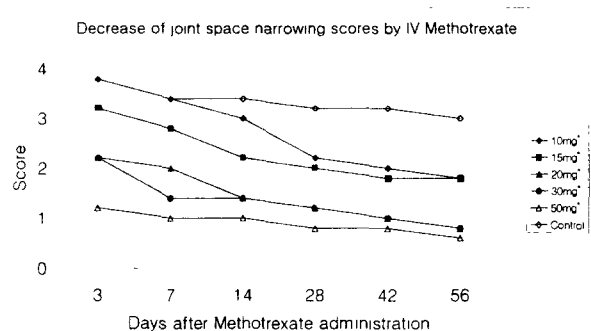


Fig. 7. Histopathologic changes of the joint space narrowing by IV methotrexate
Joint space narrowing was slowly reduced between 3 days to 8 weeks after methotrexate administration in 10, 15, 20, 30, 50mg groups. (* $p<0.05$)

또한 고용량 MTX가 지속적으로 유리되어 실험기간 동안 병변이 악화되는 소견은 관찰되지 않았고, 호전되는 소견을 보였다. 또한 고용량 MTX 투여 8주째에 10mg, 15mg, 50mg을 광학현미경으로 비교한 결과 10mg, 15mg에 비하여 50mg에서 관절 연골의 재생이 잘 되는 것을 볼수 있었다 (Fig. 8, 9, 10).



Fig 8 The Microphotograph shows joint space narrowing because of fibrosis of soft tissue and pannus. Still cartilage erosion is seen at 8 weeks after 10mg methotrexate administration (H&E Stain $\times 40$)



Fig 9. The Microphotograph shows incomplete regeneration of articular cartilage at 8 weeks after 15mg methotrexate administration (H&E Stain $\times 100$)



Fig. 10. The Microphotograph shows nearly complete regeneration of articular cartilage at 8 weeks after 50mg methotrexate administration (H&E Stain $\times 200$)

또한, 연부조직 부종, 골탈염, pannus 형성에서 대조군에 비교하여 MTX주사 후 1-2주에 조직 병리학적 점수차가 가장 컸고, MTX주사 후 3일째부터 관절강 협소, 연골 침식에서 20mg, 30mg, 50mg 군들에서 좋은 결과를 보였으며, 시간이 지나면서도 병변이 지속적으로 호전되는 것을 알 수 있었다

고 찰

저용량 MTX를 이용한 관절염의 치료효과는 1990년 Weibblatt와 Maier²⁾, 1992년 Kremer와 Phelps¹⁾에 의해 발표되었다. 그러나 이런 항류마티스 약제는 면역억제제로 작용을 한다고 생각되어지나 본 실험에서처럼 제2형 콜라겐 유도에 의한 쥐의 슬관절염이나 사람의 관절염에 있어서 약제의 정확한 억제 기전이나 관절 질환의 병리에 대해서 아직 확실히 규명된 것은 드물다. Hirata 등³⁾은 쥐를 이용한 실험에서 관절염의 경과중에서 판누스(pannus) 형성을 위해 신생 혈관 형성(neovascularization)과 내피세포의 증식이 필요하고, MTX는 내피세포(endothelial cell) 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다고 보고했는데^{2,3)}, 본 연구에서는 콜라겐 주사 후 2주째에 가장 심한 활액막의 과증식(synovial hyperplasia), 연부조직의 부종, 신생 혈관 형성, 연골의 침식(cartilage erosion)등의 소견을 보였다.

고용량 MTX는 불응성(refractory)인 류마티스 관절염

의 단기간 사용에 효과적이는데, 콜라겐 제2형 유도에 의한 쥐의 관절염에서 후족부의 발적 및 부종 같은 관절염 증상의 진행에 있어서 약 28일간의 지속적인 억제 효과가 있고 부분적으로 관절염 염증세포의 증식에 있어서도 억제 작용이 있다고 보고되었다¹⁰⁾. 또한 Gabriel 등은 MTX를 50mg/m²로 첫 12주간 매주 정맥내로 투여하여 24주까지 경과 관찰을 한 결과 불응성 류마티스 관절염에 효과가 있다고 보고를 하였다⁴⁾. 그리고 Shiroky 등은 5명의 불응성 류마티스 관절염 환자를 대상으로 MTX를 500mg/m²로 2주 간격으로 4차례 투여하여 치료한 결과 효과가 있다고 보고하였다¹¹⁾. 본 연구에서는 이보다 더 많은 고용량 MTX를 1회 투여를 하였는데도 불구하고 관절염 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이를 보아 임상 실험에서도 MTX 용량을 높여서 하는 연구 및 강화제를 투여하는 주기 등에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서, MTX 혈중 농도는 투여 직후 검사한 농도에서 최고치를 나타내었으며, 1일째에 급속히 감소하여 2일째까지 저농도로 계속 유지되는 것을 볼 수 있었다.

류마티스 관절염의 치료제로 쓰이는 MTX는 간독성, 혈액학적 이상, 신장 기능 이상, 위장 장애, 호흡기계 이상 등의 여러 합병증에 대해서 알려져 있으나, 본 연구에서는 MTX 투여 후 간독성을 줄이기 위하여 Nyrin[®] 사용 및 충분한 수분 공급으로 첫 1-2주간 쥐들의 식욕 부진 및 운동력 저하 등만이 나타났고, 황달 소견이나, 사망은 나타나지 않았다. 또한 지속적인 경과 관찰 중 약제에 의한 식욕 부진, 출혈성 설사, 점진적인 체중 감소 등은 관찰되지 않았다.

또한 다른 경로로 투여한 MTX의 약효 지속시간은 4주정도 밖에 지속되지 않는다고 보고되고 있지만, 본 연구에서는 실험 기간인 8주까지 약효가 지속된다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 골육종 환자에 대한 항암 치료로 쓰이는 MTX 용량과 동일하게 고용량의 MTX를 사용한 것이 관절염의 치료에 효과적이며, 강화제 투여 및 주기적으로 투여함으로써 더 좋은 효과 및 약효 지속 기간을 늘릴 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

제2형 콜라겐을 이용하여 유도한 쥐의 관절염 실험에

서 고용량 MTX를 정맥내 투여한 후 1-2주 사이에 대조군과 비교하여 실험군들(MTX 20, 30, 50mg)에서 현저한 치료 효과를 보였으며, 시간이 지남에 따라 병변의 재활성은 보이지 않았고, MTX를 50mg 사용하였을 때 가장 효과가 우수하였다. 이는 실제 임상에서 불응성 류마티스 관절염 환자들에게 사용할 때에 효과가 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Trentham DE, Townes AS, Kang AH: Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1:857-868, 1977
2. Weinblatt ME, Maier AL: Long term experience with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 22:33-38, 1990
3. Decker S, Winkelmann W, Nies B, van Valen F: Cytotoxic effect of methotrexate and its solvent on osteosarcoma cells in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 81(3):545-551, 1999
4. Gabriel S, Creagan E, O'Fallon WM, Jaquith J, Bunch T: Treatment of rheumatoid arthritis with higher dose intravenous methotrexate. *J Rheum* 17:460-465, 1990
5. Sugita T, Ueno M, Furukawa O, Murakami T, Takata I and Tosa T: Effect of a novel anti-rheumatic drug, TA-383, on type II collagen induced arthritis: suppressive effect of TA-383 on interleukin 6 production. *Int J Immunopharmacol* 15: 515-519, 1993
6. Joosten L, Lubberts E, Durez P, Hetsen M and Van den Berg WB: Role of interleukin 1 and interleukin 10 in murine collagen induced arthritis, protective effect of interleukin 1 and interleukin 10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 40:249-260, 1997
7. Kremer JM, Phelps CT: Long-term prospective study of the use of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Update after a mean of 90 months. *Arthritis Rheum* 35:138-145, 1992
8. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H, Hirohata K: Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum* 32(9):1065-1073, 1989
9. Handschumacher H: Immunosuppressive agents. In Gilman AG: *The Pharmacological basis of Therapeutics*. 8th ed. New York Pergamon Press 1264-1276, 1990
10. Morgan SL, Baggott JE, Bernreuter WK, Gay RE, Arani R, Alarcon GS: MTX affects inflammation and tissue destruction differently in the rat AA model. *J Rheum* 28:1476-1481, 2001
11. Shiroky J, Allegra C, Inghirami G, Chabner B, Yarboro C, Klippel JH: High dose intravenous methotrexate with leucovorin rescue in rheumatoid arthritis. *J Rheum* 15:251-255, 1988