

혈우병성 활액막염의 동물 모델에서 Rifampicin의 활막 증식 억제효과에 대한 연구

경희대학교 의과대학 내과학교실, 정형외과학교실*, 동서골관절연구원**

이상훈 · 이연아 · 박은경** · 김경수** · 조윤제* · 한정수* · 유명철* · 양형인

= Abstract =

The Suppressive Effect of Rifampicin in Animal Model of Hemophilic Synovitis

Sang-Hoon Lee, M.D., Yeon-Ah Lee, M.D., Eun-Kyung Park**, Kyung-Soo Kim, Ph.D.**,
Yonn-Jae Cho, M.D.*, Jung-Soo Han, M.D.*, Myung-Chul Yoo, M.D.*, Hyung-In Yang, M.D.

Departments of Internal Medicine, Orthopedic Surgery, East-West Bone
and Joint Research Institute**, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea*

Objective: Hemophilic arthropathy, which results from recurrent intra-articular bleeding, is a proliferative synovitis, but the sequence of pathogenic events in hemophilic synovitis (HS) is not known in detail. To investigate the pathogenic mechanism of HS and to evaluate the suppressive effect of rifampicin for HS, we designed this study.

Methods: Twenty normal male New Zealand white rabbits weighing approximately 2,000 gm were used for this study. We injected 1 mL of autologous whole blood of the rabbits into the right knee joint and normal saline into the left knee joint (control) thrice a week for 10 weeks and sacrificed 10 of them. We injected 10 mg of rifampicin into the right knee joint of HS, which is 5 rabbits of remained 10, once a week from 11th week until 15th week. At 11th week and 20th week, the rabbits were sacrificed and both knee joints of each rabbit were opened, synovial membrane specimens were collected and examined pathologically and biologically such as mRNA of IL-1, TNF- α , MMP-1 and MMP-3 in hemophilic synovium using by real-time quantitative PCR method (comparative Ct method).

<접수일 : 2007년 4월 9일, 심사통과일 : 2007년 4월 27일>

※통신저자 : 양 형 인

서울시 강동구 상일동 149번지

경희대학교 동서신의학병원 관절·류마티스센터

Tel : 02) 440-6127, Fax : 02) 440-7475, E-mail : yhira@khu.ac.kr

이 논문은 2004년도 사회복지법인 한국혈우재단 연구비지원에 의한 연구임.

Results: At 20th week, in rifampicin treated group showed decreased proliferative, and infiltrated mononuclear cells compared with control group. And mRNA of TNF- α , IL-1 and MMP-3 levels were decreased also.

Conclusion: In animal model of HS, histological changes showed the same as human hemophilic synovitis. And this study suggested that rifampicin has a controlling effect on the inflammatory process of HS by suppression of inflammatory cytokine production in the experimental hemophilic synovitis model.

Key Words: Hemophilia, Synovitis, Rifampicin, Cytokine

서 론

혈우병은 응고인자 VIII, IX의 결핍으로 인한 유전적 질환으로서, 반복적인 출혈을 초래하는 질환이다. 근골격계가 출혈이 가장 빈번한 부위이며, 관절내 출혈은 ‘혈우병성 활액막염 (Haemophilic synovitis, HS)’이라는 복잡한 염증성 질환을 일으켜 결국 만성적이고 영구적인 관절염인 혈우병성 관절염 (Haemophilic arthropathy)이 발생하게 된다 (1). 반복적인 관절 내 출혈로 발생하는 혈우병성 관절염은 비교적 젊은 나이에 심한 불구를 초래하는 (2,3) 심각한 관절질환으로서, 응고인자 VIII, IX를 투여하여 출혈을 막으려는 많은 노력에도 불구하고 혈우병에서 가장 흔하게 발생하는 합병증으로 알려져 있다 (4-6). 관절 내 출혈이 초기 유발요소라는 것을 제외하고는 혈우병성 관절염의 병태생리는 자세하게 알려져 있지 않다.

혈우병성 관절염의 병태생리에 관한 현재의 의견은 반복적인 관절내 출혈이 활액막에 철분 침착을 유발하고 그로 인해 활액막의 염증과 결국 연골파괴를 일으키는 이화인자(catabolic factors)가 분비된다는 것이다 (7). 최근의 보고들에 의하면 혈우병성 관절염의 병태생리는 류마티스관절염과 비슷하지만, 활액막 제거술이 혈우병성 관절염 환자의 임상적 상태를 호전시킬 수는 있어도 연골손상의 진행을 막을 수는 없고 (8,9), 혈액 그 자체가 생체 내(in vivo) 및 생체 외(in vitro) 조건하에서 연골세포의 기능장애를 유발하는 것으로 알려져 있다 (10-12).

반복적인 출혈이 일어나는 혈우병성 관절염은 수술적 활액막 제거술보다 화학적 활액막 파괴술이 더 효과적인 대처방안으로 생각되고 있다. 이러한 화학

적 활액막파괴술에 임상적으로 응용되고 있는 rifampicin은 비감염성 관절병변을 치료하는데 사용되어온 항생제로, 1980년대부터 류마티스관절염의 치료에 응용되다가 혈우병성 관절증의 활막증식을 억제하기 위해 사용되고 있다 (13,14). 본 저자들은 rifampicin의 혈우병성 관절염의 활막증식억제 효과에서 대해서 알아보고자 토끼 혈우병성 관절염 모델을 이용하여 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

국내의 Samtako사로부터 뉴질랜드 백색 토끼 수컷 20마리를 (평균체중 \pm 표준편차 2.20 \pm 0.07 kg) 공급 받았으며, 이 토끼들은 실험 전 2주간 우리(cage)에서 적응과정을 거쳤다. 일반적인 상업용 사료와 물을 임의로 공급하여 사육하였다.

2. 방법

토끼 귀 정맥에서 자가 전혈을 채취한 후 케타민(ketamine hydrochloride; 유한양행)을 사용하여 단기 마취 시행 하에 우측 슬관절에 10주간 1주 3회 1 cc씩 주사하였다. 대조군으로서 좌측 슬관절에는 바늘 자체로 인한 염증 가능성을 배제하기 위해 생리식염수 1 cc를 주사하였다. 적어도 2일에 1시간씩 운동 시키면서 병리학적, 방사선학적 변화 및 염증매개물질인 cytokine의 변화를 관찰하였다. 전혈 주사 후 11주째부터 15주까지 남은 10마리 중 5마리의 토끼에 1주 1회씩 혈우병성 활액막염이 발생한 우측슬관절에 10 mg의 rifampicin을 주사하였다. 주사 시행 11주와 20주에 각각 10마리씩 토끼를 희생하여 양측 슬관절에서 활액막을 채취하고, 슬관절을 채취한 후

Table 1. Primer and PCR protocol according to each cytokine

Cytokine	Primer	PCR cycle	Fragment size
IL-1 β	5'-AACCAACAAGTGGTGTTC-3' 5'-GACTCAAATTCAGCTTGTC-3'	Denaturation for 40 sec at 94°C Annealing for 40 sec at 62°C Primer extension for 1 min at 72°C×35 cycle	223bp
TNF- α	5'-CACCACTTAGAAACCTGGAC-3' 5'-TAGGTCTGGGTGACAACTTC-3'	Denaturation for 40 sec at 63°C	216bp
MMP-1	5'-ACCAAAACGAGAGTGCTGCT-3' 5'-AAGCTGAAGTTCGGGTGAGA-3'	Annealing for 40 sec at 61°C	272bp
MMP-3	5'-GCTTTGCTCAGCCTATCCAC-3' 5'-GTGCCAGGGAAGGTACTGAA-3'	Primer extension for 1 min at 72°C×35 cycle	282bp

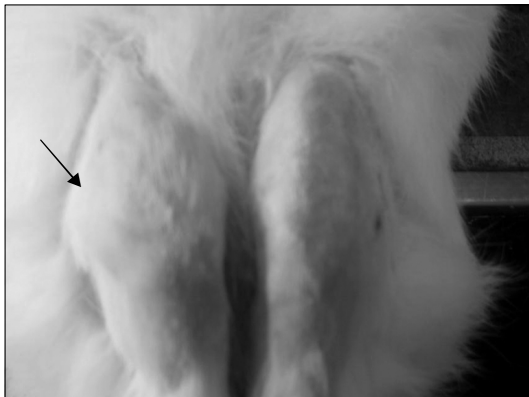


Fig. 1. The blood injected knee of rabbit (arrow) was more swollen compared with the other knee.

시상면으로 양측으로 절개하여 한쪽은 조직학적 검사를 시행하고 반대쪽은 실시간 PCR 정량분석으로 TNF- α , IL-1 β , MMP-1과 MMP-3의 mRNA를 측정하였다.

3. 활액막과 연골세포 배양 검사

1) **활액막 세포의 채취와 배양:** 실험적인 혈우병성 관절염의 활액 표본을 여러 조각으로 나누어 37°C에서 30분간 2 mg/mL의 collagenase (Sigma, U.S.A)와 RPMI1640 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD)의 DNase에서 분해시켜 활액막 세포를 분리하였다. 원심분리 후에 세포들은 10% FCS 및 2 mM L-glutamin과 항생제의 혼합제(100 U/mL penicillin and 100 ug/mL streptomycin)가 첨가된 완전한 DMEM (low glucose GibcoBRL) 용액 속에 부유상태로 있게 되며, trypsin-

EDTA method를 사용하여 배양하였다. 10% FBS와 100 units/mL penicillin과 100 ug/mL streptomycin이 함유된 5 mL의 DMEM 배지에 5×10^3 의 활액막 세포를 부유시켜 아랫부분이 평평한 96-용기 트레이 (Falcon, Becton Dickinson Labware, New Jersey)의 각 용기에 넣어 5% CO₂가 함유된 습윤된 배양기에서 배양하였다. 2시간의 배양 후에, 비 부착성의 세포를 제거하고 부착성의 세포를 완전한 DMEM 배지에서 배양하였다.

2) **IL-1 β , TNF- α , MMP-1 and MMP-3의 측정:** 하룻밤의 배양 이후 토끼 활액막에서 모든 RNA를 Trizol Reagent (GibcoBRL)를 이용하여 추출하였다. RNA의 총량은 분광학적으로 측정하였다. 역전사 반응은 1 ug의 RNA 전부를 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 0.125 uM oligo-dT, 1 unit/uL의 리보뉴클레아제 억제제와 0.25 unit/uL AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa)를 함유한 20 uL의 반응량에서 배양하여 얻을 수 있었다. 반응 혼합체는 iCycler Thermal cycler (Bio-Rad, U.S.A)를 사용하여 42°C에서 60분 배양 후 99°C에서 5분간 배양되었다. cDNA 표본은 PCR 분석을 시행할 때까지 4°C에서 보관되었다. PCR 반응은 1X PCR buffer, 0.4 mM dNTPs, 10 pmole forward and reverse primers, 2.5 unit Taq Polymerase (TaKaRa)와 20 uL에 1 uL의 cDNA solution으로 이루어졌다. IL-1 β , TNF- α , MMP-1 and MMP-3는 각각의 프로토콜에 따라 증폭되었다(표 1). PCR의 생성물은 ethidium bromide의 존재 하에 1.5% agarose gels에서 분석되었으며, 실시간 정량적 PCR 분석을 시행하였다.

결 과

1. 11주 이후 혈우병성 활액막염 토끼모델

자가 전혈을 주사한 군은 대조군에 비해서 11주에 정도의 부종을 보였다(그림 1). 그러나, 다른 조직학적 변화나 생리학적 표지자들은 대조군에 비해서 큰 차이를 보이지 않았다.

2. 11~15주 rifampicin 투여 후 혈우병성 활액막염 토끼모델

조직학적 검사를 시행하기 전에 방사선학적 검사를 시행하였다. 전혈을 주사한 슬관절은 퇴행성 변화를 보였다(그림 2).

1) 조직학적 분석: 20주째 실험동물의 슬관절에서 연골과 활액막을 채취하였다. 전혈을 주사한 관절에서 체중부하부분은 대조군에 비해 연골의 감소와 활



Fig. 2. The blood injected right knee shows degenerative change by X-ray.

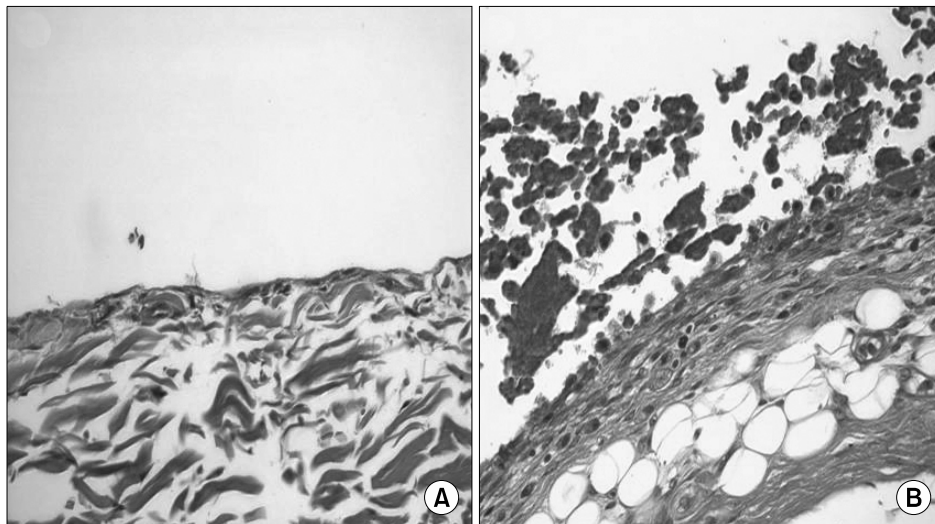


Fig. 3. The synovium of blood injected knee shows proliferation and fat tissue was increased under synovium (A) normal saline injected knee synovium (B) blood injected knee synovium (H&E stain, $\times 400$).

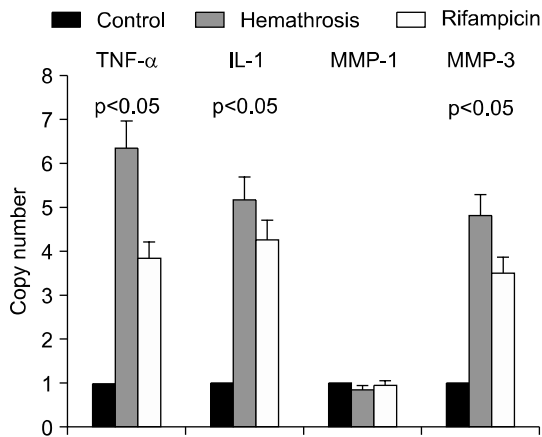


Fig. 4. The expression of TNF- α , IL-1, MMP-1 and MMP-3 mRNA in synovium of animal model of Hemarthrosis (HA) by real time-PCR. Control is saline-injected knee, HA is blood-injected synovium without rifampicin, and RFP is blood-injected synovium treated with rifampicin.

액막의 증식을 보였다. 전혈을 주사한 군에서 얻은 활액막은 정상적인 유백색의 부분 주위로 갈색의 증식된 부분을 보였다(그림 3).

2) 실시간 PCR 분석: 생리식염수를 주사한 군, 전혈만 주사한 군 및 전혈을 주사한 뒤 rifampicin을 투여한 군의 활액조직에서 mRNA를 추출하여 TNF- α , IL-1 β , MMP-1 및 MMP-3 발현을 실시간 PCR로 양을 비교하였다. Real time PCR 분석결과 TNF- α , IL-1, MMP-1 및 MMP-3의 mRNA 발현은 대조군에 비해 혈관절증(hemarthrosis) 모델에서는 증가하였으며, rifampicin을 투여한 군에서는 TNF- α , IL-1 및 MMP-3 mRNA의 발현이 현저하게 감소되었으나 MMP-1 mRNA는 변화가 없었다(그림 4).

고 찰

혈우병성 관절증은 혈우병의 가장 흔한 합병증이며, 활액막의 철분 침착이 특징으로 나타난다. 이러한 관절내 혈액의 침착은 운동장애를 일으키며 또 다른 반복적인 관절내 출혈을 야기하게 된다. 혈우병성 관절증의 병태생리는 부분적으로만 알려져 있으며, 반복적인 출혈이 활액막의 증식과 비후 및 신

생혈관화와 활액막의 염증을 일으켜 염증세포에 의한 이화 효소와 cytokine의 생산이 야기시키는 것으로 알려져 있다 (15).

응고인자에 의한 보전적인 방법으로는 진행성 혈관절증을 치료할 수는 없으므로 출혈의 재발을 막고 관절연골의 진행성 파괴를 막기 위해 활액막제거술을 실시하게 된다 (16-18). 통상의 관절절개술이나 활액막제거술은 출혈의 재발을 막기도 하지만 종종 관절 운동의 제한을 일으키는 단점을 가지고 있다 (19-21). 비수술적방법으로는 Au-198 colloidal gold, ³²P-colloidal phosphorus, ⁹⁰Y-colloidal yttrium과 ¹⁸⁶Re-colloidal rhenium과 같은 방사성물질을 투여하는 방법이 알려져 있으나 (16,18,22,23), 성장기에는 연골에 미치는 독성 때문에 어린 환자들에게는 사용의 제한점을 가지고 있다. 또 다른 비수술적방법으로 rifampicin과 같은 화학물질을 투여하는 방법이 알려져 있으며, 1980년대 후반부터 혈우병 관절염 환자에게 출혈의 재발을 막을 목적으로 사용되었고, 이후 브라질 Sao Paulo, 베네수엘라의 Caracas의 혈우병 센터에서 혈우병 환자들을 대상으로 rifampicin 투여의 임상적 실험을 실시하였다 (13). 그 결과 용량과 투여기간은 달랐지만 두 센터 모두에서 처치 후 통증을 감소시키거나 출혈의 재발이 멈추는 등 좋은 예후를 보여주었다. 또한 Caviglia 등 (14)은 rifampicin의 임상적인 실험의 결과 환자의 나이가 어리거나, 팔굽관절과 발목관절의 병변에서 더 좋은 예후를 나타냈다고 보고하였다.

본 연구는 혈우병성 관절염 연구 모델로 토끼를 사용하여 관절 파괴의 기전을 밝히고자 하였고 혈우병성 관절염에 사용되고 있는 rifampicin이 어떤 기전으로 혈우병성 관절염에 관절보호효과가 있는지에 대한 연구로 시행되었다. 반복적인 관절 내 출혈은 활액막에 철이 침착되고 이로 인한 염증반응이 일어나 염증전구 cytokine 등이 증가하고 결국 활액막 증식이 일어나 류마티스관절염과 비슷한 과정으로 관절을 파괴한다는 것을 알 수 있었다. 조직 소견에서 활액막의 증식과 혈관의 증식이 보였으며 이로 인하여 더욱 관절 내 출혈 위험성이 커져 악순환의 과정을 밟아 관절의 파괴가 일어나는 것으로 생각된다. 혈우병성 관절염의 토끼모델의 활액막에서 실시간 PCR를 시행한 결과 반복적인 출혈은 활액막에서

TNF α 와 IL-1과 같은 염증전구 cytokine의 발현과 MMP-1과 MMP-3의 생산을 증가되었고 이는 류마티스관절염과 비슷하게 관절 내 혈액 자체가 염증을 일으키고 이로 인한 활액막의 증식을 일으킨다는 것을 시사한다. rifampicin을 투여하면 TNF α IL-1과 MMP-3는 혈우병성 관절염에 비해 감소하였으나, MMP-1은 변화가 없었다. 이러한 결과는 rifampicin이 염증전구 cytokine을 억제함으로써 활액막염을 억제하는 효과를 가지고 있으며, 연골조직에서는 Type I, II, III collagen보다는 proteoglycan core protein, laminin, fibronectin 및 Type IV collagen이 분해되는 것을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

결 론

반복적 혈액의 관절 내 주입으로 조직학적 변화가 인체에서의 변화와 유사한 혈우병성 관절염 동물 모델을 성공적으로 만들었으며 rifampicin의 투여는 염증전구 cytokine을 억제함으로써 활막 증식을 억제하는 효과를 나타내었다.

REFERENCES

- Rodriguez-Merchan EC. Pathogenesis, early diagnosis, and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis. *Clin Orthop* 1997;343:6-11.
- Arnold WD, Hilgartner MW. Haemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. *J Bone Joint Surg Am* 1977;59:287-305.
- Madhok R, York J, Sturrock RD. Haemophilic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:588-91.
- Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Int Med* 1992;236:391-9.
- Petrini P, Lindvall N, Egberg N, Blomback M. Prophylaxis with factor concentrates in preventing haemophilic arthropathy. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991;13:280-7.
- Soreff J, Blomback M. Arthropathy in children with severe hemophilia A. *Acta Paediatr Scand* 1980; 69:667-73.
- Roosendaal G, Vianen ME, Wenting MJ, van Rinsum AC, van den Berg HM, Lafeber FP, et al. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:540-5.
- Rodriguez-Merchan EC. Methods to treat chronic haemophilic synovitis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:588-91.
- Roosendaal G, Mauser-Bunschoten EP, de Kleijn P, Heijnen L, van den Berg HM, Van Rinsum AC, et al. Synovium in haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 1998;4:502-5.
- Hooiveld MJ, Roosendaal G, Jacobs KM, Vianen ME, van den Berg HM, Bijlsma JW, et al. Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of the joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy. *Arthritis Rheum* 2004;50:2024-31.
- Roosendaal G, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Cartilage damage as a result of hemarthrosis in a human in vitro model. *J Rheumatol* 1997;24:1350-4.
- Roosendaal G, Vianen ME, Marx JJ, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a human in vitro study. *Arthritis Rheum* 1999;42:1025-32.
- Caviglia HA, Fernandez-Palazzi F, Galatro G, Perez-Bianco R. Chemical synoviorthesis with rifampicin in hemophilia. *Hemophilia* 2001;7:26-30.
- Caviglia HA, Fernandez-Palazzi F, Maffei E, Galatro G, Barrionuevo A. Chemical synoviorthesis for hemophilic synovitis. *Clin Orthop Relat Res* 1997;343:30-6.
- Stein H, Duthie RB. The pathogenesis of chronic haemophilic arthropathy. *J Bone Joint Surg Br* 1981; 63-B:601-9.
- Erken EHW. Radiocolloids in the management of hemophilic arthropathy in children and adolescents. *Clin Orthop* 1991;264:129-35.
- Fernández-Palazzi F, de Bosch NB, de Vargas AF. Radioactive synovectomy in haemophilic haemarthrosis. Follow-up of fifty cases. *Scand J Haematol* 1984;40(Suppl):s291-s300.
- Fernández-Palazzi F, Rivas S, Cibeira JL, Dib O, Viso R. Radioactive synoviorthesis in hemophilic synovitis. Materials, techniques, and dangers. *Clin Orthop* 1996;328:14-8.
- Greene WB. Synovectomy of the ankle for hemophilic arthropathy. *J Bone Joint Surg* 1994;76A:812-9.
- Mannucci PM, DeFranchis R, Torri G, Pietrogrande V. Role of synovectomy in hemophilic arthropathy. *Isr J Med Sci* 1977;13:983-7.
- Matsuda Y, Duthie RB. Surgical synovectomy for haemophilic arthropathy of the knee. Long-term

- follow-up. Scand J Haematol 1984;40(Suppl):237-47.
- 22) Soroa VE, del Huerto Velazquez Espeche M, Giannone C, Caviglia H, Galatros G, Fernandez D, et al. Effects of radiosynovectomy with p-32 colloid therapy in hemophilia and rheumatoid arthritis. Cancer Biother Radiopharm 2005;20:344-8.
- 23) Merchan EC, Magallon M, Martin-Villar J, Galindo E, Ortega F, Pardo JA. Long term follow up of haemophilia arthropathy treated by Au-198 radiation synovectomy. Int Orthop 1993;17:120-4.
-