

# Lipopolysaccharide로 유발된 생쥐 무릎관절낭 염증에 관한 형태학적 연구

- 윤활관절막과 섬유관절막의 변화를 중심으로 -

김진택, 안상현, 최난희, 정재만, 박인식, 강운호\*, 김호현\*\*, 이해풍\*\*\*

동국대학교 한의과대학 해부학교실, \*내과학교실,

\*\*세명대학교 한의과대학 생리학교실, \*\*\*동국대학교 생명자원과학대학 응용생물학과

**【초록】** 본 연구는 관절염 유발시 일어나는 관절낭의 형태학적 변화를 조사하기 위해 lipopolysaccharide(LPS) 주사로 인위적 관절낭 염증을 유발시킨 후 시간경과에 따른 윤활관절막과 섬유관절막의 형태 변화를 관찰하였다. BALB/C 암컷 생쥐 오른쪽 무릎관절낭에 LPS 300 $\mu$ g/kg를 주사한 후 3, 7 그리고 14일에 무릎관절을 얻었다. 무릎관절은 4주동안 EDTA용액에 탈회한 후 통상적 방법으로 paraffin에 포매하였다. 또한 윤활관절막의 미세구조변화는 embed812로 포매한 후 관찰하였다. LPS 주사후 관절연골 인접부위의 윤활관절막에서 시작된 세포과형성(hyperplasia)은 시간 경과후 전체 윤활관절막으로 확대되었다. 윤활관절막내의 미세구조의 변화로는 윤활포식세포(type I)가 관절강내로의 많은 돌기(filopodia)를 내었고, 잘 발달된 과립형질내세망을 가지는 type 2 윤활분비세포의 숫적 증가가 보였다. 한편 LPS 주사후 섬유관절막에서 나타나는 형태학적 변화는 collagen fiber 생성에 의한 섬유화가 증가되며, 이러한 섬유화를 주도하는 섬유모세포의 이주증가가 관찰되었다. 또한 혈관 주위에서는 백혈구의 이주 증가가 나타났으며, 탈과립형(degranulated type) 비만세포가 많이 관찰되었다. 이상의 결과로 LPS 주사로 관절낭에서 염증이 유발되어 윤활관절막과 섬유관절막에서 형태학적 변화가 나타났다. 이러한 일련의 형태학적 변화는 발병초기 류마티스성 관절염에서 나타나는 병리학적 소견과 동일한 결과로서, 앞으로 진행될 치료제 개발과 유발기전에 관한 해석을 위한 *in vivo* 실험의 적절한 모델로 기여할 것으로 기대된다.

**중심단말 :** 관절염, Lipopolysaccharide, 윤활관절막의 세포과형성, 섬유관절막의 섬유화

## I. 서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis)은 상하지 관절에서 발생하는 만성적인 염증성 질환으로서 윤활관절막염으로 시작하여 관절연골

및 그 주위조직까지 파괴하고, 진행함에 따라 연골의 소실과 강직, 변형같은 관절기능의 소실을 초래한다고 Buckley(1997), Cornelia 들(1997), Ralph와 Rodanthi(1972) 그리고 배 들(1994)이 보고하였다. 특히 류마티스 관절염은

pannus에 의한 뼈의 파괴, 운환관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백분해효소, O<sub>2</sub> radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 이루어진다고 Arend와 Dayer(1990), Edward 들(1985), Peter<sup>1</sup> 들(1995) 그리고 Wei 들(1989) 등이 보고하였다. 이러한 류마티스 관절염이 신한 경우 류마티스성 결절(rheumatoid nodules), 맥관염(rheumatoid vasculitis), 안염증(eye inflammation), 신경기능이상(neurologic dysfunction), 심폐기능장애, 림프절병증(lymphadenopathy), 비장거대증(splenomegaly) 등의 관절외 류마티스증상이 발현된다고 Stephen 들(1995)이 보고하였다. 한편 이런 류마티스 관절염은 주로 30~40대에서 많이 발병하며 전 인구의 2~3%가 이 질환을 갖고 있고 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다.

그러나 류마티스 관절염의 병인에 대해서는 확실히 밝혀져 있지는 않지만 현재 주장되는 기전으로는 자기 혹은 외부항원에 대한 과민반응으로, Danier 들(1993), Dayer 들(1976), Marc 들(1996), Hart 들(1989), Keren 들(1993) 그리고 Nouri 들(1984) 등의 보고에 의하면 면역세포에서 방출되는 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), collagenesis, proteinase, substance-P 등이 연골과 collagen을 감소시키며 활액의 증식과 염증을 유도하여 결국 연골과 뼈의 파괴를 초래하게되는 자가면역 질환(autoimmune disease)으로 규정되고 있는 실정이다. 이러한 연유로 현재 면역억제제 또는 면역조절제의 류마티스 관절염의 치료제로서의 효능성 연구(ACRAHC(1996), Ernest 들(1991), Gary 들(1994), Landewe 들(1995), Matthew와 Kirk(1996), Michael과 Ravinder(1994) 그리고 Peter<sup>2</sup> 들(1995))가 활발하게 진행되고 있는 중이며, 본 저자들도 면역조절능력을 가진 한약재를 이용한 치료제 개발에 많은 관심을 기울이고 있다.

한편 이러한 치료제 연구를 위해서 인위적인

류마티스 관절염 유발이 필요하게 되어, 각종의 방법들이 개발되었다. 즉, kaolin이라고 하는 일종의 crystal substance를 무릎관절낭에 주사하여 염증을 야기시키는 방법(Coggeshall 들(1983)), carrageenan이라고 하는 algal polysaccharide를 주사하여 염증을 일으키는 방법(Al-haboubi와 Zeitlin(1983)) 또는 kaolin만으로는 염증의 심도가 심할 때 두가지를 동시에 주사하는 방법, *Mycobacterium butyricum*을 inoculation하는 방법(Colpaert 들(1983)), 통증을 전달하는데 관여하는 신경전달물질로 알려진 substance P 20mg을 관절강내에 주사하는 방법(Lam과 Ferrell(1989)) 등의 여러 가지 방법들이 보고되었다. 그러나 저자들은 본 실험에서 인위적인 류마티스 관절염 유발을 위해 *Escherichia coli*에서 기인된 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였는데, 이는 염증매개 물질인 IL-1 $\beta$ 의 생산을 유발하여 염증반응의 증진을 통한 관절내 손상을 야기시키는 것으로 Matsukawa 들(1993)에 의해 보고되어 있다.

본 연구는 이러한 LPS 주사로 인위적 관절낭 염증을 유발시킨 후 시간경과에 따른 운환관절막과 섬유관절막의 형태적 변화 관찰을 통하여 류마티스 관절염 유발시 일어나는 염증반응에 의한 관절낭 손상에 따른 형태변화를 조사하였다. 아울러 본 연구 결과는 차기에 시행될 류마티스 관절염 치료제 개발에 위한 동물 실험 모델의 기초적인 자료로서의 활용가능성이 인정되는바 그 성과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

대한실험동물센터에서 분양받은 태령 6주된 BALB/C계 생쥐 암컷을 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험군은 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 무릎관절에 LPS를 주사한 LPS 주사군(LPS군)으로 나누었으며, 다시 LPS군은 LPS 처리 후 시간의 경과에 따라 3, 7 그리고

14일로 세분시켰다. 한편 실험군 각 각에는 10 마리씩 배정하였다.

## 2. LPS의 제조 및 주사

본 실험에 사용된 Lipopolysaccharide(LPS; Sigma, USA)는 증류수에 희석한 후 각각 300ug/kg씩 LPS군의 무릎관절(knee joint)에 주사하였다. 특히 정확한 무릎관절낭으로의 주사를 위해 sodium pentobarbital solution으로 마취한 다음 무릎부위 피부를 절개하여 무릎뼈를 확인한 후 주사하였다. 한편 무릎관절에서 염증이 유발된 생쥐의 확인은 LPS 주사 후 24-48 시간동안 나타나는 무릎주변의 부종을 통해서 이루어졌다.

## 3. 무릎관절의 탈회와 표본제작

LPS군은 LPS 주사 후 3, 7 그리고 14일 경과 후 sodium pentobarbital solution으로 마취한 다음 4% paraformaldehyde로 심장관류고정을 시행하였다. 관류고정 후 적출된 무릎관절을 24시간동안 4% paraformaldehyde에서 재고정하였다. 재고정 후 4주동안 EDTA solution에서 탈회(decalcification)한 후 증류수로 세척하였다. 그런 다음 무릎관절을 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하여 5um 두께로 연속절편을 만들었으며 Hematoxyline과 Eosin으로 염색하였다.

## 4. 윤활관절막의 미세구조 변화 관찰

윤활관절막세포의 미세구조의 변화를 관찰하기 위해 관절막 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선 고정된 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분동안 염색한 후 통상적인 방법으로 embed812에 포매하였다. 관절막내 미세구조 변화를 관찰하기 위하여 ultramicrotome (LKB, Nova)으로 60-80 nm 두께로 절편을 만든 다음 투과전자현미경(Hitach H-600)으로 관찰하였다.

## 5. 섬유관절막의 형태 변화 관찰

### (1) Collagen 분포 변화 관찰

LPS 주사 후 시간의 경과에 따른 섬유관절

막내에서의 collagen 분포변화를 관찰하기 위해서 Van Gieson's picric acid-fuchsin stain을 시행하였다. 절편된 무릎관절은 우선 Weigert's iron hematoxylin에서 20분동안 염색한 다음 Van Gieson's stain solution에서 5분간 염색하고, 광학현미경으로 검경하였다.

### (2) 윤활관절막주변 침윤세포의 형태 관찰

관절강쪽 섬유관절막내에 침윤된 세포의 형태를 관찰하기 위해서 5um의 연속절편을 Giemsa stain에 의거하여 Wright's stain과 Giemsa stain에서 각각 5분, 45분씩 염색하였다. 염색된 절편은 광학현미경으로 관찰하였다.

### (3) 혈관주변 침윤세포의 분포 변화 관찰

섬유관절막내 침윤세포의 분포변화를 관찰하기 위해서 Alcian blue method(pH 2.5)에 의거하여 alcian blue solution에 30분간 염색한 다음 nuclear fast red solution에 5분동안 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

### (4) 비만세포의 분포 변화 관찰

섬유관절막내 비만세포의 분포 변화를 관찰하기 위해서 5um의 연속절편을 Luna's method에 의거하여 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각각 1분, 5분동안 대조염색하였다. 염색된 절편은 광학현미경으로 관찰되었다.

# Ⅲ. 결 론

## 1. 윤활관절막의 형태 변화

### (1) 일반적인 형태 변화

LPS 주사 후 무릎관절강에서의 형태학적 변화는 시간의 경과에 따른 관절강내 염증에 의한 조직손상의 차이에 의해 뚜렷하게 구분되어 관찰되었다. 우선 LPS군중에서 윤활관절막에서의 형태 변화를 살펴보면, 비교적 형태학적 변화가 적었던 LPS 주사후 3일 경과군에서는 무릎관절강의 관절연골(articular cartilage)과 관절낭(synovial

capsule)의 윤활관절막(synovial membrane)이 연결되는 부위에서 일부 윤활관절막세포의 과형성(hyperplasia)을 관찰할 수 있었다. 그러나 그 외의 윤활관절막에서는 대조군과 동일한 형태로 나타났다. 3일군에 비해 시간이 경과된 7일군의 경우, 윤활관절막세포의 과형성이 관절연골과 윤활관절막의 연결부위에서 확장되어 전체 윤활관절막에서 나타났다. 그리고 시간에 지날수록 윤활관절막세포의 과형성증가로 인해 14일군은 7일군에 비해 그 윤활관절막의 두께가 더욱 더 비후된 것으로 관찰되었다(Fig. 1.).

(2) 윤활관절막의 미세구조 변화

관절낭은 미세구조는 외부의 섬유관절막과 내부의 윤활관절막으로 구분이 되어 나타났는데 섬유관절막은 풍부한 지방조직과 결합조직으로 구성되어 있었고, 윤활관절막은 많은 모세혈관이 분포하였으며 관절강을 따라서 2종류의 윤활세포가 존재하고 있었다. 대조군에서 윤활관절막은 2종류의 윤활세포가 1-2 층으로 관절강을 싸고 있었는데 전자밀도가 낮은 윤활포식세포(phagocytic synovial cell)는 그 수가 많으며 세포질내에 많은 사립체와 미세포음소포 등을 가지고 있었다. 전자밀도가 상대적으로 높은 윤활분비세포(secretory synovial cell)는 세포내에 잘 발달된 과립형질내세망을 가지고 있었다. 그리고 이들 윤활세포들은 관절낭내로 굵은 돌기들을 내고 있었다

LPS군은 윤활세포중 윤활포식세포의 hyperplasia가 두드러 지는 전형적인 염증의 소견을 보이고 있었다. 세포외적인 변화로는 세포사이공간이 넓어지면서 세포의 조각들이 많이 나타났으며(Fig. 14.), 모세혈관의 확장과 더불어 림프구의 침윤도 관찰되었다. 그리고 관절강내로 왕성한 분비활동을 하는 세포가 증가하였다. 세포내적인 변화로는 윤활포식세포의 돌기가 관절강내로 많이 뻗고 있었고(Fig. 13.) 윤활분비세포에서는 과립형질내세망의 확장이 두드러지고 있었다. 그리고 윤활세포들이 파괴되는 모습도 많이 관찰할수 있었다

2. 섬유관절막의 형태 변화

(1) 일반적인 형태 변화

윤활관절막주변 섬유관절막부위에서는 시간의 경과에 따른 섬유모세포(fibroblast)의 이주(migration)증가가 관찰되었다. 그 결과 3일군에서 초기 관절염의 형태적 특징인 섬유화(fibrosis)가 관절연골과 윤활관절막 접경지역에서 나타났다. 이러한 초기 윤활관절막주변에서의 섬유화가 섬유관절막내부의 지방세포층으로 진행이 확대되는 것을 7일군에서 관찰할 수 있었으나 관절강(synovial cavity)내로의 섬유화는 나타나지 않았다. 14일군의 섬유화는 섬유관절막주변 지방세포층까지 진행되는 한편, 관절강으로 섬유화가 진행되는 것도 관찰되었다(Fig. 2.). 특히 관절강으로의 섬유화는 관절낭 주변 관절연골에서 심하게 일어나 관절연골의 손상이 나타났다. 또한 이 시간대의 관절낭내의 모세혈관주변에는 많은 림프구의 이주를 확인할 수 있었다(Fig. 3.).

(2) Collagen 분포 변화

LPS 주사 후 시간의 경과에 따른 관절낭내 collagen 변화의 시작은 관절연골과 윤활관절막 연결부위에서 일어나는데 윤활연골막 아래부위에서 collagen fiber로 된 얇은 섬유화층이 관찰되었다(Fig. 6.). 이러한 얇은 섬유화층은 시간이 경과할수록 확장되어 실험 14일군에서는 섬유관절막의 일부 지방층을 제외한 섬유관절막 모든 지역에서 섬유화가 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 5.).

(3) 섬유관절막내 침윤세포의 형태 변화

LPS 주사후 관절낭의 섬유화지역으로 이주하여 침윤되는 세포는 주로 세포질의 가장자리 부위의 돌기(process)가 잘 발달된 분명한 섬유모세포인 것으로 나타났다(Fig. 8.). 이러한 섬유모세포는 시간의 경과에 따른 LPS군의 섬유화지역에서 큰 수적 증가를 보였다(Fig. 7.). 한편 실험 7일과 14일군에서는 섬유모세포외에 섬유관절막내 혈관주위에서 alician blue 양성반응세포(sulfated acid mucosubstance 함유세포)

의 분포가 증가된 것으로 관찰되었다(Fig. 10). 이러한 혈관주위에 침윤된 세포는 주로 중성호성백혈구와 림프구들이므로 관찰되었다.

#### (4) 비만세포의 분포 변화

LPS군과 대조군에서 LPS 주사후 나타나는 비만세포의 분포차이는 LPS 주사 후 14일에서 잘 나타났다. 그러나 LPS군의 경우 급격한 섬유화가 일어나는 지역에서 degranulated type의 비만세포가 관찰되었으나(Fig. 11., 12.) 비만세포의 수적 증가는 일어나지 않았다.

### IV. 고 찰

자가면역질환(auto-immune disease)으로 분류되고 있는 류마티스 관절염은 그 발현양상이 매우 다양하여 여러 관절이 갑자기 부종, 동통 등 급성관절염의 소견을 보이는 경우에서부터 몇 개월 또는 몇 년에 걸쳐 서서히 관절강직 및 변형을 초래하는 것에 이르기 까지 그 차이가 심하며, 결과적으로 불구를 초래하여 막대한 인적, 물질 손실을 유발시킬 뿐만 아니라 환자의 생명도 감소시킬 수 있어서, 사회적 문제를 지니고 있는 질환이라고 Morris(1990), Buckley(1997), Cornelia 들(1997), Ralph와 Rodanthi(1972) 그리고 배 들(1994)은 보고하였다.

이러한 류마티스 관절염의 발병 원인으로 추정되는 것으로 김(1992)와 이(1992)의 보고에 의하면 Mycoplasma, Epstein-Barr virus, cytomegalo virus, parvo virus, rubella virus에 의한 감염, 미생물 자체에 대한 반응 -staphylococcus, streptococci와 mycoplasma 등의 미생물에 대한 초항원(super antigen)생성-, 그리고 감염된 미생물체의 분자적 흉내내기(molecular mimicry)와 같은 미생물과의 반응과정에서 유발된 문제들에 의해 관절강내 구성성분의 변화를 야기시킨다. 관절강내 구성물질의 변화는 류마티스 관절염의 발병 원인에도 불확실한데 반해, 잘 알려진 주된 발병 징후이다. 요약해보면, 윤활액내의

type II collagen의 역가의 증가(Morgan 들(1993), Lars 들(1986), Leo 들(1996), van Lent 들(1996)), collagenase의 증가(박 들(1994)), prostagladins E<sub>2</sub>의 증가(Hart 들(1989)), stromelysin 증가, plasminogen activator 증가 (Joseph 들(1992), Jnana 들(1993)) 등이 보고되었다. 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해서 발생하게 되며 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokine이 관여하는 것으로 Marc 들(1996), Wei 들(1989)에 의해 보고되어 있다. 이러한 구성성분의 변화는 심각한 자가면역반응을 초래하여 관절손상을 유도하게 된다.

류마티스 관절염 유발에 대한 면역연쇄반응(immunologic cascade)은 항원제공세포(antigen presenting cell; APC)인 윤활관절막내 윤활포식세포(Type I cell ; phagocyte like synoviocyte)의 항원인식을 통해 IL-1 $\beta$ 의 분비가 증가되어 림프구와 호중구를 비롯한 단핵세포, 섬유모세포, 연골세포의 관절막내로의 이주(migration) 활성화(activation)가 일어난다고 Arvind 들(1991), Buckley(1997), Fujiwara 들(1995), Ralph와 Rodanthi(1972) 그리고 Zoltan 들(1998) 등이 보고하였다. 한편 이러한 염증관여세포의 이주에는 여러종류의 cell adhesion molecule(CAM)이 관여하는 것으로 Bruce(1994), Brown 들(1993) 등이 보고하였다. 염증관여세포들에 의해 분비되는 cytokine은 작용세포(effect cell)들에 의한 관절 손상의 결과로, 섬유화(fibrosis)를 유발시켜 panus가 형성·확대되어 윤활관절의 연골 파괴에까지 영향을 미치게 되며, 통증과 부종(edema)을 수반하게 된다고 Hitoshi 들(1994)이 보고하였다. 시간이 경과할수록 panus는 관절의 강직이나 변형의 양상으로 바뀌게 된다고 Hiroshi 들(1997), Hassan 들(1993), Lewis 들(1995), Nathan 들(1997), Peter<sup>1</sup> 들(1995) 그리고 Toshitaka 들(1992) 등이 보고하였다. 류마티스 관절염의 원인을 모르기 때문에, 원인 제거를 위한 치료나 병의 진행을 바꿀 수 있는 만족스런 치료약은 아직 없는 실정이다. 그래서 현재로서는 aspirin, 비스테로이드성

소염제-salicylate-, 단순 소염제, 부신피질호르몬-corticosteroid-, 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug), 면역억제제-cyclosporin A, cyclophosphamide, Chloroquine, Methotrexate -, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있는 것으로 Landewe 들(1995), ACRACH(1996), Peter<sup>2</sup> 들(1995), Michael과 Ravinder(1994), Matthew와 Kirk(1996), Gary 들(1994), Ernest 들(1991) 등이 보고하였으나, 각각 myelosuppression, hypertension, hepatic and renal dysfunction 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요하다.

본 실험에서 관절염을 유발시키기 위해 *Escherichia coli*에서 기인된 LPS를 사용하였는데 이는 IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN 및 그의 다른 염증매개물질들의 생산을 유발하여 염증반응의 증진을 통해 관절내 손상을 야기하는 시키는 것으로 Matsukawa 들(1993)에 의해 보고되었다. 특히 관절염증 질환의 가장 중요한 매개인자인 IL-1의 분비를 촉진시키는 LPS는 류마티스 관절염 유발에 적격으로 알려져 있어 TNF- $\alpha$ 와 collagen를 이용한 류마티스 관절염 유발 실험과 더불어 사용되고 있는 실정이다.

본 실험에서 LPS 주사로 무릎 관절낭의 윤활관절막에서 일어난 형태 변화는 전형적인 염증의 소견을 보이고 있었다. 세포외적인 변화로는 세포 사이 공간이 넓어지면서 세포의 조각들이 많이 나타났고 모세혈관의 확장과 더불어 림프구의 침윤도 관찰할수 있었으며, 세포내적인 변화로는 윤활포식세포의 돌기가 관절강내로 많이 뻗은 상태였고, 과형성된 윤활분비세포내의 과립형질내세포의 확장이 뚜렷하게 나타났다. 이런 윤활분비세포 또는 섬유모세포유사 윤활세포(fibroblast like synoviocyte : FLS)의 증가는 관절낭에서의 연쇄적 염증반응을 가속화시키는 방아쇠역할을 하는 것으로 사료되는데 *in vitro* 실험을 통해 FLS가 IL-1 $\beta$ , IL-2, CAM을 분비하는 역할한다는 Anna 들(1991), Bruce 들(1993), Carlene 들(1996), Jeanette 들

(1992), Christopher 들(1992) 그리고 전 들(1995)의 보고를 통해 이해될 수 있을 것이다.

한편 섬유관절막에서 형태적인 변화 즉, 섬유화(fibrosis)의 확산, 림프구, 중성호성백혈구를 비롯한 침윤(infiltration)세포의 증가 그리고 탈과립형(degranulated type) 비만세포의 분포증가를 관찰할 수 있었다. 섬유화의 확산은 Van collagen fiber의 분포 증가와 이를 생산하는 섬유모세포의 수적 증가를 통해서 이루어진 것으로 관찰하였다. 섬유모세포는 류마티스 관절염에서 골과 연골의 파괴에 주로 관여하는 세포로서, 염증이 생긴 윤활막이나 pannus의 인접부에서 발생한 후 확대되어 관절연골까지 침범하게 되는 vascular granulation tissue의 주요 구성요소 중의 하나이며, 또한 prostaglandin E<sub>2</sub>를 방출하여 골의 탈석회화(demineralization)을 일으키는 작용을 하는 세포이다. 섬유화는 주로 윤활관절막과 연골이 만나는 부위에서 시작하여 전체 관절낭까지로 확산되는 것으로 관찰되었으며, 섬유화의 급속한 진행 결과 pannus가 형성될 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Morgan 들(1993), Lars 들(1986), Leo 들(1996) 그리고 van Lent 들(1996) 등의 보고와 일치한다. 림프구, 중성호성백혈구를 비롯한 침윤세포의 과도한 증가는 Zoltan 들(1998)이 보고한 신생혈관을 비롯한 혈관 증가, Bruce(1994), Brown 들(1993) 등이 보고한 CAM의 분비증가에 의한 것이다. 또한 본 실험 결과인 탈과립형 비만세포의 증가 역시 관절낭에서의 염증반응 증가를 시사하는 것으로, 피부에서 과도한 염증반응시 나타나는 탈과립형 비만세포의 증가에 대한 형태학적 관찰을 한 김 들(1997)의 보고와도 일치한 결과이다.

이상의 결과를 정리해보면 LPS 주사후 우선 윤활관절막에서의 과민반응 즉, 윤활분비세포의 과형성으로 인해 여러 가지 cytokine의 분비가 증가되고 이는 섬유관절막에서의 섬유화의 증가, 림프구를 비롯한 침윤세포의 증가를 유도하게 되어 윤활관절내에서 과다한 염증반응을 일으켰다. 이러한 본 실험의 결과는 류마티스 관절염의 초기증상과 유사하다고 사료되어 류마

티스 관절염 기전과 치료 개발연구를 위한 유발 모델로서 적합하다고 생각된다.

## V. 참고문헌

1. American College of Rheumatology AD HOC Committee : Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis, Am. College Rheumatology, 39(5) : 713-722, 1996.
2. Al-Haboubi H. A., Zeitlin. I. J. : Re-appraisal of the role of histamine in carrageenan-induced paw oedema. Eur. J. Pharmacol. 88 : 169-176, 1983
3. Anna C. H. M. van dinther-Janssen, Evenliene Horst, Gerrit Koopman, Walter Newmann, Rik J. Scheper, Chris J. L. M. Meijer, and Steven T. Pals : The VLA-4/VCAM-1 Pathway is involved in Lymphocyte adhesion to Endothelium in rheumatoid synovium, J. Immunology, 147 : 4207-4210, 1991
4. W. P. Arend and Jean-Michel Dayer : Cytokine and Cytokine inhibitors or Antagonists in Rheumatoid arthritis, Arthritis and Rheumatism, 33(3) : 305-315, 1990
5. Arvind Kaul, David R Blake, Jermy d Pearson : Vascular endothelium, cytokines, and the pathogenesis of inflammatory synovitis, Ann. Rheumatic Diseases, 50 : 828-832, 1991
6. Bruce A. Johnson, George K. Haines, Lisa A. Harlow, and Alisa E. Koch : Adhesion molecule expression in Human synovial tissue, Arthritis and Rheumatism, 36(2) : 137-146, 1993
7. Bruce N. Cronstein : Adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Current Opinion in Rheumatology, 6 : 300-304, 1994
8. C. D. Buckley : Treatment of rheumatoid arthritis, BMJ, 315(26) : 236-238, 1997
9. Carlene Tsai, Luis A. Diaz, JR., Nora G. Singer, Lan Lan Li, Anita H. Kirsch, Raj Mitra, Brian J. Nickoloff, Leslie J. Crofford, and David A. Fox, : Responsiveness of Human T Lymphocytes to Bacterial superantigens presented by cultured Rheumatoid Arthritis Synoviocytes, Am. College Rheumatology, 39(1) : 125-136, 1996
10. Christopher W. Marlor, Deborah L. Webb, Michael P. Bombara, Jeffrey M. Greve, and Marie-Luise Blue : Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Fibroblastlike Synoviocytes After Stimulation with Tumor Necrosis Factor, Am. J. Pathology, 140(5) : 1055-1060, 1992
11. Coggeshall R. E., Hong K. A. P., Langford L., Schaible H. G., Schmidt R. F. : Discharge characteristics of fine medial articular afferents at rest and during passive movements of inflamed knee joints. Brain Res. 272 : 185-188, 1983
12. Colpaert F. C., Donnerer J., Lembeck F. : Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissue in rats with adjuvant arthritis. Life Sci. 32 : 1827-1834, 1983
13. Cornelia M. Weyand and Jorg J. Goronzy : Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, Medical Clinics of North America, 81(1) : 29-55, 1997
14. Daniel Henri Manicourt, Rafak Triki, Kanji Fukuda, Jean Pierre Devevogelaer, Charles Nagant DE Deuxchaisnes, and Eugene J. M. A. Thonar : Levels of circulating tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis. Rheumatism, 36(4) : 490-499, 1993
15. Jean-Michel Dayer, S. M. Krane, R. G. G.

- Russell, and D. R. Robinson : Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73(3) : 945-949, 1976
16. Edward P. A., Atul K. B., Keith G. M., and Stephen M. K. : Influences of gamma interferon on synovial fibroblast like cells. *Am. J. Soc. Clinic. invest.* 76 : 837-848, 1985
17. Ernest B., Derek J. P., and Mona L. B. : Suppression of collagen-induced arthritis by combination cyclosporin A and methotrexate therapy. *Arthritis and Rheumatism.* 34(10) : 1282-1288, 1991
18. T. Fujiwara, S. Kato, I. Itonaga, T. Torisu, and S. Masumi : Fine structure and distribution of lymphatics in the synovial membrane of monkey and human, knee joints, *International Orthopaedics(SICOT)*, 19 : 396-402, 1995
19. Gary S. Firestein, Mary M. Paine, and David L. boyle : Mechanisms of Methotrexate action in Rheumatoid Arthritis, *Am. College Rheumatology.* 37(2) : 193-200, 1994
20. Prue H. Hart, Gerard F. Vitti Diana R. Burgess, Genevieve A. Whitty, Diana S. Piccoli, and John A. Hamilton : Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E<sub>2</sub>, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 3803-3807, 1989
21. Hassan Mohamed-Ali, Peter Scholz, and Hans-Joachim Merker : Inhibition of the effects of rheumatoid synovial fluid cells on chondrogenesis and cartilage breakdown in vitro ; possible therapeutical conclusions, *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 64 : 45-56, 1993
22. Hiroshi Takayanagi. Hiromi Oda, Seizo Yamamoto, Hiroshi Kawaguchi, Sakae Tanaka, Takuji Nishikawa, and Yasuko Koshihara : A New Mechanism of Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis ; Synovial Fibroblasts Induce Osteoclastogenesis, *Biochemical and Biophysical Research communications.* 240 : 279-286, 1997
23. Hitoshi Ishikawa, Soichirou Hirata, Yasuro Nishibayashi, Shigeaki Imura, Hitoshi Kubo, and Osamu Ohno : The Role of Adhesion Molecules in Synovial Pannus Formation in Rheumatoid Arthritis, *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 300 : 297-303, 1994
24. Jeanette Morales-Ducret, Elizabeth Wayner, Mariano J. Elices, Jose M. Alvaro-Gracia, Nathan J. Zvaifler, and Gary S. Firestein :  $\alpha 4/\beta 1$  INTEGRIN [VLA-4] LIGANDS IN ARTHRITIS : Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Synovium and on Fibroblast-Like Synoviocytes, *J. Immuno.* 149 : 1424-1431, 1992
25. Joseph McDonnell, Lori A. Hoerrner, Michael W. Lark, Coral Harper, Tanvi Dey, Julie Lobner, Gerge Eiermann, Diana Kazazis, Irwin I. Singer, Vernon L. Moore : Recombinant human interleukin-1 $\beta$  -induced increase in levels of proteoglycans, stromelysin, and leukocytes in rabbit synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism.* 35(7) : 799-805, 1992
26. Juana Angel, Odile Colard, Francoise Chevy, Catherine Fournier : Interleukin-1-mediated phospholipid breakdown and arachidonic acid release in human synovial cells. *Arthritis and Rheumatism.* 36(2) : 158-167, 1993
27. Keren I. Hulkower, Stanley J. Wertheimer, Wayne Levin, John W. Coffey, Celia M. Anderson, Ting Chen, David L. DeWitt, Robert M. Crowl, William C. Hope, and

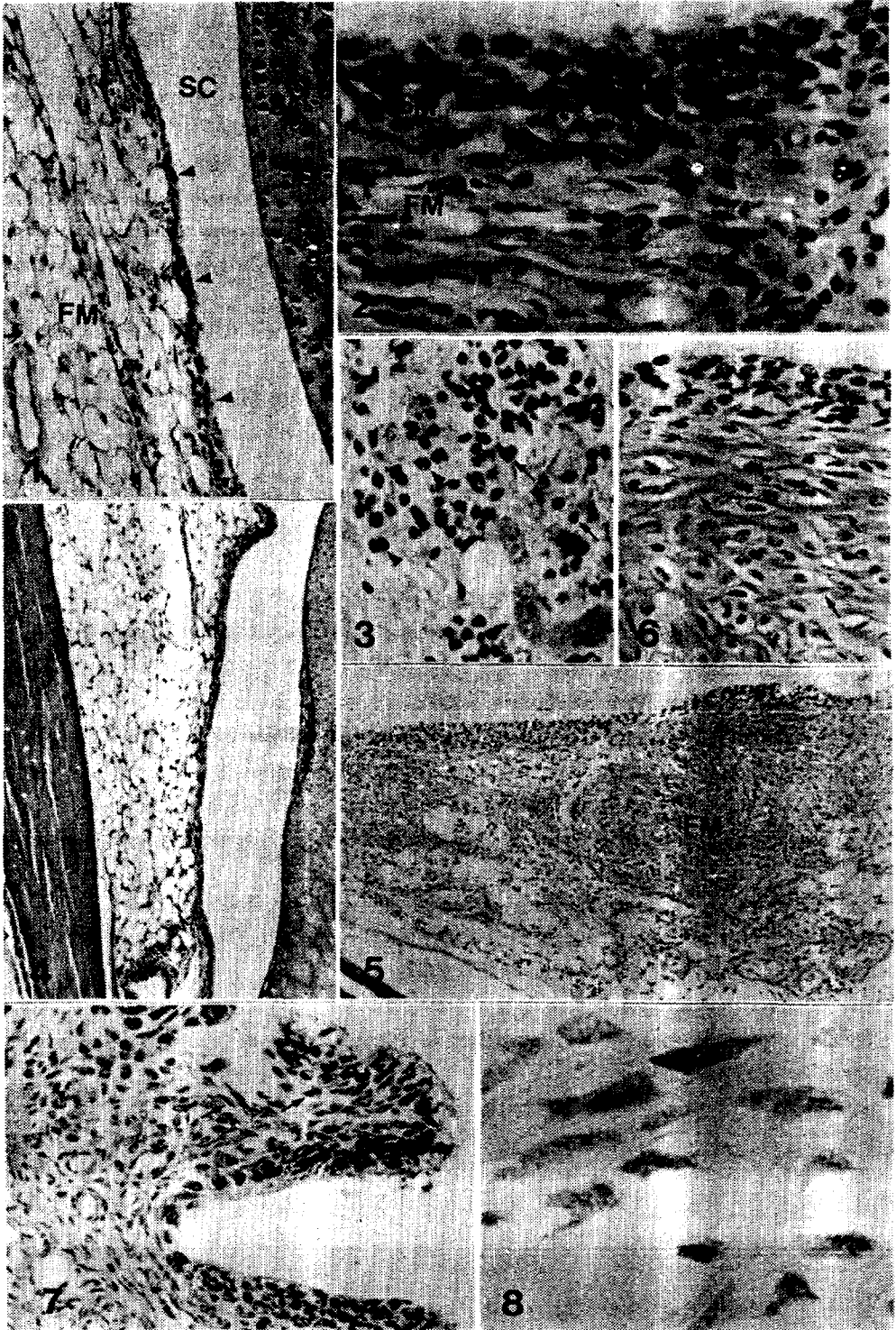


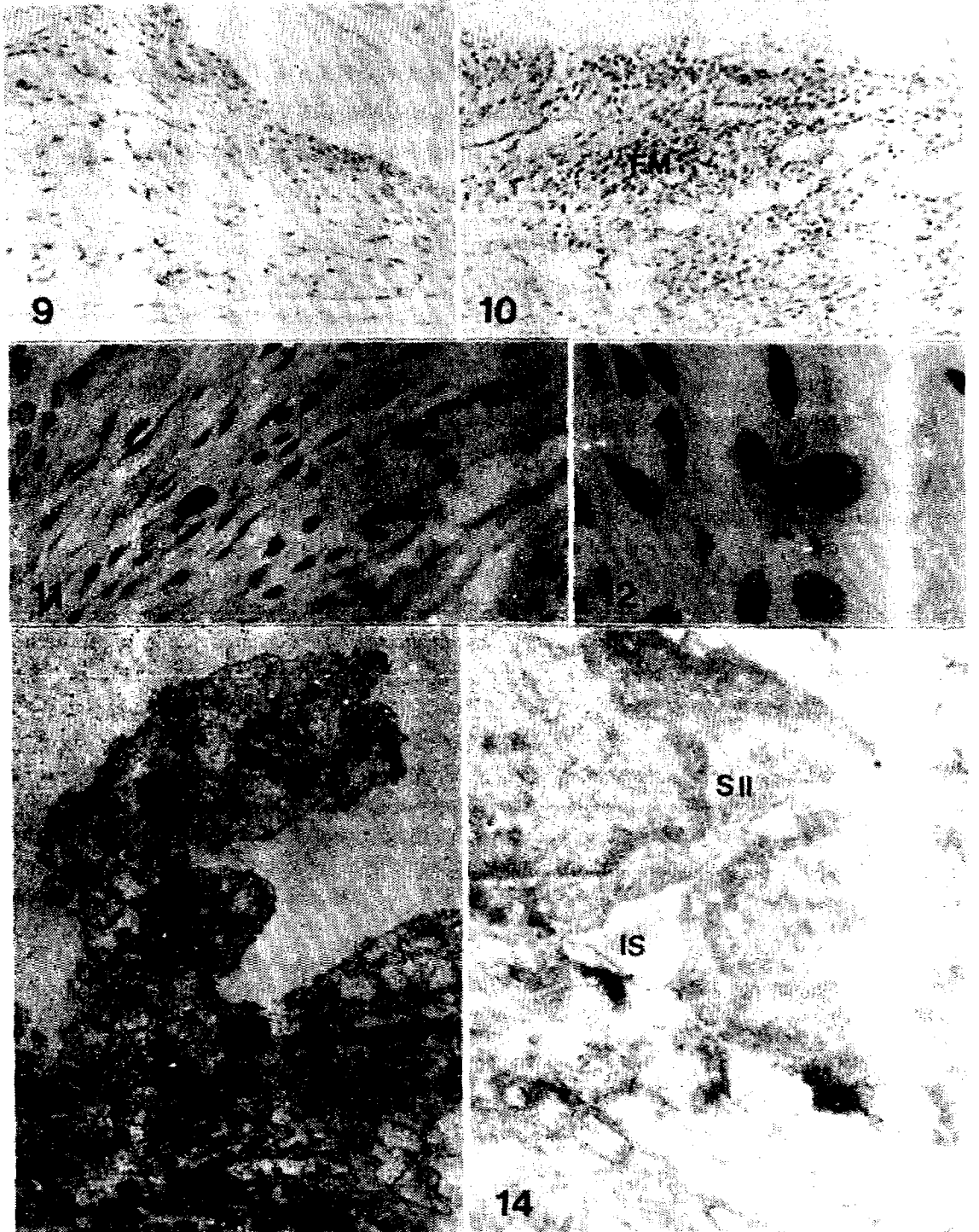
- Douglas W. Morgan : Interleukin-1 $\beta$  induces cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts : Evidence for their roles in the production of prostaglandin E<sub>2</sub>, *Arthritis and Rheumatism*, 37 : 653-661, 1994
28. Lam, F. Y., Ferell W. R. : Capsaicin suppresses substance P-induced joint inflammation in the rat. *Neurosci Lett*. 105 : 155-158, 1989
29. R. B. M. Landewé, A. M. M. Miltenburg, M. J. A. Verdonk, C. L. Verweij, F. C. Breedveld, M. R. Daha & B. A. C. Dijkmans : Chloroquine inhibits T cell proliferation by interfering with IL-2 production and responsiveness, *Clin. Exp. Immunol.*, 102 : 144-151, 1995
30. Lars Klareskog, Olof Johnell, Anders Hulth, Rikard Homdahl, Kristofer Rubin : Reactivity of monoclonal anti-type II collagen antibodies with cartilage and synovial tissue in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 29(6) : 730-738, 1986
31. Leo A. B., Joosten, Monique M. A. Helsen, Fons A. J. van de Loo, Wim B. van DE Bern : Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in dba/a mice. *Arthritis and Rheumatism*. 39(5) : 797-809, 1996
32. Lewis McCurdy, WI Winn Chatham, and Warren D. Blackburn, Jr. : Rheumatoid synovial fibroblast adhesion to human articular cartilage, *Arthritis and Rheumatism*, 38 : 1694-1700, 1995
33. Marc Feldmann, Fionula M. Brennan, and Ravinder N. Maini : Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu. Rev. Immunol.*, 14 : 397-440, 1996
34. A. Matsukawa, Ohkawara, T. Maeda, K. Takagi, and M. Yoshinaga : Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbit. *Clin. Exp. Immunol.* 93 : 206-211, 1993
35. Matthew H. Ornstein and Kirk Sperber : The antiinflammatory and antiviral effects of hydroxychloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active inflammatory arthritis, *Arthritis and Rheumatism*. 39(1) : 157-161, 1996
36. Michael J. Elliott., Ranvinder N. Maini : New Directions for biological therapy in rheumatoid arthritis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104 : 112-125, 1994
37. K. Morgan, R. B. Clague, I. Reynolds and M. Davis : Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis, *British. Rheumatology*. 32 : 333-335, 1993
38. Morris Ziff : Rheumatoid Arthritis-Its Present and Future, *J. Rheumatology*, 17(2) : 127-133, 1990
39. Nathan J. Zvaifler, Van Tsai, Saifeddin Alsalameh, Johannes von Kempis, Gary S. Firestein, and Martin Lotz : Pannocytes - Distinctive cells found in rheumatoid arthritis articular cartilage erosions, *Am. J Pathology*, 150(3) : 1125-1138, 1997
40. A. Natsukawa, S. Ohkawara, T. Maeda, K. Takagi & M. Yoshinaga : Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits, *Clin. Exp. Immunol.* 93 : 206-211, 1993
41. A. M. E. Nouri, G. S. Panayi & Sally M. Goodman : Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids, *Clin. exp. Immunol.* 55 : 295-302, 1984
42. Peter Schenck<sup>1</sup>, Stefan Schneider, Rolf Mielke, and Peter Prehm : Synthesis and

- Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.*, 22 : 400-405, 1995
43. Peter Tugwell<sup>2</sup>, Theodore Pincus, David Yocum, Michael Stein, Oscar Gluck, Gunnar Kraag, Robert McKendry, John Tesser, Philip Baker, and George Wells : Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis, *The New England Journal of Medicine*. 333(3) : 137-141, 1995
44. H. Ralph Schumacher and Rodanthi C. Kitridou : Synovitis of Recent Onset : A Clinicopathologic Study During the First Month of Disease, *Arthritis and Rheumatism*. 15(5) : 465-485, 1972
45. Stephen LD. Koda-Kimble MA, eds : Rheumatic disorders, *Applied Therapeutics: the clinical use of drugs*. 6th, ed. Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, WA: Applied Therapeutics, Inc. 41 : 1- 27, 1995
46. Toshitaka Takagi and Hugo E. Jasin : Interactions of synovial fluid immunoglobulins with chondrocytes, *Arthritis and Rheumatism* 35(12) : 1502-1509, 1992
47. P. L. E. M. van Lent, A. E. M. Holthuysen, L. A. M. van den Bersselaar, N. van Rooijen, L. A. B. Joosten, F. A. J. van de Loo, L. B. A. van de Putte, and W. B. van den Berg, : Phagocytic lining cells determine local expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis, *Arthritis and Rheumatism*. 39(9) : 1545-1555, 1996
48. Wei dong Xu, Gary S. Firestein, Raymond Taetle, Kenneth Kaushansky, and Nathan J. Zvaifler : Cytokines in chronic inflammatory arthritis : II. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovial effusions, *J. Clin. Invest.* 83 : 876-882, 1989
49. Zoltan Szekanecz, Gyula Szegedi, and Alisa E. Koch, Cellular adhesion molecules in rheumatoid arthritis : Regulation by cytokines and Possible clinical importance, *J. Invest Med.* 44 : 124-135, 1996
50. 김호연 : 류마티스성 관절염의 병인. 대한의학협회지. 35(10) : 1198-1205, 1992
51. 김진택, 박인식, 안상현 : DNCB에 의한생쥐 복강피부의 지연형 과민반응에의 연구. 동국대학교 한의학연구소 논문집. 6(1) : 117-128, 1997
52. 박일성, 노성만, 송은규, 박창수, 박창수, 양동현, 김용욱 : Collagenase로 유발한 백서 슬관절의 퇴행성 병변에 관한 형태학적 연구. 대한관절염학회지. 6(1) : 3-15, 1994
53. 배상철, 정성수, 이인홍, 유대현, 유대현, 김성운 : 퇴행성 관절염 환자의 연골조직에서 콜라겐변화에 관한 연구. 대한류마티스학회지. 1(2) : 213-220, 1994
54. 이수곤 : 류마티스 관절염의 원인 및 증상. 대한의학협회지. 35(10) : 1213-1222, 1992
55. 전재범, 김동욱, 김태환, 김승영, 김평남, 정성수, 이인홍, 배상철, 유대현, 김순길, 김성운 : 류마티스 관절염 환자의 활막 세포와 T 세포의 유착에서 ICAM-1의 역할. 대한 류마티스학회지. 2(2) : 119-125, 1995

### Legens for Figure

- Fig. 1. The synovial capsule of knee joint in no treated mouse. arrow : synovial membrane, FM : fibrous membrane, SA : articular cartilage, SC : synovial cavity. H&E. x100.
- Fig. 2. The synovial capsule of knee joint in mouse at day-14 after LPS injection. There were hyperplasia in synovial membrane(SM) and fibrosis in fibrous membrane. H&E. x400.
- Fig. 3. The infiltration of leukocytes in fibrous membrane of mouse at day-14 after LPS injection. The leukocyte as neutrophil(arrow head) and lymphocyte(arrow) were migrated with around capillary. H&E. x400.
- Fig. 4. The distribution of collagen fiber in synovial capsule of no treated mouse. Van Giesan. x100.
- Fig. 5. The distribution of collagen fiber in synovial capsule of mouse at day-14 after LPS injection. The synthesis of collagen fiber(redish fiber) were increased in fibrous membrane. Van Giesan. x100.
- Fig. 6. The magnification of collagen fiber(arrow) in fibrous membrane of mouse at day-14 after LPS injection. The meshlike arrangement of collagen fiber was appaered. Van Giesan. x100.
- Fig. 7. The distribution of fibroblast in fibrous membrane of mouse at day-14 after LPS injection. The number of fibroblast (arrow) were increased. Wright-Gimesa. x200.
- Fig. 8. The magnification of fibroblast. The cell process of fibroblast were positive reacted Wright stain solution. Wright-Gimesa. x1000.
- Fig. 9. The distibution of leukocyte around capillary in no treated mouse. Alcian blue. x100.
- Fig. 10. The infiltration of leukocyte in fibrous membrane of mouse at day-14 after LPS injection. The leukocyte were aggregated in fibrous membrane. Alcian blue. x100.
- Fig. 11. The distibution of mast cell in fibrous membrane of no treated mouse. Luna method. x200.
- Fig. 12. The magnification of degranulated type mast cell. Luna method. x1000.
- Fig. 13. The filopodia(p) of synovial phagocytic cell(type I synovial cell: SI) in synovial membrane of mouse at day-14 after LPS injection. x40000.
- Fig. 14. The synovial secreting cell(type II synovial cell: SI) in synovial membrane of mouse at day-14 after LPS injection. The number of type II cell was increased and intercellular space(IS) was enlarged. x40000.





## The Morphological Study in Inflammation of Murine Knee Joint by Lipopolysaccharide

- Based on the Morphological Changes of Synovial Membrane and Fibrous Membrane -

Jin-Tack Kim, Sang-Hyun Ahn, Nan-Hee Choi, Jae-Man Chung, In-Sick Park,  
Yun-Ho Gang\*, Ho-Hyun Kim\*\*, Hai-Poong Lee\*\*\*

*Dept. of Anatomy, Oriental Medical College, \*Dept. Internal Medicine,*

*\*\*Dept. of Physiology, Oriental Medical College, Semyung University.*

*\*\*\*Dept. of Applied Biology, College of Life Resource, Dongguk University,*

Synovial joint of BALB/C mice were injected with Lipopolysaccharide(LPS) were observed to investigate the morphological changes of synovial capsule caused by rheumatoid arthritis(RA). The RA on female Balb/c mice were induced by LPS injection, as dose of  $300\mu\text{l}/\text{kg}$ , into synovial cavity of knee joint. And then these specimen were fixed in 10% neutral buffered formalin and were decalcificated in EDTA solution for 4 weeks. The hyperplasia of synovium were appeared in synovial membrane. The filopodia of phagocytic like synoviocyte(type I synoviocyte) projected into synovial cavity and the number of fibroblast like synoviocyte(type II synoviocyte) with well-developed endoplasmic reticulum were increased in synovium. In fibrous membrane, the fibrosis induced by synthesis of collagen fiber were enlarged to all fibrous membrane, and the number of fibroblast were increased. A great number of inflammation component cell as lymphocyte and neutrophil leukocyte were infiltrated around capillary and the degranulate typed mast cell were increased. As results indicated that the hyperplasia of synovium induced by LPS, subsequently to cause the fibrosis, infiltration of inflammation component cell, and increase of degranulated type mast cell as same as symptoms of RA.

**Key Word** : Synovitis, Lipopolysaccharide, Hyperplasia of synovial membrane, Fibrosis of fibrous membrane