

부피바카인이 류마티스 관절염환자의 섬유모세포양 활막세포 배양시 세포증식과 금속단백분해효소 생산에 미치는 실험실적 영향

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 통증관리센터

한 태 형 · 장 혜 진

= Abstract =

In Vitro Effects of Bupivacaine in Cell Proliferation and Matrix Metalloproteinase of Cultured Fibroblast Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis

Tae Hyung Han, M.D. and Hae Jin Jang, M.D.

Pain Management Center, SungKyunKwan University, School of Medicine
Samsung Medical Center, Seoul, Korea

Background: Intraarticular local anesthetic injection has been therapeutically applied for pain control in various arthritis patients. However, little physiologic effects of local anesthetics on their tissue were known. This study was conducted to determine its effects on the cell proliferation and matrix metalloproteinases (MMP) production of cultured fibroblast like synoviocytes (FLS) derived from synovial tissues of rheumatoid arthritis patients.

Methods: Bupivacaine with varying concentrations 0 (control), 0.1, 0.25, 0.5% was applied to experimental cell groups growing as monolayers in culture plates for varying durations 0 (control), 30, 90, 180 seconds in the presence and absence of interleukin-1 β .

Results: No statistical significances were noted in thymidine incorporation between 0, 30, 90 and 180 seconds exposure groups with 0.5% bupivacaine after 1 day and 2 days. Thymidine incorporation between 0, 0.1, 0.25, 0.5% exposure groups 1 day and 2 days after 90 seconds exposure did not show any differences. After exposure to bupivacaine, there were statistically significant increases in MMP-1 ($p=0.025$) and MMP-3 productions ($p=0.000$) of FLS in the absence of IL-1 β , but no differences among the groups in the presence of IL-1 β .

Conclusion: We concluded that in this short-term in vitro study, bupivacaine does not have injurious effect on cultured rheumatoid arthritic joint tissues. The long-term effect cannot be known from this investigation.

Key Words: Anatomy, cell: synoviocyte (fibroblast like synoviocyte); matrix metalloproteinase; collagenase; stromelysin. Anesthetics: local anesthetic; bupivacaine. Disease: rheumatoid arthritis.

서 론

국소마취제의 주사는 치료 목적으로 점액낭염, 피막염, 상과염, 건염 등의 관절주위 염증과 각종 퇴행성 및 류마티스 관절염, 척추염 등 만성 염증의 치료에 이용되고 있으며 치료후 관절의 운동영역 및 통증 개선 등의 효과를 보인다고 알려져 있다. 이러한 효과의 기전은 혈관 확장으로 인한 혈류량의 증가, 세포막 투과성의 변화로 인한 통증 매개물질의 세척, 국소마취제로 인한 신경전도 및 통증 역치의 변화 등으로 생각된다. 그러나 임상적으로 국소마취제 주입의 치료법이 널리 이용되고 있는 것에 반하여 그 조직학적 영향에 대한 연구는 매우 적다.

류마티스 관절염의 가장 중요한 양상으로 연골과 골조직의 미란(erosion)을 보이는데 이러한 조직의 손상과정은 serine과 cysteine protease등을 포함하는 여러 가지 효소들이 매개작용을 하는 것으로 생각되며 관절의 세포외 기질의 파괴에는 특히 중성 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase: MMP)가 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 류마티스 활막은 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) 등과 같은 cytokine들의 영향을 받으면 효소들을 많이 분비하게 되는데 금속단백분해효소 중에는 콜라게나아제(collagenase, MMP-1)와 스트로멜리신(stromelysin, MMP-3)이 특히 관절의 파괴에 중요한 역할을 하며 이들 효소는 활액내막의 활막세포와 대식구 세포, 연골 세포 등에서 생성하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 따라서 이 효소의 생성 조절은 류마티스 관절염의 치료에 중요한 방법 중의 하나이며 생성의 증가는 관절 파괴를 악화시키므로 국소마취제가 이 효소에 미치는 영향에 대한 연구가 반드시 필요하다.

본 연구에서는 임상에서 흔히 쓰이는 국소마취제의 관절강내 주입이 류마티스 관절염에 어떤 영향을 미치는지 보기 위해 류마티스 관절염 환자의 섬유모세포양 활막세포(fibroblast like synovocyte, FLS)를 배양시킨 후 다양한 농도의 부피바카인을 다양한 시간별로 노출시켜 그 효과를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 ① 부피바카인이 섬유모세포양 활막세포의 세포증식을 일으키는가와 어떤 양상으로 세포증식을 일으키는지 관찰하며, ② 정상적 상태 및 IL-1를 투여하여 염증반응을 유발하였을 때로 나누어 부

피바카인이 섬유모세포양 활막세포막에 중성 기질 금속단백분해효소의 생성을 증가시키는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

연구재료는 1987년에 개정된 미국 류마티스 학회의 분류기준에 따라 류마티스 관절염으로 진단되고²⁾ 관절치환술을 시행하였던 2명의 슬관절에서 얻어진 활막조직으로부터 섬유모세포양 활막세포를 분리하여 연구대상으로 하였다.

조직의 준비는 관절치환술 시행시 얻은 활막조직을 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline; PBS)로 씻은 후 잘게 썰고 0.1%의 콜라게나아제가 포함된 PBS에 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. 이것을 소독된 거즈로 거른 후 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies, USA), 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하는 Dulbecco's minimal essential serum (DMEM, Life Technologies, USA) 용액에서 5%의 이산화탄소를 포함하는 37°C의 가습된 실험실 대기에서 배양하였다. 밤 동안의 배양 후 배양판에 붙어있지 않은 세포를 제거하고 붙어있는 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM용액에서 배양하였다.

본 연구는 각기 다른 농도의 부피바카인을 각기 다른 시간대 별로 배양된 세포들에 노출시켜 그 결과를 관찰하는 방법을 택하였다. 먼저 약제의 투여가 섬유모세포양 활막세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 노출 시간을 달리 변화시켜 노출 후 제 1일, 2일에 티미딘 결합검사를 시행하였다. 3×10^4 개의 세포가 들어있는 세포배양 평판에 0.5% 부피바카인을 노출시킨 후 평판에 있던 PBS를 제거하고 10% FBS가 들어있는 DMEM 용액에서 5%의 이산화탄소를 포함하는 37°C의 가습된 대기에서 6시간 배양한 후 well에 [3H] thymidine (NET027, Du Pont, USA) 0.5 μ Ci/ml 넣은 후 37°C에서 18시간 배양하였다. PBS로 세척한 후 1 ml의 5% 트리클로로아세트산으로 10분간 처리한 후 100% 에탄올로 세척하여 건조시키고 0.2 N 수산화나트륨 400 μ l에 녹여 6시간 방치한 후 4 ml의 scintillation cocktail을 넣고 5분간 혼든 후 방사능을 측정하였다.

국소마취제에 대한 노출은 부피바카인을 사용하여 무균의 폴리에틸렌으로 만든 6-well laboratory cham-

ber (Costar, Corning Incorporated, USA)에서 시행하였다. 3×10^4 개의 세포가 들어있는 세포배양 평판에서 배양액을 제거하고 부피바카인을 대조군 (0), 0.1, 0.25, 0.5%의 농도로 90초간 노출시켰다.

부피바카인이 섬유모세포양 활막세포의 중성 기질 금속단백분해효소의 생성에 미치는 영향을 보기 위하여 노출 72시간 후 세포배양액에서 이 효소의 농도를 효소면역측정법을 이용하여 측정하였다. MMP-1은 Biotrak cellular communication assays, Matrix Metalloproteinase-1 kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여 측정하였다. Anti-MMP-1이 입혀진 96-well-ELISA 배양평판에 표준시료와 세포배양액을 100 μ l씩 넣고 20~25°C에서 2시간 동안 배양한 후 완충액으로 4회 세척하였다. 100 μ l의 rabbit antiserum을 넣고 20~25°C에서 2시간 동안 배양한 후 완충액으로 4회 세척하고 100 μ l의 donkey anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate를 넣고 1시간 동안 20~25°C에서 배양한 후 세척하였다. 3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine (TMB) 기질을 넣고 30분간 실온에서 배양한 후 황산을 첨가하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 2회 반복 측정하였다. MMP-3는 Biotrak cellular communication assays, Matrix Metalloproteinase-3 kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여 측정하였다. Anti-MMP-3이 입혀진 96-well-ELISA 배양 평판에 표준시료와 세포배양액을 100 μ l씩 넣고 2~6°C에서 1시간 동안 배양한 후 완충액으로 4회 세척하였다. 100 μ l의 anti-MMP-3 horseradish peroxidase conjugate를 넣고 2시간 동안 2~8°C에서 배양한 후 완충액으로 4회 세척하였다. 3, 3', 5, 5'-TMB 기질을 넣고 30분간 실온에서 배양한 후 황산을 첨가하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 2회 반복 측정하였다.

부피바카인에 노출 후 interleukin-1 β 의 세포 자극 효과를 보기 위해 세포배양평판에 IL-1 β 1 ng/ml를 넣은 후 5% 이산화탄소를 함유한 가습된 37°C 대기에서 72시간 배양 후 상층액에서 위와 동일한 방법으로 MMP-1 및 MMP-3를 측정하였다.

자료 처리 및 분석에서는 SPSS version 9.0 프로그램(SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.)을 이용하였다. 티미딘 결합 및 MMP-1, MMP-3의 양은 3회 반복 실험한 수치의 평균을 구한 후 각 대상군의 수치의 평균과

표준편차로 나타내었다. 부피바카인에 노출 후 각군의 티미딘 결합 및 MMP-1, MMP-3의 비교 및 IL-1 처리 전후 군간의 비교는 Kruskal-Wallis test로 통계적 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 미만이면 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

부피바카인에 대한 노출 시간이 섬유모세포양 활막세포의 증식에 미치는 영향은 약제에 대한 각기 다른 노출 시간이 티미딘 결합에 미치는 영향으로 평가하였다. 즉 노출시간을 변화시켜 제 1일, 2일에 티미딘 결합검사를 시행하였다. 환자 I에서는 제 1일에는 30초, 90초, 180초 군에서 대조군에 비하여 77.4, 70.6, 83.3%로 감소하는 경향을($p=0.094$), 제 2일에는 115.1, 133.1, 124.4%로 증가하는 경향을 보였으나 모두 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.270$). 환자 II에서는 제 1일에는 대조군에 비하여 89.2, 46.7, 42.4%로 감소하는 경향을($p=0.072$), 제 2일에는 152.3, 119.7, 156.6%로 모든 시간에서 증가하는 경향을 보였으나 모두 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.075$)(Fig. 1).

부피바카인의 농도에 따른 섬유모세포양 활막세포의 증식에 미치는 영향은 0.1, 0.25, 0.5%의 다양한 농도의 용액을 90초간 노출을 시행한 후 티미딘 결합검사를 시행하였다. 환자 I에서는 제 1일에는 0.1, 0.25, 0.5%군에서 대조군에 비하여 각각 93.5, 80.9, 96.7%로 감소하는 경향을 ($p=0.167$), 제 2일에는 105.2, 101.9, 119.8%로 증가하는 경향을 보였으나 모두 유의한 차이는 보이지 않았다($p=0.385$). 환자 II에서는 제 1일에서는 대조군에 비하여 92.7, 80.2, 71.6%로 감소하는 경향을($p=0.465$), 제 2일에는 110.8, 106.2, 105.9%로 증가하는 경향을 보였으나 모두 유의한 차이는 없었다($p=0.409$)(Fig. 2).

부피바카인이 섬유모세포양 활막세포의 기질 금속단백분해효소의 생성에 미치는 영향은 먼저 정상 상태의 MMP-1 (collagenase) 및 MMP-3 (stromelysin)의 생성에 미치는 효과를 보았다. 이는 3×10^4 개의 세포가 들어있는 세포배양 평판에 0.5%의 부피바카인을 0 (대조군), 30, 90, 180초간 노출 시행한 후 제 3일에 세포배양액의 MMP-1과 MMP-3의 농도를 측정하였다. MMP-1의 농도는 환자 I에서는 각각 36.7, 49.1,

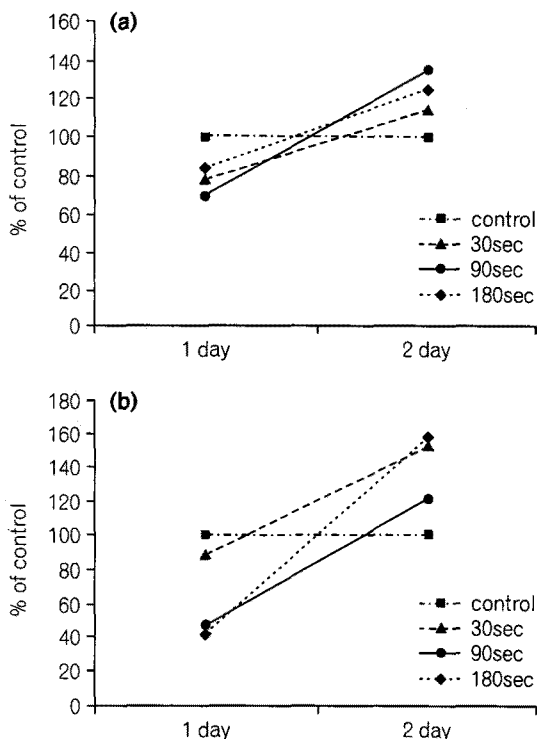


Fig. 1. The effects of duration of exposure on the rate of cell proliferation in fibroblast like synoviocytes from rheumatoid arthritis patient I (a) and patient II (b) with 0.5% bupivacaine. When compared to control group, there was no significant difference in the rate of cell proliferation between cell groups of different durations of exposure ($p > 0.05$).

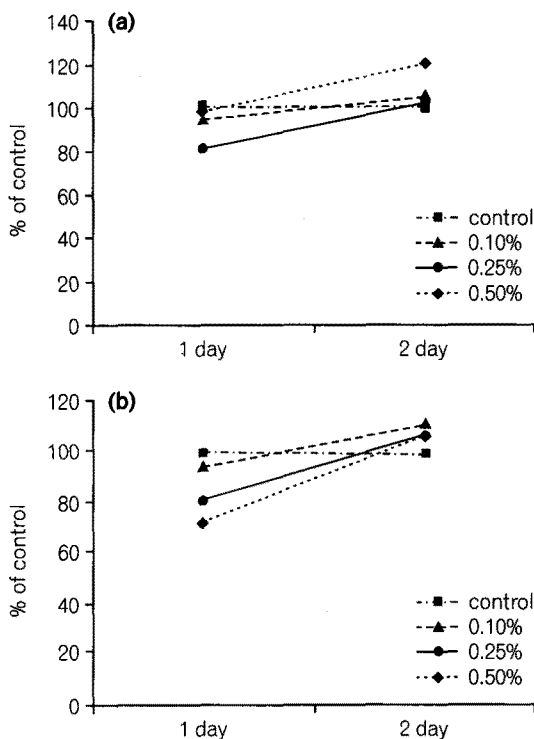


Fig. 2. The effects of various local anesthetic concentrations on the rate of cell proliferation in fibroblast like synoviocytes from rheumatoid arthritis patient I (a) and II (b) with 90 seconds duration of exposure. When compared to control group, there was no significant difference in the rate of cell proliferation between cell groups of different bupivacaine concentrations ($p > 0.05$).

78.5, 79.9 ng/ml 대조군에 비하여 90 및 180초 군에서 유의하게 생성의 증가를 보였으며($p=0.025$), 30초 군은 유의한 차이를 보이지 않았다. 환자 II에서는 각각 16.1, 18.4, 20.4, 21.7 ng/ml로 유의하게 MMP-1의 생성의 증가를 보였다($p=0.000$). MMP-3의 농도는 환자 I에서는 대조군, 30, 90, 180초 군에서 12.4, 20.9, 23.8, 26.6 ng/ml로 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 각각 통계적으로 유의하지는 않았으며($p=0.063$), 실험군 간에는 차이를 보이지 않았다. 환자 II에서는 각각 6.8, 9.9, 10.4, 11.8 ng/ml로 실험군에서 유의하게 MMP-3의 생성 증가를 보였다($p=0.000$) (Fig. 3).

IL-1 β 를 투여하여 염증반응을 유발하였을 때 부

피바카인이 MMP-1 및 MMP-3의 생성에 미치는 영향에 대해서는 0.5%의 용액에 노출 후 IL-1를 투여하고 제 3일에 세포배양액의 MMP-1과 MMP-3의 농도를 측정하였다. MMP-1의 농도는 환자 I에서는 대조군, 30, 90, 180초 군에서 231.5, 239.5, 248.8, 260.0 ng/ml ($p=0.132$)로, 환자 II에서는 92.6, 88.5, 92.4, 89.6 ng/ml로 모두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.467$). MMP-3의 농도는 환자 I에서는 대조군, 30, 90, 180초 군에서 571.7, 552.6, 546.7, 601.1 ng/ml ($p=0.516$)로, 환자 II에서도 각각 651.9, 731.6, 752.1, 733.4 ng/ml로 군간에 유의한 차이는 없었다($p=0.282$) (Fig. 4).

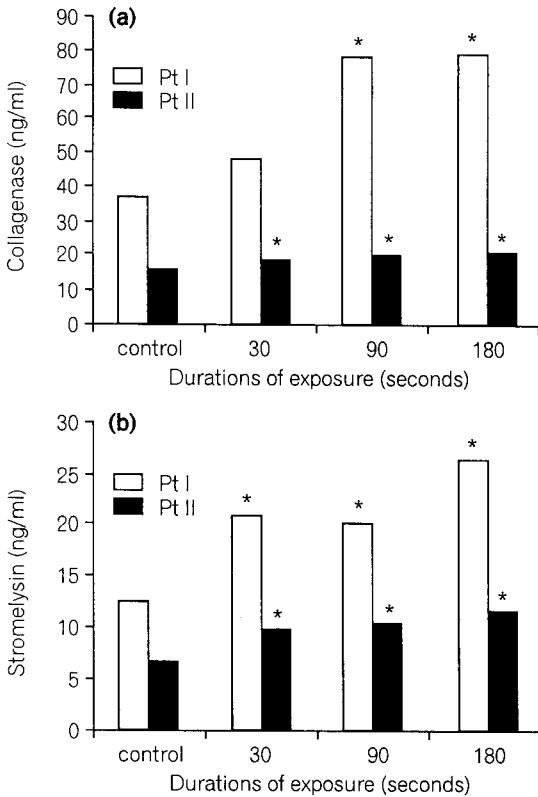


Fig. 3. The effects of local anesthetic on the collagenase (MMP-1, a) and stromelysin (MMP-3, b) production by fibroblast like synoviocytes from rheumatoid arthritis patient with 0.5% bupivacaine in the absence of interleukin-1 β . When compared to control group, exposed cell groups showed significantly increased collagenase ($p=0.025$) and stromelysin production ($p=0.000$) in the absence of interleukin-1 β (*: $p<0.05$). Pt: patient.

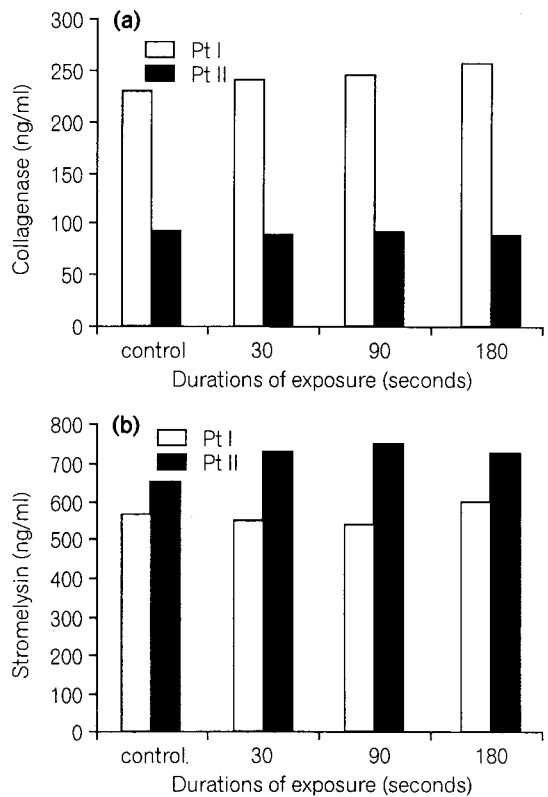


Fig. 4. The effects of local anesthetic on the collagenase (MMP-1, a) and stromelysin (MMP-3, b) production by fibroblast like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients with 0.5% bupivacaine in the presence of interleukin1 β . When compared to control, there were no significant differences in collagenase and stromelysin production between control and local anesthetic exposed groups in the presence of interleukin1 β . Pt: patient.

고 찰

류마티스 관절염은 원인이 알려지지 않은 전신적 자가면역질환으로 말초 관절의 만성적, 대칭적 미만성 활막염이 특징적인 양상이다⁴⁾. 초기 병리소견은 관절염의 유발인자나 원인물질이 혈류를 통하여 활막으로 가서 생기는 활막의 미세혈관 벽세포의 활성화나 손상으로 생각된다. 혈관내면은 대개 혈소판, 백혈구, 섬유소, 혈전 등으로 막히고 활막하 내층조직의 부종과 관절강 내의 삼출액과 같은 혈장삼출 등이 발생하며 관절강에 접하여 있는 표재성 내층세

포층의 세포들은 활성화되고 그 수가 늘어나며 다형 핵 백혈구가 증가한다. 이들은 활액낭 삼출액에서 주로 보이며 단핵세포들은 내층세포층과 더 깊은 쪽의 활막하 내층조직 바로 밑의 비정상적 혈관주위에 축적되어 일부 혹은 활막 전체에 허혈을 일으켜서 경색을 유발한다. 만성으로 진행된다면 활막은 비후되며 부종을 일으켜 활막조직의 미세혈관벽 세포의 활성화와 손상은 많은 용모 돌기를 관절강 내로 돌출시킨다. 정상적으로 1~3층의 세포로 이루어진 내층이 류마티스 관절염에서는 5~10층의 세포층으로 두꺼워지며 이는 주로 대식구양 세포와 약간의 증식성 섬유모세포양 활막세포로 이루어진다. 과도하게

증식된 활막을 형성하는 연부 조직의 세포들은 염증 세포가 아니라 강하게 활성화된 침습성 섬유모세포양 활막세포와 새로운 혈관들이며 활막의 염증과정은 결합조직의 기질에 광범위한 중앙양 증식과 활성화를 동반한다. 이들 비정상적 세포들은 관절주위의 골조직과 활막과 뼈가 붙는 관절의 경계부위의 연골을 파괴시킨다. 이러한 섬유모세포양 세포는 활막조직이 골의 미란을 일으키는 부위에 가장 많아서 조직의 파괴에 관여하는 것으로 생각된다¹⁾.

본 연구에서는 류마티스 관절염 환자의 활막조직에서 분리한 섬유모세포양 활막세포를 다양한 농도의 국소마취제에 다양한 시간 간격으로 노출시켰을 때 적어도 단기간에는 유의하게 세포의 증식을 유도하지 않는 것으로 사료된다. 그러나 이러한 결과는 자료의 수집 기간이 단 2일로 너무 짧아 류마티스성 관절염과 같이 장기간 지속되는 만성통증 질환에 미치는 영향에 대해서는 확실하게 알 수 없었다. 단 그 증가하는 경향으로 보아 부피바카인이 장기간 반복적으로 투여 될 때 활막조직을 증식시킬 가능성에 대해서는 완전히 배제할 수 없다고 사료된다.

또한 단백분해효소는 염증반응 중 세포의 기질의 파괴에 관여하는 중요한 매개체로 호중구, 단핵구, 대식구, 섬유모세포 등 많은 종류의 세포들에서 생성된다. 여기에는 aspartic proteinase, cysteine proteinase, serine proteinase, 금속단백분해효소 등이 있으며, 결합조직의 세포의 기질을 이루는 거대분자의 분해에 가장 중요한 효소는 아연 이온에 의존적인 기질 금속단백분해효소로 콜라게나아제(MMP-1)와 스트로멜리신(MMP-3)이 특히 류마티스 관절염의 관절의 파괴에 중요하다^{1,5)}. 이들 효소는 혈관내막의 섬유모세포양 활막세포에서 유전자 발현이 일어난다고 하지만^{6,8)} 국소마취제에의 노출이 이 세포들의 MMP 생성에 어떤 영향을 주는지에 대해서는 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 염증반응을 유발시키는 IL-1 β 가 없는 정상적인 경우 부피바카인이 MMP-1 및 MMP-3의 생성을 증가시키는 경향을 보였다. 실험기간 중 그 수치의 변화는 염증조건(IL-1 β)에 비하여 매우 적었으나 장기간에 걸친 만성질환과 연관되었을 때에 그 임상적 결과에 대해서는 잘 알 수 없을 것으로 생각된다.

IL-1 β 는 염증유발성 cytokine으로 IL-1 α 와 함께

단핵구와 대식구 혈관내벽세포, 섬유모세포 등에서 분비되며 전신적인 작용에는 발열, 근육의 파괴, 간에서의 급성기 단백질의 생성 유도 등이 있다. 국소적인 작용에는 활막 섬유모세포와 연골세포가 PGE2와 콜라게나아제 생성을 유도하여 조직을 파괴하는데 관여하는 것으로 알려져 있으며^{1,9)} 본 연구에서는 이러한 IL-1 β 의 성질을 이용하여 섬유모세포양 활막세포에 IL-1 β 를 가하여 류마티스 관절염과 비슷한 염증반응을 유도하고 이때 국소마취제의 효과를 관찰하고자 하였다. 염증조건을 유도하기 위한 IL-1 β 의 투여 시에는 부피바카인이 섬유모세포양 활막세포의 MMP-1 및 MMP-3의 생성에 큰 효과를 미치지 않아 염증조건에서 국소마취제는 관절의 파괴에 중요한 역할을 하는 효소의 생성을 유도하지 않는다고 추측되었다.

결론적으로 본 실험실 연구에서 다양한 농도의 부피바카인이 섬유모세포양 활막세포에 다양한 시간별로 단기간에 걸쳐 노출 되었을 때 그 증식 및 금속단백분해효소에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이러한 짧은 기간에 걸친 실험적 결과를 토대로 임상에 그 해석을 그대로 적용하기는 어려우며 앞으로 장기간에 걸친 더 많은 실험실적 연구 및 임상적 관찰이 요구된다고 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) ED: Rheumatoid arthritis. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1997, pp89-178.
- 2) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al: The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
- 3) Braddom RL: Physical medicine and rehabilitation. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1996, pp449-63.
- 4) Arthritis Foundation: Primer on the Rheumatic Disease. Atlanta, Arthritis Foundation. 1993, pp43-59, pp86-99.
- 5) Boyle DL, Sajjadi FG, Firestein GS: Inhibition of synovocyte collagenase gene expression by adenosine receptor stimulation. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 923-30.
- 6) Firestein GS, Paine MM, Littman BH: Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloprotei-

- nases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium: quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1094-105.
- 7) Gravalles EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH: In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1076-84.
- 8) McCachren SS, Haynes BF, Niedel JE: Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol* 1990; 10: 19-27.
- 9) Deleuran BW: Cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand J of Rheumatol* 1996; 25: 1-38.