

토끼의 관절연골 인공손상후 재생과정

제명대학교 의과대학 정형외과학교실, 해부병리과학교실 및 의과학 연구소*
편영식 · 손국진 · 권건영*

Regeneration Step of The Articular Cartilage after Artificial Injury

Young Sik Pyun M.D., Gook Jin Sohn, M.D., and Kun Young Kwon M.D.*

*Department of Orthopedic Surgery, and Department of Surgical Pathology**
Keimyung University School of Medicine & Institute for Medical Science, Taegu, Korea

-Abstract-

Articular cartilage consists of sparsely distributed chondrocytes surrounded by an elaborated highly organized macromolecular framework filled with water. Three classes of macromolecules (collagen, proteoglycan, noncollagenous protein) form the macromolecular framework.

It is debatable whether chondrocyte has the ability to replicate in normal situation or damaged situation. But in general the articular cartilage is known as a tissue which does not have specific reaction in dormed state after maturation cease and in damaged portion fibrous tissue transformed to a greater or lesser extent to fibrous cartilage and the formation of an imperfect form of hyaline cartilage in occasional foci.

In orthopedic department, injury to the articular cartilage can develop frequently and healing process takes major part in articular function. In this point in order to know the healing process in damaged articular cartilage, we made (cartilage)l defect including subchondral bone on medial and lateral condyle of the rabbit femur and observed the healing process by light microscope.

Through the experiment, we observed articular cartilage regeneration in subchondral defect area. Some of the subchondral defect areas of rabbit femoral cartilage become fibrillated, lose their matrix metachromasia and tend to develop chondrocyte clusters, thus mimicking human osteoarthritis and it is needed more cases and electron microscopic examination and immunochemical examination to know cartilage regeneration after cartilage injury.

Key Word : Articular Cartilage Regeneration

서 론

관절 연골은 드문드문 분포되어 있는 연골 세포와 이를 둘러싸고 있는 수분을 함유한 매우 조직화 되어진 거대분자(macromolecule)의 연골 간질(chondroid matrix)로 구성되어져 있으며 연골 간질은 교원질(collagen), proteoglycan 및 비교원성 단백질(noncollagenous protein) 등을 포함하고 있다 (Buckwalter et al, 1990).

관절 연골의 세포가 정상상태에서 증식할 수 있는 능력을 보유하고 있는지 혹은 손상된 연골에서 연골 세포가 재생능력을 갖고 있는지에 대해서는 아직도 논란의 대상이 되고 있다. 그러나 일반적으로 관절 연골은 성장이 끝난 후에는 정지된 상태로써 특별한 반응이 없는 조직으로 알려져 있으며 혈관이 없고 주위 조직으로부터 확산에 의해 영양 공급을 받고 있음으로, 손상시 치유 과정도 혈관 분포가 잘 되어있는 타조직의 치유 과정과는 다른 것으로 사료되며, 확실한 치유 과정은 아직도 잘 알려져 있지 않다.

정형외과 영역에서 외상 및 골관절염에 의한 연골 손상은 빈번히 발생되고, 이의 치유결과가 관절기능에 중요한 역할을 하며, 관절 연골이 손상 받아 치유될 경우 쉽게 외상성 관절염이 발생 한다는 것은 잘 알려진 사실이다.

이런 관점에서 손상받은 관절 연골의 치유과정의 단계적 변화를 형태학적으로 알아 보고자 가토슬관절을 수술적으로 노출시켜 대퇴골 내과 및 외과 관절연골에 손상을 주어서 이의 치유 과정을 광학 현미경으로 관찰하여 손상받은 연골의 치유된 형태학적 소견이 정상 연골과의 차이점을 관찰하였다.

재료 및 방법

3개월(1.5kg)된 뉴질랜드 산토끼 10마리를 연구재료로 사용하여 entobar를 이용한 정맥마취 하에서 수술적 방법으로 슬관절을 노출하고 대퇴내과 및 외과 관절 연골에 $5 \times 5 \times 3\text{mm}$ 크기의 연골을 포함한 연골하골을 제거하여 손상을 입힌후 수술창을 봉합하고 마취에서 회복시켜 외부고정 없이 체중부하를 주면서 토끼장 내에서 활동만 허용하였다.

연골을 손상시킨후 1주, 2주, 4주, 6주, 8주 및 10주 간격으로 토끼를 도살하고 손상부위의 관절연골을 제취하여 10% 포르말린 용액에 고정한 후

formic acid 와 sodium formate의 혼합용액에서 탈석회화 시킨후, 손상 부위의 관절 연골 조직을 제취하여 에탄올로 탈수시키고 xylol에 세척하여 파라핀을 침투시켰다. 관절 연골을 포함한 조직에서 5μ 의 연속적인 절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin 염색, toluidine blue 염색, trichrome 염색을 각각 실시하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

성 적

술후 1주에서는 미분화성 간엽 조직(undifferentiated mesenchymal tissue)과 신생된 혈관 등을 포함하는 육아조직의 형성을 볼 수 있었다(Fig. 1).

술후 2주에서는 손상된 연골 부위는 불규칙한 표면을 보이고 미분화성 간엽조직 및 혈관의 증식과 그 하부에 미성숙 연골 세포의 증식이 관찰되었으며 연골의 간질은 풍부하지 않았고, trichrome 염색으로 교원질을 포함한 섬유 조직의 증식을 보였다(Fig. 2 and Fig. 7).

술후 4주에서는 미분화성 간엽조직에서 좀더 분화된 미성숙 연골세포(immature chondrocytes)로 분화하는 소견을 보였으며, 열공(lacuna)은 관찰되지 않았고, 연골 세포의 활성(activity)은 떨어져 있었다(Fig. 3).

술후 6주에서는 미분화된 연골 세포의 무리(cluster)와 분화가 진행된 연골 세포 및 기질(differentiated chondrocyte and chondroid matrix)이 같이 존재하였으며, 연골 세포는 불규칙하게 배열되었고 열공이 존재하였다. 일부 손상된 부위의 연골 기질내에서 교원질의 fibrillation을 관찰할 수 있었다. 표면에 있는 연골세포는 활성이 감소되었으며, 하부의 연골기질 부위에는 toluidine blue 염색에서 변색성 염색 변성(metachromasia)이 소실되었다(Fig. 4 and Fig. 8).

술후 8 주에는 미분화된 연골 세포의 무리가 분화가 좋은 연골 세포로 성숙되면서 그 수가 감소되었고 열공은 잘 발달되었으며 연골 기질은 풍부하였다. 연골 하부 끌(subchondral bone)의 분화도 더욱 뚜렷해졌다(Fig. 5).

술후 10 주에는 수직으로 규칙적으로 배열된 연골 세포를 가지는 정상적인 연골 조직과 분화가 잘된 연골하부 끌조직을 관찰할 수 있었고, 연골 기질층은 두꺼워 졌으며, 비교적 부드러운 연골 표면을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

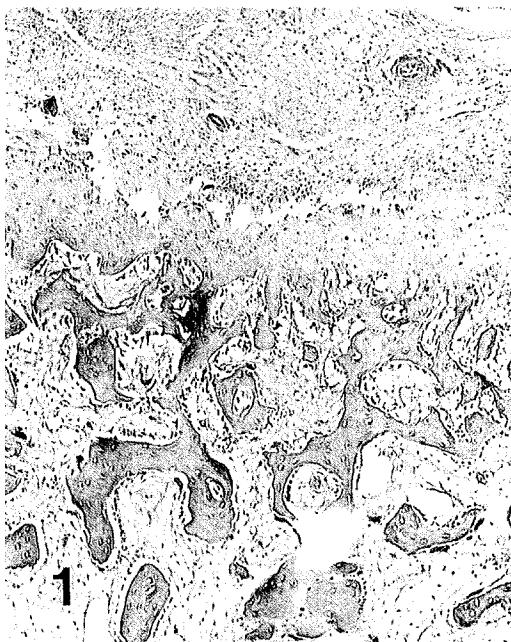


Fig. 1. After 1 week, granulation tissue composed mainly of undifferentiated mesenchymal tissue and new vessels are present. (H & E, $\times 40$)



Fig. 2. After 2 weeks, irregularity on the subchondral defect area and proliferation of undifferentiated mesenchymal tissue and blood vessel are present. Immature chondroid tissue with little chondroid matrix is noted. (H & E, $\times 40$)



Fig. 3 After 4 weeks, maturation from undifferentiated mesenchymal tissue to more differentiated immature chondrocytes with absence of lacuna is present. (H & E, $\times 40$)



Fig. 4. After 6 weeks, less differentiated chondrocyte clusters and more differentiated chondrocyte with abundant chondroid matrix are seen. (H & E, $\times 40$)

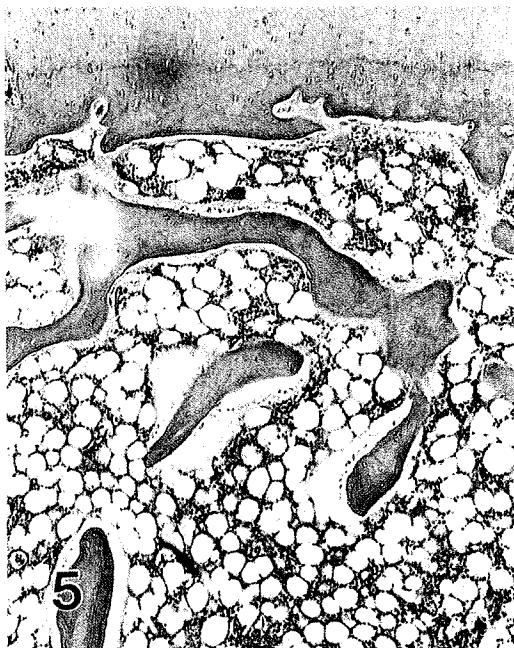


Fig. 5. After 8 weeks, maturation from immature chondrocyte clusters to mature chondrocytes is present. Lacuna of chondrocytes is prominent and chondroid matrix is abundant. Also maturation of subchondral bone is seen. (H & E, $\times 40$)



Fig. 6. After 10 weeks, nearly normalized chondroid tissue with vertically and regularly arranged chondrocytes and abundant chondroid matrix is seen. The articular surface is relatively smooth and well matured subchondral bone is seen. (H & E, $\times 40$)



Fig. 7. After 2 weeks, proliferation of fibrous tissue with abundant collagen is present. (Trichrome, $\times 100$)



Fig. 8. After 6 weeks, a round chondrocyte cluster with loss of metachromasia is seen. (Toluidine blue, $\times 200$)

고 찰

관절연골의 손상으로 관절면이 불규칙하게 되면 관절 기능의 장애 및 통증이 수반됨으로 관절연골의 손상시 그 치유의 특성을 완전히 이해하는 것은 매우 중요하다.

1743년 Hunter는 Hippocrates 시대부터 파괴된 관절연골은 치유되지 않으며 항상 문제를 일으킨다고 했으며, Leidy(1849), Kolliker(1853)와 Paget(1853)는 연골의 파열은 결코 유합되지 않으며, 관절연골은 재생력이 부족하여 파열된 틈(gap)은 주위에 생성된 pannus, 연골막, 인대 결합부나 연골하골에서 형성된 섬유조직의 발육으로 치유된다고 믿었고, Maximow(1957)와 Bloom(1957)은 포유동물의 성숙한 연골세포는 유사분열의 능력이 없어 독립적인 연골의 재생은 일으킬수 없다고 하였다. 그러나 일부 학자들은 골수나 활액막 그리고 가끔은 관절연골의 세포로부터 섬유조직이 증식되어 이들이 섬유성 연골로 변성되어 치유된다고 주장하였다 (Gurlt, 1853 ; Fisher, 1922 ; Shands, 1931 ; Key, 1931 ; Ito, 1924 ; Bennett et al, 1935).

최근 Calson(1957)은 동물실험에서 표재성 관절연골의 재생은 atypical chondrons라고 명명한 세포에 의하여 치유된다고 했고, Calandruccio(1962)는 표재성 관절연골의 결손시는 결손 주위의 정상 관절연골로부터 정상연골로 치유되나, 전층의 관절연골 결손시는 연골하골로부터 육아조직이 성장하여 연골로 치유된다고 하며, 약 10%에서 관절연골인 초자연골로 치유되는 것을 관찰할 수 있다고 보고하였다.

Campbell(1969)은 동물실험과 인체의 요골두와 슬개골 골질 환자에서 채취한 재료를 분석한 결과 섬유아세포로 불리어지는 미분화 간엽조직은 손상받은 연골주위의 조직에서 형성될 수 있으며, 이렇게 형성된 간엽조직은 특수한 조건이나 위치에서는 초자연골로 형질전환이 될 수 있다고 하였다.

현재까지 보고된 논문에 의하면 관절연골의 전층이 손상되었을 경우에는 섬유성 연골이나 비정상적인 초자연골로 치유되는 것으로 사료되나 어떤 과정을 거쳐 연골세포가 형성되는지는 아직도

논란의 대상이 되고 있다.

혈관이 존재하는 조직의 손상에는 피사, 염증, 치유의 과정을 거치나 (Mankin 1982), 관절연골에는 혈관이 없기 때문에 치유과정이 일반조직과는 다르다. 본 실험은 토끼의 연골을 연골하골과 함께 결손을 일으켰기 때문에 술후 1주에 연골하골에서 육아조직의 생성과 미분화 간엽조직을 관찰할 수 있었음은 관절내이지만 적은양의 혈관이 연골하골에 형성되어 여기에서 육아조직과 미분화성 간엽조직이 형성되는 것 생각된다.

술후 2주째부터 미분화성 간엽조직과 미성숙연골세포가 나타나기 시작하였는데, 미분화성 간엽조직은 여러 가지 조직으로 분화될 수 있는 능력이 있기 때문에 여기에서 연골세포가 형성된 것으로 추정되며 점차 시일이 경과함에 따라 점차 분화가 진행되어 술후 4주 까지는 열공이 관찰되지 않고 활성이 부족한 연골세포가 발견되는 것을 볼 때 점차 정상연골에 가까운 세포들로 분화되는 것으로 사료된다.

술후 6주째에 손상된 부위의 연골기질에 섬유성분이 다소 증가함과 변색성 염색변성의 감소를 관찰할 수 있었고, 술후 8주에는 연골세포의 무리가 점차 분화되어, 술후 10주에는 거의 정상적인 연골조직과 분화가 잘된 연골하부골조직을 관찰할 수 있었으며, 연골결손시는 약 10주간의 치유기간이 요구하는 것으로 사료된다.

치유되는 전 과정에서 유사분열의 소견은 발견할 수 없었으며 이는 성숙된 연골세포는 세포분열의 능력은 부족하고 일부 학자의 발표와 같이 소위 무사분열(meiosis)의 과정을 거쳐 세포가 증식되는 것을 의미한다. 그러나 세포핵내의 DNA에 대한 cytophotometric study나 전자 현미경적 관찰 및 면역화학적 검사시는 좀더 정확한 관절손상후 재생기전을 알 수 있을 것으로 사료되어진다.

요약

토끼의 관절연골 인공손상후 재생과정을 알기 위하여 토끼의 술관절 내과 및 외과에 관절연골을 제거하여 관찰하였다.

술후 1주에는 육아조직의 형성을 볼 수 있었으

며, 술후 2 주에는 미분화된 간엽조직 및 혈관의 증식과 그 하부에 미성숙 연골 세포의 증식과 감소된 연골 간질을 발견할 수 있었다.

술후 4 주에는 미분화된 간엽 조직에서 좀 더 분화된 미성숙 연골 세포로 분화하는 소견을 볼 수 있었으며, 술후 6 주에는 분화가 떨어진 연골 무리와 분화가 진행된 연골 세포 및 기질이 같이 존재하였으며 일부 손상된 부위의 연골 기질내에서 섬유성 연축을 관찰할 수 있었으며 이곳에서 기질의 변색성 염색 변성의 감소를 볼 수 있었다.

술후 8 주에는 연골 세포의 무리가 분화가 좋은 연골 세포로 성숙하였으며 연골 하부 골의 분화가 더 뚜렷해졌으며, 술후 10 주에는 거의 정상적인 연골 조직과 분화가 잘된 연골하부 골조직을 관찰 할 수 있었다.

이상과 같은 실험으로 관절 연골에 손상을 준후 시간이 경과함에 따라 손상된 부위가 연골 조직으로 재생함을 관찰할 수 있었다. 연골 결손후 관절 연골 부위에 생긴 섬유 성분의 증가, 기질의 변색성 염색 변성의 소실, 연골 세포 무리의 생성등은 골 관절염에서 보는 광학 현미경적 소견과 비슷하였다.

참 고 문 헌

- Baker B, Becker RO, Spadaro J : A study of electrochemical enhancement of articular cartilage repair. *Clin Orthop* 1974 ; 102 : 251 - 267.
 Buckwalt JA, Lohmander S : Operative

treatment of osteoarthritis : Current practice and future potential. *J Bone Joint Surg* 1994 ; 76A : 1405 - 1418.

Buckwalter JA : Mechanical injury of articular cartilage. In Finerman, G(ed.) : Biology and biomechanics of the traumatized synovial joint, Park Ridge, III., AAOS 1992, pp 83 - 96.
 Campbell CJ : The healing of cartilage defects. *Clin Orthop* 1969 ; 64 : 45 - 63.

Fuller JA, Ghadially FN : Ultrastructural observation on surgically produced partial thickness defect in articular cartilage. *Clin Ortho* 1972 ; 86 : 193 - 205.

Mankin HJ : The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis(first of two parts). *N Engl J Med* 1974 ; 24 : 1285 - 1292.

Mankin HJ : The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis(second of two parts). *N Engl J Med* 1974 ; 25 : 1335 - 1340.

Mankin HJ : The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982 ; 64-A : 460 - 466.

Meachim G : The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1963 ; 45 - B : 150 - 161.

Mitchell N, Shepard N : The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg* 1976 ; 58 - A: 230 - 233.