

류마티스 조직 유래 활막세포와 활액유래 활막세포의 기계적 특성 차이

정아라^{1,2}, 김희진³, 유승아^{2*}, 권보미^{1*}

세종대학교 기계공학과¹, 가톨릭대학교 의생명과학고실², 세종대학교 바이오융합공학과³

Difference between tissue-derived fibroblast-like synoviocytes and synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes of cellular mechanical properties in rheumatoid arthritis

Ara Jung^{1,2}, Heejin Kim³, Seung-Ah Yoo^{2*}, Bomi Gweon^{1*}

¹Department of Mechanical Engineering, Sejong University, Korea

²Department of Biomedicine & Health Sciences, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea.

³Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Korea

*youcap78@hanmail.net, *bgweon@sejong.ac.kr

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disorder that can cause chronic inflammation and eventually damage joint tissues. Rheumatoid arthritis occurs when the immune system mistakenly attacks the healthy body tissues, especially the joint lining. In rheumatoid arthritis (RA), fibroblast-like synoviocytes (FLS) contribute to joint destruction by producing cytokines, chemokines, and matrix-degrading molecules and migrating and invading the joint cartilages. The potential of cellular migration and invasion *in vivo* can be examined by measuring mechanical properties *in vitro*, including cell motility, cellular force, and morphology. Tissue-derived fibroblast-like synoviocytes (td-FLS) was obtained from the synovium tissue of rheumatoid patients, and Synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes (fd-FLS) was isolated from the synovial fluid aspirated from rheumatoid patients. We measured and compared cell shape, migration, and traction force of td-FLS and fd-FLS. As a result, the difference between the two cells in the migration pattern was identified.

1. 연구 배경

류마티스 관절염은 복잡한 유전적, 환경적 요소에 의해 면역과 염증반응의 조절 이상이 발생하여 관절 내 윤활막이 지속적으로 증식하고 관절의 뼈와 연골을 파괴시키는 만성염증성 전신 관절염이다. 여자에서 남자보다 3배 더 호발하기 때문에 여성질환으로 분류할 수 있다. 전형적인 류마티스 관절염은 손 발의 관절과 같은 작은 관절을 다발성으로 침범하며, 관절부위에 부종, 열감, 발적과 같은 염증의 특징적징후가 관찰되고, 적혈구 침강속도나 C-반응단백과 같은 염증지표의 상승, 류마티스 인자나 항-CCP 항체와 같은 자가항체가 검출되기 때문에 비교적 쉽게 진단할 수 있다[1].

초기에는 면역 반응에 의해 T림프구가 활성화되고 이로 인해 염증 반응이 시작되는 것으로 생각되지만, 질환이 진행하고 말기로 갈 수록 T림프구의 영향력은 감소하고 활막세포의 비정상적 증식 및 활성화로 인해 나타나는 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화로 인해 관절 파괴가 지속적으로 나타나게 된다[2, 3]. 따라서 류마티스 관절염으로 인한 관절 파괴를 예방하고 치료하기 위해서는 활막세포의 활성화 기전을 이해하고 이에 따른 관절 파괴를 막는 것이 필수적이라고 할 수 있다.

이러한 활막세포는 활막을 구성하는 주변 미세환경(microenvironment)에 따라 비정상적으로 증식되고 연골로 이동, 침투하고, 세포외 기질(ECM, extracellular matrix)을 분해함으로써 질병을 악화시키게 된다. 이에 따라 최근 다양한 연구에 따르면 활막세포의 이동/침투 억제를 통해 류마티스 관절염완화에 도움을 줄 수 있을 것으로

보인다. 일반적으로 이러한 세포의 이동과 침투과정에서는 세포역학적 변화가 함께 동반되어야 하는데 이때 세포내 골격단백질(ex. actin)의 리모델링과 함께 세포내 장력(tension), 견인력(traction)의 증가가 진행된다[4, 5, 6]. 따라서, 이러한 활막세포와 관련된 기작을 정확히 이해하고 이를 치료에 활용하기 위해서는 활막세포의 기계적요소에 대한 심도 있는 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

류마티스 관절염의 진행에 따른 관절파괴를 예방하기 위해서는 조기진단과 적극적인 조기치료 수행하는 것이 중요하며 또한 나쁜 예후 인자의 존재유무를 파악하고 질병 활성도를 지속적으로 추적-평가하여 환자개인에 가장 적합한 맞춤치료를 선택하는 것이 필수적이라고 할 수 있다. 이렇게 선택한 최적의 약물을 유지함으로써 임상적 관해에 도달한다면 류마티스 관절염이 중증으로 진행되는 것을 막고 기타 부작용이나 동반질환을 극적으로 줄여 환자의 삶의 질을 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 연구 방법

실험에 사용된 활막세포는 류마티스관절염 환자에서 유래하였으며 활막조직에서 얻은 td-FLS세포와 활액에서 얻은 fd-FLS 세포로 나누어진다. td-FLS세포는 무릎 수술을 받은 류마티스 환자로부터 활막조직은 얻은 다음 collagenase 처리한 후 PBS로 세척하여 활막세포를 분리한다. fd-FLS 세포는 활액을 40um strainer에 통과하여 통과하지 않은 것들을 PBS로 모아 원심분리 하여 얻는다. 분리한 세포는 DMEM high glucise media에 10% FBS와 1% Anti-Anti를 첨가하여 배양하였으며 passage 10 이내에서

실험에 사용되었다.

활막세포의 형태를 분석하기 위하여 35 mm plate에 활막세포를 뿌린 뒤 세포핵을 Hoechst 33342 (10 mg/mL Solution in Water)를 이용하여 10분간 염색하고 세포막은 Cell Explorer™ Live Cell Labeling Kit를 이용하여 초록색

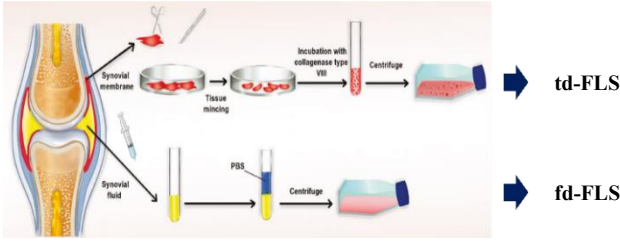


그림 1. 활막세포 분리 방법

형광으로 염색을 하였다. Leica LMi8 현미경을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 20분 간격으로 이미지를 얻었다. 얻은 이미지는 MATLAB을 이용하여 세포의 면적, 둘레, 원형정도, 형태, Aspect ratio 등의 형태학적 변수 측정하였다.

활막세포의 이동을 분석하기 위하여 35 mm plate에 활막세포를 뿌린 뒤 Leica LMi8 현미경을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 5분 간격으로 이미지를 얻었다. 얻은 이미지는 Fiji Image J와 MATLAB을 이용하여 세포의 이동 속도, 평균 제곱 변위, 이동방향, 각도 변위, 직접성 등의 이동양상을 나타내는 변수를 측정하였다.

활막세포의 힘을 측정하기 위하여 glass bottom confocal dish를 Bind silane으로 처리 후, 40% Acrylamide solution, 2% Bis solution, FluoSpheres™ Carboxylate-Modified Microspheres(0.5 µm, red fluorescent), TEMED를 이용하여 2.4 kpa gel을 만들었다. 2.4 kpa gel에 활막세포를 배양한 뒤 형광 현미경을 이용하여 gel 표면의 이미지를 이미징 후 trypsin을 이용하여 활막세포를 제거한 뒤 gel 표면의 이미지를 추가로 얻었다. 이후 두 이미지 비교를 통하여 견인력을 측정하였다.

3. 연구 결과

활막 조직에서 분리한 td-FLS와 활액에서 분리한 fd-FLS의 세포 이동을 측정하였다. 두가지 세포의 trajectory를 분석한 결과 td-FLS는 세포의 이동이 직선으로 보이는 경향이

나타났고 fd-FLS는 td-FLS보다 직진이동의 경향이 덜했다. 세포의 총 이동거리를 분석한 결과 td-FLS의 경우 대부분의 세포들이 150 µm미만으로 이동하였다. 반면 fd-FLS의 경우 150 µm 이상의 거리를 이동한 세포들도 존재했으며 200 µm이상의 거리를 움직인 세포들도 다수 존재하였다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때 td-FLS는 fd-FLS보다 직진으로 이동하는 경향을 확인하였으며 fd-FLS는 td-FLS에 비하여 먼 거리를 이동하는 것으로 확인되었다.

4. Acknowledgements

본 연구는 세종대학교 연구역량강화사업 과제(20220435)의 지원을 받아 수행하였음.

5.참고 문헌

[1] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1580-1588.

[2] Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39:1781-90, 1996.

[3] Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 46:298-308, 2002.

[4] Claudia Tanja Mierke. Mechanical Cues Affect Migration and Invasion of Cells From Three Different Directions, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020.

[5] Stephanie S. Chang, Andrew D. Rape, Stephanie A. Wong, Wei-hui Guo, and Yu-li Wang. Migration regulates cellular mechanical states, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 30, No. 26, 2019.

[6] Martin Kräter, Jiranuwat Sapudom, Nicole Christin Bilz, Tilo Pompe, Jochen Guck and Claudia Claus. Alterations in Cell Mechanics by Actin Cytoskeletal Changes Correlate with Strain-Specific Rubella Virus Phenotypes for Cell Migration and Induction of Apoptosis, *Cells*, 7(9), 2018.

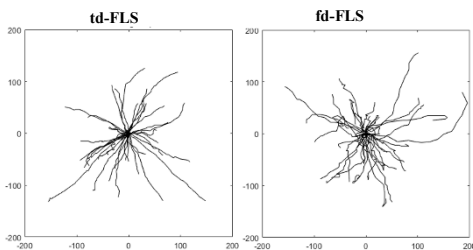


그림 3. td-FLS와 sf-FLS 의 이동경로

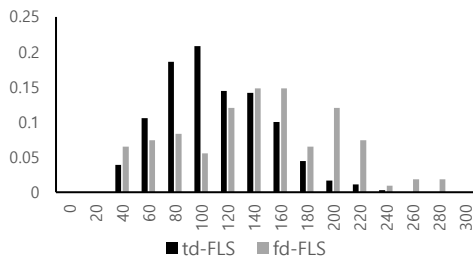


그림 2. td-FLS와 fd-FLS의 총 이동거리