관절연골의 Gd(DTPA)$^{2-}$-조영증강 및 정량적 자기공명영상에 대한 실험적 연구

이선주 · 은충기 · 이영준 · 박오환 · 박영미 · 배재익 · 류지화[2] · 백대일[3] · 정수진[4]

목적 : Trypsin으로 관절연골의 변성을 인공적으로 유도한 뒤 관절연골의 구성성분인 glycosaminoglycan(GAG)의 소실을 생화학적으로 정량분석하고 Gd(DTPA)$^{2-}$(gadolinium diethylene triamine pentaacetic acid)조영증강, 그리고 T1, T2, rho 이완시간등과 어떤 상관관계가 있는지를 조사함으로써 관절연골의 초기 퇴행성 변화에 대해서 자기공명영상(MRI)으로 관찰이 가능한 지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 적출된 3개의 돼지 슬개골에서 실험에 사용될 관절연골조각을 폭 8 mm, 길이 10 mm 크기의 관절연골조각을 3개 만들었다. 분광광흡수계(spectrophotometry)에서 dimethylmethylene blue를 이용한 chondroitin sulfate standard의 흡수도를 측정하여 GAG을 정량분석 하였다. 관절연골을 배양할 용액은 0.2 mg/ml trypsin, 1 mM Gd(DTPA)$^{2-}$ 첨가된 trypsin, 그리고 대조군용 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)의 3가지를 준비하였다. 배양시간은 1시간에서 5시간까지는 매시간마다 배양하였고 24시간과 48시간까지 배양하였다. MRI촬영은 1시간에서 5시간까지만 매시간마다 배양 후 시행하였다. 1.5T 기기에서 MRI촬영은 T1강조영상(TR/TE, 450/22)과 혼합에코기법(mixed echo sequence) (TR/TE, 760/21-168, 8 echoes)등을 시행하였다. 모든 촬영에서 영상영역은 50 mm, 절편두께는 2 mm, 그리고 매트릭스는 256×512 였다. MRI촬영자료에서 관절연골부위를 픽셀단위로 비교분석 하였다. 배양이 끝난 관절연골은 hematoxylin & eosin, toluidine blue, alcian blue, trichrome 염색 등을 시행하여 관찰하였다.

결과 : Dimethylmethylene blue를 이용한 GAG의 정량분석결과 배양시간증가에 따라 GAG의 농도가 비례적으로 증가하였다. Gd(DTPA)$^{2-}$ 첨가된 trypsin배양에서 관절연골의 T1 강조영상에서의 신호강도는 trypsin 배양에 비하여 평균 42.0% 증가하였고 4시간과 5시간배양에서는 trypsin에서만 배양한 관절연골에 비하여 신호강도가 더욱 뚜렷하게 증가되었다 ($p < 0.05$). 관절연골의 T1, T2, rho 이완시간은 배양시간에 따라 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았으나 Gd(DTPA)$^{2-}$ 첨가된 trypsin배양에서 T1이완시간의 증가가 관절연골의 표층부와 이행부에서 측정되었다. 조직검사결과 trypsin 배양의 관절연골에서 toluidine blue와 alcian blue염색에서 결손이 관찰되었다.

결론 : Trypsin 배양시간에 따라 관절연골의 GAG결손을 정량적으로 확인할 수 있었고 픽셀크기 97.9×195 ㎛인 MRI로 Gd(DTPA)$^{2-}$-조영증강 및 이완시간을 측정할 수 있었다. 배양시간에 따른 GAG결손은 T1, T2, rho 이완시간보다 Gd(DTPA)$^{2-}$-조영증강에서 유의한 차이를 관찰할 수 있었다. 그러므로 관절연골의 초기 퇴행성 변화를 진단하는 데는 T1강조영상에서 Gd(DTPA)$^{2-}$-조영증강정도를 비교하는 것이 가장 유용할 것으로 사료된다.

대한자기공명의과학회지 8:100-108(2004)

[1]인제대학교 부산백병원 진단방사선과
[2]인제대학교 동래백병원 진단방사선과
[3]백 방사선과 의원
[4]인제대학교 부산백병원 해부병리과

접 수 : 2004년 7월 23일, 채 택 : 2004년 12월 16일

통신저자 : 이선주, (614-735) 부산시 부산진구 개금동 633-165 인제대학교 부산백병원 진단방사선과
Tel. (051)890-6728, 019-622-7056 Fax. (051)896-1085 E-mail: tjswnlee@paran.com

서 론

관절연골은 관절의 기능을 유지하는 중요한 조직인데 퇴행성 관절염이나 그 외 관절질환에서 관절연골의 변성과 파괴가 일어나고 연골하골(subchondral bone)의 파괴와 더불어 관절기능이 소실된다. 관절연골은 한번 파괴되면 재생이 어렵기 때문에 관절연골 파괴의 초기단계에서 진단을 하고 연골파괴의 진행을 막거나 늦추기 위한 노력이 있어 왔다 (1, 2).

퇴행성 관절연골손상은 관절연골의 구성 성분인 glycosaminoglycan(GAG)과 교원질(collagen)의 소실이 발생되고 이차적으로 관절연골내의 수분함량의 변화가 일어나는데 이들 생화학적 구성성분의 변화나 기능적인 변화를 규명하는 것이 관절연골의 손상과정을 이해하는 데 필수적이라 할 수 있다 (3, 4). 관절연골손상의 연구에는 실험실에서 GAG이나 교원질 및 기능적인 구조에 대한 생화학적인 정량분석을 하거나 또는 이와 관련하여 정량적 자기공명영상(MRI)을 이용한 연구들이 이루어 지고 있다 (5).

MRI에서 2 mm 내외 두께의 관절연골을 관찰하기 위해서는 자장강도가 높아야 되고 특별한 촬영기법이 필요하며 관절연골 촬영에는 그 동안 자화전이대조(magnetization transfer contrast, MTC), 지방억제 3차원 경사에코(fat-suppressed 3D gradient echo), 그리고 지방억제 고속스핀에코(fat-suppressed fast spin-echo)기법 등이 유용한 것으로 보고되었고 관절연골의 확산영상(diffusion imaging)이나 T1, rho, T2 이완지도(relaxation map, relaxometry)를 이용하여 관절연골내의 변화를 관찰하는 정량적 MRI에 관한 보고도 있었다 (6-8).

또한 MRI에서 양이온이나 음이온제를 사용하여 관절연골내의 GAG 농도변화를 규명하려는 연구도 보고되어 왔다 (9,10). 최근에는 실험적으로 관절표면에서 연골하골까지 관절연골의 조직학적층에 따라 MRI촬영분석이 이루어 지고 있으므로 더욱 많은 새로운 연구 결과들이 보고되고 있다. 그러나 이들 연구들은 대부분 임상적으로 이용되지 않는 4-5T 이상의 고자장 MRI를 사용하였으며 그 연구결과가 완전 일치되지 않고 관절연골의 기능성 구조도 아직까지 완전히 밝혀지지 않고 있다. 그러므로 저자는 돼지의 슬개골을 이용하여 관절연골에서 Trypsin 배양을 시행하여 초기변성을 인공적으로 유발시킨 후 관절연골의 GAG결손을 생화학적인 분석을 통하여 정량적으로 규명하고 MRI를 이용한 관절연골 초기변성의 관찰이 가능한 지를 알아보고자 하였다.

임상적으로 널리 이용되는 1.5T MRI 촬영기기로서 변성을 일으킨 관절연골을 촬영하여 Gd(DTPA)$^{2-}$ 조영증강정도, 그리고 T1, rho, T2 이완지도등에 어떤 변화가 나타나는 지를 알아보고 그리고 이때 관절연골의 조직학적인 변화와 생화학적 정량분석을 서로 비교하여 어떤 연관성이 있는지를 규명해 봄으로써 관절연골변성에 대한 관절연골 MRI촬영의 유용성을 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

실험재료로는 도축 된지 4시간된 성숙한 돼지 3마리에서 3개의 슬개골을 적출하여 사용하였다. 실험에 사용될 관절연골은 각각의 슬개골에서 2 mm 두께의 연골하골을 포함시켜 폭 8 mm, 길이 10 mm 크기의 관절연골조각을 잘라 21개의 표본을 만들었다.

배양액은 trypsin 배양액, 조영제를 첨가한 trypsin 배양액, 그리고 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, 이하 PBS)만의 배양액 등의 3종류를 만들었다.

trypsin 배양액은 PBS에 trypsin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하여 pH 7.6에 0.2 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다. 음이온화 된 조영제가 첨가된 배양액은 0.2 mg/ml trypsin 배양액에 1 mM Gd(DTPA)$^{2-}$ (Magnevist, Schering, Berlin, Germany)를 첨가하여 사용하였다. 대조군 배양에는 PBS 용액만으로 배양하였다. 각 배양액은 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 24시간, 48시간으로 배양시간이 서로 다른 7개의 15 ml 코닝(Corning)튜브에 1.5 ml씩 나누어 담았으며 총 21개의 튜브에 배양액을 담았다. 조영제가 첨가된 배양액은 각 배양액 1.5 ml에 Gd(DTPA)$^{2-}$ 3 ㎕를 첨가하여 Gd(DTPA)$^{2-}$ 1 mM의 배양액을 만들었다.

배양은 shaking 배양기(incubator)에서 37°C, 0.5 Hz의 자극을 주면서 시행하였다.

Trypsin 배양 후에 배양액으로 유리된 GAG의 양을 측정하기 위하여 1,9-Dimethylmethylene blue(이하 DMMB) (34,108-8, Aldrich Chemical Co., U.S.A.)용액을 사용한 분광광흡수계(Novaspec II, Pharmacia LKB Biochrom Ltd, England)측정법을 이용하였다.

배양이 완전히 끝난 후 21개의 코닝튜브에서 각각 0.1 ml의 배양액을 꺼내어 4 ml 큐벳(cuvette)에 미리 담아 놓은 DMMB용액 2.5 ml와 섞은 후 15초 이내에 분광광흡수계에 넣어 흡수도(absorbance)를 측정하였다 (11,12).

Trypsin 배양액에 의해 유리된 GAG의 양을 알기 위하여 chondroitin sulfate standards(C8529, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 이용하여 농도에 따른 분광광흡수도 값을 구하였다. chondroitin sulfate를 0.5 ㎍/ml, 1 ㎍/ml, 2 ㎍/ml, 3 ㎍/ml, 4 ㎍/ml, 5 ㎍/ml의 농도로 만든 후 각 농도마다 분광광흡수계에서 흡수도를 측정하여 그 직선기울기 값을 계산하였다.

관절연골 촬영에는 1.5T MRI 기기(Gyroscan ACS-NT, Philips, Netherlands)에서 직경 8 cm크기의 원형 표면코일(circular surface coil)을 사용하였으며 관절연골은 12 ml 용량의 유리비이커에 넣어 식염수 5 ml를 채워 촬영하였다. MR 기기 내에서 위치조정시에 관절연골이 비이커내에서 움직이지 않도록 하기 위해 MR 자화율에 영향이 없으면서 탄력성이 있

어서 관절연골을 완전히 고정할 수 있는 고무조각을 관절연골과 비이커 사이에 끼워 넣었다.

동일 관절연골에서 배양과 MR촬영을 반복적으로 시행해야 되기 때문에 MR촬영면을 일정하게 정할 수 있는 기준표시로서 관절연골에 홈을 만들었는데 이 홈과 MR기기의 주자장(main magnetic field)의 방향이 평행한 위치가 되게 하여 주자장에 수직인 횡단면으로 MR촬영을 하였다. 관절연골 표면이 MRI기기의 주자장(B_0)에 평행하게 위치하도록 하여 관절연골의 신호강도에 영향을 주는 magic angle effect를 방지하였고 위상부호화방향(phase encoding direction)은 관절면에 평행하게 촬영하였다. 영상영역은 관절연골의 관찰부위가 중앙에 위치하도록 촬영하였다.

MR촬영기법은 T1강조영상과 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill) pulse sequence의 일종인 mixed echo sequence등을 사용하였다. T1강조영상의 촬영조건은 반복시간(repetition time, TR)/에코시간(echo time, TE), 450/22 msec ; 1 slice ; 여기횟수(number of excitation, NEX), 4 ; 촬영시간, 5분 24초이었다. mixed echo sequence는 TR/TE, 760/21 msec, 8 echoes (21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168 msec) ; TR_{IR}, 2240 msec ; 1 slice ; NEX, 2 ; 촬영시간, 17분 57초이었다 (Table 1).

촬영된 MRI 자료들의 영상분석프로그램은 Osiris(version 3.6, Medical imaging software, University Hospital of Geneva, Switzerland)와 Scion image(version Beta 4.0.2, Scion Co., U.S.A.)를 사용하였고 관절연골의 표면층에서 석회화층까지 linear profile의 값을 동일한 위치의 픽셀(pixel)에서 구하여 비교하였다.

배양이 끝난 관절연골은 포르말린(formalin)에 고정하여 탈회(decalcification)과정을 거친 후에 4가지 염색을 시행하였다. 관절연골의 조직학적인 형태를 관찰하기 위해 hematoxylin & eosin염색을 하였고 관절연골내의 proteoglycan 혹은 GAG결손을 조직학적으로 진단하기 위하여 alcian blue(AB), toluidine blue (TB)염색을 그리고 연골내의 교원질은 trichrome 염색법등 4가지종류의 염색을 시

Table 2. Accumulated concentration of glycosaminoglycan (ug/mg)

Culture duration	Trypsin	Trypsin-Gd
1 hr	136.1 (21.6%)	121.1 (18.9%)
2 hr	190.6 (30.2%)	171.8 (26.8%)
3 hr	230.7 (36.6%)	213.5 (33.3%)
4 hr	263.4 (41.8%)	252.9 (39.4%)
5 hr	290.9 (46.1%)	286.4 (44.6%)
24 hr	494.5 (78.4%)	487.7 (76.0%)
48 hr	630.6 (100%)	641.8 (100%)

* trypsin = trypsin culture solution, trypsin-Gd = mixture of trypsin solution and Gd (DTPA).

Table 1. Scan parameters of MR imaging.

Sequences	TR/TE	TI	flip angle	FOV	matrix	slice	thickness	NEX	scan	time
T1WI	450/22		90°	5	256×512	1	2	4	5′	24″
Mixed-echo	760/21-168	360	90°	5	256×512	1	2	2	17′	57″

* T1WI (T1-weighted image), TR(repetition time), TE (echo time), TI (inversion time), FOV (field of view), NEX (number of excitation).
† TR, TE, and TI (ms), FOV (cm), thickness (mm), scan time (min and sec).

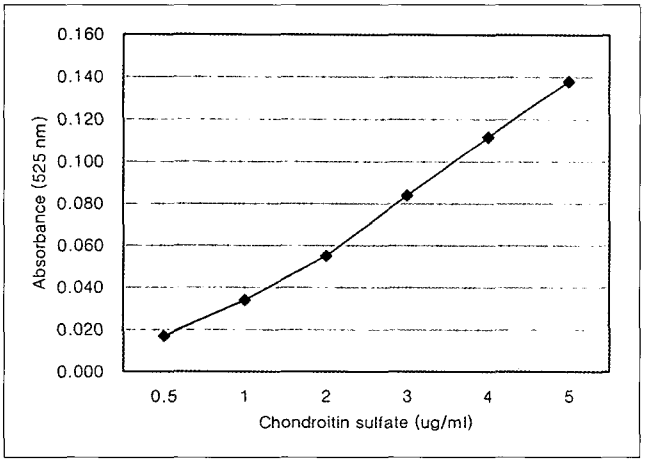


Fig. 1. Calibration curve for chondroitin sulfate standard with dimethyl-methylene blue. Absorbance measured with spectrophotometry at 525 nm.

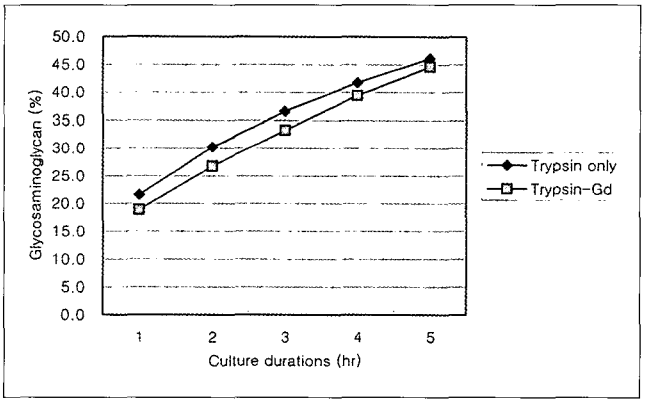


Fig. 2. The release of glycosaminoglycan from the cartilage by trypsin was proportionately increased as the culture duration increases.
* Gd = Gd (DTPA)

행하여 관찰하였다. 관절연골검체의 조직 절편들은 MRI촬영단면과 동일한 단면으로 얻었다.

촬영된 MRI자료의 비교분석에는 SPSS release 8.0 프로그램을 이용하여 t-검정법, 분산분석(ANOVA), 그리고 Pearson 상관분석을 이용하였으며 p값이 0.05미만일 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다. 각 배양액군별, 각 배양시간별로 비교하였으며, 배양시간대별로 배양액내로 분리된 GAG의 양과 조영증강 되는 정도를 비교분석 하였다.

연구결과

가. GAG 정량분석

chondroitin sulfate standard용액에 대한 3차례의 분광광흡수도 측정결과는 Fig. 1와 같이 농도변화에 따라 일정하게 관찰되었으며 농도에 따른 흡수도 변화 곡선의 평균 기울기는 식(1)과 같다.

관절연골 배양을 마친 배양액을 분광광흡수계로 측정한 결과 1시간에서 5시간째까지는 측정값이 비례적으로 감소하였다. 1시간에서 5시간까지 배양액에서 각 흡수도에 대한 GAG농도를 식(1)에 의하여 구하고 여기에 24시간과 48시간째의 측정값에 대한 농도를 더한 값을 관절연골의 GAG의 총량으로 가정하여 시간대별로 GAG이 유리되는 상대적인 양을 구한 결과는 Table 2과 같다 (Fig. 2).

$$\text{Absorbance (Y)} \approx 0.02668 \times \mu g/ml(X) + 0.00440 \quad [1]$$

나. T1강조영상에서 Gd(DTPA)$^{2-}$ 조영증강정도 측정

육안적으로 Gd(DTPA)$^{2-}$의 조영증강 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Trypsin 배양과 trypsin-Gd(DTPA)$^{2-}$ 배양 후에 T1강조영상에서 관절연골의 신호강도를 측정한 결과 신호강도가 평균 42.0% 증가하였다 ($p < 0.05$). 배양시간 4시간과 5시간째에는 조영정도가 더욱 증가하였다 (Fig. 4). 관절연골의 픽셀단위별로 신호강도를 측정한 결과 배양시간이 증가함에 따라 조영후 신호강도가 더욱 증가하였다 (Fig. 5)

다. Mixed-echo sequence에서 이완지도 및 T2 강조영상측정

관절연골의 T1 이완지도를 픽셀단위별로 측정하여 비교한 결과 trypsin 배양보다 trypsin-Gd(DTPA)$^{2-}$ 배양에서 픽셀 3-11위치에 해당되는 표면층(superficial zone)과 이행층(transitional zone)부위에 T1이완시간의 증가가 관찰되었고 Gd(DTPA)$^{2-}$ 조영증가가 되었음을 알 수 있었다 (Fig. 6). T1, T2, rho 이완시간 평균값의 비교에서는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다 (Table 3).

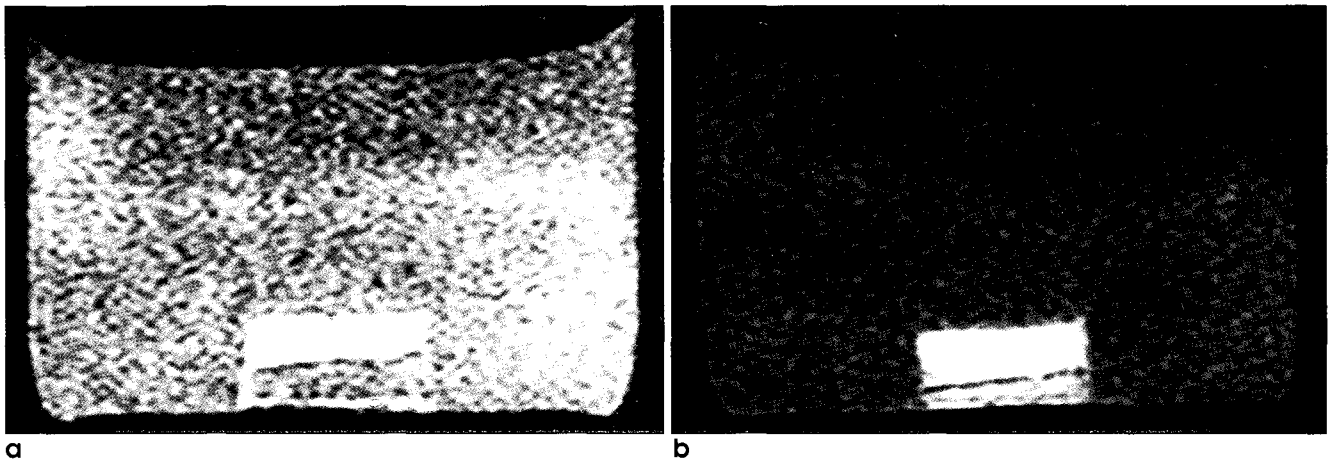
Mixed-echo sequence 에서 8에코의 T2강조 영상들을 비교할 때 TE가 증가함에 따라 관절연골의 신호강도가 급격히 감소되었다 (Table 3). 배양시간에 따른 8에코의 T2강조영상등에서 관절연골신호강도의 비교에서는 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 7).

라. 조직검사결과

trypsin 배양 후 관절연골의 toluidine blue와 alcian blue 염색에서 염색결손이 관절연골전체에 걸쳐서 관찰된 반면 대조군에서는 정상적인 염색을 관찰할 수 있었다.

고 찰

연부조직해상능이 뛰어나고 비침습적인 MRI촬영은 관절연골에 적합한 검사법으로 인정 받고 있으며 최근까지 관절연골의 촬영에는 지방억제 고속스핀에코(fat-suppressed FSE)나 지방억제 3차원경사에코(fat-suppressed 3D-SPGR or FLASH)가 유용한 것으로 알려져 있다 (6). 최근 들어 자장능



a b

Fig. 3. T1-weighted images of cartilage after 5 hr-culture. The high signal intensity of the cartilage in trypsin only culture (**A**) was noted as more bright intensity in trypsin-Gd (DTPA)$^{2-}$ culture (**B**).

력이 향상되고 표면코일의 개발로 마이크로-MRI촬영까지 가능하게 되어 관절연골의 생화학적인 구조변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 관절연골의 초기퇴행성변화에 대한 연구에도 T2강조영상, 자화전이영상, 이완시간측정, Gd(DTPA)$^{2-}$조영촬영, 확산강조영상, sodium MRI 등 여러 가지 촬영 기법들이 이용되고 있다 (5, 13-15). 이에 저자는 본 연구에서 초기변성의 관절연골촬영에 적합한 촬영기법을 알아보기 위하여 T2강조영상, 이완시간측정, Gd(DTPA)$^{2-}$ 촬영에 대한 비교실험연구를 시작하였다.

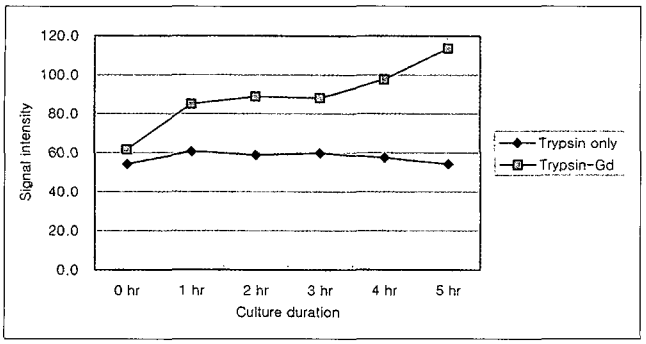


Fig. 4. Comparison of signal intensities of the cartilage in T1-weighted image after trypsin only and trypsin-Gd culture.
* Gd = Gd (DTPA)$^{2-}$

관절연골은 조직학적으로 4가지의 층으로 구분되는데 관절표면에서 부터 연골두께의 10%를 차지하는 표면(superficial)층 혹은 접선(tangential)층이 있고 그 다음은 교원질섬유가 비스듬한 방향으로 배열되어 있고 연골두께의 40%를 차지하는 이행성(transitional)층 혹은 중간(intermediate)층, 그 다음이 교원질 섬유가 관절면에 대하여 수직으로 배열된 방사상(radial)층이 있고 연골두께의 45%를 차지한다. 제일 아래쪽은 석회화(calcified)층으로 연골두께의 5-10%를 차지한다 (6, 16). 또한 관절연골은 조직학적 및 생화학적으로 복잡한 구조를 가지며 조직학적 구조배열이 균일하지 않은 특성(anisotropy)을 지닌다 (17).

MRI의 성능과 해상능이 향상됨에 따라 관절연골의 조직학적 층에 대한 MRI촬영이 가능하나 그 해석은 연구자들에 따라 다르게 보고 되었다. 관절연골이 T2강조영상에서 여러 층으로 관찰되는 원인은 교원질섬유의 배열차이, 연골내의 수분차이, GAG의 농도차이 등으로 인한 것으로 보고되어 있다 (16, 18). 관절연골의 MRI소견으로 Modl 등 (19) 은 중간의 흰층과 상하 검은 층의 3가지 띠(trilaminar)형태로 관찰된다고 하였고 Rubenstein 등 (20) 은 중간의 검은 층이 양쪽의 흰층으로 싸여 있는 형태로 관찰된다고 하였다. 그 후 Peterfy 등 (9) 은 MRI에서 관절연골이 관찰되는 층의 순서가 연구자들간에 다르게 관찰되는 것은 촬영기법에 차이가 있거나 혹은 관절연골 표

Table 3. Measurements of T1, T2, rho relxation maps and signal intensities of multiple T2-weighted images

Trypsin	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
T1 map	418.7	407.3	378.4	375.1	346.1	333.7
T2 map	422.2	395.1	366.3	403.6	387.2	377.0
rho map	475.4	465.1	445.8	498.4	499.7	375.2
TE1	195.5	194.3	189.2	186.8	190.1	182.5
TE2	157.1	158.3	157.8	145.9	149.0	142.6
TE3	117.5	122.3	114.7	117.3	112.5	107.4
TE4	97.9	100.7	94.1	91.0	97.4	86.1
TE5	81.4	82.6	78.4	76.8	76.2	69.9
TE6	63.6	62.3	62.5	61.5	64.0	55.6
TE7	47.8	55.9	52.3	45.1	50.0	44.3
TE8	43.1	46.8	42.8	49.3	44.5	39.2
Trypsin-Gd						
T1 map	387.7	405.9	356.7	372.5	342.2	229.7
T2 map	412.3	393.4	358.7	369.3	366.8	366.4
rho map	487.1	419.6	469.1	217.0	189.1	278.2
TE1	203.0	244.4	253.3	251.9	271.2	293.1
TE2	160.3	185.6	194.9	189.3	203.0	222.7
TE3	121.7	134.1	138.3	141.6	143.8	158.3
TE4	101.1	112.1	115.8	118.1	111.4	120.7
TE5	76.8	82.1	81.2	87.9	81.9	94.5
TE6	60.7	68.3	72.4	69.0	63.7	74.2
TE7	52.3	56.8	54.3	53.7	45.9	55.1
TE8	38.9	48.4	47.4	43.8	48.0	48.5

* (TE1, 21 ms; TE2, 42 ms; TE3, 63 ms; TE4, 84 ms; TE5, 105 ms; TE6, 126 ms; TE7, 147 ms; TE8, 168 ms)

층부의 신호강도를 관절액의 신호강도로 오인했기 때문인 것으로 설명하였다.

저자의 연구에서도 T1강조영상과 이완시간지도에서 관절연골의 표층부에서 심부까지의 신호 강도들이 파상성(undulating)의 변화를 보여 MRI로 관절연골의 조직학적층이 구분 가능함을 알 수 있었다.

관절연골의 구성은 대부분 세포외간질이 차지하고 1%가 연골세포로 되어 있는데 세포외간질은 71-77%가 물, 나머지는 교원질 그리고 GAG으로 구성되어 있다. 교원질은 대부분 II형 교원질로 구성되어 있으며 단백중심 축에 많은 GAG들이 결합

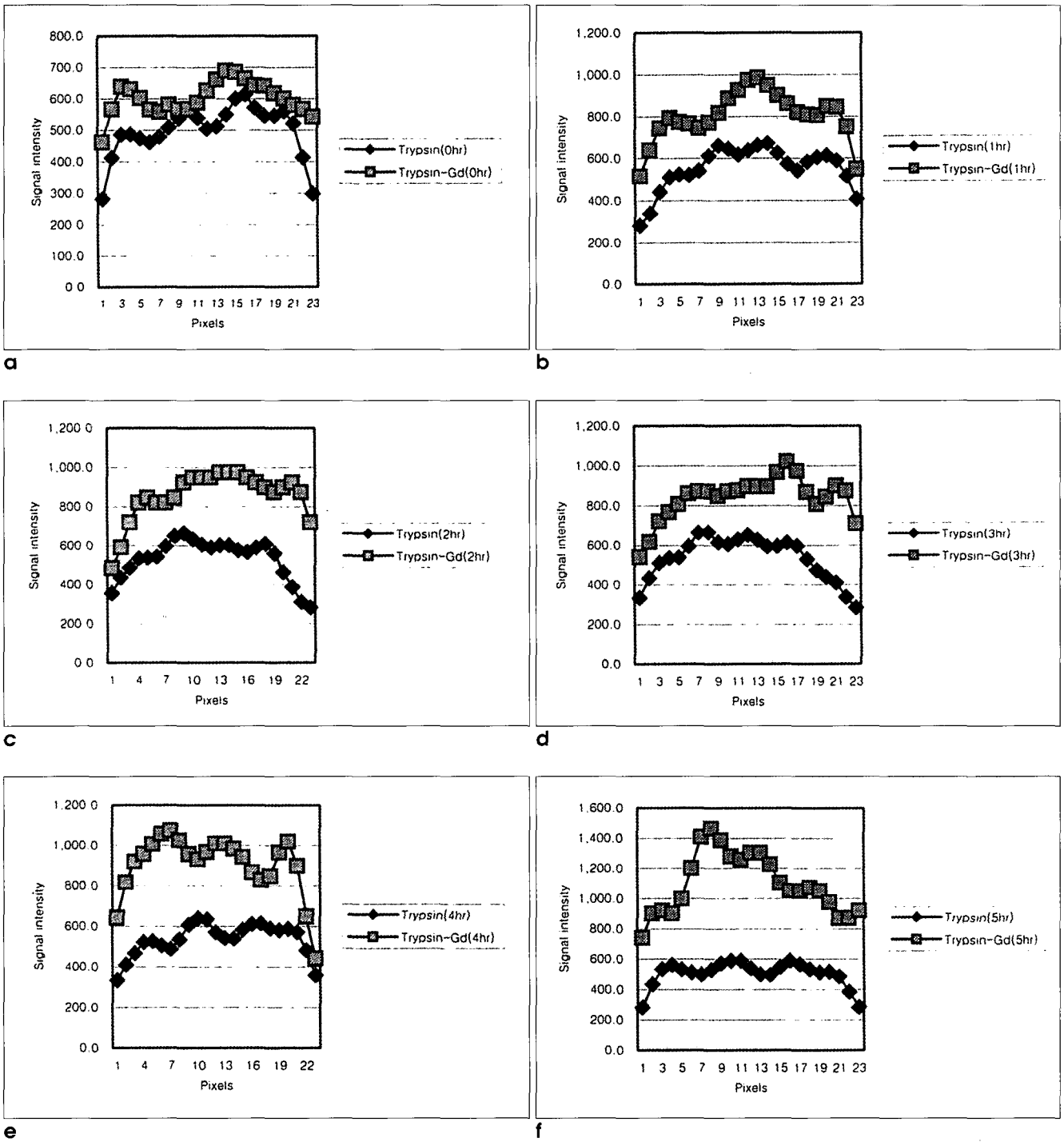


Fig. 5. The pixel-by-pixel comparison of signal intensities of cartilage in T1-weighted image. The degree of Gd(DTPA)$^{2-}$-enhancement corresponds to the gap between the two curves. The Gd(DTPA)$^{2-}$-enhancement of cartilage is increased as culture duration increases (A, 0 hr; B, 1 hr; C, 2 hr; D, 3 hr; E, 4 hr; F, 5 hr culture).

되어 proteoglycan으로 만들어 진다. GAG에는 음이온화 된 SO_3^- 기와 COO^- 기가 있기 때문에 친수력이 크고 양이온에 대한 친화력이 커서 관절연골내로 Ca^+, Na^+ 가 투과성을 지니게 한다. 따라서 관절연골 내에는 GAG로 인한 물의 삼투압에 의한 팽창력과 교원질섬유의 장력과의 힘의 평형이 항상 유지되고 있기 때문에 관절연골이 외부의 압력으로부터 저항력을 가지게 된다 (17, 21). 관절연골에 초기퇴행성변화가 발생되기 시작하면 먼저 교원질섬유의 소실이 일어나고 교원질섬유에 의해 억제되었던 GAG에 의한 수분 팽창력이 증가되어 관절연골내의 수분이 증가된다. 이로서 GAG의 결손이 뒤이어 일어 남으로서 교원질과 GAG사이의 힘의 균형이 파괴되어 관절연골의 외부의 자극에 대한 저항력이 떨어져 퇴행성 관절염이 발생된다고 알려져 있다 (4, 17). 따라서 관절연골에서 초기의 퇴행성 변화를 관찰하기 위해서는 교원질과 GAG의 결손을 얼마나 정확하게 촬영하느냐가 관절연골 MRI 연구의 중요한 목표가 된다. GAG가 음극성을 가지기 때문에 칼슘이온이나 나트륨이온 같은 양이온제나 $Gd(DTPA)^{2-}$ 같은 음이온제를 관절연골에 투여하면 GAG와 길항작용을 일으켜 GAG의 결손 양만큼 이온이 연골내로 이동하여 결합된다. 이러한 작용을 이용하면 관절연골 변성의 초기 GAG결손을 MRI로 관찰이 가능하게 된다 (10, 23). 저자의 연구에서는 trypsin 배양으로 GAG결손을 유도한 후 $Gd(DTPA)^{2-}$ 를 이용하여 MRI로 관절연골의 변화를 관찰할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 배양시간이 증가할수록 $Gd(DTPA)^{2-}$ 조영증가가 증가되었고 GAG이 더욱 많이 소실되었음을 알 수 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 3-5).

교원질섬유의 결손이 있으면 관절연골의 T2이완시간이 증가된다고 한다 (13). GAG의 결손에서는 rho 이완시간이 증가된다는 보고가 있었고 다른 연구에서는 T1강조영상에서 Gd $(DTPA)^{2-}$조영증강이 증가한다고 보고하였다 (10, 14, 23, 24).

Paul 등 (25)은 동물실험을 통하여 GAG양과 관절연골의 MRI와의 연관성을 알아보려고 시도하였으나 T1, T2, rho 이완시간에서 유의한 차이를 관찰하지 못하였다. Xia 등 (8)은 사람의 슬관절에서 관절연골층에 대하여 이완시간의 분포를 조사하였는데 T1이완시간은 균일한 분포를 보인 반면 T2이완시간은 관절 표면부에서 50 ms였고 연골하골쪽에서는 10 ms를 나타냈다고 하였다. Dardzinski 등 (26)은 T2이완시간이 관절연골의 심부에서 는 32 ms를, 표면층에서는 67 ms 를 나타낸다고 하였다. 저자의 연구에서도 이들과 유사하게 T1이완시간은 관절연골의 표면부와 심부에서 비슷한 반면 T2이완시간은 심부에서 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다.

결 론

Dimethylmethylene blue용액을 이용한 GAG의 정량분석

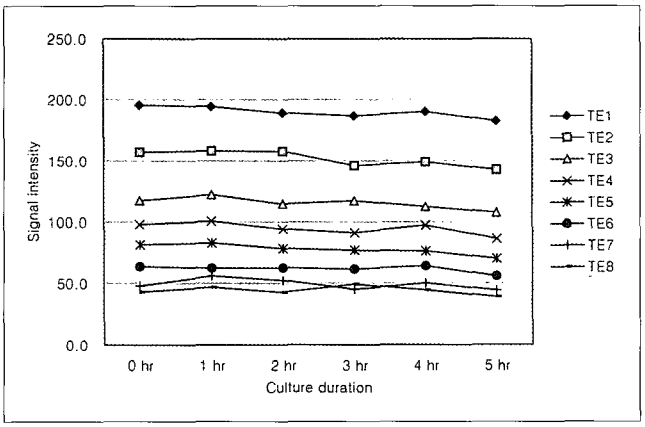
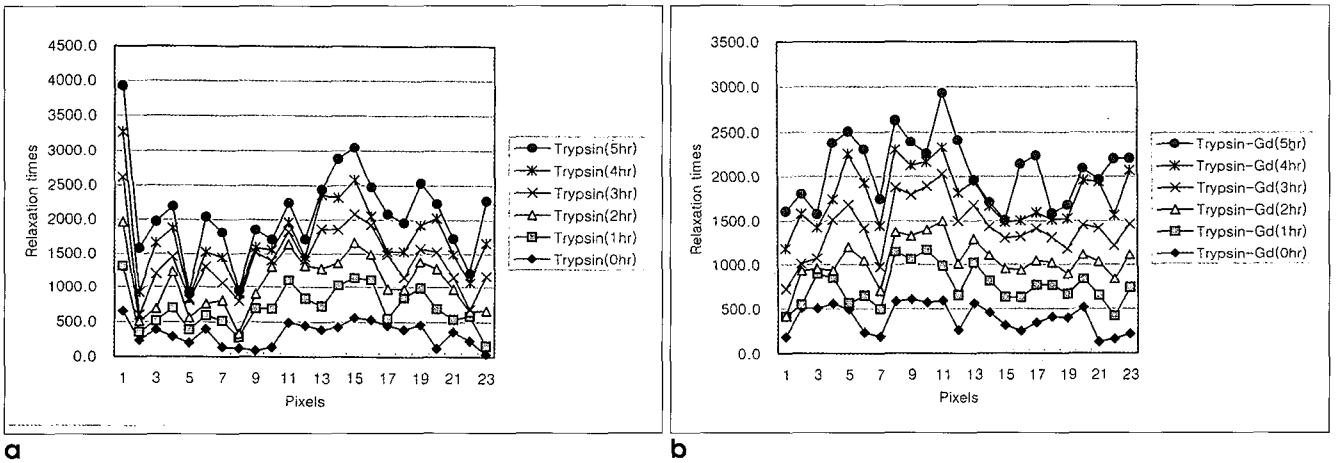


Fig. 7. Comparison of the signal intensities of cartilage treated by trypsin with increase culture duration (hr) in multiple TE (TE1, 21 ms; TE2, 42 ms; TE3, 63 ms; TE4, 84ms; TE5, 105 ms; TE6, 126 ms; TE7, 147 ms; TE8, 168 ms).



a b

Fig. 6. Graphs of accumulated signal intensities of cartilage in T1 relaxation map. With pixel-by-pixel comparison of trypsin (**A**) and trypsin-Gd(DTPA)$^{2-}$ culture (**B**), the increased relaxation time is noted in the superficial and transitional portion (pixel 3-11) of the cartilage (**B**).

결과 trypsin에 의한 배양시간증가에 따라 GAG의 농도가 비례적으로 증가하여 관절연골의 GAG결손을 정량적으로 확인할 수 있었다. Gd(DTPA)$^{2-}$ 가 첨가된 trypsin배양에서 관절연골의 신호강도는 trypsin 배양에 비하여 평균 42.0% 증가하였고 4시간과 5시간배양에서는 신호강도가 더욱 뚜렷하게 증가되었다 ($p < 0.05$). 관절연골의 T1, T2, rho 이완시간은 배양시간에 따라 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다. 그리고 조직검사결과 trypsin 배양의 관절연골에서 toluidine blue와 alcian blue염색에서 염색결손을 관찰할 수 있었다.

결론적으로 배양시간에 따른 GAG결손은 Gd(DTPA)$^{2-}$조영증강에서 유의한 차이를 관찰할 수 있었으며 1.5T MRI기기로서 관절연골의 초기 퇴행성 변화를 진단하는데는 T1강조영상에서 Gd(DTPA)$^{2-}$조영증강정도를 비교하는 것이 가장 유용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Forman MD, Malamet R, Kaplan D. A survey of osteoarthritis of the knee in the elderly. J Rheumatol 1983;10:282-287.
2. Schenk RK, Eggli PS, Hunziker EB. Articular cartilage biochemistry: articular cartilage morphology. New York, NY : Raven, 1986;3-22.
3. Akeson WH, Amiel DA, Gershuni DH. Articular cartilage physiology and metabolism. In Resnick D. Diagnosis of bone and joint disorders. 3rd ed. Philadelphia : Saunders, 1995;796-790.
4. Buckwalter JA, Mankin HG. Articular cartilage. II. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. J Bone Joint Surg 1997;79:612-632.
5. Disler DG, Recht MP, McCauley TR. MR imaging of articular cartilage. Skeletal Radiol 2000;29:367-377.
6. Kneeland JB. MR imaging of articular cartilage and of cartilage degeneration. In: Stoller DW. Magnetic resonance imaging in orthopedics and sports medicine. 2nd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997;83-91.
7. Werner A, Grunder W. Calcium-induced structural change of cartilage proteoglycans studied by 1H NMR relaxometry and diffusion measurements. Magn Reson Med 1999;41:43-50.
8. Xia Y, Farquhar T, Burton-Wurster N, Ray E, Jelinski LW. Diffusion and relaxation mapping of cartilage-bone plugs and excised disks using microscopic magnetic resonance imaging. Magn Reson Med 1994;31:273-282.
9. Peterfy CG, Genant HK. Emerging applications of magnetic resonance imaging in the evaluation of articular cartilage. Radiol Clin North Am 1996;34:195-213.
10. Bashir A, Gray M, Burstein D. Gd-DTPA2- as a measure of cartilage degradation. Magn Reson Med 1996;36:665-673.
11. Muller G, Hanschke M. Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. Connect Tissue Res 1996;33:243-248.
12. Farndale RW, Sayers CA, Buttle DJ. A direct spectophotometric microassay for sulphated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connect Tissue Res 1982;9:247-248.
13. Nieminen MT, Toyras J, Rieppo J, et al. Quantitative MR microscopy of enzymatically degraded articular cartilage. Magn Reson Med 2000;43:676-681.
14. Duvvuri U, Reddy R, Patel SD, Kaufman JH, Kneeland JB, Leigh J. T1ρ-relaxation in articular cartilage: effect of enzymatic degradation. Magn Reson Med 1997;38:863-867.
15. Insko EK, Kaufman JH, Leigh JS, Reddy R. Sodium NMR evaluation of articular cartilage degradation. Magn Reson Med 1999;41:30-34.
16. McCauley TR, Disler DG. MR imaging of articular cartilage. Radiology 1998;209:629-640.
17. Woo SLY, Kwan MK, Coutts RD, Akeson WH. Biomechanical considerations. In Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ. Osteoarthritis. 2nd ed. Philadelphia : Saunders, 1992;191-211.
18. Kim DJ, Suh JS, Jeong EK, Shin KH, Yang WI. Correlation of laminated MR appearance of articular cartilage with history, ascertained by artificial landmarks on the cartilage. J Magn Reson Imaging 1999;10:57-64.
19. Modl JM, Sether LA, Haughton VM, et al. Articular cartilage: Correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. Radiology 1991;181:853-855.
20. Rubenstein JD, Kim JK, Morava-Protzner I, Stanchev PL, Henkelman RM. Effects of collagen orientation on MR imaging characteristics of bovine articular cartilage. Radiology 1993;188:219-226.
21. Bashir A, Gray ML, Hartke J, Burstein D. Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. Magn Reson Med 1999;41:857-865.
22. Moroudas A, Venn M. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthritis femoral head cartilage. Ann Rheum Dis 1977;36:399-406.
23. Bashir A, Gray ML, Boutin RD, Burstein D. Glycosaminoglycan in articular cartilage: in vivo assessment with delayed Gd(DTPA)2--enhanced MR imaging. Radiology 1997;205:551-558.
24. Mlynarik V, Trattnig S, Huber M, Zembsch A, Imhof H. The role of relaxation times in monitoring proteoglycan depletion in articular cartilage. J Magn Reson Imaging 1999;10:497-502.
25. Paul PK, O' Byrne E, Blancuzzi V, et al. Magnetic resonance imaging reflects cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee. Skeletal Radiol 1991;20:31-36.
26. Dardzinski BJ, Mosher TJ, Li S, Slyke MA, Smith MB. Spatial variation of T2 in human articular cartilage. Radiology 1997;205:546-550.

J. Korean Soc. Magn. Reson. Med. 8:100-108(2004)

Gd(DTPA)$^{2-}$-enhanced, and Quantitative MR Imaging in Articular Cartilage

Seon-Joo Lee, M.D., Choong-Ki Eun, M.D., Yeong-Joon Lee, M.D., Auh-Whan Park, M.D., Yeong-Mi Park, M.D., Jae-Ik Bae, M.D., Ji Hwa Ryu, M.D.[4], Dae-Il Baik, M.D.[3], Soo-Jin Jung, M.D.[4]

[1]*Department of Radiology, College of Medicine, Inje University, Busan Paik Hospital.*
[2]*Department of Radiology, College of Medicine, Inje University, Dongrae Paik Hospital.*
[3]*Paik Radilogy Clinic*
[4]*Department of Pathology, College of Medicine, Inje University, Busan Paik Hospital.*

Purpose : Early degeneration of articular cartilage is accompanied by a loss of glycosaminoglycan (GAG) and the consequent change of the integrity. The purpose of this study was to biochemically quantify the loss of GAG, and to evaluate the Gd(DTPA)$^{2-}$-enhanced, and T1, T2, rho relaxation map for detection of the early degeneration of cartilage.

Materials and Methods : A cartilage-bone block in size of 8mm × 10 mm was acquired from the patella in each of three pigs. Quantitative analysis of GAG of cartilage was performed at spectrophotometry by use of dimethylmethylene blue. Each of cartilage blocks was cultured in one of three different media: two different culture media (0.2 mg/ml trypsin solution, 1mM Gd (DTPA)$^{2-}$ mixed trypsin solution) and the control media (phosphate buffered saline (PBS)). The cartilage blocks were cultured for 5 hrs, during which MR images of the blocks were obtained at one hour interval (0 hr, 1 hr, 2 hr, 3 hr, 4 hr, 5 hr). And then, additional culture was done for 24 hrs and 48 hrs. Both T1-weighted image (TR/TE, 450/22 ms), and mixed-echo sequence (TR/TE, 760/21-168ms; 8 echoes) were obtained at all times using field of view 50 mm, slice thickness 2 mm, and matrix 256 × 512. The MRI data were analyzed with pixel-by-pixel comparisons. The cultured cartilage-bone blocks were microscopically observed using hematoxylin & eosin, toluidine blue, alcian blue, and trichrome stains.

Results : At quantitation analysis, GAG concentration in the culture solutions was proportional to the culture durations. The T1-signal of the cartilage-bone block cultured in the Gd(DTPA)$^{2-}$ mixed solution was significantly higher (42% in average, $p < 0.05$) than that of the cartilage-bone block cultured in the trypsin solution alone. The T1, T2, rho relaxation times of cultured tissue were not significantly correlated with culture duration ($p > 0.05$). However the focal increase in T1 relaxation time at superficial and transitional layers of cartilage was seen in Gd(DTPA)$^{2-}$ mixed culture. Toluidine blue and alcian blue stains revealed multiple defects in whole thickness of the cartilage cultured in trypsin media.

Conclusion : The quantitative analysis showed gradual loss of GAG proportional to the culture duration. Microimagings of cartilage with Gd(DTPA)$^{2-}$-enhancement, relaxation maps were available by pixel size of 97.9 × 195 μm. Loss of GAG over time better demonstrated with Gd(DTPA)$^{2-}$-enhanced images than with T1, T2, rho relaxation maps. Therefore Gd(DTPA)$^{2-}$-enhanced T1-weighted image is superior for detection of early degeneration of cartilage.

Index words : Articular cartilage, contrast enhanced MR image, quantitative MR image, glycosaminoglycan

Address reprint requests to : Choong-Gon Choi, Department of Radiology, Asan Medical Center, Univeristy of Ulsan College of Medicine, ,#146-92, Dogok-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-270, Korea. Tel. 82-2-2224-4400, 4374 Fax. 82-2-476-4719 E-mail: cgchoi@www.amc.seoul.kr