

저산소증에 의한 활막 섬유모세포의 ICAM-1 발현에 대한 항산화제의 영향

전북대학교 의과대학 ¹정형외과학교실, ²내과학교실, ³임상의학연구소

김정렬^{1,3} · 류완희^{2,3}

Effects of Antioxidant on the Hypoxia-induced Expression of ICAM-1 in Cultured Human Synovial Fibroblasts

Jung Ryul Kim^{1,3} and Wan Hee Yoo^{2,3}

Departments of ¹Orthopedic Surgery and ²Internal Medicine, Chonbuk National University Medical School, and ³Research Institute of Clinical Medicine, Chonju, Korea

ABSTRACT

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by synovial hyperplasia and joint destruction. The synovial fibroblasts express cell adhesion molecules and have a role in adhesive interaction with inflammatory cells in synovial tissue. It has been suggested that hypoxic conditions are thought to exist in arthritic joints, and several studies indicate that reactive oxygen species (ROS) produced in hypoxic condition can initiate events that lead to pro-adhesive changes via increased expression of adhesion molecules. So, this study was designed to examine whether antioxidant can inhibit hypoxia-induced expression of ICAM-1 in cultured human synovial fibroblasts. **Methods:** Synovial fibroblasts were isolated from synovial tissue in patients with RA and cultured at hypoxic condition. Antioxidant, PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) were pre-treated for an hour before the hypoxic culture and synovial fibroblasts were harvested at 0, 6, 12, 24, 48 hours time points. Cell surface ICAM-1 expression in synovial fibroblasts was examined by the flow cytometric analysis. To analyse the expression of ICAM-1 mRNA, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. The levels of cytokines in culture supernatants were measured by ELISA, and activation of NF- κ B was analysed by electrophoretic mobility shift assay. The adhesive reaction between synovial fibroblasts and lymphocytes was assayed by measurement of fluorescent intensity of BCECF-AM in lymphocytes. **Results:** Hypoxic stimuli up-regulated the ICAM-1 expression as well as the adhesive interaction of human synovial fibroblasts to lymphocytes in a time-dependent manner, and PDTC inhibited hypoxia-induced ICAM-1 expression and cell-cell interaction. PDTC also inhibited the hypoxia-induced activation of intracellular transcription factor, NF- κ B. PDTC decreased the amount of hypoxia-induced production of IL-1 β and TNF- α . **Conclusion:** These studies demonstrate that PDTC inhibit the hypoxia-induced expression of the adhesion molecule, ICAM-1 and activation of NF- κ B in cultured human synovial fibroblasts. (*Immune Network* 2002;2(1):25-34)

Key Words: antioxidants, hypoxia, ICAM-1, rheumatoid arthritis, synovial fibroblasts

서 론

류마티스 관절염은 만성 염증성 질환으로, 염증성 활막은 현저한 저산소증을 동반하며(1,2), 저산소증에 의해 생성된 reactive oxygen species (ROS)는 관절 내에 생화학적 변화를 일으키고 면역학적 반응에 영향을 주어 관절염의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

책임저자 : 류완희, 전북대학교 의과대학 내과학교실
☎ 561-712, 전북 전주시 덕진구 금암동 634-18
Tel: 063-250-1672, Fax: 063-254-1609
E-mail: ywhim@moak.chonbuk.ac.kr

이 논문은 2000년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

ROS는 조직 또는 기관에 직접적인 산화적 손상(oxidative damage)을 주고, 면역성 염증반응에 관련된 단백질의 유전자를 발현시켜 염증반응을 일으킨다. ROS는 세포의 유착반응의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고(3,4), 혈관 내피세포에서는 세포 내의 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 통하여 ICAM-1, VCAM-1의 전사에도 관련되는 것으로 알려져 있다(5,6).

류마티스 관절염에서 활막염은 활막의 비후와 염증세포의 광범위한 침착이 특징이며(7,8), 활막조직에서 염증세포의 침착에는 혈관의 내피세포와의 유착반응과 혈관 외의 간질조직으로 누출(diapedesis)되는 과정이 있고, 간질조직에서는 누출된 염증세포와 활막 섬유모세포와의 세포-세포간 상호반응이 필요하고, 여기에는 cytokines과 유착분자 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(9-11). 저산소증은 혈관 내피세포에서 유착분자 및 cytokines의 발현을 증가시키고 내피세포-염증세포와의 상호반응에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(12-14). 따라서, 활막조직에서 저산소증에 의한 활막에서의 ROS의 생성은 활막 섬유모세포와 누출된 염증세포에 영향을 줄 수 있고, 이는 두 세포 간의 상호반응에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다. 또한, 항산화제는 여러 cytokines과 유착분자의 전사인자에 해당하는 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다(15).

이에 저자들은 류마티스 관절염 환자의 활막조직에서 활막 섬유모세포를 분리, 배양하여 항산화제가 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1의 발현과 IL-1 β 과 TNF- α 의 생성 및 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 항산화제가 저산소증의 자극에 의한 활막 섬유모세포-염증세포 간의 유착반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

활막 섬유모세포의 분리와 배양. 미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology)의 진단기준(16)을 만족하는 류마티스 관절염 환자에서 무릎 관절의 활막 제거술이나 관절 치환술을 통해 얻은 조직으로부터 Matsuoka 등(17)이 기술한 방법을 이용하여 활막 섬유모세포를 분리하였다. 활막 조직을 가위로 잘게 자른 후 collagenase (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA)로 37°C에서 45분간 처리한 후 세포 부유액을 나일론 망에 통과시키고 남은 세포를 RPMI 1640~10% FCS이 담긴 petri dish에 담아 두었다. 비부착세포를 PBS로 3회 씻어 제거하고 남아 있는 부착세포를 계대 배양하였다. 배양세포가 활막 섬유모세포임을 확인하기 위하여 anti-CD3 단일클론 항체, anti-CD68 단일클론 항체, anti-CD20 단일클론 항체, anti-vWF 항체 등을 사용한 flow cytometry (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여

배양세포 내에 T 림프구, B 림프구, 대식세포, 내피세포 등이 1% 미만임을 입증하였다. 활막 섬유모세포는 uridine diphosphoglucose dehydrogenase 염색을 이용하여 확인하였다.

저산소증 상태에서 활막 섬유모세포의 생존도. 저산소증 상태의 조건을 만들기 위하여 nitrogen gas를 주입함으로써 incubator의 조건을 5% CO₂, >95% N₂, <3% O₂가 되도록 하였다. 37°C에서 배양하였으며, 최대 48시간 동안 저산소증에 노출시키는 동안에는 O₂ 분석기를 이용하여 incubator내의 O₂농도를 지속적으로 감시하였다. 저산소증 상태에서 활막 섬유모세포의 생존도를 알기 위해 trypan blue exclusion (18) 방법과 세포배양 상층액에서 LDH (lactate dehydrogenase) 활성도를 측정하였다.

림프구의 분리와 배양. 림프구는 단핵세포를 Percoll gradient centrifugation을 이용하여 three step method로 분리하였다(19). 항응고제가 포함되어 있는 주사기로 채혈한 후 70% Percoll, 55% Percoll gradient로 500×g로 30분간 원심하여 단핵세포 분획을 얻은 후 PBS로 세척하여 사용하였다. 적혈구를 제거해야 하는 경우에는 적혈구 용해액을 처리하였다. 림프구를 풍부히 얻기 위하여 분리한 단핵세포 분획을 10% FBS-RPMI 1640에 배양한 후 비부착세포를 제거한 후에 다시 배양하였다.

Cytokines의 측정. 배양 상층액에서 pro-inflammatory cytokines의 변화를 조사하기 위해서 IL-1 β 과 TNF- α 를 sandwich ELISA kit (BioSource, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

활막 섬유모세포의 ICAM-1의 flow cytometric analysis. 활막 섬유모세포에서 ICAM-1의 발현을 관찰하기 위하여 FACScan을 이용하였다. 배양 평판(culture plate)에 trypsin EDTA를 처리하여 활막 섬유모세포를 얻어 원심 분리하여 수집하였다. 수집한 세포를 1 mg/ml BSA가 함유된 HBSS (Hanks' balanced salt solution)로 2회 세척하고 세포 수를 5×10⁵ cells/ml로 맞추어 staining buffer (0.01 M NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.1, containing normal human serum, 0.02% NaN₃)에 넣고 세포 부유액에 FITC가 표지된 human anti-ICAM-1 항체 10 μ g/ml를 첨가한 후에 얼음 위에서 30분간 부치시켰다. 이후에 HBSS로 2회 세척하고 1% paraformaldehyde 용액 (300 μ l)으로 고정된 후에 flow cytometer로 분석하였다.

RNA의 분리와 ICAM-1의 역전사 효소-PCR. 배양 평판에 trypsin EDTA를 처리한 후에 원심 분리하여 활막 섬유모세포만을 수집하고, Trizol reagent (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 RNA를 추출하여 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 mRNA를 정량하였다. 50 ng의 mRNA로부터 M-MLV RNase H-reverse transcriptase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)와 oligo-p(dT) 15 primer을 이용하여 cDNA을 합성한 후 이를 주형

으로 하고 ICAM-1 염기서열로부터 유추한 oligonucleotides, HindIII-ICAM-1 (5' CAC GCC TCC CTG AAC CTA 3')과 ICAM1-XbaI (3' AGT CCC AGC CCC ATT TGA 5')를 primer로 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통하여 정량분석 비교하였다.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). 활막 섬유모세포만을 수집한 후에 핵 추출물(nuclear extract)을 얻어 분광광도계를 이용하여 단백질을 정량하였다. NF- κ B의 활성화를 조사하기 위해서 핵 추출물(10 μ g)과 NF- κ B의 consensus DNA binding site를 end label한 P³²labeled B probe (Ig-사슬결합부위 B, 5'CCG GTT AAC AGA GGG GGC TTT CCG AG3', 10,000 cpm)를 25°C에서 30분간 반응시켰다. Probe 결합의 특이성은 50배 농도의 unlabeled probe를 첨가하여 확인하였고, 단백질-DNA 복합체는 4% non-denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 후에 건조시켜 NF- κ B의 활성도를 관찰하였다.

활막 섬유모세포와 림프구의 유착반응 조사. 활막 섬유모세포와 림프구간의 유착정도를 조사하기 위하여 먼저 정상인의 혈액에서 림프구를 분리한 후 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 5 ng/ml를 처리하여 활성화시켰다. 활성화된 림프구를 2,7-bis (carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester (BCECF-AM, 5 μ M final concentration, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)로 37°C에서 30분간 반응시켜 표지한 후에 HBSS로 3회 세척하였다. 활막 섬유모세포에 대한 림프구의 유착정도를 보기 위하여 6-well 배양 평판에 활막 섬유모세포를 배양한 다음 BCECF-AM으로 표식된 림프구(2 \times 10⁶)를 첨가하여 활막 섬유모세포와 림프구가 서로 유착되도록 5% CO₂ incubator에서 37°C에서 10분간 반응시킨 후 유착되지 않은 림프구를 제거하기 위해 HBSS로 3회 세척하였다. 활막 섬유모세

포와 이에 유착된 림프구를 trypsin EDTA으로 처리한 후 원심 분리하여 수집하여 fluorescent plate reader를 이용하여 형광강도(485-nm excitation, 530-nm emission)를 측정하였다. 활막 섬유모세포에 유착된 림프구의 수는 일정한 비율로 희석한 림프구를 이용하여 BCECF-AM를 처리한 후 형광강도를 측정하여 standard curve를 얻고, 이를 이용하여 유착된 림프구의 비율을 계산하였다.

활막 섬유모세포와 이에 유착된 림프구를 관찰하기 위하여 배양 평판에 cover glass를 두어 이 곳에 활막 섬유모세포를 배양하였다. 활막 섬유모세포와 림프구가 서로 유착되도록 PMA로 자극한 림프구를 첨가하여 10분간 배양한 후에 유착되지 않은 림프구를 PBS로 3회 세척하여 제거하고, 남은 세포를 10% formaldehyde로 고정하고 colloidin blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

항산화제. 세포 내 전사인자인 NF- κ B의 억제제로는 I κ B의 인산화(phosphorylation)를 억제함으로써 NF- κ B로부터 I κ B의 분리를 막아 phorbol esters, IL-1과 TNF- α 등의 효과를 억제하는 것으로 알려진 항산화제인 PDTC (pyrrolidine dithio-carbamate)를 사용하였다.

통계처리. 모든 실험 결과는 평균 \pm standard deviation (SD)으로 표기하였으며, analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리하였다. P values <0.05를 유의한 차이가 있는 것으로 하였으며, Student's paired t-test를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

결 과

저산소증이 활막 섬유모세포의 생존도에 미치는 영향. Trypan blue exclusion상 저산소증에 노출된 48시간까지 활막 섬유모세포의 생존도는 98% 이상을 유지하였다. 저산소증에 의한 자극을 준 각 시간별로 LDH 활성도는 대조군에서는 0.18 \pm 0.02 U/L이었으며, 저산소증에

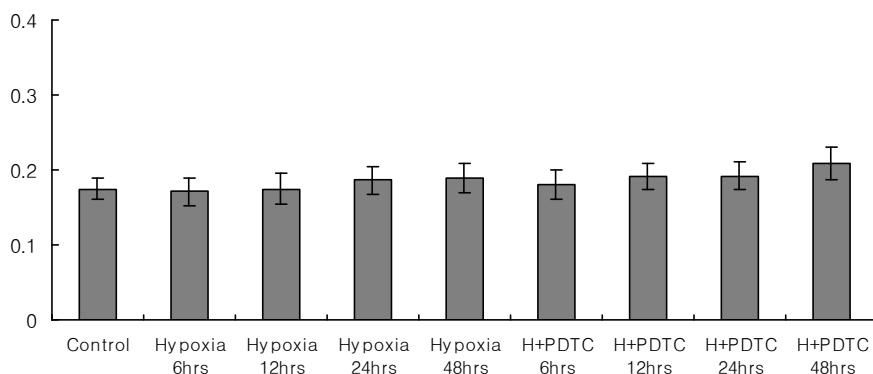


Figure 1. LDH activity in the culture supernatants was measured for determining the viability of cultured human synovial fibroblasts. Cells were treated with hypoxic stimuli with or without antioxidants (PDTC, 100 μ M) for 6, 12, 24, 48 hours. Data are presented as the mean \pm SD of six experiments (H+PDTC: hypoxic culture with treatment of PDTC an hour before hypoxic stimuli).

노출된 시간에 따라 증가하는 경향을 보였고, 48시간에는 0.19 ± 0.02 를 보였으나, 대조군과는 유의한 차이가 없었다(Fig. 1). PDTC를 전처리한 후에 저산소증 상태에서 배양한 후에 조사한 trypan blue exclusion과 배양 상층액의 LDH 활성도도 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 1). **저산소증에 의한 ICAM-1의 발현에 PDTC가 미치는 영향.**

Flow cytometric analysis of cell surface ICAM-1: 활막 섬유모세포에 저산소증에 의한 자극을 주면 ICAM-1의 발현이 대조군(normoxic condition)보다 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, B). Normoxic condition에서 ICAM-1 양성인 활막 섬유모세포의 비율이 $57 \pm 2.8\%$ 이

었으며, 저산소증의 자극을 6시간 준 경우에는 $59 \pm 4.2\%$ 로 normoxic condition과 차이를 보이지 않았다. 12시간 동안 저산소증의 자극을 준 경우부터 $78 \pm 4.8\%$ 로 유의하게 증가하였으며($P < 0.05$), 24시간에는 $84 \pm 7.5\%$ 로 증가하여 최대치를 보였다($P < 0.05$, Fig. 2B). 48시간 동안 저산소증의 자극을 준 경우에는 $81 \pm 6.8\%$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였지만($P < 0.05$), 24시간보다는 감소하는 경향을 보였다. PDTC를 전처리한 후 저산소증의 자극을 준 경우에 ICAM-1이 양성인 활막 섬유모세포의 비율은 6, 12, 24, 48시간에 각각 $57 \pm 5.2\%$, $63 \pm 4.6\%$, $65 \pm 6.1\%$, $63 \pm 5.1\%$ 를 보여 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1의 발현 증가가 억제되는 소견을 보

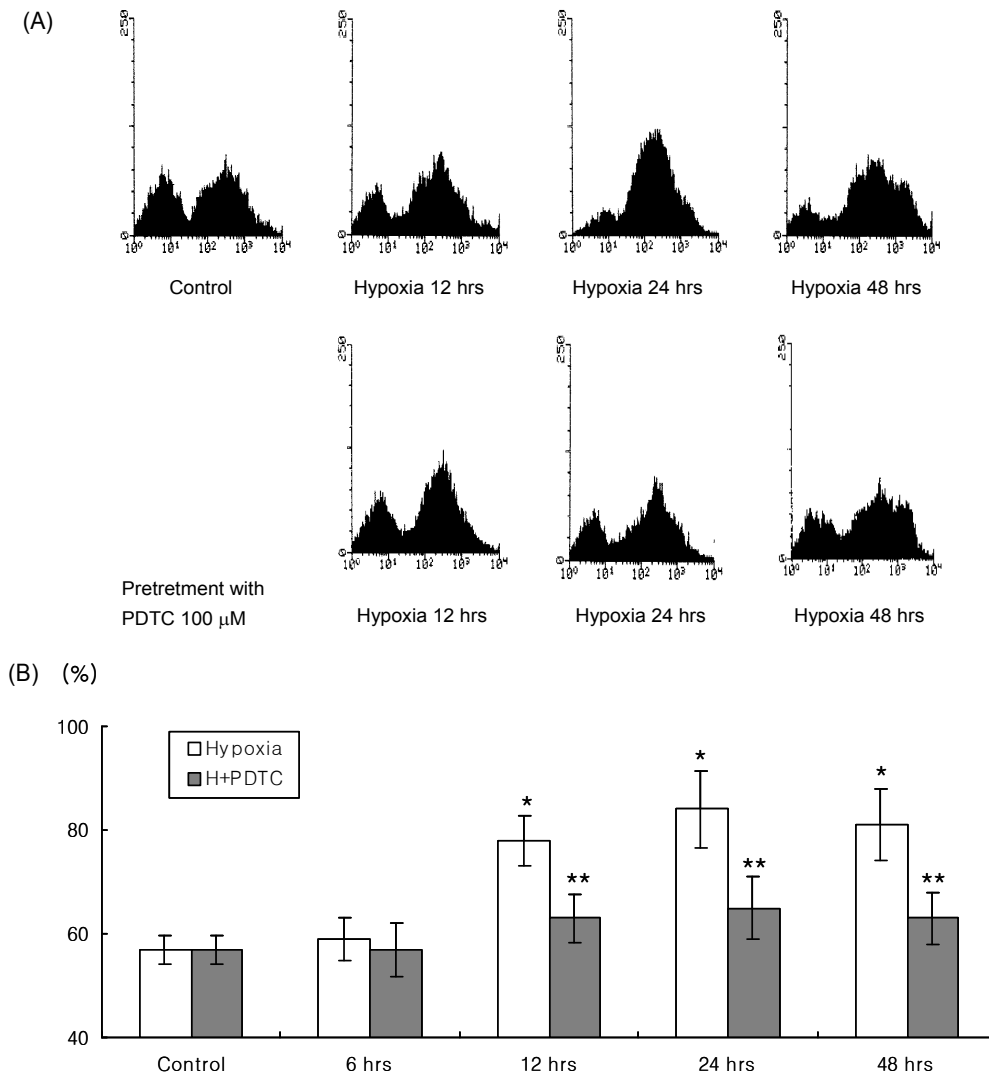


Figure 2. (A), (B). Time-course ICAM-1 expression in the synovial fibroblasts cultured in hypoxic condition with or without PDTC pre-treatment. Cell surface ICAM-1 expression was analyzed after 6, 12, 24, 48 hours of hypoxic stimuli. Samples were analyzed using FACSscan and the results were expressed as the mean \pm SD of percentage of positive cell in six experiments. * $P < 0.05$ compared with control of normoxic culture condition. ** $P < 0.05$ compared with hypoxic culture condition without PDTC pre-treatment (H+PDTC: hypoxic culture with treatment of PDTC an hour before hypoxic stimuli).

였다($P < 0.05$, Fig. 2B).

RT-PCR for ICAM-1 mRNA: 저산소증에 의한 자극 시 활막 섬유모세포의 ICAM-1 mRNA 발현이 시간에 따라 증가하였으며, ICAM-1 mRNA/ β -actin ratio는 저산소증 자극을 12, 24, 48시간 동안 준 경우에 모두 대조군에 비해 증가하였으며, 24시간에 최대치를 보였다. PDTC를 전처리한 경우에는 12, 24, 48시간 배양한 경우 모두에서 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1 mRNA 발현의 증가가 유의하게 억제되었다(Fig. 3).

배양 상층액에서 IL-1 β 과 TNF- α 농도의 변화. Normoxic culture condition에 비해 저산소증에 의한 자극을 주었을 때, 배양 상층액의 IL-1 β 와 TNF- α 가 증가하는 소견을

보였고, 저산소증에 노출된 시간이 증가함에 따라 IL-1 β 와 TNF- α 가 증가하였으며, 항산화제인 PDTC를 전처리했을 때에는 저산소증에 의한 증가가 감소하는 소견을 보였다(Fig. 4).

항산화제가 저산소증에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향. 저산소증에 의한 자극에 따른 NF- κ B의 활성화 여부를 알아보기 위해서 저산소증 상태로 3시간 동안 배양한 후에 NF- κ B의 활성도를 측정하였다. Normoxic culture condition에 비해 3시간 동안 저산소증에 의한 자극을 준 활막 섬유모세포에서 PMA를 처리한 것처럼 NF- κ B의 활성도가 증가됨을 확인할 수 있었으며(lane 2), 항산화제인 PDTC 100 μ M/ml를 전처리를 한 경우에는

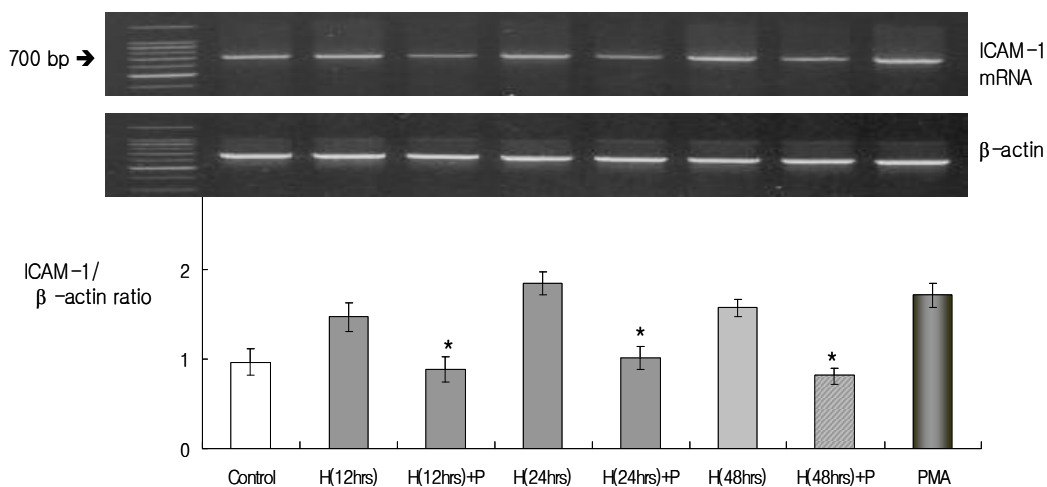


Figure 3. Time-course of induction of ICAM-1 mRNA expression in the synovial fibroblasts exposed to hypoxic culture condition (<3% O₂) for 12, 24, 48 hours with or without PDTC pre-treatment an hour before hypoxic culture, as determined by RT-PCR analysis. The ICAM-1 mRNA/ β -actin ratio were presented as the amount of the induction of ICAM-1 mRNA transcription. The results shown above are presented as the mean \pm SD of three separate experiments. * $P < 0.05$ compared with hypoxic culture condition without PDTC pre-treatment (H: hypoxic culture, P: treatment of PDTC an hour before hypoxic stimuli).

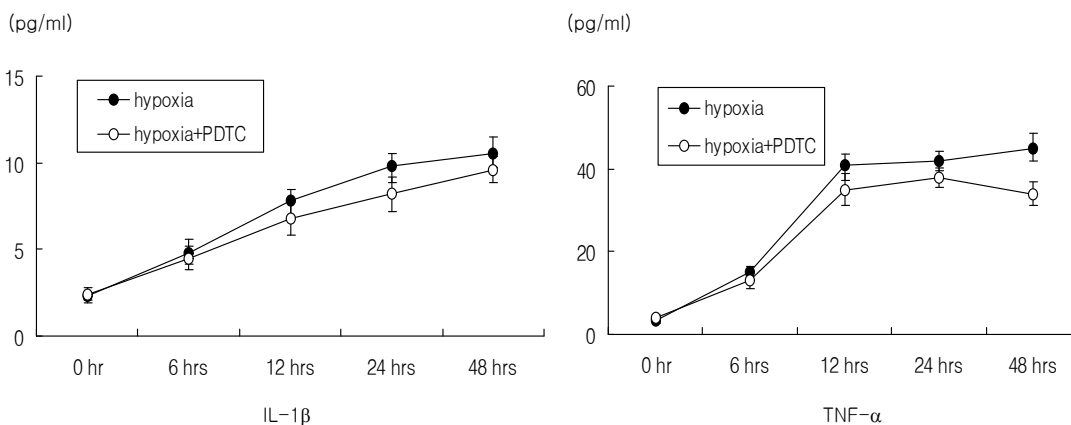


Figure 4. Concentration of IL-1 β and TNF- α in the culture supernatants of synovial fibroblasts exposed to hypoxia with or without PDTC pre-treatment an hour before hypoxic culture. Results were presented as mean \pm SD of three separate experiments.

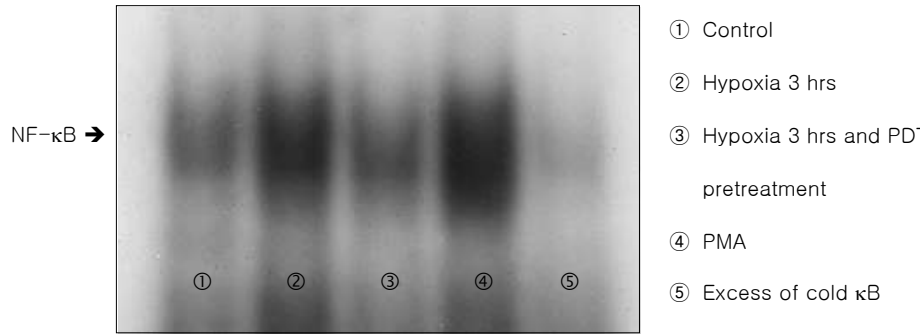


Figure 5. NF-κB activation in the rheumatoid synovial fibroblasts exposed to hypoxic culture condition with or without PDTC pre-treatment (100μM), as determined by electrophoretic mobility shift assay using P³²-labeled oligonucleotides.

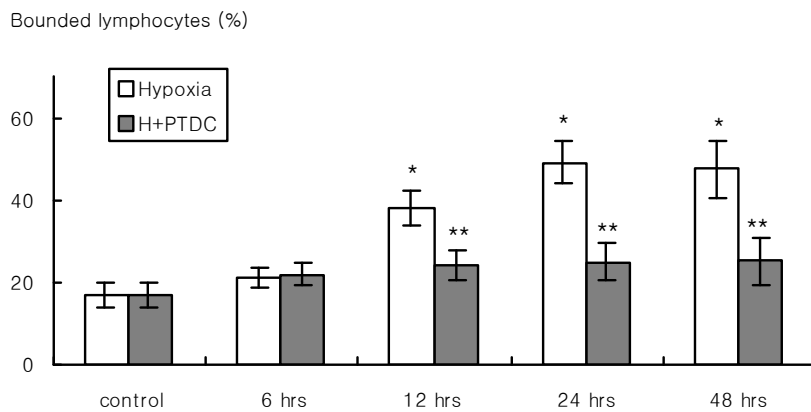


Figure 6. Lymphocyte adhesion assay. PMA-stimulated and BCECF-AM labeled lymphocytes enriched mononuclear cells were co-cultured with synovial fibroblast monolayer in the culture plates for 10 minutes. Culture plates were washed three times with PBS for removal of non-adherent cells. The fluorescent intensity of the adherent lymphocytes were measured by fluorescent plate reader. Results were % of bounded lymphocytes and presented as mean±SD of three separate experiments. *P<0.01 compared with control of normoxic culture. **P<0.01 compared with hypoxic culture condition (H+PTDC: hypoxic culture with treatment of PDTC an hour before hypoxic stimuli).

(lane 3) 저산소증에 의한 NF-κB의 활성화가 억제되었다(Fig. 5).

활막 섬유모세포와 림프구와의 유착반응. 림프구와의 유착반응을 colloidin blue로 염색을 한 후에 광학현미경으로 관찰하여 본 결과, normoxic condition에서 배양한 활막 섬유모세포에 비하여 저산소증 자극 시에 활막 섬유모세포에 보다 많은 수의 림프구가 결합하였으며, PDTC로 전처치를 한 경우에는 결합한 림프구의 수가 감소하였다(data not shown). 또한, BCECF-AM을 이용하여 유착반응을 조사한 결과에서도 저산소증에 의한 자극을 받은 활막 섬유모세포에 보다 많은 수의 림프구가 결합하고 있었으며(P<0.01), PDTC로 전처치를 한 경우에는 이러한 활막 섬유모세포와 림프구 간의 유착반응에 의한 결합이 유의하게 감소하였다(P<0.01, Fig. 6).

고 찰

Reactive oxygen species (ROS)는 세포의 유착을 조절

하는 데 중요한 역할을 하며(3,4), ICAM-1, VCAM-1 등의 유착분자의 전사과정에서 reduction-oxidation (redox)에 반응하는 NF-κB의 활성화와 관련되는 것으로 알려져 있다(5,6). 이러한 전사인자의 활성화는 NAC (N-acetyl cystein), PDTC 등의 항산화제에 의해 억제되므로(15), 항산화제는 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서 유착분자의 발현과 유착반응에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

류마티스 관절염은 활막의 저산소증과 이로 인해 생성되는 reactive oxygen radical이 염증반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 활막의 내피세포와 염증세포간의 유착반응에 대한 연구는 많았지만(20-22), 활막 조직에서 혈관 외의 누출된 염증세포와 섬유모세포 간의 상호반응에 미치는 영향에 대해서는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 이전의 보고(19)와 같이 류마티스 관절염 환자의 활막 섬유모세포에는 normoxic condition에서 ICAM-1을 발현하며, 저산소증에 노출하였을 때는

ICAM-1의 발현이 증가하고, 항산화제에 의해서 저산소증에 의한 ICAM-1의 발현의 증가가 억제되는 것이 관찰되었다. 이러한 억제 정도는 normoxic condition에서 배양한 경우보다는 증가한 소견을 보여, ICAM-1의 발현에 억제 효과를 미치는 데 필요한 PDTC의 용량이 부족하거나 또는 PDTC로 억제되지 않는 다른 기전이 있을 것으로 보인다. Normoxic condition에서 류마티스 관절염 환자의 활막 섬유모세포에서 시간에 따른 ICAM-1의 발현의 변화를 고려하면(23), 활막의 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서 ICAM-1의 발현의 증가는 류마티스 관절염에서 저산소증이 활막조직에서 활막 섬유모세포와 염증세포 간의 상호반응을 일으켜 염증반응의 지속에 관련될 수 있음을 확인해 주는 결과이며, 항산화제에 의한 억제 효과는 류마티스 관절염의 치료에 이용될 수 있을 것으로 보이나, 이에 대해서는 보다 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

항산화제의 세포에서 유착분자의 발현에 미치는 효과에 대한 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 비록 항산화제는 저산소증에 의한 ROS의 생성의 감소와 이로 인한 유착분자 발현 증가의 억제가 중요한 기전으로 생각할 수 있으나, 다른 종류의 작용기전이 작용할 수 있다(4). 저산소증은 직접 유전자의 전사에 관여할 수 있는 것으로 알려져 있으며, NF- κ B의 억제제인 I κ B를 인산화하여 세포내의 전사인자인 NF- κ B를 직접 활성화시키는 것으로 알려졌다(24,25). 활성화된 NF- κ B는 다른 종류의 전사 활성인자와 함께 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 등의 유착분자의 발현을 조절할 수 있다(25).

본 연구에서는 활막 섬유모세포를 3시간 동안 저산소증 상태에서 배양하였을 때, NF- κ B가 활성화되는 것을 관찰할 수 있었고, 활막 섬유모세포의 배양 상층액에 I κ B의 인산화를 억제하여 NF- κ B로부터 I κ B의 분리를 억제하는 것으로 알려져 있는(26), PDTC (100 μ M)를 전처리 한 경우에 저산소증에 의한 NF- κ B의 활성화가 억제되었다. 이는 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1의 발현이 NF- κ B의 활성화를 통하여 일어나는 것임을 알 수 있고, 항산화제인 PDTC가 저산소증에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1의 발현을 억제하는 기전으로는 NF- κ B의 활성화를 직접 억제하는 것과 저산소증에 의한 ROS의 생성과 관련된 항산화제 효과가 중요한 기전으로 작용할 수 있을 것으로 보인다. 이러한 연구 결과는 저산소증에 의한 ROS의 생성이 cytokines, MHC 항원, 유착분자(27,28) 및 VEGF의 발현(29)과 관련되는 NF- κ B와 류마티스 관절염에서 관절 조직의 파괴에 중요한 matrix metalloproteinases의 발현과 관련된 AP-1 (activation protein-1)의 oxidative induction을 일으킬 수 있다는 보고(30)를 뒷받침해 준다.

류마티스 관절염은 조직학적으로 활막세포의 증식에

의한 활막의 비후와 활막에 염증세포가 광범위하게 침착하는 것이 중요한 특징이다(7). 활막에 염증세포가 침착하는 데는 혈관의 내피세포와의 유착반응을 통해 혈관 밖으로 누출과정과 이 후에는 활막에 존재하는 활막 섬유모세포와의 상호반응이 중요한 역할을 한다. 활막 섬유모세포는 유착분자의 발현에 관련되는 IL-1, TNF- α , IL-6 등(31-34) 이외에 collagenase, PGE₂ 및 다른 염증 매개물질을 분비하여 류마티스 관절염의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(35,36). 저산소증은 유착분자의 발현에 영향을 줄 수 있는 IL-1, IFN- γ , TNF- α 등을 분비시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(21,32,33, 37,38). 따라서, 저산소증은 활막 섬유모세포를 자극하여 여러 가지 cytokines을 분비시킬 수 있고 이는 ICAM-1의 발현에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 활막 섬유모세포에서 유착분자의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진(23,39) IL-1 β , TNF- α 가 저산소증의 자극에 따라 변화하는지 여부를 알기 위하여 배양 상층액에서 측정하였다.

저산소증은 활막 섬유모세포에서 IL-1 β , TNF- α 의 분비를 증가시켰으며, PDTC를 전처리한 경우에는 IL-1 β 과 TNF- α 의 증가 정도가 감소하였다. 이는 저산소증에 의한 ICAM-1의 발현 증가에 IL-1 β , TNF- α 이 autocrine effect를 주었을 것으로 보인다. 그러나, 동일한 양의 PDTC (100 μ M)로 전처리를 하였을 때, ICAM-1의 발현이 대조군과 같은 정도로 감소한 데 비하여, IL-1 β , TNF- α 의 감소가 적은 것을 고려하면, 저산소증에 의한 ICAM-1의 발현에 cytokines의 효과가 부분적으로 관련되리라 생각된다. 이에 대해서는 IL-1 β , TNF- α 등에 대한 단일클론 항체를 이용하여 cytokines이 ICAM-1의 발현에 미치는 영향에 대해서는 알아볼 필요가 있다.

류마티스 관절염의 병인에서 염증반응의 지속에는 활막 섬유모세포와 염증세포 간의 상호반응이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다(40,41). 본 연구에서는 저산소증에 의한 자극과 항산화제의 처리에 의한 활막 섬유모세포에서의 ICAM-1의 발현의 변화가 류마티스 관절염의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 림프구와의 유착반응과 관련성이 있는가를 확인하고자 하였다. 저산소증 상태에서 배양한 활막 섬유모세포는 PMA로 자극한 림프구와의 유착반응에 의한 결합이 증가하고, 항산화제의 전처리는 유착반응을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 활막 섬유모세포에서 항산화제에 의해 ICAM-1의 발현과 IL-1 β , TNF- α 의 생성의 감소에 의한 것으로 보인다. 이러한 결과는 활막조직에서 저산소증은 활막 섬유모세포와 혈관으로부터 누출된 염증세포와의 유착반응을 통해 염증세포의 침착에 관련되며, 이는 류마티스 관절염에서 염증반응을 지속시키는 중요한 역할을 할 수 있고, 항산화제는 이러한 염증반응

과정을 억제할 수 있음을 간접적으로 증명해 주는 결과로 보인다.

항산화제인 PDTC, NAC, α -lipoate 등은 TNF- α , IL-1 β , PMA와 hydrogen peroxide에 의한 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다(42). 또한, ROS의 생성이나 역할을 억제할 수 있는 melatonin (43), vitamin E-like antioxidant (44), superoxide dismutase (SOD) mimetic (45), peroxynitrite decomposition catalyst (46) 등이 류마티스 관절염의 동물모델인 CIA (collagen-induced arthritis)에서 효과를 보이는 것으로 보고되었다. 항산화제의 ROS의 생성과 역할을 억제할 수 있는 효과와 유착분자의 발현과 관련된 기전에 미치는 영향 등은 이전에 보고된 동물모델을 이용한 실험에서 항산화제의 효과의 중요한 기전으로서 작용할 수 있을 것으로 보인다.

결론적으로, 항산화제는 저산소증에 의한 활막 섬유모세포의 ICAM-1의 발현을 억제할 수 있으며, 여기에는 ROS의 생성과 관련되어 NF- κ B의 활성화에 영향을 통해서 일어나는 것으로 보인다. 저산소증은 혈관 내피세포와 염증세포 간의 상호반응으로 염증세포의 누출과정에 중요하며, 또한 활막 섬유모세포에서도 유착분자의 발현을 통해 활막 섬유모세포와 염증세포간의 유착반응을 일으켜 염증세포의 침착을 통해 염증의 지속에 중요한 역할을 하며, 항산화제는 이러한 과정을 억제할 수 있음을 간접적으로 증명해 주고 있다. 이와 같이 저산소증은 류마티스 관절염에서 면역성 염증반응에 영향을 주어 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 항산화제를 이용하여 저산소증과 관련된 염증과정을 조절할 수 있는 방법이 류마티스 관절염의 치료의 한 방법으로서 이용될 수 있을 것으로 보이나 이에 대해서는 연구가 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN: Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41;1258-1265, 1998
- Allen RE, Blake DR, Nazhat NB, Jones P: Superoxide radical generation by inflamed human synovium after hypoxia. *Lancet* 2;282-283, 1989
- Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C: Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 83;2669-2677, 1994
- Lakshminarayanan V, Beno DW, Costa RH, Roebuck KA: Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 272; 32910-32918, 1997
- Voraberger G, Schafer R, Stratowa C: Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* 147;2777-2786, 1991
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92; 1866-1874, 1993
- Keyszer GM, Heer AH, Gay S: Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells* 12; 75-86, 1994
- Gay S, Gay RE, Koopman WJ: Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 52;Suppl 1: S39-47, 1993
- Harris ED Jr: Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 322;1277-1289, 1990
- Sewell KL: Immunotherapy and other novel therapies, including biologic response modifiers, apheresis, and dietary modifications. *Curr Opin Rheumatol* 5;293-298, 1993
- Kunkel SL, Lukacs N, Kasama T, Strieter RM: The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J Leukoc Biol* 59;6-12, 1996
- Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC: Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation. *J Appl Physiol* 87;1734-1740, 1999
- Cepinskas G, Lush CW, Kviety PR: Anoxia/reoxygenation-induced tolerance with respect to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured endothelial cells. A nuclear factor-kappa B-mediated phenomenon. *Circ Res* 84;103-112, 1999
- Arnould T, Michiels C, Remacle J: Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *Am J Physiol* 264;1102-1110, 1993
- Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10;709-720, 1996
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31;315-324, 1988
- Matsuoka N, Eguchi K, Kawakami A, Ida H, Na-

- kashima M, Sakai M, Terada K, Inoue S, Kawabe Y, Kurata A, et al: Phenotypic characteristics of T cells interacted with synovial cells. *J Rheumatol* 18;1137-1142, 1991
18. Rosengard BR, Cochrane DE: Complement-mediated cytotoxicity: A quick, simple method for determining levels of immunoglobulin E bound to mast cells. *J Histochem Cytochem* 131;441-444, 1983
 19. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE: Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147;2913-2921, 1991
 20. Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K: In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 6;281-290, 1999
 21. Szekanecz Z, Szegedi G, Koch AE. Cellular adhesion molecules in rheumatoid arthritis: regulation by cytokines and possible clinical importance. *J Invest Med* 44;124-135, 1996
 22. To SS, Newman PM, Hyland VJ, Robinson BG, Schrieber L: Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro. *Arthritis Rheum* 39;467-477, 1996
 23. Chin JE, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME: Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 33;1776-1786, 1990
 24. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, et al: Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 93;1564-1570, 1994
 25. Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ: Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 54;1425-1430, 1994
 26. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA: Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 175;1181-1194, 1992
 27. Baeuerle PA, Baltimore D: Baltimore. The physiology of NF- κ B transcription factor. In *molecular Aspects of Cellular Regulation*. Vol. 6. The Hormonal Control of Gene Transcription. P Cohen & JG Foulkes, Eds 423-446, 1991
 28. Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC: Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267;16323-16329, 1992
 29. Jackson JR, Minton JA, Ho ML, Wei N, Winkler JD: Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J Rheumatol* 24;1253-1259, 1997
 30. Karin M: Signal transduction and gene control. *Curr Opin Cell Biol* 3;467-473, 1991
 31. Lindsley HB, Smith DD, Davis LS, Koch AE, Lipsky PE: Regulation of the expression of adhesion molecules by human synoviocytes. *Semin Arthritis Rheum* 21;330-334, 1992
 32. Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM, Blue ML: Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol* 54;399-406, 1993
 33. Hale LP, Martin ME, McCollum DE, Nunley JA, Springer TA, Singer KH, Haynes BF: Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment. *Arthritis Rheum* 32;22-30, 1989
 34. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 4;754-759, 1992
 35. Arend WP, Malyak M, Bigler CF, Smith MF Jr, Janson RW: The biological role of naturally-occurring cytokine inhibitors. *Br J Rheumatol* 30 (Suppl 2);49-52, 1991
 36. Dayer JM: Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. *J Clin Invest* 104;1337-1339, 1999
 37. Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J, Wolitzky BA, Norton C, Plocinski J, Benjamin W, et al: Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J Clin Invest* 90;2333-2339, 1992
 38. Ala Y, Palluy O, Favero J, Bonne C, Modat G, Dornand J: Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelial cells to promote interleukin-1 and interleukin-6 production. Effects of free radical scavengers. *Agents Actions* 37;134-139, 1992
 39. Wicks IP, Leizer T, Wawryk SO, Novotny JR, Hamilton J, Vitti G, Boyd AW: The effect of cytokines on the expression of MHC antigens and ICAM-1 by normal and transformed synoviocytes. *Autoimmunity* 12;13-19, 1992
 40. Haynes BF, Grover BJ, Whichard LP, Hale LP, Nunley JA, McCollum DE, Singer KH: Synovial microenvironment-T cell interactions. Human T cells bind to fibroblast-like synovial cells in vitro. *Arthritis Rheum* 31;947-955, 1988

41. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH: The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35;729-735, 1992
 42. Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10;709-720, 1996
 43. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C: Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 23;106-116, 1997
 44. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP: Beneficial effects of raxofelast (IRFI 016), a new hydrophilic vitamin E-like antioxidant, in carrageenan-induced pleurisy. *Br J Pharmacol* 126;407-414, 1999
 45. Oyanagui Y: Nitric oxide and superoxide radical are involved in both initiation and development of adjuvant arthritis in rats. *Life Sci* 54;285-289, 1994
 46. Salvemini D, Wang ZQ, Stern MK, Currie MG, Misko TP: Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 95; 2659-2663, 1998
-