

Luciferase reporter gene assay를 이용하는 丹蔘추출물의 소염 및 진통작용에 대한 *in vitro* 연구

이한창 · 염미정 · 김건호 · 한동오 · 조미애 · 심인섭 · 이혜정 · 최강덕¹ · 함대현*

경희대학교 동서의학대학원 침구경락학교실, 1: 국립한경대학교 생물정보통신대학원

In vitro Study of Anti-inflammatory Effects of Salvia Miltiorrhiza Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay

Han Chang Lee, Mi Jung Yeom, Gun Ho Kim, Dong Oh Han, Mei Ai Zhao, In Sop Shim,
Hye Jung Lee, Kang Duk Choi¹, Dae Hyun Hahm*

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,
1: Bio & Information Technology, Hankyong National University

In order to identify the anti-inflammatory and analgesic properties of natural herbal extracts, widely used in the Korean traditional medicine, an *in vitro* screening system was designed using pGL3, a luciferase reporter vector, and the tumor necrosis factor (TNF)- α and cyclooxygenase (COX)-II as target genes. The promoter regions of each gene was generated by PCR using the human chromosome as template DNA, and inserted into pGL3 vector with KpnI and HindIII. The final construct was transfected into human myelomonocytic leukemia cells (U937) that could be differentiated and activated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or lipopolysaccharide (LPS). Using this system, we tested the anti-inflammatory and analgesic effects of several herbal extracts being regarded to have the medicinal effects of diminishing the body heat and complementing Qi. The well-known chemicals of PD98059 and berberine chloride were used as controls of the transcriptional inhibitors of TNF- α and COX-II, respectively. Among them, Salvia miltiorrhiza (Dan-Sam) was found to exhibit the significant medicinal properties of anti-inflammatory and analgesic effects.

Key words : Salvia miltiorrhiza (丹蔘), anti-inflammation, analgesia, luciferase, reporter gene, tumor necrosis factor α , cyclooxygenase II, *in vitro* screening

서 론

생체내의 다양한 조직 세포들이 각기 다른 고유의 기능을 정상적으로 수행하기 위해서는 각 세포 내에서의 유전자 발현에 대한 정량적 조절이 정확하게 이루어져야 하는데 이 같은 조절은 주로 유전자 발현단계 중, chromosome의 DNA가 mRNA로 전환되는 전사(transcription) 과정에서 대부분 결정된다. 전사단계의 유전자의 발현 조절은 해당 유전자의 promoter부분에 대한 외부 특정 신호를 전달하는 cAMP나 각종 steroid hormone 등과 같은 signal molecule들의 작용에 의해 전사가 촉진(activation)되

거나 억제(repression)되는 기전을 통해 이루어지기 때문에 유전자 전사단계는 병인에 관련된 유전자들의 전사를 방해하거나 촉진시킬 수 있는 약물을 발굴하기 위한 최적의 표적이 될 수 있다.²⁾ 실제로 미국 식품의약품 안전국 (FDA)의 허가를 받아 전 세계적으로 판매중인 50여 개의 의약품 가운데 10%이상이 유전자 전사단계를 target으로 하고 있으며 대표적 진통제인 아스피린TM이나 타이레놀TM의 주성분인 salicylate 등이 여기에 포함된다. 따라서 청열사화의 한의학적 약리기능을 갖거나 동통치료의 효과가 뛰어난 한방소재를 중심으로 염증과 통증에 관련된 생체 유전자의 발현조절 효과가 있는지를 검증할 수 있는 *in vitro* 분석 시스템을 개발한다면 뛰어난 염증 치료효과를 갖는 한방제제의 광범위한 스크리닝이 가능하기 때문에 그 약리적 우수성을 과학적, 객관적으로 제시할 수 있으며 다양한 한방 천연물 소재

* 교신저자 : 함대현, 경기 용인시 기흥읍 서천리 1 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : dhhahm@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2176
· 접수 : 2004/03/09 · 수정 : 2004/04/10 · 채택 : 2004/05/14

로부터 류마티스 관절염과 같은 염증성 만성질환을 치료할 수 있는 효과적인 신약을 발굴할 수 있는 1차 스크리닝용 기반기술을 확보할 수 있다고 사료된다.

본 연구의 target 유전자로는 inflammation의 유발에 관여하는 생체신호전달물질인 TNF- α 와 체열 및 통증 유발의 매개체인 prostaglandin (PG) 합성에 관여하는 cyclooxygenase (COX)-II를 선정하였고 이 두 유전자의 transcriptional activity를 정량적으로 측정하기 위하여 실험적 분석이 용이한 luciferase 유전자를 각 promoter의 말단에 연결하여 최종 분석시스템을 구축하였다. 사용된 한방소재는 열탕 추출 후 동결건조과정을 거쳐 분말형태로 제조된 한약재를 수용액상으로 만들어 일정량 사용하였다.

또한 상기 두 유전자는 대표적 염증성 관절질환 (inflammatory arthritis)의 하나인 류마티스 관절염의 병증 유발에 결정적인 역할을 하는 cytokine으로서 다국적 제약기업을 중심으로 이루어지고 있는 관절염 치료용 바이오 신약 개발의 주요 target이기도 하다. 따라서 두 유전자의 전사를 효과적으로 방해하는 한방소재가 발굴된다면 염증성 류마티스 관절염에 대한 치료제로서도 사용될 수 있다. 류마티스 관절염은 관절의 활액조직 내의 만성 염증반응과 관절조직의 파괴를 일으키는 자가 면역질환의 일종으로 그 유발 원인은 아직까지 정확하게 규명되지 않았으나, 어떤 항원 물질에 대한 생체 면역 반응 결과 생산되는 cytokine을 비롯한 주요 면역 반응 매개 물질이 관여하여 지속적인 염증 반응을 나타냄으로써 연골이 손상되고 뼈의 손상을 가져와 관절 기능을 제대로 할 수 없게 되는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵⁾ 특히 류마티스 관절 내의 활액조직의 증식과 관절의 파괴 등의 병리학적 기전에는 tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) 등의 proinflammatory cytokine들이 염증반응 및 관절의 손상에 주요 역할을 하는 것으로 보고 되어있고 실제로 류마티스 관절염이 유발된 환자들의 관절 부위에서 많이 발견된다.⁶⁾ 또한 염증이 있는 곳에는 prostaglandin이라는 지질성분이 다량으로 합성된다. 이 prostaglandin은 면역반응에 중요한 역할을 하는 매개체로 알려져 있으며, 세포내에 있는 arachidonic acid로부터 합성되고, 이 합성과정에는 cyclooxygenase-II (COX-II) 효소가 선택적으로 관여하고 있다.^{7,8)} 현재 류마티스 관절염에 대한 보편적인 약물 치료제로는 비스테로이드성 소염제(NSAID)와 면역억제제기능의 항류마티스 약제 등이 있다. 비록 이러한 약물의 이용은 통증을 완화시키고 염증을 억제하며 관절의 기능 소실을 최소화하는 효과를 나타내고 있으나 여러 장기의 기능 저하, 우울증, 세균감염 등의 부작용이 발생한다고 알려져 있다.^{10,11)} 따라서 한약재와 같은 천연소재로부터 치료제를 발굴할 경우 부작용이 적고 안전성이 높은 효과적인 류마티스 관절염 치료제의 개발이 가능하리라 예상된다.

본 연구에서는 류마티스 관절염 등과 같은 급, 만성 염증성 질환 치료에 사용될 효과적인 한방소재의 개발을 위해, 단삼을 중심으로 수종의 한방소재에 대한 TNF- α 와 COX-2 유전자의 mRNA 전사효율을 측정할 수 있는 in vitro assay system을 제작하고, 이를 통해 항염 및 진통의 약리작용을 갖는 한방 천연물

소재의 탐색 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 약재

세포실험에 사용한 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), LPS (lipopolysaccharide from *Escheichia coli*), PD98059, berberine chloride 등의 시약은 Sigma-Aldrich사의 제품을 구입하였고 (St Louis, MO, USA), pGL3-basic vector는 Promega사의 제품을 사용하였다. 단삼 (*Salvia miltiorrhiza*, SM), 도인 (*Prunus persica* Batsch, PP), 황기 (*Astragalus membranaceus*, AM), 우슬 (*Achyranthes bidentata*, AB) 등의 약재는 경희대 서울캠퍼스 근처의 약원 한약국에서 구입하여 정해진 protocol에 따라 열탕 추출하여 사용하였다.

2. 세포배양

본 실험에 사용한 세포주는 human leukemia monocyte의 일종인 U-937 cell로서 서울대학교 의과대학 부설, (사)한국 세포주은행으로부터 구입하였으며 세포배양은 RPMI1640 최소배지 (Gibco Ltd., UK)에 10%(v/v) fetal bovine serum과 penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml 등의 항생제를 첨가하여 만든 복합혈청배지를 사용하였고 37 $^{\circ}$ C의 온도와 5%의 CO₂ 농도를 유지하는 세포 배양기에서 수행하였다.

3. 관련 유전자 발현 변화 양상의 측정 (RT-PCR분석)

2 μ g의 total RNA를 65 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 denaturation시킨 후, 200U moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL, MD, USA)를 이용하여 최종 부피가 20 μ l인 반응 혼합액에서 9-mer의 random primer (Bioneer Co., Korea)에 대한 역전사 반응을 수행하여 cDNA library mixture를 얻었다. PCR은 cDNA를 template로 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5U Taq polymerase (TaKaRa Co., Shiga, Japan)를 포함하는 20 μ l의 반응 혼합액에 각각의 primer set (0.4 mM)를 첨가하여 수행하였으며 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, MA, USA)를 사용하였다, 각각의 primer set는 Genbank에 등록된 유전자 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였다 (Table 1).

증폭된 DNA는 1.0% agarose gel에서 전기영동한 후, EtBr 염색으로 확인하였다. gel 상의 band intensity는 ImageMaster TotalLabTM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 정량 분석하였고 내부 표준 유전자로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하여 각 유전자의 정량적 발현 수준을 보정하였다.

4. Plasmid 제작

TNF- α 와 COX-2 promoter는 말단부분에 제한효소인 *Kpn*I과 *Hind*III를 포함시켜 디자인한 각각의 primer와 human chromosomal DNA를 template로 사용하여 PCR로 증폭시켰다

(Table 1).

Table 1. Primer sequences and PCR product sizes.

Name	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Product size(bp)
human TNF- α promoter	F-CACGGAGGTACCTGCACCCTCGATGAAGC R-GTGTGCCAAAAGCTTCCTTTATATGTCCCTGGG	1,287
human COX-2 promoter	F-GGCAGATGGTACCTTCTAGAAATTCATC R-CCGAATAGAGAAGCTTCGTGACTTGG	7,270
human GAPDH	R-ATCCCATCACCATCTCCAG R-CCTGCTCACCACCTTCTTG	579
human TNF- α	F-CCTCAACCTCTTCTGGCTCA R-CTGGGCTCCGTGTCTCAA	344
human COX-2	F-CATCTTTGCCAGCACITC R-TACTCTGTGTGTTCCCGCA	341

각각의 PCR product들은 pGL3-basic vector (Promega Co., Madison, WI)에 subcloning하여 TNF- α 와 COX-2 promoter에 의해 luciferase의 발현이 조절될 수 있도록 제작하였다 (Fig. 1).

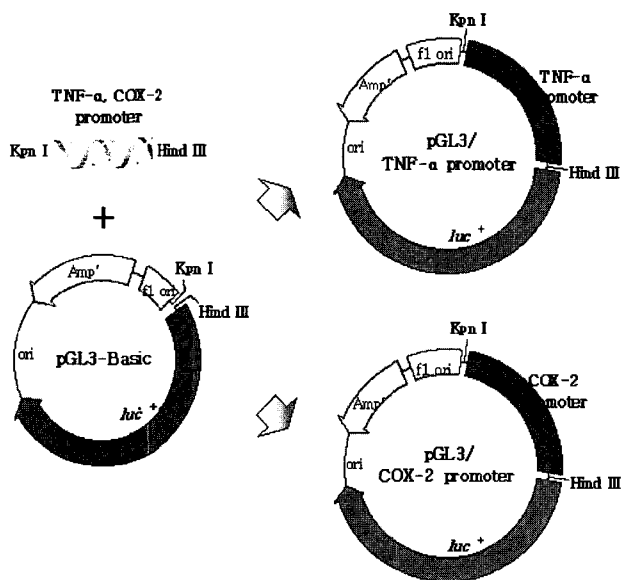


Fig. 1. The reporter vector construction by splicing the promoter regions of TNF- α and COX-2 to luciferase gene. The TNF- α and COX-2 promoters were generated by PCR and subcloned into the pGL3-basic vector.

5. Transient transfection과 luciferase assay

Fig. 2.에서와 같이 제작된 luciferase reporter vector는 U-937세포에 주입되어 형질전환 시키는데 사용되는데 이때 transient transfection방법을 사용하였다. Effectene™ (Qiagen Co., Valencia, CA) kit를 이용하여, 제조된 reporter vector 2 μ g과 transfection control vector로서 pSV β -galactosidase vector (Promega Co., Madison, WI) 1 μ g을 잘 섞은 후, 5 X 10⁶개의 U-937 cell에 co-transfection 하였다. PMA-induced 염증모델의 경우, transfection된 세포들은 24시간 후 PBS (phosphate buffered saline)로 세척되었고 각 한약재들과 PD98059, berberine chloride 또는 배지만을 포함하고 있는 12well plate에 1 X 10⁵ 개씩 split 되었다. 2시간 후, 각 well 마다 25nM의 PMA를 처리하여 염증반응이 유발되었고, 24시간 후 각각의 lysate를 얻었다.

LPS-induced 염증모델의 경우, transfection된 세포들은 24시간 후 PBS로 세척되었고 25nM의 PMA가 포함된 12well plate에 1 X 10⁵ 개씩 split 되었다. 24시간 후 각 well에는 일정 양의 한약재들과, PD98059, berberine chloride 또는 같은 양의 PBS가 첨가되었고, 두 시간 후, 각 well 마다 5 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 염증반응을 유발 하였다. 염증반응 유발 24시간 후 각 lysate를 얻었고 Luciferase activity는 Luciferase Reporter Assay System™ (Promega Co., Madison, WI) kit와 을 사용하여 측정 하였다. data의 normalization은 동일한 lysate로 β -galactosidase assay를 통해 이루어졌다.

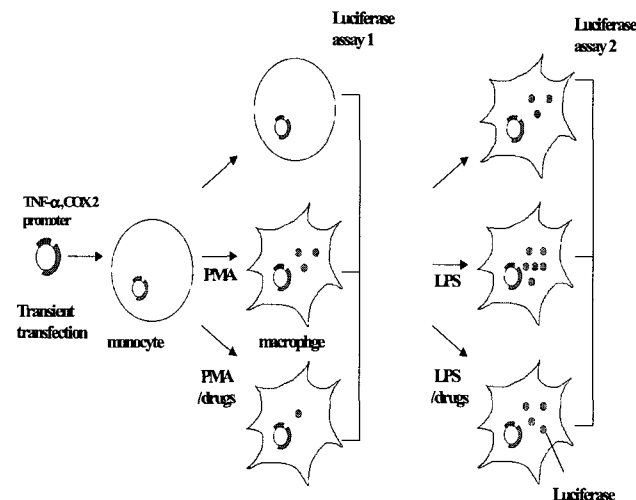


Fig. 2. Schematic diagram of luciferase reporter assay procedure.

6. MTT assay

U-937 세포에 대한 단삼의 독성 여부는 세포 활성 측정법인 MTT assay를 이용하여 수행하였다. U-937 세포는 96 well plate에 1X10⁴ cells/well 씩 split 되었고, 24시간 후 각각 0, 0.01, 0.1, 0.5 mg/ml의 농도로 단삼을 처리하였다. 24시간 후 PBS에 5mg/ml로 녹여진 MTT가 well당 10 μ l씩 첨가되었고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 더 배양되어 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 시 plate는 450g로 5분간 원심분리 후 상층액이 제거되었고 100 μ l의 0.04N HCl이 첨가된 후, 10분간 가볍게 진탕해 주었다. 흡광도는 Emax™ ELISA reader (Molecular Devices Co., USA)로 540nm에서 측정되었다. PMA에 의해 분화된 U-937 세포에 대한 단삼의 독성 여부는 세포를 25nM의 PMA로 24시간 분화를 시킨 후 위와 같은 방법으로 측정되었다.

결 과

1. RT-PCR을 이용한 U-937 세포에서의 TNF- α 와 COX-2 mRNA 발현 분석

TNF- α 와 COX-2 등의 유전자는 lipopolysaccharides (LPS) 와 같은 다양한 염증 유발물질들의 자극에 의해 발현된다.¹⁴⁾ U-937 세포는 대식세포(macrophage)의 일종으로 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 같은 다양한 시약들을 이용하

여 전단구 세포에서 단구세포로 분화시킬 수 있다. 일반적으로 U-937 세포에서 TNF- α 와 COX-2 mRNA는 PMA등에 의해 분화되지 않은 상태에서 LPS에 의해서 만든 발현되지 않는다는 실험 결과가 보고된바 있다.^{14,15)} 이와 같은 기존의 연구들을 바탕으로 본 실험에서는 U-937 세포의 분화에는 PMA를, TNF- α 와 COX-2 promoter의 inducer로는 LPS를 사용하여 염증모델을 제작하기로 하였다. 그러나 이와는 별도로 PMA 자체가 TNF- α promoter의 강력한 induction 신호로도 작용한다는 연구결과와, 세포의 분화가 이루어지지 않은 상태에서 LPS 만으로도 TNF- α promoter가 induction 된다는 연구결과 등도 보고된 바 있으며 두 물질에 대한 염증유발 기전이 서로 상이한 것으로 알려져 있다.^{16,17)} 따라서 본 연구에서는 PMA의 단독처리에 의한 분화 및 유전자 induction을 동시에 조성한 경우와 PMA로 분화시킨 후, LPS로 induction시킨 경우의 두 가지 방법으로 접근하였다. 실험에 앞서, 본 실험에 사용될 U-937세포의 자체 TNF- α 와 COX-2의 두 유전자가 PMA와 LPS에 의해 각각 어떤 양상으로 induction되는가를 확인 위해 RT-PCR 분석법을 통한 검증실험을 실시하였다.

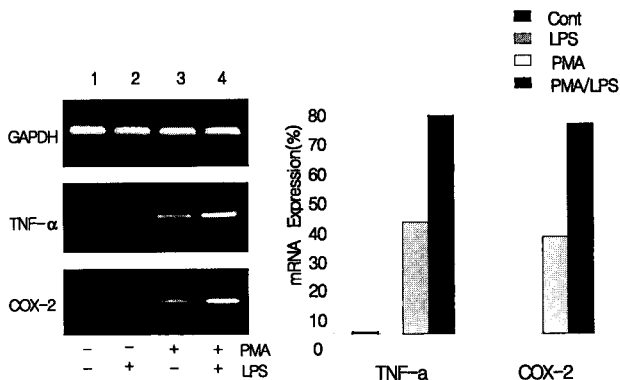


Fig. 3. RT-PCR Analyses of TNF- α and COX-2 in U-937 cells. Non-treated group (Cont), lane 1; LPS-treated group (LPS), lane 2; PMA-treated group (PMA), lane 3; PMA and LPS-treated group (PMA/LPS), lane 4. Each PCR product was normalized to GAPDH. The observed bands were correlated with the predicted size for GAPDH (579bp), TNF- α (344bp) and COX-2 (347bp).

Fig. 3에서 보는바와 같이 U-937 세포에서의 전체적인 TNF- α 와 COX-2 mRNA 발현 양상은 유사하였다. 대조군과 LPS만 처리한 세포의 경우 각 mRNA의 발현은 거의 볼 수 없었고, PMA만 처리한 세포에서는 약 40%, PMA로 분화시킨 후 LPS로 자극을 주었을 경우 약 75%의 TNF- α 와 COX-2 mRNA가 각각 발현되었다. 이 결과를 분석해 볼 때 U-937 세포는 PMA에 의해 염증반응이 유발되고, PMA로 분화한 이후에도 LPS로 자극을 주었을 때 추가적인 염증반응이 유발되는 것을 알 수 있었다.

2. Luciferase reporter assay를 이용한 한약재들의 염증 억제 효과 분석

제조된 각각의 vector로 transient transfection된 U-937 세포에서의 TNF- α 와 COX-2 promoter의 활성은 luciferase assay를 통해 측정되었다. 실험에 사용된 한약재들은 도인 (*Prunus persica*), 우슬 (*Achyranthes bidentata*), 황금 (*Scutellaria*

baicalensis), 황기 (*Astragalus membranaceus*, AM), 및 단삼 (*Salvia miltiorrhiza*) 등의 열탕 추출물들이 사용되었으며, PMA 또는 LPS에 의해 활성화되는 TNF- α 와 COX-2 promoter들이 각각의 약제들에 의해 얼마나 억제되는지의 효과를 측정하였다. 실험에 사용된 약제들은 한의학을 기초로 하여 관절염과 염증, 통증 치료에 효과가 있다고 알려져 있는 한약재들을 중심으로 선정하였고, 양성 대조군으로는 PD98059 (TNF- α 의 전사 억제인자)와 berberine chloride (COX-2의 전사 억제인자, 황련 또는 황백의 주요 약리성분)가 사용되었다.

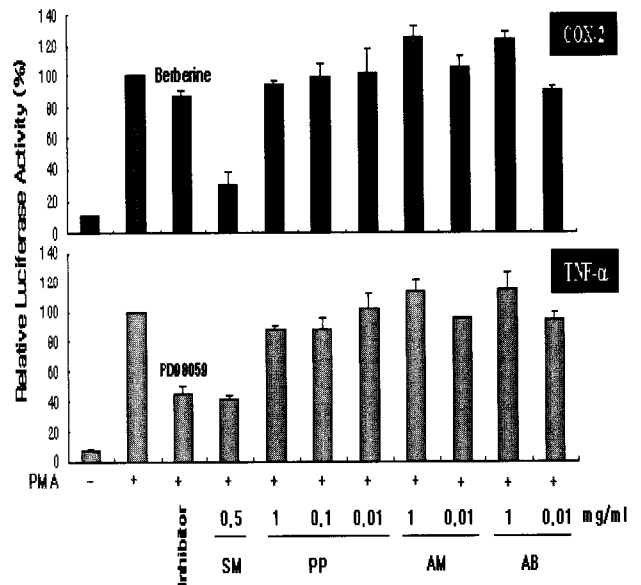


Fig. 4. Inhibitory effects of herbal extracts on PMA-induced inflammation. Transcriptional activities of TNF- α and COX-2 promoter in U-937 cells were assessed by measuring luciferase activities. Data were normalized by β -galactosidase assay. PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SM, *Salvia miltiorrhiza*; PP, *Prunus persica*; AM, *Astragalus membranaceus*; AB, *Achyranthes bidentata*. Data were presented as mean \pm SEM.

Fig. 4, 5에서와 같이, 단삼을 제외한 나머지 한약재들은 PMA와 LPS에 의해 유발된 TNF- α 와 COX-2 promoter의 활성을 억제하지 못하거나 오히려 증가시키는 것을 볼 수 있었지만, 단삼을 처리한 군에서는 그 활성이 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. PMA에 의한 단독 효과로 U-937세포의 분화와 염증반응을 동시에 일으킨 경우(Fig. 4), U-937세포의 분화되지 않은 정상 세포는 luciferase 활성이 거의 감지되지 않았으나 PMA 처리 세포의 경우, 약 10배 수준의 luciferase 활성 증가를 확인하였다.

본 실험의 positive control로 사용한 PD98059 화합물의 경우 TNF- α 의 promoter 활성(luciferase의 역가로 표현됨)을 약 50% 저해하는 inhibition 효과를 발휘하였으나 항암, 소염작용이 있다고 알려진 천연추출물인 berberine의 경우에는 COX-II promoter의 활성을 약 10% 정도 inhibition하는데 그쳤다. 하지만 본 실험을 통해 발굴된 단삼의 경우 증류 추출된 천연물임에도 불구하고 PMA에 의해 증가된 두 유전자의 promoter 활성을 약 50%정도 저해하는 강력한 소염, 진통 작용을 보였다. 비교 천연 약물로 사용된 도인, 황기, 우슬 등의 추출물들

은 두 유전자 모두의 promoter 활성화에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

PMA와 LPS를 연속적으로 처리함으로써 분화와 염증반응을 단계적으로 유도한 실험의 경우, Fig. 5에서 보는 바와 같이 LPS에 의한 추가적인 luciferase 활성 증가분이 20%내외로 미약하게 나타났는데 LPS의 경우, 면역세포에 대한 가장 강력한 염증반응을 유도한다고 알려진 antigen의 일종이기 때문에 이 같은 실험 결과는 본 실험에 사용된 U-937세포주가 알 수 없는 요인(사용 배지, 시약 등의 purity, 또는 물리화학적 배양요인)으로 인해 이미 면역학적으로 상당부분 활성화된 상태임을 나타내고 있다. 이 경우 PD98059와 berberine에 의한 transcription inhibition의 효과가 유의성 있게 관찰되었지만 PMA 단독처리에 의한 실험에 비해서 크지 않은 것으로 확인되었다. 하지만 PMA와 LPS를 연속적으로 처리하여 염증반응을 추가적으로 유도한 경우에도 단삼의 소염, 진통 효과는 PD98059와 berberine의 효과에 비해볼 때 상당히 우수한 것으로 확인되었다.

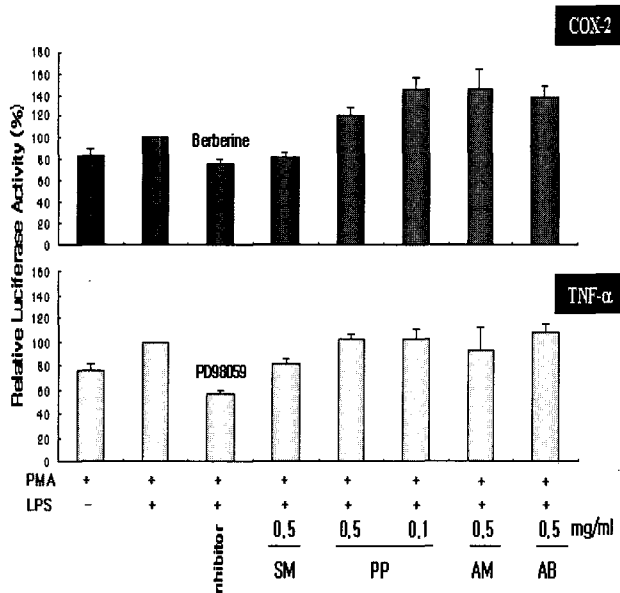


Fig. 5. Inhibitory effects of herbal extracts on LPS-induced inflammation. Transcriptional activities of TNF- α and COX-2 promoter in U-937 cells were assessed by measuring luciferase activities. Data were normalized by β -galactosidase assay. PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; LPS, lipopolysaccharide; SM, *Salvia miltiorrhiza* PP, *Prunus persica* AM, *Astragalus membranaceus* AB, *Achyranthes bidentata*. Data were presented as mean \pm SEM.

3. MTT assay를 이용한 단삼의 세포 독성 측정

U-937세포에서의 TNF- α 와 COX-2 promoter의 활성억제 효과를 보인 단삼이 세포에 어느 정도의 독성을 가지고 있는지 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Fig. 6에서와 같이 U-937 세포에 단삼을 각각 0.01, 0.1, 0.5 mg/ml의 농도로 24시간 처리하였으나, 세포의 생존율이 단삼을 처리하지 않은 군에 비해 크게 감소하지 않은 것을 볼 수 있었다. 이는 PMA에 의해 분화된 세포에서도 같은 결과를 보였다. 결론적으로 단삼 추출물은 세포의 성장을 유의성 있게 저해하거나 촉진시키지 않는 것으로 확인되었다.

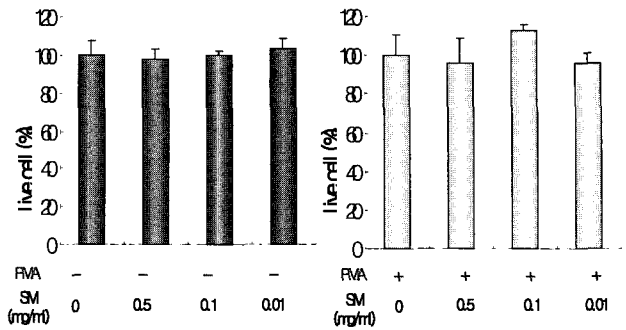


Fig. 6. *Salvia miltiorrhiza* (SM)-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in U937 cells. After cells were differentiated with 100nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) for 24 hours, cells were exposed to 0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml SM for 24 hours. Data were presented as mean \pm SEM.

고찰

류마티스 관절염은 만성 염증성 자가면역질환의 일종으로 활막의 비후와 임파구의 국소적 침윤을 특징으로 하고 동통, 종창, 강직, 발적, 발열, 운동장애 등의 증상을 나타낸다. 류마티스 관절염의 원인은 확실히 규명되지는 않았으나 비정상적으로 활성화된 임파구가 활막에 침윤하여 만성적으로 관절조직을 파괴하며, 이때 활막세포와 침윤된 세포들이 상호 작용을 통해 임파구가 추가적으로 침윤되는 것으로 알려져 있다. 또한 원인불명의 항원이 체내의 항체와 선택적인 결합을 함으로써 자가면역 반응이 일어나 면역세포가 축적되는데, 활막 주위에 활성화된 T-lymphocyte, macrophage, fibroblast, monocyte 등의 침윤이 나타나고, TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 cytokine의 발현이 촉진되어 관절조직을 파괴하는 세포성 면역반응과 함께 B-lymphocyte가 관여하여 immunoglobulin의 합성을 증가시키고 활액내 염증, 관절 조직의 파괴, 관절의 변형과 강직이 나타나게 된다.

또한 염증이 있는 곳에는 prostaglandin이라는 지질성분이 다량으로 합성된다. 이 prostaglandin은 면역반응에 중요한 역할을 하는 매개체로 알려져 있으며, 세포내에 있는 arachidonic acid로부터 합성되고, 이 합성과정에는 cyclooxygenase(COX)가 깊이 관여하고 있다. COX는 COX-1과 COX-2의 두가지 형태로 존재하는데, COX-1은 염증관련 인자에 의해 영향을 받지 않고, 세포주기 내내 일정하게 발현된다고 알려져 있다. 이에 반해 COX-2는 다양한 염증관련 인자들의 자극에 의해 발현양이 증가하게 된다. 따라서 기존의 비스테로이드계 소염진통제와는 달리 COX-2만을 선택적으로 억제하는 치료제 개발이 많이 이루어지고 있다. 류마티스 관절염의 일반적인 치료에는 비스테로이드계 소염진통제, 부신피질 hormone제, IL-1과 IL-2 및 T-lymphocyte의 활성화를 억제하는 세포독성 억제제 또는 면역억제제가 투여되어 왔으나 최근에는 류마티스 관절염의 발생시 중심적 역할을 하는 활성화된 T-lymphocyte와 염증성 cytokine 억제 및 유착분자 억제 등의 방법이 실험적으로나 임상적으로 많이 연구되고 있다. 그러나 관절염 치료에 사용되는 상기 약물들은 많은 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그러므로 류마티스 관절염의 치료법 개발은 효과적인 증상 완화 기능 뿐 아니라 최소 부작용 및

안전성을 요구한다.^{1-8,10,11)}

한의학에서는 痺症, 歷節風, 白虎風, 痛風 등에서 류마티스 관절염과 유사한 증상을 설명하고 있다. 歷節病은 <金匱要略>¹⁸⁾에 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體羸羸 脚腫如脫”이라 하여 그 증상을 묘사하고 있으며, 고대로 歷節風, 白虎病, 白虎歷節風, 類風濕性關節炎 등으로 표현되고 있으며, 최근 중국에서는 類風濕性關節炎으로 표현하고 있는데 이들은 모두 痺症의 범주에 속하는 것이다. 특히 痺症은 <黃帝內經·庫論>¹⁹⁾에 “風寒濕三氣雜至 合而爲痺也 基風勝者爲行痺 寒氣勝者爲痛痺 濕氣勝者爲着痺”라고 하여 風寒濕 外氣가 痺症의 중요한 원인이라고 언급하고 있으며 그 후에 “飲酒汗出後風寒所致”라 하였고, “血氣가 虛한데 風師를 받은 것”이라 보기도 하였으며, “血虛, 風濕, 風熱, 痰飲, 瘀血”로도 보았고, “內因은 血虛有火로, 外因은 風濕生痰”으로 보았고, “氣血本虛, 飲酒, 勞倦犯房”으로 보았다. 즉 류마티스 관절염은 신체의 기혈과 장부가 내허한 상태에서 六淫之邪가 침입하여 담, 화와 어혈을 생성하여 기혈, 관절을 저체(沮滯)하여 기혈 순행이 순조롭지 못하여 발생된다고 설명하며, 그 치료에 있어서 祛風清熱, 利濕, 行氣活血, 補肝腎, 消風經絡 등의 방법을 운용한다고 알려져 있고, 치료 방법으로 약물요법, 구요법 및 약침요법 등을 사용하는 것으로 보고 되고 있다.²⁰⁾

본 실험의 한방제제로 사용한 단삼 (丹蔘, *Salvia miltiorrhiza*)은 꿀풀과 식물로, 그 맛은 쓰고 성질은 약간 따뜻하다. 한의학에서 단삼의 歸經은 心·肝經에 들어가며 藥效로는 혈액 순환을 돕고 어혈을 없애며 마음과 정신을 안정시키고 고통을 뽑아내며 통증을 멎게 하는 효능이 있다. 主治로는 협심증, 월경 불순, 생리통, 무월경, 자궁출혈, 대하증, 적취, 어혈로 인한 복통, 관절통, 驚悸로 인한 불면증, 약창과 종독을 치료한다고 보고 되어있다.²¹⁾ 단삼 이외에 도인, 황백, 우슬, 황금, 황련, 적작약, 위령선 등의 다른 한약재들도 관절염 치료에 효과가 있다고 보고 되고 있다. 그러나 아직까지 이들의 관절염 치료 효능에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있지 못하여, 본 연구에서는 in vitro 상에서 각각의 항염증 효과를 분석하였고, 결과적으로 단삼의 항염증 효과를 증명하고 있다. 또한 세포 독성 측정 결과에서도 단삼이 세포에 독성이 극히 적은 것으로 나타났다.

이상의 결과와 같이 본 연구에서 류마티스 관절염 치료에 사용될 효과적인 한방제제의 발굴을 위해 제작 한, 한약재의 유무에 따른 TNF- α 와 COX-2 mRNA의 전사율을 측정할 수 있는 assay system은 앞으로 염증 관련 질병 치료제 발굴에 있어서 유용하게 사용이 가능할 것으로 예상되며, 이 system을 적용하여 발굴한 단삼은 in vitro 상에서 염증반응을 억제하는 약리작용이 유의성 있게 관찰됨에 따라, 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환 치료에 응용 가능하리라 생각되며, 약침액 등으로의 개발을 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

관절염과 같은 염증성 질환에 효과적인 신규 한방소재를 발굴하기 위하여 in vitro 상에서 TNF- α 와 COX-2 유전자의 전사를

억제할 수 있는 한약재를 탐색한 결과는 다음과 같다.

U-937 세포의 TNF- α 와 COX-2 mRNA는 평소에는 발현되지 않다가 PMA를 처리하여 분화 시켰을 때 발현되었고, 분화된 세포에 LPS를 처리했을 경우 그 발현양은 두 배가량 증가됨을 RT-PCR 분석법을 통해 확인하였다. 대조군과 비교할 때 단삼은 in vitro assay system에서 TNF- α 와 COX-2 mRNA 발현 정도를 유의성 있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 단삼 이외의 다른 한약재들은 TNF- α 와 COX-2 mRNA 발현 양의 감소에 크게 영향을 미치지 못했다. MTT assay 결과 단삼은 U-937 세포에 대한 독성이 거의 없는 것으로 확인되었다.

이상의 결과와 같이 단삼이 in vitro 상에서 염증 및 통증반응을 억제하는 것이 관찰됨에 따라 류마티스 관절염과 같은 염증성 만성질환 치료제로서의 가능성이 제시되었으며, 세포독성도 매우 적어 추출물 자체 혹은 약침용 제제로의 사용이 용이하리라 예상된다. 한편 본 연구에 사용된 screening system은 기타 염증관련 질병 치료제 발굴에 있어서 1차 스크리닝 방법으로 유용하게 사용될 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 (01-PJ9-PG1-01CO01-0003)의 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. Lee YH, Choi SJ, Kim A, Kim CH, Ji JD, Song GG. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in rheumatoid arthritis synovium. J Korean Med Sci. 15: 88-92, 2000.
2. Woods JM, Katschke KJ, Volin MV, Ruth JH, Woodruff DC, Amin MA, Connors MA, Kurata H, Arai K, Haines GK, Kumar P, Koch AE. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. J Immunol. 166(2): 1214-1222, 2001.
3. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain. 90(3): 271-280, 2001.
4. de Hooge AS, van De Loo FA, Arntz OJ, van Den Berg WB. Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. Am J Pathol. 157(6): 2081- 2091, 2000.
5. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 14:397-440, 1996.
6. Lei Bao, Yu Zhu, Adlan M. Elhassan, Qinyang Wu, Baoguo Xiao, Jie Zhu and J. Urban Lindgren. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 β , IL-6 and TNF- α are up-regulated in the spinal cord. Neuroimmunology. 12(18): 3905-3908, 2001.

7. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*, 24: 15-9, 1997.
8. Choi SY, Ha H, Kim KT. Capsaicin inhibits platelet activating factor-induced cytosolic Ca²⁺ increase and superoxide production. *J. Immunol*, 165: 3992-3998, 2000.
9. Cai W, Hu L, Foulkes JG. Transcription-modulating drugs: mechanism and selectivity. *Curr Opin Biotechnol*, 7: 608-615, 1996.
10. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 10(3): 256-262, 1998.
11. Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol*. 37(5): 546-554, 1998.
12. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室 編著 外. 鍼灸學 上, 下. 서울: 集文堂. 1988.
13. 上海中醫學院: 鍼灸學, 香港, 商務印書館, 1982.
14. Inoue H, Tanabe T. Transcriptional role of the nuclear factor kB site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 244:143-148, 1998.
15. Penttinen MA, Holmberg CI, Sistonen L and Granfors K. HLA-B27 Modulates nuclear factor kB activation in human monocytic cells exposed to lipopolysaccharide. *Arthritis Rheum*, 46: 2172-2180, 2002.
16. Rhoades KL, Golub SH, Economou JS. The regulation of the human tumor necrosis factor a promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem*, 261: 22102-22107, 1992.
17. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391:82-86, 1998.
18. 張仲景 : 金匱要略方論, 北京, 人民衛生出版社, 1972.
19. 張馬合註 : 黃帝內經 素問, 臺北, 大聯國風出版社, 1973.
20. 朴鍾國 : 鍼灸治療學. 서울. 集文堂, 1983.
21. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 : 中藥大辭典, 圖書出版 鼎談, 1997.
22. Latchman DS., Transcription factors as potential targets for therapeutic drugs. *Curr Pharm Biotechnol*. 1(1):57-61, 2000.