

계혈등복합방(GC)의 TNF- α 와 IL-1 β 로 유도된 인간 섬유아세포양 활막 세포 활성화 억제 작용

장광호 · 진미림 · 박희옥¹ · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:조선대학교 식품의약학과

Inhibitory Effects of GC, an Extract from Herbs, on TNF- α /IL-1 β -induced Activation of Human Fibroblast-like Sinoviocytes

Kwang Ho Jang, Mirim Jin, Hee Ok Park¹, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University, 1:Department of Food and Drug, Chosun University

Based on traditional medicine theories, GC, an extract from 5 herbs, has been formulated and prescribed for the treatment of human rheumatoid arthritis(hRA) for many years. The present studies was done to investigate whether GC has inhibitory effects on activation of fibroblast-like sinoviocytes isolated from a RA patient. In tumor necrosis factor- α (TNF- α)/ interleukin-1 β (IL-1 β) treated human sinoviocytes, the mRNA expression of molecular indicators related to pathologic changes of the sinoviocytes were examined using quantitative real-time PCR. The treatment of GC(10 μ g/ml) significantly suppressed the expression of proinflammatory cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-6 and IL-8 compared with the control, but not IL-1 β . The mRNA level of intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1) which is known to increase in the activated sinoviocytes of RA patients, was slightly decreased by GC. The expression of NOS-II was considerably reduced, which was accompanied by a decrease in the production of nitric oxide(NO). Furthermore, GC dramatically raised the mRNA levels of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1(TIMP-1), while those of matrix metalloproteinase-3 were significantly lowered. Taken together, these data suggested that GC might suppress the activation of sinoviocytes in hRA.

Key words : GC, hRA, human fibroblast-like sinoviocytes, proinflammatory cytokines, IL-8, ICAM-1, NOS-II, MMP-3, TIMP-1

서 론

한의학에서 류마티드 관절염은 비증의 범주에 속하며, 비증으로 나타나는 통풍, 역절풍, 백허열절풍 및 유평습성관절염 등이 모두 이에 해당된다고 볼 수 있다. 임상 치료법에 대한 최근 보고를 살펴보면 다른 질환과 마찬가지로 변증시치하는 것을 기본으로, 발생 초기에는 주로 표증을 다스리는 거풍습습지제를 다용하고, 중기 이후로는 활혈화어제 또는 정기의 손상 유무와 타 장기의 관련 유무를 고려한 다양한 치료법이 선택되고 있다. 계혈등복합방(GC)은 관절염의 이차적 병리 산물이라고 할 수 있

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2005/08/01 · 수정 : 2005/09/02 · 채택 : 2005/10/04

는 어혈이 심한 통증과 염증에 관여한다는 기존의 임상 및 연구 결과에 준하여 구성된 처방으로 계혈등을 군약으로 적작약, 현호색, 산사육, 희침 등 활혈화어 효능이 있는 약물로 구성되었다.

한편 서양의학적 관점에서 류마티스 관절염(RA)은 여러 관절에 부종 및 동통을 동반하면서 관절 강직 및 변형을 초래하는 자가 면역성 질환이다¹⁾. 전신적으로는 자가 항원에 대한 T세포의 활성화가 특징이지만, 관절 조직의 파괴에는 만성적인 활막 세포의 활성화가 관련되어 있다^{2,3)}. 류마티드 관절염 환자의 관절 활액에서 증가되어 있는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이토카인들이 관절염 진행에 중심적 역할을 하는 것은 잘 알려져 있다⁴⁾. 또한 NO와 같은 염증성 매개 물질의 분비와 활성화된 활막 세포에서 IL-8과 같은 키모카인과 염증세포의 부착에 관여하는 ICAM-1(intracellular adhesion molecules-1)의 발현의 증가

는 T, B 세포 뿐만 아니라 대식세포와 같은 염증 세포의 활막 내로의 이동을 증가 시킨다⁵⁾. 이들은 모두 extracellular matrix를 분해하는 단백 효소인 매트릭스 메탈로프로테이네이즈(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 유도하고 생성을 촉진한다⁶⁾. 정상적인 연골 조직에서는 MMPs와 TIMPs(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase)가 1:1로 결합하여 관절 조직의 항상성을 유지하는데, 관절염 환자의 경우에는 TIMPs에 대한 MMPs의 비율이 증가되고 심한 경우 TIMPs의 생성이 감소되거나 결합력이 약화되어 관절의 파괴가 지속적으로 증가하게 된다⁷⁾.

서⁸⁾는 류마티스 관절염 환자 활막 세포에 대한 계혈등의 면역효과를, 이⁹⁾는 계혈등의 항염 활성 효과를, 윤¹⁰⁾은 현호색, 홍화, 적작약이 관절염 흰쥐의 염증과 간에 미치는 영향을, 조¹¹⁾는 희침이 염증성 사이토카인 및 류마치스양 관절염에 미치는 영향 등을 각각 보고한 바가 있다. 그러나 류마티스염 환자로부터 분리된 활막 세포의 활성화에 대한 계혈등복합방(GC)의 효과는 보고된 바 없다. 계혈등복합방(GC)의 관절염 억제 효과를 분자적 수준에서 조사하기 위하여 TNF- α 와 IL- β 에 의해서 활성화된 인간 섬유아세포양 활막 세포(human fibroblast like synovocyte, hFLS)의 염증성 사이토카인, 키모카인, ICAM-1, NOS-II, MMP-3, 및 TIMP-1등의 발현 변화 정도를 측정할 바, 유의적인 결과를 얻었기에 이에 보고한다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 계혈등복합방(GC)의 구성 약물은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 사용하였고, 처방 1첩(貼)의 내용과 분량은 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Herb composition of GC

韓藥名	생약명	(g)
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	8
赤芍藥	<i>Paeonia Radix Rubra</i>	6
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	6
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
稀 蓂	<i>Siegesbeckiae Herba</i>	8
Total amount		34

2) 시약

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), methotrexate(MTX), trypsin-0.2% EDTA, 3-4,5-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), 2,7-dichloro-dihydrofluoresceindiacetate(DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl₂) 등은 Sigma 사(USA) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide

triphosphate(dNTP)는 TaKaRa 사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 사(Madison, USA) 제품을, RNAzol[®]는 Tel-Test 사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사(Logan, USA) 제품을, DMED은 Gibco 사(Gaithersburg, MD, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen 사(Torreyana, USA) 제품을, 인간 재조합 TNF- α 와 IL-1 β 는 R&D system 사(Minneapolis, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 계혈등복합방(GC) 추출

계혈등복합방(GC)의 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고 이를 감압 추출장치(Rotary evaporator, BuCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDu-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 후, 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 인간 섬유아 세포 Human fibroblast cells(hFCs) 배양

포경 수술 후 얻어진 피부 조직(foreskin)을 작은 조각으로 절단한 다음 corneal tube에 넣어 차가운 D-PBS로 3회(1,400 rpm에서 5분간 원심분리) 세척하였다. 세척한 조직에 DMEM {collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I(0.15 mg/ml, Sigma), 항생제(penicillinm 10⁴ μ /ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μ g/ml) 함유)를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수(PBS)를 가하여 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하여 세포를 얻었다. 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지를 사용하여 1주일 동안 배양한 후, 다시 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 가하여 세포를 얻었다. 이러한 과정을 연속으로 3회 반복하여 최종적으로 살아있는 부착세포를 얻어 DMEM-5 % FBS 배지에서 배양하였다.

3) 인간 섬유아세포양 활막 세포 일차 배양

외과 수술로 적출된 65세의 여성 류마티스양 관절염 환자의 슬관절 조직을 차가운 인산완충식염수(PBS;phosphate buffered saline)에 세척한 후, 가위로 잘게 잘랐다. 조직을 우태아 혈청이 포함되지 않은 차가운 DMEM 배지가 담긴 50ml 원심분리관으로 옮겨 잠시 세워둔 후 지방질과 배양액을 제거하였다. 10 mg의 관절 활막 조직당 1~1.5 mg/ml의 디스페이제(dispase II, grade 11, Boehringer Mannheim, indianapolis, IN, USA)를 포함하는 jolik's MEM을 가해 37℃에 30분간 진탕하여 단일세포 부유액을 얻었다. 상층액을 다른 원심분리관에 옮기고 이와 동량의 5% 우태아 혈청을 포함하는 DMED 배지(Gibco BRL Gaithersburg, MD, USA)를 더해 얼음에 보관하였다. 디스페이즈 처리를 3~4회 반복하면서 같은 방법으로 상층액을 모았다. 상층액 모두를 모아 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하고 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지로 두 번 씻어냈다. 세포의 수를 세고 단핵구 세포만 hapaque 1077(Sigma 사) 용액 위에서 원심

분리한 후 경계층의 세포를 분리하여 15% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 1주일씩 5회 계대하면서 살아있는 부차 세포를 배양하였다.

4) 광학현미경 관찰

광학현미경 관찰을 위해서는 2개의 구획을 가지고 있는 LAB-Tek 조직 배양 슬라이드 (Nunc Inc., Na-perbille, IL, USA)에 세포를 48시간 배양하고, 고정액(2.5 % glutaraldehyde, 0.12M sodium cacodylate buffer, pH 7.3)으로 점차 치환하며 4 °C에서 30분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 광학현미경(Nikon, Japan) 100배에서 관찰하였다.

5) 세포 독성 측정

세포독성 측정은 SRB assay법¹²⁾을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 자란 것을 trysin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 x 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기(37°C, 5 % CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GC(최종 농도 400, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 μ g/ml)를 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50 μ l를 가하여 1 시간 동안 4 °C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 여기에 SRB 용액(1% acetic acid용액의 0.4% 용액) 100 μ l를 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base(100 μ l)로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5 분간 흔들어 주고 ELISA reader(molecular devices, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Quantitative real time RT-PCR

(1) RNA 추출

관절 활막 세포를 24 well plate에 10% FBS를 넣어준 DMEM 배지를 사용하여 2 x 10⁵-5 x 10⁵ 로 각 well에 분주하고 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. FBS를 함유하지 않은 배지에서 12 시간 배양한 후, 각 well에 GC(100, 10 μ g/ml)와 양성대조군으로 MTX(10 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1 β (10 U/ml)와 hrTNF- α (10 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 클로로포름(CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-프로판올(2-propanol) 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % 에탄올로 수세하고 3분간 진공 펌프에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 디에틸피로카보네이트(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 75 °C에서 불활성화 시킨 후 cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g

을 DNase I(10 U/ μ l)를 처리하고 37 °C 에서 30분간 반응한 후, 75 °C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μ l), 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심분리하여 37 °C에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 °C에서 5분 동안 배양하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) Quantitative real-time RT-PCR

Semi quantitative real time PCR은 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primer는 Table II에 표시하였다. 염증성 사이토카인의 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, internal standard로는 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도는 200 nM이 되게 반응시켰다. quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 50 °C에서 2 min, 94 °C에서 10 분, 그리고 40 cycles은 95 °C에서 0.15 min, 60 °C에서 1 min 으로 하여서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하였고, 실험군의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR을 사용하여 아래와 같이 계산하였다.

Table 2. Primer sequences for real-time RT-PCR.

human TNF-alpha	F: 5' gggggaggatggatggaggatga 3'
	R: 5' gcgggtgcagaagatgatcctg 3'
human interleukin-1 β	F: 5' tccaggacagatgatggag 3'
	R: 5' tcttcaacagccaggacag 3'
human interleukin-6	F: 5' gcccccacacagacagccacc 3'
	R: 5' tgcccttctgctctccacaca 3'
human interleukin 8	F: 5' gctggcctggcctctcttg 3'
	R: 5' tggggtggaagggttggaglat 3'
human ICAM-1	F: 5' tggggtggaagggttggaglat 3'
	R: 5' gtgtctctggcctctggtc 3'
human NOS-II	F: 5' acaagcctaccctccagat 3'
	R: 5' ctcttctgttacgcctcca 3'
human MMP-3	F: 5' cgcagaatgcagaagttcc 3'
	R: 5' gatccaggaaaggctctga 3'
human TIMP-1	F: 5' aglggcctcattgcttg 3'
	R: 5' gcaggatcaggctatctgg 3'
human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)	F: 5' tggcctctagaaaacctgccaa 3'
	R: 5' gccccaggctcaaaagg 3'

y = x(1+e)ⁿ, x = starting quantity, y = yield, n = number of cycles, e = efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

(4) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위하여 Griess 용액을 제조하였다. 용액 A(0.2 % Naphthylethylene diamine dihydrochloride 수용액)와 용액 B(5 % H₃PO₄ 용액의 2 % Sulfonylamide)를 제조하

여 냉암소에 보관하고, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 활막 세포의 NO를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well당 5×10^5 씩 분주하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. GC(100, 10, 1 µg/ml)와 hrTNF-α와 hrIL-1β를 농도별로 처리한 후, 다시 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액 100 µl를 96well plate에 분주하고 혼합용액 100µl를 가하여 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과

1. 인간 활막 세포 배양 및 GC의 세포 독성

RA 환자의 관절로부터 분리한 세포를 현미경으로 관찰한 것을 Fig. 1. A에 나타내었다. 섬유아세포양 활막 세포는 표면이 넓게 퍼지며 자라고, 섬유아세포에 비하여 폴리솜과 RER가 더 잘 발달되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 이미 보고된 바와 일치하여¹³⁾ 본 실험에서 사용한 세포가 인간 활막 세포임을 확인할 수 있었다. 인간 세포에 대하여 GC가 독성을 나타내는지 조사하기 위하여 SRB 방법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. GC의 농도를 2배 희석법을 이용하여 처리하고 48시간 후에 상대적인 생존율을 배지만을 처리한 인간 섬유아세포의 생존율을 100로 하여 나타낸 결과는 Fig. 1. B에 나타내었다. 250 µg/ml의 농도로 처리하였을 때의 세포의 생존율이 77%로 가장 낮았고, 125 µg/ml이하로 처리하였을 때에는 세포의 생존율은 98%이상을 나타내었다. 그러므로 본 실험에서 사용한 GC 100 혹은 10 µg/ml의 농도는 세포 생존에 어떠한 독성도 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다.

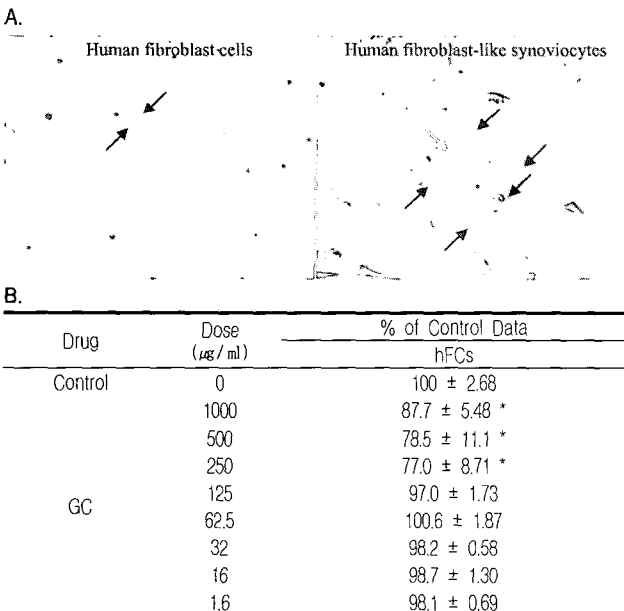


Fig. 1. Morphological comparison between human fibroblast and fibroblast-like sinoviocytes. Human fibroblast cells(hFCs) and human fibroblast-like sinoviocytes(hFLS) were cultured, and observed by bright microscopy(X1000). Human FLS showed the greater surface(red arrow), well-developed RER(white arrow) and increased number of polysome(blue arrow) than those shown in hFCs(A). Human FCs were cultured with various concentration of GC for 48 hr and the cell viability was measured by SRB method. The results were presented by mean + S.E. The statistically significant value was compared with the control group by t-test. (*p<0.05)

2. 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향

GC가 염증성 사이토카인의 발현에 대하여 억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 TNF-α와 IL-1β로 활막 세포를 자극하였다. 대조군에는 배지만을 처리하였고, GC는 10 µg/ml 혹은 100 µg/ml로 처리하였다. 양성 대조군으로는 MTX(10 µg/ml)를 사용하였다. TNF-α와 IL-1β로 자극하지 않은 세포를 정상군(WT)으로 하였다. 6 시간 후 TNF-α, IL-1β, IL-6의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR 방법에 의하여 측정하였다. TNF-α와 IL-1β만을 처리한 세포에서 조사한 모든 사이토카인의 발현이 정상군에 비하여 현저하게 증가하였다. GC는 100 µg/ml의 농도에서 TNF-α와 IL-6의 발현은 각각 0.391, 0.129로 현저히 감소하여서 MTX에 의한 억제 정도와 비슷하거나 우월하였다(Fig. 2. A, B). IL-1β의 감소 정도는 0.658이었다(Fig. 2. C). GC 10 µg/ml을 처리하였을 때, TNF-α와 IL-6의 mRNA 발현은 상당히 억제되었으나 IL-1β의 mRNA의 발현은 감소되지 않았다. 이러한 결과는 GC가 활성화된 활막 세포에서 특정 염증성 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

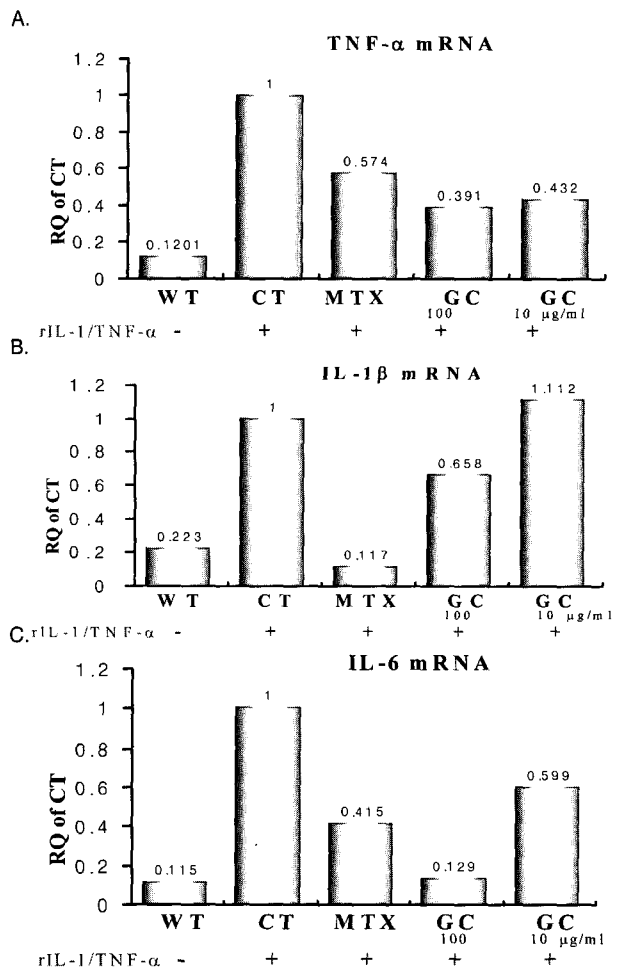


Fig. 2. Inhibitory effects of GC on the mRNA expression of proinflammatory cytokines. The hFLS were stimulated with hrTNF-α(100 ng/ml) and hrIL-1β(10 U/ml), and treated with medium(CT), methotrexate(10 µg/ml, MT) or GC(10, or 100 µg/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of TNF-α(A), IL-1β(B) and IL-6(C) mRNA expression were measured by quantitative real-time RT-PCR.

3. 염증세포의 유주와 부착에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

IL-8은 염증세포에 작용하여 염증 부위로의 침윤을 유도하는 키모카인(chemokine)으로서 류마티드 관절염의 활막 조직에 높은 농도로 존재하며, ICAM-1은 TNF- α 등에 의하여 발현이 증가되는 부착 분자(adhesion molecules)로서 관절조직으로의 염증세포의 부착과 침윤을 유도한다고 보고된 바 있다¹⁴⁾. IL-8과 ICAM-1의 mRNA 발현에 대한 GC의 효과는 Fig. 3에 표시하였다. TNF- α 와 IL-1 β 로 활성화된 세포에서는 정상세포에 비하여 IL-8과 ICAM-1의 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였다. GC를 처리한 세포에서는 대조군에 비하여 IL-8의 mRNA 발현이 현저히 감소하여 0.278(10 μ g/ml), 0.185(100 μ g/ml)로 확인되었으며, 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 억제 작용은 MTX보다 우월하였다. 10 μ g/ml의 농도에서 GC는 ICAM-1의 발현을 감소시키지 못하였으나, 100 μ g/ml의 농도에서 MTX와 비슷한 정도로 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 GC가 활막 조직으로 염증세포가 유입되고 부착하는 것을 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

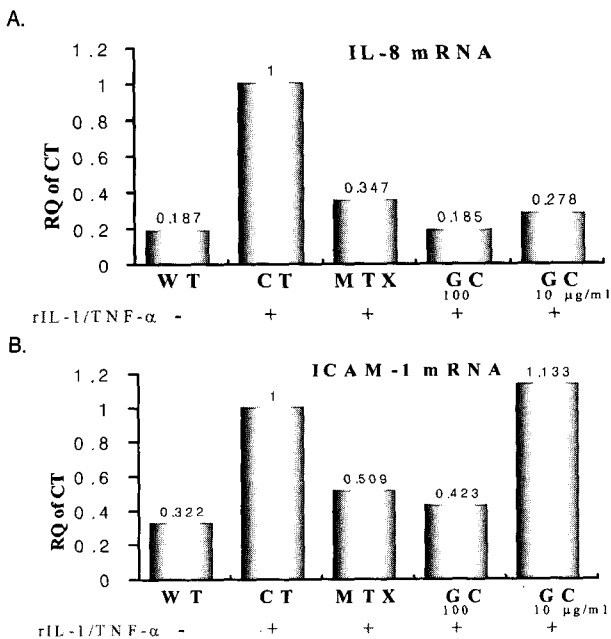


Fig. 3. Inhibitory effects of GC on the mRNA expression of IL-8 and ICAM-1. The hFLS were stimulated with TNF- α (100 ng/ml) and IL-1 β (10 U/ml), and treated with medium(CT), methotxate(10 μ g/ml, MT) or GC(10, or 100 μ g/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of IL-8(A) and ICAM-1(B) mRNA expression were measured by quantitative real-time PCR.

4. iNOS와 NO 생성에 미치는 영향

NO는 관절 조직에서 혈관의 확장과 염증을 매개하는 물질로서 MMPs의 발현 증가를 유도하여 관절 조직의 파괴에 기여한다¹⁵⁻¹⁶⁾. NO의 발생은 염증성 사이토카인에 의한 NOS-II의 mRNA 발현의 증가로 인한 효소 반응에 의한다는 것은 잘 보고된 바 있다. 정상 세포에서 NOS-II mRNA의 발현은 미약하였으나 TNF- α 와 IL-1 β 로 처리한 세포에서 현저히 증가 하였다(Fig. 4). GC를 10과 100 μ g/ml로 처리하였을 때, 각각 0.584와 0.237로

나타나 농도 의존적으로 NOS-II mRNA의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4. A). 이러한 감소는 MTX에 의한 NOS-II mRNA 감소 정도와 비슷하였다. GC가 NO 생성에는 어떠한 효과를 가지고 있는지는 배양액 중에 존재하는 NO의 양을 Griess 시약에 의한 발색반응을 이용하여 확인하였다. 540 nm에서 흡광도를 측정 한 결과 TNF- α 와 IL-1 β 로 활성화된 활막 세포 배양액 중의 흡광도 값이 6배 정도 증가하였다. GC를 100 μ g/ml로 처리한 세포와 양성대조군으로 MTX를 처리 한 세포 배양액중의 발색정도는 50% 이상 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4. B). 이러한 결과는 GC가 NOS-II의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시킬 수 있다는 것을 의미하였다.

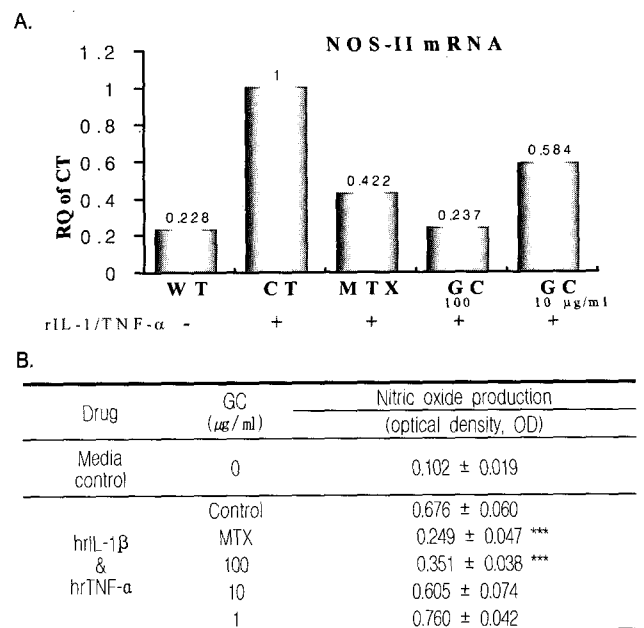


Fig. 4. Inhibitory effects of GC on the mRNA expression of NOSII and NO production. The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (100 ng/ml) and IL-1 β (10 U/ml), and treated with medium(CT), methotxate(10 μ g/ml, MT) or GC(10, or 100 μ g/ml) for 6 hr. WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of NOS-II(A) mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR. The production of NO in the supernatant were determined by measuring O.D at 540 nm(B). (***)p<0.001

5. MMP-3와 TIMP-1 발현에 미치는 영향

정상 상태에서는 MMPs는 TIMPs와 1:1로 결합하여 연골 조직의 항상성을 유지하고 있으나 관절염의 조직에서는 염증성 사이토카인, NO등과 같은 자극에 의하여 MMPs의 발현이 증가된다는 것은 잘 보고되어 있다. 과도하게 발현된 MMPs로 인하여 TIMPs와의 균형성이 깨어짐으로서 매트릭스를 구성하고 있는 콜라겐, 프로테오글라이칸의 결합이 와해되고 연골 조직의 분해가 일어난다고 알려져 있다⁶⁾. GC가 연골 조직의 파괴에 관련된 효소의 발현에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 MMP-3와 TIMP-1의 유전자 발현을 real-time PCR법으로 조사하였다. Fig. 5. A에 표시된 바와 같이 MMP-3의 유전자 발현은 농도 의존적으로 감소하였으며 양성대조군과 비슷하거나 우월한 정도를 나타내었다. 반면에 TIMP-1유전자의 발현은 GC 10과 100 μ g/ml을 처리하였을 때 대조군에 비하여 각각 2.739와 4.176

을 나타내어 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5. B). 이에 비해 MTX는 TIMP-1의 발현을 활성화 할 수 없었다. 이러한 결과는 GC가 MMP-3의 발현을 효과적으로 억제하는 반면, TIMP-1의 발현을 증가시키므로서 연골의 파괴를 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

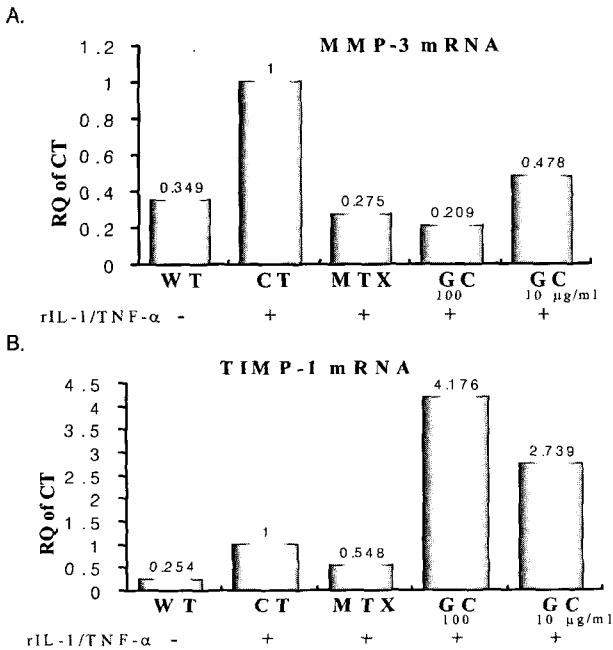


Fig. 5. Effects of GC on the mRNA expression of MMP-3 and TIMP-1. The hFSLs were stimulated with or hrTNF- α (100 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), and treated with medium(CT), methotxate(10 μ g/ml, MT) or GC(10, or 100 μ g/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of MMP-3(A) and TIMP-1(B) mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR.

고찰

류마티오이드 관절염은 관절의 활막에 발생하는 만성 염증 질환으로, 활막의 염증이 6주 이상 지속된 경우를 말하며, 발열, 피부의 발진과 결절, 체중 감소, 피로감, 폐, 심장, 눈의 염증성 변화 등 관절 이외의 염증 등이 동반되는 질환으로 전체 인구의 1% (약 40만명) 가량이 고통 받고 있다.

이에 대한 한의학적 치료 방법은 증상과 환자의 상태에 따라 거풍한습, 통기, 조습, 소담, 활혈 작용이 있는 약물과 처방이 다양하게 응용되고 있다. 특히 路 芎¹⁷⁾은 “비증이 오래되면 어혈 응체가 야기되며, 동통이 비교적 완고하다. 그 통증은 고정되어 있고 관절 변형과 더불어 설색은 자암하며, 맥락이 비저하면 외사와 어혈 담탁이 서로 멩쳐서 거풍한습 약 하나로는 효과를 보기가 힘드니 반드시 활혈통락의 약으로서 어비를 뚫어줘서 한 다”고 언급하여 활혈화어 치료법의 중요성을 강조한 바가 있으며¹⁷⁾, 최근 실험 연구 역시 이차적 병리 물질로 인정되는 어혈을 제거하는 활혈거어제에 대한 연구가 활발하다. 본 연구에서 사용된 계혈등복합방(GC)은 네가지 구성 약물이 모두 활혈화어 효능을 갖추고 있는데, 이들의 본초학적 효능을 살펴보면, 먼저 계혈

등은 활혈보혈, 서근활락 작용으로 주로 여성 월경부조 및 관절 산통 등에 활용되고, 방사선 치료로 인한 백혈구감소 등에도 응용되고 있다. 희점은 거풍습, 통경락, 청열해독 작용으로 풍습비통, 사지마비 등에 활용되고, 최근에는 고혈압과 관상동맥경화로 인한 심장질환에 주증으로 활용되고 있으며, 적작약은 청열양혈, 산어지통 작용으로 일절 혈열과 혈어의 증에 활용되고, 현호색은 활혈, 산어, 이기, 지통 작용으로 흉협안복동통, 경폐통경 등에 활용된다¹⁹⁻²⁰⁾.

서양의학적 측면에서 RA의 병리적 특징은 활막 조직내의 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6과 같은 다양한 염증성 사이토카인의 증가, NO 등과 같은 염증성 매개 물질의 증가와 궁극적으로는 관절 조직의 비가역적 파괴에 있다. 본 연구에서는 RA에 대한 GC의 효능 및 기전을 검색하고자 류마티오이드 관절염 환자로부터 분리된 섬유아세포양 활막 세포에서 병리적 활성화에 관련된 유전자의 발현에 관한 영향을 조사하였다. 류마티오이드 관절염 환자에서 TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인은 일차적으로는 활액 내의 대식세포에서 발현되어 다양한 병리작용을 나타낸다. TNF- α 는 IL-1 β , IL-6와 같은 사이토카인의 발현 유도과 내막 혈관내피 세포에서의 어드히전(adhesion) 분자의 발현 증가에 의한 염증 부위로의 면역 세포의 침윤 및 중성구, 활막세포, 연골 세포에서의 MMPs의 증가를 유도 한다. IL-1 β 의 활성화는 TNF- α 활성화의 범위와 유사하여 염증 반응과 내피세포에 백혈구의 부착등에 중요한 역할을 한다. IL-1 β 는 연골 분해, 골 재흡수를 자극하고 콜라겐과 프로티오글리칸(proteoglycan)의 합성을 막는다. 더욱이 혈중 IL-1 β 의 농도는 ESR(Ritchie joint index), 통증의 강도와 비례하고 관절 파괴와도 연관이 있음이 알려져 있다¹⁹⁻²⁰⁾. IL-6은 다양한 급성 염증성 질환에 관련하는데, 류마티오이드 환자에서는 T 세포의 활성화 및 류마티오이드 인자 생성을 촉진한다²¹⁻²²⁾. IL-8은 주로 호중구에 작용하는 것이 특징이다. 염증 반응에서 2차 매개 단백질로 작용하여 염증 세포들을 활성화하고, 그들을 염증 부위로 유인하는 화학유인인자(chemotatic factor, chemokines)의 작용을 가지고 있다. ICAM-1은 활막 세포에서 발현되어 T 세포가 염증 부위에 유주하는 것을 도우며 염증성 사이토카인의 발현을 증가시키므로서 염증반응이 시작되고 지속되도록 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. Nitric oxide(NO)는 생체 내에서 NO synthase(NOS) 라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는데, 관절에서 과량의 NO 생성은 연골세포의 탈분화를 유도할 뿐만 아니라 연골 세포의 고사를 유발하고 MMPs를 조절하는 것으로 알려져 있다. IL-1 및 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인에 의해 유발관절염 조직에서 MMPs의 발현 및 활성이 증가하는데 이는 관절 조직의 파괴와 직접적으로 관련이 있다. 다양한 종류의 콜라젠, 프로테오글라이칸, 그리고 피브로넥틴(fibronectin)과 같은 단백질 분자들은 연골세포에서 합성되어 조직을 이루는데, 연골 조직의 보존은 타입 II 콜라젠의 helical domain을 분해하는 MMP-1, 타입 IX 와 type XI collagen을 분해하는 MMP-3 등과 이 효소의 저해제로 MMP의 작용을 조절하는 인자인 TIMPs 사이의 균형에 의하여 유지된다²³⁾. 그러므로 MMPs의 작용을 억제하거나 TIMPs의 작용을 활성화하는 약물

을 개발한다면 관절염에 있어서 가장 중요한 증상인 연골 분해와 파괴를 막을 수 있을 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서 GC는 TNF- α 와 IL-1 β 에 의하여 활성화된 인간 활막세포에서 염증성 사이토인 유전자, 세포의 유주와 흡착에 관여하는 IL-8과 ICAM-1, NOS-II 의 유전자 발현을 효과적으로 억제 하였다. 또한 MMP-3의 발현을 억제하였다. 이러한 결과들은 계혈등복합방(GC)이 활막 조직에서의 염증과 염증세포의 유입을 효과적으로 억제 할 수 있는 가능성을 추측하게 한다. 더욱이 강조해야 할 것은 TIMP-1의 발현 증가이다. 양성 대조군으로 사용한 MTX는 염증에 관여하는 유전자 조절 작용을 나타내는데 비하여 연골 보호 작용을 가진 TIMP-1의 발현을 조절 할 수 없었다. MTX는 현재 류마티스 관절염 환자에서 가장 널리 사용되고 있는 약물이지만 연골 보호 작용을 나타낼 수 없음을 감안 한다면 GC에 대한 더욱 심도 있는 연구가 필요하다.

결 론

계혈등복합방(GC)의 관절염 억제 효과를 규명하기 위하여 TNF- α 와 IL-1 β 에 의해서 활성화된 인간 섬유아세포양 활막 세포의 염증성 사이토카인, 키모카인, ICAM-1, NOS-II, MMP-3, 및 TIMP-1 등의 발현 변화 정도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

계혈등복합방(GC)은 125 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 섬유아세포에 대하여 어떠한 독성도 나타내지 않았다. 계혈등복합방(GC)은 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현이 현저히 감소하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-1 β 의 mRNA 발현이 억제되었다. 계혈등복합방(GC)은 키모카인과 부착 분자의 유전자 발현을 억제하였다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-8의 mRNA 발현이 현저히 감소하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ICAM-1의 mRNA 발현이 감소하였다. 계혈등복합방(GC)은 NOS II의 유전자 발현을 억제하였으며, NO의 생성을 억제하였다. 계혈등복합방(GC)은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MMP-3의 유전자 발현을 억제하는 반면, TIMP-1의 mRNA 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 계혈등복합방(GC)의 활막 세포에 대한 활성화 억제 효능이 인정되어, 향후 이에 대한 동물 실험과 더불어 다양한 처방의 가감을 통한 지속적이고 심도 있는 연구가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 산업기술평가원에서 지원하는 지역혁신연구센터 과제인 대전대학교 난치성면역질환 동서생명의학 연구센터(TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

참고문헌

1. Lee, D.M., Weinblatt, M.E. Rheumatoid arthritis Lancet 358,

pp 903-911, 2001.
 2. Firestein, G.S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423, pp 356-361, 2003.
 3. Burmester, G.R., Stuhlmuller, B., Keyszer, G., Kinne, R.W. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis, mastermind or workhorse in arthritis? Arthritis Rheum 40, pp 5-18, 2001.
 4. Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M., Maini, R.N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissue and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 34, pp 1125-1132, 1991.
 5. Badolato, R., Oppenheim, J.J. Role of cytokines, acute phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 26, pp 526-538, 1996.
 6. Yoshihara, Y., Nakamura H., Obata, K. et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 59, pp 455-461, 2000.
 7. Jackson, C.J., Arkell, J., Nguyen, M. Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP(TIMP1) Ann Rheum Dis 57, pp 157-161, 1998.
 8. 서혜경. 관절염활막세포에 대한 계혈등의 면역효과, 대전대학교 박사학위논문, 2003.
 9. 이진훈. 계혈등의 항염활성효과, 강원대학교석사학위논문, 1999.
 10. 김병수. 玄胡索.赤芍藥.紅花 混合藥液이 關節炎 白鼠의 炎症과 肝에 미치는 影響, 강원대학교석사학위논문, 2004.
 11. 조영주. 회침이 炎症性 싸이토카인 및 류마티스양 關節炎에 미치는 影響, 대전대학교박사학위논문, 2003.
 12. Palpazissi, K., Kortssaris, H., Optimization of the sulforhodamin B(SRB) colorimetric assay, J. Immunological Method, 208, pp 151-158, 1997.
 13. Rho, Y.G., Yu, S., Cheon, H.J., Sohn, J. Effects of TGF- β , GM-CSF and PDGF on proliferation and expression of cytokines and metalloproteinase genes in rheumatoid synovial cells. Korean J. Immunol 20, pp 119-127, 1998.
 14. Tanaka, Y. The role of chemokine and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Drug Today 37, pp 477-485, 2001.
 15. Pozzan, M., Guerra, M., Manzinie, E, Calza, L., A histochemical study of the rheumatoid synovium: focus on nitric oxide, nerve growth factor high affinity receptor and innervation. J Rheumatol. 27, pp 1121-1127, 2000.
 16. Studer, R., Jaffurs, D., Stefanovic-Tacic, M., Robbins, P.D., Evans, C.H. Nitric oxide in osteoarthritis 7, pp 377-379 1999.
 17. 路志正. 實用中醫風濕病學, 인민위생출판사, 1996.
 18. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학, p 445, 276, 413, 195, 1991.
 19. Ainola, M.M., Mandelin, J.A., Liliestron, M.P., Li, T.F.,

- Hukkanen, M.V., Konttinen, Y.T. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: Involvement of MMP-3 and interleukin-1 β . *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, pp 644-650, 2005.
20. North, J., Situnayake, R.D., Tikly, M., Cremona, A., Nicoll, J., Kumaralne, D.S., Nuki, G. Interleukin-1 beta, hand and foot bone mineral content and the development of joint erosions in RA *Ann. Rheum. Dis.* 53, pp 543-546, 1994.
21. Okamoto, H., Yamamura, M., Morita, Y., Harada, S., Makino, H, Ota, Z. The synovial expression and serum levels of IL-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40, pp 1096-2105, 1997.
22. Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I. et al., IL-6 and IL-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteolike cell formation *J. Bone Miner Res* 11, pp 88-95, 1996.
23. Hegemann, N., Wondimu, A., Ullrich, K., Schmidt M.F. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. *Vet Immunol Immunopathol.* 91, pp 199-204, 2003.