

가미사물탕(GST)의 사이토카인으로 유도된 인간 섬유아세포양 활막 세포 활성화 저해 작용

박지영·진미림·김동희*

Suppressive Effects of GST on Cytokine-induced Activation of Human Fibroblast-like Sinoviocytes

Jee-Young Park, Mi-Rim Jin, Dong-Hee Kim

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

GST, an extract from 16 herbs, has been formulated and prescribed for the treatment of human rheumatoid arthritis(hRA) for many years. The present study was done to investigate whether GST has suppressive effects on activation of fibroblast-like sinoviocytes isolated from an RA patient. In tumor necrosis factor- α (TNF- α)/interleukin-1b(IL-1b) 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 GST(100 μ g/ml) suppressed the expression of proinflammatory cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-8 compared with the control. 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 GST. The expression of NOS-II was considerably reduced, which was accompanied by a decrease in the production of nitric oxide(NO). In addition, GST considerably increased the mRNA levels of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1(TIMP-1), while those of matrix metalloproteinase-3(MMP-3) were decreased. Taken together, these data suggested that GST might suppress the activation of sinoviocytes in hRA.

Key words : GST, hRA, human fibroblast-like sinoviocytes, proinflammatory cytokines, IL-8, ICAM-1, NOS-II, NO, MMP-3, TIMP-1

I. 서론

류마토이드 관절염은 관절의 활막에 발생하는 만성 염증 질환으로, 활막의 염증이 6주 이상 지속된 경우를 말하며 여러 관절에 부종 및 동통을 동반하면서 관절 강직 및 변형을 초래하는 자가 면역성 질환이다.¹⁾ 전신적으로는 자가 항원에 대한 T세포

의 활성화가 특징이지만, 관절 조직의 파괴에는 만성적인 활막 세포의 활성화가 더욱 중요하게 관련되어있음이 최근에 보고되었다.²⁾ 활막 조직내의 TNF- α 와 IL-1b, IL-6과 같은 염증성 사이토카인은 일차적으로는 활액 내의 대식세포에서 발현되어 다양한 병리작용을 나타낸다.³⁾ TNF- α 는 IL-1b, IL-6의 발현 유도 및 내막 혈관 내피 세포에서 어드히전(adhesion) 분자의 발현 증가와 이로 인한 염증 부위로의 면역 세포의 침윤을 증가시킨다. 또한 중성구, 활막세포, 연골 세포에서의 MMPs의 증

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 김동희, dhkim@dju.ac.kr
· 채택일 : 2005년 11월 21일

가를 유도 한다.⁴⁾ IL-1b의 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 있다.^{5,6)} IL-6은 다양한 급성 염증성 질환에 관련하는데 류마티드 관절염 환자에서는 T 세포의 활성화 및 류마티드 인자 생성을 촉진한다고 알려져 있다.^{7,8)} 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 염증부위에 유주하는 것을 도우며 염증성 사이토카인의 발현을 증가시킴으로서 염증반응이 시작되고 지속되도록 하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 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.^{10,11)} 염증성 사이토카인, 키모카인(chemokine) 이나 NO와 같은 염증성 물질은 모두 궁극적으로 extracellular matrix를 분해하는 단백 효소인 매트릭스 메탈로 프로테이네이즈(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 유도하고 생성을 촉진한다.¹²⁾ 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 되어 비가역적 파괴에 이르게 된다.^{13,14)} 그러므로 관절염의 치료를 위해서는 활막에서의 염증 반응의 억제 뿐만 아니라 연골의 비가역적 파괴를 막을 수 있는 약물의 개발이 요구되고 있다. 가미사물탕(GST)은 수년간 한방 임상에서 관절염의 치료를 위하여 사용된 처방으로서 GST의 관절염 억제 효과를 분자

적 수준에서 조사하기 위하여 TNF-a와 IL-b에 의해서 활성화된 인간 섬유아세포양 활막 세포(human fibroblast like synoviocyte, hFLS)의 염증성 사이토카인, 키모카인, ICAM-1, NOS-II의 유전자 발현과 NO의 생성 및 MMP-3와 TIMP-1 유전자의 발현 변화 정도를 측정하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 약재

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

2) 시약

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), methotrexate(MTX), trypsin-0.2% EDTA, 3-4,5-dimethylthiazo-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, RNAzolB는 Tel-Test 사(USA) 제품을, 우태아 혈청(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-a와 IL-1b는 R&D system 사(Minneapolis, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방 법

1) 가미사물탕(GST) 추출

가미사물탕(GST)의 3첩 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.

Table I. Herb composition of GTT

한약명 (韓藥名)	생약명	(g)
계지	Cinnamoni Ramulus	12
황기	Astragali Radix	12
지황	Rehmannia Radix	12
우슬	Achyranthis Radix	12
백복령	Holen	4
백출	Atractylodis Rhizoma	4
백작약	Paeoniae Radix	4
당귀	Angelicae gigantis Radix	4
천궁	Cnidii Rhizoma	4
파고지	Psoraleae Fructus	4
두충	Eucommiae Cortex	4
속단	phlornis umbrosa	4
진피	Aurantii Nobilis Percarpium	4
감초	Glycyrrhizae Radix	4
초		2
산초	Zanthoxylli Fructus	1.5
현호색	Corydalis turtchaninovii	3
Total amount		94.5

2) 인간 섬유아세포양 활막 세포 일차 배양

외과 수술로 적출된 65세의 여성 류마티드 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 원심분리관에 옮겨 잠시 세워둔 후 지방질과 배양액을 제거하였다. 10mg의 관절 활막 조직당 1~1.5mg/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. 디스페이제 처리를 3~4회 반복하면서 같은 방법으로 상층액을 모았다. 상층액 모두를 모아 1,200rpm에서 10분간 원심분리하고 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지로 두 번 씻어냈다. 세포의 수를 세고 단핵구 세포만 hapaque 1077(Sigma 사) 용액 위에서 원심분리한 후 경계층의 세포를 분리하여 15% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 1주일씩 5회 계대하면서 살아있는 부착 세포를 배양하였다.

3) 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, pH7.3)으로 점차 치환하며 4℃에서 30분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 광학현미경(Nikon, Japan) 1000배에서 관찰하였다.

4) Quantitative real time RT-PCR

(1) RNA 추출

관절 활막 세포를 24 well plate에 10% FBS를 넣어준 DMEM 배지를 사용하여 2x10⁵ x 10⁵ 로 각 well에 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. FBS를 함유하지 않은 배지에서 12 시간 배양한 후, 각 well에 GST(100, 10µg/ml)와 양성대조군으로 MTX(10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1β(10U/ml)와 hrTNF-α(10ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 클로로포름(CHCl₃) 50µl를 첨가한 후

15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 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 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% 에탄올로 수세하고 3분간 진공 펌프에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 디틸파이로카보네이트 (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 cDNA 합성에 사용하였다.

(2)역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I(10 μ / μ l)를 처리하고 37 $^{\circ}$ C 에서 30분간 반응한 후, 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심분리하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 $^{\circ}$ 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 200nM이 되게 반응시켰다. quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 50 $^{\circ}$ C에서 2min, 94 $^{\circ}$ C에서 10분, 그리고 40cycles은 95 $^{\circ}$ C에서 0.15min, 60 $^{\circ}$ C에서 1min 으로 하여서 수행하였다. 실험군과

대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하였고, 실험군의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR을 사용하여 아래와 같이 계산하였다.

$$y = x(1 + e)^n$$

x = starting quantity y = yield n = number of cycles

e=efficiency로 계산하여 RQ를 측정하였다.

5) 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 제조하여 냉암소에 보관하고, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 활막 세포의 NO를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well당 5 \times 10⁵씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다, GST(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)와 hrTNF-a와 hrIL-1b을 농도별로 처리한 후, 다시 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액 100 μ l를 96 well plate에 분주하고 혼합용액 100 μ l를 가하여 ELISA 리더를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

human TNF-alpha	F: 5' gggggagagatggatggagtgga 3' R: 5' gggggtgcagaagatgatcctg 3'
human interleukin-1 β	F: 5' tccaggacagggatgatggag 3' R: 5' tcttcaacagccaggacag 3'
human interleukin-6	F: 5' gccccacacagacagccactc 3' R: 5' tgctctttgctgctttcacaca 3'
human interleukin 8	F: 5' gctggcctggctctcttg 3' R: 5' tgggtggaagggttgagat 3'
human ICAM-1	F: 5' tgggtggaagggttgagat 3' R: 5' gtgtctctggctctggttc 3'
human NOS-II	F: 5' acaagcctaccctccagat 3' R: 5' ctctttgttacgcttcca 3'
human MMP-3	F: 5' cGCagaaatgcagaagtcc 3' R: 5' gatgccaggaaagggttctga 3'
human TIMP-1	F: 5' agtggcactcattgcttctg 3' R: 5' gcaggattcaggctatctgg 3'
human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	F: 5' tgcgcttagaaaaacctgccaa 3' R: 5' gccccaggctcaaagggtg 3'

Table II Primer sequences for real-time RT-PCR

III. 실험결과

1. 인간 섬유아 세포양 활막 세포 배양

RA 환자의 관절로부터 분리한 세포를 현미경으로 관찰한 것을 Fig.1에 나타내었다. 섬유아세포양 활막 세포는 표면이 넓게 퍼지며 자라고, 피부 조직에 존재하는 섬유아세포에 비하여 폴리솜과 RER가 더 잘 발달되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 이미 보고된 바와 일치하여¹⁵⁾ 본 실험에서 사용한 세포가 인간 활막 세포임을 확인할 수 있었다.



Fig.1 Morphology of fibroblast-like synoviocytes

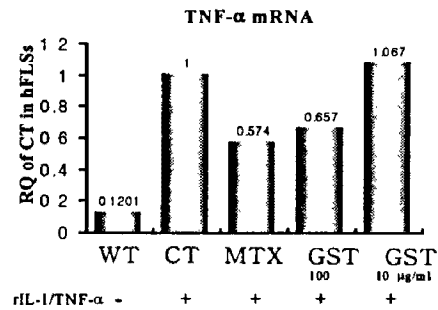
Human fibroblast-like synoviocytes(hFLS) were cultured and observed by bright microscopy (X1000). Human FLS showed the bigger surface(red arrow), well-developed RER(white arrow) and increased number of polysome(blue arrow) than those in fibroblast.

2. 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향

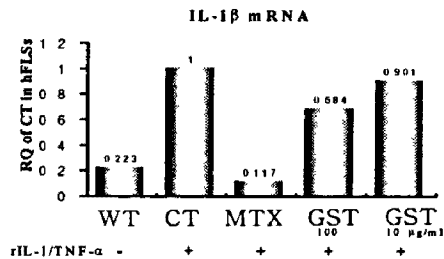
GST가 염증성 사이토카인의 발현에 대하여 억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 hrTNF- α 와 hrIL-1b로 활막 세포를 자극하였다. 대조군에는 배지만을 처리하였고, GST는 10 μ g/ml 혹은 100 μ g/ml로 처리하였다. 양성 대조군으로는 MTX(10 μ g/ml)를 사용하였다. TNF- α 와

IL-1b로 자극하지 않은 세포를 정상군(WT)으로 하였다. 6시간 후 TNF- α , IL-1b, IL-6의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR 방법에 의하여 측정하였다. TNF- α 와 IL-1b만을 처리한 세포에서 조사한 모든 사이토카인의 발현이 정상군에 비하여 현저하게 증가하였다. GST는 100 μ g/ml의 농도에서 TNF- α , IL-1b, IL-6의 발현은 각각 0.657, 0.684, 0.784로 감소시켰으나, 10 μ g/ml의 농도에서는 유의적인 감소를 나타내지 않았다.(Fig. 2 A, B, C). 이러한 결과는 GST(100 μ g/ml)가 활성화된 활막 세포에서 특정 염증성 사이토카인의 발현을 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

A



B



C

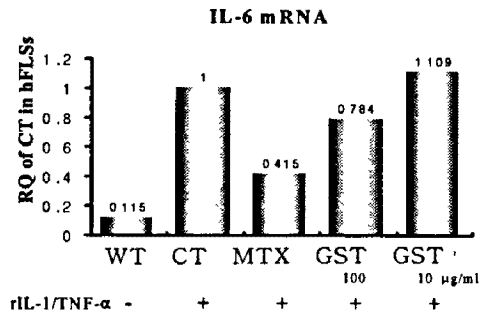


Fig.2 Effects of GST on the mRNA expression of proinflammatory cytokines

The hFLS were stimulated with hrTNF- α (100 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), and treated with medium (CT), methotrxate(10 μ g/ml, MTX) or GST(10, or 100 μ g/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of TNF- α (A), IL-1 β (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 유인하는 키모카인(chemokine) 으로서 류마티오이드 관절염의 활막 조직에 높은 농도로 존재하며, ICAM-1은 TNF- α 등에 의하여 발현이 증가되는 어드히전 분자(adhesion molecules)로서 관절 조직으로의 염증세포의 부착과 침윤을 유도한다고 보고된 바 있다. IL-8과 ICAM-1의 mRNA 발현에 대한 GST의 효과는 Fig.3에 표시하였다. TNF- α 와 IL-1 β 로 활성화된 세포에서는 정상세포에 비하여 IL-8과 ICAM-1의 발현이 현저히 증가한 것을 확인하였다. GST(100 μ g/ml)를 처리한 세포에서는 IL-8의 mRNA 발현이 대조군에 비하여 0.814로 나타났다. ICAM-1의 mRNA 발현은 0.789로 나타났다. 10 μ g/ml의 농도에는 IL-8과 ICAM-1의 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 없었다. 이러한 결과는 GST(100 μ g/ml)가 활막 조직으로 염증세포가 유입되고 부착하는 것을 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

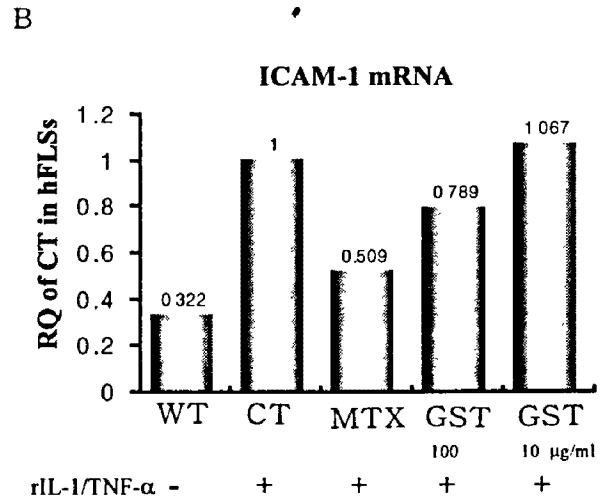
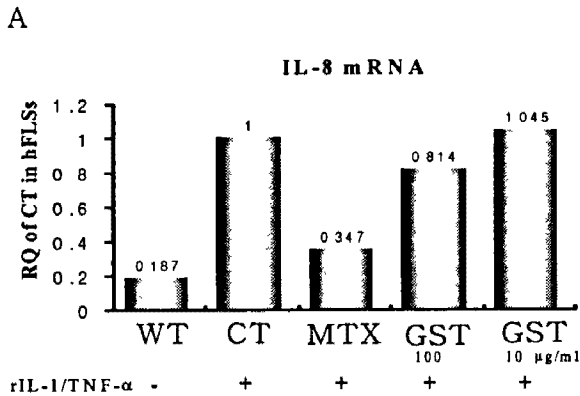


Fig.3 Effects of GST on the mRNA expression of IL-8 and ICAM-1

The hFLS were stimulated with TNF- α (100ng/ml) and IL-1 β (10U/ml), and treated with medium(CT), methotrxate(10 μ g/ml, MTX) or GST(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.

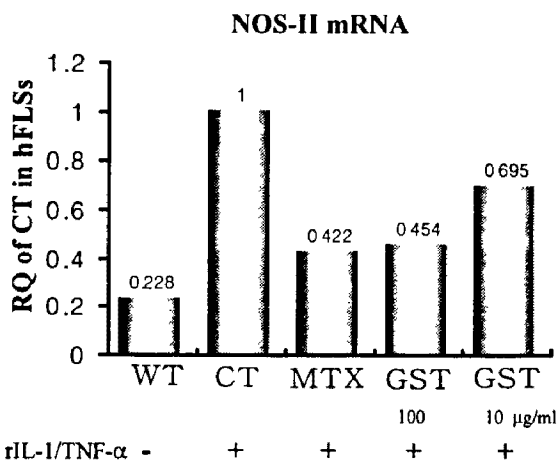
4. iNOS와 NO 생성에 미치는 영향

NO는 관절 조직에서 혈관의 확장과 염증을 매개하는 물질로서 MMPs의 발현 증가를 유도하여 관절 조직의 파괴에 기여한다. NO의 발생은 염증성 사이토카인에 의한 NOS-II의 mRNA 발현의 증가로 인한 효소 반응에 의한다는 것은 잘 보고된 바 있다^{10,11}. 정상 세포에서 NOS-II mRNA의 발현은 미약하였으나 TNF- α 와 IL-1 β 로 처리한 세포에서 현저히 증가 하였다(Fig. 4). GST를 10과 100 μ g/ml로 처리하였을 때, 각각 0.695와 0.454로 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. GST가 NO 생성에 어떠한 효과를 가지고 있는지는 배양액 중에 존재하는 NO의 양을 Griess 시약에 의한 발색반응을 이용하여 확인하였다. 540nm에서 흡광도를 측정

한 결과 TNF- α 와 IL-1 β 로 활성화된 활막 세포 배양액 중의 흡광도 값이 6-7배 정도 증가하였다. GST를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 세포와 양성대조군으로 MTX를 처리한 세포 배양액중의 발색정도는 50% 이상 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4 B). 이러한 결과는 GST가 NOS-II의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시킬 수 있다는 것을 의미하였다.

The WT group were 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). The statistically significant value was compared with the control group by t-test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

A



B

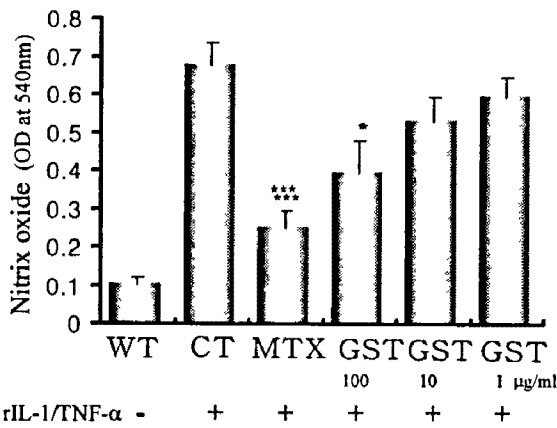


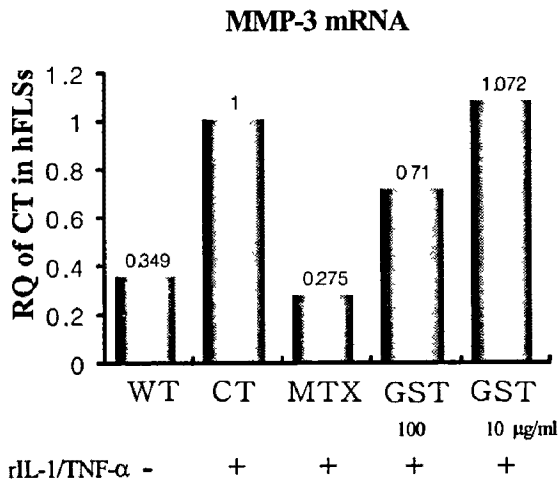
Fig.4 Effects of GST on the mRNA expression of NOSII and NO production

The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (100ng/ml) and IL-1 β (10U/ml), and treated with medium(CT), methotrxate(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) or GST(10, or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6hr.

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 있다.¹²⁾ GST가 연골 조직의 파괴에 관련된 효소의 발현에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 MMP-3와 TIMP-1의 유전자 발현을 real-time PCR법으로 조사하였다. Fig5. A에 표시된 바와 같이 MMP-3의 유전자 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 GST를 처리한 경우 대조군에 비하여 0.71의 발현정도를 나타내었다. 반면에 TIMP-1 유전자의 발현은 GST 10과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때 대조군에 비하여 약 2배 정도 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig.5 B). 이에 비해 MTX는 TIMP-1의 발현을 활성화 할 수 없었다. 이러한 결과는 GST가 MMP-3의 발현을 억제하는 반면 TIMP-1의 발현을 증가시킴으로서 연골의 파괴를 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

A



B

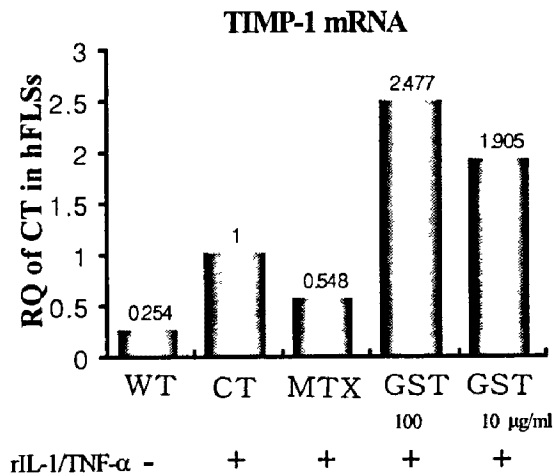


Fig. 5. Effects of GST on the mRNA expression of MMP-3 and TIMP-1
 The hFLS were stimulated with or hrTNF-a(100ng/ml) and hrIL-1b(10U/ml), and treated with medium(CT), methotrxate(10µg/ml, MT) or GST(10, or 100 µg/ml) for 6hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of MMP-3(A)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

IV. 고찰 및 결론

류마티오이드 관절염 환자의 관절 조직으로부터 섬유아세포양 활막 세포를 분리하고 배양하며 가미사물탕(GST)가 TNF-a와 IL-1b에 의한 섬유아세포양 활막 세포의 활성화를 억제하는지를 살펴본 결과 100µg/ml의 농도에서 염증성 사이토카인(TNF-a, IL-1b, IL-6), 키모카인(IL-8) 및 ICAM-1의 mRNA 발현을 억제하였다. 가미사물탕(GST)은 NOS II의 mRNA 발현과 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, MMP-3의 발현을 억제하는 반면 TIMP-1 mRNA의 발현을 증가시켰다. 정상적인 연골 조직은 타입 II 콜라젠, 프로테오글라이칸, 그리고 피브로넥틴(fibronectin)과 같은 부수적인 단백 분자들이 연골세포에서 합성되어 이루어지는데, 연골 조직의 보존은 타입 II 콜라젠의 helical domain을 분해하는 MMP-1, 타입 IX와 type XI collagen을 분해하는 MMP-3 등과 이 효소의 저해제로 MMP의 작용을 조절하는 인자인 TIMPs 사이의 균형에 의하여 유지된다. 즉, 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 된다. 류마티오이드 관절염 환자의 관절 활액에서 증가되어 있는 TNF-a, IL-1b, IL-6와 같은 염증성 사이토카인들이 관절염 진행에 중심적 역할을 하는 것은 잘 알려져 있다. 또한 NO와 같은 염증성 매개 물질의 분비와 활성화된 활막 세포에서 IL-8과 같은 키모카인과 염증세포의 부착에 관여하는 ICAM-1(intracellular adhesion molecules-1)의 발현 증가는 T, B 세포뿐만 아니라 대식세포와 같은 염증 세포의 활막 내로의 이동을 증가 시킨다. 이들은 모두 extracellular matrix를 분해하는 단백 효소인 MMPs의 발현을 유도하고 생성을 촉진한다. 본 연구에서는 한방 임상에서 관절염 치료를 위하여 다년간 사용된 가미사물탕(GST)이 TNF-a와 IL-1b에 의하여 활성화된 인간 활막 세

포에서 염증성 사이토인 유전자, 세포의 유주와 흡착에 관여하는 IL-8과 ICAM-1, NOS-II의 유전자 발현을 억제 하였다. TIMP-1의 증가는 MMP-3의 감소와 더불어 GST가 인간 관절염의 염증 반응과 연골 파괴를 막을 수 있을 가능성을 추측하게 한다.

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

V. 참고문헌

1. Lee D.M., Weinblatt M. E. Rheumatoid arthritis Lancet 358:903-911,2001
2. Firestein G.S, Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423:356-361,2003
3. Badolato R, oppenheim J. J. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 26:526-538,1996
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 34:1125-1132,1991
5. North J, Situnayake R.D., Tikly M., Cremona A., Nicoll J., Kumaralne D.S., Nuki G. Interleukin-1b, hand and foot bone mineral content and the development of joint erosions in RA Ann. Rheum. Dis 53:543-546,1994
6. Ainola M.M., Mandelin J.A., Liliestron M.P., Li T.F., Hukkanen M.V., Kontinen Y. T., Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: Involvement of MMP-3 and interleukin-1b. Clin. Exp. Rheumatol. 23:644-650,2005
7. 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. 40:1096-1005,1997
8. 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 11:88-95,1996
9. Tanaka Y. The role of chemokine and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Drug Today 37:477-485,2001
10. 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 27:1121-1127,2000
11. Studer R., Jaffurs D., Stefanovic-Tacic M., Robbins P.D., Evans C.H. Nitric oxide in osteoarthritis 7:377-3779,1999
12. 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. 91:199-204,2003
13. 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. 59:455-61,2000
14. Jackson C. J., Arkell J., Nguyen M.

Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP(TIMP1) Ann Rheum Dis 57:157-161,1998

15. Rho, Y. G., Yu S., Cheon H-J, Sohn J. Effects of TGF-b, GM-CSF and PDGF on proliferation and expression of cytokines and metalloproteinase genes in rheumatoid synovial cells. Korean J. Immunol 20:119-127,1998