

# 祛風除濕湯의 류마토이드 관절염 치료효과에 대한 실험적 연구

홍순성 · 윤일지 · 오민석\*

대전대학교 한방재활의학과

## Study on the Effect of Geopungjeseup-tang in Rheumatoid Arthritis

Soon Sung Hong, Il Ji Yoon, Min Suck Oh\*

Department of Oriental Medicine, Oriental Rehabilitation Medicine Daejeon University

This study was carried out to know the effect of Geopungjeseup-tang(GPJST) to on Rheumatoid Arthritis by using human fibroblast-like synoviocytes(hFLS). GPJST consists of *Coisis Semen*, *Coccllus Trilobus DC.*, *Lycopi Herba*, *Arisaematis Rhizoma*. The author performed several experimetal items : that is cytotoxicity of GPJST, mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, production of NO. The results were obtained as follows : The mRNA expression of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1 were dose-dependently reduced in hFLS. The production of NO was reduced. Talking all these observations into account, GPJST is considered to be effective in treating rheumatoid arthritis. Therefore we have to survey continuously in looking for the effective substance and mechanism in the future.

Key words : Geopungjeseup-tang(GPJST), Rheumatoid arthritis

### 서 론

류마토이드 관절염은 여러 기관을 침범하는 가장 흔한 만성적인 염증성 질환의 하나로 대표적인 자가면역성 질환으로 생각되고 있다. 다양한 전신증상이 나타나기도 하나, 활액막의 염증 및 증식으로 인한 관절의 부종과 동통이 대표적인 증상으로, 진행하면 관절 연골 및 뼈, 그리고 관절 주위 조직의 파괴로 관절의 강직이나 변형이 속발될 수 있으며<sup>1)</sup> 전 세계인구의 1~2%에서 이환되고 여성이 남성보다 약 2~4배 많이 호발 된다<sup>2)</sup>.

류마토이드 관절염에 대한 연구는 최근 많은 변화가 있어 점차 유발유전자나 질병약화물질의 단백질 구조가 밝혀지고 새로운 면역조절 물질이 발견되면서 면역학적, 유전학적인 논문들이 주종을 이루고 있으며<sup>3)</sup>, 한약을 이용한 류마토이드 관절염에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>4-6)</sup>.

이제 저자는 祛風除濕湯의 류마토이드 관절염에 대한 면역조절작용을 실험적으로 규명하기 위하여, 류마티스양 관절활막세포(FLS)에 RT-PCR을 이용하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1의 유전자 발현을 측정하고, ELISA를 이용하여 NO 생성량을 측정할 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 약재

본 실험에 사용한 祛風除濕湯(이하 GPJST)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Geopungjeseup-tang(GPJST)

| 한약명          | 생약명                          | 용량(g) |
|--------------|------------------------------|-------|
| 煮苡仁          | <i>Coisis Semen</i>          | 6     |
| 木防己          | <i>Coccllus Trilobus DC.</i> | 6     |
| 澤 蘭          | <i>Lycopi Herba</i>          | 6     |
| 牛膝南星         | <i>Arisaematis Rhizoma</i>   | 6     |
| Total amount |                              | 24    |

#### 2. 방법

##### 1) 감액의 조제

祛風除濕湯 4첩에 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 GPJST 분말 12.6g 얻어 이를 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

##### 2) Human fibroblast cell(hFC)의 배양

\* 교신저자 : 오민석, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9번지 청주한방병원

· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3721

· 접수 : 2006/07/06 · 수정 : 2006/08/29 · 채택 : 2006/09/19

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심 분리 하였다. 이 tube에 DMEM {containing collagenase A(5mg/ml), DNase type I (0.15mg/ml), antibiotics (penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25 $\mu$ g/ml)}를 넣고 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 hFC를 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 배양하고, 인산완충생리 식염수(PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM-5% FBS 배양액에서 이차 배양하였다.

### 3) Fibroblast-like synoviocytes(FLS)의 배양

외과 수술로 적출된 65세의 여성 류마티드 관절염 환자의 슬관절 조직을 차가운 인산완충식염수(PBS)에 세척한 후, 가위로 잘게 잘랐다. 조직을 우태아 혈청이 포함되지 않은 차가운 DMEM 배지가 담긴 50ml 원심분리관으로 옮겨 잠시 세워둔 후 지방질과 배양액을 제거하였다. 10mg의 관절 활막 조직당 1~1.5 mg/ml의 dispase II를 포함하는 jolik's MEM을 가해 37 $^{\circ}$ C에 30분간 진탕하여 단일세포 부유액을 얻었다. 상층액을 다른 원심분리관에 옮기고 이와 동량의 5% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지를 더해 얼음에 보관하였다. Dispase 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 focoll-hypaque 용액 위에서 원심분리한 후 경계층의 세포를 분리하여 15% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 1주일씩 5회 계대하면서 살아있는 부착 세포를 류마티스양 관절활막세포(FLS)로 배양하였다.

### 4) 실험군의 분류

관절 활막 세포를 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 미처리한 관절 활막 세포를 정상군(wild type, 이하 WT), hrIL-1 $\beta$ (10U/ml)와 hrTNF- $\alpha$ (10ng/ml)를 처리한 것을 대조군(control, 이하 CT), hrIL-1 $\beta$ (10U/ml)와 hrTNF- $\alpha$ (10ng/ml)를 처리한 것에 methotrexate(10 $\mu$ g/ml)를 투여한 것을 양성대조군(CT+MTX, 이하 MTX), hrIL-1 $\beta$ (10U/ml)와 hrTNF- $\alpha$ (10ng/ml)를 처리한 것에 GPJST 추출물(100, 10 $\mu$ g/ml)을 투여한 것을 실험군(CT+GPJST, 이하 GPJST)으로 나누고 6시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

### 5) Real Time Quantitative RT-PCR의 분석

#### (1) RNA 추출

원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl<sub>3</sub>) 50 $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심 분리한 후 약 200 $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA

는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

#### (2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 $\mu$ g을 DNase I(10U/ $\mu$ l) 2U/tube를 37 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 반응한 후 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 $\mu$ l 10mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides (25pmole/25 $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l RNase inhibitor(20U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(200U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다.

이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

#### (3) Real Time Quantitative RT-PCR

Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system를 이용하여 수행하였다.

#### 6) Nitric oxide(NO) 생성량의 측정

NO 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A(0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W)와 용액 B(2% Sulfonylamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 제조하여 냉암소에 보관하고, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. rIL-6 등을 처리한 FLS 세포내의 NO를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cells씩 첨가하고, GPJST 추출물(100, 10, 1 $\mu$ g/ml)과 rIL-6를 농도별로 처리한 후 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양 상층액 100 $\mu$ l를 96 well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 $\mu$ l를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 검량 곡선은 Sodium Nitrite를 0~80 $\mu$ M 사이에서 측정하였다.

#### 7) 통계 처리

실험결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

## 성 적

### 1. TNF- $\alpha$ 유전자 발현에 미치는 영향

TNF- $\alpha$  유전자 발현에 미치는 영향에서는 정상군이 0.1201, 대조군이 1.00로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 큰 폭의 증가를 나타내었다. 이에 반해 GPJST 투여군 100, 10 $\mu$ g/ml에서는 각각 0.687, 1.052로 나타나 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 1).

### 2. IL-1 $\beta$ 유전자 발현에 미치는 영향

IL-1 $\beta$  유전자 발현에 미치는 영향에서는 정상군이 0.223, 대조군이 1.00으로 나타난 반면 GPJST 투여군 100, 10 $\mu$ g/ml의 농도

에서는 각각 0.591, 0.986으로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

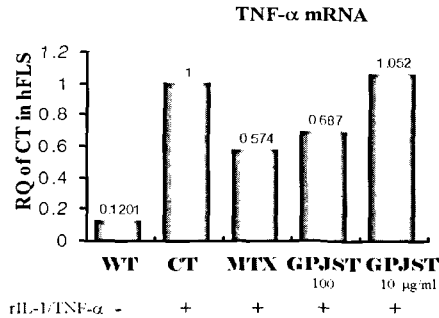


Fig. 1. Inhibitory effects of GPJST on TNF-α mRNA quantitative RT-PCR in hFLS

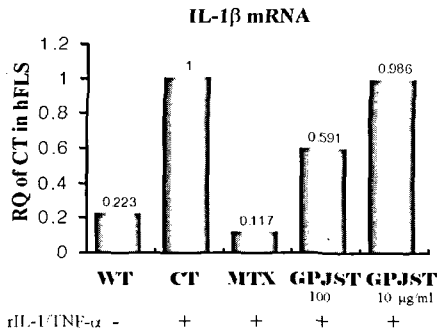


Fig. 2. Inhibitory effects of GPJST on IL-1β mRNA quantitative RT-PCR in hFLS

3. ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향

ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 정상군이 0.322, 대조군이 1.00으로 나타난 반면 GPJST 투여군 100, 10μg/ml의 농도에서는 각각 0.673, 0.967로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

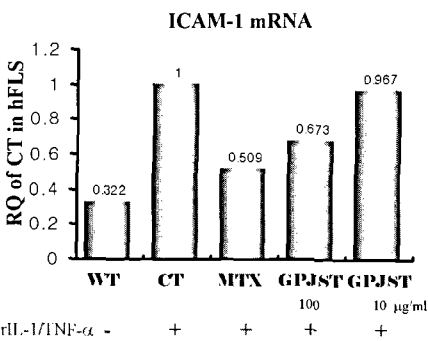


Fig. 3. Inhibitory effects of GPJST on ICAM-1 mRNA quantitative RT-PCR in hFLS

4. NO 생성량에 미치는 영향

NO 생성량에 미치는 영향에서는 정상군이 0.102±0.019, 대조군이 0.676±0.060으로 나타난 반면 GPJST 투여군 100, 10, 1μg

/ml의 농도에서는 각각 0.421±0.090, 0.452±0.015, 0.615±0.047로 나타나 100μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

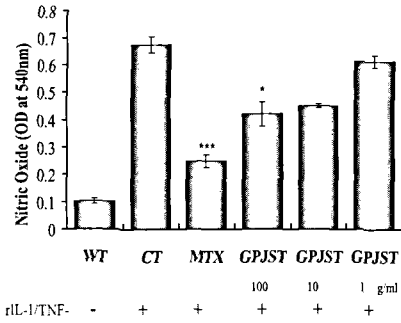


Fig. 4. Inhibitory effect of GPJST on the NO production in hFLS

고 찰

류마티드 관절염은 여러 기관을 침범하는 가장 흔한 만성적인 염증성 질환의 하나로 대표적인 자가면역성 질환으로 생각되고 있다. 다양한 전신증상이 나타나기도 하나, 본 질환의 대표적인 증상은 대칭적으로 말초 관절을 침범하는 지속적인 염증성 활액막염이다<sup>1)</sup>.

류마티드 관절염의 직접적인 원인은 아직 규명되지 않고 있으며, 발병기전 및 병태생리도 여러 방법으로 연구되고 있으나 류마티드 관절염의 예방법이나 관절염이 발병하였을 때 궁극적으로 관절염을 근절시키는 획기적인 방법이 아직 없다. 현재 사용되는 치료법으로는 크게 약물 치료, 외과적 수술 치료, 재활 및 물리 요법으로 나눌 수 있다<sup>9)</sup>.

한의학적 관점에서의 류마티드 관절염은 血虛風襲, 熱爲濕鬱, 風寒濕相搏의 원인으로 인해 발생하며, 관절이 紅腫灼熱하고 疼痛이 극심하여 활동이 곤란한 熱邪偏盛型, 관절이 紅腫疼痛하면서 發熱, 頭重感을 호소하는 濕熱積蒸型, 관절이 시리면서 아프지만 통증보다는 시린 증상을 더 호소하는 寒濕偏盛型, 관절통이 있지만 浮腫은 미약한 氣血兩虛型으로 분류하여 공통적으로 祛風通絡의 治法을 사용함과 동시에 각각 清熱解毒, 清化濕熱, 散寒祛濕, 補氣活血의 治法을 사용하여 치료한다<sup>10)</sup>.

한의학 분야에서 류마티드 관절염에 대한 실험적 연구로 adjuvant 유발 동물병태<sup>6-8)</sup>, collagen 유발 동물병태 등<sup>11-14)</sup>이 있으며, 최근엔 동물병태 실험에서 탈피 점차 hFLS를 이용한 실험이 증가하고 있다. 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 소견을 비교하는데서 발전하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다<sup>16)</sup>.

이에 저자는 류마티드 관절염에 임상적으로 활용되는 祛風除濕湯의 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 류마티드 관절염 환자의 관절활막세포(hFLS)이용하여 면역조절작용을 살펴 보았다.

본 실험에서 祛風除濕湯(GPJST)의 RT-PCR을 이용한 hFLS에서의 TNF-α, IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 모두 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소를 나타내었다

(Fig. 2-5).

이는 최근까지 다수의 연구에서 특히 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등 염증 매개성 cytokine이 관절 질환의 발현에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되고 있으며, 이들 염증 매개성 cytokine의 증가는 류마티스 관절염이나 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등 좀 더 관절 침습적이고 진행성인 질환에서 현저하다<sup>16,17)</sup>는 연구결과와 일치하였다.

ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 6).

ICAM-1은 염증반응의 주요한 표식자로 알려져 있으며<sup>16)</sup>, 염증반응 시 IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  및 LPS(lipopolysaccharide) 등과 같은 cytokine들의 자극에 의해 다양한 세포에서 표현이 증가되고<sup>18)</sup>, 대표적인 내피세포의 유착분자로서 염증 시 백혈구의 유착에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

NO는 세포 내부에서 생성되는 산소 radical로서 포유류에서는 많은 생리현상의 조절에 관계하는 것으로 알려져 있다. NO는 체내에서 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 산화과정에서 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 생성된다<sup>62,63)</sup>. 관절연골에서도 cytokine과 리포다당질에 의하여 NO의 합성이 대량으로 유도될 수 있는데<sup>20)</sup>, 유도된 NO는 연골세포의 증식을 억제하고 단백질의 생산을 감소시킨다. 다량의 NO는 또한 다른 산소 radical이 없는 상태에서도 연골세포의 세포사멸(apoptosis)을 유발할 수 있다<sup>16)</sup>.

이상의 결과로 보아 祛風除濕湯이 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용이 있어 류마티스 관절염 치료에 유효할 것으로 생각되며, 향후 임상적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

祛風除濕湯의 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용을 규명하기 위하여, 류마티스관절활막세포(FLS)에 RT-PCR을 이용하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1의 유전자 발현을 측정하고, ELISA를 이용하여 NO 생성량을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제되었다. NO 생성량에 영향에서는 대조군에 비하여 100 $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있게 감소하였다.

이상의 결과로 보아 祛風除濕湯이 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용이 있어 류마티스 관절염 치료에 유효할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학, 서울, 최신의학사, p 175, 1999.
2. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학, 서울, 도서출판정담, pp 179, 1783, 1779-1785, 1997.
3. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논

- 문의 경향, 대한침구학회지, 19(5):190-194, 2002.
4. 이중휘. Type II Collagen으로誘發된關節炎에 대한 疏經活血湯加味の 免疫抑制效果, 대전대학교대학원, 2004.
5. 諸正鎮. 血府逐瘀湯이 Adjuvant誘發關節炎에 미치는影響, 경희대학교대학원, 1993.
6. 申敏湜. 防風湯이 Adjuvant誘發關節炎에 미치는影響, 경희대학교대학원, 1994.
7. 金荀中. Adjuvant관절염에 疎經活血湯合黃連解毒湯이 미치는實驗的 研究, 대전대학교대학원, 1992.
8. 李世鉉. 行濕流氣散이 Adjuvant關節炎에 미치는影響, 대전대학교대학원, 1992.
9. 김성윤. 류마티스 관절염의 진단과 치료, 가정의학학회지, 18(11):1279-1290, 1997.
10. 전국한의과대학재활의학과학교실. 동의재활의학과학, 서울, 서원당, pp 111-116, 1995.
11. 곽준문. 疎風活血湯加味가 류마티스關節炎患者에서分離한 synoviocytes에 대한 免疫反應과 collagen으로誘發된 생쥐의關節炎抑制에 관한 研究, 대전대학교대학원, 2002.
12. 申炳熙. 桂枝芍藥知母湯이 第II型 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는影響, 경희대학교대학원, 1994.
13. 李昊根. 大羌活湯이 제II형 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는影響, 경희대학교대학원, 1994.
14. 정수현. 三痺湯이 Collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향, 한방재활의학과학회지, 10(1):173-183, 2000.
15. Waddington, R.J., Moseley, R., Embery, G. Reactive oxygen species : a potential role in the pathogenesis of periodontal disease, Oral Dis, 6:138-151, 2000.
16. Ribbens, C., Andre, B., Kaye, O., Kaiser, M.J., Bonnet, V., de Groote, D., Franchimont, N., Malaise, M.G. Increased synovial fluid levels of interleukin-12, sCD25 and sTNF-RII/sTNF-RI ratio delineate a cytokine pattern characteristic of immune arthropathies, Eur Cytokine Newt, 11:669-676, 2000.
17. Schlaak, J.F., Pfers, I., Meyer, Zum, Buschenfelde, K.H., Marker-Hermann, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patient with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies, Clin Exp Rheumatol, 14:63-88, 2002.
18. Dustin, M.L., Singer, K.H., Tuck, D.T., Springer, T.A. Expression of the lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by INF- $\gamma$  and is mediated by ICAM-1, J Exp Med, 167:1323, 1988.
19. Shapel, S.B., Toman, C., Anderson, D.C. MAC-1(CD11b/CD18) mediates adherence dependant hydrogen peroxidase production by human and canine neutrophils, J immunol, 144:2702, 1990.
20. Halliwell, B. Oral inflammation and reactive species : a missed opportunity, Oral Dis, 6:136-137, 2000.