

원 저

加味疎風活血湯이 human fibroblast-like synoviocytes 내 염증 유발 cytokine과 전사인자에 미치는 영향

양동원, 오민석, 김동희¹⁾

대전대학교 한의과대학 재활의학교실, 대전대학교 한의과대학 병리학교실¹⁾

Inhibitory Effect of *Kamisopunghwalhyeol-tang* (*Jiaweishufenghuoxie-tang*) on Inflammatory Cytokine Production and NF- κ B and AP-1 Activation in Cultured Human Fibroblast-like Synoviocytes

Yang Dong-Won, Oh Min-Seok, Kim Dong-Hee¹⁾

Department of Rehabilitation, Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University¹⁾

Objective : This study was carried out to investigate the effects of *Kamisopunghwalhyeol-tang* (*Jiaweishufenghuoxie-tang*; Kami-SPHHT) on the immunity responses of the synoviocytes isolated from the patients on rheumatoid arthritis.

Methods : Cells were stimulated by Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α in the presence or absence of Kami-SPHHT, and then induced cytokine mRNA levels were determined by RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR.

Results : Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, and NOS II mRNA expressions significantly decreased in Kami-SPHHT treated cells compared to non-treated control cells. Also, DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1 decreased in Kami-SPHHT treated hFLSs.

Conclusion : These results suggest that Kami-SPHHT may be involved in anti-inflammatory reactions by inducing cytokine gene expression in synoviocytes, and further *in vivo* examination on its efficacy can provide potential application for the treatment of rheumatoid arthritis. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(3):84-95)

Key Words: Rheumatoid arthritis, *Kamisopunghwalhyeol-tang* (Kami-SPHHT), Human fibroblast-like synoviocytes, Inflammatory cytokine, NF- κ B, AP-1

서 론

류마티오이드 관절염은 만성관절염 중 골관절염 다
음으로 흔히 볼 수 있는 질환으로, 관절내의 활막, 연
골과 주위 조직의 염증반응을 병변으로 하며 관절
이외에도 여러 장기를 침범하는 만성 전신성 염증질
환이다¹⁾.

· 접수 : 2003년 4월 24일 · 논문심사 : 2003년 5월 1일
· 채택 : 2003년 6월 23일
· 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동 대전대학교 한
의과대학 병리학교실
(Tel: 042-280-2623, E-mail: dhkim@dju.ac.kr)

한의학에서 류마티드 관절염은 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風, 痛痺, 痺症 등의 범주에 속한다²⁵⁾고 볼 수 있으며, 주로 인체의 正氣가 허한 상태에서 肌肉 經絡이 風寒濕 邪氣의 침범으로 기혈 운행이 不暢하게 되어 발생하며 治療法으로는 祛風, 散寒, 除濕, 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡 및 滋補肝腎 등²⁷⁾이 활용되고 있다.

본 시료의 기본방인 疎風活血湯은 沈⁸⁾의 《沈氏尊生書》에 “或由風濕與痰, 與死血, 致走注刺痛, 其痛處或腫或紅, 則必宜邪通氣, 宜疎風活血湯”이라 기재된 이후, 《東醫寶鑑》⁹⁾과 《證脈方藥合編》¹⁰⁾에 “治四肢百節流注刺痛, 皆是風濕痰死血所致, 其痛處或腫或紅”이라 하여 臨床의으로 류마티드 관절염에 활용 가능한 처방이다.

疎風活血湯에 대한 실험적 연구로는 윤¹¹⁾은 신장 기능을 향상시키며, 양¹²⁾은 신경독성을 방어하고, 남 등^{13,14)}은 관절염에 소염, 진통의 효과가 있으며, 안¹⁵⁾은 류마티드 관절염에 혈액학적 유의성이 있음을, 광¹⁶⁾은 류마티드 관절염의 면역 조절과 collagen 유발 관절염의 억제 효과가 있음을 보고하였다.

이에, 저자는 RA에 대한 부작용이 없는 새로운 생물학적 치료 물질을 개발하기 위한 연구로 疎風活血湯加味方¹⁷⁾에 祛風濕, 通經絡하는 豨薟¹⁸⁾을 가미한 加味疎風活血湯을 시료로 human fibroblast-like synoviocytes (이하 hFLSs)에서 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , COX-2 및 NOS II 유전자 발현을 측정하고, 전사물질인 NF- κ B 와 AP-1 binding activity에 대하여 DNA-binding 활성을 측정하였다.

방 법

1. 재료

1) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7,-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete

adjuvant, chloroform, RPMI -1640 培養液, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 牛胎兒血清 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, agarose (FMC, U.S.A), propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, rhIL-1 β , rhTNF- α 는 R & D system 社 (Minneapolis, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 熱湯抽出器 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Buchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A) 등을 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 加味疎風活血湯의 처방 구성은 대전대학교 부속한방병원 처방집¹⁷⁾에 준하였으며, 본 처방에 豨薟 8g을 가하였다. 사용한 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

3) 加味疎風活血湯 추출물 분리

加味疎風活血湯(이하 Kami-SPHHT로 지칭)은 3첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480,

Prescription of *Kamisopunghwalhyeol-tang*(Kami-SPHHT)

韓藥名	生藥名	用量(g)	韓藥名	生藥名	用量(g)
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4	蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4	羌活	<i>Angelicae koreande Radix</i>	4
威靈仙	<i>Clendtidis Radix</i>	4	桂皮	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4
白芷	<i>Angelicae davuricae Radix</i>	4	紅花	<i>Carthami Flos</i>	1.2
防己	<i>Sinomenii Radix</i>	4	秦朮	<i>Lycocotoni Radix</i>	6
黃栢	<i>Phellodendri Cortex</i>	4	龜板	<i>Testudinis Carapax</i>	4
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	4	生薑	<i>Zizyphi inermis Fructus</i>	20
南星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	4	獐齒	<i>Siegebeckia glabrescens</i>	8
Total amount					83.2

Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 21.5g Kami-SPHHT를 냉동 (-84℃) 보관 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

충남대학교 의과대학 부속병원에서 류마티오이드 관절염환자의 synovial tissue를 공급 받아 synovial membrane 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 RPMI1640 {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillinm 10⁴U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가해 30분간 계속 배양한 후 PBS로 약 2 회 1,500rpm에서 spin하고 RPMI1640-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% Trypsin-0.2% EDTA로 hFLSs를 분리하여 RPMI1640-5% FBS 배양액에 10⁶cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 분주하였다.

2) hFLSs의 역전사-중합효소 연쇄반응

(1) RNA 추출

먼저 hFLSs는 24 well plate에 1 x 10⁶ 세포로 분주 하였다. 여기에 Kami-SPHHT (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1β (10 U/ml)와

hrTNF-α (100 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양하고 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol[®] 500 µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여

M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/µl)와 antisense primer (20 pmole/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 µl Taq polymerase (5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 °C, 5분, denaturation; 95 °C, 5분, annealing; 55 °C, 1분, elongation; 72 °C, 1분을 25 cycles 한 뒤 post-elongation을 72 °C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

3) Real-time quantitative PCR 분석

(1) RNA extract and cDNA 합성

hFSLs 2x10⁶ 세포를 12 well plate에 분주한 후 우태 아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight 시켰

다. Kami-SPHHT(100 µg/ml, 10 µg/ml)를 처리하고 1 시간 후 hrIL-1β (10 U/ml)와 hrTNF-α (100 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 동시 배양한 후 상층액을 제거하고, RNAzolB를 이용하여 hFSLs막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 분리된 total RNA는 DEPC를 처리한 20 µl의 증류수에 녹인 후 DNase I (3U/tube)을 처리하여 37 °C의 항온 수조에서 1시간 배양하고, 72 °C의 heating block에서 10분간 불활성시킨 후 cDNA를 합성하였다.

(2) SYBR Green I with the Smart Cycler® System

Real-time PCR의 조건은 Taq Buffer : 75 µl, 25mM MgCl₂ : 105 µl, 2.5mM dNTP : 60 µl, 15uM S1 Primer : 15 µl, 15uM A1 Primer : 15 µl SYBR Green I(1/3,000) : 75ul, EX Taq(5u/µl) : 7.5 µl를 혼합하여 14 µl와 template 3 µl, 그리고 증류수 8 µl를 혼합하여 PCR를

Real-time PCR specific primers

Gene	Primer sequences	Size of products(bp)
IL-1β	5-AGCTTGGTCCAGAGTGAAAA-3 5-GAGGCAGAACCATGAGATAT-3	180
IL-6	5-CACITTTGGGAATCTTTCCAT-3 5-GTGAGTTGAGAAGCTACAGA-3	160
TNF-α	5-CTGGTGAAGCTTGCATCAC-3 5-GGAACAATCCAGCAGCCGAG-3	150
COX-2	5-GGAACAATGAAGCAGCCGAG-3 5-GTAGAGTGAATGTCAGTGT-3	140
NOS-II	5-GGCCTGCTTTTTACCTCAGA-3 5-ATAGGCAAACCTTCAGCTAG-3	139

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Sequence
IL-1β	sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAA-3'
	antisense	5'-AGCCCATGAGTTCCATTAC-3'
IL-6	sense	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'
	antisense	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
TNF-α	sense	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGT-3'
	antisense	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
COX-2	sense	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	antisense	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'
NOS-II	sense	5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'
	antisense	5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'
β-actin	sense	5'-TGGAATCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

기록하였다. 94℃에서 5초, 60℃에서 20초, 72℃에서 5초를 한 cycle로 하여 40 cycle을 관찰하였다.

(3) Smart Cycler® System

Smart Cycler® Unit(16개의 I-CORE™ Module 장착)이다.

4) Electromobility shift assay (EMSA)

(1) 세포 배양 및 약물처리

hFLSs를 6 well plate, 각 well에 1x10⁷ 세포씩 분주하고 우태아혈청결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight하였다. Kami-SPHHT(100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml)를 처리하였고, 약물 처리 1시간 후 hrIL-1β (10 U/ml)와 hrTNF-α (100 ng/ml)를 15분간 동시 배양하였다.

(2) Nuclear extract

배양한 세포를 4℃에서 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 생리식염수로 수세하였다. 이 세포에 3배 부피의 완충용액 A (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.8)를 첨가하고 얼음에 10분간 방치한 후 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 여기에 다시 완충용액 A를 가하고 0.1% 농도가 되도록 NP-40을 첨가한 후 Dounce homogenizer B pestle을 이용하여 세포를 마쇄·균질화하고 4℃ 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 세포에 완충용액 C (20 mM HEPES, 25% Glycerol, 0.35 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)를 2.5 ml 첨가하고 4℃에서 12,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리한 다음 상등액을 회수하여 18시간 50배 부피의 완충용액 D (20 mM HEPES, 20% glycerol, 0.2 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)에서 투석하였다. 투석된 시료를 4℃에서 12,000 rpm으로 1시간 원심 분리한 후 상등액을 회수하였다.

(3) Gel mobility shift assay

EMSA를 위한 gel shift oligonucleotide 염기배열은 다음과 같다: Annealing이된 NF-κB; 5'-GGCAACT-GCTCACTCTCCCTTT-3' 와 AP-1; 5'-TGACTCA-

3', probe 2 µl, polynucleotide kinase 2 µl, kinase buffer 1 µl, 32P γ-dATP 3 µl, D.W 12 µl를 넣고 혼합한 다음 37℃ heating block에서 1시간 방치한 후 짧게 원심 분리하였다. 원심분리 후 1x TE buffer 100 µl를 넣고 혼합하고, sephadax G50 column에서 1,800 rpm에서 5분간 원심분리하여 hot probe 100 µl의 hot probe를 얻어 probes로 사용하였다. DNA와 핵단백질과의 결합 반응은 20 µg의 nuclear extract, 2 µg의 poly (dI-dC)가 들어있는 반응액 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 250 µg/ml BSA)에 competitor를 첨가하거나 첨가하지 않고 얼음 위에서 30분간 반응시키고 미리 준비한 각각의 labelled-probe들 (0.5-1.0 ng, 100,000-2,000,000 cpm)을 첨가한 후 다시 30분간 얼음 위에서 반응시켰다. 여기에 6% polyacrylamide gel을 20분간 prerun을 하여 반응액을 loading 한 다음 150 V, 10 mA로 3시간 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue (BPB) dye가 밑으로부터 1-2 cm 정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추고 이를 vacuum gel dryer (Bio-Rad)에서 약 한 시간 건조한 다음 X-ray film에 노출시켜 감광시켰다.

결 과

1. 활액막세포의 염증 유발 cytokine에 미치는 영향
1) IL-1β에 미치는 영향

RT-PCR 분석에서는 Kami-SPHHT가 100, 10, 1 µg/ml의 농도에서 유전자 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 1). Real-time quantitative RT-PCR 분석에서는 PCR 33 cycles에서 hFLSs에 비하여 대조군(IL-1β와 TNF-α 처리군)이 약 70배의 FI 값이 관찰되었고, Kami-SPHHT 처리한 실험군은 대조군에 비하여 100 µg/ml에서 100%, 10 µg/ml에서 50%에 가깝게 IL-1β mRNA 발현이 억제되었다(Fig. 2).

2) IL-6에 미치는 영향

RT-PCR 분석에서는 이 역시 100, 10, 1 µg/ml의 농도의 Kami-SPHHT 투여군에서 유전자 발현을 감소시켰다(Fig. 3). Real-time quantitative RT-PCR 분석에

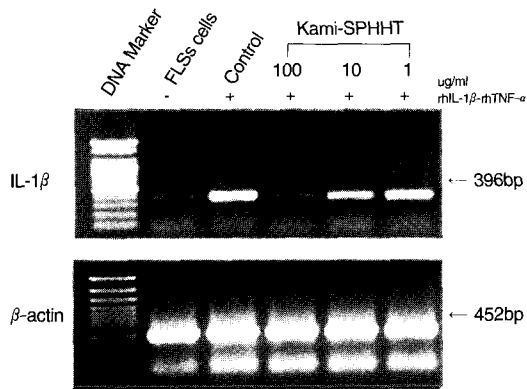


Fig. 1. Inhibitory effects of Kami-SPHHT on IL-1 β gene expression in hFLSs. Human FLSs were cocultured with *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal- hyeol-tang (Kami SPHHT) isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+rhTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed as described in *Materials and Methods*.

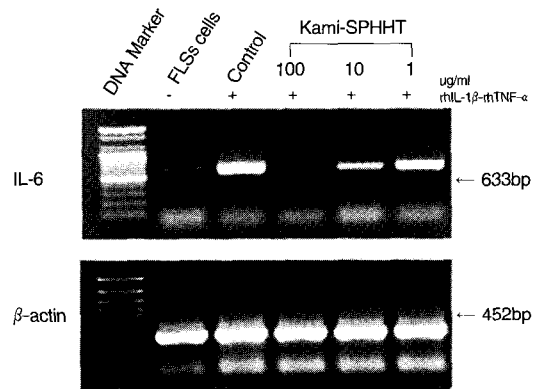


Fig. 3. Inhibitory effects of Kami-SPHHT on IL-6 gene expression in hFLSs.

서는 PCR 33 cycles에서 hFLSs에 비하여 대조군(IL-1 β 와 TNF- α 처리군)이 약 3배의 FI값이 관찰되었고, Kami-SPHHT 투여군은 대조군에 비하여 100 μ g/ml에서 50%에 가깝게 IL-6 mRNA 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

3) TNF- α 에 미치는 영향

RT-PCR 분석에서는 100, 10, 1 μ g/ml의 농도의

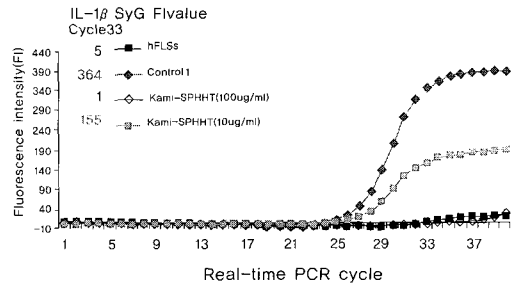


Fig. 2. Effects of Kami-SPHHT on quantitative real-time PCR of IL-1 β gene expressed using SYBR Green I dye. Human FLSs were cocultured with Kami-SPHHT isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+hrTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr. The graphic show the evolution of the fluorescent Intensity signal related cycle number on a panel of quantified hrIL-1 β mRAN expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Kami-SPHHT; *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal-hyeol-tang(100, 10 μ g/ml)

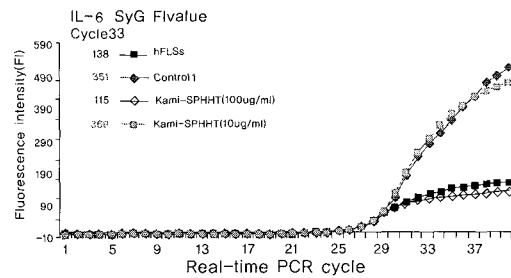


Fig. 4. Effects of Kami-SPHHT on quantitative real-time PCR of IL-6 gene expressed using SYBR Green I dye. Human FLSs were cocultured with Kami-SPHHT isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+hrTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr. The graphic show the evolution of the fluorescent Intensity signal related cycle number on a panel of quantified IL-6 mRAN expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Kami-SPHHT; *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal-hyeol-tang(100, 10 μ g/ml)

Kami-SPHHT 투여군에서 유전자 발현을 감소시켰다 (Fig. 5). Real-time quantitative RT-PCR 분석에서는 PCR 33 cycles에서 hFLSs에 비하여 대조군(IL-1 β 와 TNF- α 처리군)이 약 4배의 FI 값이 관찰되었고,

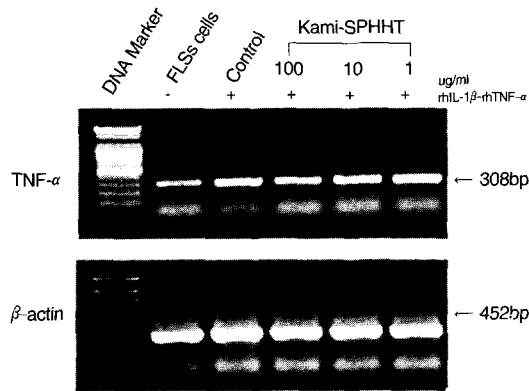


Fig. 5. Inhibitory effects of Kami-SPHHT on TNF- α gene expression in hFLSs.

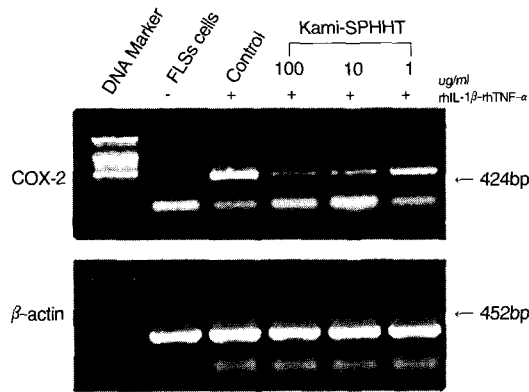


Fig. 7. Inhibitory effects of Kami-SPHHT on COX-2 gene expression in hFLSs.

Kami-SPHHT 투여군은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 내외로 TNF- α mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 6).

4) COX-2에 미치는 영향

RT-PCR 분석에서는 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 Kami-SPHHT 투여군이 유전자 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 7). Real-time quantitative RT-PCR 분석에서는 PCR 33 cycles에서 hFLSs에 비하여 대조군(IL-1 β 와 TNF- α 처리군)이 약 1.5배의 FI값이 관찰되었고, Kami-SPHHT 투여군은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 내외로 COX-2 mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 8).

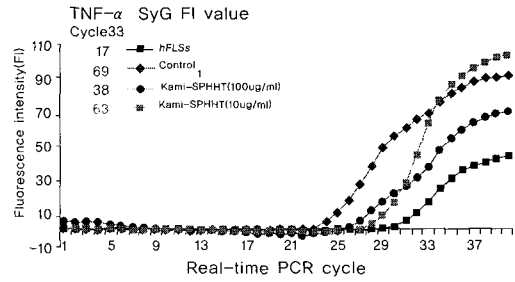


Fig. 6. Effects of Kami-SPHHT on quantitative real-time PCR of TNF- α gene expressed using SYBR Green I dye.

Human FLSs were cocultured with Kami-SPHHT isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+hrTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr.

The graphic show the evolution of the fluorescent Intensity signal related cycle number on a panel of quantified TNF- α mRAN expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Kami-SPHHT; *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal-hyeol-tang(100, 10 ug/ml)

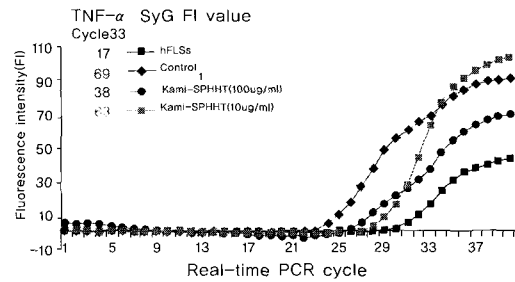


Fig. 8. Effects of Kami-SPHHT on quantitative real-time PCR of COX-2 gene expressed using SYBR Green I dye.

Human FLSs were cocultured with Kami-SPHHT isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+hrTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr.

The graphic show the evolution of the fluorescent Intensity signal related cycle number on a panel of quantified COX-2 mRAN expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Kami-SPHHT; *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal-hyeol-tang(100, 10 ug/ml)

5) NOS- II 에 미치는 영향

RT-PCR 분석에서는 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 Kami-SPHHT 투여군에서 유전자 발현을 감소시켰다 (Fig. 9). Real-time quantitative RT-PCR 분석에서는

PCR 33 cycles에서 hFLSs에 비하여 대조군(IL-1 β 와 TNF- α 처리군)이 약 15배의 FI값이 관찰되었고, Kami-SPHHT 투여군이 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 거의 50% 내외의 NOS-II mRNA 발현을 억제시켰다(Fig. 10).

2. NF- κ B binding activity에 미치는 영향

NF- κ B binding activity와 AP-1 binding activity에 미치는 영향은 모두 대조군에 비하여 Kami-SPHHT 투여군에서 DNA-binding 활성이 억제되었다(Fig. 11).

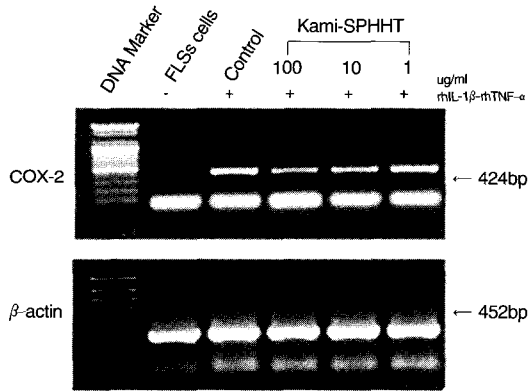


Fig. 9. Inhibitory effects of Kami-SPHHT on NOS-II gene expression in hFLSs.

고찰

류마티오이드 관절염 (rheumatoid arthritis : RA)은 원인 불명의 만성 전신성 다발 장기 질환이고 膠原性疾患 (connective tissue disease)의 일종으로 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절 연골과 그 주

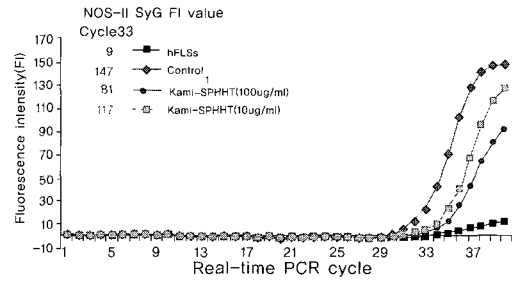


Fig. 10. Effects of Kami-SPHHT on quantitative real-time PCR of NOS-II gene expressed using SYBR Green I dye.

Human FLSs were cocultured with Kami-SPHHT isolated from hFLSs pretreated with hrIL-1 β (10 U/ml)+hrTNF- α (100 ng/ml) for 6 hr.

The graphic show the evolution of the fluorescent Intensity signal related cycle number on a panel of quantified NOS-II mRAN expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Kami-SPHHT; *Siegebeckia glabrescens* plus So-pung-hwal-hyeol-tang(100, 10 $\mu\text{g/ml}$)

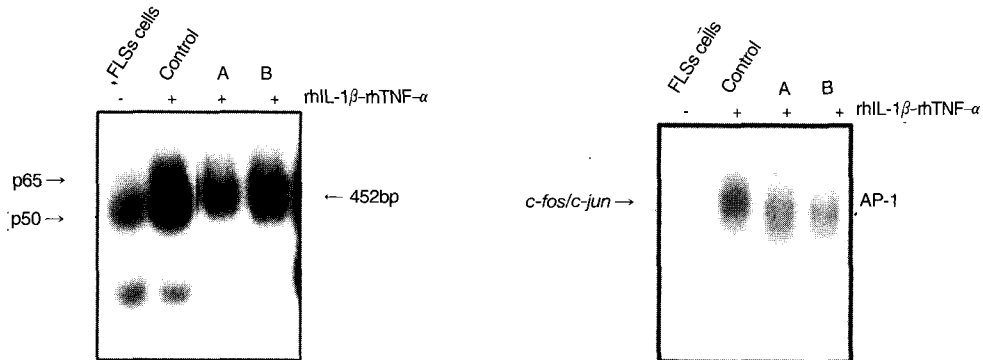


Fig. 11. Effects of Kami-SPHHT on DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1 in hFLSs.

Human FLSs were pretreated with various concentration of Kami-SPHHT (100 $\mu\text{g/ml}$, A and 10 $\mu\text{g/ml}$, B) in the presence or absence of rhIL-1 β (10 U/ml) plus rhTNF- α (100 ng/ml) for 6 h. Nuclear extracts from hFLSs were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels. Electrophoretic mobility shift assay by NF- κ B and AP-1 binding activity.

위 조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 동통이 초래되며, 점차 특징적인 관절변형 및 강직이 유발된다¹⁾.

류마티오이드 관절염의 병인과 병태에 대해서 아직은 명확한 결론이 없지만, 최근 면역학과 분자생물학의 발전으로 가장 지지를 받는 이론은 자가면역 반응이며 초기 병변으로 미세혈관의 손상과 활막 세포의 수적 증가가 특징적이다^{1),5),6)}.

관절염은 한의학적으로 歷節風, 鶴膝風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 痛痺, 痺痛, 痺症, 風痺, 痺證 등의 범주에 속한다²⁾고 볼 수 있다.

《素問·痺論》³⁾에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕外邪가 痺證의 중요한 원인이라고 언급했으며, 《外臺秘要方》⁴⁾에서는 “白虎病者 大都是風寒暑濕之毒 因虛所致 將攝失裏受 此風邪 經脈結滯 血氣不行 畜於骨節之間 或在四肢”라 하였고, 《三因方》⁵⁾에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보았다. 또한 《醫學入門》⁶⁾에서는 “痛風…形怯瘦者 多內因 血虛有火 形肥勇者 多外因 風濕生痰 以其循歷遍身 曰歷節風 甚如虎咬 曰白虎風”, “痛多痰火 腫多風濕然”, “鶴膝風…三陰虧損 風邪入 亦有虛火 陰血枯 所以痢後 多此疾.”라 하였고, 《景岳全書》⁶⁾에서는 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得而 勝之而爲痺”라 하였으며, 最近文獻인 《實用中醫內科學》⁷⁾에서는 肝腎虧損, 邪氣侵入, 氣血瘀阻 등으로 보았다.

약물요법 중 특정한 방제가 류마티오이드 관절염에 대해 미치는 영향에 관한 실험적 연구로는 血府逐瘀湯⁸⁾, 防風湯²⁰⁾, 桂枝芍藥知母湯²¹⁾, 大羌活湯²²⁾, 白虎湯과 白虎加桂枝湯²³⁾등이 있는데, 이러한 연구 동향들은 초기의 단순한 혈액학적, 혈청학적, 육안적 소견을 비교하는데서 탈피하여 점차 면역학적 효능을 검증하려는 경향을 보이고 있다.

疎風活血湯은 沈⁹⁾의 《沈氏尊生書》에 “或由風濕與痰, 與死血, 致走注刺痛, 其痛處或腫或紅, 則必宣邪通氣, 宜疎風活血湯”이라 기재되어 있고, 許⁹⁾의 《東醫寶鑑》에는 “治四肢百節流注刺痛, 皆是風濕痰死血所致, 其痛處或腫或紅”이라 하여 痺證을 다스리는데 있어서 祛風活血시킬 목적으로 활용되어 왔다.

疎風活血湯에 대한 실험적 보고로는, 윤¹¹⁾은 요량 및 전해질 배설량의 증가와 신사구체 여과율을 증가시켜 신장기능의 향상에 영향을 미친다고 하였고, 양¹²⁾은 산소자유기 억제에 의한 신경독성을 방어하는 효과가 있어 척수 감각 신경세포의 활성을 증가시키고 산화적 손상을 억제함을 보고하였다. 관절염과 관련된 실험적 보고로는 남¹³⁾과 김¹⁴⁾은 歷節風에서의 소염, 진통, 해열 효과를 실험적으로 규명하였고 안¹⁵⁾은 류마티오이드 관절염 환자에 대하여 ESR, CRP, RBC 등의 유의성 있는 변화를 보고하였으며, 疎風活血湯 약침을 이용하여 김²⁴⁾과 송²⁵⁾은 Adjuvant 관절염에서 CRP, 혈청중 총단백, globulin, albumin, anti-streptolysin의 변화에 유의함을, 광¹⁶⁾은 疎風活血湯加味가 면역조절과 collagen 유발 관절염에 억제 효과가 있음을 보고하였다.

이와 같이 疎風活血湯이 류마티오이드 관절염에 유효하게 사용되고 있는 처방으로 그 효과가 임상적으로 입증되고 있으며 실험적 연구로도 유의한 결과가 보고되고 있지만, 최근의 류마티오이드 관절염에 대한 연구 동향에서 보여지는 자가면역적 병리 기전에 기초한 면역 조절작용에 관한 연구는 부족한 실정이다.

가미된 豨蠃에 대한 실험적 보고로 오²⁶⁾는 豨蠃에 steroid 成分이 포함되어 있고, 金²⁷⁾은 豨蠃이 고지혈증에 유효하며, 李²⁸⁾ 등은 豨蠃地骨皮湯의 약침 자극 및 경구투여가 고혈압 및 고지혈증에 효과가 있음을 보고하였다.

이에 저자는, 疎風活血湯이 자가면역질환인 류마티오이드 관절염에 임상적으로 유효한 효과를 보이고 있는 점에 착안하여 류마티오이드 관절염의 치료제로서 대전대학교한방병원에서 다용되는 疎風活血湯加味方에 豨蠃을 가하여 면역학적 효과를 실험적으로 규명하고자, human fibroblast-like synoviocytes에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, NOS II 유전자 발현을 측정하였고, 전사물질인 NF- κ B, AP-1 binding activity에 대하여 DNA-binding 활성을 측정하였다.

Cytokine은 임상 시험에서 생물학적 치료제 중 가장 큰 군을 이루고 interferons, interleukin, 조혈 성장인자를 포함하며 수용성의 단백질 또는 당단백질로

세포표면의 수용체에 결합해서 매우 소량으로 세포의 분화, 증식과 작용에 영향을 주는데, 이 중에서 백혈구와 백혈구 사이에서 signal을 전달하는 인자를 interleukin(IL)이라 한다²⁹⁾.

TH 임파구는 생성하는 lymphokine 종류의 차이에 의해 다시 TH1과 TH2의 2가지 아집단으로 구분되며, TH 임파구에서 생성되는 interleukin은 지금까지 연구된 보고에 의하면 IL-2, IFN- γ , lymphotoxin 등은 TH1 세포에서 생산되고 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등은 TH2 세포에서 생산되며, IL-3, TNF- α 및 GM-CSF 등은 TH1 및 TH2 모두에서 생산되는 것으로 알려져 있다³⁰⁻³²⁾.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 대표적인 염증유발 cytokine으로 활막 조직의 염증에 관련된 cytokines는 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 등이 있으며 활액의 염증에 관련되는 것은 IL-1, IL-8, TNF- α , INF- γ 등이 있고 IL-1, TNF- α , TNF- β , IGF 등은 활막의 증식에 관여한다³¹⁻³⁵⁾.

이 중 IL-1은 섬유아세포, 연골세포, 골과피세포, 활막세포, 근세포 등에 작용해서 각종의 단백질 분해효소를 만들게 하며 조직구축의 파괴를 유도하고, 신경계의 세포에 작용해서 발열을 일으켜 식욕부진과 수면작용을 야기하는데³¹⁾, 본 실험에서는 加味疎風活血湯 투여군이 RT-PCR과 real-time quantitative RT-PCR 정량 실험에서 모두 유의성있는 결과를 나타내었다(Fig. 1,2). 특히 real-time quantitative RT-PCR 정량 실험에서는 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 거의 100%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% IL-1 β mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 2).

IL-6는 항원, IL-4, IL-5에 의해 활성화되어 증식하는 B임파구 분화의 최종시기에 작용해서 분비형의 항체를 다량 생성시키며, T임파구의 증식과 분화를 유도해서 혈액간세포와 형질세포를 증식시키는 등의 다양한 생물활성을 나타낸다³²⁾. 加味疎風活血湯이 hFLSs IL-6 유전자에 미치는 영향에서는 이 역시 RT-PCR 실험에서 농도의존적으로 유전자 발현이 억제되었고(Fig. 3), real-time quantitative RT-PCR 정량 실험에서도 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 거의 50% IL-6 mRNA 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다

(Fig. 4).

TNF- α 는 주로 활성화된 macrophage에 의하여 생성되는 염증성 cytokine으로써 세포성 면역 반응에 중요한 역할을 하고, 숙주의 다른 cytokines의 생성을 증가시키며 또한 류마티드 관절염의 중요한 병인 중의 하나로 작용하는데³³⁻³⁵⁾, 본 실험에서 TNF- α 유전자에 미치는 영향은 加味疎風活血湯 투여군에서 감소하였다(Fig. 5).

Real-time quantitative RT-PCR로 정량 실험에서도 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 내외로 TNF- α mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 6).

NO는 혈관 평활근의 이완을 조절하고 혈소판과 백혈구가 혈관벽에 부착하는 것을 방지하며, 신경전달물질로서 작용하는 등 생리적인 항상성 유지에 기여하는 반면³⁶⁾, 활동성 류마티스 관절염에서는 골흡수를 증진시키고 연골세포의 apoptosis를 유발하여 관절을 손상시키고, MMPs(단백분해효소)를 활성화시키며, 염증조직의 혈관 투과성을 변화시킨다³⁷⁾. 또한 COX-2의 활성을 촉진³⁸⁾하기도 한다.

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는 초기 단계에 작용하는 효소로서 거의 모든 세포에서 일정하게 발현되는 구성형(COX-1)과 cytokine(IFN- α , IL-1, TNF- α)에 의해 혈관내피세포, 대식세포, 섬유모세포와 신경원세포 등에서 발현이 유도되는 유도형(COX-2)이 있다. COX-1에 의해 합성이 되는 prostaglandin은 지혈과 위장관계 기능의 항상성을 유지하는 생리적 기능을 조절하며, COX-2에 의해 합성되는 대량의 prostaglandin은 염증, 통증, 발열 등의 병리적 과정을 매개한다³⁹⁾.

加味疎風活血湯이 hFLSs내 COX-2, NOS-II 유전자에 미치는 영향에서는 발현 및 정량에서 모두 대조군에 비하여 유의성있는 결과가 나타나(Fig. 7-10), 상기한 내용에 부합됨으로써 본 시료가 염증에 관여하는 다양한 사이토카인의 조절을 통하여 RA에 효과적으로 작용할 수 있음을 시사하고 있다.

NF- κB 는 AP-1과 함께 DNA 결합력이 CIA에 있어서 증가되는 경향을 보이며, 만성염증성 질환의 조절제로 사용되는 합성 glucocorticoid는 NF- κB 의존성

메카니즘에 의하여 TNF를 유발시키는 IL-6의 유전자 발현을 억제하는데³⁰⁾, 본 실험에서 NF- κ B와 AP-1 binding activity는 加味疎風活血湯 투여군에서 모두 억제되었다(Fig. 11,12).

이상의 결과로 보아 加味疎風活血湯은 RA의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 관련 사이토카인 활성화와 전사 인자의 활성을 억제하여 유의성있는 효과를 나타냄으로써, 면역 조절작용을 통한 항관절염 효과가 인정됨으로써, 향후 다양한 약물과의 상승 작용에 대한 연구가 기대된다

결론

加味疎風活血湯이 면역 조절작용에 미치는 영향을 규명하고자, 류마티오이드 관절염 환자에서 분리한 synoviocytes내의 사이토카인과 전사물질인 NF- κ B와 AP-1 binding activity에 대하여 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味疎風活血湯은 hFLSs내 IL-1 β 발현 및 정량을 농도의존적으로 유의성있게 억제하였다.
2. 加味疎風活血湯은 hFLSs내 IL-6 발현 및 정량을 농도의존적으로 유의성있게 억제하였다.
3. 加味疎風活血湯은 hFLSs내 TNF- α 발현 및 정량을 유의성있게 억제하였다.
4. 加味疎風活血湯은 hFLSs내 COX-2 발현 및 정량을 농도의존적으로 유의성있게 억제하였다.
5. 加味疎風活血湯은 hFLSs내 NOS II 발현 및 정량을 유의성있게 억제하였다.
6. 加味疎風活血湯은 NF- κ B와 AP-1 binding activity를 유의성있게 억제하였다.

이상의 결과를 보아 加味疎風活血湯의 면역 조절 작용을 통한 항관절염 효과가 인정되어, RA에 안정된 치료제로써 응용 가능할 것으로 여겨지며, 구성 약물 및 약물간의 상승 작용에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 1992: 109-31.
2. 양유걸 편저. 황제내경소문역해. 태련국풍출판사 1984:95-6,328-36.
3. 왕도. 외대비요방. 서울: 대성문화사. 1983:424.
4. 진무택. 삼인방(권3). 국풍출판사. 1977:2-3.
5. 이천. 의학입문. 서울: 대성문화사. 1989:523,369-71.
6. 장개빈. 경약전서. 인민위생출판사. 1991:248-55.
7. 황문동. 실용중의내과학. 상해: 상해과학기술출판사. 1986:554-69.
8. 심금오. 沈氏尊生書. 서울: 自由出版社. 1980:309-17.
9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1989:86,90,106,113, 370-8.
10. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울: 南山堂. 1992:125-6.
11. 尹用甲. 疎風活血湯이 家兔의 腎臟機能에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1984.
12. 楊慶錫. 疎風活血湯 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1999.
13. 남영. 歷節風에 응용되는 疎風活血湯의 消炎, 鎮痛, 解熱 효과에 관한 연구. 경희대학교대학원. 1981.
14. 金苟中. Adjuvant 關節炎에 疎經活血湯合黃連解毒湯이 미치는 實驗的 研究. 대전대학교대학원. 1992.
15. 안선준. 鍼灸刺戟 및 疎風活血湯加味方 投與가 류마티스性 關節炎 患者의 血液에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1994.
16. 광중문. 疎風活血湯加味가 류마티오이드 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.
17. 대전대학교한방병원. 한방병원처방집. 한국출판사. 1997:230.
18. 辛民教. 原色臨床本草學. 永林社. 1998:10,221-222,249-250,254-255,263,312-313,414-416, 467-468,504-509,518-519,604-605,624-627.
19. 諸正鎭. 血府逐瘀湯이 Adjuvant 誘發 關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1993.
20. 申敏湜. 防風湯이 Adjuvant 誘發 關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1994.
21. 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.

22. 李昊根. 大羌活湯이 第II形 Collagen 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1994.
23. 柳京周. 白虎湯과 白虎加桂枝湯이 류마토이드 關節炎 및 human Monocyte의 IL-8에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1995.
24. 金正진. 濃도에 따른 加味疎風活血湯 水鍼이 흰쥐의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
25. 宋彥錫. 加味疎風活血湯 水鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
26. 오세중. 회침의 Steroid 성분에 관한 연구. 생약학회지. 1973.
27. 金光湖. 豨 蠲이 實驗的 高脂血症의 豫防 및 治療效果에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1994;17(1):29-43.
28. 李和峻. 豨 蠲地骨皮湯 藥鍼製劑가 高血壓 및 高脂血症에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1994;15(1):505-24.
29. 타다토미오지. 면역의 의미론. 하늘과학문고. 1998: 43, 45, 69, 92.
30. 中島 泉. 신면역학입문. 서울: 지구문화사. 1997: 63, 118, 120, 123-124, 127-128, 175-176, 185-187, 234, 258-259.
31. Keiji Miyazawa. Regulation of Interleukin-1 β -induced Interleukin-6 gene Expression in Human Fibroblast-like Synoviocytes by p38 Mitogen-activated Protein Kinase, U.S.A., The Journal of Biological Chemistry 1998;273(38),24382-838.
32. 서울대학교 의과대학편. 중앙학. 서울: 서울대학교출판부. 1992:188-9,228-9.
33. Bingham CO 3rd. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. J Rheumatol. 2002;29 Suppl 65:3-9.
34. Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S, Koshihara Y. An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Inflamm Res. 2001;50(2):65-72.
35. Klimiuk PA, Sierakowski S. Cytokines and their antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis Przegł Lek. 2002;59(2):108-12. Review.
36. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Ugucioni M, Facchini A. Enhanced and coordinated In vitro expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 1998;41(12):2165-74.
37. Simi T. Inhibition of IL-6, IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways, J. Immunol. 2000;165:5227-37.
38. Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins new discoveries and insights. Annu. Rev. Immunol. 1996; 14:649-83.
39. Dayer JM, Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant IL-1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. Journal of Clinical Investigation. 1986;77:645-8.