絡石藤의 관절염에 대한 염증 및 세포사 억제 작용

황만영 · 차윤엽*

상지대학교 한의과대학 한방재활의학과학교실

Inhibition Effect of Trachelospermi Caulis on the Inflammation and Cell Death in Arthritis

Man Young Hwang, Yun Yeop Cha*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University

Rheumatoid arthritis is a chronic, systemic, and inflammatory autoimmune disorder that affects 1% of the adult population worldwide. Osteoarthritis is a multifactorial disease with high morbidity that is characterized by degradation of the matrix and destruction of articular cartilage. In this study, we examined the inhibition effect of Trachelospermi Caulis on the inflammation(TNF-α, IL-1β, NO), cartilage protection(MMP-13), and cell death in arthritis. RAW 264.7 and SW 1353 cells were cultivated in DMAE(GibcoBRL, USA) with 5% FBS and Fungizone in 37℃, 5% CO2. THP-1 cells were cultivated in RPMI(GibcoBRL, USA) with 5% FBS and Fungizone in 37℃, 5% CO2. Activity of caspase-3, XIAP, Cytochrome C in the cell was examined by using western blot. The results obtained were as Follows; Concentration of nitric oxide in Trachelospermi Caulis treatment group significantly decreased compared with that of non-treatment group ($P<0.05$). In treated group, Concentration of Trachelospermi Caulis was not significantly associated with cell death. Concentration of TNF-α and IL-1β in Trachelospermi Caulis treatment group decreased significantly compared with that of none treatment group ($P<0.05$). Relative density of MMP-13 in Trachelospermi Caulis treatment group decreased significantly compared with that of none treatment group and dose-response relationship was observed. After treatment of staurosporin in SW1353 which increases cell death, in Trachelospermi Caulis treated group, the cell death was effectively decreased. In conclusion, these results suggest that Trachelospermi Caulis inhibit inflammation and cell death in arthritis. More researches about effect of Trachelospermi Caulis are considered to need.

Key words : Trachelospermi Caulis, arthritis, inflammation, cell death

서 론

류마티스 관절염은 전신적 소견을 가지는 관절의 염증성 질환이며[1] 일차적으로 활막염이 발생하고 연골이나 건, 인대 등 주위 관절조직의 손상으로 인한 염증의 부산물로 효소들이 나와 관절의 파괴를 촉진 시킨다[2]. 또한 골관절염은 관절연골의 연화 및 구조의 와해 등의 병리적 소견을 특징으로 하는 만성질환으로서 관절하골에 충혈과 골아세포의 활성이 증가되어 관절의 가장자리에 새로운 연골 및 골의 생성으로 골극을 형성하고 관절막이 섬유화되는 질환이다[3].

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 238 상지대학교 부속한방병원
· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260(1)

· 접수 : 2006/02/10 · 수정 : 2006/03/09 · 채택 : 2006/03/31

많은 연구에 의하면 사이토카인(cytokine system)은 류마티스 관절염에서 활막의 염증을 지속시키는데 중심적인 역할을 하며[4,5], 이는 세포간 신호전달과 면역 및 염증반응의 매개에 중요한 역할을 하는 조절 단백들이다[6]. 특히 TNF-α와 IL-1β, IL-6, IL-8 등 염증 매개성 사이토카인이 관절 질환의 발현에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되고 있으며 이들 염증 매개성 사이토카인의 증가는 류마티스 관절염이나 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등 좀 더 관절 침습적이고 진행성인 질환에서 현저하다[7]. 또한 TNF-α는 골모세포나 연골아세포에서 관절염 활막 섬유세포(fibroblast)에서 발현되는 중요한 분해효소인 MMP-13의 발현을 증가 시키는 것으로 알려져 있다[8].

한의학에서 류마티스 관절염은 증상으로 미루어 볼 때 痺證, 痺痛, 歷節風과 같은 病證과 매우 흡사하며, 발병 원인은 風, 寒,

濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다[9].

본 연구에서 사용된 絡石藤은 산과 들, 황무지에 자라고 보통 암석, 담장 기타 다른 식물에 덩굴져 사는 식물로[10] 한의학에서는 心, 肝經으로 들어가 祛風通絡, 凉血消腫의 효능이 있다고 알려져 있어 風濕痺痛과 筋脈拘攣이 熱性에 편중된 자에게 적용하여 치료하였다[11]. 絡石藤에 대해서는 신[12], 임[13] 등이 문헌과 동물 실험을 통하여 효능을 연구한 바가 있었고, 추[14]는 小兒腹瀉에 外洗治療 연구를 하였으며, 한[15]은 抗癌 효과를 연구하였으나, 絡石藤이 관절에 미치는 효과에 대한 실험연구는 부족하였다. 이에 저자는 絡石藤을 이용하여 관절의 염증 반응에 중요한 인자인 NO, TNF-α, IL-1β, MMP-13의 변화와 세포사 억제를 실험 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 絡石藤은 강원도 원주 제일약업사에서 구입하였으며 상지대학교 부속한방병원 약제과의 한약사에 의해 검증 받았다.

2. 絡石藤 시료의 제조

絡石藤 50g을 물 300ml에 4시간 끓인 후 거즈로 거른 다음 동결 건조기에서 3일간 건조시킨 후 건조된 가루(3.13 g-수율은 3.31/50 * 100)를 실험에 사용하였다.

3. 세포주 배양

Rat macrophage 세포주인 RAW 264.7(KCLB 40071)과 human monocyte 세포주인 THP-1(KCLB 40202)를 한국세포주은행에서 구입하였고 human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353(ATCC HTB-94)은 American Type Culture Collection에서 구입하였다. RAW 264.7과 SW 1353은 DMAE(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO_2에서 배양하였으며 THP-1은 RPMI(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 ㎕/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100 ㎕ 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

5. Nitric oxide(NO) 측정

NO를 측정하기 위하여 RAW 264.7세포를 24-well에 well 당 5×10^5 세포를 넣고 키우다가 lipopolysaccharide(LPS, 200 ng/㎖)와 絡石藤을 농도별로 처리한 후 12시간이 지난 다음 배지 100 ㎕와 동량의 Griess 용액(1% sulfanilamine in 5% phosphoric acid + 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in H_2O)을 섞어 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로 $NaNO_2$를 사용하여 농도를 측정하였다.

6. TNF-α와 interlukine-1β 측정

human TNF-α(tumor necrosis factor-α)와 IL-1β(interlukine-1β)를 측정을 측정하기 위하여 R and D System(Minneopolis, USA)의 TNF-α와 interlukine-1β 측정키트를 이용하여 매뉴얼에 따라 측정하였다. Human monocyte 세포주인 THP-1를 96-well에 well 당 5×10^5 세포를 넣고 키우다가 LPS(200 ng/㎖)와 絡石藤을 농도별로 처리한 후 18시간이 지난 다음 배지 100 ㎕를 측정키트의 96 well에 각각 넣고 sample 희석액을 50 ㎕를 96 well polystyrene plate에 분주하고 분주된 well에 standard와 sample을 각각 50 ㎕씩 분주한 후 실온에서 한 시간 방치하였다. 이것을 세척용액으로 3회 세척하였고 Biotinylated Antibody 100㎕을 각 well에 첨가한 후 한 시간 동안 실온에 방치한 후 상기와 같이 3회 세척하였고 각 well에 Streptavidin-HRP를 100 ㎕ 첨가 후 실온에서 30분간 반응하였다. 각 well에 100 ㎕ TMB 용액을 100 ㎕첨가하여 30분간 실온에서 반응시키고 0.18 M의 황산 100 ㎕ 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)로 490 nm에서 각각의 표준용액을 이용하여 농도를 측정하였다.

7. Western blot 분석

1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7의 세포 당 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 ㎕로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 ㎍/㎕)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 ㎍/㎕에 BCA 용액 100 ㎕를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 ㎕와 BCA 용액 100 ㎕을 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 50 ㎍를 caspase-3, cytochrome C, XIAP, Actin를 확인하기 위하여 12.5% SDS-polyacrylamide SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk을 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 cytochrome c(PharMingen, USA), caspase-3 (PharMingen, USA), XIAP(Cell Signalling, USA), Actin(Santa Cruz, USA)의 항체를 사용하여 하루 밤 동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하

고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG 로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네 번 세척한 후 chemiluminescence 시약(Pierce, USA)으로 반응시킨 후 Fugi X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

4) 밴드의 상대적 농도 측정

웨스턴 분석한 밴드의 농도를 측정하기 위하여 Prism 이미지 분석시스템을 이용하여 각각의 밴드크기를 측정하여 상대적으로 계산하였다.

8. 통계 처리

모든 결과는 평균값±표준편차로 나타내었고, 통계적 의의는 Student's t-test에 의하여 p값이 0.05이하의 경우 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Rat macrophage 세포주인 RAW 264.7에서 nitric oxide(NO) 측정

NO는 염증반응의 중요한 인자로 絡石藤에 의하여 이 NO가 감소 될 수 있는지 알아보기 위하여 絡石藤을 0.2, 0.6, 1, 2 mg/㎖ 농도로 RAW 264.7에 LPS와 같이 처리하였다. LPS만을 처리한 세포에서는 NO가 증가 하였으며, 絡石藤의 처리 농도에 따라 각각 NO의 농도가 유의성 있게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 1A). 이러한 감소가 絡石藤의 농도에 의하여 세포가 사멸함으로써 NO가 감소 할 수 있는데 각 농도별 세포 생존률의 차이에 유의성이 없어 세포사와는 아무런 관련이 없음을 보여 주고 있다(Fig. 1B).

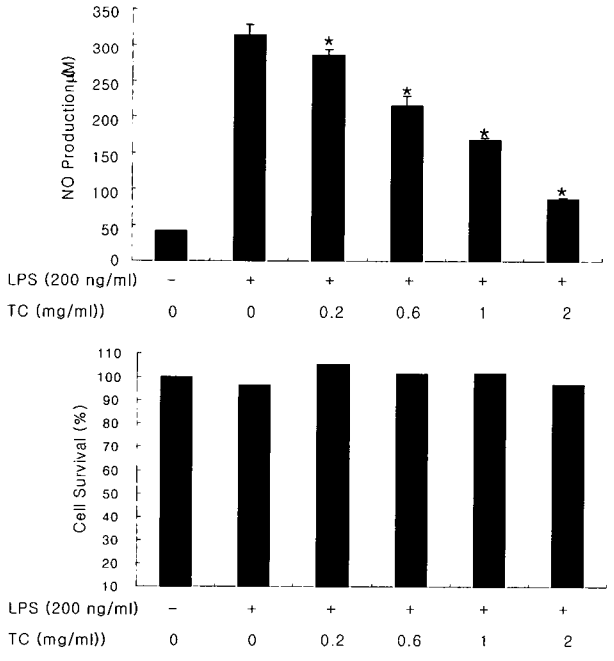

Fig. 1. Measurement of Nitric oxide(NO) in RAW 264.7 cell of Rat macrophage cell line. *, p < 0.05. A: Inhibition of NO production in LPS-Stimulated Raw 264.7 Cells by TC. B: Cell survival ratio in LPS-Stimulated Raw 264.7 Cell by TC. LPS: lipopolysaccharide, the endotoxin of Gram-negative bacteria. TC: Trachelospermi Caulis

2. Human monocyte 세포주인 THP-1에서 TNF-α와 interlukine-1β 측정

TNF-α와 interlukine-1β(IL-1β)은 관절염의 진행과정 중 염증반응과 조직손상에서 나타나는 인자이다. LPS만을 처리하면 TNF-α가 증가하였고, 이때 絡石藤을 동시에 처리하면 LPS에 의한 TNF-α의 증가를 농도에 따라 유의성 있게(P<0.05) 억제하였다(Fig. 2). IL-1β를 측정한 결과는 LPS만을 처리하면 IL-1β가 증가하였고 이때 絡石藤을 동시에 처리하면 LPS에 의한 IL-1β의 증가를 농도에 따라 유의성 있게(P<0.05) 억제하였다(Fig. 3).

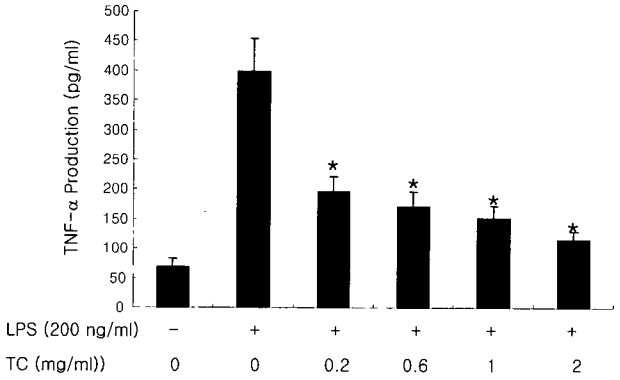

Fig. 2. Measurement of TNF-α in THP-1 of Human monocyte cell line. *, p < 0.05. LPS: lipopolysaccharide, the endotoxin of Gram-negative bacteria. TC: Trachelospermi Caulis

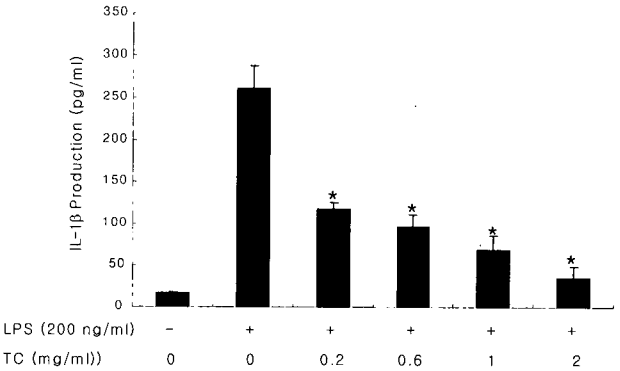

Fig. 3. Measurement of IL-1β in THP-1 of Human monocyte cell line. *, p < 0.05. LPS: lipopolysaccharide, the endotoxin of Gram-negative bacteria. TC: Trachelospermi Caulis

3. Human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에서 MMP-13 발현

Human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에서 MMP-13 발현을 알아보고자 TNF-α를 20 ng/㎖ 농도로 처리하였다. 그 결과 MMP-13의 발현이 증가하였으나, 동시에 絡石藤을 농도별로 처리하면 농도에 따라 TNF-α에 의한 MMP-13의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 4).

4. Staurosporin 처리에 의한 세포사에서 絡石藤의 보호 효과

Human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에 staurosporin을 처리하여 세포사를 유도하였으며, 絡石藤을 농도별로 처리하였을 때 caspase-3와 세포사 억제인자인 XIAP(X chromosome-linked inhibitor of apoptosis) 및 미토콘드리아의 인자인 cytochrome C의 변화를 알아보았다. 그 결과 staurosporin 만을 처리 하였을

때 세포사가 일어나 caspase-3가 활성화 되었으며, 이 때 XIAP은 감소하였고 cytochrome C는 증가하였다(Fig. 5). staurosporin과 絡石藤을 동시에 처리하면 staurosporin에 의한 세포사를 억제할 수 있음이 확인되었다.

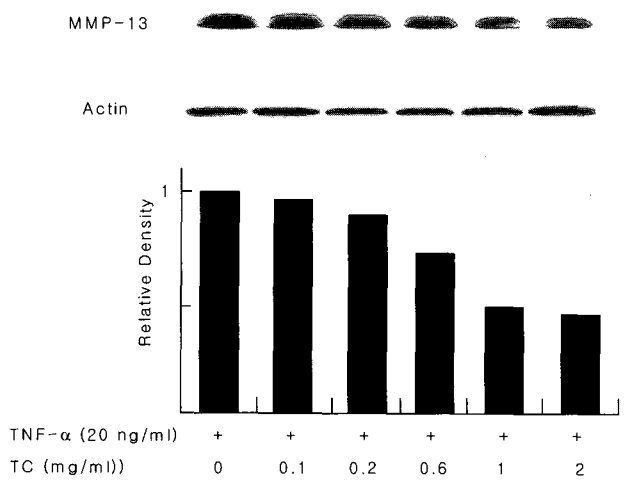

Fig. 4. Expression of MMP-13 in SW 1353 of Human chondrosarcoma cell line. TC: Trachelospermi Caulis

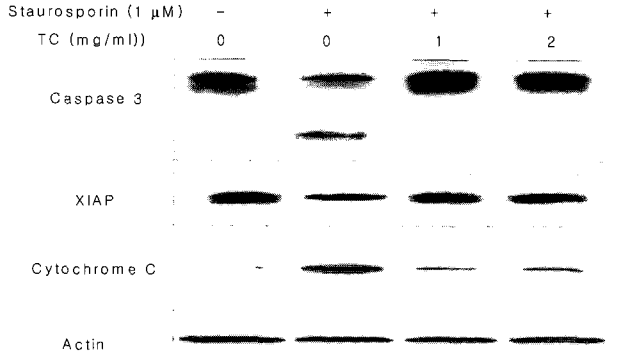

Fig. 5. Protection effect of TC in cell death by the treatment of staurosporin in SW 1353.

고 찰

골관절염과 류마티스 관절염으로 대표되는 관절염은 현재까지 완치 방법이 없어 증상을 조절하며 평생 살아가야 하는 전형적인 만성 질환이기 때문에 대상자의 신체적 상태뿐 아니라 심리사회적인 상태에까지 많은 영향을 미친다[16]. 관절염이란 관절에 염증을 일으키는 현상을 말하고 염증이란 병든 부위에 부종, 홍조, 발열, 동통과 같은 병리학적인 반응을 특징으로 한다[17].

관절염을 일으키는 가장 대표적인 5가지 질환은 골관절염, 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 강직성 척추염 그리고 통풍이다. 관절염의 원인은 매우 다양하여 박테리아나 바이러스 같은 병원체 감염 뿐 만 아니라 유전적인 소인과 환경적인 원인 등이 복합되어 발병한다고 보고 있다[18]. 하지만 아직 원인이 뚜렷하게 밝혀지지 않고 있어 앞으로도 많은 연구가 필요하다.

본 실험에 사용된 絡石藤(Trachelospermi Caulis)은 夾竹桃科(Apocynaceae)에 속한 마삭줄 Trachelospermum asiaticum var. intermedium NAKAI와 털마삭줄 T. jasminoides var. pubescems MAKINO의 帶葉한 藤莖을 건조한 것으로 가을에 잎이 떨어지기 전에 채취하여 曬乾한다[11].

≪中草藥學≫[19]에는 "苦, 微寒. 入心,肝,腎經. 祛風通絡, 凉血消腫. 風濕痺痛, 筋脈拘攣 症에 사용 한다"고 했고 ≪本草備要解析≫[20]에는 "苦溫無毒. 祛風, 舒筋. 堅筋骨, 利關節. 治一切風"이라고 나와 있으며, ≪中國本草圖鑑≫[21]에는 "苦, 平. 有小毒. 祛風通絡, 活血止痛. 風濕性關節炎, 腰脚痛, 跌打損傷, 癰瘡腫毒. 外用으론 創傷出血"에 사용한다고 나와 있다. 또한 ≪醫學入門≫[22]에는 "味苦性微寒 風熱死肌口舌乾 背癰咽腫漿難入 堅筋利竅主腰膕"이라 나와 있고, ≪新·藥品植物學≫[23]에는 "진통약(편도선염, 후통, 관절통)"에 사용 할 수 있다고 되어 있다. 최근 연구를 살펴 보면 鎭痛, 鎭靜, 抗痙攣, 抗菌, 白血球 遊走抑制作用 등에 絡石藤이 유의한 효능이 있음이 확인되었고[13], 小兒腹瀉에 外洗法으로 絡石藤을 사용하여 연구하였으며[14], 항암제로서 絡石藤을 연구하기도 하였다[15]. 상기 문헌들을 살펴본 결과 絡石藤은 다양한 질병을 치료 할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 염증성 관절 질환에 더 유의한 효과가 있을 것으로 생각된다. 하지만 絡石藤을 이용한 관절염 치료연구는 문헌적인 연구에 그치고 있어 이에 저자는 絡石藤의 관절염에 대한 염증 및 세포사 억제 작용을 알아보고자 본 실험을 하게 되었다.

산화질소(Nitric Oxide)는 아미노산인 알기닌(arginine)에서 산화질소 합성 효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 만들어진다. 일단 합성된 산화질소는 세포 밖으로 확산되어 나오고 근처의 세포에 국소적으로 작용한다[24]. NO는 염증반응의 중요한 인자로 박테리아의 세포벽성분인 Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 세포의 NOS 효소가 활성화 되면 세포외 NO의 농도가 증가하게 된다. 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고되고 있다[25]. 絡石藤에 의해 NO가 감소 될 수 있는지 알아보기 위하여 絡石藤을 0, 0.2, 0.6, 1, 2 mg/ml 농도로 Rat macrophage 세포주인 RAW 264.7에 LPS와 같이 처리한 결과 LPS 처리를 하지 않았을 때 NO Production이 41.2 μM였고 LPS만을 처리한 세포에서는 NO가 314.1 μM로 증가하였으며, 絡石藤을 점차 높은 농도로 처리하자 NO의 농도가 점차 285.1 μM, 215.3 μM, 167.7 μM으로 낮아지고 TC 2 mg/ml의 농도에서는 86.1 μM으로 LPS만 처리했을 때에 비해 NO가 현저히 감소되었다(Fig. 1A). 이러한 감소가 絡石藤의 농도에 의하여 세포가 사멸함으로써 NO가 감소 할 수 있는데 농도별로 유의한 차이가 없는 것으로 보아 絡石藤의 효능과 세포사와는 아무런 관련이 없음을 보여주고 있다(Fig. 1B). 이는 絡石藤이 염증반응의 중요한 원인인 NO를 감소시킴으로서 염증 반응을 막을 수 있을 것으로 생각된다.

면역계에 있어서 세포와 세포사이의 상호작용은 세포들끼리의 직접적인 접촉을 통해서 어떤 신호들이 전달됨으로써 이루어지기도 하지만, 어떤 세포의 분비물이 그 자신세포 혹은 다른 종류의 세포 활성이나 분화에 영향을 주기도 한다. 이렇듯 세포에서 분비되는 수용성단백질로서 다른 세포의 특성이나 성격을 변

화시키는 물질을 사이토카인이라 한다[26]. 연골의 파괴 산물은 활막의 만성적인 염증 반응을 일으키는데 활막대식세포에서 IL-1, TNF-α 같은 사이토카인의 생산이 일어난다.

TNF-α와 interlukine-1β는 관절염의 진행과정 중 염증반응과 조직손상에서 나타나는 인자로 human monocyte 세포주인 THP-1에서 측정한 결과 LPS 처리를 하지 않았을 때 TNF-α Production이 68.2 pg/ml였고 LPS만 처리하면 397.5 pg/ml로 증가하였다가 絡石藤 농도를 0.2, 0.6, 1, 2 mg/ml로 처리하자 TNF-α 가 195.6, 169.7, 150.8, 114.7 pg/ml로 감소하였다(Fig. 2).

IL-1β 역시 LPS 처리를 하지 않았을 때 IL-1β Production이 16.5 pg/ml였고 LPS만 처리하면 261.2 pg/ml로 증가하였고 絡石藤 농도를 0.2, 0.6, 1, 2 mg/ml로 처리하자 118.1, 96.9, 68.1, 34.3 pg/ml로 감소하였다(Fig. 3).

絡石藤 처리에 의한 NO의 감소와 TNF-α 및 IL-1β 분비의 감소는 관절염에 絡石藤이 임상적으로 효과가 있을 가능성이 많다는 것을 제시해준다.

MMP는 관절연골의 활막(synovium)의 분해에서 발현되는 효소로 MMP-13은 연골세포와 관절염 활막 섬유세포에서 발현되는 가장 중요한 분해효소이다. TNF-α와 같은 염증성 사이토카인에 의해 유발된 관절염 조직에서 MMPs의 발현 및 활성이 증가하는데 이는 관절 조직의 파괴와 직접적으로 관련이 있다[27]. 실험 결과 TNF-α를 20 ng/ml 농도로 처리하였을 때 MMP-13의 발현이 증가하였다. 동시에 絡石藤을 농도별로 처리하면 농도에 따라 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 絡石藤이 NO, TNF-α 및 IL-1β의 발현을 감소시킨다는 것을 다시 한번 입증하는 것이라 하겠다.

일반적으로 세포 고사 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해 효소에 의해 세포 내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는데, 자극에 의해 미토콘드리아 막에 존재하여 막내를 자유롭게 움직이는 Cytochrom C[28]가 세포질 밖으로 방출되어 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9를 활성화 시키고 이렇게 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 세포고사를 유도하는 것으로 보고되었다[29]. 최종적으로 활성화된 caspase-3는 poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)를 활성화시켜 DNA fragmentation과 핵의 응축을 유도하면서 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다[30]. caspases 활성은 inhibitor of apoptosis(IAP)계 단백들에 의해 억제되는데 IAPs중 XIAP(Xchromosome-linked inhibitor of apoptosis)는 가장 강력한 caspase 억제성 단백으로서 시발체인 capase-9 뿐 아니라 작용체인 caspase-3 및 caspase-7을 억제할 수 있다[31]. 즉, XIAP는 세포자멸사를 효과적으로 억제한다.

실험에 쓰인 staurosporin은 protein kinase 억제인자의 하나로 알려져 있는데[32], protein kinase의 활성을 통해서 세포의 손상 억제 현상이 일어난다고 알려져 있다[33]. 본 실험에서는 human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에 staruosporin을 처리하여 세포사를 유도하였으며, 絡石藤을 농도별로 처리하였을 때 caspase-3와 세포사 억제인자인 XIAP 및 미토콘드리아의 인자인 Cytochrome C의 변화를 알아본 결과 staurosporin 만을 처리 하였을 때 세포사가 일어나 caspase-3가 활성화 되었으며 XIAP은 감소하였고 Cytochrome C는 증가하였다. 반면에 絡石藤을 농도별로 처리한 결과 caspase-3가 억제 되고 XIAP가 증가했으며 Cytochrom C가 감소하였다(Fig. 5). 이로서 絡石藤이 staurosporin에 의한 세포사를 억제할 수 있음을 알 수 있으며 관절염에서 세포사의 진행을 억제할 수도 있을 것으로 생각이 된다.

이상의 결과에서 絡石藤 추출물이 관절 염증 질환에 효과적으로 작용하여 염증 반응을 억제시키고 세포사의 진행을 감소시킴이 확인되었다. 앞으로 絡石藤은 성분 분석 및 각종 질병에 대한 유효성 검사를 통해 더 많은 분야에서 치료제로 응용 할 수 있는 추가적인 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

관절염에 대한 絡石藤의 치료효과를 알아보기 위해 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Rat macrophage 세포주인 RAW 264.7에서 nitric oxide(NO)를 측정한 결과 絡石藤의 농도에 따른 NO의 감소효과는 LPS만을 처리한 세포에서는 NO가 증가하였으며, 絡石藤의 처리 농도에 따라 점차 NO의 농도가 유의성 있게($P<0.05$) 감소하였다. 또한 세포사와 絡石藤 처리 농도와는 아무런 관련이 없었다. Human monocyte 세포주인 THP-1에서 TNF-α와 interlukine-1β를 측정한 결과 LPS만 처리하면 TNF-α와 IL-1β가 증가하였고, 絡石藤과 동시에 처리하면 농도에 따라 TNF-α와 IL-1β의 증가가 유의성 있게($P<0.05$) 억제되었다. Human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에서 MMP-13 발현을 알아보고자 TNF-α를 20 ng/ml 농도로 처리한 결과 MMP-13의 발현이 유의성 있게 증가하였으나, 絡石藤을 농도별로 처리하면 농도에 따라 TNF-α에 의한 MMP-13의 발현이 유의성 있게 억제되었다. Human chondrosarcoma 세포주인 SW 1353에 staurosporin을 처리하여 세포사를 유도한 결과 staurosporin 만을 처리 하였을 때 세포사가 일어나 caspase-3가 활성화되었으며, 이때 XIAP은 감소하였고 Cytochrome C는 증가하였다. 반면에 絡石藤을 농도별로 처리한 결과 caspase-3가 억제 되고 XIAP가 증가했으며 Cytochrome C가 감소하였다. 이는 絡石藤이 세포사를 억제할 수 있음이 확인된 것이다.

이상으로 絡石藤 처리에 의해 염증반응의 중요한 인자인 NO의 감소와 관절염의 진행과정 중 염증반응과 조직손상에서 나타나는 인자인 TNF-α 및 IL-β, MMP-13의 분비가 감소하였고, staurosporin으로 인한 세포사가 억제되었다. 향후 絡石藤을 관절염 치료제로서 내, 외용약뿐만 아니라 여러 가지 급, 만성 염증 질환에 대해서도 지속적인 연구를 통하여 그 효능을 검증해야할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Braddom, R.L., et al. Physical medicine & rehabilitation. Philadelphia, WB Saunders. pp 715-727, 1996.
2. 박재갑. 개정판 인간생명과학. 서울대학교출판부. p 239, 1997
3. 정성수. 골관절염의 임상상과 진단. 대한내과학회지. 제63권

부록2호. p 432, 2002.
4. Miossec, P. Cytokines in rheumatoid arthritis. Cell Mol Biol. 47, 675-678, 2001.
5. Houssiau, F.A. Cytokines in rheumatoid arthritis. Clin Rheuamtol. 14, 10-13, 1995.
6. Choy, E.H., Panayi, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 344, 907-916, 2001.
7. 전찬홍, 김진희, 박정호, 안광성, 김형진, 김응호, 안중경, 차훈석, 고은미. 류마티스 관절염 활액내 사이토카인의 농도. 대한내과학회지 64(5):579, 2003.
8. Uchida, M., Yamato, H., Yamagiwa, H., Fujieda, A., Murayama, H., Fukumoto, S. Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metaloproteinase-13 in vivo. J Bone Miner Metab. 19, 207-212, 2001.
9. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구 동향. 대한침구학회지 21(4):179, 2004.
10. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균. 中藥大辭典 2권. 강소신의학원. p 841, 1998.
11. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 永林社. pp 273-274, 1991.
12. 신민교, 송호준, 이장천. 絡石藤과 地錦의 效能에 관한 書誌學的 比較考察(Ⅱ). 대한본초학회지 3(1):37-43, 1998.
13. 임형호, 김성수, 신현대. 絡石藤의 效能에 關한 實驗的 硏究. 경희의학 7(3):334-341, 1991.
14. 鄒彩華. 絡石藤外洗治療小兒腹瀉. 中國外治雜誌 4期 p 48, 2001.
15. 韓英梅. 絡石藤中的木脂素類成分及其生物活性. 中國民族民間醫藥雜誌. 1期 pp 1-2, 2001.
16. 김인자, 김종임, 이은옥. 골관절염 환자와 류마티스 관절염 환자의 지각된 질병 영향 비교. 류마티스건강학회지 10(1):119-130, 2003.
17. 이상헌. 류마티스건강학회지 1(1):117-126, 1994.
18. 김호연. 류마티스건강학회지 10(2):213-217, 2003.
19. 上海中醫學院. 中草藥學. 商務印書館. p 280, 1983.
20. 楊東喜. 本草備要解析. 一中社. p 302, 1991.
21. 東國大學校 韓醫科大學 本草學會中. 國本草圖鑑. 麗江出版社. p 214, 1994.
22. 李梴. 神效 編註醫學入門. 大星文化社. p 363, 1994.
23. 藥品植物學硏究會. 新·藥品植物學. p 346, 1995.
24. Geoffrey M.Cooper. The Cell. 도서출판 한우리. p 524, 2000.
25. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1993.
26. 약학대학협의회 미생물면역학분과회 편. 신·약품미생물학. 학창사. p 204, 2000.
27. 장광호, 진미림, 박희옥, 김동희. 계혈등복합방(GC)의 TNF-α와 IL-1β로 유도된 인간 섬유아세포양 활막 세포 활성화 억제 작용. 동의생리병리학회지 19(5):1230, 2005.
28. 김재호. 생물화학 제3판. 滿文閣. p 489, 2001.
29. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91(4):479-489, 1977.
30. Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis. an update. Apoptosis. 7(4):321-328, 2002.
31. 김상현, 이창훈, 설미영, 송진미, 이종협, 이민기, 김종민. Tuberculosis and Respiratory Diseases 58(5):480-490, 2005.
32. 남정, 여경아, 이해남, 조현희, 류기성, 유영옥, 나종구, 한구택. MCF-7 세포주에서 Staurosporine 투여에 의한 세포주기 분기 변화와 p53단백 발현. 대한산부회지 44(3):501, 2001.
33. 허정무, 오재민, 박래길, 소흥섭, 문연자, 최민규, 이갑상, 정연태, 박옥규. Gliotoxin에 의해 유발된 아폽토시스에 대한 Protein Kinase C(PKC) 전처리의 영향. 대한체질인류학회지 13(1):119-128, 2000.