

원 저

加味疎風活血湯이 류마토이드 관절염에 미치는 실험적 연구

김태영, 송영일, 윤일지, 오민석
대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

Immunological Study of the *Gami-sopunghwalhyeol-tang* (*Jiāwèi-shūfēnghuóxuè-tang*: GSHT) on Rheumatoid Arthritis in Human Fibroblast-like Synoviocytes

Tae-Young Kim, Young-II Song, Il-Ji Yoon, Min-Suck Oh

Dept of Oriental Rehabilitation Medicine,
College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

Objectives: This study was carried out to find the immune responses of the *Gami-sopunghwalhyeol-tang* (*Jiāwèi-shūfēnghuóxuè-tang*) (hereinafter referred to GSHT) to the human fibroblast-like synoviocytes (hFLSs) isolated from patients with rheumatoid arthritis.

Methods: Experiments were performed to measure the cytotoxicity against hFCs and the production of pro-inflammatory cytokines in hFLSs and the production of NO, ROS.

Results: 1. The gene expression of TNF- α , IL-6, IL-8 in hFLSs was effectively reduced at 100 μ g/ml, whereas IL-1 β was effectively reduced at 100 and 10 μ g/ml of GSHT.

2. The gene expression of ICAM-1, MMP-3 in hFLSs was effectively inhibited at 100 and 10 μ g/ml of GSHT, whereas TIMP-1 was effectively increased at 100 and 10 μ g/ml of GSHT.

3. The gene expression of NOS-II in hFLSs was effectively inhibited at 100 μ g/ml of GSHT.

4. The production of NO and ROS in hFLSs was inhibited at 100 and 10 μ g/ml of GSHT.

5. The proliferation of hFLSs was significantly inhibited at 100 μ g/ml of GSHT.

Conclusions: Comparison of the results for this study showed that *Gami-sopunghwalhyeol-tang* (*Jiāwèi-shūfēnghuóxuè-tang*: GSHT) had immunomodulatory effects of suppressing or enhancing.

Key Words: *Gami-sopunghwalhyeol-tang* (*Jiāwèi-shūfēnghuóxuè-tang*), rheumatoid arthritis, immunomodulatory

緒 論

류마토이드 관절염은 대표적인 자가면역성 질환으로 활막조직의 만성 염증 및 연골과 골괴괴로 인한 관절의 변형을 초래하여 통증, 부종, 압통 및 강직이 나타난다^{1,2)}. 이에 대한 직접적인 원인은 아직 규명되어 있지 않으나, 환경적 요인과 유전적 소인들이 복합적으로 작용하여 면역 조절 기전의 이상을 초래함으로써 만성 염증이 지속적으로 조직의 손상을 유발시키는 것으로 여겨진다³⁾.

한의학적으로 류마토이드 관절염은 痺證의 범

· 접수 : 2006년 8월 18일 · 논문심사 : 2006년 8월 21일
· 채택 : 2006년 8월 30일
· 교신저자 : 윤일지, 대전광역시 서구 둔산동 1136번지
대전대학교 둔산한방병원 한방재활의학과교실
(Tel: 042-470-9561, Fax: 042-470-9006,
E-mail: koyij@dju.ac.kr)

주에 속한다고 볼 수 있는데⁴⁾, 이중 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風 등⁵⁾은 膝, 足, 肘, 腕 및 手足指 등의 관절에 극심한 통증과 종대, 변형 등의 증상을 일으켜 결국 운동제한을 야기하므로 류마티오이드 관절염이나 통풍성 관절염과 유사한 질환으로 여겨지고 있다. 치료에 있어서는 虛實에 따라서 淸熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血 하거나 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝 한다^{6,7)}.

한의학에서 류마티오이드 관절염의 최근 연구동향을 살펴보면 면역학과 유전학적인 측면에서 접근하고 있고⁸⁾, 한의학 문헌에 기록된 痺證의 治療處方들이 류마티오이드 관절염의 면역기능에 효과가 있으며, 면역조절 효과가 있는 대부부의 單味之劑 한약 역시 痺證方의 구성약물을 주로 사용하였다⁹⁾.

疎風活血湯은 《沈氏尊生書》¹⁰⁾에 처음記載된 이래, 《東醫寶鑑》⁵⁾ 등에서 痺證을 다스리는 處

方으로 언급되어 왔다.

疎風活血湯에 대한 실험적 연구로는 남¹¹⁾은 관절염에 消炎, 鎮痛효과가 있음을, 안¹²⁾은 류마티오이드 관절염에 혈액학적 유의성이 있음을, 김 등^{13,14)}은 Adjuvant 유발 관절염에 혈액학적으로 유의성이 있음을, 곽 등^{15,16)}은 류마티오이드 關節炎에 면역조절작용이 있음을 報告하였다.

이에 저자는 疎風活血湯에 紅花, 鷄血藤, 稀簽, 薏苡仁, 澤蘭 각 6g을 加한 경험방인 加味疎風活血湯이 疎風活血湯 원방보다 류마티오이드 관절염에 보다 나은 효과를 보이는 것을 면역학적 관점에서 규명하기 위하여 관절염환자의 활막세포 (human fibroblast-like synoviocytes)를 대상으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3, TIMP-1, NOS-II 유전자 발현과 NO 생성, 세포 증식 억제 및 ROS 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

Table 1. Prescription of Gami-sopunghwalhyeol-tang (GSHT)

Herbal name	Pharmacognostic Name	Amount(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
威靈仙	Clematidis Radix	4
白芷	Angelicae davuricae Radix	4
防己	Stephaniae tetrandrae Radix	4
黃柏	Phelodendri Cortex	4
南星	Arisaematis Rhozoma	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
羌活	Notopterygii Rhizoma	4
桂枝	Cinnamomi Ramulus	4
紅花	Carthami Flos	10
生薑	Zizyphi inermis Fructus	20
鷄血藤	Spatholobi Caulis	6
稀簽	Siegesbeckiae Herba	6
薏苡仁	Coisis Semsn	6
澤蘭	Lycopi Herba	6
Total amount		94

재료와 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 加味疎風活血湯(이하 GSHT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

2) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약으로는 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) (Sigma, USA) 제품을, Taq polymerase, Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (TaKaRa, Japan), 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLVRT), RNase inhibitor (Promega, USA), RNazolB (Tel-Test, USA), Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, USA), DMEM (Gibco, USA), RNase (Pharmingen, USA), rIL-6 (R&D system, USA), [methyl-3H] thymidine (Amersham, UK) 제품 등을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 Real Time Quantitative RT-PCR (Applied Biosystems, USA), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Centrikon, Sigma, USA), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), turbo thermal-cycler™ (Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision, Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), Liquid Scintillation Counter (LKB, USA), clean bench

(Vision scientific Co., Korea), Glass microfiber filter (Whatman, UK), rotary vacuum evaporator (BÜCHI, Switzerland), autoclave (Hirayama, Japan), image system (Kodak, USA), plate shaker (Lab-Line, USA), Elisa Reader (Molecular Devices, USA) 및 homogenizer (OMNI, USA) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

加味疎風活血湯 2첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 GSHT 분말 17.5g을 얻어 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) human fibroblast cells 배양

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA), DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 human fibroblast cells (이하 hFCs)를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 배양하고, 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 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 subculture하였다.

3) Fibroblast-like synoviocytes (FLS)의 배양

외과 수술로 적출된 65세의 여성 류마티오이드 관절염 환자의 슬관절 조직을 차가운 인산완충식염수(PBS)에 세척한 후, 가위로 잘게 잘랐다. 조직을 우태아 혈청이 포함되지 않은 차가운 DMEM

배지가 담긴 50 ml 원심분리관으로 옮겨 잠시 세워둔 후 지방질과 배양액을 제거하였다. 10 mg의 관절 활막 조직당 1~1.5 mg/ml의 dispase II(grade II, Boehringer Mannheim, USA)를 포함하는 jolik's MEM을 가해 37°C에 30분간 전탕하여 단일세포 부유액을 얻었다. 상층액을 다른 원심분리관에 옮기고 이와 동량의 5% 우태아 혈청을 포함하는 DMED 배지 (Gibco BRL, USA)를 더해 얼음에 보관하였다. Dispase 처리를 3~4회 반복하면서 같은 방법으로 상층액을 모았다. 상층액을 모두 모아 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하고 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지로 두 번 씻어냈다. 세포의 수를 세고 단핵구 세포만 ficoll-hypaque 용액 위에서 원심분리한 후 경계층의 세포를 분리하여 15% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 1주일씩 5회 계대하면서 살아있는 부착 세포를 human fibroblast-like synoviocytes (이하 hFLSs)로 배양하였다.

4) 광학현미경 관찰

광학현미경 관찰을 위해서 2개의 구획을 가지고 있는 LAB-Tek tissue culture chamber slide (Nunc Inc., 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) 1000배에서 관찰하였다.

5) 세포독성 측정

세포독성 측정은 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trypsin-EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0 × 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 GSHT(최종 농도 400, 200, 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 μg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 μl를 가하

여 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 μl/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 μl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking 하고 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 실험군의 분류

관절 활막 세포를 24 well plate에 1 × 10⁶ 세포로 각 well에 분주하고, 미처리한 관절 활막 세포를 정상군(wild type, 이하 WT), hrIL-1β(10 U/ml)와 hrTNF-α(10 ng/ml)를 처리한 것을 대조군(control, 이하 CT), hrIL-1β(10 U/ml)와 hrTNF-α(10 ng/ml)를 처리한 것에 methotrexate(10 μg/ml)를 투여한 것을 양성대조군(CT+MTX, 이하 MTX), hrIL-1β(10 U/ml)와 hrTNF-α(10 ng/ml)를 처리한 것에 GSHT 추출물(100, 10 μg/ml)을 투여한 것을 실험군(CT+GSHT, 이하 GSHT)으로 나누고 6시간 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

7) Real Time Quantitative RT-PCR

(1) RNA 추출

hFLSs를 24 well plate에 1 × 10⁶ 세포로 각 well에 분주하고, 여기에 GSHT 추출물(100, 10 μg/ml)과, 양성대조군으로 MTX (10 μg/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1β (10 U/ml)와 hrTNF-α (10 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 μl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CGSTH13) 50 μl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μl와 동

량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치 하였다. 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 μ 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 μ g과 DNase I (10 U/ μ l) 2U/tube를 37 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 반응한 후 75 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25pmole/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-GSTH1, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MGSTH2)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 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 system을 이용하여 수행하였다.

염증 사이토카인 유전자 발현은 SYBR GSHT Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로는 GAPDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도는 200 nM이 되게 반응시켰다.

Real time quantitative PCR의 조건 : pre-denaturation은 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 94 $^{\circ}$ C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard

로 GAPDH를 사용하였고, target group의 RQ (relative quantitative)는 quantitative PCR을 사용하여 아래와 같이 계산하였다.

$$y = x(1+e)^n \quad x = \text{starting quantity}$$
$$y = \text{yield} \quad n = \text{number of cycles}$$
$$e = \text{efficiency}$$

8) Nitric oxide 생성량 측정

Nitric oxide (NO) 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A(0.2 % Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W)와 용액 B (2 % Sulfonamide in 5 % H3PO4)를 제조하여 냉암소에 보관하고, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. rIL-6 (R&D system) 등을 처리한 FLS 세포내의 NO를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 \times 10⁵ cells씩 첨가하고, GSHT 추출물(100, 10, 1 μ g/ml)과 rIL-6를 농도별로 처리한 후 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양 상층액 100 μ l를 96well plate에 분주하고 다시 혼합용액 100 μ l를 분주한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준 검량 곡선은 Sodium Nitrite를 0~80 μ M 사이에서 측정하였다.

9) hFLSs 증식 억제 효과 측정

hIL-1 β (10U/ml)와 rhTNF- α (100ng/ml) 등을 처리한 FLS의 증식억제 정도를 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁶ cells씩 첨가하고, GSHT 추출물(100, 10, 1 μ g/ml)을 각각 처리하고 1시간 후 rhIL-1 β 10U/ml와 rhTNF- α 100ng/ml를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 68시간 동시배양 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-3H] thymidine을 첨가한 후 최종 72시간 배양하였다. 세포 내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 dissociation 용액으로 세포를 분리한 후 세포수집기(Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter) 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

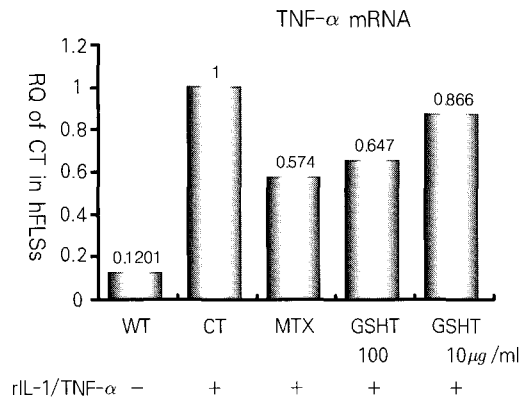


Fig. 1. Inhibitory effects of GSHT on TNF-α mRNA with real-time quantitative PCR in hFLSs

10) Reactive oxygen species의 분석

rhIL-1β (10 U/ml)와 rhTNF-α (100 ng/ml) 등을 처리한 hFLS내의 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 × 10⁵ cells씩 첨가하고, GSHT 추출물(100, 10, 1 μg/ml)을 처리하고 1 시간 후 rhIL-1β 10 U/ml과 rhTNF-α 100 ng/ml을 처리하여 37 °C에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 μM을 처리하고 5 분간 배양하고 2 회 수세한 후 flow cytometer로 세포 내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

11) 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 정리하였으며, 유효수준은 0.05와 0.001 이하인 경우 효과가 있는 것으로 인정하였다. 유의성 검증은 Student's T-test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. hFCs에 대한 세포독성

hFCs에서는 대조군의 세포생존율이 100±1.7

Table 2. Cytotoxicity Effects of GSHT on hFCs

Group	Dose (μg/ml)	% of Control Data
		hFCs
Control	0	100 ± 1.7
	1000	83.7 ± 1.3 [‡]
	500	81.1 ± 1.5 [‡]
	250	86.2 ± 1.2 [‡]
GSHT	125	87.2 ± 1.9 [‡]
	62.5	91.5 ± 1.8 [‡]
	32	93.1 ± 2.8 [*]
	16	93.8 ± 3.1
	1.6	93.6 ± 2.3

Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, †p<0.01, ‡p<0.001).

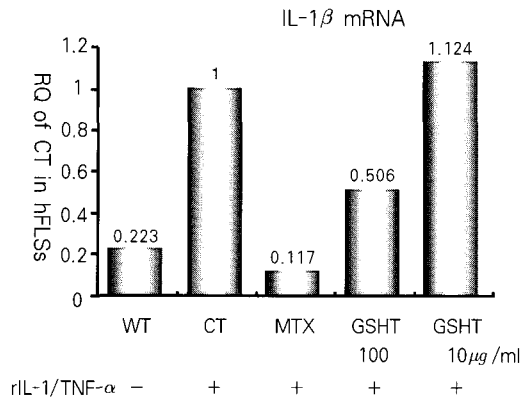


Fig. 2. Inhibitory effects of GSHT on IL-1β mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

(%)인데 비하여, GSHT 투여군 1.6, 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000μg/ml의 농도에서는 각각 93.6±2.3, 93.8±3.1, 93.1±2.8, 91.5±1.8, 87.2±1.9, 86.2±1.2, 81.1±1.5, 83.7±1.3 (%)로 나타났다 (2).

2. TNF-α 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10μg/ml의 농도에서는 각각 0.647, 0.866으로 나타나 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 1).

3. IL-1β 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10μg/ml의 농도에서는 각각 0.506, 1.124로 나타나 100μg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 2).

4. IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10μg/ml의 농도에서는 각각 0.524, 0.796으로 나타나 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 3).

5. IL-8 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10μg/ml의 농도에서는

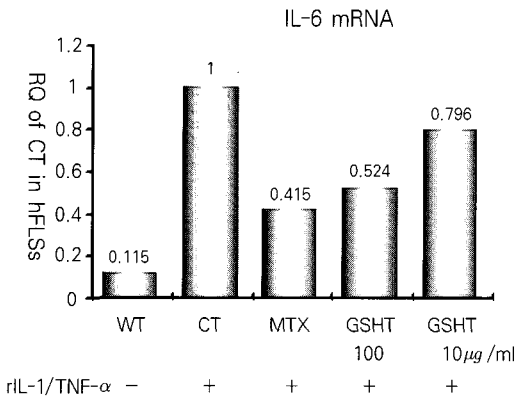


Fig. 3. Inhibitory effects of GSHT on IL-6 mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

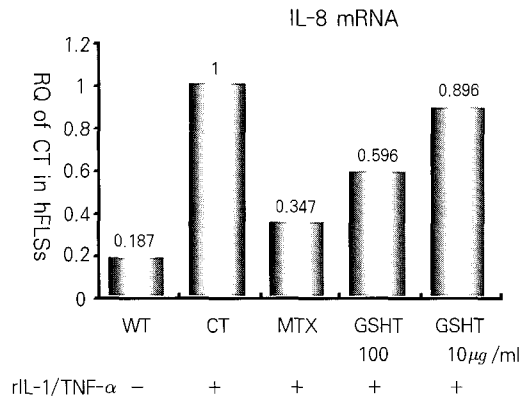


Fig. 4. Inhibitory effects of GSHT on IL-8 mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

각각 0.596, 0.896으로 나타나 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 4).

6. ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10 μ g/ml의 농도에서는 각각 0.451, 0.785로 나타나 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 5).

7. MMP-3 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10 μ g/ml의 농도에서는 각각 0.372, 0.564로 나타나 대조군에 비해 억제

되었다(Fig. 6).

8. TIMP-1 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10 μ g/ml의 농도에서 각각 3.412, 1.756으로 나타나 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 7).

9. NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10 μ g/ml의 농도에서는 각각 0.355, 1.255로 나타나 100 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 8).

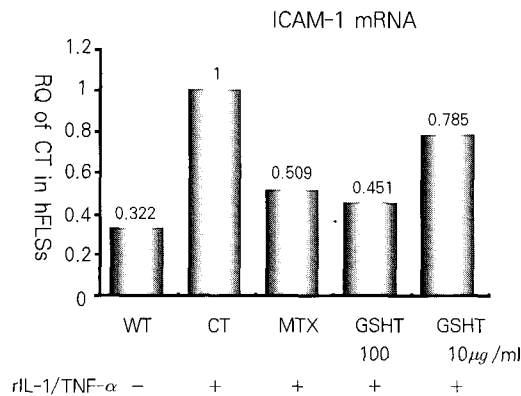


Fig. 5. Inhibitory effects of GSHT on ICAM-1 mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

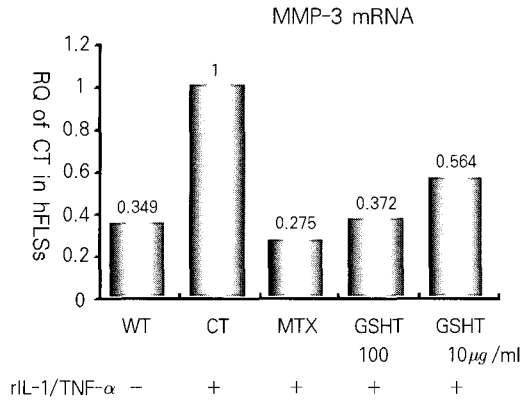


Fig. 6. Inhibitory effects of GSHT on MMP-3 mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

10. Nitric oxide 생성량에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10, 1 μ g/ml의 농도에서 각각 0.356 ± 0.038 , 0.368 ± 0.048 , 0.586 ± 0.059 로 나타나 100, 10 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Fig. 9).

12. ROS 생성량에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10, 1 μ g/ml 농도에서 각각 55.1, 76.5, 68.9 %로 나타나 대조군에 비해 억제효과가 있었다(Fig. 11).

11. hFLSs 증식억제에 미치는 영향

GSHT 투여군은 100, 10, 1 μ g/ml의 농도에서 각각 3106 ± 425.0 , 3806 ± 554.8 , 4820 ± 188.2 (cpm)으로 나타나 100 μ g/ml 농도에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 10).

考 察

대표적인 자가면역성 질환인 류마티드 관절염은 관절을 둘러싸고 있는 활막조직의 만성 염증성 질환과 연골과 골파괴로 인한 관절의 파괴와 변형을 초래한다¹⁾. 보통 대칭적인 관절침습으로 인

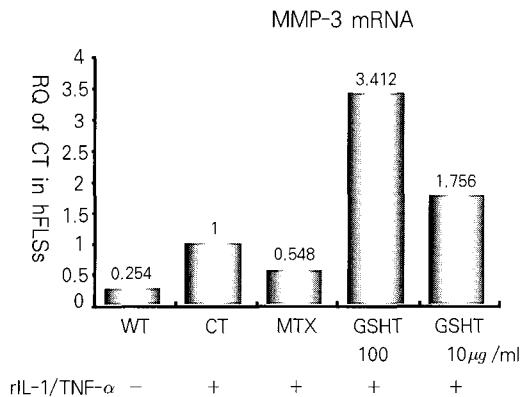


Fig. 7. Inhibitory effects of GSHT on TIMP-1 mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

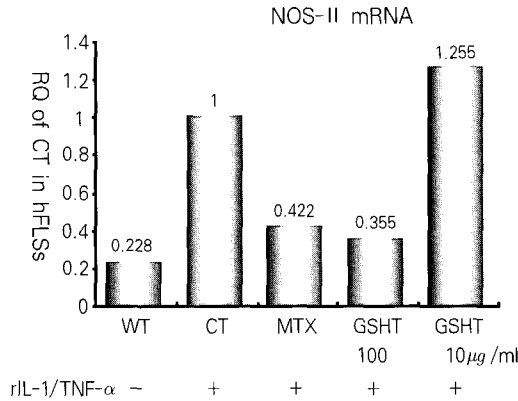


Fig. 8. Inhibitory effects of GSHT on NOS-II mRNA real-time quantitative PCR in hFLSs

하여 통증, 부종, 압통이 관절주위에 나타날 수 있으며, 통증은 관절운동에 의해 악화되고, 1시간 이상 지속되는 전신적인 강직감이 나타나기도 한다²⁾.

이에 대한 직접적인 원인은 아직 규명되어 있지 않으나, 환경적인 요인과 유전적인 소인들이 복합적으로 작용하여 관절염이 발생하는 것으로 추정하고 있다. 이러한 원인에 의하여 면역 조절 기전의 이상이 초래되고, 만성 염증이 관절을 중심으로 지속되고 관련된 세포, 즉 임파구, 대식 세포, 섬유화 세포 등에서 분해된 각종 cytokine과 단백질 분해 효소를 비롯한 다양한 염증 유발 인자에 의

해 조직의 손상이 지속적으로 일어난다³⁾.

최근 10여년동안 분자생물학, 생화학, 미생물학 및 면역학의 발달로 류마토이드 관절염에 대한 개념에 많은 변화가 있었다. 유발물질들의 발견으로 인한 분자 면역학적인 병인규명과 새로운 면역조절 물질의 발견으로 인한 면역치료법의 연구로 인해, 최근 류마토이드 관절염에 대한 면역학과 유전의 학적인 측면에서의 접근이 주로 시도되고 있다⁹⁾.

한의학적으로 류마토이드 관절염은 그 病因病理와 임상증상에 따라 痹證의 범주에 속한다고 볼 수 있다⁴⁾. 《素問·痺論》¹⁷⁾에 “風寒濕三氣雜之, 合

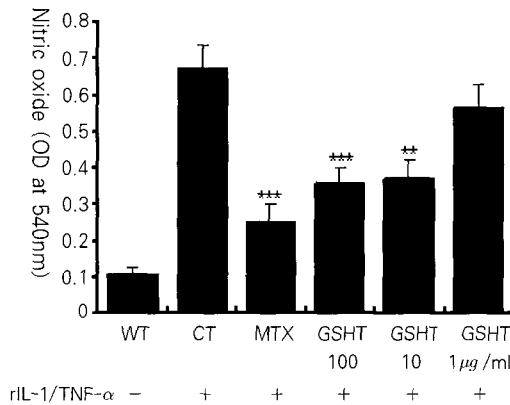


Fig. 9. Inhibitory effect of GSHT on the NO production in hFLSs

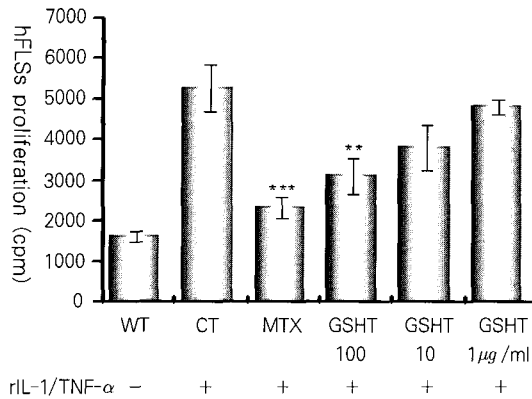


Fig. 10. Inhibitory effect of GSHT on the cell proliferation in hFLSs

而爲痺也”라 한 이래 여러 文獻에서 痺證에 대해 言及하는데, 이러한 痺證의 범주에서 痛痺, 痛風, 白虎風, 歷節風 등⁵⁾은 膝, 足, 肘, 腕 및 手足指 등의 關節에 극심한 통증과 종대, 변형 등의 증상을 일으켜 결국 운동제한을 야기하는 질환으로 류마토이드 關節염이나 통풍성 關節염의 임상 증상과 유사한 질환으로 여겨지고 있다.

痺證의 치료는 風寒濕熱의 邪氣에 의한 경우는

邪氣의 輕重에 따라 清熱, 祛風, 散寒, 除濕, 活血을 하고, 虛弱한 환자의 경우는 調補氣血, 補腎助陽, 滋陰養肝을 한다^{6,7)}.

류마토이드 關節염의 최근 연구동향을 살펴보면 한의학의 文獻에 기록된 痺證의 治療處方들이 류마토이드 關節염의 면역기능에 조절효과가 있으며, 대부분의 면역조절 효과가 있는 單味之劑의 한약 역시 痺證方의 주된 구성으로 확인된다. 특

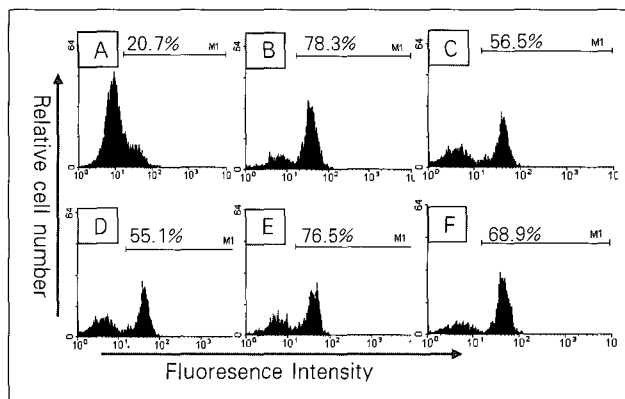


Fig. 11. Inhibitory effect of GSHT and MTX on the ROS production in hFLSs.

hFLSs were stimulated with IL-1β (10 U/ml)/ TNF-α (100 ng/ml) and co-cultured GSHT (100 μg/ml D, 10 μg/ml E, 1 μg/ml F), MTX (10 mg/ml C) for 48h. After 48hr cultured, DCFH-DA reagent (50 mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS production by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. DMEM media control (A) was not treated, rIL-1β + rhTNF-α was control (B).

히 한약처방의 구성상 補氣活血劑, 寒熱劑의 調和와 通經之劑의 적절한 配合는 면역조절 효과를 확대시키는 결과를 나타내 辨證原理를 근거로 藥物의 配伍를 강조한 한의학적 이론의 타당성을 반영해주고 있다. 향후 류마티오이드 관절염의 면역기능을 효과적으로 조절할 수 있는 한약의 추가적 발굴과 더불어 이를 중심으로 이루어진 처방에 대해서 심도있는 연구를 수행해야 될 필요성이 점차 중요하게 생각되고 있다⁸⁾.

疎風活血湯은 《沈氏尊生書》¹⁰⁾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 記載되어 있고, 《東醫寶鑑》⁵⁾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.

류마티오이드 관절염과 관련된 疎風活血湯의 실험적 연구로 남¹¹⁾은 歷節風에서의 消炎, 鎮痛, 解熱 효과를 실험적으로 규명하였고, 안¹²⁾은 류마티오이드 관절염 환자에 대하여 ESR, CRP, RBC 등의 유의성 있는 변화를 보고하였으며, 김¹³⁾과 송¹⁴⁾은 疎風活血湯 藥針을 이용하여 Adjuvant관절염에서 CRP, 혈청 총단백, globulin, albumin, antistreptolysin의 변화에 유의함을, 곽¹⁵⁾과 양¹⁶⁾은 疎風活血湯加味가 류마티오이드 관절염 환자에서 분리한 synoviocytes에 대한 면역조절에 효과가 있음을 보고하였다.

본 연구에 사용한 加味疎風活血湯은 疎風活血湯에 紅花를 6g 增量하고, 鷄血藤, 豨薟, 薏苡仁, 澤蘭을 6g을 加한 경험방으로 原方의 祛風活血하여 痺證을 치료하는 효능을 더욱 증대시킨 處方이라 할 수 있다.

紅花는 活血通經, 散瘀止痛하는 효능이 있는데 Adjuvant 관절염에 미치는 영향에 관한 실험적 연구가 보고 되었다^{18,19)}. 鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡하는 효능이 있는데 류마티오이드 관절염 환자의 활막세포와 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염

억제에 효과가 있음이 보고 되었다^{18,20,21)}. 豨薟은 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒하는 효능이 있는데 항 류마티즘 작용의 치료기전에 대한 연구와 염증성 싸이토카인 및 류마티오이드양 관절염에 효과가 있음이 보고 되었다^{18,22,23)}. 薏苡仁은 健脾滲濕, 除痺止瀉, 清熱排膿하는 효능이 있는데 소염 및 진통 작용이 있어 Adjuvant 관절염에 효과가 있음이 보고 되었다^{18,24,25)}. 澤蘭은 活血祛瘀, 行水消腫하는 효능이 있는데 Collagen으로 유발시킨 관절염에 미치는 영향이 보고 되었다^{18,26)}.

이에 저자는 加味疎風活血湯이 류마티오이드 관절염에 미치는 효과를 면역학적 관점에서 규명하기 위하여, 류마티오이드 관절염환자의 관절활막세포(hFCs)를 이용하여 면역조절작용을 살펴보았다.

본 실험에서는 加味疎風活血湯에 대한 세포독성과, hFLSs를 대상으로 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3, TIMP-1, NOS- II 의 유전자 발현에 대한 효과와, NO 생성, 세포증식 억제효과 및 ROS 생성에 대한 효과를 관찰하였다.

본 실험에서 hFCs에 대한 세포독성은 GSHT 투여군 1.6, 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각 93.6 \pm 2.3, 93.8 \pm 3.1, 93.1 \pm 2.8, 91.5 \pm 1.8, 87.2 \pm 1.9, 86.2 \pm 1.2, 81.1 \pm 1.5, 83.7 \pm 1.3(%)의 세포생존율이 나타나 32 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 유의성있는 세포독성이 나타났다(Table 2).

활막조직의 염증에 관련된 cytokine으로는 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 등이 있으며, 활액의 염증에 관련된 것으로는 IL-1, IL-8, TNF- α , INF- γ 등이 있고, IL-1, TNF- α , TNF- β , IGF 등은 활막의 증식에 관여한다^{3,29-31)}.

TNF- α 는 다양한 기능을 가진 전염증성 cytokine으로 증식, 분화, 분화된 표현형의 유지, 다양한 세포의 apoptosis와 같은 다양한 세포 반응을 조절한다^{32,33)}. TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의하여 생성되며 IL-1, IL-6, GM-CSF 및 IL-8과 같은 다른 전염증성 cytokine의 생성을 유도하며

³⁴⁾, 또한 anti-TNF therapy가 류마티드 관절염 환자의 치료에 효과가 있다는 보고가 있어 TNF- α 가 류마티드 관절염의 병리에서 중요한 역할을 함을 알 수 있다^{35,36)}.

본 실험에서 TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 4).

IL-1은 159개의 아미노산으로 구성된 IL-1 α 와, 269개의 아미노산으로 이루어진 IL-1 β 의 2종류가 있으며, 섬유아세포, 연골세포, 골과피세포, 활막세포, 근세포 등에 작용해서 각종의 단백질 분해 효소를 만들게 하며 조직구축의 파괴를 유도하며, 감염에 대한 숙주의 급성기 반응의 다양한 작용을 매개해서 이 시기의 생체방어에 있어서 중요한 역할을 담당한다^{30,31)}.

본 실험에서 IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군 100 μ g/ml의 농도에서 억제되었다(Fig. 5).

IL-6는 주로 대식세포나 T-임파구, 섬유모세포 등에서 분비되는 전구염증성 사이토카인으로 B-임파구에서 면역글로불린의 생성을 유도하고, T-임파구의 증식과 세포독성 T-세포로 분화시키는 역할을 한다³⁷⁾. 뿐만아니라 감염에 대한 급성 반응에 관여하는 주된 사이토카인 중 한 가지이다. 류마티드 관절염 환자의 윤활액(Synovial fluid)에는 다량의 IL-6가 존재하고, 이러한 환자의 혈청내 IL-6 양은 질병의 활성도와 밀접한 관계가 있다³⁸⁾.

본 실험에서 IL-6 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 6).

IL-8은 bacterial endotoxins, IL-1, TNF- α , LPS의 자극에 의해 mononuclear phagocytes와 여러 종류의 tissue cell 다시 말해 단핵구, 임파구, 섬유아세포, 내피세포, 활막세포, 연골세포로부터 생산되며, 천식, 성인호흡관장애후군, 심근경색, immune vasculitis, 신염, 통풍, 건선, 류마티드 관절염과

관련된 광범위한 병리적 상태에 참여하고 있다. 이중에서 특히 류마티드 관절염 환자들의 세포들은 높은 호중구 자극활성을 가지고 있고 이 작용은 거의 전적으로 IL-8에 기인하는 것으로 보고되었다. 류마티드 관절염 환자의 말초혈액단핵구, 골수, 활액의 단핵구중 IL-8의 생산량은 세포의 용적에 비례하는데 활액의 단핵구에서 가장 높게 나왔으며 활액에서 IL-8의 수치는 SLE(systemic lupus erythematosus)나 퇴행성관절염에서 보다 높게 나타났다. 또한 류마티드 관절염 환자 말초혈액단핵구로부터 분비되는 IL-8은 건강한 사람보다 거의 7배가 더 많았으며 혈청에서도 류마티드 관절염의 양성환자에서는 음성환자보다 IL-8의 수치가 높게 나왔다. 퇴행성관절염에서도 물론 IL-1, TNF- α 의 자극을 받아 IL-8이 분비되지만 류마티드 관절염에서 훨씬 높은 수치를 나타내고 있다³⁹⁾.

본 실험에서 IL-8 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 억제되었다(Fig. 7).

유착분자(adhesion molecules)는 염증부위에 백혈구, 임파구, 단핵구가 활막에 침투되도록 하는데 중요한 역할을 하며^{27,40)}, 류마티드 관절염에서 염증반응을 촉진 또는 악화시키는 중요한 요인 중 하나인데⁴¹⁾, 활막세포가 염증성 cytokine의 자극을 받아 유착분자의 발현을 증식시키며⁴²⁾ 증가된 유착분자는 활막세포와 T cell간의 유착을 촉진시킨다⁴³⁾.

류마티스 관절염에서 유착분자는 임파구가 내피세포에 유착되어 활막에 침윤되고 여러 세포들과 상호작용하는 전과정에 참여하고⁴⁴⁾, 여러 가지 염증성 cytokine에 의하여 그 발현량이 크게 증가하며^{42,43)}, 활성화된 T임파구와 활막세포간의 유착에 큰 역할을 하며^{43,45)}, 염증세포를 활막조직에 모집하고 유착시켜서 염증반응을 촉진시켜 관절염의 증상을 악화시키는 중요한 역할을 하므로⁴³⁾ 혈청 및 혈장내에 존재하는 유착분자를 측정함

으로써 면역 활성도를 간접적으로 측정할 수도 있을 것으로 보여⁴⁶⁾ 향후 류마티오이드 관절염 환자에 있어 질환의 활성도, 예방, 치료에 대한 효과 등을 판정하는데 좋은 지표가 될 것이다^{43,46)}.

ICAM(intercellular adhesion molecule)-1은 유착분자의 분류에서 VCAM과 함께 immunoglobulin superfamily에 속하며⁴³⁾ 류마티오이드 관절염의 활액막에서는 거의 모든 세포에서 고농도로 발현되고^{43,47)}, 활액막내에서 염증성 cytokine에 의해 자극되면 그 발현이 크게 증가하며^{42,43)} 특히 대식세포성 활막세포에서 강하게 발현되어^{42,47)}, 활막세포와 T cell 간의 유착에 큰 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁴³⁾.

본 실험에서 ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 8).

MMP(Matrix metalloproteinase)는 암세포와 hFLSs가 생체내에서 extracellular matrix protein에 작용하여 invasion을 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 전이 및 침투 유발 효소이다. MMP는 정상적인 생물학적 과정인 배아발생, 착상, 기관형성, 신경성장, 배란, 자궁확장, 뼈형성, 상처치유, 혈관신생 및 세포사멸 뿐만 아니라 관절염, 암, 심혈관 질환, 신경성 질환, 뇌혈액 관문의 파괴, 피부 및 위궤양, 간경화 등의 다양한 병적인 과정에도 관여한다. 비록 MMP의 주요기능이 조직의 흡수와 다양한 질환의 진행 과정 동안에 수반되는 ECM의 제거이지만, MMPs에 의해 유도되는 단백질 분해에 의한 거대분자인 ECM의 생물학적 기능 전환 또한 매우 중요하다⁴⁸⁾.

이중 MMP-3는 여러 MMP의 전구체를 활성화시키며 넓은 기질 특이도를 가지고 골관절염 연골의 proteoglycan의 분해에 관여한다고 증명된 바 있다⁴⁹⁾.

본 실험에서 MMP-3 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 9).

혈관 신생 억제 단백질로 알려진 TIMP(Tissue inhibitor of metallo -proteinase)는 ECM을 파괴한다고 알려진 MMP와 1 : 1로 결합하여 효소활성을 저해하여 혈관 신생의 균형을 조절하는 것으로 알려져 있다⁵⁰⁾. TIMP의 주요 기능인 MMP와의 결합에 의한 효소활성 저해 이외에도, 세포성장 촉진활성^{51,52)}, 계배 섬유아세포의 형질 전환⁵²⁾, 혈관내피세포의 증식 억제⁵³⁾ 및 인간의 양막과 닭의 난황막에서의 혈관 신생을 억제하는 것으로 밝혀져 있으며^{54,55)}, 혈관 신생을 활성인자로 알려진 VEGF와 bFGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 이동, collagen gel 전이를 억제하며 암의 성장을 억제한다고 알려져 있다^{56,57)} 특히, 현재까지 연구된 여러 가지 TIMP중에서 TIMP-1은 MMP-3의 중요한 조절인자로 알려져 있다^{49,58)}.

본 실험에서 TIMP-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 증가되었다(Fig. 10).

NO(Nitric Oxide)의 과생산은 지속적인 염증과 조직 손상에 관련되어 있는데, 관절염 실험 모델에서 NO의 생합성이나 활성을 조절함으로써 관절염 병태가 개선됨을 확인할 수 있었다. NO를 생산하는 NOS(NO synthase)는 eNOS, nNOS, iNOS 세종류가 있는데, 이것들은 다양한 염증반응 매개체로써, 유전자 수준에서 조절된다. NOS-II는 바로 이 iNOS를 지칭하는 것인데 이는 대식세포에서 존재하여 높은 농도의 NO 생산을 담당하기 때문에 그것은 만성적인 염증 손상을 일으키는 주된 악성 인자로 여겨져 왔다. 사람 류마티오이드 활막세포에서 NOS-II 기전에 대한 이해는 NO pathway를 조절함으로써, 만성 염증 질환 치료제의 개발을 가능하게 하였고, 이러한 NOS-II의 선택적인 억제제로는 aminoguanidine, N-iminoethyl-L-lysine 등이 있다^{59,61)}.

본 실험에서 NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 억제되었다(Fig. 11).

NO는 short-lived free radical로 혈관의 긴장, 혈소판 기능, 신경 전달, 면역 기능에서 중요한 역할을 한다. 또한 전염증성 특징을 나타내며 염증 반응을 조절하는 숙주의 방어와 면역에서 중요한 역할을 하고 있다. SLE, Sjogren's syndrome, vasculitis, 류마토이드 관절염 및 골관절염 등과 같은 질병의 다양한 과정동안 과량 생산된다⁶²⁾.

활동성 류마토이드 관절염 환자에서 단핵세포는 NO합성을 증가시켜, 과다한 NO는 염증성 연골세포의 정상대사과정에 생성되는 활성산소 superoxidase anion(O₂)와 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite (ONCC)를 생성함으로써 골흡수를 증진시키고 연골을 손상시킨다⁶³⁾. NO는 IL-1의 matrix 생산의 억제작용의 일부를 매개하고, 배양된 연골세포에서 MMPs(단백분해효소)를 활성화시키고, 염증조직의 혈관 투과성을 변화시킨다⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

본 실험에서 Nitric oxide 생성량에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군 100, 10 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게(p<0.001, p<0.05) 억제되었다(Table 2, Fig. 12).

hFLSs 증식에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군 100 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 억제되었다(Table 3, Fig. 13).

軟骨組織을 파괴하는 물질 중 하나로 추측되고 있는 ROS는 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, hypochlorous acid 등이 이것에 속하며, superoxide radical, hydrogen peroxide은 직접적으로 조직을 손상시키지는 않지만 여러 기전에 의해서 반응성 높은 hydroxyl radical로 전환되어 조직에 손상을 주는 것으로 알려져 있다⁶⁷⁾. 이처럼 ROS가 류마토이드 관절염 발병에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀짐에 따라 이를 소거하여 류마토이드 관절염을 치료하려는 연구가 진행되고 있다^{68,69)}.

본 실험에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군의 모든 농도에서 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 14).

이상의 결과를 총괄해보면 加味疎風活血湯이

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3, TIMP-1, NOS-II의 유전자 발현을 조절하고, NO 생성, hFLSs 증식, ROS 생성을 억제하는 효과를 나타냄으로써 류마토이드 관절염을 비롯한 여러 염증질환에도 효과가 있을 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

結 論

加味疎風活血湯이 류마토이드 관절염에 미치는 영향을 규명하고자, 류마토이드 관절염 환자의 활막세포내 유관한 싸이토카인의 유전자 발현, NO 생성, 세포증식 변화 및 ROS 생성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8의 유전자 발현은 100, 10 μ g/ml 농도에서 억제되었고, IL-1 β 의 유전자 발현은 100 μ g/ml의 농도에서 억제되었다.
 2. ICAM-1의 유전자 발현은 100, 10 μ g/ml 농도에서 억제되었다.
 3. MMP-3의 유전자 발현은 100, 10 μ g/ml 농도에서 억제되었고, TIMP-1의 유전자 발현은 100, 10 μ g/ml 농도에서 증가되었다.
 4. NOS-II의 유전자 발현은 100 μ g/ml에서 억제되었다.
 5. NO 생성은 100, 10 μ g/ml에서 유의성 있게 억제되었다.
 6. 세포증식은 100 μ g/ml에서 유의성 있게 억제되었다.
 7. ROS 생성은 100, 10 μ g/ml에서 억제되었다.
- 이상과 같이 加味疎風活血湯이 류마토이드 관절염 환자의 활막세포에서 유효한 면역조절작용을 나타내었으며, 향후 이에 대한 임상적 연구가 필요하다고 생각된다.

參考文獻

1. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서

- 울:정담출판사. 1997:1779-85.
2. 배상철. 류마티스 관절염치료의 최신지견. 가정의학회지. 2001;22(1):21-6.
 3. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울:최신의 학사. 2001:175-6.
 4. 전국한외과대학재활의학교실. 동의재활의학 과학. 서울:서원당. 1995:95-6.
 5. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:365-78.
 6. 姜仁守. 痺證治療의 用藥에 관한 小考. 대한 한의학회지. 1990;11(1):245-52.
 7. 金起賢. 痺證. 서울:정담출판사. 1993:23-9.
 8. 최도영, 이재동, 백용현, 이송실, 유명철, 한정수, 양형인, 박상도, 유미현, 박은경, 박동석. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지. 2004;21(4):177-96.
 9. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논문의 경향. 대한침구학회지. 2001;19(5):190-4.
 10. 沈金鰲. 沈氏尊生書. 臺北:自由出版社. 1980:309-17.
 11. 남영. 歷節風에 응용되는 疎風活血湯의 消炎, 鎮痛, 解熱 효과에 관한 연구. 경희대학교대학원. 1981.
 12. 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.
 13. 김정진. 濃度에 따른 加味疎風活血湯 水鍼이 흰쥐의 Adjuvant關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
 14. 宋彥錫. 加味疎風活血湯 水鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1990.
 15. 곽중문. 疎風活血湯加味가 류마티드 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.
 16. 양동원. 加味疎風活血湯이 炎症誘發 cytokine 과 MRL/MpJ-lpr/lpr 생쥐의 關節炎 抑制에 관한 研究. 대전대학교대학원. 2003.
 17. 楊維傑 編著. 黃帝內經素問譯解. 台北市:台聯國風出版社. 1984:95-6, 328-36.
 18. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:도서출판 영림사. 1994:277, 307, 425, 434, 446.
 19. 이희태, 이학인. 홍화약침이 (紅花藥鍼) Adjuvant 관절염에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 경산대학교 제한동의학술원. 동서의학. 1998:23(3):6-20.
 20. 徐海卿. 류마티드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應. 大田大學校大學院. 2003.
 21. 최정식, 송대원. 鷄血藤이 collagen으로 유발된 생쥐의 관절염억제에 관한 연구. 대한본초학회지. 2003;18(3):79-88.
 22. 錢瑞琴, 張春英, 付宏征, 林文翰, 高子芬. 豨薟草活性部位抗風濕作用机理研究 (Study on Therapeutic Mechanism of Anti-Rheumatism Action of Herba Siegesbeckiae). 中國中西醫結合雜誌. 2000;20(3):192-5.
 23. 조영주. 豨薟이 炎症性 싸이토카인 및 류마티스양 關節炎에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 2003.
 24. 정선. 의이인탕의 소염□진통작용. 조선대학교대학원. 1999.
 25. 김훈. 薏苡仁分劃藥鍼이 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1997.
 26. 이준호. 澤蘭藥鍼이 Collagen으로 誘發시킨 關節炎에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 2000.
 27. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학 강의. 대구:경북대학교출판부. 1996:10, 22, 25, 77, 193, 200, 211-2, 215, 232-5, 248, 357.
 28. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994:18, 134, 148-50, 206.
 29. 타다토미오지 저, 황상의 역. 면역의 의미론.

- 서울:하늘과학문고. 1998;43, 45, 69, 92.
30. 中島泉 著, 吳贊鎬 譯. 신면역학입문. 서울: 지구문화사. 1997;63, 118, 120, 123-4, 127-8, 175-6, 185-7, 234, 258-9.
 31. 서울대학교 의과대학편. 중양학. 서울:서울대학교출판부. 1992:188-9, 228-9.
 32. Old, L. J.. in Tumor Necrosis Factor. Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy (Bonavida, B., and Granger, G., eds), Karger, Basel. 1990:1-30.
 33. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M.. Apoptosis control by death and decoy receptors, Curr. Opin. Cell Biol. 1999;11:255-60.
 34. Feldman M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. Cell. 1996;85:307-10.
 35. Elliot M, Maini RN, Feldmann M. Randomised double blind comparison of a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha versus placebo in rheumatoid arthritis. Lancet. 1994;344:1105-10.
 36. Mageed RA, Adams G, Woodrow D, Podhajcer OL, Chernajovsky Y. Prevention of collagen-induced arthritis by gene delivery of soluble TNF receptor. Gen Ther. 1998;5:1584-92.
 37. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6 from basic science to medicine. Arthritis Res. 2002;4:233-42.
 38. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deux-chaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum. 1988;32:784-8.
 39. 이충원. 竝祛湯이 류마토이드 관절염 및 Human Monocyte의 IL-8에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1995.
 40. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. Arthritis Rheum. 1993;36(2):137-46.
 41. Hale LP, Martin ME, McCollum DE, Nunley JA, Springer TA, Singer KH, Hayns BF. Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment. Arthritis Rheum. 1989;32:22-30.
 42. Tsai C, Diaz LA, Singer NG, Li LL, Kirsch AH, Mitra R, Nickoloff BJ, Crofford LJ, Fox DA. Responsiveness of human T lymphocytes to bacterial superantigens presented by cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. Arthritis Rheum. 1996;39(1):125-36.
 43. 전재범, 김동욱, 김태환, 김승영, 김평남, 정성수, 이인홍, 배상철, 유대현, 김순길, 김성운. 류마티스 관절염 환자의 활액막 세포와 T세포의 유착에서 ICAM-1의 역할. 대한류마티스학회지. 1995;2(2):119-125.
 44. Pitzalis C, Kingsley GH, Panayi GS. Adhesion molecules in rheumatoid arthritis. Role in the pathogenesis and prospects for therapy. Ann Rheum Dis. 1994;53:287-8.
 45. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis. Arthritis Rheum. 1990;33(6):768-73.
 46. 김신규. 류마티스 관절염의 면역혈청학적 검사. 대한의학협회지. 1992;35(10):1207-12.
 47. Marlor CW, Webb DL, Bombara MP, Greve JM, Blue ML. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblastlike synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. Am J Pathol. 1992;140(5):1055-60.
 48. Nagase, H., and Woessner, J. F. Jr.. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 1999;274:21491-4.

49. Goupille P, Jayson M, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases. The clue to intervertebral disc degeneration Spine. 1998;23:1612-26.
50. Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W.. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. Nature. 1977;389:77-81.
51. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). J Cell Sci USA. 1994;107:2373-9.
52. Yang TT, Hawkes SP. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:10676-80.
53. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. J Cell Physiol. 1993;157:351-8.
54. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane. requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. J Cell Biol. 199;108:671-82.
55. Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). Biochem Biophys Res Commun. 1990;171:1264-71.
56. Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. Biochem Cell Biol. 1996;74:853-62.
57. Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS, Zetter B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38:817-23.
58. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs. Spine. 1996;21:1-8.
59. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. Mol. Med. 2000;6:347.
60. Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. Eur. J. Pharmacol. 1995;273:15.
61. McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. J Immunol. 2001;166(4):2734-40.
62. Clancy, RM; Amin, AR; Abramson, SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis & Rheumatism. Arthritis Rheum. 1998;41(7):1141-51.
63. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Immunology. 2001;103(3):255-61.
64. Van't Hof RJ. Nitric Oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. Rheumatology. 2000;39:1004-8.
65. Ralston. Nitric Oxide and bone. what a gas.

- Rheumatology. 1997;36:831-8.
66. Grabowski PS. Immunolocalization of inducible Nitric Oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Rheumatology. 1997;36:651-5.
67. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med. 2000;108(8):652-9.
68. Cremer L, Herold A, Avram D, Szegli G. A purified green barley extract with modulatory properties upon TNF alpha and ROS released by human specialised cells isolated from RA patients. Roum Arch Microbiol Immunol. 1998 ;57(3-4):231-42.
69. Ostrakhovich EA, Ilich-Stoianovich O, Afanas'ev IB. Active forms of oxygen and nitrogen in blood cells of patients with rheumatoid arthritis. effect of laser therapy. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2001;(5):23-7.