

원저

# 소염약침의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

• 윤미영<sup>1</sup>, 유화승<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>대전대학교 한의과대학 한방병리학교실

<sup>2</sup>대전대학교 한의과대학 둔산한방병원 동서암센터

## Inhibitory Effects of Soyeum Pharmacopuncture (SPP) on LPS-induced Inflammation Related Cytokine Expressions of RAW 264.7 cells

Yoon Mi-Young<sup>1</sup> · Yoo Hwa-Seung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oriental Pathology, Oriental Medical School, Daejeon University

<sup>2</sup>East-West Cancer Center, Daejeon University Dunsan Oriental Hospital

### ABSTRACT

**Aim** This study was done to investigate whether SPP has inhibitory effects on the activation of RAW 264.7 cells.  
**Method** In tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/ interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6, the mRNA expression of molecular indicators related to inflammatory changes of the Rheumatoid Arthritis (RA) were examined using quantitative real-time PCR.  
**Results** The treatment of SPP significantly suppressed the expression of proinflammatory cytokines and chemokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 compared with the control. The expression of NOS-II was considerably reduced, which was accompanied by a reduction in the production of nitric oxide (NO). It also reduced the expression of TNF- $\alpha$  in serum of Balb/c mice compared with control group.  
**Conclusion** SPP is an effective herbal material for suppressing the inflammation related cytokines of RAW 264.7 cells.

**key words** RAW 264.7, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NOS-II, nitric oxide (NO), Anti-inflammation

## 1. 서론

류마티오이드 관절염 (Rheumatoid arthritis, RA)은 여러 관절에 염증을 유발하는 자가 면역성 질환이다. 활막세포 (sinoviocytes)의 활성화로 인한 만성적인 염증이 지속되어 판누스 (pannus)를 형성하며, 이들은 비가역적인 연골과 관절의 파괴를 하여 여러 관절에 부종 및 통증을 동반하면서 관절 강직 및 변형을 초래하는 자가 면역성 질환으로, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 염증성 사이토카인들이 질병 진행에 중심적 역할을 하는 것은 잘 알려져 있다<sup>1,4</sup>. 또

한 NO와 같은 염증성 매개 물질의 분비 등은 대식세포 등 염증 세포의 활막 내로의 이동을 증가시킨다<sup>5</sup>.

한약의 병리적 염증 억제효과에 대한 최근 관련 연구를 살펴보면 이<sup>6</sup>는 계혈등의 항염 활성 효과를, 김<sup>7</sup>은 현호색, 홍화, 적작약이 관절염 흰쥐의 염증과 간에 미치는 영향을, 조<sup>8</sup>는 희침이 염증성 사이토카인 및 류마티스양 관절염에 미치는 영향 등을 각각 보고한 바가 있다. 또 소염 약침에 대한 연구로는 staphylococcus aureus에 미치는 영향<sup>9-10</sup> 등에 대해 발표된 바가 있으나 이는 증류약침액에 관련된 연구로 동결건조분(기제)을 이용한 소염약침액에

\* 교신저자 : 유화승, 대전시 서구 둔산동 1136 대전대부속 둔산한방병원 동서암센터  
(Tel: 042-470-9132 Fax: 042-470-9006, E-mail: altyhs@dju.ac.kr)

대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 소염약침의 질관리(Quality control)를 위해 HPTLC(high-performance thin layer chromatography)를 실시하였고, 소염효과에 대한 연구를 위해 소염약침의 관절염과 관련된 염증 억제 효과를 분자적 수준에서 조사하기 위하여 LPS에 의해서 활성화된 RAW 264.7 세포의 염증성 사이토카인의 발현 변화 정도를 측정한바 유의적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 소염약침의 처방은 다음과 같다 (Table 1).

〈Table 1〉 Prescription of "Soyeum"

Herb	Botanical name	Relative amount (g)
蒲公英	Taraxaci herba	77.4
金銀花	Lonicerae flos	77.4
生地黄	Rehmanniae radix	77.4
連翹	Forsythiae fructus	77.4
黃連	Coptidis rhizoma	47.6
黃芩	Scutellariae radix	47.6
黃柏	Phellodendri cortex	47.6
梔子	Gardeniae fructus	47.6
Total amount		500.0

#### 2) 시약

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-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), chloroform, RPMI-1640 배양액, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) 등은 Sigma 사 (USA) 제품을, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는

Promega사 (Madison, USA) 제품을, RNazol<sup>®</sup>는 Tel-Test사 (USA) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, USA) 제품을, DMED은 Gibco사 (Gaithersburg, MD, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen사 (Torreyana, USA) 제품을, 인간 재조합 TNF-a와 IL-1b는 R&D system사 (Minneapolis, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 소염약침액 제조방법

##### (1) 소염약침액 추출

소염약침의 처방 (500g)을 준비하여, 3차 증류수 (UP)로 먼지를 제거한다.

##### (2) 약재불림

반응조하부에 소염약침의 처방 (500g\*1)당 증류수 2.500cc를 넣고, 반응조상부와 환류 냉각관만을 설치하여 1시간 동안 불린다.

##### (3) 전탕

Controller의 온도와 시간을 설정한 후 전원을 켜면 impeller가 회전하면서 반응조 내부의 소염을 저어주게 된다. 이때 냉각관으로 약 5℃의 냉각수가 흐르면 전탕이 되는 동안 소염 성분이 외부로 빠져 나가지 않고, 반응조 내에서만 순환한다(팔강약침의 전탕원리와 동일, 전탕온도 : 105℃, 시간 : 120분).

##### (4) 상층액 분리

전탕이 끝난 소염 농축액을 부후너 깔대기 (Buchner Funnel)로 걸러서 찌꺼기는 버리고 여액은 갈색 병에 담아, 알코올 용매를 이용하여 추출한다.

##### (5) 90% alcohol 교반과 감압농축

① 소염 농축액의 양을 측정하여 alcohol 90% ((농축액\*90)/10)를 첨가하여 magnetic stirrer로 3시간 이상 교반한다.

② decompressor 기를 이용하여 추출한다.

③ 자석 교반이 끝나면 둥근 플라스크에 90% alcohol 교반액을 넣고 감압농축한다.

④ 감압농축이 되면 alcohol은 끓는점의 차이에 의한

추출법으로 날아가고, 농축된 소염만 플라스크에 남는다. (온도 : 65℃이하, vacuum : 15정도 설정, 약 5℃의 냉각수).

(6) 80% alcohol 교반과 감압농축

90% alcohol 감압농축액의 양을 측정하여 alcohol 80%로 조정한 후 3시간 이상 교반한다 (예 : 90% alcohol 감압농축액 200cc + alcohol 800cc). 자석 교반이 끝나면 동근 플라스크에 80% alcohol 교반 액을 넣고 감압 농축한다.

(7) 70% alcohol 교반 후 여과

① 80% alcohol 감압농축액의 양을 측정하여 alcohol 70%로 조정한 후 3시간 이상 교반한다 (예, 80% alcohol 감압농축액 300cc + alcohol 700cc).

② 자석 교반이 끝나면 부후너 깔대기 (Buchner Funnel) 여과하여 여액을 감압농축 한다.

(8) 재 감압농축 및 여과

70% alcohol 교반까지 3단계 완료 후 증류수를 넣어서 재감압농축 한다 (마지막 단계이므로 caramel 상태가 될 때까지 충분히 감압 농축한다). 이때 잔여 alcohol이 완전히 휘발될 수 있도록 최대한 감압농축한 후 0.45 $\mu$ m → 0.2  $\mu$ m 까지 여과한다.

(9) 예비동결

① 재감압농축이 완료되면 동결건조기용 플라스크에 나누어 -30℃정도에서 예비동결 한 후 동결 건조기에서 건조한다 (동결 건조된 소염 분말은 평균적으로 500g 당 10g이 얻어진다).

2) HPTLC를 이용한 소염약침의 지문분석

그림 1에 보이는 것처럼 고성능 박피 크로마토그래피 (HPTLC)에 기반한 지문분석이 CAMAG application system (Switzerland)에 의해 시행되었다. 황련약침은 HPLC-grade methanol에 용해되어 pre-washed silica gel 60 F254 HPTLC plates (size 10×10 cm; thickness of the silica gel 0.2 mm; Merck, Germany)에 automated applicator (Linomat IV, CAMAG, Merck KGaA, Germany)와 함께 공급되어졌다. 다음으로 소염약침은 HPLC-grade buthanol/acetic acid/water (7:1:2)를 사용하여 분리되어졌다(migration

distance 60 mm). 이동된 물질들은 digital camera (CAMAG, Germany)로 촬영되었다.

3) RAW 264.7 세포배양

DMEM {collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), 항생제(penicillinm 10<sup>4</sup>  $\mu$ /ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 $\mu$ g/ml) 함유를 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수(PBS)를 가하여 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리하여 세포를 얻었다. 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지를 사용하여 1주일 동안 배양한 후, 다시 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 가하여 세포를 얻었다. 이러한 과정을 연속으로 3회 반복하여 최종적으로 살아있는 부착세포를 얻어 DMEM-5 % FBS 배지에서 배양하였다.

4) Quantitative real time RT-PCR

(1) RNA 추출

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 10% FBS를 넣어 준 DMEM 배지를 사용하여 2×10<sup>5</sup>-5 x 10<sup>5</sup> 로 각 well에 분주하고 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. FBS를 함유하지 않은 배지에서 12 시간 배양한 후, 각 well에 SPP(100, 10  $\mu$ g/ml)와 양성대조군으로 CsA (10  $\mu$ g/ml)를 처리하고 1시간 후 LPS (10 U/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzol<sup>B</sup> 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 클로로포름(CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상층액을 회수하여 2-프로판올(2-propanol) 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % 에탄올로 수세하고 3분간 진공 펌프에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 디에틸파이로카보네이트 (DEPC)를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹여 75 ℃에서 불활성화 시킨 후 cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3  $\mu$ g을 DNase I(10  $\mu$ /l)를 처리하고 37 ℃ 에서 30

분간 반응한 후, 75 °C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5µl 10mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides(25pmole/ 25µl), 1µl RNase inhibitor(20U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5µl 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT(200U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl 가 되도록 하였다. 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm 에서 5초간 원심분리하여 37 °C에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 °C에서 5분 동안 배양하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Quantitative real-time RT-PCR

Semi quantitative real time PCR은 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 primer는 Table II에 표시하였다. 염증성 사이토카인의 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard로는 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종 농도는 200 nM이 되게 반응시켰다. quantitative real-time PCR의 조건은 pre-denaturation은 50 °C에서 2 min, 94 °C에서 10 분, 그리고 40 cycles은 95 °C에서 0.15 min, 60 °C에서 1 min 으로 하여서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하였고, 실험군의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR을 사용하여 아래와 같이 계산하였다 (Table 2).

<Table 2> Primer sequences for real-time RT-PCR.

Human TNF-α	F: 5' gggggaggatggatggaggatga 3' R: 5' GCgggtGCagaagatgatcctg 3'
Human interleukin-1β	F: 5' tccaggacagatggag 3' R: 5' tcttcaacaGCcaggacag 3'
Human interleukin-6	F: 5' GCccccacacagacagccactc 3' R: 5' tgccctttgctgcttcacaca 3'
Human NOS-II	F: 5' acaagcctaccctccagat 3' R: 5' ctccctgttacGCcttcca 3'

y = x (1+e)<sup>n</sup>

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

e = efficiency로 계산하여 RQ (relative quantitative)를 측정하였다.

(4) LPS로 유도된 급성 염증생쥐모델

급성 염증성 생쥐모델은 lipopolysaccharide (LPS)를 1mg/kg을 복강에 주사한 후 90분 후에 혈액을 채혈하여 염증유전자의 발현을 분석하였다.

5) 혈청에서 TNF-α 생성량 측정

LPS를 주사하고 90분 후에 Balb/c 생쥐를 ethyl ether로 마취하고 심장천자법으로 채혈한 후 혈청을 분리하여 TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다. 각 well에 생쥐의 혈청 100µl (1/100 dilution)씩 분주한 후 antibody cytokine-biotined conjugated 100µl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 2시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100µl를 처리하고 2시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 소염약침의 지문분석

소염약침을 입증하고 질관리를 하기위해 HPTLC에 의한 지문분석을 하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 소염 약침은 황련의 주요한 성분인 베르베린(berberine) 및 콕티신(coptisine)을 포함하고 있으며, 보이는 기타 밴드들은 에피베르베린(epiberberine), 팔마틴(palmatine) 등으로 추정된다.

#### 2. 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향

SPP가 염증성 사이토카인의 발현에 대하여 억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 LPS로 RAW 264.7 세포를 자극하였다. 대조군에는 배지만을 처리 하였고, SPP는 10 µg/ml 혹은 100 µg/ml로 처리하였다. 양성 대조군으로는 CsA (10 µg/ml)를 사용하였다. LPS로 자극하지 않은 세포를 정상군(WT)으로 하였다. 6 시간 후 TNF-α, IL-1b, IL-6의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR 방법에 의하여 측정하였다. LPS만을 처리한 세포에서 조사한 모든 사이토카인의 발현이 정상군에 비하여 현저하게 증가

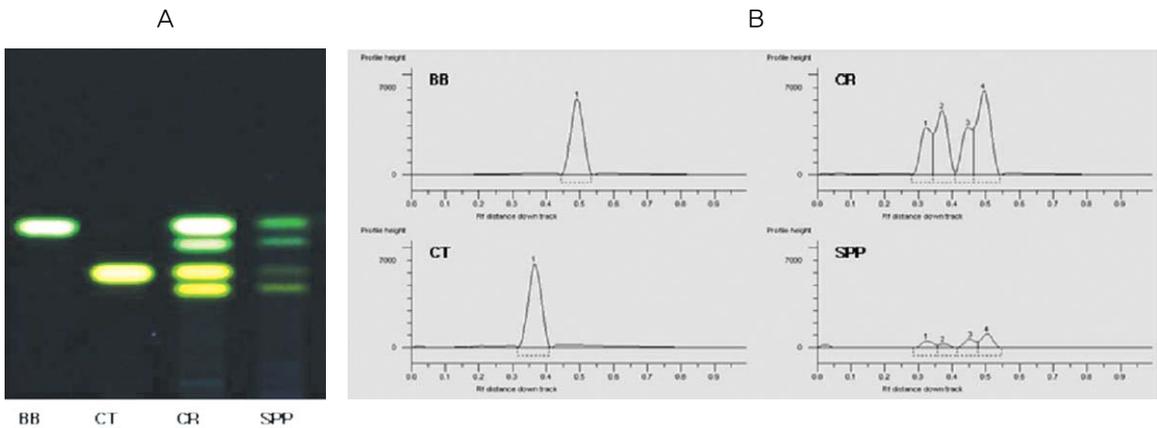


Fig. 1 Fingerprint of SPP

Two microliter of berberine (0.2mg/ml), Coptisine (0.2mg/ml), 4 uL of Coptis rhizoma extract (0.2mg/ml), and 4 uL of SSP (500 mg/ml), were spotted on HPTLC plate and separated (migration distance 70 mm) using HPLC-grade ethanol/chloroform/acetone/acetic acid/water (3:3:3:0.5:0.5) (A). The migrated components were visualized (A) at 366 nm and analyzed with density and RF value (B). BB, berberine CT, Coptisine CR, Coptis rhizoma SSP, Soyeum Pharmacopuncture

하였다. SPP는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현은 각각 0.724, 0.761, 0.434로 IL-6의 감소가 가장 현저하였다 (Fig. 2 A, B, C).

이들 사이토카인은 모두 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-6의 발현은 현저히 감소하여 CsA에 의한 억제 정도와 비슷하거나 우월하였다 (Fig. 2 C). 이러한 결과는 SPP가 활성화된 RAW 264.7 세포에서 특정 염증성 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제 할 수 있다는 것을 의미하였다.

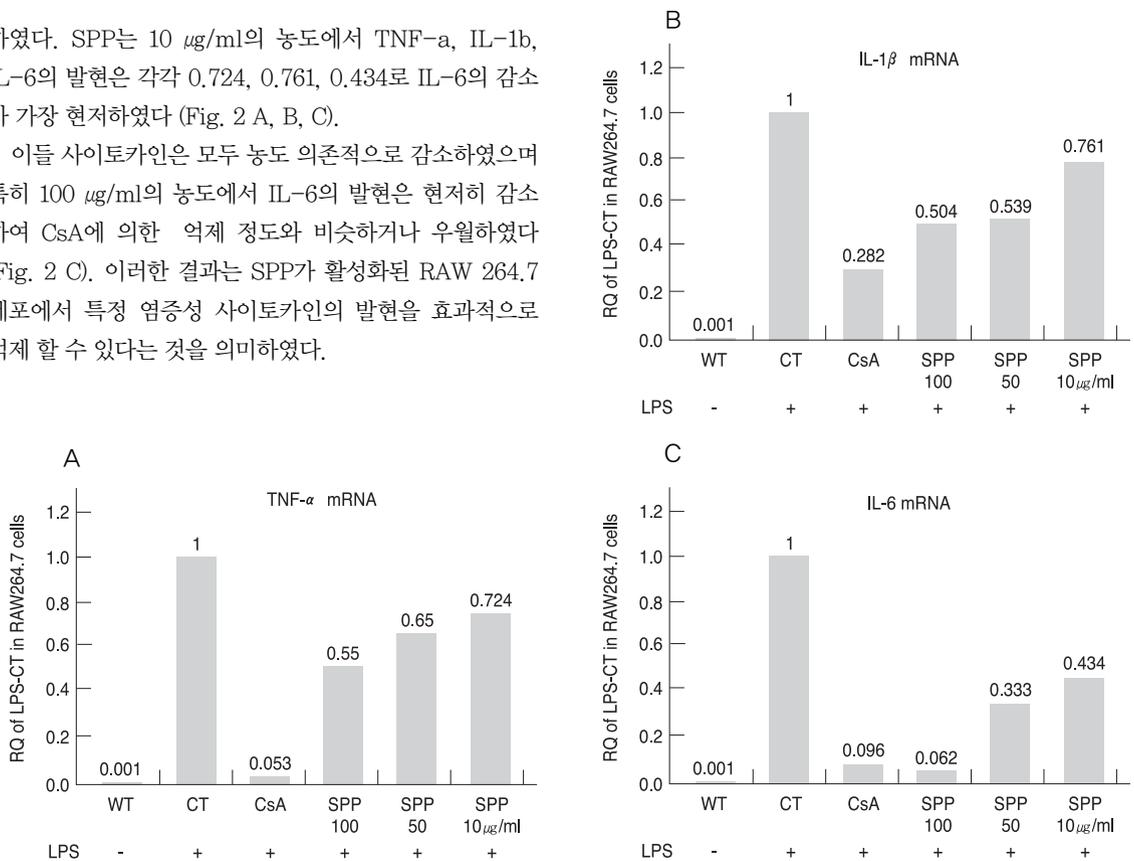


Fig. 2 Inhibitory effects of SPP on the mRNA expression of proinflammatory cytokines

The RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) and treated with medium (CT), CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ , MT) or SPP (10, 50 or 100  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 hrs. The WT(wild type) group was cultured without cytokine stimulation. The levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) and IL-6 (C) mRNA expression were measured by quantitative real-time RT-PCR.

### 3. NOS-II와 NO 생성에 미치는 영향

NO는 관절 조직에서 혈관의 확장과 염증을 매개하는 물질로서 MMPs의 발현 증가를 유도하여 관절 조직의 파괴에 기여한다<sup>11-12)</sup>.

NO의 발생은 염증성 사이토카인에 의한 NOS-II의 mRNA 발현의 증가로 인한 효소 반응에 의한다는 것은 이미 보고된 바 있다. RAW 264.7 세포에서 NOS-II mRNA의 발현은 미약하였으나 LPS로 처리한 세포에서 현저히 증가하였다 (Fig. 3). SPP를 10, 50 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였을 때, 각각 0.219, 0.129, 0.104로 나타나 농도 의존적으로 NOS-II mRNA의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3A). 이러한 감소는 CsA에 의한 NOS-II mRNA 감소 정도와 비슷하였다. SPP가 NO 생성에는 어떠한 효과를 가지고 있는지는 배양액 중에 존재하는 NO의 양을 Griess 시약에 의한 발색반응을 이용하여 확인하였다. 540 nm에서 흡광도를 측정된 결과 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포 배양액 중의 흡광도 값이 6배 정도 증가하였다. SPP를 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포와 양성대조군으로 CsA를 처리 한 세포 배양액 중의 발색정도는 50% 이상 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 SPP가 NOS-II의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시킬 수 있다는 것을 의미하였다.

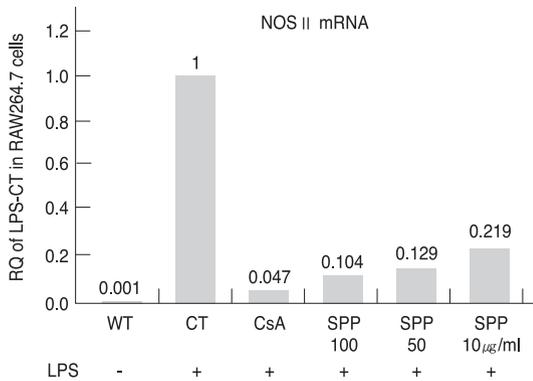


Fig. 3 Inhibitory effects of SPP on the mRNA expression of NOS II and NO production

The hFLS were stimulated with LPS (100 ng/ml) and treated with medium (CT), CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ , MT) or SPP (10, 50 or 100  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 hrs. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of NOS-II mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR. The production of NO in the supernatant was determined by measuring O.D at 540 nm.

### 4. 동물에서의 TNF-alpha 검사

Balb/C 생쥐에 5일간 소염약침을 복강투여하고 (3 mg /20 g) 당일 투여 후 1시간 후에 LPS를 주사한 후 90분 후에 혈청을 분리하여 TNF- $\alpha$  ELISA를 실시한 결과 Normal은  $277.3 \pm 18.73$  (pg/ml), Control은  $7135.7 \pm 426.6$  (pg/ml), SPP 투여군은  $4808.2 \pm 673.2$  (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다. 이 실험은 in vivo에서 약물에 의한 TNF- $\alpha$  억제능을 관찰하는데 효과적이다. 실험 결과 대조군에 비해 소염약침을 투여한 경우의 TNF- $\alpha$  발현이 현저하게 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

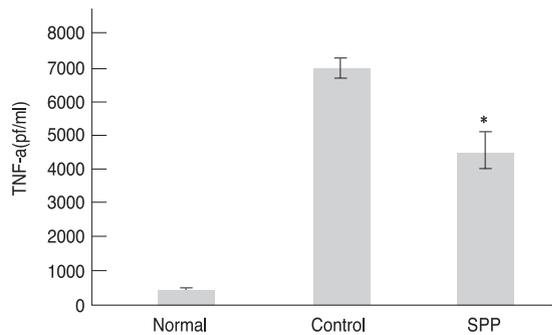


Fig. 4 Inhibitory effects of SPP on the TNF- $\alpha$  expression of the serum of Balb/c mice

Female mice were co-treatment with SPP (3mg /20 g) and LPS (5 mg/kg) into the Balb/c mice. Total TNF- $\alpha$  levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were analyzed using Student's paired test and differences between experimental and control groups were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or higher T test.

## IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 류마티드 관절염 (RA)에 대한 SPP의 효능 및 기전을 분자생물학적으로 검색하고자 RAW 264.7 세포로부터 병리적 염증과 관련된 유전자의 발현에 관한 영향을 조사하였다. 쥐 대식세포주인 RAW264.7 Cells는 mouse macrophage cell에서 유래된 세포로, 대식세포 (macrophage)는 자연면역과 획득면역 반응에 직접 관여하여 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하고, 특히

염증반응에 관여하여 염증반응시 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)과 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 염증 매개 사이토카인의 생산을 유도하여 감염 초기 생체 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup>

류마티오이드 관절염 환자에서 TNF- $\alpha$ 나 IL-1b와 같은 염증성 사이토카인은 일차적으로는 활액 내의 대식세포에서 발현되어 다양한 병리작용을 나타낸다. TNF- $\alpha$ 는 IL-1b, IL-6와 같은 사이토카인의 발현 유도와 내막 혈관내피세포에서의 어드히전(adhesion) 분자의 발현 증가에 의한 염증 부위의 면역 세포의 침윤 및 중성구, 활막세포, 연골 세포에서의 MMPs의 증가를 유도 한다. 또 IL-1b의 활성화는 TNF- $\alpha$  활성화의 범위와 유사하여 염증 반응과 내피세포에 백혈구의 부착 등에 중요한 역할을 하고, 연골 분해, 골 재흡수를 자극하고 콜라겐과 프로티오글리칸 (proteoglycan)의 합성을 막는다. 더욱이 혈중 IL-1 $\beta$ 의 농도는 ESR, 통증의 강도 등과 비례하고 관절 파괴와도 연관이 있음이 알려져 있다.<sup>14-15)</sup>

IL-6은 다양한 급성 염증성 질환에 관련하는데, 류마티오이드 관절염 환자에서는 T 세포의 활성화 및 류마티오이드 인자 생성을 촉진한다<sup>16-17)</sup>. Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 NO synthase (NOS) 라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는데, 관절에서 과량의 NO 생성은 연골세포의 탈분화를 유도할 뿐만 아니라 연골 세포의 고사를 유발하고 MMPs를 조절하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 SPP는 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토인 유전자인 TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6와, 세포의 유주와 흡착에 관여하는 NOS-II 의 유전자 발현을 효과적으로 억제하고 NO의 생산을 억제시켰다. 이러한 결과들은 소염약침(SPP)이 염증과 염증세포의 유입을 효과적으로 억제 할 수 있는 가능성을 추측하게 한다.

소염 약침에 대한 연구로는 스태필로코쿠스 아우레우스 (staphylococcus aureus)에 미치는 영향<sup>9-10)</sup> 등이 보고된 바가 있으나 이들은 종류 약침액에 관련된 연구로, 동결건조분 (기제)을 이용한 소염 약침액에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구는 임상에서 활용도가 높은 소염약침의 소염작용에 대한 객관적 근거를 얻기위해 시도되었으며, 소염약침에 대해서 종류약침을 사용했을 경우 임상적으로는 활용도가 높으나 실제 약물개발에 있어서 소위 팔강약침(종류약침)은 질관리(quality control)에 있어서 문제점을 가지고 있어 동결건조분(기제)에 대한 기전탐색을 우선적으로 시행하게 되었다.

결론적으로 소염약침은 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하는데 특히 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-6의 발현은 현저히 감소하여 CsA에 의한 억제 정도와 비슷하거나 우월하였다. 또 소염약침은 NOS II의 유전자 발현을 억제하였으며, NO의 생성을 억제하였을 뿐만 아니라 동물실험에 있어서도 혈청내 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유의성 있게 억제시켰다. 이상의 결과로 보아 소염약침의 RAW 264.7 세포에서 발현되는 염증관련 사이토카인 억제 효능이 인정되며, 향후 이에 대한 동물 실험과 더불어 진일보한 연구가 요구되는 바이다.

### 참고문헌

1. Lee D.M., Weinblatt M. E. Rheumatoid arthritis. Lancet 358:903-911, 2001
2. Firestein G.S, Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423:356-361, 2003
3. Burmester G. R., Stuhlmuller B, Keyszer G., Kinne R. W. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis, mastermind or workhorse in arthritis? Arthritis Rheum 40:5-18, 2001
4. Chu C.Q., Field M., Feldmann M., Maini R. N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissue and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 34:1125-1132, 1991
5. Badolato R, oppenheim J. J. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 26:526-538, 1996
6. 이진훈 : 계열등의 항염활성효과, 강원대학교 석사학위논문, 1999
7. 김병수 : 玄胡素, 赤芍藥, 紅花 混合藥鍼液이 關節炎白鼠의 炎症과 肝에 미치는 影響, 강원대학교 석사학위논문, 2004
8. 조영주 : 희침이 炎症性 사이토카인 및 류마티스양 關節炎에 미치는 影響, 대전대학교 박사학위논문, 2003
9. 서형식. 소염약침액이 staphylococcus aureus와 staphylococcus epidermidis에 미치는 항균효과에

- 대한 실험적 연구. 대한약침학회지, 9(2):73-77, 2006
10. 서형식. 소염약침액, 황련해독탕, 황련이 staphylococcus aureus에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. 대한약침학회지, 9(2):87-92, 2006
  11. Pozzan M., Guerra M., Manzinie E, Calza L. A histochemical study of the rheumatoid synovium: focus on nitric oxide, nerve growth factor high affinity receptor and innervation. *J Rheumatol.* 27:1121-1127, 2000.
  12. Studer R., Jaffurs D., Stefanovic-Tacic M., Robbins P.D., Evans C.H. Nitric oxide in osteoarthritis 7:377-379, 1999.
  13. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264. 7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406(3):301-9, 2000
  14. Ainola M.M., Mandelin J.A., Liliestron M.P., Li T.F., Hukkanen M.V., Konttinen Y. T., Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: Involvement of MMP-3 and interleukin-b. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23:644-650, 2005
  15. North J, Situnayake R.D., Tikly M., Cremona A., Nicoll J., Kumaralne D.S., Nuki G. IL-1b, hand and foot bone mineral content and the development of joint erosions in RA *Ann. Rheum. Dis.* 53:543-546, 1994
  16. Okamoto H, Yamamura M., Morita Y., Harada S., Makino H, Ota Z. The synovial expression and serum levels of IL-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:1096-1105, 1997
  17. Kotake S., sato K., Kim K. J., Takahashi N., Udagawa N., Nakamura I. et al., IL-6 and IL-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteolike cell formation *J. Bone Miner Res* 11:88-95, 1996