

관절 5호방의 류마토이드 관절염 치료효과에 대한 실험적 연구

최재영 · 허동석 · 윤일지 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 한방재활의학과

Study on the Effect of *Gwanjulbang-5* in Rheumatoid Arthritis

Jae Young Choi, Dong Seok Heo, Il Ji Yoon, Min Seok Oh*

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

This study was carried out to know the effect of *Gwanjulbang-5*(hereinafter refer to GJB-5) to on Rheumatoid Arthritis by using human fibroblast-like synoviocytes(hFLS). We performed several experimetal items : that is cytotoxicity of GJB-5, mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in hFLS and production of NO, ROS. The results were obtained as follows : GJB-5 reduced the production of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 in hFLS, increased the production of TIMP-1. As well as GJB-5 reduced the production of ICAM-1, MMP-3, NOS-II, the production of NO and ROS, and the proliferation of hFLS in proportion to the concentration of GJB-5. In conclusion, these results shows that GJB-5 had immunomodulatory effects in treating rheumatoid arthritis.

Key words : *Gwanjulbang-5*, Rheumatoid Arthritis, immunomodulatory, Pro-inflammatory cytokines, Human fibroblast-like synoviocytes(hFLS)

서 론

류마토이드 관절염은 만성 활막염을 특징으로 하는 자가면역 질환으로 활막염이 지속되면서 연골과 연골하골까지 염증이 파급되어 관절이 파괴, 변형되고 신체 장애를 유발하는데, 류마토이드 관절염은 관절 뿐 아니라 폐나 신장 등의 장기를 침범하여 전신적인 질환으로 인식되고 있다¹⁾.

한의학에서 류마토이드 관절염이란 명칭을 직접 언급한 바는 없지만 문헌에 기록된 증상으로 미루어 볼 때 痺證, 痺痛, 歷節風과 같은 병증과 매우 흡사하며, 발병 원인은 風, 寒, 濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다²⁾. 邪氣의 침입은 대체로 생체의 正氣가 허약한 경우에 발생하는데 正氣는 인체의 정상적인 생리기능을 영위하는 필수적인 조건이며 邪氣에 저항하는 기능을 수행하므로 면역기능을 대변하는 한의학적 개념이라고 볼 수 있다³⁾.

류마토이드 관절염의 원인과 병태생리에 대하여 현재까지 명확한 결론이 없는 실정이며^{4,5)} 최근의 연구는 많은 변화가 있어 점차 유발유전자나 질병 악화 물질의 단백질 구조가 밝혀지

고 새로운 면역조절 물질이 발견되면서 면역학적, 유전학적인 논문들이 주종을 이루고 있으며⁶⁾, 한약을 이용한 류마토이드 관절염에 대한 실험적 연구⁷⁻¹⁵⁾가 활발히 이루어지고 있다.

본 실험에 쓰여진 관절 5호방은 補肝腎 하는 약제와 祛風除濕 하는 약제들이 적절히 배합되어 류마토이드 관절염에 임상적으로 쓰여지는 방제이다. 하지만 본 처방의 효과에 대한 실험적인 근거는 아직 미비한 실정이다.

이에 저자는 관절 5호방의 류마토이드 관절염에 대한 면역조절작용을 실험적으로 규명하기 위하여, 류마토이드 관절염 환자의 섬유아세포양 활막세포에 RT-PCR을 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3, TIMP-1, NOS-II의 유전자 발현을 측정하고, FLS 생성 및 NO 생성량을 측정하고, ROS의 생성억제 효과를 측정한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용한 관절 5호방(이하 GJB-5)의 구성 약물은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 Table 1에 표시하였다.

* 교신저자 : 오민석, 청주시 상당구 용담동 173-9, 대전대학교 청주한방병원

· E-mail : ohmin@dju.ac.kr, · Tel : 043-339-3721

· 접수 : 2007/03/08 · 채택 : 2007/04/04

Table 1. Herb Composition of Gwanjulbang-5(GJB-5)

韓藥名	生藥名	(g)
鷄血藤	<i>Spatholobi caulis</i>	8
豨薟	<i>Siegsbeckiae herba</i>	8
延胡索	<i>Corydalis tuber</i>	8
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	12
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	12
熟地黃	<i>Rehmannia Radix</i>	12
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	12
白茯苓	<i>Holen</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
破故紙	<i>Psoraleae Fructus</i>	4
杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	4
續斷	<i>Phlornis umbrosa</i>	4
陳皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
山椒	<i>Zanthoxylli Fructus</i>	1.5
Total amount		113.5

2) 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), DNase 1, methotrexate (MTX), trypsin-0.2% EDTA, 2,7-dichloro-dihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride (MgCl₂), gress, hapaque 1077 (Sigma Co., USA), EtoH, Naphthylethylene diamine dihydrochloride, H₃PO₄, Sulfonylamide, 등은 Sigma 사 (USA) 제품을, taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 는 TaKaRa 사 (Japan) 제품을, Naphthylethylene diamine dihydrochloride, H₃PO₄, Sulfonylamide, 역전사효소 (Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 promega 사 (Madison, USA) 제품을, glutaraldehyde, sodium cacodylate, RNAzol^B는 Tel-Test 사 (USA) 제품을, Dispase (dispase II, grade 11, Boehringer Mannheim, indianapolis, IN, USA), 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, USA) 제품을, DMED은 Gibco 사 (Gaithersburg, MD, USA) 제품을, RNase는 pharmingen 사 (Torreyana, USA) 제품, [methyl-3H] Thymidine (Amersham, USA), 인간 재조합 TNF-α와 IL-1β는 R&D system 사 (Minneapolis, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 조직 배양 슬라이드 (Nunc Inc., Na-perbille, IL, USA), 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Centrikon, Sigma), Bio-freezer (Sanyo, Japan), ice-maker (Vision, Korea), CO₂ incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., KMC-1400L, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), autoclave (Hirayama, Japan), plate shaker (Lab-Line, USA), Elisa leader (molecular devices, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검역의 조제

GJB-5의 3첩 분량에 각각 증류수 2,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고 이를 감압 추출장치 (Rotary evaporator, BuCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 후, 냉동 (-84℃) 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) human fibroblast-like synoviocytes(hFLS) 배양

외과 수술로 적출된 65세의 여성 류마티오이드 관절염 환자의 슬관절 조직을 차가운 인산완충식염수 (Dulbecco's phosphate buffered saline: D-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 Dispase를 포함하는 Jolik's MEM을 가해 37℃에 30분간 전탕하여 단일세포 부유액을 얻었다. 상층액을 다른 원심분리관에 옮기고 이와 동량의 5% 우태아 혈청을 포함하는 DMED 배지를 더해 얼음에 보관하였다. Dispase 처리를 3~4회 반복하면서 같은 방법으로 상층액을 모았다. 상층액 모두를 모아 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하고 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지로 두 번 씻어냈다. 세포의 수를 세고 단핵구 세포만 hapaque 1077 용액 위에서 원심분리한 후 경계층의 세포를 분리하여 15% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 1주일씩 5회 계대하면서 살아있는 부착 세포를 배양하였다.

3) 광학현미경 관찰

광학현미경 관찰을 위해서 2개의 구획을 가지고 있는 LAB-Tek 조직 배양 슬라이드에 세포를 48시간 배양하고, 고정액 (2.5% glutaraldehyde, 0.12 M sodium cacodylate buffer, pH 7.3)으로 점차 치환하며 4℃에서 30분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 광학현미경 1000배에서 관찰하였다

4) 실험군 분류

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

5) hFLS 활성 억제 효과 측정

TNF-α와 IL-1β에 의해 유도된 세포 증식의 억제 작용을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 × 10⁶의 세포를 배양하고 GJB-5 추출물 (1, 10, 100 μg/ml)을 처리한 후 1시간 후에 hrIL-1β (10 U/ml)와 hrTNF-α (10 ng/ml)를 처리하고 37℃, CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 4 시간 전에 50 μCi/ml의 [methyl-3H] Thymidine을 첨가하여 배양하였다.

세포 내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 dissociation으로 세포를 분리한 후 세포 수집기를 사용하여 유리 섬유여지 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

6) Real time Quantitative RT-PCR

(1) RNA 추출

관절 활막 세포를 24 well plate에 10%, FBS를 넣어진 DMEM 배지를 사용하여 $2 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ 로 각 well에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. FBS를 함유하지 않은 배지에서 12시간 배양한 후, 각 well에 GJB-5 (100, 10 µg/ml)와 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 세포를 수확하였다. 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 여기에 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 클로로포름(CHCl₃) 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-프로판올 (2-propanol) 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% 에탄올로 수세하고 3 분간 진공 펌프에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 75°C에서 불활성화시킨 후 cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 DNase I (10 U/µl)를 처리하고 37°C 에서 30분간 반응한 후, 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), 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. 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심분리 하여 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) Real Time Quantitative RT-PCR

Semi quantitative real time PCR은 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 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 2분, 94°C에서 10분, 그리고 40 cycles은 95°C에서 0.15 분, 60°C에서 1분으로 하여서 수행하였다.

실험군과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하였고, 실험군의 RQ(relative quantitative)는 Quantitative PCR을 사용하여 아래와 같이 계산하였다.

$$y = x(1 + e)n$$

x = starting quantity, y = yield, e = efficiency, n = number of cycles

7) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위하여 Griess 용액을 제조하였다. 용액 A (0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride 수용액)와 용액 B (5% H₃PO₄ 용액의 2% Sulfonamide)를 제조하여 냉암소에 보관하고, 사용 직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 활막 세포의 NO를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well당 5×10^5 씩 분주하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. GJB-5 (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)와 hrTNF-α와 hrIL-1β를 농도별로 처리한 후, 다시 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액 100 µl를 96 well plate에 분주하고 혼합용액 100 µl를 가하여 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 세포내 reactive oxygen species (ROS)의 분석

FSL내에서 생성된 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5 cells씩을 배양하고 hrIL-1β (10 U/ml)와 hrTNF-α (10 ng/ml)를 처리한 후, GJB-5 추출물 (1, 10, 100 µg/ml)을 처리하고 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 50 mM을 처리하고 5 분간 배양하고 2회 수세 한 후 유세포 분석기로 세포내 형광 DCF 또는 ROS를 측정하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, Student's t-test를 이용하여 p<0.05, p<0.01, p<0.001 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. hFLS 활성 억제 효과

GJB-5 투여군 100, 10, 1 µg/ml의 농도에서 각각 3070 ± 453.6, 5046.6 ± 485.8, 5028 ± 373.1 (cpm)로 나타나, 100 µg/ml의 농도에서 활성 억제 효과가 나타났다(Fig. 1).

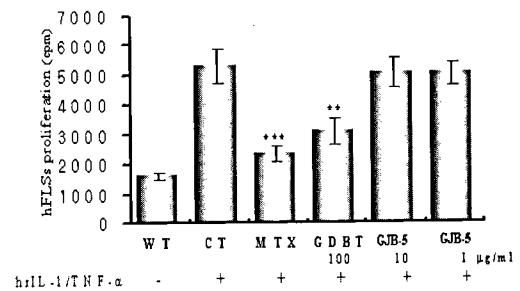


Fig. 1. Inhibitory effects of GJB-5 on the activation of hFLS. The hFLS were stimulated with hrTNF-α (10 ng/ml) and hrIL-1β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 µg/ml, MTX) and GJB-5 (100, 10, 1 µg/ml) for 6hr. The cells were harvested following the further incubation with [3H]-thymidine reagent for 4 hrs. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The cpm from harvested cells were measured as described in Material and Methods. The results are expressed the mean±SE. Statistically significant value was compared with control group by t-test (**p<0.05, ***p<0.01). WT : wild type(only FLS) CT : control group(WT + TNF-α + IL-1β) MTX : positive control group(CT + MTX)

2. 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향

GJB-5 투여군 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 TNF- α 의 발현은 각각 0.509, 0.933으로 IL-1 β 의 발현은 0.459, 0.836으로, IL-6의 발현은 0.684, 0.775로 농도 의존적인 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2, 3, 4).

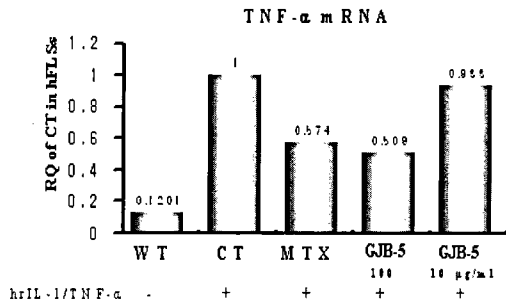


Fig. 2. Effects of GJB-5 on the TNF- α mRNA expression. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), and treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) or GJB-5 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of TNF- α mRNA expression were measured by quantitative real-time RT-PCR.

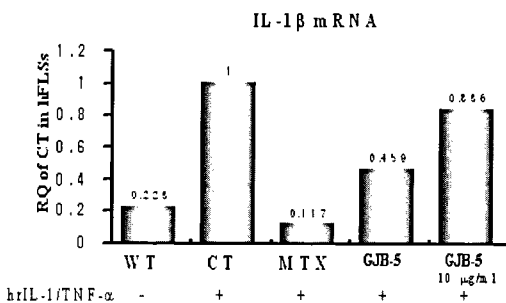


Fig. 3. Effects of GJB-5 on the IL-1 β mRNA expression. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) and GJB-5 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of IL-1 β mRNA expression were measured by quantitative real-time RT-PCR.

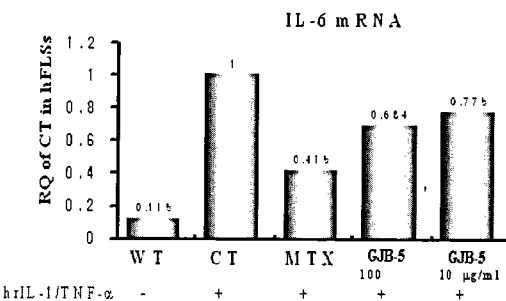


Fig. 4. Effects of GJB-5 on the IL-6 mRNA expression. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) and GJB-5 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of IL-6 mRNA expression were measured by quantitative real-time RT-PCR.

3. 염증세포의 유주와 부착에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

GJB-5 투여군 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 IL-8의 mRNA 발현이 0.235, 0.866으로 나타났고, ICAM-1의 mRNA 발현은 0.578, 0.754로 나타나 농도 의존적인 감소효과를 나타내었다(Fig. 5, 6).

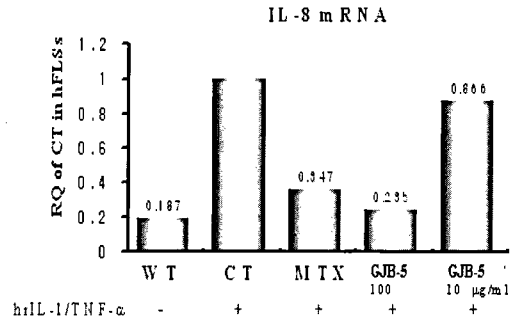


Fig. 5. Effects of GJB-5 on the IL-8 mRNA expression. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) and GJB-5 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of IL-8 mRNA expression were measured by quantitative real-time PCR.

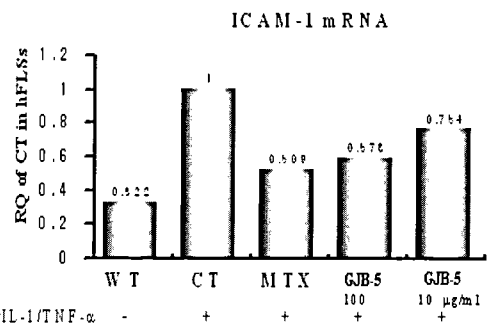


Fig. 6. Effects of GJB-5 on the ICAM-1 mRNA expression. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) and GJB-5 (100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of ICAM-1 mRNA expression were measured by quantitative real-time PCR.

4. NOS-II 유전자 발현과 NO 생성에 미치는 영향

NOS-II 유전자 발현은 GJB-5 투여군 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 0.587로 감소하였으며(Fig. 7), GJB-5가 NO 생성량에 미치는 영향에서는 GJB-5 투여군 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 각각 0.403 ± 0.026 , 0.367 ± 0.047 , 0.535 ± 0.040 nm로 나타나 농도의존적으로 감소하였고, 특히, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 8).

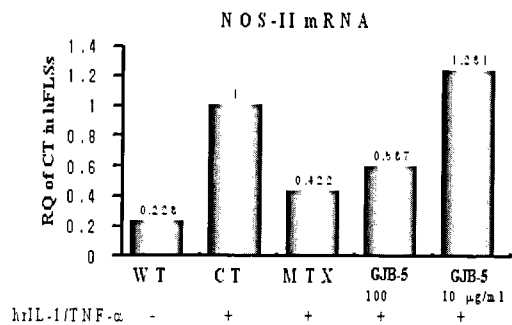


Fig. 7. Effects of GJB-5 on the mRNA expression of NOS-II. The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (10 ng/ml) and IL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrexate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX) and GJB-5 (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 hr. The WT group were cultured without cytokine stimulation. The levels of NOS-II mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR.

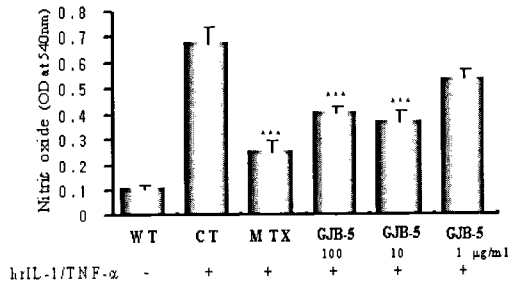


Fig. 8. Effects of GJB-5 on the nitric oxide production in human fibroblast-like synoviocytes. The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (10 ng/ml) and IL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrxate (10 μ g/ml, MTX) and GJB-5 (100, 10, 1 μ g/ml) for 6 hr. The WT group were cultured without cytokine stimulation. The production of NO in the supernatant were determined by measuring O.D at 540 nm. The statistically significant value was compared with the control group by t-test (***p<0.001).

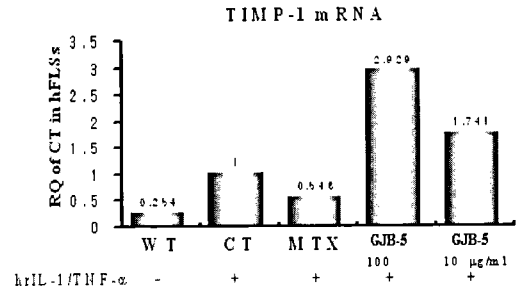


Fig. 11. Effects of GJB-5 on the mRNA expression of TIMP-1. The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrxate (10 μ g/ml, MTX) and GJB-5 (100, 10 μ g/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of TIMP-1 mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR.

5. ROS 생성에 미치는 영향

GJB-5 투여군의 1, 10, 100 μ g/ml 농도에서 각각 77.3, 58, 50.1%로 나타나 농도 의존적으로 생성 억제효과가 나타났다(Fig. 9).

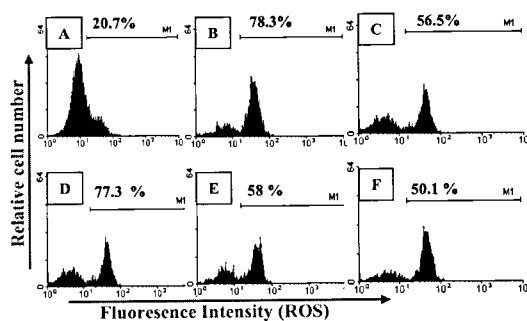


Fig. 9. Inhibitory effects of GJB-5 on the ROS production in hFLS. The hFLS were stimulated with hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml) after that treated with medium (CT, B), methotrxate (10 μ g/ml, MTX, C) and GJB-5 (1, 10, 100 μ g/ml, D, E, F) for 48 hr. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The WT group was cultured without cytokine stimulation (A).

6. MMP-3와 TIMP-1 발현에 미치는 영향

MMP-3의 유전자 발현은 GJB-5 투여군 10, 100 μ g/ml의 농도에서 각각 0.771, 0.101로 나타나 농도 의존적인 감소효과를 나타내었다(Fig. 10). 반면 TIMP-1 유전자의 발현은 GJB-5 투여군 10, 100 μ g/ml의 농도에서 각각 1.741, 2.929로 증가하였다(Fig. 11).

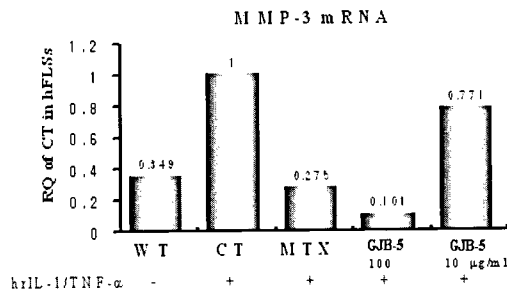


Fig. 10. Effects of GJB-5 on the mRNA expression of MMP-3. The hFLS were stimulated with or hrTNF- α (10 ng/ml) and hrIL-1 β (10 U/ml), after that treated with medium (CT), methotrxate (10 μ g/ml, MTX) and GJB-5 (100, 10 μ g/ml) for 6 hr. The WT group was cultured without cytokine stimulation. The levels of MMP-3 mRNA expressions were measured by quantitative real-time PCR.

고찰

류마티오이드 관절염은 만성 활막염을 특징으로 하는 자가면역 질환으로 활막이 지속되면서 연골과 연골하골까지 염증이 파급되어 관절이 파괴, 변형되고 신체 장애를 유발한다. 류마티오이드 관절염은 관절 뿐 아니라 폐나 신장 등의 장기를 침범하여 전신적인 질환으로 인식되고 있다¹⁾.

류마티오이드 관절염의 발병원인에 대하여 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없으나, 세포수준과 분자생물학적 측면에서 심층 연구가 진행되면서 류마티오이드 관절염의 활막 세포층이 무질서하게 과도 증식하고, pannus가 형성되어 주변 연골 및 골파괴로 이행하는 악성 종양의 양상을 나타내고 있어 많은 주목을 받고 있다^{16,17)}.

류마티오이드 관절염에 대한 서의학적 치료로는, 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs), 부신피질 호르몬제, 항류마티오이드 약물(DMARDs), 세포독성제, 면역억제제 등 다양한 약제들이 사용되고 있으나, 장기 사용으로 인한 약물의 부작용으로 우울증, 위장관의 궤양 유발, 장출혈, 간기능 저하, 신장병과 같은 심각한 부작용을 야기하고 있어 더 안전하고 효과적인 치료방법이 요구되고 있다¹⁸⁾.

한의학 문헌에서 류마티오이드 관절염을 직접 언급한 바는 없지만 기록된 증상으로 미루어 볼 때 痺症, 痺痛, 歷節風과 같은 병증과 매우 흡사하여, 張¹⁹⁾은 《金匱要略》에서 “歷節風, 不可屈伸”, “諸肢節疼痛, 身體魁羸, 脚腫如脫”이라 하여 최초로 歷節風을 頑固한 痺證으로 언급하였고, 朱²⁰⁾는 歷節病을 가리켜 “痛風은 四肢百節이 走痛하는 것으로 方書에 白虎歷節風證이라고 하는 것은 이것이다”라고 하여 痛風, 白虎病, 歷節病 등의 명칭으로 혼용하였고, 王²¹⁾은 白虎風을 “風寒暑濕之毒因虛所致 將攝失理 受此風邪 經脈結滯 血氣不行 蓄於骨節之間 或在四肢 肉色不變 氣質晝靜而夜發 發則徹受酸痛 後曰 其病如虎之嗜”라 하였는데 이 중 歷節病은 關節變形, 極甚한 疼痛, 活動受限, 僵硬, 皮膚生塊의 임상적 특징을 갖는 疾患으로 현재의 류마티오이드 관절염과 가장 근접한 것으로 姜²²⁾은 보고하였다.

한의학적 관점에서의 류마티오이드 관절염의 원인은 《素問·痺論》²³⁾에서 “風寒濕三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕外邪가 痺症의 중요한 원인이라고 언급하였고 《三因方》²⁴⁾에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보았고, 《實用中醫內科學》²⁵⁾에서는 肝腎虧損, 邪氣侵入,

氣血瘀阻 등으로 보았으며, 祛風散寒, 除濕清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡, 滋補肝腎 등의 치료방법이 활용²⁶⁾되고 있다.

류마티오이드 관절염을 일으키는 원인 물질들에 관하여 최근에 규명되고 있는데, 그 중 cytokine은 세포 간 신호전달과 면역 및 염증 반응의 매개에 중요한 역할을 하는 조절 단백질로서, 염증성 관절 질환에서 질병 특이적인 cytokine의 발현 양상을 규명하려는 많은 연구가 이루어져 왔다²⁷⁾. 최근까지 다수의 연구에서 특히 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6, IL-8 등 염증 매개성(pro-inflammatory) cytokine이 관절 질환의 발현에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되고 있으며, 이들 염증 매개성 cytokine의 증가는 류마티오이드 관절염이나 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등 좀 더 관절 침습적이고 진행성인 질환에서 현저하다^{28,29)}. 따라서 혈액에서의 cytokine의 측정은 진단이나 예후 예측 등의 임상적 유용성을 가질 것으로 전망되고 있다^{30,32)}.

또한 최근 염증반응에 대한 연구는 과거에 관심을 가졌던 염증에 의한 매개물질이나 화학주행물질 및 cytokine 등의 역할 외에 세포간 유착분자(intercellular adhesion molecule, ICAM)에 대한 관심이 증가하고 있다. 이는 다양한 염증반응의 일련과정에 세포-세포간 또는 세포-기질간의 유착과 이의 조절이 필요한 바 유착분자의 역할이 염증반응의 진행에서 중요시되기 때문이다³³⁾.

한편 류마티오이드 관절염에서 염증 매개성 cytokines(IL-1 β , TNF- α , INF- γ)에 의해 자극받은 synovial cell의 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의해 NO(nitric oxide)의 양이 증가하는 것을 볼 수 있고, 이들이 중재물질로 작용하여 MMP(matrix metalloproteinase)의 양을 증가시키는 것으로 밝혀지면서³⁴⁾, NO, NOS, ROS(reactive oxygen species), MMP와 그 억제인자인 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)에 대한 관심이 증대되고 있는데, 만성염증조직에서는 상당한 양의 superoxide anion, hydrogen peroxide, NO와 같은 활성산소종(ROS)이 활성화된 면역세포에서 많이 발생된다. 만성염증반응의 경우, 특히 NO가 rheumatoid joint, demyelinating nerves, 궤양성대장염의 대장, 피부염과 같은 염증이 있는 부위에서 고농도로 존재하게 되는데 이는 주로 iNOS의 발현 증가 때문이다. 따라서 이러한 활성산소종과 질소종을 제거하거나, 생성을 억제하는 물질을 찾으려는 노력이 많이 진행되고 있다^{35,36)}.

MMP는 ECM(extracellular matrix)을 구성하는 요소들을 분해하는 효소군이다. 따라서 MMP 활성을 조절하는 것이 조직 재구성과 상처치유의 정상적 과정을 유지하는데 매우 중요함을 알 수 있다. MMP는 또한 종양침투, 전이, 염증 진행과정에도 참여하고 있다. 류마티오이드 관절염은 활성산소종과 MMP의 증가를 보이는 염증질환이고, 면역반응에 의한 조직파괴를 보인다^{37,38)}.

류마티오이드 관절염의 최근 한의학적 연구동향을 살펴보면 한의학의 문헌에 기록된 癰證의 치료처방들이 류마티오이드 관절염의 면역기능에 조절효과가 있으며, 대부분의 면역조절 효과가 있는 單味之劑의 한약 역시 癰證方의 주된 구성으로 확인된다. 특히 한약처방의 구성상 補氣活血劑, 寒熱劑의 調和와 通經之劑의 적절한 배합은 면역조절 효과를 확대시키는 결과를 나타내 辨證原理를 근거로 藥物의 配伍를 강조한 한의학적 이론의 타당

성을 반영해주고 있다³⁾.

본 연구에 사용된 관절 5호방은 補肝腎 하는 약재에 祛風除濕 하는 약재들이 적절히 배합되어 류마티오이드 관절염에 임상적으로 쓰여지는 방제이다.

처방 구성은 鷄血藤, 稀薺, 延胡索 각 8 g, 桂枝, 黃芪, 熟地黃, 牛膝 12 g, 白茯苓, 白朮, 白芍藥, 當歸, 川芎, 破故紙, 杜仲, 續斷, 陳皮, 甘草 각 4 g, 山椒 1.5 g으로 구성되었는데, 鷄血藤은 補血과 活血祛風에 의하여 순환상태를 개선하고 진통하여 風濕에 의한 痺痛에 쓰고, 稀薺는 祛風濕, 強筋骨하여 風濕으로 인한 四肢痺痛 특히 슬관절통에 사용한다. 延胡索은 진통의 상용약으로 두통, 흉통, 복통, 협통, 월경통, 관절통, 타박손상통 등의 기체혈어로 인한 둔통에 응용하면 효과가 있고, 桂枝는 發汗解表, 溫經通脈하여 外感風寒에 쓰고, 대뇌의 지각중추에 작용하여 동통역치를 높임으로써 진통효과를 나타내고, 黃芪는 補氣升揚 작용으로 氣血兩虛로 인하여 순환이 장애되어 생기는 동통이나 血痺에 활용하고, 熟地黃은 滋陰, 補血의 상용약이며, 牛膝은 祛瘀止痛, 活血通經, 補益肝腎의 효능으로 風濕으로 인한 痺痛에 사용한다. 白茯苓은 利水滲濕, 健脾化中, 寧心安神의 효능이 있고, 白朮은 補脾益氣, 燥濕利水的 효능이 있으며, 白芍藥은 補血, 緩急止痛, 當歸는 補血, 行血, 潤腸, 調經, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛, 破故紙는 補腎溫脾, 固精縮尿, 杜仲은 補肝腎, 強筋骨, 安胎의 효능이 있으며, 續斷은 補肝腎, 續筋骨, 活血, 安胎의 효능이 있고, 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰, 甘草는 補脾益氣, 清熱解毒, 山椒는 溫中, 止痛, 祛濕, 驅蛔 등의 효능이 있다³⁹⁾. 하지만 본 처방의 효과에 대한 실험적인 근거는 아직 없는 실정이다.

이에 저자는 관절 5호방이 류마티오이드 관절염에 미치는 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 류마티오이드 관절염 환자의 섬유아세포양 활막세포(hFLS)를 이용하여 면역조절 작용을 살펴보았다.

본 실험에서 GJB-5이 hFLS 증식 억제 작용이 있는지를 [3H]-thymidine uptake 방법을 이용하여 조사한 결과 정상군이 1604 ± 119.2(cpm), 대조군이 5277 ± 563.8(cpm)인데 비하여 GJB-5 투여군 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 3070 ± 453.6, 5046.6 ± 485.8, 5028 ± 373.1(cpm)으로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의적인 감소효과를 나타내었다(Fig. 1).

염증성 사이토카인의 발현에 대한 억제 효과를 RT-PCR 방법에 의한 RQ값 측정을 통한 조사 결과, TNF- α , IL-1 β , IL-6 모두 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소를 나타내었다(Fig. 2-4).

이는 최근까지 다수의 연구에서 특히 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6 등 염증 매개성 cytokine이 관절 질환의 발현에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되고 있으며, 이들 염증 매개성 cytokine의 증가는 류마티오이드 관절염이나 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등 좀 더 관절 침습적이고 진행성인 질환에서 현저하다^{40,41)}는 연구결과와 일치하였다.

염증 세포의 유주와 부착에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IL-8과 ICAM-1의 mRNA 발현을 검색한 결과, 둘 다 농도의존적인 감소 효과를 나타내었다(Fig. 5, 6).

NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 고농도에서 감소하였고(Fig. 7), NO 생성량에 미치는 영향에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의

농도에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

ROS 생성에 미치는 영향에서는 농도 의존적으로 생성 억제 효과가 나타났고, 특히 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 양성 대조군과 비슷한 결과가 나타났다(Fig. 9).

MMP-3 유전자 발현에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소되었고(Fig. 10), TIMP-1 유전자 발현은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 11).

이상의 내용을 총괄해 보면 관절 5호방의 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용을 규명하기 위하여, 인간 섬유아세포양 활막세포(hFLS)에 적용하여 실험한 결과, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3 유전자 발현은 농도 의존적으로 억제되었고, TIMP-1 유전자 발현은 농도 의존적으로 증가되었으며, NOS-II 유전자 발현은 고농도에서 억제되었고, hFLS 증식은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의적인 감소효과가 나타났으며, NO 생성량은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있게 감소하였고 ROS 생성은 농도 의존적으로 생성 억제효과가 나타났다.

이상의 결과로 보아 관절 5호방이 류마티스 관절염에 대하여 면역조절작용이 있어 류마티스 관절염 치료에 유효할 것으로 생각되며, 향후 임상적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

관절 5호방의 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용을 규명하기 위하여, 인간 섬유아세포양 활막세포(hFLS)에 RT-PCR을 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-3, TIMP-1, NOS-II의 유전자 발현을 측정하였으며, ELISA를 이용하여 hFLS 생성 및 NO 생성량을 측정하고, flow cytometer를 이용하여 ROS의 생성 효과를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

hFLS 증식에 미치는 영향에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타내었다. TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자 발현에 미치는 영향에서는 농도 의존적으로 억제되었다. IL-8, ICAM-1 유전자 발현에 미치는 영향에서는 농도 의존적으로 억제되었다. NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향에서는 고농도에서 감소하였고, NO 생성량에 미치는 영향에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 감소하였다. ROS 생성에 미치는 영향에서는 농도 의존적으로 억제효과가 나타났다. MMP-3 유전자 발현에 미치는 영향에서는 농도 의존적으로 감소되었고, TIMP-1 유전자 발현은 농도 의존적으로 증가되었다.

이상의 결과로 보아 관절 5호방이 류마티스 관절염에 대한 면역조절작용이 있어 류마티스 관절염 치료에 유효할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 양형인. 류마티스 관절염의 최신 치료. 경희의학, 20(1):1-3, 2004.
2. 허 준. 동의보감. 서울, 법민문화사, p 979, 1999.
3. 최도영 외 10인. 류마티스 관절염에 대한 한약의 면역학적 연구동향. 대한침구학회지 21(4):177-196, 2004.

4. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울, 최신의학사, p 175, 2004.
5. 김진호, 한태륜. 재활의학. 서울, 군자출판사, p 503, 2004.
6. 김영태, 이재동, 이윤호. 최근 RA와 관련된 임상 및 실험 논문의 경향. 대한침구학회지 19(5):190-194, 2002.
7. 이중휘. Type II Collagen으로誘發된關節炎에 대한 疏經活血湯加味の 免疫抑制效果. 대전대학교대학원, 2004.
8. 諸正鎮. 血府逐瘀湯이 Adjuvant誘發關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원, 1993.
9. 申敏濔. 防風湯이 Adjuvant誘發關節炎에 미치는 影響. 경희대학교대학원, 1994.
10. 金荷中. Adjuvant관절염에 疎經活血湯合黃連解毒湯이 미치는 實驗的 研究. 대전대학교대학원, 1992.
11. 李世鉉. 行濕流氣散이 Adjuvant關節炎에 미치는 影響. 대전대학교대학원, 1992.
12. 광중문. 疎風活血湯加味が 류마티스關節炎患者에서 分離한 synoviocytes에 대한 免疫反應과 collagen으로誘發된 생쥐의關節炎抑制에 관한 研究. 대전대학교대학원, 2002.
13. 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.
14. 李昊根. 大羌活湯이 제II형 Collagen誘發關節炎의 抗體에 미치는 影響. 경희대학교대학원, 1994.
15. 정수현. 三痺湯이 Collagen으로 유발된 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 10(1):173-183, 2000.
16. Firestein, G.S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N.J., Green, D.R. Somatic Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene in Rheumatoid Arthritis Synovium. Proc Natl Acad Sci USA. 94(20):10895-10900, 1997.
17. Reme, T., Travaglio, A., Gueydon, E., Adla, L., Jorgensen, C., Sany, J. Mutations of the p53 Tumor Suppressor Gene in Erosive Rheumatoid Synovial Tissue. Clin Exp Immunol. 111(2):353-358, 1998.
18. 이상훈 외 7인. 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독 약침의 류마티스 관절염 치료 효과 연구. 대한침구학회지 20(6):80-88, 2003.
19. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北, 대련국풍출판사, pp 32-33, 1973.
20. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울, 대성문화사, p 206, 1982.
21. 王 燾. 外臺秘要. 北京, 華河出版社, p 266, 1993.
22. 강인수. 비증치료의 용약에 관한 소고. 대한한의학회지 11(1):245-252, 1999.
23. 楊維傑 編著. 黃帝內經素問譯解. 台北市, 台聯國風出版社, pp 95-96, 328-336, 1984.
24. 陳無擇. 三因方(卷3). 大連, 國風出版社, pp 2-3, 1977.
25. 黃文東 外. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 554-569, 1986.
26. 權宰植 外. 癩證. 서울, 鼎談, pp 207-208, 214-215, 219-222, 270, 1993.
27. Choy, E.H., Panayi, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 344: 907-916, 2001.

28. Ribbens, C., Andre, B., Kaye, O., Kaiser, M.J., Bonnet, V., de Groote, D., Franchimont, N., Malaise, M.G. Increased synovial fluid levels of interleukin-12, sCD25 and sTNF-RII/sTNF-RI ratio delineate a cytokine pattern characteristic of immune arthropathies. *Eur Cytokine Newt.* 11: 669-676, 2000.
29. Schlaak, J.F., Pfers, I., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., Marker-Hermann, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patient with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol.* 14: 63-88, 2002.
30. Punzi, L., Calo, L., Plebani, M. Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 39: 63-88, 2002.
31. Arend, W.P. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 45: 101-106, 2001.
32. Wingard, J.R., Demetri, G.D. Clinical applications of cytokines and growth factors. Norwell. Kluwer Academic publishers. p 39, 1999.
33. Kutukculer, N., Caglayan, S., Aydogdu, F. Study of pro-inflammatory(TNF- α , IL-1 α , IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patient with juvenile chronic arthritis : correlation with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol.* 17: 288-292, 1998.
34. Hirai, Y., Honda, S., Ukei, Y., Yamasaki, S., Urayama, S., Kamachi, M., Kawakami, A., Ida, H., Kita, M. Fukuda, T., Shibatomi, K., Kawabe, Y., Aoyagi, T., Eguchi, K. Effect of nitric oxide in matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci.* 68: 913-920, 2001.
35. Rausch-Fan, C., Matejka, M. From plaque formation to periodontal disease is there a role for nitric oxide. *Eur J Clin Invest.* 31: 833-835, 2001.
36. Kendall, H.K., Marshell, R.I., Bartold, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 7: 2-10, 2001.
37. Halliwell, B. Oral inflammation and reactive species : a missed opportunity. *Oral Dis.* 6: 136-137, 2000.
38. Waddington, R.J., Moseley, R., Embery, G. Reactive oxygen species : a potential role in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis.* 6: 138-151, 2000.
39. 이상인 외 5인. *한약임상응용*. 서울, 성보사, pp 38, 152, 188, 208, 225, 267, 271, 275, 293-294, 316-317, 321, 324, 342, 345-346, 354, 358, 360, 1998.
40. Ribbens, C., Andre, B., Kaye, O., Kaiser, M.J., Bonnet, V., de Groote, D., Franchimont, N., Malaise, M.G. Increased synovial fluid levels of interleukin-12, sCD25 and sTNF-RII/sTNF-RI ratio delineate a cytokine pattern characteristic of immune arthropathies. *Eur Cytokine Newt.* 11: 669-676, 2000.
41. Schlaak, J.F., Pfers, I., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., Marker-Hermann, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patient with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol.* 14: 63-88, 2002.