

동충하초 추출물이 관절염 Synovial Cell에 미치는 영향

김찬구^{#1}, 노성수¹, 서영배^{1*}

대전대학교 한의과대학 본초학교실

Research on Effects of Cordyceps Sinensis in Arthritis Synovial Cells

Chan-Ku Kim^{#1}, Seong-Soo Roh¹, Young-Bae Seo^{1*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University
Daejeon 300-716, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to know the effect of Cordyceps sinensis(CS) on the immune inflammatory responses of arthritis and function.

Methodes : To analyse immunomodulatory effects of CS, cytotoxicity and inhibition of proliferation against of synovial cells, gene expression of inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1 were measured in vitro.

Results : CS didn't show cytotoxicity against human synovial cells and inhibited proliferation of human synovial cells in a dose-dependent manner in combination with rIL-6. CS reduced the gene expression of IL-6 and IL-1 β in a dose-dependent manner but didn't reduced that of TNF- α in human synovial cells. CS reduced the binding-activity of NF- κ B and also reduced that of AP-1 remarkably.

Conclusion : We found out that Cordyceps sinensis has immunomodulatory effect of suppressing synovial cells. And Cordyceps sinensis will be used as a stable remedium in the auto-immune disease in the future.

Keywords : Cordyceps sinensis, synovial cells, Arthritis

*교신저자 : 서영배, 대전대학교 한의과대학

· Tel : 042-280-2625 · E-mail : genin@dju.ac.kr

#제1저자 : 김찬구, 대전대학교 한의과대학

· Tel : 042-280-2640 · E-mail : ddede@dju.ac.kr

· 접수 : 2007년 8월 23일 · 수정 : 2007년 9월 17일 · 채택 : 2007년 9월 21일

서 론

冬蟲夏草는 補陽藥으로 麥角菌科에 속하는 冬蟲夏草菌 (*Cordyceps sinensis* Sacc.)이 蝙蝠蛾科 昆蟲의 幼蟲을 寄主로 하여 형성된 子實體(子座) 및 幼蟲의 屍體로¹⁾, 《月王藥診》²⁾에 처음 기재되었고, 補肺益腎하고 止血化痰하는 效能으로 肺虛咳血, 腎虛陽痿, 結核咳嗽, 盜汗, 遺精, 腰膝酸痛, 老人衰弱之咳嗽, 貧血虛弱, 神經性胃痛, 嘔吐, 反胃, 食慾不振, 筋骨疼痛, 老人畏寒 등의 치료에 응용되고 있다³⁾.

冬蟲夏草의 현대 약리작용 연구중 면역억제와 관련된 보고로, Chen 등⁴⁾은 冬蟲夏草가 in vitro 에서 전신성 홍반성 낭창 환자의 interleukin-2 부족을 개선시키고, lupus 동물모델인 NZB/NZW F1 생쥐의 생존기간을 연장시키며, anti double-stranded DNA의 생성을 억제하므로 human systemic lupus erythematosus에 사용될 수 있음을 보고하였고, Kuo 등⁵⁾은 冬蟲夏草 메탄올 추출물중의 CS-36-39와 CS-48-51 분획이 자연살해 세포 활성, polyhydroxyalkanoate로 자극된 human mononuclear cell의 interleukin-2 및 tumor necrosis factor- α 생성 등을 억제하는 것으로 보아 冬蟲夏草에 면역억제 성분이 있음을 보고하였다.

이와 같이 冬蟲夏草가 면역억제에 대하여 다양한 면역조절작용이 있는 약재임에도 불구하고, 단순한 면역 증강제로서 인식되고 있으며 국내에는 분자생물학적 방법을 통한 면역과 관련된 특별한 연구보고가 없는 실정이다.

이에 冬蟲夏草에 면역억제 작용이 있다는 점에 착안하여, 자가면역질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 冬蟲夏草의 가능성을 살펴보고자, in vitro 에서 human synovial 세포에 대한 세포독성, 증식 억제 효과, IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자 발현 측정, IL-1 β , IL-6 발현량 ELISA 분석, NF- κ B와 AP-1측정을 통한 signal 경로 분석한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

실험에 사용된 冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.)는 1997년 8월 中國 安國市 약재시장

에서 구입한 것을 질소 충전 진공포장하고, 온도 4°C 저온창고에서 보관 후 실험전 다시 정선한 것만을 사용하였다(Fig. 1).

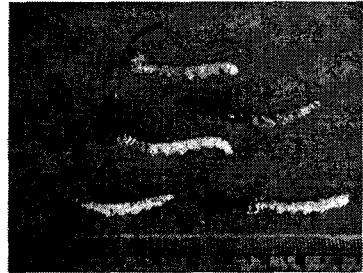


Fig. 1. *Cordyceps Sinensis* (Berk.) Sacc.

2) 冬蟲夏草 추출물 (*Cordyceps sinensis* extract : CSE) 제조

冬蟲夏草 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기 (Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조된 冬蟲夏草 추출물 (14 g)을 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Cordycepin, diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma (USA)사 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa (Japan)사 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase : M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega (USA)사 제품을, RNazoIb는 Tel-Test (USA)사 제품을, 우태아혈청은 Hyclone (Logan, USA)사 제품, 그리고 Agarose (FMC, USA) 등을 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 HPLC (Shimadzu, LC-10AD, Japan), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), 원심분리기 (Sigma, USA), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Turbo Thermalcycler™ (Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision과학) 및 homogenizer

(OMNI, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) Cordycepin (3'-deoxyadenosin) 분석

표준품 cordycepin 5 mg/ml를 증류수 (HPLC 용)에 녹이고 1 mg/ml/H₂O의 농도가 되도록 정확히 제조하여 5 µg을 HPLC에 주입하여 분석 하였다.

CSE의 cordycepin 함유여부를 관찰하기 위하여 CSE 2 mg/ml/H₂O와 cordycepin 2 mg/ml/H₂O를 각각 조제하여 여과하였다. 그리고 CSE와 cordycepin을 동량으로 혼합한 시료 5 µg을 HPLC에 주입하여 분석 하였는데 그 조건은 다음과 같다.

HPLC	Shimadzu
Detector	220 nm
Pump	LC-10AD pump
Column	J'sphere ODS-H80 (YMC Co., Japan)
Column	Temp. 30°C
Solvent	30% MeOH in H ₂ O

2) Human synovial 세포 분리 및 세포증식 억제 효과

(1) Synovial 세포 분리

충남대학교 의과대학 부속병원에서 관절염환자의 synovial tissue를 공급 받아 synovial membrane 조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 DMEM (containing collagenase A (5 mg/ml, BM, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양 하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 PBS로 약 2회 1,500 rpm에서 spin한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 synovial 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 분주 하였다.

(2) Synovial 세포의 세포독성

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. Human synovial 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 자란것을 trypsin-EDTA용액으로 single 세포가 되도록 떼어내고, 1.5 x 10⁴개의 세포를 96 well plate에 분주하고 incubator (3

7°C, 5% CO₂)에서 24시간 배양한 후 冬蟲夏草 추출물을 48시간 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하여, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid) 50 µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치하고, 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 그리고 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하여 RT에서 30분간 staining 한 뒤, 0.1% acetic acid solution으로 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 5분간 shaking하고 Elisa Leader (molecular devices, USA)로 540 nm에서 absorbance를 측정하였다.

(3) Synovial 세포의 증식억제

rIL-6 (R&D system)등을 처리한 synovial 세포의 증식억제정도를 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2x10⁶ 세포씩 첨가하고, 冬蟲夏草 추출물과 IL-6를 농도별로 처리하여 세포를 37°C에서 72시간 배양 하였으며, 50 µCi/ml의 [methyl-³H] Thymidine을 첨가하여 다시 8시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기 (β-counter)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정 하였다.

(4) Synovial 세포의 RT-PCR

① RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 synovial 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 µl 10mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/25µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20

μ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Turbo ThermalcyclerTM (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (p35, IL-12), interleukin-12 (p40, IL-12), 그리고 interferon- γ (IFN- γ)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ)와 antisense primer (20 pmole/ μ)를 혼합하여 1 μ 를 가하고, 다시 3 μ 2.5 mM dNTPs, 3 μ 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ Taq polymerase (5 U/ μ)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation : 95°C, 5분, denaturation : 95°C, 1분, annealing : 55°C, 1분, elongation : 72°C, 1분씩 25 cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다;

IL-1 β 는, sense oligonucleotide, 5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'; antisence oligonucleotide, 5'-AGCCATGAGTTCCATTCAC-3'. IL-6는, sense oligonucleotide, 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'; antisence oligonucleotide, 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'.

TNF- α 는, sense oligonucleotide, 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'; antisence oligonucleotide, 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'.

β -actin은, sense oligonucleotide, 5'-TGGAATCTGTGGCATCCATGAAAC-3'; antisence oligonucleotide, 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCG-3'.

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.

(5) Cytokine 측정

Synovial 세포를 실험 3일전에 subculture (1x10⁵ cells/ml) 하여 12 well plate에 2x10⁶ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight 시켰다. 冬蟲夏草 추출물 (0 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml)을 처리하고 1시간 후 rIL-6 (100 U/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 冬蟲夏草 추출물 처리하고 48 시간 동안 CO₂ 조직배양기에서 배양하였다. 배양 종료후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수, 투석하고, 필터링하여 CSE를 제거하였다. Cytokine 발현량 분석은 ELISA kit를 사용하였고, IL-1 β (R&B system) 생산량을 측정하였고 IL-6 는 bioassay를 수행하였다.

(6) Electromobility shift assay (EMSA)

① 세포배양 및 한약처리

synovial 세포를 6 well plate, 각 well에 1x10⁷ 세포씩 분주하고 12시간 동안 우태아혈청 결핍 RPMI-1640 배양액에서 배양한 후 冬蟲夏草 추출물과 rIL-6 (100 μ g/ml)를 첨가한 다음 다시 6시간 동안 배양하였다.

② Nuclear extract

배양한 세포를 4°C에서 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 생리식염수로 수세하였다. 이 세포에 3배 부피의 완충용액 A (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.8)를 첨가하고 얼음에 10분간 방치한 후 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 다시 완충용액 A를 가하여 0.1%농도가 되도록 NP-40을 첨가하고, Dounce homogenizer B pestle을 이용하여 세포를 마쇄하여 균질화한 후 4°C에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 세포에 완충용액 C (20 mM HEPES, 25% glycerol, 0.35 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9) 2.5 ml를 첨가하고 4°C에서 12,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리한 다음 상등액을 회수하여 18시간 50배 부피의 완충용액 D (20 mM HEPES, 20% glycerol, 0.2 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)에서 투석하였다. 투석된 시료를 4°C에서 12,000 rpm으로 1시간 원심분리한 후 상등액만을 회수하였다.

③ Gel mobility shift assay

EMSA를 위한 gel shift oligonucleotide 염기배열은 다음과 같다: NF- κ B : 5'-GGCAACTGCTCAC TCTCCCTTT-3', 그리고 AP-1 : 5'-TTTCATAT

TACTCT-3'을 α32P-ATP와 Klenow 효소를 사용하여 3'-end를 채우고, 5'-end를 labelling하여 probes로 사용하였다. DNA와 핵단백질과의 결합반응은 20 μg의 nuclear extract, 2 μg의 poly (dl-dC)가 들어있는 반응액 (10 mM Tris-Cl, pH8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 250 μg/ml BSA)에 competitor를 첨가하거나 첨가하지 않고 얼음 위에서 30분간 반응시키고 미리 준비한 각각의 labelled-probe들(0.5-1.0 ng, 100,000-2,000,000 cpm)을 첨가한 후 다시 30분간 얼음 위에서 반응시켰다. 6% polyacrylamide gel을 20분간 prerun을 하여 반응액을 loading 한 다음 150V, 10 mA로 3시간 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue (BPB) dye가 밑으로부터 1-2cm 정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추고 이를 vacuum gel dryer (Bio-Rad, USA)에서 약 한 시간 건조한 다음 X-ray film에 노출시켜 감광시켰다.

(7) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정 하였다.

결 과

1. Cordycepin 측정

CSE의 cordycepin 함량측정은 cordycepin과 CSE를 HPLC용 증류수에 혼합한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.

표준품 cordycepin 5 μg을 주입하였을 때 6.479분에서 단일 피크를 볼 수 있었으며, 이 피크의 면적은 7,395,487 area로 측정되었다(Fig. 2, Top run).

CSE의 cordycepin 성분함량을 관찰하기 위하여 cordycepin 2.5 μg과 CSE 2.5 μg을 동량으로 혼합하여 분석한 결과 6.480분의 피크에서 5,073,159 area로 측정 되었는데(Fig. 2, Bottom run), 이는 cordycepin 단일피크와 비교하면 1,375,415 area의 증가가 나타난 것으로 판단된다.

그런데 cordycepin과 CSE 병용시에 나타난 피크의 UV 곡선(Fig. 3.(B))이, cordycepin 단독투여에서 나타난 UV곡선(Fig. 3.(A))과 일치되는 형태를 나타난 것으로 보아 본 실험에 사용된 동충夏草에 cordycepin이 함유되어 있음을 알 수 있다.

따라서 본 실험에 사용된 동충夏草에는 cordycepin이 함유되어 있는 것으로 판단되었다.

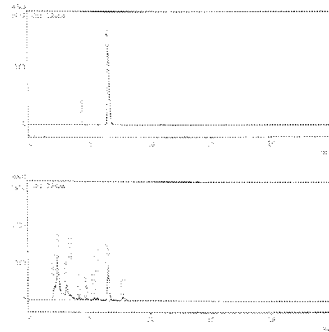


Fig. 2. Quantitative Cordycepin Chromatography of Cordyceps Sinensis Extract by High Speed Liquid Chromatography

HPLC chromatogram on J'sphere ODS-H8O column of the decoctions repeated from crude CSE and cordycepin. HPLC chromatogram cordycepin standard (5 μg) (Top run). HPLC chromatogram of a subject equal mixed with CSE (2.5 μg) and cordycepin (2.5 μg)(Bottom run).

2. Human synovial cell 증식 억제효과

1) Human synovial cell에 대한 세포독성

CSE의 세포독성을 관찰하기 위하여 CSE를 1 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml씩 투여하여 48시간을 배양한 뒤 세포생존율을 측정하였다.

대조군의 생존율은 100±7.2%로 나타났고 1 μg/ml 투여군은 99.0±8.4%이었으며, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml 및 400 μg/ml 투여군은 각각 98.0±6.5%, 99.4±8.9%, 100.3±2.6%, 91.0±4.6% 및 85.3±6.2% 등의 생존율이 나타나 synovial 세포에 대한 CSE의 독성이 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

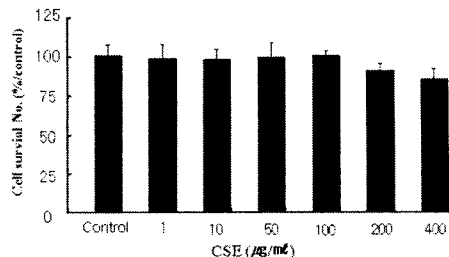


Fig.3. Cytotoxicity Effects of Cordyceps Sinensis extract on Human Synovial Cells

Human synovial cells (2x10⁴cells/well) were treated with various concentration CSE for 48 hrs. The results were expressed the mean± S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) 冬蟲夏草에 의한 human synovial 세포 증식 억제효과 분석

대조군에 의한 synovial 세포 증식은 15,638±505 cpm 이었으나, rIL-6만을 처리한 결과 144,470±4,203 cpm으로 증가되었다.

rIL-6에 CSE 1 µg/ml를 투여한 군은 140,231±5,546 cpm으로 감소되었으나 유의성은 없었고 CSE 10 µg/ml 투여군, 100 µg/ml 투여군, 200 µg/ml 투여군 등은 각각 123,145±2,389 cpm, 110,896±4,723 cpm, 74,345±2,122 cpm 등으로 유의성있게 감소되어 농도 의존적으로 synovial 세포가 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 4).

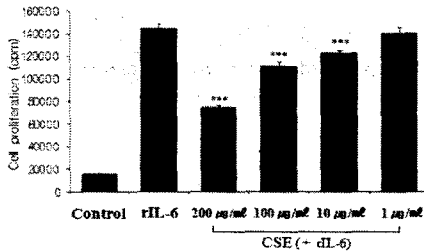


Fig. 4. Suppression of Interleukin-6 Production by Human Synovial Cells Culture by Cordyceps Sinensis extract

Human synovial cells were stimulated with or without 100 U/ml rIL-6 for 24 hrs. The results were expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value was compared with only rIL-6 group data by Student's t-test (***)p<0.001).

3. Human synovial 세포의 IL-1β, IL-6, TNF-α 유전자 발현 분석

IL-6 유전자발현에서 media 대조군 (lane 1)의 Ht값은 178이었고, rIL-6만을 처리한 결과 (lane 2) Ht값은 170이었다(Fig. 5).

rIL-6와 CSE 병행처리군에서 100 µg/ml 처리군 (lane 3)의 Ht값은 96이었고, 50 µg/ml 처리군 (lane 4)의 Ht값은 98이었으며, 10 µg/ml 처리군 (lane 5)의 Ht값은 125로 rIL-6만을 처리한 것보다 IL-6 유전자발현이 43.6%에서 26.5%까지 농도 의존적으로 현저한 억제효과가 나타났다(Fig. 5).

IL-1β 유전자발현에서 media 대조군 (lane 1)의 Ht값은 209이었고, rIL-6만을 처리한 결과 (lane 2) Ht값은 201이었다(Fig. 5).

rIL-6와 CSE 병행처리군에서 100 µg/ml 처리군 (lane 3)의 Ht값은 129이었고, 50 µg/ml 처리군 (lane 4)의 Ht값은 140이었으며, 10 µg/ml 처리군 (lane 5)

의 Ht값은 175로 rIL-6만을 처리한 것 보다 IL-1β 유전자발현이 35.9%에서 13.0%까지 현저한 억제효과가 나타났다(Fig. 5).

TNF-α 유전자발현에서 media 대조군 (lane 1)의 Ht값은 204이었고, rIL-6만을 처리한 결과 (lane 2) Ht값은 203이었다(Fig. 5).

rIL-6와 CSE 병행처리군에서 100 µg/ml 처리군 (lane 3)의 Ht값은 201이었고, 50 µg/ml 처리군 (lane 4)의 Ht값은 205이었으며, 10 µg/ml 처리군 (lane 5)의 Ht값은 200으로 rIL-6만을 처리한 것에 대하여 현저한 증가와 역제가 나타나지 않았다(Fig. 5).

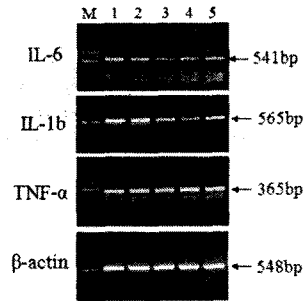


Fig. 5. Inhibitory Effects of Cordyceps Sinensis Extract on Cytokine Gene Expression in Human Synovial Cells

Human synovial cells were cultured with Cordyceps sinensis extract (CSE) and rIL-6 for 3 hrs. RT-PCR was performed by cytoplasmic RNA isolated.

Lane M, 100bp DNA marker ; lane 1, RPMI-1640 media control ; lane 2, rIL-6 (100 U/ml) ; lane 3, rIL-6 + CSE (100 µg/ml) ; lane 4, rIL-6 + CSE (50 µg/ml) ; lane 5, rIL-6 + CSE (10 µg/ml) and internal control (β-actin).

4. Human sinovial cells의 IL-6와 IL-1β 분비량 분석

대조군의 IL-6분비량을 100±5.3%로 나타냈을 때 CSE 10 µg/ml 투여군은 88±6.4%로 억제 되었으나 유의성은 없었다. 그러나 CSE 100 µg/ml 투여군과 CSE 200 µg/ml 투여군에서는 각각 74±4.7%와 70±5.8%로 IL-6 분비량이 유의성 있게 억제 된 것으로 보아 농도 의존적으로 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 7).

대조군의 IL-1β 분비량은 27.0±2.8 ng/ml로 측정 되었고, CSE 10 µg/ml 투여군은 20.0±4.1 ng/ml로 IL-1β의 분비량이 억제되었으나 유의성은 없었다.

그러나 CSE 100 µg/ml 투여군과 200 µg/ml 투여군은 각각 12.0±2.3 ng/ml와 11.0±3.0 ng/ml로 농도

의존적으로 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

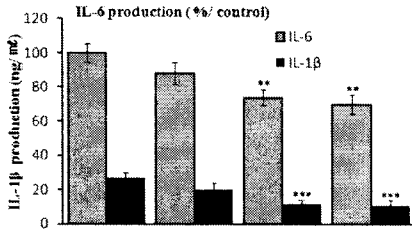


Fig. 6. Inhibitory Effects Cordyceps Sinensis Extract on Interleukin-6 and Interleukin-1β Production in Human Synovial Cells Culture

Human synovial cells (5x10⁵cell/well) were incubated with various concentrations of Cordyceps sinensis extract (CSE) for 1h and stimulated with 100 U/ml rIL-6. After 48 hrs incubation, the culture supernatants were collected, centrifuged, dialysed, and filtered to remove the CSE. Interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β) production was bioassayed (B9.55 cell) as described in material and methods. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value was compared with only rIL-6 group data by Student's t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

5. NF-κB, AP-1 분석 유전자 발현 분석

CSE에 의한 유전자 발현을 조절하는 전사조절인자를 알아보기 위하여, IL-6 와 IL-1β 유전자 발현을 유도하는 전사조절인자와 결합하는 NF-κB와 AP-1을 관찰하였고, human synovial 세포에 rIL-6 와 CSE로 동시자극한 후 electrophoretic mobility shift assay를 수행하여 autoradiography로 분석하였다.

그 결과 rIL-6 처리군 (lane1)은 대조군(C)에 비하여 NF-κB, AP-1 binding activity가 크게 증가하였으나, rIL-6에 CSE 50 μg/ml (lane 2)와 CSE 100 μg/ml (lane 3)를 병행 처리한 군은 rIL-6 (lane 1) 처리군 보다 NF-κB, AP-1 binding activity가 감소되었고, CSE 처리로 IL-6 와 IL-1β 유전자 발현이 억제되는 RT-PCR 결과와 일치하였다(Fig. 7).

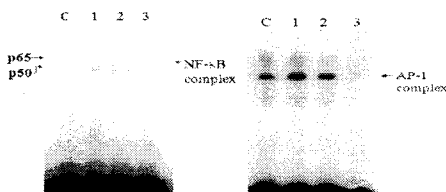


Fig. 7. Effects of Cordyceps Sinensis Extract on DNA-binding

Activity of NF-κB and Activating Protein-1 in Human Synovial Cells

Human synovial cells were cultured with Cordyceps Sinensis extract (CSE) for 6 hrs. Nuclear extracts from human synovial cells were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels. Extracts were prepared from either untreated cells (lane C) or cells stimulated with lane 1, rIL-6 ; lane 2, rIL-6 + CSE ; lane 3, rIL-6 + CSE (100 μg/ml). NF-κB and activating protein-1 (AP-1) binding activity was measured by electrophoretic mobility shift assay.

고찰

류마티스 관절염은 교원성 질환의 일종으로 주로 다발성 관절염을 일으키는 전신 염증성 자가 면역질환이며, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 동통이 초래되나, 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발된다^{6,7)}.

동충하초의 약리작용은 매우 다양한 약리활성 성분에 의하여 나타나며, 특히 피부이식과 장기이식 등의 이식요법과 면역계의 과잉반응으로 나타나는 자가면역 질환에 있어 면역억제제로 사용될 수 있다.

이에 동충夏草에 면역억제 작용이 있다는 점에 착안하여, 자가면역 질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 동충夏草의 가능성을 살펴보고자, in vitro 실험을 수행하였다.

Th 림프구에서 생성되는 interleukine 중 IL-1β, IL-6, TNF-α는 대표적인 염증유발 cytokine으로 synovial 세포에서 과잉 생산되어 synovial 세포의 증식을 촉진한다^{8,10)}. 관절염 환자의 synovial 세포는 proinflammatory cytokine의 일종인 interleukin-1β (IL-1β)의 분비를 상승시키며¹¹⁾, 이로 인한 인지질의 변환 그리고 arachidonic acid 대사과정에 관련된 효소계의 활성도등을 증가시킨다¹²⁾.

IL-6는 항원, IL-4, IL-5에 의해 활성화되어 증식하는 B림프구 분화의 최종시기에 작용해서 분비형의 항체를 다량 생성시키며, T림프구의 증식과 분화를 유도해서 혈액간세포와 형질세포를 증식시킨다^{8,10)}. Sasai 등¹³⁾은 DBA/1J 생쥐의 8세대의 역교배에 의하여 만들어진 IL-6 결핍성 생쥐의 CIA에서 골조송증과 골침식, 체액성 및 세포성 응답 등이 감소됨을 보고 하면서, IL-6의 억제가 RA의 치료에 유의성이 있음을 주장하였다.

TNF- α 는 주로 활성화된 macrophage에 의하여 생성되는 염증성 cytokine 으로서 세포성면역반응에 중요한 역할을 하고, 숙주의 다른 cytokines의 생성을 증가시키며 또한 류마티스 관절염의 중요한 병인 중의 하나로 작용한다⁸⁻¹⁰.

NF- κ B는 산화환원반응에 민감한 전염증성 (proinflammatory) 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로¹⁴, NF- κ B가 활성화 됨에 따라 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등의 cytokines 발현이 야기된다¹⁴⁻¹⁶. NF- κ B는 AP-1과 함께 DNA 결합력이 collagen induced arthritis (CIA)에 있어서 증가되는 경향을 보인다¹⁷.

Activating protein-1 (AP-1)은 Jun과 Fos 유전자군에 의한 이량체적 복합체(dimeric complex)로¹⁸, Jun/Fos의 활성은 세포외적 환경에서 세포핵 전사기관으로 중앙증진 신호를 전달하는데 있어 중요한 인자로써¹⁹, TNF와 같은 염증성 cytokines에 대한 많은 응답들은 이형 이량체적 전사인자인 AP-1에 의해 매개되는 novo 유전자 발현을 요구한다²⁰.

이러한 이론적 기반을 토대로 冬蟲夏草의 관절염 synovial 세포에 미치는 영향을 실험적으로 입증하고자 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

본 실험에 앞서 冬蟲夏草의 眞僞를 판정하고자 유효성분중의 하나인 cordycepin의 함유여부를 분석하였다.

분석에 사용된 표준품 cordycepin은 큰번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*)에서 추출된 것으로, 1 mg/ml/H₂O의 농도의 cordycepin 5 μ g을 HPLC에 주입한 결과 6.479분에서 7,395,487 area의 단일피크를 확인 할 수 있었다. 冬蟲夏草의 cordycepin 함유를 분석하기 위하여 표준품 cordycepin과 冬蟲夏草 추출물을 동량으로 혼합한 시료 5 μ g을 HPLC에 주입한 결과 6.480분에서 5,073,159 area의 피크를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이것은 표준품 cordycepin에 비하여 1,375,415 area의 증가가 나타난 것으로, 본 실험에 사용된 冬蟲夏草에 cordycepin이 함유되어 있다고 판단되었다.

冬蟲夏草의 human synovial 세포에 대한 세포독성은 in vitro 에서 진행되었는데, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 및 400 μ g/ml 투여군에서 85.3 \pm 6.2% 이상의 생존율이 나타난 것으로 보아 human synovial 세포에 대한 冬蟲夏草의 독성이 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

Human synovial 세포 증식 억제효과에서 대조군의 synovial 세포는 15638 \pm 505 cpm 이었으나, rIL-6

만을 처리한 결과 144470 \pm 4203 cpm으로 증가되었고, rIL-6에 CSE 1 μ g/ml를 투여한 군은 140231 \pm 5546 cpm으로 감소되었으나 유의성은 없었으며, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 투여군 등은 각각 123145 \pm 2389 cpm, 110896 \pm 4723 cpm, 74345 \pm 2122 cpm 등으로 유의성 있게 감소되어 농도 의존적으로 synovial 세포가 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

Human synovial 세포에 대한 IL-6 유전자발현에서 대조군과 rIL-6 단독처리군의 Ht값은 각각 178과 170으로 측정 되었으나, rIL-6와 冬蟲夏草 병행처리군은 冬蟲夏草 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 투여에서 각각 125, 98, 96의 Ht값이 측정되어 IL-6 유전자발현이 26.5%~43.6%까지 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5).

IL-6 분비량은 대조군의 100 \pm 5.3%에 비하여 冬蟲夏草 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 투여군에서 각각 88 \pm 6.4%, 74 \pm 4.7%, 70 \pm 5.8%의 감소를 보여, 100 μ g/ml와 200 μ g/ml 투여군에서 유의성 있는 IL-6 분비량 감소가 나타났는데 이는 IL-6 유전자발현과 상응되는 결과로 볼 수 있다(Fig. 6).

IL-1 β 유전자발현에서 대조군과 IL-1 β 단독처리군의 Ht값은 각각 209와 201로 측정되었으나, IL-1 β 와 冬蟲夏草 병행처리군은 冬蟲夏草 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 투여에서 각각 175, 140, 129의 Ht값이 측정되어 IL-1 β 유전자발현이 13.0%~35.9%까지 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 6).

IL-1 β 분비량은 대조군이 27.0 \pm 2.8 ng/ml로 측정되었고, 冬蟲夏草 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 투여군은 각각 20.0 \pm 4.1 ng/ml, 12.0 \pm 2.3 ng/ml, 11.0 \pm 3.0 ng/ml 등으로 측정되어, 100 μ g/ml와 200 μ g/ml 투여군에서 유의성 있는 IL-1 β 의 분비량 감소가 나타났는데, 이는 IL-6 유전자발현과 분비량과의 관계처럼 IL-1 β 의 유전자발현과 상응되는 결과로 볼 수 있다(Fig. 6).

TNF- α 유전자발현은 대조군과 TNF- α 단독 처리군의 Ht값이 각각 204와 203으로 측정되었는데, TNF- α 와 冬蟲夏草 병행처리군은 冬蟲夏草 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 투여에서 각각 200, 205, 201의 Ht값이 측정되어 유의성 있는 증가와 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 4).

NF- κ B에 대한 영향에서 rIL-6 단독처리군은 대조군에 비하여 NF- κ B binding activity가 크게 증가되었으나, rIL-6와 冬蟲夏草 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml 병행처리군은 rIL-6 단독처리군에 비하여 NF- κ B

binding activity가 감소되었는데(Fig. 8), 이는 IL-6와 IL-1 β 유전자 발현이 억제되는 RT-PCR 결과와 일치 되는 것이다(Fig. 4).

AP-1에 대한 영향에서 rIL-6 단독처리군은 대조군에 비하여 AP-1 binding activity가 크게 증가되었는데, rIL-6와 冬蟲夏草 50 μ g/ml 병행 투여군의 AP-1 binding activity는 약간 감소되었고, 100 μ g/ml 투여군에서는 AP-1 binding activity가 거의 억제 되는 결과를 보였는데(Fig. 7), 이 또한 IL-6와 IL-1 β 유전자 발현이 억제되는 RT-PCR 결과와 일치 되는 것이다(Fig. 4).

이상의 결과로 in vitro 에서 冬蟲夏草에 의한 human synovial 세포의 증식억제는 효과는 주로 전사조절인자 AP-1의 발현이 억제되어 IL-6, IL-1 β 의 유전자 발현 억제됨으로써 나타나는 것으로 판단된다. 이는 TNF- α , IL-1, IL-6 등과 같은 염증관련 cytokines들이 CIA진행에 결정적 역할을 하고²¹⁻²³⁾, IL-6의 억제가 RA의 치료에 유의성이 있다는¹³⁾ 등의 보고에 상응되는 결과이다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 in vitro 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었고, 또한 면역증진작용도 함께 나타남을 확인 할 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가 면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

冬蟲夏草의 면역억제기능을 관찰하고자, 冬蟲夏草의 진위를 판별한 후 in vitro 실험에서 human synovial 세포에 대한 세포독성, 증식 억제 효과, IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자 발현 분석, IL-1 β , IL-6 cytokine ELISA 분석, NF- κ B와 AP-1측정을 통한 signal 경로를 분석 등을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Synovial 세포에 대한 冬蟲夏草의 세포독성은 없었다.
2. 冬蟲夏草와 rIL-6 병용투여에서 synovial 세포의 증식은 농도 의존적으로 억제 되었다.
3. 冬蟲夏草 투여로 synovial 세포에서 IL-6와 IL-1 β 의 유전자 발현과 분비량이 농도 의존적으로 억제 되었으나, TNF- α 에는 영향이 없었다.
4. 冬蟲夏草 투여로 전사인자 NF- κ B의 binding activity는 약간 억제되었으나, AP-1의 binding

activity는 현저하게 억제 되었다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 in vitro 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었고, 또한 면역증진작용도 함께 나타남을 확인 할 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 閻文玫 主編. 中藥材眞偽鑑定. 北京:人民衛生出版社. 1996: 149-50.
2. 青海省藥品檢驗所. 青海省藏醫藥研究所主編. 中國藏藥(第1卷). 上海: 上海科學技術出版社. 1996: 344-6.
3. 黃泰康 主編. 常用中藥成分與藥理手冊. 北京: 中國醫藥科技出版社. 1994: 727-33.
4. Chen JR, Yen JH, Lin CC, Tsai WJ, Liu WJ, Tsai JJ, Lin SF and Liu HW. The effects of Chinese herbs on improving survival and inhibiting anti-ds DNA antibody production in lupus mice. Am J Chin Med. 1993;21(3-4):257-62.
5. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF and Shiao MS. Growth inhibitors against tumor cells in Cordyceps sinensis other than cordycepin and polysaccharides. Cancer Invest 1994;12(6):611-5.
6. 김호연. 류머티스관절염의 병인. 대한의학협회지. 1992;35(10):1198.
7. 金穆鉉. 류머티양 관절염의 역학. 대한의학협회지. 1986;29(1):7-10.
8. 中島 泉 著·吳贊鏞 譯. 신면역학입문. 서울: 지구문화사. 1997: 63,118,120,123-4,127-8,175-6,185-7,234,258-9
9. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울: 서울대학교출판부. 1997: 100,114,117,122-31,179-80,253,255,262,266-9.
10. 서울대학교 의과대학편. 중앙학. 서울: 서울대학교출판부. 1992: 188-9,228-9.
11. Yilmaz M, Kendirli SG, Altintas D, Bingol G and Antmen B. Cytokine levels in serum of patient with juvenile rheumatoid arthritis. Clin. Rheumatol. 2001;20:30-5
12. Hara S, Kudo I, Chang HW, Matsuta K,

- Miyamoto T and Inoue K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.* 1989;105:395-9
13. Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M and Kishimoto T. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 1999;42(8):1635-43.
14. Xu Y, Kinningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, Majima H, Kasarskis EJ and St. Clair DK. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol.* 1999;18(9):709-22.
15. Cheng N, Shi X, Ye J, Castranova V, Chen F, Leonard SS, Vallyathan V and Rojanasakul Y. Role of transcription factor NF-kappaB in asbestos-induced TNFalpha response from macrophages. *Exp Mol Pathol.* 1999;66(3):201-10.
16. Schwaninger M, Sallmann S, Petersen N, Schneider A, Prinz S, Libermann TA and Spranger M. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem.* 1999;73(4):1461-6.
17. Han Z, Boyle DL, Manning AM and Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28(4):197-208.
18. Kang DC, Motwani M and Fisher PB. Role of the transcription factor AP-1 in melanoma differentiation (review). *Int J Oncol.* 1998;13(6):1117-26.
19. Lee DK, Kim B, Lee SG, Gwon HJ, Moon EY, Hwang HS, Seong SK, Lee M, Lim MJ, Sung HJ, Shin DH, Yoon SJ and Yang CH. Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer Res.* 1998;18(1A):119-24.
20. Kyriakis JM. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr* 1999;7(4~6):217-31.
21. Durie FH, Fava RA and Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73(1):11-8.
22. Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA and Townes AS. Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clin Exp Immunol.* 1992;89(2):244-50.
23. Takai Y, Seki N, Senoh H, Yokota T, Lee F, Hamaoka T and Fujiwara H. Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989;32(5):594-600.