

LPS 유도 생쥐 관절염에서 금은화의 MIF 활성 조절이 COX-2와 MMP-9 생성 억제에 미치는 영향

안상현 · 김호현^{1*}

동국대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 세명대학교 한의과대학 생리학교실

Lonicerae Flos Inhibited COX-2 and MMP-9 in LPS Induced Arthritis of Mouse through Regulation of MIF

Sang Hyun Ahn, Ho Hyun Kim^{1*}

*Department of Anatomy, Oriental Medicine College, Dongguk University,
1: Department of Physiology, Oriental Medicine College, Semyung University*

The present study was designed in order to determine whether Lonicerae flos (LF) could mitigate rheumatoid arthritis through inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 and matrix metalloproteinase (MMP)-9 by regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF). We found that MIF mRNA expression in synoviocytes stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate dose-dependantly decreased by LF extract treatment (0.4 - 1.0 mg/ml). The distribution of MIF, COX-2 and MMP-9 positive reacted cells in LPS induced arthritis of mice were decreased by LF (45 mg/kg/day) treatment for 28 days. These data likely indicate that LF may act as MIF inhibitor and may be possible to develop useful agent for rheumatoid arthritis.

Key words : Lonicerae flos, rheumatoid arthritis, MIF, COX-2, MMP-9

서 론

류마티스성 관절염은 전신적인 만성 염증성 질환으로 주로 관절 윤활강(synovial cavity)에 지속적인 염증이 야기되어, pannus에 의한 뼈의 파괴, 윤활관절막염에 의한 각종 cytokine의 영향, 다양한 단백분해효소, O₂ radical과 2차적인 관절연골의 퇴행성 변화에 의해 연골의 소실이 일어난다¹⁾.

류마티스성 관절염은 발병 원인이 불확실한데 반해, 발병 시 관절강 내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있다. 윤활액내의 type II collagen 역가 증가²⁾, macrophage migration inhibitory factor(MIF)의 증가³⁾, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, tumor necrosis factor(TNF)-α의 증가^{4,5)}, 염증성 전사인자인 Nuclear factor(NF)-κB 활성화와 염증효소 cyclooxygenase(COX)-2와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 증가^{6,7)}, 단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)의 증

가^{8,9)} 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것으로 심각한 관절손상을 유도한다.

현재 류마티스성 관절염 치료제로 aspirin, 비스테로이드성 소염제-salicylate-, 단순 소염제, 부신피질호르몬-corticosteroid-, 질환 변형 약제(DMARD : disease modifying antirheumatic drug), 항TNF-α제제-infliximab, etanerept, Adalimumab-, 면역억제제-cyclosporin A, cyclophosphamide, Chloroquine, Methotrexate-, 세포독성 억제제 등이 광범위하게 사용되고 있다^{10,11)}. 각각은 myelosuppression, 고혈압, 간과 신장의 기능장애 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용에 제약이 따르는 경우가 많아 보다 효과적이며 안정성이 입증된 치료제의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서 류마티스성 관절염이란 명칭을 직접 언급한 바는 없지만 문헌에 기록된 증상을 미루어 볼 때 痺證, 痺痛, 歷節 風과 같은 病證과 매우 흡사하며, 발병원인은 風·寒·濕 外邪의 침입과 肝腎의 虛損이 주된 요인으로 간주되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 外邪의 침입은 대체로 생체의 正氣가 虛弱한 경우에 발생하는데, 正氣는

* 교신저자 : 김호현, 충북 제천시 세명로 세명대학교 한의과대학 생리학교실
· E-mail : binbae@semyung.ac.kr, · Tel : 043-649-1343
· 접수 : 2010/01/11 · 수정 : 2010/02/24 · 채택 : 2010/03/17

인체의 정상적인 생리기능을 영위하는 필수적인 조건이며 邪氣에 저항하는 기능을 수행함으로 면역기능을 대변하는 한의학적 개념으로 볼 수 있다. 또한 腎은 元氣를 저장하며, 主骨하고, 肝은 藏血과 主筋의 기능을 수행함으로 근골격 질환은 肝腎의 기능과 긴밀한 연관성을 가진다¹⁵⁾.

본 연구에 사용된 金銀花(Lonicerae Flos)의 性味는 寒, 無毒, 甘하며, 肺胃心으로 歸經하고 淸熱解毒, 涼散風熱의 효능이 있어 癰腫疔瘡, 腫瘍, 喉痺, 丹毒, 疥癬, 楊梅惡瘡, 瘰癧, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱을 치료한다¹⁶⁾. 주요 약리작용으로는 항균작용^{17,18)}, 항산화작용¹⁹⁾, 항염증작용²⁰⁻²²⁾, 항암작용²³⁻²⁶⁾ 등이 있으며, 임상적으로 편도선염, 후두염 등의 상기도 감염²⁷⁾, 피부화농증이나 바이러스성 결막염, 인플루엔자, 폐렴²⁸⁾ 등의 치료에 사용한다고 보고되었다.

본 연구는 金銀花의 류마티스성 관절염에 대한 항염증효과를 조사하기 위해 유허관절세포에서 MIF mRNA 발현을 조사하였고, 인위적으로 류마티스성 관절염이 유발된 생쥐에 金銀花 추출물 투여 후 유허관절막내에서 일어나는 일반적인 형태변화, 혈관분포, 섬유화, 그리고 MIF, COX-2, MMP-9의 면역조직화학적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포주와 세포배양

실험에 사용한 생쥐 무릎 유허관절세포는 관절염이 유발된 암컷 DBA 생쥐 무릎관절에서 적출하였다. 우선 관절 주변 근육을 제거하여 유허관절주머니 개방한 후 0.1% collagenase가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Weljin, Korea)에 2시간동안 반응하여 유허관절막 분리하고 세절하였다. 0.1% collagenase에 37°C에서 1시간동안 처리한 다음 3000 rpm에 5분간 원심분리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% fetal bovine serum(FBS; Sigma, USA)이 함유된 DMEM를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin(Sigma), 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다. 실험에는 3-5회 계대배양 세포를 사용하였다.

2. 금은화 추출물의 제조

금은화 (제주도산, 2006) 200 g을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 감압·농축 후 동결 건조하여 추출물 62 g (수득률 31%)을 얻었다.

3. 유허관절세포 내 MIF 유전자 발현 조사를 위한 RT-PCR

금은화 추출물의 첨가량 결정을 위해 MTT assay를 실시하였는데, 금은화 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하

였다. 금은화 추출물이 류마티스 관절염 유발을 주도하는 cytokine인 macrophage migration inhibitory factor(MIF)에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 유허관절세포 - 5×10⁵ cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 1 ng/ml)를 1시간 처리하여 MIF mRNA 발현을 유도하였다. 금은화 추출물 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 primer(sense, 5'-CACCATGCCTATGTTTCATCGTGAACA-3'; antisense, 5'-GGGCTCAAGGCGAAGGT GGAACCGTT-3')를 PCR machine으로 반응시켰다. PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 통해 비교하였다.

4. 관절염 생쥐모델과 금은화 추출물 투여

오리엔트(한국)에서 분양 받은 태령 4주된 DBA 암컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군 (CON군), 관절염 유발군 (AE군), 관절염 유발 후 금은화 투여군 (LT군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 관절염 유발을 위해 lipopolysaccharide(LPS, Sigma)를 증류수에 희석한 후 각각 300 µg/kg씩 무릎관절에 주사하였다. 특히 무릎관절낭으로의 정확한 주사를 위해 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 다음 무릎부위 피부를 절개하여 무릎뼈를 확인한 후 주사하였다. 한편 무릎관절에서의 관절염 유발여부는 LPS 주사 후 24-48시간 동안 무릎주변에서 나타나는 부종 (edema)의 확인을 통해 이루어졌다. 금은화 추출물 45 ml/kg을 매일 28일 동안 경구투여 하였다.

5. 유허관절 표본 제작과 조직화학

관절염 유발 28일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 무릎관절을 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 µm 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. 한편 유허관절막의 자유면 기저부에서 모세혈관의 분포 변화를 조사하기 위해서 Wright's stain을, 유허관절막내 섬유화를 조사하기 위해 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색을 실시하였다.

6. 면역조직화학 염색

윤활관절막내에서 류마티스 관절염 유발을 주도하는 cytokine인 macrophage migration inhibitory factor(MIF), 염증 효소인 cyclooxygenase(COX)-2 그리고 단백질효소인 matrix metalloproteinase(MMP)-9의 양성반응 변화를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 무릎관절 표본을 우선 proteinase K로 proteolysis한 다음 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse MIF(1:100, Santa Cruz Biotech, USA), rabbit anti-mouse COX-2(1:500, Santa Cruz Biotech) 그리고 rabbit anti-mouse MMP-9(1:100, Santa Cruz Biotech)에 4℃ humidified chamber에서 5일 동안 반응시켰으며, 2차 항체 goat anti-rabbit IgG(1:100, Santacruz)에 3일 동안 link 하였다. Avindin biotin complex(ABC) kit(DAKO)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학적 수치화를 위해 Optimas 5.2를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 본 실험 결과의 유의성은 ANOVA test(SPSS14KO, SPSS, USA)를 통해 확인하였다.

결 과

1. 관절염 관련 MIF 유전자발현 억제

PMA 자극에 의한 윤활관절세포에서의 MIF mRNA 발현은 증가하였는데, 금은화 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, PMA 자극 시 발현되는 MIF mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 13.9%, 0.6 mg/ml서 20.3%, 0.8 mg/ml에서 20.6%, 1.0 mg/ml에서 52.6% 감소하였다(Fig. 1).

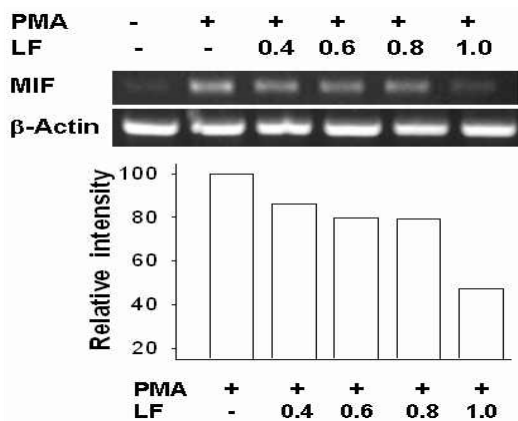


Fig. 1. Inhibition of MIF mRNA expression by Lonicerae flos (LF). The synoviocytes cells were treated with PMA for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4 - 1.0 mg/ml) of LF, and the cells were further incubated for 24 hours. The PMA-induced MIF mRNA expression were dose-dependantly decreased in LF treated synoviocytes. Abbreviation. PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; MIF, macrophage migration inhibitory factor.

2. 관절염 유발 생쥐모델 손상 완화

1) 일반적인 형태 변화

관절염 유발 후 윤활관절막의 자유면(apical surface)에서 관찰되는 주된 형태학적 변화는 윤활관절세포 과형성(hyperplasia)으로 인한 윤활관절막 자유면의 두께 증가였다. 윤활강 쪽으로 많은 돌기(filopodia)를 내어 마치 세포질이 이탈한 것처럼 보이는 윤활관절세포의 출현도 증가하여 윤활관절막의 자유면 표면이 전반적으로 거칠게 나타났다. 또한 자유면 쪽으로 침윤하는 림프구의 증가도 관찰되었다. 그러나 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐에서는 윤활관절막의 자유면 두께 증가가 감소하였다. 윤활강 쪽에서 많은 세포질 돌기를 내는 윤활세포들의 출현도 감소한 것으로 관찰되어, 대체적으로 윤활관절막이 매끄러운 표면 상태로 관찰되었다. 또한 윤활관절막 자유면 쪽으로 림프구 침윤도 줄었다(Fig. 2A).

2) 윤활관절막내 혈관 분포 감소

대조군의 윤활관절막내 지방조직사이에서 적은 수로 분포한 혈관은 관절염 유발 후 증가되는 양상을 보였는데, 특히 윤활관절막의 자유면 기저부의 윤활세포주변에서 직경이 큰 모세혈관의 출현이 증가하였다. 그러나 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐에서는 일부 윤활관절막의 자유면에서만 모세혈관의 급속한 출현 증가가 관찰되었을 뿐, 그 외 지역에서는 대조군과 유사한 분포양상을 보였다(Fig. 2B).

3) 윤활관절막내 섬유화 감소

관절염 유발 후 윤활관절막내 주된 형태학적 변화 중 하나는 섬유화(fibrosis)와 섬유화를 주도하는 섬유모세포 침적 증가였다. 섬유화는 일부 지방층을 제외한 윤활관절막의 모든 지역에서 관찰되었고, 이런 섬유화부위에서는 세포가장자리가 잘 발달된 섬유모세포의 분포가 증가하였다. 그러나 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐의 윤활관절막 자유면에서는 낮은 섬유화가 관찰되었다. 섬유화는 지방층사이의 모세혈관주변에서 마치 지방세포를 얇게 둘러싸고 있는 형상으로 관찰되었으며, 섬유화주변에 침적된 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 2C).

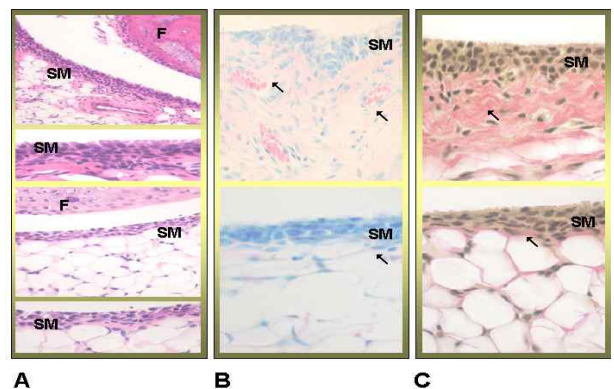


Fig. 2. Mitigation of LPS induced arthritis by LF(upper photo, arthritis elicitation group; lower photo, LF treated group after arthritis elicitation). A. Inhibition of damaged synovial membrane as hyperplasia and infiltration of inflammation intricate cells(H&E, x40, x400). B. Inhibition of angiogenesis(arrow, wright' stain, x400). C. Inhibition of fibrosis(arrow, Van Gieson's, x400). Abbreviation. F, femur; SM, synovial membrane. Others same as Fig. 1.

4) 윤희관절막내 MIF 활성

MIF의 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐에서는 감소하였다. 이런 MIF 양성반응세포는 윤희관절막 자유면에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 관절염 유발군은 대조군에 비해 926% 증가하였으나, 관절염 유발 후 금은화 추출물 투여군은 관절염 유발군에 비해 73% 감소하였다(Table 1, Fig. 3A).

5) 윤희관절막내 COX-2 생성 억제

전염증효소인 COX-2 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 윤희관절막 자유면에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 관절염 유발군은 대조군에 비해 1302% 증가하였으나, 관절염 유발 후 금은화 추출물 투여군은 관절염 유발군에 비해 75% 감소하였다(Table 1, Fig. 3B).

6) 윤희관절막내 MMP-9 생성 억제

단백분해효소인 MMP-9의 양성반응세포의 분포는 관절염 유발 후 증가하는 반면, 관절염 유발 후 금은화 추출물을 경구 투여한 생쥐에서는 감소하였다. 이런 MMP-9 양성반응세포는 윤희관절막 자유면에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. MMP-9 양성반응의 영상분석 결과 관절염 유발군은 대조군에 비해 322% 증가하였으나, 관절염 유발 후 금은화 추출물 투여군은 관절염 유발군에 비해 41% 감소하였다(Table 1, Fig. 3C).

Table 1. The image analysis for inhibition of arthritis intricate cytokine production by *Lonicerae flos* (LF)

Objective	Group		
	CON	AE	LT
MIF	354± 8	3631±56	966±15*
COX-2	284± 9	3981±46	1010±25*
MMP-9	454±11	1915±25	1127±18*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120) Abbreviation. CON, No-treated group; AE, arthritis elicited group; LF treated group after arthritis elicitation; MIF, macrophage migration inhibitory factor; COX-2, cyclooxygenase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; *, P < 0.05 compared with AE.

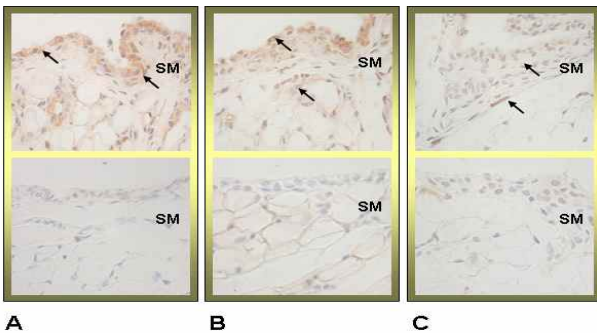


Fig. 3. Inhibition of arthritis intricate cytokine production by LF(upper photo, arthritis elicitate group; lower photo, LF treated group after arthritis elicitation). A. Suppression of MIF(arrow) activation(MIF immunohistochemistry, x400). B. Inhibition of COX-2(arrow) production(COX-2 immunohistochemistry, x400). C. Inhibition of MMP-9(arrow) production(MMP-9 immunohistochemistry, x400). Abbreviation. MIF, macrophage migration inhibitory factor; COX-2, cyclooxygenase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9. Other abbreviation same as Fig. 2.

고찰

류마티스성 관절염은 노화나 퇴행성 변화에 의하여 발생하는 골관절염 다음으로 많은 만성질환으로, 특정 관절에서만 국한되어 통증이 나타나는 것이 아니라 팔다리 여러 곳을 옮겨 다니며 전신의 관절을 침범하는 것이 특징이다²⁹⁾. 이러한 류마티스성 관절염이 심한 경우 류마티스성 결절(rheumatoid nodules), 맥관염(rheumatoid vasculitis), 안염증(eye inflammation), 신경기능 이상(neurologic dysfunction), 심폐기능장애, 림프절 병증(lymphadenopathy), 비장거대증(splenomegaly) 등의 관절 외 류마티스 증상이 발현된다³⁰⁾. 한편 류마티스성 관절염은 주로 30-40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병율을 보이고 있지만 보통 평균 유병율은 0.8%로 추정되며, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다³¹⁾.

한의학에서는 류마티스성 관절염을 “痺證”, “歷節風”이라고 표현하며¹²⁻¹⁴⁾,痺는 저리고 순환이 안 된다는 의미이고,歷節風은 관절 마디마디에 痛症을 나타낸다는 뜻으로 순환 장애로 인해 관절마디마디에 痛症을 나타내는 질환으로 단순한 관절의 염증이라기보다는 전신질환으로 보고 있다³²⁾.歷節風은關節이 붓고 심한 疼痛이 있으며 屈伸不利하는 것이 특징으로 紅腫, 下肢腫痛, 脚腫如脫, 短氣, 頭眩欲吐, 手指變曲 등의 증상 등이 나타난다³³⁾. 그 원인을 살펴보면 <內經-痺論>에서는 風寒濕三氣가 합하여 痺證이 된다고 하였으며, 또 風은 그 성질이 善行而數變하여 疼痛이 遊走하므로 行痺라 칭하여 歷節風이 발병하는데 歷節風의 外邪 중 특히 風邪의 침범과 밀접한 관계가 있으며, 음식과 생활환경과도 관계가 있음을 말하여 소위 “飲食起居 爲其病本”이라 하였다³⁴⁾.

인동덩굴(*Lonicera japonica* THUNBERG)은 忍冬科(Caprifoliaceae)에 속하는 식물이며, 花蕾를 건조한 것을 金銀花라고 하며, 잎을 건조한 것을 忍冬(*Lonicerae Folium*)이라고 한다³⁵⁾. 金銀花는 주로 涼散風熱, 擁腫精瘡, 喉痹, 丹毒, 熱血毒痢, 風血感冒, 溫炳發熱의 약효를 가지며 한방이나 민간에서 이노, 해독 화농증 및 피부종양의 세척제로 사용되어왔으며, 특히 淸血解毒에 유효하다고 기록 되어있다³⁶⁾. 金銀花 약리작용에 관한 연구로는 金銀花의 EtOAc 분획의 mutagen에 의한 돌연변이 생성억제³⁷⁾와 항산화효과³⁸⁾, 金銀花의 tannin 성분의 HIV-1 RT 저해³⁹⁾, 金銀花의 ochnaflavone 성분의 phospholipase A2 저해⁴⁰⁾ 등이 보고되었다. 특히 金銀花의 ochnaflavone을 비롯한 flavonoid 성분들은 NF-κB 활성 조절을 통하여 염증효소인 COX-2와 iNOS 생성을 억제함으로써 항염증능이 있는 것으로 보고되었다^{41,42)}.

이러한 금은화의 항염증능이 류마티스성 관절염에 대한 치료효과를 조사하기 위해서 실시된 본 연구는 윤희관절세포의 MIF mRNA 발현을 측정하였고, LPS로 인위적 류마티스성 관절염이 유발된 생쥐에 금은화 추출물 투여 후 윤희관절막의 일반적인 형태변화, 혈관분포, 섬유화 그리고 면역조직화학을 통한 MIF, COX-2, MMP-9 양성반응 변화를 관찰하였다.

류마티스성 관절염 유발 시 윤희관절막의 두께 비후는 자유

면에 위치한 윤활관절세포 또는 섬유모세포유사윤활세포 (fibroblast like synoviocyte; FLS)의 세포과형성에 기인된 것으로 MIF 활성화에 의한 세포분열의 촉진과 세포자기살해의 억제의 결과이다. MIF는 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 류마티스성 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다³⁾. FLS의 증가는 이는 IL-1 β , IL-2, cell adhesion molecular(CAM)을 분비 증가에 의한 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생성 증가와 섬유화 (fibrosis)와 염증부위의 이주세포의 증가를 유도한다⁴³⁾. 특히 모든 지역에서 일어난 섬유화는 FLS에서의 IL-1 β 신호기전에 의한 것으로 collagen fiber의 합성 촉진과 collagenase의 합성 또한 유도하고⁴⁴⁾, 관절염 유발 시 중성호성백혈구, 단핵구 및 림프구 등에 대한 주화작용⁴⁵⁾, 관절 내 연골과 연골 하 골조직의 파괴⁴⁶⁾ 및 prostaglandin 등의 염증매개물질의 분비를 자극한다⁴⁷⁾. 본 실험에서도 류마티스성 관절염의 윤활관절막내에서 FLS의 세포과형성, 혈관신생성 증가, 섬유화 증가를 확인할 수 있었다.

MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에 의한 TNF- α 의 분비 증가를 일으키며, 그 결과 염증관련 전사인자인 NF- κ B의 활성을 유도한다. 전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 염증효소 COX-2 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도한다^{48,49)}. 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다^{50,51)}. 본 실험에서도 NF- κ B에서도 활성화에 의한 COX-2 양성반응세포의 윤활관절막내 분포 증가를 일으켰다.

한편 MIF의 활성화는 FLS와 대식세포에서 MMP 생성을 유도하는데, MMP-9는 laminin과 type IV collagen을 선택적으로 분해하여 기저막을 파괴하여 염증관련 세포 이주를 용이하게 한다⁸⁹⁾. 본 실험에서도 윤활관절막내에서 MMP-9 양성반응세포의 분포 증가가 관찰되었다.

이에 반해 金銀花 추출물 처리군의 윤활관절막내에서는 FLS의 세포과형성, 혈관신생성, 섬유화 등이 류마티스성 관절염 유발군보다 적었다. 이는 MIF 활성화 억제에 의한 것으로 金銀花 추출물이 PMA로 자극된 윤활관절세포에서 MIF mRNA의 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 *in vitro*의 결과와 LPS 동물모델을 통해 금은화 처리 후 MIF 양성반응세포의 분포 감소가 관찰된 *in vivo* 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 金銀花의 MIF 활성화 억제는 NF- κ B 활성을 저해함으로써 염증효소 COX-2 작용을 차단하게 되어 염증으로 유발되는 윤활관절막내 조직 손상을 막았다. 또한 윤활관절막내 MMP-9의 생성을 억제함으로써 세포의 기질의 손상과 염증세포의 이주증가를 막았다. 이상의 결과로 金銀花는 MIF의 활성화 억제를 통해 초기 류마티스성 관절염의 진행을 차단하고 항염증작용을 통해 류마티스성 관절염로 기인된 조직 손상을 완화시키는 치료 효과를 보이는 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 金銀花 추출물은 윤활관절세포에서 MIF 유전자 발현을 억제하였고, LPS 유발 생쥐 관절염 모델에서 윤활관절막내 조직 손상의 완화와 MIF, COX-2, MMP-9 양성반응을 감소시켰다. 金銀花 추출물은 MIF 활성화 억제를 통해 COX-2와 MMP-9 생성을 억제함으로써 류마티스성 관절염에 대한 치료 효과를 보이는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Peter, S., Stefan, S., Rolf, M., Peter, P. Synthesis and Degradation of Hyaluronate by Synovia from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 22: 400-405, 1995.
2. Leo, A.B., Monique, M.A., Fons, A.J., van de Loo, Wim, B. Anti-cytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/a mice. *Arthritis Rheum.* 39(5):797-809, 1996.
3. Morand, E.F. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. *J. Internal medicine.* 35: 419-426, 2005.
4. Leech, M., Metz, C.N., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S.R., Bucala, R. MIF in Rheumatoid arthritis : evidence for proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 42: 1601-1608, 1999.
5. Marc, F., Fionula, M.B., Ravinder, N.M. Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu. Rev. Immunol.* 14: 397-440, 1996.
6. Sampey, A.V., Hall, P.H., Mitchell, R.A., Metz, C.N., Morand, E.F. Regulation of synoviocytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 44: 1273-1280, 2001.
7. Yasmina, J., Catalina, A., Carmen, M., Alicia, A., Irene, G., Florencia, R., Rosa, P., Javier, L. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. & Therapy.* 7: R1034-1045, 2005.
8. Burrage, P.S., Mix, K.S., Brinckerhoff, C.E. Matrix metalloproteinases ; role in arthritis. *Front Biosci.* 11: 529-543, 2006.
9. Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M., Nishihira, J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. *J. Biol chem.* 275: 444-450, 2000.
10. Matthew, H. Ornstein, Kirk, S. The antiinflammatory and antiviral effects of hydroxychloroquine in two patients with acquired immunodeficiency syndrome and active

- inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 39(1):157-161, 1996.
11. 송정수. 류마티스관절염의 완치를 향하여. *대한내과학회지* 69(6):581-589, 2005.
 12. 이학인, 양재하, 권순주. 류마티스관절염의 동서의학적 고찰, *경산대 濟韓東醫學術院 論文集*, 4(1):199-209, 1999.
 13. 許人仁, 張再良. 歷節風證治探要. *上海中醫藥大學學報*, 14(4): 37-39, 2000.
 14. 張浩, 呂愛平. 試論腎虛痺證(類風濕性關節炎) 發育生物學基礎. *中國中醫基礎醫學雜誌*, 9(2):8-10, 2003.
 15. 王炎焱, 黃烽, 路輝. 論中國藥治療風濕性關節炎的研究思路 *中華醫學從刊*, 3(12):6-8, 2003.
 16. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *본초학*. 서울, 永林社, pp 198-199, 2004.
 17. 강옥희. 金銀花의 藥理作用에 關한 研究. *우석대학교 석사학위논문*, 1987.
 18. 배지현, 김미순, 강은혜. 식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과. *한국식품과학회지* 37(4):642-647, 2005.
 19. 문태철, 박정옥, 정광원, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱, 정규찬. 금은화 플라보노이드 성분의 항염증작용. *약학회지* 43(1):117-123, 1999.
 20. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. *Int J. Mol Med.* 7(1):79-83, 2001.
 21. Lee, S.J., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. Anti-inflammatory activity of *Lonicera japonica*. *Phytotherapy Research.* 12(6):445-447, 1998.
 22. Kwak, W.J., Han, C.K., Chang, H.W., Kim, H.P., Kang, S.S., Son, K.H. Loniceroside C, an Antiinflammatory Saponin from *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull.* 51(3):333-335, 2003.
 23. 황윤정. 주엽나무잎 및 금은화의 phenol성 성분. *충북대학교 대학원*, 1994.
 24. Rim, B.M., Rim, C.W., Choi, J.Y., Chung, Y.S., Jeong, H.G. Effects of *Lonicera japonica* extract as a biological response modifier. *Environ. Mut. Car.* 12(1):45-54, 1992.
 25. 김경진, 한두석. 금은화의 가용성 Ethyl acetate 소분획의 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암효과. *원광치의학* 8(2):31-41, 1998.
 26. 한두석, 배경현, 김영욱, 최규은, 광정숙, 백승화. 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제6보) 금은화 Ethyl Acetate 가용성 분획의 인체 구강유상피암종세포에 미치는 세포독성작용. *생약학회지* 29(1):22-27, 1998.
 27. 이금택, 최병태, 이용태, 고우신. 慈雲膏加 金銀花가 흰쥐의 創傷에 미치는 效果. *대한한의학회지* 20(1):132-141, 1999.
 28. Huang, K.G. *The Pharmacology of Chinese herbs*. 2nd ed., Boca Ranton: CRC. pp 388-389, 1998.
 29. 이재동. 류마티스 관절염의 한방치료. *경희의학*, 20(1):4-9, 2004.
 30. Stephen, L.D., Koda-Kimble, M.A. *Rheumatic disorders, Applied Therapeutics: the clinical use of drugs*. 6th ed. Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, WA : Appl. Therap. Inc. pp 1-27, 1995.
 31. Lipsky, P.E. *Rheumatoid arthritis*. *Harrison's principle of internal medicine*, 16th ed. New York, McGraw Hill, pp 1968-1977, 2005.
 32. 許浚. *東醫寶鑑*. 서울, 南山堂, p 378, 1983.
 33. 趙浩. *聖濟總論*. 北京, 人民衛生出版社, pp 1111-1117, 3129-3174, 1987.
 34. 楊維儔. *黃帝內經 素問 靈樞 譯解*. 서울, 成輔社, pp 315-328, 1980.
 35. Tang, W., Eisenbrand, G. *Chinese drugs of plant origin*. Springer-verlag. Berlin. pp 621-625, 1992.
 36. 陳再民. *原說韓方醫藥大辭典 (中國藥學大典)*. 中國, 講談社, p 160, 1982.
 37. Chung, K.C., Kwon, D.Y., Baek, S.H., Kim, S.H., Chang, H.W. Effect of *Lonicera Flos's* ethyl acetate fraction on mutagenicity. *Yakhak Hoeji.* 32: 328-333, 1988.
 38. Choi, C.W., Jung, H.A., Kang, S.S., Choi, J.S. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from *Flos Lonicerae*. *Arch Pharm Res.* 30(1):1-7, 2007.
 39. Chang, C.W., Lin, M.T., Lee, S.S., Liu, K.C., Hsu, F.L., Lin, J.Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-alpha activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res.* 27(4):367-374, 1995.
 40. Chang, H.W., Baek, S.H., Chung, K.W., Son, K.H., Kim, H.P., Kang, S.S. Inactivation of phospholipase A2 by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(1):843-849, 1994.
 41. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. *Int J Mol Med.* 7(1):79-83, 2001.
 42. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H. The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF-kappaB regulation, in RAW264.7 cells. *Arch Biochem Biophys.* 447(2):136-146, 2006.
 43. Carlene, T., Luis, A.D., Nora, G.S., Lan, L.L., Anita, H.K., Raj, M., Brian, J.N., Leslie, J.C., David, A.F. Responsiveness

- of Human T Lymphocytes to Bacterial superantigens presented by cultured Rheumatoid Arthritis Synoviocytes, *Am. College Rheumto.* 39(1):125-136, 1996.
44. Mizel, S.B., Dayer, J.M., Krane, S.M., Mergenhagen, S.E. Stimulation of Rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor(IL-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2474-2486, 1981.
 45. Pettipher, E.R., Higgs, G.A., Henderson, B. IL-1 induces leukocytes infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8749-8756, 1986.
 46. Saklatvala, J. IL-1 - Purification and biochemical aspects of its action on cartilage. *J. Rheum.* 14: 52-58, 1987.
 47. Bunning, R., Crawford, A., Richardson, H., Opendakker, G., van Damme, J., Russell, R. IL-1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 924: 437-449, 1987.
 48. Baeuerle, P.A. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 95: 729-731, 1998.
 49. Y.X. Li, N. Li, Y.S. Li, B. Wu, J.S. Li. Upregulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. *Transplant Proceed.* 32: 1283-1286, 2000.
 49. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 17(2):S38-40, 1993.
 50. Rothkötter, H.J., Pabst, R., Bailey, M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno immunopath.* 72: 157-165, 1999.
 51. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 93(5):705-716, 1998.