

류마토이드 關節炎 患者 滑膜細胞에 대한 鷄血藤의 免疫反應

서해경 · 오민석 · 김동희^{1*}

대전대학교 한의과대학 재활의학교실, 1:대전대학교 한의과대학 병리학교실

Immunity Responses of the Spatholobus Suberectus Dunn to the Synovial Cells Isolated from Patients with Rheumatoid Arthritis

Hae Gyoung Seo, Min Suck Oh, Dong Hee Kim^{1*}

Department of Rehabilitation, Collage of Oriental Medicine, 1: Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was carried out to know the immunity responses of the Spatholobus suberectus Dunn(hereinafter referred to STSD) to the synovial cells isolated from patients with rheumatoid arthritis. Various experiments were performed in vitro to analyse the immunity effects of STSD. Gene expression and production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS and COX-2 were determined by RT-PCR and ELISA kit. And also the binding activity of NF- κ B and AP-1 were measured by Electromobility shift assay (EMSA) and the production of ROS was measured by flow cytometry. The results were obtained as follows 1. The gene expression and production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α were reduced significantly. 2. The gene expression of iNOS and COX-2 were reduced. 3. The binding activity of NF- κ B and AP-1 were inhibited. 4. The production of ROS in human synovial cells was reduced significantly. Comparison of the results for this study showed that STSD had immunomodulatory effects of suppressing or enhancing. So we expect that STSD should be used as a effective drugs for not only rheumatoid arthritis but also another auto-immune disease. Therefore we have to survey continuously in looking for the effective substance and mechanism in the future.

Key words : Rheumatoid arthritis, Spatholobus suberectus Dunn, Immunity responses, Synovial cells

서 론

류마토이드 관절염의 원인과 병태 생리에 대하여 아직은 명확한 결론이 없고, 현재까지 제기된 가설은 감염설, 비타민 결핍, 호르몬의 부조화 및 면역학적 인체 반응 등이 있지만, 자가 항체들의 출현을 위시한 다양한 변화들로 미루어 보아 자가 면역 반응설이 가장 유력하다¹⁾. 류마토이드 관절염은 한의학적으로 歷節風, 痛風, 白虎歷節風 등^{2,4)}과 痺證의 범주에 속하는데⁵⁾, 痺란 風寒濕의 邪氣가 인체의 榮衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱한 틈을 타고 肌肉과 經絡으로 침입하거나 關節에 凝滯됨으로써 氣血運行이 순조롭지 못하여 筋骨, 肌肉, 肢體, 關節 등에 疼痛, 酸楚, 重着, 麻木, 腫脹, 屈伸不利, 發赤 및 關節의 強直性 變形 등을 초래하는 병증이다^{5,6)}. 본 시료인 鷄血藤은 靑代《本草綱目拾遺》⁷⁾에 最初로 記錄

되었으며, 豆科에 속하는 密花豆(Spatholobus suberectus Dunn)와 昆明鷄血藤(M.reticulata Benth) 등, 그 藤莖을 건조한 것이다. 性味는 溫, 苦, 微甘하고 藥性이 緩和하며, 肝·腎經으로 들어가 行血補血, 舒筋活絡하여 關節酸痛, 風濕痺痛, 手足麻木, 月經不調, 血虛經閉, 月經痛 등에 사용된다⁸⁾. 鷄血藤에 대한 실험 보고로 이⁹⁾는 항염증 효과가 있다고 하였고, Su¹⁰⁾는 악성 빈혈에 유효하다고 하였고, Wang¹¹⁾은 HDL를 높여 지질대사를 조절한다고 하였으며, 오¹²⁾는 조절성 cytokine을 자극하여 조절과 면역 증강작용을 한다고 하였으며, Lam¹³⁾은 HIV-1 단백질 분해 효소를 억제하여 면역을 증강시킨다고 하였으나, 류마토이드 관절염에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다. 이에 저자는 鷄血藤이 風濕痺痛에 사용되고, 항염증 및 면역 증강 작용이 있다는 점에 준하여, 류마토이드 관절염 환자의 synovial 세포를 대상으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2 유전자 발현과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 분비량을 측정하고, 전사 활성 인자인 AP-1, NF- κ B 활성화도 및 ROS 분비량 등을 측정하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 김동희, 대전과역사 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr · Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2003/03/27 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/27

실 험

1. 재료

1) 약물과 시료 제조

鷄血藤(Spatholobus suberectus Dunn - 이하 STSD로 칭함)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. STSD 100g에 증류수 1,300ml를 가하여 열탕 추출기(대응, DWT-1800T, 한국)에서 3시간 동안 추출하여 얻은 추출액을 흡입 여과하여 감압농축기(Büchi Co., B-580, Switzerland)로 감압 농축하고, 이를 다시 동결 건조기(EYELA, FDU-540, Japan)로 완전 건조하여 냉동(-20℃) 보관하였다.

2) 시약

Dulbecco's modified Eagles media(DMEM), RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), trypsin-EDTA는 Gibco BRL Co.(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였고, diethyl, magnesium chloride(MgCl₂), chloroform(CHCl₃), pyrocarbonate(DEPC), sulforhodamine-B (SRB), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), 3,4,5-dimethylthiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), isopropanol, tris base, polyacrylamide, trichloro-acetic acid(TCA), agarose, DNase type I은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa Shuzo Co. (Otsu Shiga, Japan)에서 구입하였고, Moloey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega Co.(Madison, WI, USA)에서 구입하였으며, RNAzolB는 Tel-Test Inc.(Butler, PA, USA)에서 구입하였고, hrIL-1 β , hrTNF- α , IL-1 β ELISA kit, IL-6 ELISA kit, TNF- α ELISA kit는 R&D Systems Inc.(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, DNA 100bp marker는 Intron Co.(서울, Korea)에서 구입하였고, collagenase A, penicillin, streptomycin, amphotericin B는 BM (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

Human synovial 세포(이하 HSC라 함)는 충남대학교 의과대학 부속병원에서 류마티오이드 관절염 환자의 synovial tissue를 공급받아 synovial membrane 조직을 차가운 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 15ml 튜브에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 튜브에 RPMI-1640에 collagenase A(5mg/ml), DNase type I (0.15mg/ml), penicillin(104U/ml), streptomycin (10mg/ml), amphotericin B(25 μ g/ml)를 첨가한 배양 배지를 사용하여 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 처리하고 이를 D-PBS로 2회 세척한 후 1,500 rpm에서 원심분리 한 다음, 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 human synovial 세포를 분리하여 5% FBS를 첨가한 RPMI-

1640에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 분주하였다.

2) Human synovial 세포에 대한 면역 반응

(1) Human synovial 세포의 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

① RNA 추출

Human synovial 세포는 24 well plate에 1×10⁶개의 세포로 각 well에 분주하고, STSD(1, 10, 100 μ g/ml)으로 처리하고 1시간 후 hrIL-1 β (10U/ml)와 hrTNF- α (100ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 μ l를 넣고 용해될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 isopropanol 200 μ l와 동량을 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 침전하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 100mM DTT, 4.5 μ l 5xRT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후, 합성된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 water bath 방식의 turbo themalycer™(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행한다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 β -actin, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6(interleukin -6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2(COX-2), 그리고 inducible nitric oxide synthases(iNOS)의 primer는 Table 1과 같으며, 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10xPCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l taq polymerase(5U/ μ l)를 첨가한 다음 증류수를 더하여 최종 부피가 30 μ l가 되게 하여 pre-denaturation은 95℃에서 5분, denaturation은 95℃에서 5분, annealing은 55℃에서 1분, elongation은 72℃에서 1분간을 25회 한 후, 72℃에서 최종적으로 3분 동안 elongation을 실시하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 20 μ l씩 1.2% agarose gel로 제작하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. PCR 산물은 Window 1-D main program (AAB, USA)을

이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

Table 1. Oligonucleotide Primer Sequences User for RT-PCR

Gene	Primer	Nucleotide Sequences
IL-1 β	sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	antisense	5'-AGCCCATGAGTTCATTAC-3'
IL-6	sense	5'-ATGAAGCTCTTCTCCACAAGCGC-3'
	antisense	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
TNF- α	sense	5'-AGCGGCTGACTGAAGTCAAGTGT-3'
	antisense	5'-GTCACAGTTTCAGCTGTATAGGG-3'
COX-2	sense	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAT-3'
	antisense	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'
iNOS	sense	5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'
	antisense	5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'
β -actin	sense	5'-TGGAACTCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

(2) ELISA에 의한 cytokine 정량

Human synovial 세포를 실험 3일전에 2차 배양(1×10^5 cells/ml)하여 12 well plate에 2×10^6 개 세포를 각 well에 분주한 후, 우태아혈청결핍 RPMI-1640 배양액으로 12시간 배양시켰다. STSD(100, 10, 1 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-6(100U/ml)와 hrTNF- α (100ng/ml)를 각각의 well에 첨가하였다. 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액과 STSD으로 처리하고 48시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하여, ELISA kit로 생산량을 측정하였다.

(3) Electromobility shift assay (EMSA)

① 세포 배양 및 약물 처리

Human synovial 세포를 6 well plate에 1×10^7 개 세포를 분주하고 우태아혈청결핍 RPMI-1640 배양액으로 12시간 배양하였다. 여기에 STSD(100, 10 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1 β (10U/ml)와 hrTNF- α (100ng/ml)를 5시간 동안 동시 배양하였다.

② 핵추출

배양한 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 1,200rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS로 세척하였다. 이 세포에 3배 부피의 완충용액 A(10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH 7.8)를 넣고 얼음에 10분간 방치한 후 2,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 이 후 상층액을 제거하고 다시 완충용액 A를 가하고 Nonidet P-40이 0.1% 되게 첨가하여 homogenizer(OMNI Ins., Macro ES, USA)를 이용하여 세포를 분쇄하여 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액인 세포질을 제거하였다. 이 세포에 완충용액 C(20mM HEPES, 25% Glycerol, 0.35mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH 7.9) 2.5ml를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 1시간 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하여 18시간 후 50배 부피의 완충용액 D(20mM HEPES, 20% Glycerol, 0.2mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH 7.9)를 넣은 후 핵막을 터뜨려 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리하여 핵추출을 얻었다.

③ Gel mobility shift assay

NF- κ B의 활성화 측정용을 위한 NF- κ B consensus binding

site를 가진 oligonucleotide probe는 5'-GGCAACTGCTCACTC TCCCTTT-3'이며, AP-1는 5'-TGACTCA-3'이며 각각 2 μ l를 합성하여 2 μ g의 poly(dl-dC)가 들어있는 10mM Tris-HCl(pH 8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 2mM DTT)을 함유, 250 μ g/ml BSA)에 희석한 후 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 각각의 labelled-probe들(0.5-1.0ng, 100,000-2,000,000 cpm)을 이용하여 32P-ATP 효소를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 20 μ g의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 얼음위에서 6% polyacrylamide gel에 걸어 150V, 10mA로 3시간 동안 전기영동을 하였다. bromophenol blue(BPB)의 염색이 밀도로부터 1-2cm 정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추고 이를 gel dryer(Bio-Rad, Model 583, USA)에서 약 1시간 건조한 다음 X-ray film에 노출시켜 감광시켰다.

(4) 세포내 reactive oxygen species (ROS) 분비량 측정

Human synovial 세포내의 ROS 분비량을 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5×10^5 개 세포를 첨가하고, STSD(10, 50 μ g/ml)를 처리하고 1시간 후 hrIL-1 β (10U/ml)와 hrTNF- α (100ng/ml)를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한다. 배양종료 후 DCFH-DA 50mM을 처리하고 5분간 배양하고 2회 수세한 후 flow cytometry(Becton Dickinson, FACSVantage™, USA)로 세포내 형광 ROS를 측정하였다.

성 적

1. Human synovial cell에 대한 면역 반응

1) 염증 유발 cytokine에 미치는 영향

IL-1 β 유전자 발현에서는 정상군의 Ht값이 12, 대조군이 186으로 나타났으며, STSD 1, 10, 100 μ g/ml 처리군에서는 각각 177, 91, 42로 나타나 대조군 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1).

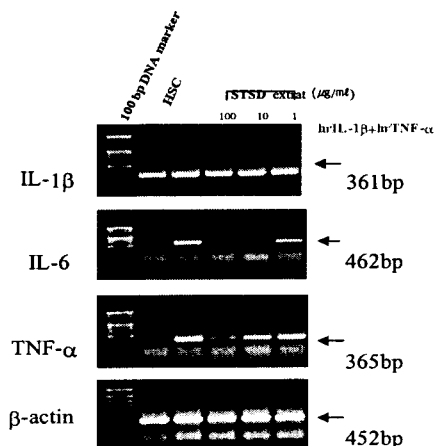


Fig. 1. Inhibitory effects of STSD extract on iNOS and COX-2 mRNA expression in human synovial cells. Human synovial cells were pretreated with various concentration STSD extract in the presence or absence hrIL-1 β (10U/ml) and hrTNF- α (100ng/ml) for 6h. Amplified iNOS, COX-2 PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control(β -actin) and the analysis Ht was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described in materials and methods.

IL-6 유전자 발현은 정상군이 13, 대조군은 157로 나타났으며, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 각각 59, 26, 12로 나타나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다 (Fig. 1). TNF- α 유전자 발현은 정상군이 162, 대조군이 220으로 나타났으며, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군이 각각 216, 207, 189로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 1).

2) IL-1 β , IL-6, TNF- α 분비량에 미치는 영향

IL-1 β 분비량 측정에서는 정상군이 18.2 \pm 3.1pg/ml, 대조군이 86.5 \pm 16.8pg/ml로 나타난 반면, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군이 각각 58.4 \pm 13.6, 30.5 \pm 12.7, 24.6 \pm 4.7pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하였으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 유의성 있게(p<0.05, p<0.01) 억제하였다. IL-6 분비량 측정에서는 정상군이 896 \pm 58.1pg/ml, 대조군이 3456 \pm 406.2pg/ml로 나타난 반면, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 각각 2155 \pm 149.5, 1056 \pm 124.1, 702 \pm 59.4pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하였으며, 모든 실험 농도에서 유의성 있게(p<0.01, p<0.001) 억제하였다. TNF- α 분비량 측정에서는 정상군이 530 \pm 43.1pg/ml, 대조군이 1768 \pm 203.5pg/ml로 나타난 반면, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 각각 1602 \pm 132.5, 1342 \pm 120.8, 882 \pm 144.3pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하였으며, IL-1 β 분비량 측정에서와 같이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있게(p<0.05, p<0.001) 억제하였다(Table 2).

Table 2. Inhibitory Effect of STSD on the IL-1 β , IL-6 and TNF- α Production in Human Synovial Cells

Group	Dose	IL-1 β Production (pg/ml)	IL-6 Production (pg/ml)	TNF- α Production (pg/ml)
RPM1640-Media	0	18.2 \pm 3.1	896 \pm 58.1	530 \pm 43.1
hrIL-1 β (10U/ml) Control	0	86.5 \pm 16.8	3456 \pm 406.2	1768 \pm 203.5
plus hrTNF- α (100ng/ml)	STSD 1	58.4 \pm 13.6	2155 \pm 145.9*	1602 \pm 132.5
	10	30.5 \pm 12.7*	1056 \pm 124.1**	1342 \pm 120.8*
	100	24.6 \pm 4.7**	702 \pm 59.4**	882 \pm 144.3**

The results are expressed the mean \pm S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

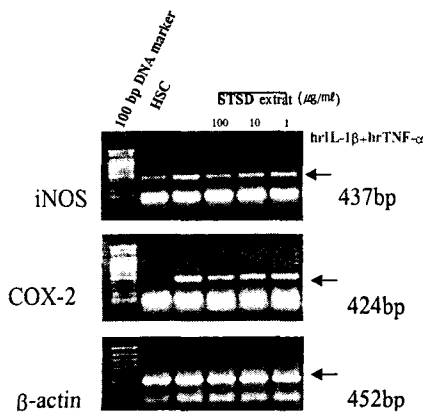


Fig. 2. Inhibitory effects of STSD extract on iNOS and COX-2 mRNA expression in human synovial cells.

3) iNOS와 COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

iNOS 유전자 발현은 정상군의 Ht값은 36, 대조군은 88로 나타났으며, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 각각 72, 61, 45로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2). COX-2 유전자 발현은 정상군의 Ht값은 12, 대조군은 156으로 나타났으며, STSD 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 각각 147, 92, 88로 나타나 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2).

4) 전사 활성 인자 NF- κ B 및 AP-1 활성화에 미치는 영향

Human synovial 세포에 hrIL-1 β 와 hrTNF- α 를 처리하여 활성도가 증가된 대조군에 비하여 STSD 처리군에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 NF- κ B 및 AP-1 활성을 현저하게 억제하였다(Fig. 3).

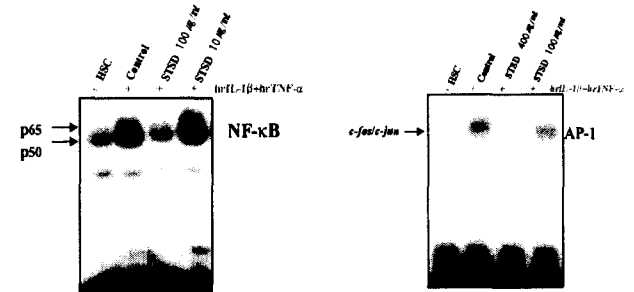


Fig. 3. Effects of STSD on DNA-binding activity of NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) in human synovial cells. Human synovial cells were pretreated with various concentration STSD (100 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence hrIL-1 β (10U/ml) plus hrTNF- α (100ng/ml) for 6h. Nuclear extracts from human synovial cells were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels. Electrophoretic mobility shift assay by NF- κ B and activator protein-1(AP-1) binding activity.

5) 세포내 reactive oxygen species (ROS) 분비량

세포내 reactive oxygen species (ROS) 분비량에 미치는 효과에서는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 STSD 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 ROS 분비량이 감소하였다.

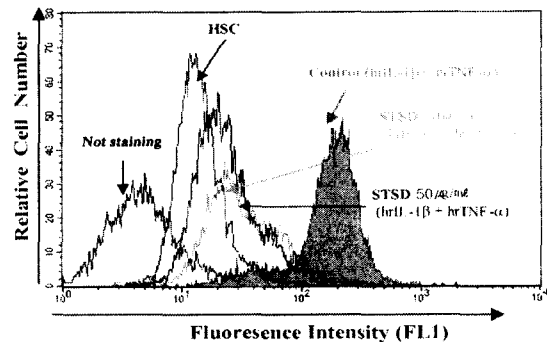


Fig. 4. Inhibitory effect of STSD on the ROS production in human synovial cells. Human synovial cells were cocultured with STSD and pretreated with hrIL-1 β (10U/ml) and hrTNF- α (100ng/ml) for 48h. After cultured, DCFH-DA reagent(50mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS production by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in materials and methods.

고찰

류마티오이드 관절염은 관절내 연골과 주위 조직의 염증반응을 병변으로 하며, 관절 이외에도 여러 장기를 침범하는 전신성 만성 염증성 질환으로 자가면역질환의 하나로 인식되고 있다^{1,14,15}. 류마티오이드 관절염의 발생에 있어 세포성 면역반응은 주로 T림프구에 의하여 이루어지나, NK세포와 대식세포들에 의해 이루어지기도 하며, 이들 세포간에는 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다^{15,16}. 만성 염증성 질환의 하나인 류마티오이드 관절염은 활액막에 활액세포가 증식하고, 많은 림프구와 어느 정도의 혈질세포 그리고 대식세포가 침윤되는데^{15,16}, 가장 많이 침착하는 세포는 T림프구이다¹⁷. 이 중 TH림프구는 Interferon- γ , GM-CSF, IL-2, IL-6, TNF- α , transforming growth factor β 등의 cytokine을 분비하여 대식세포의 활성화와 HLA molecule을 증가시킨다¹⁸. 그 외에 B세포의 증식과 분화에 관여하며 국소적으로 B세포의 자극을 증진시킨다¹⁹. 단핵구는 혈관밖으로 나가 대식세포로 바뀌며, T림프구에서 분비되는 interferon- γ 와 같은 cytokine에 의해 활성화되어²⁰ IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage growth factor β , transforming growth factor β 등의 cytokine과 prostaglandin E₂와 collagenase을 분비한다^{21,22}. 이 중 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 가장 많이 분포하는 대표적인 염증유발 사이토카인이다. IL-1 β 는 류마티오이드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증진시키고²³, 호중구, 림프구, 단핵세포의 침윤을 유발하며²⁴, ICAM-1의 발현을 촉진하여 내피세포에 대한 백혈구의 유착성을 증가시키고²⁵, 섬유모세포, 활액막세포 및 연골세포에서 PGE₂와 collagenase 생산을 촉진하여 관절 연골의 파괴와 골의 재흡수를 초래함으로써 다양한 관절염 실험에서 대표적 지표로 사용된다. 본 실험에서 IL-1 β 유전자 발현은 농도 의존적으로 억제되었고, 특히 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 50% 이상 억제되었다(Fig. 1). IL-6은 IL-1과 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질²⁶으로서 류마티오이드 관절염의 염증반응에 주된 매개 작용으로 혈청 및 관절염의 손상된 관절의 관절액에서 활성도가 증가하며, 골관절염보다 높은 활성도를 보여 류마티오이드 관절염의 활성도와 연관성이 보고된 바가 있다²⁷. 또한 Katherine²⁸ 등은 IL-6이 활액막이나 관절 조직의 혈관에서 분비되어 혈청에서보다 관절액에서 더 높은 활성도를 보인다고 보고하였는데, 이 같은 보고는 IL-6가 류마티오이드 관절염에서 면역반응의 매개체로서 병리생리에 중요한 역할을 담당함을 재확인해 주는 결과이다. 본 실험에서 IL-6 유전자 발현은 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 유전자 발현을 50% 이상 억제하고, ELISA kit로 탐색한 정량 검사에서도 다른 사이토카인에 비해 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성있는 결과가 나타나, 본 시료가 IL-6에 매우 효과적으로 작용함을 알 수 있었다(Fig. 1). TNF- α 은 IL-1 β 와 마찬가지로 주로 대식세포에서 분비되고, 류마티오이드 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키며, 호중구, 림프구, 단핵구의 화학유주 및 섬유모세포증식 활막섬유모세포와 연골세포에 작용해서 PGE₂와 collagenase 생산을 촉진하는데²⁹, 본 실험에서 TNF- α 유전자 발현은 대조군에 비해 농도 의존적

로 유전자 발현을 억제하였으나 큰 차이가 나지 않았으며, 분비량의 정량 검사에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 유의성있는 결과가 나타나, IL-1 β 유전자 발현(Fig. 1) 및 분비량의 결과(Table 2)와 부합되었다. iNOS(inducible nitric oxide synthases)는 대식세포, 호중구, 섬유모세포, 비만세포, 혈관내피세포 및 혈관평활근세포 등의 arginine에서 INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF 등의 여러 염증성 cytokine에 의해서 발현하여 NO를 생성시키는 효소이다³⁰. 활동성 류마티스 관절염 환자에서 단핵세포는 NO 합성을 증가시키는데, 과다한 NO는 염증성 연골세포의 정상대사과정에 생성되는 활성산소 superoxide anion(O₂)와 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite(ONCC)를 생성함으로써 골흡수를 증진시키고 연골을 손상시킨다³¹. Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는 초기 단계에 작용하는 효소로서 거의 모든 세포에서 일정하게 발현되는 구성형(COX-1)과 cytokine(IFN- α , IL-1, TNF- α)에 의해 혈관내피세포, 대식세포, 섬유모세포와 신경원세포 등에서 발현이 유도되는 유도형(COX-2)이 있다. COX-1에 의해 합성이 되는 prostaglandin은 지혈과 위장관계 기능의 항상성을 유지하는 생리적 기능을 조절하며, COX-2에 의해 합성되는 대량의 prostaglandin은 염증반응, 통증 등의 병리적 과정을 매개한다³². 본 실험에서 iNOS와 COX-2 유전자 발현은 모두 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 2). 이 역시 IL-1 β , TNF- α 유전자 발현 결과와 부합되어, 본 시료가 IL-1 β , TNF- α 등의 cytokine 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 유전자 발현을 큰 폭으로 억제함을 추측할 수 있다. 아울러 iNOS와 COX-2가 cytokine에 의해 대식세포 혈관내피세포 및 연골세포 등에서 동시에 유도 혹은 억제되는 유사점이 밝혀지면서 이 둘 사이에 상호 교차 반응이 존재할 것으로 여겨지고 있다는 점에서 매우 유의성있는 결과로 여겨진다. 염증 질환과 관련 있는 전사인자 AP-1, NF- κ B, STATs는 직간접적으로 MAP kinase(MARK) 경로에 의해 조절되며, 이러한 인산화 정보 전달은 다양한 세포의 자극에 의해 활성화되고, 염증 질환에서 유전자 전사를 조절한다³³. NF- κ B는 Rel(c-Rel), Rel B, p65(NF- κ B1), p52(NF- κ B2)의 단백질이 dimer를 형성 구성한다³⁵. NF- κ B에 유도 증가된 cytokine은 관절에서 백혈구를 끌어들이는 혈관교차 분자의 발현과 세포의 기질을 쇠퇴시키고 파괴시키는 MMP를 증가시킨다³⁵. NF- κ B 유도인자로는 류마티스 관절염의 염증 반응에 의해 생성되는 TNF- α , IL-1 β , 활성세포종들이 있고, 표적 유전자로는 TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF 등의 cytokines, VCAM-1, ICAM-1 등의 adhesion molecules 및 다양한 acute phase response protein들이 있다. 즉 활성화된 NF- κ B에 의해 발현 유도된 물질들은 다시 NF- κ B의 활성을 유도하는 기전을 통해 NF- κ B의 기능을 더욱 극대화시킨다³⁵. c-Jun과 c-fos heterodimer로 이루어진 AP-1(activator protein 1)은 IL-1 β , IL-6, TNF- α , collagenase 등의 류마티스 관절염에 영향을 주는 많은 유전자 발현에 중요한 역할을 한다³⁶. c-fos 유전자의 과다한 발현은 림프구 침투 없이 관절 파괴를 이끈다. 또한 관절세포의 성장을 증가시키고 파골세포에서 골라겐 합성을 억

제하기도 하고 파골성 골흡수를 증가시키는 요소를 방출하는 파골세포를 자극한다^{35,36}. 본 실험에서 IL-6와 IL-1 β , TNF- α 유전자 발현을 유도하는 NF- κ B, AP-1를 관찰하고자, EMSA를 실시하여 autoradiography로 분석한 결과, human synovial 세포에 hrIL-1 β 와 hrTNF- α 을 처리한 대조군은 활성도가 증가되는 반면, STSD 병행 처리군에서는 전사인자인 NF- κ B, AP-1의 활성도가 농도 의존적으로 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 동물세포에서는 TNF- α , IL-1에 의해서 NF- κ B가 활성화되어진다는 점에서 이 역시 TNF- α , IL-1 β 유전자 발현 및 분비량의 결과와 일치하는 결과를 나타내었다. 면역 과정중 대식세포에서 생산되는 과도한 reactive oxygen species(ROS)는 주위 조직에 유리되어 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 여과성을 향진시키고 세포막의 파괴를 초래하여 세포독성을 유발시킨다^{37,38}. 특히 ROS는 NF- κ B, AP-1과 같은 전사인자의 활성화, PLA2, 세포사멸을 유도하는데^{37,38}, 본 실험에서 ROS 분비량은 대조군에 비하여 감소하여(Fig. 4) iNOS 유전자 발현 결과와 일치하였다.

이상을 결과를 통하여 계혈등에 의한 류마티오이드 관절염 환자의 synovial 세포에 대한 효과는 전사조절인자 NF- κ B, AP-1의 발현이 억제하여 IL-6, IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현이 억제되며, 또한 iNOS와 COX-2를 억제함으로써 ROS를 감소시킴으로써 류마티오이드 관절염에 유의한 것으로 나타나 항 후 다양한 처방의 가미를 통한 임상 활용이 기대된다.

결론

계혈등이 류마티오이드 관절염 환자에서 분리한 synovial 세포내의 면역반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자 발현을 대조군에 비하여 농도의존적으로 억제하였으며, IL-1 β , TNF- α 분비량을 10 μ g/ml 이상의 농도에서, IL-6 분비량을 1 μ g/ml 이상의 농도에서 유의성있게 억제하여 IL-6에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다. 또한 iNOS와 COX-2 유전자 발현과 ROS 분비량을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하고, 전사인자인 NF- κ B와 AP-1 활성도를 100 μ g/ml 농도에서 현저하게 억제함으로써 항 후 임상에서 활용이 기대된다.

참고문헌

1. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울대학교출판부. 100,114,117, 253,255,262,122-131,179-180, 266-269, 1997.
2. 巢元方. 諸病源候論. 인민위생출판사. 5-8, 1982.
3. 李 梴. 編註醫學入門. 대성문화사. 369-371,523, 1989.
4. 王 燾. 外臺秘要方. 대성문화사. 424, 1983.
5. 權宰植 외. 痔證. 鼎談. 207-208,214-215,219-222,270, 1993
6. 전국한의과대학재활의학교실. 동의재활의학과학. 서원당. 95-96, 1995.
7. 趙學敏. 本草綱目拾遺. 중국중의약출판사. 230-233, 1998.
8. 安德均. 原色 國本草圖鑑. 교학사. 670, 1999.

9. 이진훈. 계혈등의 抗炎活性效果. 강원대학교 대학원. 1999.
10. Su EY, Chen HS. Clinical observation on aplastic anemia treated by *Spatholobus suberectus* Composita, *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 17(4):213-5, 1997.
11. Wang W, Wang J, Zhao D, Liu H, Zhou W, Chen K. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dum, *Euonymus alatus* Sieb. and *Eupolyphaga sinensis* Walker on regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 16(5):299-301, 1991.
12. 오형숙. 계혈등 추출물이 생쥐의 조혈 및 면역작용에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2000.
13. Lam TL, Lam ML, Au TK, Wan DC. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and metanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci*. 67(23):2889-96, 2000.
14. 김호연. 류머티스관절염의 병인. 대한의학회지. 35(10): 1198, 1992.
15. Rene Cailliet. M. D. 무릎을 침해하는 여러 가지 관절염. 무릎의 동통과 기능장애. 대학서림. 125-48, 1991.
16. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학강의. 경북대학교출판부. 10,22,25,77,193,200,215,235, 248,357,211-212,232-5, 1996.
17. 대한병리학회. 병리학. 고문사. 85,1672,1166-1170, 1997.
18. 김세종. 면역학.고려의학. 18,134,206,148-150, 1994.
19. 해리슨 번역 편찬위원회. 해리슨 내과학. 도서출판정담. 179,1783,1779-1785, 1997.
20. 김동집, 박동준. 류머티스 관절염의 병인. 대한류마티스학회지. 1:1-12, 1994.
21. 김호연. 류머티스 관절염의 최근 경향. 대한내과학회지. 35(10):1213-1222, 1992.
22. 김동집. 류머티스 관절염의 면역학적 병인. 대한의학회지. 29(1):21-23, 1986.
23. Hom JT, Bendele AM, Carlson DG. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 141(3):834-41, 1988.
24. Nunermori EN, Ehsain N, Wang M, Lee S, McGuire J, Amento EP. Interleukin-1 and transforming growth factor factor- α : synergistic stimulation of metalloproteinase, PGE₂ and Proliferation in huamn fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 210:166-71, 1994.
25. Morita. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium. *Rheumatology International*. 20(2):49-54, 2001.
26. Jacqueline Uson, Alejiandro Balsa, Dorsa Pascual-Salcedo. Soluble IL-6 Receptor and IL-6 Levels in Serum and synovial fluid of patient with differant Arthropathies. *J. Rheumatol*. 24:2069-2075, 1997.
27. Simi T. Inhibition of IL-6, IL-10 Signaling and Stat

- Activation by Inflammatory and Stress Pathways. *J. Immunol.* 165:5227-5237, 2000.
28. Katherine L, Manson Terry L, Moore James M. Cytokine level in synovial fluid and serum of patient with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.*, 21:2359-2363, 1994.
 29. Dayer JM, Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant IL-1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *Journal of Clinical Investigation.* 77:645-648, 1986.
 30. 김명화. 나환자의 피부 병변에서 inducible Nitric Oxide Synthase와 Cyclooxygenase-2의 발현. *대한피부과학회지.* 39(2):176-82, 2001.
 31. 정성훈. 대장 직장암에서 inducible Nitric Oxide Synthase 및 p53 발현의 임상적 관련성. *대한외과학회지.* 62(1):64-7, 2002.
 32. Anguita J, Samanta S, Ananthanarayanan SK, Revilla B, Geba GP, Barthold SW, Fikrig E. Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 15;34(3):187-191, 2002.
 33. Kim HY, Rikihisa Y. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes and neutrophils in response to anaplasma phagocytophila. *Infect Immun.* 70(8):4132-4141, 2002.
 34. Ghosh S, May MJ. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today.* 19:80-88, 1998.
 35. Shunichi Shiozawa. Studies on the Contribution of c-fos/AP-1 to Arthritic Joint Destruction. *J. Clin. Invest.* 99:1210-6, 1997.
 36. Zuoning Han. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *Clin. Invest.* 108:73-81, 2001.
 37. 박수남. 피부노화와 활성산소. *서울산업대학교 논문집.* 50:330-4, 1999.
 38. 배윤수. Reactive Oxygen Species에 의한 세포신호전달. *Biochemistry New.* 19(4), 1999.