

大黃牧丹湯의 요산지표 개선효과와 관련 유전자 탐색

김중배 · 지규용 · 엄현섭*

동의대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of Daihwangmudan-tang on Urate Lowering and Detection of Relevant Genes

Joong Bae Kim, Gyoo Yong Chi, Hyun Sup Eom*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Dongeui University

In order to testify the urate lowering effects of Daihwangmudan-tang(DMT), ICR mice were injected monosodium urate into the abdominal cavity and then DMT was administered on 2 and 4 days after injection. Uric acid and triglyceride were measured as hematological indices of gout, and some genes related with this change were identified by ACP based GeneFishing PCR method and direct sequencing. From this experiment, DMT highly decreased the blood levels of uric acid and significantly suppressed and lowered the acute increment of triglyceride level. There were 11 differentially expressed genes(DEG) having relations with positive actions of DMT, and 4 major genes in the middle of DEGs were sequenced; Mfap 2, jagged 2, Hsd17b7, Dkk1-1. These genes were supposed that several mechanisms through interleukin 1 and T-cell anergy, LDL cholesterol metabolism, wnt pathway would be related with the anti-inflammation effect against gout.

Key words : Urate-lowering effect, DEG, Gene-detection, Daihwangmudan-tang(DMT)

서론

통풍(gout)은 異種의 기원을 갖는(heterogeneous) 질병군을 대표하는 용어로 혈청요산농도의 증가, 활액의 백혈구에 MSU결정이 나타나는 재발성 급성 관절염, 사지관절의 심한 변형과 跛行(crippling)을 초래하는 MSU결정의 관절내 혹은 주위 축적, 간질조직과 혈관을 포함하는 신장병변, 요산성 腎石 등이 이환과정에서 단일하게 혹은 결합하여 발현된다¹⁾.

미국에서 백인남자의 누적집계 통풍 발생률(incidence)은 8.6%이고 이노제를 사용하지 않은 원발성 통풍은 5.9%라고 하며²⁾, 1977년에서 78년 사이 원발성 통풍의 연간발생률은 100,000명당 20.2명이던 것이 1995년에서 1996년 사이에는 45.9명으로 증가하였다³⁾. 그런데 이는 10년 사이에 배로 증가한 것이며 류머티스성 관절염 환자수에 비해서도 2배가 넘는 수치이다.

Wallace가 보고한 각 연령대별 통풍환자의 유병률(prevalence)⁴⁾을 보면 45-64세는 1000명당 12명이고 65-74세는 30

명, 75세 이상은 40명(1999년 기준) 정도로 연령이 증가함에 따라 통풍도 현저히 증가함을 알 수 있다. Bieber⁵⁾는 이처럼 통풍의 숫자가 늘어나는 이유에 대해 수명의 증가와 고혈압, 비만, 대사증후군 등을 들고 있는데 이는 고령화 사회로의 이행이 빠르게 진행되고 있는 우리나라에도 똑같이 적용된다⁶⁾.

한편 통풍은 95% 정도가 성인 남자에게 이환되는 것으로 알려져 있으며 여자는 5% 정도에 불과하고 사춘기 이전의 아동에게서도 거의 드물다¹⁾. 그렇지만 통풍성 관절염은 약 85-90%가 엄지발가락, 발목, 무릎 등의 관절국소에 급성염증과 건드릴 수 없을 만큼의 심한 통증을 일으키며 만성적으로 경과하면 여러 장기조직을 침범하기 때문에 환자의 고통을 증가시킨다.

또한 허⁷⁾의 보고와 같이 신장의 대사기능이 저하된 환자는 약물치료나 음주, 백혈병, 당뇨, 이노제와 salicylate 등의 유발요인이 생기면 급성적인 통풍발작이 일어나기 쉽다. 그런데 大黃牧丹湯은 이러한 급성으로 유발된 통풍환자에 대한 임상치료에서 유의할만한 효과를 보였기에 이를 실험적으로 확인하고자 하였다.

한의학에서 痛風에 관한 실험적 연구는 80년대부터 monosodium urate를 백서의 足趾⁸⁾에 투여하여 급성 통풍성 관절염을 일으키고 약물을 투여하여 실험한 연구가 있고, 족지⁹⁻¹¹⁾

* 교신저자 : 엄현섭, 부산시 부산진구 양정2동 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : hseom@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8644

· 접수 : 2005/11/30 · 수정 : 2005/12/05 · 채택 : 2005/12/14

혹은 복강¹²⁾에 MSU를 투여하고 藥鍼을 자극하여 치료효과를 확인한 연구가 있었으나 처방을 활용한 연구는 아직 드문 실정이다. 또한 국내에서 통풍에 대한 연구는 주로 임상외과학적인 증례 보고^{13,14)} 형식이나 증설논문^{15,16)}으로 이루어지며 동물실험연구는 드문 실정이다.

이제 저자는 마우스에 MSU를 복강주사하여 통풍모델을 만들고, <金匱要略> 이후 임상에서 腸癰에 빈용되었던 大黃牧丹湯을 투여하여 혈중요산의 변화를 관찰한 다음 이 처방에 의해 나타나는 유전자 발현의 변화를 탐색하여 유의할만한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 4주된 ICR 수컷 마우스이며 샘타코(주)에서 구입하였다. 고형사료와 물은 제한없이 공급하면서 12시간 낮, 12시간 밤의 생활리듬을 주었으며 항온항습 상태에서 2주간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 마우스 9마리를 1군으로 하여 통풍을 유발시키지 않은 정상군(Normal)과 통풍을 유발시킨 대조군(Control, 2일군 C2, 4일군 C4), 통풍을 유발시킨 후 대황묵단탕을 투여한 실험군(Sample, 2일투여군 S2, 4일투여군 S4)으로 각각 배정하여 실험을 실시하였다.

2) 약물

실험에 사용된 대황묵단탕은 시중의 대황당건재약품에서 한약표준품 500g을 아래와 같은 비율로 구입하여 정제한 다음 粗末하여 圓底 flask에 넣고 증류수 4,000ml를 가하여 3시간 가열하고 추출하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 후 freeze dryer로 동결 및 건조하여 분말 61g을 얻었다. 大黃牧丹湯의 처방구성은 다음과 같다.

Table 1. Ingredients and each doses of Daihuangmudan-tang(DMT)

韓藥名	學名	用量
大黃	<i>Rheum palmatum L.</i>	160
牧丹	<i>Paeonia suffruticosa</i>	120
桃仁	<i>Prunus persica</i>	80
瓜子	<i>Benincasa hispida</i>	80
芒硝	<i>Mirabilite</i>	60

2. 실험 방법

1) 통풍 유발

통풍은 MonoSodium Urate(MSU)로 유발시켰는데, MSU의 조제는 1 Normal NaOH 49ml를 포함한 1,600ml의 끓는 물에 8g의 uric acid를 녹인 후 HCl을 가하여 pH를 7.2로 맞추고 용액을 저으면서 상온으로 식힌 다음 5℃에서 하루 밤을 보관하였다. MSU 생성여부를 현미경으로 확인한 후 saline과 혼합하여 20%

MSU 용액을 만들어 1ml/100g용량으로 1일 1회, 3일 연속 복강 투여하였다. Control group은 2일간 혹은 4일간 정상식사와 함께 생리시염수만 공급하였다.

2) 약물 투여

大黃牧丹湯 냉동건조분말을 증류수에 용해(60mg/100g)한 검액을 1일 투여량으로 해서 각각 2일과 4일씩 경구투여하였다.

3) 채혈

채혈은 최종 약물투여 후 24시간을 경과한 후에 마취(Ketamin : Lumpun=1 : 1)하고 심장천자에 의해 개체 당 약 1ml씩 채혈하여 혈액분석 샘플로 사용하였다.

4) Uric acid와 TG 측정

실험이 끝난 후 실험동물의 심장을 천자하여 채혈하고 이를 원심분리(2500rpm, 15분)하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청(200μl)을 가지고 MIRA로 요산과 triglyceride 수치를 측정하였다.

5) RNA 추출 및 gene의 동정

채혈 후 각 군별로 2마리씩 마우스의 우측 발목관절을 중심으로 길이 1.5cm를 절단하여 유전자 분석용 sample을 제조하고(주)씨젠 생명과학연구소에 검사를 의뢰하였다. 이 샘플로부터 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 유용한 DEG를 얻었으며 연구소에서 사용한 방법은 다음과 같다.

① First-strand cDNA Synthesis¹⁷⁾

Total RNAs extracted from samples were used for the synthesis of first-strand cDNAs by reverse transcriptase. Reverse transcription was performed for 1.5 h at 42°C in a final reaction volume of 20 μl containing 3 μg of the purified total RNA, 4 μl of 5 reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 μl of dNTPs (each 2 mM), 2 μl of 10 μM dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3'), 0.5 μl of RNasin RNase Inhibitor (40 U/ μl Promega), and 1 μl of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ μl Promega). First-strand cDNAs were diluted by the addition of 80 μl of ultra-purified water for the GeneFishingTM PCR and stored at -20°C until use.

② ACP-based GeneFishingTM PCR¹⁸⁾

Differentially expressed genes were screened by ACP-based PCR method (Kim et al., 2004) using the GeneFishingTM DEG kits (Seegene, Seoul, South Korea). Briefly, second-strand cDNA synthesis was conducted at 50°C during one cycle of first-stage PCR in a final reaction volume of 20 μl containing 3-5 μl (about 50 ng) of diluted first-strand cDNA, 1 μl of dT-ACP2 (10 μM), 1 μl of 10 μM arbitrary ACP, and 10 μl of 2 Master Mix (Seegene). The PCR protocol for second-strand synthesis was one cycle at 94°C for 1 min, followed by 50°C for 3 min, and 72°C for 1 min. After second-strand DNA synthesis was completed, the second-stage PCR amplification protocol was 40 cycles of 94°C for 40 s, followed by 65°C for 40 s, 72°C for 40 s,

followed by a 5 min final extension at 72°C. The amplified PCR products were separated in 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

③ Direct Sequencing^{19,20)}

The differentially expressed bands were re-amplified and extracted from the gel by using the GENCLEAN II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA), and directly sequenced with ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

6) 통계방법

통계는 각 군별로 t-test를 실시하였는데 대조군은 정상군과, 실험군 2·4일군은 각각 대조군2·4일군과 비교하였다. 그러나 uric acid 수치가 대조군에서 비정상적으로 낮게 나온 두 개체는 통계과정에서 제외하였으며 그에 따라 통계검정시 다른 군의 개체수도 그에 맞추어 조정하였다.

실험성적

1. DMT가 MSU에 의해 유발된 통풍의 요산변화에 미치는 영향
ICR 생쥐의 복강에 MSU를 투여한 후 2일째와 4일째 되는 날 혈액을 채취하여 요산의 수준을 측정 한 결과는 다음과 같았다.



Fig. 1. Effects of DMT on the changes of uric acid level. N: normal mice, C2: control group mice after 2 days of injection, C4: control group mice after 4 days of injection, S2 and S4: sample group mice after 2 and 4 days of injection and administration. Hyperuricemia was induced by intraperitoneal injection of monosodium hydrate(a dose of 1 ml/100g, once per day for 3 days consecutively. ### : p<0.001 compared with normal group. *** : p<0.001, ** p<0.01 : compared with C2 and C4 group

2. DMT가 MSU에 의해 유발된 통풍의 Triglyceride 변화에 미치는 영향

ICR 생쥐의 복강에 MSU를 투여한 후 2일째와 4일째 되는 날 혈액을 채취하여 Triglyceride의 수준을 측정 한 결과는 다음과 같았다.

3. 대항목단당의 약리작용과 관련된 유전자의 무작위 탐색

GeneFishing기법을 이용하여 pre-screening을 2사람의 연구원이 반복 실험한 결과 여기서 총 11개의 DEG(differentially expressed gene)가 발굴되었으며 그 결과는 다음과 같다. 이 중에서 변화가 두드러진 3번과 7번, 10번, 11번의 DEG를 선택하여 RT-PCR을 통하여 DMT의 약리작용과 관련된 유전자를 동정하였다.

Changes of the triglyceride level after induction of gout

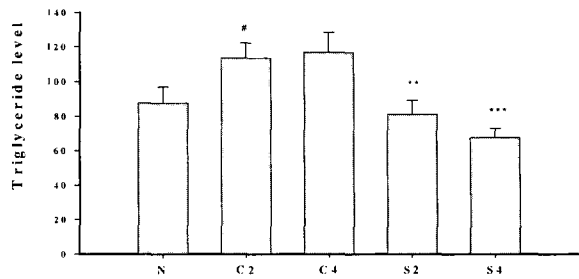


Fig. 2. Effects of DMT on the changes of triglyceride level. Hyperuricemia was induced by intraperitoneal injection of monosodium hydrate(a dose of 1 ml/100g, once per day for 3 days consecutively. # : p<0.05 compared with normal group. ** : p<0.01 compared with C2 group, *** : p<0.001 compared with C4 group

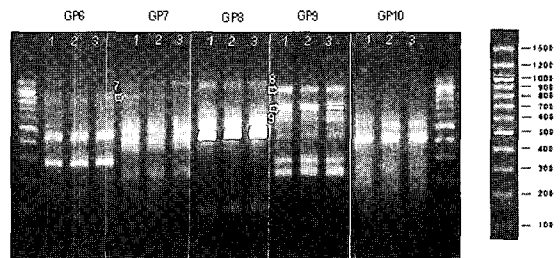
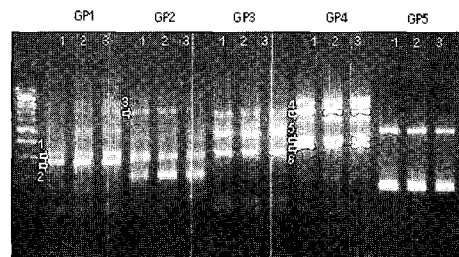


Fig. 3. Manifestation of genes showing difference in expression between control and sample group.(continuing)

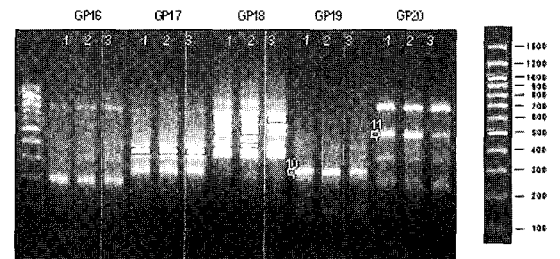
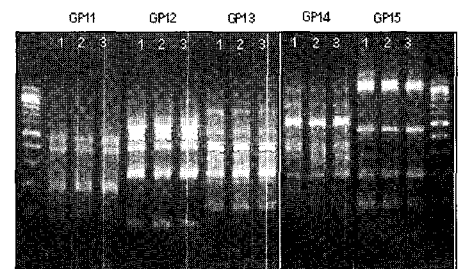


Fig. 4. Manifestation of genes showing difference in expression between control and sample group

4. 유전자의 동정과 관련기능 검색

Sequencing을 통하여 획득한 염기서열을 가지고 blast searching한 결과 다음과 같은 유전자들이 동정되었다.

Table 2. Results of gene sequencing and blast search

DEG No.	Sequence homology search
DEG3	· >gi 31982203 ref NM_008546.2 __ Mus musculus microfibrillar-associated protein 2(Mfaps), mRNA Length=1073 Score = 1211bits(611), Expect = 0.0 Identities = 614/615(99%), Gaps=0/615(0%) Strand=Plus/Plus
DEG7	· >gi 21410389 gb BC031134.1 __ Mus musculus jagged 2, mRNA(cDNA clone IMAGE 4954982), partial CDs Length = 1238 Score = 860 bits (434), Expect = 0.0 Identities = 449/453(99%), Gaps = 1/453(0%)
DEG10	· >gi 31542966 ref NM_010476.2 __ Mus musculus hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7(Hsd17b7), mRNA Length = 4528 Score = 317bits(160), Expect = 5e-84 Identities = 160/160(100%), Gaps = 0/160(0%) Stand = Plus/Plus
DEG11	· >gi 31980690 ref NM_015789.2 __ Mus musculus dickkopf-like 1(Dkk1), mRNA Length = 906 Score = 785 bits (396), Expect = 0.0 Identities = 417/420(99%), Gaps = 3/420(0%) Stand = Plus/Plus

고찰

尿酸의 기원은 기본적으로 핵산의 구성물인 purine이기 때문에 세포핵이 파괴되는 질환이나 유인이 있으면 통풍도 증가하게 되는데 임상적으로 음식물에 포함된 퓨린의 과섭취에서 오는 통풍보다 비율이 높다. 또한 혈중 요산의 증가는 요산의 과도한 생성과 정상세포의 신진대사과정 및 정상적인 노화과정에서도 나타난다. 그러므로 신장에서 배설되는 대사과정에 장애가 생기는 것도 중요한 원인이나 실제로는 이들이 복합되어 생기기도 하므로 기본적으로 대사질환이라 한다. 따라서 요산의 생산과 몸 밖으로의 배출이 균형을 이루도록 하는 것이 중요하다. 현재 痛風에 관한 병리기전은 이미 소상히 밝혀져 있으나 적절한 치료 약은 아직 개발되어 있지 않아서 임상적으로 효과적인 치료제가 요구되고 있다.

한편 중성 지방은 콜레스테롤과 함께 동맥경화와 당뇨병, 비만증 등과 함께 고요산혈증의 중요한 원인이 되는 물질이다. 중성지방은 소장에서 흡수되어 리포단백과 결합하여 혈액으로 유입되며, 혈액 중에서 에너지원의 운반이나 저장, 장이나 조직을 유지하는 중요한 역할을 하지만, 사용되지 않고 남으면 피하 등에 축적되며 비만이나 동맥변성 등 성인병 형성의 주범이 된다. 특히 한국인은 심근경색 환자에서 콜레스테롤 농도보다 오히려 중성지방이 고농도를 보이는 경우가 많은데 이처럼 중성지방 농도를 측정하는 것이 통풍과 같은 대사성질환에도 중요한 지표가 된다.

중성지방의 수치는 식후 30분경부터 증가하기 시작하여 4~6시간 후에 최고에 달하므로 검사는 보통 조조 공복시에 시행한다. 신생아에선 40 ~70 mg/dL정도가 정상이다가 성인이 되면서 점차 약간씩 늘어나 50 ~150 mg/dL정도가 정상범위가 된다.

다. 그리고 남성의 평균치는 115mg/dL로 여성의 100mg/dL보다 높으며 남성에서는 40대, 여성에서는 60대에 가장 높게 나타난다. 또한 중성지방의 농도는 대사가 활발한 여름에 낮고, 겨울철에 높은 것으로 알려져 있으며 식사종류라든가 성별, 연령대에 따라서도 변동되고 알코올이나 경구피임약, 스테로이드제의 복용으로도 중성지방 농도가 증가하기 때문에 오진을 줄이기 위해서는 여러 번 측정할 필요가 있다. 이 때문에 본 실험에서도 반복측정할 필요가 있으나 채취가능한 혈청량이 작아 불가능하므로 군당 개체수를 9마리로 하였다. 특히 중성지방이 높은 것은 비만과 운동부족이 원인이라는 사실, 또 지방이나 탄수화물 등이 많은 고칼로리식을 먹으면 중성지방이 증가하고 酒家도 고농도를 보인다는 사실로부터 통풍형성과 직접적인 관련이 있음을 알 수 있다. 그렇지만 痛風性 관절염의 근본적인 기전은 신장을 통해 배설되어야 할 요산이 관절주위 결합조직에 축적되는 것이므로 신기능저하와 발열 및 격심한 동통이 수반되는 급성 염증의 재발이다. 이러한 이유에서 통풍의 치료를 위한 기본적인 방제이론이 유도된다.

신의 배설기능을 촉진하여 소변을 통해 배설하여야 하므로 利尿機轉이 관여하며, 핵산대사노폐물이 조직내에 축적되어 痲熱을 일으키므로 血液과 응체된 복합체를 제거하는 것이 기본 원칙이다. 이러한 목적에서 <金匱要略>에서 腸癰에 사용된 大黃牧丹湯은 통풍의 적절한 치료처방으로 활용될 수 있다.

仲景은 “腸癰者 少腹腫痞 按之即痛如淋 小便自調 時時發熱 自汗出 復惡寒 其脈遲緊者 癰未成 可下之 當有血 脈洪數者 膿已成 不可下也 大黃牧丹湯主之”라 설명하고 大黃牧丹湯을 창방하였으며 구성 내용은 大黃四兩 牡丹一兩 桃仁五十介 瓜子半升 芒硝三合이다. 大黃은 寒無毒하고 味苦하여 瀉熱通腸 涼血解毒 逐瘀通經하는 효능이 있어서 實熱便秘와 腸癰腹痛 및 瘡腫을 치료한다 하였고²¹⁾, 牡丹은 미가 苦辛하고 성이 寒하여 血分에 들어가 苦寒은 血熱을 清熱하고, 辛은 瘀血을 行血케 하여 涼血散瘀하는 효능이 있어 瘀血을 留하지 않게 하며, 活血하여도 妄行하지 않게 하는 특점을 가지고 있고, 氣가 清芳하여 陰分의 伏熱을 清透케 하므로 熱邪가 들어가 나타나는 吐衄, 斑疹, 또는 夜熱早涼 및 血熱로 인한 瘀血停滯 등을 치료한다. 桃仁의 味는 苦甘하고 性은 平하며 質潤하여 肝經血分에 들어가 破瘀行血에 상응하는 약물이 되며, 紅花와 同용하여 치료효과를 증가시킨다. 그러므로 모든 瘀血阻滯와 積血, 宿血堅痛으로 인한 證은 桃仁으로 치료하며 또한 腸癰이나 肺癰에 적용하면 活血消癰의 효과가 있다. 瓜子는 甘微寒하여 利尿消腫하는 작용이 있어서 水腫脹滿과 小便短赤不利에 사용되며, 芒硝는 寒하고 鹹苦하여 胃와 大腸經으로 귀경하며 瀉熱通便 潤燥軟堅 清火消腫하는 작용이 있다. 따라서 腸胃의 實熱을 瀉滌하여 燥屎를 除하므로 實熱積滯와 大便燥結을 치료하며 大黃과 相須하여 瀉熱通便의 효과를 증강시킨다^{22,23)}.

의사학적으로 虞搏²⁴⁾, 李東垣²⁵⁾, 龔廷賢²⁶⁾ 등은 飲酒와 食肉 厚味와 性急, 作勞, 酒色醉臥 등의 음식섭취와 섭생의 실조에서 원인을 찾았는데, 이는 현대의학에서 gout의 발병이론과 매우 일치한다. 이런 점들로 볼 때 血熱과 瘀滯를 제거하기 위한 大黃목 단탕은 통풍치료에 적합할 것으로 예측된다. 또한 김²⁷⁾은 이 외

에도 역대 의가들이 제기했던 寒氣勝이나 勞力の 원인도 gout의 발병과 일정한 관련이 있으며, 한의학적으로 痛風은 痛痺의 범주에서 속하고 白虎歷節風과 동의어로 볼 수 있다고 총괄하였다.

서양의학에서의 통풍치료제로는 colchicine이나²⁸⁾ urate lowering drug인 allopurinol(xanthine oxidase inhibitor)²⁹⁾, 그리고 COX-2(cyclo-oxygenase 2)에 대한 선택적 억제제인 etoricoxib, 혹은 NSAID(Non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs) 계열인 indometacin 등을 사용하는데³⁰⁾, 이들은 각기 작용기전에 따른 부작용들을 갖고 있다. 그러므로 보다 효과적이면서도 효능이 좋은 치료제가 요구되는 상황이다.

본 실험에서 대황목단탕은 대조군에서 유의하게 증가되었던 요산과 중성지방을 고도로 유의성있게 감소시킴으로써 급성 단계의 고요산혈증에 대하여 초기단계부터 억제효능을 발현함을 알 수 있었다. 요산과 중성지방은 통풍성 관절염의 진단과 관련하여 매우 중요한 지표이다. 군별 결과를 비교해 보면 요산에 대한 실험결과인 Fig. 1에서 대조군 C2와 C4는 정상군 N에 비하여 $p < 0.001$ 로 고도의 유의성이 인정되었는데 이는 혈액학적으로 통풍이 형성되었음을 의미한다. C2와 실험군 S2를 비교해보면 $p < 0.001$ 로 역시 고도의 유의성이 인정되었고 C4와 S4를 비교해보아도 $p < 0.01$ 로 역시 현저한 유의성이 인정되었다. 이는 본 대황목단탕이 혈중 요산수치의 강하에 매우 신속한 효과를 나타냄을 시사한다. 그렇지만 S2와 S4를 비교해 보면 유의할 만한 변화가 나타나지 않는데, 이는 대황목단탕의 효과가 신속히 발현되며 투여가 계속됨에 따라 약효도 지속됨을 의미한다. 중성지방에서도 역시 각 군별 비교를 볼 때 $p < 0.01$ 로 정상군에 비해 대조군의 TG가 증가하였고 실험군에서 대조군에 비해 유의할 만한 수치의 감소가 나타나 지질대사 방면에도 대황목단탕이 개선시키는 효과가 있음을 확인하였다.

이어서 조직학적으로 통풍병변의 침상결절을 확인하여야 하지만 결절이 형성되기까지의 소요기간이 길어서 급성단계의 회복과정에서의 변화를 확인하고자 하는 본 실험목적과는 맞지 않으므로 급성적인 MSU독성과 회복과정에 관여하는 유전자를 검색하였다. 그 결과 결합조직의 microfibril과 synovial fibroblast의 염증에 관여하는 것임을 알 수 있었다. 먼저 DEG3에서 발굴된 Mfap2는 Magp, MAGP, Magp1, MAGP-1, MFAP-2, Microfibril-associated glycoprotein, microfibrillar-associated protein 2 등의 異名으로서³¹⁾(gene symbol MFAP2) 결합조직 미세섬유(microfibril)의 구성분이며 선천성 결합조직질환(Marfan's disease)의 원인인자의 한 후보이다³²⁾. 또한 structural integrity에 중요한 integral microfibril molecule의 best candidate이며 모든 조직의 microfibril에 관련되고 전 발생기를 통하여 간질조직과 결합조직세포에 광범하게 발현된다³³⁾고 하였다.

그런데 통풍환자들은 MSU가 거의 대부분 결합조직에 축적된다는 사실과 결정(crystal)이 cartilage, synovia, tendon sheaths, skin의 피하층, kidney의 interstitial area 등에 축적된다는 것들은 초기 연구시부터 이미 밝혀진 바 있다^{34,35)}. 또한 그 이전에 관해서 Giovine 등은 결정(tophi)이 cytokine-inducible material인 fibrous tissue에 의해 둘러싸인 IL-1 inducer(urate

crystal)와 인접해 있는 IL-1 producing cell(mononuclear phagocyte)을 포함하고 있다고 하였는데³⁶⁾ 이러한 염증과정을 통해서 섬유화와 拘縮이 진행되는 것으로 보인다. Mfap2(MAGP-2)는 바로 이 섬유화 과정에서 과발현되는 것으로 추측된다³⁷⁾. Fig. 3에서 control 군과 2일째에는 비슷한 정도의 발현을 보이다가 4일째 군에서 사라진 것을 확인할 수 있는데, 이는 DMT가 섬유화를 형성하는 microfibril-associated glycoprotein을 억제하는데 기여하는 것으로 해석된다.

다음으로 DEG 7에서 발굴된 cDNA는 jagged 2유전자인데, 이는 mouse 발생과정에서 다리의 결손이라든가 두면부 및 흉선의 결손을 가져오고³⁸⁾, cochlea에 있는 sensory hair cell의 수가 늘어난다거나 습指症, 꼬리의 굽슬 등³⁹⁾을 가져오는 것으로 알려졌다. 그렇지만 jagged 유전자는 notch 유전자와 함께 T-cell 분화기전에 관련되며, 따라서 아마도 T-cell의 면억복응(T-cell anergy)에도 개입될 것이다(might be involved). 왜냐 하면 류머티스 관절염(RA)에서 T cell은 IL-2 생산의 결핍이라든가 세포주기에서 G1 stage의 정체, anergic-type Ca^{2+} 의 fluxes와 같은 anergy의 특징도 보이지만 그래도 여전히 기능을 매개하고 있으므로 완전히 anergy라고는 말할 수 없기 때문이다. 이러한 pseudo-anergy는 T cell과 fibroblast-like synoviocytes의 direct cell-cell contact에 의해 유도되는데⁴⁰⁾, 결국 jagged 유전자는 관절염의 형성에도 관여하는 것임을 알 수 있다. 이는 TNF에 의한 류머티스 염증에서의 synovial fibroblast와 정상 synovial fibroblast모형을 가지고 real time RT-PCR을 통한 비교실험 결과에서도 확인된다. Ando⁴¹⁾등에 의하면 TNF는 RA synovial tissue의 rheumatoid synovial fibroblast에서 Notch-1, Notch-4, Jagged-2 등의 발현을 유도하였다.

그런데 Fig. 2의 GP7에서 control 그룹에 나타났던 것이 S2에서 거의 사라지고 S4에서 완전히 사라졌는데 이는 Gfap2의 변화와 상응하는 결과로써 관절염증의 개선에 기여한 것으로 추정된다. 다음으로 Hsd17b7은 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene을 말하는데, Entrez gene homepage⁴²⁾를 통해 검색해 보면 cholesterol과 lipid 및 steroid 생합성 등의 대사과정에 관여하고, estrone을 생물학적으로 보다 활성이 큰 estradiol로 전환시키는데 관여한다⁴³⁾. 그런데 요산은 본래 활성산소종(reactive oxygen species)을 제거하는 강력한 scavenger이지만 죽상동맥경화(atherosclerosis)를 만드는데 기여하며 특히 죽상경화성 심장병은 통풍환자에게 많이 발생하는 것으로 알려져 있다⁴⁴⁾. 비록 이에 관한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않지만 HDL-cholesterol의 감소⁴⁵⁾와 내장 지방(visceral fat)의 증가⁴⁶⁾ 및 혈청 지단백의 증가⁴⁷⁾와 혈청의 oxidized LDL 농도상승⁴⁸⁾ 등이 관련되어 있음이 보고되었다.

또한 Paimela는 적혈구 침강률(ESR)과 C-reactive protein(CRP)이 증가한 것에 근거하여 oxidized LDL antibody level과 염증(inflammation)간에 상호관계가 있다고 보고⁴⁹⁾하였는데, 이상의 보고들을 종합하면 Hsd17b7은 지질대사에 관여하는 경로를 통하여 죽상경화의 형성 및 염증과정에 영향을 미치고, 이로써 통풍의 발생과 치료과정에 발현된 것임을 알 수 있다. Fig. 2에서 Hsd17b7은 현저한 변화가 보이지는 않았으나 치료군

에서 점차 감소하는 모습을 보이고 있다. 이는 DMT가 지질대사 개선과 염증상태의 진전에 긍정적인 작용을 하였음을 의미한다. 다음으로 Dkk1은 Dickkopf gene family에 속한 Dickkopf-like 1 유전자인데 마우스의 배아에서는 신경조직에 보이지만 성체에서는 정소(testis; 발생과정에 있는 spermatocyte와 spermatid의 acrosome 및 성숙한 정자의 acrosome)에 존재하여 acrosome assembly에 관여하는 것으로 추정된다⁵⁰.

따라서 현재까지 밝혀진 Dkk1 정보로는 본 통풍모델 실험과 직접적인 관계가 없이 우연하게 발현된 것으로 생각된다. 그렇지만 수많은 조직발생과정에 관여하는 potent morphogen인 Wnt gene family⁵¹는 Wnt/ β catenin signalling 과정에서 LDL-receptor-related protein 6(LRP6)가 co-receptor로써 요구되는데⁵², DKK family gene은 WNT가 LRP와 binding하는 것을 길항하여 WNT/ β -catenin signaling pathway의 negative feedback mechanism에 관여하는 것으로 알려졌다⁵³. 또한 RA synovial tissues의 Reverse transcriptase-PCR 분석에서 5종의 wnt군(wnt1, 5a, 10b, 11, and 13)과 3종의 fz군(fz2, 5, 7) isoform들이 발현되었는데 이는 osteoarthritis의 synovial tissue에서 wnt5a와 fz5가 현저히 적게 발현된 점과 비교되고, RA fibroblast-like synoviocyte에서는 정상인의 normal synovial fibroblast와 비교할 때 IL-6, IL-8, IL-15가 매우 높게 발현되었다⁵⁴. 이러한 사실로부터 wnt family는 synovial fibroblast의 inflammation이 있을 때 과발현되고 Dkk gene은 이를 억제하여 염증회복에 기여하게 되는 일련의 과정을 유추할 수 있다.

이상의 실험결과와 고찰을 바탕으로 대황목단탕은 MSU로 유발된 ICR mouse의 통풍모델에 대하여 요산과 중성지방을 낮춤으로써 유의한 치료작용을 하였으며, gene sequencing에 의한 DEG의 Blast searching 결과로부터 그 기전으로서 synovial fibroblast의 염증이 진행되는 과정에서 microfibril의 섬유화와 수축을 저해하는 것으로 해석할 수 있었다.

결 론

MSU로 유발된 ICR 마우스의 통풍성 관절염 모델에 대하여 대황목단탕을 투여한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

대황목단탕은 혈중요산의 수준을 고도로 유의성있게 감소시켰다. 대황목단탕은 MSU에 의해 증가된 중성지방의 급성적인 상승을 고도로 유의성있게 감하시켰다. 대황목단탕의 약리작용에 관여하는 DEG는 약 11종류가 있었으며 유전자 검색결과 결합조직섬유의 염증기전에 관련된 것이 가장 주요함을 알 수 있었다. 유의한 변화가 발현된 유전자로는 Mfap 2, jagged 2, Hsd17b7, Dkk1 등이 동정되었다. 이 유전자들은 interleukin-1과 T-cell anergy, LDL cholesterol metabolism, wnt pathway 등을 통하여 염증과정에 관여할 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Wilson et al, Harrison's principles of internal medicine, Int.

ed., Vol 2, McGraw Hill, pp 1834-1835, 1992.

2. Roubenoff et al, JAMA 256:3004-3007, 1991.

3. Arromdee et al, J. of Rheumatol., 29(11):2403-2406, 2002.

4. Wallace et al, J. Rheum., 31(8):1582-1587, 2004.

5. Bieber et al, Arthritis Rheum., 50(8):2400-2414, 2004.

6. <http://www.medscape.com/viewprogram/3689>

7. 허기훈외8명, 신기능저하환자에서 pyrazinamide 복용으로 유발된 급성 통풍성 관절염, 대한신장학회지, 22(5):586-589, 2003.

8. 김태희, 두호경, 人蔘敗毒散이 Microcrystalline Sodium Urate로誘發된 흰쥐의 痛風에 미치는 影響 경희의학 5(1), 1989.

9. 朴文鉉·朴東錫, 桑枝水鉞이 痛風誘發 흰쥐의 病理的 所見 및 血漿 β -endorphin 含量에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 석사학위논문.

10. 金善赫, 李俊茂, 紅花油藥鉞이 Microcrystalline Sodium Urate로 유발된 흰쥐의 痛風에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌 15(1):483-491, 1998.

11. 張賢碩, 韓相源, 崔鐘百, 威靈仙水鉞이 痛風誘發 흰쥐의 病理的 所見에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):485-498, 1994.

12. 權度希, 崔道永, 木通藥鉞刺戟이 痛風誘發 흰쥐에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌 14(2):173-189, 1997.

13. 박태수 외 5인, 관절염을 이용한 만성 통풍성 관절염의 치료, 대한정형외과학회지 33(1):202-206, 1998.

14. 차훈석 외 6인, 만성 결절성 통풍 환자에서 발생한 칸디다 관절염 1 예, 대한내과학회지 54(1):105-108, 1998.

15. 趙秀李, 李仁善, 痛風의 東西醫學的 比較 考察, 東醫物理療法科學會誌 4(1):223-234, 1994.

16. 백한주 외5인, 통풍성 관절염의 임상 양상에 관한 연구, 대한내과학회지 52(6):727-736, 1997.

17. I.T., Hwang, Y.J., Kim, S.H., Kim, C.I., Kwak, Y.Y., Gu, and J.Y., Chun. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. BioTechniques 35:1180-1184, 2003.

18. Pohjanvirta, R. Comparison of several hot-start Tag DNA polymerases for detection of differentially expressed genes by GeneFishing. Biochemica 2:17-18, 2004.

19. K.C., Hwang, X.S., Cui, S.P., Park, M.R., Shin, S.Y., Park, E.Y., Kim, and N.H., Kim. Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system. Mol. Reprod. Dev. 69:43-51, 2004.

20. Y.J., Kim, C.I., Kwak, Y.Y., Gu, I.T., Hwang, and J.Y., Chun. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. BioTechniques 36:424-426, 428, 430, 2004.

21. 전국한의과대학 본초학교수 공편저, 本草學, 영림사, p 243, 1998.

22. 이상인, 본초학, 수서원, 서울, p 288, 304, 1982.

23. 黃宮繡, 本草求真, 宏業書局, 臺北, 民國70년.

24. 虞搏, 醫學正傳, 인민위생출판사, 북경, pp 212-213, 1986.

25. 李東垣, 東垣十種醫書, 대성문화사, 서울, pp 480-481, 1983.

26. 龔廷賢, 萬病回春, 人民衛生出版社, pp 308-311, 1993.
27. 김동욱, 김갑성, 서양의학의 Gout와 韓醫學의 痛風의 比較考察, 대한침구학회지 17(4):100-112, 2000.
28. Spilberg, D. Mechanism of Action of Colchicine in Acute Urate Crystal-Induced Arthritis. *J Clin Invest.* Sep; 64(3):775-780, 1979.
29. Gutiérrez-Macías A, Lizarralde-Palacios E, Martínez-Odrizola P, Miguel-De la Villa F. Fatal allopurinol hypersensitivity syndrome after treatment of asymptomatic hyperuricaemia. *BMJ.*
30. Schumacher, H.R. Jr, Boice, J.A., Daikh, D.I., Mukhopadhyay, S., Malmstrom, K., Ng, J., Tate, G.A., Molina, J. Randomised double blind trial of etoricoxib and indometacin in treatment of acute gouty arthritis. *BMJ.* Jun 22; 324(7352): 1488-1492, 2002.
31. Hoffmann, R., Valencia, A. A gene network for navigating the literature. *Nature Genetics* 36:664, 2004.
32. Faraco, J., Bashir, M, Rosenbloom, J, Francke, U, Characterization of the human gene for microfibril-associated glycoprotein (MFAP2), assignment to chromosome 1p36.1-p35, and linkage to DIS170. *Genomics* 25(3):630-637, 1995.
33. Cay, M., Kielty1, Michael, J., Sherratt, and C. Adrian, Shuttleworth, Commentary: Elastic fibres, *Journal of Cell Science* 115:2817-2828, 2002.
34. Warren, A. Katz and Maxwell Schubert, The interaction of monosodium urate with connective tissue components, *J Clin Invest.* 49(10):1783-1789, 1970.
35. Sokolov, L. The pathology of gout, *Metab.(Clinical Exp.)*, 6:230, 1957.
36. F.S., di Giovine, S.E., Malawista, E., Thornton, and G.W., Duff, Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution, *J Clin Invest.* 87(4):1375-1381, 1991.
37. Lemaire, R., Korn, J.H., Shipley, J.M., Lafyatis, R., Increased expression of type I collagen induced by microfibril-associated glycoprotein 2: novel mechanistic insights into the molecular basis of dermal fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 52(6):1812-1823, 2005.
38. Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H.D., Shawber, C., Norton, C.R., Serreze, D.V., Weinmaster, G., Gridley, T., Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice, *Genes Dev.* 12(7):1046-1057, 1998.
39. jagged 2(jag2) from the Mouse Genome Informatics homepage operated by The Jackson. <http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerDetail&key=33854>
40. Danielle, Burger, Cell contact interactions in rheumatology, *Arthritis Res.* 2(6):472-476, 2000.
41. Ando, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., Ohta, S., Jiang, X., Tada, T., Kobayashi, M., Matsui, N., Okamoto, T. Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts, *Oncogene* 22(49):7796-7803, 2003.
42. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=15490
43. Ohnesorg, T., Adamski, J. Promoter analyses of human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 94(1-3):259-261, 2005.
44. W.N., Kelley, and H.R., Schumacher, Jr., Gout. In: W.N., Kelley, E.D., Harris, Jr., C.B., Sledge et al. *Textbook of Rheumatology*, Saunders, Philadelphia, pp 1291-1336, 1993.
45. S. Takahashi, T. Yamamoto, Y. Moriwaki, Z. Tsutsumi and K. Higashino, Impaired lipoprotein metabolism in patients with primary gout—influence of alcohol intake and body weight. *Br. J. Rheumatol.* 33 pp 731-734, 1994.
46. S. Takahashi, Y. Moriwaki, Z. Tsutsumi, J. Yamakita, T. Yamamoto and T. Hada, Increased visceral fat accumulation further aggravates the risks for insulin resistance in gout. *Metabolism* 504 pp 393-398, 2001.
47. S. Takahashi, T. Yamamoto, Y. Moriwaki, Z. Tsutsumi and K. Higashino, Increased concentrations of serum Lp(a) lipoprotein in patients with primary gout. *Ann. Rheum. Dis.* 54 pp 90-93, 1995.
48. Tsutsumi, Z., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Ka, T., Yamamoto, T. Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies in patients with primary gout: effect of urate-lowering therapy. *Clin. Chim. Acta.* 339(1-2):117-122, 2004.
49. L. Paimela, T. Helve, M. Leirisalo-Repo, O. Vaarala, G. Alfthan, G. Palosuo et al., Clinical significance of antibodies against oxidised low density lipoprotein in early RA. *Ann. Rheum. Dis.* 55 pp 558-559, 1996.
50. Kohn, M.J., Kaneko, K.J., DePamphilis, M.L. DkkL1(Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis. *Mol Reprod Dev.* 71(4):516-522, 2005.
51. Tian, Q., Jin, H., Cui, Y., Guo, C., Lu, X. Regulation of Wnt gene expression. *Dev Growth Differ.* 47(5):273-281, 2005.
52. Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., Niehrs, C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature.* 411(6835):321-325, 2001.
53. Katoh, Y., Katoh, M. Comparative genomics on Dkk1 orthologs. *Int J Oncol.* 27(1):275-279, 2005.
54. Sen, M., Lauterbach, K., El-Gabalawy, H., Firestein, G.S., Corr, M., Carson, D.A. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(6):2791-2796, 2000.