

원저

홍화자약침의 윤�활관절막내에서의 MIF활성 억제를 통한 LPS 유발 관절염의 치료 효과

박원 · 김경호 · 이창환 · 이동건 · 이현진 · 황지혜 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Treatment Effect of *Honghwa-ja* Herbal Acupuncture on Inhibitory MIF Activation on Synovial Membrane by LPS-induced Arthritis

Park Won, Kim Kyung-ho, Lee Chang-hwan, Lee Dong-gun, Lee Hyun-jin, Hwang Ji-hye and Kim Kap-sung

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : The aim of this study was to investigate anti-arthritic effects of *Honghwa-ja* herbal acupuncture extract through inhibitory MIF activation.

Methods : After Rheumatoid arthritis(RA) knee joint was induced by lipopolysaccharide(LPS) in vivo, *Honghwa-ja* herbal acupuncture solution was applied on ST₃₅(犢鼻) and EX-LE₂₀₂(內膝眼) corresponding human body. To research the effect on the expression of MIF, COX-2, MMP-9 mRNA, RT-PCR was performed on LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

Results : In the *Honghwa-ja* herbal acupuncture solution treated Raw 264.7 cell, the mRNA expression of cytokines, RA related inflammation factors, such as the MIF, COX-2, and MMP-9 reduced concentration dependently. Positive reaction of RA-related cytokines MIF, IL-6R- α , STAT3, COX-2, MMP-9 was reduced.

Conclusion : *Honghwa-ja* herbal acupuncture extract has significant protecting ability against acute progressive RA by inhibiting the production of MIF, as a top in cytokines related to inflammation.

Key words : *Honghwa-ja* herbal acupuncture, MIF activation, LPS-induced arthritis

· 접수 : 2007년 7월 23일 · 수정 : 2007년 7월 31일 · 채택 : 2007년 7월 31일
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교 부속병원 한방병원 침구과
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

I. 서론

관절염이란 관절에 여러 가지 원인으로 염증성 병변이 일어나 관절의 동작제한, 강직, 염증, 통증, 부종 등의 증상이 나타나는 질환으로¹⁾, 질병의 급 만성도, 염증의 원인, 병발되는 특정 관절 등에 따라 퇴행성 관절염, 류마티드 관절염, 화농성 관절염, 결핵성 관절염, 통풍성 관절염 등으로 구분할 수 있다²⁾.

이중 류마티드 관절염은 윤활 관절강 내에서 각종 사이토카인, 다양한 단백질분해효소, 염증성 혼합체에 의해 뼈의 파괴와 연골의 소실이 일어나는 만성적인 염증질환으로³⁾ 초기에는 관절의 부종과 동통을 초래하며 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발되는 다발성 전신질환이다. 한 보고에 따르면 진료 기관에서 진료하는 모든 외래 환자의 10% 이상이 근골격계 증상을 호소하고 있으며, 특히 전체 관절 질환 중에서 류마티드 관절염의 유병율은 인구의 0.3~2.1% 정도로 퇴행성 관절질환 다음으로 흔하게 발생한다⁴⁾.

류마티드 관절염의 정확한 원인과 병태생리는 밝혀져 있지 않지만 류마티드 관절염 환자의 약 80%에서 자가 IgG의 Fc편에 대한 항체가 검출되어 면역학적 염증 반응이 활액막에서 시작하여 관절염으로 발전되는 것으로 알려져 있는데⁵⁾, 관절내 type II collagen 역가⁶⁾, collagenase⁷⁾, prostaglandin E2, stromelysin, plasminogen activator⁸⁾ 등이 증가되는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 물질 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해서 발생되고 염증 매개성 cytokine이 관여되는 것으로 보고 있다⁹⁾.

류마티스성 관절염에서 발견되는 특징적 증상들은 韓醫學의으로는 痺證의 범주에 속하는데 痺 痺 風寒濕熱과 같은 邪氣가 肌表와 經絡에 침범하여 氣血運行이 순조롭지 못함으로 발생되고 肢體, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 疲勞, 麻木, 腫着, 屈伸不利와 關節腫脹 등을 主要症狀로 하는 病症으로 후세에는 歷節風¹⁰⁾, 白虎風¹¹⁾ 白虎歷節風¹²⁾ 등으로 불리었다.

紅花(Carthmus tinctorius L.)는 菊花科 一年生 草本인 잇꽃으로 性味는 辛, 溫, 無毒하고 心, 肝에 歸經하며 그 種子인 紅花子(Carthami Semen)는 性味, 效能이 花와 類似하나 甘, 溫하고 心, 脾에 歸經하여 活血, 解毒의 效能이 있다. 또 活血, 通經의 效果가 있으므로 血滯로 인한 經閉, 腹痛, 癥瘕 또는 產後血暈에 적용되기도 하고 瘀血을 消散시키는 作用이 있

어 각종 어혈저체로 인한 疼痛, 關節痠痛, 瘡癰, 腫毒 등을 다스리므로 류마티드 관절염에 효과가 있을 것으로 사료된다¹³⁾.

이에 저자는 홍화자약침이 MIF 활성 억제체를 통하여 류마티스성 관절염에 대한 치료효과를 확인하기 위해 lipopolysaccharide(LPS)를 생쥐의 슬관절에 주입하여 류마티스성 관절염을 유발한 후, in vivo 실험을 통하여 홍화자약침을 犢鼻(ST₃₅)와 內膝眼(EX-LE₂₀₂)에 시술하여 RA 완화 효과 조사를, in vitro 실험을 통하여 cytokine mRNA 발현 유도 RAW 264.7cell-5×10⁵cells/wel을 대상으로 MIF 관련 cytokine 유전자 발현 변화 조사를 한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 세포주와 세포배양

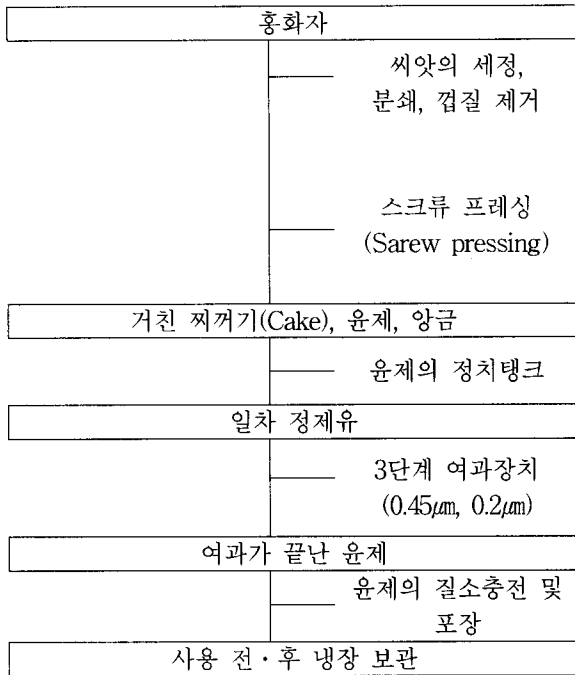
실험에 사용한 생쥐의 대식세포(macrophage)인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank(KCLB ; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS ; Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다.

2) 동물

테령 4주된 BALB/c계 암컷 생쥐(대한실험동물센타, 서울)를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 무치치한 정상군, 류마티드 관절염(Rheumatois arthritis, RA)을 유발한 대조군(RA군) 및 류마티드 관절염 유발 후 홍화자약침한 실험군 (HA군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

3) 약재

동국대학교 일산 한방병원에서 사용하는 홍화자(Carhtami Semen)를 다음과 같은 약침 제조 과정을 거쳐 홍화자약침제제를 만들었다(scheme 1).



Scheme 1. 홍화자 약침액 조제의 과정

4) 약침기

Hemiltone syringe(Hewlett-Packard, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) *in vitro* 실험을 통한 홍화자추출물이 MIF 관련 cytokine 유전자 발현 변화 조사

홍화자약침액이 inflammatory cytokine인 cyclooxygenase(COX)-2와 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)-9 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7cell - 5 \times 10⁵ cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 lipopolysaccharide (LPS ; Final 1 μ g/ml)를 2시간 처리하여 RA 관련 cytokine mRNA 발현을 유도하였다. 홍화자추출물

40, 60, 80, 100 μ g/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 수거하여 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, COX-2와 MMP-9 primer를 PCR machine으로 반응시켰다. PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동 하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β -actin의 증폭을 동시에 실시하였다(Table 1).

Abbreviations : MMP-9, matrix metalloproteinase-9 ; COX-2, cyclooxygenase-2.

2) *in vivo* 실험을 통한 홍화자약침의 RA 완화 효과 조사

(1) 실험동물의 RA 유발

RA 유발을 위해 lipopolysaccharide(LPS ; Sigma, USA)를 증류수에 희석한 후 각각 300 μ g/kg씩 무릎관절에 주사하였다. 특히 무릎관절낭으로의 정확한 주사를 위해 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 다음 무릎부위 피부를 절개하여 무릎뼈를 확인한 후 주사하였다. 한편 무릎관절에서의 RA 유발여부는 LPS 주사 후 24-48시간 동안 무릎주변에서 나타나는 부종(edema)의 확인을 통해 이루어졌다.

(2) 홍화자약침의 시술

RA 유발 3일부터 21일까지 홍화자약침 50 μ l/kg을 犢鼻(ST₃₅)와 內膝眼(EX-LE₂₀₂)에 하루씩 번갈아가며 반복적으로 시술하였다.

(3) 윤활관절 표본 제작

RA 유발 후 21일 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 μ m 두께로 연속절편을 만들었다.

(4) 면역조직화학

Interleukin-6 receptor(IL-6R- α)와 그의 전사인자인 Signal transducers and activators of transcription (STAT)-3, inflammatory cytokine인 COX-2, 금속단백분해효소인 MMP-9의 윤활관절막내 분포변화를

Table 1. The Primer of MMP-9, COX-2 and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product(bp)	No. of cycles
MMP-9	sense	5'-AGGCCTCTACAGAGTCTTTG-3'	824	30
	antisense	5'-CAGTCCAACAAGAAAGGACG-3'		
COX-2	sense	5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	30
	antisense	5'-GCACGTAGTCTTTCGATCACT-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

조사하기 위해 항체를 이용한 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 1차항체(1 : 100, Santacruz, USA)에 4°C humidified chamber에서 5일 동안 반응시켰으며, 2차항체(1 : 100, Santacruz)에 3일 동안 link 하였다. Avindin biotin complex(ABC) kite(DAKO)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 영상분석과 통계처리

Cytokine 유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 SPSS 8.0을 통한 ANOVA test로 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. MIF 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 MIF 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 Fibroblast like synoviocyte(FLS)와 대식세포로 세포막에서 강한 MIF 양성반응을 보였다. RA 군은 대조군에 비해 568% 증가한 5,300±327/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에

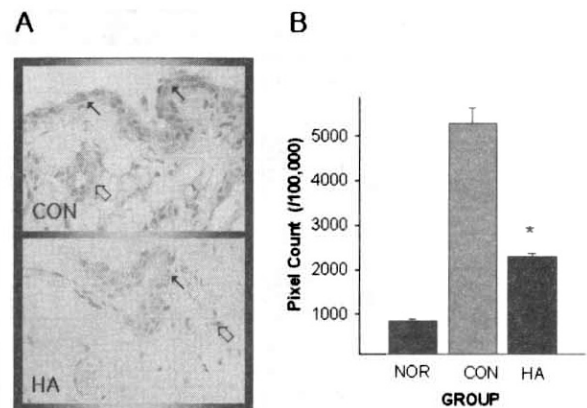


Fig. 1. Inhibition of Rheumatoid arthritis(RA)-induced macrophage migration inhibitory factor(MIF) activation by Honghoaja Herbal acupuncture

A. Immuno-reaction of MIF in synovial membrane (←, MIF positive reacted fibroblast like synoviocyte ; ↗, MIF reacted positive macrophage ; x400).

B. Image Analysis for MIF positive reaction.

Abbreviations : NOR, normal mice ; CON, RA elicited mice ; HA, Honghoaja extract treated mice after RA elicitation ; *, P < 0.05 compared with CON.

비해 HA군에서 MIF 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, HA군에서는 RA군에 비해 52% 감소한 2,545±126/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 1).

2. Pro-inflammatory cytokine 활성화 억제

1) IL-6R- α 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 IL-6R- α 양성반응세포는 synovial B cell로 세포막에서 강한 IL-6R- α 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 499% 증가한 3,839±201/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해

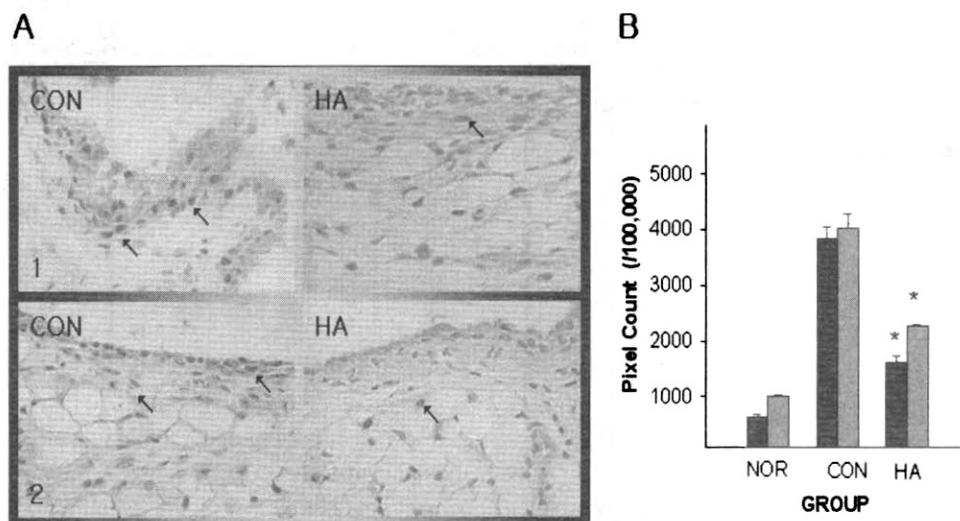


Fig. 2. Inhibition of RA-induced interleukin(IL)-6R- α and Signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 activation by Honghoaja Herbal acupuncture

A. Immuno-reaction of IL-6R- α (1) and STAT3(2) in synovial membrane (\leftarrow , positive reacted synovial B cell ; x400).

B. Image Analysis for IL-6R- α and STAT 3 positive reaction.
Abbreviation same as Fig. 1.

HA군에서 IL-6R- α 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, HA군에서는 RA군에 비해 58% 감소한 1,624 \pm 97/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 2).

2) 전사인자 STAT 3 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 STAT 3 양성반응세포는 synovial B cell로 핵막주변에서 강한 STAT 3 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 298% 증가한 4028 \pm 262/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해 HA군에서 STAT 3 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, HA군에서는 RA군에 비해 44% 감소한 2,264 \pm 41/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 2).

3. 금속 단백질분해효소 9 활성화 억제

1) MMP-9 유전자 발현 억제

LPS 자극에 의한 Raw264.7 세포에서의 MMP-9 mRNA 발현은 증가하였는데, 홍화자약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 MMP-9 mRNA 발현량에 비해 10-2에서 47.1%, 10-1에서 78.6%가 감소하였다(Fig. 3-A).

2) MMP-9 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 MMP-9 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 대식세포로 세포막에서 강한 MMP-9 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 246% 증가한 2,274 \pm 50/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해 HA군에서 MMP-9 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, HA군에서는 RA군에 비해 17% 감소한 1,891 \pm 83/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 3-B).

4. Inflammatory cytokine 활성화 억제

1) COX-2 유전자 발현 억제

LPS 자극에 의한 Raw264.7 세포에서의 COX-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 홍화자추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 COX-2 mRNA 발현량에 비해 10-2에서 55.4%, 10-1에서 61.9%가 감소하였다(Fig. 4-A).

2) COX-2 생성 억제

윤활관절막에서 분포하는 COX-2 양성반응세포는 두 종류로 윤활관절막 자유면에 분포하는 FLS와 대

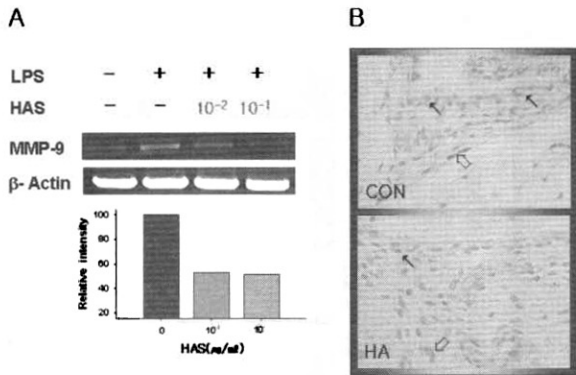


Fig. 3. Inhibition of MMP-9 activation by Honghoaja Herbal acupuncture

A. The changes of MMP-9 mRNA expression by Honghoaja acupuncture solution(HAS).

B. Immuno-reaction of MMP-9 in synovial membrane (←, MMP-9 positive reacted fibroblast like synoviocyte ; ↗, MMP-9 positive reacted macrophage ; x400).

Abbreviations same as Fig. 1.

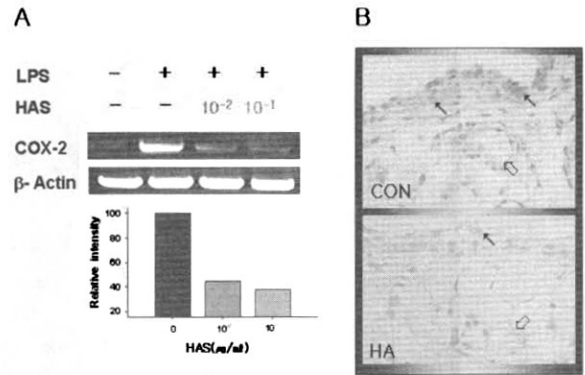


Fig. 4. Inhibition of COX-2 activation by Honghoaja Herbal acupuncture

A. The changes of COX-2 mRNA expression by HAS.

B. Immuno-reaction of COX-2 in synovial membrane (←, COX-2 positive reacted fibroblast like synoviocyte ; ↗, COX-2 positive reacted macrophage ; x400).

Abbreviations same as Fig. 1.

식세포로 세포막에서 강한 COX-2 양성반응을 보였다. RA군은 대조군에 비해 1318% 증가한 3,758±110/100,000 pixel로 관찰되었다. RA군에 비해 HA군에서 COX-2 양성반응이 감소된 것으로 관찰되었는데, HA군에서는 RA군에 비해 78% 감소한 815±35/100,000 pixel로 관찰되었다(Fig. 4-B).

IV. 고 찰

류마티드 관절염은 만성적인 염증질환으로 초기에는 관절의 부종과 동통을 초래하며 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발되는 질환으로서 직접적인 원인은 규명되어 있지 않다¹⁴⁾. 그러나 대부분의 학자들은 약 30-40%의 유전적인 소인과 60-70%의 환경적인 요인들이 복합적으로 작용하여 관절염이 발생하는 것으로 추정하고 있다. 류마티드 관절염에 대한 원인으로 아직까지 정확하게 밝혀진 것은 없지만 현재까지 가장 유력한 학설은 자가면역질환의 일종이라고 알려져 있다. 현재 양방에서 사용되고 있는 치료법으로는 약물요법, 일반적인 보존요법, 수술요법 등이 있다.

류마티드 관절염은痺證의 범주에 속하며痺란

閉, 즉 막혀서 잘 통하지 않음을 말한다. 후세에는 歷節風, 白虎風, 白虎歷節風, 痛風, 類風濕性關節炎 등으로 불리었으며 명칭과 분류방법은 일정치 않았지만 기본적인 내용은 內經의 범주를 벗어나지 못하였다. 《黃帝內經·痺論》¹⁵⁾에서 風寒濕의 三氣가 合하여 痺證을 일으킨다라고 하였고 風이 勝할 때는 行痺, 寒이 勝할 때는 痛痺, 濕이 勝할 때는 着痺라고 하였다. 《金匱要略》¹⁶⁾에서는 歷節風은 屈伸하기 힘든 것이고, 關節 통증이 나타나는데 신체가 마르고 다리는 붓는다고 하여 歷節風을 표현하였고, 李東垣은 《東垣十種醫書》¹⁷⁾에서 痛風은 血이 熱을 받아서 끓어 올라서 생기고 혹은 濕氣가 많은 지역에 살거나 바람을 받고 찬기운에 노출되면 病이 생긴다라고 하였다. 《外臺秘要》에서는 白虎病이란 대개 風寒濕의 毒이 몸이 虛해져서 들어오는 것이고 攝生을 잘해야 한다고 주장하였다. 《諸病源候論》에서는 飲酒로 주리가 열린 상태에서 汗이 나고 風에 상하거나 氣血이 不足할 때 風邪에 傷하여 發病한다라고 하였다.

《丹溪心法》¹⁸⁾에서는 病의 원인을 痰, 風熱, 風濕, 血虛로 나누었고, 《景岳全書》¹⁹⁾에서는 飲酒後 犯房이나 風雨濕熱과 血虛, 血燥를 주요원인으로 보았다.

痺證의 治療는 風寒濕熱의 便乘에 따라 祛風, 散寒, 除濕, 清熱 등의 治法이 있고 舒經通絡을 겸하여 氣血이 通하게 하는데 痺證이 오래도록 치유되지 않고 반복하여 발작하면 氣血虧虛하게 되고 장부에 손

상을 미치는 가담에 扶正祛邪의 방법으로 祛邪와 동시에 補益氣血, 滋養肝腎의 방법을 겸하여 치료한다고 하였다.

관절염의 치료방법에 대한 논문으로는 當歸²⁰⁾, 防風²¹⁾, 丹蔘²²⁾, 玄胡索²³⁾, 大戟²⁴⁾, 紅花와 川椒²⁵⁾, 乳香과 沒藥²⁶⁾이 각각 진통작용이 있다고 보고되었고, 生草烏와 法製草烏²⁷⁾ 등이 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 유효하다는 보고가 있었고, 이 실험에서 사용된 紅花가 疼痛과 血栓症 등에 유효하다는 보고²⁸⁾가 있었다.

한편 류마티스 관절염은 주로 30-40대에서 많이 발병하며 세계적으로 다양한 유병율을 보이고 있지만 보통 평균 유병율은 0.8%로 추정되며²⁹⁾, 일반적으로 여성이 남성보다 발생률이 3배나 높지만 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소한다.

류마티스성 관절염의 발병 원인은 불확실한데 반해, 류마티스성 관절염 발병시 관절강내 구성물질의 변화는 잘 알려져 있으며 이는 주된 발병 징후이다. 요약해 보면, 윤활액내의 type II collagen 역가 증가³⁰⁾, macrophage migration inhibitory factor(MIF)의 증가, proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 증가³¹⁻³²⁾, 염증효소 cyclooxygenase(COX)-2가³³⁻³⁴⁾, 단백질분해효소(matrix metalloproteinase ; MMP)의 증가^{35, 36)} 등이 일어나는데, 이러한 물질의 분비 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해 발생하게 된 것이며 심각한 관절손상을 유도하게 된다.

RA 유발시에는 MIF 활성이 일어나는데, MIF는 in vitro와 in vivo 실험을 통해 류마티스성 관절염을 비롯한 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하며 수동면역과 획득면역에 기본적 참여자로 알려져 있다³⁷⁾. 본 실험에서도 RA유발군의 윤활관절막내에서 MIF 양성반응세포의 분포증가를 확인할 수 있었다.

MIF의 활성은 FLS와 대식세포에서 염증관련 전사인자인 NF- κ B의 활성을 일으켜, 염증효소 COX-2 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다³⁸⁻⁴⁰⁾. 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 관여한다⁴¹⁻⁴³⁾. 본 실험에서도 COX-2 양성반응세포의 조직내 분포 증가를 일으켰다.

또한 MIF의 활성은 synovial B cell에서 IL-6의 분비 증가를 유도하는데, Janus family tyrosine kinase (Jak) - signal transducers and activators of transcription(STAT) 경로를 통해 ligand 자극에 대한 특정 반응을 정확하고 빠르게 유도한다. 즉 Jak1 & Jak2의 활성화는 IL-6R- α 와 gp130 receptor subunit의 특정 tyrosine residue의 인산화를 유도함으로써 수용체가 Sic homology 2 domain을 매개로한 STAT3과 결합을 이룰 수 있는 docking site를 형성하도록 유도한다. 이어서 cytoplasmic protein인 STAT의 수용체로서의 recruitment가 일어나면 STAT은 receptor-associated Jak에 의하여 conserved tyrosine residue의 인산화를 겪은 후, 수용체로부터 유리되어 hetero-dimerization을 이룬 다음 핵으로 전위되어 IL-6 유전자의 promoter인 STAT-response element에 결합하여 전사조절인자로서 작용함으로써 유전자의 발현을 유도하게 된다⁴⁴⁻⁴⁵⁾. RA 유발군에서 IL-6R- α 와 STAT3 양성반응세포의 분포 증가가 관찰되었으며, IL-6R- α 양성반응세포는 림프구형으로 세포막주변 세포질에서 양성반응을 보였다. 한편 STAT3 양성반응세포는 림프아세포형(lymphoblast type)으로 핵과 핵주변 세포질에서 강한 양성을 보여, 인산화 이후 STAT3의 핵내로의 전이(translocation)로 유추된다.

한편 MIF의 활성은 FLS와 대식세포에서 MMP 생성을 유도하는데, MMP-9는 laminin과 type IV collagen을 선택적으로 분해하고 기저막을 파괴하여 염증관련 세포이주를 용이하게 한다. 본 실험에서도 윤활관절막내의 FLS와 MMP-9 양성반응세포의 분포 증가가 관찰되었다. 이에 반해 홍화자약침은 MIF 활성을 억제하는데, RA 동물모델을 통해 홍화자약침 처리후 윤활관절막내에서 MIF 양성반응을 보이는 FLS와 대식세포의 분포 감소가 관찰된 in vivo의 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 홍화자약침의 MIF 활성 억제는 NF- κ B 활성을 저해함으로써 염증효소 COX-2의 작용을 차단하게 되어 염증으로 유발되는 윤활관절막내 조직 손상을 막았다. 또한 synovial B cell에서 JAK-STAT pathway를 차단하여 IL-6와 STAT3 전사를 억제하였다. MMP의 발현을 억제하여 윤활관절막내 MMP-9의 생성을 억제함으로써 세포외기질의 손상과 염증세포의 이주증가를 막았다. 이상의 결과로 홍화자약침은 MIF의 활성 억제를 통해 초기 류마티스성 관절염의 진행을 차단하여 류마티스 관절염로 기인된 조직 손상을 완화시키는 치료 효과를 보이는 것으로 생각된다.

V. 결 론

홍화자약침이 MIF 활성 억제를 통하여 류마티스성 관절염에 대한 치료효과를 확인하기 위해 in vivo 실험을 통하여 lipopolysaccharide(LPS)를 생쥐의 슬관절에 주입하여 류마티스성 관절염을 유발한 후, 홍화자약침을 犢鼻(ST35)와 內膝眼(EX-LE 202)에 상응하는 생쥐의 무릎부위에 시술하여 MIF, pro-inflammatory cytokine 인 IL-6R- α (전사인자 STAT3), inflammatory cytokine인 COX-2, 금속단백분해효소인 MMP-9의 변화를 통한 RA 완화 효과 조사를, in vitro 실험을 통하여서는 cytokine mRNA 발현 유도 RAW 264.7cell - 5×10^5 cells/wel을 대상으로 MIF 관련 cytokine인 MMP-9 및 COX-2 유전자 발현 변화 조사를 한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍화자약침액이 처리된 Raw 264.7cell에서는 류마티스성 관절염 관련 cytokine인 MMP-9과 COX-2 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였다.
2. 홍화자약침으로 시술된 생쥐의 윤활관절막내에서는 류마티스성 관절염 관련 cytokine인 MIF, IL-6R- α , STAT3, COX-2, MMP-9 양성반응이 감소하였다.

이와 같은 결과는 홍화자약침이 MIF의 활성을 억제시켜 초기 류마티스성 관절염의 진행을 차단함으로써 류마티스성 관절염에 대한 치료 효과를 보이는 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. 오정희. 재활의학. 서울 : 대학서림. 1986 : 306-19.
2. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1994 : 71-7, 1166-77.
3. Peter Schenck, Stefan Schneider, Rolf Miehke, and Peter Prehm. Synthesis and degradation of hyaluronate by synovia from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1995 ; 22 : 400-5.

4. 강병철. 오늘의 진단 및 치료. 서울. 도서출판 한우리. 1999 : 875-900.
5. Morgan K, Clague RB, Reynolds I and Davis M. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. British J Rheumatol. 1993 ; 32 : 333-5.
6. Van Lent Holthuysen A E M, van den Bersselaar L A M, van Rooijen N, Joosten L A B, van de Loo F A J, van de Putte L B A and van den Berg W B. Phagocytic lining cells determine local m expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 1996 ; 39 : 1545-55.
7. 박일성, 노성만, 송은규, 박창수, 양동현, 김용욱. Collagenase로 유발한 백서 슬관절의 퇴행성 병변에 관한 형태학적 연구. 대한관절염학회. 대한관절염학회지. 1994 ; 6 : 3-15.
8. Juana A, Odile C, Francoise C and Catherine F. Interleukin-1-mediated phospholipid breakdown and arachidonic acid release in human synovial cells. Arthritis Rheum. 1993 ; 36 : 158-67.
9. Marc Feldmann, Fionula MB and Ravinder NM. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-400.
10. 巢元方. 巢氏諸病源候論(券二), 臺北 : 國立中國醫藥研究所. 1964 : 1.
11. 王壽. 外臺秘要(上). 臺北 : 國立中國醫藥研究所. 1964 : 369.
12. 龔信. 古今醫鑑. 南昌 : 江西科學出版社, 1990 : 284-5.
13. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林出版社, 1989 : 467.
14. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1986 : 121, 128.
15. 王琦 外. 黃帝內經素問今釋. 서울 : 成輔社. 1983 : 206.
16. 張仲景. 金匱要略方論. 東方書店. 1980 : 30-2.
17. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울 : 一中社. 1994 : 480-1.
18. 朱震亨. 丹溪心法(拳四). 臺北 : 五洲出版社. 1981 : 7-8.
19. 張介賓. 景岳全書. 臺北 : 臺聯國豐出版社. 1980 : 211-3.

20. 朴快煥. 當歸水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響에 관한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1984 : 261-272.
21. 李種國. 防風水鍼이 鎮痛, 消炎, 解熱 및 鎮痙에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1986 : 11-23.
22. 宋春浩. 丹蔘水鍼이 鎮痛 및 血壓降下에 미치는 影響에 관한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1985 : 205-218.
23. 安鉉石 外. 玄胡索藥鍼刺戟이 鎮痛, 抗痙攣 및 抗潰瘍效果에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11(1) : 99-112.
24. 姜成吉. 大戟水鍼이 鎮痛 및 水銀中毒에 미치는 影響에 관한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1982 : 1-18.
25. 朴英培. Mouse의 鎮痛效果에 미치는 水鍼療法の 實驗的 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1980 : 199-204.
26. 安春載 外. 玄胡索, 乳香 및 沒藥藥鍼刺戟이 鎮痛效果에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11(1) : 145-172.
27. 盧富來. 生草烏와 法製草烏水鍼이 흰쥐의 Adjuvant 關節炎에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1994 ; 11(1) : 435-450.
28. 손철훈 외. 농도별 홍화수침자극이 흰쥐 뇌부위별 Catecholamine 함량에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1992 ; 9(1) : 53-69.
29. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. Harrison's principle of internal medicine, 16th ed. New York : McGraw Hill. 2005: 1968-77.
30. Leo A B, Joosten, Monique M A Helsen, Fons A J van de Loo, Wim B van DE Bern. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in dba/a mice. Arthritis Rheum. 1996 ; 39(5) : 797-809.
31. 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. 1999 ; 42 : 1601-8.
32. Marc Feldmann, Fionula M Brennan and Ravinder N Maini. Role of cytokines in rheumatoid arthritis, Annu. Rev Immunol. 1996 ; 14 : 397-440.
33. Sampey A V, Hall P H, Mitchell R A, Metz C N, Morand E F. Regulation of synovio- cytes phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2001 ; 44 : 1273-80.
34. 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. 2005 ; 7 : R1034-1045.
35. Burrage P S, Mix K S, Brinckerhoff C E. Matrix metalloproteinases : role in arthritis. Front Biosci. 2006 ; 11 : 529-43.
36. 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. 2000 ; 275 : 444-50.
37. Morand E F. New therapeutic target in inflammatory disease : macrophage migration inhibitory factor. J Internal medicine. 2005 ; 35 : 419-426.
38. Baeuerle P A. IκB-NF-κB structure : at the interface of inflammation control. Cell. 1998 ; 95 : 729-731.
39. Z Morise, S Komatsu, J W Fuseler, D N Granger, M Perry, AC Issekutz, and M B Grisham. ICAM-1and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. Am J Physio. 1998 ; 27 ; G246-252.
40. Y-X Li, N Li, Y-S Li, B Wu, and 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. 2000 ; 32 ; 1283-1286,
41. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. J Hepatol. 1993 ; 17(2) : S38-40.
42. H J Rothkötter, R Pabst and M Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. Veterinary

- Immuno immunopath. 1999 ; 72 : 157-165.
43. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998 ; 93(5) : 705-716.
44. Lionel B I and Xiaoyu H. The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis : Pathogenic or protective? *Arthritis & Rheumatism*. 2003 ; 48(8) : 2092-2096.
45. 이충은. JAK-STAT pathway를 경유하는 cytokine과 호르몬의 작용기전. *대한내분비학회*. 2000 ; 15(3) : 367-387.