

Behçet 患者의 單球細胞에서 溫清飲의 cytokine 分泌抑制 효과

임흥진* · 황충연 · 강학천 · 김남권 · 권일호

원광대학교 한의과대학 외관과교실

Inhibitory Effects of Onchungum on Cytokine Production from Phytohaemagglutinin-stimulated Peripheral blood Mononuclear cells of Behçets Patients

Hong Jin Lim*, Choong Yeon Hwang, Hsueh Chuan Chiang, Nam Kwon Kim, Il Ho Kwon

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Oriental Medical Collage, Wonkwang University

Behçets disease is a systemic inflammatory disorder. The etiology and pathogenesis of Behçets disease has yet been fully elucidated but might involve immune dysfunction. Cytokines involved in the regulation of inflammatory reactions and immune responses may play a role in the pathogenesis of Behçets disease (BD). Onchungum is an Oriental herbal medication, which has been successfully used in Korea for the treatment of BD. This report describes modulation effects of Onchungum on cytokine production from phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of Behçets patients by ELISA. Onchungum significantly inhibited the production of pro-inflammatory cytokines, TNF- α and IL-1 β , compared to absence of Onchungum (by 52.3 1.4 % inhibition for TNF- α and 113.5 3.3 % for IL-1 β , $p < 0.001$). Onchungum also inhibited the production of IFN- γ , immunoregulatory Th1 cytokine, by 89.4 0.8 % ($p < 0.001$). The inhibitory effects of Onchungum on cytokine production showed dose-dependent manner, and the pre-treatment of 1mg/ml Onchungum had better effects than immunosuppressive drug for treatment of BD, cyclosporin A. Our results suggest that Onchungum treatment for Behçets disease patients may have pharmacologic activities and abilities of regulation of immune and inflammatory responses by cytokine modulation.

Key words : onchungum, cytokine, Behçets

서 론

Behçet 병은 아직까지 免疫學的, 病理學의 原因이 잘 알려져 있지 않은 全身性 炎症疾患이다¹⁾. 이 疾患은 再發性的의 口腔 및 外陰部潰瘍, 葡萄膜炎 등의 眼疾患, 紅斑 等の 皮膚疾患, 血管, 關節, 消化器, 神經系疾患 등이 동반되어 全身的으로 나타나는 것이 특징²⁾으로 1937년 Behçet가 처음으로 記述하였다³⁾. 韓醫學에서는 金匱要略⁴⁾에 記錄되어 있는 狐惑證과 類似하다고 보는데 狐惑證은 病의 狀態가 傷寒과 같으며 喉에 蝕함이 惑이 되고 陰에 蝕함이 狐가 되며 目赤하여 鳩眼과 같다고 記述하여 口瘡과 陰瘡과 眼病을 같은 疾患으로 言及하고 있다. 原因으로는 憂思郁怒, 過勞勞累, 睡眠不足으로 肺脾腎 三臟의 陰이 虧損되어 虛熱

內生하고 正氣虛弱하여 風溫濕熱之邪 侵入하여 上蘊下注하고 入絡하여 粘膜 肌膚 關節에 막히고 經絡 또한 막히어 氣血凝滯하여 發生한다고 하였다. 溫清飲⁵⁾은 明代 龔廷賢(A.D.1522~1619年)⁶⁾이 著述한 “萬病回春”에 처음 收錄된 處方으로 그 主治症은 “面色痿黃, 臍腹刺痛, 寒熱往來, 崩漏不止”로, 그 후 康⁷⁾, 裴⁸⁾ 등은 Behçet 證候群, 崩漏, 諸出血症, 搔痒症 등에 廣範圍하게 應用된다 하였다. Cytokine은 免疫反應과 炎症反應의 조절에 중요한 역할을 하므로 Behçet 병에 있어서도 불균형한 cytokine의 조절은 중요한 意味를 가진다. 중앙괴사인자알파 (TNF- α)와 인터루킨-1베타 (IL-1 β)는 炎症性 cytokine으로서 Behçet 병을 포함한 많은 炎症性 疾患에서 중요한 역할을 하고 있다. 활동성 Behçet 병 증상을 나타내는 患者들의 혈청에서 증가된 IL-1 β 를 관찰할 수 있었으며, 患者들에서 분리한 말초혈액 단구세포로부터 分泌된 IL-1 β 를 정상인과 비교했을 때 증가되어있음이 報告되었다⁹⁾. 또한 이 疾患을 가진 患者들의 단구세포로부터 TNF- α 가 지속적으로 生

* 교신저자 : 임흥진, 전북 익산시 영등동 197-11 이레한의원
E-mail : jin5@thru.net Tel : 063-842-5112
· 접수: 2002/06/10 · 수정: 2001/07/15 · 채택 : 2002/08/06

성됨을 관찰하였고 정상인과 비교하여 혈청의 TNF- α 의 양이 유의하게 증가되어 있음을 報告하였다^{10,11)}. 이에 본 연구에서는 Behçet 병의 治療를 위해 사용되는 溫清飲이 患者로부터 분리된 말초혈액 단구세포에서 炎症性 cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 억제할 수 있는지 조사하였고, 溫清飲이 免疫反應을 조절하는 중요한 cytokine인 IFN- γ 의 生成을 抑制하는 효과에 대해서도 조사하였다. 또한 Behçet 병 患者의 治療를 위해 사용되고 있는 효과가 우수한 면역억제제인 cyclosporin A (CsA)와 溫清飲의 cytokine 生成 조절효과도 비교하여, 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

Phytohaemagglutinin (PHA), CsA, Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077)와 그 외 모든 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. 세포배양액 RPMI 1640은 Gibco BRL (Grand Island, NY, 미국), fetal bovine serum (FBS)은 Life Sciences사 (Grand Island, NY, 미국)로부터 구입하였다. Anti-human TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 에 대한 항체와 biotinylated anti-human TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 항체, 그리고 재조합 human TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 는 R&D사 (Minneapolis, MN, 미국)로부터 구입하였다.

2. 약재

약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다. 처방은 방약합편에 준하였고 그 내용(1첩기준)은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Onchungueum

한약명	생약명	용량(g)
황금	Radix Scutellariae	3.75g
황련	Rhizoma Coptidis	3.75g
황백	Cortex Phellodendri	3.75g
치자	Fructus Gardeniae	3.75g
생지황	Rhizoma Rehmanniae	3.75g
당귀	Radix Angelicae Gigantis	3.75g
백작약	Radix Paeoniae Lactiflorae	3.75g
천궁	Rhizoma Cnidii	3.75g
총량		30g

3. 溫清飲 추출액 준비

실험에 사용할 溫清飲 추출액 준비를 위해 처방에 따라 준비된 각각의 한약재를 증류수에 넣고 3시간 정도 끓인 다음 이수추출물을 -70℃에 얼리고 완전히 수분을 제거하기 위해 4일 동안 동결 건조하였다. 동결건조가 끝난 분말을 PBS (phosphate-buffered saline)에 녹이고 0.22 μ m 여과지로 여과하여 실험에 사용하기까지 4℃에 보관하였다.

4. 말초혈액 단구세포의 분리 및 배양

Behçet 병 환자 2명으로부터 말초혈액 3 ml을 얻어 EDTA

처리된 용기에 담아 응고를 막았다. 생체의 세포의 활성을 최소화하기 위하여 즉시 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077)를 사용하여 원심분리한 후 혈액으로부터 단구세포 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)를 분리하였다. 분리된 단구세포는 PBS에 washing 후 RPMI 1640 배양액을 첨가해 5% CO₂, 95% humidity가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다. RPMI 1640 배양액은 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, 10% FBS를 넣어서 준비하였다. 본 실험에 앞서 예비실험으로 PHA로 활성화된 혈액단구세포로부터 cytokine이 많이 분비되는 조건을 정하였다. 세포는 6 \times 10⁵ cells/ml로 seeding하고 30분간 안정화시킨 다음 溫清飲 (0.1-1.0 mg/ml)과 CsA (5 μ g/ml)를 처리하였다. 30분 뒤에 PHA (25 μ g/ml)로 세포를 활성화시킨 다음 24 시간동안 배양한 후 세포의 상층액만을 원심분리하여 얻고 이것을 정량하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

5. cytokine 정량

혈액 단구세포로부터 생성된 cytokine 정량을 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 사용하였다¹²⁾. 먼저 96-well plate에 1차 capture Ab(1 μ g/ml)를 100 μ l씩 넣어서 4℃에 하룻밤 두었다. 다음날 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS (PBST)로 washing한 다음 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% Na₃N로 포함한 PBS로 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝나면 PBST로 washing하고, -70℃에 준비해둔 sample과 함께 농도를 알고있는 재조합 cytokine을 100 μ l씩 넣어 37℃에서 2시간 두었다. 2시간 후에 다시 PBST로 washing하고 2차 detection Ab(0.5-1 μ g/ml)를 100 μ l씩 넣어서 1시간 30분 동안 37℃에 둔 다음 well을 PBST로 washing하고 효소인 avidin-peroxidase를 넣어 37℃에 30분간 두었다. 남아있는 효소를 PBST로 완전히 제거한 후 이 효소와 반응하여 발색하는 기질 ABTS를 첨가하고 색깔이 나타나면 반응을 멈춘 다음 405 nm 파장을 사용하여 ELISA reader에서 흡광도를 측정하였다. 농도를 알고있는 재조합 cytokine을 이용하여 sample의 농도를 결정하였다.

실험결과

1. 환자의 임상적 특징

Behçet 병으로 판정되는 두 명의 환자로부터 말초혈액을 채혈하여 단구세포를 분리하였으며 두 환자의 특징은 표 1에 정리하였다. 한 명은 30세 여성으로 5년의 병력기간을 가지며 눈에 Behçet 병으로 인한 포도막염을 가지고 있었으나 溫清飲 투여 후 더 이상의 악화는 진행되지 않았다. 또한 외음부 궤양과 피부에 결절성 홍반 증상이 있었다. 또 다른 환자는 50세 남성으로 10년의 병력기간을 가지며 aphtha성 구강 궤양을 호소하였고 溫清飲 투여 후 구강궤양의 재발은 막을 수 있었다. 앞의 환자와 마찬가지로 외음부 궤양과 피부에 결절성 홍반을 나타내었으며 위장관 부위의 염증으로 인한 설사와 복통 증상을 보였다. 이들이 나타내는 구강궤양, 포도막염, 외음부 궤양, 피부의 결절성 홍반 등은 잘 알려진 Behçet 병의 주증상이었다.

Table 2. Summary of patients' clinical features

	Patient 1	Patient 2
Sex	Female	Male
Age (yr)	30	50
Duration of disease (yr)	5	10
Symptoms	<ul style="list-style-type: none"> · Ocular lesions - uveitis · Genital ulceration · Skin lesions - erythema nodosum 	<ul style="list-style-type: none"> · Oral aphthous ulceration · Genital ulceration · Skin lesions - erythema nodosum · Gastrointestinal involvement

2. TNF- α 생성에 미치는 溫清飲의 효과

Behçet 병 환자로부터 분리한 단구세포를 PHA 자극을 통해 활성화시킨 다음 상층액에 분비되어진 염증성 cytokine인 TNF- α 의 양을 ELISA 방법을 통해 정량하였다. 그리고 溫清飲이 TNF- α 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 PHA 자극 30분 전에 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml의 溫清飲을 처리하여 그 효과를 알아보았다(Fig. 1). PHA 자극을 통해 단구세포로부터 분비되는 TNF- α 의 양은 3.60 ± 0.08 ng/ml로 자극하지 않은 1.48 ± 0.11 ng/ml 보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). PHA 자극 전에 溫清飲 0.1 mg/ml을 처리하면 3.16 ± 0.04 ng/ml, 1.0 mg/ml을 처리하면 2.49 ± 0.03 ng/ml로 溫清飲을 처리하지 않았을 때보다 각각 20.8%와 52.3%의 억제율을 나타내었다.

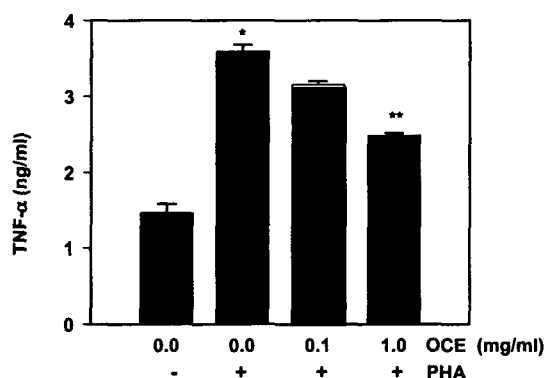


Fig. 1. Effect of Onchungeum (OCE) on PHA-stimulated TNF- α production from PBMC of Behçet patients was measured by ELISA. PBMC (6×10^5 cells/ml) were cultured and stimulated with PHA for 24 h in the absence or presence of Onchungeum (0.1 and 1.0 mg/ml) for 30 min prior to stimulation. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared to saline value and **, $p < 0.001$ PHA-treated alone value.

3. IL-1 β 생성에 미치는 溫清飲의 효과

또 다른 염증성 cytokine IL-1 β 의 분비도 PHA 자극에 의해 혈액 단구세포로부터 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2). 그리고, 溫清飲이 IL-1 β 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 PHA 자극 30분 전에 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml의 溫清飲을 처리하여 그 효과를 알아보았다. PHA 자극을 통해 단구세포로부터 분비되는 IL-1 β 의 양은 8.07 ± 0.07 ng/ml로 자극하지 않은 5.63 ± 0.30 ng/ml 보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). PHA 자극 전에 溫清飲 0.1 mg/ml을 처리하면 7.05 ± 0.22 ng/ml, 1.0 mg/ml을 처리하면 5.30 ± 0.08 ng/ml로 溫清飲을 처리하지 않았을 때보다 각각 41.8%와 113.5%의 억제율을 나타내었다. 즉, 그림 1과 2에서 보

듯이 溫清飲은 염증성 cytokine의 생성을 농도 의존적으로 감소 시킴을 알 수 있었다.

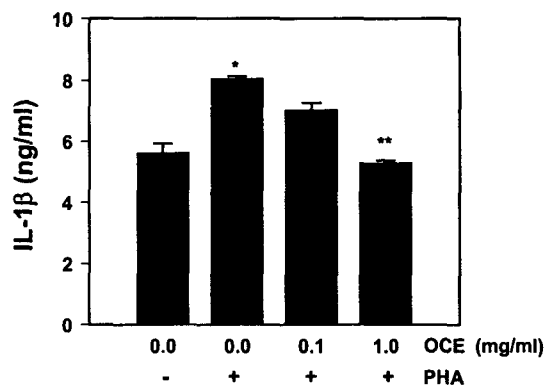


Fig. 2. Effect of Onchungeum (OCE) on PHA-stimulated IL-1 β production from PBMC of Behçet patients was measured. PBMC (6×10^5 cells/ml) were cultured with or without Onchungeum (0.1 and 1.0 mg/ml) for 30 min and then stimulated with PHA for 24 h. The cell-free supernatants were collected and IL-1 β concentration was determined by ELISA. Each datum represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared to saline value and **, $p < 0.001$ PHA-treated alone value.

4. IFN- γ 생성에 미치는 溫清飲의 효과

면역반응을 조절하는 cytokine인 IFN- γ 가 정상인에 비해 Behçet 병을 가진 환자의 단구세포에서 증가되어있다는 보고를 근거로 본 연구에서도 PHA 자극에 의한 IFN- γ 의 생성과 溫清飲의 효과를 알아보았다(Fig. 3). PHA 자극을 통해 단구세포로부터 분비되는 IFN- γ 의 양은 1.149 ± 0.079 ng/ml로 자극하지 않은 세포로부터 분비된 IFN- γ 의 양인 0.022 ± 0.006 ng/ml 보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). PHA 자극 전에 溫清飲 0.1 mg/ml을 처리하면 1.028 ± 0.058 ng/ml, 1.0 mg/ml을 처리하면 0.141 ± 0.010 ng/ml로 溫清飲을 처리하지 않았을 때보다 각각 10.7%와 89.4%의 억제율을 나타내었다. 이상의 결과에서 보듯이 溫清飲 1.0 mg/ml의 전처리를 통하여 PHA에 의한 단구세포의 활성을 효과적으로 억제할 수 있었다.

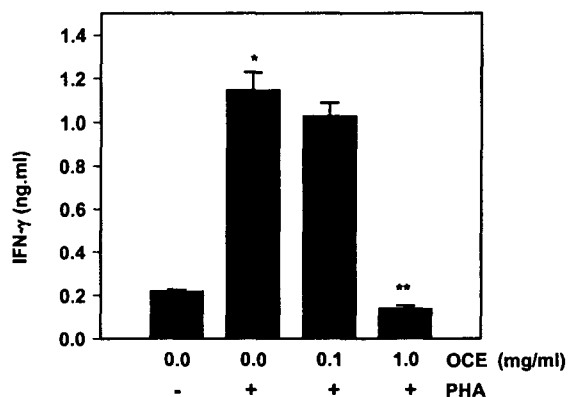


Fig. 3. Effect of Onchungeum (OCE) on PHA-stimulated IFN- γ production from PBMC of Behçet patients was measured by ELISA. PBMC (6×10^5 cells/ml) were cultured and stimulated with PHA for 24 h in the absence or presence of Onchungeum (0.1 and 1.0 mg/ml) for 30 min prior to stimulation. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared to saline value and **, $p < 0.001$ PHA-treated alone value.

5. cytokine 생성에 미치는 溫清飲과 CsA의 효과 비교

cytokine 생성에 미치는 溫清飲의 억제효과를 보다 확실하게 증명하기 위하여 효과가 우수한 면역억제제인 cyclosporin A의 억제효과와 비교하였다(Fig. 4). Cyclosporin A는 약 15년 동안 Behçet 병을 가진 환자의 포도막염 등의 치료를 위해 사용하여 왔으며 지금까지도 여전히 가장 효과가 우수한 치료약물로 사용되어지고 있다. 그림 4에서 溫清飲의 효과적인 농도인 1 mg/ml을 전처리 하였을 때와 cyclosporin A의 효과농도 5 μ g/ml을 전처리 하였을 때 각각의 cytokine 생성 억제율을 비교하여 나타내었다. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 모두에서 溫清飲이 cyclosporin A보다 20% 이상 더 높은 효과를 나타내었고, 단구세포로부터 분비된 cytokine의 양은 표 2에 정리하였다. 표에서 보듯이 溫清飲은 염증성, 면역성 cytokine의 생성에 있어 cyclosporin A보다 더 우수한 억제 효과를 보였고, 그 억제율은 IL-1 β , IFN- γ , TNF- α 의 순서로 높았다.

Table 3. Comparison with Onchungum and CsA on cytokine production

	TNF- α (ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	IFN- γ (ng/ml)
Saline	1.48 \pm 0.11	5.63 \pm 0.30	0.022 \pm 0.006
PHA	3.60 \pm 0.08	8.07 \pm 0.07	1.149 \pm 0.079
On-Chung-Eum	2.49 \pm 0.03**	5.30 \pm 0.08**	0.141 \pm 0.010**
CsA	2.95 \pm 0.22*	5.90 \pm 0.15*	0.479 \pm 0.046*

PBMC (6×10^5 cells/ml) were stimulated with PHA (25 μ g/ml) for 24 h in the absence or presence Onchungum (1 mg/ml) and CsA (5 μ g/ml). Statistically significance assessed by one-way ANOVA with post-hoc test of the means according to Tukey's method. *, p < 0.05, **, p < 0.001 compared to PHA-treated alone value.

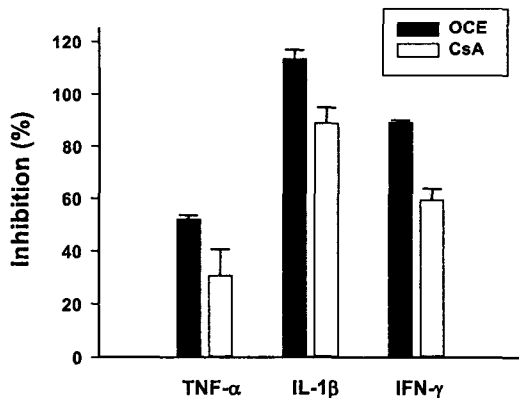


Fig. 4. Cytokine inhibitory effects of Onchungum (OCE) and CsA were compared. PBMC (6×10^5 cells/ml) were stimulated with PHA (25 μ g/ml) for 24 h in the absence or presence Onchungum (1mg/ml) and CsA (5 μ g/ml). The amount of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ produced from PBMC was measured by ELISA and calculated the inhibition rate. Each datum represents the mean \pm SEM of three independent experiments.

고찰

Behçets 證候群은 疼痛을 동반한 再發性 口腔潰瘍과 外陰部潰瘍, 葡萄膜炎 等の 眼疾患과 紅斑 等の 皮膚병변과 함께 關節炎, 神經系疾患 等を 동반하는 全身의 多發性 疾患으로 알려져 있다^{1,2,3,13}. 韓醫學에서 Behçets 證候群은 狐惑³, 口眼生殖器綜合證, 白塞氏綜合證¹⁴ 등으로 표현되는데, 金匱要略⁴에 “狐惑之爲

病 狀如傷寒 默默欲眠 目不得閉 臥起不安 蝕於喉爲惑 蝕於陰爲狐 不欲飲食 惡聞食臭 其面目乍赤 乍黑 乍白 蝕於上部則聾鳴 甘草瀉心湯主之. 蝕於下部則咽乾 苦蔘湯洗之. 蝕於肛者 雄黃熏之. 病者脈數 無熱 微煩 默默但欲臥 汗出 初得之三 四日 目赤如鳩眼 七 八日 目四眦黑 若能食者 膿已成也 赤小豆當歸散主之”라하여 咽喉와 陰部の 潰瘍과 眼疾患을 같이 記錄하고 있다. 원인으로는 憂思郁怒하고 過勞勞累하고 睡眠不足하면 肺·脾·腎의 三陰虧損하며 虛熱內生하고 復因正氣虛弱한데 風溫濕熱之邪 外侵하여 上蘊下注 氣血凝滯하여 發生한다고 하였다. 또한 諸病源候論¹⁵ 濕蠶病諸候에도 類似的 記錄이 보이는데 濕蠶病은 脾胃가 虛弱하여 水濕이 乘하거나 下利不止하거나 病後에 客熱이 腹內에 凝結하여 上下脣에 瘡이 생기고 肛門이 爛開한다 하였다. 본 疾患의 病因論 및 發病 機轉은 아직 확실하지 않으나 virus 感染說, 血栓性 靜脈炎說, 알레르기설, 교원병설 등 여러가지 사실이 제시되었으며 최근은 면역연구의 발달로 自家免疫說이 重要하게 생각되고 있다¹⁶. 自家免疫疾患으로 추정하는 이유는 본 疾患의 환자에서 면역복합체들의 增加, 皮膚抗原에 대한 지연형 過敏反應 皮膚병변의 조직소견중 심한 임파구침윤¹⁷ 등을 들고 있다. 본 疾患의 臨床症狀은 口腔, 皮膚, 外陰部 및 眼部를 침범하는 것으로, 가장 먼저 나타나며 거의 모든 환자에게 나타나는 口腔 症狀은 주로 口脣의 疳瘡, 구강 疳瘡, 잇몸, 혀끝, 혀측연이 침범되며 구개, 편도, 인두벽의 發生은 드물다. 병변은 초기에 발적이 되고 약간 튀어나오며, 1-2일 사이에 靨양을 형성한 뒤 백색 혹은 황색의 위막을 형성한다. 이러한 靨양은 一般적으로 흔적 없이 治愈되나 커다란 靨양인 境遇는 반흔을 남기기도 한다. 溫清飲⁵은 黃連解毒湯에 四物湯을 합방을 한 處方으로서, 黃連解毒湯은 黃連을 비롯한 네가지 약물로 구성된 처방으로 熱毒을 解除한다는 뜻이 있다. 熱毒은 火邪다. 熱毒이 陽에 入하면 狂하고, 心을 所擾하면 煩躁하고, 津液을 枯渴시키면 口燥,咽乾하고, 熱毒이 上逆하면 乾嘔하고 神을 昏하면 錯語하고, 胃에 入하면 發斑하고,血을 통하여 上行하면 吐衄血한다. 本方은 熱毒을 解除하므로, 疳瘡에 狂躁煩心,口燥,咽乾,乾嘔,錯語,吐血,衄血,發斑 등을 다스린다. 여기에 通治血病을 하는 四物湯을 合方함으로 해서, 出血로 인한 貧血과 皮膚病에 사용할 수 있다고 말하고 있다¹⁸. 연구결과 溫清飲은 PHA로 활성화된 Behçet 병 환자의 말초 혈액 단구세포로부터 cytokine들의 생성을 효과적으로 억제하였고, 이러한 결과는 溫清飲이 Behçet 병 환자의 cytokine 생성과 분비를 조절함으로써 면역과 염증반응을 조절할 수 있는 치료제임을 제시하고 있다. Behçet 병은 그 원인과 병리기전이 아직 정확히 밝혀지지 않은 질환이다. 감염원 등의 환경적 요인, 면역시스템의 비정상, HLA-B51 대립유전자의 발현빈도 등의 유전적 요인이 제시되고 있으나¹¹, 특히 최근에 면역시스템의 비정상을 나타내는 많은 데이터들과 Th1 세포에 의해 매개되는 염증반응에 대한 사실이 重要하게 여겨지고 있다²³. TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine은 염증반응의 전체 네트워크의 조절에 기여하며 염증성 질환에서도 중요한 역할을 하고 있다. 여러 보고들에서 염증성 cytokine과 Behçet 병의 연관성을 보여주는 연구들이 발표되었다. Mege 등은 Behçet 병 환자로 부터 분리한 단구세포

를 LPS (lipopolysaccharide)로 자극했을 때 TNF- α 의 생성이 현저하게 증가되는 것을 보고하였고¹⁰⁾, Sayinalp 등은 Behçet 병 환자의 혈청에서 TNF- α 가 의미있게 증가되어 있음을 관찰하였다¹¹⁾. 또한 Behçet 병 환자의 혈청 중에 IL-1 β 의 증가와 환자의 말초혈액으로부터 분리한 단구세포에서 IL-1 β 의 증가가 보고되었으나⁹⁾ 또 다른 연구에서는 그러한 IL-1 β 의 유의한 증가를 찾지 못하였다. 최근의 연구결과 Crohn's 병과 류마티스성 관절염을 포함하는 면역 및 염증 질환의 치료를 위한 목적으로 TNF- α 에 관심을 모으고 있다²⁵⁾. 류마티스성 관절염에서 TNF- α 와 함께 IL-1 β 의 역할을 억제할 경우에는 염증반응의 조절에 더욱 효과적인 결과를 나타냄이 보고되었다²⁶⁾. Behçet 병의 경우에도 이러한 치료법의 보고가 있는데 Hassard 등은 TNF- α 에 대한 항체가 위장관 질환을 앓고 있는 Behçet 병 환자에게 효과적인 치료방법이 될 수 있다는 것을 제시하였다²⁸⁾. 효과적인 면역 조절제이면서 항염증제로 사용되고 있는 thalidomide는 Behçet 병뿐만 아니라 다른 여러 면역체계의 질병에 성공적으로 사용되고 있는 약물이다²⁹⁾. 이러한 thalidomide는 사람의 단구세포로부터 TNF- α 생성을 억제하는 효과를 가진다³⁰⁾. 그리고 thalidomide 뿐만 아니라 또 다른 면역억제제 cyclosporin A는 PHA로 활성화된 사람의 단구세포로부터 INF- γ 의 생성을 의미있게 억제하는 것으로 보고되었다³¹⁾. INF- γ 는 면역반응을 조절하는 cytokine으로서 면역계에 포함된 세포들의 성장과 분화에 영향을 주는 cytokine이다. Behçet 병 환자에서 연구된 INF- γ 에 대한 연구에 따르면 정상인에 비해 환자의 말초혈액 단구세포에서 생성되는 INF- γ 의 양이 유의하게 높은 것으로 보고되었다. 본 연구를 통해 Behçet 병 환자에서 분리한 말초혈액 단구세포를 PHA로 자극할 경우에 溫清飲의 전처리가 염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β)과 Th1 cytokine (INF- γ)의 생성을 효과적으로 억제할 수 있음을 관찰하였다. 또한 본 연구에서 우수한 면역억제제 cyclosporin A와 함께 실험을 진행함으로써 溫清飲과의 효과를 비교한 결과 溫清飲이 cyclosporin A에 비해 cytokine 억제 효과가 더 우수하였다. 비록 cyclosporin A가 Behçet 병을 포함한 여러 질환에서 그 효과가 매우 우수한 약물로서 사용되고 있으나²⁰⁾ 장기적으로 임상에서 사용할 경우 약효의 감소라든지 뇌독성과 같은 여러 가지 부작용을 가지고 있다^{33,34)}. 그러나 韓醫學的 처방인 溫清飲은 그러한 부작용과 독성이 없으면서 본 연구에서는 cyclosporin A보다 더 우수한 효과까지 나타내었으므로 Behçet 병 치료에 대한 좋은 처방임을 제시할 수 있었다. 본 연구를 바탕으로 앞으로의 연구에서 溫清飲이 불균형한 Th1/Th2 cytokine들을 조절할 수 있는지와 면역에 관여한 세포들을 조절할 수 있는지 또는 신호전달과정의 분자들을 조절하는지의 여부를 조사하여 밝힘으로써 溫清飲의 정확한 조절기전을 밝힐 수 있을 것이다.

결론

1. 溫清飲으로 말초혈액 단구세포를 PHA 자극 전에 처리한 집단과 처리하지 않은 집단을 비교할 때, 溫清飲 0.1 mg/ml을 처리하면 TNF- α 량이 3.16 ± 0.04 ng/ml로 억제되며, 1.0 mg/ml을 처리

하면 TNF- α 량이 2.49 ± 0.03 ng/ml로 억제되어 溫清飲을 처리하지 않은 對照群보다 각각 20.8%와 52.3%의 억제율을 나타내었고, IL-1 β 의 양이 7.05 ± 0.22 ng/ml로 억제되며, 1.0 mg/ml을 처리하면 IL-1 β 의 양이 5.30 ± 0.08 ng/ml로 억제되어, 溫清飲을 처리하지 않은 對照群보다 각각 41.8%와 113.5%의 억제율을 나타내었다. 또, INF- γ 의 양이 1.028 ± 0.058 ng/ml로 억제되며, 1.0 mg/ml을 처리하면 INF- γ 의 양이 0.141 ± 0.010 ng/ml로 억제되어, 溫清飲을 처리하지 않은 對照群보다 각각 10.7%와 89.4%의 억제율을 나타내었으며, 溫清飲의 효과적인 농도인 1 mg/ml을 전처리 하였을 때와 cyclosporin A의 효과농도 5 μ g/ml을 전처리 하였을 때 각각의 cytokine 생성 억제율을 비교하였을 때, 溫清飲은 염증성, 면역성 cytokine의 생성에 있어 cyclosporin A보다 20% 이상의 더 우수한 억제 효과를 보였고, 그 억제효과는 IL-1 β , INF- γ , TNF- α 의 순서로 높게 나타났다.

이상의 실험결과로 보아 單球細胞 培養血液에서 溫清飲의 投與는 炎症性, 免疫性 cytokine의 生成抑制 效果에 有意性이 있으며, 향후 지속적인 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med* 341:1284-1291, 1999.
2. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamani PG. Behçet's disease. *Semin, Arthritis Rheum* 27:197-217, 1998.
3. Shimizu, T., Ehrlich, G.E. and Inaba, G. et, al: Behçet Disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 8: 223, 1979.
4. 何任 主編: 金匱要略講義, 湖南科學技術出版社, pp.47-50, 1990.
5. 龔廷賢: 增補萬病回春(下卷), 台北, 大中國圖書公司, p.83, 1967.
6. 洪元植: 中國醫學史, 서울, 東洋醫學研究院, p. 259, 1984.
7. 康秉秀: 漢方臨床알레르기, 서울, 成輔社, p. 189, 1988.
8. 裴元植: 增補最新漢方臨床學, 서울, 南山堂, pp. 589-593, p.741, 1982.
9. Yosipovitch G, Shohat B, Bshara J, Wysenbeek A, Weinberger A. Elevated serum interleukin 1 receptors and interleukin 1b in patients with Behçet's disease: Correlations with disease activity and severity. *Isr J Med Sci*, 31:345-348, 1995.
10. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, et al. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor α , interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 20:1544-1549, 1993.
11. Sayinalp N, Özcebe OI, Özdemir O, Haznedaroğlu IC, Dündar S, Kirazlı Ş. Cytokines in Behçet's disease. *J Rheumatol* 23:321-322, 1996.
13. Kastner DL. Intermittent and periodic arthritic syndromes. In: Koopman WJ, editors. *Arthritis and allied conditions: a*

- textbook of rheumatology. 13th ed. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1279-1306, 1997.
14. 吳之伍 外 : 中西醫結合治療白塞病療效觀察, 臨床皮膚科 雜誌, 26(3) : 183-184, 1997.
 15. 巢元方, 巢氏諸病源候論, 臺北, 集文書局, p.187, 1976.
 16. 김중남 : Behçet씨 證候群의 臨床的 研究, 이화의대지, 6(4) : 321-328, 1983.
 17. Haim S, Sobel JD, Friedman-Birnbaum R and Lichtig C: Histological and direct immunofluorescence study of cutaneous hyperreactivity in Behçet disease. Br. J. Dermatol. 95: 631-636, 1976.
 18. 申載鏞, 方藥合編解說, 成輔社, p.216, 1989.
 19. 李挺, 醫學入門, 서울, 南山堂, 卷四, p.206, 281, 卷六 p.455, 1996.
 20. 許浚, 原本東醫寶鑑, 南山堂, p. 396. 1989.
 21. 辛民教, 臨床本草學, 南山堂, p. 308,310,312,279,297,249,223, 221, 1986.
 22. 張介賓, 國譯景岳全書(上), 서울, 一中社, 6:474, 1992.
 23. Arbesfeld SJ, Kurban AK. Behçet's disease. New perspectives on an enigmatic syndrome. J Am Acad Dermatol 19:767-779, 1988.
 24. 金定濟, 診療要覽, 서울, 東洋醫學研究院, p.363, 1974.
 25. Bondeson J, Maini RN. Tumour necrosis factor as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases: the clinical experience with infliximab (Remicade). Int J Clin Pract 55:211-216, 2001.
 26. Chabaud M, Miossec P. The combination of tumor necrosis factor- α blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. Arthritis Rheum 44:1293-1303, 2001.
 27. 朴炳坤, 增補韓方臨床40年, 서울, 大光文化社, p.441, 1989.
 28. Hassard PV, Binder SW, Nelson V, Vasiliauskas EA. Anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy for gastrointestinal Behçet's disease: Case report. Gastroenterology 120:995-999, 2001.
 29. Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: Current and potential clinical applications. Am J Med 108:487-495, 2000.
 30. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. J Exp Med 173:699-703, 1991.
 31. McHugh SM, Rifkin IR, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ, Lockwood CM, et al. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral mononuclear cell cultures. Clin Exp Immunol 99:160-167, 1995.
 32. 李挺, 原本編註醫學入門(下), 서울, 南山堂, 3:351, 1866.
 33. Ozyazgan Y, Yurdakul S, Yazici H, Tuzun B, Iscimen A, Tuzun Y, et al. Low dose cyclosporin A versus plused cyclophosphamide in Behçet's syndrom: a single masked trial. Br J Ophthalmol 76:241-243, 1992.
 34. Kotake S, Higashi K, Yoshikawa K, Sasamoto Y, Okamoto T, Matsuda H. Central nervous system symptoms in patients with Behçet disease receiving cyclosporin therapy. Ophthalmology 1999;106:586-589, 1999.