

# 加味活血湯이 Rheumatoid arthritis 관련 사이토카인 및 轉寫因子에 미치는 영향

신상문 · 박종오 · 유동열 · 김동희\*

대전대학교 한의과대학

## Inhibitory Effect of Gamihwalhyeol-tang on Inflammatory Cytokine and NF- $\kappa$ B, AP-1 Activation in Human Synovial Cells

Sang Moon Shin, Jong Ho Park, Dong Youl Yoo, Dong Hee Kim\*

Department of Oriental Medicine, Daejeon University

The present study was carried out to examine the effects of Kami-hwal-hyeol-tang(KHHT) on the immune responses of synoviocyte cells prepared from the rheumatoid arthritis patients, and also on the collagen-mediated arthritis in mouse model. Several experiments were performed in vitro and in vivo to analyse the immunomodulatory effects of KHHT, and the major findings are summarized below : 1. KHHT did not show the cytotoxicity against mFLCs and hFLSs. 2. KHHT inhibited gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, NOS and GM-CSF in hFLSs. Furthermore, KHHT-treated hFLSs showed reduced production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6 compared to the control cells. 3. KHHT treatment of hFLSs inhibited the binding activity of NF- $\kappa$ B and AP-1 to their consensus DNA sequences. 4. KHHT treatment(400  $\mu$ g/ml) of hFLSs significantly inhibited hFLSs proliferations compared to the control cells. 5. KHHT significantly reduced the production of ROS in hFLSs compared to the control cells. The present data show that KHHT plays an important role for the regulation of AP-1 and NF- $\kappa$ B gene expression. Also, it was found that KHHT has anti-arthritis effect. Further studies of KHHT in relation to RA therapeutics may provide important information to develop drugs to treat this disease.

Key words : Gamihwalhyeol-tang(加味活血湯), Rheumatoid arthritis

### 서 론

류마(rheuma)란 용어는 AD 1세기에 "흘러내리는 液性 物質"의 뜻으로 처음 소개되었으며, "류마티즘"이란 인체 관절 부위에 關節炎을 일으켜 筋·骨格系 및 전신에 증상이 나타나는 현상을 총칭한다<sup>1)</sup>. 關節炎은 그 자체가 병이 아니고 류마티스 질환의 결과로서 표현되는데, 임상적으로 化膿性 關節炎, 結核性 關節炎, 류마토이드 關節炎(Rheumatoid arthritis, RA) 등으로 구분되며<sup>2,3)</sup>, 이 중 RA는 전체 성인 인구의 약 1% 정도가 발병하는 질환으로 慢性關節炎 중 退行性 關節疾患 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환<sup>1-3)</sup>이다. RA에 대한 병인은 아직 완전하게는 밝혀지지 않았지만, 感染, 호르몬의 不調和, Vitamin 缺乏 및 自家 免疫 反應

등으로 보고되고 있으며<sup>3,6)</sup>, 특히 최근에는 T 細胞가 중요한 역할을 하여 炎症 媒介體와 溶解 物質의 방출을 가져옴으로써 중국적으로 關節을 파괴한다는 自家 免疫 反應이 主 病機로 擡頭되고 있다<sup>3,4,6)</sup>. 韓醫學에서 RA를 비롯한 關節炎은 소위 《素問·痺論》<sup>7)</sup>에서 "風寒濕三氣雜至合而爲痺也 其風氣勝者爲行痺, 寒氣勝者爲痛痺, 濕氣勝者爲著痺"라고 언급된 바와 같이 동통을 동반하는 痺證과 가장 유사하다고 볼 수 있으며, 이 밖에 古來의 韓醫學 서적에서 나타나는 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風 및 產後風 등의 範疇<sup>8-10)</sup>에서 오늘날 RA를 포함한 關節炎과 유사한 病症과 病機를 찾을 수 있다. 최근 RA 치료제 개발을 위한 연구는 分子 生物學의 발전으로 질병을 일으키는 誘發 遺傳子나 關節炎 誘發 因子의 immuno-determinant sequence 들이 밝혀지고 있으며<sup>11,12)</sup>, 細胞 表面 단일클론 抗體, 抗炎症 관련 사이토카인과 관련 遺傳子 傳達體系 등에 대한 다양한 실험 연구<sup>13-15)</sup>가 보고되고 있다. 그러나 아직까지는 RA에 사용되는 치료제가 위장이나

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

E-mail : dhkim@dju.ac.kr Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2002/11/25 · 수정 : 2002/12/30 · 채택 : 2003/01/27

신장의 장애 등을 비롯한 다양한 副作用<sup>16)</sup>이 초래되어 이에 대한 보완이 절실히 요구되고 있다. 韓醫學界에서도 최근 연구 결과에 준하여 새로운 RA 治療劑 개발을 위하여 大防風湯, 桂枝芍藥知母湯 등의 祛風濕止痛, 舒筋活絡 작용이 강한 처방이나 약물을 선정하여 血液·組織學的 실험과 더불어 免疫調節作用에 대한 검색<sup>17,21)</sup> 등이 심도있게 이루어지고 있다. 본 試料인 加味活血湯<sup>22)</sup>은 產後風에 활용되는 처방으로 疎風活血湯에 補氣血, 祛風止痛하는 약물을 가미한 功補兼法의 처방이다. 王<sup>23)</sup>은 痺證 환자 480例의 臨床事例 報告에서 발병 원인중에 하나로 產後風을 언급한 바가 있고, 郭<sup>24)</sup>은 疎風活血湯加味方이 免疫調節作用을 통한 RA에 가장 효과적인 것으로 보고한 바가 있으며, 가미된 약물중 鷄血藤 역시 RA 관련 사이토카인 조절에 매우 효과적인 것으로 밝혀지고 있다<sup>25)</sup>는 점에서 본 시료의 RA에 대한 효과적인 작용이 기대된다. 이에 저자는 RA가 여성에게 好發하고 自家免疫疾患이라는 점에서, 產後風 치료 처방인 加味活血湯을 試料로 in vitro에서 Human Fibroblast-Like Synovio-cytes (hFLSs)에 interleukin-1β (IL-1β)와 tumor necrosis factor-α (TNF-α)를 처리한 후 다양한 炎症 유발 사이토카인의 발현 및 정량 변화를 검색하고, 염증 질환 관련 전사 인자인 AP-1, NF-κB의 활성 억제 효과, hFLSs 增殖抑制效果, 細胞內 reactive oxygen species (ROS)의 변화 등을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 가미활혈탕(KHHT)의 처방구성은 대전대 학교 부속한방병원 처방집<sup>22)</sup>에 준하였으며, 구성 약제는 대전대 학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Kamihwalhyul-tang(KHHT)

韓藥名	生藥名	分量(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	6
白芍藥	Paeonia Radix Alba	6
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	6
川芎	Cnidii Rhizoma	6
山查肉	Crataegii Fructuse	6
黃芪	Astragali Radix	6
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	6
威靈仙	Clendtidis Radix	4
白芷	Angelicae davuricae Radix	4
防己	Sinomenii Radix	4
人參	Gingseng Radix	4
黃柏	Phellodendri Cortex	4
南星	Arisaematis Rhizoma	4
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4
荊芥	Schizonepetae Herba	4
防風	Ledebourielae Radix	4
羌活	Angelicae koreande Radix	4
秦艽	Lycotoni Radix	4
桂枝	Cinnamomi Ramulus	4
麻黃	Ephedrae Herba	4
紅花	Carthami Flos	1
鷄血藤	Spatholobi Caulis Fructus	6
生薑	Zizyphi inermis Fructus	20

### 2) 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), (3, 4, 5)-dimethyl thiazol-(2, 5)-carboxy methoxyphenyl-(2, 4)-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), (2, 7)-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), bovine type II collagen, complete adjuvant, chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), DNase type I 등은 Sigma(U.S.A)사 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 Takara(Japan)사 제품을, 역전사효소(Moleoy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega(U.S.A)사 제품을, RNAzol<sup>B</sup>는 Tel-Test (U.S.A)사 제품을, 우태아혈청은 Hyclone(U.S.A)사 제품을, propidium iodide와 RNase는 Pharmingen(U.S.A)사 제품을, rhIL-1β, rhTNF-α는 R&D system(U.S.A)사 제품을, streptomycin, amphotericin B는 BM(U.S.A)사 제품을 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 기기는 CO<sub>2</sub> incubator(Forma Co., U.S.A.: Model 3226S), clean bench (Vision scientific Co., Korea), centrifuge(Beckman Co., U.S.A), inverted microscope (Nikon Co., Japan), bright microscope(Nikon Co., Japan), ELISA-reader(Emax, U.S.A), FACScan(Becton dickinson, U.S.A), rotary vacuum evaporator(Büchi Co., Switzerland), autoclave(Sanyo Co., Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A), camera(Nikon Co., Japan), microcentrifuge (한일과학, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), Turbo ThermocyclerTM (Bioneer Co., Korea), electrophoresis tank(Cosmos Co., U.S.A), cool block(FinePCR Co., Korea), mesh Screen(Sigma Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 추출물 분리

KHHT은 3첩 분량에 각각 증류수 2000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축한 뒤, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 KHHT를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) mLFCs 培養 및 細胞毒性 測定

mLFCs는 BALB/c 생쥐의 肺組織을 차가운 D-PBS로 3회 洗滌한 후 작은 조각으로 切斷하여 conical tube(15 ml)에 넣고 1,400 r.p.m.에서 5분간 遠心分離하였다. 이 후 tube에 collagenase A(5 mg/ml), DNase type I(0.15 mg/ml), Sigma), antibiotics (penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 μg/ml)가 포함된 DMEM를 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 培養器에서 2時間 동안 培養하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 添加하고 30分間 계속 培養한 후 人산완충생리식염수

(PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 遠心分離하고, DMEM-10% FBS에서 1주일 동안 培養하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFCs를 分離한 후 DMEM-5% FBS 培養液에 10<sup>5</sup> cells/ml 濃度로 맞추어 96 well plate에 분주하였다. 細胞毒性 測定은 SRB assay法<sup>26)</sup>을 變形하여 使用하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 培養하였다. 이 후 KHHT 抽出物(最終 濃度 400, 200, 100, 10, 1 µg/ml)을 48 時間 동안 處理하였다. 培養 終了 후에 培養液을 버리고 人산완충용액으로 2회 洗滌하였다. 각 well에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50 µl를 가하고 1 時間 동안 4°C에 방치한 후 蒸溜水로 5회 洗滌한 다음 well plate를 공기 중에서 乾燥하였다. 여기에 SRB(0.4%/1% acetic acid) 溶液을 100 µl/well로 가하고 室溫에서 30 分간 染色한 후 0.1% acetic acid 溶液으로 약 4-5회 洗滌한 다음 공기 중에서 乾燥하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader에서 540nm에서 吸光度를 測定하였다.

### 3) Human Fibroblast-Like Synoviocytes (hFLSs) 배양

충남대학교 의과대학 부속병원에서 류마티드 관절염 환자의 synovial tissue를 공급 받아 synovial membrane 조직을 차가운 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하여 conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube에 collagenase A (5 mg/ml), DNase type I (0.15 mg/ml), antibiotics (penicillin 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)가 포함된 RPMI 1640을 넣고 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양한다. 배양 후 PBS로 약 2 회 1,500 r.p.m.에서 spin한 후 RPMI 1640-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% Trypsin-0.2% EDTA로 hFLSs를 분리하여 RPMI 1640-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 24 well plate에 분주하였다. 細胞毒性 測定은 mLFCs의 細胞毒性 방법과 동일하게 시행하였다.

### 4) hFLSs의 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

#### (1) RNA 추출

hFLSs는 24 well plate에 1×10<sup>6</sup> 세포로 각 well에 분주하고, KHHT 추출물 (400, 200, 100, 1 µg/ml)을 처리하고 1 시간 후 rhIL-1β (10 U/ml)와 rhTNF-α (100 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 6 시간 배양한 후 2,000 r.p.m.에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500 µl를 넣고 lysis될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50 µl를 첨가한 후 15초간 혼합하였다. 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 r.p.m.에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 isopropanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 다시 13,000 r.p.m.에서 원심 분리한 후 70% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추

출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

#### (2) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 r.p.m.에서 5초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

#### (3) cDNA PCR

PCR 반응은 이미 합성된 3 µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, NOS-II 그리고 GM-CSF 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/µl)와 antisense primer (20 pmole/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 µl Taq polymerase (5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행한다. 각 PCR products는 20 µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20 분간 전기영동을 통하여 분석하였다. Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Sequence
IL-1β	sence	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAA-3'
	antisence	5'-AGCCCATGAGTTCACATTCAC-3'
IL-6	sence	5'-ATGAAGTCTCTCCACAAGCGC-3'
	antisence	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
TNF-α	sence	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGT-3'
	antisence	5'-GTCACAGTTTTACGCTGTATAGGG-3'
COX-2	sence	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'
	antisence	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'
iNOS	sence	5'-CGGAGATTGCTCAACAAC-3'
	antisence	5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'
β-actin	sence	5'-TGAATCCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisence	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

### 5) Real-time quantitative PCR 분석<sup>27)</sup>

#### (1) RNA extract and cDNA 합성

12 well plate에 hFLSs를 2×10<sup>6</sup> 세포를 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI 1640 배양액으로 overnight 시켰다. 여기에 KHHT (400, 100 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 rhIL-1β (10 U/ml)와 rhTNF-α (100 ng/ml)를 각각의 well에 첨가하여 4 시간

동안 동시 배양한 후 상층액을 제거하고, RNAzolB를 이용하여 hFLSs막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 분리된 total RNA는 DEPC를 처리한 20  $\mu$ l의 증류수에 녹인 후 DNase I (3 U/tube)을 처리하여 37°C의 항온수조에서 1 시간 배양하고, 72°C의 heating block에서 10 분간 불활성시킨 후 cDNA를 합성하였다.

(2) SYBR Green I with the Smart Cycler® System

Real-time PCR의 조건은 Taq Buffer : 75  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> : 105  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP : 60  $\mu$ l, 15  $\mu$ M S1 Primer : 15  $\mu$ l, 15  $\mu$ M A1 Primer : 15  $\mu$ l SYBR Green I(1/3000) : 75  $\mu$ l, EX Taq (5 U/ $\mu$ l) : 7.5  $\mu$ l를 혼합하여 14  $\mu$ l와 template 3  $\mu$ l, 그리고 증류수 8  $\mu$ l를 혼합하여 PCR를 기록하였다. 94°C에서 5 초, 60°C에서 20초, 72°C에서 5초를 한 cycle하여 40 cycles을 관찰하였다.

Table 2. Real-time PCR specific primers

Gene	Primer sequences	Size of products (bp)
TNF- $\alpha$	5-CTGGTGAAGCTTGCATCAC-3	150
	5-GGAACAATCCAGCAGCCGAG-3	
COX-2	5-GGAACAATGAAGCAGCCGAG-3	140
	5-GTAGAGTGAATGTCAGTGT-3	

6) ELISA에 의한 사이토카인 測定

hFLSs 細胞를 實驗 3日前에 subculture( $1 \times 10^5$  cells/ml) 하여 12 well plate에  $2 \times 10^6$  細胞를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 培養液으로 하룻밤 培養시켰다. 여기에 KHHT 抽出物(400, 100, 10  $\mu$ g/ml)을 處理하고 1時間 후 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$ 를 각각의 well에 添加하였다. 6時間 후 RPMI-1640 培養液으로 각 well을 洗滌한 후 새로운 培養液과 KHHT를 處理하고 48 hrs 時間 동안 CO<sub>2</sub> 組織培養器에서 培養하였다. 培養 終了後 全體 培養液을 2,000 rpm에서 5분간 遠心分離하여 상층액을 회수한 후 ELISA kit를 이용하여 IL-6와 TNF- $\alpha$  生産量을 測定하였다.

7) Electromobility shift assay (EMSA)

(1) 세포 배양 및 약물 처리

hFLSs를 6 well plate 각 well에  $1 \times 10^7$  세포씩 분주하고 우태아혈청결핍 RPMI 1640 배양액으로 overnight하였다. KHHT 추출물 (400, 100  $\mu$ g/ml)등을 처리하였고, 약물처리 1 시간 후 rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml)와 rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml)를 15분간 동시 배양하였다.

(2) Nuclear extract

배양한 세포를 4°C에서 1,200 r.p.m.으로 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 생리식염수로 수세하였다. 이 세포에 3배 부피의 완충용액 A (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.8)를 첨가하고 얼음에 10분간 방치한 후 2,000 r.p.m.으로 10 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 다시 완충용액 A를 가하고 0.1% 농도가 되도록 NP-40을 첨가하고 Dounce homogenizer B pestle을 이용

하여 세포를 마쇄하여 균질화하고 4°C에서 2,000 r.p.m.으로 10 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 이 세포에 완충용액 C (20 mM HEPES, 25% Glycerol, 0.35 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)를 2.5 ml 첨가하고 4°C에서 12,000 r.p.m.으로 1 시간 동안 원심 분리한 다음 상층액을 회수하여 18 시간 50배 부피의 완충용액 D (20 mM HEPES, 20% glycerol, 0.2 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)에서 투석하였다. 투석된 시료를 4°C에서 12,000 r.p.m.으로 1 시간 원심 분리한 후 상층액을 회수하였다.

(3) Gel mobility shift assay

EMSA를 위한 gel shift oligonucleotide 염기배열은 다음과 같다: annealing된 NF- $\kappa$ B; 5'-GGCAACTGCTCACTCTCCCTTT-3'와 AP-1; 5'-TGACTCA-3', probe 2  $\mu$ l, polynucleotide kinase 2  $\mu$ l, kinase buffer 1  $\mu$ l, 32P  $\gamma$ -dATP 3  $\mu$ l, D.W. 12  $\mu$ l를 넣고 혼합한 다음 37°C heating block에서 1 시간 방치한 후 짧게 원심 분리하였다. 원심 분리 후 1 $\times$ TE buffer 100  $\mu$ l를 넣고 혼합하고, sephadex G50 column에서 1,800 r.p.m.에서 5분간 원심 분리하여 hot probe 100  $\mu$ l의 hot probe를 얻어 probes로 사용하였다.

DNA와 핵단백질과의 결합반응은 20  $\mu$ g의 nuclear extract, 2  $\mu$ g의 poly (dl-dC)가 들어있는 반응액 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 250  $\mu$ g/ml BSA)에 competitor를 첨가하거나 첨가하지 않고 얼음 위에서 30 분간 반응시키고 미리 준비한 각각의 labelled-probe (0.5-1.0 ng, 100,000~2,000,000 cpm)을 첨가한 후 다시 30분간 얼음 위에서 반응시켰다. 6% polyacrylamide gel을 20 분간 pre-run을 하여 반응액을 loading 한 다음 150 V, 10 mA로 3 시간 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue (BPB) dye가 밑으로부터 1~2 cm정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추고 이를 vacuum gel dryer (Bio-Rad)에서 약 한 시간 건조한 다음 X-ray film에 노출시켜 감광시켰다.

8) hFLSs 增殖 抑制效果 測定

rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$ 를 處理한 hFLSs 細胞의 增殖 抑制 程度를 測定하기 위하여 96 well plate의 각 well에  $2 \times 10^6$  cells씩 添加하고, KHHT(400, 100, 10  $\mu$ g/ml)를 濃度別로 處理한 후 細胞를 37°C에서 72 時間 培養 後, 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 3 分間 shaking하고 ELISA reader에서 490 nm에서 吸光度를 測定하였다.

9) 細胞內 reactive oxygen species (ROS)의 分析

rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$ 를 處理한 hFLSs 細胞內의 ROS를 測定하기 위하여 24 well plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cells씩 添加하고, 여기에 KHHT(100  $\mu$ g/ml)를 處理한 後 細胞를 37°C에서 48 時間 培養하였다. 培養 終了 後 DCFH-DA 50  $\mu$ M을 處理하고 5 分間 培養하고 2 回 水洗한 後 flow cytometer로 細胞內 螢光 DCF 또는 ROS를 測定하였다.

## 실험성적

### 1. mLFC와 hFLS 세포에 대한 세포독성

mLFC 세포에 대한 세포독성 평가에서는 대조군에 비해 KHHT의 400, 200, 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $94.4 \pm 3.7$ ,  $96.0 \pm 4.8$ ,  $97.4 \pm 5.2$ ,  $99.1 \pm 4.8$ ,  $99.9 \pm 3.4\%$ 의 세포 생존율이 나타났고, hFLS 세포에서는 400, 200, 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $93.8 \pm 4.4$ ,  $94.2 \pm 3.9$ ,  $98.6 \pm 4.0$ ,  $97.4 \pm 3.1$ ,  $99.5 \pm 4.6\%$ 로 나타났다(Fig. 1).

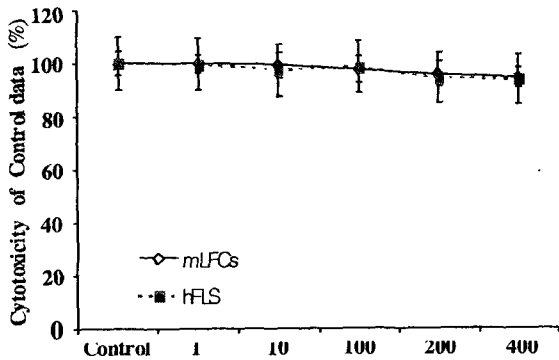


Fig. 1. Cytotoxicity effects of KHHT extract on mLFCs and hFLSs of mouse. Mouse lung fibroblast cells(mLFCs) and human fibroblast-like synoviocytes (hFLSs) were pretreated with various concentration KHHT extract. The results are expressed the mean $\pm$ SE (N=6).

### 2. 활약막 세포의 염증 유발 싸이토카인에 미치는 영향

#### 1) IL-1 $\beta$ 유전자 발현에 미치는 영향

KHHT가 IL-1 $\beta$  유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, media control의 Ht값은 21, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ht값은 188로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 투여군은 각각 47, 94, 136, 167로 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 2).



Fig. 2. Inhibitory effects of KHHT extract on mRNA expression of IL-1 $\beta$  in hFLSs.

#### 2) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

KHHT가 IL-6 유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, media control의 Ht값은 14, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ht값은 195

로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 투여군은 각각 15, 32, 65, 115로 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 3).

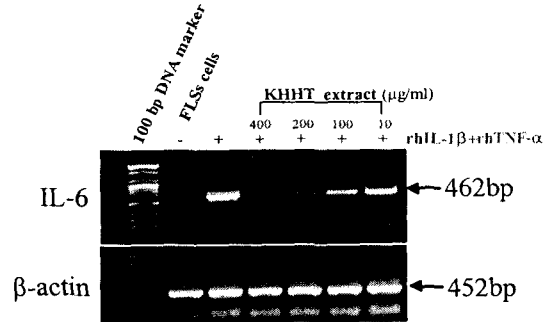


Fig. 3. Inhibitory effects of KHHT on mRNA expression of IL-6 in hFLSs.

#### 3) TNF- $\alpha$ 유전자 발현에 미치는 영향

##### (1) RT-PCR 분석

KHHT가 TNF- $\alpha$  유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, media control의 Ht값은 145, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ht값은 171로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 투여군은 각각 160, 158, 168, 173으로 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 4).

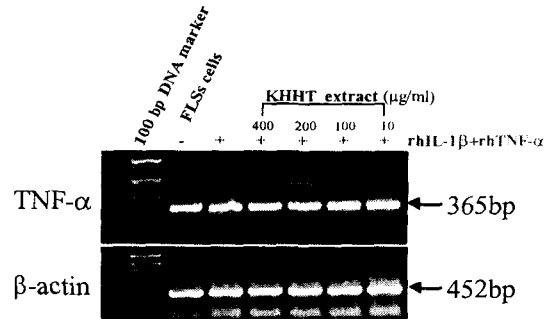


Fig. 4. Inhibitory effects of KHHT extract on mRNA Expression of TNF- $\alpha$  in hFLSs.

##### (2) Real-time quantitative RT-PCR 분석

SYBR Green을 이용하여 TNF- $\alpha$ 의 mRNA를 real-time quantitative RT-PCR로 정량 실험을 수행한 결과 PCR 33 cycles에서 hFLS 세포에 비하여 대조군(rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  처리군)이 약 4배의 FI 값이 관찰되었고, 대조군에 KHHT를 처리한 실험군은 대조군에 비하여 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 거의 50% TNF- $\alpha$  mRNA 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

#### 4) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

##### (1) RT-PCR 분석

KHHT가 COX-2 유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, 음성

대조군인 media control의 Ct값은 28, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ct값은 119로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu$ g/ml의 농도 투여군은 각각 24, 31, 70, 72로 나타나 모든 농도에서 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 6).

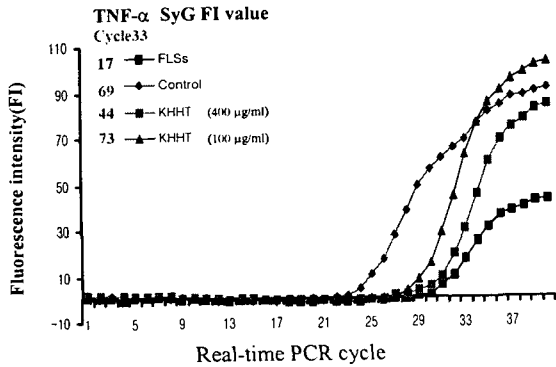


Fig. 5. Effects of KHHT on TNF- $\alpha$  mRNA expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Human FLSs were cocultured with KHHT isolated from hFLSs pretreated with rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml + rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 6 hours. The graphic show the evolution of the fluorescent intensity signal related cycle number on a panel of quantified TNF- $\alpha$  mRNA expression in hFLSs using SYBR Green I dye.

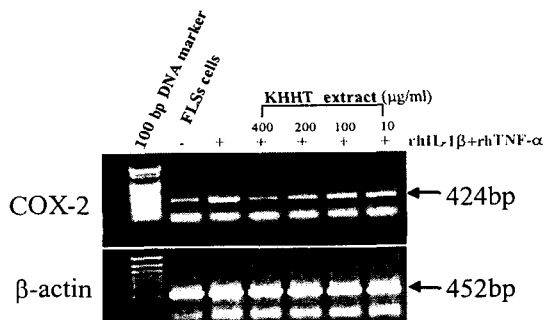


Fig. 6. Inhibitory effects of KHHT extract on COX-2 mRNA expression in hFLSs.

(2) Real-time quantitative RT-PCR 분석

SYBR Green을 이용하여 hFLS 세포에서 발현되는 COX-2의 mRNA를 real-time quantitative RT-PCR로 정량실험을 수행한 결과 PCR 33 cycles에서 hFLS세포에 비하여 대조군(rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  처리군)이 약 1.5배의 FI값이 관찰되었고, 대조군에 KHHT를 처리한 실험군은 대조군에 비하여 400  $\mu$ g/ml에서 거의 50% TNF- $\alpha$  mRNA 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

5) NOS-II 유전자 발현에 미치는 영향

KHHT가 NOS-II 유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, 음성대조군인 media control의 Ct값은 32, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ct값은 128로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu$ g/ml의 농도 투여군은 각각 25, 30, 77, 79로 나타나 모든 농도에서 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 8).

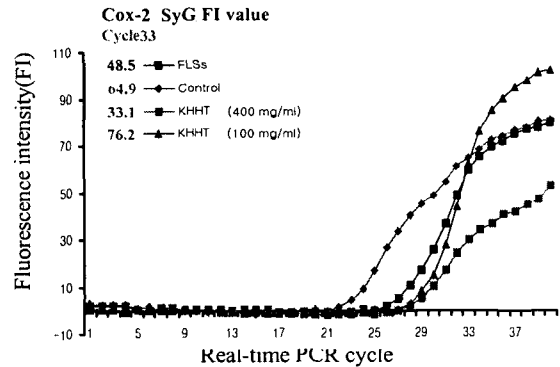


Fig. 7. Effects of KHHT on COX-2 mRNA expression in hFLSs using SYBR Green I dye. Human FLSs were cocultured with KHHT isolated from hFLSs pretreated with rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml + rhTNF- $\beta$  (100 ng/ml) for 6 hours. The graphic show the evolution of the fluorescent intensity signal related cycle number on a panel of quantified COX-2 mRNA expression in hFLSs using SYBR Green I dye.

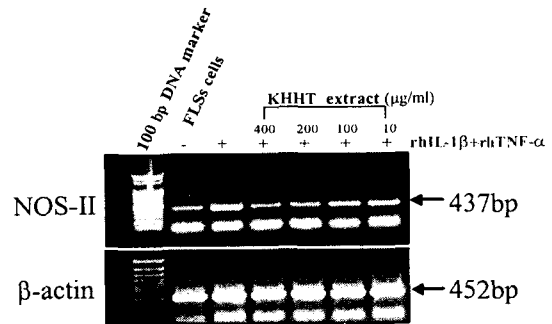


Fig. 8. Inhibitory effects of KHHT extract on NOS-II mRNA expression in hFLSs.

6) GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향

KHHT가 GM-CSF 유전자에 미치는 영향을 알아본 결과, 음성대조군인 media control의 Ct값은 35, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군의 Ct값은 157로 나타났으며, KHHT 400, 200, 100, 10  $\mu$ g/ml의 농도 투여군은 각각 27, 65, 126, 133으로 나타나 모든 농도에서 rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$  투여군에 비해 감소하였다(Fig. 9).

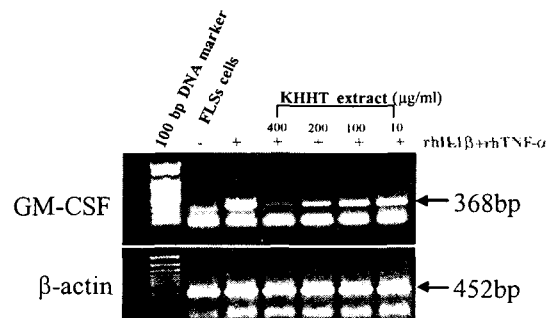


Fig. 9. Inhibitory effects of KHHT extract on GM-CSF mRNA expression in hFLSs.

3. ELISA kit에 의한 염증 유발 사이토카인 정량

1) IL-1 $\beta$  분비량에 미치는 효과

hFLS에서 KHHT가 IL-1 $\beta$  분비량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ELISA kit로 측정된 결과, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$ 만을 처리한 대조군은 105.5 $\pm$ 13.2(pg/ml)로 나타난 반면, KHHT 400, 100, 10  $\mu$ g/ml 병용 처리군은 각각 15.2 $\pm$ 5.3, 79.1 $\pm$ 12.2, 107.0 $\pm$ 9.3(pg/ml)으로 나타나, 대조군에 비하여 IL-1 $\beta$  분비량을 농도 의존적으로 억제하였으며, 400  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

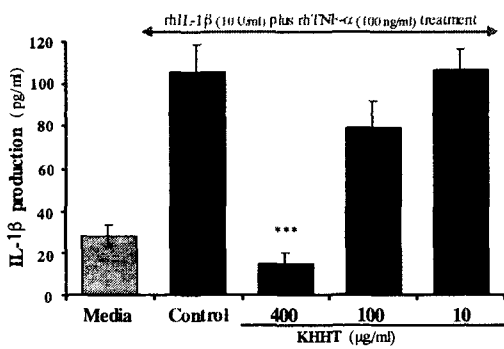


Fig. 10. Inhibitory effect of KHHT on the IL-1 $\beta$  production. Human fibroblast-like synoviocytes were pretreated with various conc. of KHHT in the presence or absence rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml) and rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 6h. After 6h, RPMI 1640-free washed two repeat and fresh RPMI 1640 media supplemented with 1% FBS. The supernatants were collected after 72h and IL-1 $\beta$  concentration in the culture supernatants was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

2) IL-6 분비량에 미치는 효과

hFLS에서 KHHT가 IL-6 분비량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ELISA kit로 측정된 결과, rhIL-1 $\beta$ 와 rhTNF- $\alpha$ 만을 처리한 대조군은 3,790 $\pm$ 366.1(pg/ml)로 나타난 반면, KHHT 400, 100, 10  $\mu$ g/ml 병용 처리군은 각각 250 $\pm$ 24.3, 1027 $\pm$ 98.4, 3567 $\pm$ 302.6 (pg/ml)으로 나타나, 대조군에 비하여 IL-6 분비량을 농도 의존적으로 억제하였으며, 100  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 유의성 있게 억제하였다(Fig. 11).

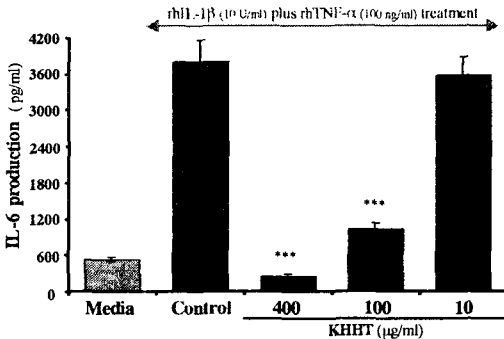


Fig. 11. Inhibitory effect of KHHT on the IL-6 production. Human fibroblast-like synoviocytes were pretreated with various conc. of KHHT in the presence or absence rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml) and rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 6h. After 6h, RPMI 1640-free washed two repeat and fresh RPMI 1640 media supplemented with 1% FBS. The supernatants were collected after 72h and IL-6 concentration in the culture supernatants was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

4. hFLS에서 NF- $\kappa$ B binding activity에 미치는 영향

KHHT가 염증 전사 인자인 NF- $\kappa$ B binding activity에 미치는 영향을 검색한 결과, Fig. 12에서와 같이 대조군에 비하여 KHHT 투여군의 DNA-binding 활성이 억제되었다.

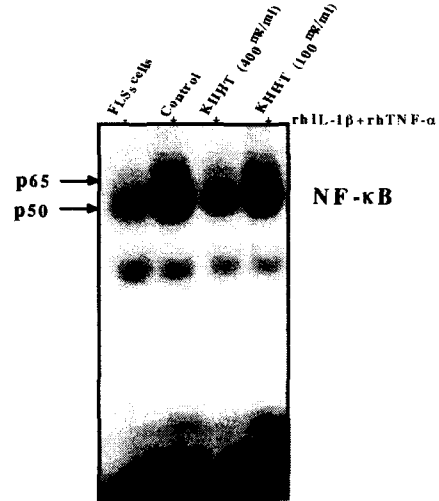


Fig. 12. Effects of KHHT on DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B in hFLSs. Human FLSs were pretreated with various conc. of KHHT (400 and 100  $\mu$ g/ml) in the presence or absence rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml) plus rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 6h. Nuclear extracts from hFLSs were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels. Electrophoretic mobility shift assay by NF- $\kappa$ B binding activity.

5. hFLS에서 AP-1 binding activity에 미치는 영향

KHHT가 염증 전사 인자인 AP-1 binding 활성에 미치는 영향을 검색한 결과 Fig. 13에서와 같이 대조군에 비하여 KHHT 투여군의 DNA-binding 활성이 억제되었다.

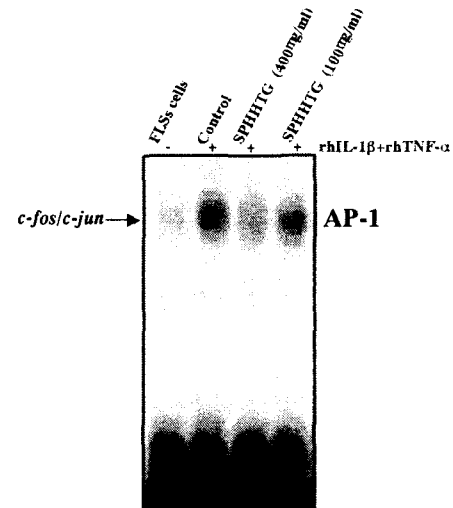


Fig. 13. Effects of KHHT on DNA-binding activity of AP-1 in hFLSs. Human FLSs were pretreated with various concentration of KHHT (400 and 100  $\mu$ g/ml) in the presence or absence rhIL-1 $\beta$  (10 U/ml) plus rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml) for 6h. Nuclear extracts from hFLSs were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels. Electrophoretic mobility shift assay by AP-1 binding activity.

6. hFLSs 증식에 미치는 영향

hFLSs 증식에 미치는 영향에서는 rhIL-1β (10 U/ml)와 rhTNF-α 만을 처리한 대조군은 1.87±0.09(OD)으로 나타났고, rhIL-1β (10 U/ml), rhTNF-α와 KHHT 400, 100, 10 μg/ml 병용 처리군은 각각 1.06±0.08, 1.94±0.09, 1.88±0.10(OD)로 나타나, 대조군에 비하여 모든 실험군에서 hFLS 세포 증식을 억제하였으며, 400 μg/ml 처리군에서는 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 14).

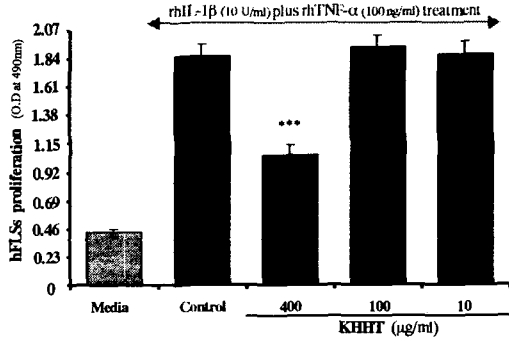


Fig. 14. Effect of KHHT on the hFLSs proliferation.

7. 세포내 reactive oxygen species (ROS)에 미치는 영향

ROS 생산량은 rhIL-1β (10 U/ml)와 rhTNF-α을 처리한 대조군에 비하여 KHHT(100 μg/ml) 병행 처리군에서는 Fig. 15에서와 같이 ROS 생산량이 감소되었다.

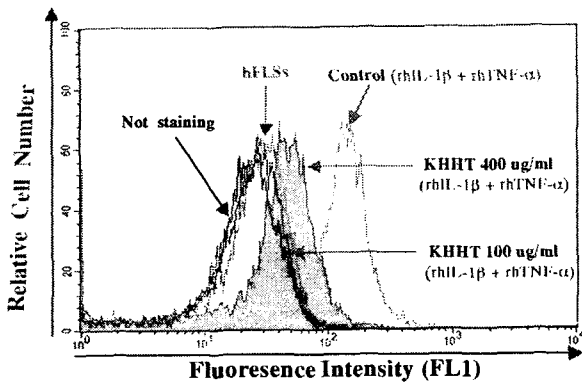


Fig. 15. Inhibitory effect of KHHT on the ROS production in hFLSs. Human FLSS were cocultured with KHHT and hFLSs pretreated with rhIL-1β (10 U/ml) + rhTNF-α (100 ng/ml) for 48 hours. After cultured, DCFH-DA reagent (50 mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS production by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

고찰

류마티오이드 관절염(RA)은 만성 전신성 염증 병변의 일환으로 주로 말초 관절을 침범하며, 특히 손목과 손의 작은 관절을 침범하는데, 관절염 이외에도 피부, 혈관, 심장, 폐, 근육 등 전신의 장기 조직을 침범하여 비화농성 증식성 활막염을 일으킨다

<sup>1,3,11,13,16</sup>. 염증은 조직 손상에 대한 정상적인 방어기전으로서 정상적으로는 염증 유발 요인을 제거, 손상된 조직의 치유, 기능의 회복을 가져오지만, RA와 같은 만성 질환에서는 원인의 제거가 불가능하여 결국 계속되는 염증으로 인하여 조직의 손상에 따른 기능 손실을 가져온다<sup>1-3,4,6</sup>. 현재 RA에 대한 약물 치료는 크게 소염진통제(NSAIDs), 항류마티스제제(DMARDs), 부신피질 호르몬제제로 구분할 수 있으나<sup>29</sup>, NSAIDs는 위장관이나 신장의 장애를 초래하고, 부신피질 호르몬제중 일부는 골다공증, 위장관 장애, 당뇨병, 고혈압 등 다양한 합병증이 발생하며, 항류마티스제제(DMARDs)는 약제에 따라 작용 기전과 부작용 및 기대되는 약효의 신속성 등이 서로 다르다는 단점이 있다<sup>28,29</sup>. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근 활발히 연구가 진행되고 있는 치료 방법은 proinflammatory 사이토카인의 길항 물질을 이용하는 방법과 유전자 치료 방법 등이다<sup>11-15</sup>. 현재 류마티오이드 관절염에 가장 많이 쓰이는 약인 비옥스(Vioxx), 셀레브렉스(Celebrex), 엔브렐(Enbrel) 등은 모두 염증을 완화하기 위해 사이토카인에 작용하는 약들이다. 한의학에서 RA는 소위 《素問·痺論》<sup>7</sup>에서 “風寒濕三氣雜至合而為痺也 其風氣勝者為行痺, 寒氣勝者為痛痺, 濕氣勝者為著痺”라고 언급된 바와 같이 동통을 동반하는 비증과 가장 유사하다고 볼 수 있으며, 이 밖에 古來의 한의학 서적에서 나타나는 痛風, 歷節風, 鶴膝風, 白虎歷節風 및 產後風 등의 범주에서 오늘날 RA를 포함한 관절염과 유사한 病症과 病機를 찾을 수 있다<sup>8-10</sup>. 주요 병인으로는 내경에서 주로 風寒濕 外邪가 病證의 중요 원인<sup>7</sup>으로 기재된 이후 《醫學心悟》<sup>30</sup>에서는 풍·한·습사의 성질에 따른 비증의 특징을 기술한 바가 있고, 《巢氏諸病源候論》<sup>31</sup>《景岳全書》<sup>32</sup>《外臺秘要方》<sup>33</sup>등에서는 기본적으로 인체 정기가 허한 상태에서 풍·한·습사의 침입으로 발생한다고 기술하여 정기의 허실 유무가 중요함을 언급하였고, 《金匱要略》<sup>34</sup>에서는 “此皆飲酒 汗出 當風所致”로, 《三因方》<sup>35</sup>에서는 風濕이 相搏하거나 飲酒, 汗出入水 등으로 痰이 형성되어 발병한다고 보았다. 따라서 한의학에서 RA를 포함한 관절염의 치료는 대부분 祛風, 散寒, 除濕을 중심으로 清熱, 化痰祛瘀, 活血通絡 및 滋補肝腎 등의 방법이 활용되고 있다<sup>7-10,17-25</sup>. 실제로 이러한 이들 치료법들은 소위 양방에서 RA 치료의 궁극적인 목표로 삼는 염증과 연관이 있는 관절통, 조직강직, 전신 피로감, 활막염 소견, 관절이나 뼈 손상의 진행, ESR 이나 CRP 치의 상승 등에 대하여 완전 관해를 유도함으로써 임상적으로 매우 효과적임이 치료 과정에서 증명되고 있다. 본 시료인 가미활혈탕은 대전대학교 부속한방병원에서 산후풍으로 인한 관절통에 활용되는 처방<sup>22</sup>으로 疎風活血湯에 補氣血, 祛風止痛하는 약물을 가미한 功補兼法의 처방이다. 기존에 이미 疎風活血湯과 약물 구성에 있어 유사한 처방들의 항관절염 효과가 실험적으로 규명된 바가 있고<sup>17,18,23,36</sup>, 특히 최근 과<sup>24</sup>의 논문에서 疎風活血湯加味方이 면역 조절작용을 통한 RA에 가장 효과적인 것으로 보고된 바가 있으며, 안<sup>36</sup>은 류마티오이드 관절염 환자에 대하여 疎風活血湯이 ESR, CRP, RBC 등에 유의성있는 변화를 초래함을 보고한 바가 있어, 산후풍으로 인한 관절통에 응용되는 본 시료 역시 RA를 포함한 관절염에 유의적인 결과가 기대된다. 특히 여성 환자가



남성에 비해 3 : 1 정도로 발병율이 높다는 점에서 여성 질환 치료제에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. RA에 대한 원인 및 발병 기전은 아직 밝혀지지 않은 것이 많지만 면역유전적으로 감수성을 가진 숙주가 미생물인 환경에 폭로됨으로써 시작되고 계속되는 자기면역 반응으로 T 세포가 중요한 역할을 하여 염증 매개체와 용해 물질의 방출을 가져옴으로써 종국적으로 관절을 파괴한다는 면역학적 이론이 주를 이루고 있다<sup>1,3,4,6,11-15</sup>. 일단 여러 원인에 의해 염증성 활막염이 시작하면 T세포 특히 CD4+나 기억세포가 류마티스 관절염의 초기에 이환된 관절안에 나타나며, 곧이어 활막 모세관의 내피세포에서 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)이 나타나고 다른 염증 세포의 유출과 부착이 진행된다<sup>3,6</sup>. 현재까지 관절 부위에 파괴적이고 증식성인 활막염을 가져오는 매개체로 알려진 것은 활성화된 림프구, 대식세포, 그리고 다른 종류의 세포가 생산하는 분비물 등이 있는데, 이들 사이토카인의 국소적인 생산물이 RA의 병리적, 임상적 양상의 원인으로 생각되고 있다<sup>37,38</sup>. 즉 이들 사이토카인의 활성도가 류마티스 활막염의 여러 양상인 활막조직염증, 활막염증, 활막 증식, 연골과 골의 손상 등과 RA에서의 전신 양상을 나타내는 원인으로 인식된다. RA 관련 사이토카인으로는 T림프구에서 나온 IL-2, IL-6, 과립세포-대식세포 colony 자극요소(GM-CSF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 등이 있고, 활성화된 대식세포에서 유래하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage CSF, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 등이 있으며, 이 외에 fibroblast, endothelial cell 등에서 분비하는 IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, macrophage, CSF 등이 있다<sup>40,42-44</sup>. RA에 있어서는 특히 IL-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 염증을 유도하는 중요한 사이토카인으로 알려져 있으며, 최근 연구된 치료제중 IL-1과 TNF를 차단하는 약물들이 이미 류마티스 관절염 치료제로서 승인을 받고 있다<sup>40,42-44</sup>. IL-1 $\beta$ 는 TNF- $\alpha$ 와 같이 섬유세포, 과립세포로부터 MMP의 방출을 자극하고, NF- $\kappa$ B 전사인자와 JNK kinases, p38 kinases의 하부 활동을 유도함으로써 조직 손상을 일으키는데<sup>40,43</sup>, 본 실험에서는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, 200  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 50% 이상 감소하였으며(Fig. 2), ELISA kit에 의한 분비량에 대한 정량 확인에서도 100  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 10). IL-6는 단핵구와 대식세포, 활막세포, T세포에 의해 생산되는 다기능의 염증성 사이토카인으로서, 특히 IL-1과 TNF- $\alpha$ 에 의해 분비가 촉진되는데<sup>37,39</sup>, 본 실험에서는 대조군에 비하여 모든 농도에서 큰 폭으로 감소하였으며(Fig. 3), 분비량에 대한 정량에서도 100  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 유의성있게 억제되었다(Fig. 11). RA에서 TNF- $\alpha$ 는 활액(synovial fluid)의 대식세포(macrophage)에서 일차적으로 생산되고 RA 관절에서 높은 농도로 나타나며, TNF- $\alpha$ 를 저해하면 IL-1, IL-6와 granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)를 억제된다<sup>37,39,43</sup>. 최근 Feldman 등<sup>44</sup>은 사람 TNF에 대한 monoclonal 항체를 관절염 환자의 정맥내로 주사한 결과, 관절 부종과 혈청 C-reactive 단백질의 수준이 극적으로 개선되는 것을 볼 수 있었다고 보고한 바가 있다. 본 실험에서는 in vitro

(RT-PCR과 real-time quantitative RT-PCR)에서 모두 TNF- $\alpha$  유전자 발현 및 분비량이 유의적으로 억제되어 IL-1, IL-6 발현 결과와 역시 부합됨으로써 본 시료가 특히 관절염과 가장 유관한 IL-1, TNF- $\alpha$  및 IL-6 간의 염증 유도 기전에 매우 효과적으로 작용함을 알 수 있다. IL-1, IL-6와 함께 활성화된 대식세포에서 유래하는 또 다른 사이토카인으로, 관절 활막세포와 대식세포의 증식을 유도하는 GM-CSF<sup>37,41</sup> 유전자 발현 역시 대조군에 비하여 농도의존적으로 모든 농도에서 감소하였다(Fig. 4, 5).

Prostaglandin synthase(cyclooxygenase)는 두 개의 isoform인 COX1과 COX2로 되어 있는데<sup>45</sup>, 이 중 COX2는 RA 활막같이 염증이 있는 조직에서의 prostaglandin 형성에 주로 관여하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>45,46</sup>. 또한 COX2는 IL-1, TNF, LPS같은 mitogen 이나 reactive oxygen intermediates 염증 유발 자극 인자들에 의해 활성화되어 prostaglandin을 증가시키는 까닭에 현재 prostaglandin synthase 2(COX2)를 선택적으로 억제시키는 NSAIDs 약제 개발에 많은 연구<sup>46,47</sup>가 이루어지고 있다. 본 실험에서 hFLSS에서의 COX-2 유전자 발현 평가에서는 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 큰 폭으로 억제되었으며, real-time quantitative RT-PCR에 의한 정량 실험에서도 400  $\mu$ g/ml 농도에서 50% mRNA 발현이 억제되었다(Fig. 6, 7). 이 역시 IL-1, TNF 유전자 발현 결과와 부합되어, 본 시료가 IL-1, TNF 등의 사이토카인 활성을 억제함으로써, COX-2 유전자 발현을 큰 폭으로 억제한다고 추측할 수 있다. NO는 RA에서 혈액 유입 증가, chondrocytes에 의한 matrix 생산의 억제 metalloproteinases의 활동, 면역 반응의 변화, osteoblast 활동 억제, 사이토카인 유발, osteoclastic bone resorption의 증진 등에 관계한다는 많은 연구<sup>48-50</sup>가 보고되었다. 특히 염증 발현은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 pathway를 유발하는 활동 때문으로 보고되고 있는데, iNOS 경로는 IL-1, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  등의 염증전구 세포에 의해 활성화된다<sup>51</sup>. 실제로 관절염 조직에는 염증성 사이토카인인 IL-1이 다량 존재하고 과다한 NO를 생성하는 iNOS가 발현된다. 과다 생성된 NO는 염증성 연골세포의 정상 대사과정 중에 대량 생성되는 활성산소 superoxide anion ( $O_2^-$ )과 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 생성함으로써 연골세포에 산화적 스트레스를 가하여 관절염의 원인이 되는 것으로 추정되고 있다<sup>49,50</sup>. 최근 Animal model에서 관절 염증과 조직 손상이 NOS 억제제의 투여로 감소되었다는 보고<sup>52</sup>는 이 같은 사실을 증명해주고 있다. 본 실험에서도 IL-1, TNF- $\alpha$  유전자 발현 결과와 일치하게 NOS-II 유전자 발현이 농도 의존적으로 모든 농도에서 큰 폭으로 감소하였다(Fig. 8). 염증 질환과 관련 있는 전사 인자로는 AP-1, NF- $\kappa$ B, STATs로, 이들은 직·간접적으로 MAP kinase (MARK) pathway에 의해 조절되며, 이러한 인산화 정보 전달은 다양한 세포의 자극에 의해 활성화되고, 염증 질환에서 유전자 전사를 조절한다<sup>43,53,54</sup>. 사이토카인과 교차분자의 유전자 발현은 다양한 전사인자에 의해 조절되며, 이 중의 하나인 NF- $\kappa$ B는 산화 환원 반응에 민감한 전염증성(proinflammatory) 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로, 염증 과정에 중요한 역할을 한다. NF- $\kappa$ B에 의해 유도 증가된 사이토

카인은 관절에서 백혈구를 끌어들이는 혈관 고착 분자의 발현과 세포외기질을 쇠퇴시키고 파괴시키는 MMP를 증가시킨다<sup>53,54</sup>. 또 다른 전사인자인 Activating protein-1 (AP-1)은 관절염에서 활액세포의 성장을 증가시키고, 파골 세포에서 collagen 합성을 억제하기도 하며, 파골성 골흡수를 증가시키는 요소를 방출하는 파골세포를 자극한다<sup>55</sup>. 본 실험에서 NF-KB binding activity에 미치는 효과에서는 400 µg/ml 농도에서 현저하게 억제되었으며, AP-1 binding activity는 200 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 12). NF-κ B가 활성화됨에 따라 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등의 사이토카인 발현이 야기된다는 점에서 NF-κ B 활성 억제 결과 역시 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 발현 결과와 부합되고, 상기한 IL-10 발현 증가는 RA에 대한 본 시료의 면역조절 작용을 시사해주고 있다. 인간의 폐를 통해 흡수된 대부분의 산소는 mitochondria 내에서 ATP를 생산하는데 이용되지만 약 5% 정도는 호흡의 부산물 반응에 의해 인체에 해로운 것으로 알려진 ROS로 전환되며 지속적인 ROS의 생성은 세포를 구성하는 DNA, 단백질, 지방 등의 생체 고분자 물질을 산화시켜 세포의 기능을 서서히 저하시키는 것으로 알려져 있다<sup>56,57</sup>. 따라서 ROS에 의한 세포기능의 저하는 곧 퇴행성 질환을 일으키는 것으로 생각되고 있는데, 본 실험에서 ROS 생산량은 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 감소하여(Fig. 15) NOS-II 유전자 발현 결과(Fig. 8)와 부합되었다.

## 결 론

加味活血湯이 免疫調節作用을 통한 RA 病機 및 病態 모델에 미치는 影響을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다. mFLCs와 hFLSs에 대한 독성 실험에서는 모두 90% 이상의 세포 생존율이 나타나 細胞毒性은 나타나지 않았고, hFLSs에서 IL-1β 유전자 발현은 대조군에 비하여 농도의존적으로 감소하였으며, 분비량에 대한 정량에서도 100 µg/ml 이상의 농도에서 억제되었다. hFLSs에서 IL-6 유전자 발현은 대조군에 비하여 모든 농도에서 큰 폭으로 감소하였으며, 분비량에 대한 정량에서도 100 µg/ml 이상의 농도에서 유의성있게 억제되었다. TNF-α 유전자 발현은 대조군에 비하여 100 µg/ml 이상의 농도에서 억제되었으며, CIA 병태 모델에서도 모든 실험 농도에서 유의성있게 억제되었고, hFLSs에서 COX-2 유전자 발현은 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 억제되었으며, real-time quantitative RT-PCR에 의한 정량 실험에서도 400 µg/ml 농도에서 mRNA 발현이 50% 억제되었다. NOS-2 유전자 발현은 대조군에 비하여 농도의존적으로 모든 농도에서 감소하였고, GM-CSF 유전자 발현은 대조군에 비하여 농도의존적으로 모든 농도에서 감소하였다. hFLSs내 NF-κ B binding activity는 400 µg/ml 농도에서 현저하게 억제되었으며, AP-1 binding activity는 200 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다. hFLSs 증식에 미치는 영향에서는 400 µg/ml 농도에서 유의성 있게 억제되었으며, ROS에 미치는 영향에서는 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 생산량이 감소되었다.

以上の 結果를 통하여 加味活血湯은 RA의 발생 및 진행에

중요한 역할을 하는 관련 사이토카인, 면역 세포 및 전사인자인 AP-1, NF-κ B 활성을 억제하여 유의성있는 효과를 나타냄으로써, 면역 조절작용을 통한 항관절염 효과가 인정되며, 향후 RA 치료 처방 개발에 기초적 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 大韓整形外科學會 : 整形外科學, 서울, 最新醫學社, pp.109~131, 1992.
2. Rene Cailliet. M. D. : 무릎을 침해하는 여러 가지 관절염, 무릎의 동통과 기능장애, 서울, 대학서림, pp.125~148, 1991.
3. 김호연 : 류마티스 관절염의 병태생리, 의약정보, 19(3):34~37, 1993.
4. 서울대학교의과대학 : 면역학, 서울, 서울대학교출판부, p. 100, 114, 117, 253, 255, 262, pp. 122~131, 179~180, 266~269, 1997.
5. Emery P, Foster W, Suarez-Almazor M. Rheumatoid arthritis, Clin Evid. 2002, Jun;(7):1101-21.
6. Cope AP, Studies of T-cell activation in chronic inflammation, Arthritis Res., 2002;4 Suppl 3:S197-211.
7. 裴秉哲 譯 : 今釋黃帝內經素問, 成輔社, p.376, 1994.
8. 權宰植 外 4人 : 痺證, 鼎談, pp.207~208, 214~215, 219~222, p.270, 1993.
9. 金定濟 : 診療要鑑, 東洋醫學研究所, pp.459~460, 1974.
10. 朴柄昆 : 增補韓方臨床40年, 大光文化社, p.343, 1989.
11. Dayer JM. Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis? J Rheumatol Suppl. 65:10-5, 2002.
12. Arend WP. The mode of action of cytokine inhibitors. J Rheumatol Suppl. Sep;65:16-21, 2002.
13. Bresnihan B. Preventing joint damage as the best measure of biologic drug therapy. J Rheumatol Suppl. 65:39-43, 2002.
14. Trucco M, Robbins PD, Thomson AW, Giannoukakis N. Gene therapy strategies to prevent autoimmune disorders. Curr Gene Ther. 2(3) : 341-54, 2002.
15. Apparailly F, Millet V, Noel D, Jacquet C, Sany J, Jorgensen C. Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis. Hum Gene Ther. 13(10):1179-88, 2002.
16. 金寅相 譯 : 骨·關節疾患, 第一醫學社, pp.12-15, 1988.
17. 李忠遠 : 苙祛湯이 류마티드 關節炎 및 Human Monocyte의 IL-8에 미치는 影響, 경희대학교대학원, 1995.
18. 申炳熙 : 桂枝芍藥知母湯이 第II型 Collagen 誘發 關節炎의 抗體에 미치는 影響, 경희대학교대학원, 1994.
19. 柳京周 : 白虎湯과 白虎加桂枝湯이 류마티드 關節炎 및 human Monocyte의 IL-8에 미치는 影響, 경희대학교대학원,

- 1995.
20. 李俊昊 : 澤蘭 藥鍼이 collagen으로 誘發시킨 關節炎에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 2000.
  21. 엄익환 : 虎杖根과 虎杖根에서 分離한 Resveratrol과 Emodin 이 류마티드 關節炎 抑制에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 2002.
  22. 대전대학교한방병원 : 한방병원처방집, 한국출판사, p.374, 2001.
  23. 王素芝 외 : 辨證治療痺證(類風濕性關節炎爲主)480例의臨床總結, 新中醫, 21 (11):34-35, 1989.
  24. 郭重文 : 疎風活血湯加味가 류마티드 關節炎患者에서 分離한 synoviocytes에 대한 免疫反應과 collagen으로 誘發된 생쥐의 關節炎 抑制에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 2002.
  25. 서애경 : 류마티드 關節炎患者 synoviocytes에 대한 鷄血藤의 免疫反應, 大田大學校大學院, 2003.
  26. Papazissi, K., geromichalos. D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H.: Optimization of the sulforhodamine B (SRB) Colormetric assay, J. Immunological method. 208, pp.15 1~158, 1997.
  27. Loeffler, J., N. Henke, H. Hebart, D. Schmidt, L. Hagemeyer, U. Schumacher, H. Einsele. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. J. Clin. Microbiol. 38:586, 590, 2000.
  28. Simon LS, Yocum D. New and future drug therapies for rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 39 Suppl 1:36-42. Review, 2000.
  29. Fries JF. Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 39 Suppl 1:30-5. Review, 2000.
  30. 程國彭 : 醫學心悟, 中國中醫出版社, p.139, 1999.
  31. 巢元方 : 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, pp.5~8, 1982.
  32. 張介賓 : 景岳全書, 정답, p.218, 1999.
  33. 王 燾 : 外臺秘要方, 서울, 大星文化社, p.424, 1983.
  34. 張仲景 : 金匱要略方論, 臺北, 東方書店, pp.30~39, 1950.
  35. 陳無擇 : 三因方(卷3), 大連, 國風出版社, pp.2~3, 1977.
  36. 안선준 : 鍼灸刺戟 및 疎風活血湯加味方 投與가 류마티스性 關節炎 患者의 血液에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 1994.
  37. Bingham CO 3rd. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. J Rheumatol. 29 Suppl 65:3-9, 2002.
  38. Danks L, Sabokbar A, Gundle R, Athanasou NA. Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. Ann Rheum Dis. 61(10):916-21, 2002.
  39. Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S, Koshihara Y. An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Inflamm Res. 50(2):65-72, 2001.
  40. Klimiuk PA, Sierakowski S. Cytokines and their antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis Przegl Lek. 59(2):108-12. Review, 2002.
  41. Monfardini C, Canziani G, Plugariu C, Kieber Emmons T, Godillot AP, Kwah J, Bajgier J, Chaiken I, Williams WV. Structure-based Design of Mimetics for Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Curr Pharm Des. 8(24):2185-99, 2002.
  42. Keiji Miyazawa : Regulation of Interleukin-1 $\beta$ -induced Interleukin-6 gene Expression in Human Fibroblast-like Synoviocytes by p38 Mitogen-activated Protein Kinase, U.S.A., TheJournal of Biological Chemistry V.273, N0.38, pp.24382~24838, 1998.
  43. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone. Feb, 30(2):340-6. Review, 2002.
  44. Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases. Transplant Proc. Dec ;30(8):4126-7. Review, 1998.
  45. 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):187-91, 2002.
  46. Cantor SB. Pharmacoeconomics of coxib therapy. J Pain Symptom Manage. 24(1 Suppl):S28-37, 2002.
  47. Fleischmann R, Iqbal I, Slobodin G. Meloxicam. Expert Opin Pharma-cother. 3(10):1501-12, 2002.
  48. Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuda T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, Eguchi K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. Life Sci. 12:68(8):913-20, 2001.
  49. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Ugucioni M, Facchini A. Enhanced and coordinated In vitro expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 41(12):2165-74, 1998.
  50. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Immunology. 103(3):255-61. Review, 2001.
  51. Bauerova K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. Gen Physiol Biophys. 18 Spec No:15-20. Review, 1999.
  52. Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in

- pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 1;18(17):7008-14, 1998.
53. Kim HY, Rikiyama 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):4132-41, 2002.
54. Hozumi A, Nishimura Y, Nishiuma T, Kotani Y, Yokoyama M. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281(6):L1444-52, 2001.
55. Pacey S, Bolivar I, Goltzman D. Role of activator protein 1 transcriptional activity in the regulation of gene expression by transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2 in ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 15(12):2352-61, 2001.
56. Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species-implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med.* 22(1-2):151-9, 1997.
57. Alam K, Ali R. Human anti-DNA autoantibodies and induced antibodies against ROS-modified-DNA show similar antigenic binding characteristics. *Biochem Mol Biol Int.* 47(5):881-90, 1997.