

류마티스관절염 활막세포에서 Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Agonist 처리의 염증매개인자 감소 및 활막세포 증식의 억제효과

연세대학교 의과대학 내과학교실

권용진 · 정수진 · 김태연 · 박민찬

= Abstract =

Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Agonist Inhibits Pro-inflammatory Gene Expressions and Cellular Proliferation of Fibroblast Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis by Down-regulation of NF-kappaB

Yong-Jin Kwon, Soo-Jin Chung, Tae-Yeon Kim, Min-Chan Park

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: This study investigated the effect of rosiglitazone, a synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonist, on pro-inflammatory gene expressions and cellular proliferation of fibroblast like synoviocyte (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA), and to determine whether these actions are mediated by nuclear factor-kappaB (NF-B) down-regulation.

Methods: Synovial tissues from patients with RA were obtained during total knee replacement surgery, and FLS were isolated. RA FLS were subsequently treated with 10 μ M, 50 μ M and 150 μ M rosiglitazone with or without TNF- α (10 ng/mL) stimulation. FLS proliferation in response to rosiglitazone treatment was measured by MTT assay, and mRNA expressions of IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2 and MMP-9 were determined by real-time quantitative RT-PCR. The effects of rosiglitazone on NF- κ B activation were evaluated using electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Results: Rosiglitazone treatment without TNF- α induced a dose-dependent reduction in mRNA expressions of IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2 and MMP-9 from RA FLS. When TNF- α

< 접수일 : 2010년 5월 3일, 수정일 (1차 : 2010년 5월 17일, 2차 : 2010년 5월 19일) 심사통과일 : 2010년 5월 19일 >

※ 통신저자 : 박 민 찬

서울시 강남구 도곡동

강남세브란스병원 내과

Tel : 02) 2019-3337, Fax : 02) 2019-3508, E-mail : mcpark@yuhs.ac

were treated with rosiglitazone, mRNA expressions of COX-2, MMP-9 were reduced dose-dependently. But mRNA expressions of IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7 were increased in 10 μ M rosiglitazone with TNF- α and then decreased as the concentration of rosiglitazone increased. Rosiglitazone treatment also suppressed FLS proliferation in a dose-dependent manner, and EMSA showed decreased NF- κ B expression with rosiglitazone treatment.

Conclusion: Rosiglitazone suppressed cellular proliferation and mRNA expressions of pro-inflammatory mediators by down-regulating the NF- κ B signaling pathway in RA FLS. The outcomes suggest that activation of PPAR- γ can be a novel therapeutic approach in RA.

Key Words: Rosiglitazone, Rheumatoid arthritis, Fibroblast-like synoviocytes, Pro-inflammatory mediators, NF- κ B

서 론

류마티스관절염은 가장 흔한 염증성 관절염으로 약 1%의 유병율을 가진다 (1,2). 류마티스관절염의 정확한 원인이나 발병기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 자가면역 현상이 주요 기전으로 알려져 있으며 대칭성, 다발성 말초 관절염이 특징인 만성 전신성 염증질환이다 (3). 가장 먼저 염증이 시작되는 부위는 관절을 둘러싸고 있는 활막으로서, 활막 세포가 비정상적으로 과다증식하여 연골과 뼈의 손상을 유발하여 관절 파괴와 그에 따른 기능 손실을 초래한다 (4,5). 류마티스관절염 환자의 활막에는 다양한 면역세포들이 침윤되어 있으며 특히 대식세포가 많은 부분을 차지하고 있다. 어떠한 원인 항원에 의해 염증이 시작되면 nuclear factor-kappaB (NF- κ B), mitogen-activated protein kinases, I κ B kinase (IKK) 및 activator protein (AP)-1과 같은 신호전달체계가 관여하여 대식세포와 단핵구로부터 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 등 다양한 염증성 사이토카인과 chemokine (C-C motif) ligand (CCL)-2, CCL-7 등의 케모카인, 그리고 matrix metalloproteinase (MMP)-9, cyclooxygenase (COX)-2 등이 분비되어 염증을 악화시키게 된다 (6-12). 그 결과 활막의 증식이 가속화되어 pannus를 형성하여 연골을 파괴하고 여러 염증매개 인자들이 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)의 활성화를 유발하여 파골세포를 활성화시켜 골파괴를 일으켜 관절손상이 진행되는 것으로 알려져 있다 (13,14).

이러한 염증을 억제하고 관절의 변형을 최소화하

기 위해 류마티스관절염의 치료 약제 개발에 대한 연구도 꾸준히 지속되어 왔다. 최근에는 류마티스관절염에서 활막 증식과 관절 파괴에 중심적인 역할을 할 것으로 생각되는 여러 염증성 사이토카인들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, NF- κ B의 산물인 TNF- α 및 IL-1 β 의 작용을 차단하는 약제가 개발되어 류마티스관절염의 임상증상의 호전뿐 아니라 방사선 소견의 진행까지 늦출 수 있음이 보고되었다 (15-17). 하지만 치료효과가 뛰어난데도 불구하고 일부 환자들은 여전히 치료에 반응을 보이지 않아 새로운 치료법 개발의 필요성이 강조되고 있다.

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)는 유전자 전사에 관여하는 핵수용체(nuclear receptor family)의 하나로, 지질대사 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (18,19). 최근 들어 PPAR- γ 가 염증반응에도 관여함이 밝혀졌는데, PPAR- γ agonist를 관절염 실험 쥐 모델에 투여하자 대식세포에서 염증매개 물질의 생성이 감소하는 것이 관찰되었다 (20,21). 또한 PPAR- γ 가 TNF- α 및 IL-1 β 를 비롯한 다양한 염증성 사이토카인에 대한 억제 작용뿐만 아니라 COX-2와 MMP-9를 비롯한 다양한 염증매개 물질들의 발현을 감소시키고 이러한 항염증작용은 주로 NF- κ B의 억제 작용에 의한 것으로 받아들여지고 있다 (22,23). 이상의 연구 결과들을 미루어 볼 때, 대식세포의 활성화 및 NF- κ B에 의해 발현이 증가된 여러 염증매개 인자들이 그 병인에 있어서 중요한 류마티스관절염에 있어서도 PPAR- γ agonist가 항염증효과를 나타낼 가능성이 있을 것으로 추정된다.

류마티스관절염의 병인에 있어서 관절 활막이 특

이적 면역반응이 일어나는 주요 부위임은 분명히 밝혀져 있는 바, 류마티스관절염의 관절 활막에서 발생하는 병태생리를 연구하고 활막염의 발생을 억제 혹은 감소시키는 인자를 발견하는 것은 류마티스관절염의 발생기전을 이해하며 새로운 치료를 도모할 수 있는 매우 중요한 임상적 의미를 갖는다고 생각된다.

본 연구에서는 류마티스관절염 환자의 관절활막에 대하여 synthetic PPAR- γ agonist인 rosiglitazone을 투여하고 투여 용량과 비례하여 활막에서 발생하는 염증반응이 감소되는지, 그리고 활막세포의 증식이 억제되는지의 여부를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 임상시료 수집

1987년 미국 류마티스학회가 제정한 류마티스관절염의 진단기준 (24)에 의거하여 류마티스관절염으로 진단된 환자를 대상으로 하였으며, 류마티스관절염의 진단은 ① 1시간 이상의 조조 강직을 가지며, ② 손과 손목의 관절에 염증이 증명되고, ③ 좌우 대칭적으로 관절의 염증이 증명되고, ④ 3부위 이상의 다발성 관절염이 증명되며, ⑤ 혈액검사를 류마티스 인자가 양성이며, ⑥ 피부에 류마티스 결절이 증명되고 ⑦ 방사선 소견상 특징적인 골파괴 소견을 보이는 경우로, 상기 사항 중 4가지 이상을 만족할 경우 류마티스관절염으로 진단하였고 다른 결체조직 질환 혹은 관절질환 및 관절 외상의 과거력이 있는 경우는 배제하였다. 류마티스관절염 환자에서 진단적 관절경 수술 혹은 인공 관절치환술을 통하여 환자 동의하에 관절 활막을 채취하였다.

2. 섬유모세포양 활막세포(Fibroblast-like synovocyte)의 분리 및 배양

류마티스관절염 환자의 활막조직을 인산완충액(cell culture phosphate-buffered saline, ccPBS)이 담겨있는 100 mm dish에 담아 지방조직, 인대, 연골 등을 제거한 다음 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)으로 세척하였다. 여기에 250배 희석된 2.5% collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞어 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 분리된 섬유모세포양 활막세포의 세포

용액을 1,200 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 20% 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, GIBCO BRL)이 함유된 DMEM에서 7일간 배양하였다. 배양된 활막세포는 5~8회 계대 배양한 후 실험에 사용하였다. Rosiglitazone (Cayman, Ann arbor, MI, USA)은 dimethylsulphoxide (DMSO)에 각각 (10 μ M, 50 μ M 및 150 μ M)의 농도로 용해시켜 사용하였다.

3. MTT assay를 통한 세포증식도 평가

활막세포의 증식 정도는 method of transcriptional and translational (MTT) assay를 통해 정량분석하였다. EZ-CyTox Kit를 이용하여 rosiglitazone이 활막세포의 증식억제를 유발하는 적정 농도를 측정하였는데 96 well에 배양한 활막세포를 10 μ M, 50 μ M 및 150 μ M의 rosiglitazone으로 처리한 뒤 24시간, 48시간 및 72시간 후에 활막세포의 증식억제 여부를 확인하기 위해 각 well 마다 kit reagent를 넣고 6시간 동안 incubation후 microtitre plate reader로 wave length 420~480에서 흡광도를 측정하였다.

4. RNA 분리 및 정량적 real-time PCR

활막세포에 rosiglitazone을 각각 10 μ M, 50 μ M 및 150 μ M의 농도로 처리한 뒤 TNF- α (10 ng/mL)를 함께 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 나누어 48시간동안 반응시킨 후 total RNA를 Trizol-reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 활막세포로부터 분리하였다. RNA의 농도는 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 측정하고 RNA의 순도는 260 nm와 280 nm에서 측정한 흡광도의 비율을 이용하여 평가하였다. 역전사 반응은 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)를 사용하였으며 MgCl₂, RT buffer, dNT, RNase Inhibitor, AMV, Oligo dT, RNase Free water를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6), 케모카인(CCL-2, CCL-7), COX-2와 MMP-9의 mRNA 발현 감소 정도를 확인하기 위해 각각의 염증매개물질들에 대한 특이적인 primer를 사용하여 증폭하였으며 PCR buffer, D.W., Ex Taq과 20 pmol sense와 anti-sense primer를 각각 첨가하여 95°C, 58°C, 72°C에서 30 cycle PCR 반응을 수행한 후 ethidium bromide를 사용하여 2% agarose gel상에서 band를 분석하였다.

정량적 real-time PCR은 Taqman master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), sense와 anti-sense primer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 gene Amp 7300 sequence detector를 통해 threshold cycle (Ct)를 측정하였다.

5. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

100 mm 배양 접시에 활막세포와 rosiglitazone 100 μ M을 처리하고 48시간뒤에 인산완충액(phosphate buffered saline: PBS)으로 두 번 세척하고 세포를 긁어낸후, 저장성 용해 완충액(hypotonic lysis buffer : 10 mM HEPES, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 200 mM sucrose) 조성의 buffer A 1 mL를 첨가하여 vortex한 후 10분간 얼음 위에 놓아두었다. 다시 4°C에서 5분간 3,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 걷어 내고 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin 조성의 buffer B 100 μ L를 첨가한 후 20분간 얼음 위에 놓아두었다. 이후 4°C에서 15분간 1,500 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 걷어 새로운 tube에 옮긴 후 BCA protein assay를 이용하여 protein의 농도를 측정한 후 -20°C에서 보관하였다.

Double-stranded NF- κ B oligonucleotide를 biotin 부착된 것을 이용하여 LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 DNA-protein interaction을 확인하였는데 먼저 4~6% polyacrylamide gel에 pre-run 이후 nylon membrane을 이용하여 transfer시킨 후 chemiluminescence으로 biotin-labeled DNA를 detect하였다. Membrane은 cassette에 expose시킨 후 X-ray film에 2~3분 후 delope하여 shift된 정도를 film 상에서 확인하였다. Band의 크기가 커진 만큼 negative acrylamide gel에서 mobility가 shift된 것을 확인하였다.

결 과

1. Rosiglitazone 처치에 따른 섬유모세포양 활막세포의 증식 억제

PPAR- γ 가 류마티스관절염의 병인에 관여하는지

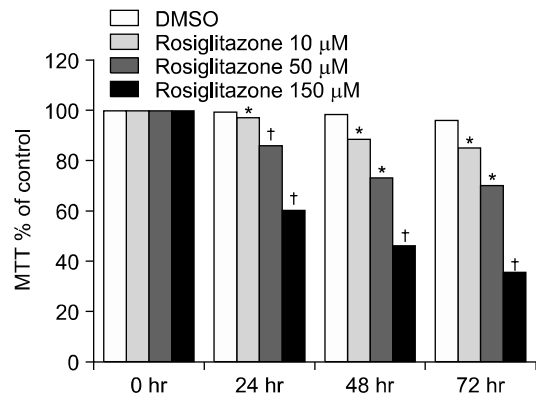


Fig. 1. The effects of rosiglitazone on the viability of rheumatoid FLS. Rheumatoid FLS were treated with varying concentrations of rosiglitazone (10 μ M, 50 μ M, and 150 μ M) for 24 hours, 48 hours and 72 hours and the extent of FLS viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control and data was the mean of five separate experiments. Rosiglitazone inhibited cellular proliferation of rheumatoid FLS dose and time dependently. *p-value < 0.05, †p-value < 0.01.

여부를 알아보기 위해 류마티스관절염 환자의 활막으로부터 섬유모세포양 활막세포를 분리 배양하여 rosiglitazone을 각각 10 μ M, 50 μ M 및 150 μ M의 농도로 처리한 뒤 24시간, 48시간 및 72시간 후에 활막세포의 증식 억제여부를 MTT assay를 통해 측정된 결과, 그림 1과 같이 rosiglitazone을 투여한 군에서 섬유모세포양 활막세포의 증식 억제가 유도되었으며 이러한 억제 효과는 농도와 시간에 비례하여 증가하였다.

2. Rosiglitazone 처치에 따른 IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2와 MMP-9의 mRNA 발현 감소

Rosiglitazone의 항염증 효과를 확인하기 위하여 류마티스관절염의 활막에서 염증을 유발하고 악화시켜 병태생리에 가장 중요한 역할을 하는 IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, MMP-9 그리고 COX-2의 mRNA 발현이 rosiglitazone 처치 후 감소하는지 관찰하였다. 류마티스관절염 환자의 활막으로부터 분리 배양된 섬유모세포양 활막세포에 rosiglitazone을 각각 10 μ M, 50 μ M 및 150 μ M의 농도로 처리한 뒤 TNF- α (10 ng/mL)를 함께 투여한 군과 투여하지 않은 군으



로 나누어 48시간동안 반응시킨 후 IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2와 MMP-9의 mRNA 감소 정도를 RT-PCR 및 정량적 real-time PCR을 통해 확인한 결과, 그림 2와 같이 TNF- α 를 투여하지 않은 경우 rosiglitazone의 농도가 증가함에 비례하여 IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 현저하게 감소하였으며 COX-2와 MMP-9의 경우 TNF- α 를 투여한 군에서도 rosiglitazone의 농도에 비례하여 mRNA의 발현이 감소되었다. 그러나 IL-1 β , IL-6, CCL-2와 CCL-7의 경우 TNF- α 를 투여한 군에서는 10 μ M의 rosiglitazone을 처리하였을 때 오히려 rosiglitazone을 처리하지 않은 대조군에 비해 mRNA의 발현이 증가하였으며 rosiglitazone의 농도가 증가함에 따라 점차 발현이 감소하였으나 대조군에 비해서는 여전히 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

3. Rosiglitazone에 의한 NF- κ B의 down-regulation

Rosiglitazone의 항염증작용을 매개하는 신호전달체계를 확인하기 위해 nuclear extracts로부터 electrophoretic mobility shift assays (EMSA)를 시행하여 NF- κ B의 억제 여부를 확인한 결과, 그림 3과 같이 섬유모세포양 활막세포에서 TNF- α 에 의해 활성화된 NF- κ B는 rosiglitazone을 처리한 후 down-regulation되

는 것을 관찰하였다.

고 찰

류마티스관절염은 다발성으로 관절 활막에 염증이 발생하는 만성 염증성 자가면역 질환이다. 대부분 수 년에 걸쳐 관절과괴를 유발하며 특히 연골과 뼈의 비가역적 손상을 유발하여 관절의 기능 저하를 초래한다 (4). 염증이 있는 활막에는 수많은 단핵구와 대식세포가 침윤되어 있으며 특히 T 세포로부터의 신호와 면역복합체에 의해 활성화된 대식세포가 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 형성하게 되고 이로 인해 세포 접착분자들(cell-adhesion molecules)과 CCL-2, CCL-7와 같은 케모카인, COX-2, MMP-9 등의 발현을 증가시켜 관절염증 및 섬유모세포양 활막세포의 과다증식을 유발하여 연골과괴를 일으키고 RANKL 및 파골세포(osteoclast)를 활성화시켜 골과괴를 유발하게 된다 (25-27). 또한 염증성 사이토카인을 비롯한 여러 염증매개인자들은 염증세포의 침윤을 가속화시키고 신생 혈관을 생성하며 collagenase 등의 MMP분비를 촉진하여 섬유모세포양 활막세포의 과다증식 및 연골과괴를 일으킨다. 즉 류마티스관절염의 병인에 있어 가장 핵심적인 역할을 하는 것이 대식세포에서 분비되는 여러 염증매개물질이므로 대식세포의 활성을 억제하는 것이 류마티스관절염의 치료에 매우 중요한 것으로 생각된다 (28).

Peroxisome은 진핵세포내에 존재하는 미세기관으로, 지방산의 산화에 관여하며, peroxisome의 증식을 일으키는 약물(peroxisome proliferators) 중 지질대사에 중요한 영향을 나타내는 fibrates 계통의 clofibrates, fenofibrates 등은 임상에서 널리 사용되고 있다. 이러한 peroxisome proliferator의 수용체는 1990년대 이후 밝혀져 peroxisome proliferator-activated receptor로 총칭되고 있다. PPAR는 핵내에 위치하는 핵수용체로서 부신피질호르몬 수용체나 활성형 지용성 비타민 수용체와 유사한 구조를 가지며 유전자 전사 활성화를 매개하는 DNA 결합성 전사인자이다. PPAR는 갑상선 호르몬 수용체나 비타민 D 수용체와 비슷하게 9-cis retinoic acid 수용체인 retinoid X receptor (RXR)와 heterodimer를 형성하지만 peroxisome

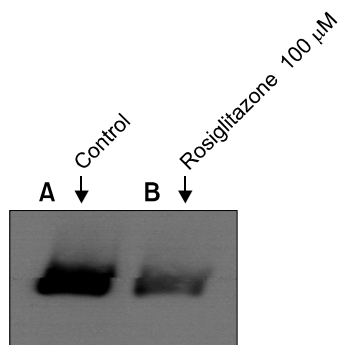


Fig. 3. Inhibition of NF- κ B by rosiglitazone in rheumatoid FLS. The effects of rosiglitazone on the DNA-binding activity of NF- κ B was tested by EMSA. (A) Treated with vehicle only, (B) treated with rosiglitazone 100 μ M for 48 h. NF- κ B was significantly inhibited by rosiglitazone. The results are representative of five independent experiments.

proliferator responsive element와 결합하여 표적 유전자에 특이적으로 작용한다 (29). PPAR는 α , β , γ 의 3가지 아형이 존재하는데 그 중 PPAR- γ 는 지방세포에 발현하여 지방세포 분화와 지질대사를 조절한다. 지방산 대사산물이 염증반응의 신호전달과정에 중요한 역할을 하므로 PPAR- γ 가 이러한 과정에 관여할 것이라는 가능성이 제시되어 왔으며 최근 들어 PPAR- γ 가 대식세포에서 발현되어 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 염증반응을 억제하는 것이 밝혀졌다 (30,31). PPAR- γ agonist는 두 가지 종류로 분류될 수 있는데 fatty acid와 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15d-PG J_2) 등의 endogenous agonist (32-34)와 thiazolinedions (rosiglitazone, troglitazone), fibrates 등의 synthetic agonist가 있다 (35).

류마티스관절염에서도 이들 PPAR- γ agonist의 항염증작용에 대한 연구가 진행되었는데 Yutaka 등이 발표한 연구에 의하면 15d-PG J_2 와 troglitazone이 류마티스관절염 환자의 활막세포의 증식 억제와 apoptosis를 유도하고 관절염 실험 쥐 모델에서 활막조직에 단핵구의 침윤과 pannus 형성을 감소시켰다 (36). 그러나 Ji 등이 발표한 연구에 의하면 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 15d-PG J_2 가 TNF- α , IL-1 β 의 발현을 억제하였고 troglitazone이 NF- κ B의 활성을 감소시키기는 하였으나 활막세포의 증식 억제 및 apoptosis를 유도하지는 못하였다 (37). 이처럼 synthetic PPAR- γ agonist의 항염증효과에 대한 관심이 높아지고 있음에도 불구하고 만성 염증성 질환의 대표라고 할 수 있는 류마티스관절염을 대상으로한 연구들마다 그 결과에 차이를 보이고 있으며 대표적인 synthetic PPAR- γ agonist인 rosiglitazone의 류마티스관절염에 있어서의 작용을 조사한 연구는 아직까지 충분히 진행되지 않았다.

본 연구에서는 류마티스관절염 환자의 섬유모세포양 활막세포에 대표적인 synthetic PPAR- γ agonist인 rosiglitazone을 다양한 농도로 처리하였을 때 투여농도가 증가함에 비례하여 IL-1 β , IL-6, CCL-2, CCL-7, COX-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 감소됨을 관찰하였다. 섬유모세포양 활막세포에 염증을 더욱 증가시키기 위해 TNF- α 를 투여하였는데 COX-2와 MMP-9의 경우 TNF- α 를 투여한 군에서도 rosiglitazone의 농도에 비례하여 mRNA의 발현이 감소되었

다. 그러나 IL-1 β , IL-6, CCL-2와 CCL-7의 경우 TNF- α 를 투여한 군에서는 10 μ M의 rosiglitazone을 처리하였을 때 오히려 rosiglitazone을 처리하지 않은 대조군에 비해 mRNA 발현이 증가하였고 rosiglitazone의 농도가 증가함에 따라 점차 발현이 감소하였으나 대조군에 비해서는 증가되어 있는 상태임을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상의 원인으로서는 TNF- α 처리와 같이 염증이 더욱 조장된 경우에는 저농도의 rosiglitazone이 오히려 pro-inflammatory action을 할 가능성이 있을 수 있겠다. 하지만 50 μ M과 150 μ M의 rosiglitazone을 투여한 경우 TNF- α 만 투여한 경우보다 pro-inflammatory gene의 발현이 증가되어 있기는 하나, rosiglitazone의 투여 용량을 늘릴수록 그 증가 정도가 감소되는 양상으로 보아 본 연구에서 사용한 rosiglitazone의 용량보다 더욱 고용량을 투여하였을 경우의 pro-inflammatory gene의 발현 pattern의 변화는 추후 조사해볼 필요가 있겠다.

일반적으로 알려진 rosiglitazone의 염증반응에서의 작용 기전은 본 연구에서도 확인된 바와 같이 NF- κ B의 down-regulation을 통한 anti-inflammatory action이 주를 이룰 것으로 생각되나 TNF- α 와 rosiglitazone을 같이 투여한 경우에 본 연구에서 관찰된 IL-1 β , IL-6, CCL-2와 CCL-7의 증가현상이 어떠한 기전을 매개로 하는 것인지에 대해서는 추후 추가적인 연구가 필요하겠다.

본 연구에서는 rosiglitazone이 섬유모세포양 활막세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 시행했고 그 결과, rosiglitazone의 투여농도에 비례하여 섬유모세포양 활막세포의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다. PPAR- γ 의 세포증식 억제 효과는 사이토카인의 발현을 조절하는 NF- κ B, AP-1 등의 전사인자를 억제하여 초래되는 것으로 알려져 있는데 (38), 특히 NF- κ B는 류마티스관절염에서 중요한 전사인자로서 염증작용을 조절하는데 섬유모세포양 활막세포에서 발현이 증가되어 염증성 사이토카인의 생성을 증가시킴으로서 관절염을 악화시키는 것으로 알려져 있다. PPAR- γ agonists가 류마티스관절염에서 항염증작용을 나타내는 대표적인 신호전달체계 역시 NF- κ B의 억제에 의한 것으로 생각되어지는데 이를 확인하기 위해 본 연구에서는 rosiglitazone이 대식세포의 대표적인 염증반응 신호전달

체계인 NF- κ B를 억제시킬 수 있는지 여부를 EMSA를 통해 알아보았고 그 결과 활성화된 NF- κ B가 rosiglitazone의 투여에 의해 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 TNF- α 를 처리하지 않은 상태에서 단독으로 투여된 rosiglitazone이 대식세포의 핵수용체인 PPAR- γ 를 활성화시켜 류마티스관절염의 병인에 중요한 여러 가지 염증매개 물질들의 생성을 감소시키고 관절과괴를 유발하는 섬유모세포양 활막세포의 과다증식을 억제하며 이러한 반응은 NF- κ B 활성화에 의해 유발되는 것으로 생각되어진다.

본 연구를 통하여 PPAR- γ 가 류마티스관절염의 병인에 관여함을 확인하고 synthetic PPAR- γ agonist를 투여했을 때 관절 활막에서 일어나는 면역반응을 감소시키고 활막의 증식을 억제함을 규명하였으며 이는 임상적으로는 질병의 진행을 늦추어 기능적 손실을 감소시키는 등 류마티스관절염의 치료에 있어서 새로운 치료방침을 제공하는 것이며 경제적으로는 새로운 표적물질의 증명으로 인한 신약개발 및 치료전략 수립에 크게 이바지할 것이다.

결 론

본 연구에서는 PPAR- γ 가 류마티스관절염의 병인에 관여하는지 여부를 알아보기 위해 류마티스관절염 환자의 활막으로부터 섬유모세포양 활막세포를 분리 배양하여 다양한 농도의 rosiglitazone을 단독으로 처리한 뒤 농도에 비례하여 TNF- α , IL-1 β , CCL-2, CCL-7, COX-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 또한 rosiglitazone 처리에 따른 활막세포의 세포증식이 억제되고 대식세포의 대표적인 염증반응 신호전달체계인 NF- κ B down-regulation을 확인하였다.

본 연구를 통하여 PPAR- γ 가 류마티스관절염의 병인에 관여하여 항염증 작용이 있음을 확인하였으며 류마티스관절염의 치료에 있어서 새로운 치료방침을 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987

- American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006;36: 182-8.
- 2) Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11: 229.
- 3) Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903-11.
- 4) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307-10.
- 5) Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:151-60.
- 6) Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42 Suppl 2:3-10S.
- 7) Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-15.
- 8) Morand EF, Leech M. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2005;10:12-22.
- 9) Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:372-8.
- 10) Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. Molecular targets of rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7:53-66.
- 11) Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47: 584-90.
- 12) Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:212.
- 13) Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravalles EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:1068-76.

1

c ih aenia ae
1c ouo Gww

aBoO apO ii

- KN. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol* 2006;33:2398-408.
- 16) Schoels M, Knevel R, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas DT, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search. *Ann Rheum Dis* 2010;69:638-43.
- 17) Fleischmann R, Stern R, Iqbal I. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1333-44.
- 18) Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004;10:355-61.
- 19) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-56.
- 20) Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;483:79-93.
- 21) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:330-9.
- 22) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
- 23) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.
- 24) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- 25) Smeets TJ, Dolhain R, Miltenburg AM, de Kuiper R, Breedveld FC, Tak PP. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88:84-90.
- 26) Yamanishi Y, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;27:355-71.
- 27) Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J* 2008;275:4448-55.
- 28) Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.
- 29) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
- 30) Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, et al. A nuclear receptor atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 2005;19:2466-77.
- 31) Nencioni A, Wesselborg S, Brossart P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses. *Crit Rev Immunol* 2003;23:1-13.
- 32) Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7355-9.
- 33) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
- 34) Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93:229-40.
- 35) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270:12953-6.
- 36) Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, et al. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000;106:189-97.
- 37) Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun* 2001;17:215-21.
- 38) Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-208.