

류마티스관절염 활막세포에서 IL-10의 ERK와 AP-1 신호 전달 분자 조절을 통한 VEGF 억제

가톨릭대학교 의과대학 류마티스 연구센터

이선영 · 조미라 · 박미경 · 오혜좌 · 박성환 · 김호연

= Abstract =

IL-10 Inhibits VEGF Production in the Synovial Fibroblasts of RA Patients via Down-regulation of the ERK and AP-1 Pathways

Seon-Yeong Lee, Mi-La Cho, Mi-Kyung Park, Hye-Jwa Oh,
Sung-Hwan Park, Ho-Youn Kim

*Rheumatism Research Center, Catholic Institutes of Medical Science,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: Interleukin (IL)-10 has been demonstrated to have anti-inflammatory and anti-tumour activity. Because aberrant angiogenesis is a significant pathogenic component of tumor growth and chronic inflammation, we investigated the effect of IL-10 on the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by the synovial fibroblasts derived from the patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods: Fibroblast-like synoviocytes (FLS) were cultured with transforming growth factor (TGF- β) alone or with IL-10. The level of VEGF was measured by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (using the 24, 48 and 72 h culture supernatants). The FLSs were cultured with TGF- β for 48 hr in the presence of PD98059 (an ERK inhibitor), curcumin and SP600125 (a JNK and Ap-1 inhibitor, respectively). The level of VEGF in the supernatants was measured by ELISA. Cell viability was assessed using MTT assay. The expressions of VEGF, ERK, AP-1 and IL-10 in the synovial tissue were quantified by immunohistochemistry.

Results: IL-10 exhibited the inhibitory effect on VEGF production when the FLSs were stimulated with TGF- β . ERK and AP-1 inhibitors inhibited the TGF- β induced VEGF production.

< 접수일 : 2009년 8월 8일, 수정일 (1차 : 2009년 8월 31일, 2차 : 2009년 9월 1일) 심사통과일 : 2009년 9월 2일 >

※통신저자 : 조 미 라

서울시 서초구 반포동 505번지

가톨릭대학교 의과대학 류마티스 연구센터

Tel : 02) 2258-7467, Fax : 02) 599-4287, E-mail : iammla@catholic.ac.kr

본 연구는 2008년 범석학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(2007.10.01-2008.09.30).

Moreover, TGF- β increased the phosphorylation of ERK and C-Jun, which was significantly inhibited by the IL-10.

Conclusion: IL-10 may exert an antiangiogenic effect by inhibiting the ERK- and AP-1 mediated VEGF expression in rheumatoid synovial fibroblasts.

Key Words: IL-10, VEGF, ERK, AP-1, Rheumatoid arthritis synovial fibroblast

서 론

류마티스관절염은 만성적 면역 반응을 특징으로 하는 전신성 질병으로, synovial lining cell의 과증식이 일어나며, 단핵세포의 침윤, 관절내의 신생 혈관 형성이 일어나는 것이 특징으로 (1), 염증 반응이 일어나는 활막 조직은 pannus를 형성하여, 연골 조직과 골 파괴를 일으키며, 이들 활막 조직의 압 조직과 같은 비 정상적인 형성은 신생혈관생성(angiogenesis) 반응을 일으켜 지속적인 염증과 병인을 유발한다 (2). 활막의 비정상적인 형성을 통한 신생혈관생성 반응은 활막 내의 염증성 세포의 이동을 높여, 관절내의 염증 반응과 이를 통한 pannus의 형성을 촉진하여 염증 반응을 과도하게 촉진하는 것으로 보고 되었다 (3,4).

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 글라이코 단백질로(glycoprotein) 혈관내피세포의 증식과 혈관 투과성을 증가 시킬 수 있다. 류마티스관절염에서 VEGF는 대조군에 비해 류마티스관절염 환자의 활액과 혈청에서 높게 발현하며, erythrocyte sedimentation rate (ESR)와 C-reactive protein (CRP)과 상호 작용하는 것으로 보고되었다 (5,6). 배양된 활막 세포에서 VEGF는 tumor necrosis factor (TNF- α), transforming growth factor (TGF)- β , interleukin (IL)-1, IL-6, CD40 리간드에 의해서 생성이 되며 (7,8), VEGF는 직접적으로 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키고, 혈관 내피세포에서 (IL)-8과 monocyte chemoattractantprotein-1 (MCP-1)의 합성을 유도한다고 알려졌다 (9,10). 또한 collagen-induced arthritis (CIA) 마우스 군에서 항-VEGF 항체가 류마티스관절염을 감소시키는 효과가 관찰 되었다 (11). 따라서 VEGF는 신생 혈관 생성부위의 혈관 내 투과성을 증가시켜 염증 세포를 직접적으로 자극하거나 활성화 시킬 수 있음이 조사되었고, 이는 VEGF의 제어는 염증성 면역

반응 조절함으로써 류마티스관절염 질환의 제어 가능성을 시사한다.

면역 세포들은 TNF- α , IL-1 β , IL-17과 같은 다양한 염증성 사이토카인을 발현하고 또한, IL-10과 같은 항 염증성 사이토카인을 발현하기도 한다 (12). IL-10은 T, B 세포뿐만 아니라, 조절 T 세포 (regulatory T cell), 대식세포 등의 다양한 세포에서 발현되며, IL-10은 염증 질환, 자가면역 질환, 이식 부작용 등과 같은 질병에서 면역 세포들의 염증반응 활성을 억제 조절하여 질환을 예방하거나 치료할 수 있다고 보고되었다 (13). 특히, 암세포 형성에 IL-10은 VEGF, MMP-9과 같은 신생혈관생성 인자들을 억제함으로써 암세포 성장을 억제하는 것으로 알려졌다 (14). 그러나 류마티스관절염의 활막 조직 내 세포에서 신생혈관생성 촉진인자인 VEGF발현에 대한 IL-10의 효력에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구에서는, 류마티스관절염 활막 세포에서 TGF- β 에 의해 활성화 된 VEGF가 IL-10에 의해서 억제 조절되는지, VEGF 활성화 관련 신호 전달 분자들이 IL-10에 의해서 조절되는지 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

대상은 미국 류마티스학회(American College of Rheumatology, ACR)의 분류기준에 만족하는 류마티스 관절염 환자를 대상으로 하였으며, 본 연구는 서울성모병원 임상연구 관리규정과 헬싱키 선언을 준수하여 시행하였다. 활막 조직은 관절 치환 술을 받은 류마티스관절염 환자로부터 분리하였다.

2. 활막 세포의 분리 및 자극

활막 세포는 관절치환술을 받은 류마티스관절염 환자로부터 얻은 활막 조직을 효소를 이용하여 분리하였으며, 조직은 2~3 mm 조각으로 잘게 자른 후

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, California, USA)에 4 mg/mL의 농도의 type 1 collagenase (Worthington Bio-chemical, NJ, USA)와 함께 37°C water bath에서 4시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 조직은 500 g에서 원심분리 하였고 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco, California, USA), L-glutamin (sigma, MO, USA) 2 mM, penicillin (Sigma, MO, USA) 100 units/mL과 streptomycin 100 μ g/mL이 들어있는 DMEM 배양액으로 희석 후 25 cm² 플라스크에 담아 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하여, 활막 세포를 얻었다. 4명의 환자에서 분리한 활막 세포를 5에서 6번 사이의 계대 배양후 사용하였으며, 24 well plate에 1×10⁴/mL, 6 mm² dish에 1×10⁵/mL의 농도로 세포를 배양하여, insulin transferring selenium A (ITSA, invitrogen, California, USA)가 포함된 serum free DMEM 배양액으로 starvation하였다. TGF- β (R&D system, MN, USA)는 10 ng/mL의 농도로 처리하며, IL-10 (R&D system, MN, USA)은 1, 10, 20, 50 ng/mL의 농도로 처리하였으며, PD98059 (sigma, MO, USA), curcumin (sigma, MO, USA), SP600125 (sigma, MO, USA)는 2시간 전처리하여 TGF- β 처리하거나 IL-10 함께 처리하여 37°C, 5% 배양기에서 배양 하였다.

3. SFMC 분리

관절염 환자의 활액 세포(synovial fluid mononuclear cells, SFMC)를 분리하기 위해서 관절내 활액을 채취한 처리된 주사기를 이용하여 채취한 후 단핵구 세포를 Ficoll-Paque TM (Amersham Biosciences, Uppsala, SWEDEN)를 이용하여 centrifuge gradient법으로 분리하였다. 채취한 활액은 PBS에 1 : 4의 비율로 희석하여 Ficoll 층이 흐트러지지 않게 50 mL tube에 천천히 떠운 다음 2,000 rpm, 30분간 원심분리 하였다. 원심 분리 후 Buffy coat 층만을 따서 새 tube에 담은 후 PBS로 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여, SFMC만을 분리 한다.

4. VEGF와 IL-10 ELISA

Sandwich ELISA용 96 well plate (NUNC, Kamstrupvej, Denmark)에 capture monoclonal antibody VEGF (R&D system, MN, USA)과 IL-10 각각 2 μ g/mL로

상온에서 2시간 반응 시킨 후, 차단 용액(1% bovine serum albumin (BSA)/0.05% Tween20)이 함유된 phosphate buffered saline (PBS, Gibco, California, USA)을 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. Recombinant human VEGF과 IL-10은 각 5,000~78.125 pg/mL로 희석하여 첨가하고, 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 0.05% PBST으로 4번 세척하였다. Biotinylated anti-human VEGF (R&D system, MN, USA)과 IL-10 (R&D system, MN, USA)은 각 200 ng/mL의 농도로 첨가하고 실온에서 2시간 반응시킨 후 4번 세척하였다. ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate (Sigma, MO, USA)를 1 : 2,000으로 희석하여 첨가하여 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 Phosphate Disodium salt Hexahydrate (PNPP)/DEA (Fluka, MO, USA) 용액을 1 mg/mL 농도로 첨가하여 반응 시킨다. 반응 후 0.2N NaOH로 반응을 멈추고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. MTT assay

96 well plate에 1×10³/mL의 농도로 세포를 배양하여, ITSA가 포함된 serum free DMEM 배양액으로 starvation한다. TGF- β 는 10 ng/mL의 농도로 처리하며, IL-10은 1, 10, 20, 50 ng/mL의 농도로 처리하였으며, 48시간 동안 37°C, 5% 배양기에서 배양 하였다. 여기에 MTT 용액(Thiazolyl blue, 2.5 mg/mL, in deiodinized H₂O) 10 μ L를 혼합하여 4시간 동안 반응시킨 후 5분간 원심 분리하고, 여기에 0.04 M HCl 100 μ L를 첨가하고 5분 동안 실온에 방치하였다가 ELISA 판독기로 595 nm로 측정하였다.

6. RT-PCR

자극제가 처리된 활막 세포로부터 총 RNA를 RNAzol-B (TEL-TEST, TX, USA)를 이용하여 추출하였다. 2 μ g의 RNA에 Random primer 1 μ L를 가하여 70°C에서 5분간 방치한 후 바로 얼음에 담가 급 냉 시켰다. 여기에 4 μ L의 5x M-MULV buffer (Intron, seoul, Korea), 1 μ L의 10 mM dNTP (Intron, seoul, Korea), 0.5 μ L RNase inhibitor (Intron, seoul, Korea)와 혼합한 후 총 반응 액이 19 μ L가 되도록 증류수를 가하였다. 25°C에서 5분간 반응 시킨 후 1 μ L의 역 전사 효소 M-MULV (Intron, seoul, Korea)

를 더하고 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 이렇게 생성된 cDNA산물을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 염기 서열은 VEGF (sense: CAG CAA GCT TAA CTG GGC ACA GAA AGG GAC CG, anti-sense: AGG TTC TAG ATC AGG GGG AGC AGG CAG GC), IL-10 (sense: AAA TTT GGT TCT AGG CCG GG, antisense: GAG TAC AGG GGC ATG ATA TC), GAPDH (sense: CGA TGC TGG GCG TGA GTA C, antisense: CGT TCA GCT CAG GGA TGA CC)를 사용하였다. PCR 과정 중 각각 서로 다른 양으로 역 전사된 cDNA와 PCR cycle 수를 변경하면서 PCR을 시행하여 대수적으로 증가하는 cDNA 양과 PCR cycle 수를 결정하였다. VEGF에서는 변성을 위해 94°C 45초, annealing은 59°C 30초간, 신장은 72°C 30초간의 과정을 30회 반복하였으며 GAPDH에서는 변성을 위해 94°C 45초, annealing은 59°C 30초간, 신장은 72°C 30초간의 과정을 22회 반복하였다. 음성 대조군으로 추출한 cDNA 대신 증류수를 넣어 PCR 산물이 관찰되지 않도록 하여 PCR에 오염이 없음을 확인 하였다.

7. Western blot

10% SDS-PAGE에 일정량의 단백질을 4°C에서 80 V로 전기영동 하였으며, 전기영동 후 전개된 단백질을 nitrocellulose 흡착지를 사용하여 4°C 250 mA에서 2시간 동안 젤에서 흡착지로 이동시켰다. 단백질 이동이 끝난 후 흡착지를 분리해내어 차단 용액(5% fat-free skin milk in Tris-buffered saline, 5% BSA in Tris-buffered saline)에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 1 : 1,000으로 희석한 항 ERK (Santa-cruze, California, USA), 항 phospho ERK (Santa-cruze, California, USA), 항 AP-1 (Santa-cruze, California, USA) 항 phospho AP-1 (Santa-cruze, California, USA), 항체를 각각 4°C에서 12~16시간 반응시키고, horseradish peroxidase (HRP)가 부착된 goat anti-mouse IgG (Santa-cruze, California, USA) 각각을 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA)의 용액 1, 2를 1 : 1로 섞어서 흡착지에 반응시키고 X-ray 필름에 노출시켜 항

체 결합 신호를 확인하였다.

8. 면역 조직 화학 염색법

4% 파라포름알데하이드에 고정된 각 활막 조직을 통상의 방법대로 파라핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 7 μ m 절편을 만들어 슬라이드에 붙인 후 헤마톡실린과 에오진(hematoxylin-eosin)염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 사이토카인의 발현 정도를 보기 위해 면역조직 화학 염색법으로 ABC (vector laborites, California, USA)를 사용하여 염색하였으며, 슬라이드에 부착된 절편을 자일렌과 에타올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 3% H₂O₂로 내 인성 과산화 효소를 차단시키고 PBS로 수세하였다. 비 특이적인 반응을 차단할 목적으로 blocking 용액으로 30분 반응시킨 후 primary Ab를 4°C에서 ERK (Santa-cruze, California, USA), AP-1 (Santa-cruze, California, USA), IL-10 (R&D system, MN, USA), VEGF (R&D system, MN, USA)를 16~18시간 반응시켰다. Primary Ab 반응 후 결합이 안된 항체를 PBS로 수세하고 바이오 틴이 결합된 이차 항체와 과산화 효소가 결합된 streptavidin반응을 시킨 후 DAB으로 발색 시켰다. Mayer's 헤마톡실린으로 대조염색한 후 수세하고 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균±표준오차로 나타냈으며, 통계적 유의성은 Student's t-test를 실시하였고 p값이 0.05이하일 때 통계적으로 유의 하다고 분석하였다.

결 과

1. 류마티스관절염 환자 활막 세포에서 IL-10에 의한 VEGF mRNA 발현 억제

류마티스관절염 환자의 활막 세포에서 TGF- β 에 의해 증가된 VEGF가 IL-10에 의해 조절이 되는지 알아보고자, 활막 세포 1 \times 10⁵ cell/mL로 배양된 세포에 TGF- β 10 ng/mL의 농도로 처리하고, IL-10을 1, 10, 20, 50 ng/mL의 농도로 함께 처리하여 12시간 후 VEGF mRNA 수준을 평가하였다. 결과 TGF- β 에 의해 증가되었던 VEGF는 IL-10 농도 의존적으로 감

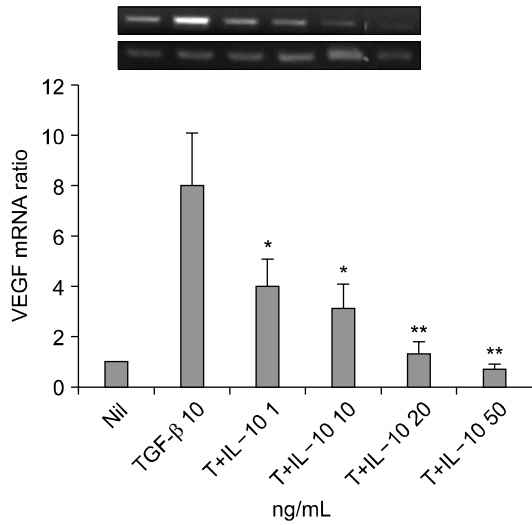


Fig. 1. IL-10 inhibits the VEGF mRNA in the TGF- β stimulated RA synovial fibroblasts. The FLSs were cultured with TGF- β (10 ng/mL) alone or with the indicated concentrations of IL-10 (1~50 ng/mL) for 12 h. The mRNA level of VEGF was measured by RT-PCR. The data is expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01 versus the that were well treated with TGF- β alone).

소 하였으며, IL-10 20, 50 ng/mL의 농도에서는 아무 것도 처리하지 않은 값 수준까지 감소되었다. 특히 IL-10 1 ng/mL의 저 농도에 의해서도 VEGF의 활성 억제가 나타났으며(그림 1), 이러한 결과는 류마티스관절염 활막 세포에서 TGF- β 에 의해 활성화된 VEGF를 IL-10이 억제 할 수 있음을 보여주는 결과이다.

2. 류마티스관절염 환자 활막 세포에서 IL-10에 의한 VEGF 단백질 생산 조절

앞의 결과로 IL-10 농도 의존적으로 VEGF의 활성을 억제되는데 시간에 따른 영향은 어떠한지 조사하고자 하였으며, 유전자 수준에서 조절뿐만 아니라 VEGF 단백질 발현에도 IL-10에 의해 억제 조절되는지 sandwich ELISA를 이용하여 조사하였다. 활막 세포 1×10^4 cell/mL의 농도로 배양된 세포에 TGF- β 10 ng/mL와 IL-10 1, 10, 20, 50 ng/mL 각각의 농도를 함께 처리하여 12, 24, 48시간 배양 후, 배양액에서 VEGF 단백질 발현 양을 조사하였다. 결과 단백

질 수준에서도 TGF- β 에 의해 증가되었던 VEGF의 발현이 IL-10 농도 의존적으로 감소 되었으며, 특히 IL-10 50 ng/mL의 농도에서는 VEGF 억제 능력이 매우 뚜렷하게 나타났으며 통계적으로 유의함을 관찰하였다. 시간 별 IL-10의 억제 능력은 24시간부터 IL-10 20, 50 ng/mL의 농도에서 통계적으로 유의하게 VEGF의 발현 양을 감소 시켰으며, 특히 72시간 배양액에서는 IL-10에 의한 VEGF 억제가 뚜렷이 나타났으며 IL-10 10 ng/mL의 농도에서부터 통계적으로 유의하게 나타났다. 이러한 VEGF 억제에 IL-10에 의한 세포 독성은 없는지 조사하기 위해 MTT법을 이용해 세포에서 독성효과를 관찰하였으나 IL-10의 농도에 따른 독성효과는 없었다(그림 2).

3. 류마티스관절염 활막 세포에서 IL-10에 의한 ERK와 AP-1 인산화 억제 조절

기존에 TGF- β 는 ERK와 AP-1의 신호 전달을 활성화 시키는 것으로 보고 되었다 (15). 따라서 류마티스관절염 활막 세포에서 TGF- β 가 ERK와 AP-1를 활성화 시켜 VEGF를 증가시키는지 조사하였다. 활막 세포 1×10^4 cell/mL의 농도로 배양된 세포에 TGF- β 를 처리하기 2시간 전 ERK 억제제 PD98059, JNK 및 AP-1 억제제 curcumin, SP600125 처리하고 TGF- β 는 10 ng/mL의 농도로 처리하여 48시간 후 배양액에서 VEGF를 측정하였다. 결과 TGF- β 에 의해 증가되었던 VEGF 발현은 ERK 억제제 PD98059와 AP-1 억제제 SP600125에 의해서 감소 되었다. 뿐만 아니라 TGF- β 자극 6시간 후에 phospho ERK와 phospho C-Jun (AP-1)의 발현이 증가 되었으며, IL-10 10, 50 ng/mL의 농도로 함께 처리하였을 때 TGF- β 에 의해 증가되었던, phospho ERK와 phospho C-Jun의 발현은 억제 되었다. 특히 IL-10에 의해 phospho ERK 발현은 뚜렷하게 억제 되었다(그림 3).

4. 류마티스관절염 활막 조직에서 ERK, AP-1, VEGF와 IL-10 발현 조사

류마티스관절염 활막 세포에서 IL-10은 TGF- β 에 의해 활성화된 VEGF를 억제하며, 이때 ERK와 AP-1 신호 전달을 매개하여 억제하는 것으로 확인 되었다. 따라서 류마티스관절염 환자와 대조군인 골관절염 환자의 활액 내 VEGF와 IL-10의 mRNA 발현 양

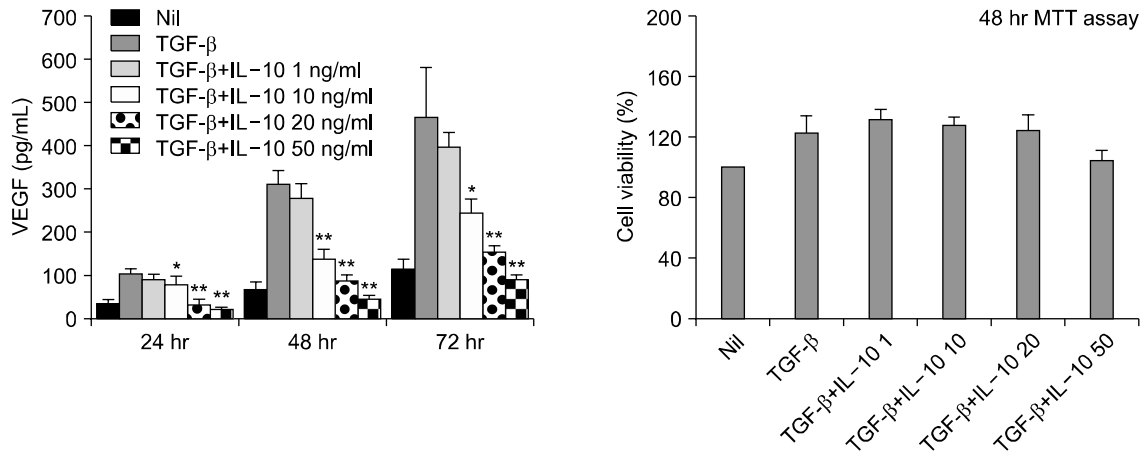


Fig. 2. IL-10 inhibits the TGF- β induced VEGF production in synovial fibroblasts. The FLSs were cultured for 24, 48 and 72 h with TGF- β (10 ng/mL) in the presence of increasing doses of IL-10 (1~50 ng/mL). The level of VEGF in the supernatants was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell viability was assessed using MTT assay. The data is expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01 versus the that were well treated with TGF- β alone).

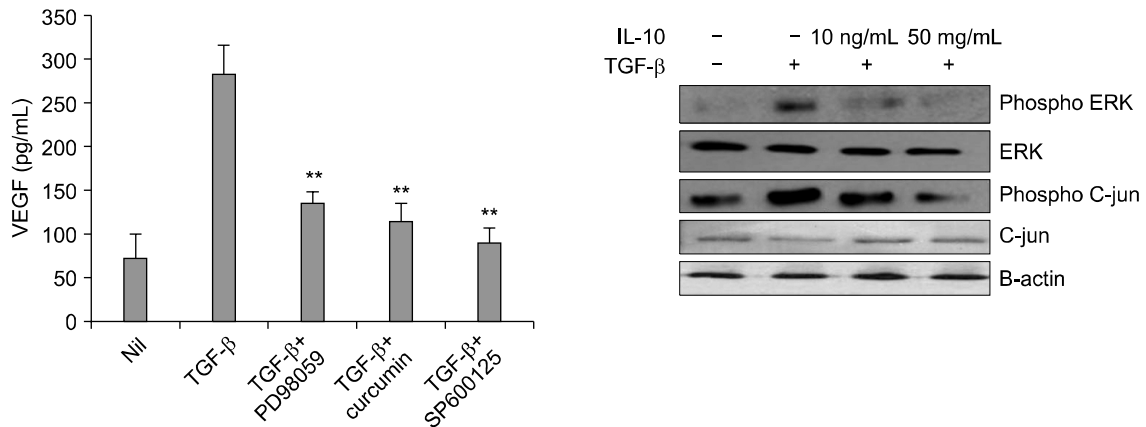


Fig. 3. IL-10 inhibits the TGF- β -induced phospho ERK and phospho C-Jun expressions in synovial fibroblasts. The FLSs were cultured for 48 h with medium alone or with 10 ng/mL of TGF- β in the presence of PD98059 (an ERK inhibitor), curcumin and SP600125 (a JNK and Ap-1 inhibitor, respectively). The level of VEGF in the supernatants was measured by ELISA. The levels of phospho ERK and phospho C-Jun in the cell lysates were measured by western blotting. This data shows the dose-dependent inhibition of the phospho ERK and phospho C-Jun expressions by IL-10 (10 ng/mL, 50 ng/mL). The data is expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments (** p <0.01 versus the that were well treated with TGF- β alone).

을 비교 조사하였다. 류마티스관절염 환자군과 대조군의 활액 내에서 단핵 세포를 분리하여 VEGF와 IL-10의 유전자 발현을 조사하였다. 결과 흥미롭게도, 대조군 SFMC와 비교해 류마티스관절염 환자의

SFMC에서 VEGF의 유전자 발현은 의미있게 높음을 관찰하였으며, 이에 반해 IL-10의 유전자 발현 양은 대조군에 비하여 감소되어 있음을 조사하였다. 류마티스관절염 활막 조직에서 VEGF의 발현 및 ERK,

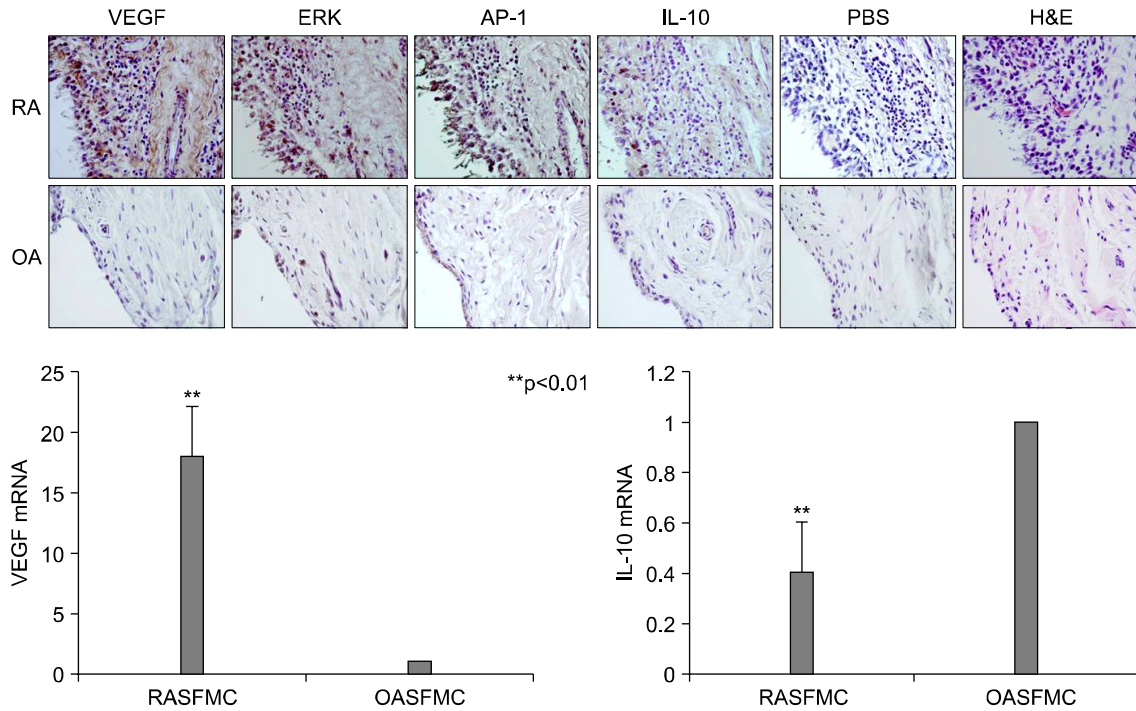


Fig. 4. VEGF was highly expresses by RA patients, as compared to the OA patients, in the synovial tissue and synovial fluid mononuclear cells. Immunostaining was performed using the specific antibodies against VEGF, ERK, AP-1 and IL-10 in the synovial tissue samples from the patients with RA and OA. VEGF, ERK, AP-1 and IL-10 stained a brown color. All the tissues were counterstained with hematoxylin (original magnification $\times 400$). The levels of mRNA VEGF and IL-10 in the synovial fluid were measured by RT-PCR. The data is expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments (** $p < 0.01$ versus OA SFMC).

AP-1의 발현이 대조군에 비하여 증가되어 있음을 면역조직화학염색법을 통해서 관찰 하였다. 이러한 결과로 류마티스관절염은 환자의 병인조직과 생체물질에서 VEGF가 IL-10과 상반된 발현양상을 보이는 것을 조사하였고, 이때 VEGF 생성반응에 주요한 ERK와 AP-1 신호전달 분자 또한 병인조직의 병변 부위에서 VEGF와 함께 의미있게 증가됨을 조사하였다(그림 4).

고 찰

류마티스관절염은 초기 면역반응에는 T 세포의 활성화로 인해 염증반응이 시작되어 질환의 병인 활성화반응이 상승되면서 질환 악화가 심화될수록 상대적으로 T 세포의 영향력이 감소하고 활막 세포의

비정상적 증식 및 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화로 인해 관절 파괴가 지속적으로 나타나게 된다 (16). 이러한 관절내 활막의 염증과 증식으로 인해 조직에서의 산소의 요구도가 증가하여 (8), 활막에서 혈관신생이 진행되며 면역 염증세포로의 영양분과 산소 공급이 이루어지게 된다.

VEGF는 관절염 초기에 나타나는 혈관신생 촉진인자로서 내피세포의 증식, 혈관신생 및 모세혈관 투과성을 증가시키고 (17), 배아발육(embryonic development), 창상 치유, 고형종양의 성장 및 복수생성 등의 정상 및 비정상적인 과정에 주요한 역할을 한다 (18).

류마티스관절염의 병인과 관련된 보고에 따르면 골관절염이나 다른 관절염에 비하여 류마티스관절염 환자의 활액 및 혈액에서 VEGF가 유의하게 증가되고 (19), 활동성 류마티스관절염 활막내 활막 세포

및 대식세포에서 VEGF 발현의 증가가 보고되어 있다 (20). 류마티스관절염에서 VEGF의 강력한 활성화 유도자로는 TGF- β 가 알려져 있다 (8,21). TGF- β 는 세포 성장, 염증 반응, 신생혈관 형성 등의 다양한 기능을 가지는 사이토카인으로, 류마티스관절염의 활막 조직에서 높은 농도로 발현되며, 활막 세포에서 VEGF의 강력한 활성화자 뿐만 아니라 IL-6의 활성을 일으키는 것으로 알려져 있다 (21).

본 연구에서는 신생혈관형성에 의한 류마티스관절염의 과도한 활막 증식 및 염증반응을 제어하기 위하여 항 사이토카인으로 IL-10을 선택하였다.

IL-10은 이식거부, 염증, 자가면역의 특징을 갖는 많은 질환에서 치료적인 특징뿐만 아니라 병인적인 특징을 갖는 것으로 사이토카인으로 알려져 있다 (22). IL-10은 기존의 연구를 통해 종양세포 주변의 신생혈관억제 능력이 확인 (23) 되었으나 종양세포와 유사하게 성장하는 류마티스관절염 활막 세포에서 VEGF 생성과 관련된 IL-10의 역할은 조사되지 않았다.

본 연구의 결과에 따르면 IL-10은 TGF- β 에 의해 증가되는 VEGF의 생산을 전사수준에서만 아니라 단백질 발현수준에서도 억제시켰으며 이러한 억제는 MAPK (ERK)와 AP-1의 신호체계 조절 의존적임이 확인되었다. 기존 결과에 따르면 류마티스관절염의 활막 세포에서 특정 약물을 이용한 VEGF 생산 조절 메커니즘 조사에서도 p38MAPK와 AP-1 의존적으로 VEGF의 생산이 억제됨이 조사되어 (24), 류마티스관절염 환자의 활막 세포에서 신생혈관 생성에 MAPK와 AP-1의 신호체계가 중요함을 알 수 있다 (24).

최근 보고된 바에 의하면 류마티스관절염 활막 세포에서 신생혈관 생성반응과 인자들을 조절한 것으로 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)의 음성적인 조절 자로써 phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)에 의한 PI3-kinase/Akt 활성화의 차단은 류마티스관절염의 전임상 동물 모델의 활막 세포 내 Akt 인산화를 감소시키고 신생혈관 생성을 감소되는 것이 보고되었다 (25).

류마티스관절염 환자의 활막 조직에서의 IL-10의 발현은 많은 면역세포의 침윤에도 불구하고 증가되어 있지 않고 이에 비해 VEGF는 높게 발현되었는데 이는 과도한 활막 내 염증과 신생혈관의 활성화의 가속화에 기여할 것이다. 최근 보고에 따르면 CD147

을 높게 발현하는 환자의 활막 세포에서 생성된 VEGF에 의해 신생혈관 형성됨을 보고하였고 PI3-kinase/Akt 신호체계의 차단을 통해 이러한 세포에서의 VEGF 생산량이 감소함을 확인하였다 (26).

따라서 우리의 결과는 IL-10은 MAPK와 AP-1 신호 분자의 차단을 통해서 VEGF를 억제하는 결과를 얻었으며, IL-10의 발현이 VEGF의 생성을 억제하여 신생혈관 형성을 차단할 수 있고, 이로 인하여 과도한 병인 활성화 반응 부위로의 면역세포 이동과 침윤을 억제할 수 있다는 것을 추측할 수 있게 한다. 뿐만 아니라 류마티스관절염 환자의 활막 내 단핵구 세포에서도 VEGF의 발현은 높은 반면 IL-10의 발현이 낮은 것을 관찰 하였으며 이러한 결과는 실제 류마티스관절염 환자에서 IL-10의 발현이 낮음으로 인해 VEGF의 발현이 제어되지 못하여 과도한 관절 손상 및 염증 반응을 제어하지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 류마티스관절염 질환에서 IL-10이 신생혈관 형성을 통한 관절과괴 병인 반응을 제어할 수 있을 것으로 기대한다. 이러한 결과는 류마티스관절염 활막 세포에서 IL-10이 중요한 병인 조절 반응을 주도할 수 있는 것을 시사한다.

결 론

류마티스관절염의 활막 세포에서 TGF- β 의 신호를 통해 ERK와 C-Jun/AP-1이 활성화 되어 신생혈관생성인자 VEGF가 생성되며 이때 IL-10은 ERK와 AP-1 신호전달분자의 인산화를 억제하여 VEGF 생성을 차단하였다. 이는 활막과 조직에서 IL-10을 이용해 신생혈관생성 반응을 조절하고 류마티스관절염 환자의 치료에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1) Koch A. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:951-62.
- 2) Harris ED Jr. Recent insights into the pathogenesis of the proliferative lesion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1976;19:68-72.
- 3) Walsh DA. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:103-12.
- 4) Hong KH, Cho ML, Min SY, Shin YJ, Yoo SA, Choi

- JJ, et al. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2007;147:573-9.
- 5) Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:321-4.
 - 6) Maeno N, Takei S, Imanaka H, Takasaki I, Kitajima I, Maruyama I, et al. Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:2244-8.
 - 7) Jackson JR, Minton JAL, Ho ML, Wei N, Winkler JD. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin-1 β . *J Rheumatol* 1997;24:1253-9.
 - 8) Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganeli P, Yeo K, Brown F, et al. Hypoxia augments cytokine [transforming growth factor-beta (TGF-beta) and interleukin (IL)-1]-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1999;115:176-82.
 - 9) Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor- κ B and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 1999;48:1131-7.
 - 10) Lee TH, Avraham H, Lee SH, Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:10445-51.
 - 11) Sone H, Kawakami Y, Sakauchi M, Nakamura Y, Takahashi H, Shimano H, et al. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:562-8.
 - 12) Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:697-703.
 - 13) Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 2000;87:448-52.
 - 14) Cervenak L, Morbidelli L, Donati D, Donnini S, Kambayashi T, Wilson JL, et al. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. *Blood* 2000;96:2568-73.
 - 15) Finlay GA, Thannickal VJ, Fanburg BL, Paulson KE. Transforming growth factor beta1 induced activation of the ERK pathway and AP 1 in human lung fibroblasts requires the autocrine induction of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 2000;8:27650-6.
 - 16) Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis: T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum* 2002;46:298-308.
 - 17) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-35.
 - 18) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. *Science* 1983;219:983-96.
 - 19) Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Immunol* 1994;180:341-7.
 - 20) Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1624-30.
 - 21) Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, Katoh R, Ando T, Watanabe Y, et al. TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int Immunol* 2007;19:117-26.
 - 22) Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MC, de Bruin K, Cutler DL, Affrime MB, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J Immunol* 1997;158:3971-7.
 - 23) Di Carlo E, Coletti A, Modesti A, Giovarelli M, Forni G, Musiani P. Local release of interleukin-10 by transfected mouse adenocarcinoma cells exhibit pro- and anti-inflammatory activity and results in a delayed tumor rejection. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:61-8.
 - 24) Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, et al. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002;46:1202-9.
 - 25) Wang CR, Shiau AL, Chen SY, Lin LL, Tai MH,

- Shieh GS, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by adenovirus-mediated PTEN gene transfer. *Arthritis Rheum* 2008;58:1650-6.
- 26) Wang CH, Chen LN, Zhu P, Fan CM, Wang YH, Jia JF. CD147 stimulates the angiogenesis in rheumatoid synovium via the activation of vascular endothelial growth factor. *J Mol Cell Immunol* 2007;23:426-8.
-