

콜라겐 유도성 관절염 마우스모델에서 레스베라트롤 식이요법의 류마티스관절염 완화효과

천윤홍¹ · 김현옥¹ · 서영선¹ · 허재형¹ · 조원용¹ · 임혜송¹ · 하영술² · 성미정³ · 권대용³ · 이상일¹

¹경상대학교 의학전문대학원 내과학교실 및 건강과학연구소, ²경상대학교병원 임상연구소, ³한국식품연구원

Inhibitory Effects for Rheumatoid Arthritis of Dietary Supplementation with Resveratrol in Collagen-induced Arthritis

Yun-Hong Cheon¹, Hyun-Ok Kim¹, Young-Sun Suh¹, Jae Hyung Hur¹, Wonyong Jo¹, Hye-Song Lim¹, Young-Sool Hah², Mi Jeong Sung³, Dae Young Kwon³, Sang-Il Lee¹

¹Department of Internal Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University School of Medicine, ²Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital, Jinju, ³Research Division for Emerging Innovative Technology, Korea Food Research Institute, Seongnam, Korea

Objective. Resveratrol is well-known for its anti-inflammatory, anti-oxidant effects on several diseases. We investigated whether dietary supplementation with resveratrol may suppress joint inflammation and destruction in a mouse model of collagen-induced arthritis (CIA). **Methods.** Mice were randomly divided into two groups; CIA mice with normal diet-fed and CIA mice fed a 0.05% resveratrol diet. The effect of resveratrol on arthritis was assessed by clinical scoring system. The plain radiographs of paws were obtained to evaluate the effects on preventing bone destruction. Joint inflammation, cartilage damage, and osteoclastic bone resorption were checked by staining with H&E, Safranin-O, and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). Levels of pro-inflammatory cytokines were checked by enzyme-linked immunosorbent assay. The level of expression of nuclear factor (NF)- κ B was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results.** Dietary supplementation with resveratrol led to mitigated severity of arthritis compared to the normal diet group (6.7 ± 0.8 vs. 2.7 ± 0.6 , $p < 0.01$). Resveratrol-fed mice showed decreased bone destruction on radiograph (3.4 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.2 , $p < 0.01$), and showed significantly inhibited pathological changes (inflammation 2.0 ± 0.3 vs. 3.2 ± 0.2 , $p < 0.01$; cartilage damage 1.5 ± 0.3 vs. 3.2 ± 0.2 , $p < 0.01$; pannus formation 1.4 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.3 , $p < 0.01$; erosion; 1.4 ± 0.2 vs. 3.3 ± 0.3 , $p < 0.01$). Generation of TRAP-positive osteoclasts was inhibited in the resveratrol-fed mice (55.3 ± 12.7 vs. 3.27 ± 0.8 , $p < 0.01$). Resveratrol-fed mice showed decreased levels of tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, monocyte chemoattractant protein 1, and the soluble receptor activator of NF- κ B ligand in joint tissues and sera. Expression of NF- κ B, measured by EMSA, was decreased in resveratrol-fed mice. **Conclusion.** Dietary supplementation with resveratrol mitigates inflammation and bone destruction in CIA mice. (*J Rheum Dis* 2015;22:93-101)

Key Words. Collagen-induced arthritis, Resveratrol, Rheumatoid arthritis

Received : April 13, 2014, Revised : December 31, 2014, Accepted : January 30, 2015

Corresponding to : Sang-Il Lee, Department of Internal Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University School of Medicine, 79 Gangnam-ro, Jinju 660-702, Korea. E-mail : golgu@gnu.ac.kr

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718

Copyright © 2015 by The Korean College of Rheumatology. All rights reserved.

This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis)은 만성적인 염증과 다발성 관절의 파괴를 특징으로 하는 전신성 자가 면역 질환으로 치료비용과 사회경제적인 비용이 계속해서 증가하고 있다[1,2]. 현재 류마티스관절염의 치료는 항류마티스제(disease modifying antirheumatic drugs) 및 다양한 생물학적 제제를 통해 주로 이루어지고 있다. 특히 최근에 류마티스관절염의 발병기전에 대한 연구가 발전되면서 adalimumab, etanercept, infliximab 등의 tumor necrosis factor (TNF)- α 길항제를 포함하여 interleukin (IL)-6 수용체 길항제인 tocilizumab, T세포를 억제하는 abatacept, B세포를 억제하는 rituximab 등 다양한 생물학적 제제가 광범위하게 사용되면서 류마티스관절염의 치료성적이 획기적으로 개선되었다[3,4]. 그럼에도 불구하고, 여전히 많은 류마티스관절염 환자들이 효과가 입증되지 않은 다양한 건강보조식품이나 대체의학을 무분별하게 이용하고 있는 실정이다[5,6]. 그래서 가격이 저렴하고 부작용이 적으면서 실제로 류마티스관절염의 예방이나 치료에 도움이 되는 건강 식품들을 올바르게 규명하는 연구의 중요성이 강조되고 있다[7,8].

레스베라트롤(resveratrol; 3,5,6-trihydroxystilbene)은 식물성 항독성물질(plant phytoalexin)의 일종으로 다양한 질환에서 항염증, 항산화, 항암 효과를 나타낸다고 알려져 있다[9-13]. 그리고 레스베라트롤은 여러 세포 및 동물실험에서 T세포 및 B세포 혹은 세포 내 신호전달경로를 조절하여 류마티스관절염에 대한 치료효과를 나타낸다고 보고되었다[13-20]. 그러나 기존 연구들은 짧은 기간 동안 피하 또는 복강주사로 투여하여 진행한 연구들로서 생체 이용률이 낮다고 알려진 레스베라트롤이 주로 경구 복용하는 건강보조식품이나 보조제 형태로 개발될 수 있을지는 여전히 의문이다. 그러므로 레스베라트롤을 식이요법의 형태로 장기간 경구로 섭취했을 때 류마티스관절염의 발생을 예방할 수 있는지에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

따라서 본 저자들은 류마티스관절염의 대표적 동물 모델인 콜라겐 유도 관절염(collagen induced arthritis, CIA) 마우스를 이용하여 레스베라트롤이 함유된 사료를 장기간 복용하였을 때 관절염의 완화 정도와 관절 파괴에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

Collagen induced arthritis의 제작 및 레스베라트롤 투여

6주령의 수컷 DBA/1 마우스를 구입하여(Orient, Seoul, Korea) 1주 동안의 적응기간을 거친 후 7주령의 마우스를 대상으로 CIA를 유도하였다. 모든 실험은 경상대학교병원의 동물실험 윤리위원회(institutional animal care and

use committee)에 의해 승인된 규정에 따랐다(승인번호: GLA-100917-M0092). 1마리당 150 μ g의 제2형 콜라겐(Chondrex, Redmond, WA, USA)을 동일한 양의 2 mg/mL 농도의 complete Freund's adjuvant (Chondrex)와 1:1 비율로 혼합하여 마우스 꼬리 기저부 2 cm 아래쪽의 피내에 천천히 주입하였다. 3주 뒤 100 μ g의 제2형 콜라겐과 incomplete Freund's adjuvant (Chondrex)를 1:1의 비율로 혼합하여 마우스 꼬리 기저부 1 cm 아래쪽의 피내에 천천히 주입하여 CIA를 유도하였다[21].

실험동물은 무작위로 2개 군으로 나누었으며 각 군은 10 마리였다. 본 실험에서 식이는 AIN-93G diet (중앙실험동물)을 기본으로 배합하여 공급하였다. 대조군 식이는 AIN 93G diet을 공급하였는데 조성은 카세인(casein) 140 g/kg, dyetrose 155 g/kg, 옥수수녹말(cornstarch) 465.692 g/kg, 자당(sucrose) 100 g/kg, 셀룰로오스(cellulose) 50 g/kg, 콩기름(soybean oil) 40 g/kg, t-butylhydroquinone 0.008 g/kg, 소금(salt mix) #210050 35 g/kg, VITAMIN Mix #310025 10 g/kg, L-시스틴(L-cystine) 1.8 g/kg, and 타타르산수소콜린(choline bitartrate) 2.5 g/kg이었다. 치료군 식이는 레스베라트롤을 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 0.05%의 비율로 AIN 93G diet에 섞어서 제작하였고 한국식품연구원에서 지원을 받았다.

마우스 한 마리당 레스베라트롤의 평균 섭취량은 80 mg/kg/d였다. 모든 실험군들은 CIA 유도 2주 전부터 실험 식이를 시작하였고 CIA 유도 후 9주 동안 실험 식이를 유지하였다.

관절염의 평가

CIA 2차 주사 이후 일주일에 2회씩 육안으로 실험 마우스들의 2개의 앞발과 2개의 뒷발(총 80개의 발)의 발적과 부종의 발생 유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 발생률(incidence) 및 관절염의 위중도(severity)를 평가하였다[22]. 관절염 발생률과 위중도 평가는 blind된 관찰자에 의해 평가되었다. 각 다리당 관절염의 위중도는 0~3점으로 분류하였다. 0점은 발에 아무런 증상이 나타나지 않은 정상적인 상태이며, 1점은 발가락, 발등, 발목 등에서 한 군데라도 최소한의 종창이나 홍조가 유발된 상태, 2점은 발가락, 발등, 발목 중 두 군데 이상에서 확실한 부종과 홍조가 발생한 상태, 3점은 발가락에서 발목 전 부위에 걸쳐서 상당한 부종과 종창이 관찰되거나 강직으로 발을 자유로이 이용하지 못하는 상태로 규정하였다[22]. 마우스에서 관절염 점수가 2점 이상인 경우를 관절염이 발생한 것으로 간주하였다. 발목의 두께는 electrical caliper를 사용하여 발목 중 부종이 가장 심한 부위에서 측정을 하였다. 관절염 유발 49일째에 CIA 마우스를 희생시키고 발목 조직을 채취하여 방사선적 및 조직학적 평가들을 진행하였다.

관절의 방사선적 평가

마우스를 희생시킨 후 뒷발을 채취하여 30 kVp와 90 mA의 조건으로 mammographic imager (Mammomat NovationDR; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)를 사용하여 단순방사선 촬영을 시행하였다. 단순 방사선 사진들은 류마티스내과 의사와 방사선과 의사가 함께 평가하였고, 관절 파괴(articular destruction) 및 골 미란(bone erosion) 정도는 0~5점으로 분류하였다[22]. 0점은 관절 손상이 없는 상태, 1점은 중족지 관절에서 발목관절까지의 여러 관절 중 하나의 관절에서만 골 미란을 보이는 상태, 2점은 한 관절에서 2~4개의 골 미란을 보이는 상태, 3점은 여러 관절에서 2~4개 이상의 골 미란이 동시에 보이는 상태, 4점은 여러 관절에서 골의 변형이 동반되는 심한 골 미란이 관찰되는 상태, 5점은 관절이 완전 파괴되거나 강직이 심하게 나타나는 상태로 정의하였다.

관절의 조직학적 평가

단순방사선 촬영을 마친 뒷발을 10% formalin으로 고정 한 이후 3주 동안 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)에서 탈 석회화(decalcification)를 시키고 파라핀(paraffin)으로 고정한 후 5 μ m 간격으로 조직을 절편하여 슬라이드를 제작하였다. 헤마톡실린-에오신(H&E) 및 사프란닌(safranin)-O 염색을 시행하였고 관절 내 염증, 판누스(pannus) 형성, 연골 손상(cartilage damage)과 골 미란 정도를 광학현미경으로 관찰하여 0~4점으로 평가하였다[22]. CIA 마우스에서 파골세포(osteoclast)의 흡수 정도(bone resorption activity)를 평가하기 위해 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 시행하였고, 각 슬라이드마다 현미경 시야에서($\times 200$) 열 군데를 무작위로 선정하여 세 개 이상의 핵을 가지는 TRAP 염색 양성 세포들을 세어서 합산하여 평가하였다.

사이토카인 측정

마우스를 희생시킨 후 즉시 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 -70°C 에서 보관하였다. 실험직전에 해동하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA; and R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용해 매뉴얼에 따라 TNF- α , IL-1 β , IL-6, soluble receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (sRANKL), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) 및 IL-17의 농도를 측정하였다. 발목을 적출하고 액화질소(liquid nitrogen)에서 빠르게 냉동시킨 후 냉동 조직들을 분쇄하고 proteinase inhibitor cocktail (Calbiochem, San Diego, CA, USA)이 포함되어 있는 lysis buffer (Mammalian Protein Extraction Reagent; Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을 분리한 후 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등을 측정하였다.

전기 이동성 교대 분석 실험(electrophoretic mobility shift assay)

마우스 조직으로부터 핵 추출물(nuclear extract)을 추출하여 proteinase inhibitor cocktail (Calbiochem)과 함께 배양하였고, 이후 NF- κ B의 nuclear binding activity를 보기 위해 κ -light chain 결합부위를 포함하는 oligonucleotide (5'-CCGGTTAACAGAGGGGGCTTCCGAG-3)를 합성하였다. Oligonucleotide에 동위원소인 α - ^{32}P -dCTP로 labeling하여 probe로 사용하였다. 이후 binding buffer (10 mM Tris HCL, pH 7.6, 500 mM KCL, 10 mM EDTA, 50% glycerol, 100 ng of poly [dI-dC], and 1 mM dithiothreitol)와 핵 추출물 10 μ g과 labeled oligonucleotides (10,000 counts per minute)를 넣어준 후 상온에서 30분 간 반응을 시킨 후 4% polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 전기영동 후 겔은 건조과정을 거쳐 film으로 현상하여 NF- κ B의 활성도를 관찰하였다[23].

통계적 유의성의 검증

Fisher's exact test를 이용하여 두 그룹간의 발병률 차이를 평가하였으며 Mann-Whitney U test를 시행하여 관절염 위중도 정도, 영상학적 결과 및 조직학적 결과를 분석하였다. 그 외의 다른 실험결과들은 Student's t-test를 사용하여 평가를 하였다. 실험결과들은 평균 \pm 표준오차로 나타냈으며 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다. 모든 데이터는 PASW ver. 18.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 분석을 하였다.

결 과

Collagen-induced arthritis 마우스에서 레스베라트를 식이의 관절염 위중도 감소효과

CIA 마우스에서 장기간의 레스베라트를 함유식이가 관절염의 발생을 억제하는지를 평가하기 위해서 CIA 유도 2주 전부터 실험이 종료될 때까지 총 11주 동안 레스베라트가 함유된 식이(평균 80 mg/kg/d)와 일반식이를 각각 섭취시키면서 실험을 진행하였다. 레스베라트를 함유식이를 시행한 마우스군은 대조군에 비해서 관절염의 위중도가 감소하였다(Figure 1). 특히, 실험 28일째부터 일반식이를 한 CIA 마우스에서 관절염의 위중도가 계속 증가한 반면, 레스베라트를 함유식이를 한 CIA 마우스에서는 관절염의 점수와(6.7 ± 0.8 vs. 2.7 ± 0.6 , $p<0.01$) 발목 두께가(4.2 ± 0.1 vs. 3.6 ± 0.1 mm, $p<0.01$) 각각 통계적으로 유의하게 감소하였다.

Collagen-induced arthritis 마우스에서 레스베라트를 함유식이의 영상학적 관절파괴 억제 효과

CIA 유도 후 49일째 발목 관절을 채취하여 단순 방사선

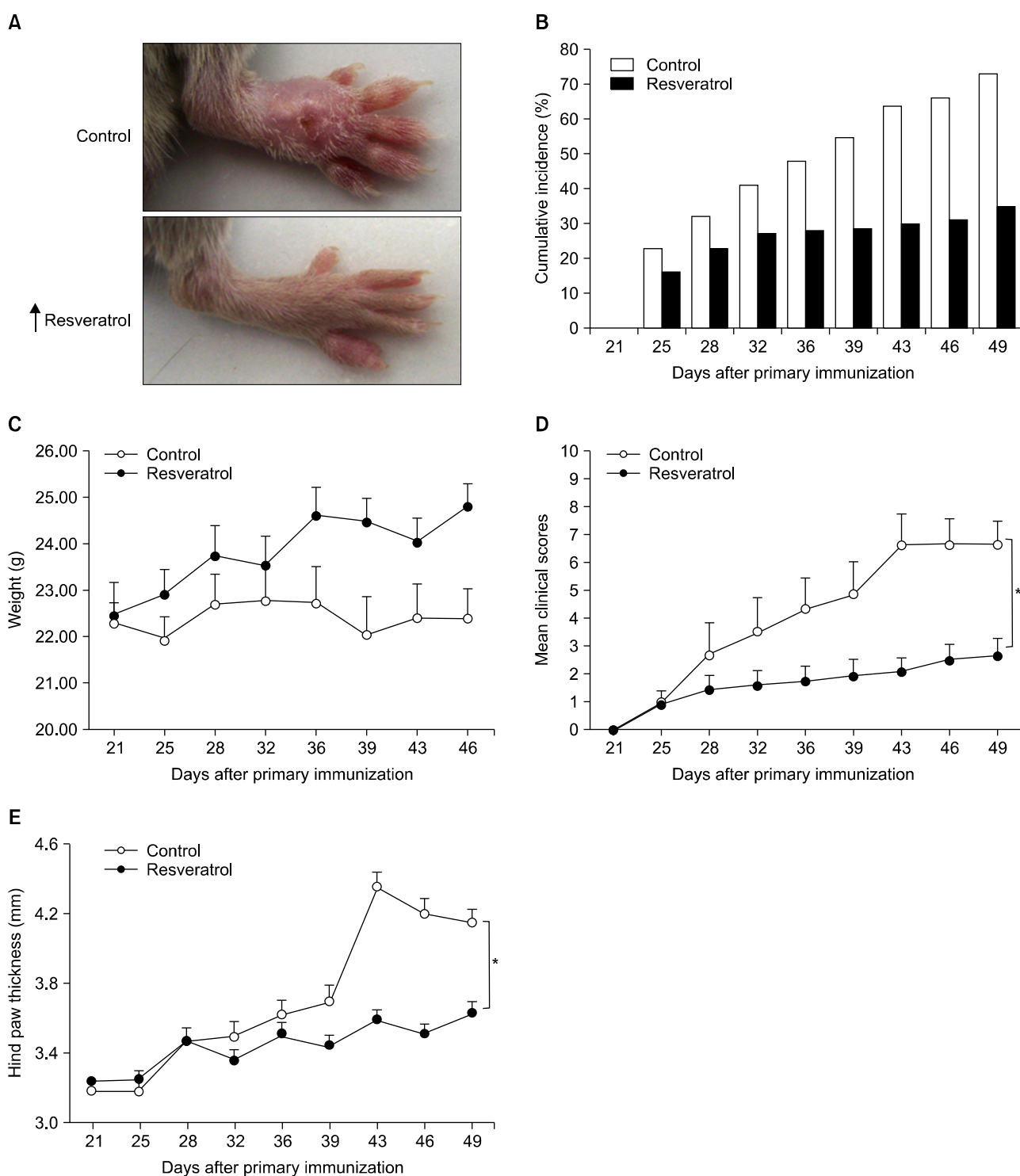


Figure 1. Resveratrol feeding mitigates erythema and joint swelling in collagen-induced arthritis mice. (A) Representative images show the gross features of the hind paws on day 49. The normal diet-fed mice show more severe erythema and swelling (upper panel) compared with resveratrol-fed mice (lower panel). (B) The cumulative incidence of arthritis. The mice were considered arthritic when inflammation was observed in any paw with ≥ 2 , and the incidence of arthritic mice in each group is shown as a percentage. (C) Weight of mice checked in each group was checked until day 49. (D) Clinical scores, as assessed by a visual arthritis scoring system were checked until day 49. (E) The hind paw thickness was measured on the indicated days after the primary immunization. Values are mean \pm standard error, $n = 10$ mice for each group. * $p < 0.01$ versus normal diet-fed mice.

촬영을 시행하였다. 일반식이를 한 대조군에서는 CIA 마우스의 전형적인 특징인 관절 파괴, 관절 변위(joint displacement) 및 불규칙한 뼈 증식(irregular bony proliferation) 등의 소견이 발목 관절 전반에 걸쳐서 확인되었다. 그러나 레스베라트롤 함유식이를 시행한 CIA 마우스군에서는 관절 파괴가 훨씬 적게 관찰되었다(Figure 2A). 관절 파괴 정도를 정량적으로 나타내는 관절평가 점수도 일반 식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 시행한 CIA 마우스군에서 통계적으로 유의하게 낮게 나타났다(3.4 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.2 , $p < 0.01$; Figure 2B).

Collagen-induced arthritis 마우스에서 레스베라트롤 함유식이의 병리학적 효과

염증, 연골손상, 뼈의 파괴 및 파골세포 활성도를 평가하기 위해서 관절 조직을 광학현미경으로 관찰하였다. 일반식이를 한 대조군 CIA 마우스들의 관절에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스군에서는 염증 정도, 판누스 형성, 관절 파괴의 소견 등이 현저하게 감소되었다(Figure 3A). 정량적인 병리학적 점수도 일반 식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스군에서 통계적으로 유의하게 낮았다(inflammation 3.2 ± 0.2 vs. 2.0 ± 0.3 , $p < 0.01$; cartilage damage 3.2 ± 0.2 vs. 1.5 ± 0.3 , $p < 0.01$; pannus formation 3.0 ± 0.3 vs. 1.4 ± 0.3 , $p < 0.01$; erosion; 3.3 ± 0.3 vs. 1.4 ± 0.2 , $p < 0.01$; Figure 3B). 파골세포의 형성 정도를 평가하기 위해 시행한 TRAP 염색에서도 일반식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스들에서 TRAP 양성 세포수가 유의하게 감소되었다(55.3 ± 12.7 vs. 3.27 ± 0.8 , $p < 0.01$; Figure 3C).

Collagen-induced arthritis 마우스에서 레스베라트롤 함유식이의 염증성 사이토카인 억제 효과

레스베라트롤 경구섭취가 류마티스관절염의 발생에서 중요한 역할을 하는 다양한 염증매개 물질 및 골 파괴인자의 생성에 미치는 영향을 관절 조직 및 혈청에서 ELISA를 통해서 측정하여 비교하였다. 일반 식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스들의 관절조직에서 TNF- α (124.7 ± 8.2 vs. 61.6 ± 11.3 pg/mL; $p < 0.05$), IL-1 β (429.5 ± 68.8 vs. 227.2 ± 56.9 pg/mL; $p < 0.05$), IL-6 (422.8 ± 4.4 vs. 117.4 ± 19.4 pg/mL; $p < 0.01$), sRANKL (367.2 ± 49.6 vs. 111.7 ± 56.9 pg/mL; $p < 0.01$), MCP-1 (406.9 ± 106.5 vs. 89.2 ± 27.3 pg/mL; $p < 0.01$) 등의 농도가 각각 통계적으로 유의하게 감소되었다(Figure 4A). 그리고 혈청에서도 일반 식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스들의 경우 TNF- α (92.3 ± 38.9 vs. 20.8 ± 6.1 pg/mL; $p < 0.05$)와 IL-1 β (570.9 ± 89.8 vs. 357.1 ± 19.9 pg/mL; $p < 0.01$)의 농도가 통계적으로 유의하게 감소되었다(Figure 4B). 또한 염증성 사이토카인들의 감소가 NF- κ B 경로와 관련이 있는지를 확인하기 위해

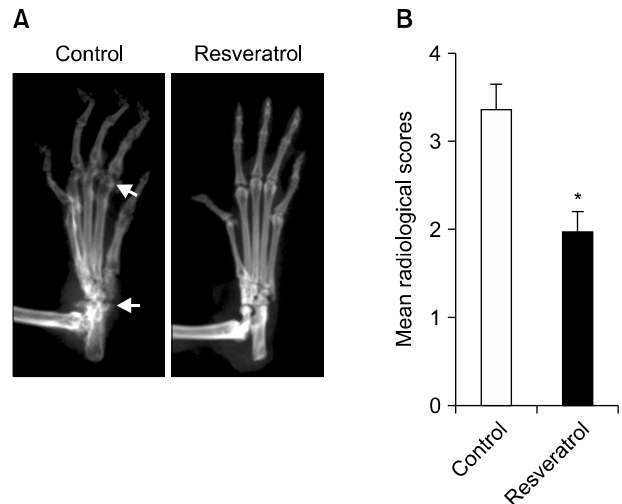


Figure 2. Resveratrol feeding suppresses bone destruction in collagen-induced arthritis (CIA). The hind paws from CIA mice were taken for radiological analysis on day 49. (A) Representative radiographs of hindpaws. Normal diet-fed mice show severe bone erosion and joint damage (arrows) compared with resveratrol-fed CIA mice. (B) Quantitative analysis of bone destruction. Values are mean \pm standard error, $n = 10$ mice for each group. * $p < 0.01$ versus normal diet-fed mice.

마우스 발목 조직을 이용하여 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 시행하였다. 일반 식이군에 비해서 레스베라트롤 함유식이를 한 CIA 마우스들의 관절조직에서 NF- κ B 발현 정도가 감소하여 있음을 확인하였다(Figure 4C).

고 찰

본 연구에서는 류마티스관절염의 대표적인 마우스 모델인 CIA 마우스에서 단기간의 피내 또는 복강 내 주사투여가 아닌 경구를 통한 장기간의 레스베라트롤 함유식이가 관절의 염증 및 뼈의 파괴에 어떤 영향을 미칠 것인가를 살펴보았다. 11주 동안 레스베라트롤이 함유된 식이요법이 관절염의 위중도와 관절의 파괴를 감소시키는 것을 확인하였고 추가로 관절 및 혈청에서 염증성 사이토카인의 분비가 감소되고 조직학적 및 영상의학적 연구에서도 관절과괴를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

류마티스관절염은 대표적인 자가면역질환이자 만성 염증성 질환으로 치료받지 않는 경우 관절의 파괴에 따른 영구적인 장애발생으로 일상 생활의 심각한 불편과 막대한 경제적 손실을 초래한다[24]. 류마티스관절염은 일반적으로 비스테로이드성소염제, 부신피질호르몬제 및 항류마티스제제와 생물학적제제 등을 사용하여 치료한다[3,4]. 최근 류마티스관절염의 병태 생리에 대한 이해의 증가로 류

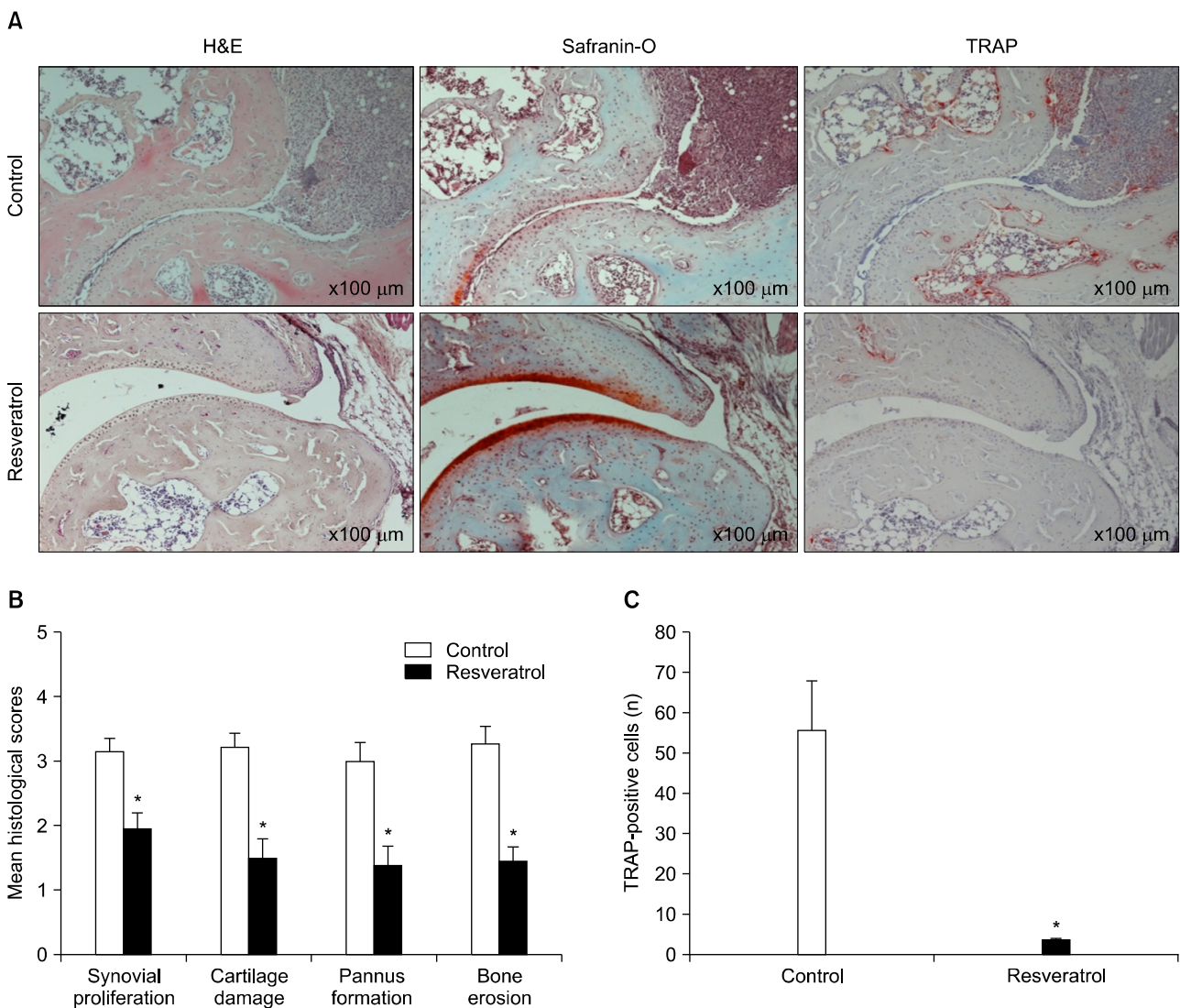


Figure 3. Resveratrol feeding reduces pathologic findings and osteoclastogenesis. (A) Representative histological features of ankle joints, hind paws from collagen-induced arthritis mice were obtained on day 49, sectioned, and stained with H&E, safranin-O, or tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) ($\times 100$). (B) Quantitative scores of histological abnormalities. (C) Total number of TRAP-positive cells per field. Values are mean \pm standard error, $n = 10$ mice for each group. * $p < 0.01$ versus normal diet-fed mice.

마티스관절염의 치료에 많은 진전이 있었으나 높은 약제비, 다양한 약물의 부작용 및 국내 보험기준에 의한 고가 약물 사용의 제한 등의 어려움이 여전히 존재한다[25]. 또한 류마티스관절염은 완화와 악화를 반복하면서 오랜 기간 지속되는 특징이 있어서 많은 류마티스관절염 환자들이 다양한 종류의 건강보조식품, 민간요법 및 대체 의학 등에 의존하거나 병원치료를 병행하고 있는 실정이다. 실제로 2002년 Kim 등[5]은 류마티스관절염 환자의 34.4%에서 대체의학을 이용하고 있음을 보고하였고, 2008년 Lee 등[6]은 류마티스관절염 환자의 37%에서 대체의학 및 건강보조식품을 경험하였다고 보고하였다. 다양한 기능성 식품 중에는 류마티스관절염의 발생을 예방한다고 보고된 오메가-3처럼 일부 효과가 검증된 것도 있지만

[26], 여전히 대부분의 기능성 식품들이 류마티스관절염에 미치는 영향은 대부분 과학적으로 검증이 되지 않은 상태이다. 따라서 최근 새로운 천연물 신약 혹은 기능성 식품으로서 관심이 높아진 레스베라트롤이 류마티스관절염에 미치는 효과에 대한 검증이 필요하다.

레스베라트롤은 적어도 70종 이상의 식물에서 발견되는 식물성 항독성 물질로서, 특히 적포도의 껍질과 레드 와인에 다량 함유되어 있다[9,26]. 레스베라트롤은 ‘프렌치 패러독스’라고 불리는 현상, 즉 프랑스인들이 고기를 많이 섭취함에도 심혈관 질환이 적게 발생하는 것이 레드 와인에 많이 함유된 레스베라트롤 때문이라고 알려지기 시작하면서 최근 각광을 받게 되었고[27], 이후 많은 연구들을 통해서 레스베라트롤은 다양한 질환에서 항염증작용(anti-in-

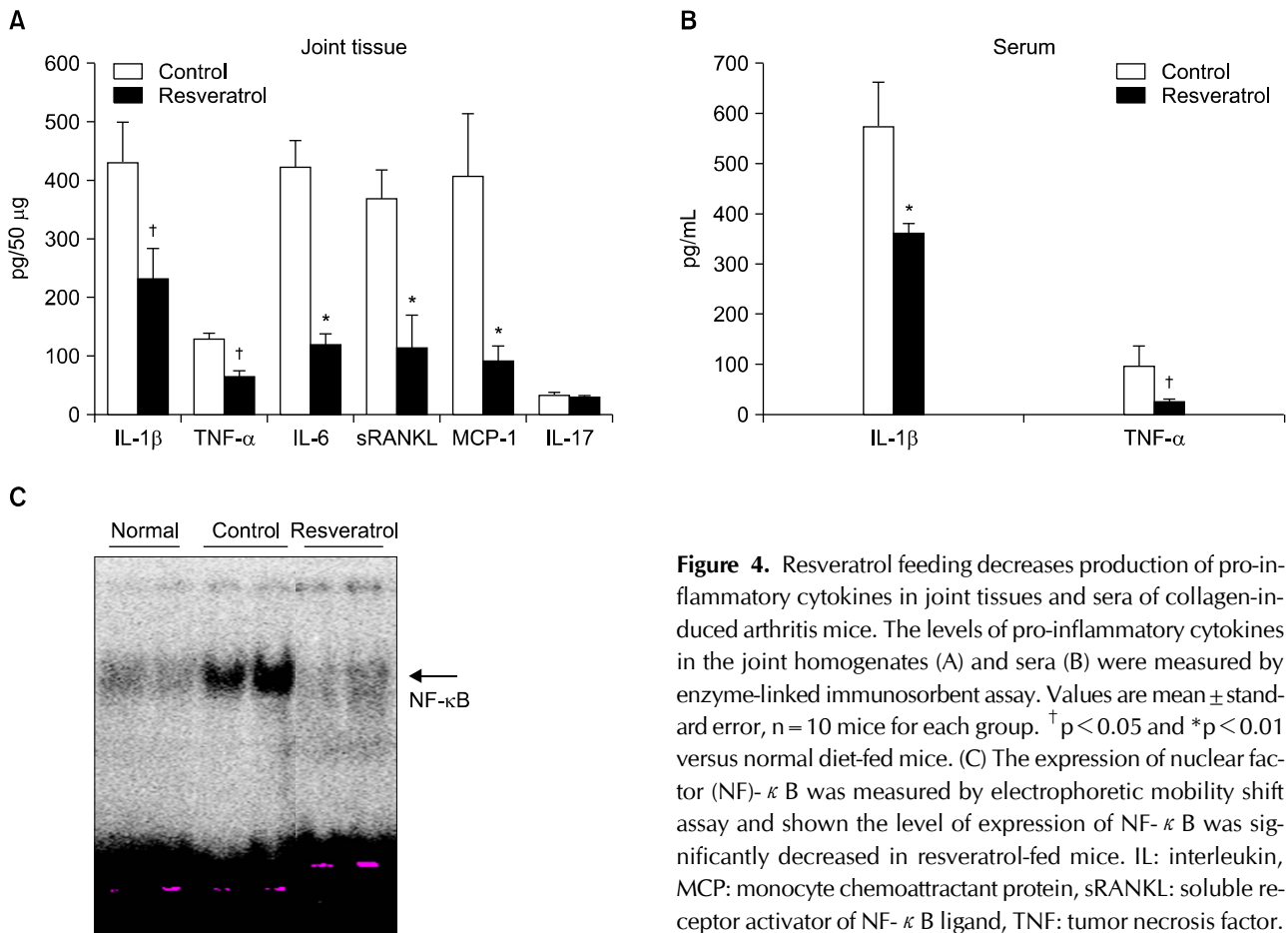


Figure 4. Resveratrol feeding decreases production of pro-inflammatory cytokines in joint tissues and sera of collagen-induced arthritis mice. The levels of pro-inflammatory cytokines in the joint homogenates (A) and sera (B) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Values are mean \pm standard error, $n = 10$ mice for each group. [†] $p < 0.05$ and $^*p < 0.01$ versus normal diet-fed mice. (C) The expression of nuclear factor (NF)- κ B was measured by electrophoretic mobility shift assay and shown the level of expression of NF- κ B was significantly decreased in resveratrol-fed mice. IL: interleukin, MCP: monocyte chemoattractant protein, sRANKL: soluble receptor activator of NF- κ B ligand, TNF: tumor necrosis factor.

flammatory effect), 항산화작용(anti-oxidative effect), 항암작용(anti-cancer effect)을 가지고 있다고 밝혀졌다[9-20]. Glehr 등[17]은 rheumatoid arthritis fibroblast-like synovocyte (RA-FLS)를 이용한 *in-vitro* 실험에서 레스베라트롤이 NF- κ B ligand receptor (RANKL)와 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 억제한다고 보고하였고, Tian 등[18] 역시 RA-FLS 실험에서 레스베라트롤이 PI3 kinase/Akt 경로를 조절함으로써 TNF- α -induced IL-1 β , MMP 3 생산을 억제하여 류마티스관절염에 효과가 있을 수 있음을 보고하였다. Lei 등[14]은 랫트(rat)의 연골세포를 대상으로 한 실험에서 레스베라트롤이 SIRT1을 활성화시켜 IL-1 β 에 의해 유도되는 NF- κ B 활성을 억제한다고 보고하였으며, Chen 등[16]은 adjuvant arthritic rat에게서 레스베라트롤이 NF- κ B 경로와 관련된 사이토카인인 IL-1 β , TNF- α 를 감소시켜서 관절염을 억제한다고 보고하였다. 또한 Manna 등[19]은 레스베라트롤 실험군에서 NF- κ B의 subunit인 p65의 phosphorylation을 억제하는 것을 증명하여 레스베라트롤이 TNF- α -induced NF- κ B 활성을 억제한다고 보고하였고, Csaki 등[20]도 레스베라트롤이 IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis를 억제하여 연골 보호 효과가 있음을 보고하여,

레스베라트롤이 NF- κ B 경로를 통해 항염증 작용 한다는 것을 입증하였다.

본 실험에서도 장기간의 레스베라트롤 함유식을 한 CIA 마우스에서 관절염의 발생률과 위중도가 감소하고, NF- κ B 경로와 관련이 높은 TNF- α , IL-1 β , IL-6, sRANKL 등을 감소하였음을 확인하였다. 또한 EMSA에서 레스베라트롤 식이 마우스들에서 NF- κ B의 발현정도가 현저하게 감소함을 확인하였다. 위의 실험들을 종합하여 볼 때, 레스베라트롤이 T세포의 증식을 억제하거나 중요한 세포 내 신호전달경로 중 하나인 NF- κ B 경로를 억제하고 이로 인해 TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인들을 억제하여 항염증 작용을 할 것으로 생각되며, 류마티스관절염에도 치료효과를 나타낼 것으로 생각된다.

CIA 마우스를 대상으로 한 연구에서 레스베라트롤이 관절염 발생을 예방하고 완화시킬 수 있다는 보고가 있었다. 최근 Xuzhu 등[15]은 CIA 마우스에서 레스베라트롤을 희석하여 복강 내로 투여한 실험에서 레스베라트롤이 항콜라겐 항체를 감소하고, Th17 세포수를 감소하며 IL-17을 감소하고 B 세포를 억제함으로써 관절염 치료효과가 있음을 보고하여 레스베라트롤이 류마티스관절염의 예방 및 치료약제로 사용 가능할 수 있다고 보고하였다. 하지만

Xuzhu 등[15]이 한 실험은 레스베라트롤을 희석하여 복강 내로 투여한 실험으로, 장기간 레스베라트롤 함유 식이를 복용한 후 관절염 발생 및 완화 효과를 본 실험과는 차이가 있다. 또한 본 실험에서는 Th17, IL17, B cell에 초점을 맞추지 않고 NF- κ B 경로를 통한 레스베라트롤의 항염증효과를 증명하려고 실험을 진행하였다는 차이점이 있다. 하지만 레스베라트롤은 섭취 후 빠른 시간 내에 대사가 되는 것을 고려할 때, 복강 내 투여보다는 섭취 후 관절염 완화 효과가 있음을 본 연구가 좀 더 레스베라트롤의 상용 가능성에 대해 더 근접한 연구라고 생각한다.

류마티스관절염에서 뼈의 파괴과정에는 파골세포가 핵심적인 역할을 한다고 잘 알려져 있다[28]. Shakibaei 등[29]은 레스베라트롤이 SIRT1을 활성화시켜 RANKL-induced NF- κ B의 탈 아세틸화(deacetylation)를 유도하여 NK- κ B의 전사활성화(transcriptional activation)를 억제함으로써 파골세포형성(osteoclastogenesis)을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서도 레스베라트롤 함유식이이 CIA 마우스의 관절 내 파골세포의 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 더불어서 레스베라트롤에 복용에 의한 다양한 염증성 사이토카인과 sRANKL의 감소 역시 파골세포의 감소에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 이러한 결과들에 근거하여 본 저자들은 레스베라트롤 식이가 파골세포의 수와 활성을 감소시켜서 관절의 파괴 역시 최소화할 수 있을 것으로 생각한다.

레스베라트롤은 간에서 빠르게 대사된 후 소장을 통해 배설되기 때문에 실제로 주로 약리적 효과를 나타내는 유리형 trans-resveratrol은 체내에 거의 남지 않고 유해효과가 입증되지 않은 레스베라트롤의 대사산물이 상대적으로 많이 존재하는 등 생체이용률이 매우 낮아 경구복용을 통한 치료제 혹은 기능성식품으로 상용화되기 어렵다고 보고되었다[30]. 다른 한편, Rotches-Ribalta 등[31]은 인체 내에 산재해 있는 sulfatase에 의해서 레스베라트롤의 대사산물이 다시 레스베라트롤로 바뀔 가능성이 높다고 제시하면서 레스베라트롤의 상용가능성을 보고하였다. 기존의 다양한 실험 연구결과들이 레스베라트롤이 류마티스관절염의 예방 및 치료에 있어 보조적인 기능성식품으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였지만[13-20], 장기간의 경구복용에 의해서 실제로 레스베라트롤이 염증 및 관절 파괴를 억제하는지에 관한 연구는 진행되지 않았었다. 본 연구에서 저자들은 비록 레스베라트롤의 CIA 마우스 체내 농도를 측정하지는 못하였고, 레스베라트롤 섭취한 마우스들과 대조군 간의 식이섭취량 정도를 평가하지 못하였다는 점 및 기존에 보고된 레스베라트롤의 다른 가능한 항염증 기전인 Th17 세포와 IL 17를 측정하지 못하였다는 제한점이 있지만, 장기간의 레스베라트롤 함유식이이 CIA 마우스에서 NF- κ B 경로를 억제하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, sRANKL 등을 감소함으로써 관절염의 위중도를 감소시키고 관절 파괴를 억제하는 효과가 있다는 것을 확인하

였다. 위의 연구 결과를 통해 우리는 레스베라트롤이 경구복용을 통한 치료약제 혹은 기능성 식품으로 개발될 수 있는 가능성을 확인하였다.

결론

본 연구를 통하여 저자들은 레스베라트롤 함유식이를 장기간 복용하였을 때 CIA 마우스의 혈청과 관절에서 NF- κ B의 활성을 억제하고 이와 관련된 염증성 사이토카인의 분비를 억제함으로써 염증 및 관절파괴가 억제되는 것을 확인하였다. 이런 결과들은 레스베라트롤이 류마티스관절염의 경구복용 보조치료제 혹은 기능성 식품으로 개발될 수 있는 가능성을 시사하면서 향후 추가적인 임상연구가 진행되기를 기대해본다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(NRF-2013R1A1A2008212).

레스베라트롤은 한국 식품 연구원에서 지원을 받아 사용하였습니다.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2591-602.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
- Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010;69:964-75.
- Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:625-39.
- Kim YR, Yoo TS, Park HK, Kim TH, Jun JB, Jung SS, et al. Complementary and alternative medicine use and its usefulness in patients with RA. *J Korean Rheum Assoc* 2002; 9:173-83.
- Lee MS, Lee MS, Yang CY, Lee SI, Joo MC, Shin BC, et al. Use of complementary and alternative medicine by rheumatoid arthritis patients in Korea. *Clin Rheumatol* 2008;27:29-33.
- Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N*

- Engl J Med 2004;350:2167-79.
8. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473-88.
 9. Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54:468-76.
 10. Olas B, Wachowicz B, Majsterek I, Blasiak J. Resveratrol may reduce oxidative stress induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anticancer Drugs* 2005;16:659-65.
 11. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003;17:1975-85.
 12. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-6.
 13. Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, et al. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 2007;109:2293-302.
 14. Lei M, Wang JG, Xiao DM, Fan M, Wang DP, Xiong JY, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1 β -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor- κ B activity. *Eur J Pharmacol* 2012;674:73-9.
 15. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, et al. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis* 2012;71:129-35.
 16. Chen XY, Wang ZC, Li J, Liu XL, Sun YH. Regulation of synovial cell activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis. *Exp Ther Med* 2013;6:172-6.
 17. Glehr M, Breisach M, Walzer S, Lohberger B, Fürst F, Friesenbichler J, et al. The influence of resveratrol on the synovial expression of matrix metalloproteinases and receptor activator of NF-kappaB ligand in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Z Naturforsch C* 2013;68:336-42.
 18. Tian J, Chen JW, Gao JS, Li L, Xie X. Resveratrol inhibits TNF- α -induced IL-1 β , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol Int* 2013;33:1829-35.
 19. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164:6509-19.
 20. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 2008;75:677-87.
 21. Kim HO, Lee SI. Experimental Animal models for rheumatoid arthritis: methods and applications. *J Rheum Dis* 2012;19:189-95.
 22. Jeong YG, Kim HO, Lim HS, Hah YS, Cho HY, Yu J, et al. COMP-angiopoietin-1 stimulates synovial proliferation but suppresses osteoclast by enhancing angiogenesis and osteoblast maturation in collagen-induced arthritis. *J Rheum Dis* 2012;19:82-90.
 23. Hah YS, Lee YR, Jun JS, Lim HS, Kim HO, Jeong YG, et al. A20 suppresses inflammatory responses and bone destruction in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2313-21.
 24. Filipovic I, Walker D, Forster F, Curry AS. Quantifying the economic burden of productivity loss in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:1083-90.
 25. Son KM, Jung YO, Kim IJ, Kim BJ, Lee SY, Mun SY, et al. Clinical characteristics of Korean rheumatoid arthritis patients with indications for TNF- α blocker. *J Rheum Dis* 2013;20:356-60.
 26. Di Giuseppe D, Wallin A, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long-term intake of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study of women. *Ann Rheum Dis* 2013 Aug 12 [Epub]. DOI:10.1136/annrheumdis-2013-203338.
 27. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 1998;138:619-20.
 28. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
 29. Shakibaei M, Buhrmann C, Mobasheri A. Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J Biol Chem* 2011;286:11492-505.
 30. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012;158:182-93.
 31. Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol Res* 2012;66:375-82.