



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석 사 학 위 논 문

류마티스관절염 활막세포에서
포도씨추출물에 의한 세포사 연구

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

허 예 린

지도교수 김 상 현

2021년 2월

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물에 의한 세포사 연구

허
예
린

2
0
2
1
년

2
월

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물에 의한 세포사 연구

지도교수 김 상 현

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 1 년 2 월

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

허 예 린

허예린의 석사학위 논문을 인준함

주 심 백 원 기

부 심 김 상 현

부 심 김 지 민

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 1 년 2 월

감사의 말씀

본 논문이 제출되기까지 많은 도움을 주신 교수님들과 선생님들께 감사 인사를 전하고 싶습니다.

올바른 연구자가 되기까지 물심양면으로 도움 주신 지도교수님이신 김상현 교수님 감사드립니다. 밤낮 없이 지도해주시고 부족한 저에게 연구자로서 한 발짝 나아갈 수 있도록 깨우침을 주신 백원기 교수님 덕분에 이겨낼 수 있었습니다. 글로 다 표현하지 못할 만큼 진심으로 감사드립니다. 심사위원을 맡아주신 김지민 교수님, 많은 격려와 세심하게 지도 해주셔서 감사드립니다. 늘 든든한 버팀목이 되어 아무것도 모르는 저에게 실험 노하우와 방향을 제시해주신 정희정 박사님과 본인 일처럼 늘 든든한 해결사가 되어 주시고 움츠려진 저를 밖으로 나올 수 있게 이끌어주신 이지현 선생님, 두 분 모두 저 때문에 너무 고생하신 것 같아 죄송하고 감사드립니다. 부족한 시간 쪼개어 논문 첨삭과 많은 응원을 해주신 정혜진 교수님, 최혜정 박사님 감사드립니다. 갑작스러운 물음에도 흔쾌히 도와주고 지지해준 친구들, 감사합니다.

논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 교수님들과 선생님들께 보답하기 위해 그리고 저 자신을 위해 지금보다 더욱 발전된 연구자로 거듭날 수 있도록 노력하겠습니다.

2021년 2월

허 예 린

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	7
4. 고 찰	16
5. 요 약	19
참고문헌	20
Abstract	26
국문초록	28

List of Figures

Figure 1. GSPE reduces cell viability in RA-FLS	10
Figure 2. GSPE scavenges reactive oxygen species in RA-FLS	11
Figure 3. GSPE induces apoptosis in RA-FLS	13
Figure 4. GSPE induces autophagy in RA-FLS	15

1. 서 론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 전신의 만성 염증성 질환으로, 관절 활막의 지속적인 염증 반응으로 인한 뼈와 연골의 파괴가 특징적이다. 활막세포(fibroblast like synoviocytes, FLS)는 관절 내막 구조에 포함되는 세포 유형으로, 류마티스관절염 발병에 중요한 역할을 한다. 류마티스관절염 활막세포는 건강한 활막세포와 달리 활막염을 영속화하는 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-6 등의 염증성 시토카인, chemokine (C-C motif) ligand(CCL)-2, CCL-7 등의 케모카인 및 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)를 생성한다(1). 이로 인해 활막 환경은 고압 및 저산소 조건으로 변형되어 활막세포의 표현형이 공격적으로 바뀌고 비정상적으로 증식한다(2). 이러한 특징은 세포자멸사(apoptosis) 내성에 기인하며(3), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과도한 생산 및 자가포식(autophagy) 생존 기전이 복잡하게 연결되어 관여한다(4,5). 연구에 의하면 류마티스관절염 환자는 활성산소종이 증가되어 있으며 비타민 C, 비타민 E 등 체내 항산화제 수준이 감소되어 있어, 산화 스트레스(oxidative stress) 불균형을 초래한다(6). 산화 스트레스 불균형은 염증 증가, DNA 돌연변이, 다양한 시토카인 생성, nuclear factor(NF)- κ B 활성화를 유발하여 세포사로부터 보호하기 위해 세포의 운명을 조절한다(7,8). 따라서 류마티스관절염 활막세포의 특징을 표적으로 한 치료가 류마티스관절염을 효과적으로 억제할 것이라 예상된다(1).

포도씨추출물(grape seed proanthocyanidin extract, GSPE)은 다양한 생물학적 기능을 가진 폴리페놀 혼합물(polyphenolic compounds)로 이루어져 있다. 그 중 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)은 독성이 거의 없다고 알려져 있으며, 강력한 항산화 기능을 가진다(9). 연구에 의하면 포도씨추출물은 대장암, 자궁경부암, 비인두암, 췌장암, 위암 등 다양한 암세포주에서 혈관 신생 억제, 세포 주기 조절, 세포자멸사 및 자가포식을 포함한 세포의

수명을 조절한다고 보고된 바 있다(10-16). 또한 염증 및 자가면역질환에서 NF- κ B, mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 같은 신호 전달 경로 활성화를 통한 염증 억제 효과가 있다(17).

포도씨추출물은 콜라겐-유도 관절염(collagen-induced arthritis, CIA) 동물 모델과 류마티스관절염 활막세포에서 염증성 시토카인 감소, 파골세포(osteoclast) 분화 억제 등 류마티스관절염 중증도를 약화시킨다는 연구 결과가 있다(18-21). 그러나 류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물의 세포사 기전에 대한 연구는 아직 알려져 있지 않다. 류마티스관절염 활막세포는 암세포와 매우 유사한 공격적인 표현형, 비정상적인 증식, 미세환경을 가진다(2). 활막세포의 특징과 기존의 항암 및 항류마티스 연구 결과들을 미루어 볼 때, 포도씨추출물이 활막세포의 증식을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물 처리를 통한 세포사를 관찰하고 그 기전을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 환자 대상:

이 연구는 계명대학교 동산병원 기관 연구윤리심의위원회(Institutional Review Board number: 2020-01-055) 승인을 받은 후에 시행되었다. 류마티스관절염 활막조직은 1987년 미국 류마티스학회(American College of Rheumatology)에서 제정한 진단 기준을 만족하는 환자를 대상으로 활막절제술을 통해 표본을 얻었다(22). 류마티스관절염 평가를 위해 적혈구침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), C-반응성단백질(C-reactive protein, CRP), 류마티스인자(rheumatoid factor, RF), 항CCP항체(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP Ab) 수치를 조사하였다.

2.2. 류마티스관절염 활막세포 배양:

수집한 활막조직을 세포로 분리하기 위해 지방을 제거하고 잘게 잘라준 후, type II collagenase(Gibco, Waltham, MA, USA) 0.5 mg/mL가 포함된 무혈청 Dulbecco's minimum Eagle's medium(DMEM) 배지에 37 °C 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 현탁액만 거르기 위해 멸균거즈에 여과 후 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 침전물을 phosphate-buffered saline(PBS)에 세척 후 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 이 과정을 두 번 반복하였다. 침전물을 5% CO₂, 37 °C 조건에서 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 DMEM으로 배양하였다(1,23). 사용된 DMEM과 FBS는 welgene(Gyeongsan-si, Korea), penicillin은 hyclone(Logan, UT, USA) 제품을 사용하였다. 활막세포는 림프구와 대식세포 오염을 피하기 위해 4-7회 계대 배양된 것을 사용

하였다(24).

2.3. 시약:

포도씨추출물은 한림 제약(Seoul, Korea)에서 제공 받았다. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone(z-VAD-fmk)은 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-methyladenine(3MA), chloroquine diphosphate salt soid(CQ), N-acetyl-cysteine(NAC), 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA), propidium iodide(PI)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포용해완충액(lysis buffer)은 Thermo Fisher(Waltham, MA, USA), 단백질분해효소 억제제(protease inhibitor)와 인산가수분해효소 억제제(phosphatase inhibitor)는 Roche Diagnostics GmbH(Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

일차항체 β -actin(1 : 5,000), p62/SQSTM1(1 : 8,000) 항체는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), LC3(1 : 2,000) 항체는 MBL International Corporation(Woburn, MA, USA), pro-caspase 3(1 : 2,000) 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA), PARP(1 : 1,000) 및 cleaved-caspase 3(1 : 1,000) 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이차항체 Peroxidase AffiniPure Donkey Mouse IgG(H+L)(1 : 5,000), Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Rabbit IgG(H+L)(1 : 2,000) 항체는 Jackson ImmunoResearch(Baltimore, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.4. 세포 생존 수 산정:

생존율을 평가하기 위해 류마티스관절염 활막세포를 6 well 배양접시에 2×10^5 cells/mL로 부착시킨 후 포도씨추출물을 처리하였다. 회수한 세포를

0.2%의 trypan blue로 염색한 후, 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 염색되지 않은 세포의 수를 산정하였다. 정확한 분석을 위해 각각의 독립된 실험을 3회 이상 시행하여 평균값과 표준편차를 측정하였다.

2.5. 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 수준 분석:

류마티스관절염 활막세포를 60 mm 세포 배양접시에 4×10^5 cells/mL를 부착시킨 후 포도씨추출물과 NAC을 처리하여 5% CO₂, 37 °C 조건에서 16 시간 동안 배양하였다. 세포를 확보하여 DCFH-DA 30 µM을 처리한 후 빛을 차단하여 5% CO₂, 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 PBS로 세척한 후 3,000 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포를 PBS에 부유시킨 후 BD FACSCanto II 유세포 분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 활성산소종 양적 변화를 분석하였다.

2.6. 세포주기 분석:

류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물과 z-VAD-fmk를 처리한 후 16 시간 동안 5% CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였다. 배양된 세포를 확보하여 70% 차가운 에탄올로 4 °C에서 24시간 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 3,000 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포에 PI용액(2.5 mg/mL PI, 5 mg/mL RNase A, 0.1% NP40, 0.1% trisodium citrate)을 처리하고 빛을 차단하여 4 °C에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 세포는 BD FACSCanto II 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

2.7. Western blot:

류마티스관절염 활막세포를 6 well 배양접시에 2×10^5 cells/mL로 부착시킨 후 약물을 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 세포용해완충액, 단백질을 분해효소 억제제, 인산가수분해효소 억제제를 넣고 얼음 위에서 15분 동안 반응시킨 후 새 튜브로 옮겼다. 단백질을 상층액을 얻기 위해 4 °C, 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 한 후, 확보한 상층액을 bicinchoninic acid(BCA, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 분석으로 단백질 농도를 측정하였다. 30 µg으로 단백질을 정량하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 전기영동한 후 겔에서 nitrocellulose membrane(Amersham, Chicago, IL, USA)으로 단백질을 이동시켰다. 5% skim milk가 첨가된 TBS-T 용액(20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)을 사용하여 membrane을 실온에 1시간 이상 blocking 후, 일차항체를 4 °C에서 밤새 반응 시켰다. 이차항체를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate(Millipore, Billerica, MA, USA) 용액으로 발광시켜 화학 발광 이미지 분석 장비(Fusion Solo 6S, Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France)로 특정 단백질의 발현을 확인하였다.

2.8. 자료 처리 및 통계학적 검정:

각 실험결과에 대한 측정은 Microsoft Office Excel 2013(Microsoft, Raymond, WA, USA)을 사용하여 평균과 표준편차를 계산하였다. 유의성은 대조군에 대한 Student's *t*-test로 비교하였으며, *p*값이 0.05 미만일 경우 유의하다고 판단하였다.

3. 성 적

3.1. 포도씨추출물에 의한 세포 생존율 감소

포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 세포 증식을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 세포 생존 수 변화를 조사하였다. 포도씨추출물을 100 - 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 포도씨추출물의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소하였다(Figure 1A). 포도씨추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 4 - 24시간별로 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 16시간 처리에서 유의하게 감소하였다(Figure 1B). 포도씨추출물 50 - 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 16시간 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, 농도 증가에 따라 세포 생존율이 17%, 34%, 53%로 유의하게 감소하였다(Figure 1C). 이 결과들로 보아 류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물 처리 시 세포 증식 억제 효과를 확인할 수 있었다.

3.2. 포도씨추출물에 의한 세포자멸사 유도 효과

포도씨추출물에 의한 류마티스관절염 활막세포의 세포 생존 억제가 세포자멸사 유도 효과인지 여부를 조사하였다. 류마티스관절염 활막세포에 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk 50 μM 을 30분 동안 전처리한 후 16시간 동안 포도씨추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 와 단독 또는 병용 처리하여 세포 생존율 변화를 확인한 결과, 포도씨추출물 단독 처리 시 감소한 세포 생존율이 z-VAD-fmk 병용 처리 시 유의하게 회복되었다(Figure 2A). 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석하였다. 류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물을 50 - 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 16시간 처리한 결과 sub-G1기가 포도씨추출물 농도 의존적으로 7.2%, 11.5%, 13.1% 증가하였고 G2/M기 또한 13.3%, 14.1%, 16.6%로 증가하였다. 위와 같은 조건으로 z-VAD-fmk를 병

용 처리하여 유세포 분석한 결과, 포도씨추출물 단독 처리 시 증가한 sub-G1기가 z-VAD-fmk 병용 처리 시 감소하였다(Figure 2B). 이어서 western blot을 통해 세포자멸사의 주요 단백질인 PARP, pro-caspase 3, cleaved-caspase 3의 발현을 확인하였다. 류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물 50 - 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 pro-PARP, pro-caspase 3 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하였으며 cleaved-caspase 3, cleaved-PARP 단백질 발현은 검출되지 않았다. Z-VAD-fmk 50 μM 을 병용 처리한 결과, 포도씨추출물 단독 처리 시 감소한 pro-PARP 단백질 발현이 z-VAD-fmk 병용 처리에 의해 증가하였다. U87MG 세포에 TRAIL 처리한 군을 양성대조군으로 확인한 결과 cleaved-PARP, cleaved-caspase 3 단백질 발현이 나타났으며, 류마티스관절염 활막세포에서 cleaved-form 단백질 발현이 나타나지 않음을 확인할 수 있다(Figure 2C). 이 결과들로 보아 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 G2/M기 정지와 동반된 세포자멸사 유도에 관여한다는 것을 유추할 수 있었다.

3.3. 포도씨추출물에 의한 자가포식 유도 효과

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물에 의한 세포 증식 억제 효과에 자가포식현상이 관여하는지 조사하였다. 포도씨추출물 50 - 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 16시간 처리하여 western blot을 통해 자가포식 지표 단백질인 LC3, p62 단백질 발현 정도를 확인하였다. 포도씨추출물 농도 증가에 따라 LC3-II 단백질 발현이 증가하였으며 p62 단백질 발현이 감소하였다(Figure 3A). 이어서 자가포식 개시 작용 단백질인 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)를 억제하는 3MA, 자가포식소체와 용해소체와의 융합을 억제하는 CQ를 처리하여 광학 현미경으로 세포 변화를 관찰 후 생존 세포수를 산정하고 LC3-II 발현을 관찰하였다. 자가포식현상 초기 단계 억제제인 3MA 500 μM 과 포도씨추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 16시간 동안 단독 또는 동시 처리한 결과, 포도씨추출물 단독 처리 시 죽은 세포 부유물의 증가, 세

포 생존을 감소, LC3-II 단백질 발현의 축적이 3MA 병용 처리로 인해 죽은 세포 부유물 감소, 세포 생존을 회복, 축적된 LC3-II 단백질 발현이 감소하였다(Figure 3B). 마찬가지로 자가포식현상 후기 단계 억제제인 CQ 20 μ M와 포도씨추출물 200 μ g/mL를 16시간 동안 단독 또는 동시 처리하였다. 포도씨추출물 단독 처리 시 죽은 세포 부유물 증가, 세포 생존을 감소 LC3-II 단백질 발현 축적은 CQ 병용 처리로 인해 죽은 세포 부유물 감소, 세포 생존을 회복, 축적된 LC3-II 단백질 발현이 더 축적되어 발현됨을 관찰할 수 있었다.(Figure 3C). 이 결과들로 보아, 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 자가포식을 통한 세포사 유도에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. 포도씨추출물에 의한 활성산소종 효과

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 활성산소종 억제제인 NAC을 양성대조군으로 사용하여 세포 생존 수 변화를 관찰하였다. 류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물 200 μ g/mL, NAC 10 mM을 처리한 결과, 포도씨추출물 처리 시 세포 생존율은 대조군에 비해 감소하였으나, NAC 처리 시 세포 생존율 변화가 없었다. 이 결과로 보아, NAC은 류마티스관절염 활막세포에서 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 유추할 수 있었다(Figure 4A). 활성산소종 양적 변화를 확인하기 위해 포도씨추출물 100 μ g/mL, NAC 10 mM을 8시간 처리하여 유세포 분석기로 확인한 결과, 대조군 대비 NAC 처리 시 1.7배 감소하였고 포도씨추출물 처리 시 53배 감소하였다(Figure 4B). 이 결과로 보아, 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 활성산소종 생성을 감소시키며 그 효과가 NAC 보다 뛰어난 것으로 보였다.

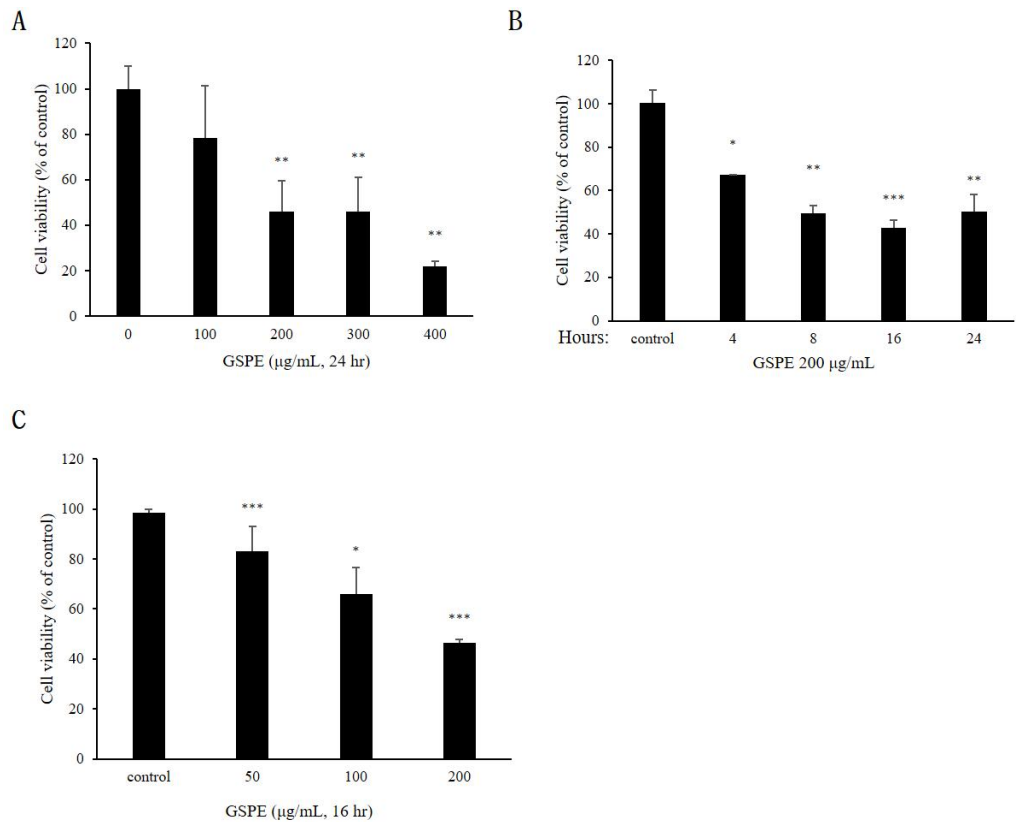


Figure 1. GSPE reduces cell viability in RA-FLS. (A) RA-FLS were treated in various concentrations (0 - 400 µg/mL) for 24 hr. (B) The cell viability of GSPE-treated (200 µg/mL) RA-FLS were evaluated at various times (4 - 24 hr). (C) RA-FLS were treated in various concentrations (0 - 200 µg/mL) for 16 hr. Cell viability was determined with the hemocytometer using trypan blue staining. Error bars are shown as means $\pm$ standard deviation (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with control cells.

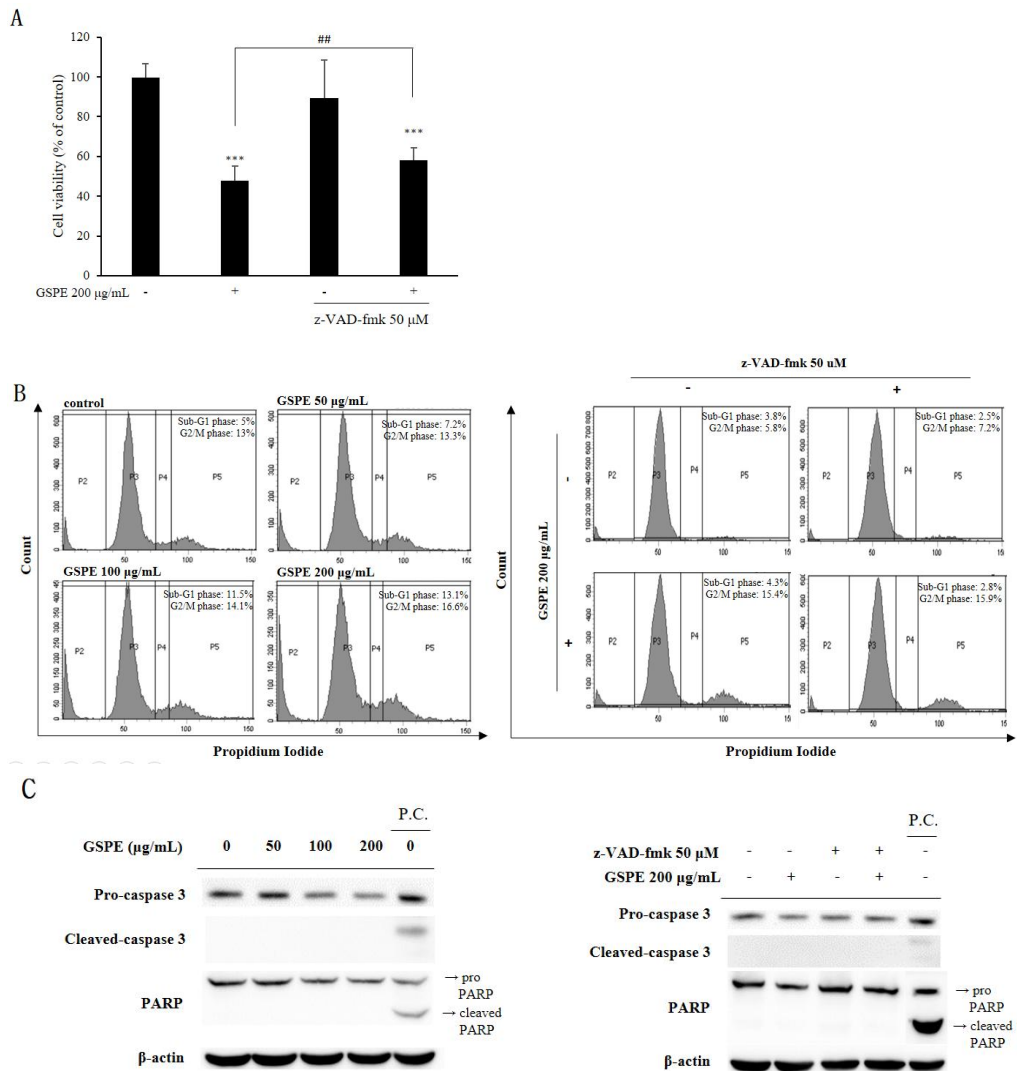


Figure 2. GSPE induces apoptosis in RA-FLS. (A) RA-FLS were pre-treated with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (50 µM) for 30 min before the addition of GSPE 200 µg/mL for 16 hr. Cell viability was determined with the hemocytometer using trypan blue staining. Error bars are shown as means ± standard deviation (SD). *** $p < 0.001$, compared with control cells. ## $p < 0.01$, compared to the GSPE treated cells. (B) RA-FLS were treated with GSPE 50 - 200 µg/mL and

pretreated with or without z-VAD-fmk (50 μ M) for 30 min and then incubated with GSPE 200 μ g/mL 16 hr. RA-FLS were stained with PI and measured cell cycle by flow cytometry. (C) Western blot analysis was performed using PARP, pro-caspase 3, cleaved-caspase 3 antibodies. β -actin was used as a loading control. U87MG cells treated with TRAIL were used as a positive control (P.C.).

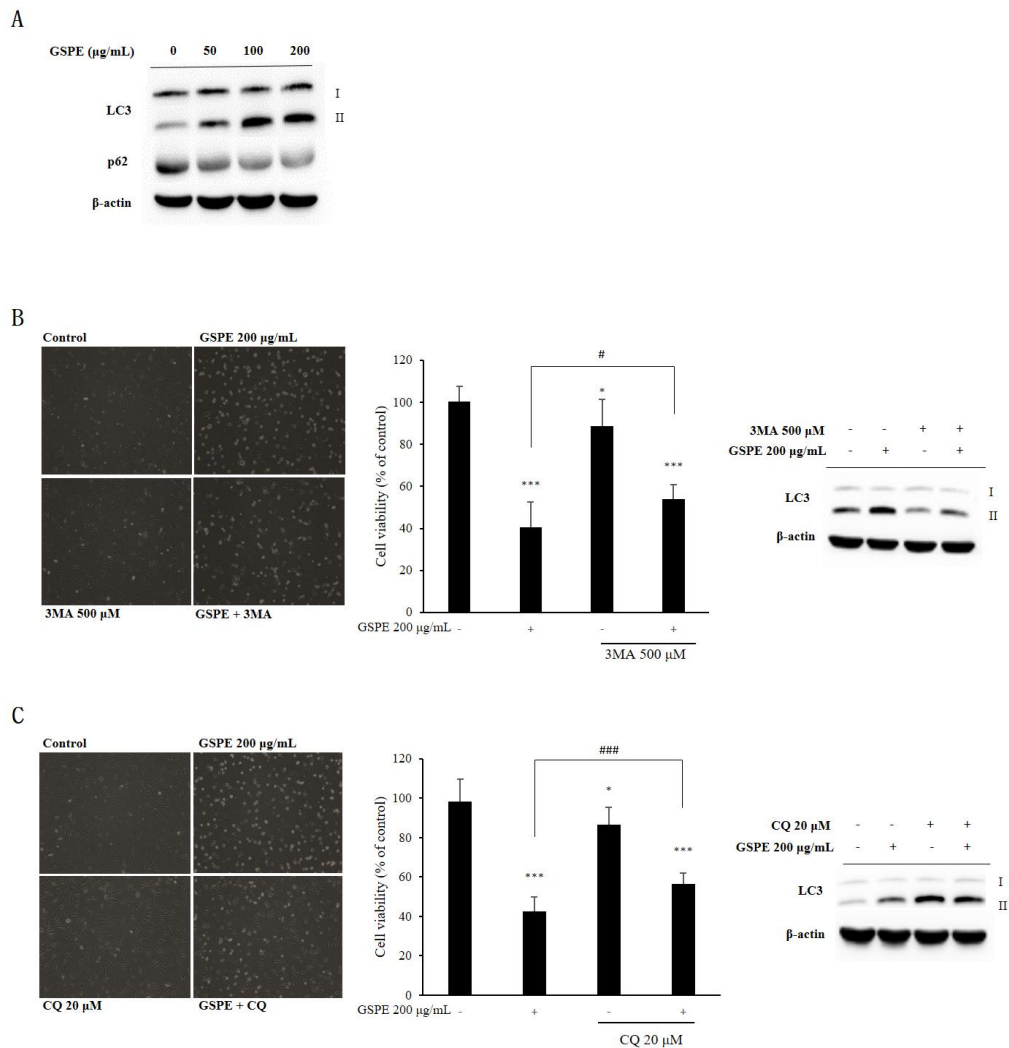


Figure 3. GSPE induces autophagy in RA-FLS. (A) RA-FLS were treated in various concentrations (0 - 200 µg/mL) for 16 hr. Western blot analysis was performed using anti-LC3 and anti-p62 antibodies. β-actin was used as a loading control. (B&C) RA-FLS were co-treated with GSPE 200 µg/mL in the presence or absence of autophagy inhibitor (3MA 500 uM, CQ 20 uM) for 16 hr. Cell morphology was photographed by light microscope (× 200). Cell viability was determined with

the hemocytometer using trypan blue staining. Error bars are shown as means $\pm$ standard deviation (SD). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, compared with control cells. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$, compared to the GSPE treated cells. Western blot analysis was performed using anti-LC3 antibody. β -actin was used as a loading control.

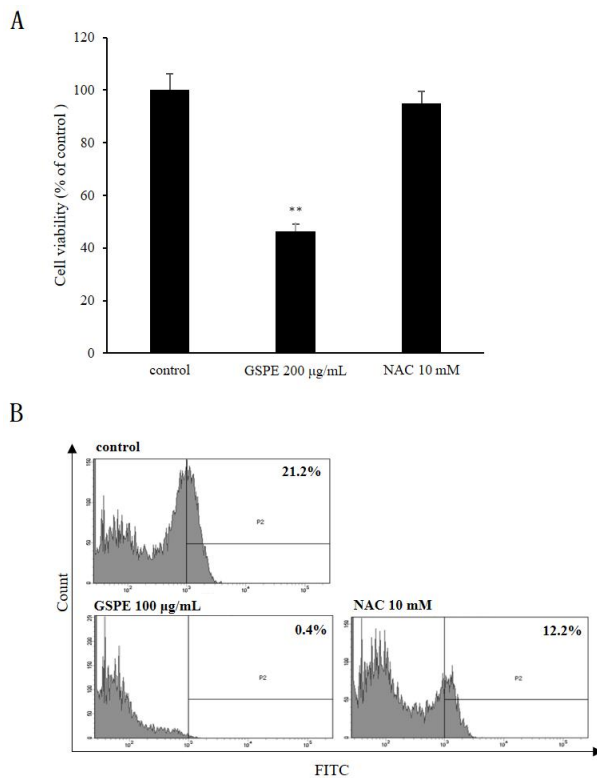


Figure 4. GSPE scavenges reactive oxygen species in RA-FLS. (A) RA-FLS were treated in GSPE 200 µg/mL and NAC 10 mM for 16 hr. Cell viability was determined with the hemocytometer using trypan blue staining. (B) RA-FLS were treated in GSPE 100 µg/mL, NAC 10 mM for 8 hr. The intracellular ROS level was analyzed by flow cytometry using the DCHF-DA 30 µM.

4. 고 찰

류마티스관절염은 활막의 비정상적인 증식으로 인해 뼈와 연골이 파괴되어 나타나는 질환이다(1). 류마티스관절염 활막세포는 염증성 시토카인의 과잉 생산과 고압 및 저산소 미세 환경을 가지며(2), 세포자멸사에 대한 저항성이 있다(3). 류마티스관절염 활막세포의 세포자멸사 저항 기전은 p53 유전자의 돌연변이, 활성 질소 및 산소가 풍부한 미세 환경, phosphatase and tensin homolog(PTEN)의 상대적인 낮은 발현으로 인한 NF- κ B의 활성화 등이 세포자멸사의 감소에 영향을 준다고 알려져 있다(1). 이러한 특징은 활성산소종 생성으로 인해 자극될 수 있으며, 이로 인해 변형된 생리학적 불균형은 자가포식 생존 기전으로 유도될 수 있다(8).

세포사는 세포자멸사, 자가포식 등이 있으며, 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다(25). 세포자멸사는 자가포식과 서로 협력하여 세포의 사멸을 유도하기도 하며, 자가포식이 세포의 생존을 촉진하여 세포자멸사를 억제하기도 한다(26). 세포자멸사는 세포 사멸 수용체(death receptor)의 활성화와 관련된 외인성 경로와 미토콘드리아를 통한 내인성 경로로 구분된다. 이 두 경로는 caspase 3를 통해 서로 연결되어 세포사를 유도한다(27). 자가포식은 자가포식소체와 용해소체의 융합에 의해 불필요한 세포소기관 또는 단백질을 분해하는 기전으로(28), 특정 스트레스 하에서 세포를 보호하는 기전으로 작용하나 지속적인 스트레스 하에서 방어 기전이 극복되지 못해 세포의 사멸을 초래한다(29).

포도씨추출물은 프로안토시아니딘 복합체를 가지고 있는 강력한 항산화제로(30), 산화 스트레스에 매개하는 대사 장애 질환으로부터 세포 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다(31). 연구에 의하면 포도씨추출물이 류마티스관절염 동물 모델과 활막세포에서 toll-like receptor(TLR)4 신호전달경로를 통해 관절염 억제 효과를 유도하고(18), 염증성 시토카인 억제 및 파골세포의 불균형으로 인한 뼈 파괴를 억제한다는 보고가 있다(20). 그러나 활막세포의 세포사에 대한 연구는 아직까지 알려진 바 없다. 포도씨추출물은

일부 암세포에서 세포자멸사와 자가포식을 동시에 유도하여 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(12,32). 따라서 이 연구에서는 암세포와 유사한 특징을 가진 활막세포에서 포도씨추출물을 통한 세포 증식의 억제와 세포사 기전을 조사하였다.

본 연구에서 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포의 생존을 유의하게 억제하였다. 세포 생존 억제는 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk와 포도씨추출물 병용 처리 시 회복되었다. 류마티스관절염 활막세포에 포도씨추출물 처리 후 세포주기를 확인한 결과, 포도씨추출물 농도 의존적으로 sub-G1기와 G2/M기가 증가하였고, 증가된 sub-G1기는 z-VAD-fmk 병용 처리로 인해 감소하였다. 세포자멸사 표지 단백질인 pro-PARP와 pro-caspase 3의 발현이 포도씨추출물 농도에 따라 감소하였으며, 감소된 pro-PARP 단백질 발현은 z-VAD-fmk의 병용 처리에 의해 증가하였다. 이 결과들로 보아 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 보이나, 단백질 수준에서는 부분적으로 발현되어 다른 세포사 기전이 연관되어 유발될 것이라 생각된다.

포도씨추출물을 류마티스관절염 활막세포에 처리 후 자가포식 표지 단백질 발현을 확인한 결과, LC3-II 단백질 발현의 증가와 p62 단백질 발현의 감소를 관찰할 수 있었다. LC3-II 단백질 발현의 증가는 자가포식소체가 정상적으로 형성되었음을 의미하며, p62 단백질 발현의 감소는 용해소체가 형성된 후 손상된 세포소기관이 분해될 때 함께 분해됨으로써 자가포식 흐름이 끝까지 수행되고 있음을 의미한다(33). 따라서 이 결과는 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 자가포식현상 유도에 관여하는 것으로 보인다. 자가포식현상이 어떻게 유도되는지 알아보기 위해 자가포식 초기 단계를 억제하는 3MA 및 자가포식 후기 단계를 억제하는 CQ를 포도씨추출물과 병용 처리하여 세포 생존율 및 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 포도씨추출물 단독 처리 시 감소한 세포 생존율은 자가포식 억제제들과 포도씨추출물 병용처리에 의해 회복되었고 증가한 LC3-II 단백질 발현은 3MA에 의해 감소, CQ에 의해 증가하였다. 3MA는 PI3K를 억제하여 자가포식소체 형성을 막아 결과적으로 LC3-II를 억제하고, CQ는 자가포식소체와 용

해소체의 결합을 억제하여 결과적으로 LC3-II가 축적되어 나타난다(34). 이 결과들로 보아, 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 자가포식현상을 통해 세포사를 유도하는 것으로 보인다.

포도씨추출물을 통한 세포사 과정에서 활성산소종의 역할은 세포의 종류에 따라 상반된 연구 결과로 나타난다(35-37). 류마티스관절염은 산화 스트레스 불균형으로 인해 활성산소종이 축적되어 염증과 활막의 증식에 영향을 미친다(3). 류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물과 유사한 폴리페놀계 항산화제인 resveratrol이 활성산소종 생성을 억제함으로써 세포자멸사를 유도하여 세포 증식을 억제 한다는 연구가 있다(38). 본 연구는 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 항산화 작용에 의해 세포사를 유도할 것이라 생각되어 활성산소종 억제제인 NAC을 양성대조군으로 사용하여 세포 생존율과 활성산소종 변화를 관찰하였다. 그 결과, 포도씨추출물 처리는 세포 생존율이 감소하였으나, NAC 처리는 변화가 없었다. 활성산소종은 NAC 처리에 비해 포도씨추출물 처리에서 현저하게 감소하였다. 이 결과들로 보아, 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 활성산소종 감소에 영향을 미치는 것으로 보이나, NAC 이외의 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide와 같은 항산화 효소나 일부 천연 항산화 물질을 이용하여 포도씨추출물의 항산화 효과 유효성을 비교할 필요가 있을 것으로 보인다.

이러한 결과들을 종합해볼 때, 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사와 자가포식을 유도하여 세포사를 일으키는 것으로 생각되었다. 향후 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사와 자가포식 유도에 어떤 신호전달경로가 작용하여 항산화 작용에 영향을 주는 지 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

5. 요약

류마티스관절염은 전신의 만성 염증성 질환으로, 활막세포가 류마티스관절염 병인에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 류마티스관절염 활막세포는 세포자멸사 내성을 가지며, 고압 및 저산소 환경 조건에서 비정상적으로 증식한다. 이 연구에서는 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 세포사를 유도하는지 조사하였다.

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물 처리 시 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며 sub-G1기, G2/M기의 증가, pro-PARP, pro-caspase 3 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 이 결과는 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk의 병용 처리 시 상쇄되었다. 이를 보아 포도씨추출물에 의한 류마티스관절염 활막세포의 생존율 감소가 세포자멸사와 연관이 있다는 것을 유추할 수 있었다. 또한 LC3-II 단백질 발현의 증가, p62 단백질 발현의 감소로 자가포식현상이 유도됨을 알 수 있었다. 이 효과는 자가포식 억제제인 3MA와 CQ를 포도씨추출물과 병용 처리 시 상쇄되었으며, 자가포식현상이 세포사 기전으로 작용 한다고 유추할 수 있었다. 류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물 처리 시 활성산소종의 수준은 활성산소종 억제제인 NAC 처리와 비교하여 현저하게 억제되었다. 이 결과들을 미루어 볼 때, 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사와 자가포식을 유도하여 세포사를 일으키며 활성산소종 억제와 연관이 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bartok B, Firestein GS: Fibroblast like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233: 233-55.
2. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M: Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 110.
3. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR: Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 1995; 51: 419-36.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
5. Agostini M, Di Marco B, Nocentini G, Delfino DV: Oxidative stress and apoptosis in immune diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2002; 15: 157-64.
6. Nourmohammadi, Athari-Nikazm S, Vafa M.R, Bidari A, Jazayeri S, Hoshyarrad A, et al.: Effects of Antioxidant Supplementations on Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Biol Sci* 2010; 10: 63-6.
7. Kato M, Ospelf C, Gay RE, Gay S, Klein K: Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 40-8.

8. Vomero M, Barbati C, Colasanti T, Perricone C, Novelli L, Ceccarelli F, et al.: Autophagy and Rheumatoid Arthritis: Current Knowledges and Future Perspectives. *Front Immunol* 2018; 9: 1577.
9. Katiyar SK, Athar M: Grape seeds: ripe for cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 614–21.
10. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y: Polyphenolics in grape seeds–biochemistry and functionality. *J Med Food* 2003; 6: 291–9.
11. Punathil T, Katiyar SK: Inhibition of non–small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2. *Mol Carcinog* 2009; 48: 232–42.
12. Nie C, Zhou J, Qin X, Shi X, Zeng Q, Liu J, et al.: Reduction of apoptosis by proanthocyanidin–induced autophagy in the human gastric cancer cell line MGC–803. *Oncol Rep* 2016; 35: 649–58.
13. Katiyar SK: Emerging Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer. *Molecules* 2016; 21: 1610.
14. Raina K, Tyagi A, Kumar D, Agarwal R, Agarwal C: Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 187–95.
15. Prasad R, Katiyar SK: Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting

mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF- κ B. *Cancer Lett* 2013; 334: 118-26.

16. Kaur M, Tyagi A, Singh RP, Sclafani RA, Agarwal R, Agarwal C: Grape seed extract upregulates p21 (Cip1) through redox-mediated activation of ERK1/2 and posttranscriptional regulation leading to cell cycle arrest in colon carcinoma HT29 cells. *Mol Carcinog* 2011; 50: 553-62.
17. Nurhan U: Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods* 2020; 67: 103861.
18. Kim SH, Bang J, Son CN, Baek WK, Kim JM: Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *Korean J Intern Med* 2018; 33: 612-21.
19. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH, et al.: Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. *PLoS One* 2012; 7: e51377.
20. Ahmad SF, Zoheir KM, Abdel-Hamied HE, Ashour AE, Bakheet SA, Attia SM, et al.: Grape seed proanthocyanidin extract has potent anti-arthritic effects on collagen-induced arthritis by modifying the T cell balance. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 79-87.
21. Cho ML, Heo YJ, Park MK, Oh HJ, Park JS, Woo YJ, et al.: Grape

- seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. *Immunol Lett* 2009; 124: 102-10.
22. 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.
 23. Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U: Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 2010; 16: 458-68.
 24. Astrid Hirth, Alla Skapenko, Raimund W Kinne, Frank Emmrich, Hendrik Schulze-Koops, Ulrich Sack: Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4: 117-25.
 25. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3-11.
 26. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A: Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16: 966-75.
 27. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.

28. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2018; 104: 485-95.
29. Shintani T, Klionsky DJ: Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306: 990-5.
30. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al.: Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res* 2003; 523-524: 87-97.
31. Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Iahtisham-Ul-Haq, Patel S, Pan X, et al.: Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2019; 116: 108999.
32. Yao K, Shao J, Zhou K, Qiu H, Cao F, Li C, et al.: Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through the mitochondrial pathway in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. *Oncol Rep* 2016; 36: 771-8.
33. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al.: p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131-45.
34. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B: Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140: 313-26.

35. Hah YS, Kim JG, Cho HY, Park JS, Heo EP, Yoon TJ: Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds induce apoptotic and autophagic cell death via generation of reactive oxygen species in squamous cell carcinoma cells. *Oncol Lett* 2017; 14: 1925–32.
36. Yen CY, Hou MF, Yang ZW, Tang JY, Li KT, Huang HW, et al.: Concentration effects of grape seed extracts in anti-oral cancer cells involving differential apoptosis, oxidative stress, and DNA damage. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 94.
37. Du Y, Guo H, Lou H: Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1695–701.
38. Zhang Y, Wang G, Wang T, Cao W, Zhang L, Chen X: Nrf2–Keap1 pathway-mediated effects of resveratrol on oxidative stress and apoptosis in hydrogen peroxide-treated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2019; 1457: 166–78.

Study of Cell Death by Grape Seed Proanthocyanidin Extract in Rheumatoid Arthritis-Fibroblast Like Synoviocytes

Heo, Ye Rin

Department of Internal Medicine
Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Sang Hyon Kim)

(Abstract)

Fibroblast like synoviocytes (FLS) play a key role in the etiology of rheumatoid arthritis (RA). RA-FLS are resistant to apoptotic cell death, and this function can contribute to the reactive oxygen species (ROS)-mediated autophagy induction. Thus, new agents that target FLS could potentially complement the current therapies. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) has powerful anti-oxidative activity. Some previous studies have shown that GSPE has an anti-inflammatory effect in animal models of RA. The present study aimed to investigate whether GSPE induces cell death in RA-FLS. GSPE-induced apoptotic cell death was observed in RA-FLS. GSPE increased the sub-G1 phase and G2/M phase and decreased the expression of pro-PARP and pro-caspase 3. These results were reversed by z-VAD-fmk. GSPE was

observed to increase the expression of LC3-II and decrease the expression of p62. The autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine decreased the cell toxicity of GSPE and changed the expression of LC3 II proteins. GSPE was observed to decrease reactive oxygen species (ROS) in RA-FLS. These data suggest that GSPE can increase apoptotic and autophagic cell death and decrease ROS in RA-FLS.

Further studies on the detailed mechanisms of the interaction between the two types of cell death and the role of ROS are needed in the future.

류마티스관절염 활막세포에서 포도씨추출물에 의한 세포사 연구

허 예 린

계명대학교 대학원

의학과 내과학 전공

(지도교수 김 상 현)

(초록)

류마티스관절염 활막세포는 류마티스관절염 병인에 핵심 역할을 하며, 세포자멸사 저항성을 가지고 있다. 이 특징은 활성산소종에 의해 매개되는 자가포식 세포 보호 기전에 기여한다. 따라서 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사를 유도하는 것이 류마티스관절염 증상 및 진행을 개선할 수 있다. 포도씨추출물은 강력한 항산화제로, 류마티스관절염 동물 모델 및 활막세포에서 항염증 및 관절 파괴 억제 효과가 보고되었다. 이 연구에서는 포도씨추출물이 류마티스관절염 활막세포에서 세포사를 유도하는지 알아보았다. 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 세포 생존을 감소를 유도하였으며 sub-G1기와 G2/M기의 증가, pro-PARP와 pro-caspase 3 단백질 발현이 감소하였다. 이 결과들은 z-VAD-fmk 병용 처리에 의해 상쇄되어 세포자멸사와 관련이 있음을 알 수 있었다. 포도씨추출물이 자가포식을 유도하는지 알아본 결과, LC3 단백질 발현의 증가와 p62 단백질 발현의 감소

를 확인하였다. 포도씨추출물에 의해 감소된 세포 생존율이 자가포식 억제제인 3-methyladenine(3MA)와 chloroquine(CQ)에 의해 회복하였고 증가한 LC3 단백질 발현이 3MA로 인해 감소, CQ로 인해 축적된 것으로 보아 자가포식을 통한 세포사와 관련이 있음을 알 수 있다. 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 활성산소종 양적 감소를 유도하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 포도씨추출물은 류마티스관절염 활막세포에서 세포자멸사 및 자가포식을 통한 세포사에 영향을 미치는 것으로 보이며, 이 과정에서 활성산소가 관여할 것으로 생각된다. 향후 세포사와 활성산소종에 대한 자세한 기전은 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.