

五味消毒飲이 마우스 腹腔 大食細胞에서 NO의 分泌過程에 미치는 영향

박혜준 · 윤화정 · 윤정원 · 윤소원 · 고우신*

동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

Inhibitory Effect of Omisodok-eum on the Secretion of NO in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages

Hae Joon Park, So Won Yoon, Jung Won Yoon, Hwa Jung Yoon, Woo Shin Ko*

Department of Oriental Medicine, Oriental Otorhinolaryngology & Dermatology Class, Graduate School, Dongeui University

Inflammation is localized response to foreign substance such as bacteria or in some instance to internally produced substances and has relation with immunity system. The macrophages plays a role in the development of the lymphohaemopoietic system before and after birth, as well as in the natural and acquired immune responses of adult to immunogens, including infectious agents. NO have been suggested to play an important role in endotoxin-mediated shock and inflammation. In this study, we investigated the effect of Omisodok-eum on the production of NO. The Omisodok-eum inhibited the secretion of NO in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages, without affecting cell viability. The protein level of inducible nitric oxide synthase(iNOS) in peritoneal macrophages was also decreased by Omisodok-eum. These results suggest that Omisodok-eum suppresses the endotoxin-induced inflammatory responses through inhibiting the production of NO

Key words : Omisodok-eum(五味消毒飲), nitric oxide, iNOS, macrophages, inflammation

서 론

五味消毒飲은 清代 吳謙의 醫宗金鑑¹⁾에 기록된 處方으로, 주로 清熱解毒하고 涼血消腫하는 효능으로 癰疽, 疔瘡 등 瘡瘍疾患에 사용한다고 되어 있다²⁾. 癰疽는 肌肉, 骨髓, 臟腑部位에서 局部的으로 發熱, 發赤, 堅硬, 腫痛, 患部の 陷沒突起 및 化膿 등의 樣相을 나타내는 證狀의 總括의 概念이며, 病原性 微生物의 感染으로 毛細血管의 擴張과 血液 및 體液의 貯溜로 發熱, 浮腫, 疼痛, 機能失調 등의 證狀을 수반하는 炎症性 疾患에 해당되는데³⁾, 炎症이라는 것은 흔히 볼 수 있는 病變으로 局部에 가해진 炎症 유발성 자극과 조직 상해에 대한 血管 및 綜合 組織系의 자기방어체계인 免疫過程의 일부분으로 外部로부터 物理的, 化學的, 生物學的 損傷으로 복구하는 生體의 反應에 의하여 組織의 損傷과 더불어 炎症反應 즉 浮腫, 發熱, 疼痛이 나타나게

된다^{4, 5)}. 이러한 炎症反應의 대부분은 細菌이나 傷害된 局部組織에서 유래하는 化學因자의 誘導에 의해 대식세포가 活性化되어 발생하는 因子인 NO, TNF- α 등과 많이 관련되어 있다⁶⁾. 그리고 最近의 研究는 이러한 NO, TNF- α 의 조절로 인한 anti-inflammatory 물질과 관련된 연구가 많이 진행되고 있으며^{7,8,9)}, 이런 炎症反應과 관련이 있는 癰疽疾患에 多用되는 處方중 하나인 五味消毒飲을 응용하여 抗炎症作用을 통한 免疫作用에 역할을 알아보고자 本 研究를 시도하여 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 實驗에 사용한 五味消毒飲(이하 OMSDE)의 처방 구성은 吳의 醫宗金鑑¹⁾에 의거하였으며, 藥材는 동의대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다.

* 교신저자 : 고우신, 부산시 부산진구 양정동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학 E-mail : wsko@hyomin.dongeui.ac.kr Tel : 051-850-8657

· 접수: 2002/07/10 · 수정: 2002/08/24 · 채택 : 2002/09/19

Table 1. Prescription of Omisodok-eum

韓藥名	生藥名	重量(g)
金銀花	Lonicerae Flos	11.25g
野菊花	Chrysanthemum indicum	4.4g
蒲公英	Taraxacum mongolicum	4.4g
紫花地丁	Viola mandshrica	4.4g
天葵子	Semiaquilegia adoxoides	4.4g
전체		28.85g

2. 시약

Anti-murine IκB-α antibody, Anti-murine iNOS polyclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)로 부터 구입했으며, LPS(phenol extracted Salmonella enteritidis), Thioglycollate(TG), broth(Brewer)는 DIFCO(Detroit, MI)社로 부터 구입했다. Tween-20, BSA, phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG, 그리고 p-nitrophenyl phosphate, nitrate reductase (from Aspergillus species), β-NADPH, sodium pyruvate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-d iphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 구입했다. Lactate dehydrogenase는 Amresco(Solon, OH)로 부터 구입했고, 24, 96-well 조직 배양 plates와 60 mm 배양 dishes는 Nunc, Inc. (North Aurora Road, IL)로 부터 구입했다. L-arginine(200 mg/L)을 포함하고 있는 RPMI, FBS 그리고 다른 조직배양 시약들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD)로 부터 구입했다. 모든 All 시약과 media for tissue culture experiments were tested for LPS content with use of colorimetric Limulus amoebocyte lysate assay (detection limit, 10 pg/ml; Whittaker Bioproductus, Walkersville, MD)

3. 검액의 조제

OMSDE의 조제는 2첩 분량을 증류수 1200ml와 같이 일반 약탕기에 2시간 정도 가열하였다. 2500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 다음 여과지로 여과하였다. 여과한 액을 다시 0.45μm 크기의 여과지로 여과하였고, freezer dryer로 20시간 동결건조하여 분말을 얻어 보관하였다. 실험시에는 OMSDE extract를 필요한 농도로 PBS(phosphate buffered saline)에 녹인 후 0.22μm 크기의 여과지로 여과한 후 사용하였다.

4. 대식세포 배양

C57BL/6 mice는 대한실험 동물센터(충청북도, 음성)로 부터 8-12주령의 체중이 25-30g 내외 크기로 구입하였으며, 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(23℃, 60%)에서 2주 이상 적응시킨 후 사용하였다. mouse에 3% TG를 2.5ml 복강내 주사하여 3일 후에 TG로 유도된 복강 대식세포는 이전에 보고된 방법으로 분리하였다¹⁰⁾. 복강세척은 10 U/ml heparin이 포함된 HBSS 10ml를 사용하여 두 번 세척하여 복강세포를 얻었다. 그리고 얻은 복강 대식세포는 10%(v/v) FBS를 포함한 RPMI배양액에 넣고 24-well 조직배양 plates(2×10⁵ cells/well)에 골고루 배분되어 5% CO₂ 배양기에서 37℃상태로 배양되었다. dishes에 정착이 되어있지 않는 cells들은 흡입기로 제거되었으며, 실험기준에 맞게 조절된 media를 준비해 주었다.

5. nitric oxide의 측정(Griess assay)

대식세포에 있어서의 Nitric oxide의 합성된 농도는 Griess reaction¹¹⁾에 의하여 측정되었다. 간단히 기술하면, 대식세포 배양 상층액 100μl을 얻어서 똑같은 양의 Griess reagent(0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 와 1% sulfanilamide의 1 : 1 혼합)을 혼합한 후 96well plate에 넣고 분광광도계(Molecular Devices Co., Melno park, CA, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양 상층액에 있는 Nitrite(NO₂)농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였다. 데이터는 mean±S.E로 작성하였다.

6. Cell viability assay

세포생존을 및 세포독성은 MTT assay를 사용하여 측정하였다. Griess reaction후에 남아있는 cells를 가지고 cell viability를 측정하였다. 설명하면, 5mg/μl의 MTT(3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액 10μl를 각각 well마다 넣고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다. 배양된 세포내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 100μl의 DMSO를 첨가하여 세포를 완전히 용해시켰다. 각각 well의 흡광도는 분광광도계를 통하여 570nm에서 읽었다.

7. Western blot analysis

복강 대식세포는 여러 가지 농도의 OMSDE를 넣고 배양되었다. 그리고 1μg/ml의 LPS로 자극되었다. 세포들은 세 번 PBS(calcium and magnesium-free phosphate buffered saline)로 씻어내고, 0.2ml의 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1μg/ml leupeptin, 150mM NaCl)로 lysis시켰다. 그리고 용해된 단백질은 Bradford method¹³⁾로 결정되었다. iNOS측정을 위하여 lane 당 위에서 얻은 단백질 30μg를 Laemmli method¹⁴⁾로 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동 시켰다. 20mA로 1시간 전기영동시킨 후 분리된 단백질을 60V로 2시간동안 Nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그리고 5% skim milk로 3시간동안 차단시킨 후, 1% TPBS(PBS containing 0.1% Tween 20)로 씻어냈다. 그리고 1:1000로 희석된 iNOS(Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, USA) monoclonal antibody로 1시간 동안 같이 실온에 보관시켰고, 0.1% TPBS로 세 번 씻은 후에 horseradish peroxidase(Amersham, Buckinghamshire, UK)가 붙어있는 anti-rabbit secondary antibody를 1:1000로 희석시켜 Nitrocellulose membrane과 같이 1시간 동안 실온에 보관하였다. Amersham ECL system(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 x-ray film(Agfa, Belgium)에 현상시켰다.

8. Preparation of nuclear extract

Nuclear extracts는 Andrews과 Faller의 method¹⁵⁾에 따라서 준비되었다. 간단히 설명하면, cells는 60mm dishes에 배양된

후에 얼어졌다. 그리고 PBS로 3번 씻은후에 250 μ l의 ice-cold buffer A(10 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)로 resuspend시킨다. 그리고 10분동안 ice에 놓아 두었다가, 10초 동안 vortex시킨다. 그리고 4 $^{\circ}$ C에서 1분동안 12,000 rpm에서 원심분리시킨다. cytosolic의 단백질을 포함하고 있는 상층액을 제거한 후 남아있는 nuclear proteins에 50 μ l의 buffer C(20 mM HEPES, pH 7.6, 25% glycerol, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)로 resuspend시키고 ice에 30분 동안 놓아둔다. 후에 nuclear protein을 포함하고 있는 supernatants는 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 12,000 rpm에서 원심분리시키고, 얼어진 sup은 -70 $^{\circ}$ C에서 보관되었다.

9. Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)

Nuclear extracts의 Gel shift assay는 manufacturer's instructions(Promega, Madison, WI)에 따라서 시행되었다. 간략히 설명하면, NF- κ B binding consensus sequence를 가진 oligonucleotide를 Promega사에서 구입하여 Promega사에서 추천하는 방법으로 EMSA를 실시한다. 생쥐 大食細胞에 여러 자극을 준 후 핵단백질을 분리하여 핵단백질 10 μ g과 32P-labeled oligonucleotide를 20분 동안 室温에서 반응시킨 후 4% non-denaturing gel에서 25mA에서 1시간 동안 전기영동한다. gel을 말려서 Phosphoimage analysis를 하거나 X-ray film에感光시켜 특이적인 band를 확인한다.

10. Statistical analysis

실험결과와 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였다.

결 과

1. Effect of OMSDE on NO production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages

OMSDE의 anti-inflammatory activity를 molecular level에서 조사하기 위하여, LPS로 자극된 mouse의 복강대식세포에서 nitrite production를 살펴보았다. TG로 유도된 mouse의 복강대식세포는 OMSDE과 1시간 동안 배양되었다. 그리고 복강 대식세포는 LPS(1 μ g/ml)로 자극된 후 24시간동안 배양되었다. 자극된 복강 대식세포에서 생산된 nitrite concentration는 Griess reagent로 측정되었다. Fig. 1에서 자극이 없었던 복강 대식세포는 1.68 \pm 0.53 μ M NO를 생산하였고, OMSDE의 투여없이 LPS로 자극된 복강 대식세포에서는 25.16 \pm 0.87 μ M NO를 생산했다. 복강 대식세포에 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml의 OMSDE이 처치가 되었을때는, 각각 18.34 \pm 1.41, 13.27 \pm 1.54, 9.56 \pm 1.29, 4.00 \pm 0.12, 4.28 \pm 0.32 μ M NO를 생산하였다. OMSDE은 배양된 세포에서 농도의존적으로 NO의 생산을 유의하게 억제하였다.

2. Cytotoxic Effect of OMSDE in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages

LPS로 자극된 mouse의 복강 대식세포에서 OMSDE 자체가

cytotoxic한 상태인가를 알아보기 Griess reaction후에 남아있는 cells를 가지고 cell viability를 측정하였다. 위에서 설명한 MTT assay를 통하여 570nm에서 분광광도계를 통하여 알아본 결과, Fig. 2에서 OMSDE의 투여없이 LPS로 자극된 복강대식세포에서는 74.35 \pm 13.79의 생존율을 나타냈고, 복강대식세포에 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml 농도의 OMSDE의 처치가 되었을때는, 각각 76.73 \pm 12.03, 76.61 \pm 11.75, 82.21 \pm 11.99, 84.86 \pm 17.00, 82.47 \pm 18.75의 생존율을 나타내었다. 이런 결과로 미루어 OMSDE은 LPS로 자극된 복강대식세포에서 세포에 독성효과를 유발함이 없이 NO 생산을 유의하게 억제하는 것을 알 수 있다.

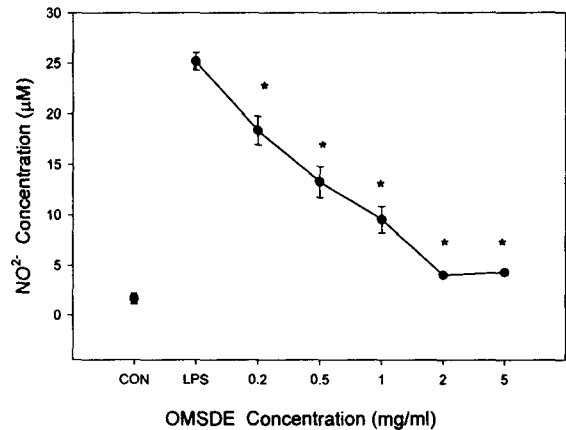


Fig. 1. Inhibition effect of OMSDE on the nitrite production on the LPS-stimulated macrophages. TG-elicited mouse macrophage(2 \times 10⁶ cells/well) were incubated for 1 hr in the presence of the indicated concentrations of OMSDE. Then, the cells were stimulated with LPS(1 μ g/ml). After cells were incubated for 24 hr. The production of nitrite concentration was determined by measuring the culture medium with Griess reagent. * : P<0.01 significantly different from the LPS.

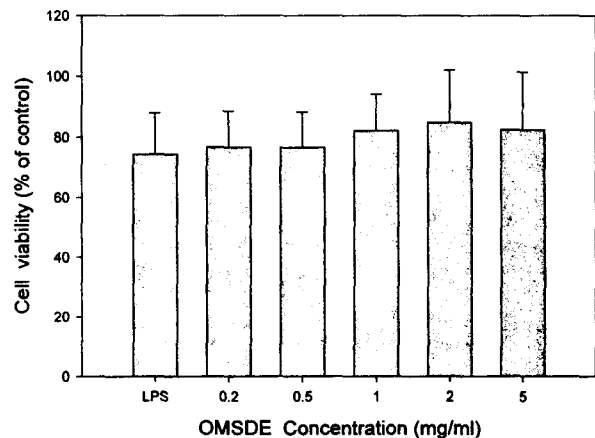


Fig. 2. Cell cytotoxicity effects of OMSDE on the LPS-stimulated macrophages. TG-elicited mouse peritoneal macrophage(2 \times 10⁵ cells/well) were incubated for 1 hr in the presence of the indicated concentrations of OMSDE. Then, the cells were stimulated with LPS(1 μ g/ml). After cells were incubated for 24 hr. No effect on cell viability was detected in the tested concentration as measured by the MTT assay.

3. Effect of OMSDE on expression of iNOS in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages

LPS로 자극된 mouse의 복강대식세포에서 생산된 NO는 iNOS와 관련이 많으므로 western blot analysis를 통하여 iNOS의 양을 분석하였다. TG로 유도된 복강 대식세포는 각각 0.2, 0.5 mg/ml 농도의 OMSDE과 같이 1시간 동안 배양되었다. 그리고 복강 대식세포는 LPS(1 µg/ml)로 24시간 자극되었다. 측정된 iNOS의 level은 OMSDE의 농도의존적으로 아주 감소되었다 (Fig. 4). Western blot analysis에서의 이러한 결과는 OMSDE과 LPS로 자극된 mouse의 복강 대식세포에서 iNOS효소의 발현의 억제를 통제하므로써 NO의 생산을 억제한다는 것을 표시하는 것이다.

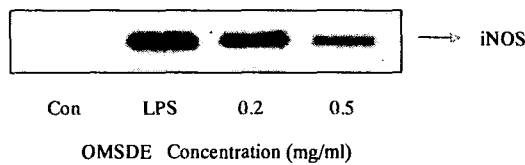


Fig. 3. Effects of OMSDE on the synthesis of iNOS in the LPS-stimulated macrophages. TG-elicited mouse peritoneal macrophage(2 × 10⁶ cells/well) were incubated for 1 hr in the presence of the indicated concentrations of OMSDE. Then, the cells were stimulated with or without LPS(1 µg/ml) and incubated for 24 hr. After, the cellular proteins were collected and then 10% SDS-PAGE was performed. Western blot was probed with a monoclonal antibody to iNOS. The position of m.w. marker and iNOS are indicated.

4. Effect of reduction binding activity of NF-κB by OMSDE in LPS-stimulated macrophages.

iNOS gene의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자(transcription factor)로는 NF-κB, AP-1, c/EBP 등이 있으며, 이들 중 여러 가지 면역 기능에 관여하는 대표적인 전사조절인자가 NF-κB이다. 따라서 본 연구자들은 mouse의 복강 대식세포에서 LPS에 의한 NF-κB의 DNA binding activity를 EMSA 방법으로 조사하였다. 1 µg/ml의 LPS를 처리하고 30분 후에 NF-κB의 DNA binding activity가 증가하였으며, OMSDE을 1시간 전 처리하고 LPS를 처리하면 NF-κB의 activity가 각 추출물의 농도에 의존적으로 매우 현저히 감소하였다. 이런 결과는 OMSDE이 NF-κB의 DNA binding activity를 억제시키므로써 NF-κB의 조절을 받는 iNOS 유전자의 발현을 저해시켜(Fig. 3), Fig. 1에서 보는 바와 같이 NO의 생산을 억제시킨 것으로 생각된다.

5. Inhibitory effects of OMSDE on IκB-α degradation in LPS-stimulated macrophages

cytoplasm에서 NF-κB는 IκBs라고 하는 억제 단백질과 연결되어 비활성화된 형태로 존재한다. IκBs는 IκB-α, IκB-β, IκB-γ¹⁶⁾로 구성되어 있다. NF-κB의 일반적인 pathway는 IκBs의 degradation에 의하여 시작된다. OMSDE이 IκBs의 degradation에 어떠한 영향을 주는지를 평가하기 위하여 IκBs의 하나인 IκB-α의 level을 Western blot analysis를 통하여 측정하였다. mouse 복강 대식세포에서 1 µg/ml의 LPS를 처리하고 30분 후에 IκB-α의 degradation이 증가하였으며, OMSDE을 1시간 전 처리하고

LPS를 처리하면 IκB-α의 degradation이 각 추출물의 농도에 의존적으로 매우 현저히 억제되었다. 이로 보아 OMSDE이 NF-κB의 억제 단백질중의 하나인 IκB-α의 degradation을 억제함으로써 NF-κB의 DNA binding activity 억제시키고(Fig. 4), NF-κB의 조절을 받는 iNOS 유전자의 발현을 저해시켜(Fig. 3), NO의 생산을 억제한 것으로 사료된다(Fig. 1).

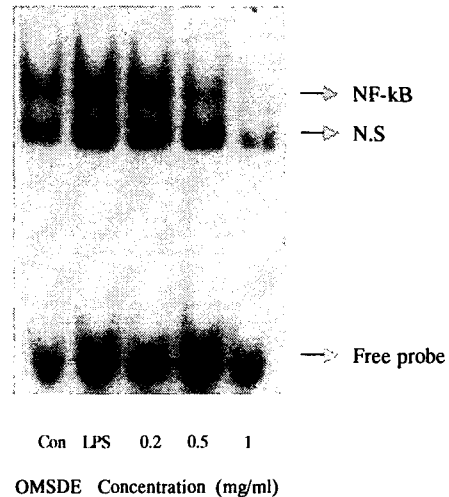


Fig. 4. Reduced binding activity of NF-κB by OMSDE in LPS-stimulated macrophages. TG-elicited mouse peritoneal macrophages(2.5 × 10⁶ cells/ml) were incubated in 3 ml of incubation medium with indicated of OMSDE for 1 hr prior to LPS stimulation(1 µg/ml) for 30 min. After then, cells were harvested, followed by extraction of nuclei and incubated with 32P-end-labeled probes containing binding site for NF-κB.

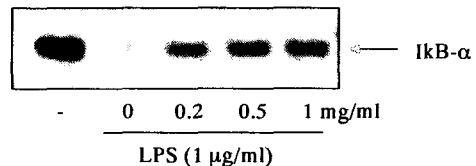


Fig. 5. Effects of OMSDE on IκB-α degradation in LPS-stimulated macrophages. TG-elicited mouse peritoneal macrophages(2.5 × 10⁶ cells/ml) were incubated in 3 ml of incubation medium with indicated of OMSDE for 1 hr prior to LPS stimulation(1 µg/ml) for 30 min. After then, cells were harvested, and then level of IκB-α were determined by Western blotting.

고찰 및 결론

nitric oxide(NO)는 neurons에서 hepatocytes까지 여러 다양한 세포들에서 합성된다^{17,18)}. NO는 nitric oxide합성효소(NOS)에 의하여 amino acid L-arginine로 부터 유도된다. NOS에는 3가지 isoforms이 존재한다고 알려져 있고, 크게는 두가지 범주인 constitutive NOS와 inducible NOS로 나눈다. Constitutive NOS 효소는 neurons^{19,20)}, cardiac myocytes²¹⁾와 같은 cell에 항상 존재하면서 자극시 즉시 활성화되어 적은 양의 NO를 생산한다. inducible NOS는 hepatocytes^{22,23)}, vascular smooth muscle cell^{24,25)}, fibroblasts²⁶⁾, mouse의 macrophages^{27,28)}와 같은 세포에서 합성되어지는데 이때는 많은 양의 NO가 생산된다. 대식세포는 출생전이나 출생후에 lymphohaemopoietic 시스템의 발생에

중요한 역할을 할뿐만 아니라, 선천적이건 후천적인 갖고 있는 면역시스템에서 여러가지 감염을 포함하는 immunogens에 반응에 중요한 역할을 한다. lymphoid and non-lymphoid 조직에 상주하는 것이 대식세포의 일반적인 모습이라고 잘 알려져 있을 뿐만 아니라, 또한 어떤 부위 염증이 발생시 유도되어 해당되는 부위로 이동하고 활성화된 대식세포는 일련의 면역반응을 초래한다. 또한 활성화된 대식세포는 iNOS의 작용에 의하여 L-arginine로부터 많은 양의 nitric oxide(NO)을 생산한다²⁹. iNOS에 의하여 합성된 NO는 많은 cell의 기능들을 조절하고, trauma^{30,31}, sepsis³², multiple sclerosis³³, arthritis^{34,35}와 같은 여러가지 질병들의 발현에 관계한다. 그리고 과잉생산된 NO는 급만성 염증에서 병리적인 역할을 한다는 다양한 증거들이 있다³⁶. 그러므로 NO의 과잉생산 억제는 여러가지 형태의 염증질환에 충분히 도움이 될 것이다. 그래서 NOS의 억제제는 NO가 과잉생산되어 발생된 질병의 개선에 유용하게 사용될 목적으로 응용될 수 있다³⁷. 이런 선택적인 iNOS의 억제제는 periodontitis³⁸, osteoarthritis³⁹, experimental autoimmune myocarditis⁴⁰, virus 감염에 의한 염증이나 demyelination⁴¹, carrageenan으로 유발된 염증모델⁴², multiple sclerosis⁴³ 그리고 shock⁴⁴을 감소시킨다는 보고가 있다. LPS로 자극된 mouse의 peritoneal macrophages에서 발생한 NO의 양을 보면 OMSDE는 농도 의존별로 NO의 양을 감소시켰으며(Fig. 1), NO를 생산하는 요소인 iNOS의 양도 감소시켰다(Fig. 3). 이것은 OMSDE이 peritoneal macrophages에서 과잉 생산되는 NO의 양을 통제하므로써 외부감염시 발생하는 질병의 개선에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 적절한 NO의 생산 감소 및 iNOS의 발현억제에도 불구하고 세포 생존에는 MTT assay를 통하여 알아본 결과 문제가 없었다(Fig. 2). 그러면 OMSDE가 어떠한 signal pathway과정을 거쳐서 발현이 되었는지를 알아보기 위하여, iNOS의 발현을 조절하는 인자중의 하나인 NF- κ B의 핵내에서의 활성상태를 살펴 보았다. NF- κ B는 p50, p65, C-rel, B-rel 및 p52 등의 subunit로 이루어진 단백질로, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF 등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하며, iNOS발현을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다^{45,46,47}. NF- κ B는 자극이 없을때는 억제 단백질 I κ B- α 나 I κ B- β 와 결합한 비활성 상태로 핵안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I κ B- α 나 I κ B- β 의 특정 serine기가 떨어져 나가 활성화 되는데 NF- κ B의 활성화에 의해서 iNOS발현이 유도되고, 이 iNOS에 의해 NO가 생성된다. NF- κ B의 활성도를 Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)를 통하여 알아보았다. 그 결과 OMSDE가 농도 의존별로 iNOS 활성 및 NO의 분비 억제 효과를 나타낸 것과 같이 OMSDE의 농도 의존별로 NF- κ B의 활성도를 떨어지게 하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 그리고 OMSDE이 I κ Bs의 degradation에 어떠한 영향을 주는지를 평가한 결과 I κ B- α 의 degradation이 각 추출물의 농도에 의존적으로 매우 현저히 억제되었다(Fig. 5). 이로 보아 OMSDE이 NF- κ B의 억제 단백질중의 하나인 I κ B- α 의 degradation을 억제함으로써 NF- κ B의 DNA binding activity가 억제되고 NF- κ B의 조절을 받는 iNOS 유전자의 발현을 저해시켜

항 염증 효과를 보일 것이라 사료된다. 이것으로 미루어 癰疽에 다용되는 OMSDE은 염증질환이 발생시 염증과정에서 중요한 pathway의 하나인 I κ B- α 의 degradation을 억제함으로써 다음단계인 NF- κ B의 전사를 조절되고 또한 다음 단계인 유전자의 iNOS의 발현을 억제되었다. 그리고 iNOS의 생성물질인 NO의 양도 줄어들게 되는 것이다. 그러므로 충분히 OMSDE은 염증질환에 염증을 개선하는 약제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 吳 謙 編, 醫宗金鑑, 서울, 대성문화사, pp.399-403, 1991.
2. 顧伯康 主編, 中醫外科學, 北京, 人民衛生出版社, 1987, p.470
3. 고우신, <靈樞·癰疽>에 관한 研究, 원광대학교 대학원, 1995.
4. 白允基, 病理學, 서울, 高文社, p.23, 1988.
5. 李潤台 譯, 最新 免疫學, 서울, 集文堂, pp.355-358, 1989.
6. 대한 병리학회 대구·경북지부학회, 간추린 병리학, 서울, 정문각, 62-73, 2000.
7. 진영희, NO and TNF- α Secretion in IFN- γ plus LPS-stimulated Murine Macrophages Are Inhibited by the Stress Response, 부산대 대학원, 1999.
8. 강호건, The study of the TakRiSoDokEum on the Anti-inflammatory Effects, 동의대 대학원, 2000.
9. 김남권, 龍膽瀉肝湯이 抗바이러스 活性 및 免疫反應에 對한 實驗的 考察, 원광대 대학원, 1997.
10. McCarron, R.M., Goroff, D.k., Luhr, J.E., Murphy, M.A., Herscovitz, H.B., Methods for the collection of peritoneal and macrophages. Methods Enzymol. 108, 274-284, 1984.
11. Schmidt H.H.H.W. and Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. Methods in Nitric Oxide research, John Wiley and Sons Ltd. pp.491-497, 1996.
12. McLaughlin, P.J., Elwood, N.J., Ramade, L.T., Pica, M.R., McKenzie, I.F., Improvement in sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay for tumor necrosis factor. Immunol. Cell Biol. 68, 51-55, 1990.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.
14. Laemmli, U.K., Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970..
15. Andrews, N.C., Faller, D.V., A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucleic. Acids. Res. 19, 2499, 1991..
16. Mercurio, F., Manning, A.M. Multiple signals converging on NF- κ B. Curr. Opin. Cell. Biol. 11, 226-232, 1999.

17. Palmer R., Fernge A. and Moncada S. : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived factor, *Nature*;327:524-526, 1987.
18. Ignaro L., Buga G., Wood K., Byrns R. and Chaudhuri G. : Endothelial-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Natl. Acad. Sci. USA*, 84:385-388, 1987.
19. Garthwaite J., Charles S. and Chess-Withams R. : Endothelial-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain, *Nature* 336:385-388, 1998.
20. Bredt D. and Synder S. : Isolation of nitric oxide synthetase. A calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:682-685, 1990.
21. Finkel M., Oddis C., Jacob T., Watkins S., Hattler B. and Simmons R. : Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide, *Science*;257:387-389, 1992.
22. Curran R., Billiar T., Stuehr D., Hofman K. and Simmons R. : Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginin in response to inflammatory products from kupffer cells, *J. Exp. Med.* 170:1769-1774, 1989.
23. Curran R., Billiar T., Stuehr D., Hofman K. and Simmons R. : Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis, *Ann. Surg.* 212:462-471, 1990.
24. Busse R. and Mulsch A. : Introduction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells, *FEES Lett.* 265:133-136, 1990.
25. Nakayama D., Geller D. and Lowenstein C. : Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle, *Am. J. Repair Cell Biol.* 7:471-476, 1992.
26. Werner-Felmayer G., Werner E., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G. and Wachter H. : Tetrahydrobiopterin dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts, *J. Exp. Med.* 172:1599-1607, 1990.
27. Hibbs JB Jr., Taintor R. and Varin Z. : Macrophages cytotoxicity : a role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite, *Science* 235:1599-1607, 1990.
28. Stuehr D. and Marietta M. : Mammalian nitrate biosynthesis : mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia Coli lipopolysaccharide, *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA* 82:7738-7742, 1985.
29. Siamon G., Sandra C., David G. and Anthony D : *Molecular immunobiology of macrophages*, Oxford University and Queensland Institute of Medical Research, 1995.
30. Szabo C., Thiemermann C., Invited opinion : role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic and anaphylactic shock and thermal injury, *Shock*2, 145-155, 1994.
31. Kibourn R., Jubran A., Gross S., Griffith O., Levi R. Adams J., et al., Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1132-1138, 1990.
32. Thiemermann C., Nitric oxide and septic shock. *Gen. Pharmacol.* 29, 159-166, 1997.
33. Parkinson J., Mitrovic B., Merrill J., The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* 75, 174-186, 1997.
34. McCarthy-Francis N., Allen J., Mizel D., Albina J., Xie Q., Nathan C., et al., Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178, 749-754, 1993.
35. Miyasaka N., Hirata Y., Nitric oxide and inflammatory arthritis. *Life Sci.* 61, 2073-2081, 1997.
36. Clancy R., Abramson S., Nitric oxide : a novel mediator of inflammation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210, 93-101, 1995.
37. Southan G., Szabo C., Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 51, 383-394, 1996.
38. Lohinai Z., Benedek P., Fether E., Gyorfi A., Rosivall L., Fazekas A., et al., Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br. J. pharmacol.* 123, 353-360, 1998.
39. Pelletier J., Jovanovic D., Fernandes J., Manning P., Connor J., Currie M., et al., Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum.* 41, 1275-1286, 1998.
40. Shin T., Tanuma N., Kim S., Jin J., Moon C., Kim K., et al., An inhibitor of nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 92, 133-138, 1998.
41. Rose J., Hill K., Wada Y., Kutrz C., Tsunoda I, Fujinami R., et al., Nitric oxide synthase inhibitor, aminohuandinine, reduces inflammation and demyelination produced by Thiler's virus infection. *J. Neuroimmunol.* 81, 82-89, 1998.
42. Cuzzocrea S., Zinfarelli B., Hake P., Salzman A., Szabo C., Anti-inflammatory effects of mercaptoethyl-guanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger in carrageenan-induced models of inflammation. *Free. Rad. Biol. Med.* 24, 450-459, 1998.
43. Hua L., Liu J., Brosnan C., Lee S., Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon0beta : implications for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43, 384-387, 1998.
44. Levy B., Valtier M., de Chillou C., Bollaert P., Cane D.,

- selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock*, 11, 98-103.
45. McElhaney, M.R., Chandler, L.J., Streit, W.J. Astrocytes but not microglia express NADPH diaphorase activity after moter-neuron injury in the rat, *Neurosci. Lett.* 180:67-70, 1994.
46. Endoh, M., Maiese, K., Wanger, J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res.* 651:92-100, 1994.
47. Iadecola, C., Zhang, F.Y., Casey, R., Clark, H.B., Ross, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene-expression in vascular cells after transient focal cerebral-ischemia, *Stroke.* 27:1373-1380, 1996.