

원 저

二精丸의 NF- κ B 활성화 기전을 통한 COX-2 저해 기전

손명용, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Inhibition of COX-2 gene expression via NF- κ B pathway by *Ichungwhan*

Myung-yong Son, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : The present study was undertaken to investigate the molecular mechanisms of *Ichungwhan* for inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression via suppression of NF- κ B (nuclear factor κ B) using aged rats. NF- κ B is the most important modulator of inflammation and NF- κ B regulates the gene expression of several pro-inflammatory cytokines, such as COX-2.

Methods : In the experiment, we investigated the scavenging property of *Ichungwhan* on reactive species (RS) including nitrogen-derived species (RNS), measured by DCF-DA (2,2'-dichlorodihydrofluorexycin diacetate) / DHR 123 (dihydrorhodamine 123) assay. Protein expression levels of COX-2, NF- κ B, p-ERK and p-p38 were assayed by western blot.

Results : We showed that *Ichungwhan* inhibits RS including RNS and inhibits NF- κ B activation by blocking the dissociation of inhibitory I κ B- β via suppression of IKK pathway. Also, *Ichungwhan* inhibits COX-2 gene expression.

Conclusions : These findings suggest that *Ichungwhan* modulates COX-2 gene expression via suppression of the NF- κ B pathway.

Key Words: peroxynitrite, reactive species, cyclooxygenase-2, nuclear factor κ B, *Ichungwhan*

서 론

노화과정은 시간에 따라 기능의 저하를 초래한다. 이러한 기능의 변화는 생물체 내외의 요인으로부터 초래되는 산화적 스트레스를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 되고, 세포내의 항상성을 잃게 된다. 최근의 노화 가설들 중 산화적 손상 가설¹⁾과 프리라디칼 가

설²⁾로 노화현상을 잘 설명할 수 있다. 이들 가설들은 노화 연구 분야뿐만 아니라, 다른 생물학 분야의 연구자들로부터 주목을 받고 있다. 노화과정의 주요한 원인으로 RS (reactive species) 뿐만 아니라 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase와 같은 활성종을 생성하는 효소들이 중요한 역할을 담당하고 있다³⁾.

특히 여러 가지 자극에 의해 반응되는 것으로 알려진 redox (산화환원) 감수성 인자 NF- κ B (Nuclear factor κ B)는 다른 전사인자와는 다르게 I κ B (Inhibitor κ B)라 불리는 저해성 분자에 의해 불활성 상태로 세포질에 존재한다. NF- κ B는 p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ

· 접수 : 2004년 7월 12일 · 논문심사 : 2004년 8월 5일
· 채택 : 2004년 8월 18일
· 교신저자 : 정지천, 서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대학교
강남한방병원 1내과
(Tel: 02-3416-9711, Fax: 02-3416-9770, E-mail:
jjcjh@hitel.net)

B2), p65 (Rel-A), c-Rel 등이 결합한 형태로 존재하는데 주로 p65-p50 heterodimer의 NF-κB가 주로 관찰된다⁴⁾. 기저 상태에서는 IκB와 결합한 상태로 세포질 내에 존재하며 UV, RS 등과 같은 다양한 외부 자극에 의해서 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)가 활성화되고, IKK (Inhibitor κB kinase) pathway를 통해서 IκB가 분해되면서 NF-κB가 핵 속으로 이동하여, COX-2, iNOS 등과 같이 NF-κB를 binding site로 가지는 여러 가지 노화 관련 유전자를 발현시킨다. NF-κB는 이러한 유전자 발현을 통해 apoptosis, 종양 형성, 세포 증식, 염증, 면역반응을 조절한다. NF-κB의 활성화와 그것에 의한 유전자 발현은 노화, 암, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직 손상, 바이러스성 복제, 급성 염증 상태, 조직이식 숙주반응, 독성/부패성 조직 손상 등을 포함하는 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다⁵⁾. 또한 노화 과정과 노인성 질환에는 NF-κB의 활성화를 초래하는 RS 반응이 밀접하게 관련되어 있다⁶⁾.

RS 중에서도 특히 ONOO⁻는 NO와 ·O₂보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 세포질 효소 활성의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 고혈압, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{4,9)}.

二精丸은 聖濟總錄¹⁰⁾에 助氣固精 補填丹田 活血駐顏 長生不老의 효능을 가진 神仙服草木藥으로 수록된 이래 肝腎陰虛 精氣虛少 頭暈目眩 早衰 등의 치료에 常用되어 왔다^{11,12)}. 補脾益氣 潤肺滋陰하는 약재인 黃精 (Polygonati sibirici Rhizoma)과 滋腎養肝 補精氣하는 枸杞子(Lycii Fructus)로 구성되어 補肝腎 健脾益精氣의 효능을 나타낸다^{11,13)}. 그런데 腎臟의 陰氣虛弱은 東양의학에서 노화의 중요 원인으로 작용하고, 黃精과 枸杞子는 久服輕身不老의 효능이 있어 延年益壽 약물에 속한다¹³⁾. 그러므로 二精丸은 노화 방지 효능을 나타낼 것으로 기대되는데, 남¹⁴⁾ 등은 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻를 직접 소거하고 생성을 억제한다고 보고하였다. 따라서 二精丸이 실제로 노화 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고, 노화와 관련

된 지표들을 검토하고 그들이 조절되는 기전을 분자 수준에서 검토하는 것은 매우 흥미로운 일일 것이다.

본 연구에서는 二精丸이 세포 배양계에서 *t*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) 처리에 의해 유도된 RS의 제거 활성화에 대하여 조사하였고, 노화 과정에서 증가한다고 알려져 있는 NF-κB signaling pathway 관련 단백질들 즉, MAPKs, IKK-αβ, NF-κB와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 노화 쥐에서 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

二精丸의 구성 약재인 黃精과 枸杞子를 시중에서 구입하여 정제하여 사용하였다.

2) 시약

DL-penicillamine, LPS, tbhp는 시그마 화학 주식회사 (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. COX-2, IKK-αβ, NF-κB, p-ERK, p-p38 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, Polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P)은 Millipore Corp (Bedford, MA, USA)에서, Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagents는 Amersham Life Science, Inc (Arlington Heights, IL, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

3) 동물

생후 5주령된 체중 25g 내외의 ICR mouse와 생후 24개월, 6개월된 SD rat를 각각 24±1℃, 50±10% 습도에서 SPF 조건하에 사육하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

黃精과 枸杞子 각 100g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압

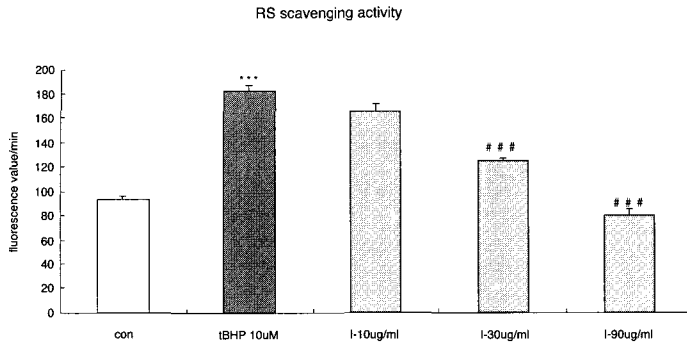


Fig. 1. Inhibitory effect of *Ichungwhan* on *t*-BHP induced oxidative stress. RS scavenging activity of *Ichungwhan* on induced *t*-BHP in endothelial cells. RS was determined in the presence of the *Ichungwhan* at increasing concentrations. Then RS scavenging activity was measured by the microplate fluorescence. I; *Ichungwhan*, untreated groups; CON, *t*-BHP 10 μ M, treated group; treated with *t*-BHP 10 μ M after treated 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 90 μ g/ml *Ichungwhan*. Each bar is the mean S.D of three experiments. Statistical significance: *** p < 0.001 versus con, ### p < 0.001 versus *t*-BHP (10 μ M).

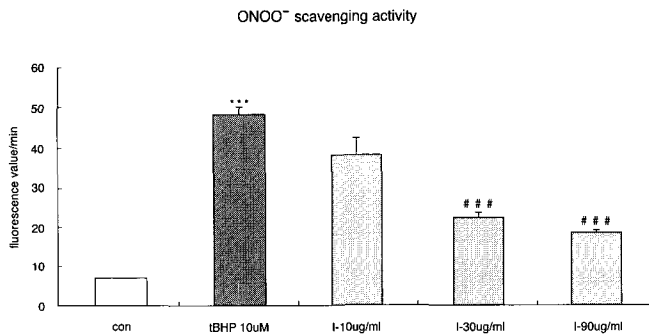
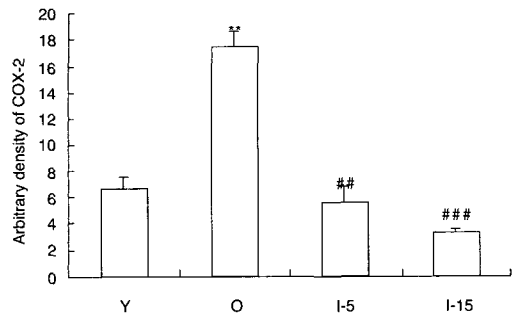
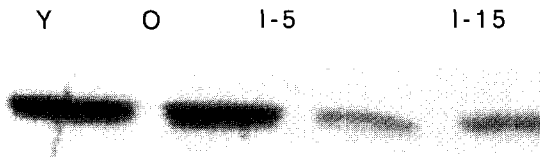


Fig. 2. Inhibitory effect of *Ichungwhan* on *t*-BHP induced peroxynitrite. ONOO⁻ scavenging activity of *Ichungwhan* on induced *t*-BHP in endothelial cells. ONOO⁻ was determined in the presence of the *Ichungwhan* at increasing concentrations. Then ONOO⁻ scavenging activity was measured by the microplate fluorescence. I; *Ichungwhan*, untreated groups; CON, *t*-BHP 10 μ M, treated group; *Ichungwhan*, treated with *t*-BHP 10 μ M after treated 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 90 μ g/ml *Ichungwhan*. Each bar is the mean S.D of three experiments. Statistical significance: *** p < 0.001 versus con, ### p < 0.001 versus *t*-BHP (10 μ M).



COX-2

Fig. 3. Effects of *Ichungwhan* on COX-2 protein level. Protein were prepared and separated on Young rats, and Old rats feeding on *Ichungwhan* 5 mg/kg and 15 mg/kg. Protein loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gel, electrophoresed, and subsequently transferred onto polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblots were probed with antibody specific for COX-2. Y: Young rat (6 months), O: Old rat (24 months), I-5: treated with *Ichungwhan*-5 mg/kg, I-15: treated with *Ichungwhan*-15 mg/kg. Statistical significance: ** p < 0.01 versus con, ## p < 0.01 versus *t*-BHP (10 μ M), ### p < 0.001 versus *t*-BHP (10 μ M).

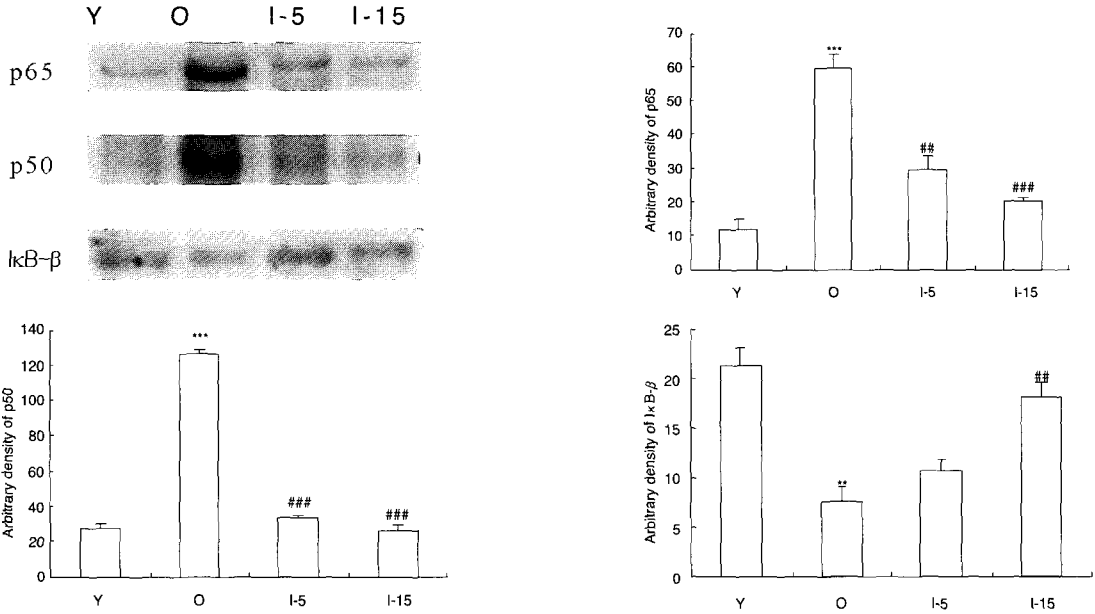


Fig. 4. Effects of *Ichungwhan* on p65, p50 and IκB-β protein levels. Protein were prepared and separated on Young rats, and Old rats feeding on *Ichungwhan* 5 mg/kg and 15 mg/kg. Protein loaded onto 12% SDS-polyacrylamidegel, electrophoresed, and subsequently transferred onto polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblots were probed with antibody specific for p65, p50, IκB-β. Y: Young rat (6 months), O: Old rat (24 months), I-5: treated with *Ichungwhan*-5 mg/kg, I-15: treated with *Ichungwhan*-15 mg/kg. Statistical significance: ** $p < 0.01$ versus con, *** $p < 0.001$ versus con, ## $p < 0.01$ versus t-BHP (10 μ M), ### $p < 0.001$ versus t-BHP (10 μ M).

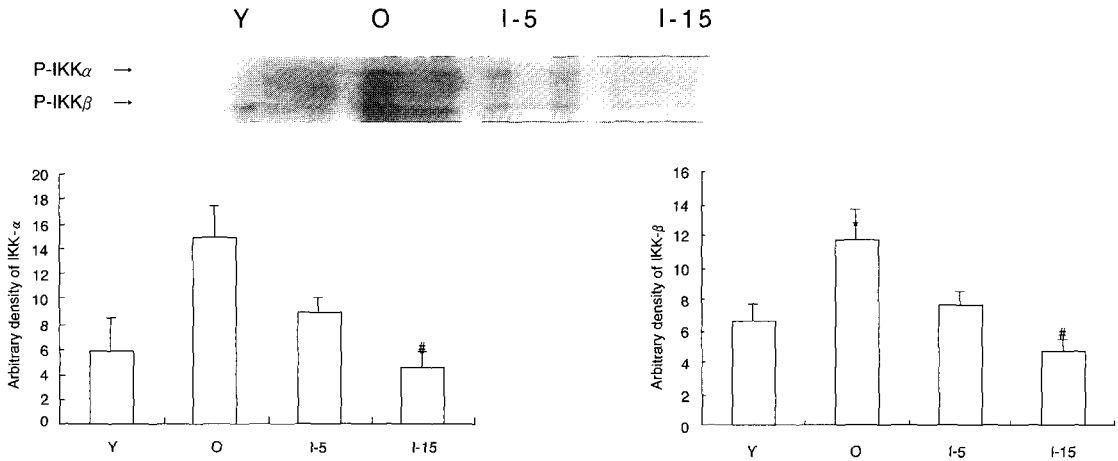


Fig. 5. Effects of *Ichungwhan* on p-IKKα/β protein level. Protein were prepared and separated on Young rats, and Old rats, feeding on *Ichungwhan* 5 mg/kg and 15 mg/kg. Protein loaded onto 12% SDS-polyacrylamidegel, electrophoresed, and subsequently transferred onto polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblots were probed with antibody specific for p-IKKα/β. Y: Young rat (6 months), O: Old rat (24 months), I-5: treated with *Ichungwhan*-5 mg/kg, I-15: treated with *Ichungwhan*-15 mg/kg. Statistical significance: * $p < 0.05$ versus con, # $p < 0.05$ versus t-BHP (10 μ M).

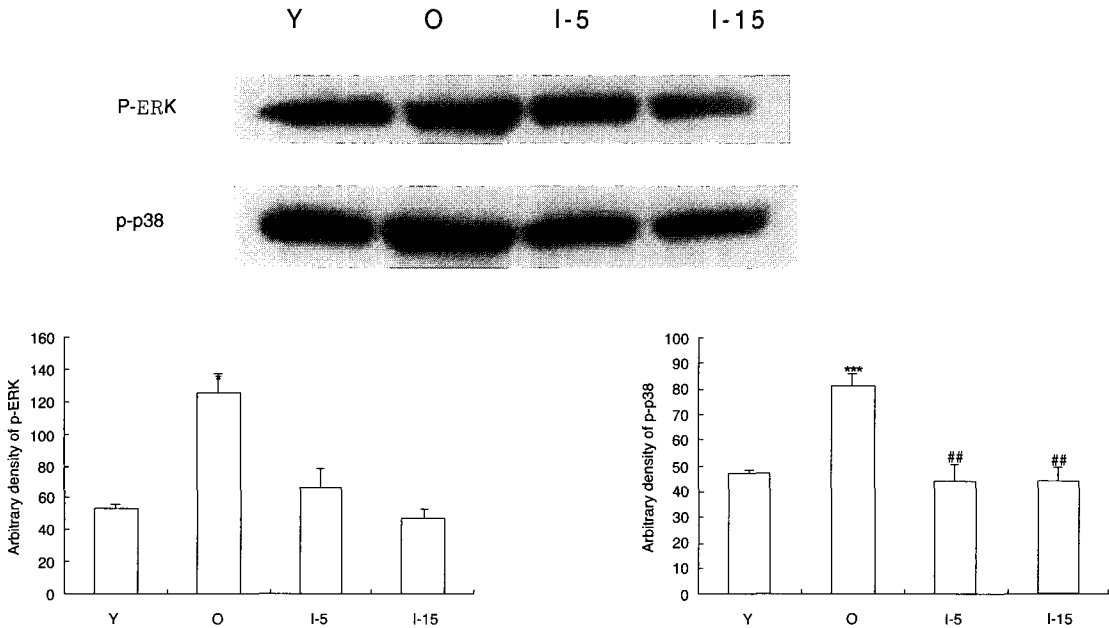


Fig. 6. Effects of *Ichungwhan* on p-ERK and p-p38 protein level. Protein were prepared and separated on Young rats, and Old rats feeding on *Ichungwhan* 5 mg/kg and 15 mg/kg. Protein loaded onto 12% SDS-polyacrylamidegel, electrophoresed, and subsequently transferred onto polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblots were probed with antibody specific for p-ERK and p-p38. Y: Young rat (6 months), O: Old rat (24 months), I-5: treated with *Ichungwhan*-5 mg/kg, I-15: treated with *Ichungwhan*-15 mg/kg. Statistical significance: * $p < 0.05$ versus con, *** $p < 0.001$ versus con, ## $p < 0.01$ versus t-BHP (10 μ M).

농축기를 사용하여 건조시켜 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

YPEN-1 cell을 각각 100 cm² tissue culture flask (Corning Co., New York, USA.)에 2×10⁶ cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 5% fetal bovine serum 함유하고 여기에 glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25 μ g/ml), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였다. 그리고 NaHCO₃을 가하여 pH 7.4~7.6으로 조절한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM : Nissui, Tokyo, Japan)로 37℃, 5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) RS 측정법

DCFDA assay¹³⁾로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의

에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 μ M DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 되므로, 여기과장 485 nm 및 방출과장 530 nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다. 이 때 활성산소 생성원으로 총활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을 사용하였다.

4) ONOO⁻ 측정법

DHR 123 assay¹⁶⁾로 ONOO⁻를 측정하였다. 5 M의 DHR 123에 Rhodamine buffer (90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4), and 5 mM potassium chloride), 100 μ M DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid), 5 μ M DHR 123을 각각 첨가하여 사용하였다. ONOO⁻ scavenging activity는 fluorescence GENious을 이용하여 여기파장 485 nm 및 방출파장 530 nm에서 측정하였다.

5) 배양 YPEN-1 세포에서 RS/ONOO⁻ 생성 억제 활성 측정

YPEN-1 배양 세포에 二精丸을 10, 30, 90 μ g/ml로 처리한 뒤 1시간 후에 *t*-BHP (10 μ M)를 처리하여 활성산소/질소 생성계를 유도한 후에 DCFDA/DHR 123 assay 방법에 따라 형광광도계 (여기파장 485 nm / 방출파장 530 nm)로 형광을 측정하여 二精丸이 활성산소/질소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다.

6) COX-2 발현 측정

24개월령의 쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 10일간 투여한 후 단두하여 신장을 적출하고 신장 조직을 균질화하여 COX-2 발현을 측정하였다.

7) NF- κ B 정보전달계 단백질 IKK- α β , p-ERK, p-p38 측정

24개월령의 쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 10일간 투여한 후 단두하여 신장을 적출하고 신장 조직을 균질화하여 IKK- α β , p-ERK, p-p38 발현을 관찰하였다.

8) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student *t*-test를 이용하여 통계 처리하였다.

결 과

1. *t*-BHP 처리 세포에서 RS/ONOO⁻ 생성에 미치는 영향
二精丸이 *t*-BHP에 의해 증가된 RS의 생성을 억제하는지를 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 그 결과 *t*-BHP 처리에 의해 증가된 RS 생성이 二精丸 10, 30, 90 μ g/ml 처리에 의해 각각 9.7%, 31.1%, 56.3% 억제되었다(Fig. 1).

RS 중에서도 특히 독성이 더욱 강한 것으로 알려져 있는 ONOO⁻에 대한 二精丸의 억제 효과를 검토한 결과 *t*-BHP 처리에 의해 증가된 ONOO⁻ 생성이 二精丸 10, 30, 90 μ g/ml 처리에 의해 각각 21.7%, 54.2%, 61.9% 억제되었다(Fig. 2).

2. 노화 쥐에서 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향

24개월령의 노화 흰쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 투여한 후 신장을 균질화하여 6개월령의 흰쥐와 비교하여 western blot을 실시하였다. 二精丸을 투여한 군과 6개월령 흰쥐, 24개월령 흰쥐에서 COX-2의 발현 정도를 비교하여 관찰한 결과 6개월령 쥐보다 24개월령 쥐에서 그들의 발현이 증가하였고, 二精丸을 식이한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3).

3. 노화 쥐에서 NF- κ B 단백질의 발현에 미치는 영향

24개월령의 쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 10일간 투여한 후 신장을 균질화하여 6개월령의 쥐와 비교하여 western blot을 실시하였다. 二精丸을 투여한 군과 6개월령 쥐, 24개월령 쥐에서 먼저 p65, p50의 발현 정도를 비교하여 관찰한 결과 6개월령 쥐보다 24개월령 쥐에서 그들의 발현이 증가하였고, 二精丸을 투여한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 p65와 p50과 함께 있으면서 이들을 저해하는 분자인 I κ B- α / β 를 관찰한 결과 二精丸이 I κ B- α 의 분해를 억제하는 사실을 알 수 있었다(Fig. 4). 결과적으로 二精丸은 I κ B- α / β 의 분해를 막아서 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것을 억제하여 NF- κ B를 binding site로 가지는 노화지표 단백질인 COX-2의 단백질 발현을 억제하는 활성이 있다는 것을 시사한다.

4. 노화쥐에서 p-IKK 단백질의 발현에 미치는 영향

24개월령의 쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 10일간 투여한 후 신장을 균질화하여 6개월령의 쥐와 비교하여 western blot을 실시하였다. 二精丸을 식이한 군과 6개월령 쥐, 24개월령 쥐에서 먼저 NF- κ B의 upstream인 IKK 단백질의 활성형인 p-IKK 단백질 발현을 관

찰한 결과 6개월령 쥐보다 24개월령 쥐에서 그들의 발현이 증가하였고, 二精丸을 식이한 군에서 농도의 존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 이러한 결과에서 二精丸이 p-IKK 단백질의 발현을 억제하여 NF- κ B를 조절하는 것을 알 수 있다.

5. 노화 쥐에서 MAPKs 단백질의 발현에 미치는 영향
24개월령의 쥐에 二精丸 5, 15 mg/kg을 투여한 후 신장을 균질화하여 6개월령의 쥐와 비교하여 western blot을 실시하였다. 二精丸을 투여한 군과 6개월령 쥐, 24개월령 쥐에서 p-ERK, p-p38의 단백질 발현을 비교하여 관찰한 결과 24개월령 쥐보다 6개월령 쥐에서 그들의 발현이 증가하였고, 二精丸을 투여한 군에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6). 이 같은 결과는 二精丸이 MAPKs pathway를 경유하여 NF- κ B를 조절한다는 것을 시사한다.

고 찰

二精丸은 肝臟과 腎臟의 陰氣가 부족하여 발생하는 精氣虛少 精神萎靡 頭暈 目眩, 早衰 등의 치료에 활용되는 方劑이다¹¹²⁾. 處方을 구성하는 黃精과 枸杞子는 모두 補陰 藥물로서 각각 補脾益氣 潤肺滋陰하고 滋腎養肝 補精氣하는 효능을 가지고 있으므로¹³⁾ 助氣固精 活血駐顏의 효능을 나타낸다^{10,12)}. 腎臟의 陰氣는 一身의 陰液의 根本으로서 濡潤, 滋養作用을 하며, 腎陽과 더불어 生長發育과 生殖을 주관한다¹⁷⁾. 內經 素問¹⁸⁾에 '天壽過度氣脈常通 而腎氣有餘也', 虞¹⁹⁾가 '腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭' 라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였으니, 腎氣虛衰는 老化的 重要 原因이다¹³⁾. 그러므로 二精丸은 고대로부터 노화를 억제하는 효능이 있다고 하였다.

실험 연구에 의하면 黃精은 冠狀動脈 疾患, 高脂血症, 粥狀動脈硬化 등의 心血管系 疾患을 개선하고 고혈당을 강하시키며 병원미생물에 대하여 저항하는 작용을 나타내며²⁰⁾, streptozotocin으로 유도한 당뇨병 흰쥐에서 NOS 활성과 nitrite, 과산화지질 및 glutathione 함량을 정상 수준으로 조절하였다²¹⁾.

枸杞子는 사염화탄소로 유도한 마우스에서 간장내 인지질, 콜레스테롤 함량을 개선시켜 지방간 및 간손상을 억제하였고, choline樣 효과를 나타내어 혈관을 확장하고 혈압을 강하시키는 작용을 나타내었다²²⁾. 또한 간장의 지질 및 체지방의 증가를 억제하고 지방세포의 증식과 분화를 억제하였으며²³⁾, 마우스의 세포성 및 체액성 면역 반응을 증강시키고²⁴⁾, 혈압 강하 작용을 나타내었다²⁵⁾. 활성산소를 소거하고 지질 과산화를 억제하며 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase의 활성을 증가시키는 강한 항산화 작용을 내어 노화 지연작용이 있을 것이라고 보고되어 있다²⁶⁾. 實驗動物의 壽命을 延長시키는 效果가 보고되었다²⁷⁾.

이러한 구성 약물의 기존 연구 보고를 살펴보면 심혈관계에 중요한 역할을 할 가능성이 시사되는데, 심혈관의 노화는 개체 노화의 기본이 되며 노화 조절에도 중요한 역할을 한다. 그래서 본 연구에서는 노화의 원인 물질인 RS를 중심으로 그 생성 억제와 제거능을 검토하였고, 노화 과정에서 많이 알려진 COX-2, NF- κ B pathway를 검토하였다.

RS 중에서도 특히 ONOO⁻는 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{17,28)}. 이와 같이 ONOO⁻는 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다. 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO⁻ 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다²⁸⁾.

二精丸의 구성 약물인 黃精에는 convallamarin, convallarin, kaempferol-glycoside, quercitrin-glycoside,

azetidine-2-carboxylic acid가 함유되어 있고, 枸杞子에는 carotenoid, zeaxanthine, physalinen, betaine, β -sitosterol, cinnamic acid, diterpene sugiol, kukoamine A, rutin 등이 함유되어 있다³⁰⁾. 실제 여러 flavonoid 및 carotenoid 물질들은 ONOO⁻를 효과적으로 제거한다는 많은 보고가 있다³⁰⁾. 이 속에 함유되어 있는 이들 물질들이 ONOO⁻를 제거한 것으로 사료된다. Phenol성 화합물의 ONOO⁻ 소거 작용은 low density lipoprotein (LDL) 산화를 방지하고 만성 심장질환의 발병률을 저하시키므로 phenol성 화합물의 섭취가 심혈관계 질환 발병률과 역의 상관관계가 있음을 시사하였다³¹⁾. 이런 활성은 OH group의 수에 따라 그 활성산소 제거능이 달라지며, 전이금속을 chelating하여 Fenton 반응에 의한 활성산소 형성을 지연한다고 보고하였다³²⁾. 이러한 phenol성 물질의 ONOO⁻ 제거 활성은 二精丸 중의 flavonoid 및 carotenoid 등이 ONOO⁻ 제거 활성에 주로 관여하리라는 것을 시사해 준다.

위에서 본바와 같이 二精丸의 ONOO⁻ 제거 작용에는 枸杞子에 함유된 p-carotene 및 rutin, 黃精에 함유된 quercetin 및 kaempferol 등이 주된 역할을 하리라 추측된다. 이러한 사실은 많은 phenol성 물질들이 ONOO⁻ 제거능을 가진다고 이미 보고되어 있어, 二精丸의 노화 방지 및 노인성 질환 예방과 밀접한 관계가 있을 것으로 예상된다.

t-BHP를 처리한 세포배양계에서 생성이 증가된 RS를 二精丸은 효과적으로 억제하였고, RS 중에서 특히 독성이 가장 강하다고 알려진 ONOO⁻ 생성을 더욱 효과적으로 강력히 억제하였다.

二精丸은 노화과정에서 ROS 및 RNS 생성에 중요한 역할을 하는 노화지표 단백질인 COX-2 단백질의 발현을 억제하였으므로 노화를 억제할 가능성이 있는 처방일 것으로 시사되었다.

그리고 노화쥐에 二精丸을 투여한 군에서 노화 지표 단백질인 NF- κ B, p-ERK, p-p38의 단백질 발현을 관찰한 결과 二精丸이 다양한 외부 자극에 의해서 발현되는 MAPKs의 활성을 막고, IKK pathway를 통해서 I κ B가 분해되는 것을 막아서 NF- κ B가 핵 속으로 이동하지 못하게 하여, COX-2와 같이 NF- κ B를

binding site로 가지는 여러 가지 노화 관련 유전자의 발현을 억제하였다.

이상의 결과로서 二精丸이 MAPKs를 통해서 NF- κ B pathway를 강력히 억제한다는 것을 알았고, 이는 NF- κ B를 binding site로 가지는 여러 가지 노화지표 단백질의 발현을 억제하여 노화 과정에서 일어나는 미세 염증 반응 억제를 가져와 노화 과정을 조절할 수 있을 가능성과 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다.

결론

노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 담당하는 RS, 그리고 RS 중 가장 독성이 강하다고 알려진 ONOO⁻ 제거 활성과, 노화과정에서 증가한다고 알려진 노화지표 단백질 NF- κ B, COX-2, p-ERK, p-p38 단백질의 발현 양상을 검토하였다. 二精丸은 YPEN-1 세포 배양계에서 t-BHP로 유도된 RS 생성을 농도 의존적으로 억제하였고, 특히 ONOO⁻의 생성을 강력하게 억제하였다. 또한 24개월령 쥐에서 二精丸은 노화 과정에서 생성이 증가되는 NF- κ B, COX-2, p-ERK, p-p38의 발현을 억제하였다. 이상의 결과로 二精丸은 RS, 특히 ONOO⁻의 생성을 효과적으로 억제하였고, 노화 및 노인성 질환의 예방 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

참고문헌

1. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:651-68.
2. Harman D. Free radical theory of aging: nutritional implications. *Age* 1978;1:143-50.
3. Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression : NF- κ B activation and I κ B α degradation. *Free Radical Biol Med.* 2000;28:683-92.
3. Ghost S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses.

- Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
4. Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci Lett.* 1997;225:61-4.
 5. 平田結善緒. NO와 NOS. 內分泌, 糖尿病科. 1996;2:207-14.
 6. Haenen GR, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:591-6.
 7. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:164-70.
 8. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW and Yu BP. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology.* 2000;10:207-22.
 9. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 2002:2263.
 10. 王毅, 靳近金, 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京:中國醫藥科技出版社. 1989:31-2.
 11. 廬祥之 編著. 益壽延年二百方. 北京:中國中醫藥出版社. 1991:150.
 12. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧:遼寧科學技術出版社. 1989:53-4, 327-9, 331-4.
 13. 남원기, 정지천. 二精丸의 Peroxynitrite 제거 기전, 대한한방성인병학회지. 2003;9(1):1-10.
 14. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichloro fluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 1983;134:111-6.
 15. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Res. Commun.* 1994;16:149-56.
 16. 金完熙, 崔達永 編著. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:282-4.
 17. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯釋. 上海:上海科學技術出版社. 1983:4-5.
 18. 虞搏. 醫學正傳. 서울:成輔社. 1986:9.
 19. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:998-1000.
 20. 이상현, 신현철, 정지천. 黃精抽出物이 흰쥐의 음경해면체 조직에서 nitric oxide synthase 활성 및 Nitrite 함량에 미치는 영향. 한방성인병학회지. 1999;5(1):163-75.
 21. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1983:501-3, 1964-6.
 22. 김남수, 송용선. 枸杞子抽出液이 白鼠의 肥滿模型에 미치는 影響. 한방재활학회지. 1997;7(2):65-83.
 23. 김영희, 이병렬. 枸杞子分割藥鍼이 마우스의 免疫機能에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1996;13(2):67-86.
 24. 이호섭, 류도근, 윤용갑, 유윤조. 枸杞子煎湯液이 實驗的 腎性高血壓 白鼠의 血壓과 血漿 Renin 活性度 및 ANP 濃度에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1996;17(1):37-47.
 25. Kim HP, Lee EJ, Kim YC, Kim J, Kim HK, Park JH, Kim SY, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from Lycium chinense fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:390-2.
 26. 劉小英. 枸杞的抗衰藥理研究與臨床應用概述, 四川中醫. 1993;7:18-9.
 27. Chung HY, Kim HJ, and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:327-35.
 28. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노연주. 한국유용식물자원 연구총괄. 대전:화학연구소. 1988:576-8.
 29. Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK and Jung HA. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother Res.* 2002;16:232-5.
 30. Neumann HA, Carlsson K and Brom GH. Uptake and localization of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall measured by laser scanning microscopy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;43:423-6.
 31. Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS, No JK and Back BS. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J Agric Food Chem.* 1998;46:4484-6