

## 五味消毒飲의 抗炎效果 및 機轉에 關한 實驗的 研究

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

서윤정, 김송백, 조한백, 최창민, 이순이

### ABSTRACT

#### Anti-inflammatory Effects of *Omisodokeum*

Yun-Jung Seo, Song-Baeg Kim, Han-Baek Cho, Chang-Min Choe, Soon-Yee Lee  
Department of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental  
Medicine, Wonkwang University

**Purpose:** The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of the water extract of *Omisodokeum* (OMSDE) on peritoneal macrophages.

**Methods:** To verify the anti-inflammatory mechanism of OMSDE, the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the phosphorylation of MAPK were examined.

**Results:** The extract of OMSDE suppressed the production of LPS-induced nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and IL-12 in the macrophages. OMSDE inhibited the degradation of inhibitory  $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) and it suppressed the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) but didn't inhibit c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38, indicating that OMSDE may inhibit the pro-inflammatory cytokine production process by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and ERK 1/2. Furthermore, OMSDE inhibited the production of interferon (IFN)- $\beta$  but didn't inhibit of IFN- $\alpha$  in the LPS-stimulated macrophages through the down-regulation of interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-7. The Oral administration of OMSDE inhibited LPS-induced endotoxin shock and the production of TNF- $\alpha$  in serum but didn't inhibit of IL-1 $\beta$  and IL-6.

**Conclusion:** These results suggest that OMSDE may be effective in the prevention and treatment of inflammatory diseases.

**Key Words:** Herbal medicine, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL), interferon (IFN)

“이 논문은 2006년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구됨.”  
“This research was supported by Wonkwang Univ. Research Fund. 2006”

## I. 서 론

五味消毒飲은 《醫宗金鑑 外科心法要訣》<sup>1)</sup>에 최초로 收載된 처방으로, 金銀花, 野菊花, 蒲公英, 紫花地丁, 紫背天葵子로 구성되며, 淸熱解毒 작용이 강하여 熱毒으로 인한 膿腫성 질환의 치료에 사용되고<sup>2)</sup>, 특히 부인과에 있어서는 帶下, 陰瘡, 급성골반염 등의 치료에 사용되어 온 처방이다<sup>3,4)</sup>.

염증은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 선천 면역 계통의 복합적인 반응으로, 감염 장소에 발적 (redness), 발열 (heat), 부종 (swelling), 통증 (pain) 등이 나타난다<sup>5)</sup>. 선천 면역은 대식세포를 활성화하고<sup>6)</sup>, 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)- $1\beta$ , TYPE I interferon (IFN) 등의 cytokine이나 nitric oxide (NO) 등의 염증물질을 다량 분비하여 염증반응에 중요한 역할을 한다<sup>7,8)</sup>.

염증반응은 인체의 주요 방어 작용의 하나로 감염을 통제하고 조직을 복구하는 기능을 수행하기도 하지만, 인체에 해로운 작용도 유발하여 조직 손상과 병을 일으킬 수도 있다<sup>5,9)</sup>.

이에 본 연구자는 淸熱解毒의 효능으

로 膿腫성 질환에 常用되는 五味消毒飲이 급성 염증 반응으로 유도된 cytokine 및 endotoxin shock에 미치는 영향 및 기전을 실험적으로 알아보려고 하였다. 五味消毒飲이 LPS로 활성화된 대식세포에서 NO, TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  등의 생성과 그 생성에 있어 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), interferon regulatory factor (IRF)-1, IRF-7의 기전에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

C57BL/6 6주령 mouse의 암컷을 (주) 오리엔트바이오 (S. Korea 성남 경기도)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 약 재

본 실험의 五味消毒飲은 《醫宗金鑑》의 내용을 근거로 했다. 약재는 원광대학교 본초학 교실에서 구입한 후 정선하여 사용했으며, 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of Omisodokeum (OMSDE)

Scientific name	Herbal name	Amount (g)
<i>Lonicera japonica</i> THUNB.	FLOS LONICERAE(金銀花)	12
<i>Chrysanthemum morifolium</i> RAMAT.	FLOS CHRYSANTHEMI(野菊花)	4.8
<i>Taraxacum mongolicum</i> H. AND NAZZ.	HERBA TARAXACI(蒲公英)	4.8
<i>Viola mandshurica</i> W. BECKER	HERBA VIOLAE(紫花地丁)	4.8
<i>Semiaquilegia adoxoides</i> (DC.) MAKINO	RADIX SEMIAQUILEGIAE(紫背天葵子)	4.8
Total amount		31.2

### 3) 시 약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640 등의 세포 배양용 시약은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사, 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 chloroform, HEPES, sodium dodesyl sulfate (SDS), LPS (Serotype : 055 : B5) 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사, 실험에 사용된 항체인 anti-p38 Ab 등은 Cell signaling (Denvers, USA)사에서 구입하였다. ERK1/2, p38, JNK, Actin 은 Santa Cruze Bio Technology (USA)에서, ELISA에 사용한 Anti-mouse TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 antibodies, 재조합 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 시료의 제조

실험에 사용된 약제는 五味消毒飲 (Table 1) 2첩 분량인 62.4 g을 1 l의 3차 증류수로 2시간 30분 동안 전탕하여 거즈로 여과한 다음 -70°C (Defreezer)에서 12시간 동안 동결시키고, Freezing Dryer로 동결 건조시켜서 3.7 g의 분말을 얻었다. 그 얻어진 분말을 생리식염수로 녹여서 filter (0.2  $\mu$ m syringe filter)로 3회 여과한 후 실험에 사용하였다.

### 2) 복강 대식세포의 배양

Thiogluccolate를 이용하여 염증성 대식세포를 얻기 위하여 2.5 ml의 thiogluccolate를 C57BL/6 mouse의 복강 내에 주사하고, 3일 후에 희생시킨 후 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 7 ml를 복강 내에 주

사하여 잘 흔든 다음, 다시 주사기로 유출했다. 유출된 복강세포는 4°C, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 후 10% FBS가 함유되고 1% penicillin이 보충된 RPMI 1640에 현탁한 다음, cell을 counting해서 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml로 6cm dish나 plate에 분주하여 대식세포가 바닥에 부착되도록 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 3시간 동안 배양하고, 상층액을 버린 후에 dish나 plate에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다.

### 3) 세포 생존율의 측정

대식세포의 생존율은 MTT 분석법<sup>10)</sup>으로 측정했다. 이로써 세포 독성을 확인할 수 있다.

지수성장을 하는 세포들은 RPMI 1640 배지에서 1 $\times$ 10<sup>6</sup> /ml의 밀도로 현탁했고, 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 농도에서 AETD로 처리했다. 4시간 동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위하여 MTT 용액 (0.5 % 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide)을 첨가하고 2시간 동안 배양했다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액 (50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가하여 용해한 다음, 20~24시간 동안 배양하였다. formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정하였다.

### 4) NO의 측정

NO는 NOS 효소에 의해 L-arginine에서 L-citrullin과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 NO<sub>2</sub>, nitrite (NO<sub>2</sub>-), nitrate (NO<sub>3</sub>-)로 변한다. Griess reaction<sup>11)</sup>에 의하여 형성된 보라색의 아조염 (azo dye, -N=N-)의 농도로부터

nitrite의 농도를 측정했다. 즉, 100  $\mu$ l의 그리스 시약(Griess reagent : 0.5%의 Sulfanilamide, 2.5%의 phosphorous acid 및 0.5%의 naphthylethylenamine)을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100  $\mu$ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터 (MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 nitrite의 standard curve로부터 계산하였다.

5) Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12)의 측정

대식세포에五味消毒飲 추출물을 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도로 30분 동안 전 처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 배양 후 pro-inflammatory cytokine의 염증 매개물질을 상층액에서 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)법<sup>12)</sup>으로 정량하였다.

6) Western blot analysis<sup>13)</sup>

대식세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation시킨 후五味消毒飲 추출물(500 mg/ml)로 전 처리 하고 30분 후에 LPS (500 ng/ml)로 자극한 다음 cold PBS로 3회 세척하였다. 시간별 (0, 15, 30, 60 mins)로 cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 5 mins)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. 단백질을 lysis시키고, 원심분리 (15,000 rpm, 20 mins)로 찌꺼기를 침전시킨 후 단백질을 정량하였다. 같은 양의 단백질에 sampling buffer (4 $\times$ )를 같이 넣어 섞은 다음, 그 sample을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 나

서 5% skim milk로 2시간 동안 blocking하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I $\kappa$ B- $\alpha$ 를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

7) Total RNA의 추출

배양한 세포에五味消毒飲 추출물을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집하고 원심분리를 하여 상층부의 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포층에 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100  $\mu$ l의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 그 후 2-propanol과 1 : 1로 섞은 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 남은 침전물에 80% ethanol을 가하여 2회 씻고 건조시킨 후 DEPC 처리한 증류수를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

8) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70°C에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 single strand buffer (1 $\times$ ), 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase을 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, PCR buffer (1 $\times$ ), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 30cycle

반복하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

iNOS (306bp):

TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG  
(forward)

GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG  
(reverse)

TNF- $\alpha$  (276bp):

ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC  
(forward)

TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT  
(reverse)

IL-6 (463bp):

AT CCA GTT GCC TTC TTG GGA  
(forward)

CAT TGG GAA ATT GGG GTA  
GGA AG (reverse)

IL-12 (110bp):

AGG CGA GAC TCT GAG CCA C  
(forward)

CTT CAC ACT TCA GGA AAG TCT  
(reverse)

$\beta$ -ACTIN (514bp):

TGT GAT GGT GGG AAT GGG  
TCA G (forward)

TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC  
C (reverse).

PCR반응이 끝난 후 sampling buffer (1 $\times$ )를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10  $\mu$ 씩을 넣고 전기영동 한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

#### 9) Endotoxin shock의 동물실험

mice를 10마리씩 3개의 그룹으로 나누고 첫 번째는 생리식염수를, 두 번째는 五味消毒飲 추출물 100 mg/kg을, 세 번째는 五味消毒飲 추출물 500 mg/kg을 일주일간 매일 경구투여 하고 3시간 후 복

강에 LPS (50 mg/kg)를 주사하여 그 생존율을 72시간 동안 관찰하였다.

#### 10) In vivo의 실험모델

五味消毒飲 추출물을 mouse 한 그룹에 10마리씩, 마리당 100 mg/kg과 500 mg/kg의 농도로 일주일간 매일 경구투여한 후 치사량의 LPS (50 mg/kg)를 복강내 주사했다. 3시간 뒤에 mouse의 심장에서 혈액을 1 ml 주사기로 뽑아낸 후 2,000 rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하여 상층액 serum만 분리하고 ELISA 방법으로 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6를 정량하였다.

#### 11) Real-time PCR

Real-Time PCR은 앞에 기술한 RNA 추출 방법으로 얻어서 합성한 cDNA를 사용하여 TaqMan 방법으로 확인하였고, 사용한 primer와 probe는 아래와 같다.

Primer :

TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA  
(mHPRT-f),

TGAGAGATCATCTCCACCAATAACTT  
(mHPRT-r):

CCGAAGACCTTATGAAGCTCTTTG  
(mIRF-1-f),

GCAAGTATCCCTTGCCATCG  
(mIRF-1-r):

CTGGAGCCATGGGTATGCA  
(mIRF-7-f),

AAGCACAAGCCGAGACTGCT  
(mIRF-7-r):

CCTGTGTGATGCAGGAACC  
(mIFN- $\alpha$ 4-f),

TCACCTCCCAGGCACTGA  
(mIFN- $\alpha$ 4-r):

ATGAGTGGTGGTTGCAGGC

(mIFN-β-f),  
 TGACCTTTCAAATGCAGTAGATTCA  
 (mIFN-β-r);  
 Probe :  
 FAM-TGGGAGGCCATCACATTGTG  
 GCTAMRA (mHPRT),  
 FAM-CAGTCTGAGTGGCAGCGGAC  
 ACACA-TAMRA (mIRF-1),  
 FAM-CTGGAGGGCGTGCAGCGTGA-  
 TAMRA (mIRF-7),  
 FAM-AGACTCCCTGCTGGCTGTGA  
 GGACA-MGB-NFQ (mIFN-α4),  
 FAM-AAGCATCAGAGGCGGACTCT  
 GGGA-TAMRA (mIFN-β)

### 3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 student's t-test에 준하였고, p-value가 0.05 미만 일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결 과

### 1.五味消毒飲 추출물이 대식세포의 독성에 미치는 영향

mouse의 대식세포에五味消毒飲 추출물을 농도별 (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 전처리하고 MTT 분석법으로 생존율을 측정한 결과五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml에서 각각 98.35±2.40%, 95.42±4.25%, 87.23±3.27%, 67.00±4.56%로 나타나 1.0 mg/ml만 대식세포에 독성을 나타냈다(Fig. 1).

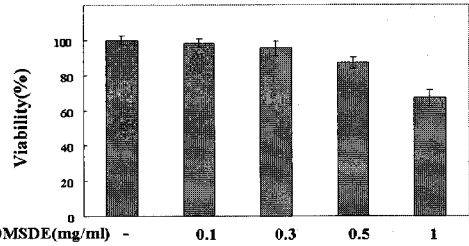


Fig. 1. The effect of OMSDE extract on cytotoxicity in peritoneal macrophages.

### 2.五味消毒飲 추출물이 NO의 생성에 미치는 영향

정상군은 아무런 처치도 하지 않았고, 대조군은 LPS (500 ng/ml)만 처리하였으며, 실험군은五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml를 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 Griess reaction으로 NO의 생성을 측정한 결과, 정상군은 0.82±0.19 ng/ml, 대조군은 38.84±1.66 ng/ml,五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml의 실험군은 각각 33.84±0.56 ng/ml, 8.84±1.30 ng/ml, 3.71±0.51 ng/ml로 나타나 NO 생성은 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml 농도에서 현저하게 감소하였다(Fig. 2A). RT-PCR 방법으로五味消毒飲 추출물이 iNOS mRNA의 발현을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

### 3.五味消毒飲 추출물이 TNF-α의 생성에 미치는 영향

정상군은 대식세포에 아무 처리도 하지 않았고, 대조군은 대식세포에 LPS (500 ng/ml)로 자극하였으며, 실험군은五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml를 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 상태에서 ELISA 방법으로 측정한 결과, 정상군은 0.17±0.01 ng/

ml, 대조군은  $1.52 \pm 0.08$  ng/ml, 五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml의 실험군은 각각  $1.34 \pm 0.08$  ng/ml,  $0.62 \pm 0.05$  ng/ml,  $0.19 \pm 0.05$  ng/ml로 나타나 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 또한, 五味消毒飲 추출물은 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 3B).

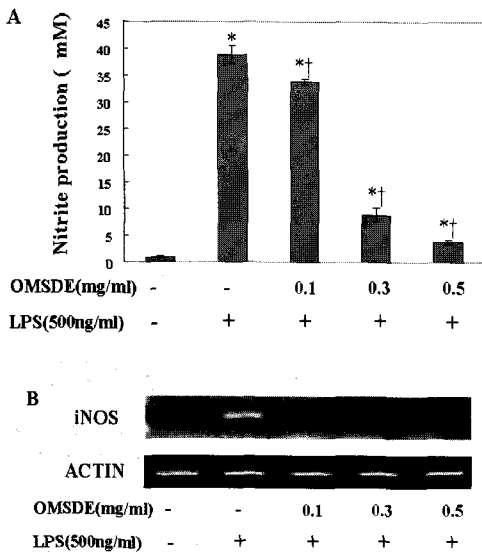


Fig. 2. The effect of OMSDE extract on LPS-induced NO production in peritoneal macrophage.

(\*P < 0.05 : significant as compared to control. † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone)

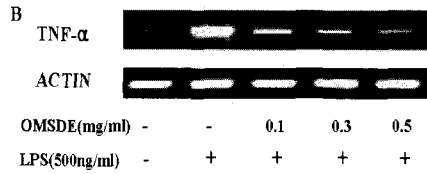
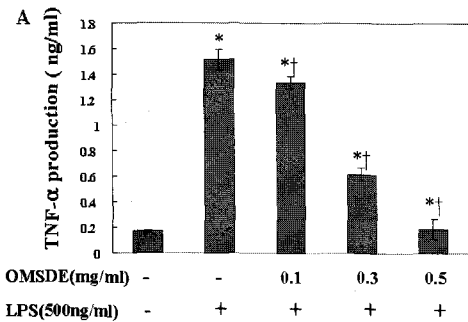


Fig. 3. The effect of OMSDE extract on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in peritoneal macrophages.

#### 4. 五味消毒飲 추출물이 IL-1 $\beta$ 의 생성에 미치는 영향

五味消毒飲 추출물을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군은 0.04 ng/ml, 대조군은  $0.12 \pm 0.01$  ng/ml, 五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml의 실험군은 각각  $0.11 \pm 0.01$  ng/ml,  $0.09 \pm 0.06$  ng/ml,  $0.05 \pm 0.02$  ng/ml로 나타나 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4A). 또한, RT-PCR 방법으로 조사한 결과 五味消毒飲 추출물은 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 4B).

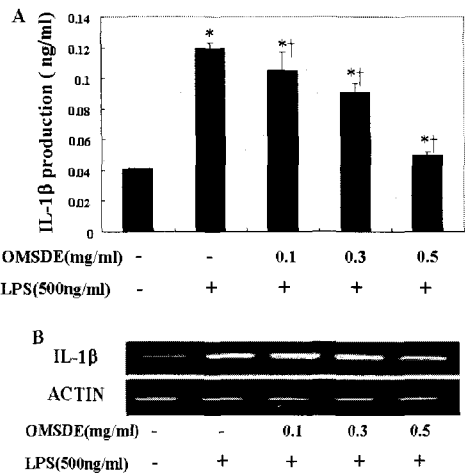


Fig. 4. The effect of OMSDE extract on LPS-induced IL-1 $\beta$  production in peritoneal macrophages.

5. 五味消毒飲 추출물이 IL-6의 생성에 미치는 영향

五味消毒飲 추출물을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군은 0.20 ng/ml, 대조군은 4.50±0.12 ng/ml,五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml의 실험군은 각각 5.20±0.11 ng/ml, 1.20±0.11 ng/ml, 0.45±0.08 ng/ml로 나타나 0.1 mg/ml 농도를 제외하고는 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5A). 또한, RT-PCR 방법으로 조사한 결과五味消毒飲 추출물은 IL-6 mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 5B).

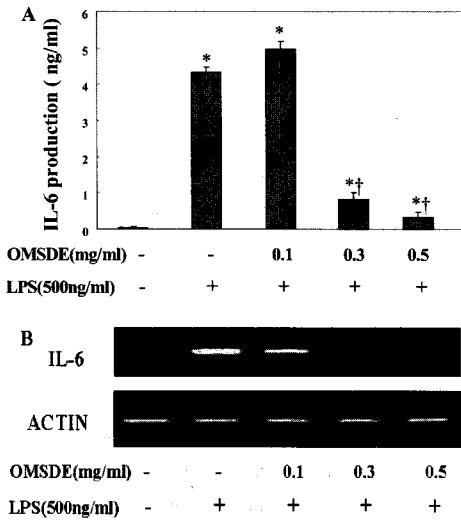


Fig. 5. The effect of OMSDE extract on LPS-induced IL-6 production in peritoneal macrophages.

6.五味消毒飲 추출물이 IL-12의 생성에 미치는 영향

五味消毒飲 추출물을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml)로 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후

ELISA 방법으로 측정된 결과, 정상군은 0.35 ng/ml, 대조군은 23.21±3.01 ng/ml,五味消毒飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml의 실험군은 18.45±1.78 ng/ml, 16.65±3.24 ng/ml, 4.87±0.54 ng/ml로 나타나 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 6A). 또한, RT-PCR 방법으로 조사한 결과五味消毒飲 추출물은 IL-12 mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 6B).

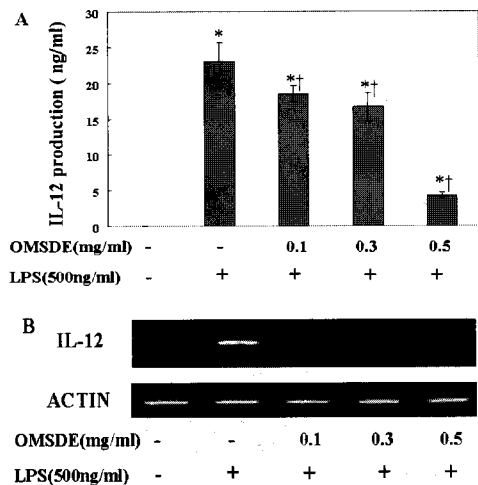


Fig. 6. The effect of OMSDE extract on LPS-induced IL-12 production in peritoneal macrophages.

7.五味消毒飲 추출물이 LPS로 유도된 NF-κB 및 MAPK의 활성화에 미치는 영향

五味消毒飲 추출물이 NF-κB 및 MAPK인 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포에五味消毒飲 추출물(0.5 mg/ml)로 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후, IκB-α 및 ERK 1/2, p38, JNK 1/2를 western blot 분석한 결과,五味消毒飲 추출물은 IκB-α의 degradation을 억제하여 NF-κB의 활성을 억제하고, MAPK에



서는 p38과 JNK 1/2의 인산화를 억제하지 못하였으나 ERK 1/2의 인산화를 억제함을 확인하였다(Fig. 7).

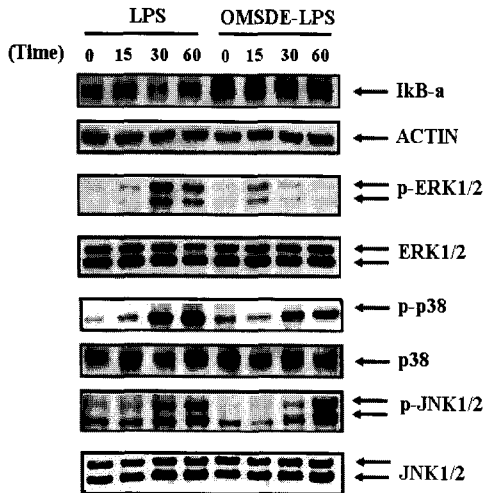


Fig. 7. The effect of OMSDE extract on the expression of IκB-α degradation and MAPK activity in LPS-stimulated peritoneal macrophage cells.

8.五味消毒飲 추출물이 IFN-α와 IFN-β mRNA의 발현에 미치는 영향

대식세포에五味消毒飲 추출물 (0.5 mg/ml)을 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 Real Time-PCR 방법으로 측정한 결과, IFN-α는 0, 0.5, 1, 3, 6, 12시간 후 대조군이 각각 8.84, 18.94, 25.99, 57.77, 56.76, 38.04 fold changes, 실험군이 각각 7.00, 15.08, 19.87, 47.20, 55.47, 31.52 fold changes로, IFN-β는 0, 0.5, 1, 3, 6, 12시간 후 대조군이 각각 0.00, 0.00, 1.69, 0.29, 0.02, 0.02 fold changes, 실험군이 각각 0.00, 0.00, 0.23, 0.03, 0.02, 0.00 fold changes로 나타나서,五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 IFN-α mRNA의 발현을 억제하지 못하였으나, IFN-β mRNA의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 8).

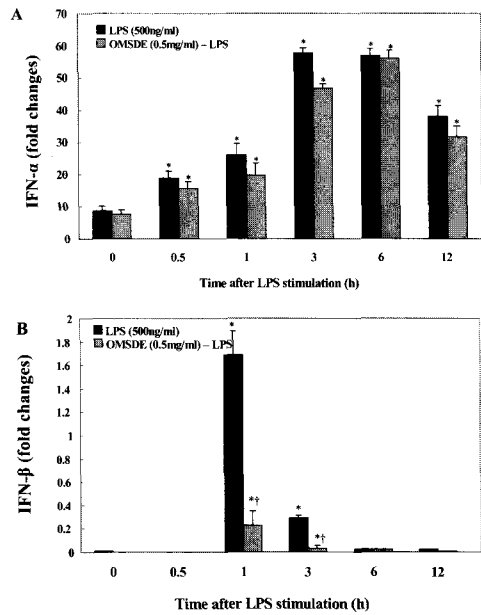


Fig. 8. The effect of OMSDE extract on LPS-induced IFN-α and IFN-β production in peritoneal macrophages.

9.五味消毒飲 추출물이 IRF-1과 IRF-7 mRNA의 발현에 미치는 영향

대식세포에五味消毒飲 추출물 (0.5 mg/ml)을 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 Real-Time PCR 방법으로 IRF-1과 IRF-7 mRNA 발현 정도를 확인한 결과, IRF-1은 0, 0.5, 1, 3, 6, 12시간 후 대조군이 각각 0.00, 0.06, 0.32, 0.68, 0.85, 1.16 fold changes, 실험군이 각각 0.01, 0.05, 0.03, 0.58, 0.02, 0.07 fold changes로, IRF-7은 0, 0.5, 1, 3, 6, 12시간 후 대조군이 각각 0.04, 0.03, 0.03, 1.73, 17.44, 31.52 fold changes, 실험군이 각각 0.00, 0.00, 0.00, 0.00, 0.52, 0.14 fold changes로 나타나서,五味消毒飲 추출물은 IRF-1과 IRF-7 mRNA의 발현을 모두 억제함을 확인하였다(Fig. 9).

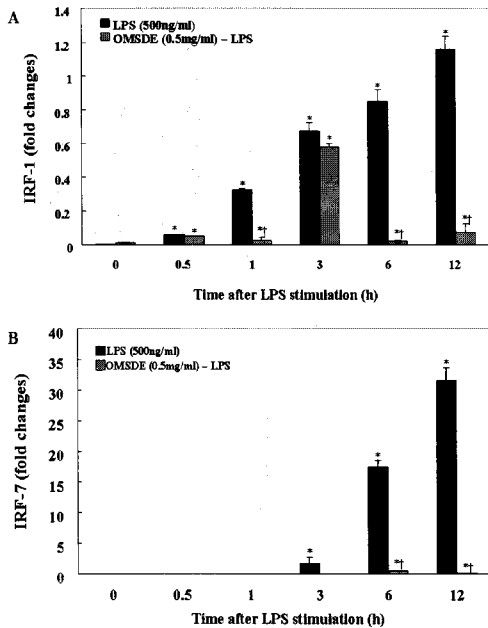


Fig. 9. The effect of OMSDE extract on LPS-induced IRF-1 and IRF-7 production in peritoneal macrophages.

### 10. 五味消毒飲 추출물이 mouse의 생존율에 미치는 영향

五味消毒飲 추출물이 LPS로 유도된 endotoxin shock에서 mouse 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mouse를 세 그룹으로 나누어 첫 번째는 생리식염수를, 두 번째는五味消毒飲 추출물 100 mg/kg을, 세 번째는五味消毒飲 추출물 500 mg/kg을 일주일간 매일 경구투여한 후 일주일째 LPS (50 mg/kg)를 복강주사한 결과 생리식염수만 투여한 그룹에서는 24시간 이후 0%의 생존율을 보였으나,五味消毒飲 추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 그룹에서는 각각 80%, 100%의 생존율을 보였고, 36시간 이후五味消毒飲 추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 그룹의 생존율은 각각 40%, 80%, 48시간 후 생존율은 각각 0%, 40%를 보였다(Fig. 10).

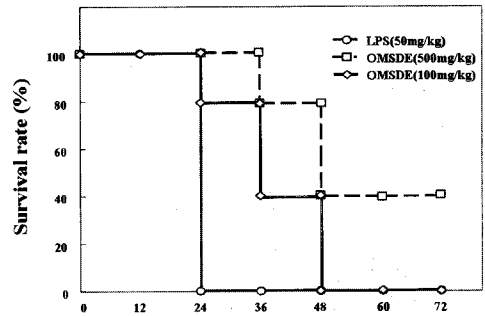


Fig. 10. The effect of OMSDE extract on LPS-induced endotoxin shock in vivo.

### 11. 五味消毒飲 추출물이 혈청 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성에 미치는 영향

정상군은 아무 처리도 하지 않았으며, 대조군은 LPS (50 mg/kg)를 복강 내 주사하였고, 실험군은五味消毒飲 추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg을 일주일간 경구투여하고 LPS (50 mg/kg)를 복강 내 주사한 후 혈청 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6를 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 정상군, 대조군,五味消毒飲 추출물 100 mg/kg과 500 mg/kg의 실험군 순으로 TNF- $\alpha$ 는 각각  $0.04 \pm 0.00$  ng/ml,  $1.99 \pm 0.08$  ng/ml,  $0.71 \pm 0.06$  ng/ml,  $0.73 \pm 0.04$  ng/ml로, IL-1 $\beta$ 는 각각  $0.05 \pm 0.01$  ng/ml,  $0.37 \pm 0.02$  ng/ml,  $0.34 \pm 0.04$  ng/ml,  $0.33 \pm 0.02$  ng/ml로, IL-6는 각각  $0.07 \pm 0.00$  ng/ml,  $31.01 \pm 1.00$  ng/ml,  $30.22 \pm 2.52$  ng/ml,  $41.77 \pm 4.10$  ng/ml로 나타났다. 따라서五味消毒飲 추출물은 in vivo 실험에서 LPS로 유도된 IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제하지 못하나, TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

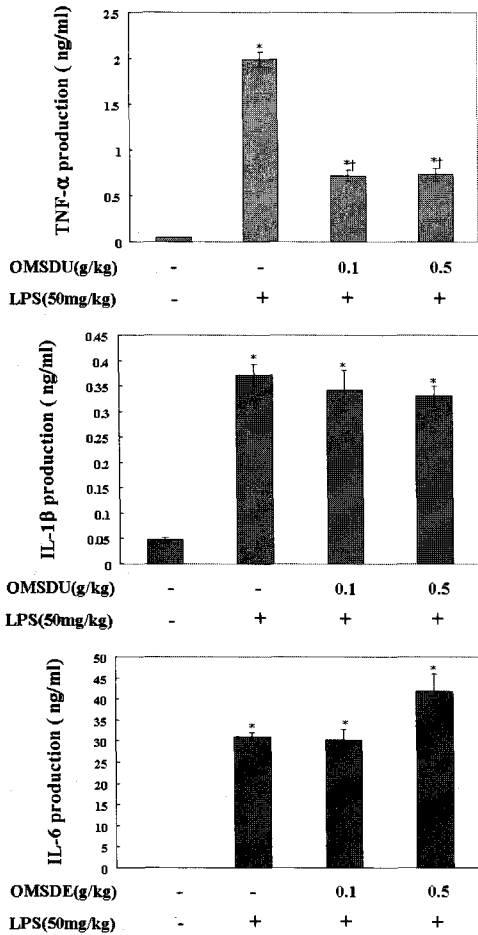


Fig. 11. The effect of OMSDE extract on LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 production in vivo.

#### IV. 고찰

五味消毒飲은 金銀花 3錢, 野菊花, 蒲公英, 紫花地丁, 紫背天葵子 각 1錢2分으로 구성된다<sup>1)</sup>.五味消毒飲은 각 구성 약물이 清熱解毒, 消腫散結, 活血止痛 작용이 강하여<sup>14,15)</sup> 항염, 항균 효과가 있어<sup>16-20)</sup> 급성 골수염, 관절염, 봉와조직염, 폐렴, 외감 발열, 급성 비뇨기계 감염 등의 치료에 이용된다<sup>2,21)</sup>. 특히 부인과에서는 熱毒에 의한 陰腫, 陰挺, 陰瘡, 帶

下, 乳癰, 자궁경부미란, 급성 골반염, 조기 양막파수, 산욕기 감염, 수술 후 감염 등에 응용된다<sup>22-24)</sup>.

감염에 대한 방어로 감염 4일 이내의 초기에는 선천 면역 (innate immunity) 이 주 면역방어 기전이고, 감염 4일 이후에는 적응 면역 (adaptive immunity) 반응이 유도된다<sup>25,26)</sup>. 선천 면역은 대식세포를 활성화하고, cytokine을 생성하며, 염증 상태를 발현하는 역할을 한다<sup>6)</sup>.

대식세포의 염증 유발과 신호전달 경로 연구에 LPS가 많이 이용된다<sup>27)</sup>. LPS는 그람음성균의 세포벽 성분으로, 내독소 (endotoxin)인 지질 A를 포함하고 있어서, 그람음성균이 대식세포에 의해 파괴되면 혈관계로 배출되어 열, 설사, 심하면 endotoxin shock을 일으킨다<sup>28)</sup>. 이러한 LPS와 대식세포의 세포 표면 수용체인 toll like receptor(TLR)-4의 결합은 신호전달 경로를 활성화하여<sup>29)</sup> 대식세포의 핵에 신호를 전달함으로써 cytokine을 합성하고 세포외액으로 분비한다<sup>30)</sup>.

cytokine은 면역 세포에서 분비되는 단백질로, 수용체를 가진 다른 세포들의 행동에 영향을 미치어 세포들 사이에서 신호를 주고받게 한다<sup>30)</sup>. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  등은 선천 면역을 매개하고 조절하는 cytokine으로서 다면 발현성의 효과를 통해 염증 반응에 함께 관여한다<sup>31)</sup>. 대부분의 cytokine은 저농도일 때 autocrine 작용을 하거나 paracrine 작용을 하지만, 고농도일 때는 endocrine 작용을 하여 shock와 같은 전신반응을 유발할 수 있다<sup>32)</sup>.

endotoxin shock는 감염이 혈액으로 파급되어 생기는 전신 염증성 반응 증후군

으로 혈관기능 정지 (vascular collapse), 파종성 혈관내 응고 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 및 대사장애 (metabolic disturbances)를 특징으로 하는데, LPS가 대식세포를 자극하여 cytokine이나 NO를 과잉 분비하게 하기 때문에 일어난다<sup>33)</sup>.

본 연구에서는五味消毒飲이 급성 염증 반응에 미치는 효과를 확인하기 위하여五味消毒飲이 선천 면역에 관여하는 cytokine 및 endotoxin shock에 미치는 영향을 알아보고자,五味消毒飲이 LPS로 활성화된 대식세포에서 NO 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  등의 생성과 그 생성의 기전인 NF- $\kappa$ B와 MAPK 및 IRF-1, IRF-7에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저五味消毒飲 추출물이 대식세포의 독성에 미치는 영향을 조사한 결과,五味消毒飲 추출물 1.0 mg/ml에서는 대식세포의 생존율이 67 $\pm$ 4.56%로 세포독성을 나타내었으나 0.5 mg/ml 이하에서는五味消毒飲 추출물이 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 따라서 이후의 실험은五味消毒飲 추출물 1.0 mg/ml는 제외하였다.

본 연구에서五味消毒飲 추출물이 NO 생성을 억제하였으며(Fig. 2A), iNOS mRNA의 발현을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 2B). 따라서五味消毒飲 추출물은 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 전사 단계에서 iNOS mRNA의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제하여 항염 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

또한,五味消毒飲 추출물은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 생성을 모두 억제하였으며(Fig. 3A-6A), 각 cytokine mRNA

의 발현을 모두 억제하였다(Fig. 3B-6B). 따라서五味消毒飲 추출물은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 mRNA의 발현을 억제하므로 전사 단계에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 생성을 억제하여 항염 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

LPS로 활성화된 대식세포에서 NO와 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12는 LPS와 TLR-4의 결합을 통해 NF- $\kappa$ B가 활성화되고, MAPK가 인산화되면서 생성된다<sup>34-40)</sup>.

본 연구에서五味消毒飲 추출물이 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 생성을 억제하고 각각의 mRNA 발현을 억제하는 것이 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 degradation 억제를 통한 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제와 MAPK 중 ERK 1/2의 인산화 억제를 통해 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

최근 보고에 의하면 대식세포의 LPS에 의한 endotoxin shock에 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 가 관여한다고 알려져 있다<sup>41-44)</sup>. 본 연구에서五味消毒飲 추출물이 IFN- $\alpha$  mRNA의 발현에는 별 영향을 미치지 못 하였으나, IFN- $\beta$  mRNA의 발현은 확연하게 억제하였다 (Fig. 8). 대식세포의 TLR-4가 LPS와 결합하여 전사인자 IRF-1과 IRF-7을 발현시킴으로써 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 를 생성한다<sup>45-47)</sup>.

본 연구에서五味消毒飲 추출물이 LPS로 활성화된 대식세포에서 전사인자 IRF-1과 IRF-7 mRNA의 발현을 억제함으로써 IFN- $\beta$  mRNA의 발현을 억제하는 것으로 사료된다(Fig. 9).

五味消毒飲이 in vivo 실험에서 mouse의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS만 주사한 대조군은 24시간 후에 0% 생존율을 보였고,五味消毒飲 추출

물 100 mg/kg을 전처리한 후 LPS를 주사한 실험군은 48시간 후에 0% 생존율을 보여,五味消毒飲 추출물 100 mg/kg은 endotoxin shock를 지연시키기는 하지만 억제하지는 못하였다. 그러나五味消毒飲 추출물 500 mg/kg은 72시간 후에도 40%의 생존율을 유지함으로써,五味消毒飲 추출물이 LPS에 의한 endotoxin shock에 일부 효과가 있음을 확인하였다 (Fig. 10).

五味消毒飲 추출물이 in vivo 실험에서 mouse의 endotoxin shock를 억제하는 것을 확인한 후,五味消毒飲 추출물이 혈청 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과,五味消毒飲 추출물은 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성에는 영향을 미치지 못하였으나 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하였다 (Fig. 11). 따라서五味消毒飲 추출물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제함으로써 LPS에 의한 endotoxin shock를 억제하는 것으로 사료된다.

결과적으로五味消毒飲 추출물은 NF- $\kappa$ B와 ERK 1/2의 활성을 억제함으로써 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 생성을 억제하고, IRF-1과 IRF-7을 억제하여 IFN- $\beta$ 의 발현을 억제하였다. 또한 in vivo 실험에서五味消毒飲추출물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하고 endotoxin shock를 부분적으로 억제하였다.

이상의 결과를 통해 볼 때,五味消毒飲은 항염 및 endotoxin shock 억제 효과가 있어 급성 염증 질환의 치료에 유효하다고 생각되며, 따라서 본 연구가 부인과 염증성 질환의 치료에五味消毒飲을 응용할 수 있는 실험적 근거를 마련한 것으로 사료된다.

향후五味消毒飲의 독성평가와 혈청

TYPE I IFN 생성에 미치는 영향, 항균효과 등에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는五味消毒飲이 급성 염증 반응에 미치는 영향을 실험하여 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 0.5 mg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았다.
- 2.五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 생성 및 mRNA 발현을 억제하였다.
- 3.五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화와 ERK 1/2의 인산화를 억제하였다.
- 4.五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 IFN- $\beta$  mRNA의 발현을 억제하였다.
- 5.五味消毒飲 추출물은 대식세포에서 LPS에 의한 IRF-1과 IRF-7 mRNA의 발현을 억제하였다.
- 6.五味消毒飲 추출물은 in vivo 실험에서 LPS에 의한 endotoxin shock를 부분적으로 억제하였다.
- 7.五味消毒飲 추출물은 in vivo 실험에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하였다.

이를 바탕으로五味消毒飲은 급성 골반염과 같은 부인과 영역에서 다양한 급성 염증으로 인한 질환의 증상 억제 및

치료에 적극 활용될 수 있을 것으로 사  
료된다.

- 투 고 일 : 2008년 1월 23일
- 심 사 일 : 2008년 1월 28일
- 심사완료일 : 2008년 2월 1일

## 참고문헌

1. 吳謙 등. 御纂醫宗金鑑. 서울: 法人文  
化社. 2006:954-956.
2. 楊蘊祥. 古今名方. 河南省: 河南科學  
技術出版社. 1983:519.
3. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의  
학 I, II. 서울: 정담. 2007: I 282-310,  
316, II 312, 354.
4. 夏桂成. 實用婦科方劑學. 北京: 人民  
衛生出版社. 1997:313-314.
5. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman.  
Basic Immunology: Functions and  
Disorders of the Immune System.  
2nd ed. Seoul: Panmun Books.  
2005:1-39, 263-289.
6. Peter Parham. The immune system.  
2nd ed. Seoul: Lifescience Publishing  
Co.. 2006: 1-33, 223-273.
7. Rietschel ET. et al. Bacterial endotoxin:  
molecular relationships of structure to  
activity and function. FASEB J.  
1994;8(2):217-225.
8. Galdiero F. et al. Release of cytokines  
induced by Salmonella typhimurium  
porins. Infect Immun. 1993;61(1)  
:155-161.
9. 서울대학교 의과대학 미생물학교실.  
핵심 병원미생물학. 서울: 서울대학  
교출판부. 2006: 11-30, 65-163.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay  
for cellular growth and survival:  
application to proliferation and  
cytotoxicity assays. J Immunol  
Methods. 1983;65:55-63.
11. Schmidt, HHW, Kelm M. Determination  
of nitrite and nitrate by the Griess  
reaction. In: Methods in Nitric  
Oxide Research, edited by Freilisch  
M, and Stamler J. Chichester, UK:  
Wiley. 1996:491-497.
12. Bergsdorf N, Nilsson T, Wallen P.  
An enzyme linked immunosorbent  
assay for determination of tissue  
plasminogen activator applied to  
patients with thromboembolic  
disease. Thromb Haemos. 1983;  
50(3):740-744.
13. Burnette WN. "Western blotting":  
electrophoretic transfer of proteins  
from sodium dodecyl sulfate-  
polyacrylamide gels to unmodified  
nitrocellulose and radiographic  
detection with antibody and  
radioiodinated protein A. Anal  
Biochem. 1981;112(2):195-203.
14. 許浚. 原本 東醫寶鑑. 6판. 서울: 南  
山堂. 2001:533-556.
15. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학.  
서울: 영림사. 2000:343, 411, 439,  
445, 577.
16. 신재용. 金銀花 煎湯 熟成度에 따른  
抑菌作用에 關한 實驗研究. 대한한의  
학회지. 1983;4(2):32-38.
17. 김종운. 菊花와 野菊의 效能에 關한  
比較 研究. 경희대학교 대학원 한의

- 학과 본초학 교실 석사학위논문. 1984.
18. 김석근. 浦公英 水抽出物이 鎮痛 抗炎作用에 미치는 影響. 한의학회지. 1992;13(1):152-161.
  19. 고운채. 紫花地丁의 鎮痛·消炎에 관한 實驗的 研究. 본초학회지. 1987; 2(1):17-24.
  20. 박성규. 紫花地丁 種類의 效能에 關한 比較 研究. 본초학회지. 1991; 6(1):77-83.
  21. 俞小平, 黃志傑. 中國古方新用. 北京: 科學技術文獻出版社., 2000:237-247.
  22. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 北京: 人民衛生出版社. 1994:369, 564.
  23. 陣茂仁, 張俊龍. 中西醫結合專科病診療大系 婦產科病學. 山西省: 山西科學技術出版社. 1999:63-68.
  24. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1997:263-265.
  25. 김세중. 면역학 길라잡이. 서울: 고려의학. 2000:1-13, 65-68, 89-90.
  26. Richard A. et al. Kuby immunology. 5th ed. Seoul: World Science Co.. 2006:1-62, 315-339, 385-409.
  27. J.H.L. Playfair, B.M. Chain. Immunology at a Glance. 8th ed. Seoul: E\*PUBLIC. 2006: 10-11, 20-21, 54, 60-61.
  28. 김장수 역. 알기 쉽게 이해하는 임상 미생물학. 서울: 도서출판 대한의학서적. 2003: 3-17.
  29. Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. J Leukoc Biol 1996;60(1):8-26.
  30. Janeway, Charles A. Immunology. 6th ed. Seoul: Lifescience Publishing Co., 2005: 37-103, 214-256, 434-489.
  31. 임병우, 최동국, 석경호. 기초 면역학. 서울: 도서출판 효일. 2006: 189-235.
  32. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. J R Coll Surg Edinb 2000;45(3):178-82.
  33. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. Proc Soc Exp Biol Med. 1995;210(2):93-101.
  34. Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(22):10945-10949.
  35. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem. 1992;59(3):897-905.
  36. Kang JL, Lee K, Castranova V. Nitric oxide up-regulates DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants. Mol Cell Biochem. 2000; 215(1-2):1-9.
  37. Lee BG et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264. 7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol. 2000; 406(3):301-309.
  38. Seo WG et al. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of

- nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35(1):21-28.
39. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol.* 2000;164(11):5564-5574.
40. Cho SY et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem.* 2003;243(1-2):153-160.
41. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(4):419-424.
42. Toshchakov V. et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* 2002;3(4):392-398.
43. Sing A. et al. Bacterial induction of beta interferon in mice is a function of the lipopolysaccharide component. *Infect Immun.* 2000;68(3):1600-1607.
44. Deonarain R et al. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. *J Virol.* 2000;74(7):3404-3409.
45. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998;17(22):6660-6669.
46. Sato M et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity.* 2000;13(4):539-548.
47. Taniguchi T et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:623-655.