

解毒四物湯의 抗炎效果 및 免疫反應에 關한 研究

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

김양호, 조한백

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effects of Haedoksamultang in RAW 264.7 cells

Yang-Ho Kim, Han-Baek Cho

Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose: This study was performed to determine anti-inflammatory effects of Haedoksamultang.

Methods: In this study, I examined the effects of Haedoksamultang on the production of nitric oxide(NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β) as well as the expression of inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), TNF- α , and IL-1 β in RAW 264.7 cells. Haedoksamultang inhibited LPS-stimulated NO production. Western blotting and RT-PCR analysis showed that Haedoksamultang suppressed LPS-induced iNOS and COX-2 protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. Haedoksamultang also suppressed the expression and production of LPS-stimulated TNF- α and IL-1 β in RAW 264.7 cells. Haedoksamultang inhibited NF- κ B activation in LPS-treated RAW 264.7 cells. Moreover, this compound blocked I κ B- α phosphorylation and nuclear translocation of the cytosolic NF- κ B p65 subunit, which highly correlated with the production and expression of inflammatory mediators.

Results: Haedoksamultang suppresses that inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B activation.

Conclusion: These results suggest that Haedoksamultang may be beneficial for treating inflammatory disease.

Key Words: herbal medicine, anti-inflammatory effect, NO, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B

I. 緒 論

解毒四物湯은 朱¹⁾의 《丹溪心法附餘》에 “治婦人經脈不住，惑如豆汁，五色相雜，面色痿黃，臍腹刺痛，寒熱往來，崩漏不止.”라고 하여 최초로 기재된 이래 부인의 帶下 및 崩漏의 치료에 사용되어 온 처방으로 黃柏 黃連 黃芩 梔子 當歸 川芎 白芍藥 熟地黃으로 구성되어 있다.

대하는 “縱帶脈以下”의 뜻으로 여성성기의 분비물을 충칭한다. 生理的인 성기 분비물은 성기내벽을 항상 습윤시키기는 하나 외음부까지 유출될 정도로 양이 많지 않다. 만약 그 양이 증가하여 외음부까지 유출하고 色과 質에 이상이 나타나며 악취, 국부의 瘙癢感과 灼熱感, 疼痛 및 小腹脹痛 등이 함께 나타나면 병리적인 대하로서 성기에 염증이 있음을 의미하며 일반적으로 대하는 병리적인 대하를 의미한다²⁾. 이는 전신 또는 국부의 특정한 병인 등에 의해 생식기관이 충혈되고 병적 분비물이 증가하는 것으로 세균이나 원충, 곰팡이균 등의 침입으로 생식기관이 감염되어 나타나는 경우가 많다³⁾.

최근 한약의 항염효과에 대하여 많은

연구가 진행되고 있다. 항염증작용에 대한 실험적 연구로 崔⁴⁻⁷⁾ 등의 연구가 있으나 여성의 생식기 염증성 질환인 대하의 치료에 사용된 解毒四物湯에 관한 연구는 접해본 바가 없었다.

이에 저자는 解毒四物湯이 RAW 264.7세포에서 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)의 生成뿐만 아니라 inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase(COX-2), TNF- α , IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 기전을 알아보기 위해 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 材

이 실험에서 사용된 약제는 (주)유니허브닷컴에서 구입한 것을 精選하여 사용하였으며, 처방내용은 朱震亨의 《丹溪心法附餘》¹⁾에 준하였고, 한 貼의 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Haedoksamultang(HST)

Herbal Name	Scientific Name	Dose(g)
黃 柏	<i>CORTEX PHELLODENDRI</i>	4
黃 連	<i>RHIZOMA COPTIDIS</i>	4
黃 芩	<i>RADIX SCUTELLARIAE</i>	4
梔 子	<i>FRUCTUS GARDENIAE</i>	4
當 歸	<i>RADIX ANGELICAE SINENS</i>	4
川 芎	<i>RHIZOMA CHUANXIONG</i>	4
白芍藥	<i>RADIX PAEONIAE ALBA</i>	4
熟地黃	<i>RADIX REHMANNIAE PREPARATA</i>	4
Total amount		32

2) 試 藥

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicilin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용한 항체인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B p65, I κ B- α 는 Santa Cruze(Santa Cruze Biotechnology, USA)사에서 구입하였다. LPS, MTT는 Sigma(USA)사에서 구입하여 사용하였다.

3) 검액의 제조

解毒四物湯 3貼 分量 96g을 증류수 1,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 4시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압, 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 건조액기스 15g을 제조하였다.

2. 方 法⁸⁾

1) 細胞培養

대식세포인 RAW264.7세포는 ATCC에서 구입하여, 5% CO₂/95% air 배양기에서 열에 의해서 비활성된 10% fetal bovine serum가 포함된 RPMI 1640 배양액으로 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

2) 細胞生存能力 測定

세포생존능력은 MTT분석방법을 이용하여 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 분석기로 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 50 μ L의 MTT 반응용액(0.05g MTT/50mL PBS)을 각 실험군에 처리한 다음 4시간 동안 배양하고, 반응하지 않은 MTT 용액을 버리고 생존세포에 의한 MTT반응결과로 생성된 formazan을 DMSO로 용해하여 세포생존율을 간

접적으로 계산하였다.

3) NO의 測定

NO는 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 24well plate에 RAW264.7 세포를 분주하고 96well plate에 실험목적에 따라 배양된 세포의 배양액 100 μ L를 동일 부피의 Griess 시약과 혼합한 다음 실온에서 10분 동안 반응시키고 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

4) TNF- α 및 IL-1 β 分泌量 測定

RAW264.7 세포를 LPS로 자극하여 분비된 TNF- α 및 IL-1 β 量은 상용되는 「TNF- α assay kit」(R&D System) 및 「IL-1 β assay kit」(R&D system)를 사용하여 제조자가 제공하는 protocol에 따라서 측정하였다.

5) mRNA 抽出

mRNA는 세포를 PBS로 세 번 세척한 후에 TRIzol(TM) (Molecular Research Center) 시약과 제조자가 제공하는 protocol에 따라 분리하였다.

6) RT-PCR(Reverse Transcription-PCR) 分析

1mM dNTPs, 1.75U/ μ L RNase 억제 효소, 2.5U/ μ L의 M-MLV 역전사 효소(Promega社), 25U/ μ L의 올리고(dT) 프라이머, 추출된 25ng RNA, 5mM MgCl₂ 및 PCR 완충액(5mM KCl; 10mM Tris-HCl pH 8.3)을 함유하고, 전체 20 μ L을 갖는 역전사 반응 혼합액을 제조하였다. 이후, 제조된 역전사 반응 혼합액은 상온에서 10분 동안 배양한 후 thermal cycler를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. 역전사 반응조건은 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 80 $^{\circ}$ C에서 3분으로 한다. 일차 cDNA을 생성한 후 반응 튜브는 얼음에

5분 동안 방치한 후 PCR 반응에 이용하였다. PCR반응용액은 1U의 AmpliTag™ DNA 폴리머라아제 (Promega社), 센스 프라이머와 안티센스 프라이머 5μg/μl, 역전사 반응용액 20μL, 2mM MgCl₂ 및 PCR 완충액, 최종 30μl를 함유한다. PCR 반응은 GeneAmp PCR 시스템 (Perkin Elmer 社)을 이용하여 수행하며, PCR 반응조건은 94℃에서 변성 (denaturation) 30초, 60℃에서 어닐링 (annealing) 30초 및 75℃에서 확장 (extension) 45초로 하였다. iNOS 및 COX-2 cDNA에 대해서는 35사이클 수행하였으며, β-actin에 대해서는 25사이클 수행하였다. 10μl의 RT-PCR 반응산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동 후에 에티디움 브로마이드로 염색하고, UV를 이용하여 핵산증폭을 확인한다. RT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 하기와 같고 모두 바이오니아사에서 합성을 의뢰하여 구입하였다.

iNOS (sense) : 5'-GGCCTTGGCTC CAGCATGTAC-3'

iNOS (antisense) : 5'-GCTGCCGCT CTCATCCAGAAC-3'

COX-2 (sense) : 5'-ACACTCTATC ACTGGCATCC-3'

COX-2 (antisense) : 5'-GAAGGGAC ACCCTTTCACAT-3'

β-actin (sense) : 5'-CCTTCTACAA TGAGC-3'

β-actin (antisense) : 5'-ACGTCACA CTTCATG-3'

7) Western blot 분석

Western blot 분석을 다음과 같이 수행하였다. 세포를 protease inhibitor 혼합물(0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride,

5mg/ml aprotinin, 5mg/ml pepstatin A 및 1mg/ml chymostatin)이 포함된 20mM Tris HCl buffer (pH 7.4)로 용혈시켰다. Lowry protein assay kit (P5626, Sigma)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질 시료를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 분리하고 Hybond enhanced chemiluminescence(ECL) nitrocellulose membrane(Amersham)으로 전이하였다. Membrane을 5% skim milk로 blocking 하고 primary antibody 및 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody 를 결합시킨 다음 표식하여 목적하는 단백질의 발현 여부를 판정하였다.

8) 핵 추출액

25mM Tris-HCl, 5mM EGTA, 2mM EDTA, 100mM NaF, 0.02mM leupeptin, 0.01mM E64, 0.12mM pepstatin, 0.2mM PMSF 및 5mM DTT로 조성된 완충액을 이용하여 세포를 파괴하고, 14,000rpm로 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 핵추출은 10mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCL, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1.5mM MgCl₂, 1mM DTT, 10μg/ml leupeptin, 4mM Pefabloc SC, 50mM NaF 및 Na₃VO₄가 함유된 완충액 1mL을 처리하고, 10% Nonidet P-40 62.5μl을 처리한 다음 10초간 균질하게 혼합하고, 30분 동안 얼음에 방치하였다. 4℃에서 10분 동안 5,000rpm으로 원심분리하여 핵 침전물을 수집하였다. 20mM HEPES(pH 7.9), 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1.5mM MgCl₂, 20%(w/v) 글리세롤, 1mM DTT, 10μg/ml leupeptin, 10μg/ml aprotinin,

4mM Pefabloc SC, 50mM NaF 및 Na3VO4가 함유된 완충액 150 μ l을 분리된 핵 침전물에 처리시킨 후, 30분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 방치하였다. 그런 다음, 15,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다.

9) EMSA(Electrophoretic Mobility Shift assay)

NF- κ B 활성도 측정은 핵 추출액을 이용하는 EMSA(Electrophoretic Mobility Shift assay)방법을 사용하였다. 簡記하면, 10 μ g의 핵추출물을 NF- κ B-specific 32P-labeled oligonucleotide와 함께 배양하였다. 결합반응은 2 μ g poly(dI-dC), 2mg BSA, 20mM HEPES(pH 7.5), 50mM KCl, 1mM DDT, 2.5mM MgCl2, 4% Ficoll과 3000-6000cpm을 갖는 random primer-labeled oligonucleotide를 함유한 20 μ l로 반응을 수행하였다. 실온에서 20분간 방치한 후에 시료는 4% non-denaturing polyacrylamide gel에 loading하고 0.5x TBE 완충용액으로 running하여 전기영동 후에 gel을 건조하여 x-ray 필름에 노출시켰다.

10) 統計處理

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

III. 結 果

1. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞의 生存率에 미치는 影響

解毒四物湯 추출물의 세포독성에 대해 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 解毒四物湯 추출물을 다양한 농도(0.1mg/

ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 1mg/ml)로 처리하고 24시간 후에 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과 解毒四物湯 추출물은 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으나, 1mg/ml 농도에서는 세포생존율이 약 85%로 약간의 세포독성을 보였다(Fig. 1).

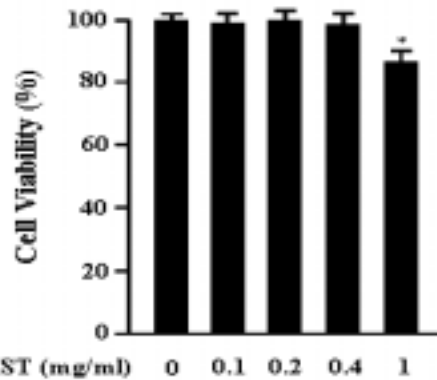


Fig. 1. Effect of Headoksamultang on the viability of RAW 264.7 cells.

The cells were incubated for 24hrs with medium or Headoksamultang (0.1 - 1 mg/ml). The cell viability was determined by MTT assay. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments. *, p < 0.05 compared with control.

2. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해 誘導되는 NO 生成 抑制 效果 및 iNOS와 COX-2의 蛋白質 發現 억제효과

解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 정상군은 RAW 264.7 세포에 아무런 처지도 하지 않았고, 대조군은 LPS(1 μ g/ml)로 자극하였으며 실험군은 解毒四物湯 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml)로 전처리하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극하여 24시간 후에 NO의 농도를 측정하였다.

그 결과 NO의 농도는 정상군은 22.5 μ M, 대조군은 1.23 μ M, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4 mg/ml 농도의 실험군은 각각 14.0 μ M, 11.2 μ M, 4.8 μ M 로 나타나 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 2).

또한 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 억제할 수 있는지 알아보기 위해서 RAW 264.7 세포에 LPS(1 μ g/ml)로 자극한 군과 解毒四物湯 추출물을 60분간 전처리 하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극한 군으로 나누어 18시간 후에 Western blot으로 분석하였다. 실험결과 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의해 발현이 유도된 iNOS 및 COX-2 단백질을 농도 의존적으로 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

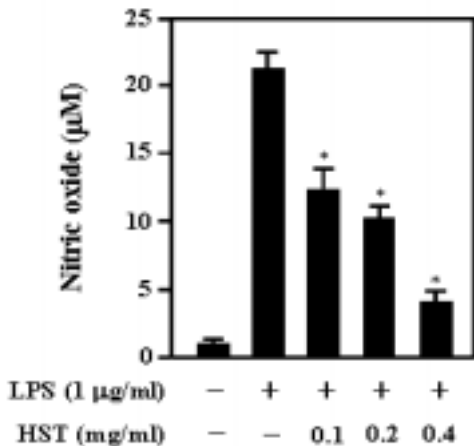


Fig. 2. Effect of Haedoksamultang(HST) on NO production in RAW 264.7 cells. Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60min, and then incubated with or without LPS(1 μ g/ml) for 24hrs. The amount of NO in the supernatant from each treatment group was measured using Griess reagent. Each bar

represents mean \pm SD of three independent experiments. *, p < 0.05 compared with LPS.

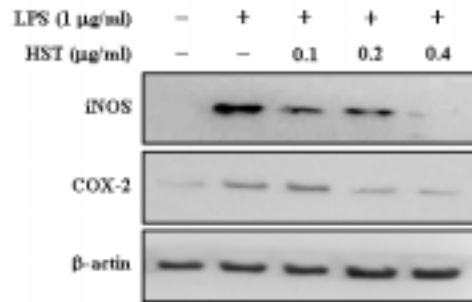


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 cells.

Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60mins, and then incubated with or without LPS(1 μ g/ml) for 18hrs. Total cellular proteins were isolated from cells treated with HST and Western blot analysis was performed using specific antibodies for iNOS, COX-2, and β -actin. This experiment was repeated three times with similar observation.

3. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해 誘導되는 iNOS 와 COX-2의 mRNA 發現에 미치는 影響

解毒四物湯추출물이 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 억제하였기 때문에, 본 실험에서는 NO의 생성 감소가 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 억제하여 야기 되는지 알아보았다. 정상군은 RAW 264.7 세포에 아무런 처치도 하지 않았고, 대조군은 LPS(1 μ g/ml)로 자극하였으며, 실험군은 解毒四物湯 추출물을 60분간 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml)로 전처리하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극하여 12시간 후에 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 그 결과 解毒四物湯이 LPS에 의해 발현이 유도된 iNOS 및 COX-2 mRNA를 억제하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

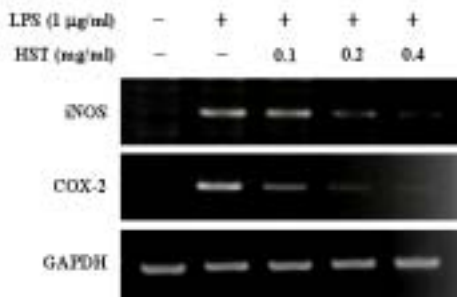


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 gene expression in RAW 264.7 cells.

Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60mins, and then incubated with or without LPS(1 μ g/ml) for 12hrs. Total RNA was isolated and 2 μ g of the total RNA was reverse transcribed to make cDNA and amplified using gene specific primers for iNOS, COX-2, and β -actin. This experiment was repeated three times with similar observation.

4. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해 誘導되는 TNF- α 生成에 미치는 影響

解毒四物湯 추출물이 TNF- α 生成에 미치는 영향을 알아보았다. RAW 264.7 세포에 解毒四物湯 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml)로 전처리하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극하여 24시간 후에 TNF- α 의 생성을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 정상군은 1.7ng/ml, 대조군은 0.1ng/ml, 그리고 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml 농도의 실험군은 각각 1.45ng/ml, 1.3ng/ml, 0.7ng/ml 로 나타나 解毒四物湯 추출물은 LPS에 의한 TNF- α 의 생성을 억제하였다(Fig. 5).

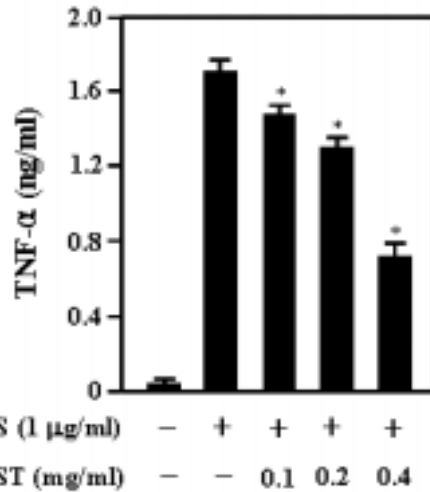


Fig. 5. HST inhibits the production of inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60mins, and then incubated with or without LPS(1 μ g/ml) for 24hrs.. The levels of TNF- α was determined in the culture media using ELISA kits. Each bar represents mean \pm SD of three independent experiments. *, p < 0.05 compared with LPS.

5. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해 誘導되는 IL-1 β 生成에 미치는 影響

解毒四物湯 추출물이 IL-1 β 生成에 미치는 영향을 알아보았다. RAW 264.7 세포에 解毒四物湯 추출물을 다양한 농도(0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml)로 전처리하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극하여 24시간 후에 IL-1 β 의 생성을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 정상군은 92.5pg/ml, 대조군은 9.8pg/ml, 그리고 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml 농도의 실험군은 각각 59.9pg/ml, 43.0pg/ml, 19.8pg/ml 로 나타나 解毒四物湯 추출물은 LPS에 의한 IL-1 β 의 생성을 억제하였다(Fig. 6).

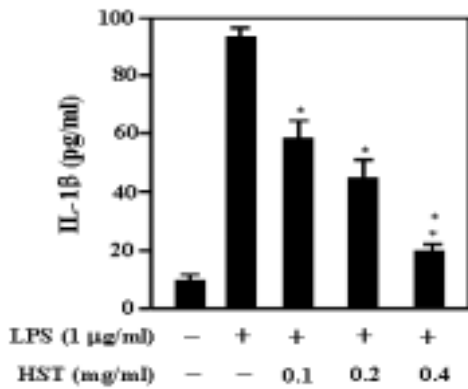


Fig. 6. HST inhibits the production of inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60mins, and then incubated with or without LPS(1μg/ml) for 24hrs.. The levels of IL-1β was determined in the culture media using ELISA kits. Each bar represents mean±SD of three independent experiments. *, p < 0.05 compared with LPS.

6. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해誘導되는 TNF-α 및 IL-1β의蛋白質發現에 미치는影響

解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 TNF-α 및 IL-1β의 단백질 발현을 억제하여 야기되는지 알아보기 위해서 RAW 264.7 세포에 LPS(1μg/ml)로 자극한 군과 解毒四物湯 추출물을 60분간 전처리하고 LPS(1μg/ml)로 자극한 군으로 나누어 18시간 후에 Western blot을 수행하여 분석하였다. 실험결과 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의해 발현이 유도된 TNF-α 및 IL-1β 단백질을 농도 의존적으로 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

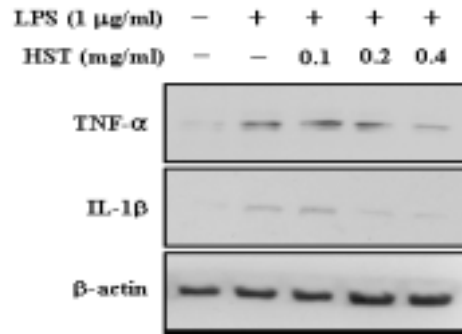


Fig. 7. Inhibition of LPS-induced inflammatory protein expression in RAW264.7 cells. Cell were pretreated with or without HST extract at indicated concentration for 60mins, and then incubated with or without LPS(1μg/ml) for 18hrs. Total cellular proteins were isolated from cells treated with HST and Western blot analysis was performed using specific antibodies for TNF-α, IL-1β, and β-actin. This experiment was repeated three times with similar observation.

7. 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 細胞에서 LPS에 의해誘導되는 NF-κB의 활성화에 미치는影響

解毒四物湯 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 발현 억제가 NF-κB의 활성화와 관련이 있는지 알아보았다. RAW 264.7 세포에 LPS(1μg/ml) 혹은 解毒四物湯(0.4mg/ml)과 LPS를 처리하고 12 시간 동안 배양한 후 EMSA를 수행하였다. 그 결과 LPS를 처리한 군은 NF-κB DNA binding 활성이 증가하였다. 반면에 解毒四物湯 추출물을 처리한 군은 LPS에 의해 증가된 NF-κB DNA binding 활성이 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 8). DNA와 NF-κB간의 binding 특이성은 unlabelled oligonucleotide (cold probe)와 NF-κB p65 항체를 이용하여 입증하였다.

또한 NF-κB의 활성화는 NF-κB p65 단위가 세포질에서 핵으로 이동하기 때문

에 증가한다고 알려져 있다. 따라서 解毒四物湯 추출물이 LPS가 NF- κ B p65 단위를 세포질에서 핵으로 이동시키는 것을 억제하는지 Western blot으로 확인하였다. 그 결과 대조군의 세포질에서는 NF- κ B p65가 감소되었고, 핵에서는 NF- κ B p65가 증가되었으며, 解毒四物湯 추출물을 처리한 실험군의 세포질에서는 NF- κ B p65가 감소가 억제되었고, 핵에서는 NF- κ B p65가 증가가 억제되었다(Fig. 9A).

NF- κ B p65가 핵으로 이동되기 위해서는 I κ B- α 의 인산화가 일어나야 한다. 그러므로 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화를 억제하는지 실험하였다. RAW 264.7 세포에 LPS(1 μ g/ml)로 자극한 군과 解毒四物湯 추출물을 60분간 전처리하고 LPS(1 μ g/ml)로 자극한 군으로 나누어 20분 후에 Western blot으로 분석하여 I κ B- α 의 인산화를 확인하였다. 解

毒四物湯 추출물은 LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화를 현저히 억제하였다(Fig. 9B).

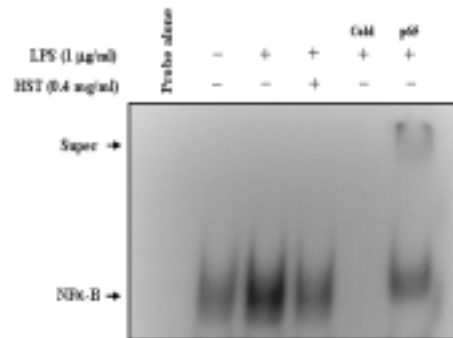


Fig. 8. Effects of HST on LPS-induced NF- κ B activation in RAW264.7 cells. The cells prepared after 2hrs of treatment with LPS(1 μ g/ml) either alone or with HST(0.4mg/ml). Six micrograms of nuclear protein was used in the DNA binding assay, and the total binding reaction was resolved in 5% nondenaturing polyacrylamide gel. This experiment was repeated three times with similar observation.

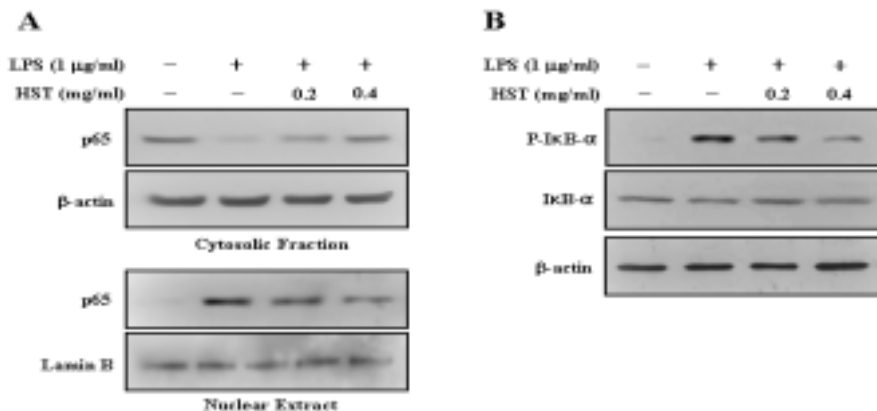


Fig. 9. HST blocks LPS-induced translocation of NF- κ B p65 and phosphorylation of I κ B- α in RAW264.7 cells.

(A) The cells were treated with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of HST(0.2 and 0.4mg/ml) for 2hrs, and cytosolic and nuclear fraction were prepared.

(B) The cells were stimulated with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of HST(0.2 and 0.4 mg/ml) for 20 mins. Total cellular proteins were isolated from cells and Western blot analysis was performed using specific antibodies. This experiment was repeated three times with similar observation.

IV. 考 察

대하는 출혈 이외의 질 분비에 적용되는 말로서, 분비물의 양이 지나치거나 생식내강의 어느 부위에 병적인 상황이 진행되어 생기는 이상삼출물을 지칭한다. 자궁경부, 질, 난관 등의 감염으로 인한 경우가 많으며, 부인과적 증상 가운데서 가장 흔한 염증성 질환이다⁹⁾.

대하의 가장 흔한 원인은 질염으로, 원인에 있어서 생식연령층은 *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Haemophilus Vaginalis* 와 *Herpes Virus* 등에 의한 감염이, 사춘기 전이나 폐경기 이후의 질염은 질점막층이 얇기 때문에 임균, 기타 비특이성 병원균에 의한 감염이 많다. 질강내 산도가 낮으면 세균이나 트리코모나스 질염이 잘 발생하며, 산도가 높으면 진균 감염이 잘 온다. 따라서 한 가지 질염을 치료하면 그 결과로 다른 질염이 속발하는 경우도 있을 수 있다. 또한 세균성 질염을 치료하기 위하여 항생제를 장기간 사용하면 질내 정상균총이 살균되어 유산생성을 못하게 되므로 질산도가 낮아지고 트리코모나스 질염이나 진균성 질염이 쉽게 발생한다¹⁰⁾.

또한 자궁경관의 분비선에는 질염의 원인이 되는 세균이 서식하는 경우가 많기 때문에 국소 약물 치료로는 원인균을 완전히 퇴치하지 못하므로, 질염의 국소 치료는 치료에 다소 도움이 될지라도 근치 요법이 될 수는 없다¹⁰⁾. 그러므로 내성 발생, 재발, 만성화에 대한 효과적인 여성 생식기 염증성 질환의 치료제 개발이 요구되고 있다.

대하병에는 두 가지 뜻이 내포되어 있

다. 첫째는 廣義로 부인의 月經病, 妊娠病, 産後病 등을 가르키는 것이고, 둘째는 狹義의 의미로서 膈道에서 白·黃·靑·黑·赤白混合 등의 汚濁하고 고약한 냄새를 풍기는 액체의 유출이 있는 것을 말하는데, 보통 대하라 함은 보통 狹義의 대하를 지칭하는 것이다¹¹⁾.

대하의 원인에 대한 한의학 고전의 서술을 살펴보면, 《素問·骨空論》¹²⁾에 “任脈爲病 男子內結七疝 女子帶下瘦聚”라 하였고, 《素問·玉機眞藏論》¹²⁾에 “脾傳之腎 病名曰疝瘕 少腹冤熱而痛”이라 하여 任脈爲病, 脾傳之腎病 등으로 대하의 원인을 말하였고, 張¹³⁾은 “曾經半産 瘀血在小腹不去”라 하여 반복된 유산으로 瘀血이 小腹에 在하여 발생한다고 하였으며, 巢¹⁴⁾는 “風冷入于胞絡”이라 하였고, 李¹⁵⁾는 “帶下赤白皆濕熱”, “外感風邪 傳各經”이라 하여 외부의 風冷 濕熱의 邪가 胞脈의 공허한 틈을 침범하여 나타나는 六淫性 帶下 및 “瘦人多熱……乃陰虛火盛也”, “肥人多濕……濕痰流下滲入膀胱”이라 하여 體質에 따른 대하의 원인을 언급하였으며, 沈¹⁶⁾은 風冷入於脬絡, 濕熱, 脾虛氣虛, 濕痰, 脾腎虛, 木鬱 등을 대하의 원인이라 하였다. 이러한 諸家의 이론을 종합해 보면 外因으로는 대부분 體虛受風冷入於胞絡을, 內因으로 濕熱, 濕痰, 脾氣虛, 脾腎虛, 肝鬱 등을 대하의 원인으로 이해하고 있음을 알 수 있었으며, 치료원칙에 있어서는 淸熱利濕, 燥濕化痰 등이 중시되고 있다^{17,18)}.

解毒四物湯은 四物湯에 黃連解毒湯을 합한 처방으로 四物湯의 溫補養血之劑와 黃連解毒湯의 淸熱瀉火之劑를 합하여 婦人科 疾患인 帶下 및 崩漏를 치료하는 處方이다¹⁹⁾. 解毒四物湯은 黃柏 黃連 黃

芩 梔子 當歸 川芎 白芍藥 熟地黃이 各1錢으로 構成되어 있으며, 朱¹⁾의 《丹溪心法附餘》에 최초 기재된 이래 濕熱邪毒으로 인한 帶下 및 崩漏의 치료에 清熱涼血止血 목적으로 사용되어 왔다^{2,20-25)}.

각 구성약물의 性味와 效能을 살펴보면 黃柏은 苦, 寒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱, 滋陰降火하는 效能을 가지고 있다. 黃連은 苦, 寒하고 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 效能을 가지고 있다. 黃芩은 苦, 寒하고 瀉實火, 除濕熱, 止血, 安胎의 效能을 가지고 있다. 梔子는 苦, 寒하고 清熱, 瀉火, 涼血의 效能을 가지고 있다. 當歸는 甘辛, 溫하고 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 效能을 가지고 있다. 熟地黃은 甘, 微溫하고 滋陰補血, 益精填髓의 效能을 가지고 있다. 白芍藥은 苦酸, 微寒하고 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗의 效能을 가지고 있다. 川芎은 辛, 溫하고 活血行氣, 祛風止痛의 效能을 가지고 있다²⁶⁾.

이상을 종합해보면 구성약물 중 熟地黃, 當歸, 白芍藥, 川芎은 四物湯으로서 養血潤燥하며, 血虛를 治療하고, 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子는 黃連解毒湯으로서 각각 脾胃熱, 肺大腸熱, 腎膀胱熱, 心熱을 내려주므로 三焦의 熱을 도두 瀉하는 效能이 있어서²⁷⁾, 熱毒을 제거하고 扶正祛邪하는 作用으로 濕熱邪毒으로 인한 帶下에 효과적인 처방이다²⁰⁾.

모든 개체는 염증반응을 통해서 자신을 외부 병원성물질에 對항하여 保護할 수 있다. 炎症반응은 매우 복잡한 세포 내 사이토카인들의 信號 전달에 의해서 발생한다. 활성화된 大食세포들은 炎症성 매개체로 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등을

방출한다²⁸⁾.

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성 박테리아의 외부 세포막을 구성하는 성분으로 이전부터 大食세포의 活化인자이며, endotoxic shock의 原因물질로 알려져 있다. LPS 자극시 大食세포에서 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 등과 같은 cytokine 및 NO가 생성된다²⁹⁻³¹⁾. 생성된 NO는 神經 전달, 혈관의 이완, 세포매개성 면역반응 및 炎症반응에 參與하고 炎症반응을 매개하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 또한 LPS 자극에 의해 활성화된 大食세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12와 같은 pro-inflammatory cytokine 등을 생성하게 된다³²⁻³⁴⁾. 炎症매개 물질이 과량 생성되면 과도한 면역반응을 야기하게 되어 각종 질환을 악화시키는 原因이 된다. 그러므로 NO, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 炎症매개물질의 억제는 각종 면역질환 및 炎症성질환의 治療에 도움이 될 것이다^{35,36)}.

따라서 본 연구에서는 여성 생식기 炎症질환에 應用되고 있는 解毒四物湯의 항염효과 및 作用기전에 對한 과학적 근거를 제시하고자 解毒四物湯 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO, TNF- α , IL-1 β 의 生成 및 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 조사하였고 그 기전을 알아보기 위해 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 활성화에 미치는 影響을 조사하였다.

먼저 解毒四物湯 추출물이 세포독성이 있는지 조사한 결과 解毒四物湯 추출물은 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.4mg/ml 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으나, 1mg/ml 농도에서는 세포생존율이 약 85%로 약간의 세포독성을 보였다(Fig. 1).

NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라 COX를 활성화하여 prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. NO의 생성을 유발하는 inducible NO synthase (iNOS)는 외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 사이토카인인 IL-1이나 TNF, lipopolysaccharide(LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되는 것으로 알려져 있다^{37,38)}. 따라서 iNOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 새로운 염증치료제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 각종 염증치료제들이 iNOS 저해 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{39,40)}. COX는 COX-1과 COX-2 두 가지 isoform이 있는데 COX-1은 조직내에서 존재하며 꾸준히 일정한 작용을 나타내는 반면에, COX-2는 염증을 포함한 다양한 자극에 의하여 단기간 내에 급격히 발현되는 것으로 알려졌다⁴¹⁾. COX-2의 발현을 유도하는 물질은 LPS, cytokine, 다양한 혈관성장인자등이 있으며, IL-4, IL-10과 스테로이드에 의해 억제된다⁴²⁾.

본 연구에서 解毒四物湯 추출물은 LPS에 의한 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 2), LPS에 의해 발현이 유도된 iNOS 및 COX-2 단백질을 농도 의존적으로 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과는 解毒四物湯 추출물이 염증 매개 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 항염효과를 나타내고 있음을 제시하고 있다.

解毒四物湯 추출물이 iNOS 및 COX-2

의 단백질 발현을 억제하였기 때문에, 본 실험에서는 NO의 생성 감소가 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 억제하여 야기되는지 알아보았다. 그 결과 解毒四物湯 추출물은 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현을 억제하였으며, 0.1mg/ml에서 0.4 mg/ml 농도까지 농도 의존적으로 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 解毒四物湯 추출물이 염증 매개 단백질인 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현도 억제하고 있음을 확인시켜주고 있다.

낮은 농도의 LPS는 숙주에 유익하지만 높은 농도의 LPS는 염증성 사이토카인 뿐만 아니라 염증 관련 유전자의 발현을 증가시킨다. 이러한 염증성 유전자 및 사이토카인들은 관절염, 다발성경화증, 폐혈증과 같은 많은 염증성 질환을 야기한다⁴³⁻⁴⁵⁾. 그러므로 iNOS, COX-2, TNF- α 등과 같은 염증성 유전자와 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하면 많은 염증성 질환을 치료할 수 있기 때문에 현재 많은 연구자들이 이들 유전자에 대한 억제제를 개발하려고 노력하고 있다.

TNF- α 는 혈관의 확장과 혈관투과성을 높이고 발적, 발열, 종창의 염증 반응을 일으켜 감염을 제한하도록 돕지만, 다량 생성되면 시상하부에 작용하여 열이 생기게 하는 내재성 발열원으로서 체온을 상승시키며, 급성기 반응 (acute phase response)을 일으키고, 응집계 (coagulation system)를 활성화시킨다. IL-1 β 는 저농도에서는 국소 염증 반응을 매개하고, 고농도에서는 TNF- α 처럼 열을 발생시키면서, 간에서 급성기 단백질(acute phase protein)의 합성을 유도하여 급성기 반응을 일으킨다⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

이에 본 연구에서는 解毒四物湯 추출

물이 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 解毒四物湯 추출물을 처리한 군은 LPS에 의해 유도된 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 현저히 감소시켰다(Fig 5, 6). 또한 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성을 억제하였기 때문에, TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 감소현상이 TNF- α 및 IL-1 β 의 단백질 발현을 억제하여 야기되는지 알아보았다. 그 결과 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의해 발현이 유도된 TNF- α 및 IL-1 β 를 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이는 解毒四物湯 추출물에 의한 TNF- α 및 IL-1 β 의 생성 억제 효과가 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-1 β 의 발현을 억제함으로써 야기되고, 이러한 결과는 解毒四物湯 추출물이 염증성 반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 제시하고 있다.

NF- κ B는 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증관련 유전자와 사이토카인의 발현을 조절한다고 알려져 있다⁴⁹⁾. 항염제로 사용되고 있는 dexamethasone, sulfasalazine, aspirin 등은 NF- κ B의 활성을 억제하여 염증성 유전자의 발현을 억제한다고 보고되었다^{50,51)}. LPS와 TNF- α 같은 염증 유발물질은 염증관련 유전자와 사이토카인의 발현에 의존적으로 NF- κ B의 신호전달 체계를 활성화시킨다. 항산화제로 알려진 asthaxanthin, EGCG, pyrrolidine 등은 NF- κ B의 활성을 억제할 뿐만 아니라 염증성 유전자 및 NO의 생성을 억제한다고 보고되었다⁵²⁻⁵⁵⁾.

이에 본 연구에서는 解毒四物湯 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 발현 억

제가 NF- κ B의 활성과 관련이 있는지 알아보았다. 그 결과 LPS를 처리한 군은 NF- κ B DNA binding 활성이 증가하였다. 반면에 解毒四物湯 추출물을 처리한 군은 LPS에 의해 증가된 NF- κ B DNA binding 활성이 억제되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

또한 NF- κ B의 활성은 NF- κ B p65 단위체가 세포질에서 핵으로 이동하기 때문에 증가한다고 알려져 있다. 따라서 解毒四物湯 추출물이 LPS가 NF- κ B p65 단위체를 세포질에서 핵으로 이동시키는 것을 억제하는지 Western blot으로 확인하였다. 그 결과 解毒四物湯 추출물을 처리한 실험군의 세포질에서는 NF- κ B p65가 감소가 억제되었고, 핵에서는 NF- κ B p65가 증가가 억제되었다(Fig. 9A). 이는 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 NF- κ B p65 단위체의 세포질에서 핵으로의 이동을 억제하고 있음을 말해 준다.

여러 가지 염증반응에서 중심적인 역할을 수행하는 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)는 분자량이 50 - 70 KD인 동일하거나 구조적으로 동질의 단백질단위의 이합체이다⁵⁶⁾. 휴지세포에서 NF- κ B는 세포질 내에서 κ B의 억제 단백질 (inhibitor of κ B, I κ B)과 결합하여 불활성 상태로 존재한다⁵⁷⁾. NF- κ B의 활성화는 신호에 의하여 I κ B 단백질이 분해되는 것으로 시작한다. 이 과정의 상세한 것은 아직 완전히 알려져 있지 않지만, I κ B 카이네이즈 (IKK)라고 불리는 여러 하부단위의 카이네이즈 복합체에 의하여 I κ B가 과인산화가 일어난다⁵⁸⁾. IKK-媒介 인산화는 I κ B가 세포질의 프로테아좀 (proteasome)에 의해서

분해가 시작된다. 일단 NF- κ B가 I κ B로부터 분리되면, 이것은 핵내로 들어가 표적 유전자 내의 특이 DNA 서열과 결합하여 전사를 시작하게 된다⁵⁹⁻⁶¹.

이와 같이 NF- κ B p65가 핵으로 이동되기 위해서는 I κ B- α 의 인산화가 일어나야 한다. 그러므로 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화를 억제하는지 실험하였다. 그 결과 解毒四物湯 추출물이 LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화를 현저히 억제하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 9B). 이는 解毒四物湯 추출물에 의한 염증성 사이토카인의 발현 억제가 NF- κ B의 활성의 억제를 통해서 이루어지고 있음을 입증하고 있다. 이는 解毒四物湯 추출물이 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 염증성 유전자 및 사이토카인의 발현을 억제하여 염증성 질환의 치료에 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과로 본 연구에서는 解毒四物湯 추출물이 NF- κ B의 활성을 억제하여 염증성 유전자(iNOS와 COX-2)와 사이토카인(TNF- α 와 IL-1 β)의 발현을 억제하고 있음을 확인하였으며 향후 어떠한 성분들이 이러한 효과를 나타내는지에 대한 추가적인 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

본 연구는 RAW 264.7 세포에서 解毒四物湯의 항염효과 및 면역반응에 대하여 실험적으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 解毒四物湯은 RAW 264.7 세포에서

염증유발물질인 LPS 자극에 의해 생성되는 NO를 억제하였다.

2. 解毒四物湯은 염증유발물질 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포의 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였다.

3. 解毒四物湯은 RAW 264.7 세포에서 염증유발물질인 LPS 자극에 의한 TNF- α 및 IL-1 β 생성과 발현을 억제하였다.

4. 解毒四物湯은 RAW 264.7 세포에서 염증유발물질인 LPS 자극에 의한 NF- κ B의 활성을 억제가 I κ B- α 의 인산화를 억제하여 야기되었다.

이상의 결과로 미루어 解毒四物湯이 NF- κ B의 활성을 억제하여 염증성 유전자(iNOS와 COX-2)와 사이토카인(TNF- α 와 IL-1 β)의 발현을 억제하고 있음을 밝혔다. 본 연구의 결과로 解毒四物湯이 염증질환에 효과가 있음이 확인되어 부인의 대하병같은 염증성질환에 사용될 수 있음을 제시해주고 있다.

□ 투 고 일 : 2008년 4월 28일

□ 심 사 일 : 2008년 4월 29일

□ 심사완료일 : 2008년 5월 10일

참고문헌

1. 朱震亨. 丹溪心法附餘(下). 서울: 大星文化社. 1982;714.
2. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울: 행림출판사. 1994;227-229, 230-239.
3. 申天浩 編. 病證診治. 서울: 성보사. 1991;553.
4. 崔圭東. 芍藥甘草湯이 抗痙攣 鎮痛 解

- 熱 抗炎症 및 抗潰瘍에 미치는 影響. 慶熙大韓醫科大論文集. 1982;5:209-215.
5. 李龍根. 秦芫蒼朮湯과 加味方이 鎮痛 解熱 抗炎 作用 및 腸管 輸送 등에 關한 실험적 연구. 大韓外官科學會誌. 1989;2(1):1-16.
 6. 李庚容. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 當歸 에탄올 추출물의 항염 증 효과. 원광대학교 대학원. 2004.
 7. 李昇彦. LPS로 유도한 복강대식세포에서 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 분해억제에 의한 柴梗半夏湯의 항염증효과. 원광대학교 대학원. 2007.
 8. Jang BC et al. Catalase induces the expression of inducible nitric oxide synthase through activation of NF-kappaB and PI3K signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Biochemical Pharmacol.* 2004;68(11): 2167-2176.
 9. 한방여성의학편찬위원회. 한방여성의학. 서울: 정담. 2007;166, 282-310.
 10. 崔裕德. 새임상부인과학 2판. 서울: 고려의학. 2001;451-452.
 11. 姜明孜. 臨床婦產科學. 서울: 成輔社. 1989;162-169.
 12. 楊維傑 編. 黃帝內經譯解(素問). 서울: 成輔社. 1980;165, 443.
 13. 張仲景 編. 仲景全書. 서울: 大星文化社. 1989;435.
 14. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 臺北: 集文書局. 433-454.
 15. 李梴. 編注醫學入門. 서울: 大星文化社. 1992;465.
 16. 沈堯封. 沈氏女科輯要(中醫婦科名著集成). 北京: 華夏出版社. 1998;1060.
 17. 柳沈根. 大하 유발 원인의 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1989;3:27-32.
 18. 최은수, 이인선. 大하의 원인에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1994;7:47-68.
 19. 東醫科學院 編著. 東醫處方大全. 서울: 麗江出版社. 1993;1494.
 20. 柳長華, 郭端華. 婦科常見病實用方. 北京: 인민위생출판사. 1999;143, 488.
 21. 江克明, 包明蕙 編著. 校正 方劑大辭典. 서울: 의성당. 1991;1179.
 22. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당. 1989;159.
 23. 羅元愷. 中醫婦科學. 北京: 인민위생출판사, 1994;89.
 24. 肖淑春. 동의임상부인과학. 서울: 법인문화사. 1999;74, 115.
 25. 沈金鰲. 婦科玉尺(中醫婦科名著集成). 北京: 華夏出版社. 1998;843.
 26. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 영림사. 2000;236, 248, 372, 400, 402, 405, 530.
 27. 尹用甲. 동의방제와 처방해설. 서울: 의성당. 2002;294.
 28. 김선영 등. 면역생물학(6판). 서울: 라이프사이언스. 2005;78.
 29. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signal activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640): 394-397.
 30. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406(6797):782-787.
 31. Hoshino K et al. Toll-like receptor 4(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene

- product. *J immunol.* 1999;162(7):3749-3752.
32. Lee BG et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406(3):301-309.
33. 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 and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35(1):21-28.
34. Kwqamata H et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):217-226.
26. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001;69(6):625-635.
35. Seo WG et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):119-123.
36. McCartney-Francis N et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 1993;178:749-757.
37. Knowlers RG et al. Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;172:1042-1048.
38. Rees DD et al. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;173:541-545.
39. Pellat-Deceunynck C, Wietzerbin J, Drapier JC. Nicotineamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem. J.* 1994;297:53-58.
40. Yu SM. Thaloporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 1994;303:289-298.
41. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer.* 2007;121:2357-2363.
42. Lee SK, Park EJ. Styrylherocycles as a novel class inhibitor of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2004;14:2105-2108.
43. Alfon J et al. Nitric oxide synthase II(NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening, Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis.*
-

- 1999;145:325-331.
44. Yang F et al. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J. Nutr.* 1998;128 :2334-2340.
45. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996;271:1424-1437.
46. 김광혁 등 역. 세포·분자 면역학. 서울: 정문각. 1998;310-311, 313.
47. 김정철 등 역. 한눈에 알 수 있는 면역학. 서울: E*PUBLIC. 2006;10-11, 20-21, 54, 60-61.
48. 김세종. 면역학 길라잡이. 서울: 고려의학. 2000;1-13, 65-68, 89-90.
49. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:725-734.
50. Makarov SS. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today.* 2000;6:441-448.
51. Leach M et al. Effects of inhibitors of the activity of cyclo-oxygenase-2 on the hypotension and multiple organ dysfunction caused by endotoxin: a comparison with dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 1998;124:586-592.
52. Lee SJ et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappa B activation. *Mol. Cells.* 2003;16:97-105.
53. Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* 1997;52:465-472.
54. Ziegler-Heitbrock HW. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J. Immunol.* 1993;151:6986-6993.
55. Pahan K et al. N-acetyl cysteine inhibits induction of no production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;24:39-48.
56. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol. Immunol.* 2007 ;4:31-41.
57. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappa B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:49-62.
58. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* 2006 ;25:6717-6730.
59. Bergmann A. IKK epsilon signaling: not just NF-kappaB. *Curr. Biol.* 2006;16:R588-690.
60. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappa B pathway. *Nat. Cell Biol.* 2005;7:758-765.
61. Hamilton TA et al. Regulation of

macrophage gene expression by pro-
and anti-inflammatory cytokines

Pathobiology. 1999;67:241-244.