

Original Article

황련이 화상조직에 미치는 항산화와 항염증 및 피부재생 효과

김희경, 홍승욱

동국대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The anti-inflammatory effects of Huang-Lyun (Coptidis Rhizoma, CR) on injured tissue after burn elicitation

Hee-kyung Kim, Seung-Ug Hong

Dept. of Oriental Medical Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology
College of Oriental Medicine, Dongguk University

Background and Objective: Coptidis Rhizoma is a medicinal herb known for its antioxidant and anti-inflammatory effect. The purpose of this study was to examine the effects of CR on the experimental burn elicitation in vitro and in vivo.

Material and Methods: In order to know the antioxidant effect on skin cell of mice after burn elicitation, superoxide dismutase (SOD) activity was measured.

In vitro, the RAW 264.7 macrophage cells were treated with lipopolysaccharides for experimental inflammation. iNOS mRNA expression was observed after CR-treatment. In order to know effects on the skin regeneration in the burned mice, we counted the nitric oxide (NO) in blood. We also observed the histological structure in the epidermal basal layer and the dermal section, and we studied changes of angiogenesis in the capillaries surrounding the basal layer and dermal papilla. The changes of transcription of iNOS mRNA (inducible nitric oxide synthase mRNA) and changes of NF- κ B (nuclear factor κ B) p65 positive reaction were also observed to investigate the changes of the stress in the skin.

Results: The results indicated that CR has significant effects on the antioxidant effect on skin cells of mice after burn elicitation by increasing SOD activity in the in vitro test. It seemed that CR decreased the amount of NF- κ B which induced the iNOS mRNA dose-dependently and suppress activating NO and angiogenesis. Furthermore, CR facilitated the process of skin recovery after experimental burn.

Conclusion: CR can be applied for burned skin via antioxidant effect and skin regeneration.

Key Words : Burned skin, SOD activity, iNOS, NO, NF- κ B, Coptidis Rhizoma

서론

열에 의한 피부의 손상인 화상은 우리의 일상생활에서 쉽게 발생하는 질환이다. 흔히 접하게 되는 여름철의 태양볏에 의한 1도, 2도 화상부터 에너지

사용의 증가와 문명 발달로 인해 현대사회에서 빈도가 증가하는 중증화상을 모두 포괄하며, 최근의 통계를 보면 미국에서는 매년 250만명이 화상을 입고, 10만명은 입원치료가 필요할 정도로¹⁾, 의료기술의 향상에도 불구하고 중증환자, 사망자 수는 매년 증

• Received : 22 December 2010

• Revised : 15 February 2011

• Accepted : 15 February 2011

• Correspondence to : 홍승욱(Seung-Ug Hong)

경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지, 동국대학교의료원 일산한방병원 안이비인후피부과

Tel : +82-31-961-9085, Fax : +82-31-961-9009, E-mail : heenthso@hanmail.net

가되고 있다.

화상에 대해 한의학에서는 “燒傷系熱毒灼盛傷皮肉 導致熱盛傷陰 熱毒內攻 臟腑不和陰陽不衡失調 後期爲毒邪漸退 久病導致氣血兩虧 或陰傷爲敗 因此 諸症進生”이라 하였고, 그에 따라 火毒의 邪氣를 청열하는 淸熱解毒 또는 淸熱止痛, 解毒生肌의 治法을 선택하였다²⁾. 화상에 대한 한의학적 치료는 크게 외치법, 내치법, 침구치료 방면으로 시행되어 왔다. 외치법은 주로 黃柏 등의 단미제를 이용하고^{3,4)}, 《醫宗金鑑⁵⁾》에서는 내복약이 등장하며, 현대에는 김⁶⁾ 등의 실험 연구, 정⁷⁾ 등의 임상치험례, 이⁸⁾ 등의 침구치료례, 증례를 통한 치험례⁹⁾, 약침을 통하여 효능을 확인한 연구¹⁰⁾ 등 다양한 한의학적 방법들이 화상의 치료 효과를 높이고 있음을 보여주고 있다.

황련(Coptidis Rhizoma)은 미나리아재비과에 속한 다년생 본초인 황련과 동속식물의 뿌리줄기를 말린 것으로, 주로 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 작용을 가지고 있고¹¹⁾ 항산화효과를 가지는 것이 약리학적 방법으로 증명되었다¹²⁾. 황련의 항균작용은 포도구균에 대한 연구로 입증된 바 있고¹³⁾, 황련의 항염작용에 관한 연구는 여러 조건 하에서 다양하게 입증되어왔다¹⁴⁻¹⁸⁾. 혈관신생억제에 대한 효과도 확인할 수 있는 바¹⁹⁾, 이러한 선행 연구를 통해 화상에도 황련을 적용시킬 수 있을 것으로 사료되나, 화상의 발병기전 하에서의 황련의 항염증, 항산화효과는 연구된 바 없었다.

전술한 연구를 토대로 저자는 황련이 가지고 있는 항산화효과와 항염증효과의 상관관계, 그리고 항산화를 통한 피부재생효과의 여부를 검증하기로 하였다. superoxide dismutase(SOD) 활성도를 측정하고, 화상을 유발한 생쥐에게 황련을 투여했을 때 RAW264.7세포에서 iNOS mRNA 발현과 Nitrite 생성 변화를 조사하였고, 화상유발피부에서 일어나는 조직학적 변화 및 염증반응의 주도적 전사인자 NF-κB의 활성 억제 여부에 대한 실험을 시행하였다. 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

오리엔트(한국)에서 분양 받은 태령 6주된 BALB/c 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 정상군(Normal, NOR), 화상 유발군(Burn Elicited, CON) 그리고 화상 유발 후 황련 추출물 처리군(Coptidis Rhizoma Treated, SAM)으로 나누었으며, 각각 10 마리씩 배정하였다.

2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW264.7 cell은 KCLB (Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo, Japan)에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin(Sigma, USA), 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

3) 황련(Coptidis Rhizoma) 추출물의 제조와 첨가량 결정

황련 100 g을 증류수 1000 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압·농축한 후 동결 건조하여 14.61 g(수득률 15%)의 추출물을 얻었다. 화상 유발 후 14일 동안 실험군에 10 mg/kg량으로 구강투여 하였다.

2. 실험 방법

먼저 황련의 항산화효과를 조사한 후, in vitro와 in vivo로 나누어 실험을 진행하였다.

1) 황련의 항산화효과 조사

황련의 항산화능력을 측정하기 위해 riboflavin을

이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mM buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100 μ l, EDTA/cyanide 200 μ l, riboflavin 100 μ l 그리고 항산화 측정할 농도별(0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml) 황련 추출물 100 μ l을 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 10 번 반복하여 평균값을 계산하였다.

2) RAW 264.7 cell을 이용한 iNOS mRNA와 NO assay(In vitro)

(1) iNOS mRNA 발현 측정

황련이 염증효소인 inducible Nitric oxide synthase (iNOS)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 연구, 조사하기 위해 PCR법의 하나인 역전사중합효소연쇄반응법(RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10^5 cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(LPS, 1 μ g/ml, Sigma)를 2시간 처리하여 NF- κ B 활성을 유도한 후 황련 추출물 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24 시간동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β -actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이

용한 영상분석(image analysis)을 통해 비교하였다.

(2) Nitrite assay

NO 생성량은 Nitrite assay를 통해 측정하였는데, 12시간 배양된 RAW 264.7 macrophages - 5×10^5 cells/well에 lipopolysaccharide(1 μ g/ml) 2시간 처리 후 황련 추출물을 농도별(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml)로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액 상층액 50 μ l에 Greiss reagent(Sigma) 50 μ l을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨(NaNO_2)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, 질소산화물(nitric oxide, NO_2) 생성을 산출하였다.

3) NF- κ B 활성 억제를 통한 항염증효과(In vivo)

(1) 화상 유발

화상은 우선 생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 80°C의 D/W를 스포이트를 이용하여 피부에 떨어뜨린 후 약 15초간 노출시켜 직경 10 mm 인 2도 화상을 유발하였다. 화상 유발 부위는 Caliper(Mitutoyo, JAPAN)로 길이 측정을 실시하고 해부현미경을 이용하여 $\times 4$ 의 배율로 촬영한 후 각각을 비교하였다.

(2) 전사인자 NF- κ B 활성 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor(NF)- κ B 분포 변화를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켜 비특이적 면역 반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti

Table 1. The primer of iNOS and β -actin mRNA

| Primer | | Primer sequences | Product(bp) | No. of cycles |
|----------------|-----------|----------------------------------|-------------|---------------|
| iNOS | sense | 5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3' | 527 | 30 |
| | antisense | 5'-AGAAGCTGAGGGTACATGCTGGAGCC-3' | | |
| β -actin | sense | 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3' | 840 | 35 |
| | antisense | 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3' | | |

mouse nuclear factor(NF)- κ B p65(1:500, Santa Cruz Biotec)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, 2차항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotec)에 4 °C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex(Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) iNOS 생성 변화 관찰

NO 생성에 관여하는 염증 효소인 iNOS의 조직 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS (1:250, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

(4) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 결과는 Sigmaplot2000(SPSS INC, USA)을 통해 유의성을 검증하였다.

4) 피부손상 완화 효과(In vivo)

(1) 조직표본제작과 조직화학

유발 14일째 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin: NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 화상부위 피부를 적출한 후 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께의 연속절편으로 제작되었다. 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편 진피 내 모세혈관 분포 변화를 관찰하기 위해서 mallory azan 염색을 실시하였다.

(2) 혈관분포의 영상분석

화상부위의 혈관분포 변화를 영상분석 하기 위해 화상 유발된 등쪽 피부를 절개 후 나타난 혈관을 $\times 4$ 배율로 촬영하였다. Optimas 5.2(Optima Co., USA)에서 먼저 image 기능의 sharpen low-filter를 사용하여 혈관을 명확하게 한 후 binary morphology에서 invert 기능을 선택하여 분포 혈관을 intensity 190-210으로 부각시킨 다음, Histogram으로 동일영역의 pixel을 계수하였다.

실험 결과

1. 항산화효과

황련 추출물의 항산화 효율은 0.4 mg/ml에서 73 \pm 3.4%, 0.6 mg/ml에서 82 \pm 1.9%, 0.8 mg/ml에서 89 \pm 1.7%, 1.0 mg/ml에서 96 \pm 1.7%로 농도-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

2. RAW 264.7 세포내 iNOS mRNA 발현 및 NO 생성 억제

1) iNOS mRNA 발현 억제

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS

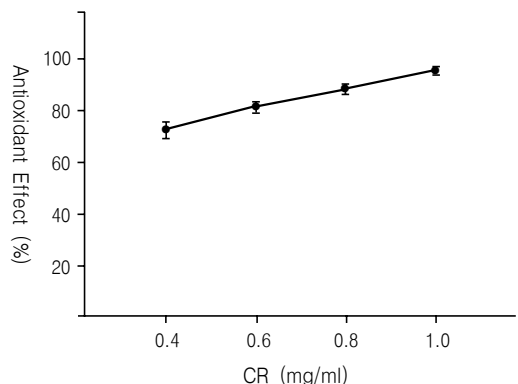


Fig. 1. The anti-oxidant effects of Coptidis Rhizoma (CR). The SOD ability of CR were dose-dependantly increased.

Abbreviation: SOD, Super Oxide Dismutase; CR, Coptidis Rhizoma

mRNA 발현은 증가하였는데, 황련 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 8%, 0.6 mg/ml에서 10%, 0.8 mg/ml에서 20%, 1.0 mg/ml에서 27%가 감소하였다(Fig. 2-A).

2) NO 생성 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 603%(4.57 ± 0.04 nM/ 5×10^5 cells)로 증가한 반면, 황련 추출물 처리된 RAW 264.7 세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 황련 추출물 0.4 mg/ml 처리 시 10%(4.10 ± 0.02 nM/ 5×10^5 cells), 0.6 mg/ml 처리 시 83%(0.76 ± 0.02 nM/ 5×10^5 cells), 0.8 mg/ml 처리 시 85%(0.70 ± 0.01 nM/ 5×10^5 cells) 그리고 1.0 mg/ml 처리 시 86%(0.66 ± 0.01 nM/ 5×10^5 cells)로 감소하였다(Fig. 2-B).

3. 화상 유발 생쥐에서 NO 생성 조절을 통한 항염증효과

1) 화상 유발 피부 직경 감소

대조군의 화상 유발 후 피부의 직경은 4.6 ± 0.20 mm로 측정되었다. 이에 반해 실험군은 대조군에 비해

30% 감소한 4.0 ± 0.13 mm로 측정되었다(Fig. 3-A).

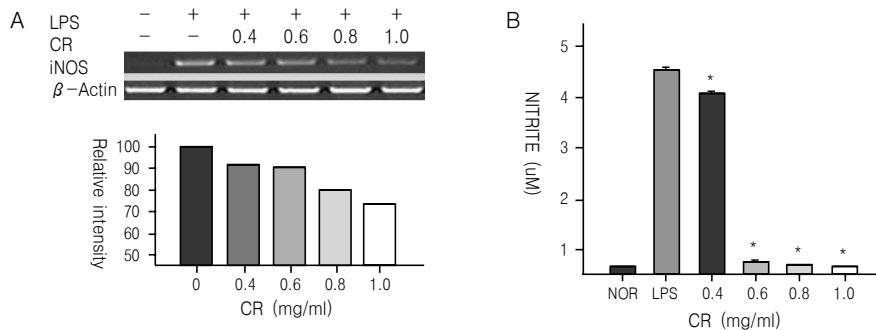
2) 피부 조직 손상 완화

화상에 의한 외부형태 손상이 확인된 대조군의 피부에서는 탈락과정에 있는 혈병(blood clot), 상피세포 과형성(hyperplasia), 진피내 모세혈관의 분포 증가와 과립백혈구와 림프구의 기저층으로 침윤 증가가 관찰되었다. 실험군에서는 대조군에서 비해 피부손상 부위가 감소한 것으로 관찰되었는데, 대조군에 비해 낮은 상피세포 과형성, 진피내 모세혈관의 분포 감소, 염증관여세포의 침윤 감소가 관찰되었다(Fig. 3-A).

3) 혈관 분포 감소

화상 유발 피부를 절개하여 진피쪽 피부를 영상 분석 한 결과. 정상군에 비해 대조군에서는 그 가지수가 증가한 반면, 실험군에서는 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 정상군에 비해 대조군은 4227%나 증가한 반면, 실험군은 대조군에 비해 65% 감소되었다(Table 2, Fig. 3-B).

mallory azan 염색 후 관찰된 모세혈관 분포는 대조군에서 손상이 심했던 상피주변의 진피 유두 주변에서 증가한 것으로 관찰되었다. 이에 반해 실험군



Abbreviation: NOR, No-treated RAW 264.7 cells; LPS, lipopolysaccharide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; *, P < 0.05 compared with LPS alone.

Fig. 2. Inhibition of LPS-induced iNOS mRNA expression (A) / NO production (B) by CR.

The RAW 264.7 cells were treated with LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4, - 1.0 mg/ml) of CR, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS mRNA expression and NO production were dose-dependantly decreased in CR treated RAW 264.7 cells.

Table 2. The image analysis of angiogenesis in CR-treated mice after burn elicitation. (image analysis for 100,000 particles / range of intensity: 190-210)

| Objective | Group | | |
|-----------|-------|---------|---------|
| | NOR | CON | SAM |
| Angiogram | 45±4 | 1947±54 | 686±13* |

의 진피 유두에서 모세혈관의 분포가 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 3-B).

4) 전사인자 NF-κB 활성화 억제

대조군의 상피 기저층의 세포 핵 주변에서 강한 NF-κB p65 양성반응이 관찰되는데, 대조군에서 정상군에 비해 829% 증가하였으나, 실험군에서는 대조군보다는 증가폭이 적었다. 실험군에서 NF-κB p65 antibody 양성반응은 100,000 particle 당 1810±47로서, 대조군인 100,000 particle 당 3141±87에 비해 42%의 유의성 있는 감소 경향을 보였다(Table 3, Fig. 4-A).

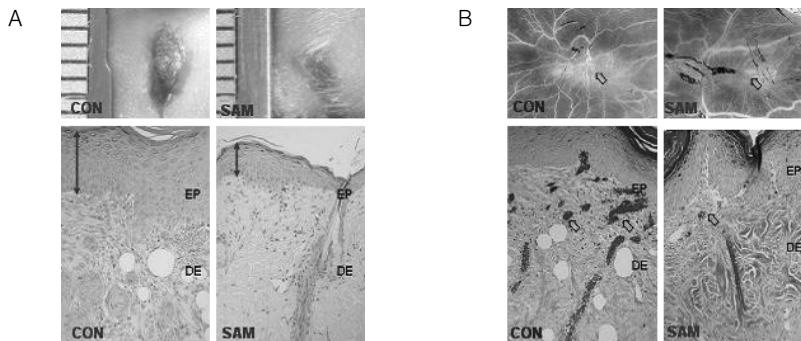
5) 염증효소 iNOS 생성 억제

대조군의 상피 기저층의 세포질 가장자리에서 강한 iNOS 양성반응이 관찰되는데, 대조군에서 정상군에 비해 1079% 증가하였으나, 실험군에서는 대조군보다는 증가폭이 적었다. 실험군에서 NF-κB p65 양성반응은 대조군에 비해 57%의 유의성있는 감소 경향을 보였다(Table 3, Fig. 4-B).

고찰

화상은 대부분 외부의 물리적 자극에 의해 고온, 고열의 물리적, 화학적 자극에 의해 발생하며, 피부에 가해지는 흔한 외상 중의 하나이다. 화상은 의료기술의 향상에도 불구하고 외과치료 중 가장 높은 사망률을 나타내며, 다양한 합병증을 유발하여, 치료과정에서의 통증 정도가 여타 질병보다 심하고, 치료가 완료된 이후에도 만성적인 통증과 눈에 보이는 흉터, 그리고 기능장애로 인한 후유증에 시달리며, 미래에 대한 불확실성으로 인한 불안, 우울을 겪는 경우가 흔하다²⁰⁾.

병리학적으로는 일반적으로 외상에 의한 조직손



Abbreviation: EP, epidermis; DE, dermis; CON, Burn elicited mice; SAM, CR treated mice after burn elicitation.

Fig. 3. The cure effect of GR for burn caused skin damages.

A. mitigative effects (upper, Change of external burn region; lower, Hematoxylin & eosin, ×200). The size of burn in SAM were more decreased than CON. Epidermal damage, as hyperplasia (↓) and dermal damage, as infiltration of inflammatory cell and increase of capillary in SAM were more declined than CON. B. Decrease of angiogenesis (upper, Change of external capillary distribution; lower, mallory azan, ×200) is shown above. The angiogenesis (vacant arrow) in SAM were significantly decreased than CON and had probability.

Table 3. Analysis of anti-inflammation in CR treated mice after burn elicitation. (image analysis for 100,000 particles / range of intensity : 190-210)

| Antibody | Group | | |
|--------------------|--------|---------|----------|
| | NOR | CON | SAM |
| NF- κ B p65 | 338±13 | 3141±87 | 1810±47 |
| iNOS | 423±11 | 4988±82 | 2156±100 |

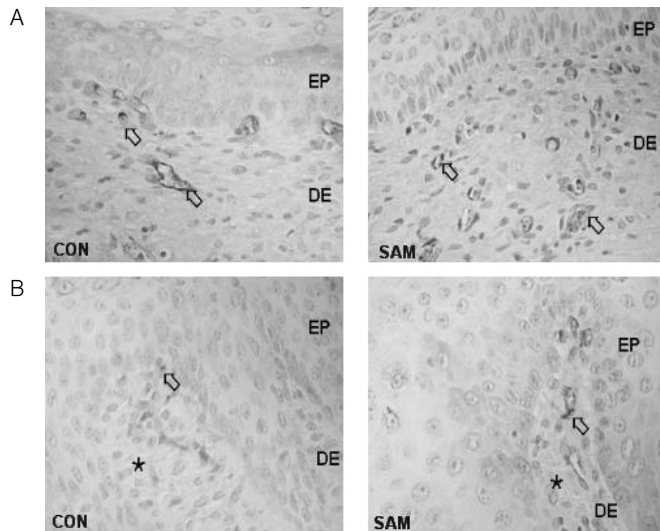
Abbreviation: NF- κ B, nuclear factor κ B; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Other abbreviation same as table 2.

상과 재생화의 과정으로, 조직의 파괴에 따른 염증의 발생과 수복이 진행되게 된다. 염증이란 생체에 가해진 어떤 자극에 의해 반응기전을 나타내는 현상이며 주증은 종창 발적(충혈) 발열 동통을 야기시키고 후에는 기능장애를 수반하게 된다. 또한 종창은 삼출액이 지각신경말초를 압박하였을때 발생하는 심한 동통이다²¹⁾. 화상이 발생한 피부환경은 병균의 증식에 최적화된 조건을 제공하여 수 시간 내에 포도상구균을 중심으로 한 혼합감염 등 다른 외상보다

감염의 위험이 높으며, 심한 경우 2차적 감염에 의해 사망의 원인이 되기도 한다. 또한 수복과정에서 발생하는 섬유화에 의한 심한 반흔 및 영구적 불구를 일으키기도 한다²²⁾.

清代《醫宗金鑑⁵⁾》을 살펴보면 “湯燙火燒 皮爛疼癢起挑破 使毒輕 煩燥作嘔 防毒陷 便秘 神昏氣喘亡.....初用清涼膏塗之 解毒止痛 不致臭爛 次以罌粟膏塗之 痛止生膿時換 黃連膏貼 之收斂 火毒攻裏者宜四順清冷飲服之 務令二便通利則熱毒必解”라 하여 解毒止痛, 痛止生膿, 收斂, 通利熱毒함을 제시하였고, 《洞天奧旨²³⁾》에는 “火燒瘡遍身燒傷如黑者難救或燒輕而不致黑者猶可療也, 然皮焦肉卷 疼痛難熬 有百計千方用之而不驗者 以火毒內攻而致不得法也, 故燒傷之症, 必內外同治, 則火毒易解之”라 하여 화상의 辨證과 豫後에 대해 언급한 부분을 볼 수 있다.

이로부터 알 수 있듯이 화상의 치법은 火毒의 灼盛을 막는 清熱, 解毒, 收斂의 治法이 大綱이 되며 補法으로 보조하게 된다. 이를 바탕으로 최근의 연



Abbreviation: *, dermal papilla; NF- κ B, nuclear factor κ B; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Other abbreviation same as Fig. 3

Fig. 4. The anti-inflammatory effect of CR in burn caused skin.

- A. Decrease of transcription factor (NF- κ B p65 (vacant arrow) immunohistochemistry X 1000).
- B. Decrease of inflammation cytokine (iNOS (vacant arrow) immunohistochemistry, ×1000).

구를 살펴보면 외용약의 효능에 대한 고찰로는 大黃, 乳香, 沒藥을 외용하였을 때 화상 피부의 손상에 미치는 영향이 보고된 바⁴⁾ 있고, 紫雲膏를 이용한 조직의 수복효과²⁴⁾, 《醫宗金鑑》에서 清涼膏, 罌粟膏, 四順清涼飲 등의 구체적 처방을 찾아볼 수 있다. 현대의 연구로는 紫根, 梔子의 경피흡수시의 화상치료효과에 대해 연구²⁵⁾되어 왔으며, 清熱消毒飲, 牛黃清心丸의 처방이 내복약으로 사용된 치험례⁷⁾도 찾아볼 수 있다. 補法에 해당하는 加味十全湯을 이용한 보고⁶⁾도 있다. 또한 針과 함께 화상의 초기치료에 清熱消毒飲을 응용⁷⁾하기도 하였으며, 鍼을 화상부위에 시술한 효과에 대한 연구⁹⁾, 흰쥐의 화상부위에 시술된 침과 소염약침이 조직회복에 미치는 영향에 대한 효과²⁶⁾ 등이 밝혀졌고, 장²⁷⁾ 등도 침 자극을 통하여 TGF- β 1, TGF- β 3, EGF와 IL-6의 발현이 억제됨을 연구한 바 있다.

황련(黃連, *Coptidis Rhizoma*)은 여러해살이 초본 식물로 중국이 원산이며, 중국에서는 黃連(*C. chinensis* FRANCH.), 三角葉黃連(*C. deltoidea* C. Y. CHENG etHSIAO), 云連(*C. japonica* MAKINO var. *dissecta* NAKAI)11)도 약용한다. 황련은 국내생산이 없기 때문에 전량을 수입에 의존하고 있으며, 수입의 대부분은 중국을 통해 이루어진다²⁸⁾. 《東醫寶鑑》²⁹⁾은 黃連의 性質에 대해 味苦 無毒하여 心經으로 들어가 瀉心하고 脾胃 중의 濕熱을 빼내고, 熱毒을 없애 明目 鎮肝하는 효능이 있으며 腸滯과 下痢膿血을 치료하고, 消渴, 煩燥, 驚悸 등을 멎게 한다고 기술하였으며, 半夏瀉心湯, 三黃瀉心湯, 黃連解毒湯, 回春涼膈散 등의 처방 등에 다용되어왔다. 황련의 약리에 대한 실험적 연구로는 緒論에 論한 연구 외에도 임상약학분야에 있어 지질대사와 관계된 논문³⁰⁾, 세포 조직의 염증과 사멸에 대한 연구³¹⁾, 세포재생과 관련한 이¹⁵⁾ 등의 보고, 항균작용과 관련한 보고⁹⁾, 항염증작용에 대한 보고로는 황련으로 염증매개인자 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level이 억제됨이 발표되었고¹⁷⁾, 뇌신경세포에 있어서의 염증매개물질의 억제작용¹⁴⁾, 백서의 대뇌 저산소증모델 유발 후의 황련 투여시 활성산소발현이 줄어들어 연구³²⁾되어

왔다. 이를 감안할 때, 화상으로 인한 火毒의 清熱과 염증의 수복에 관해서도 황련의 효과를 기대해볼 수 있으나, 화상유발모델 하에서의 황련의 효과는 연구된 바가 없었다.

따라서 본 연구는 화상유발 생쥐의 피부에서 황련의 NO 생성 억제를 통한 항염증효과가 화상 유발 손상 완화에 미치는 효과를 조사하였으며, *in vitro* 실험으로 RAW264.7 cell을 이용하여 황련추출물 농도에 따른 SOD활성변화를 측정하였고, BALB/c 생쥐에 인위적으로 화상을 유발시킨 다음 황련을 구강투여한 후 화상유발피부의 조직학적 변화, 혈관분포 감소, 피부내 손상과 전사인자 NF- κ B 활성억제를 통한 항염증효과, 즉 iNOS 발현의 억제 등을 관찰하였다.

산화스트레스는 활성산소종/활성질소종의 발생에 따른 항산화 방어제간의 심각한 불균형 상황을 말한다. 산화질소(Nitric oxide, NO) 소모가 동반된 산화반응은 이차적인 산화, 질소화를 유발하고 이러한 이차적인 질소화합물은 독특한 염증성 세포 신호 전달성을 나타낸다^{33,4,5)}. 염증성 산화물에 의한 산화, 질소화스트레스는 내피세포 기능성 장애³⁶⁾, 고혈압³⁷⁾, 동맥경화³⁸⁾, 허혈/재관류 손상³⁹⁾ 및 염증반응³³⁾의 병리기전을 주도하는데, 이러한 다양한 자극은 대식세포내 iNOS를 발현시켜 많은 양의 NO 생성을 촉진시킨다⁴⁰⁾. 최근에는 iNOS의 전사인자 NF- κ B 활성억제를 통한 NO 생성 저해로 기인된 항염증효과에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 의학에서도 *Curcuma longa*⁴¹⁾, *Rosmarinus officinalis*⁴²⁾ 등의 생약제제에서 NO 조절제를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

화상에 의한 국소 손상 역시 전술한 강한 산화작용과 염증반응을 야기하여 각종 염증매개물질을 활성화, 백혈구를 자극하게 된다. 염증성 cytokine의 유전자 발현은 다양한 전사인자에 의해 조절되며, 특히 Nuclear Factor κ B(NF κ B)가 중요한 역할을 하게 된다. NF- κ B는 p50과 p65의 subunit 형태로 구성되어 있으며 자극 전에는 I κ B라는 저해단백질과 결합된 형태로 세포질에 존재하다가¹⁵⁾, 염증성

cytokine, T, B세포, lipopolysaccharide(LPS), 바이러스, 그리고 산화 스트레스 등에 의해서 자극이 되면 I κ B가 분리되고 NF- κ B가 핵내로 이동하여, 목표 유전자의 NF- κ B의 결합부위에 결합하여 다양한 염증 관련 유전자의 발현을 유도한다⁴³⁾. 이는 NF- κ B가 TNF- α , IL-6, IL-1 β , 그리고 염증효소인 iNOS의 발현으로 이어져 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도 한다. 기존의 연구를 살펴보면 RA환자의 관절강에서 NF- κ B의 활성이 관찰되었고⁴³⁾, 관절염을 유발한 흰쥐를 이용한 연구 등에서도 확인한 강도가 비교⁴⁴⁾ 되며, 염증반응을 억제하는 소염제의 대부분은 NF- κ B 활성 경로를 억제하여 염증성 cytokine을 억제하는 것으로 나타나는 등¹⁵⁾ NF- κ B가 cytokine 매개염증반응의 중요한 조절인자임을 알 수 있다. 따라서 우수한 NF- κ B 저해제는 곧 cytokine과 단백질분해효소, 산화제의 분비, 이로 인해 호중구와 단백구들이 산소유리기를 생성하고, 이 산소유리기가 세포사를 초래하는 일련의 과정을 억제하는데 중요한 역할을 한다고 보여진다.

이러한 사실을 검증하기 위해 본 연구는 黃連의 항산화능력을 측정하기 위해 riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였으며, 그 결과 황련 농축액에서 SOD 활성이 농도-의존적으로 증가함을 보여주는 바, 黃連은 화상으로부터 세포 조직을 보호하는 항산화효과를 가진 것으로 판단된다.

또한 화상 유발 14일 후 iNOS mRNA의 발현을 조사한 결과, 정상군에 비해 화상유발군에서는 그 수가 증가한 반면, 황련투여군에서는 화상유발군에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며, 농도에 따라 비례하여 효과가 증가하였다. 즉 화상유발군에서는 강력한 면역시스템 활성화 물질인 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 황련투여군에서는 0.4 mg/ml에서 8%, 0.6 mg/ml서 10%, 0.8 mg/ml에서 20%, 1.0 mg/ml에서 27%가 감소하였다.

NO의 생성 역시 농도에 따라 비례하여 감소됨을 나타냈는데, LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 대조군에 비해 603%로 증가한 반면, 황련

추출물 0.4 mg/ml 처리 시 화상유발군 대비 10%감소, 0.6 mg/ml 처리 시 화상유발군 대비 83% 감소, 0.8 mg/ml 처리 시 85%, 그리고 1.0 mg/ml 처리 시 86% 로 감소하였다.

전술했듯이 iNOS와 NO의 활성은 NF- κ B의 활성에서 기인하는데, 본 연구에서도 이 사실을 확인할 수 있다. 화상유발군의 상피 기저층의 세포 핵 주변에서는 강한 NF- κ B p65 양성반응이 관찰되는데, 이 양성반응이 화상유발군에서 대조군에 비해 829% 증가하였으나, 황련투여군에서는 480%증가하는데 그쳐, 화상유발군에 비해 42%나 감소하는 유의성있는 결과를 보였다. 또한 상피 기저층의 세포질 가장 자리에서 관찰되는 강한 iNOS 양성반응은, 화상유발군에서 대조군에 비해 1079% 증가하였으나, 황련투여군에서 NF- κ B p65 양성반응은 463% 증가하여 화상유발군에 비해 57%나 감소하였다. 이는 NF- κ B 활성이 억제된 결과로서, 황련 추출물은 I κ B kinase (IKK) 활성감소에 따른 I κ B의 인산화 유도감소를 유발하여 NF- κ B를 불활성화시킨다. 즉 생쥐 iNOS 유전자의 TATA box 앞쪽 55bp와 917bp 위치의 NF- κ B /Rel 결합부위⁴⁷⁾에 결합하여 전사 유도해야 할 NF- κ B/Rel 감소에 의해 iNOS 발현 감소가 유도된 것으로 사료되며, 이를 통해 황련의 강한 항산화작용의 기전을 이해할 수 있다.

이러한 항산화, 항염증효과는 실제 화상조직의 수복의 촉진에도 강한 도움을 준 것으로 관찰되었는데, 화상 유발 피부직경을 측정한 결과 화상유발군의 화상 유발 후 피부의 직경은 4.6 \pm 0.20 mm인 반면 황련투여군은 4.0 \pm 0.13 mm로, 대조 군에 비해 30% 감소한 결과를 나타내었다.

화상유발군의 피부에서는 혈병, 상피세포 과형성, 모세혈관의 분포 증가와 과립백혈구, 림프구의 침윤 증가가 관찰되는데, 이 역시 황련투여군에서는 화상유발군에서 비해 감소한 것으로 나타났다. 즉, 화상유발군에 비해 낮은 상피세포 과형성, 진피내 모세혈관의 분포 감소, 염증관여세포의 침윤 감소는 황련의 투여가 피부 조직 손상 완화에도 긍정적 영향을 주어 세포조직의 복구가 좀 더 빠르게 이루어지

고 있었음을 알 수 있게 한다.

혈관신생(angiogenesis)은 새로운 혈관이 맥관계를 구성하는 이전단계로부터 성장해나가는 복잡한 과정을 거치며, 신생혈관은 병소에 백혈구의 순환을 유리하게 하고, 활성화된 대식세포는 NF- κ B, TNF- α 등 다양한 cytokine을 분비하게 되기 때문에 염증성 질환에 있어 중요한 병리적 요소로 작용한다. 최근 연구결과를 통해 NF- κ B의 선택적 반응 억제와 혈관신생억제가 연결되어 있으며, 이들의 억제가 매우 효율적인 소염작용을 한다는 것이 밝혀지고 있다.⁴⁶⁻⁴⁷⁾.

화상 유발 피부를 절개하여 분석 한 결과 역시 황련투여군에서는 화상유발군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 대조군에 비해 화상유발군은 4227%나 증가한 반면, 황련투여군은 대조군에 비해 1479% 증가된 데 그쳐 화상유발군에 비해 65%나 혈관신생이 감소됨을 알 수 있었다. 이는 mallory azan 염색 후 관찰된 모세혈관 분포에서도 드러났는데, 화상유발군에서는 진피 유두부분에서의 모세혈관의 분포가 증가한 반면 황련투여군은 감소된 것으로 나타나 황련 투여시 상처가 빠르게 치유되고 있음을 알 수 있다.

이러한 연구결과를 살펴볼 때 황련은 화상이 유발된 생쥐의 피부 조직의 손상을 절반 이상 완화시키고, 손상의 회복속도를 빠르게 하여 완전한 조직수복에 도움을 주는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 조직학적, 면역학적 기전을 통하여 분석한다면 이는 각종 염증매개물질의 발현 억제에 의한 항산화작용, 소염작용의 결과로 인식할 수 있으며, 황련의 농도에 따라서 이러한 작용이 증가하는 실험 결과를 미루어볼 때 單味체제로서의 현대의학의 항산화제, 소염제와 동일한 효과를 보인다고 결론내릴 수 있다. 따라서 清熱解毒, 消腫止痛에 근거한 황련의 경구투여는 화상 환자의 조직손상의 회복을 돕기 위한 보조적인 치료제로서 널리 사용될 수 있을 것이라 사료된다. 다만 본 연구는 황련의 화상유발부위를 수복하는 효능 검증에만 그쳤는데, 단순한 화상유발 후의 황련제 투여가 아니라 서양 의학적인 화상치료

시의 효능을 비교검토하지 못한 점은 실험 초기 설계의 미비함으로 지적될 수 있다. 효능에 대한 통계 분석도 정상군, 실험군, 대조군 3군의 14일 후 결과 검토가 아니라 대조군내, 실험군내의 전후비교분석을 통해서 수행되었으면 더욱 정교한 실험이었을 것이라 생각된다. 또한 기타 단미 한약재와의 효능의 차이를 검토하지 못한 것 또한 아쉬움으로 남는다. 추후의 연구에 있어서 황련이 타 한약재, 타 항생소 억제와의 효능차이가 추가로 검증된다면 임상활용도가 보다 높아질 것으로 생각된다.

결론

황련의 항염증, 항산화 효과와 피부재생효과를 검증하기 위해 행해진 본 연구는 iNOS 발현과 NO 생성 억제를 조사하기 위해 RAW 264.7 대식세포에 염증유발물질인 LPS 처리 후 황련을 경구투여하여 SOD 활성도, iNOS mRNA, NO의 발현여부, 염증 조절 전사인자인 NF- κ B의 활성여부 및 혈관신생의 변화, 화상유발피부의 조직학적 변화 등을 관찰함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃連은 농도 의존적으로 SOD activity를 증가시켰다.
2. 黃連은 화상 유발 생쥐의 염증유발에 관여하는 효소 iNOS의 발현과 산화질소의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 산화질소의 생성을 80%이상 감소시켰다.
3. 黃連은 염증유발 전사인자 NF- κ B의 활성을 절반 이상 감소시켰다.
4. 黃連 투여시 화상유발 생쥐의 피부에서 진행성 손상이 30%정도 빨리 복구 되고, 피부손상 완화효과(진피 내 모세혈관의 분포 감소, 염증 관여세포의 침윤 감소)가 있는 것을 관찰하였다.
5. 黃連은 화상 유발 후 발생하는 혈관신생작용을 억제하여 화상유발대비 65%의 혈관생성 억제작용을 나타냈다.

이상의 결과로 iNOS mRNA 발현 억제능이 있는 황련은 화상유발 피부에서 전사인자 NF- κ B 활성 조

절을 통한 항염증작용으로 피부 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. The epidemiology of sunburn in the US population in 2006. Brown TT - J Am Acad Dermatol - 01/10/2009;55(4):577-83.
2. 許載創. 中醫外科傷科名著集成(外科症治全書). 華夏出版社. 1997:271.
3. MK Yu, DH Jeong, SH Sim, SY Park, JH Choi, JH Kim. A literature review on external treatment of a burn. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2003;16(3):38-67
4. SB Kim. Effect of skin application with Rhubarb, Olibanum and Myrrha. Dep. of Oriental medical graduate school, Dongguk Univ. 2001.
5. 吳謙. 醫宗金鑑. 대성문화사. 1991:448.
6. HY Kim, SU Hong. The effects of GT on injured tissue after burn elicitation. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2009;22(1):62-75
7. SY Jung, EK Kang, HS Seo. One case of second degree burn wound. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2007;20(1):285-93
8. JA Lee, 심재성 2도 화상을 유발한 쥐에서 화상 주위 침 자극이 피부 재생에 미치는 영향, Dep. of Oriental medical graduate school, Dongguk Univ, 2009
9. SH Won, JS Owi, EJ Choi, KR Kwon. A clinical case study of Acupuncture treatment for burned hand. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2005;22(1):13-7.
10. BY Song, CH Lee. Effects of the Acupuncture or Pharmacopuncture Treatment for the Histologic and Morphologic Recovery on the Mouse with the Burn Skin. Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2009;26(3):81-92
11. 전국 한의과대학 본초학교실, 본초학, 영림사, 2001:180-1
12. YJ Kim, MJ Lee, JW Park, JK Kim, DY Choi, CH Kim. Antioxidant Activity of Water-Extract from *Coptis chinensis* Franch, Korean journal of life science, 2000;10(3):241-6
13. HS Seo. The Experimental Study on Antibacterial Potency of *Coptidis rhizoma* extract on *Staphylococcus aureus* & *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2006;19(2):71-6
14. YK Park, HW Jeong, CM Kim, JS Choi, YS Kim, Effects of Berberine on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells. Kor J of Herbalogy. 2007; 22(4):117-25
15. SK Lee, Y Lee, SH Shin, EY Kim, BC Shin. Effects of *Coptidis Rhizoma* on the Anti-inflammation and Motor Recovery in Photothrombotic Brain Infarction Model in Rats. Kor J of Herbalogy. 2009;24(1):179-89
16. EH Choi, TH Lee. Effects of *Coptidis Rhizoma* and *Aconiti Lateralis Preparata Radix* on the Change of Plasma Corticosterone Level and Rectal Temperature Induced by LPS. Kor J of Herbalogy. 2006;21(2):77-85
17. DI Kim, HJ Cheong, SK Cheong, HK Lee. The Inhibitory Effects of *Schizandrae Fructus* and *Coptidis Rhizoma* on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level of BEAS-2B Human Epithelial Cells. 경희의학, 2001;17(2):199-213
18. EY Chae, CS Cho, CJ Kim. The effect of Cationic Bovine Serum Albumin of *Coptidis Rhizoma* to Membranous Nephropathy Mouse Model. Kor J of Herbalogy. 2009;24(1):99-110
19. CH Lee. 황련추출물의 NF-kB 활성 및 혈관신생 억제 효과, 강원대학교, 2003
20. YS Park. A Study on Pain and Anxiety of Burn

- Patients. The Journal of Korean Society of Public Health Nursing. 2001;15(1): 83-95.
21. MC Park, SU Hong, The Effects of Sunbanghwalmyeong-eum Extract on Anti-oxidant, Anti-allergic and Anti-inflammatory ability in mouse cell. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2008;21(2):46-53
 22. 이유신. 임상피부과학. 여문각. 1998:290.
 23. 陳士澤. 洞天奧旨. 中醫古籍出版社. 1992:151-2.
 24. 공태영, 박태열. 紫雲膏(A)를 이용한 火傷治療 및 皮膚疾患 治療例. 韓醫外治療法學會誌. 2000: 2(1); 53-8
 25. DH Min, DK Kim, JP Lim, JH Yang. Transdermal Drug Delivery; Therapeutic Effect of the Preparations of Lithospermi Radix and Gardeniae Fructus Extracts on the Burn and Wound Healing. The J of Korean Society of Pharmaceutical Science and Technology, 2005; 35(4):255-63
 26. BY Song, CH Lee, Effects of the Acupuncture or Pharmacopuncture Treatment for the Histologic and Morphologic Recovery on the Mouse with the Burn Skin. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society, 2009;26(3);81-92
 27. HJ Chang, BS Woo, CS Shin, YK Seo, DJ Back, NS Kim. The Effects of Acupuncture on TGE-beta(1), TGE-beta(3), EGF, and IL-6 in the Burn Wound Healing of Rats, The J of Korean Association of Physical Anthropology. 2003: 16(1);51-62
 28. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. 2001:134-7.
 29. 허준. 동의보감, 서울: 여강출판사, 2003:1654, 2019, 2976
 30. YS Choi, YI Lee, SY Lee. Effects of Extracts of *Coptis japonica* on Lipid Metabolism in Rats. The J of Korean Society of Pharmacognosy. 1996;27(3):246-53.
 31. JK Lee, SJ Park, SC Kim, SY Ji. *Coptidis Rhizoma* Extract induces Apoptotic Cell Death in YD-10B Cell. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2009;22(2):50-9
 32. JR Choi. 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連의 활성산소 억제 및 미토콘드리아 막전위 유지 효능, 생명과학회지, 2008;18(3):311-7
 33. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 26(9-10): 1346-55, 1999.
 34. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Luscis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 296(5577): 2391-4, 2002.
 35. Lim DG, Sweeney S, Bloodsworth A, White CR, Chumley PH, Krishna NR, Schopfer F, O'Donnell VB, Eiserich JP, Freeman BA. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(25):1594-6, 2002.
 36. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 86(9):E85-90, 2000.
 37. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 323(1):22-7, 1990.
 38. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43(3): 562-71, 1999.

39. Muller MJ, Vollmar B, Friedl HP, Menger MD. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med.* 21(2):189-97, 1996.
40. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 235(4787):473-6, 1987.
41. Min-Hsiung Pan, Shoei-Yn Lin-shiau, Jen-Kun Lin. Comparative Studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and Its Hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60:1665-76, 2000.
42. Ai-Hsiang LO, Yu-Chih Liang, Shoei-Yn Lin-Shiau, Chi-Tang Ho, Jen-Kun Lin. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating NF- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 23(6):983-91, 2002.
43. D.A Walsh, Angoigenesis and *arthritis*, *Rheumatology*, 1999;38:103-12
44. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(20):9730-4, 1993.
45. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata, Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science.* 239 (4839):497-500, 1988.
46. Sunul K. Manna, Asok Mukhopadhyay, Nguyen T. Van, and Bharat B, Silymarin suppresses Activation of NF- κ B, c-Jun N-Terminal Kinase and Apoptosis, *J. Immunol*, 1999;163:6800-9
47. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard IM, Shevely V, Nuseir N, Macrophage-induced angiogenesis is mediated by TNF-a, *Nature*, 1987;329(6140): 630-2