

RAW 264.7 세포에서 Heme Oxygenase-1 발현 유도를 통한 松節 약침액의 항염증 효능

이강파¹ · 문진영²

¹동국대학교 과학기술대학 생명과학과, ²동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Pinus densiflora Gnarl Extract for Pharmacopuncture Inhibits Inflammatory Responses through Heme Oxygenase-1 Induction in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages

Kang-Pa Lee¹, Jin-Young Moon²

¹Division of Bio Science, College of Science and Technology, Dongguk University

²Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Objectives : The gnarl of *Pinus densiflora*, called Songjeol in Korea, has been used as a medicinal herb for the treatment of inflammatory-related diseases such as arthralgia, myalgia and bruise. However, the molecular actions and mechanisms have not been clearly investigated. The aim of this study was to clarify the anti-inflammatory activity of *Pinus densiflora* gnarl pharmacopuncture (PDGP) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells.

Methods : Cytotoxicity was assessed by XTT assay. The amount of nitric oxide (NO) production was determined by nitrite assay. The mRNA expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2) and heme oxygenase-1 (HO-1) were analyzed by RT-PCR. Reactive oxidative species (ROS) generation was measured using the fluorescence microscopy. In addition, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and redox factor-1 (Ref-1) protein expressions were detected by Western blotting.

Results : PDGP inhibited NO production and ROS generation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. At the mRNA level, PDGP suppressed IL-1 β , IL-6 and COX-2 expression. On the other hand, PDGP induced HO-1 mRNA expression. Furthermore, PDGP suppressed iNOS and Ref-1 protein expression.

Conclusions : This result suggests that PDGP can act as a suppressor agent on NO and iNOS through induction of HO-1, and play an useful role in blocking inflammatory responses.

Key words : *Pinus densiflora* gnarl, pharmacopuncture, nitric oxide, heme oxygenase-1

I. 서 론

염증은 조직에 상처나 감염 등이 발생할 때, 자신을 보호하기 위한 신체의 대응기전이며, cytokine이나 free radical 등의 자극성 물질에 대한 생체 방어반응이다¹⁾. 대식세포가 내독소로 알려진 lipopolysaccharide(LPS)의 자극을 받으면 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6) 등과 같은 염증성

· 교신저자: 문진영, 경북 경주시 석장동 707번지
동국대학교 한의과대학 경혈학교실
Tel. 031-961-5830, Fax. 031-961-5823
E-mail: ampmoon@dongguk.ac.kr

· 투고 : 2012/02/03 심사 : 2012/02/17 채택 : 2012/03/02

cytokine(pro-inflammatory cytokine)을 방출하게 되고²⁻⁴⁾, inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현을 유도하여 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂와 같은 염증성 인자가 생성됨으로써 염증반응이 매개된다^{5,6)}. 특히 이 과정에서 과잉 생성된 NO는 그 자체로 염증 유발과 조직손상을 일으킬 뿐만 아니라, 활성산소인 superoxide와 결합하게 되면 보다 반응성이 강한 peroxynitrite의 형태로 전환되어 생체조직의 과사를 야기할 수 있다⁷⁾. 한편 heme oxygenase-1(HO-1)은 세포, 동물 및 사람을 대상으로 진행된 다양한 실험연구를 통해 활성산소의 자극과 같은 산화적 스트레스로부터 세포와 조직을 보호하는 중요 분자로 인식되고 있으며, 특히 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 HO-1은 NO의 생성과 iNOS 유전자 발현을 저해함으로써 염증반응을 차단하는 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 따라서 항염증제의 연구개발에 있어서 활성산소종(reactive oxidative species : ROS)과 활성질소종(reactive nitrogen species : RNS)에 대한 소거제 및 HO-1의 발현을 적절한 수준으로 유도할 수 있는 항산화제의 탐색에 관심이 증가하고 있다.

松節은 소나무의 가지에 생긴 결절(마디)로서 性味는 苦溫하고 祛風燥濕, 止痛의 효능이 있어 風濕으로 인한 근육과 관절의 통증, 경련 및 부종을 치료하고 술을 빚어 마시면 下肢의 연약함을 개선한다 하였다¹⁰⁾. 또한 임상에서 松節은 주로 풍습성 관절염, 요각통 등의 치료에 사용되며 거풍·진정·진통·소염 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

松節과 관련한 실험연구로 저자 등은 이전의 연구¹²⁾에서 다양한 산화반응 모델을 이용하여 松節 약침액의 항산화 효능을 중점적으로 검토한 결과, 본 약물이 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 억제하고, 자유기에 의한 plasmid DNA의 분절을 방어하며, ROS 및 RNS를 소거함과 더불어, 자유기와 금속이온에 의한 인체 저밀도 지단백(human LDL)

의 산화적 손상에 대해 현저한 저해 효능이 있음을 규명하였다. 또한 이 실험결과를 바탕으로 향후 松節 약침액이 만성 염증질환의 일종인 심혈관계의 산화적 손상을 보호하는데 유용할 것임을 시사한 바 있다. 그러나 현재까지 松節 약침액의 항염증 효능에 대한 보다 구체적인 실험연구는 미흡한 실정이며, 특히 이미 규명된 바 있는 본 약물의 항산화 활성을 통한 염증반응 제어효과 및 작용기전에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다.

따라서 이번 연구에서는 松節 약침액의 항염증 효능을 세포분자 수준에서 검토하기 위해 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 다음, NO의 생성과 COX-2, IL-1 β 및 IL-6에 대한 조절 효능을 mRNA 수준에서 평가하였다. 한편 HO-1의 발현에 대한 영향을 관찰함으로써 본 약물의 NO 생성 억제기전이 항산화 활성과 관련된 것인지를 규명하고자 하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 ROS의 생성에 대한 억제효과를 관찰하기 위하여 ROS와 상호 특이적 반응 및 발색을 일으키는 DCF-DA를 처리한 후 형광현미경으로 그 결과를 분석하였다. 더불어 단백질 수준의 분석을 통해 LPS로 유도된 NO의 생성이 iNOS의 발현증가를 통한 것임을 재확인하고, 松節 약침액이 이 반응 과정을 차단할 수 있는지를 알아보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline (PBS)은 Gibco BRL(Grand Island, USA), XTT assay kit은 WelGENE Inc.(Korea), reverse transcriptase는 impron II kit을 Promega(Madison, USA), Ex taq은 TakaRA Co.(Japan), primary

antibody와 secondary antibody는 Cell signaling (Denvers, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 Sigma(St. Louis, USA)사에서 구입하였다.

2. 약재 및 약침액 조제

본 실험에 사용된 松節은 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc) 가지의 결절(마디)로 동국대학교 한방병원(경북, 경주시)에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 松節 약침액(*Pinus Densiflora* Gnarl Pharmacopuncture : PDGP)은 水劑-알콜 沈法에 따라 제조하였다. 즉, 600 g의 약재를 작은 크기로 자르고 3시간 동안 전탕, 추출하였다. 침전물을 여과한 다음, rotary evaporater(EYELA N-1000, Japan)에서 100 mL이 되도록 농축하였다. 농축액에 99.9% 에탄올을 가하여 단계별로 75%, 85% 및 95% 에탄올 용액이 되도록 조절하였다. 각각의 단계에서 침전물을 여과 및 제거하였다. 여액을 감압 농축하여 에탄올을 제거한 다음, freezer dryer (Freezone6, Labconco, USA)를 이용하여 동결 건조하였으며 최종 8.8 g(회수율 1.5%)의 분말을 회수하였다. 시료는 -20℃에 보관하였고, 3차 증류수에 녹인 다음, 0.22 μm로 여과하여 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받았고, 10% FBS와 항생제(1% penicillin-streptomycin)가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포 배양용 100mm dish에서 세포가 80%의 밀도로 성장하였을 때 계대배양하여 실험에 사용하였다.

4. XTT assay

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 0.5×10^5 cells/well 농도로 분주하고 농도별 PDGP(0, 10, 50, 100, 500, 1000 ug/mL)를 처리한 다음, 24시간 배양하였다. 세포생존율은 XTT assay 방법에 따라 측정하였다. 즉, well당 20 μl의 XTT 반응액을 첨가하여 2시간 배양한 다음, ELISA microplate reader로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군과 실험군의 백분율로 환산하여 표기하였다.

5. Nitrite assay

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 PDGP의 영향을 검토하기 위하여 세포를 1.5×10^5 cell/mL 농도로 조절하여 24 well plate에 분주하고 12시간 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 배지로 8시간 배양하였다. 농도별 PDGP (0, 5, 10, 50, 100, 250 ug/mL)를 전처리하고 30분 동안 배양한 다음, 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 회수하여 원심분리하고, 상층액을 Griess reagent(1% sulphanilamide and 0.1 naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% H₃PO₄)와 혼합하여 반응시킨 후, ELISA microplate reader로 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 nitrite 대조군과 상대적인 값을 비교하여 uM 값으로 표기 하였다.

6. RT-PCR

염증성 사이토카인 및 매개 물질의 mRNA 발현량을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS(100 ng/mL)와 PDGP(100 ug/mL)를 처리한 다음, 시간대별(3, 6, 8시간)로 Trizol을 첨가하여 total RNA를 회수하였으며, 260 nm에서 정량한 뒤 Pomega impron II kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합

성된 cDNA는 primer(Table 1)의 Tm값에 따른 thermal cycle을 30회 반복하였으며, 증폭된 생성물은 1% agarose gel에 전기영동하고 ethidiumbromide (EtBr)로 염색한 후, UV 조명하에서 밴드를 분석하였다.

Table 1. Primer Sequences used for Semi-Quantitative RT-PCR

Primer	sequence(5' - 3')	Product Size (bp)
IL-1 β	F TTGACGGACCCCAAAA GATG	204 (223)
	R AGAAGGTGCTCATGTC CTCA	
HO-1	F CTGTGTAACCTCTGCT GTTCC	668
	R CCACACTACCTGAGTC TACC	
IL-6	F CCACTTCACAAGTCGG AGGCTT	396
	R CCAGCTTATCTGTTAG GAGA	
COX-2	F GGAGAGACTATCAAGA TAGTGATC	860
	R ATGGTCAGTAGACTTT TACAGCTC	
GAPDH	F GCCCATCACCATCTTC CAG	306
	R TGAGCCCTTCCACAAT GCC	

7. DCF-DA를 이용한 ROS 생성 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 24시간 배양 후, 100 μ g/mL PDGP를 처리한 다음, 30분간 배양하였다. 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 6시간 배양한 뒤, 상층액을 제거한 세포에 cold PBS를 가하여 세척하고, 4% paraformaldehyde로 고정시킨 다음, 0.1% Triton X-100를 가하여 30 min 반응시켰다. H₂DCF-DA로 염색시킨 후, 형광

현미경에서 발색정도를 분석하였고, 세포의 생존 여부는 1 μ g/mL DAPI 반응액으로 세포핵을 염색함으로써 확인하였다.

8. Western blot analysis

단백질 시료는 RAW 264.7. 세포에 phosphatase inhibitors(50 mM fluoride, 1mM sodium orthovanadate, 10 mM pyrophosphaste)를 첨가하여 수집하였고, BSA 정량을 통해 30 μ g 씩을 100 $^{\circ}$ C에서 7분간 변성을 유도하였다. 변성이 완료된 단백질은 10~12% SDS-PAGE gel에서 전기영동시켰고, 1시간 동안 100 V 전기반응기를 사용하여 PVDP membrane으로 옮긴 뒤, 5% skim milk로 비특이적 단백질을 억제시켰다. 1차 항원은 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 세척하였고, HPR-conjugated secondary antibody를 결합시킨 뒤, ECL system으로 반응시켰다. 이를 X-ray film으로 감광 반응 시킨 후, 단백질의 발현정도를 분석하였다.

9. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 표기하였으며, student's *t*-test 방법을 실시하여 분석하였고, *p*<0.05 미만일 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. PDGP의 세포독성

RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 검토하고자 PDGP를 각각 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/mL의 농도로 처리하고 24시간 배양한 다음, XTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 대조군과 PDGP를 10, 50, 100, 250 μ g/mL의 농도로 처리한 실험군에서는 모두 90%를 넘는 세포생존율을 보였으나, PDGP를 500 μ g/mL 이상의 고농도로

처리하였을 때, 현저한 세포독성($p < 0.001$)을 나타내었다(Fig. 1).

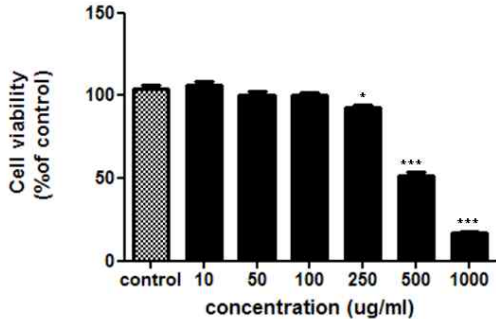


Fig. 1. Effect of PDGP on cell viability of RAW264.7. RAW264.7 cells were incubated with PDGP(0, 10, 50, 100, 500 and 1000 ug/mL) for 24 h. Cell viability was assessed by XTT assay and expressed by the percentage of control. Each value represents the mean±SD of three separate experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, compared with control group.

2. NO 생성량에 미치는 영향

Fig. 1에서 살펴본 바와 같이 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 250 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 PDGP를 전처리하고, LPS(100 ng/mL)를 처리함으로써 NO의 방출을 유도하였다. 본 실험의 결과, LPS 처리에 의해 NO의 생성이 정상세포에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, PDGP를 전처리한 모든 실험군에서 LPS에 의해 증가된 NO의 생성이 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2).

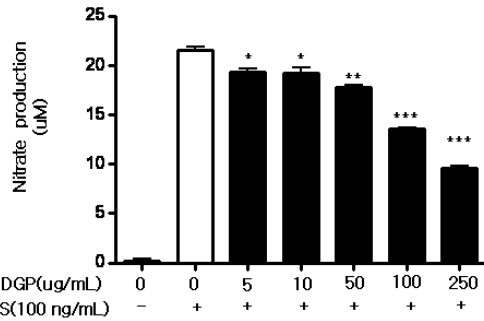


Fig. 2. The inhibition effects of PDGP on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7. RAW264.7 cells were incubated with PDGP(0, 5, 10, 50, 100, 250 ug/mL) for 30 min prior to treatment with 100 ng/mL LPS for 24 h and their efficacy assessed by nitrite assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with LPS treatment sample.

3. IL-6, IL-1 β , COX-2 및 HO-1 mRNA 발현 변화

본 실험에서는 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 및 매개물질에 대한 PDGP의 영향을 mRNA 수준에서 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 LPS(100 ng/mL)와 PDGP(100 ug/mL)를 처리한 다음, 시간대별(3, 6, 8시간)로 각각 mRNA를 취하여 IL-6, IL-1 β , COX-2의 발현변화를 측정하였다. 그 결과 IL-6, IL-1 β 및 COX-2는 LPS를 처리한 후, 시간이 경과함에 따라 발현량이 증가하였다. 반면, PDGP를 처리한 실험군에서는 LPS에 의해 증가된 IL-6, IL-1 β , COX-2의 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였다. 한편, HO-1은 LPS의 처리에 의해 발현이 유도되었으며, 이러한 발현양상은 PDGP의 처리에 의해 보다 강하게 증가하였다(Fig. 3).

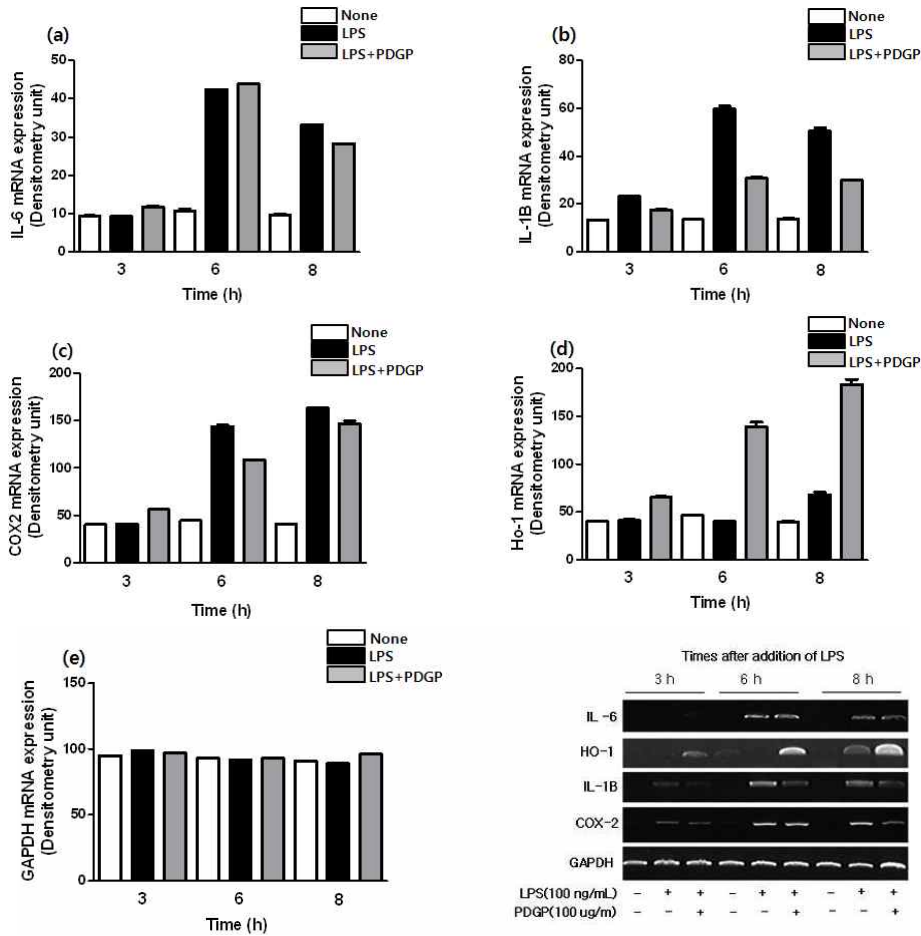


Fig. 3. The mRNA of inflammatory response factors were analyzed by RT-PCR.

RAW 264.7 cells were stimulated with LPS(100 ng/mL) and with or without PDGP(100 ug/mL) and were harvested at each time-point and total RNA isolated for cDNA synthesis. The PCR performed on the cDNA using the following special primers shows table 1.

Bar graph (a)IL-6 (b)IL-1β (c)COX-2 illustrating RT-PCR data demonstrating that the LPS-induced up-regulating of proinflammatory cytokines expression can be attenuated in the presence of PDGP. (d) HO-1 and (e) GAPDH showed each mRNA expression levels.

4. LPS로 유도된 ROS 생성에 대한 PDGP의 억제 효능

LPS로 유도된 ROS 발생에 대하여 PDGP가 항산화 활성을 나타내는지를 검토하기 위하여 H₂DCF-DA를 처리하여 염색한 다음, 형광현미경하에서 그 결과를 분석하였다. DAPI 염색에서 나타나는

청색의 발색반응을 통해 세포의 생존을 확인하였고(Fig. 4a), 형광분석을 통해 DCF-DA 발색정도는 LPS 단독 처리군에서 현저히 증가함을 확인하였다. 반면 PDGP를 전처리한 실험군에서는 LPS 처리로 인한 ROS의 발생이 감소하였다. 이 결과는 PDGP가 RAW 264.7 세포에 대한 LPS 처리로 유도된 ROS의 발생을 억제하는 효능이 있음을 보여주고 있다(Fig. 4).

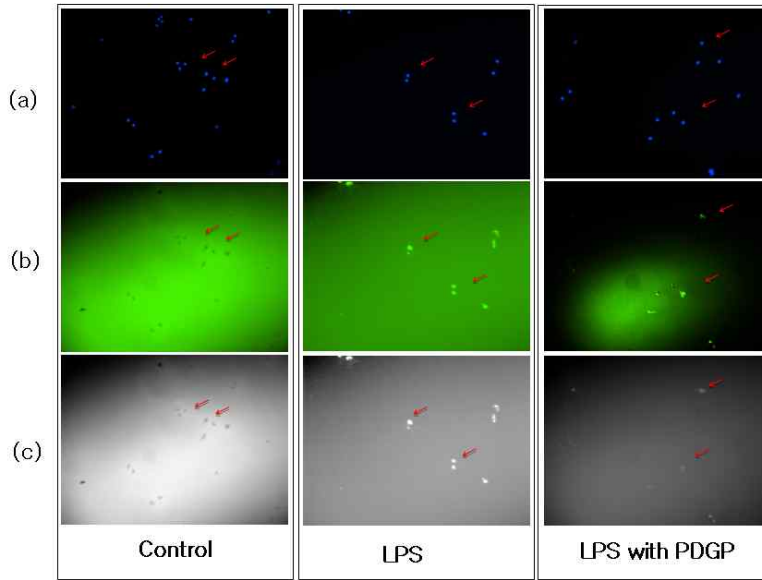


Fig. 4. Microscopic observations and effects of PDGP on ROS generation.

RAW 264.7 were treated with 0 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PDGP for 30 min prior to treatment with 100 ng/mL LPS or without of LPS for 6 h. The morphology of cells was detected by a microscopic observation. RAW 264.7 were harvested and washed with ice-cold PBS. DCF-DA treated cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 30 min, respectively. Cells were treated 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI reaction mixture and stained RAW264.7 were examined using fluorescence microscopy.

(a) DAPI fluorescence (b) ROS were detected by DCF-DA staining on FITC fluorescence (c) For analysing ROS generation yield, the image (b) convert color gray. The arrow indicates position of comparative analysis.

5. Ref-1 및 iNOS의 단백질 발현 변화

본 실험에서는 Ref-1 및 iNOS의 단백질 수준의 변화를 살펴보았다. 먼저 Ref-1 단백질은 대조군과 LPS 단독 처리군에서 모두 발현되고 있음을 관찰하였고, PDGP의 처리에 의해 그 발현 정도가 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 한편, Fig. 2에

서 살펴본 바와 같이 LPS로 유도된 NO의 생성이 iNOS의 발현증가를 통한 것임을 확인하고, 이에 대한 PDGP의 영향을 단백질 수준의 분석을 통해 검토하였다. 그 결과, 대조군에 비해 LPS 단독 처리군에서 iNOS 발현이 증가하였고, PDGP 처리군에서는 발현 정도가 감소하였다(Fig. 5).

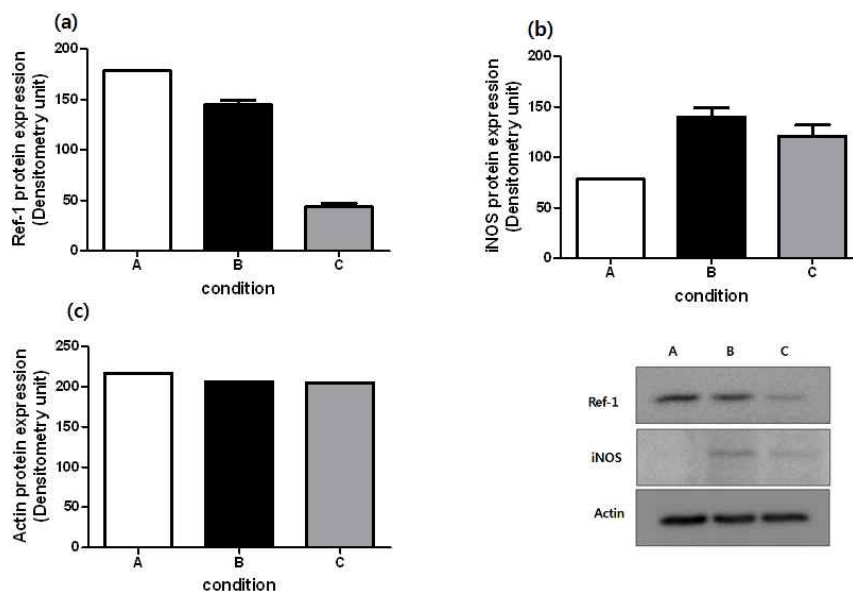


Fig. 5. Effects of PDGP on Ref-1 and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7.

Bar graph (a)Ref-1 (b)iNOS (c)GAPDH illustrating western blot data demonstrating that cells stimulated with LPS(100 ng/mL) were harvested at each condition. A: control, B: LPS alone, C: LPS with PDGP(100 ug/mL)

IV. 고 찰

松節은 風濕邪를 몰아내고 筋肉을 느슨하게 하며 經絡을 通하게 하는 효능이 있어, 풍습성 관절통과 근육통, 타박으로 인한 어혈과 동통의 치료에 사용되고, 특히 임상에서 藥鍼 시술 즉 혈위 주사 요법의 효과가 비교적 좋은 것으로 보고되었다¹³⁾. 이전의 연구에서 저자 등은 다양한 산화반응 유발 시스템을 이용하여 松節 약침액의 현저한 항산화 효능을 실험적으로 입증함으로써 향후 본 약물이 생체의 산화적 스트레스로 인한 병증 치료에 유용할 것임을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 松節 약침액의 항염증 효능을 검토하고 이러한 효능이 항산화 효능과 관련된 것인지를 규명하고자 하였다. 먼저, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 검토하고자 PDGP를 다양한 농도로 처리한 다음, XTT assay로 측정된 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 거의 100%에 가까운 세포생존율을 보였다. 또한 RAW 264.7 세포에 LPS

를 처리한 결과, NO의 생성량이 증가하였으나, PDGP(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 전처리에 의해 유의성 있는 감소($p < 0.001$)를 나타내었다.

이 결과에서 PDGP가 염증성 자극에 의한 NO의 생성을 억제하였으므로, PDGP의 항염증 효능을 보다 구체적으로 규명하고자 IL-6, IL-1 β 및 COX-2에 대한 mRNA 발현 양상의 변화를 관찰하였다. 대식세포는 감염초기에 IL-6 발현이 증가하는데, 이를 통해 IL-1 β 및 COX-2와 같은 염증 매개 인자의 생성이 증가하게 된다. 본 실험의 결과에서도 LPS의 자극에 의하여 IL-6, IL-1 β 및 COX-2의 mRNA 발현이 증가하였다. 반면, PDGP의 처리에 의해 LPS의 자극으로 인해 증가된 IL-6, IL-1 β 및 COX-2의 mRNA 발현이 감소하였다. 한편, 산화적 스트레스로부터 세포 보호에 관여한다고 알려진 HO-1의 mRNA 발현에 대한 영향을 검토함으로써 PDGP의 항염증 효능이 항산화 효능과 관련된 것임을 규명하고자 하였다. Heme oxygenase는 heme이 bilirubin, Fe²⁺(iron), 일산화탄

소(CO)로 산화적 변성 과정에서 발현되는 효소로, 특히 HO-1의 경우 산화적 스트레스를 억제하기 위해 발현되는 세포내 항산화 활성 표지 인자로 알려져 있다⁸⁾. 특히 LPS의 자극을 받은 RAW 264.7 세포에서 HO-1은 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시킨다고 보고되었다. 본 실험에서 LPS의 처리에 의해 HO-1의 발현이 다소 유도되었으나, 이러한 발현 양상은 PDGP의 처리에 의해 보다 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 PDGP가 HO-1의 발현을 효과적으로 유도함으로써 LPS 자극에 의한 iNOS의 발현을 억제할 수 있으며, 이로 인해 결국 NO의 생성을 감소시켰음을 나타냄과 동시에, 저자 등이 이전에 보고했던 PDGP의 항산화 효능을 재확인하는 것임을 보여주고 있다. 따라서 PDGP의 항염증 효능이 항산화 활성과 관련된 것임을 보다 심도있게 규명하기 위하여 LPS로 유도된 ROS의 발생에 대한 효과를 H₂DCF-DA assay를 통해 형광현미경하에서 분석하였다. 형광분석 결과, LPS의 처리에 의해 현저하게 증가된 DCF-DA 발색 정도가 PDGP의 전처리로 인해 감소하였으므로, RAW 264.7 세포에서 LPS의 처리로 유도된 ROS의 발생을 PDGP가 억제함을 알 수 있었다. 또한, iNOS의 발현에 대한 PDGP의 영향을 규명하기 위해 단백질 수준에서 그 변화를 분석하였다. 그 결과, LPS로 유도된 NO의 생성 증가는 iNOS의 발현 증가를 통한 것임을 확인할 수 있었고, PDGP의 처리로 인하여 iNOS 발현이 감소됨을 알 수 있었다. 한편, Ref-1은 복합적 기능을 지닌 37 kD 단백질로 세포의 성장, 분화, 생존 및 사멸에 관여된 AP-1, NF- κ B, p53, Egr-1 및 c-Myb과 같은 산화환원에 민감한 세포내 다수 전사인자의 활성화에 관여하고¹⁴⁾, 산화적 스트레스 조건하에서 그 발현이 증가하며, 산화적 손상을 받은 DNA의 복구에도 관여한다고 알려져 있다^{15,16)}. 특히, 최근의 연구에 의하면 macrophage에 LPS로 자극을 가한 결과, Ref-1 단백질의 발현이 증가하였고, Ref-1을 siRNA로 저해한 다음

LPS로 자극할 경우에는 iNOS 발현이 억제되었다^{17,18)}. 이는 LPS로 자극한 대식세포에서 NO의 생성 증가는 Ref-1 단백질 발현 유도를 통한 iNOS의 발현 증가와 관련됨을 제시하고 있다. 따라서 PDGP가 Ref-1 단백질 발현에 어떠한 영향을 나타내는지 관찰하였다. 본 실험에서 Ref-1 단백질은 대조군과 LPS 단독 처리군에서 모두 발현되고 있었으나, PDGP의 처리에 의해 현저하게 감소됨을 관찰할 수 있었다.

V. 결 론

이상의 연구결과에서 松節 약침액은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성 증가와 IL-6, IL-1 β 및 COX-2 mRNA 발현 증가를 억제하였다. 또한 HO-1 발현을 유도함으로써 iNOS의 발현을 억제하고 NO 생성을 감소시킬 수 있으며, 염증성 자극에 의한 ROS의 생성 또한 억제하였다. 한편 Ref-1 단백질에 대한 발현을 억제함으로써 iNOS의 발현 및 NO를 생성을 저해하였다.

따라서 松節 약침액은 향후 산화적 손상과 관련된 병증 뿐 아니라, 염증성 질환의 치료에도 유용할 것으로 기대되며, 보다 심도 있는 연구가 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어졌음

참고문헌

1. Radosavljević T, Mladenović D, Vučević D, Vukićević RJ. The role of oxidative/nitrosative stress in pathogenesis of paracetamol-induced toxic hepatitis. *Med Pregl.* 2010 ; 63(11) : 827-32.

2. Tzeng YL, Datta A, Kolli VK, Carlson RW, Stephens DS. Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A : inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. *J Bacteriol.* 2002 ; 184(9) : 2379-88.
3. Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Current pharmaceutical design.* 1999 ; 5(6) : 417-41.
4. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 1993 ; 54(2) : 171-8.
5. Albina JE, Reichner JS. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz.* 1995 ; 3(1) : 46-64.
6. Lee SJ, Lim KT. Phytogly coprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 via p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn Schmi Arch Pharmacol.* 2008 ; 377 : 45-54.
7. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991 ; 266(7) : 4244-50.
8. Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem Pharmacol.* 2003 ; 66 : 1821-32.
9. Bornman L, Baladi S, Richard MJ, Tyrrell RM, Polla BS. Differential regulation and expression of stress proteins and ferritin in human monocytes. *J Cell Physiol.* 1999 ; 178(1) : 1-8.
10. 허준. 동의보감. 서울 : 법민문화사. 2007 : 832, 860, 2004.
11. 안덕균. 원색한국본초도감. 서울 : 교학사. 2006 : 346.
12. 임선희, 이강파, 문진영. 松節 약침액이 자유기와 금속 이온으로 유도된 인체 저밀도 지단백질의 산화 반응에 미치는 효과. *경락경혈학회지.* 2011 ; 18(2) : 23-36.
13. 中藥大辭典 편찬위원회. 中藥大辭典. 서울 : 도서출판 정담. 1997 : 2490-2.
14. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 1996 ; 271(50) : 32253-9.
15. Demple B, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease : definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci.* 1991 ; 88(24) : 11450-4.
16. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 1997 ; 15 : 351-69.
17. Song JD, Lee SK, Kim KM, Kim JW, Kim JM, Yoo YH, Park YC. Redox factor-1 mediates NF- κ B nuclear translocation for LPS-induced iNOS expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Immunology.* 2008 ; 124 : 58-67.
18. Jedinak A, Dudhgaonkar S, Kelley MR, Sliva D. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 regulates inflammatory response in macrophages. *Anticancer Res.* 2011 ; 31 : 379-85.