

清血散이 Redox Status 및 NF-κB 의존성 단백질에 미치는 영향

오정표 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Cheonghyul-San* on the Generation of Redox Status and on the Expression of NF-κB Dependent Proteins

Jeong Pyo Oh, Ji Cheon Jeong*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

The aim of this study was to investigate the effects of *Cheonghyul-san* on the generation of peroxynitrite (ONOO⁻), nitric oxide (NO) and superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), and on the expression of NF-κB-dependent proinflammatory proteins in ob/ob mice. Mice were grouped and treated for 5 weeks as follows. Both the normal lean (C57BL/6J black mice) and control obese (ob/ob mice) groups have received the standard chow. The experimental groups were fed with a diet of chow supplemented with 7.5, 15 and 30 mg *Cheonghyul-san* per 1 kg of body weight for 14 days. For this study, the fluorescent probes, namely 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein-2 (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used. Western blot was performed using anti-IKK-α, anti-phospho IκB-α, anti-NF-κB (p50, p65), anti-COX-2, anti-iNOS, anti-VCAM-1 antibodies, respectively. *Cheonghyul-san* prevented H₂O₂-induced cell death. *Cheonghyul-san* inhibited the generation of ONOO⁻, NO and $\cdot O_2^-$ in the H₂O₂-treated LLC-PK₁ cells. The generation of ONOO⁻, NO and $\cdot O_2^-$ were inhibited in the *Cheonghyul-san*-administered ob/ob mice groups. The GSH/GSSG ratio was decreased in the ob/ob mice, whereas the ratio was improved in the *Cheonghyul-san*-administered groups. *Cheonghyul-san* inhibited the protein expression levels of phospho-IκB-α, IKK-α, NF-κB (p50, p65), COX-2, iNOS and VCAM-1 genes. These results suggest that *Cheonghyul-san* is an effective scavenger of ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ and NO, and has an inhibitory effect on the expression of NF-κB-dependent inflammatory genes in ob/ob mice. Therefore, *Cheonghyul-san* might be used as a potential therapeutic drug against the diabetes- and obesity-related proinflammatory diseases.

Key words : *Cheonghyul-san*, peroxynitrite, IKK-α, IκB-α, NF-κB, COX-2, iNOS

서 론

Reactive oxygen species (ROS), cytokines, mitogens, bacterial lipids, viral transactivators 등을 포함한 다양한 자극이 발생하면 NF-κB inducing kinase (NIK)가 inhibitor κB kinase (IKK) 복합체를 활성화시키고 이어 inhibitor κB (IκB)의 인산화와 단백질 분해가 일어나고¹⁾, NF-κB가 핵내로 유입되어 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor α (TNF-α), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), interleukin-6 (IL-6) 등 염증 반응에 관련

된 단백질의 발현을 증가시키게 된다²⁾.

NF-κB는 염증 반응, 면역, 세포 분화, apoptosis에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 중심 역할을 하는 전사 인자로서¹⁾, 암, 당뇨병, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직 손상, 급성 염증, 독성/부패성 조직 손상 등을 포함하는 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다²⁾. 특히 노화 과정과 노인성 질환에 nuclear factor κB (NF-κB)의 활성화를 초래하는 ROS와 RNS 생성이 밀접한 관련이 있음이 보고되어, NF-κB는 노화 과정에서 발생하는 염증 과정에 중추적인 역할을 하는 대표적인 redox sensitive 전사 인자로 인식되고 있다^{3,5)}.

노화 과정 중의 염증 반응에서는 ROS와 reactive nitrogen species (RNS) 뿐만 아니라 COX-2, iNOS, xanthine oxidase (XOD) NADPH oxidase와 같은 활성종을 생성하는 효소들이 중

* 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1, 동국대 경주한방병원 2내과

· E-mail : jjcjh@paran.com, · Tel : 054-770-1265

· 접수 : 2009/02/06 · 수정 : 2009/03/02 · 채택 : 2009/03/20

요한 역할을 담당하고 있다. 노화에 대한 분자염증 (molecular inflammation) 가설에 의하면 노화 과정에 분자 수준에서 일어나는 염증 반응이 중요하게 관여하는데, 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 ROS의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 nitric oxide (NO)의 대량 생성이 peroxynitrite (ONOO) 생성을 더욱 증가시켜 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 및 노인성 질환을 초래한다고 하였다^{3,4)}. ONOO는 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 NO와 superoxide anion radical ($\cdot O_2$)이 반응하여 대량 생성되는데, 강한 조직 파괴력을 나타내므로 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있다⁶⁾.

한편 내장 지방 조직의 40%가 염증 관련 세포인 대식세포 (macrophage)로 구성되어 있고 비만에서 의미 있게 조절되는 유전자의 상당수가 지방 조직의 염증 유전자와 대식세포 유전자들이라는 것이 밝혀져 비만을 일종의 만성적인 염증 상태로 간주하는데 큰 증거를 제시하고 있다⁷⁾. 또한, 많은 염증 관련 유전자와 대식세포 특이적 유전자들의 고발현이 인슐린 농도가 증가하기 전에 일어나며, 인슐린 감도를 높이는 약물로 처치할 경우 이들 유전자들이 저발현되는 것으로 밝혀져 비만과 연관된 인슐린 저항성이 부분적으로 지방 조직에서 시작되는 만성적 염증 질환이라고 제시되었다⁸⁾.

淸血散은 저자들이 임상 경험을 통해 당뇨병과 고지혈증 및 비만의 치료에 효과적인 약물들을 선정하여 개발 중인 처방이다. 楡根皮 (*Ulmī Pumilae Radix et Cortex*), 龍膽 (*Gentianae Scabrae Radix*), 山藥 (*Dioscoreae Radix*), 滑石 (*Talcum*) 등으로 구성되어 淸熱 祛濕 利水 止渴 滋陰 등의 효능이 있다. 이전의 연구에서 淸血散은 혈당과 혈청 지질을 감소시키고 polyol pathway에 관여하는 효소들의 활성을 조절하며 활성산소를 소거시켜 oxidative stress를 감소시키는 것으로 보고되었다⁹⁾. 염증 반응은 동맥경화증과 당뇨병에 의한 혈관 변성 및 비만에서 잘 나타나므로 淸血散은 당뇨병과 비만에 관련된 염증에 대하여 억제 효능을 나타낼 것으로 기대된다.

본 연구에서는 淸血散이 LLC-PK₁ 세포에서 H₂O₂ 처리에 의한 세포사와 ROS, NO 및 ONOO-의 생성에 미치는 영향을 검토하고, ob/ob 마우스에서 ROS, NO 및 ONOO- 생성과 NF-κB와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

淸血散의 구성 약재는 시중 (옵니허브닷컴, 서울, 한국)에서 구입하고 정선하여 사용하였으며, 1일 분량은 다음과 같다(Table 1).

2) 시약 및 기기

Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA), Sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules,

USA), hydrogen peroxide, NP-40, CAPS, protease inhibitors, bovine serum albumine, potassium phosphate 는 Sigma-Aldrich chemical Co. (ST. Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan), 1차 항체인 IKK-α, IκB-α, p-IκB-α는 Cell Signaling Technology (Cell Signaling, USA), p50, p65, iNOS, COX-2, VCAM-1, β-actin, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다. 기기는 GENios (GENios-basic, TECAN, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다.

Table 1. Composition and Contents of *Chunghyul-san*

韓藥名	성약명	중량
楡根皮	<i>Ulmī Pumilae Radix et Cortex</i>	8 g
龍膽	<i>Gentianae Scabrae Radix</i>	7 g
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	5 g
滑石	<i>Talcum</i>	3 g
Total Amount		23 g

3) 동물

체중 30 g 내외, 5주령의 외관상 건강한 수컷 C57BL/6J 마우스와 ob/ob 마우스 (중앙실험동물, 서울, 한국)를 7일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22℃ 내외, 습도는 50%로 유지하고 light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 마우스용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 淸血散 460 g에 3배 량의 95% methanol을 가하고 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 66.34 g (수율 14.42%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 세포 배양

마우스의 신장세포인 LLC-PK₁ 세포를 경북대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 100π dish (Corning Co., New York, USA)에 배양하였다. 이때 5% fetal bovine serum, L-glutamine (5.84 μg/ml)과 L-sodium bicarbonate (2.438 g/ml)을 함유한 DMEM/F12 배지에 penicillin-streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 사용하였고, 37℃, 5% CO₂ incubator 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) MTT assay

淸血散이 H₂O₂에 의한 세포사로부터 세포를 보호하는 효과를 알기 위하여 Tada 등의 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. 노란색의 (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) 용액은 살아 있는 세포에서는 mitochondria의 succinyl dehydrogenase에 의해 비수용성인 보라색의 formazan으로 환원된다. 이 formazan의 발색 정도를 spectrophotometer로 측정하여 세포의 생존율을 측정함으로써 淸血散의 독성 및 세포보호 효과를 측정할 수 있다. LLC-PK₁을 96 well plate에 1×10^4 /well로 접종하여 24시간 배양하여 淸血散 추출물을 1시간 전처리하고 H₂O₂를 최종 농도 100 mM이 되도록 가하여 5시간 더 배양한 후 淸血散의 세포 보호효과를 측정하였다. 측정시에는 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간 추가 배양하고 solubilization 용액 (dimethyl sulfoxide:ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) LLC-PK₁ cell에서 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 소거능 측정

LLC-PK₁ 세포를 96 well plate에 1×10^4 /well로 분주한 후 하루 동안 배양한 다음 淸血散 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 후, H₂O₂ 100 mM을 처리하여 5시간 배양한 후 ·O₂⁻ 소거능은 DCFDA assay¹¹⁾, NO 소거능은 DAF-2 assay¹²⁾, ONOO⁻ 소거능은 Kooy 등의 방법¹³⁾에 의해 측정하였다.

5) 실험군 분류 및 검액의 투여

실험동물은 C57BL/6J 마우스로 정상군, ob/ob 마우스로 대조군, ob/ob 마우스에 淸血散추출물 7.5, 15, 30 mg/kg을 투여한 실험군 등 5군으로 나누었으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 淸血散추출물은 14일간 사료에 섞어 투여하였다.

6) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하고 신장을 채취하여 생리 식염수로 잘 씻어내고 Whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70℃에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 신장 조직의 일부에 4배 용량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉 하에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 600 × g에서 10분간 원심분리하고, 상층액을 8,000 × g에서 다시 20분간 원심분리하여 침전물인 mitochondria층을 분리하였으며 이를 제거한 상층액을 취하여 ROS, ONOO⁻, NO 및 GSH/GSSG 등의 측정을 위한 시료로 사용하였다. 또한 western blot 수행을 위해 신장 조직에 0.1 M HEPES, 1 M KCl, 30 mM MgCl₂, 0.1 M PMSF 등이 포함된 buffer를 가하여 균질화하고 ice에 20분간 방치한 후 10% NP-40을 넣고 12,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리한 상층액을 cytosol 분획으로 하였고 pellet에 0.1 M HEPES, 1 M KCl, 1 M NaCl, 0.1 M PMSF, 10% glycerol 등이 포함된 buffer를 가하여 resuspension하고 튜브를 vortexing를 해주면서 ice에 20분간 방치한 뒤 12,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 상층액을 nuclear 분획으로 하여 실험에 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 0~4℃에서 실시하였다.

7) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹¹⁾로 활성산소를 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 96 well microplate에 淸血散추출물을 농도별로 분주하고, 활성산소

생성원과 DCFDA를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다. 이때 활성산소 생성원으로 신장 균질액을 사용하였다.

8) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. Dimethyl sulfoxide 550 μl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하여 사용하였다. 96 well microplate에 淸血散추출물을 농도별로 분주하고, NO 생성원과 DAF-2를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다¹²⁾. 이때 NO 생성원으로 신장 균질액을 사용하였다.

9) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹³⁾에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 淸血散추출물을 농도별로 분주하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriamine penta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)을 첨가한 후, 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 신장 균질액을 사용하였다.

10) GSH/GSSG 비율 측정

GSH/GSSG 비율은 Gaitonoide의 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다. GSH는 조직 균질액에 0.1 M phosphate buffer와 OPT 시약을 넣고 30분간 방치 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였고, GSSG는 조직 균질액에 NEM 시약을 넣고 30분 방치후 0.5 N NaOH 와 OPT 시약을 넣고 25분간 방치 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다

11) Western blot analysis

마우스에서 적출한 신장 조직 균질액의 cytosol, nuclear 분획에서 단백질을 분리하여 발현을 관찰하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질들을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단시키고 각 표적 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 다음 2차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

12) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

13) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로

표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

결 과

1. LLC-PK₁ 세포에서 H₂O₂ 처리에 대한 보호 효과

LLC-PK₁ 세포에 H₂O₂ 100 mM을 처리하였을 때 세포 생존율이 58.21%였으나, 清血散추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800 μg/ml로 전처리한 세포는 생존율이 각각 59.67, 65.99, 75.01, 82.27, 79.20, 68.03%로 나타나 200 μg/ml까지는 농도 의존적으로 H₂O₂에 의한 세포사가 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 1).

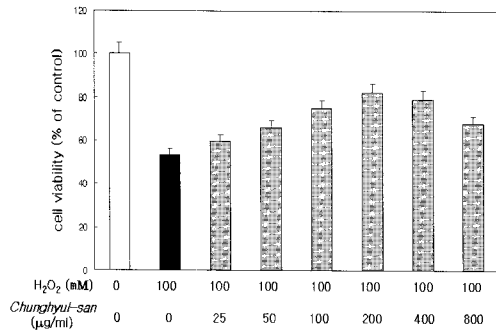


Fig. 1. Cytoprotective effect of *Chunghyul-san* on H₂O₂-induced cell death in LLC-PK₁ cells. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Chunghyul-san* (25, 50, 100, 200, 400, 800 μg/ml). After 5hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean±S.D.

2. LLC-PK₁ 세포에서 H₂O₂ 처리로 유도한 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

·O₂⁻는 정상 세포에서 117.27±6.58 fluorescence/min인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 165.98±9.27 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 清血散 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 200 μg/ml 농도에서 141.35±8.59 fluorescence/min, 400 μg/ml 농도에서 129.68±8.77 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2A). NO는 정상 세포에서 55.09±5.67 fluorescence/min인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 110.87±7.46 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 清血散 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 200 μg/ml 농도에서 95.54±5.21 fluorescence/min, 400 μg/ml 농도에서 87.46±7.00 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2B). ONOO⁻는 정상세포에서 177.55±8.35 fluorescence/min인데 비하여 H₂O₂ 처리에 의해 283.77±13.59 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 清血散 추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 200 μg/ml 농도에서 260.58±11.93 fluorescence/min, 400 μg/ml 농도에서 245.67±11.63 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3).

3. ROS, NO 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

ROS 생성은 정상군에서 19.27±1.77%였으나 대조군에서는 49.08±3.96%로 증가되었다. 清血散추출물을 7.5, 15, 30 mg/kg 투

여한 실험군에서는 각각 46.22±3.65, 43.27±3.59, 39.87±3.71%로 감소되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다 (Fig. 4A). NO 생성은 정상군에서 12.38±1.05%였으나 대조군에서는 28.95±1.99%로 증가되었다. 실험군에서는 각각 28.65±3.34, 26.58±3.11, 22.47±2.99%로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 4B). ONOO⁻ 생성은 정상군에서 8.75±0.59%였으나 대조군에서는 32.88±2.17%로 증가되었다. 실험군에서는 각각 29.65±2.92, 28.09±2.77, 23.08±2.68%로 감소되어 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 5).

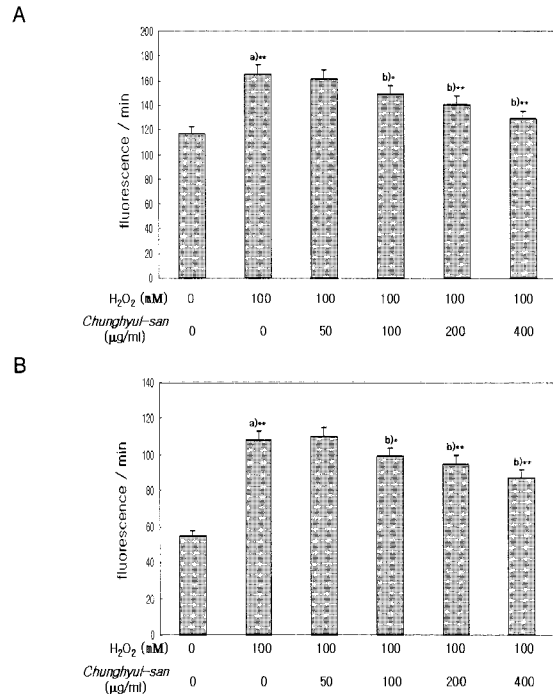


Fig. 2. Effect of *Chunghyul-san* on ROS and NO generation in LLC-PK₁ cells. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Chunghyul-san* (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05). A : The generation of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe. B : The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe.

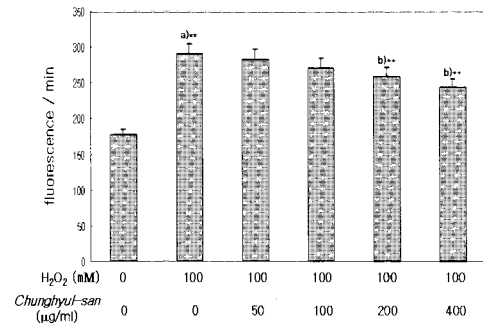


Fig. 3. Effect of *Chunghyul-san* on ONOO⁻ generation in LLC-PK₁ cells. Cells were exposed to H₂O₂ (100 mM) in the presence and absence *Chunghyul-san* (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01). The generation of ONOO⁻ was measured by DHR 123 fluorescence probe.

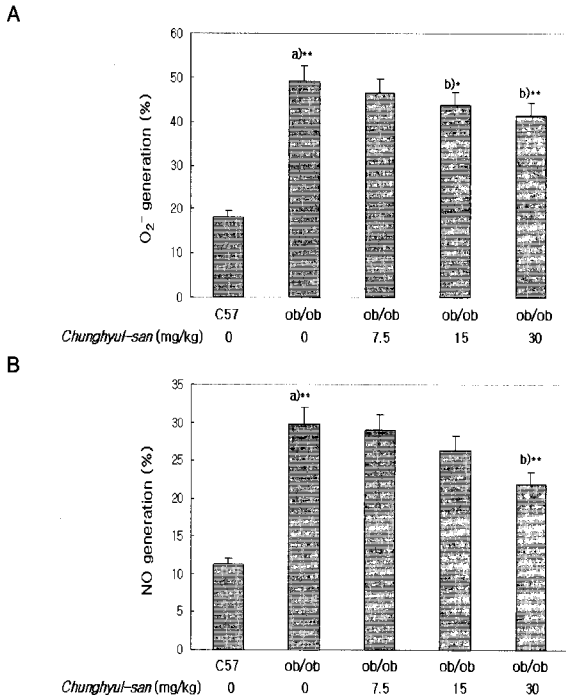


Fig. 4. Effect of *Chunghyul-san* on ROS and NO generation in mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05). A. The generation of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe, B. The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe.

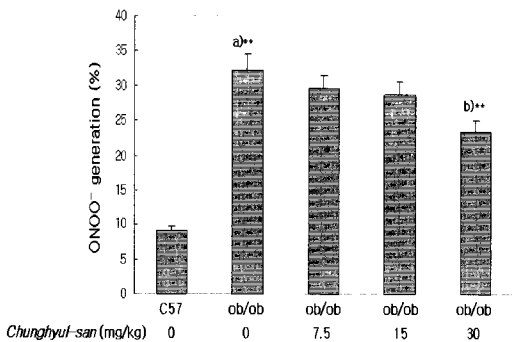


Fig. 5. Effect of *Chunghyul-san* on ONOO⁻ generation in mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01). C. The generation of ONOO⁻ was measured by DHR 123 fluorescence probe.

4. GSH/GSSG 비율에 미치는 영향

정상군에서 GSH와 GSSG의 비율은 0.17±0.01%였으나 대조군에서는 0.06±0.01%로 유의하게 감소되었다. 실험군에서는 각각 0.19±0.01, 0.22±0.02, 0.28±0.02%로 증가되어 15, 30 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 6).

5. IKK-α, p-IκB-α에 미치는 영향

NF-κB 활성화에 관여하는 신호전달계인 IKK-α, p-IκB-α에 미치는 영향을 검토한 결과 대조군에서 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7).

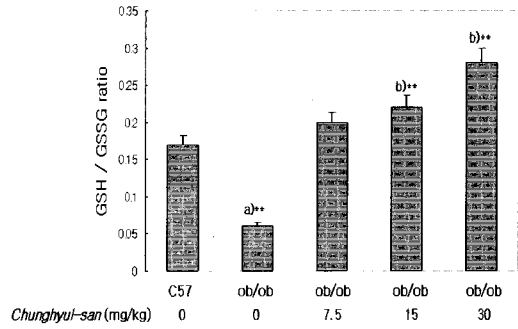


Fig. 6. Effect of *Chunghyul-san* on GSH/GSSG level in mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01).

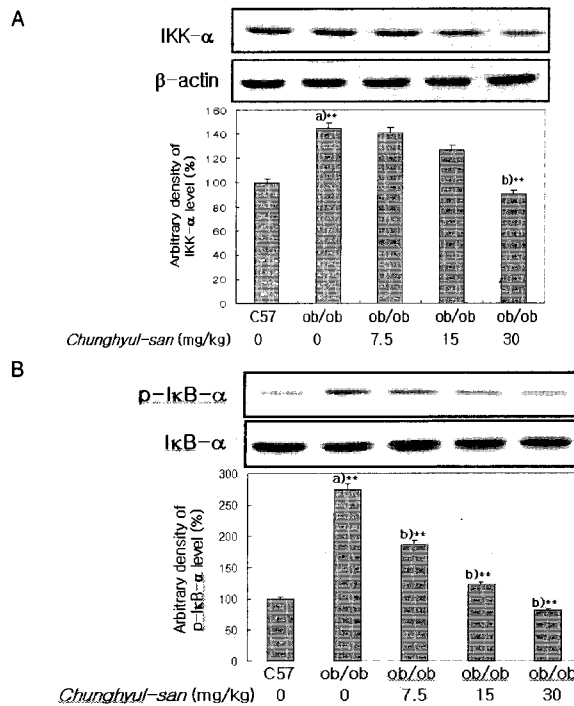


Fig. 7. Effect of *Chunghyul-san* on IKK-α and IκB-α expression. Western blot was performed to detect IKK-α and IκB-α protein levels in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A. IKK-α protein, B. IκB-α protein

6. NF-κB 단백질 양에 미치는 영향

NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NF-κB의 subunit인 p50와 p65의 핵내 양을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 8).

7. 염증 촉진 인자의 발현에 미치는 영향

淸血散추출물이 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS의 단백질 양에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 9). 염증 관련 접착분자 단백질인 VCAM-1의 단백질 양에 미치는 영향을 관

찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나, 清血散주출 물을 투여한 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 10).

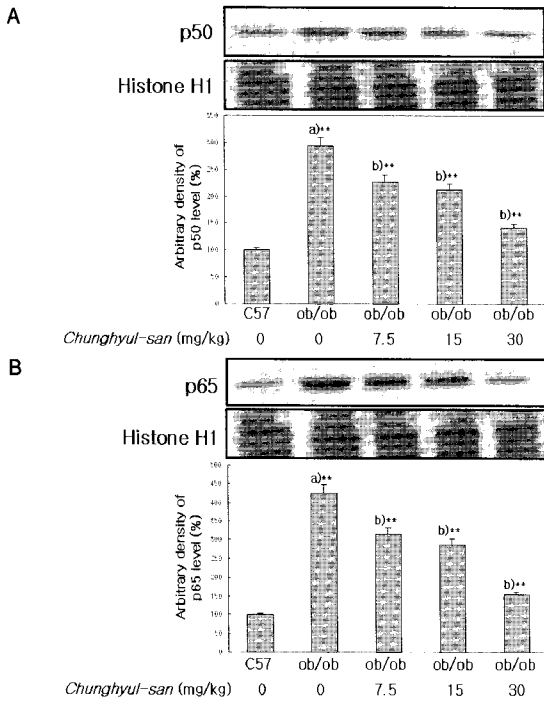


Fig. 8. Effect of *Chunghyul-san* on NF-κB expression. Western blot was performed to detect NF-κB protein levels in nuclear fractions from mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal; b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

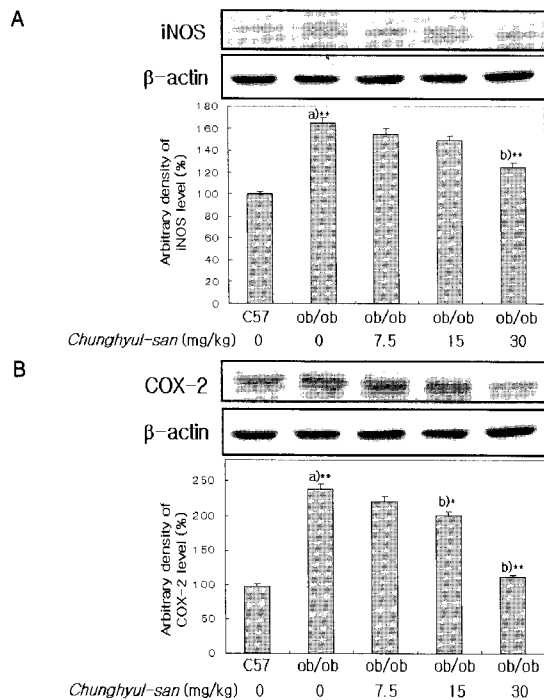


Fig. 9. Effect of *Chunghyul-san* on iNOS and COX-2 expression. Western blot was performed to detect iNOS and COX-2 protein levels in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal; b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05). A. iNOS protein, B. COX-2 protein.

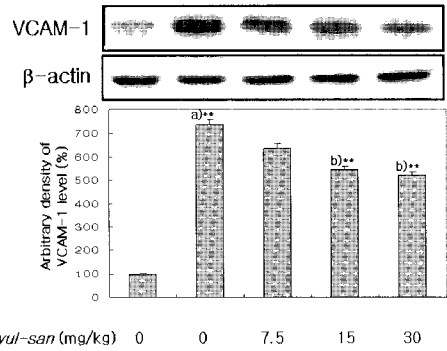


Fig. 10. Effect of *Chunghyul-san* on VCAM-1 expression. Western blot was performed to detect VCAM-1 protein levels in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated with *Chunghyul-san* (7.5, 15, 30 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal; b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

고찰

清血散은 임상에서 당뇨병과 고지혈증 및 비만의 치료에 활용되는 약물 가운데 탁월한 효과를 나타내는 약물들을 선정하여 개발 중인 처방이다. 구성 약물 중 楡根皮는 느릅나무의 코르크층을 벗긴 樹皮 및 根皮를 건조한 것으로 利水, 通淋, 消腫, 除邪氣, 久服輕身不飢 등의 효능으로 小便不通, 淋濁, 水腫, 癰疽發背, 丹毒, 疥癬 등의 치료에 사용되어 왔다^{16,17}. 실험 연구에 의하면 암세포 성장 억제 효과¹⁸, 항산화 효과¹⁹, 소염 및 면역 증진 효과²⁰ 등이 있는 것으로 보고되었다. 龍膽은 瀉肝膽火邪, 除下焦濕熱 등의 효능이 있어 肝經熱盛, 目赤, 咽痛, 熱痢, 陰部濕癢 등을 비롯한 염증성 질환의 치료에 사용되어 왔다²¹. 山藥은 健脾止瀉, 補肺, 固腎, 養陰益精, 止渴 등의 효능으로 虛損勞傷, 健忘, 遺精, 消渴 등의 치료에 사용되어 왔으며^{17,21} 혈당 강하에 유효하다는 실험 보고가 있다²². 滑石은 滲濕利竅, 瀉熱利水 등의 효능으로 中暑積熱, 嘔吐煩渴, 水瀉熱痢, 石淋 등의 치료에 활용되어 왔다²¹. 그러므로 清血散은 清熱 祛濕 利水 止渴 滋陰 등의 효능을 나타내어 당뇨병과 그 합병증 및 비만에 관련된 염증에 대하여 억제 효과를 나타낼 것으로 기대하고 본 실험을 시도하였다.

비만은 전신적 지방산의 과잉 배출, 지방조직의 크기 팽창 및 지방조직의 미세 허혈, 세포체의 스트레스, 그리고 염증반응들 간의 복잡한 상호 작용을 통해 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 제시되고 있다. 또한 비만에서 대식세포가 염증 전파와 인슐린 저항성 유도에 중요한 역할을 하는 세포라는 가설이 제시되었다²³. 즉, 염증은 2형 당뇨병과 인슐린 저항성의 대사성 장애의 기초가 되고 있다. 대식세포의 활성화는 염증을 증폭시키고 대식세포로 분비되는 adipokine에는 leptin, TNF-α, resistin, adiponectin 등이 있다. 이들 adipokine들은 체내 에너지 상태에 따라서 그 발현이 조절되며, 중추신경계와 말초조직에 작용하여 인슐린 감수성, 지방산 산화와 당대사, 식욕 등을 조절하여 생체 에너지 대사의 조절에 있어서 중요한 역할을 담당한다²⁴. 비만에서 동반되는 인슐린 저항성 및 이와 연관된 대사장애들은 이러한 adipokine들과 밀접히 관련되어 있다. 비만에서 과도한 지방조직의 증가는 지방세포의 유전자 발현과 신호전달 체계의 변화를 초래하여 adipokine 분비의 이상을 유발한다. 이러한

adipokine 분비의 이상이 비만에서 제2형 당뇨병과 동맥경화성 심혈관질환 등과 같은 대사성 질환의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다²⁵⁾.

당뇨병 환자와 당뇨병 실험동물에서 ROS의 생성이 증가되어 있고, 증가된 ROS가 혈관의 인슐린 저항성을 유발하고 이 과정에서 혈관세포의 증식 이상과 관련된 세포내 신호전달 체계가 활성화되어 당뇨병성 혈관합병증이 발생할 것으로 추측하고 있다^{26,27)}.

Cytokine과 염증 촉진 인자의 활성화는 혈관의 변성을 가져와 혈관 투과성의 증가를 초래함으로써 염증 반응을 일으킨다. 산화적 스트레스를 받은 혈관내피세포는 혈관의 노화를 야기하고, 이로 인해 NF-κB의 활성화와 함께 염증 반응을 유도하여 개체의 노화가 진행된다는 것이다. 염증 반응과 혈관 변성에서 NF-κB 활성화는 IL-1β, IL-6와 TNF-α을 포함하는 일부 주요 염증 촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하고 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증의 발생에 중요한 역할을 한다²⁸⁾. 동맥경화증은 혈관 노화의 대표적인 예로서 지속적인 NF-κB의 활성화에 의한 염증 및 혈관 평활근 세포의 증식과정으로 인해 일어난다. 동맥경화 병변 부위에서 평활근세포, 대식세포 및 혈관내피세포의 NF-κB 활성이 증가되어 있다^{29,30)}.

먼저 LLC-PK₁ 세포에 H₂O₂를 처리하였을 때 세포 생존율이 저하되었으나 淸血散추출물을 농도별로 전처리한 경우에 농도 의존적으로 세포사가 억제되는 것으로 나타났다. LLC-PK₁ 세포에 H₂O₂를 처리하여 ROS/RNS 생성을 유도한 결과 ROS와 NO 생성이 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물을 전처리한 경우에 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 ONOO⁻도 H₂O₂를 처리에 의해 생성이 증가되었으나 淸血散추출물 전처리에 의해 유의하게 감소되었다.

본 실험에서는 ROS에 의한 염증 반응이 진행되는 ob/ob 마우스를 대상으로 ONOO⁻, NO 및 ROS에 대한 생성 저해능을 검토하고, 염증 반응에 관여하는 단백질에 미치는 영향을 검토하였다. ob/ob 마우스는 유전적 고혈당 비만 마우스로서 비만은 3주령에서부터 나타나기 시작하여 정상 마우스의 3배 가까이 된다. 체지방의 증가와 함께 인슐린 저항성이 나타나며 계속해서 고혈당과 고인슐린혈증을 보여 2형 당뇨병과 유사한 임상적 특성을 나타낸다^{31,32)}. ob/ob 마우스에서 ROS와 NO 생성이 현저하게 증가되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 ONOO⁻도 ob/ob 마우스에서 생성이 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의하게 억제되었다.

GSH/GSSG 비율에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob 마우스에서 유의하게 감소되었으나 淸血散추출물을 투여한 경우에 유의성 있게 증가되었다. ob/ob 마우스에서 GSH가 감소되고 GSSG가 증가되었으나 淸血散추출물 투여군에서는 GSH가 증가되고 GSSG가 감소된 것이다. 생체내의 ROS를 소거시키는 항산화 물질인 GSH는 GSH peroxidase에 의해 H₂O₂를 제거하면서 GSSG로 전환되고, GSSG는 GSH reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원된다³³⁾. 그러므로 淸血散추출물은 GSSG를 GSH로 환원시켜 ROS에 의한 조직 손상을 효과적으로 방어하는 것으로 여겨진다.

염증 반응 신호 전달 과정의 초기 단계인 IKK-α 및 IKK-β 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob 마우스에서 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 또한 NF-κB 활성화에 관여하는 IκB-α 단백질은 ob/ob 마우스에서 인산화가 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 감소되는 것으로 나타났다.

NF-κB 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob mouse에서 핵내의 p50, p65 단백질 양이 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 그러므로 淸血散추출물은 NF-κB의 활성화로 인한 여러 가지 염증 촉진 단백질의 발현을 억제하여 염증 과정을 조절하는 것으로 여겨진다.

COX-2는 뇌를 제외한 대부분의 조직에서는 자극이 없으면 나타나지 않지만 급만성 염증 등과 같은 병태화적인 조건에서는 고농도로 유리된다³⁴⁾. 또한 성장인자와 mitogen에 유도되어 지속적인 prostaglandin 분비를 통한 다양한 만성 염증 질환, 즉 류머티스성 관절염, 궤양성 대장염, Crohn's disease, helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 간경변 유발시 혈관 이완과 혈관신생에도 관여한다^{35,36)}.

iNOS는 L-arginine과 분자산소에 의하여 NO의 생성 반응을 촉매하는 효소로서, iNOS에 의해 일시적으로 대량 생산되는 NO는 세균, 바이러스, 종양세포 등에 대한 생체 방어 반응을 담당한다. 그러나 iNOS의 과잉 유도가 지속될 경우 과량으로 생성된 NO는 생체에 대하여 장해 인자로 작용하여 유해한 결과를 초래한다. 또한 국소적으로 iNOS의 과잉 발현을 유발하는 질환으로 만성 관절염, 심근염, 사구체염, 인슐린 의존성 당뇨병, 과민성 대장염 등이 있다³⁷⁾.

VCAM-1은 IL-1, IL-6, TNF-α 등과 같은 염증성 cytokine에 의해 유도되거나 상승 발현되는 접착분자 단백질로서 단핵 백혈구가 염증 장소로 유입되도록 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 염증질환 발생 시에 과량으로 발현되어 과도한 염증 반응을 유발하게 된다^{38,39)}.

본 실험 결과 ob/ob 마우스에서 COX-2, iNOS 단백질의 발현이 증가되었으나 淸血散추출물 투여에 의해 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다. 또한 VCAM-1의 발현이 증가된 것을 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 淸血散추출물이 ROS와 RNS를 저해하는 효과에 의해 염증인자 단백질의 발현을 저해시키는 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 淸血散추출물은 ROS와 RNS의 생성을 억제하고 IκB가 인산화되는 것을 억제하여 NF-κB가 핵 속으로 이동하지 못하게 함으로써 NF-κB에 의해 조절받는 COX-2, iNOS 및 VCAM-1 등의 염증 촉진 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 미세염증 반응의 억제를 가져와 당뇨병과 비만에 관련된 염증성 질환에 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다.

결론

淸血散이 당뇨병과 비만에 관련된 염증 억제 효능이 있는지

를 확인하기 위하여 ob/ob 마우스에서 ROS, NO 및 ONOO⁻에 대한 제거능 및 NF-κB와 관련된 염증성 단백질 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 清血散추출물은 H₂O₂를 처리한 LLC-PK₁ 세포에서 농도 의존적으로 세포사를 유의성 있게 억제시키고 ROS, NO 및 ONOO⁻ 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. ob/ob 마우스에서 ROS, NO 및 ONOO⁻ 생성이 증가되었으나 清血散추출물 투여에 의해 유의성 있게 감소되었다. ob/ob mouse 에서 GSH/GSSG 비율이 감소되었으나 清血散추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다. 清血散추출물 투여는 ob/ob mouse에서 증가된 IKK-α, p-IκB-α 및 NF-κB (p50, p65)의 발현을 억제시켰다. 또한 ob/ob mouse에서 염증 촉진인자인 COX-2, iNOS 및 VCAM-1의 발현이 증가되었으나 清血散추출물 투여에 의해 억제되었다. 이상의 결과로서 清血散은 ROS, NO 및 ONOO⁻를 효과적으로 소거하고 IκB가 인산화되는 것을 억제하여 NF-κB 활성을 조절함으로써 COX-2, iNOS, VCAM-1 등의 염증 촉진 단백질의 발현을 억제하여 당뇨병과 비만에 관련된 염증 및 염증성 질환에 유용한 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

참고문헌

- Luo, S.F., Wang, C.C., Chien, C.S., Hsiao, L.D., Yang, C.M. Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells : involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B pathways. *Cell Signal*. 15: 497-509, 2003.
- Korhonen, P., Helenius, M., Salminen, A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci Lett*. 225: 61-64, 1997.
- Chung, H.Y., Kim, H.J., Jung, K.J., Yoon, J.S., Yoo, M.A., Kim, K.W., Yu, B.P. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology*. 10: 207-222, 2000.
- Chung, H.Y., Kim, H.J. and Kim, J.W. The inflammation hypothesis of aging : Molecular modulation by calorie restriction. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 928: 327-335, 2001.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K.J., Kim, H.J., Goto, S. Age-associated increase in oxidative stress and unclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*. 18: 749-750, 2004.
- Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P., Chung, H.Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression : NF-κB activation and IκBα degradation. *Free Radical Biol Med*. 28: 683-692, 2000.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112: 1796-1808, 2003.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 112: 1821-1830, 2003.
- 한상태, 정지천. 清血散이 ob/ob mouse의 혈당, 고지혈증, polyol pathway 및 reactive oxygen species에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 22(2):350-356, 2008.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 93: 157-165, 1986.
- Cathcart, R., Schwiers, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem*. 134: 111-116, 1983.
- Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem Tokyo*. 125: 658-661, 1999.
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 16: 149-156, 1994.
- Gaitonide, M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cystein in the presense of other naturally occuring amino acid. *Biochem. J*. 104: 627, 1967.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275, 1951.
- 孫星衍 輯. 神農本草經. 北京, 科學技術文獻出版社, p 39, 1999.
- 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 上海, 上海科學技術出版社, pp 166-168, 2438-2439, 1984.
- Han, K.J., Lee, K.S., Kong, K.H., Cho, S.H. Separation and purification of substance having matrix metalloproteinase-9 inhibition effect in *Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* Nakai. *Anal Schi technol*. 16: 179-184, 2003.
- 정창주. 楡根皮추출물이 흰쥐의 항산화계 및 지질대사에 미치는 영향. *조선대학교 대학원 박사학위논문*, 2006.
- 이환용. 楡根皮의 소염 및 면역 증진 효과. *경희대학교 대학원 박사학위 논문*, 2005.
- 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 113-114, 271-272, 492-493, 1981.
- 송효정. 六味地黃湯加山藥이 Alloxan 당뇨 백서의 혈당 및 혈청 변화에 미치는 영향. *경희의학*, 8(4):388-398, 1992.
- Steinberg, G.R. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle*. 6: 888-894, 2007.
- Berg, A.H., Combs, T.P., Scherer, P.E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 13: 84-89, 2002.

25. Frühbeck, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 456: 1-22, 2008.
26. Cai, H., Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844, 2000.
27. Matsubara, T., Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 137: 3295-3298, 1986.
28. Chung, H.Y., Kim, H.J., Shim, K.H., Kim, K.W. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process : role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev.* 111: 97-106, 1999.
29. Maziere, C., Auclair, M., Djavaheri-Mergny, M., Packer, L., Maziere, J.C. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF- κ B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int.* 39: 1201-1207, 1996.
30. Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C.A., Hagl, S., Libby, P., Kubler, W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1623-1629, 1999.
31. Mordes, J.P. and Rossini, A.A. Animal models of diabetes mellitus. *Am J Med.* 70(2):353-360, 1981.
32. Eleazar, S. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes metabolism reviews.* 8(3):179-208, 1992.
33. Vendemiale, G., Altomare, E., Grattagliano, I., Albano, O. Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. *J hepatol.* 9: 359, 1989.
34. Chung, H.Y., Sung, D.Y., Kim, A.R., Choi, H.R., Kim, H.J., Choi, J.S., Yang, R., Lee, K.H., Yu, B.P. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO⁻: Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.* 10: 46-59, 2000.
35. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver disease. *J Hepatol.* 17(2):S38-40, 1993.
36. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 93(5):705-716, 1998.
37. Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Chio, J.S., Yu, B.P. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Techniq.* 59: 264-272, 2002.
38. Baran, D., Vendeville, B., Ogborn, M., Katz, N. Cell adhesion molecule expression in murine lupus-like nephritis induced by lipopolysaccharide. *Nephron.* 84: 167-176, 2000.
39. Lakshminarayanan, V., Beno, D.W., Costa, R.H., Roebuck, K.A. Differential regulation of interleukine-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem.* 272(52):32910-32918, 1997.