

Gold Sodium Thiomalate에 의한 유도성 Nitric Oxide Synthase Gene의 발현억제: Gold 제제와 Sodium Salicylate의 차이점

임종호 · 배진영
을지의과대학교 약리학 교실

Gold Sodium Thiomalate Inhibits iNOS Gene Expression in RAW 264.7 Macrophage: Differential Regulation by Gold Sodium Thiomalate and Sodium Salicylate

Jong Ho LIM and Jin Young BAE

Department of Pharmacology, College of Medicine, Eulji University

(Received November 27, 2002 ; accepted December 6, 2002)

Abstract – Gold sodium thiomalate (GST, gold compound) is a widely used anti-arthritic, anti-rheumatic and anti-inflammatory drug that is considered a good alternative to sodium salicylate (NaSA) for individuals who cannot tolerate salicylates. Nitric oxide (NO) synthesized by inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been implicated as a mediator of inflammation. Recent evidence suggests that anti-inflammatory effect of NaSA lies in the inhibition of iNOS, but nothing has been reported about the direct effect of iNOS expression by GST. The present study was designed to elucidate sequentially the action mechanisms of GST and NaSA on lipopolysaccharide (LPS) plus interferon-gamma (IFN- γ) induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages. Both GST and NaSA inhibited NO production and iNOS protein expression in a dose dependent manner. GST inhibited iNOS mRNA expression induced by LPS plus IFN- γ , whereas NaSA did not. These findings suggest that GST may exert anti-arthritic, anti-rheumatic and anti-inflammatory effect by inhibiting iNOS expression induced by LPS plus IFN- γ at transcriptional level, whereas NaSA exert its effect by inhibiting iNOS expression at the translational or posttranslational level.

Key words □ RAW, iNOS, NO, GST (gold sodium thiomalate), NaSA (sodium salicylates)

1. 서 론

NO (Nitric Oxide)는 자연계에 비교적 널리 존재하는 단순하고 불안정한 질소계 라디칼 중에 하나로, *in vivo* 와 *in vitro*에서 다양한 생리적 또는 병태·생리적 기능을 수행하는 것으로 근자에 집중적으로 연구 보고되고 있다 (Schmidt *et al.*, 1994). 일반적으로, 일정하게 발현되는 cNOS (constitutive Nitric Oxide Synthase)로부터 생성된 NO는 생체의 항상성(homeostasis) 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 반면에 유도성 iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)로부터 생성된 NO는 염증반응과 조직손상의 회복에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다(Nathan *et al.*, 1994). NO의 생산은 류마티스 관절염, 크론씨병, 궤양성 대장염 등에서 염증이 진행

중인 동안에 크게 증가하였고, 반면에 NOS억제제의 사용으로 NO 생산이 감소되면 염증의 징후인 혈관투과성과 홍반이 크게 감소됨이 관찰되었다(Washington *et al.*, 1999, Veihelmann *et al.*, 1999). 최근에는 NO가 cyclooxygenase-2와 상호작용하고, 이 효소를 활성화시켜 염증물질인 prostaglandin의 합성을 증가시키고, 그러므로 염증반응을 조장한다는 것이 보고되었다(Chen *et al.*, 2001, Berg *et al.*, 1999). LPS와 cytokine들이 이런 염증반응에 아주 중요한 매개자로 작용하고, 이들은 주로 NF- κ B로 대표되는 전사조절 인자들을 조절하여 NO 생산을 조절하고 결국 염증 반응을 조정한다고 알려져 왔다. 즉 이들 전사인자의 일부는 iNOS Gene의 promoter에 결합하고, iNOS m-RNA의 생산을 자극하여 결국 NO의 생산량을 늘리고 이것이 염증반응을 일부 촉진하는 것으로 알려져 왔다(Jacobs *et al.*, 2001, Whan *et al.*, 2001).

금제제(gold compound)는 1890년 코흐(Robert Koch)가

*To whom correspondence should be addressed.

결핵균 치료에 사용한 이후로 강력한 소염제, 면역조정제로 정확한 기전은 모른 채 오랜 동안 사용되어 왔고, 오늘날 chrysotherapeutic agent라 하여 난치성 류마티스 관절염에 많이 사용되고 있다(Dimartino *et al.*, 1997). 지금까지 알려진 기전은 lysosomal enzyme들의 유리를 막아서 염증 반응을 억제시킨다는 보고(Finkelstein *et al.*, 1997)와 단핵구, 백혈구, 대식세포의 화학주화성을 조정하여 소염작용을 한다는 보고들이 있다(Liu *et al.*, 2000; Hirohata *et al.*, 1999, Yanni *et al.*, 1994). 또한 면역 글로블린의 활성이나 수준(양)에 영향을 주어 체액성 면역반응을 조정한다는 연구도 많고(Friedman *et al.*, 1990, Honoki *et al.*, 1998), 세포 매개성 면역에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2001). 최근에는 각종 암세포배양주에서 금제제가 DNA, RNA, 단백질 합성을 억제하고, 여러 가지 cytokines의 대사에 영향을 주는 것으로 알려지고 있으나(Yamada *et al.*, 1999), 아직 금제제의 소염기전에 대해 이렇다할 결론은 없는 형편이다.

최근에 금제제(auranofin)가 NF- κ B의 활성을 억제, cyclooxygenase-2 발현이 억제되고 결국 prostaglandin E 등 염증 전구물질의 합성이 줄게되는데, 이것이 소염작용의 기전이라는 보고가 있었다(Yamada *et al.*, 1999). NO의 양과 염증반응이 상당히 밀접한 관계가 있음이 다수 보고되고 있는 상황에서, 소염제라고 알려진 금제제와 iNOS Gene의 발현 및 NO의 생산에 대해서는 연구된 바가 없었다. 그리하여 당연히 추측되는 금제제의 NO 관련성 소염 기전을 알아보하고자 이 실험을 계획하였다. 본 실험은 이미 NO 관련성이 잘 알려진 sodium salicylate를 비교대상으로 하여(Ryu *et al.*, 2000), 아직도 류마티스 관절염에 자주 투여되고 있는 금제제인 GST의 소염기전 일부를 규명하고자 시행하였다.

3. 실험재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin 등은 GIBCO-BRL사에서, anti-mouse iNOS antibody, anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody는 Transduction Lab.사에서, recombinant mouse IFN- γ 는 Genzyme사에서, Poly (dI-dC), ECL western blotting reagent는 Amersham사에서, TRIzol reagent는 GIBCO-BRL사에서, RNazol B는 BIOTECK사에서, phenol, chloroform, ethyl alcohol은 Merck사에서, PCR minic construction kit는 Clontech사에서, protein assay kit, acrylamide, bis-acrylamide는 Bio-Rad사에서, agarose는

FMC사에서, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane은 Millipore사에서, oligo-dT, dNTP, Taq. Polymerase, molony murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) 등은 Promega사에서, Lipopolysaccharide (LPS), sodium dodecyl sulfate (SDS), Tris-Cl, Trizma-base, Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), DMSF, Leupeptin, DTT, Ethidium bromide, sulfanilamide, Tween-20, HEPES, Bovine serum albumin, sodium salicylate (NaSA) 등은 Sigma사에서 구입하였으며, Gold sodium thiomalate는 Merck사의 Myochrysin을 D10 (DMEM+10% FBS)에 녹여 사용하였다. 이외 다른 시약들은 특급의 것을 사용하였다.

세포배양

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 미국 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하였으며, 세포배양은 37°C, 5% CO₂ 및 95% 공기로 유지되는 incubator (Nuair Co.)를 사용하였으며, sodium pyruvate (1 mM), proline (1 mM), insulin (10⁻⁷M), penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 units/ml)과 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다.

Nitrate의 측정

RAW 264.7 세포에서 LPS, cytokine, sodium salicylate (NaSA), gold sodium thiomalate (GST) 처리후 유리되는 NO의 양은 그 산화물인 nitrite를 Griess 반응을 이용하여 colorimetric 방법으로 측정하였다. 각 약물처리 12시간 후 각 배양액 100 μ l와 Griess 용액(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylendiamine dihydrochloride) 100 μ l를 취하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계(ELISA reader, Titertek Multiscan MCC/340, Finland)를 사용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 결과는 sodium nitrite 농도에 따른 흡광도의 표준곡선을 이용하여 nitrite의 생성량을 측정하였다.

Western blot analysis

LPS, cytokine, NaSA, GST (Gold sodium thiomalate) 처리 후 이들 약물들이 RAW 264.7 세포에서 직접적으로 iNOS 단백질의 생성에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여, Laemmli의 discontinuous buffer system에 준하여 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 실시한 후 western blotting을 실시하였다. 즉 분리한 세포내 단백질 약 50 μ g을 100°C에서 5분간 가열한 후 얼음에 급냉시켜 denaturation 시킨 후 이를 8% polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후 이를 PVDF membrane으로 전기적 전사를 실시하였다. 전사시에는

western blot chamber내에서 20% methanol이 함유된 0.025 M Tris-Cl/0.192 M glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 10 volt에서 12시간 이상 전사하였다. 전사 후 PVDF membrane을 5% skim milk/PBS에서 1시간 blocking 한 후 PBS로 5분간 3회 진탕 세척하였다. 이어 PBST (PBS/0.02% Tween 20) 용액내에서 iNOS에 대한 monoclonal antibody (1차 항체)와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 2차 항체인 horseradish peroxidase conjugation 되어 있는 immunoglobulin G에 1시간 반응시킨 후 PBST 용액으로 3회 세척한 후 ECL western blotting detection kit를 이용하여 autoradiography를 실시하였다.

세포내 RNA 분리

세포에서 약물의 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 먼저 total RNA를 Karlinsey등의 방법을 변형한 방법으로 분리하였다. 즉 RAW 264.7 세포를 LPS, cytokine, NaSA (sodium salicylate), GST (Gold sodium thiomalate)로 처리 6시간 후, 차가운 PBS로 2회 세척하고 total RNA isolation reagent (GIBCO-BRL, 1 µl/10 cm dish)로 용해시켰다. 다음 100 µl의 chloroform을 가하여 15초간 혼합하고, 상온에서 15분간 방치한 후 4°C, 12,000 rpm (Hanil, MICRO 17R)에서 20 분간 원침하여 얻은 상청액에 동량의 isopropranolol을 가하고 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원침 하였다. 원침된 pellet을 DEPC가 함유된 80% ethanol 1 ml를 가하여 RNA를 침사시키고, 이를 공기중에서 말린 다음 20 µl의 RNase free water에 부유시켰다. 처리가 끝난 RNA 용액은 spectrophotometer (Beckman, DU-650, 260 nm)에서 RNA의 농도를 측정하여 실험에 사용하였다.

RNA의 역전사반응 및 중합효소의 연쇄반응(RT-PCR)

LPS, cytokine, NaSA, GST (Gold sodium thiomalate)로 처리한 RAW 264.7 세포에서 분리된 total RNA로부터 iNOS mRNA 발현의 변동을 관찰하기 위하여, 먼저 역전사반응(reverse transcription; RT)으로 cDNA를 만들고, 이를 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭시켰다. 즉 각각의 조건에서 얻어진 total RNA 중 10 µg을 75°C에서 5분간 가열하여 denaturation시키고, 이를 얼음에 담가 급냉시킨 후 4 µl의 10×RT buffer (0.5 M Tris/pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M MgCl₂), 4 µl의 10×dNTP (2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl의 oligo-dT₁₅ (25 pmol), 1 µl의 역전사효소용액(M-MLV RT; 200 U/µl)과 함께 반응액이 40 µl가 되도록 증류수를 가한 후 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. cDNA 산물은 94°C에서 5분간 가열하여 역전사

효소를 불활성화시킨 다음 얼음에 담가 급냉하였다.

iNOS 유전자(cDNA)에 대한 중합효소 연쇄반응은 각각의 역전사반응에서 얻은 cDNA 산물 5 µl에, 4 µl의 10×PCR buffer (100 mM Tris/pH 8.0, 30 mM MgCl₂, 2.5 µg/ml BSA), 4 µl의 2.5 mM dNTP, 1 µl씩의 iNOS에 대한 특이적인 primer (10 pmol/µl), 1 µl의 *Taq* DNA polymerase (0.2 U/µl)와 함께 반응액이 40 µl 되도록 증류수를 가하여 유도하였다. 증폭반응을 위하여 PCR (PCR thermal cycler; MJ research, Inc. PTC-100)을 30회 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 65°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분간 시행하였다. 이때 사용된 primer는 mouse iNOS 유전자의 sense primer 및 antisense primer (바이오니아사)로써, 각각의 염기서열은 5'-CAG AAG CAG AAT GTG ACC ATC-3' (sense primer) 및 5'-CTT CTG GTC GAT GTC ATG AGC-3' (antisense primer)이며, 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 610 bp 였다. β-actin 유전자 합성을 위해 사용한 sense primer는 5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3'이고, antisense primer는 5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3'이며 이 primer가 표적으로 하는 DNA 크기는 290 bp 였다.

전기영동에 의한 중합효소의 연쇄반응 산물(cDNA)의 검색

RNA의 역전사반응 및 중합효소 연쇄반응으로 증폭된 cDNA 산물은 전기영동으로 검색하여 iNOS mRNA 발현의 변동을 관찰하였다. 즉 증폭된 PCR 산물(20 µl)을 10×gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)와 잘 섞은 다음, Tris-acetate-EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)용액 및 1 µg/ml의 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동에서 이동된 DNA band는 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)를 이용하여 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

여러 연구자들이 금 제제의 소염작용의 기전을 여러 측면에서 보고하였지만, 염증 작용과 관련이 깊다고 알려진 NO와의 관계에 대하여는 연구 된 것이 별로 없었다. 본 연구에서는 이러한 관계성에 주목하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Fig. 1은 RAW 264.7세포를 활성화시키는 대표적 물질인 LPS (Lipopolysaccharide)와 IFN-γ (Interferon gamma)의 조합과 그에 따른 NO 유도를 보여준다. LPS와 IFN-γ는 단독으로보다는 서로가 공 자극으로 작용할 때, NO의 유리에 상승적으로 작용함을 관찰할 수 있었다. 이

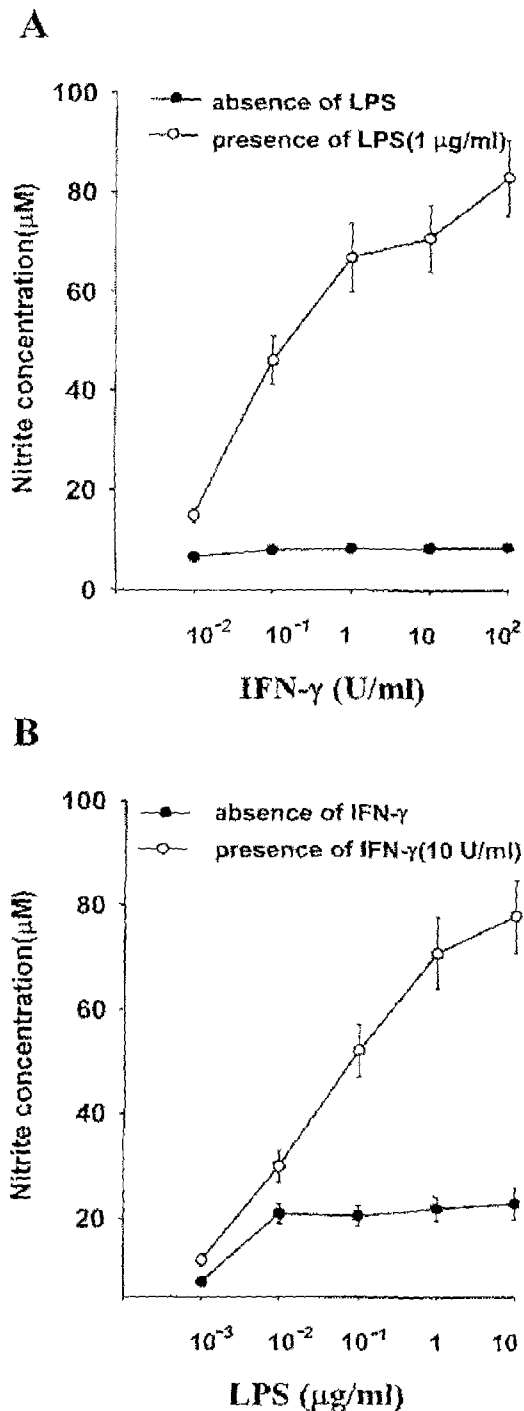


Fig. 1. Synergistic effects of LPS and IFN- γ on NO synthesis. (A) RAW 264.7 cells were cultured in the presence of different concentrations of IFN- γ with or without 1 μ g/ml of LPS. After incubation for 12 h, the culture supernatants were collected and measured for nitrite concentration by Griess reaction. (B) RAW 264.7 cells were cultured in the presence of different concentrations of LPS with or without 10U/ml of IFN- γ for 12 h, and the nitrite concentration in the culture supernatants was measured. The data represent the mean \pm SE of four different cultures.

실험 결과를 바탕으로 본 실험에서는 LPS (1 μ g/ml)와 IFN- γ (10 U/ml)를 이러한 농도로 혼합하여, RAW264.7 세포를 적당하게(세포 손상 없이) 활성화(NO 유도)시킬 방법으로 사용하였다. 이러한 농도의 LPS와 IFN- γ 를 혼합하여 처리하면 대조군에 비하여 NO의 유리가 최소 30 배 이상 증가 하였다. 아직 혼합투여의 상승적 기전이 명확하게 밝혀지지는 않았지만, 대식세포인 RAW264.7 세포에서 NO의 유리가 LPS/IFN- γ 의 혼합 처리에 의하여 유의하게 증가되는 것은 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

Fig. 2는 LPS/IFN- γ 에 의해 유도된 NO 발현에 대하여, NSAIDs의 일종인 NaSA (sodium salicylate)와 금제제인 GST (gold sodium thiomalate)가 억제효과를 나타냄을 잘 보여준다. LPS/IFN- γ 의 자극에 의해 유도된 NO를 적절하게 억제하는 NaSA와 GST의 농도는 실험결과 NaSA는 5-10 mM, GST는 5-20 μ g/ml의 농도가 적절하였다. 이 실험은 *in vitro* 실험이고, 상기의 두 약물 모두 치료적 농도보다 약간은 높게 벗어나 있으므로 결과의 해석에는 유념을 해야 할 것이다. LPS/IFN- γ 로 공 자극된 RAW264.7의 세포배양액에 NaSA 및 GST를 투여하여 일정시간 후 배양액으로부터 유리된 NO의 양을 측정하였다. NaSA와 GST 모두는, LPS/IFN- γ 에 의해 증가된 NO의 유리를 억제시켰는데, 이러한 억제의 효과는 용량에 비례하였다. NaSA 10 mM의 경우 대조군에 비해 대략 50%의 억제가 있었고, GST 20 μ g/ml의 경우는 대략 25%의 억제가 있었다(Fig. 2).

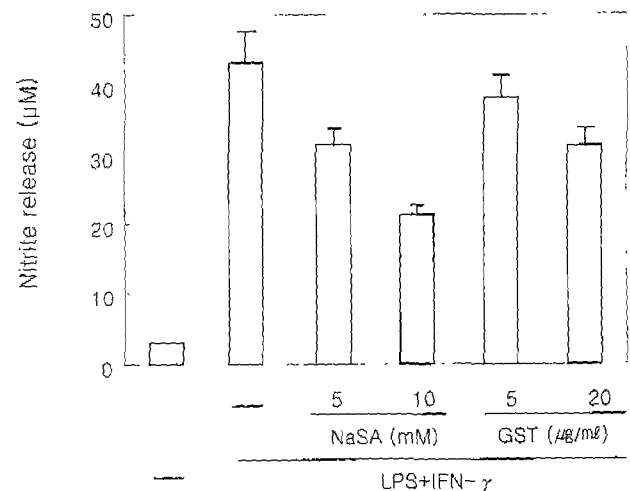


Fig. 2. Effects of sodium salicylate and gold sodium thiomalate on LPS plus IFN- γ -induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were activated with LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (10 U/ml) in the presence or absence of indicated concentrations of sodium salicylate(NaSA) or gold sodium thiomalate(GST). After 12 h incubation, the concentrations of nitrite released into media were measured by Griess reaction. Each value is shown as mean \pm SE from four independent experiments.

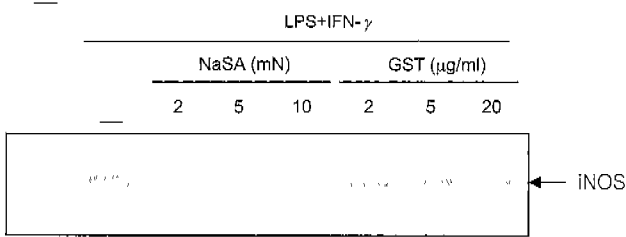


Fig. 3. Effects of sodium salicylate and gold sodium thiomalate on LPS plus IFN- γ -induced iNOS protein in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were activated with LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (10 U/ml) in the presence or absence of indicated concentrations of sodium salicylate or GST. Western blotting: After 12h incubation, cell lysate (50 μ g) was subjected to a SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8%), transferred to a PVDF membrane, and developed by enhanced chemiluminescence.

그리하여 RAW264.7 세포 내 NO의 유리에 대한 NaSA 또는 GST의 억제 효과가 iNOS 단백질 발현의 차이에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 마찬가지로 방법, 즉 LPS/IFN- γ 로 자극시키고 이들 약물들을 처리한 후 iNOS 단백질에 대한 항체를 이용하여 western blot analysis를 시행하였다(Fig. 3). 대조군의 RAW264.7 세포에서 발현되지 않던 iNOS 단백질은 LPS/IFN- γ 처리에 의하여 뚜렷한 단일 band의 iNOS 단백질 발현을 관찰할 수 있었으며, 이때 NaSA 및 GST는 모두, LPS/IFN- γ 에 의하여 증가된 iNOS 단백질의 발현을 현저히 억제하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 그리고 이러한 NaSA, GST 처리에 의한 iNOS 단백질 발현의 억제 현상은 어느 정도 용량에 비례하여 나타나서, NaSA의 경우는 그 발현이 2 mM에서부터 억제되기 시작하여, 5, 10 mM에서 크게 억제되었다. 그리고 GST의 경우 2 μ g/ml에서 시작되어 5 μ g/ml 그리고 20 μ g/ml에서 현저히 억제되었다(Fig. 3). 따라서 대식 세포에서 NaSA, GST에 의한 NO 유리의 억제 효과는 iNOS 단백질 발현의 저하에 의한 것임을 알 수 있었다.

LPS/IFN- γ 로 자극된 RAW264.7 세포에서 NaSA 및 GST 처리에 의한 iNOS 단백질 발현 및 NO 유리의 감소가 유전자 전사수준에서 일어나는 지를 확인하기 위하여, 이들 약물들을 마찬가지로 처리한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR 방법으로 발현되는 iNOS mRNA의 양을 측정하였다(Fig. 4). 이때 NaSA는 LPS/IFN- γ 에 의하여 증가된 iNOS mRNA의 발현에 대하여 전혀 영향을 미치지 못하였으나, 흥미롭게도 GST는 mRNA의 발현을 현저히 억제하였다. 그리고 GST에 의한 이러한 mRNA 발현의 억제는 비교적 용량 의존적인 경향을 나타내었다(Fig. 4). iNOS mRNA stability analysis가 진행되어야, mRNA와 그 단백질의 양적 관계에 대한 좀더 정확한 주장을 할 수 있으나, NaSA 연구결과를(Ryu *et al.*, 2000) 참

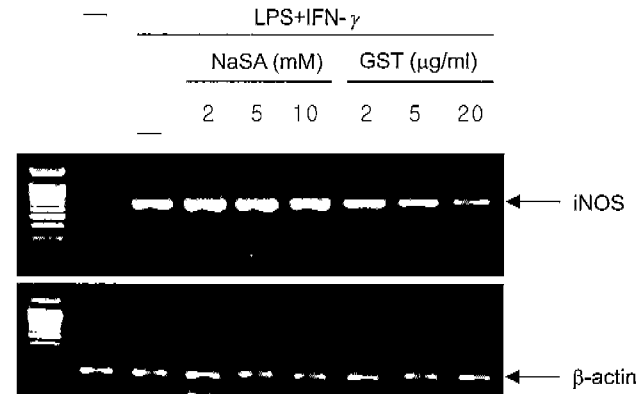


Fig. 4. Effects of sodium salicylate and gold sodium thiomalate on LPS plus IFN- γ -induced mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were activated with LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (10 U/ml) in the presence or absence of indicated concentrations of sodium salicylate (2, 5, 10 mM) or GST (2, 5, 20 μ g/ml) for 6h. Total RNA was prepared RT-PCR was carried out as described under Materials and methods. The PCR products were separated on a 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide. β -actin was used as an internal control.

조하여 보거나, 금(AU) 원소의 화학적 특성이 안정함을 감안할 때, iNOS mRNA의 stability는 충분히 짐작된다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 NaSA는 유전자 전사 후 (translational or posttranslational) 단계에서 iNOS 단백질 형성을 억제하는 반면, GST는 유전자 전사(transcriptional) 단계에서 iNOS 단백질 형성을 억제하는 것으로 추측된다.

이상의 결과로 볼 때 금제제인 GST의 강력한 염증억제작용(anti-inflammatory, anti-arthritic, anti-rheumatic)이 일정부분은 염증시 증가되는 NO의 억제에 의한 것이라고 추측할 수 있다. 그리고 이러한 NO 생산의 억제기전이, NaSA로 대표되는 NSAIDs의 경우와는 다르게(Washington *et al.*, 1999, Veihelmann *et al.*, 1999), 금제제인 GST는 부신피질 소염제처럼 유전자 전사의 단계에서 억제한다는 점이 주목된다(Jeon *et al.*, 1998). 그리고 최근에 널리 사용되는 진통·해열제인 acetaminophen도 유전자 전사 단계에 작용함이 밝혀져(Ryu *et al.*, 2000), 크게 대별되는 소염제 약물군 간의 NO 발현에 관한 연구가 요망된다. 일부 연구에서 금제제가 전사인자인 NF- κ B의 활성화(이동)를 억제하여 cyclooxygenase-2 mRNA를 억제하고, 이것이 prostaglandin E의 합성을 억제하여 소염제로서 작용한다는 보고가 있어(Yamada *et al.*, 1999) 이것과의 연관성도 주목된다. 본 연구자 등은 류마티오이드 관절염에서 비교적 널리 사용되고 있는 근육 주사용 금제제인 GST의 염증억제에 관한 작용을 좀더 추적하고자, 핵단백을 분리하여 mRNA의 상류 수준이라 사료되는 전사조절인자(NF- κ B 등)의 수준에서 GST의 작용을 추적하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 범석학술장학재단 연구비의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Berg J., Fellier H., Christoph T., Grarup J., and Stimmeder D. (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 *in vitro*. *Inflamm. Res.*, 48(7), 369-79.
- Chen Y.C., Shen S.C., Lee W.R., Hou W.C., Yang L.L., and Lee T.J. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.*, 82(4), 537-48.
- Dimartino M.J. and Walz D.T. (1997). Inhibition of lysosomal enzyme release from rat leukocytes by auranofin. A new chrysotherapeutic agent. *Inflammation*, 2(2), 131-42.
- Finkelstein A.E., Roisman F.R., and Walz D.T. (1997). Effect of auranofin, a new antiarthritic agent, on immune complex-induced release of lysosomal enzymes from human leukocytes. *Inflammation*, 2(2), 143-50.
- Friedman H., Specter S., Klein T., Newton C., Rivenbark M., Rowlands D., and Walz D.T. (1990). Auranofin-induced suppression of autoimmune antibody production and inflammation in genetically autoimmune-prone mice. *Inflammation*, 14(4), 463-70.
- Hirohata S., Nakanishi K., Yanagida T., Kawai M., Kikuchi H., and Isshi K. (1999). Synergistic inhibition of human B cell activation by gold sodium thiomalate and auranofin. *Clin. Immunol.*, 91(2), 226-33.
- Honoki K., Muramatsu T., Nakatani C., Iida T., and Shirai T. (1998). A case of nonscarring inflammatory epidermolysis bullosa acquisita: characterization of IgG autoantibodies by immunofluorescence, immunoblotting and immunogold electron microscopy. *J. Dermatol.*, 25(10), 666-72.
- Jacobs A.T. and Ignarro L.J. (2001). Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.*, 276(51), 47950-7.
- Jeon Y.J., Han S.H., Lee Y.W., Yea S.S., and Yang K.H. (1998). Inhibition of NF-kappa B/Rel nuclear translocation by dexamethasone: mechanism for the inhibition of iNOS gene expression. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45(3), 435-41.
- Kim T.S., Kang B.Y., Lee M.H., Choe Y.K., and Hwang S.Y. (2001). Inhibition of interleukin-12 production by auranofin, an anti-rheumatic gold compound, deviates CD4(+) T cells from the Th1 to the Th2 pathway. *Br J. Pharmacol.* Oct., 134(3), 571-8.
- Liu J., Akahoshi T., Namai R., Matsui T., and Kondo H. (2000). Effect of auranofin, an antirheumatic drug, on neutrophil apoptosis. *Inflamm. Res.*, 49(9), 445-51.
- Nathan C. and Xie Q.W. (1994). Nitric oxide synthase; role tolls, and controls. *Cell.*, 78, 915-918.
- Ryu Y.S., Lee J.H., Seok J.H., Hong J.H., Lee Y.S., Lim J.H., Kim Y.M. and Hur G.M. (2000). Acetaminophen inhibits iNOS gene expression in RAW 264.7 macrophages: differential regulation of NF-kappaB by acetaminophen and salicylates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16;272(3), 758-64.
- Schmidt H.H. and Walter U. (1994). NO at work. *Cell.*, 78, 919-925.
- Veihelmann A., Krombach F., Refior H.J., and Messmer K. (1999). Effects of NO synthase inhibitors on the synovial microcirculation in the mouse knee joint. *J. Vasc. Res.*, 36(5), 379-84.
- Waddington S.N., Mosley K., and Cattell V. (1999). Induced nitric oxide (NO) synthesis in heterologous nephrotoxic nephritis; effects of selective inhibition in neutrophil-dependent glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 118(2), 309-14.
- Whan Han J., Gon Lee B., Kee Kim Y., Woo Yoon J., Kyoung Jin H., Hong S., Young Lee H., Ro Lee K., and Woo Lee H. (2001). Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-kappaB. *Br J. Pharmacol.*, 133(4), 503-12.
- Yamada R., Sano H., Hla T., Hashiramoto A., Fukui W., Miyazaki S., Kohno M., Tsubouchi Y., Kusaka Y., and Kondo M. (1999). Auranofin inhibits interleukin-1beta-induced transcript of cyclooxygenase-2 on cultured human synoviocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 26, 385(1), 71-9.
- Yanni, G., Farahat, M.N.M.R., Poston, R.N. and Panayi, G.S., (1994). Intramuscular gold decreases cytokine expression and macrophage numbers in the rheumatoid synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis.*, 53, 315-322.