

원저

腦 星狀細胞를 대상으로 한 Cobrotoxin의 炎症 治療 機轉 研究

유재룡 · 송호섭

경원대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Study of anti-inflammatory mechanism with Cobra Venom on Astrocytes of Rats

Yoo Jae-ryong and Song Ho-sueb

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Kyung-Won University

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of Cobrotoxin on binding affinity of cobrotoxin with P50, IKK α and IKK β , activities of NF- κ B, Cell viability of astrocyte, expressions of protein molecules of NF- κ B such as P50, P-I κ B, I κ B and inflammation related genes such as Cox-2, iNOS, cPLA2 in the SNP or LPS induced Inflammatory pathway of Rats' astrocytes.

Methods : In this study, The expression of cytosolic phospholipase A2, Nitric oxide, Cyclooxygenase-2 and inducible nitrogen oxide synthase was determined by western blotting with corresponding antibodies, and the generation of NF- κ B was assayed by EMSA method in astrocytes of rats. The Cell viability of astrocytes was determined by MTT assay, and Binding affinity of Cobrotoxin with P50, IKK α and IKK β was assayed by Surface plasmon resonance analysis, and NF- κ B dependent luciferase activity was determined by luciferase analysis, and Uptake of cobrotoxin in astrocytes was identified by Confocal laser scanning microscope

Results : 1. Compared with control, LPS-induced NF- κ B DNA binding activity was decreased significantly by 0.1, 0.5 μ g/ml of Cobrotoxin in Astrocyte.

· 접수 : 2005년 4월 29일 · 수정 : 2005년 5월 2일 · 채택 : 2005년 5월 14일
· 교신저자 : 송호섭, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대 부속한방병원 침구과
Tel. 02-425-3456 E-mail : hssong70@kyungwon.ac.kr

2. Compared with control, LPS-induced NF- κ B dependent luciferase expression was decreased significantly by 0.1, 0.5 and 1 μ g/ml of Cobrotoxin in Astrocyte.
3. Compared with control, SNP induced P50, I κ B expressions in astrocyte were decreased significantly by 0.1, 0.5 and 1 μ g/ml of Cobrotoxin and P-I κ B expression was decreased significantly by 0.5 and 1 μ g/ml of Cobrotoxin.
4. Compared with control, LPS induced P50, I κ B expressions in astrocyte were decreased significantly by 0.5 and 1 μ g/ml of Cobrotoxin.
5. Compared with control, SNP induced Cox-2, iNOS, cPLA2 expressions in astrocyte were decreased significantly by 1 μ g/ml of Cobrotoxin.
6. Compared with control, LPS induced Cox-2, cPLA2 expressions in astrocyte were decreased significantly by 0.1, 0.5, 1 μ g/ml of Cobrotoxin and iNOS expression was decreased significantly by 0.5, 1 μ g/ml of Cobrotoxin.
7. Compared with 0.5 μ g/ml of Cobrotoxin, SNP-induced NF- κ B DNA binding activity in astrocyte was increased significantly by Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 1mM and Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 5mM.
8. Compared with 0.5 μ g/ml of Cobrotoxin, LPS-induced NF- κ B DNA binding activity in astrocyte was increased significantly by Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 5mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with GSH 1mM and Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with GSH 5mM.
9. Compared with 0.1 μ g/ml of cobrotoxin, SNP induced P50 expressions in astrocyte were increased significantly by Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with DTT 5mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with GSH 1mM and Cobrotoxin 0.5 μ g/ml with GSH 5mM.
10. The uptake of the labeled cobrotoxin into the cells was shown under a confocal laser scanning microscope. cobrotoxin was uptaken into the membrane and nucleus of astrocytes.

Conclusion : In summary, the present results demonstrate that cobrotoxin directly binds to sulfhydryl group of p50 and IKKs resulting in the reduction of translocation of p50 and I κ B release, thereby inhibits activation of NF- κ B, and suggest that pico to nanomolar range of cobrotoxin could inhibit the expression of genes in the NF- κ B signal pathway.

key words : Cobrotoxin, Astrocyte

I. 緒 論

정상세포는 신경학적 세포들 중 하나로 중추신경계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 항상성을 유지하기 위해 다양한 면역 매개 cytokine을 합성하고 반응하는데 이 cytokine 들은 Alzheimer 병, 다발성경화증, 에이즈와 같은 다양한 신경병리학적 질환에 관여한다¹⁻⁴⁾.

Nuclear factor kappa B(NF- κ B)는 다양한 면역, 염증 및 세포생존에 관련된 유전자를 조절하는 가장 중요한 전사인자중 하나로 cytokine, 자

외선, 산화적 스트레스, 박테리아, 바이러스 등이 염증성 병리 자극에 의해 활성화되면 세포의 핵내로 전위되어 iNos, Cox-2와 같이 대표적으로 염증 유발과 관련된 유전자를 발현시켜 NO, PGE₂ 등의 염증 전반응물질을 생산함으로써 염증을 악화시키므로 염증을 억제하는 항염증 및 항류마티스약의 개발을 위해서는 NF- κ B의 활성을 억제하는 것이 중요하다는 점을 인식하고 연구가 진행되고 있다⁵⁻⁷⁾.

또한 최근에 새로운 치료방법이나 약제를 개발하기위해 특정한 독에 대한 수용체나 ion 채널 복합체에 대한 중요한 분자 계면의 특성을 규명하고자 하는 연구가 주목을 받고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

Cobrotoxin(*Vipera lebetina turanica*)은 Turkmenistan과 같은 중앙아시아에 주로 서식하는 뱀의 독으로 한 그룹의 기본 펩타이드들과 12개의 이황화결합을 가진 235개 아미노산 들로 구성된 중요한 factor V activator로 구성되어 있다¹¹⁾.

factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결합력이 강하다¹²⁻¹⁴⁾고 하였는데 순환기계나 중추 신경계에 영향을 미치고, cysteine 잔기를 가진 다른 분자와도 높은 결합력을 나타내어 분자의 생물학적 활성 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

이에 본 연구에서는 정상세포에 SNP나 LPS 등에 의해 염증이 유발한 후 nano나 pico mole 정도의 농도에서 다양한 농도로 Cobrotoxin을 처리하여 P50, Inhibitor of κ B의 kinase complex(IKK)의 SH기에 결합하여 NF- κ B의 활성을 저해하는지 iNos, Cox-2, cPLA₂와 같은 대표적 염증 유발 관련 유전자의 발현을 억제하여 NO, PGE₂ 등의 염증 전반응물질을 생산을 감소시키는지 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약

lipopolysaccharide 1 μ g/ml, sodium nitroprusside 200 μ M, 기타 細胞培養과 western blotting 試藥은 연구용에 적합한 것들을 사용하였다.

2) 시료

乾燥 粉末 코브라毒[Russia Academy, Tashkent in Uzbekistan]을 蒸溜水에 희석하여 사용하였다.

3) 기기

Liquid scintillation counter(model LS 3801, USA), image analyser (Mitsubishi electric Co., Japan), FACS calibur flow cytometer(Becton Dickinson, NJ), Delta Scan System(Photon technology international; Princeton, NJ, USA), ELISA(Sunrise, Austria), Luminometer(LB 69P WinGlow, Germany), Spectrometry(Spectra MAX plus, CA USA), Gel dryer(Model 583 Gel dryer, CA USA), Centrifuge(HA-1000-3, KOREA), CO₂ incubator(MCO-17AIC, JAPAN), BIACORE 2000and CM5 sensor chip BIACORE AB (Uppsala, Sweden)이다.

2. 방법

1) 시료 조제

Cobrotoxin을 3차 증류수로 희석하여 0.1, 0.5 및 1.0 μ g/ml 농도로 나누어 사용하였다.

2) 세포주 배양 및 세포내 유전자 주입

Astrocytes를 2 \times 10⁵cells로 penicillin (100U/ml), streptomycin (100mg/ml) 및 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양하였다. 세포가 90% 이상 배지에 차면 세포에 plasmid를 lipofectamine을 이용하여 세포 내로 도입 시킨다. Transfection을 위하여 DNA-lipofectamine을 준비하였다.

3) 군 분류

(1) 정상군(Normal group)

정상군은 astrocytes에 아무 처리도 하지 않았다.

(2) 대조군(Control group)

대조군은 astrocytes에 각각 LPS 1.0 μ g/ml, SNP 200 μ M를 처리하였다.

(3) 실험군(Treatment group)

실험군은 astrocytes에 LPS 1.0 μ g/ml, SNP 200 μ M로 유발 후 蜂藥鍼液 0.5, 1.0 및 5.0 μ g/ml를 각각 처리하였다.

4) Cobrotoxin이 LPS, SNP에 의해 유도 성장세포의 COX2, iNOS, cPLA2들에 미치는 영향

Western blotting을 이용하여 發色 정도를 분석하고, 현상한 film의 구획을 정한후 光學濃度計를 이용하여 相對 濃度를 각각 측정 비교하였다.

(1) 시료준비 및 정량측정

원하는 물질의 처리가 끝나면 scraper로 세포를 모으고, 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1,000rpm에서 원심분리 하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

(2) Electrophoresis 및 transfer

정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 60mM Tris pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue로 조성된 5× sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모았다.

(3) Western Blotting 및 ECL Detection

TBS-T 용액으로 희석한 3% skim milk에 1차 항체를 권장농도로 약 200~1,000배 희석하여 만든 용액에 blocking된 membrane을 담가두어 실온에서 2시간 정도 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 10분마다 새로운 TBS-T 용액으로 갈아주면서 1시간 동안 세척하였다. Peroxydase가 부착되어 있으며 1차 항체와 반응하기에 적합한 2차 항체를 권장농도로 약 1,000~2,000배 희석하여 1차 항체와 결합한 membrane을 반응시킨 후 실온에서 1시간 정도 반응시키고 TBS-T 용액으로 10분간 3~5번 세척하였다. 편평한 판에 미리 wrap을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거한 후 판 위에 올렸다. ECL 용액 1(black), 2(white)를 1:1로 잘 섞어 membrane에 뿌려, 골고루 용액을 묻히고 1분 정도 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 wrap을 씌웠다. Film을 cassette에 올려놓고 membrane이 고정된 판을 일정 시간 film에 찍은 다음 developer에 담갔다. 어느 정도 film에 band가

나타나면 fixer로 옮겨 골고루 고정이 잘 되도록 흔들며 고정시켰다. 고정이 끝나면 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조시키고 관찰하였다.

5) Cobrotoxin이 NF-κB에 미치는 영향

(1) 시료준비 및 정량측정

핵추출물은 이미 보고된 방법을 약간 변형하여 배양된 astrocytes 세포를 사용하여 분리하였다. 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 4°C에서 10,000g로 5분간 원심분리하여 PBS를 제거하였다. 세포는 10mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol (DTT), 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)로 구성된 완충액 A를 400μl 넣어 vortex하고 10분간 ice에서 보관한 후 4°C에서 25,000g로 6분간 원심분리하였다.

(2) Oligonucleotide Probe 제조

핵추출물과 NF-κB oligonucleotide의 결합 정도를 알아보기 위해 EMSA를 수행하였다. DNA 결합부위에 대한 NF-κB oligonucleotide (promega, catalog E3291)는 NF-κB DNA결합부위에 대한 consensus sequence인 -GGGGACTTCC-가 포함되어있는 이중가닥 oligonucleotide로서 Promega에서 구입하였다. AP-1 및 NF-κB oligonucleotide probe를 만들기 위해서는 1.5ml 소형 원심분리용 튜브에 이중가닥 oligonucleotide (5ng) 3μl와 10× polypolynucleotide kinase buffer 2.5μl, 100μCi [γ-³²P]ATP를 혼합한 후 추가적으로 증류수를 넣어 최종 부피가 25μl가 되도록 하고 이 혼합액에 1μl의 T4 kinase (5unit)를 최종적으로 넣어주었고 혼합액이 들어있는 튜브를 반응이 일어나도록 37°C에서 45분간 방치하였다. 반응을 시킨 후 50mM Tris/HCl (pH 7.5)을 넣어서 50 μl의 부피가 되도록 oligonucleotide가 들어있는 혼합액을 희석하였다. Sephadex G-50이 들어있는 Nick column (Pharmacia Biotech)을 가지고 NF-κB oligonucleotide probe를 순수 정제하는데 정제방법은 다음과 같았다. column안에 있는 용액을 버린 후, equilibration buffer인 10mM Tris-HCl (pH 7.5)로 한번 세척하고 column을 지지대에 부착한 후, 대략 3ml의 equilibration

buffer를 사용하여 gel을 균질화 하였다. Equilibration buffer가 gel bed에 완전히 흡수된 후, NF- κ B oligonucleotide 반응용액 50 μ l를 column에 넣어주었고 부가적으로 400 μ l buffer 용액을 넣은 다음 gel bed 로 들어가게 하였다. Oligonucleotide probe 용액을 받기 위해 column 아래 부분에 tube를 설치한 후, 추가로 400 μ l를 더 넣어주어 방사선 표지된 oligonucleotide 용액을 정제하였다. 정제된 oligonucleotide 용액 1 μ l를 피펫팅하여 2ml의 scintillation cocktail용액이 들어있는 vial에 넣어 scintillation counter(Packard Instrument Co., USA)를 사용하여 oligonucleotide probe의 radioactivity를 측정하였다.

(3) PAGE 전기영동

Oligonucleotide probe의 결합반응을 하기 위하여 5 μ l의 완충액 [10mM Tris(pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1 μ g/ml poly dI-dC, 0.1 μ g/ml bovine serum albumin]과 5 μ g의 핵 추출물을 혼합한 후 이 혼합액을 15분간 4°C에서 미리 반응시켰다. 그 다음에 [γ -³²P] ATP로 표지된 100,000cpm의 oligonucleotide probe를 넣어주고 증류수로 혼합액의 최종부피를 25 μ l로 한 후 상온에서 20분 동안 방치하여 혼합액을 반응시켰다. NF- κ B의 결합 능력을 알아보기 위한 EMSA를 수행하기 위하여 위에서 얻은 oligonucleotide 반응액에 2 μ l 0.1%(w/v) bromophenol blue dye를 넣어서 전기영동에 사용하였다. 10ml의 polyacrylamide:bis (30%:0.8% w/v)와 38.4ml의 증류수 그리고 5 \times TBE (500mM Tris pH 8.0, 450mM borate, 5mM EDTA) 2.5ml를 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10%(w/v) ammonium persulfate 0.5ml과 TEMED 25 μ l를 부가 혼합하여 6% non-denaturing gel을 조제한 다음, 깨끗이 세척한 후 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 형성하였다. 전기영동 buffer는 0.25 \times TBE buffer를 사용하고, 전기영동 gel은 150V로 1시간동안 prerunning한 후, bromophenol blue dye가 함유된 반응액과 혼합하여 loading하고 150V로 전기영동 하였다. Competition (specific

and non specific) assay와 NF- κ B 구성 unit인 p65 및 p50의 antibodies를 이용하여 super shift 효과를 토대로 NF- κ B DNA-protein band를 확인하였다.

전기영동이 끝난 gel은 3M filter paper에 polyacrylamide gel을 올려놓고 slab gel dryer(Hoffer Scientific Co. SE-1160)로 80°C에서 1시간 건조시킨 후 -70°C에서 감광시켰다. 하루 후 감광된 X-ray film (Kodak Bio-Max film)을 현상하여 NF- κ B 결합능의 활성도를 확인하였다.

6) Luciferase Assay

1 volumes의 water를 1 volume of 5 \times lysis buffe에 넣어 사용 전 실온에 equilibrate 1 \times lysis buffer를 만들었다. 배양세포의 배지를 버리고 PBS로 씻고 1 \times lysis buffer를 넣은 후 (e.g., 400l/60mm culture dish, 900l/100mm culture dish or 20l per well of a 96-well plate)세포를 떼어냈다. 얼음속의 microcentrifuge tube에 세포를 넣고 12,000g에서 15초간 원심분리 한 후 supernatant 또는 cell lysate 를 70°C에서 보관하였다. well당 20l 의 cell lysate를 넣은 plate를 injector와 같이 luminomete에 설치하고 injector 통하여 well 당 100 l의 luciferase assay reagent 넣고 10초간 빛의 강도를 측정하였다.

7) Surface plasmon resonance analysis

BIACORE 본체를 켜 후 Control software를 작동 시킨 후, BIACORE의 syringe 에 연결되어 있는 두 개의 tube를 HBS buffer 가 들어 있는 bottle에 넣어준다. Sensor chip case의 상단에 있는 화살표의 방향을 보면서 insert part 에 넣어 sensor chip (CM-dextran) 을 장착한다. EDC (ethyl-N-(dimethylaminopropyl) carbodii-mide)와 NHS (N-hydroxysuccimide)를 1:1 (EDC 50 l 와 NHS 50 l) 로 섞어서 sensor chip 위에 흘려주어 칩 표면을 활성화 시킨다. sensor chip이 활성화가 되면 Chip 에 p50 를 coupling 시켜주는데,은 HBS buffer에 녹이거나 희석시키는 것이 좋으며, 최종농도는 10-200

g/ml로 맞추도록 한다. p50의 경우 200 g/ml을 사용하였으며, injection 하였을 때 RU 값이 2000 정도 올라가면 binding 이 잘된 것이라 볼 수 있다. 1M ethanolamine, pH 8.5을 이용하여 sensor chip 표면을 고정화 시키고, cobrotoxin 을 125-2000 nM (2000 nM, 1000 nM, 500 nM, 250/125 nM) 범위가 되도록 HBS buffer로 희석하여 sensor chip 위에 흘려준다. cobrotoxin injection이 끝난 후 결합된 p50 와 cobrotoxin을 인위적으로 분리하는 과정으로 이때는 protein의 성질에 따라 pH를 조정하여 사용하는데, 50 mM NaOH pH12를 사용하였다. 생성된 데이터는 sensorgram이라는 형태로 표시되며 단위는 Resonance Unit 혹은 Response Unit(RU)를 사용하는데, 1000RU의 변화는 1ng/mm²의 질량의 변화를 의미한다. The BIACORE 2000 system을 이용하였다. 그래프의 Kinetics analysis 는 BLAevaluation 3.0 software (BIACORE AB, 5-75450, Uppsala, Sweden)를 이용하였다.

8) 세포내 cobrotoxin의 uptake 시험

1M sodium bicarbonate 0.5 mL 에 2 mg/mL cobrotoxin을 넣은 후 1M sodium bicarbonate 50 L 를 첨가하여 pH를 맞춘다. Room temperature에서 reactive dye가 들어 있는 vial 에 protein solution을 넣은 후, vial안에 들어 있는 magnetic stir bar를 이용하여 Room temperature에서 1시간 동안 충분히 녹인다. Labeling 된 protein 을 column에 흘려준 후 elution buffer를 흘려주어 분리한다. Raw 264.7 (0.5x 10⁶ cells/cm²) 을 chamber slide (Lab-Tak II chamber slider system, Nalge Nunc Int., Naperville, IL, USA) 에 37C, 5% CO₂ 에서 24 시간 배양한 후, Alexa Fluor 488 dye 을 붙인 cobrotoxin을 각 chamber에 5, 10 mg/ml 농도별로 처리한 후 37C, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양한다. 배지를 버리고 4% paraformaldehyde 200 ml 을 각 chamber에 넣어 실온에서 1 시간 동안 고정화 시킨 후 360 oil 을 이용하여 Confocal laser scanning microscope (dual wavelength scan, MRC1024,

Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 로 immunofluorescence images를 촬영한다.

9) 통계 처리

모든 실험값은 평균값±표준편차로 하였고, 통계학적 분석은 sigma state program (SPSS, USA)을 이용하였다. 통계학적 유의성은 ANOVA test 후 대조군과 실험군의 비교는 tukey test에 의해 P<0.05인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

III. 成績

1. NF-κB와 DNA의 결합 능력에 미치는 영향

1) LPS로 유도

(1) Astrocyte 내

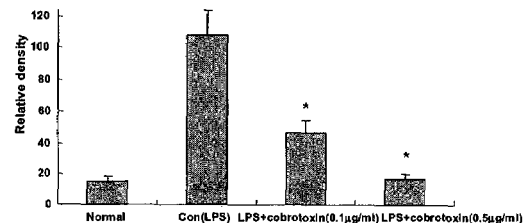


fig. 1. Inhibitory effect of cobrotoxin in NF-κB DNA binding activity in astrocytes after treatment with LPS
Values are mean±SD of three experiment with duplicates
*: P<0.05, significant different from control group

2. Astrocyte의 NF-κB Dependent Luciferase 발현에 미치는 영향

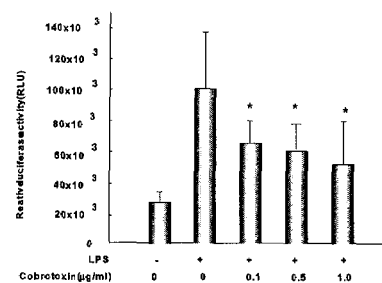


fig. 2. Inhibitory effect of cobrotoxin in NF-κB transcriptional activity in astrocytes after treatment with LPS
Values are mean±SD of three experiment with triplicates
*: p<0.05, significant different from control group

3. NF-κB 구성 단백질인 P50, P-IκB, IκB 발현에 미치는 영향

1) SNP 및 LPS로 유도

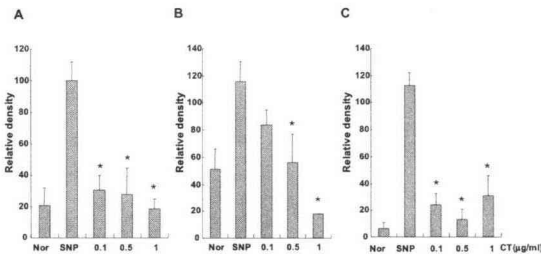


fig. 3. Inhibitory effect of cobrotxin on the SNP-induced p50 (A), p-IκB (B) and IκB (C) expression in astrocytes
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
*: P<0.05, significant different from control group

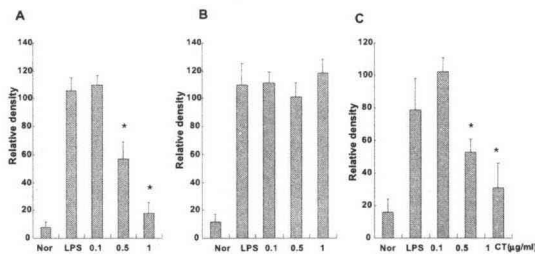


fig. 4. Inhibitory effect of cobrotxin on the LPS-induced p50 (A), p-IκB (B) and IκB (C) expression in astrocytes
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
*: P<0.05, significant different from control group

4. 炎症관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2 발현에 미치는 영향

1) SNP 및 LPS로 유도

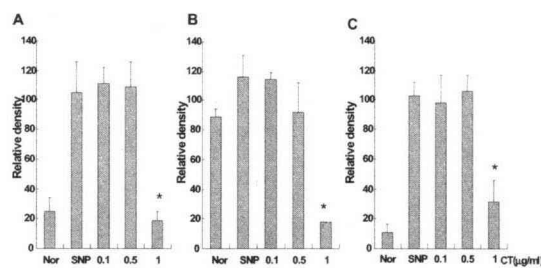


fig. 5. Inhibitory effect of cobrotxin on the SNP-induced Cox-2 (A), iNOS (B) and cPLA2 (C) expression in astrocytes
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
*: P<0.05, significant different from control group

5. GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기 환원시 NF-κB와 DNA의 결합 능력에 미치는 영향

1) Astrocyte내

(1) SNP 및 LPS로 유도

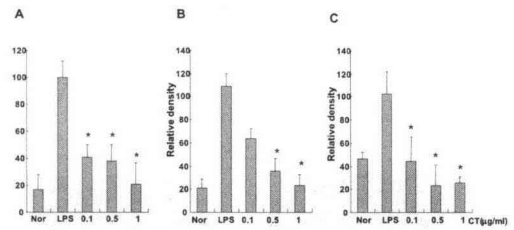


fig. 6. Inhibitory effect of cobrotxin on the LPS-induced Cox-2 (A), iNOS (B) and cPLA2 (C) expression in astrocytes
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
*: P<0.05, significant different from control group

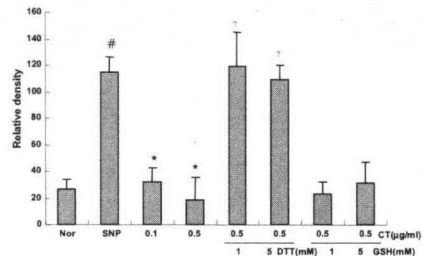


fig. 7. Reverse effect of DDT and GSH on the inhibitory effect of cobrotxin in NF-κB DNA binding activity in astrocytes after treatment with SNP
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
#: P<0.05 Statistical Significance Compared with Normal
★: P<0.05 Statistical Significance Compared with Control
?: P<0.05 Statistical Significance Compared with 0.5μg/ml of cobrotxin treated group

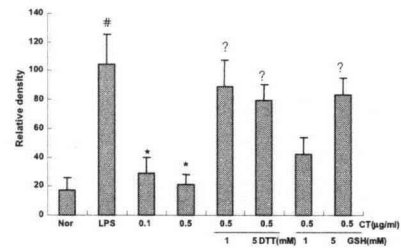


fig. 8. Reverse effect of DTT and GSH on the inhibitory effect of cobrotxin in NF-κB DNA binding activity in astrocytes after treatment with LPS
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
#: significant different from normal group
★: significant different from control (LPS treated) group
?: significant different from cobrotxin treated group

6. GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기 환원시 NF-κB 구성 단백질인 P50 발현에 미치는 영향

1) SNP로 유도

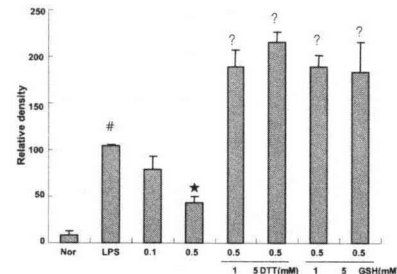


fig. 9. Reverse effect of DTT and GSH on the inhibitory effect of cobrotxin in NF-κB DNA binding activity in Raw264.7 cells after treatment with LPS
Values are mean±SD of two experiments with triplicates
#: significant different from normal group
★: significant different from control (LPS treated) group
?: significant different from cobrotxin treated group

7. Cobrotoxin의 세포 내 유입 확인

1) Astrocyte 내

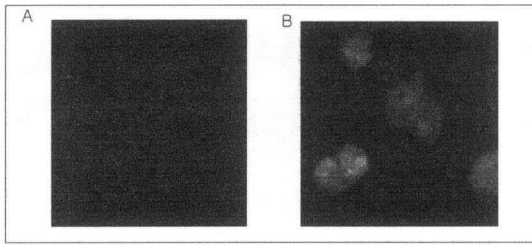


fig. 10. Uptake of cobrotoxin in Raw 264.7 cells
Figure representative from two experiments

Uptake of Cobrotoxin into cytosolic and nucleus of Raw 264.7 cells demonstrated by confocal laser scanning microscope (x 360).
A: cells were treated with Cobrotoxin unlabelled.
B: cells were treated with Cobrotoxin labelled with Alexa Fluor 488 dye.

IV. 考 察

평균수명연장과 출산율의 저하로 고령화 사회가 급속히 진행됨에 따라 노화에 의한 각종 노인성 질환을 비롯한 뇌의 퇴행성 변화로 인한 여러 가지의 학적 문제점들 또한 점점 증가하여 사회문제로 대두되고 있다¹⁵⁻¹⁶⁾. 한의학적으로 뇌의 병변은 뇌의 생리기능의 장애 또는 음양평형실조로 나타나는데 <<靈樞·海論篇>>¹⁷⁾에서는 “腦爲髓之海 髓海有餘 輕徑多力 自過其度 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 解惰安臥”라 하여 年老하여 腎氣가 점차 쇠하여 陰精이 虧損되면 精이 缺乏되어 腦에 上衝하지 못함으로써 腦海가 空虛해 지고, 元神이 失養되어 精神衰弱, 智力減退, 視聽覺 障礙, 言語困難, 肢體活動 不便 등의 病的 症狀가 나타난다고 하였다¹⁸⁻¹⁹⁾. 뇌의 퇴행성 병변은 뇌혈관장애, alzheimer 병, pick병, 다발성경화증, 에이즈, 매독, 뇌염과 같은 여러 가지 원인 질환에 의해 발생되며 염증기전과 관련이 있는 것으로 인식되고 있다^{16,20)}. 뇌 정상 세포는 중추신경계에서 항상성을 유지하기 위해 중요한 기능을 하고 있고, 면역적응세포로서 기능을 수행할 수 있는 것은 다양한 면역조절 세포활성 cytokine을 합성하며 그들과 반응할 수 있기 때문으로 cytokine, 자외선, 산화적 스트레스, 박테리아,

바이러스 등이 염증성 병리 자극 등에 반응하여 TNF- α , IL-1, IL-6 등을 분비하는데 이들은 뇌 퇴행성병변의 다양한 원인질환과 밀접한 관련이 있다^{1-2,21-23)}.

일반적으로 알려진 바로는 염증이나 세포소멸이 유발되는 기전은 세포에 LPS, SNP 들의 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6 (IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되어 nuclear factor kappa B(NF- κ B), inducible nitric oxide synthetase (iNOS), TNF- α , cyclooxygenase-2(COX-2)들이 발현된다²⁴⁾. 이 중 세포의 염증반응에는 TNF- α 들과 같은 염증 매개 물질 및 NF- κ B와 같은 전사 인자의 활성이 관련되며²⁵⁾, NF- κ B의 활성은 염증, 자가면역 및 종양성 질환의 병리에서 중요한 역할을 하고, 특히 염증 반응의 중요한 매개 물질로 작용하는 PGE2를 생성하는 COX-2³¹⁾ 및 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 Nitric oxide(NO)들을 생성하는 iNOS, 세포막에 존재하는 phospholipid의 sn-2 acylester 결합을 가수분해하여 세포 내에서 COX와 lipooxygenase(LOX)의 작용을 받아 PG, thromboxane, leukotrience으로 변환되는 AA를 포함한 free fatty acid와 platelet-activating factor(PAF)의 前驅 物質인 lysophospholipid를 생성하여 排卵, 血小板 凝集, 腎水分 平衡, 免疫 作用 들을 포함하는 다양한 생리 기전 특히, signal transduction²⁷⁻²⁸⁾에 관여하는 酵素인 cPLA2²⁶⁾의 발현과 관련되고 있다.

NF- κ B는 p65, p50 및 p53 들로 구성되어 있고, 세포질 내에서는 여기에 I κ B라는 억제 단백질이 붙어 있어 안정적이며, 이에 자극이 주어지면 IKK α 또는 IKK β 가 분해효소로 작용하게 되고 ubiquitination되어 인산화되면 I κ B가 유리되면서 NF- κ B구성인 p50, p53 및 p65들이 핵 안으로 들어가 NF- κ B가 조절하는 COX-2, iNOS, cPLA2 들의 유전자에 붙어 이 유전자를 발현하도록 하여 염증을 유발하게 된다²⁹⁻³⁰⁾.

한편, IKK α , IKK β 와 p50 subunit과 같은 NF- κ B signal pathway에 관련된 분자들에 cysteine 잔기가 있다는 점이 밝혀졌고, 몇몇 연구³²⁻³⁷⁾에서 NF- κ B의 활성을 억제하기 위해서 cysteine 잔기를 제거하거나 비활성화시키는 것이

중요한 역할을 할 것으로 추정하고 연구를 진행하였다. 예를 들면 延命草가 직접 P50와 결합하여 선택적으로 NF- κ B의 활성을 억제한다³⁴⁾고 하였고, the synthetic quinone derivative, (2E)-3-[5-(2,3-dimethoxy-6-methyl-1,4-benzoquinoyl)]-2-nonyl-2-propenoic acid (E3330)이 직접 P50와 결합하여 DNA와 결합력을 억제한다³⁵⁾고 하였으며, 수은이온(Hg²⁺)이 강력한 thiol 억제제로서 P50와 mercaptide 결합을 형성하여 NF- κ B의 활성을 저해한다³⁶⁾고 하였고, NF- κ B의 활성을 억제한다고 알려진 천연물이나 thiol 금속이 IKK와 결합하여 활성을 억제함으로써 NF- κ B의 활성을 저해한다³²⁻³³⁾고 하였으며, 최근에는 봉약침의 봉독과 그 주요성분 중 하나인 melittin이 직접 IKK α , IKK β 와 p50의 sulfhydryl group에 결합하여 세포질 내에서 I κ B의 유리를 막고, NF- κ B의 활성을 저해함으로써 염증반응에 관계된 여러 유전자들의 발현과 염증성 cytokine의 생성을 억제한다³⁷⁾고 하였다.

Cobrotoxin(*Vipera lebetina turanica*)은 Turkmenistan과 같은 중앙아시아에 주로 서식하는 뱀의 독으로 한 그룹의 기본 펩타이드들과 12개의 이황화결합을 가진 235개 아미노산 들로 구성된 중요한 factor V activator로 구성되어 있다¹¹⁾. factor V activator는 혈액응고에 중요한 역할을 하며, nicotinic acetylcholine receptor와의 결합력이 강하¹²⁻¹⁴⁾고 하였는데 순환기계나 중추신경계에 영향을 미치고, cysteine 잔기를 가진 NF- κ B signal pathway에 관련된 분자들과의 결합력 측정에서 IKK α 와 2.16 x 10⁻⁹ M, IKK β 와 3.24 x 10⁻⁸ M, P50와 1.54-10M로 나타나 봉독이나 melittin의 p50와의 결합력이 각각 4.6x10⁻⁶ M, 1.2x10⁻⁸ M로 2.4x10⁻¹⁰ M인 p50와 P50항체와의 결합력에 비하면 1/500-1/50 정도이나 3 to 5.4-8 M인 p50와 DNA의 결합력 보다는 훨씬 강하다³⁸⁻⁴⁰⁾는 점을 감안할 때 cobrotoxin의 NF- κ B signal pathway에 관련된 분자들과의 결합이 봉독이나 melittin보다 훨씬 강하다는 점이 봉독이나 melittin보다 더 NF- κ B의 전사능력은 물론 DNA와의 결합력을 억제하여 결과적으로 COX-2, iNOS, cPLA2, TNF- α , and ILs(IL-1, IL-6 등)과 같은 NF- κ B target

genes의 발현을 억제하고 I κ B의 유리, p50의 핵내 전위를 보다 더 억제할 수 있으리라 사료된다. 또한 정확히 알 수는 없지만 cysteine 잔기내 thiol group이 중요한 목표가 된다고 추정되는 만큼 DTT나 GSH와 같은 환원제를 사용하여 cysteine 잔기를 환원시키거나 transfection assay로 cysteine 잔기의 아미노산을 다른 형태의 아미노산으로 바꿀 경우 Cobrotoxin의 활성이 감소하여 NF- κ B signal pathway에 관련된 분자들과 결합력이 감소될 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 정상세포에 SNP나 LPS 등에 의해 염증이 유발한 후 nano나 pico mole 정도의 농도에서 다양한 농도로 Cobrotoxin을 처리하여 P50, Inhibitor of κ B의 kinase complex(IKK)의 SH기에 결합하여 NF- κ B의 활성을 저해하는지 iNos, Cox-2, cPLA2와 같은 대표적 염증 유발 관련 유전자의 발현을 억제하여 NO, PGE2 등의 염증 전반응물질을 생산을 감소시키는지 cysteine의 SH기를 환원시키거나 transfection assay로 cysteine 잔기의 아미노산을 다른 형태의 아미노산으로 바꿀 경우 NF- κ B signal pathway에서 NF- κ B에 대한 cobrotoxin의 작용이 감소하는지 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

LPS로 염증을 유발한 후 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.1 μ g/ml 처리군, Astrocyte 내에서의 Cobrotoxin 0.1, 0.5 μ g/ml 처리군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

LPS로 염증을 유발한 후 Astrocyte 내에서 NF- κ B Dependent Luciferase 발현을 살펴본 결과 Cobrotoxin 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

SNP로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 NF- κ B 구성 단백질인 P50, P-I κ B, I κ B 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 P50와 I κ B는 Cobrotoxin 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었고, P-I κ B는 Cobrotoxin 0.1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 억제를, Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

LPS로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 NF- κ B 구성 단백질인 P50, P-I κ B, I κ B 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 P50와 I κ B는 Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

SNP로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 염증 관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 Cox-2, iNOS, cPLA2 모두 Cobrotoxin 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

LPS로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 염증 관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 Cox-2와 cPLA2의 경우 Cobrotoxin 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml 모든 처리군에서, iNOS의 경우 Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.

Astrocyte내에서 SNP로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기를 환원하여 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 5mM의 동시처리군은 각각 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml 처리군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

Astrocyte내에서 LPS로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기를 환원하여 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 5mM의 동시처리군과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 GSH 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 GSH 5mM의 동시처리군 모두에서 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml 처리군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

Astrocyte 내에서 SNP로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기 환원시 NF- κ B 구성 단백질인 P50 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 SNP, Cobrotoxin 1 μ g/ml와 DTT 1 또는 5mM 동시처리군과 SNP, Cobrotoxin 1 μ g/ml와 GSH 1 또는 5mM 동시처리군 모두에서 Cobrotoxin 1 μ g/ml 처리군에 비하여 발현의 유의한 증가를 나타내었다.

Cobrotoxin의 세포 내 유입 확인을 살펴본

결과 Astrocyte 내에서 Cobrotoxin이 세포내로 유입되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 Cobrotoxin 처리는 정상 세포 들을 대상을 LPS 및 SNP로 유도된 NF- κ B 관련 염증 기전과 iNOS, COX-2, cPLA2와 같은 염증관련 유전자의 발현 및 NO, PGE₂에 유의한 변동을 나타내었고, 이들 결과는 Cobrotoxin의 항염증 효과 및 그 치료기전에 대하여 입증한 것이며, 향후 안전성 연구를 바탕으로 임상에서의 신경계 및 심혈관계 염증치료에 적용될 수 있도록 노력할 뿐만 아니라 지속적인 연구를 통하여 Cobrotoxin 약침 개발과 같은 적극적인 활용이 기대된다.

V. 結 論

Cobrotoxin의 항염증 치료 기전에 대해 연구하기 위하여 정상세포에 LPS 및 SNP로 염증을 유도한 후 NF- κ B와 DNA의 결합 능력, NF- κ B Dependent Luciferase 발현, Astrocyte의 세포활성, NF- κ B 구성 단백질인 P50, P-I κ B, I κ B 및 염증관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2의 발현과 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기를 환원시 NF- κ B와 DNA의 결합 능력, NF- κ B 구성 단백질인 P50 발현에 미치는 영향과 Cobrotoxin의 정상세포 내 유입 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS로 염증을 유발한 후 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.1 μ g/ml 처리군, Astrocyte 내에서의 Cobrotoxin 0.1, 0.5 μ g/ml 처리군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
2. LPS로 염증을 유발한 후 Astrocyte 내에서 NF- κ B Dependent Luciferase 발현을 살펴본 결과 Cobrotoxin 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
3. SNP로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 NF- κ B 구성 단백질인 P50, P-I κ B, I κ B 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 P50와 I κ B는

- Cobrotoxin 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었고, P-I κ B는 Cobrotoxin 0.1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 억제를, Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
4. LPS로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 NF- κ B 구성 단백질인 P50, P-I κ B, I κ B 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 P50와 I κ B는 Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
 5. SNP로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 炎症 관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 Cox-2, iNOS, cPLA2 모두 Cobrotoxin 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
 6. LPS로 염증을 유발한 후 Cobrotoxin이 炎症 관련 遺傳子인 Cox-2, iNOS, cPLA2 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 Cox-2와 cPLA2의 경우 Cobrotoxin 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml 모든 처리군에서, iNOS의 경우 Cobrotoxin 0.5, 1 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의한 억제를 나타내었다.
 7. Astrocyte내에서 SNP로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기를 환원하여 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 5mM의 동시처리군은 각각 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml 처리군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
 8. Astrocyte내에서 LPS로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기를 환원하여 NF- κ B와 DNA의 결합 능력을 관찰한 결과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 DTT 5mM의 동시처리군과 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 GSH 1mM, Cobrotoxin 0.5 μ g/ml과 GSH 5mM의 동시처리군 모두에서 Cobrotoxin 0.5 μ g/ml 처리군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
 9. Astrocyte 내에서 SNP로 염증을 유발한 후 GSH와 DTT로 Sulf-hydryl기 환원시 NF- κ B 구성 단백질인 P50 발현에 미치는 영향을 관

찰한 결과 SNP, Cobrotoxin 1 μ g/ml와 DTT 1 또는 5mM 동시처리군과 SNP, Cobrotoxin 1 μ g/ml와 GSH 1 또는 5mM 동시처리군 모두에서 Cobrotoxin 1 μ g/ml 처리군에 비하여 발현의 유의한 증가를 나타내었다.

10. Cobrotoxin의 세포 내 유입 확인을 살펴본 결과 Astrocyte 내에서 Cobrotoxin이 세포내로 유입되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 Cobrotoxin 처리는 정상 세포 들을 대상을 LPS 및 SNP로 유도된 NF- κ B 관련 염증 기전과 iNOS, COX-2, cPLA2와 같은 염증관련 유전자의 발현 및 NO, PGE2에 유의한 변동을 나타내었고, 이들 결과는 Cobrotoxin의 항염증 효과 및 그 치료기전에 대하여 입증한 것이며, 향후 안전성 연구를 바탕으로 신경계 및 심혈관계 염증치료에 약침개발과 같은 적극적인 활용이 기대된다.

VI. 參考文獻

1. Benveniste EN, Sarpaccio SM, Norris JG, Grenett HE and Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. J. Neuroimmunol. 30: 201, 1990.
2. Malipiero UV, Frei K and Fontana A. Production of hemopoietic colony-stimulation factors by astrocytes. J. Immunol. 144: 3816, 1990.
3. Aloisi F, Borsellino G, Testa U, Gallo P, Russo G, Feschle C and Levi G. Cytokine regulation of astrocyte function: invitro studies using cells from the human brain. Int. J. Dev. Neurosci. 13(3) : 265, 1995.
4. fillit H, Ding WH, Buce L, Kalman J, Altstiel L, Lawior B and Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. Neuroscience Lett. 129 : 318D, 1991.

5. Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem.* 276: 35530-6, 2001.
6. Yadav PN, Liu Z, Rafi MM. A diarylheptanoid from lesser galangal (*Alpinia officinarum*) inhibits proinflammatory mediators via inhibition of mitogen-activated protein kinase, p44/42, and transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Pharmacol Exp Ther.* 305:925-31, 2003.
7. Banerjee T, Valacchi G, Ziboh VA, van der Vliet A. Inhibition of TNFalpha-induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-kappa B activation in A549 cells. *Mol Cell Biochem.* 238:105-10, 2002.
8. Samson, A., Scherf, T., Eisenstein, M., and Chill, J. *Anglisters J.* 2, 319-32, 2002.
9. Sher, E., Giovannini, F., Boot, J., Lang, B. *Biochimie.* 82: 927-36, 2000.
10. Van, L. E., and Moyer, M. *J. Appl. Physiol.* 3: 1009-16, 1999.
11. Siigur, E., Aaspollu, A., and Siigur, J. *Gene* 263: 199-203, 2001.
12. Servent, D., Winckler, D. V, Hu, H.Y., Kessler, P., Drevet, P., Bertrand, D., and Menez, A. *J.Biol. Chem.* 39: 24279-86, 1997.
13. Conroy, W.G., Saedi, M.S., and Lindstrom, J. *J. Biol. Chem.* 35: 21642-51, 1990.
14. Michalet, S., Teixeira, F., Gilquin, B., Mourier, G., Servent, D., Drevet, P., Binder, P., Tzartos, S., Menez, A., Kessler, P. *J. Biol. Chem.* 33: 25608-15, 2000.
15. 신명기 외 2인 : 노인정신장애환자의 추적 치료실태에 관한 고찰, *신경정신의학*, 34(3): 663-670, 1995.
16. 이동원의 : 치매에 관한 동서의학적 비교고찰, *대한 한방내과학회지*, 16(1):2-5, 11, 14, 1995.
17. 洪元植 譯 : 黃帝內經靈樞解釋, 서울, 高文社, p. 109, 234-235, 1982.
18. 李清福, 劉渡舟 編著 : 中醫精神醫學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.211-212, 1988.
19. 王清任 : 醫林改錯, 臺聯, 國風出版社, pp.22-25, 1975.
20. 崔龍竣 : 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院, 博士論文, 1966.
21. Fontana, A., Frei, K., Borner, S. and Hofer, E. Immune-mediated encephalitis; on the role of antigen-presenting cells in brain tissue, *Immunol. Rev.* 100, 185, 1987.
22. Laurenzi, MA., persson, MA., Dalsggard, CJ., and Haegerstrand, A. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes; activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand. J. Immunol.* 31, 529, 1990.
23. Lotz, M., Vaughan, JH and Carson, DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes, *Science* 241, 1218, 1988.
24. Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, C. Related Articles : Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* Summer. 1999; 1(2): 129-44.
25. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 2000; 97(9): 4844-4849.
26. 김세종. 免疫學. 서울: 高麗醫學. 1994; 263-264.
27. R.N. Dubios, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, P.E. Lipsty. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASWB J.* 1998;

- 12(12): 1063-1073.
28. S.Y. Choi, H. Ha, K.T. Kim. Capsaicin inhibits platelet activating factor-induced cytosolic Ca²⁺ increase and superoxide production. *J. Immunol.* 2000; 165: 3992-3998.
 29. 김홍희, 황경곤, 정파진. NF-κB 전사 인자에 대한 소고. *조선대학교 구강생물학 연구소.* 1999; 171-174.
 30. 이윤실. p53에 의한 세포사에서의 NF-κB의 기능. *Nature* 404. 2000; 892-897.
 31. J.K. Horton, A.S. Williams, Z. Smith-Phillips, R.C. Martin, G. O'Beirne. Intracellular measurement of prostaglandin E₂ : effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid Expression *Anal Biochem.* 1999; 271(1): 18-28.
 32. Jeon, K.I., Byun, M.S., and Jue, D.M. *Exp. Mol. Med.* 2, 61-6, 2003.
 33. Kapahi, P., Takahashi, T., Natoli, G., Adams, S.R., Chen, Y., Tsien, R.Y., and Karin, M. *J. Biol. Chem.* 46, 36062-6, 2000.
 34. Lee, J.H., Koo, T.H., Hwang, B.Y., and Lee, J.J. *J. Biol. Chem.* 21, 18411-20, 2002.
 35. Goto, M., Yamada, K., Katayama, K., and Tanaka, I. *Mol. Pharmacol.* 5, 860-73, 1996.
 36. Dieguez-Acuna, F.J., and Woods, J.S. *Toxicol. In Vitro* 1, 7-16, 2000.
 37. Park, H.J., Lee, S.H., Son, D.J., Oh, K.W., Kim, K.H., Song, H.S., Kim, G. J., Oh, G. T., Yoon, D. Y., and Hong, J. T.(2004 in press).
 38. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Malek S, Ghosh G. Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* ; 32:24392-9, 2000.
 39. Garcia-Pineros AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J Biol Chem* ;276:39713-20, 2001.
 40. Kim IY, Stadtman TC. Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;94:12904-7, 1997.