

露蜂房이 t-butylhydroperoxide에 의한 Peroxynitrite 생성과 염증성 단백질 발현에 미치는 영향

장재식 · 정지천* · 신현철¹

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Vespaee Nidus* on Peroxynitrite Production and Protein Expression of Proinflammatory Mediators

Jae Shik Jang, Ji Cheon Jeong*, Hyeon Cheol Shin¹

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

Peroxynitrite (ONOO⁻) is a reactive oxidant formed from superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$) and nitric oxide (NO), which can oxidize cellular components such as essential protein, non-protein thiols, DNA, low-density lipoproteins and membrane phospholipids. $\cdot\text{O}_2^-$ and ONOO⁻ have contributed to the pathogenesis of diseases such as stroke, heart disease, Alzheimer's disease and atherosclerosis. Because of damaging effects of $\cdot\text{O}_2^-$ and ONOO⁻ oxidants, *Vespaee Nidus*, which has been known to strengthen the kidneys to preserve the vital energy, was tested as a potential specific scavenger of those oxidants. In this study, the viability of *Vespaee Nidus* (1, 10, 50 g/ml) to scavenge $\cdot\text{O}_2^-$, NO, ONOO⁻ and so to protect cells against tert-butylhydroperoxide (t-BHP) induced cell death was tested. The levels of $\cdot\text{O}_2^-$ and ONOO⁻ were detected by staining with DCFH-DA and DHR 123, respectively. Protein expression levels of COX-2, iNOS and NF- κ B were assayed by western blot. *Vespaee Nidus* blocked t-BHP-induced cell death in a dose-dependent fashion. *Vespaee Nidus* inhibited t-BHP-induced production of $\cdot\text{O}_2^-$, NO and ONOO⁻ in YPEN cells. The lipid peroxide level was increased and glutathione level was decreased in lipopolysaccharide (LPS)-treated ICR mouse, whereas the ones in the *Vespaee Nidus*-administered group were regulated beneficially. *Vespaee Nidus* inhibited the expression of COX-2, iNOS and NF- κ B (p65 and p50) genes in LPS-treated ICR mouse. The present study suggests that *Vespaee Nidus* is a powerful antioxidant and promotes cellular defense activity by scavenging the toxic oxidants such as $\cdot\text{O}_2^-$ and ONOO⁻.

Key words : *Vespaee Nidus*, reactive oxygen species, nitric oxide, peroxynitrite, iNOS, COX-2, NF- κ B

서 론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 의한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다^{1,2}. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$)와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다³.

산화 스트레스 가설에 의하면 활성질소·산소가 세포 및 조직 손상을 초래하여 노화 과정을 촉진한다고 하였으며¹, 노화의 염증 가설에 의하면 이 때 생성되는 ONOO⁻가 노화의 주범이라고 제안하였다⁴.

ONOO⁻는 NO와 $\cdot\text{O}_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억

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

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

· 접수 : 2007/10/22 · 채택 : 2007/11/23

제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이러한 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 심근장해, 패혈증, 고혈압, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다³⁻⁷⁾.

노화 과정의 주요한 원인으로 reactive species (RS) 뿐만 아니라 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase와 같은 활성종을 생성하는 효소들이 중요한 역할을 담당하고 있다⁸⁾. 특히 여러 가지 자극에 의해 반응되는 것으로 알려진 redox (산화환원) 감수성 인자 nuclear factor κ B (NF- κ B)는 다른 전사인자와는 다르게 inhibitor κ B (I κ B)라 불리는 저해성 분자에 의해 불활성 상태로 세포질에 존재한다. NF- κ B는 p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (Rel-A), c-Rel 등이 결합한 형태로 존재하는데 주로 p65-p50 heterodimer의 NF- κ B가 주로 관찰된다⁹⁾. NF- κ B는 유전자 발현을 통해 apoptosis, 종양 형성, 세포 증식, 염증, 면역 반응을 조절한다. NF- κ B의 활성화와 그것에 의한 유전자 발현은 노화, 암, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직 손상, 바이러스성 복제, 급성 염증상태, 조직이식 숙주반응, 독성/부패성 조직 손상 등을 포함하는 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다¹⁰⁾. 또한 노화 과정과 노인성 질환에는 NF- κ B의 활성화를 초래하는 RS 반응이 밀접하게 관련되어 있다. 특히 COX-2는 노화 과정에서 현저히 발현이 증가하고 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 노화 지표이다⁸⁾.

露蜂房 (*Vespa Nidus*)은 胡蜂科 (말벌과; Vespidae)에 속한 果馬蜂 (*Polistes olivaceus* Degeer), 日本長脚胡蜂 (*P. japonicus* Saussure) 혹은 異腹胡蜂 (*Parapolybia varia* Fabricius)의 벌집을 채취하여 晒乾하거나 약간 삶은 후 죽은 벌이나 번데기를 제거하고 건조한 것으로¹⁴⁾ '蜂腸'이라고도 한다. 祛風 攻毒 殺蟲 등의 효능으로 驚癇 癩瘡 風痺 癰疽 癰癤 陽痿 痔漏 등의 치료에 활용되어 왔다¹⁵⁾. 최근 露蜂房의 추출물인 propolis가 강한 항산화 활성을 가지며 항균, 항염증, 항종양 등의 다양한 약효를 나타낸다고 알려지고 있으며, acetaminophen에 의한 간손상을 유발한 마우스에서 catalase 및 SOD 활성을 증가시키고 glutathione 함량을 증가시킨다고 보고되었다¹⁶⁾. 그러므로 혈관 염증과 관련하여 노인성 질환 및 노화를 조절하는 효능을 나타낼 가능성이 기대된다.

본 연구에서는 露蜂房이 t-butylhydroperoxide (t-BHP) 처리에 의해 생성되는 ROS, NO 및 ONOO⁻에 대한 억제능이 있는지를 검토하고 lipopolysaccharide (LPS) 처리로 산화 스트레스를 유도한 마우스에서 염증 인자 단백질인 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

露蜂房 (*Vespa Nidus*)은 시중 (태원당약업사, 대구, 한국)에서 상등품을 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA), sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA), NP-40, CAPS, protease inhibitors, 3-Morpholinopyridone (SIN-1), DL-penicillamine, sodium nitroferricyanide(III) dihydrate (SNP), lipopolysaccharides (LPS) 등은 Sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), ONOO⁻, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (A Brand of EMD Biosciences, Inc., USA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan), 1차 및 2차 항체는 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) 등을 사용하였다.

3) 동물

생후 6주령된 체중 25 g 내외의 외관상 건강한 ICR mouse (오리엔트, 대구, 한국)를 Light dark cycle 12 h, 온도 25°C, 습도 60% 유지되는 조건에서 적응 사육하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 露蜂房에 3배 량의 95% methanol을 가하고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하였고 추출액은 실온으로 냉각시킨 후 감압 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

Rat의 혈관내피세포인 YPEN 세포를 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 75 cm² tissue culture flask (Corning Co., New York, USA)에 5×10⁶ cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 5% fetal bovine serum을 함유하고 여기에 glutamine (5.84 μg/ml), amphotericin B (0.25 μg/ml), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였다. 그리고 NaHCO₃을 가하여 pH 7.4-7.6으로 조절된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Nissui, Tokyo, Japan)로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) 세포 보호 효과

t-BHP에 의한 세포사로부터 露蜂房이 세포를 보호하는 효과를 Tada 등의 방법²¹⁾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 측정하

여 세포의 생존율을 측정함으로써 露蜂房의 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. 혈관내피세포인 YPEN 96 well plate에 1×10^4 /well로 접종하여 24시간 배양하고 serum free 배지로 바뀌준 후, 露蜂房추출물을 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 배지에 가하여 1시간 전처리한다. t-BHP를 최종 농도 30 μM 이 되도록 가하여 3시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간 추가 배양한 후 solubilization 용액 (dimethyl sulfoxide:ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) 혈관내피세포에서 ROS, NO 및 ONOO⁻ 소거능 측정

YPEN 세포를 96-well plate에 1×10^4 /well로 심은 후 하루 동안 배양한 다음 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 露蜂房추출물을 처리하여 1시간 배양한 후, t-BHP 10 μM 을 처리하여 1시간 배양한다. DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490 nm/방출파장 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 제거능을 검토하였다²²⁾. 또한 DHR 123을 처리한 후 여기파장 500 nm / 방출파장 536 nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능을²³⁾, DAF-2를 처리하여 여기파장 485 nm/방출파장 530 nm에서 NO 제거능을²⁴⁾ 평가하였다.

5) 산화 스트레스 유발 및 검역의 투여

실험 동물을 정상군, LPS를 처리한 대조군 및 露蜂房추출물을 투여하고 LPS를 처리한 실험군으로 분류하였으며, 각 군에 5 마리씩 배정하였다. 露蜂房추출물은 10, 20, 50 mg/kg 의 용량을 1일 1회 5일간 경구투여하였고, 대조군에는 동량의 증류수를 투여하였다. 6일째 LPS 5 mg/kg 을 복강주사하고 5시간 후 ether로 가볍게 흡입 마취시킨 상태에서 복부 정중선을 따라 개복하고 신장을 적출하여 균질화한 후, postmitochondria 분획을 실험에 사용하였다.

6) Lipid peroxide 함량

조직내 Lipid peroxide 함량을 Ohkawa 등의 방법²⁵⁾에 따라 측정하였다. 조직 마쇄 균질액을 1,000 \times g에서 원심분리한 후 상층액을 취해 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol : pyridine (15:1) 혼합액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 생성된 시료의 malondialdehyde (MDA) 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였으며 MDA 함량은 조직 mg 당 nmole로 나타내었다.

7) Glutathione 함량

조직내 GSH 함량은 Ellman 등의 방법²⁶⁾에 따라 측정하였다. 조직 균질액을 1,000 \times g에서 원심분리한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1,000 \times g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1 mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1 mg 당 nmole로 나타내었다.

8) Western blot analysis

마우스에서 적출한 신장 조직 균질액의 cytosol 분획에서 단

백질을 분리하여 염증 인자의 단백질 발현을 관찰하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켜 주었다, 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단시키고 각 타겟 단백질의 1차 antibody를 2시간 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 30분간 세척한 다음 2차 antibody를 2시간 반응시키고, TBST로 40분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

9) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법²⁷⁾과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

10) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

성 적

1. 혈관내피세포에서 t-BHP로 유도한 세포사멸에 대한 세포 보호 효과

30 μM 의 t-BHP를 처리하였을 때 세포 생존율은 75%였으나, 露蜂房추출물 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 전처리한 세포는 생존율이 81, 89, 95%로 나타나 농도 의존적으로 t-BHP에 의한 세포사가 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 1).

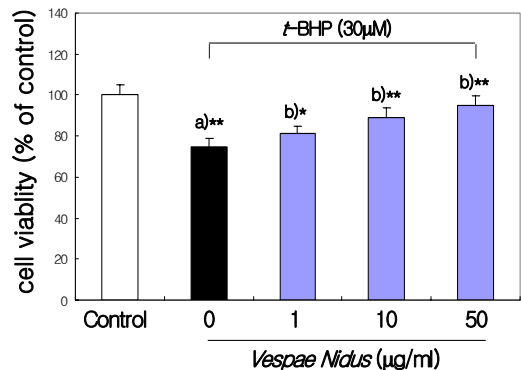


Fig. 1. Cytoprotective effect of *Vespae Nidus* on t-BHP induced cell death in YPEN cells. Cells were exposed to t-BHP (30 μM) in the present and absence *Vespae Nidus* (1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 3 hr exposure the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean \pm S.D. a) Significantly different from the not-treated t-BHP. b) Significantly different from the t-BHP group (** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

2. 혈관내피세포에서 t-BHP에 의한 ROS, NO 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

정상 혈관내피세포의 $\cdot\text{O}_2^-$ 는 108.44 \pm 7.11 fluorescence/min

인데 비하여 *t*-BHP 처리에 의해 231.15±17.15 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 露蜂房추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 50 µg/ml 농도에서 148.91±11.09 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2).

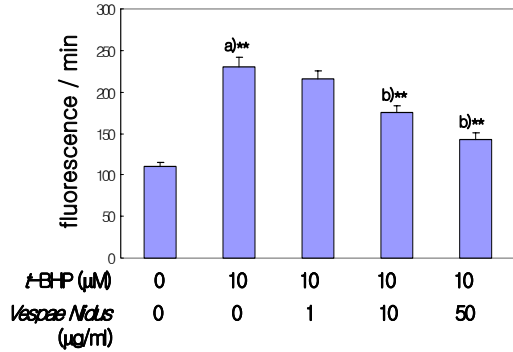


Fig. 2. Effect of *Vespae Nidus* on *t*-BHP induced ROS in YPEN cells. Cells were pre-treated with various concentration of *Vespae Nidus* for 1hr and then treated with *t*-BHP (10 µM) for 1hr. Detection of intracellular ROS by staining with fluoremeter using DCFDA. Each value is the mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the not-treated *t*-BHP. b) Significantly different from the *t*-BHP group (** : p < 0.01).

NO는 정상 세포에서 84.22±6.85 fluorescence/min인데 비하여 *t*-BHP 처리에 의해 156.71±13.49 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 露蜂房추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 10 µg/ml 농도에서 138.09±12.27 fluorescence/min, 50 µg/ml 농도에서 100.64±8.36 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3).

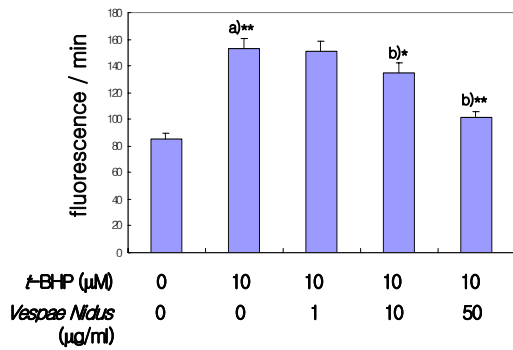


Fig. 3. Effect of *Vespae Nidus* on *t*-BHP induced NO in YPEN cells. Cells were pre-treated with various concentration of *Vespae Nidus* for 1hr and then treated with *t*-BHP (10 µM) for 1hr. Detection of intracellular ROS by staining with fluoremeter using DAF-2. Each value is the mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the not-treated *t*-BHP. b) Significantly different from the *t*-BHP group (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

ONOO⁻는 221.51±18.76 fluorescence/min인데 비하여 *t*-BHP 처리에 의해 483.33±35.44 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나 露蜂房추출물을 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 10 µg/ml 농도에서 387.27±31.85 fluorescence/min, 50 µg/ml 농도에서 302.72±29.44 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

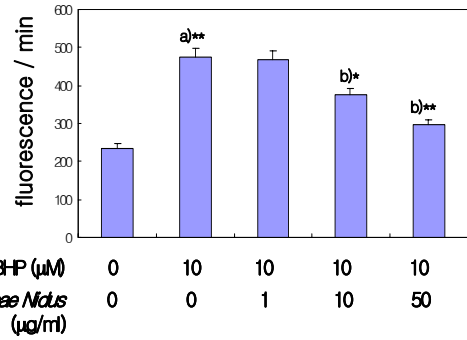


Fig. 4. Effect of *Vespae Nidus* on *t*-BHP induced ONOO⁻ in YPEN cells. Cells were pre-treated with various concentration of *Vespae Nidus* for 1hr and then treated with *t*-BHP (10 µM) for 1hr. Detection of intracellular ROS by staining with fluoremeter using DHR 123. Each value is the mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the not-treated *t*-BHP. b) Significantly different from the *t*-BHP group (** : p < 0.01, * : p < 0.05).

3. LPS 처리 마우스에서 MDA 함량에 미치는 영향

정상군의 신장 조직중 과산화지질 함량은 11.60±0.58 MDA nmole/mg이었으나 LPS를 처리한 대조군에서는 22.44±1.12 MDA nmole/mg으로 2배 가량 증가되었다. 반면에 LPS를 처리하고 露蜂房추출물을 경구 투여한 실험군의 경우는 19.48±0.97, 18.81±0.94, 16.14±0.81 MDA nmole/mg으로 대조군에 비해 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5)

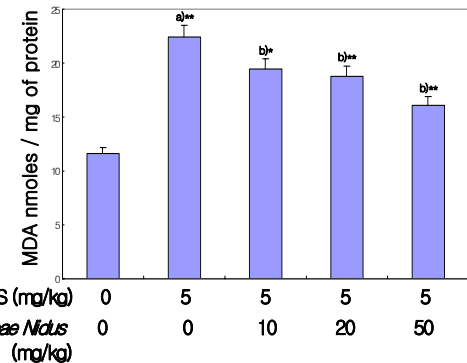


Fig. 5. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced Lipid Peroxidation in mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05).

4. LPS 처리 마우스에서 glutathione 함량에 미치는 영향

정상군의 신장 조직중 glutathione 함량은 18.40±0.92 nmole/mg이었으나 대조군은 15.60±0.78 nmole/mg으로 감소되었다. 반면에 실험군의 경우는 17.02±0.85, 17.78±0.89, 19.82±0.99 nmole/mg으로 대조군에 비해 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 6).

5. LPS 처리 마우스에서 COX-2 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

염증 인자인 COX-2의 발현 정도를 관찰한 결과 정상군에 비하여 LPS를 처리한 대조군에서 증가되는 것으로 나타났다. 반면에 露蜂房추출물을 경구투여하고 LPS를 처리한 실험군에서는

농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7).

iNOS의 발현을 관찰한 실험에서도 정상군에 비하여 대조군에서 증가되는 것으로 나타났으나 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 8).

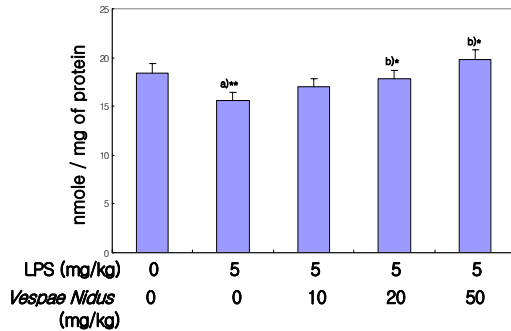


Fig. 6. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced glutathione level in mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. Results are mean±S.D. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05).

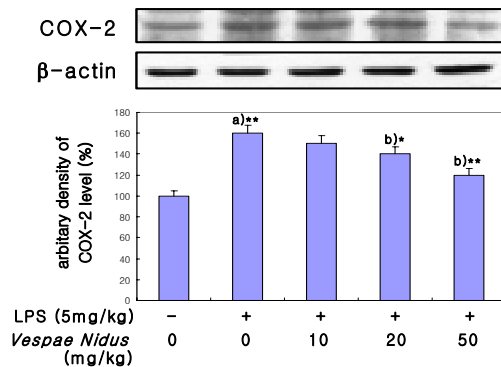


Fig. 7. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced COX-2 in mouse kidney. Western blot was performed to detect COX-2 protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * p < 0.05).

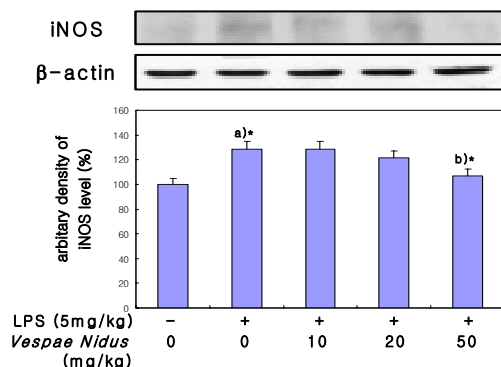


Fig. 8. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced iNOS in mouse kidney. Western blot was performed to detect iNOS protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (* p < 0.05).

6. LPS 처리 마우스에서 핵내의 NF- κ B 단백질 발현에 미치는 영향

NF- κ B의 subunit인 p50 및 p65의 핵내 양을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 9, 10).

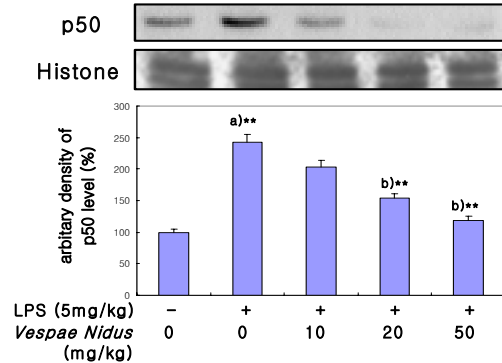


Fig. 9. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced p50 in mouse kidney. Western blot was performed to detect p50 protein level in nuclear fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01).

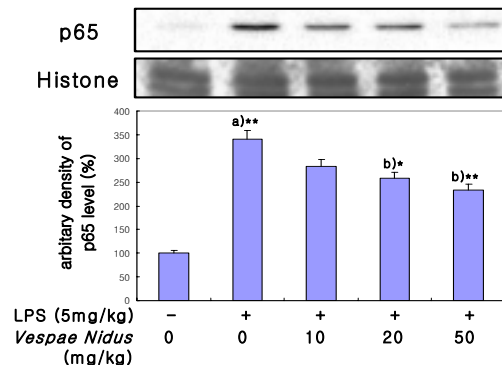


Fig. 10. Effect of *Vespae Nidus* on LPS-induced p65 in mouse kidney. Western blot was performed to detect p65 protein level in nuclear fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Vespae Nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * p < 0.05).

고찰

露蜂房은 性味가 平苦鹹微甘이며 肝, 腎, 胃에 歸經하여 祛風, 攻毒, 殺蟲, 止痛 등의 효능으로 驚癇 癩癧 風痺 癰疽 瘰癧 痔漏 陽痿 등을 비롯한 염증성 질환과 외과 질환의 치료에 내복 및 외용 약물로 활용되어 왔다¹³⁻¹⁵. 성분은 주로 밀랍과 수지이며¹¹⁻¹³, 추출물로 propolis가 있는데 이는 잎, 꽃, 열매 및 새싹을 보호하기 위해 분비된 항균성과 방수성, 절연성을 가진 식물의 수지화합물과 벌들의 타액효소가 혼합되어 만들어진 황갈색 또는 암갈색의 물질을 말한다²⁸. 최근 propolis에 대한 실험 연구에서 항암, 항염증, 면역 조절, 항고혈압, 항고혈당, 항산화 및 항균 활성이 보고되었다^{16-19,29-31}.

Propolis의 항산화 활성은 주로 지질의 peroxy radical에 대

한 flavonoid의 소거 효과에 기인하는 것이 알려져 있다¹⁶⁾. Flavonoid는 propolis의 주성분으로 DPPH 라디칼에 대한 강한 소거 활성, 지질과산화 억제 활성, superoxide anion radical 소거 활성, DNA에 대한 방사선 방어 효과 등이 알려져 있으며³²⁾, 또한 ONOO⁻를 효과적으로 제거한다는 보고도 있다³³⁾.

따라서 露蜂房이 노화 억제 효과를 나타낼 가능성이 기대되므로 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가진 활성산소와 NO, ONOO⁻를 제거하는 작용이 있는지를 검토하고, 염증 인자 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

ONOO⁻는 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다. 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO⁻ 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다³⁴⁾.

생체 내에서 일어나는 거의 모든 현상들은 혈관을 거쳐 발생하므로 혈관 내피세포에서 t-BHP를 처리하여 세포사를 유도하고 露蜂房이 보호 효과를 나타내는지를 MTT assay로 검토한 결과 露蜂房추출물의 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가되었다. 또한 혈관내피세포에서 t-BHP 처리에 의해 ROS, NO 및 ONOO⁻ 생성이 증가되었으나 露蜂房추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

활성산소는 불안정한 조직 세포를 공격하여 과산화지질을 다량 생성시키고 이 때 생성된 과산화지질은 세포의 구성막 성분을 파괴시켜 세포 손상을 유발시키는 내인성 독성물질로 알려져 있다³⁵⁾. LPS 처리 마우스에서 MDA 함량이 증가되었으나 露蜂房추출물을 투여한 경우에 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이는 露蜂房추출물이 ROS 및 ONOO⁻ 생성 및 제거 효과에 의해 세포막의 불포화지방산의 지질과산화를 억제함으로써 MDA가 저해된 것으로 생각된다.

또한 glutathione 함량도 LPS 처리에 의해 감소되었으나 露蜂房추출물을 투여한 경우에는 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다. Glutathione은 주로 간에서 생합성되어 전신에 널리 분포하는데 여러 가지 생화학적 반응에 필수적인 물질이며 oxygen free radical의 소거에도 밀접하게 관여하고 있다³⁶⁾. 그러므로 露蜂房추출물이 체내에 독성이 유발되면 생체 방어시스템의 가동을 촉진시켜 해독 반응을 빠르게 촉진시키는 것으로 생각된다.

염증 인자 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토한 실험에서 LPS 처리에 의해 COX-2 및 iNOS 단백질 발현이 증가되었으나 露蜂房추출물을 경구투여한 경우에 억제되는 것으로 나타났다. 또한 露蜂房추출물은 핵내의 p50 및 p65 단백질의 발현이 LPS 처리에 의해 증가되는 것을 농도 의존적으로 억제하여 NF- κ B의 활성화를 억제시키는 것으로 여겨진다. 그러므로 露蜂房이 활성산소를 억제하는 항산화 효과에 의해서 염증 인자들을 억제시키는 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 露蜂房은 ONOO⁻, 활성산소 및 활성질소를 소거하고 생성을 억제할 뿐만 아니라 여러 가지

염증성 단백질의 발현을 억제하여 염증 과정 및 염증성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 것으로 사료된다.

결 론

露蜂房이 t-BHP에 의해 생성되는 ROS, NO 및 ONOO⁻에 대한 억제능이 있는지를 검토하고 LPS를 처리한 마우스에서 염증 인자 단백질인 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 露蜂房추출물은 혈관내피세포에서 t-BHP로 유도한 세포사에 대하여 농도 의존적으로 저해하는 효과를 나타내었다. 혈관내피세포에서 t-BHP에 의해 ROS, NO, ONOO⁻ 생성이 증가되었으나 露蜂房추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. LPS 처리로 산화 스트레스를 유도한 마우스에서 MDA 생성이 증가되고 glutathione 함량이 감소되었으나 露蜂房추출물 경구 투여에 의해 회복되었다. 露蜂房추출물은 LPS 처리로 증가된 iNOS, COX-2의 발현을 억제하였고, NF- κ B (p65와 p50)의 발현도 억제하였다. 이상의 결과로서 露蜂房은 ONOO⁻를 효과적으로 소거하고 염증 인자 단백질의 발현을 억제하여 염증 및 염증성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

참고문헌

1. Yu, B.P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 21: 651-668, 1996.
2. 平田結善緒. NO and NOS. *内分泌, 糖尿病科*, 2: 207-214, 1996.
3. Carr, A.C. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1716-1723, 2000.
4. 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.
5. 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.
6. Haenen, G.P.M.M., Paquay, J.B.G., Korthouwer, R.E.M., Bast, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 591-596, 1997.
7. Pannala, A.S., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B., Singh, S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 164-170, 1997.
8. Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P., Chung, H.Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression : NF- κ B activation and I κ B α degradation. *Free Radical Biol Med.* 28: 683-692, 2000.
9. Ghost, S., May, M.J., Kopp, E.B. NF- κ B and Rel proteins :

- evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16: 225-260, 1998.
10. 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.
 11. 전국 한의과대학 본초학교수. *本草學*. 서울,영림사, pp 647-648, 1991.
 12. 李尙仁. *本草學*. 서울, 醫藥社, pp 534-535, 1983.
 13. 江蘇新醫學院 編. *中藥大辭典*. 上海, 上海科學技術出版社, pp 2736-2737, 1983.
 14. 吳儀洛. *本草從新*. 上海, 上海科學技術出版社, p 340, 1982.
 15. 朱良春 編著. *蟲類藥的應用*. 山西, 山西科學技術出版社, pp 58-70, 1994.
 16. Scheller, S., Witczok, T., Imielski, S., Krol, W., Gabrys, J. and Shani, J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol.* 57(3):461-465, 1990.
 17. 양송원. 천연물질의 항균 활성에 관한 연구. 전남대학교 대학원, 2001.
 18. 송윤선. Propolis의 약물학적 특성. 항염증 및 에스트로젠성 효과. 숙명여자대학교 대학원, 2001.
 19. 허홍열. Propolis가 마우스에서 종양 발생 및 비장세포와 대식세포의 성장에 미치는 영향. 경북대학교 대학원, 1998.
 20. 김영대, 이명중. 露蜂房의 항산화 작용에 관한 연구. *한방재활의학회지* 13(1):11-22, 2003.
 21. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 93: 157-165, 1986.
 22. Cathcart, R., Schwiens, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 134: 111-116, 1983.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358, 1979.
 26. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys.* 82: 70-77, 1959.
 27. 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.
 28. A Monti, M., Berti, E., Carminati, G. and Cusini, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis.* 9: 163-164, 1983.
 29. Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.* 35: 77-82, 1991.
 30. Frenkel, K., Wei, H., Bhimani, R., Ye, J., Zaduanisky, J.A., Huang, M., Ferraro, T., Conney, A.H., Grunberger, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.* 53: 1255-12561, 1993.
 31. Pascual, C., Gonzalez, R., Toricella, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol.* 41: 9-13, 1994.
 32. 정일윤. 프로폴리스에서 분리한 플라보노이드 화합물의 항산화 활성 및 방사선 방어 효과. *한국식품영양학회지* 34(2):162-166, 2005.
 33. Choi, J.S., Chung, H.Y., Kang, S.S., Jung, M.J., Kim, J.W., No, J.K. and Jung, H.A. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother. Res.* 16: 232-235, 2002.
 34. Kim, H.J., YU, B.P., Chung, H.Y. Molecular inflammation hypothesis of aging based in the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Free Radical Biol Med.* 10: 991-1005, 2002.
 35. Hornsby, P.J., Crivello, J.F. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Mol Cell Endocrinol.* 30: 123-147, 1983.
 36. Ross, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : Mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol Ther.* 37(2):231-239, 1988.