

五精丸이 ob/ob mouse에서 Redox Status 및 NF-κB Signaling에 미치는 영향

백기범 · 정지천*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects on Redox Status and NF-κB Signaling by *Ojunghwan*

Ki Beom Baek, Ji Cheon Jeong*

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

Peroxynitrite (ONOO⁻), superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$) and nitric oxide (NO) are cytotoxic because they can oxidize several cellular components such as proteins, lipids and DNA. They have been implicated in the aging processes, and age-related diseases such as Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, cancer, diabetes, obesity and atherosclerosis. The aim of this study was to investigate the effects of *Ojunghwan* on the generation of peroxynitrite (ONOO⁻), nitric oxide (NO) and superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), and on the expression of NF-κB-dependent inflammatory proteins in ob/ob mice. Mice were grouped and treated for 5 weeks as follows. Both the normal lean (C57/BL6J 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 30 and 90 mg *Ojunghwan* per 1 kg of body weight for 14 days. For this study, the fluorescent probes, namely 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used. Western blot was performed using anti-phospho IκB-α, anti-IKK-α, anti-NF-κB (p50, p65), anti-COX-2, anti-iNOS, anti-VCAM-1 and anti-MMP-9 antibodies, respectively. *Ojunghwan* inhibited the generation of ONOO⁻, NO and $\cdot O_2^-$ in the lipopolysaccharide (LPS)-treated mouse kidney postmitochondrial fraction in vitro. The generation of ONOO⁻, NO, $\cdot O_2^-$ and PGE₂ were inhibited in the *Ojunghwan*-administered ob/ob mice groups. The GSH/GSSG ratio was decreased in the ob/ob mice, whereas that were improved in the *Ojunghwan*-administered groups. *Ojunghwan* inhibited the expression of phospho-IκB-α, IKK-α, NF-κB (p50, p65), COX-2, iNOS, VCAM-1 and MMP-9 genes. These results suggest that *Ojunghwan* is an effective scavenger of ONOO⁻, $\cdot O_2^-$, NO and PGE₂, and has an inhibitory effect on the expression of NF-κB-dependent inflammatory genes in ob/ob mice. Therefore, *Ojunghwan* might be used as a potential therapeutic drug against the inflammation process and inflammation-related diseases.

Key words : *Ojunghwan*, peroxynitrite, nitric oxide, reactive oxygen species, IKK-α, IκB-α, NF-κB, COX-2, iNOS, MMP-9

서 론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응과 깊이 관련되어 있다. 특히 노화된 생물에 있어서 생리적 조절이 손상된 것으로 알려진 염증 반응은

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

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

· 접수 : 2008/07/28 · 수정 : 2008/08/11 · 채택 : 2008/09/17

proinflammatory state (염증 촉진 단계)가 지속적으로 유지되는 만성적인 염증 반응을 의미하며, 이것이 잘 조절되지 못할 경우 노화 촉진이나 노인성 질환으로 연결될 것이다^{1,2)}.

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)}. NO와

superoxide anion radical ($\cdot O_2$)이 반응하여 생성되는 ONOO⁻는 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내므로 NO와 $\cdot O_2$ -보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있다³⁾.

염증 과정과 염증성 질환에는 reactive species (RS) 반응에 의해 초래되는 nuclear factor κB (NF-κB)의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. NF-κB는 면역, 염증 반응, 세포 분화, apoptosis에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 중심 역할을 하는 전사 인자로서⁶⁾, inhibitor κB (IκB)라는 억제 단백질과 결합된 불활성화 상태로 세포질에 존재한다^{6,7)}.

ROS, cytokines, mitogens, bacterial lipids, viral transactivators 등을 포함한 다양한 자극이 발생하면 NF-κB inducing kinase (NIK)가 IκB kinase (IKK) 복합체를 활성화시키고 이어 IκB의 인산화와 단백질 분해가 일어나고⁶⁾, NF-κB가 핵 내로 유입되어 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor (TNF-α), matrix metalloproteinases (MMPs), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), interleukin-6 (IL-6) 등 염증 반응에 관련된 단백질의 발현을 증가시키게 된다⁸⁾. 또한 COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 통증, 염증과 발열을 전달할 뿐만 아니라 종양 형성을 도와준다^{9,10)}. 따라서 ROS, NO 및 PGE₂의 생성을 억제하고 그 원인인 iNOS와 COX의 발현을 억제하며 NF-κB의 활성화를 조절하는 작용을 나타내는 약물이라면 염증성 질환의 예방과 치료에 도움이 될 것이다.

五精丸은 延年益壽 효능을 가진 二精丸^{11,12)}과 三精丸¹²⁻¹⁴⁾ 및 枸杞還童丸^{13,15)}을 합방한 처방이다. 枸杞子 (*Lycii Fructus*)와 黃精 (*Polygonati sibirici Rhizoma*)으로 구성된 二精丸은 <聖濟總錄>¹¹⁾에 助氣固精 補填丹田 活血駐顏 長生不老 등의 효능을 가진 神仙服草木藥으로 수록되어 있고, 蒼朮 (*Atractylis Rhizoma*)과 地骨皮 (*Lycii Cortex Radicis*) 및 桑椹子 (*Mori Fructus*)로 구성된 三精丸은 <東醫寶鑑>¹⁴⁾에 久服輕身 延年益壽 面如童子한다고 기재되어 있다. 또한 枸杞子和 蒼朮로 구성된 枸杞還童丸은 <普濟方>¹⁵⁾에 益肝腎之精, 明目進食, 益氣延年한다고 수록되어 있다. 노년기에는 腎陰이 부족해져 消渴을 비롯한 성인병이 유발되기 쉽고 노화가 촉진되는데 腎陰을 補하는 약재들로 구성된 五精丸의 補陰 효능은 노화 방지 효과와 함께 비만, 당뇨병 및 그 합병증의 억제에도 유효할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 五精丸이 당뇨병과 비만에 관련된 염증 억제 효능이 있는지를 검토하기 위하여 in vitro에서 ROS, NO 및 ONOO⁻에 대한 생성 저해능을 검토하고, 유전적 고혈당 비만 마우스 (ob/ob mouse)에서 ROS, NO, ONOO⁻ 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성과 NF-κB를 비롯한 염증성 단백질에 미치는 영향을 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

五精丸의 구성 약재는 시중 (태원당약업사, 대구, 한국)에서 구입하고 정선하여 사용하였으며, 10 貼 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition and contents of *Ojunghwan*

韓藥名	생약명	중량
桑椹子	<i>Mori Fructus</i>	125 g
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	120 g
蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	120 g
黃精	<i>Polygonati sibirici Rhizoma</i>	60 g
地骨皮	<i>Lycii Cortex Radicis</i>	60 g
Total Amount		485 g

2) 시약 및 기기

시약은 sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA), NP-40, CAPS, protease inhibitors, DL-penicillamine, bovine serum albumine, potassium phosphate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), lipopolysaccharide (LPS)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), carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (EMD Biosciences, Inc., 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)에서 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)를 사용하였다.

3) 동물

체중 30 g 내외, 5주령의 외관상 건강한 수컷 ob/ob mouse 와 C57BL/6J mouse (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, mouse용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 五精丸 485 g에 3배량의 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 104.57 g (수율 21.56%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 실험군 분류 및 검액의 투여

실험동물은 C57 mouse로 정상군, ob/ob mouse로 대조군, ob/ob mouse에 五精丸추출물을 투여한 실험군 등 4군으로 나누었으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 실험군은 五精丸추출물 30,

90 mg/kg을 14일간 사료에 섞어 투여하였다.

3) 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 vortexing해 주면서 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.

4) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹⁶⁾에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 五精丸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 가한다. 그리고 10 μM ONOO⁻를 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 신장 균질액을, 대조군으로는 penicillamine을 사용하였다.

5) 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 五精丸추출물을 농도별로 분주하고, NO 생성원과 DAF-2를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다¹⁷⁾. NO 생성원으로 신장 균질액을, 대조군으로는 carboxy PTIO를 사용하였다.

6) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹⁸⁾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. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용

해한 600 U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 μM DCFDA와 600 U/ml esterase를 혼합하여 (최종 농도 6 U/esterase) 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 37℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 96 well microplate에 五精丸추출물을 농도별로 분주하고, 활성산소 생성원과 DCFDA를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다. 활성산소 생성원으로 신장 균질액을, 대조군으로는 Trolox를 사용하였다.

7) GSH/GSSG 비율 측정

GSH/GSSG 비율은 Gaitonoid의 방법¹⁹⁾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

8) Prostaglandin E₂ 측정

세포내에서 생성되는 염증물질인 Prostaglandin E₂(PGE₂)의 양은 serum을 사용하여 PGE₂ immunoassay kit (R&D SYSTEMS)의 실험 방법에 따라 측정하였다.

9) Western blot analysis

마우스에서 적출한 신장 조직 균질액의 cytosol, nuclear 분획에서 단백질을 분리하여 발현을 관찰하였다. 동일 량의 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 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.

10) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법²⁰⁾과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

11) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

실 험

1. 마우스 신장 균질액에서 ONOO⁻, NO 및 ROS 생성에 미치는 영향

LPS로 활성산소 및 질소 생성계를 유도한 신장 균질액에서 ONOO⁻, NO 및 ROS에 대한 억제 활성을 관찰하였다. ONOO⁻

생성에 대하여 五精丸추출물은 각각 10, 41, 80% 억제하여 ONOO⁻ 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine보다 약하지만 비교적 강한 억제 활성을 나타내었다(Fig. 1A). NO 생성에 대하여 五精丸추출물은 각각 9, 31, 61% 억제하여 NO 제거제인 carboxy-PTIO보다는 약하지만 비교적 강한 NO 억제 활성을 나타내었다(Fig. 1B). ROS에 대한 五精丸추출물의 생성 저해능을 검토한 결과 11, 31, 77 μg/ml 농도에서 각각 3, 18, 63% 억제하는 것으로 나타나 ROS 제거제인 trolox보다는 약하지만 비교적 강한 ·O₂⁻ 억제 활성을 나타내었다(Fig. 1C).

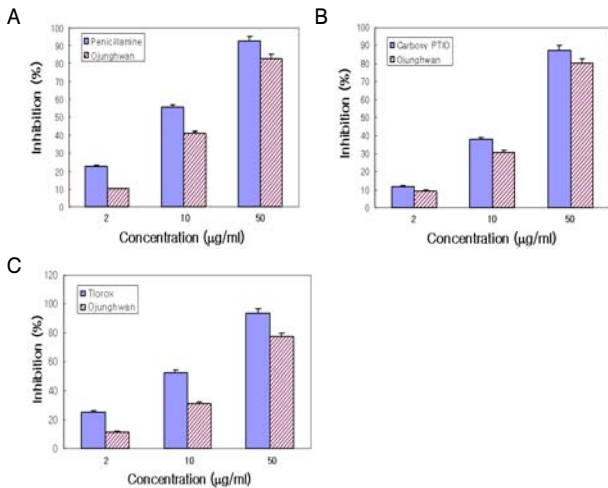


Fig. 1. Effect of *Ojunghwan* on LPS-induced ONOO⁻, NO and ROS inhibition in mouse kidney homogenate. Mice were injected LPS (5 mg/kg, single dose). Mice were sacrificed 5 hours after injection. *Ojunghwan* (2, 10, 50 μg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. Each values are the mean±S.E. of triplicate experiments. A : The inhibition of ONOO⁻ was measured by DHR 123 fluorescence probe. B : The inhibition of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. C : The inhibition of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe.

2. ONOO⁻, NO 및 ROS 생성에 미치는 영향

ONOO⁻ 생성은 정상군에서 13.28±0.77%였으나 대조군에서는 31.98±2.75%로 증가되었다. 五精丸추출물 30, 90 mg/kg을 투여한 실험군에서는 각각 29.78±1.99, 24.79±1.65%로 감소되어 90 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 2A). NO 생성은 정상군에서 12.11±0.81%였으나 대조군에서는 22.87±1.92%로 증가되었다. 실험군에서는 21.54±1.77, 18.46±1.31%로 감소되어 90 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다 (Fig. 2B). ROS 생성은 정상군에서 27.34±1.65%였으나 대조군에서는 65.87±4.01%로 증가되었다. 실험군에서는 60.44±3.75, 53.09±2.91%로 감소되어 모두 유의성이 인정되었다(Fig. 2C).

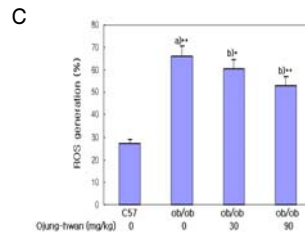
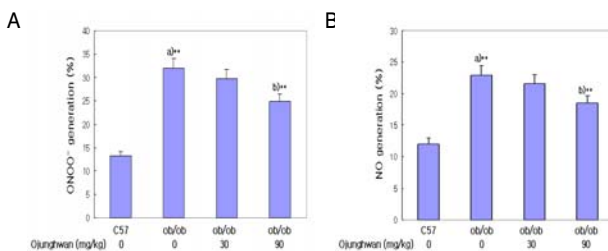


Fig. 2. Effect of *Ojunghwan* on ONOO⁻, NO and ROS generation in mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05). A : The generation of ONOO⁻ was measured by DHR 123 fluorescence probe. B : The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. C : The generation of ROS was measured by DCFH-DA fluorescence probe.

3. GSH/GSSG 비율에 미치는 영향

정상군에서 GSH와 GSSG의 비율은 0.18±0.01%였으나 대조군에서는 0.10±0.01%로 유의하게 감소되었다. 실험군에서는 0.25±0.02, 0.35±0.02%로 증가되어 모두 유의성이 인정되었다(Fig. 3).

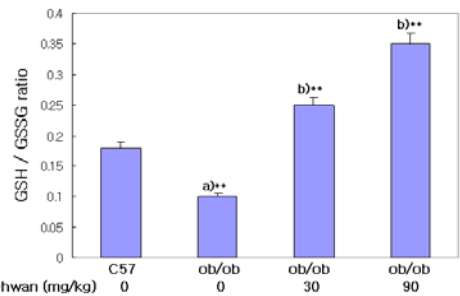


Fig. 3. Effect of *Ojunghwan* on GSH/GSSG level in mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05).

4. PGE₂ 생성에 미치는 영향

五精丸추출물이 세포내에서 생성되는 염증물질인 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 검토하기 위해서 serum에서의 PGE₂ 양을 조사하였다. 정상군에는 283.24±19.81 pg/ml였으나 대조군에서는 369.54±25.79 pg/ml로 유의하게 증가되었다. 실험군에서는 351.77±23.96, 322.62±22.73 pg/ml로 감소되어 90 mg/kg 투여군에서 유의성이 인정되었다(Fig. 4).

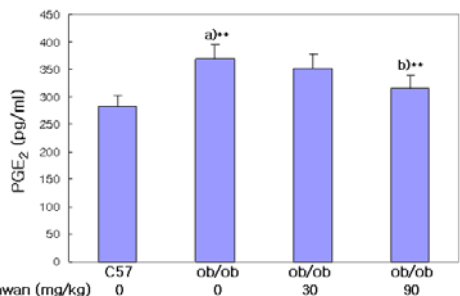


Fig. 4. Effect of *Ojunghwan* on PGE₂ level in mouse serum. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** p < 0.01, * p < 0.05).

5. IKK- α 및 phospho I κ B- α 에 미치는 영향

NF- κ B 활성화에 관여하는 신호전달계인 IKK- α 에 미치는 영향을 검토한 결과 대조군에서 증가되었으나 五精丸추출물을 투여한 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5A). Phospho I κ B- α 는 대조군에서 증가되어 인산화가 진행되었으나 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5B).

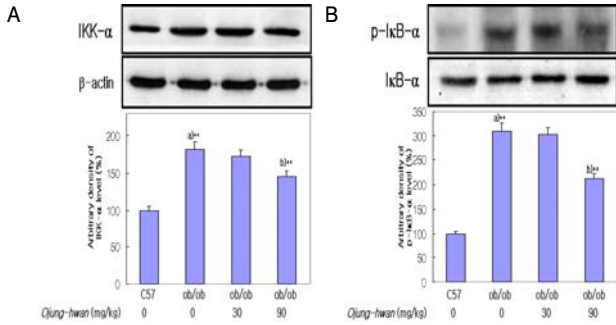


Fig. 5. Effect of *Ojunghwan* on IKK- α and p-I κ B- α expression. Western blot was performed to detect IKK- α and p-I κ B- α protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean \pm S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05). A : IKK- α protein, B : p-I κ B- α protein.

6. NF- κ B 단백질 양에 미치는 영향

五精丸추출물이 ROS 감수성 전사인자인 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵내의 p50, p65 양을 조사하였다. NF- κ B의 subunit인 p50, p65 핵내 양을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6).

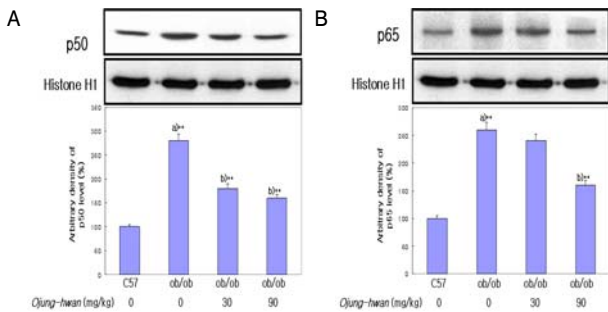


Fig. 6. Effect of *Ojunghwan* on NF- κ B expression. Western blot was performed to detect NF- κ B protein level in nuclear fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean \pm S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01, * : p < 0.05). A : p50 protein, B : p65 protein.

7. 염증 촉진 인자의 발현에 미치는 영향

五精丸추출물이 염증 촉진인자인 COX-2, iNOS의 단백질 양에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나, 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7). VCAM-1, MMP-9의 단백질 양에 미치는 五精丸추출물의 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되었으나, 실험군에서는 감소되는 경향을 보였다(Fig. 8).

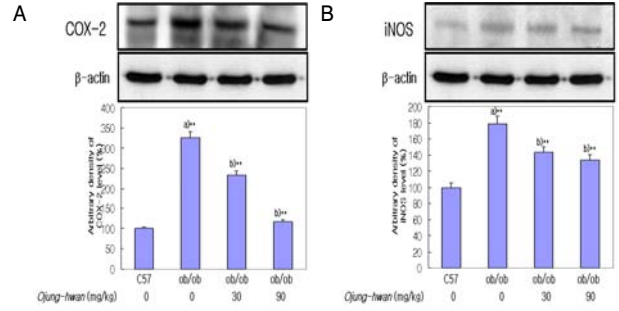


Fig. 7. Effect of *Ojunghwan* on COX-2 and iNOS expression. Western blot was performed to detect COX-2 and iNOS protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean \pm S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A : COX-2 protein, B : iNOS protein.

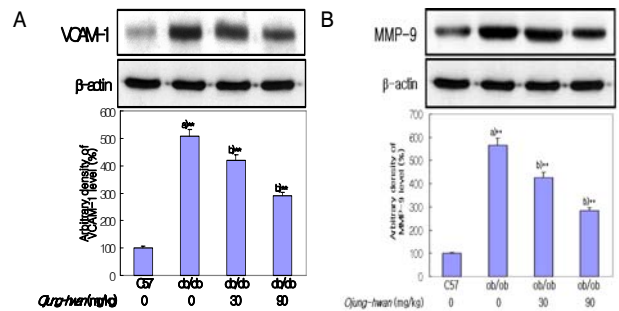


Fig. 8. Effect of *Ojunghwan* on VCAM-1 and MMP-9 expression. Western blot was performed to detect VCAM-1 and MMP-9 protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Ojunghwan* (30, 90 mg/kg) for 14 days. Results are mean \pm S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (** : p < 0.01). A : VCAM-1 protein, B : MMP-9 protein.

고찰

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- κ B의 활성화와 함께 염증 반응을 유도하여 개체의 노화가 진행된다는 것이다. 염증 반응과 혈관 변성에서 NF- κ B 활성화는 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 를 포함하는 일부 주요 염증 촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하고 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증의 발생에 중요한 역할을 한다⁵⁾. 동맥경화증은 혈관 노화의 대표적인 예로서 지속적인 NF- κ B의 활성화에 의한 염증 및 혈관 평활근 세포의 증식과정으로 인해 일어난다. 동맥경화 병변 부위에서 평활근세포, 대식세포 및 혈관내피세포의 NF- κ B 활성이 증가되어 있다^{22,23)}.

본 실험에 사용된 五精丸은 延年益壽 효능을 가진 二精丸과 三精丸 및 枸杞還童丸을 합방한 처방으로 腎陰을 補하는 약재들로 구성되어 있다. 구성 약물의 효능을 살펴보면 枸杞子는 性味甘苦寒으로 滋腎養肝 補虛勞 強筋骨 明目聰耳 등의 효능을 가지고 있고, 蒼朮은 性味甘辛溫이며 燥胃健脾 發汗除濕 散風寒濕 能升發胃中陽氣 등의 효능을 가지고 있으며, 黃精은 性味甘平이며 補脾益氣 潤肺滋陰 填精髓 등의 효능이 있고, 桑椹子는

性味가 甘酸溫으로 補腎水 利五臟 安魂鎮神 聰耳明目 生津止渴 利水消腫 解酒烏髮 등의 효능을 가지고 있으며, 地骨皮는 性味가 苦寒辛으로 清熱涼血 助正氣 除肝腎虛熱 降肺中伏火 등의 효능을 가지고 있다^{24,25}. 특히 枸杞子和 黃精은 久服輕身不老의 효능이 있어 延年益壽 약물에 속하는데²⁶, 消渴의 치료에도 사용되어 왔으며 동물 실험에서 혈당 강하 효과를 나타내었다²⁷. 한의학에서 腎과 脾의 虛損은 노화의 주된 원인으로 인식되고 있으므로²⁸, 五精丸은 先天의 근본인 腎과 後天의 근본인 脾를 함께 보충하고 조절하여 노화와 비만을 억제하고 당뇨병과 그 합병증에도 효과를 나타낼 것으로 기대된다, 따라서 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 제6염색체 상에 열성 유전자 ob가 homo 접합체 (ob/ob)로 되었을 때 나타난다. 비만은 3주령에서부터 나타나기 시작하고 그 때부터 체중이 눈에 띄게 증가하여 80 g까지도 도달하여 정상 마우스(30-40 g)의 3배 가까이 된다. 체지방의 증가와 함께 인슐린 저항성이 나타나며 계속해서 고혈당과 고인슐린혈증을 보여 2형 당뇨병과 유사한 임상적 특성을 나타낸다^{28,29}.

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 발생될 것으로 추측하고 있다^{30,31}.

마우스에 LPS를 주입하여 활성산소 및 활성질소 생성체를 유도한 신장의 균질액에 五精丸추출물을 처리한 실험에서 농도 의존적으로 ONOO⁻ 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 또한 NO와 ROS 생성에 대해서도 五精丸추출물은 유의한 억제 활성을 나타내었다.

ob/ob mouse에서 ROS와 NO 생성은 현저하게 증가되었으나 五精丸추출물을 투여한 경우에 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 ONOO⁻도 ob/ob mouse에서 생성이 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 유의하게 억제되었다.

GSH/GSSG 비율에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob mouse에서 유의하게 감소되었으나 五精丸추출물을 투여한 경우에 유의성 있게 증가되었다. ob/ob mouse에서 GSH가 감소되고 GSSG가 증가되었으나 五精丸추출물 투여군에서는 GSH가 증가되고 GSSG가 감소된 것이다. 생체내의 oxygen free radical을 소거시키는 항산화 물질인 환원형 glutathione (GSH)은 glutathione peroxidase에 의해 H₂O₂를 제거하면서 산화형 glutathione (GSSG)으로 전환되고, GSSG는 glutathione reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원된다³². 그러므로 五精丸추출물은 GSSG를 GSH로 환원시켜 oxygen free radical에 의한 조직 손상을 효과적으로 방어하는 것으로 여겨진다.

PGE₂는 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증 매개 물질로서 혈관 확장, 염증, 항염증 등 많은 생리학적 활성을 가지며 세포 내에서는 c-AMP의 농도를 증가시켜 세포내 여러

반응을 일으키는 물질로 알려져 있다. 만성 염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 signaling proteins의 상승 조절 작용을 일으켜 NO와 prostaglandins (PG)를 과량 생성하게 되고, 이는 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 질환의 원인이 된다^{9,10}. 본 실험에서 五精丸추출물은 ob/ob mouse에서 증가된 PGE₂ 생성을 감소시키는 나타나 염증 반응을 저해하는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

염증 반응 신호 전달 과정의 초기 단계인 IKK-α 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob mouse에서 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 또한 NF-κB 활성화에 관여하는 IκB-α 단백질은 ob/ob mouse에서 인산화가 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 감소되는 것으로 나타났다.

NF-κB 활성화에 미치는 영향을 검토한 결과 ob/ob mouse에서 핵내의 p50, p65 단백질 양이 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 그러므로 五精丸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 병태학적인 조건에서는 고농도로 유리된다³³. 그리고 성장인자와 mitogen에 유도되어 지속적인 prostaglandins 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^{34,35}.

iNOS는 L-arginine과 분자산소에 의한 NO의 생성 반응을 촉매하는 효소로서, iNOS에 의해 일시적으로 대량 생산되는 NO는 외부로부터 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. 그 대표적인 예가 패혈성 shock나 cytokine 투여에 의한 치료 저항성의 혈관 확장과 심근 수축력의 저하이다. 또한 국소적으로 iNOS의 과잉 발현이 관여하고 있는 질환으로 만성 관절염, 심근염, 사구체염, 인슐린 의존성 당뇨병, 파킨성 대장염 등이 있다³⁶.

VCAM-1은 IL, TNF-α 등과 같은 proinflammatory cytokine에 의해 유도되거나 상승 발현되는 접착분자 단백질로서 단핵 백혈구가 염증 장소로 유입되도록 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 혈관 염증질환 발생 시에 과량으로 발현되어 과도한 염증 반응을 유발하게 된다³⁷⁻³⁹. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)과 기저막 (basement membrane)의 분해에 관여하는 일종의 단백질 분해효소로서 여러 효소의 family로 이루어져 있다. MMP는 결합조직 구성성분들의 과도한 분해, immediate early genes (IEGs)와 cytokines 및 free radicals에 의하여 발현이 증가되므로 류머티스성 관절염, 만성 궤양뿐만 아니라 종양의 침투와 전이, 염증 진행 과정에도 관여하고 있는데, MMP-9는 세포 분화, 사멸, 혈관 신생, 면역 및 종양세포 성장 등에 관여하는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁻⁴².

본 실험 결과 ob/ob mouse에서 COX-2, iNOS 단백질 발현이 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다. 또한 VCAM-1과 MMP-9의 발현이 증가된 것을 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 五精丸추출물이 ROS와 RNS를 저해하는 효과에 의해 염증인자 단백질의 발현을 저해시키고, PGE₂ 생성을 감소시키는 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 五精丸은 ROS와 RNS의 생성을 억제하고 IKK pathway를 통해서 IκB가 인산화되는 것을 억제함으로써 NF-κB가 핵 속으로 이동하지 못하게 하여 COX-2, iNOS 및 VCAM-1 등과 같이 NF-κB를 binding site로 가지는 염증 촉진 단백질 및 MMP-9의 발현을 억제하여 노화 관련 미세염증 반응의 억제를 가져와 당뇨병과 비만에 관련된 염증 및 염증성 질환에 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다.

결 론

五精丸이 당뇨병과 비만에 관련된 염증 억제 효능이 있는지를 확인하기 위하여 ROS, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂ 생성과 NF-κB와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 검토하였다.

五精丸추출물은 마우스 신장 균질액에서 LPS에 의해 유도된 ROS, NO 및 ONOO⁻의 생성을 유의성 있게 억제하였다. ob/ob mouse에서 ROS, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂ 생성이 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 유의성 있게 감소되었다. ob/ob mouse에서 GSH/GSSG 비율이 감소되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 유의하게 증가되었다. 五精丸추출물은 ob/ob mouse에서 증가된 IKK-α, phospho IκB-α 및 NF-κB (p50, p65)의 발현을 억제시켰다. 또한 ob/ob mouse에서 염증 촉진인자인 COX-2, iNOS, VCAM-1 및 MMP-9의 발현이 증가되었으나 五精丸추출물 투여에 의해 억제되었다.

이상의 결과로서 五精丸은 ROS, NO, ONOO⁻ 및 PGE₂를 소거하고 NF-κB와 관련된 염증 인자를 억제시킴으로써 염증 및 염증성 질환에 유용한 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

참고 문헌

- De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., Ginaldi, L. Inflammation-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* 579(10):2035-2039, 2005.
- Ginaldi, L., De Martinis, M., Monti, D., Franceschi, C. Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence. *trends Immunol.* 26: 79-84, 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. NF-κB and Rel proteins : Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16: 225-260, 1998.
- 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.
- Halushka, P.V., Mais, D.E., Mayeux, P.R. and Morinelli, T.A. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 29: 213-239, 1989.
- Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Fahmi, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 33(3):155-167, 2003.
- 趙佶. 聖濟總錄. 北京, 人民衛生出版社, p 2263, 2002.
- 王毅, 靳長金, 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 31-32, 95, 1989.
- 何紹奇, 宋乃光 編著. 中老年保健養生方. 北京, 學苑出版社. pp 208-209, 219-220, 2002.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 78, 1981.
- 朱橚. 普濟方. 서울, 翰成社, p 3339, 1995.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gaitonide, M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring 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.
- 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.

22. Maziere, C., Auclair, M., Djavaheri-Mergny, M., Packer, L., Maziere, J.C. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF-κB in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int.* 39: 1201-1207, 1996.
23. 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.
24. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 71, 74, 118-119, 207, 1981.
25. 吳儀洛. 本草從新. 上海, 上海科學技術出版社, pp 22-23, 67, 180, 1982.
26. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧, 遼寧科學技術出版社, pp 53-54, 327-329, 331-334, 1989.
27. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京, 人民衛生出版社, pp 741-743, 998-1000, 1983.
28. Mordes, J.P. and Rossini, A.A. Animal models of diabetes mellitus. *Am J Med.* 70(2):353-360, 1981.
29. Eleazar, S. Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes metabolism reviews.* 8(3):179-208, 1992.
30. Cai, H., Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844, 2000.
31. Matsubara, T., Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 137: 3295-298, 1986.
32. 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.
33. Chung, H.Y., Soung, D.Y., Kim, A.R., Choi, H.R., Kim, H.J., Choi, J.S., Yang, R., Lee, K.H. and Yu, B.P. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO⁻: Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.* 10: 46-59, 2000.
34. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver disease. *J Hepatol.* 17(2):S38-40, 1993.
35. 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.
36. 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.
37. Fries, J.W.U., Williams, A.J., Atkins, R.C., Neman, W., Lipscomb, M.F., Collins, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol.* 143: 725-737, 1993.
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.
40. Woessner, J.F. and Nagase, H. Matrix metalloproteinases and Timps. Oxford, Oxford university Press. pp 1-10, 2000.
41. McCawley, L.J. and Metrisian, L.M. Matrix metalloproteinases : They're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 13(5):534-540, 2001.
42. Liu, K.J., Rosenberg, G.A. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39: 71-80, 2005.