

# 虎杖根이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 LLC-PK<sub>1</sub> 세포의 Redox Status 및 NF-κB Signaling에 미치는 영향

김슬리 · 정지천\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실

## Effects of Polygoni Cuspidati Radix on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated LLC-PK<sub>1</sub> Cell's Redox Status and NF-κB Signaling

Sol Ri Kim, Ji Cheon Jeong\*

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

This study was designed to identify the effects of Polygoni cuspidati Radix(PCR) on the generation of superoxide anion radicals ( $\cdot O_2^-$ ), nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ) in the renal epithelial cells of mouse(LLC-PK<sub>1</sub>). The effects of PCR on the expression of inflammation-related proteins, IKK- $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B (p50, p65), COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$ , VCAM-1, were examined by western blotting. For this study, the fluorescent probes, namely dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) were used. Protein expression levels of IKK- $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B (p50, p65), COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$ , VCAM-1 were assayed by western blot. PCR reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death dose-dependently. It inhibited the generation of  $\cdot O_2^-$ , NO, ONOO $\cdot$  and PGE<sub>2</sub> in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated LLC-PK<sub>1</sub> cells *in vitro*. PCR inhibited the expression of IKK- $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ , COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$  and VCAM-1 genes by means of decreasing the NF- $\kappa$ B activation. These results suggest that PCR is an effective NO,  $\cdot O_2^-$ , ONOO $\cdot$  scavenger, and this substance recommended to be applied in treatment for the inflammatory process and inflammation-related disease.

Key words : Polygoni cuspidati Radix, LLC-PK<sub>1</sub> cell, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Reactive oxygen species, NF- $\kappa$ B activation

### 서 론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)인 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)인 nitric oxide (NO), nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), nitrous acid (HNO<sub>2</sub>), peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ) 등에 의한 oxidative stress는 조직손상과 세포손상을 일으켜 노화과정을 촉진하며 노인성 질환의 발생 과정에 관여한다<sup>1)</sup>.

NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타내며<sup>2)</sup> 세포막을 쉽게 확산하여 활성산소들과 반응할 수 있는데 특히  $\cdot O_2^-$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은

산화제인 ONOO $\cdot$ 을 생성한다<sup>3)</sup>. NO와  $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 강한 ONOO $\cdot$ 는 단백질, 지질, DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 세포막 산화 손상, 세포질 효소 활성 저해, 세포 변이를 일으켜 세포 손상을 유발시키며 노화, 암, 관절염, 피부염증 등의 여러 질환과 관련되는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>.

염증 과정과 염증성 질환에는 reactive species (RS)에 의해 초래되는 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데<sup>5)</sup>, 염증이 있어서 중요한 역할을 하는 세포 표면 수용체 (SH2, SH3), 유착분자 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; E-selectin; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) 및 cytokine (LPS, IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF), chemokine 등을 암호화하는 유전자들의 유도에 있어서 중요한자이다<sup>6)</sup>. 정상적인 상태에서 비활성화된 상태로 존재하다가 산화 환원의 불균형에 의해 활성화되어 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 등을 발현시킨다. iNOS는 cytokine과

\* 교신저자 : 정지천, 성남시 분당구 수내3동 87-2, 동국대학교 분당한방병원  
· E-mail : kyjic1931@daum.net, · Tel : 031-710-3727  
· 접수 : 2012/07/05 · 수정 : 2012/08/07 · 채택 : 2012/08/20

bacteria 산물인 endotoxin 및 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 전사단계에서 발현이 증가되며<sup>7)</sup>, COX-2는 노화 과정에서 현저히 발현이 증가되고, 주로 조직에서 prostaglandins (PGs)를 생성하여 염증과 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>.

NF-κB는 세포질 속에 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 inhibitor κB(IκB)에 의해 불활성 상태로 존재한다. 자외선, RS 등과 같은 자극에 의해 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)가 활성화 되고, IKK (Inhibitor κB kinase) pathway를 통해서 IκB가 분해되면서 NF-κB가 핵 속으로 이동하여, COX-2, iNOS, TNF-α, VCAM-1, interleukin-6 (IL-6) 등과 같이 NF-κB를 binding site로 가지는 여러 가지 노화 관련 유전자를 발현시킨다. 이는 종양형성, 자가면역 질환, 염증 질환에 중요한 역할을 담당한다<sup>9,10)</sup>.

虎杖根 (Polygoni cuspidati Radix)은 蓼, 大蟲杖, 苦杖, 酸杖, 斑杖이라고도 하며 蓼科 (마디풀과; Polygonaceae)에 속한 多年生草本인 호장근 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 또는 왕호장근 *P. sachalinensis* Fr. Schm.의 根莖과 根을 건조한 것으로, 性은 微寒, 味는 苦酸하며 祛風利濕, 散瘀定痛, 止咳化痰하는 효능이 있어 關節痺痛, 濕熱黃疸, 經閉, 癥瘕, 咳嗽痰多, 水火燙傷, 跌打損傷, 癰腫瘡毒을 主治한다<sup>11)</sup>. 호장근에 관한 기존 연구 동향을 보면 百日咳 유발균 生育抑制작용<sup>12)</sup>, 혈관신생 억제작용<sup>13)</sup>, 수축혈관 이완작용<sup>14)</sup>, 항암작용<sup>15)</sup>, 지질과산화 억제 작용과 항산화작용<sup>16)</sup>, 항균효과<sup>17)</sup> 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 염증성 질환의 치료에 활용되고 있는 虎杖根이 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사와 염증 억제 효능이 있는지에 대해 확인하기 위해 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, ONOO<sup>-</sup> 및 PGE<sub>2</sub> 생성과 NF-κB와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 연구한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제

호장근 (Polygoni cuspidati Radix, PCR)는 시중 (태원당약업사, 대구, 한국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (EMD Biosciences Inc., USA)에서, 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)은 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA)에서, NP-40, CAPS, Tris base, ammonium persulfate, ponceau, glycerol, protease inhibitors, bovine serum albumin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO,

USA)에서, 1차 항체인 IKK-α, phospho-IκB-α는 Cell Signaling Technology (Cell Signaling, USA)에서, p50, p65, iNOS, COX-2, VCAM-1, IL-1β, β-actin, histone H1과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다. 기기는 GENios (GENios-basic, Tecan, Austria), UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu Co., Japan) 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

### 3) 세포

Mouse의 신장상피세포인 LLC-PK<sub>1</sub> 세포 (Renal epithelial cells)는 경북대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받아 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검역의 조제

잘게 분쇄한 호장근 300 g에 3배 량의 95% methanol을 가지고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 55.88 g (수율 18.63%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2) 세포 배양

LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 100 mm dish (Corning Co., New York, USA)에 배양하였다. 이때 5% fetal bovine serum, L-glutamine (5.84 μg/ml)과 L-sodium bicarbonate (2.438 g/ml)를 함유한 DMEM/F12 배지에 penicillin-streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

### 3) MTT assay

호장근의 세포 독성 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발시킨 세포사에 대한 호장근의 세포 보호 효과를 알아보기 위해, Tada 등의 방법<sup>18)</sup>으로 측정하였다.

노란색의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액은 살아 있는 세포에서는 mitochondria의 succinyl dehydrogenase에 의해 비수용성인 보라색의 formazan으로 환원된다. 이 formazan의 발색 정도를 spectrophotometer로 측정하여 세포의 생존율을 측정함으로써 호장근의 독성 및 세포 보호 효과를 측정할 수 있다. LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>/well로 접종하여 24시간 배양하고 serum free 배지로 바꿔준 후, 호장근 추출물을 농도별로 가하여 1시간 전처리한 다음 호장근의 세포 독성을 측정하였다. LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>/well로 접종하여 24시간 배양하여 호장근 추출물을 1시간 전처리하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 최종 농도 100 mM이 되도록 가하여 5시간 더 배양한 후 호장근의 세포 보호 효과를 측정하였다. 측정시에는 배지를 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 세포에 가하여 4시간 추가 배양하고 solubilization 용액 (dimethyl sulfoxide:ethanol, 1:1)을 가하여 24시간 배양한 후, 595 nm에서 발색 정도를 측정하였다.

4) LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 ·O<sub>2</sub>, NO 및 ONOO<sup>-</sup> 소거능 측정

LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>/well로 분주하여 하루 동안 배양한 다음 호장근 추출물을 농도별로 전처리한 후 1시간 동안 배양하고, 각각 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM을 처리하여 5시간 동안 배양한 후 각 소거능을 측정하였다.

·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 소거능은 DCFDA assay<sup>19)</sup>로 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 따라서 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 200 μl와 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 희석한 0.125 mM DCFDA 50 μl를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다.

NO 소거능은 Nagata 등의 방법<sup>20)</sup>으로 측정하였다. 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)은 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. 따라서 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 150 μl와 Dimethyl sulfoxide 414.5 μl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석한 DAF-2 50 μl를 첨가한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다.

ONOO<sup>-</sup> 소거능은 Kooy 등의 방법<sup>21)</sup>에 의해 측정하였는데 96 well microplate의 배지를 제거하고 각 well당 free media 20 μl와 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4) 180 μl를 가하여 5분간 방치한 후 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다.

5) Prostaglandin E<sub>2</sub> 측정

세포내에서 생성되는 염증물질인 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 양은 배지를 사용하여 PGE<sub>2</sub> immunoassay kit (R&D SYSTEMS)로 측정하였다.

6) Western blot analysis

LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 100 mm dish에 24시간 배양한 후 호장근 추출물을 농도별로 1시간 전처리하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM을 가하여 5시간 더 배양한 후 PBS로 세척하고 scraper로 모은 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 cytosol, nuclear 단백질을 분리하여 염증인자의 단백질 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 타깃 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.

7) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>22)</sup>과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

8) 통계 처리

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

결 과

1. 세포 독성

호장근을 농도별 (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml)로 처리하였을 때 각각의 농도에서 98.27, 95.22, 87.71, 83.24, 72.55, 54.77, 43.01%의 생존율을 나타내어, 400 μg/ml까지는 세포 독성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

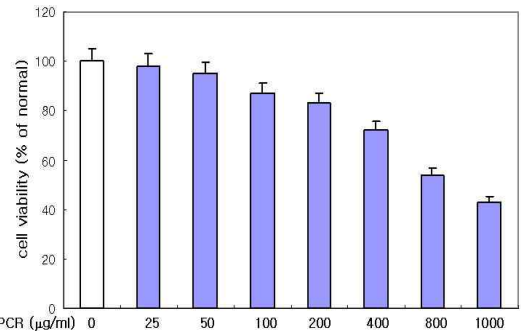


Fig. 1. Cytotoxic Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to PCR (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). After 24-hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean±S.D.

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 대한 세포 보호 효과

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때의 세포 생존율은 42.13%였으나, 호장근 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml로 전처리한 세포의 생존율은 각각 44.13, 54.87, 68.12, 76.24, 79.55, 64.29, 48.59%로 나타나 400 μg/ml까지는 농도 의존적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

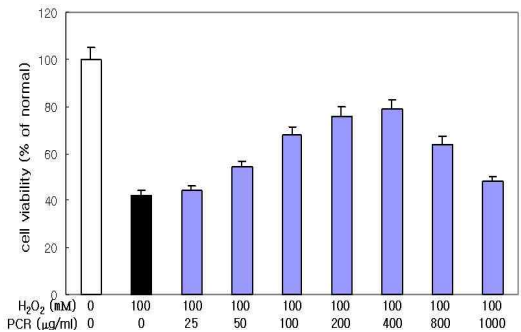


Fig. 2. Cytoprotective Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Death in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μg/ml). After 5hr exposure, the cell viability was evaluated by MTT assay. Each value is the mean±S.D.

3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO 및 ONOO<sup>-</sup> 생성에 미치는 영향  
·O<sub>2</sub><sup>-</sup>는 정상 세포에서 133.28±7.01 fluorescence/min인데 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 214.89±12.58 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 100 μg/ml 농도에서 169.85±7.03 fluorescence/min, 200 μg/ml 농도에서 160.51±6.55 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

NO는 정상 세포에서 72.58±3.77 fluorescence/min인데 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 118.06±6.71 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 50 μg/ml 농도에서 101.65±4.33 fluorescence/min, 100 μg/ml 농도에서 98.24±5.27 fluorescence/min, 200 μg/ml 농도에서 84.63±4.09 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

ONOO<sup>-</sup>는 정상 세포에서 148.26±6.21 fluorescence/min인데 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 343.48±11.48 fluorescence/min으로 생성이 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되어 50 μg/ml 농도에서 294.57±14.68 fluorescence/min, 100 μg/ml 농도에서 259.18±10.21 fluorescence/min, 200 μg/ml 농도에서 235.13±9.99 fluorescence/min으로 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

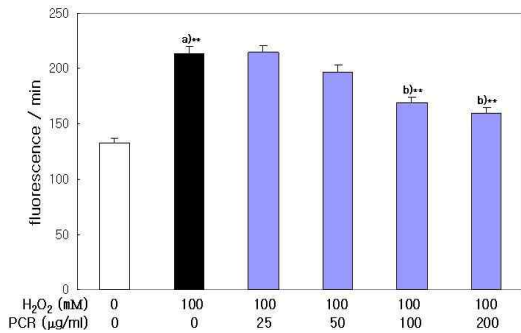


Fig. 3. Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) on ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> Generation in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100, 200 μg/ml). The generation of ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01).

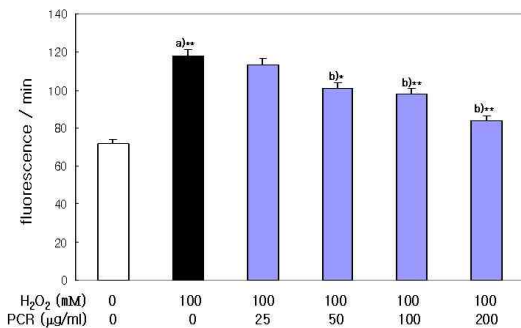


Fig. 4. Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) on NO Generation in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100, 200 μg/ml). The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05).

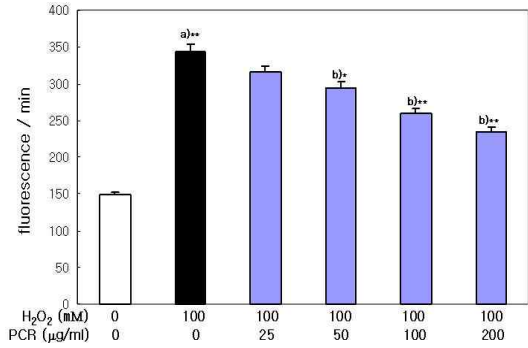


Fig. 5. Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) on ONOO<sup>-</sup> Generation in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100, 200 μg/ml). The generation of ONOO<sup>-</sup> was measured by DHR 123 fluorescence probe. Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05).

4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

PGE<sub>2</sub>는 정상 세포에서 16.22±0.81 pg/ml인데 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 29.67±1.45 pg/ml로 유의성 있게 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 실험군에서는 50 μg/ml 농도에서 25.44±1.18 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 23.81±1.27 pg/ml로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6).

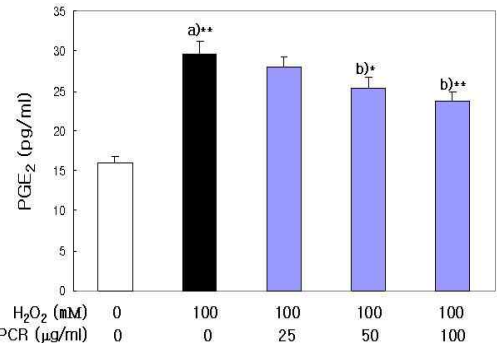


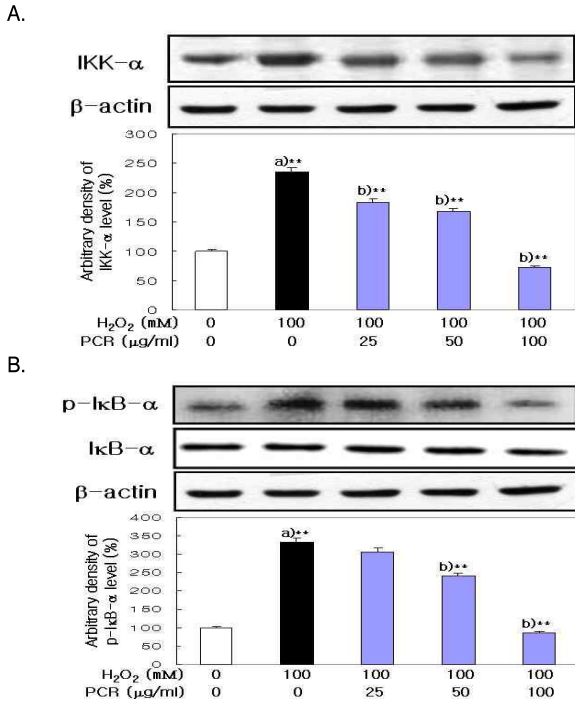
Fig. 6. Effect of Polygoni cuspidati Radix (PCR) on PGE<sub>2</sub> Level in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. LLC-PK<sub>1</sub> cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05).

5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 IKK-α 및 phospho-IκB-α에 미치는 영향

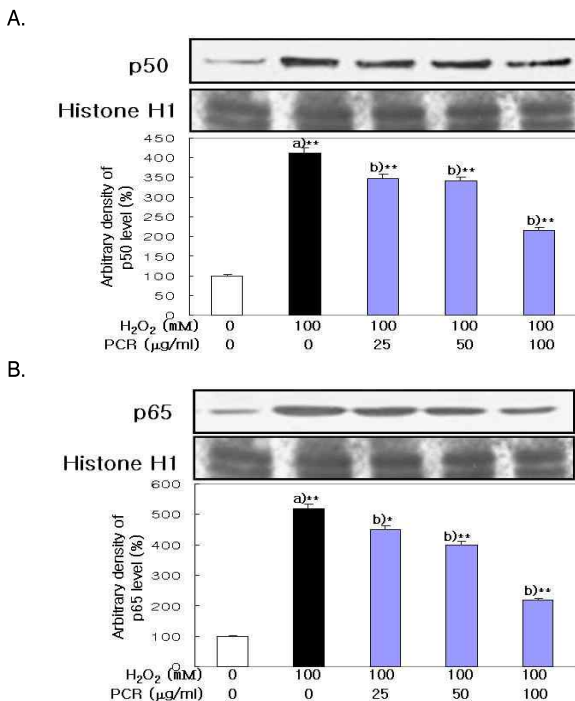
IKK-α는 정상 세포에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 실험군에서는 감소되었다(Fig. 7A). Phospho-IκB-α는 정상 세포에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가하여 인산화가 진행되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 실험군에서는 감소되었다(Fig. 7B).

6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 NF-κB 단백질 양에 미치는 영향

호장근 추출물이 ROS 감수성 전사인자인 NF-κB의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 핵 내의 p50, p65 양을 조사하였다. NF-κB의 subunit인 p50, p65 핵내 양을 관찰한 결과 정상 세포에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 8).



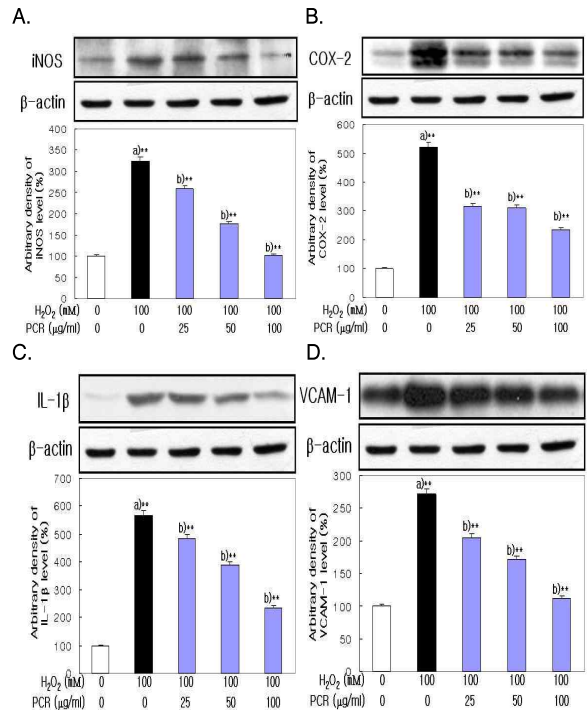
**Fig. 7.** Effect of *Polygoni cuspidati Radix* (PCR) on IKK-α and phospho-IκB-α Expression in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. Western blot was performed to detect IKK-α and phospho-IκB-α protein level in cytosol fractions from LLC-PK<sub>1</sub>. Cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01). A : IKK-α protein, B : phospho-IκB-α protein.



**Fig. 8.** Effect of *Polygoni cuspidati Radix* (PCR) on NF-κB Expression in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. Western blot was performed to detect NF-κB protein level in nuclear fractions from LLC-PK<sub>1</sub>. Cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05). A : p50 protein, B : p65 protein.

7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 염증 촉진 인자의 발현에 미치는 영향

호장근 추출물이 염증 촉진 인자인 COX-2, iNOS, IL-1β 및 VCAM-1의 단백질 발현양에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상 세포에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가되었으나, 호장근 추출물을 전처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 9).



**Fig. 9.** Effect of *Polygoni cuspidati Radix* (PCR) on iNOS, COX-2, IL-1β and VCAM-1 Expression in LLC-PK<sub>1</sub> Cells. Western blot was performed to detect COX-2, iNOS, IL-1β and VCAM-1 protein level in cytosol fractions from LLC-PK<sub>1</sub>. Cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) in the presence and absence PCR (25, 50, 100 μg/ml). Results are mean±S.D. a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control (\*\* : p < 0.01). A : iNOS protein, B : COX-2 protein, C : IL-1β protein, D : VCAM-1 protein.

고 찰

虎杖根은 마디풀과에 속하는 多年草인 虎杖根 또는 王虎杖根의 根莖과 根을 건조한 것으로 <名醫別錄>에 ‘微溫, 主通利月水. 破留血癥結’이라고 최초로 기재된 이래<sup>23)</sup>, <東醫寶鑑>에서는 ‘性微溫, 味苦無毒, 破留血癥結, 通利月水, 下產後惡血, 排膿, 主瘡癰, 癰毒, 撲損瘀血, 利小便, 通五淋’이라 기재되어 있다<sup>24)</sup>. 임상적으로는 活血祛瘀하여 通經하고 通絡定痛시키는 효능이 있어 瘀阻로 인한 經閉와 風濕痺痛 및 跌打損傷 등 證을 치료하고, 清熱利濕시키는 효능이 있어 濕熱黃疸와 淋濁帶下를 치료하며, 清熱解毒작용을 가지고 있어 水火燙傷이나 瘡癰腫毒, 毒蛇咬傷에 塗敷하여 치료한다. 苦降泄熱하고 化痰止咳하므로 肺熱咳嗽을 치료하며 瀉下通便시키는 작용이 있어 熱結便秘를 치료하고, 최근 임상에서는 膽石症과 尿道結石에 金錢草를 합방하여 응용한다<sup>11)</sup>. 虎杖根의 주요 성분은 flavonoid 화합물, phenol 화합물, stilbene 유도체, anthraquinone 유도체들이며, emodin, emodin 8-O-β-D-glucopyranoside, chrysophanol, rhein, anthraglycoside

A, anthraglycoside B, fallacinol, questinol, resveratrol, polydatin(piceid), physcion 등으로 보고되어 있다<sup>25,26</sup>.

虎杖根의 약리성분중 emodin은 TNF에 의해 유도되는 NF-κB의 활성을 억제하며, tyrosine kinase의 억제물질로 작용한다고 보고되어 있으며<sup>27,28</sup>, Resveratrol과 탄닌 성분은 혈장 cholesterol을 저하시키고 심근수축력과 관상동맥 혈류량을 증가시키는 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>29</sup>.

虎杖根에 대한 연구로 百日咳 유발균에 대해 生育抑制 효과가 있으며<sup>12</sup>, 虎杖根으로부터 분리된 emodin의 혈관신생 억제 활성 효과가 있고<sup>13</sup>, 수축혈관에 대한 이완 효과가 있었다는 보고가 있었다<sup>14</sup>. 또한 子宮頸部癌細胞의 성장억제 및 細胞枯死 촉진<sup>15</sup>, 지질과산화 억제 항산화<sup>16</sup>, Helicobacter pylori에 대한 항균성 및 urease 활성 억제 등의 보고가 있다<sup>17</sup>.

본 실험에서 虎杖根 추출물을 농도별로 처리한 결과 400 μg/ml 농도 이하에서 72.55% 이상의 생존율을 나타내어 400 μg/ml까지는 세포 독성이 거의 없는 것으로 나타났으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 을 처리 시 400 μg/ml까지 농도 의존적으로 세포사를 저해하는 것으로 나타났다.

면역세포들에서 생성되는 ROS와 RNS는 감염과 염증 반응에서 이물질을 제거하는 중요한 역할을 하지만 과도한 양이 지속적으로 축적될시 세포구성 성분의 손상과 조직 손상의 주요 원인이 된다<sup>20</sup>.

ROS는 반응성이 크기 때문에 단백질, 지질, 핵산 등과 반응하여 생체 분자의 기능을 변화시키거나 활성을 저하시키는데 이는 암, 노화, 뇌졸중, 심근경색, 관절염의 손상의 중요한 기전으로 알려져 있다<sup>30</sup>. ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 호기성 세포에서 유해 물질에 노출될 때 과다 생성되면 세포나 조직에 손상을 주며 반응성이 높은 다른 ROS를 형성한다<sup>31</sup>. 생체내에는 ROS를 제거할 수 있는 SOD, catalase, peroxidases, ascorbate, tocopherol, carotenoids 등 enzymatic, nonenzymatic antioxidant defense system을 가지고 있으나 생체 내에서 발생하는 ROS를 제어하기에는 충분치 않다<sup>32</sup>.

NO는 L-arginine의 산화 반응에 의해 생성되며, 그 생성반응을 촉매하는 NO synthase (NOS)는 효소학적 특성에 따라 endothelial form(eNOS), neuronal form(nNOS)과, inducible NOS (iNOS) 등 3종의 NOS isozyme들이 존재한다고 알려져 있다<sup>33</sup>. "Inflammation Hypothesis of Aging"<sup>34</sup>에 의하면 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어나면서 활성산소의 생성 증가와 iNOS의 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO<sup>-</sup>를 더욱 증가시켜 세포와 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진한다고 하였다.

ONOO<sup>-</sup>는 강력한 산화제로 지질, 단백질 및 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통하여 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 지질과 산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>5,35</sup>. 이러한 독성 작용으로 노화 과정에 중요한 발병요인인

ONOO<sup>-</sup>는 생체 내에 존재하는 제거효소가 없기 때문에 ONOO<sup>-</sup>에 의한 세포 손상을 방지하는 것은 노화를 예방하는데 중요하며 이런 항산화 능력을 가진 천연물을 찾고 계속 연구를 하는 것이 중요하다<sup>36</sup>.

본 실험에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 LLC-PK<sub>1</sub>에서 虎杖根 추출물 ONOO<sup>-</sup> 생성에 대해 농도 의존적으로 억제 활성을 나타내었다. 또한 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO 생성에 대한 실험에서도 虎杖根 추출물은 농도 의존적으로 감소시켰다.

Prostaglandin 중 PGE<sub>2</sub>는 통증과 발열의 전달에 관여하는 중요한 염증 매개 물질로서 혈관 확장, 세포 내 cyclic adhesion monophosphate (c-AMP) 농도 증가 등 다양한 반응을 일으키는 물질로 알려져 있다. 만성 염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 signaling proteins의 상승 조절 작용을 일으켜 NO와 PG를 과다 생성하게 된다<sup>37</sup>.

본 실험에서 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 배지에서의 PGE<sub>2</sub> 양이 증가되었으나 虎杖根 추출물 전처리에 의해 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

NF-κB는 염증이 있어서 중요 역할을 하는 세포 표면 수용체 (SH2, SH3), 유착분자 (ICAM-1, VCAM-1) 및 cytokine (LPS, IFN-γ, IL-1, TNF, IL-6), chemokine 등을 암호화하는 유전자들의 유도에 있어서 중요인자이다<sup>6</sup>. 자외선, RS 등과 같은 외부 자극에 의해 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)가 활성화 되고, IKK pathway를 통해서 IκB가 분해되면서 NF-κB가 핵 속으로 이동하여, COX-2, iNOS, TNF-α, VCAM-1, interleukin-6 (IL-6) 등과 같이 NF-κB를 binding site로 가지는 여러 가지 노화 관련 유전자를 발현시킨다. NF-κB는 이러한 유전자 발현을 통해 apoptosis 종양형성, 세포 증식, 염증, 면역 반응을 조절하는데 노화, 암, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직손상, 바이러스성 복제, 급성 염증상태, 조직이식 숙주반응, 독성/부패성 조직 손상 등을 포함하는 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다고 알려져 있다<sup>10</sup>.

본 실험에서 NF-κB 활성화에 관여하는 신호전달체인 IKK-α와 phospho-IκB-α에 미치는 영향을 검토한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가되었으나 虎杖根 추출물 전처리에 의해 감소되었다. 또한 phospho-IκB-α는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가하여 인산화가 진행되었으나 虎杖根 추출물 전처리에 의해 감소하였다.

ROS 감수성 전사인자인 NF-κB의 활성에 미치는 영향을 검토해 본 결과 핵내의 p50, p65 양이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 증가되었으나 虎杖根 추출물 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이로서 虎杖根 추출물은 NF-κB의 활성화로 인한 여러 가지 염증 지표 단백질의 발현을 억제하는 것으로 보인다.

보통 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하는데 이는 COX-2의 생성, 효소 활성저해에 의한 것이며 COX는 위, 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin을 합성하는 COX-1과 동물과 인간의 염증반응 부위에서 발현되는 COX-2로 구분된다<sup>38,39</sup>. COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 지속적으로 PGs를 분비하며 만성 염증 질환 (류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염)을 유발한다<sup>40</sup>.



iNOS는 각종 cytokine과 bacteria 산물인 endotoxin 및 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의하여 전사단계에서 발현이 증가되며<sup>7)</sup> L-arginine과 분자산소에 의한 NO의 생성 반응을 촉매하는 효소로서 과잉 유도가 지속될 경우 과량으로 생성된 NO는 생체에 유해한 결과를 초래한다. iNOS의 과잉 발현이 관여하고 있는 질환으로 만성 관절염, 심근염, 사구체염, 인슐린 의존성 당뇨병, 과민성 대장염 등이 있다<sup>41)</sup>. IL-1β는 대식세포에 의해 분비되는 cytokine 중의 하나이며<sup>42)</sup>, 혈관계형의 염증성 기전에 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>43)</sup>. 또한 VCAM-1은 활성산소에 의한 산화스트레스를 받으면 혈관내피세포에서 발현하는 접착분자로서 동맥경화를 유발한다고 알려져 있다<sup>44)</sup>.

본 실험에서 虎杖根 추출물은 염증 촉진인자인 COX-2, iNOS, IL-1β, VCAM-1의 단백질 발현증가를 억제하는 것으로 나타났다. 그러므로 虎杖根이 활성산소를 억제하는 항산화 효과에 의해서 염증 인자들을 억제시키는 것으로 사료된다.

이상의 연구에서 虎杖根은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ·O<sub>2</sub>, NO, ONOO<sup>-</sup> 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제하며, NF-κB와 관련된 염증성 단백질의 발현을 억제하여 항염증 효과를 나타내어, 염증 및 염증성 질환의 조절 약물로 유효하게 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

虎杖根 추출물이 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포사와 염증 억제 효능이 있는지를 확인하기 위해 ·O<sub>2</sub>, NO, ONOO<sup>-</sup> 및 PGE<sub>2</sub> 생성과 NF-κB와 관련된 염증성 단백질에 미치는 영향을 검토하였다. 虎杖根 추출물은 400 μg/ml 이하 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 인한 세포사를 농도 의존적으로 감소시켜 세포 생존율을 증가시켰고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 유도된 ·O<sub>2</sub>, NO, ONOO<sup>-</sup> 및 PGE<sub>2</sub> 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 虎杖根 추출물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리로 증가된 IKK-α, phospho IκB-α, NF-κB (p50, p65), 염증 촉진인자인 COX-2, iNOS, IL-1β, VCAM-1의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로서 虎杖根은 ·O<sub>2</sub>, NO, ONOO<sup>-</sup>의 생성을 억제하며, 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. Helmer, K.S., Chang, L., Cui, Y., and Mercer, D.W. Induction of NF-κB, IκB-α, and iNOS in rat gastric mucosa during endotoxemia. *J Surg Res.* 104(1):46-52, 2002.
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. Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., and Bast, A.

5. Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P., and Chung, H.Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-κB activation and IκBα degradation. *Free Radic Biol Med.* 28(5):683-692, 2000.
6. Baeuerle, P.A., and Henkei, T. Function and activation of NF-κB in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12: 141-179, 1994.
7. Nathan, C.F., and Hibbs, J.B. Roles of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 1: 65-70, 1991.
8. Kawamori, T., Rao, C.V., Seibert, K., and Reddy, B.S. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 58: 409-412, 1998.
9. Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., and Willoughby, D.A. Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* 7(12):1291-1297, 2001.
10. Korhonen, P., Helenius, M., and Salminen, A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci Lett.* 225: 61-64, 1997.
11. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 編著. 本草學. 서울, 永林社, pp 462-463, 2005.
12. 정운석, 이주일, 서운교. 백일해 유발균 *Bordetella pertussis*에 대한 虎杖根의 생육억제 효과. 대한한방내과학회지 26(3):543-550, 2005.
13. 이태규, 김중화, 소준노. 虎杖根으로부터 분리된 emodin의 혈관신생 억제 활성. 한국농화학회지 46(1):50-54, 2003.
14. 김동조, 김호현, 고흥. 虎杖根 물추출물의 내피세포 의존성 혈관이완효과. 동의생리병리학회지 22(1):131-136, 2008.
15. 최변탁, 김연희, 이동녕, 김형준. 虎杖根이 子宮頸部癌細胞의 成長抑制 및 細胞枯死에 미치는 영향. 대한한방방인과학회지 19(1):1-13, 2006.
16. 김지연, 양기숙. 虎杖根의 사염화탄소로 유도된 지질과산화 저해활성. 약학회지 43(5):572-576, 1999.
17. 이인선, 임효권, 이승욱. 虎杖根에 의한 *Helicobacter pylori*의 생육 저해. 한국식품과학회지 35(6):1182-1187, 2003.
18. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 93(2):157-165, 1986.
19. Cathcart, R., Schwiens, E., and Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 134: 111-116, 1983.
20. Nagata, N., Momose, K., and 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.
21. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 16: 149-1456, 1994.
  22. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1):265-275, 1951.
  23. 陶弘景. 名醫別錄. 북경, 人民衛生出版社, pp 228-229, 1986.
  24. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 법인문화사, p 1962, 1999.
  25. Qian, G., Leung, S., Lu, G., and Leung, K. Differentiation of Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati from Closely Related Herbs by HPLC Fingerprinting. *Chem Pharm Bull*. 54: 1179-1186, 2006.
  26. Sato, M., Maulik, G., Bagchi, D., and Das, D.K. Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radic Res*. 32: 135-144, 2000.
  27. Jayasuriya, H., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., MacLaughlin, J.L., and Chang, C.J. Emodin, a protein kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod*. pp 55, 696-698, 1992.
  28. Kumar, A., Dhawan, S., and Aggarwal, B.B. Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B activation, I $\kappa$ B degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene* pp 17, 913-918, 1998.
  29. 최병진. 환약의 약리. 서울, 고려의학, pp 117-118, 339, 2000.
  30. Mates, J.M., Pérez-Gómez, C., and Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human disease. *Clin. Biochem*. 32(8):595-603, 1999.
  31. Shingu, M., Oribe, M., Todoroki, T., Tatsukawa, K., Tomo-Oka, K., Yasuda, M., and Nobunaga, M. Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. *J. Invest. Dermatol*. 81(3):212-215, 1983.
  32. Pannala, A.S., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B., and Singh, S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 232: 164-170, 1997.
  33. Shimokawa, H., Zanchetti, A., and Mancina, G. Handbook of Hypertension. Elsevier Science. Amsterdam. pp 1007-1068, 1997.
  34. 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.
  35. Crow, J.P., Beckman, J.S., and McCord, J.M. Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry*. 34(11):3533-3552, 1995.
  36. 정혜영, 성도유, 김애라, 최혜리, 김현진, 최재수. ONOO-의 생성, 독성, 제거 및 노화와 관련성. *한국노화학회지* 10(1):46-59, 2000.
  37. 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.
  38. Masferrer, J., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isacson, P.C., and Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 91: 3228-3232, 1994.
  39. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Ksaxon, P. Pharmacological and biochemical demonstration and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12013-12017, 1994.
  40. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver disease. *J Hepatol*. 224(1):61-64, 1993.
  41. Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Choi, J.S., and Yu, B.P. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*. 59(4):264-272, 2002.
  42. 김선영 외 14명 역. 번역생물학 6판. 서울, 라이프사이언스, p 78, 237, 2005.
  43. Alagappan, V.K., McKay, S., Widyastuti, A., Garrelds, I.M., Bogers, A.J., and Hoogsteden, H.C. Proinflammatory cytokines upregulate mRNA expression and secretion of vascular endothelial growth factor in cultured human airway smooth muscle cells. *Cell Biochem Biophys*. 43(1):119-129, 2005.
  44. Pannala, A.S., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B., and Sin, S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 232: 164-170, 1997.