creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264451

2014년 2월
박사학위논문

지질다당류에 의해 활성화된 대식세포에서의 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 항염증 효과

조선대학교 대학원

보완대체의학과

나 백 희

지질다당류에 의해 활성화된 대식세포에서의 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 항염증 효과

Anti-inflammatory effect of 4-tert-butyl phenyl salicylic acid in lipopolysaccharides-stimulated Raw 264.7 mouse macrophage cells

2014년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

나 백 희

지질다당류에 의해 활성화된 대식세포에서의 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 항염증 효과

지도교수 유 진 철

이 논문을 보완대체의학 박사학위 신청논문으로 제출함

2013년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

나 백 희

나백희의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	문 경 래	인
위 원	조선대학교 교수	이 미 자	인
위 원	조선대학교 교수	서 재 홍	인
위 원	선문대학교 교수	송 재 경	인
위 원	조선대학교 교수	유 진 철	인

2013년 12월

조선대학교 대학원

목 차

도목차 ····· iii

표목차 ····· iv

ABSTRACT ····· v

List of Abbreviations ····· vii

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 12
1. 시약 ····· 12
2. 대식세포 배양 ····· 12
3. 세포 생존율 ····· 13
4. NO 생성 측정 ····· 13
5. Western blot analysis ····· 14
6. ELISA를 이용한 IL-6, IL-1β, TNF-α 생성량 측정 ····· 14
7. RT-PCR을 이용한 iNOS, COX-2 및 사이토카인 mRNA 발현 측정 ····· 15
8. 통계분석 ····· 16

Ⅲ. 결과 ····· 18
1. TBPS의 Raw 264.7 세포의 증식에 미치는 영향 ····· 18
2. TBPS의 NO 생성 저해 효과 ····· 20
3. TBPS의 iNOS 발현 억제 효과 ····· 22
4. TBPS의 COX-2 발현 억제 효과 ····· 24
5. TBPS의 세포 내 염증 관련 단백질의 mRNA 발현에 미치는 영향 ····· 26
6. TBPS의 염증 매개성 사이토카인 저해 효과 ····· 28

7. TBPS의 염증 매개성 사이토카인의 mRNA 발현 억제 효과 ····· 30
8. TBPS의 NF-kB, IkBα, p-IkBα 발현에 미치는 영향 ····· 32

Ⅳ. 고찰 ····· 35

Ⅴ. 결론 ····· 40

Ⅵ. 참고문헌 ····· 42

Ⅶ. 감사의 글 ····· 49

도목차

Fig. 1. Origin of salicylic acids ····· 5
Fig. 2. Structures of salicylic acid and salicylic acid derivatives ····· 6
Fig. 3. Inflammatory response process of iNOS and COX-2 ····· 7
Fig. 4. Regulation of PG formation by NO ····· 8
Fig. 5. Schematic of the prostaglandin pathway ····· 9
Fig. 6. Pro-inflammatory and effector cytokines involved in autoimmune inflammatory and allergic diseases ····· 10
Fig. 7. The NF-kB pathway ····· 11
Fig. 8. Effect of TBPS on cell viability ····· 19
Fig. 9. Effect of TBPS on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells ····· 21
Fig. 10. Effects of TBPS on LPS-stimulated iNOS expression in Raw 264.7 cells ····· 23
Fig. 11. Effects of TBPS on LPS-stimulated COX-2 expression in Raw 264.7 cells ····· 25
Fig. 12. Effects of TBPS on the mRNA levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Raw 264.7 cells ····· 27
Fig. 13. Effect of TBPS in the suppression of TNF-α, IL-1β, IL-6 production in LPS-stimulated Raw 264.7 macrophage cells ····· 29
Fig. 14. Effect of TBPS on LPS-stimulated TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA gene expression ····· 31
Fig. 15. Effect of TBPS on LPS-stimulated NF-kB expression ····· 33
Fig. 16. Inhibition of LPS-stimulated IκBα phosphorylation and degradation by TBPS ····· 34
Fig. 17. Anti-inflammatory mechanisms of TBPS ····· 39

표목차

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR analysis ····· 17

ABSTRACT

Anti-inflammatory Effect of 4-tert-butyl Phenyl Salicylic Acid in Lipopolysaccharides-stimulated Raw 264.7 Mouse Macrophage Cells

Na, Baek Hee
Advisor : Prof. Yoo, Jin Cheol, Ph.D.
Department of Complementary and Alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

Inflammation may lead to onset of a variety of diseases if it runs uncontrolled. Over-expression of both inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins is well known to be crucially related to stimulative effect on some severe chronic inflammatory diseases as well as various tumors. Nuclear factor-κB (NF-κB) is also known to play a critical role in transcriptional regulation of these proteins. This study aims to investigate the anti-inflammatory effect of 4-tert-butyl phenyl salicylic acid (TBPS), one of the salicylic acid derivatives, and to figure out its mechanism by using the model of lipopolysaccharides (LPS)-stimulated Raw 264.7 mouse macrophage cells.

MTT assay, Western blot analysis, ELISA analysis, and Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis were performed in order to

explore the anti-inflammatory effect of TBPS. It was found that TBPS meaningfully regulated nitric oxide (NO) production without cytotoxic effects on Raw 264.7 cells in a stable state of 1~15 μg/㎖. TBPS dose-dependently reduced iNOS expression, and COX-2 expression significantly in a range of 1~15 μg/㎖. Moreover, expressions of iNOS mRNA and COX-2 mRNA meaningfully decreased in a dose dependent manner. In addition, TBPS significantly inhibited the production of inflammatory mediators or pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-a (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6). Moreover, mRNA gene expressions of TNF-α, IL-1β and IL-6 attenuated in a dose dependent manner.

Furthermore, it was found that TBPS suppressed the LPS-stimulated DNA binding activity of NF-κB. TBPS potently inhibited the translocation of NF-κB into the nucleus by IκBα degradation following IκBα phosphorylation. It indicates that the TBPS inhibits NF-κB activation.

In conclusion, the results show the first that TBPS exerts the anti-inflammatory effect in vitro, both by inhibiting the expressions of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 cells, and by suppressing the activation of the NF-κB signaling pathway. Therefore, TBPS may be a potential therapeutic candidate for the regulatory agents of inflammation.

Key words: Anti-inflammatory effect, 4-tert-butyl phenyl salicylic acid (TBPS), NF-κB pathway, COX-2, iNOS

List of Abbreviations

COX-2	Cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IκB	Inhibitor of κB kinase
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LPS	Lipopolysaccharide
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric oxide
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBPS	4-tert-butyl phenyl salicylic acid
TNF-α	Tumor necrosis factor-α

Ⅰ. 서론

인류의 오랜 염원인 질병 없는 삶을 위하여 우리 인류는 우수한 의약품을 개발하는 데 끊임없이 노력해 왔다. 이를 방증하듯, 기원전 3000년경부터 인류문명의 발상지인 이집트, 메소포타미아, 중국의 황하유역을 중심으로 천연물을 이용한 의료관련 자료들이 발견되고 있다. 전통적으로 사용한 천연약물은 주로 생활주변에서 구할 수 있는 식물들을 절단, 분쇄, 추출 등의 간단한 가공을 통해 경험적으로 사용해 왔다. 19세기 들어 산업혁명과 유기화학의 발달로 식물에서 천연유효성분을 순수하게 분리할 수 있게 되었고 나아가 유기합성을 통해 대량생산이 가능하게 되었다. 합성 의약품의 효시는 1899년 독일 Bayer사에서 개발하여 베를린 특허청에 등록한 아스피린(aspirin)으로 그 뿌리는 천연 약물이다.

식물유래 천연 살리실산(salicylic acid)은 고대부터 진통, 해열 및 소염에 효과를 보여 항염증 약물로 사용되어 왔다(1). 살리실산은 흰 버드나무 껍질뿐만 아니라 장미과 메도스위트(*Filipendula ulmaria*)와 조팝나무의 꽃과 뿌리에도 다량 함유되어 있다(2)(Fig. 1). 살리실산염은 윈터 그린(*Gaultheria procumbens*), 블랙코호루트(*Gaultheria procumbens*), 포플러나무 껍질(*Populus spp.*)과 자작나무 껍질(*Betula lenta*) 등의 다른 *Salix* 종에도 함유되어 있다(3). 전통 약용식물 중 만삼(*Codonopsis lanceolata*)과 목단피(*P. suffruticosa Andr*)에는 살리실산이 다량 함유되어 있고 감초, 대황, 천궁, 복분자, 작약, 황금, 인진쑥 등에도 상당량 함유되어 있다고 알려져 있다(4). 이 외에도 블랙베리, 블루베리, 키위, 피망, 올리브, 토마토, 버섯 등 설익은 과일이나 채소에도 살리실산이 포함되어 있다.

이러한 천연 살리실산은 페놀성 식물호르몬으로서 식물에서 병원균 감염 시 잎과 엽록체 구조에 특이적 변화를 유도하며, 병원성과 관련된 단백질의 생성을 유도하여 병원체에 대한 방어작용을 한다(5-6). 또한 병원균과 스트레스에 대한 식물의 방어반응에서 신호 분자로서 중요한 역할을 하여 식물의 병원성 관련 유전자의 발현을 활성화하고 질병 저항을 유도한다(7).

버드나무 껍질의 주요 생리활성 성분인 살리신은 1829년 프랑스 약사인 H. Leroux가 발견했으며, 이 살리신은 살리실산에 당이 결합된 배당체이다. 1838년 이탈리아 화학자 R. Piria가 살리신의 정제법을 찾아냈고 1861년 A. W. Kolbe가 처음으로 합성에 성공한 것을 R. Schmidt가 개량하였다.

그동안 살리실산으로부터 다양한 유도체들이 발견되거나 합성되어 의약품으로 활용되고 있다. 그 중 대표적인 예를 들면(Fig. 2), 아스피린으로 알려져 있는 아세틸 살리실산은 1899년 독일 화학자 F. Hoffmann이 근무하고 있던 독일 Bayer사에서 살리신의 쓴맛과 위장 장애 등의 부작용을 보완하기 위해 개발한 약품이다. 이는 살리실산의 히드록시기를 카르복실기로 치환시켜 만든 최초의 단일성분 합성의 약품이다. 아스피린은 대표적인 비스테로이드 항염증약으로 해열진통제, 류마티즘 치료제 등으로 사용되고 있다(8-9). 또 저단위 아스피린을 장기 복용하면 혈소판 응집을 억제하여 뇌졸중, 심혈관 질환, 혈전 등을 예방하는 효과가 있어(10), '21세기 기적의 약'으로 불리기도 한다. 그러나 아스피린의 장기 복용은 특히 위장 출혈, 지혈 저해를 비롯한 몇 가지 심각한 부작용을 초래한다(11-12).

4-아미노 살리실산은 PAS (para-aminosalicylic acid)로 더 잘 알려진 항결핵제로 사용되고 있다. PAS는 그 구조가 필수대사물질인 파라 아미노벤조산과 비슷하여 엽산의 합성을 억제하는 정균 작용을 나타낸다. 5-아미노 살리실산은 크론병, 궤양성 대장염 등 염증성 장질환 치료에 사용되고 있다(13). 천연 메틸 살리실산은 식물의 많은 종에서 생산되는 유기 에스테르로 향료로 많이 사용되었는데, 현재 소염제, 신경통 치료 위한 연고 도포제로 많이 활용되고 있으며 과자, 치약, 껌 등의 향료로도 첨가되고 있다. 또한 콜린 살리실산은 구강 궤양의 통증 완화제에 이용되며, 피부염, 여드름, 건선 치료용 피부 관리 제품에도 함유되어 있고 티눈이나 사마귀 등 각질 제거용품에도 활용되고 있다(14).

염증은 국소적인 자극에 대한 혈관이 살아있는 조직의 복합반응으로, 어떤 원인에 의해 조직이 손상 받았을 때 이 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 회복시키려는 생체의 고도로 발달한 방어기전이다(15-20). 이처럼 염증이 유해 자극으로부터 생체를 보호하는 정상적인 과정이긴 하지만, 급성이든 만성이든, 여러 형태의

조직손상을 초래한다. 그런 손상을 최소화하기 위해 체내에서는 염증반응이 진행되면서 항염증 기전도 작동되어 과도한 손상이 일어나지 않도록 긴밀히 조절된다. 이때 정상적인 염증반응인 경우 염증성 매개물질의 생성이 감소되고 항염증성 매개물질은 증가하게 된다(21). 그러나 초기 염증 유발인자가 완전히 제거되지 못하거나 또는 염증반응의 조절이 잘못될 경우, 염증매개 물질이 과도하게 분비되거나 지속적으로 생성된다. 그렇게 되면 만성 염증상태가 지속되고 조직손상을 계속 유도하게 되어 각종 만성 질병을 유발한다(22). 류마티즘성 관절염, 동맥 경화, 심혈관 질환과 암 그리고 알츠하이머병 등과 같은 각종 만성질환이 만성 염증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(23-31).

염증반응에 중요한 역할을 하는 대식세포는 면역반응에서도 중요한 역할을 하며, 염증 매개성 사이토카인이나 LPS에 의해 활성화되어 염증을 유발한다. LPS는 그람 음성 세균 지질다당류로 대식세포를 활성화시키는 강력한 자극인자 중 하나이다(32). LPS는 대식세포, 단핵구, 호중구 및 수지상세포 등에 발현되어 있는 Toll-like receptor (TLR)를 활성화시켜 IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α와 같은 염증성 사이토카인을 방출함으로써 염증단계를 촉진시킨다. 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1β, IL-6 등 다양한 염증 매개성 사이토카인뿐만 아니라 NO와 prostaglandin (PG)을 생성한다(Fig. 3). NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, 프로스타글란딘 중 PGE2는 프로스타글란딘 합성효소에 의해 합성되어 염증과정에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 PG는 비만세포, 대식세포, 내피세포와 기타 여러 종류의 세포로부터 생성되어 염증의 혈관반응과 전신반응 및 염증의 국소적인 효과 외에도 염증의 통증과 발열기전에도 관여한다(33-39)(Fig. 4, 5).

대식세포는 pathogen associated molecular patterns (PAMPs) 중의 하나인 LPS를 TLR 4의 이질이합체화로 인식하여 세포 내 전사인자인 NF-κB의 활성화를 유도해 염증 반응을 진행한다(40). LPS 자극에 의해 활성화된 NF-κB는 세포질에서 핵 내로 이동하여 TNF-α, L-1β, IL-6 나 interferon-γ (IFN-γ)와 같은 염증 매개성 사이토카인류를 생성할 뿐만 아니라 NF-κB는 NOS와 COX의 발현, 특히 염증반응에 관여하는 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 유도하여, 염증반응의 지표물질인 NO와 prostaglandin E2 (PGE2)는 염증반응을 심화시킨다.

NF-κB family에 속하는 전사인자들은 면역과 염증반응 및 세포 증식과 세포자멸사 등에 광범위하게 작용하며 이들 기전에 관여하는 많은 세포와 조직의 과정을 전사수준에서 조절한다(41-42). NF-κB는 iNOS, COX-2 및 염증 매개성 사이토카인에 의해 발현이 증가하거나 면역계 세포를 비롯한 여러 세포 유형에서 다양한 신호에 의해 유도되는 중요한 전사인자이다. NF-κB는 세포 내에 존재하는 이량체 유전자 전사단백 복합체를 통칭하며, 주된 유형은 p50과 p65 소단위가 복합체를 이루는 형태이다. NF-κB는 평상시 활성화되지 않은 상태로 IκBα에 결합된 형태로 세포질(cytoplasm) 내에 존재한다(43-44). 그러나 염증성 자극이 주어지면 IκBα가 인산화되고 분해되어 NF-κB를 활성화시킨다. 활성화된 NF-κB는 세포질에서 핵내로 이동하게 되며 그 곳에서 표적 유전자의 촉진자 부위와 결합하여 유전자 전사를 조절하게 된다(45-46). 표적유전자가 NF-κB에 의해 자극되면 염증관련 유전자의 전사를 활성화시켜 염증 관련 단백질의 발현이 증가하게 됨으로써 염증 반응이 진행된다(47)(Fig. 7). 각각의 염증 매개물질은 서로 독립적으로 작용하는 것이 아니라 상호 긴밀한 관계를 가지면서 염증반응에 관여하며 인체에는 이 매개체의 작용을 점검해 주는 체계가 균형을 유지하고 있다. 그러나 그 균형이 깨져 염증 매개물질의 과도하고 지속적인 생성과 그로 인한 NO 및 PGE_2의 대량 생성은 그 자체로 인해 세포, 조직 및 장기의 손상을 초래하여 여러 만성 염증성 질환의 원인으로 작용한다.

살리실산이나 다른 살리실산 유도체들에 대해서는 수많은 연구들이 보고되어있다. 그러나 살리실산 유도체 중 4-tert-부틸 메틸 살리실산의 항염증 효과에 대한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 항염증 효과 및 그 작용기전을 규명하고자 하였다. 이를 위해 지질다당류에 의해 활성화된 대식세포(Raw 264.7 macrophage cells)를 모델로 하여 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 NO 생성 조절효과, iNOS와 COX-2 활성 조절효과, 염증 매개성 사이토카인의 생성 조절효과를 단백질 및 유전자 발현수준에서 살펴보았다. 나아가 이들 조절효과들에 미치는 유전자 전사인자들의 작용기전을 규명하여 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 신규 항염증 소재로의 개발 가능성을 검토하였다.

(a) White Willow Bark
(*Salix alba)*

(b) Meadowsweet
(*Filipendula ulmaria*)

Fig. 1. Origin of salicylic acids

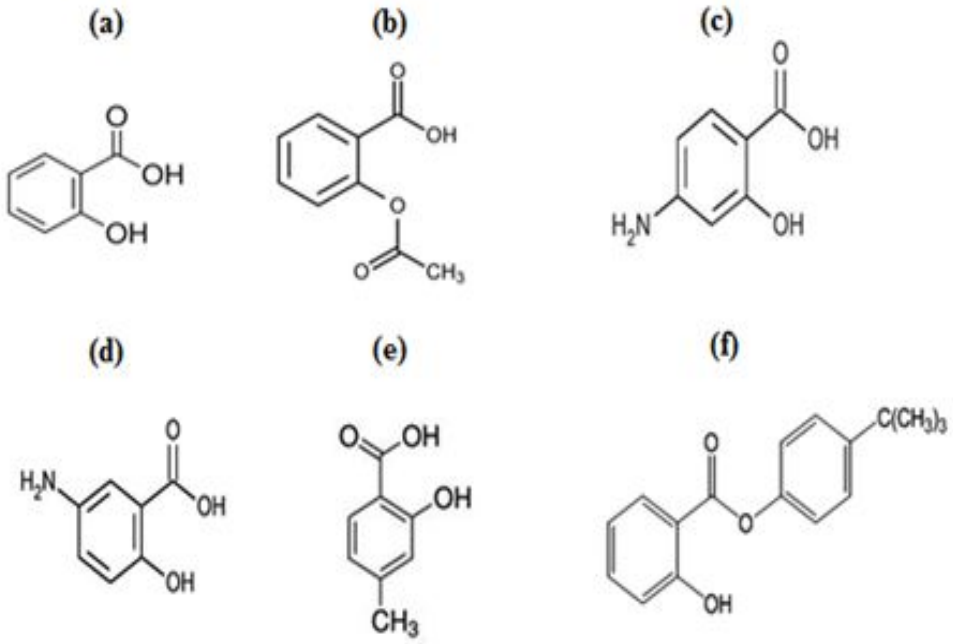

Fig. 2. Structures of salicylic acid and salicylic acid derivatives
(a) salicylic acid (b) acetyl salicylic acid (c) 4-aminosalicylic acid
(d) 5-aminosalicylic acid (e) methyl salicylic acid
(f) 4-tert-butylphenyl salicylic acid

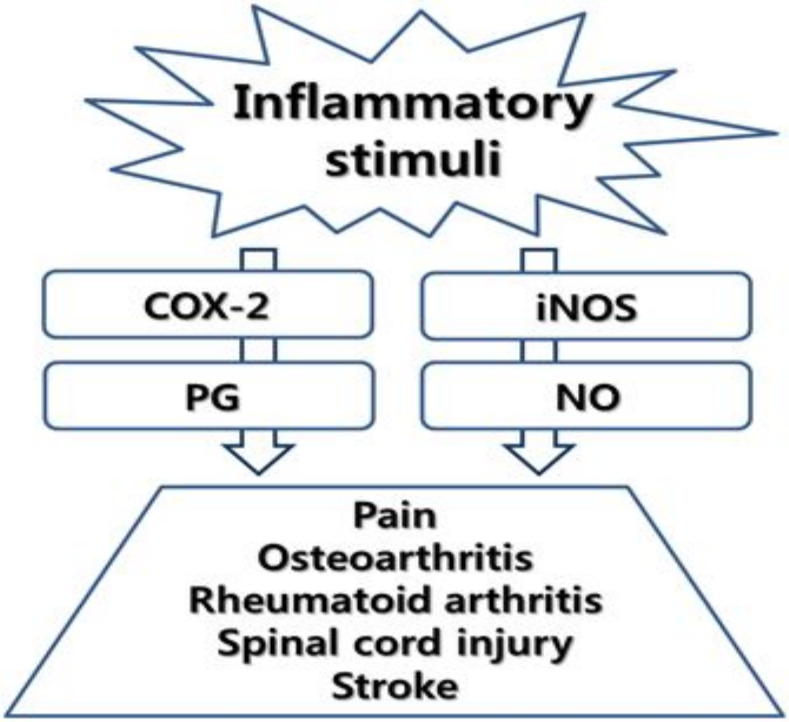

Fig. 3. Inflammatory response process of iNOS and COX-2 (37)

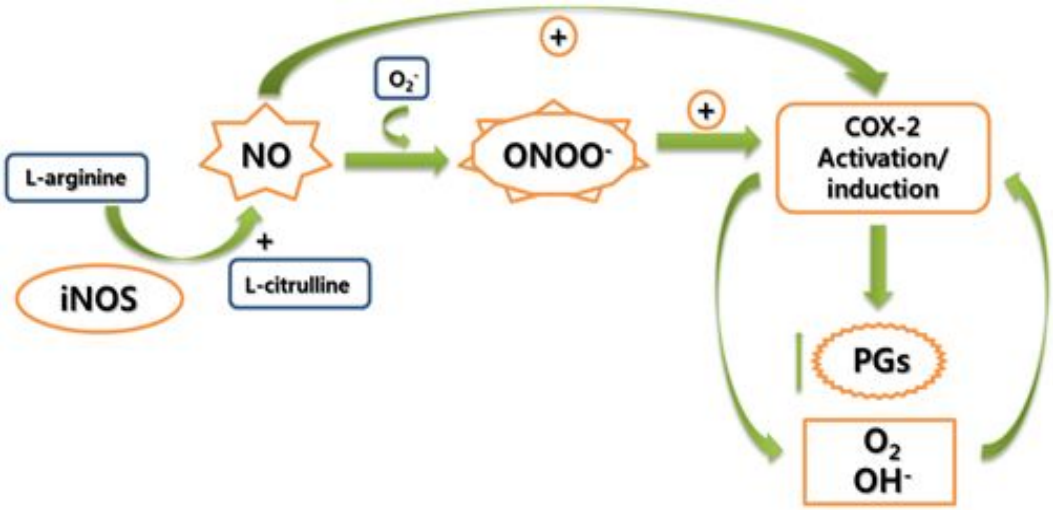

Fig. 4. Regulation of PG formation by NO (37)

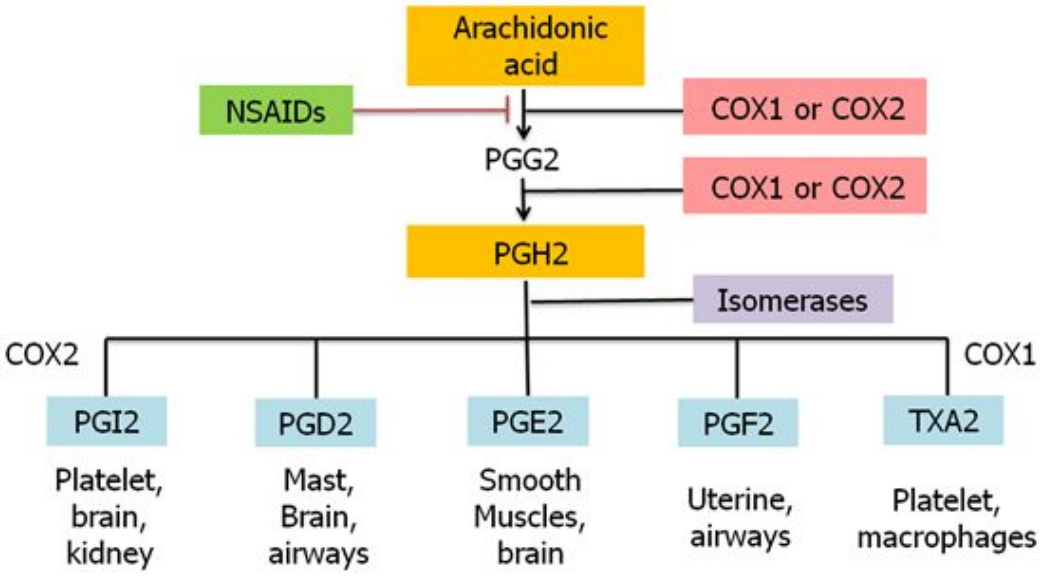

Fig. 5. Schematic of the prostaglandin pathway (38)

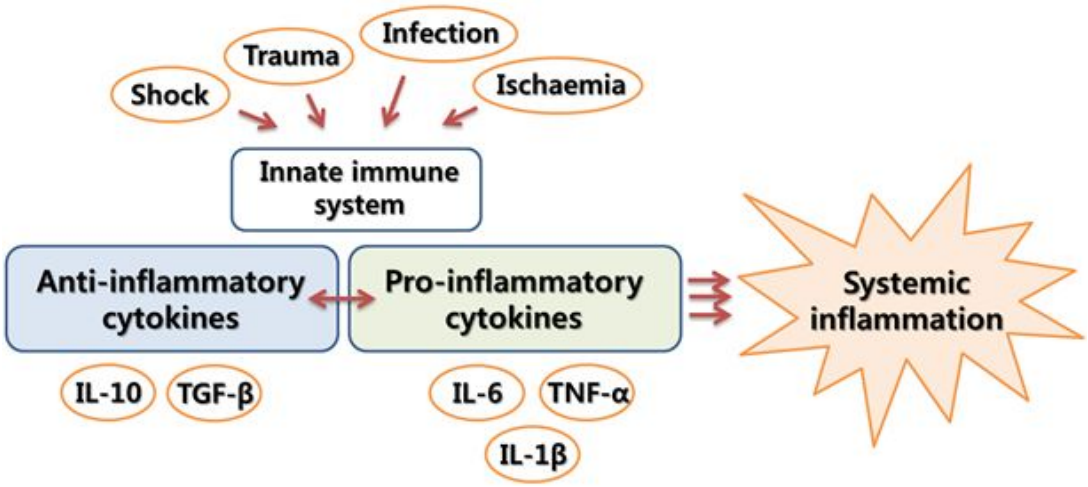

Fig. 6. Pro-inflammatory and effector cytokines involved in autoimmune inflammatory and allergic diseases (39)

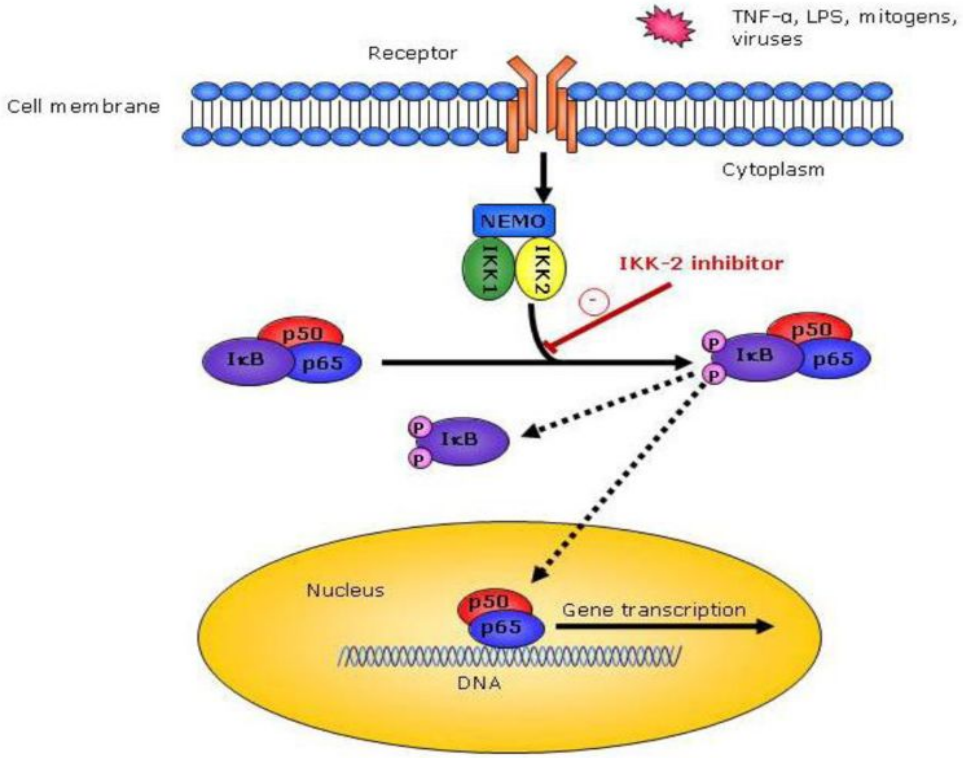

Fig. 7. The NF-kB pathway (48)

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약

세포배양을 위한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), fetal bovine serum (FBS)과 anti-anti는 각각 Hycolne과 GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. LPS (Lipopolysaccharide), DMSO (dimethyl sulfoxide), Griess reagent, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma aldrich로부터 구입하여 사용하였다. Mouse TNF-α, IL-6, IL1β ELISA kit는 BD biosciences (San Diego, CA, USA)에서 Rabbit anti-mouse iNOS polyclonal, NFκ-B, IκBα 항체는 Santa Cruz Biotech Inc (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, COX-2와 HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG는 cell signaling에서 구입하였다. Alkaline phosphatase Conjugated affinipure Donkey Anti mouse IgG는 Jackson Immunoresearch Laboratories INC에서 구입하여 사용하였다. 살리실산 유도체인 4-tert-부틸 페닐 살리실산은 선문대 생체분자 설계 센타에서 제공받아 실험을 진행하였다.

2. 대식세포 배양

본 연구에서 사용한 쥐의 복강 대식세포주인 Raw 264.7 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% anti-anti가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37℃, 5% CO_2 조건하에서 계대 배양하였다. Mouse TNF-α, IL-6, IL1β ELISA kit는 BD biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Rabbit anti-mouse iNOS polyclonal, NFκ-B, IκBα항체는 Santa Cruz Biotech Inc (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, COX-2와 HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG는 cell signaling에서 구입하였다. Alkaline phosphatase Conjugated affinipure Donkey Anti mouse IgG는 Jackson Immunoresearch Laboratories INC에서 구입하였다.

3. 세포 생존율

TBPS의 세포에 대한 독성 측정은 MTT 측정법으로 확인하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는데, 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 감소되는 점을 이용한 것이다. 먼저 Raw 264.7 세포 $1x10^5$ cells/㎖를 96 well plate에 100 ㎕ 분주하고, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 배양한 세포는 TBPS을 농도별(1, 5, 10, 15, 20 ㎍/㎖)로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, phosphate buffered saline (PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 5 mg/㎖의 MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 50 ㎕를 각 well에 넣고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액을 버리고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 100 ㎕씩 넣어 formazin을 용해한 후, microplate reader (Model 550, Bio-Rad labolatories, Japan)로 550 nm 흡광도를 측정하였다. 그리고 상대 세포 생존율은 TBPS 미처리 대조군과 비교하여 계산하였다.

4. NO 생성 측정

사이토카인에 의해 RAW 264.7 세포가 발생하는 nitrite를 측정하기 위해 Griess 반응을 이용하였다. 이 방법은 Griess 시약의 diazo기가 nitrite를 만나면 분홍색으로 변하는 색깔 반응을 이용한 것이다. 6 well plate에 각 well1 당 $1x10^6$ cells/㎖의 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM에 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양 후, NO 생성을 유도하기 위해 LPS (1 ㎍/㎖)를 전 처리하였다. 1시간 후 TBPS를 처리하여 12시간 배양한 후 nitrite 측정을 위해 상층액 100 ㎕를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 상온의 암실에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader UV 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 NO 함량을 정량하였다.

5. Western blot analysis

Raw 264.7 세포를 2×10^5 cells/㎖의 농도로 6 well plate에 분주하여 12시간 배양한 후 TBPS를 농도별 (1, 5, 10, 15 ㎍/㎖)로 처리한 다음, LPS (1 ㎍/㎖)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 다음 세포를 얻어 원심 분리하여 pellet에 lysis buffer를 가해 얼음에 incubation 후 13,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 모았다. 모은 상층액은 bradford assay를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 20 ㎍ 해당량을 5×sample buffer에 넣고 100℃에서 5분간 불활성화시킨 후 12% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer한 후 5% skim milk에서 60분 동안 blocking하였다. iNOS, COX-2, NF-κB, IκBα, p-IκBα와 actin 항체는 4℃에서 overnight시킨 후 tris-buffered saline Tween-20 (TBST, 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) buffer로 15분간 3회 세척하고 2차 항체는 1:1,000의 비율로 희석하여 2시간 상온에서 부착시켰다. iNOS, COX-2, NF-κB, IκBα, p-IκBα 단백질의 검출을 위해, TBST buffer로 10분간 3회 세척하고 2분간 membrane에 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 처리하여 LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. β-actin 단백질 검출은 TBST buffer로 10분간 3회 세척하고 AP (AP conjugate substrate kit, Bio-rad laboratories Inc.) 발색 완충액으로 발색시켜 단백질의 발현을 확인하였다.

6. ELISA를 이용한 IL-6, IL-1β, TNF-α 생성량 측정

세포 배양액 내의 사이토카인의 생성량은 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여 배양하였다. 세포에 1 ㎍/㎖의 LPS를 처리한 뒤 1시간 후에 1, 5, 10, 15 ㎍/㎖의 TBPS를 처리하여 배양하였다. 그 후 배양 배지를 취하여 사이토카인의 생성을 측정하였다. 먼저 96 wells microplate에 IL-6, IL-1β, TNF-α 각각의 capture 항체를 coating 버퍼에 희석하여 100 ㎕씩 분주한 후 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액(PBS with

0.05% Tween 20)으로 3번 세척한 후 blocking 버퍼를 200 ㎕ 분주하여 실온에서 1시간 방치하였다. 그 후 세척용 완충액으로 3번 세척 후 assay 샘플을 100 ㎕씩 분주하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 세척용 완충에서 5번 세척하고 detection 항체 100 ㎕ 씩 분주하여 1시간 반응시키고 5번 세척한 후 SAV-HRP를 100 ㎕ 씩 분주하여 반응시킨 후 7번 세척하였다. 기질액을 100 ㎕ 가한 후 30분 반응시켜 색의 변화를 관찰하고 50 ㎕ 황산을 처리하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

7. RT-PCR을 이용한 iNOS, COX-2 및 사이토카인 mRNA 발현 측정

TBPS의 염증 관련 단백질과 사이토카인의 유전자 수준에서의 효과를 알아보기 위해 RT-PCR법으로 iNOS, COX-2 및 사이토카인의 mRNA 발현을 측정하였다. Petri dish에 $1x10^7$ cells/㎖ Raw 264.7 세포를 12시간 동안 배양한 후, TBPS를 농도별로 처리하여 시간별로 배양한 다음 RNA를 분리하기 위해 상층액을 버리고 1 ㎖의 TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, USA)을 넣어 3분간 반응시켜 1.5 ㎖ 튜브에 모았다. 여기에 chloroform 200 ㎕를 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후, 얼음에서 10분간 방치하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 수행하였다. 상층액을 회수하여 미리 차갑게 해둔 1.5 ㎖ 튜브에 옮긴 후, 차가운 isopropanol을 동량 넣고 −20℃에서 1시간 반응시켰다. 4℃에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 RNA pellet에 75% ethanol 1 ㎖를 넣었다. 다시 4℃에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 RNA pellet을 clean bench에서 약 30분간 건조시킨 후, diethylpyrophosphate (DEPC) water 20 ㎕에 RNA pellet을 녹였다. RNA 정량은 UV/vis (SmartSpecTM3000, Bio-Rad, USA) 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RT/PCR Premix에 사이토카인의 10 pmole/μl의 sense primer 1 ㎕와 10 pmole/㎕의 antisense primer 1 ㎕, 1 ㎍의 RT 생성물, DEPC 처리된 증류수를 넣어 최종 부피가 25 ㎕가 되도록 한 후 RT-PCR를 수행하였다. RT-PCR은 cDNA 합성: 42℃, 30분, predenaturation: 94℃, 5분, denaturation: 94℃, 30초, annealing: 56-58℃, 30초, extention: 72℃, 40초를 30 cycles, postextention: 72℃, 7분간 수행하였

다. RT-PCR의 생성물은 1% agarose gel을 사용한 전기영동으로 분리하고 0.1% ethidium bromide로 염색한 다음 UV에서 밴드를 관찰하였다. 각 primer의 염기서열은 Table 1에 나타냈다.

8. 통계분석

본 연구의 모든 실험은 세 번 이상 반복하였으며, 얻어진 결과들을 평균값과 표준편차(mean±SD)를 계산하여 나타내었다.

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR analysis

Primers	Primer sequences	
	Forward	Reverse
iNOS	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
TNF-α	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
IL-1β	5'-TGGACGGACCCCAAAAGATG-3'	5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3'
IL-6	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'	5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
GAPDH	5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGCAC-3'	5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'

Ⅲ. 결과

1. TBPS가 Raw 264.7 세포의 증식에 미치는 영향

살리실산 유도체인 TBPS의 마우스 대식세포인 Raw 264.7에 대한 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하여 세포생존율을 측정하였다. TBPS을 농도별(1, 5, 10 15, 20 ㎍/㎖)로 처리한 후, 자극되지 않은 배지에서 24시간 배양하였다. TBPS를 처리하지 않은 세포의 증식을 100으로 하고, TBPS로 활성화된 시험군의 세포증식을 측정한 결과, 세포증식 억제율은 Fig. 8과 같다. 1~10 ㎍/㎖의 농도에서는 TBPS가 세포독성을 보이지 않았지만, TBPS 15 ㎍/㎖의 농도에서는 86%정도의 세포생존율을 나타냈다. TBPS 20 ㎍/㎖ 농도에서는 세포독성을 보여 60% 정도의 세포생존율을 보였다. TBPS는 20 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 세포독성이 낮아 세포의 생존율에 영향을 주지 않음을 확인하였다. 따라서 다음의 모든 실험은 1~15 ㎍/㎖의 범위의 농도에서 진행하였다.

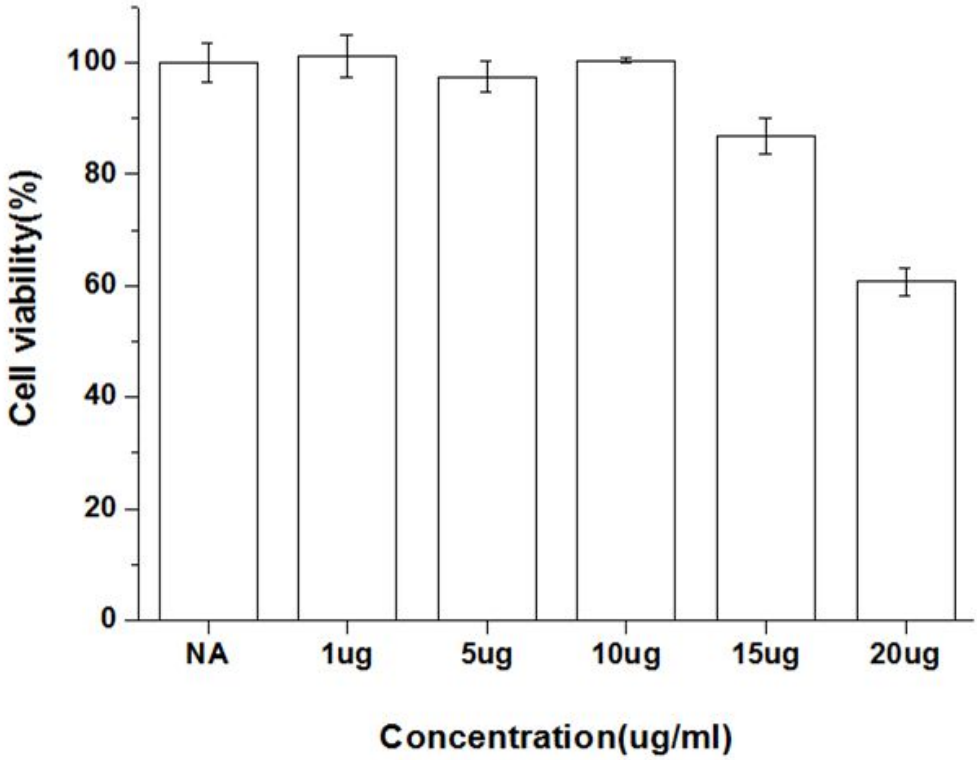

Fig. 8. Effect of TBPS on cell viability

Cell viability was measured after 24 hours incubation. Survival rates were tested with MTT assay in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated in the presence or absence of 1~20 μg/mℓ TBPS for 24 hours. Each bar shows the mean ± S.D of three independent experiments performed in triplicate.

2. TBPS의 NO 생성 저해 효과

Raw 264.7 세포에서 TBPS의 NO 생성 저해 효과를 알아보기 위해 LPS로 NO 생성을 유도한 뒤, 세포독성이 안정적인 범위인 1, 5, 10, 15 ㎍/㎖의 농도로 TBPS를 처리하여 TBPS의 NO 생성 억제 여부를 확인하였다. 그 결과, LPS를 처리하지 않은 군에서는 NO가 생성되지 않았으나 LPS를 처리한 군에서는 NO의 양이 증가하였다. LPS와 TBPS를 함께 처리했을 때, TBPS의 농도가 1 ㎍/㎖의 저농도에서는 NO의 양이 LPS만 단독으로 처리했을 때와 비슷하게 1.4 ㎂로 증가하였다. 그러나 TBPS를 15 ㎍/㎖의 고농도로 처리했을 때는 LPS를 처리하지 않은 군과 비슷한 수준인 0.9 ㎂까지 NO의 양이 감소하였다. LPS와 TBPS를 함께 처리했을 때 1~15 ㎍/㎖에서 LPS에 의해 증가된 NO의 양이 농도 의존적으로 감소하였다. 이 실험의 결과, TBPS가 LPS로 유도된 NO의 발현을 농도 유의적으로 저해함을 확인하였다(Fig. 9).

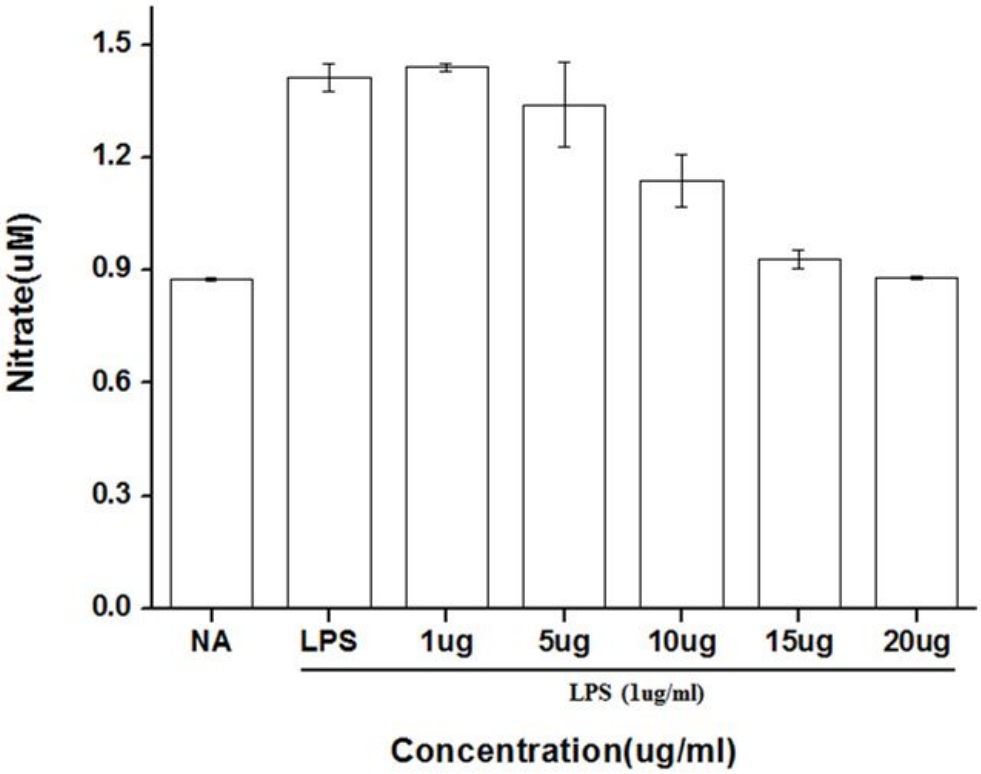

Fig. 9. Effect of TBPS on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells
Inhibition of LPS-stimulated NO production by TBPS in Raw 264.7 cells. The cells were treated with indicated concentrations of TBPS for 1 hour prior to the addition of 1 ㎍/㎖ of LPS, and the cells were further incubated for 12 hours. NO production was determined in culture supernatant by Griess reagent. Results represent the mean±S.D. of three independent experiments.

3. TBPS의 iNOS 발현 억제 효과

NO를 생성하는 효소인 iNOS의 발현에 대한 TBPS의 효과를 조사하였다. LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포로부터 TBPS의 iNOS 단백질 발현에 대한 저해 효과는 Western blot analysis를 수행하여 진행하였다. Raw 264.7 세포에 LPS로 자극을 준 후 TBPS를 1~15 ㎍/㎖ 농도로 처리하였다. 그 결과, Raw 264.7 세포만 배양한 무처리군에서는 iNOS의 발현이 전혀 나타나지 않았다. 그러나 LPS를 단독으로 처리한 군에서는 iNOS의 발현이 무처리군에 비해 현저히 증가하였다. LPS 1 ㎍/㎖과 TBPS를 1, 5, 10, 15 ㎍/㎖의 농도별로 처리한 경우 iNOS의 발현이 무처리 대조군에 비해 농도 의존적으로 현저히 억제됨을 확인하였다 (Fig. 10).

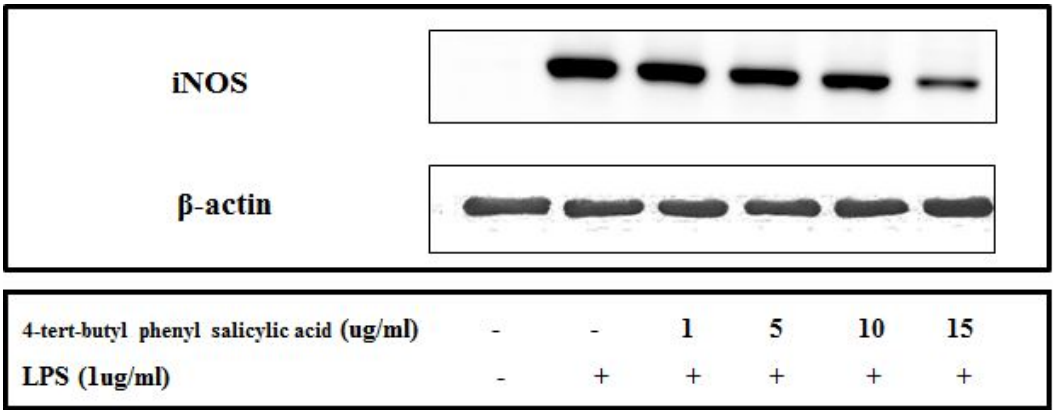

Fig. 10. Effects of 4-TBPS on LPS-stimulated iNOS expression in Raw 264.7 cells

Inhibition of LPS-stimulated iNOS expression by TBPS. The cells were treated with indicated concentrations of TBPS for 1 hour prior to the addition of 1 μg/㎖ of LPS, and the cells were further incubated for 24 hours. The levels of iNOS protein were monitored. This experiment has been repeated three times with similar observations.

4. TBPS의 COX-2 발현 억제 효과

TBPS가 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에서 COX-2 단백질 발현에 대한 저해 효과를 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하지 않은 무처리군에서는 COX-2의 발현이 약간 증가하였으나 LPS를 처리한 군에서는 COX-2의 발현이 무처리 대조군에 비해 현저히 증가하였다. LPS와 TBPS를 함께 처리한 경우 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 억제되었으며 이는 iNOS 단백질 발현과 같은 양상을 나타냈다 (Fig. 11). 이 결과는 또한 NO 생성 저해 효과의 결과와 일치되어, NO 생성 저해 효과가 TBPS에 의한 iNOS, COX-2 단백질 발현 저해에서 기인함을 확인하였다.

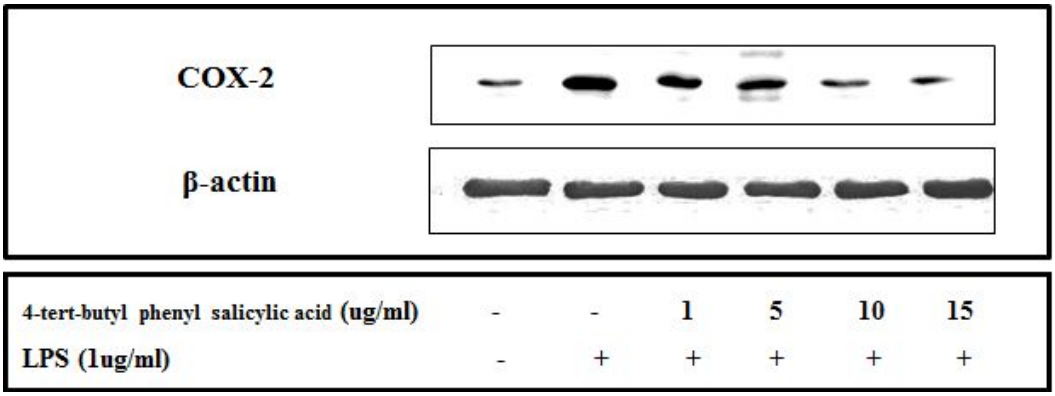

Fig. 11. Effects of TBPS on LPS-stimulated COX-2 expression in Raw 264.7 cells

Inhibition of LPS-stimulated COX-2 expression by TBPS. The cells were treated with indicated concentrations of TBPS for 1 hour prior to the addition of 1 μg/mℓ of LPS, and the cells were further incubated for 24 hours. The levels of COX-2 protein were monitored. This experiment has been repeated three times with similar observations.

5. TBPS의 세포 내 염증 관련 단백질의 mRNA 발현에 미치는 영향

Western blot analysis를 수행하여 TBPS가 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 따라서 iNOS와 COX-2의 발현이 유전자 수준에서 조절됨을 확인하기 위해 NO를 생산하는 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR법을 이용하여 관찰하였다. TBPS와 함께 시간별로 배양한 Raw 264.7 세포에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR법으로 iNOS 및 COX-2의 mRNA을 증폭시켜 비교하였다. 그 결과, LPS를 처리하지 않은 군에서는 iNOS와 COX-2의 mRNA가 유도되지 않았다. 그러나 LPS를 단독으로 처리한 군에서는 iNOS와 COX-2가 유도되었으며, LPS와 TBPS를 동시 처리한 군에서는 TBPS의 농도가 증가할수록 iNOS와 COX-2의 mRNA의 발현이 현저하게 억제되었다. 이런 결과에 근거하여 TBPS가 단백질뿐만 아니라 전사수준에서도 효과적으로 iNOS와 COX-2의 발현을 조절함을 확인하였다 (Fig. 12).

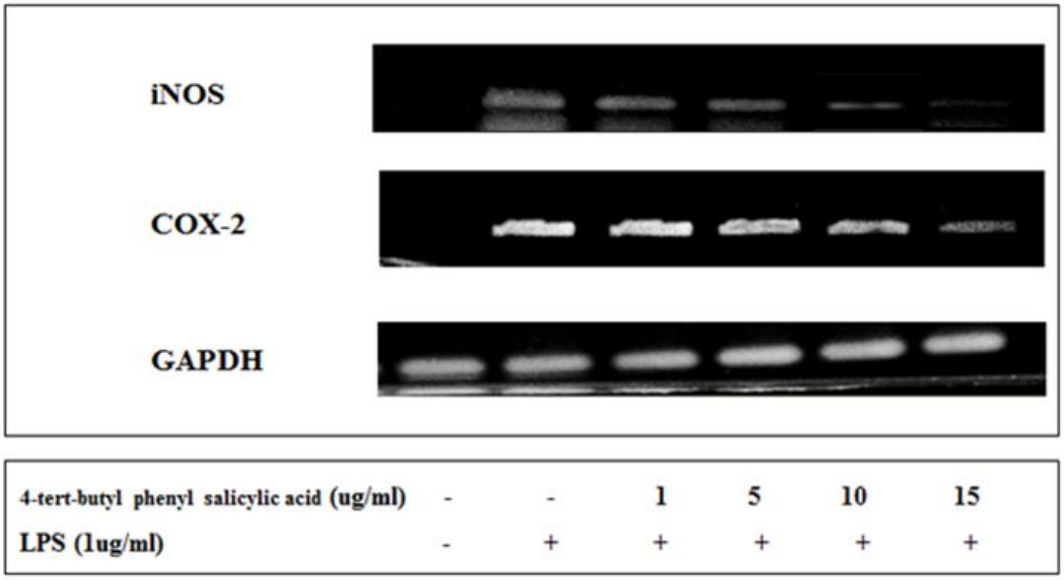

Fig. 12. Effects of TBPS on the mRNA levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Raw 264.7 cells

Raw 264.7 cells (1×10^6 cells/㎖) were pre-incubated for 12 hours, and the cells were stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) in the presence of TBPS (1, 5, 10, 15 ㎍/㎖) for 12 hours.

6. TBPS의 염증 매개성 사이토카인 저해 효과

LPS로 자극된 Raw264.7 세포에서 생성되는 염증 매개성 사이토카인의 생성에 대한 TBPS의 효과를 확인하기 위해 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 생성을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. TBPS를 1~15 μg/mℓ 농도를 LPS (1 μg/mℓ)와 함께 처리하여 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 생성량의 변화는 Fig. 13에 나타내었다. LPS 자극에 의해 TNF-α, IL-1β와 IL-6의 경우 모두 생성량이 크게 증가하였고, LPS를 단독으로 처리하였을 때보다 TBPS를 함께 처리하였을 때 각각의 사이토카인 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다. 이를 통해 TBPS가 염증 매개성 사이토카인의 발현을 농도 의존적으로 저해함을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

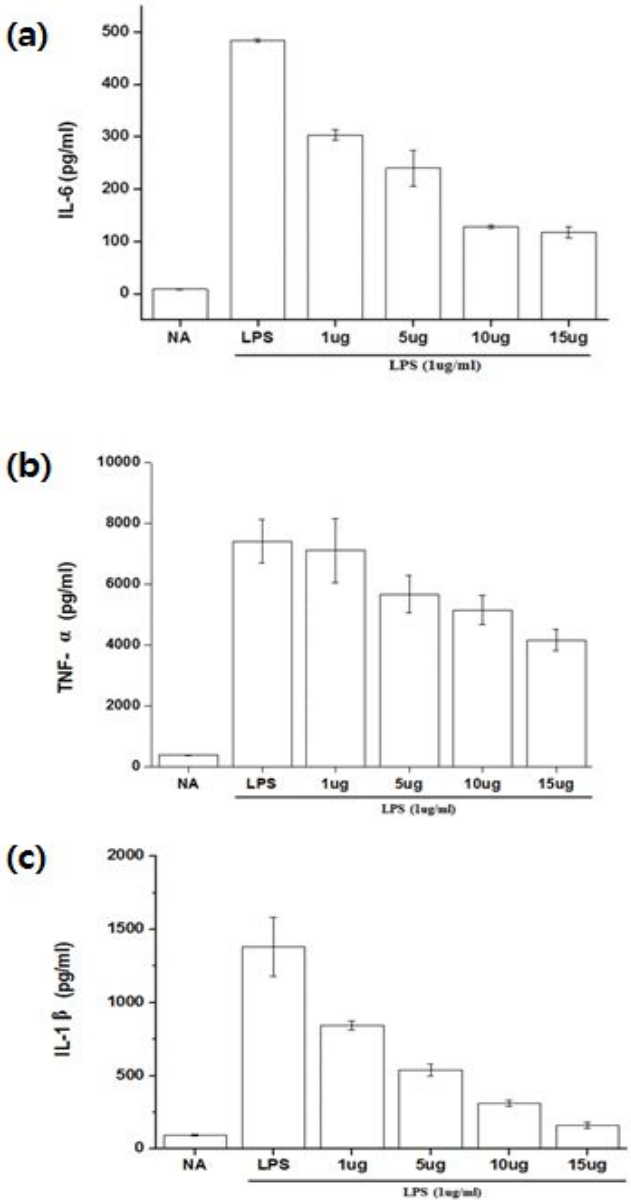

Fig. 13. Effect of TBPS in the suppression of TNF-α, IL-1β, IL-6 production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells

Cells were incubated with the indicated concentrations of TBPS for 30 minutes before treatment with LPS (1 ㎍/㎖) for 24 hours. After incubation for 24 hours, the supernatant was collected, and the amount of proinflammatory cytokines were measured by ELISA assay.

7. TBPS의 염증 매개성 사이토카인의 mRNA 발현 억제 효과

TBPS의 염증 매개성 사이토카인의 생성은 ELISA 방법으로 확인하였다. 그 결과 염증 매개성 사이토카인의 양이 TBPS의 농도가 증가할수록 감소함을 확인하였다. 그 결과를 토대로 TBPS가 염증 매개성 사이토카인의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하고자 RT-PCR을 수행하였다. Raw 264.7 세포에 TBPS를 첨가하여 12~24시간 동안 배양한 후 세포의 Total RNA를 추출하였다. RT-PCR을 수행하여 사이토카인의 mRNA 발현양을 분석한 결과, IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현은 LPS를 처리하지 않은 군에서는 발현하지 않았다. 그러나 LPS를 처리하였을 때는 mRNA 발현이 현저하게 증가하였다. LPS와 TBPS를 1~15 ㎍/㎖ 농도로 함께 처리하였을 때 농도 의존적으로 mRNA 발현양이 감소함을 확인하였다. 이 결과는 ELISA를 이용한 실험결과와 일치하였으며 TBPS가 유전자 수준에서 염증 매개성 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 14).

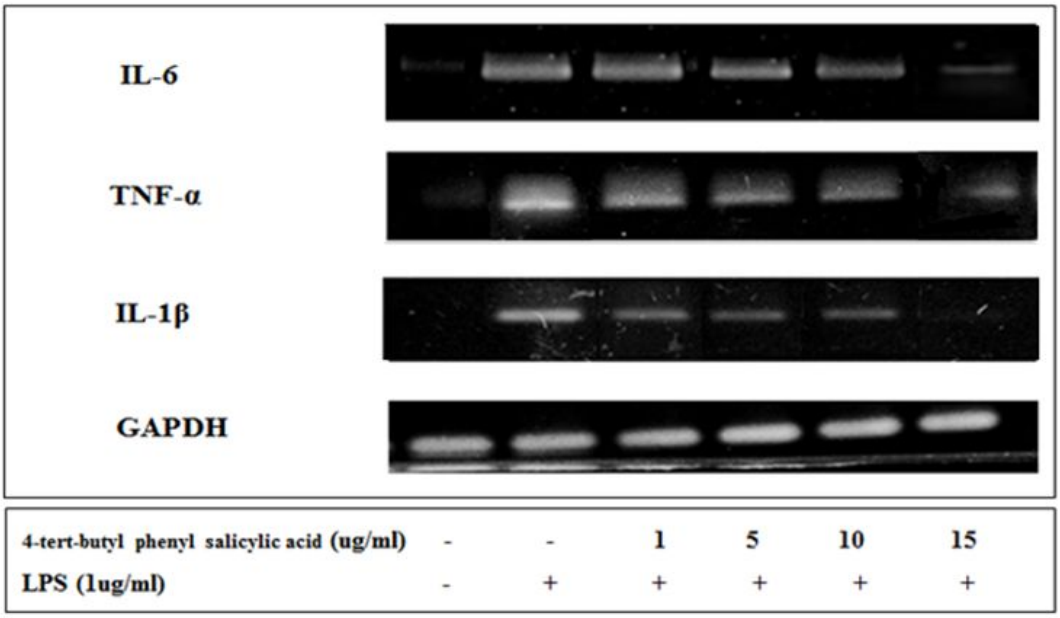

Fig. 14. Effect of TBPS on LPS-stimulated TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA gene expression

After LPS treatment 2~12 hours, the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA were determined by RT-PCR. GAPDH was used as internal control for RT-PCR assays.

8. TBPS의 NF-κB, IκBα, p-IκBα 발현에 미치는 영향

iNOS, COX-2 및 여러 염증 매개성 사이토카인들은 전사수준에서 주요 전사인자인 NF-κB에 의해 조절된다. 외부 자극이 주어지게 되면 NF-κB와 IκBα의 결합이 IκBα의 인산화에 의해 분해되고 유리된 NF-κB가 핵 내로 이동하여 염증 반응이 유도된다. 따라서 TBPS에 의해 NF-κB, IκBα의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하여 조사하였다. NF-κB의 핵 내로의 이동을 확인하기 위해 세포질과 핵 내의 NF-κB의 양을 각각 측정했다. 그 결과, LPS 무처리군에서는 세포질 내의 양이 증가되어 있었다. 반면 LPS 단독 처리군에서는 세포질 내의 양이 감소하고 핵 내의 양이 증가함을 보였다. LPS와 TBPS를 함께 처리하였을 때의 NF-κB의 양을 확인한 결과 TBPS의 농도가 증가할수록 핵 내의 양은 감소하고 반대로 세포질 내의 양은 증가하였다. 이 결과 NF-κB의 양이 세포질 내에서 증가하였고 핵 내로의 이동이 억제되어 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켜 염증반응을 억제함을 확인하였다(Fig. 15).

또한 NF-κB와 IκBα와 복합체를 이루어 세포질에 존재하는 IκBα의 발현 양상을 확인하였다. 자극이 주어져 활성화된 IκBα의 경우 인산화되면서 NF-κB와 유리되어 염증반응이 이루어진다. TBPS를 처리했을 때 IκBα와 p-IκBα의 양을 Western blot analysis로 확인하였다. 무처리군에서는 세포질 내의 IκBα의 양이 증가되어 있으며 LPS 처리군에서는 IκBα의 양이 감소하고 p-IκBα의 양이 증가하였다. LPS와 TBPS를 함께 처리했을 때를 확인한 결과 TBPS의 농도가 증가할수록 p-IκBα의 양이 감소하고 IκBα의 양이 증가하였다(Fig. 16).

이 실험의 결과 TBPS 처리 시 LPS에 의해 자극된 IκBα의 인산화를 억제하여 NF-κB와 IκBα의 복합체가 유지됨으로써 염증반응이 억제됨을 확인하였다. 이는 TBPS가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF-κB 신호전달을 억제함을 의미한다.

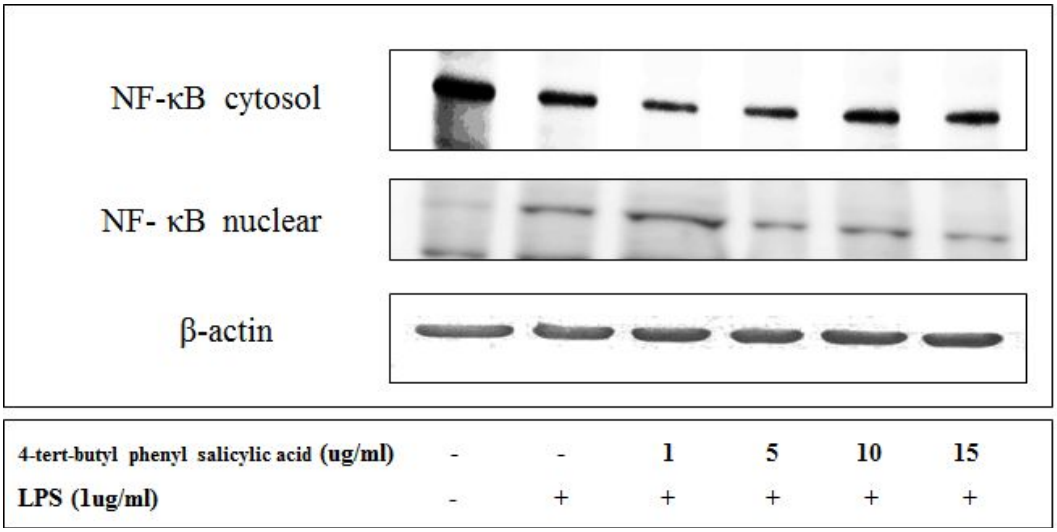

Fig. 15. Effect of TBPS on LPS-stimulated NF-kB expression
Western blot analysis was performed to detect NF-kB protein level.

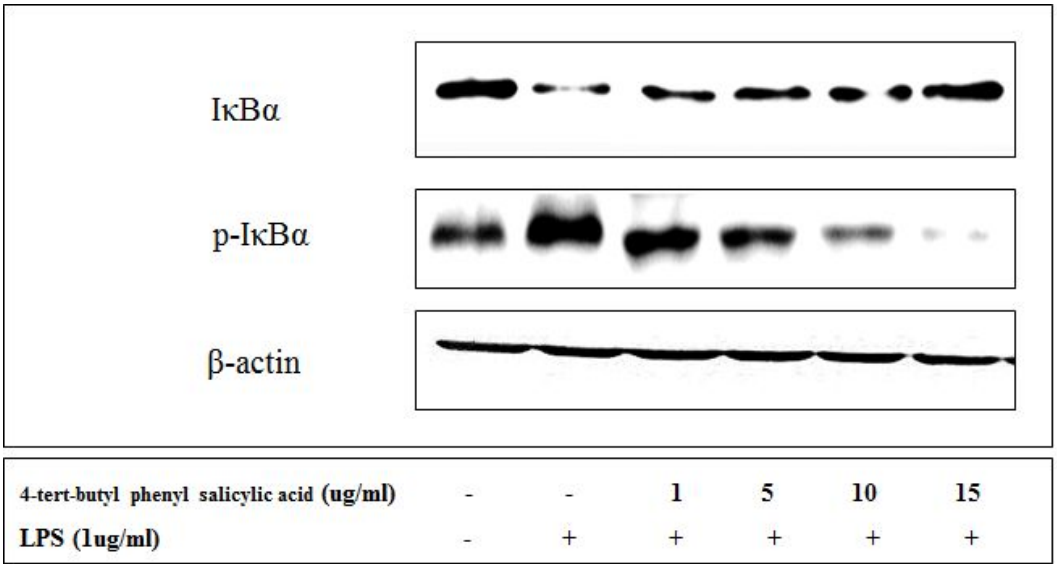

Fig. 16. Inhibition of LPS-stimulated IκBα phosphorylation and degradation by TBPS

Raw 264.7 cells were treated with indicated concentrations of TBPS for 1 hour prior to the addition of 1 μg/㎖ of LPS, and the cells were further incubated for 1 hour. Western blot analysis was carried out. These experiments have been repeated three times with similar observations.

Ⅳ. 고찰

본 연구에서는 살리실산 유도체인 TBPS의 항염증 효과와 그 작용기전을 확인하기 위해 NO의 생성 및 염증 관련 단백질, 염증 매개성 사이토카인들의 발현 양상을 확인하였다.

TBPS의 세포독성과 NO 생성 저해 효과를 측정하기 위해 마우스 복강 대식세포인 Raw 264.7을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 그 결과 1~15 ㎍/㎖의 농도에서 세포에 독성을 보이지 않음을 확인하였다(Fig. 8).

TBPS의 NO 생성 조절 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 LPS 1 ㎍/㎖로 자극한 후 TBPS를 농도별로 처리하여 NO 생성 저해 효과를 분석하였다. 그 결과 세포에 독성을 보이지 않는 농도인 1~15 ㎍/㎖에서 효과적으로 NO 생성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 9). 이것은 TBPS의 NO 저해 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아닌 고유의 효과임을 알 수 있었다.

NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NOS는 3종류의 동종 효소가 있다. 신경세포성 NOS와 내피세포성 NOS는 항상성 유지를 위해 세포 속에 항상 존재하는 인체 구성인자다. 이들은 저농도로 발현되고 세포질 내 칼슘이온의 증가에 의해 급속히 활성화된다. 상대적으로 iNOS는 평소 휴지기 세포 내에는 존재하지 않고 염증반응에만 관여한다(50-51). iNOS의 발현은 NF-κB 활성으로 유도되며, iNOS는 칼슘 농도와 관계없이 일부 세포에서, 특히 대식세포와 중성구에서 LPS, 사이토카인 및 박테리아독소 같은 특수한 염증성 자극인자에 노출되는 경우에만 발현되며 이때 다량의 NO가 생성된다. iNOS에 의해 생성된 고농도의 NO는 세포독성 및 조직손상 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개물질의 생합성을 촉진시킨다(52-53).

아라키돈산을 PGE2로 전환시키는 COX는 2종류의 유사형태가 있다. 그 중

COX-1은 염증 자극인자에 의해 생성되고 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 조직 구성인자로 위장 보호 및 신장 기능 유지와 같은 인체의 항상성 유지에 관여한다. 반면 COX-2는 대부분의 정상적인 휴지기 조직에는 존재하지 않는다. COX-2는 TNF-α, 사이토카인, 세균성 내독소, 자외선 등과 같은 다양한 염증 유발인자에 의해 생성되고 염증반응에만 관여한다(54). COX-2의 과다 발현은 염증뿐만 아니라 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중대한 역할을 한다(55). 자극에 의해 염증 관련 단백질이 유도되면 다량의 NO가 생성되고, 생성된 고농도의 NO는 주위 조직에 세포독성을 나타낸다. 자극이 주어지면 NO는 염증반응과 염증 매개물질의 생합성을 촉진하여 염증을 유발시킨다(56).

TBPS의 NO 생성 억제능이 확인됨에 따라 TBPS가 항염증 활성에 핵심적인 역할을 담당하는 단백질인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 Western blot analysis로 평가하고, RT-PCR을 수행하여 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 Fig. 10과 Fig. 11에 제시된 바와 같이 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 TBPS 처리에 의해 농도 1~15 ug/ml의 범위에서 농도 유의적으로 감소됨을 보였으며 그 활성의 정도는 Fig. 9의 NO 생성 저해 효과의 결과와 일치하였다. 이 결과는 NO 생성 저해 효과가 TBPS에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 저해에서 기인함을 시사한다. 또한 RT-PCR 결과, TBPS는 농도 의존적으로 염증 관련 단백질과 그 단백질의 유전자 수준에서의 발현을 억제한다는 사실을 확인하였다(Fig. 12).

Wu는 아스피린과 살리실산염을 비교하면서 살리실산염의 경우 iNOS와 COX-2 효소와 mRNA 발현은 0.18~180 ㎍/㎖의 농도에서 농도 의존적으로 저해되었다고 보고하였다(57). 또한 Kepka-Lenhart 등은 LPS로 유도된 iNOS의 발현을 조사한 결과 아스피린과 살리실산염의 경우 각각 36 ㎍/㎖, 27.6 ㎍/㎖의 농도에서 단백질 및 유전자의 발현이 억제되었다고 보고했었다(58). 그러나 TBPS의 경우는 1~15 ㎍/㎖의 낮은 농도에서 세포독성 없이 염증 관련 효소 및 mRNA의 발현이 저해되었다. 기존에 보고되었던 살리실산염 및 아스피린과 비교하였을 때 본 연구에 사용된 TBPS는 독성이 강하지만 매우 낮은 농도에서 효과적으로 염증 관련 효소의 발현이 저해됨을 확인하였다.

염증 반응이 진행되기 위해서는 NO와 같은 염증 매개물질 이외에 면역 세포에서 생성 분비되는 염증 매개성 사이토카인이 동반된다. 그 중 TNF-α, IL-1β, IL-6가 대표적인 사이토카인으로 LPS와 같은 외부자극에 의해 생성된다. TNF-α는 주로 활성화된 단핵구나 대식세포에서 맨 먼저 생성되어 단독 또는 IL-1, IFN-γ와 같은 사이토카인들과 함께 작용한다. TNF-α는 특히 LPS에 의해 자극될 경우 대식세포에서 대량 생산되지만, 림포이드계 세포, 비만세포, 내피세포를 비롯하여 인체 내의 다양한 세포에서도 생산된다(50). IL-6 유전자 발현은 TNF-α, IL-1, IFN-γ와 같은 염증 매개물질에 의해 자극되며, 감염과 조직 손상에 따른 인체의 주요한 반응 매개물질로 작용한다. IL-1β는 선천면역과 염증에서 TNF-α와 함께 작용하여 iNOS 발현을 유도한다. IL-1β의 수용체는 TNF-α의 수용체와 구조가 다른데도 면역 생물학적 기능은 TNF-α와 매우 비슷하다. 이는 두 사이토카인에 대한 수용체가 동일한 단백질로 신호를 보내며 동일한 전사인자 NF-κB와 AP-1을 활성화시키기 때문이다. IL-1β는 보통 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하여 세포 성장이나 체내 항상성 유지에 필요하다. 하지만 염증이나 상처 또는 면역학적 자극이 주어질 때는 대량으로 생산되어 인체 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다(59). 이처럼 LPS, TNF-α, IL-1β, IL-6와 같은 염증 매개물질들은 단독 또는 상호작용을 하며 전사인자인 NF-κB를 활성화시켜 NO, PGE2, TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성을 증가시킨다.

TBPS가 염증 관련 단백질의 발현을 억제함을 확인하였고, 염증 관련 단백질 이외에 염증 매개성 사이토카인의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Fig. 13에서와 같이 IL-1β, IL-6, TNF-α 염증 매개성 사이토카인들은 TBPS에 의해 생성량이 감소하였으며 RT-PCR로 분석한 mRNA 유도 또한 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 14). 이런 결과에 근거하여 TBPS는 염증을 유발하는 사이토카인들의 발현을 조절하는 효과적인 면역조절자임을 확인하였다.

염증 반응에 있어 NF-κB는 iNOS, COX-2 및 염증 매개성 사이토카인의 발현을 조절한다. 평상시 휴지기 세포에서는 NF-κB와 IκBα가 결합되어 세포질 내에 존재하는데, 염증성 자극이 주어지면 IκBα의 인산화에 의한 IκBα의 분해가 촉진된다. IκBα가 분해되어 자유로워진 NF-κB는 핵 내로의 이동이 촉진되어 전자조절인자로

작용하면서 iNOS와 COX-2의 발현을 증가시켜 염증 반응을 유도한다(60-61). 즉 자극이 오면 세포질 내의 NF-κB의 양은 현저하게 줄어들게 되며, 핵 내의 NF-κB의 양이 증가하게 된다. 따라서 염증에 관련된 사이토카인과 단백질의 발현은 NF-κB 활성화 경로에 의해 조절된다.

본 연구에서 TBPS가 염증반응에 영향을 미치는 전사조절인자인 NF-κB의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 그 결과, 핵 내로의 NF-κB 이동이 TBPS에 의해 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 15). 또한 TBPS에 의해 IκBα의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과 TBPS의 농도가 증가할수록 IκBα의 인산화가 감소되어 NF-κB의 활성을 저해하였다(Fig. 16).

Kopp와 Ghosh는 살리실산 나트륨이 3.2 mg/㎖의 농도에서 IκBα의 인산화 억제를 통해 NF-κB의 핵 내로의 이동을 저해하였고, 아스피린 또한 IκBα의 인산화를 억제하여 NF-κB의 활성화를 저해했다고 보고하였다. 그들은 항염증약 살리실산 나트륨과 아세틸 살리실산이 NF-κB 전사인자의 활동을 억제하여 항염증 효과를 발휘한다는 사실을 맨 처음 보고하면서 다른 비스테로이드성 항염증제들도 전사수준에서 조절함으로써 항염증 효과를 발휘할 것이라고 제시했다(62).

암과 각종 만성 질환에서 NF-κB 역할의 중요함이 잘 알려져 있기 때문에 NF-κB의 억제제도 수 없이 많이 확인되었다. NF-κB도 다른 많은 전사 인자와 마찬가지로 작용하는 세포의 종류 또는 작용 단계 등에 따라 서로 다른 여러 가지 기능을 한다. 따라서 많은 다른 천연물이나 합성물은 효과와 그 구조상의 차이, 그리고 목표로 하는 NF-κB 신호 경로상의 단계가 다르더라도 NF-κB 활성화를 억제한다(63). 항염증 효과 외에 항암작용으로도 알려진 상귀나린은 벤조페난트렌 알카로이드의 일종으로 IκBα의 인산화 및 분해를 차단하여 NF-κB 활성화를 강력하게 억제한다고 Chaturvedi 등은 보고했고(64), Jung 등은 항혈소판 및 혈관 확장 작용이 있어 말초 혈관 질환의 허혈성 증상 또는 동맥질환으로 인한 간헐성 파행 치료에 광범위하게 사용되는 실로스타졸이 NF-κB의 DNA 결합 및 전사 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다(65).

또한 Zhang 등은 중국의 전통 약용 식물 G. yunnanensis에서 분리한 천연 살리실산염 유도체 methyl salicylate 2-O-β-D-lactoside가 분자 구조가 살리실산과 화학적으로 연관성이 있고, 아스피린 보다 항염증 효과가 더 현저할 뿐만 아니라 위장관 독성도 감소되었다고 보고하였다(66). 그들은 이어서 살리실산 나트륨이나 아스피린보다 더 강력하게 NF-κB 활성화를 억제하여 항염증 효과를 나타내며 이는 NF-κB 신호 전달 경로에 미치는 억제 효과가 IKK-β의 인산화 억제에 의한 것이라고 보고하였다(67).

본 연구에서 살펴 본 TBPS는 시험관 실험에서 기존의 살리실산 및 유도체들과 비교하였을 때, 15 ㎍/㎖의 농도에서 효과적으로 NF-κB의 활성을 저해하였다. 이는 TBPS가 살리실산 나트륨보다 낮은 농도에서 효과적으로 NF-κB의 활성을 억제하여 iNOS와 COX-2 및 염증 매개성 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제함으로써 항염증 효과를 발휘한다는 사실을 의미한다.

Ⅴ. 결론

본 연구는 지금까지 항염증 효과에 대해 보고된 바 없는 살리실산 유도체인 4-tertiary-부틸 페닐 살리실산의 항염증 효과 및 그 작용기전을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 세포 독성 없는 범위 1~15 ㎍/㎖의 농도에서 LPS에 의해 증가된 NO 생성이 유의적으로 감소하였다.
2. 염증 관련 단백질 iNOS와 COX-2 생성이 농도 의존적으로 감소하였다.
3. 사이토카인 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 생성이 농도 의존적으로 감소하였다.
4. 염증 관련 단백질과 사이토카인 유전자 발현 (mRNA 생성)이 농도 의존적으로 감소하였다.
5. 염증 매개성 사이토카인 및 염증 관련 효소 생성을 전사수준에서 조절하는 NF-κB의 활성화 및 IκBα 인산화를 억제함을 확인하였다.
6. TBPS의 항염증 효과는 NF-κB 신호전달 경로를 억제함으로써 발휘된다는 사실을 확인하였다.

이상의 연구 결과는 향후 살리실산 유도체인 4-tert-부틸 페닐 살리실산의 항염증 기전에 대한 생화학적 해석 및 이를 활용한 지속적인 연구를 위한 자료가 될 것이며, 또한 이를 토대로 항염증 소재 개발 연구를 위한 기초자료로 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

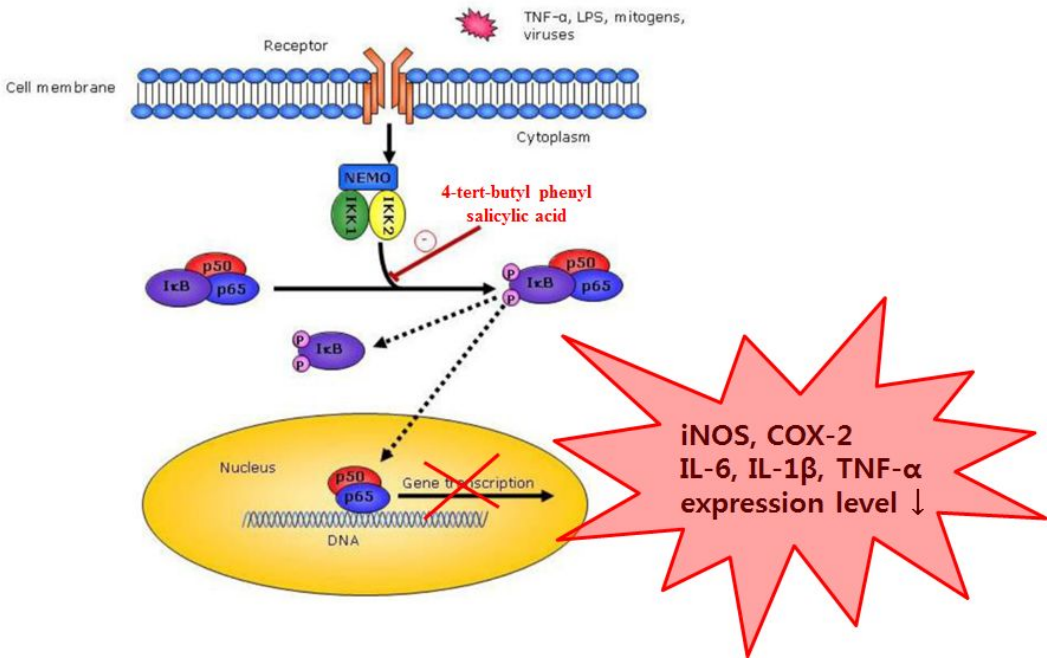

Fig. 17. Anti-inflammatory mechanisms of TBPS

Ⅴ. 참고문헌

1. Mackowiak PA. Brief history of antipyretic therapy. Clin Infect Dis. 2000; 31: 154-6.
2. Hedner T, Everts B. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. Clin Rheumatol. 1998; 17: 17-25.
3. Meier B, Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J, Sticher O. Comparative high-performance liquid and gas-liquid chromatographic determination of phenolic glucosides in salicaceae species. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 1988; 442: 175-86.
4. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. Comparision of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 2004; 12: 191-202.
5. Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF. Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. Arabidopsis Book. 2011; 9: e0156.
6. Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature. 2001; 414: 562-5.
7. Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B. Mini-Review Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signal Behav. 2009; 4: 493-6.
8. Vane SJ. Differential inhibition of cyclooxygenase isoforms: an explanation of the action of NSAIDs. J Clin Rheumatol. 1998; 4: 3-10.
9. Vane SJ. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. Thorax. 2000; 55: 3-9.
10. Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3rd, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. N Engl J Med. 1983; 309: 396-403.

11. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. Circulation. 2000; 101: 1206-18.
12. Angiolillo DJ, Datto C, Raines S, Yeomans ND. Impact of concomitant low-dose aspirin on the safety and tolerability of naproxen and esomeprazole magnesium delayed-release tablets in patients requiring chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy: an analysis from 5 Phase III studies. J Thromb Thrombolysis. 2013; DOI 10.1007: 11239-013-1035-4
13. Daniel F, Seksik P, Cacheux W, Jian R, Marteau P. Tolerance of 4-aminosalicylic acid enemas in patients with inflammatory bowel disease and 5-aminosalicylic-induced acute pancreatitis. Inflamm Bowel Dis. 2004; 10: 258-60.
14. Steele K, Shirodaria P, O'Hare M, Merrett JD, Irwin WG, Simpson DI, Pfister H. Monochloroacetic acid and 60% salicylic acid as a treatment for simple plantar warts: effectiveness and mode of action. Br J Dermatol. 1988; 118: 537-43.
15. Denko CW. A role of neuropeptides in inflammation. In: Whicher JT, Evans SW. Biochemistry of Inflammation, Kluwer Pub. London. 1992; 18: 177-81.
17. Gallucci S, Provenzano C, Mazzarelli P, Scuderi F, Bartoccioni E. Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. Int Immunol. 1998; 10: 267-73.
18. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 2007; 7: 31-40.
19. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 1994; 8: 217-25.
20. Willoughby DA. Herberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann Rheum Dis. 1975; 34: 471-8.
21. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2002; 2:

787-95.
22. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 2003; 24: 25-9.
23. Debnath T, Kim da H, Lim BO. Natural products as a source of anti-inflammatory agents associated with inflammatory bowel disease. Molecules. 2013; 18: 7253-70.
24. Gallucci S, Provenzano C, Mazzarelli P, Scuderi F, Bartoccioni E. Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. Int Immunol. 1998; 10: 267-73.
25. Henson PM, Murphy RC. Mediators of the inflammatory process. Elsevier, Amsterdam, 1989: 404, Evans SW, Whicker JT. An overwiew of the inflammatory response. In Whicher JT, Evans SW. Biochemistry of Inflammation. Kluwer Pub. London. 1992; 1-15
26. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. Am J Clin Nutr. 2006; 83: 456-60.
27. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappaB. Dig Dis Sci. 2007; 52: 1890-6.
28. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem. 2008; 54: 24-38.
29. Patel TN, Shishehbor MH, Bhatt DL. A review of high-dose statin therapy: targeting cholesterol and inflammation in atherosclerosis. Eur. Heart J. 2007; 28: 664-72.
30. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. J Alzheimers Dis. 2008; 13: 359-69.
31. Ulivi V, Cancedda R, Cancedda FD. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) inhibits the synthesis of the acute phase protein SIP24 in cartilage: Involvement of COX-2 in resolution of inflammation. J Cell Physiol. 2008;

217: 433-41.
32. Jackson JJ, Kropp H. beta-Lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. J Infect Dis. 1992; 165: 1033-41. LPS
33. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. Kidney Int. 2007; 71: 290-7.
34. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. Anal Biochem. 1999; 271: 18-28.
35. Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. Prog. Lipid Res. 2004; 43: 3-35. 21
36. Sandee D, Sivanuntakorn S, Vichai V, Kramyu J, Kirtikara K. Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in COX-1 and COX-2 knock-out mouse fibroblast cell lines. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009; 88: 111-6. 22
37. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. Kidney Int. 2007; 71: 290-7. 23
38. Fernandes P. Predicting pathway effects. Drug discovery and development. 2012.
39. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic acti-inflammatory pathway. Nature reviews Drug Discovery. 2005; 4: 673-84.
40. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. Trends Microbiol. 2004; 12: 186-92.).
41. Celec P. Nuclear factor kappaB-molecular biomedicine: the next generation. Biomed Pharmacother. 2004; 58: 365-71.

42. Koki A, Khan NK, Woerner BM, Dannenberg AJ, Olson L, Seibert K, Edwards D, Hardy M, Isakson P, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. Adv Exp Med Biol. 2002; 507: 177-84.
43. Nakao S, Ogata Y, Sugiya H. Nicotine stimulates the expression of cyclooxygenase-2 mRNA via NFkappaB activation in human gingival fibroblasts. Arch. Oral. Biol. 2009; 54: 251-7.
44. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998; 16: 225-60.
45. Oh GS, Pae HO, Choi BM, Seo EA, Kim DH, Shin MK, Kim JD, Kim JB, Chung HT. 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Cancer Lett. 2004; 205: 23-9.
46. Chen G, Wood EG, Wang SH, Warner TD. Expression of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells is unrelated to nuclear factor-kappaB activation. Life Sci. 1999; 64: 1231-42.
47. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, Kim KS. Bulnesia sarmienti aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. J Life Sci. 2009; 19: 479-85.
48. Rastrick JM, Stevenson CS, Eltom S, Grace M, Davies M, Kilty I, Evans SM, Pasparakis M, Catley MC, Lawrence T, Adcock IM, Belvisi MG, Birrell MA. Cigarette smoke induced airway inflammation is independent of NF-κB signalling. PLoS One. 2013; 8: e54128.
49. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochem Pharmacol. 1996; 51: 383-94.
50. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992; 6: 3051-3064.
51. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol. 1996; 10: 291-316.

52. Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, Choi JW, Lee KT. In vitro anti-inflammatory activity of the essential oil from ligularia fischeri var. spiciformis in murine macrophage Raw 264.7 cells. Yakhak Hoeji 2002;46: 343-347.
53. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of zanthoxylum bungeanum. J Ethnopharmacol. 2001; 77: 209-17.
54. Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. Biochem Pharmacol. 2004; 68: 1089-100.
55. Wu D, Mennerich D, Arndt K, Sugiyama K, Ozaki N, Schwarz K, Wei J, Wu H, Bishopric NH, Doods H. Comparison of microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion and COX-2 inhibition in acute cardiac ischemia in mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009; 90: 21-5.
56. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat. Res. 1994; 305: 253-64.
57. Wu KK. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. Thromb Res. 2003; 110: 273-6
58. Kepka-Lenhart D, Chen LC, Morris SM Jr. Novel actions of aspirin and sodium salicylate: discordant effects on nitric oxide synthesis and induction of nitric oxide synthase mRNA in a murine macrophage cell line. J Leukoc Biol. 1996; 59: 840-6.
59. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell. 1992; 70: 705-7.
60. Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S. Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 273: 1008-14.
61. Pruett SB, Fan R, Zheng Q. Characterization of glucocorticoid receptor

translocation, cytoplasmic IkappaB, nuclear NFkappaB, and activation of NFkappaB in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. Int Immunopharmacol. 2003; 3: 1-16.

62. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science. 1994; 265: 956-9.

63. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. Biochim Biophys Acta. 2010; 1799: 775－87.

64. Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GB, Agarwal S, Aggarwal BB. Sanguinarine (Pseudochelerythrine) Is a Potent Inhibitor of NF-κB Activation, IκBα Phosphorylation, and Degradation. J. Biol. Chem. 1997; 272: 30129－34.

65. Jung WK, Lee DY, Park C, Choi YH, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Yea SS, Ahn SC, Lee CM, Park WS, Ko JH, Choi IW. Cilostazol is anti-inflammatory in BV2 microglial cells by inactivating nuclear factor-kappaB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. Br. J. Pharmacol. 2010; 159: 1274－85.

66. Zhang D, Liu R, Sun L, Huang C, Wang C, Zhang DM, Zhang TT, Du GH. Anti-inflammatory activity of methyl salicylate glycosides isolated from Gaultheria yunnanensis (Franch.) Rehder. Molecules. 2011; 16: 3875-84.

67. Zhang T, Sun L, Liu R, Zhang D, Lan X, Huang C, Xin W, Wang C, Zhang D, Du G. A Novel Naturally Occurring Salicylic Acid Analogue Acts as an Anti-Inflammatory Agent by Inhibiting Nuclear Factor-kappaB Activity in RAW264.7 Macrophages. Mol Pharm. 2012; 9: 671-7.

Ⅵ. 감사의 글

결코 쉽지 않았던 여정이었습니다. 하지만 저를 아껴주셨던 많은 분들의 손길과 마음길이 있었기에 박사 학위 논문이라는 결실을 맺게 되어 더할 나위 없이 감개무량합니다.

본 논문이 나오기까지, 체계적인 지도와 애정 어린 관심으로 이끌어 주신 유진철 지도교수님께 특별히 깊은 감사를 올립니다. 매 실험마다 세미나를 거쳐 많은 사실을 알 수 있도록 꼼꼼하게 지도해 주셨고, 어려움에 처할 때마다 응원으로 힘을 주셨습니다.

그리고 이 분야에 보다 넓고 깊은 안목을 길러주셨고, 바쁘신 가운데도 열성으로 제 논문을 심사해 주신 서재홍 총장님, 문경래 교수님, 이미자 교수님, 선문대학교 송재경 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

또한 학위 과정동안 열정적으로 지도해 주신 김종중 교수님, 박상학 교수님, 박종 교수님, 양남웅 교수님, 소금영 교수님, 홍란 교수님, 김복희 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 어려울 때마다 도움을 주셨던 약품 미생물학 실험실 최윤희 박사님, 최윤석님께도 많은 고마움을 전합니다.

제가 이 모든 분들의 은혜에 보답하는 길은 제 분야의 연구에 보다 더욱 매진하며, 나아가 습득한 지식을 토대로 지역사회에 봉사하는 일이라 생각합니다. 이를 항상 마음에 새기며 여생을 살아가겠다는 다짐을 하면서, 도움주신 이 모든 분들께 다시 한 번 충심으로 감사의 말씀을 올립니다.