

碩士學位論文

마우스 대식세포에서 갈근의
TNF α , IL-1 β , NF κ B 증가효과



濟州大學校 大學院

獸醫學科

梁元亨

2006年 6月

마우스 대식세포에서 갈근의 TNF α , IL-1 β , NF κ B 증가효과

指導教授 박 전 흥

梁 元 亨

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.



梁元亨의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (인)

委 員 _____ (인)

委 員 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2006年 6月

초 록

마우스 대식세포에서 갈근의 TNF α , IL-1 β , NF κ B 증가효과

(지도교수 : 박전홍)

양 원 형

제주대학교 대학원
수의학과

갈근 추출물은 면역조절 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 앞선 실험에서 갈근 추출물이 COS-1 세포에서 nuclear factor kappa B (NF κ B)와 activating protein-1 (AP-1)과 같은 항염증성 전사인자를 증가시키는 것을 관찰하였다. 본 연구에서는 갈근 추출물이 COS-1 세포와 마우스 대식세포인 RAW264.7에서 면역반응에 관여하는 tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 beta (IL-1 β)와 같은 사이토카인과 NF κ B, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO)를 증가시키는지 관찰하고자 하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용하여 사이토카인을 측정하였을 때 RAW264.7 세포에서 0.4 mg/ml 농도의 갈근 추출물은 TNF α 와 IL-1 β 를 증가시켰다 ($p < 0.001$). 갈근 추출물은 4 mg/ml 농도에서 COX-2를 4~5배 정도의 활성을 유도하며 0.4 mg/ml 농도에서 NF κ B의 활성을 4배정도 유도한다 ($p < 0.001$). 갈근 추출물은 RAW264.7 세포에서 Griess 반응에 의해 측정된 NO를 농도 의존적으로 증가시킨다. RAW264.7 세포에서 western blot 분석에 의한 COX-2와 iNOS의 발현도 증가한다. 이러한 결과들은 갈근 추출물이 TNF α 와 IL-1 β 같은 항염증성 사이토카인과 NF κ B, COX-2, iNOS, NO를 COS-1과 RAW264.7 세포에서 증가시키는 것을 나타낸다. 본 연구는 갈근 추출물이 IL-1 β , TNF α 의 증가를 유도하는 사실을 보고한 최초 연구이다.

중심어 : 갈근, TNF α , IL-1 β , NF κ B, COX-2

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료 및 방법		-----	3
III. 결	과	-----	5
IV. 고	찰	-----	11
V. 결	론	-----	12
VI. 참 고 문 헌		-----	13
영 문 초 록		-----	16



I. 서 론

갈근은 두통 및 편도선염의 치료, 관상동맥혈류와 뇌 혈류량을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (육, 1997, 이 등, 1998). 갈근 추출물에 의한 면역활성 증가 작용이 보고된 바 있으며 (이 등, 2004), 본 실험실에서는 여러 생약제제를 이용하여 항염증성 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF κ B), activating protein-1 (AP-1) 등의 유전자 발현을 스크리닝 하던 중 COS-1 세포에서 갈근이 NF κ B와 AP-1의 활성을 증가시키는 사실을 확인하였다 (이, 2003).

NF κ B는 세포질내에서 inhibitory kappa B (I κ B)와 결합되어 비활성화 상태로 존재하는 전사인자이다. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)와 tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 beta (IL-1 β) 등에 의해 I κ B가 인산화되어 NF κ B는 활성화된다. 활성화된 NF κ B는 염증, 분화, 종양형성에 관여하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 유전자의 발현을 유도한다 (Bharti 와 Aggarwal, 2002, Nakao 등 2002, Zingarelli 등 2003).

TNF α 는 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 주로 단핵포식세포에서 생산이 촉진되며, 그람 음성 세균과 다른 감염성 미생물에 의한 급성 염증반응의 주된 매개자다. TNF α 는 NF κ B와 AP-1의 활성화와 단핵포식세포에 작용하여 IL-1 β 의 분비를 자극한다. TNF α 와 유사하게 LPS에 의해 단핵포식세포에서 생성이 촉진된 IL-1 β 는 NF κ B와 AP-1 전사인자를 활성화시킨다 (강 등, 2004).

COX는 프로스타글란딘과 thromboxane 합성의 속도제한효소이다 (Smith 등, 1996). LPS와 염증성 사이토카인 등에 의해 합성이 유도되며, 염증세포와 중추신경계에서 프로스타글란딘 생합성에 주도적 역할을 한다 (Adams, 2001). COX-2는 IL-1 β , LPS, TNF α , phorbol ester, TPA에 의해 합성이 유도된다 (Inoue 등, 1995, Pilbeam 등, 1993, Jones 등, 1993, Nakao 등, 2000, Roshak 등, 1996).

Nitric oxide (NO)는 대부분 iNOS에 의하여 만들어지며, 생체 내 혈관확장, 신경 전달체제, 항균물질, 면역조절, 염증 반응 등에 작용한다. iNOS는 사이토카인의 자극을 받아 다량의 NO를 생산한다 (Katzung, 2001, Geller 와 Billiar, 1998).

본 연구에서 앞서 보고된 바 있는 갈근 물 추출물이 사람의 악성 간질세포인 SCC-13에서 NF κ B의 활성을 억제한다는 것과 갈근 물 추출물이 COS-1 세포에서 NF κ B의 활성을 증가시킨다는 NF κ B 활성화에 대한 갈근의 상반되는 작용이 세포주 차이에 의한 것인지를 확인하고 이 작용이 염증 및 면역반응에 관여하는지를 관찰하

고자 염증 및 면역반응에 관여하는 RAW264.7 세포를 사용하여 확인하였다 (송 등, 2004, 이, 2003). 갈근 추출물이 NFκB를 증가시키며, 항염증성 사이토카인을 증가시킨다고 가정하였으며, 이러한 가정을 확인하기 위해 사이토카인인 TNF-α, IL-1β와 NFκB 그리고, NFκB가 활성화시키는 COX-2, iNOS와 NO를 조사하였다.



II. 재료 및 방법

세포배양 : COS-1, RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (서울대학교, 서울)에서 구입하여 10% heat-inactivated FBS와 100 IU penicillin-streptomycin (Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's Medium으로 37℃에서 5% CO₂ 배양기로 배양하였다.

재료 : 갈근 물 추출물 (005;중국산, 006;한국산)은 한국식물추출물은행 (한국생명공학연구원, 대전)에서 구입하여 phosphate buffered saline에 녹여 200 mg/ml이 되도록 한 후 냉장보관하여 사용하였다. COX-2의 enhancer를 포함하는 pES2-luc는 Dr. David L. DeWitt (Michigan State University)로부터 제공받았다. NFκB의 enhancer를 포함하는 firefly luciferase reporter plasmid (pNFκB-luc) (Stratagene, USA), renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK 또는 pRL-CMV) (Promega, USA), TNFα와 TPA 시약 (Sigma, USA), anti-iNOS 항체와 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-COX-2 항체 (BD Biosciences, USA), TNFα와 IL-1β ELISA kit (Biosource, USA)는 구매하였다.

Transient transfection assay : 96well plate에 well당 2×10^4 개의 COS-1과 RAW264.7 세포를 넣은 후 37℃에서 5% CO₂배양기로 24시간 배양하였다. Well 당 50 μg 의 plasmid DNA 혼합물을 FuGENE 6 transfection reagent (Roche, USA)를 이용하여 transfection시켰다. Transfection 24시간 후 갈근 추출액을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 firefly와 renilla luciferase 활성을 측정하였다. 측정은 Dual-Glo Luciferase Activity kit (Promega, USA)를 이용하여 luminometer (Berthold, Germany)로 측정하였다.

NO 농도 측정 : Griess 반응으로 측정하였다 (Hevel 과 Marletta, 1994). 100μl 세포배양배지를 Griess 시약 (Sigma, USA) 100μl에 혼합한다. 실온에서 10분간 배양 후 microplate reader를 이용하여 흡광도를 550nm에서 측정한다. 시료를 처리하지 않은 세포배양배지를 음성대조군으로 사용한다. 시료에서 아질산염의 양은 아질산나트륨 표준곡선을 통해 측정한다.

Western Blot 분석 : 대조군 또는 갈근시료를 처리한 RAW264.7 세포로부터 세포 단백질을 추출한다. 세척된 세포 침전물을 lysis buffer로 재부유 후 4℃에서 60분간 배양한다. 단백질 농도를 정량하여 8~10% SDS-PAGE 후 polyvinylidene difluoride 막에 blotting한다. 5% 탈지분유로 1시간 blocking 한 후 1:1,000 희석된 anti-iNOS과 anti-COX2 항체를 4℃에서 밤새 반응시킨다. Tween20/Tris-buffered

saline (TTBS)로 세척 후 1 : 2,000 희석된 horseradish peroxidase 결합 2차 항체를 1시간 동안 실온에서 배양 후 TTBS로 세척한 후 화학발광 키트 (Amersham Life Science, USA)를 이용하여 관찰한다. Western blot 분석을 통해 얻어진 각 밴드의 밀도는 scanning laser densitometer (Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하여 β -actin에 대한 iNOS와 COX-2의 비율을 표시한다.

ELISA : 24well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^6 /well 되도록 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 같은 추출액을 농도별로 처리하여 24시간 배양 후 상층액을 수거하여 TNF α 와 IL-1 β 를 측정하였다. 450 nm에서 (Molecular Devices, USA) 흡광도를 측정하였다.

Data분석 : 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 1원 분산분석법과 Tukey-Kramer 다중검정법으로 유의성을 검증하였다.



Ⅲ. 결 과

갈근은 중국산(005), 한국산(006) 갈근 물 추출물 시료 모두에서 선천면역 및 염증을 매개하는 사이토카인인 TNF α 와 IL-1 β 를 증가시켰다 [Fig. 1, 2]. TNF α 의 경우 중국산 갈근 0.4, 4 mg/ml 처리군에서 각각 2009.43 \pm 36.08 ($p < 0.001$), 903.70 \pm 67.28 ($p < 0.01$)로 611.25 \pm 67.40인 대조군에 비해 증가되었으며, 한국산 갈근 동일 농도 처리군에서 각각 3885.99 \pm 104.84 ($p < 0.001$), 1014.11 \pm 44.59 ($p < 0.001$)로 611.25 \pm 67.40인 대조군에 비해 증가되었다. TNF α 는 0.4 mg/ml 농도에서 4 mg/ml 농도에 비해 높게 발현되었으며 ($p < 0.001$), 0.4 mg/ml 농도에서 한국산 갈근이 중국산 갈근에 비해 높은 증가가 관찰되었다 ($p < 0.001$) [Fig. 1].

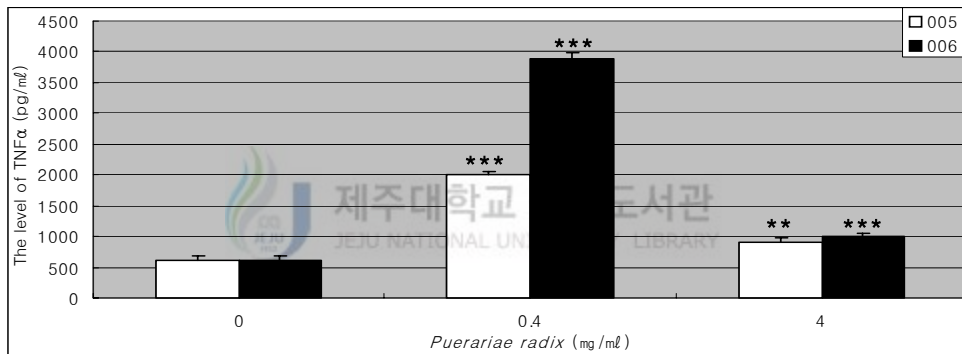


Fig. 1. Effect of *Puerariae radix* (PR) on level of TNF α in mouse macrophage RAW264.7 cell line. 005 (imported PR) and 006 (domestic PR) induced TNF α at dose of 0.4 and 4 mg/ml. Each bar represents mean \pm S.D. ** < 0.01 , *** < 0.001 as compared with the control group (0 mg/ml).

IL-1 β 의 경우 TNF α 와는 다르게 4 mg/ml 농도에서만 중국산 갈근은 4418.81 \pm 578.64 (p<0.001), 한국산 갈근은 1320 \pm 250.54 (p<0.01)로 대조군에 비해 증가되었다. IL-1 β 는 4 mg/ml 농도에서 0.4 mg/ml 농도에 비해 중국산 갈근 (p<0.001), 한국산 갈근 (p<0.01) 발현이 증가하였으며, 중국산 갈근이 한국산 갈근에 비해 4 mg/ml 농도에서 IL-1 β 가 높게 관찰되었다 (p<0.001) [Fig. 2].

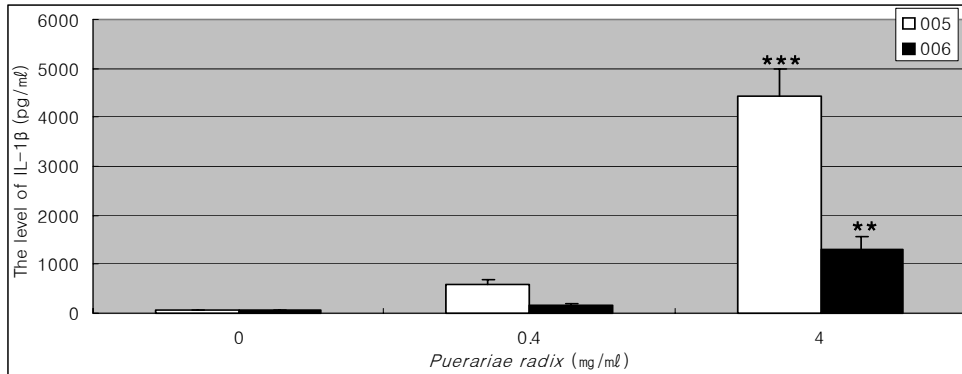


Fig. 2. Effect of *Puerariae radix* (PR) on level of IL-1 β in mouse macrophage RAW264.7 cell line. 005 (imported PR) and 006 (domestic PR) induced level of IL-1 β at dose of 4 mg/ml. Each bar represents mean \pm S.D. ** < 0.01, *** < 0.001 as compared with the control group (0 mg/ml).

중국산과 한국산 두 가지 갈근 시료의 모든 농도에서 NFκB의 유의적인 전사활성 증가가 관찰되었다 [Fig. 3]. 중국산 갈근 0.04, 0.4 및 4 mg/ml 처리군에서 각각 2.32 ± 0.39 ($p < 0.01$), 3.67 ± 0.32 ($p < 0.001$) 및 2.30 ± 0.20 ($p < 0.01$)로 1 ± 0.14 인 대조군에 비해 증가하였다. 한국산 갈근 0.04, 0.4 및 4 mg/ml 처리군에서 각각 2.01 ± 0.39 ($p < 0.05$), 3.63 ± 0.46 ($p < 0.001$) 및 3.48 ± 0.30 ($p < 0.01$)로 1 ± 0.14 인 대조군에 비해 증가하였다. 특히 두 가지 갈근 시료를 0.4 mg/ml 처리한 경우는 양성 대조군으로 사용한 LPS 처리군 ($1 \mu\text{g/ml}$)과 비슷한 정도의 전사활성이 관찰되었다. 4 mg/ml 농도에서 한국산 갈근이 중국산 갈근에 비해 전사활성이 높게 관찰되었다 ($p < 0.01$).

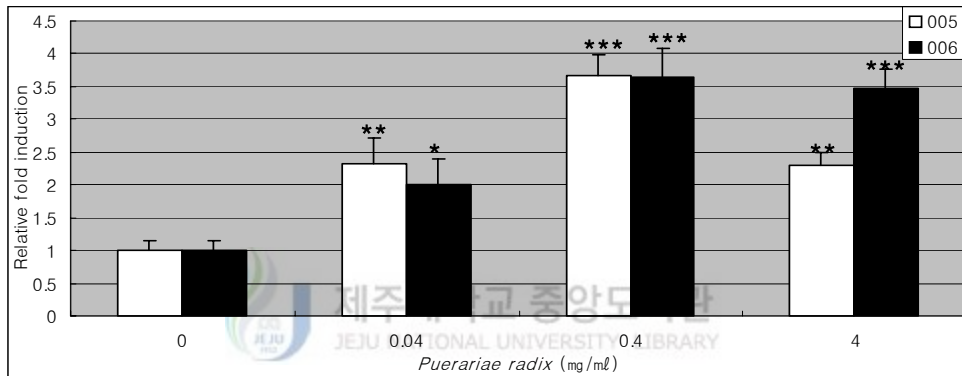


Fig. 3. Effect of *Puerariae radix* (PR) on transactivation of NFκB in mouse macrophage RAW264.7 cell line. 005 (imported PR) and 006 (domestic PR) induced transactivation of NFκB at dose of 0.04 - 4 mg/ml. Each bar represents mean \pm S.D. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 as compared with the control group (0 mg/ml).

중국산과 한국산 두 가지 갈근 시료 모든 농도에서 COX-2의 유의적인 전사활성이 관찰되었다 [Fig. 4]. 중국산 갈근 0.04, 0.4 및 4 mg/ml 처리군에서 각각 2.41 ± 0.27 ($p < 0.01$), 2.36 ± 0.06 ($p < 0.01$) 및 4.26 ± 0.72 ($p < 0.001$)로 1 ± 0.1 인 대조군에 비해 증가하였다. 한국산 갈근 0.04, 0.4 및 4mg/ml 처리군에서 각각 2.51 ± 0.13 ($p < 0.01$), 3.32 ± 0.08 ($p < 0.001$) 및 5.32 ± 0.54 ($p < 0.001$)로 1 ± 0.1 인 대조군에 비해 증가하였다. 두 가지 시료에서 농도의존적인 전사활성 증가가 관찰되며 4 mg/ml 농도는 다른 농도에 비해 활성이 유의적으로 높았다 ($p < 0.001$). 시료 종류에 따른 전사활성의 차이는 한국산 갈근이 중국산 갈근에 비해 0.4 mg/ml 농도에서 높게 관찰되었다 ($p < 0.001$). 한국산 갈근에 의한 iNOS와 COX-2의 발현과 NO는 농도의존적으로 증가하였다 [Fig. 5]. NO 생성도 농도 의존적으로 증가하였다 ($p < 0.001$) [Fig. 6]. LPS와 갈근 시료 (006)를 병용처리시 대조군인 LPS 처리군에 대해 NO의 생성 증가가 유의적으로 관찰되었다 ($p < 0.001$) [Fig. 7].

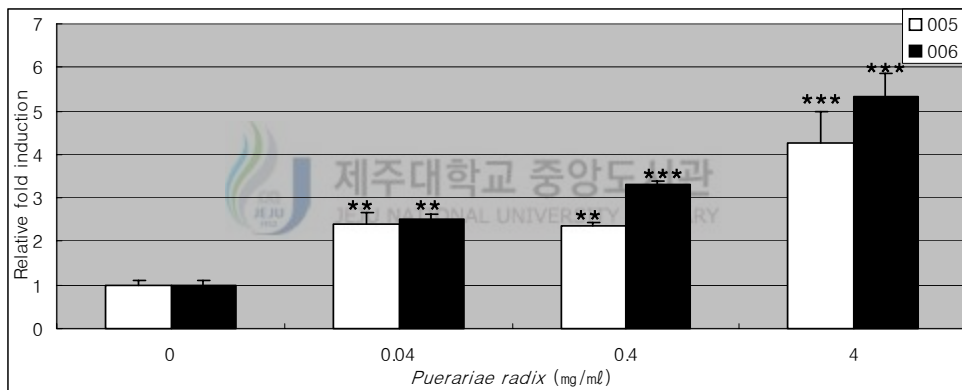


Fig. 4. Effect of *Puerariae radix* (PR) on transactivation of COX-2 in COS-1. 005 (imported PR) and 006 (domestic PR) induced transactivation of COX-2 at dose of 0.04 - 4 mg/ml in a dose-dependent manner. Each bar represents mean \pm S.D. ** < 0.01, *** < 0.001 as compared with the control group (0 mg/ml).

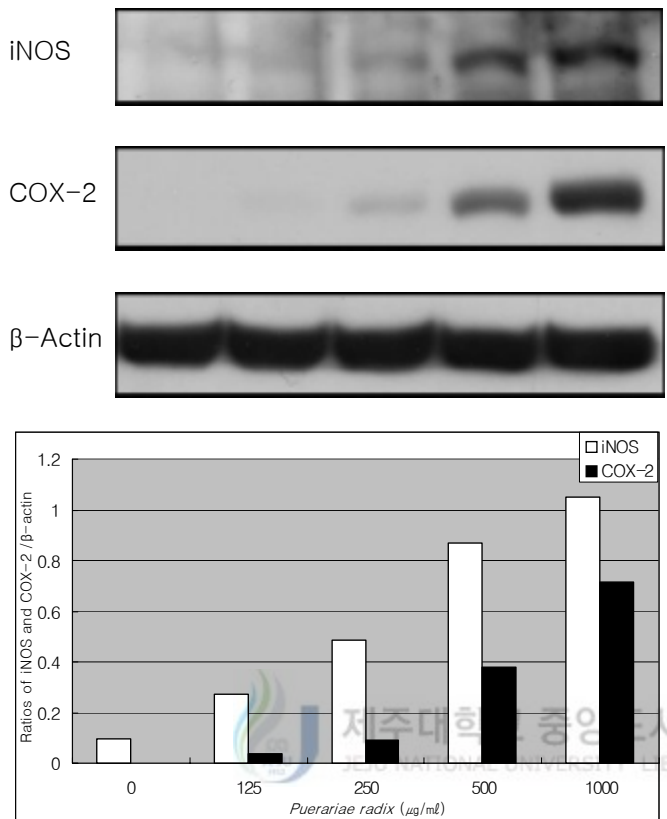


Fig. 5. The effect of *Puerariae radix* (PR) on the expression of iNOS and COX-2 proteins in mouse macrophage RAW264.7 cell line. PR induce activation of iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner.

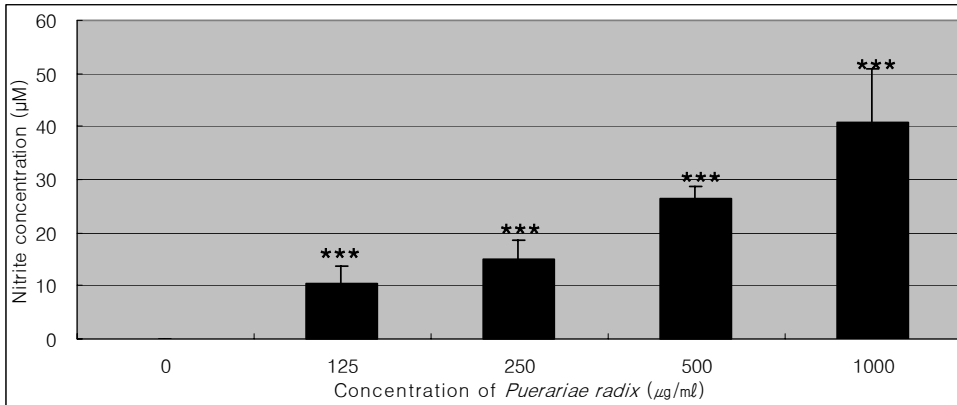


Fig. 6. *Puerariae radix* (PR) induces the production of NO in mouse macrophage RAW264.7 cells line in a dose-dependent manner. Each bar represents mean \pm S.D. *** $<$ 0.001 as compared with the control group (0 $\mu\text{g/ml}$).

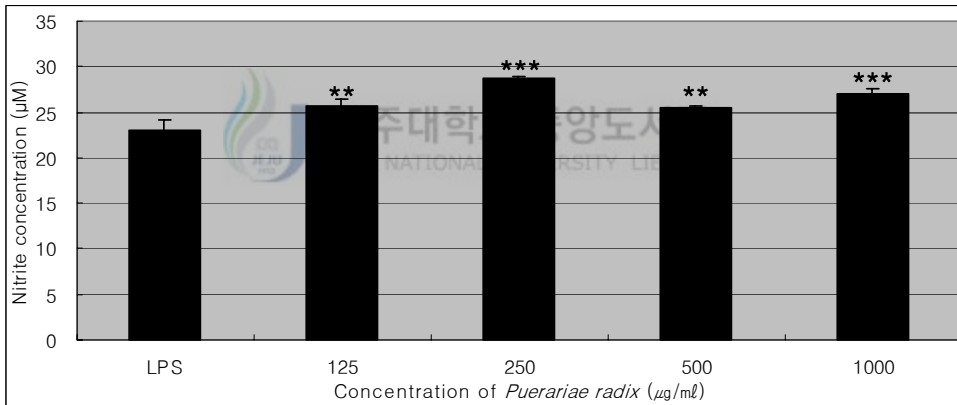


Fig. 7. *Puerariae radix* (PR) with LPS induces the production of NO in mouse macrophage RAW264.7 cells line. Each bar represents mean \pm S.D. ** $<$ 0.01, *** $<$ 0.001 as compared with the control group (LPS).

IV. 고찰

갈근 (*Puerariae radix*)은 다년생 덩굴성 목본으로 콩과에 속하는 쑥 (*Pueraria lobata* Ohwi) 뿌리의 겉껍질을 벗겨낸 것을 말한다. 쑥은 온열대에서 자라는 다년생 덩굴나무로 *Pueraria lobata* (*P. thunbergiana*), *P. thomsanii*, *P. omeinsis*, *P. phaseoloides*, *P. mirifica* 등으로 분류되며, 일본, 대만, 중국, 우리나라 전역에 야생한다 (Tsumura, 1991, 육, 1997, 정과 신, 2003, 보건사회부, 1987). 갈근의 주요 성분과 약리학적 효과와 작용기전이 연구되고 있다. 몇 가지 연구 결과를 살펴보면, 갈근 물 추출물 0.1 mg/ml 은 사람의 악성 각질세포인 SCC-13에서 NFκB의 활성을 억제한다 (송 등, 2004). 이는 COS-1 세포에서 갈근 물 추출물이 0.4 mg/ml 농도에서 NFκB를 증가시킨다는 보고와는 상반된다 (이, 2003). 갈근 에탄올 추출물은 20 μg/ml 농도에서 염증성 사이토카인 IL-1, TNFα, interferon-γ 또는 LPS를 전 처리한 골수 유래 비만세포에서 COX-2의 활성과 NO의 생성을 억제하였다 (김 등, 2006). 그리고, 갈근의 열수 추출물이 2.5 mg/kg 농도에서 종양전이를 억제하며, 100 μg/ml 농도에서 골수세포의 증식활성을 증가시켜 면역활성을 증가시켰다 (이 등, 2004).

TNFα와 IL-1β 같은 사이토카인은 LPS에 의해 증가되며 증가된 사이토카인은 NFκB의 활성을 유도하며 NFκB의 활성에 의해 COX-2와 iNOS 및 NO의 생성이 증가된다. 또한 NFκB의 활성은 적응면역반응에 관여하는 IL-2의 mRNA 발현을 증가시키기도 한다. 사이토카인은 적응면역반응의 활성화 단계에서 림프구의 성장과 분화를 자극하며 선천면역반응에서 대식세포를 활성화하여 염증반응에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질이다. TNFα와 IL-1β는 주로 선천면역반응에 관여하는 사이토카인이다 (강 등, 2004).

본 연구에서는 갈근 물 추출물을 RAW264.7 세포에 처리한 것과 에탄올 추출물을 COS-1 세포에 처리한 것에 의한 COX-2 활성과 NO 생성억제에 관한 보고에 대해 상반되는 결과가 관찰된 것은 사용한 추출물의 차이에 의한 것으로 생각되어지며, NFκB에 대한 상반되는 결과는 사용한 세포주의 차이에 의한 것으로 생각되어진다. 갈근 추출물에 의해 사이토카인인 TNFα와 IL-1β의 증가와 NFκB, COX-2의 발현 증가, NO의 생성 증가를 관찰하였다. 갈근 추출물이 면역활성을 증가시킨다는 보고 (이 등, 2004)와 본 실험에서 관찰된 증가된 항목인 TNFα, IL-1β, NFκB가 면역반응에 작용하는 것을 생각해보면 갈근 추출물이 면역반응 조절에 관여하는 것으로 생각되며, 갈근 추출물이 면역반응 조절에 관여하는 것이 TNFα와 IL-1β의 증가에 의한 것인지를 확인하기 위해 추가적인 실험이 필요하다.

V. 결 론

본 실험을 통하여 갈근의 물 추출물이 RAW264.7 세포에서 사이토카인 TNF α , IL-1 β 증가와 NF κ B의 활성을 증가시키는 것을 확인하였으며, TNF α , IL-1 β 와 NF κ B, COX-2에서 중국산과 한국산 갈근의 차이가 관찰되었다.



VI. 참고문헌

강재성, 김광혁, 김문규, 김희선, 박문향, 박세광, 박영민, 박장환, 박정규, 박종욱, 박주영, 백태현, 서수영, 손정원, 송강원, 송용상, 송호연, 신성희, 유영춘, 윤용달, 윤현수, 이광호, 이창주, 이현구, 이현철, 정상인, 정현택, 최태생, 하운문, 한훈, 2004, 세포분자면역학 5판, 범문사, 서울, pp.183, 247-254.

김시나, 김희석, 남경숙, 황성완, 황성연, 2006, 갈근 추출물에 의한 염증성 Cytokine 생성 억제 및 Prostaglandin E₂ 활성 저해에 관한 연구. 한국식품영양과학회지, 35(1) 28~34.

보건사회부, 1987, 대한약전 제5개정, 한국메디칼인텍스사, 서울, p.813.

송희순, 박연희, 김승균, 문원국, 김동우, 문기영, 2004, 겨우살이(*Viscum album*)와 칩뿌리(*Pueraria radix*) 추출물의 NF- κ B활성 억제 및 항산화 효과. 한국식품영양과학회지, 33(10) 1594~1600.

정보섭, 신민교, 2003, 향약(생약)대사전, 영림사, 서울, pp.704-705.

육창수, 1997, 생약도감, 경원, 서울, p.290.

이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희, 1998, 한약임상응용, 전통의학연구소, 서울, pp.62~63.

이국경, 2003, Luciferase gene expression bioassay 및 gene expression 데이터베이스를 이용한 대체시험법의 개발 (I), 식품의약품안전청.

이창호, 김인호, 김연연, 김용조, 황종현, 유광원, 2004, 한국식품영양과학회지, 33(4) 626~632.

Adams, H. R. 2001, Veterinary pharmacology and therapeutics, Iowa state university press, Iowa, pp.422.

Bharti, A. C., Aggarwal, B. B. 2002, Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, 64(5~6) 883~888.

Geller, D. A. and Billiar, T. R. 1998, Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*, 17(1) 7~23.

Hevel, J. M. and Marletta, M. A. 1994, Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol*, 233 250~258.

Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y. and Tanabe, T. 1995, Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem*, 270(42) 24965~24971.

Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. and Prescott, S. M. 1993, Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 268(12) 9049~9054.

Katzung, B. G. 2001, Basic & Clinical Pharmacology, McGraw-Hill, New York, pp. 326~331.

Nakao, S., Ogata, Y., Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S. and Sugiya, H. 2000, Activation of NFkappaB is necessary for IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 209 113~118.

Nakao, S., Ogtata, Y., Shimizu, E., Yamazaki, M., Furuyama, S. and Sugiya, H. 2002, Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 238 11~18.

Pilbeam, C. C., Kawaguchi, H., Hakeda, Y., Voznesensky, O., Alander, C. B. and Raisz, L. G. 1993, Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*, 268(34) 25643~25649.

Roshak, A. K., Jackson, J. R., McGough, K., Chabot-Fletcher, M., Mochan, E. and Marshall, L. A. 1996, Manipulation of distinct NFkappaB proteins alters interleukin-1beta-induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation. 271(49) 31496~31501.

Smith, W. L., Garavito, R. M. and DeWitt, D. L. 1996, Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271(52) 33157~33160.

Tsumura, A. 1991, Kampo, Japan Publications, Tokyo, p.137.

Zingarelli, B., Sheehan, M. and Wong, H. R. 2003, Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*, 31(1) 105~111.



Puerariae radix increased TNF α , IL-1 β and NF κ B in mouse macrophage cells

I. Abstract

Puerariae radix extracts (PR) is known to have immunomodulatory effect. Previously we observed PR induced the pro-inflammatory transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF κ B) and activating protein-1 (AP-1) in African green monkey kidney cells (COS-1). This study aims to investigate whether PR increases cytokines, NF κ B, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nitric oxide (NO) in COS-1 and mouse macrophage cells (RAW264.7). PR, at a concentration of 0.4 mg/ml, increased the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) assayed by enzyme-linked immunosorbent assay in RAW 264.7 cells ($p < 0.001$). PR induced the activation of COX-2 by four or five folds at 4 mg/ml, and of NF κ B four times at 0.4 mg/ml ($p < 0.001$), respectively. PR increased NO measured by Griess reaction in RAW264.7 cells in a dose-dependent manner. The expressions of COX-2 and iNOS in RAW264.7 cell are increased by western blot analysis. These data indicate that PR increased the proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α , NF κ B, COX-2, iNOS, and NO in COS-1 and RAW264.7 cells. Based of our knowledge, this paper is the first study presenting PR induces the increasing of IL-1 β and TNF α .

Keyworlds : *Puerariae radix*, IL-1 β , TNF α , NF κ B, COX-2

감사의 글

2006년 한해도 어느덧 절반이라는 시간이 흘렀습니다.

수의학과를 졸업하고 석사과정에 입문하여 이제 작은 결실을 이루었습니다. 저를 학문의 길로 인도해 주셨고 항상 격려와 조언을 주시다 고인이 되신 이국경 교수님께 깊은 감사를 드리며, 지난여름 갑작스러운 일 이후에 지도교수님이 되셔서 저를 이끌어 주시고 학문적으로 많은 가르침을 주신 박전홍 교수님께 감사드립니다. 그리고 본 논문을 정성껏 다듬어 주시고 심사해주신 이영재 교수님과 주홍구 교수님께도 고개 숙여 감사드립니다.

지난 1996년에 수의학과에 입학하여 수의학이란 학문을 접하기 시작하여 지금까지 저에게 많은 가르침을 주셨던 김희석 교수님, 배종희 교수님, 신태균 교수님, 이경갑 교수님, 임윤규 교수님, 이두식 교수님, 정종태 교수님, 우호춘 교수님, 손원근 교수님, 지영훈 교수님, 이주명 교수님, 강태영 교수님, 윤영민 교수님, 김재훈 교수님, 황규계 교수님, 박현정 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

대학원 생활을 도와준 실험실 식구들인 창복, 성, 태웅이와 같이 대학원 생활을 하며 많은 도움을 주었던 현호, 보람, 미형, 민희, 지영에게 감사드립니다.

마지막으로 지금까지 아낌없는 사랑으로 키워주신 부모님과 지금까지 많은 조언과 보살핌을 주신 형과 언제나 힘이 되준 막내 동생에게 감사를 드립니다.

2006년 7월
양 원 형