

# 三白草가 腹腔 大食細胞로부터 Nitric Oxide(NO)遊離機轉에 대한 研究

전길환·신민교·송호준\*

## ABSTRACT

### Studies on the mechanism of Nitric oxide (NO) induction in the Peritoneal Macrophage by HERBA SAURUI (HS)

Jeon Gil Hwan, Shin Min Kyo, Song Ho Joon\*

\*Oriental Medicine of Won Kwang University

HERBA SAURURI (HS) has been known to use antiinflammatory drug. To investigated the mechanism of HS-induced NO synthesis, I evaluated the ability of protein kinase C (PKC) inhibitors such as staurosporine (STSN) or polymyxin B to block HS-induced effects. HS alone had only a small effect, whereas in combination with rIFN- $\gamma$  markedly increased NO synthesis in a dose dependent manner. STSN and polymyxin B decreased NO synthesis, which had been induced by rIFN- $\gamma$  plus HS. Furthermore, prolonged incubation of the cells with phorbol ester, which down-regulates PKC activity abolished synergistic cooperative effect of HS with rIFN- $\gamma$  on NO synthesis. STSN and Polymyxin B potently inhibited HS-induced TNF- $\alpha$  secretion by rIFN- $\gamma$  plus HS. However, rIFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$ -induced NO synthesis was not blocked by STSN or polymyxin B. On the other hand, tyrosine kinase inhibitor, genistein, blocked the NO synthesis and TNF- $\alpha$  secretion by rIFN- $\gamma$  plus HS. In conclusion, the present results strongly suggest that the capacity of HS to increase NO synthesis from rIFN- $\gamma$ -primed macrophages is the result of HS-induced TNF- $\alpha$  secretion via the signal transduction pathway of PKC and tyrosine kinase.

\* 원광대학교 한의과대학

## I. 緒論

三白草 *Saururus chinensis* (LOUR.) Baill.는 三白草科 (Saururaceae)에 속한 多年生草本<sup>1-30)</sup>인 三白草의 帶根全草이다.

이 약은 唐代·蘇敬<sup>31)</sup> 등<sup>1-30)</sup>의 《唐本草 (新修本草): AD. 659》草部 下品 下卷 第十一에 “三白草,味甘·辛,寒,有小毒.主水腫,脚氣,利大小便,消痰破癰,除積聚,消疔腫.生池澤畔.”이라 收載된 이래, 唐代·陳藏器<sup>31)</sup>의 《本草拾遺: AD. 739》에 “搗絞汁服,令人吐逆,除胸膈熱痰,亦主瘡及小兒痞滿.”이라 한 것을 비롯하여, 明代·李時珍<sup>8)</sup>이 《本草綱目: AD. 1590-1596》에서 이를 인용하면서 “療脚氣風毒脛腫,搗酒服,亦甚有驗.又煎湯,洗癬瘡.”이라고 하였으며, 그 이후에 더욱 발전되어 “味苦·辛,寒無毒,入肝·腎經.清利濕熱,消腫,解毒 등의 效能으로 水腫,脚氣浮腫,黃疸,淋濁,帶下,癰腫,疥癬 등의 病증을 다스린다”<sup>16,31)</sup>고 하였다.以後 現今까지 전해져 내려오고 있으나 臨床에서 널리 활용되지 못하다가 최근에 접어들어 肝癌과 泌尿器系의 癌病<sup>32,38)</sup>에 응용할 수 있는 것으로 조사되었다.

成分으로는 帶根全草에 精油가 함유되어 있으며, 그 主成分은 methyl-n-nonyl-ketone이다. 또 줄기에는 加水分解性 tannin 1.72%가 함유되었고 잎에는 quer-cetin, quercitrin, isoquercitrin, avicularin, hyperin, rutin, 및 加水分解性 tannin 0.544%가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>15,16,18,19,36,37)</sup>

三白草에 대한 藥理學的인 研究보고로는 利尿, 鎮咳消炎, 血糖下降, 血小板凝集抑制 작용이 있음이 밝혀져있고<sup>38,40)</sup>, 또한 황색포도상구균, 장티푸스균 (*salmonella typhi*)의 성장을 억제하는 작용이 보고되어 있다.<sup>39)</sup>

이에 저자는 三白草의 主治症中 疔毒, 黃疸, 癰腫, 小便不利, 淋瀝澀痛, 帶下, 水腫, 脚氣등의

병증에 응용되는 점등이 抗炎症과 관련이 있는 것으로 생각된다.

그러므로 三白草는 抗炎症에 대한 效果와 臨床에서 抗癌에 대한 治療效果가 있어<sup>32)</sup> 三白草의 帶根全草, 줄기, 잎으로 구분하여 腹腔 大食細胞에 처리하였을 때, 癌細胞 및 박테리아를 殺滅하는 역할을 할 수 있는 nitric oxide (NO)의 생성과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )유리량에 대하여 실험한 결과를 다음과 같이 보고하는 바이다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 材料

#### (1) 試藥

본 연구에 사용한 murine rIFN- $\gamma$  ( $1 \times 10^5$  U/mg), murine rTNF- $\alpha$  ( $1 \times 10^5$  U/ml), rabbit anti-murine TNF- $\alpha$  polyclonal Ab (neutralizing) 와 hamster anti-murine TNF- $\alpha$  mAb는 Genzyme (Munich, Germany)에서 구입하였으며, phosphatase-labeled anti-rabbit IgG (heavy + light)는 Serotec (Oxford, UK)에서 구입하였다. *Escherichia coli*로부터 얻은 LPS (lipopolysaccharide), staurosporine (STS), phorbol-myristate-acetate (PMA), polymyxin B, N-(1-naphthyl)-ethyl-enediamine dihydrochloride, sodium nitrite와 sulfanilamide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 배지와 시약은 colorimetric *Lunulus* amoebocyte lysate assay (detection limit 10 pg/ml; Whittaker Bioproducts, Walkerville, MD)을 사용하여 LPS양을 조사하였다. 96 well tissue culture plate와 100-mm diameter petri dishes는 Nunc (Naperville, IL)에서 구입하였다. DMEM, HBSS, FCS와 다른 조직 배양 시약은 Life Technologies GIBCO BRL (Gaitheersburg, MD)에서 구입하였다.

## (2) 實驗動物

C57BL/6 마우스는 대한실험동물센터 (충북 음성)에서 구입하여 원광대학교 한의과 대학 본 초학교실에서 사육하였다. 복강 대식세포배양을 위하여 마우스는 8주령에서 12주령 된것을 사용하였다.

## 2. 方法

### (1) 試料의 製造

三白草는 제주도에서 재배한 것을 구입하였으며 帶根全草, 줄기, 잎 각각 600g씩을 세절하여 5000 ml 둥근 플라스크에 넣고 증류수 3000 ml와 함께 2 시간 동안 가열하여 여과후에 rotary vaccum evaporator에서 200 ml 감압농축한 다음농축된 시료를 동결건조하여 최종 18g을 얻었다. 이상의 시료를 실험직전에 생리 식염수에 필요한 농도별로 용해하여 사용하였다.

### (2) 腹腔 大食細胞 培養

8-12주령 마우스에 2.5 ml TG (thioglycollate)를 腹腔에 넣고 3일후에 腹腔內 大食細胞를 분리하였다<sup>45)</sup>. 腹腔內를 10 U/ml heparin이 들어있는 HBSS 8 ml로 세척하였다. 細胞를 96-well tissue culture plate (2 x 10<sup>5</sup> cells/well)에 10% (v/v) FCS가 들어있는 DMEM배지로 배양하였고, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 3시간 동안 배양한 후에 plate에 붙지 않는 細胞를 제거하기 위하여 HBSS로 세번 세척한후 10% (v/v) FCS가 들어있는 DMEM으로 배양하였다.

### (3) Nitrite 농도 측정

細胞 배양시 NO생성은 microplate assay 방법으로 측정하였다<sup>46)</sup>. nitrite를 측정하기 위하여, 배지에서 100- $\mu$ l 취하여 동량의 Griess 시

약 (1% sulfanilamide/ 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 넣고 10분간 실온에서 배양한 후에, Titertek Multiskan (Flow Laboratories, North Ryde, Australia)을 이용하여 540 nm 파장에서 측정하였으며. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>농도는 sodium nitrite를 사용하여 결정하였다. 細胞가 없는 배지도 5-8  $\mu$ M의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>을 포함하고 있어서 각 실험마다 환산해서 처리했다.

### (4) TNF- $\alpha$ 분비 측정

TNF- $\alpha$  분비의 측정은 ELISA를 변형하여 측정했다<sup>47)</sup>. 이 방법은 배지내 TNF농도가 40 pg/ml 이상에서 측정 할 수 있다. 먼저 96-well plate에 human TNF- $\alpha$ 에 특이성을 갖는 murine mAb 6.25 ng/ml을 coating하였다. 이 방법에서 각각의 과정중이나 과정사이에 0.05% Tween 20이 들어있는 PBS (PBS-Tween)나 PBS만으로 2번 세척하였다. coating한후에 well에 사용한 모든 시약은 실온에서 1시간 동안 배양하였다. standard curve작성을 위하여 rTNF- $\alpha$ 를 serum에넣고 세포내에서 유리된 TNF- $\alpha$ 와 비교하였으며, 배지에 넣은 후에 assay plate를 순차적으로 rabbit anti-TNF- $\alpha$ , phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 2,2'-azinobis을 넣었다. 기질을 넣고 10분 후에 Titertek Multiskan을 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## III. 實驗 結果

### 1. rIFN- $\gamma$ 와 三白草 帶根全草·줄기·잎에 의해 유도된 NO생성의 영향

먼저 三白草의 신호전달기전을 규명하기 위하여, 마우스 腹腔 大食細胞에서 삼백초가 NO생성을 유도 할 수 있는가를 조사하였다. 마우스 腹腔 大食細胞는 priming과 triggering 신호를

보내는데 시간 격차가 중요하기 때문에 rIFN- $\gamma$  (5 U/ml)를 처리 6시간 후에 三白草의 帶根全草· 줄기· 잎을 처리하였다. 腹腔 大食細胞를 배지 단독 또는 rIFN- $\gamma$  (5 U/ml)가 들어있는 배지로 6시간 배양한후에 腹腔 大食細胞에 각각, 三白草의 帶根全草· 줄기· 잎, LPS를 처리하고 42시간 배양한 후에 NO유리를 Griess (nitrite)방법을 이용하여 측정하였다.

Figure 1에서 보는바와 같이 三白草 帶根全草는 소량의 NO생성을 유도할수 있지만, 三白草 帶根全草와 rIFN- $\gamma$ 를 처리하면 배양 大食細胞에서 현저하게 많은 양의 NO를 생성한다. rIFN- $\gamma$  존재하에 NO생성에 대한 三白草 帶根全草의 용량의존적인 효과를 알아보기 위하여 三白草 帶根全草를 용량별로 처리하였다 (Figure 2).

三白草의 줄기는 단독으로 소량의 NO생성을 유도할 수 있었다. 그러나 三白草 줄기와 rIFN- $\gamma$ 를 처리하게 되면, 三白草 帶根全草와 rIFN- $\gamma$ 를 처리 할때보다 현저하게 많은 양의 NO생성을 유도 할수 있었다 (Figure 1). 또한, rIFN- $\gamma$  존재하에 NO생성에 대한 三白草 줄기의 용량의존적인 효과를 알아보기 위하여 三白草 줄기를 용량별로 처리하였다 (Figure 2). 三白草의 잎의 효과에 대한 실험을 수행하였을때 三白草 잎에서는 단독 또는 rIFN- $\gamma$  존재하에 三白草 잎을 처리하였을때에도 소량의 NO만 생성되었다 (Figure 1). 또한 용량의존적인 실험에서도 三白草 잎은 소량의 NO생성만 유도하였다 (Figure 2).

## 2. 三白草 帶根全草· 줄기의 protein kinase C (PKC) 활성화에 미치는 영향

三白草의 帶根全草와 줄기에 의해 유도되는 신호가 PKC활성화와 연관성이 있는가를 조사하기 위하여, STSN 또는 polymyxin B와같은 PKC활성 조절자의 효과를 조사하였다<sup>48)</sup>. rIFN-

$\gamma$ 을 처리한 大食細胞에 STSN 또는 polymyxin B를 처리하면 NO생성에 대한 三白草의 帶根全草와 줄기에 대한 효과가 감소한다. 하지만 rIFN- $\gamma$ 만 처리한 군에서는 NO생성에 대한 감소는 미비하였다 (Table I·II). 더욱이, rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草 및 줄기를 처리하기 6시간 전에 PMA를 처리하면 NO생성에 대한 rIFN- $\gamma$ 와 三白草 帶根全草 및 줄기의 상승적인 효과가 없었다 (Figure 3A·3B). 세포에 phorbol ester를 장시간 처리하면 수 시간 동안 PKC효소의 활성이 감소된다는 사실<sup>49)</sup>은 잘 알려져 있기 때문에 이런 현상은 PKC down-regulation에 의해서 야기 되어질 것이다.

## 3. 三白草 줄기와 帶根全草에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리와 PKC와의 관계

NO생성과 TNF- $\alpha$ 유리와와의 상관관계를 조사한 결과, Figure 4A·4B에서 보는바와 같이 三白草의 帶根全草와 줄기에서 유도되는 NO생성은 anti-murine TNF- $\alpha$ -neutralizing Abs에 의해 점진적으로 감소하고있다. 위의 결과는 腹腔 大食細胞에서 三白草 帶根全草와 줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리가 NO생성을 유도하는데 중요하다는 것을 의미한다.

## 4. 三白草 줄기와 帶根全草에 의한 TNF- $\alpha$ 와 PKC의 상관성에 대한 영향

三白草의 帶根全草와 줄기에 의한 신호전달에 PKC가 관여하는지를 조사하기 위하여, 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리가 STSN 또는 polymyxin B에 의해 억제되는가를 조사하였다. 腹腔 大食細胞를 배지 단독 또는 STSN 또는 polymyxin B가 들어있는 배지로 6시간 배양한후에, 三白草의 帶根全草 또는 줄기를 처리하고 6시간 또는 18시간 배양하였다. STSN (200 nM) 또는 polymyxin B

(100 U/ml) 처리시에 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리가 현저하게 억제되었다 (Table III).

### 5. rIFN- $\gamma$ 와 rTNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 NO 생성에 대한 영향

PKC 억제제가 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 NO생성을 억제할 수 있는가를 조사하였다. 그 결과 STSN 또는 polymyxin B가 rIFN- $\gamma$ 와 rTNF- $\alpha$  (1000 U/ml)에 의해 유도되는 NO생성을 억제하지 못한 반면에, rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도되는 NO생성은 억제하였다 (Figure 5A·5B). 위의 결과는 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도되는 PKC활성화는 腹腔 大食細胞에서 TNF- $\alpha$ 유리에 제한된다는 것을 의미한다.

### 6. 三白草의 帶根全草 또는 줄기와 tyrosine kinase와의 상관성.

三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도된 PKC활성화가 tyrosine kinase 인산화를 유도할 수 있는가를 조사하기 위하여, tyrosine kinase 억제제인 genistein (10  $\mu$ M)을 전처리하고, 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 대한 NO생성 효과를 조사하였다. genistein을 처리하고 IFN- $\gamma$ 를 처리한후 6시간후에 三白草의 帶根全草 또는 줄기를 처리하고 42시간후에 NO생성을 측정하였다. rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도되는 NO생성은 genistein에 의해 현저하게 억제되었으나 (Figure 6A·6B), rIFN- $\gamma$ 에 의해 유도되는 NO생성은 미비하게 억제되었다.

NO생성에 대한 IFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草·줄기의 상호 상승적인 효과는 腹腔 大食細胞에서 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$  분비에 의존하기 때문에, genis-

tein이 복강 대식세포에서 三白草의 帶根全草 또는 줄기에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$  분비에 영향을 미칠것으로 생각한다. Table IV에서 보는 바와 같이 genistein이 현저하게 TNF- $\alpha$  분비량을 억제하였다.

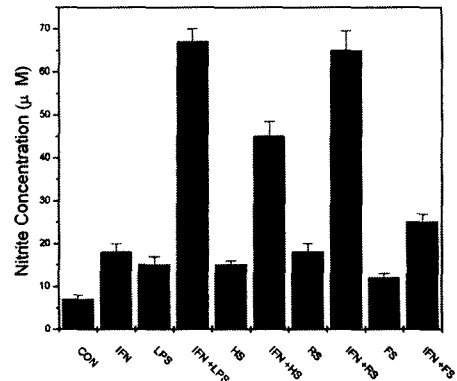


Figure 1. Effects of HS, RS, or FS on the induction of NO synthesis in murine peritoneal macrophages. Effect of HERBA SAURUI (HS:10  $\mu$ g/ml), RAMULUS SAURUI (RS:10  $\mu$ g/ml), FOLIUM SAURUI (FS:10  $\mu$ g/ml), or LPS (10 ng/ml) on NO synthesis in rIFN- $\gamma$ -treated macrophages. TG-elicited macrophages ( $2 \times 10^5$ ) were cultured with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml). The cells were then stimulated with HS, RS, FS, or LPS at 6 h after incubation. After 48 h of culture, NO release was measured by the method of Griess (nitrite). Values are the means  $\pm$ SD of three experiments.

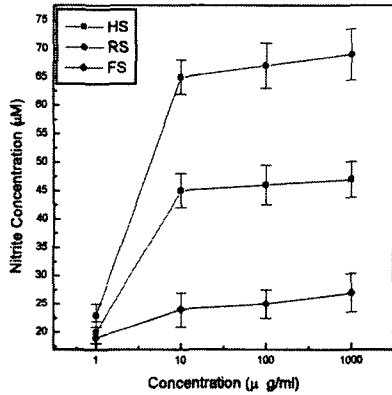


Figure 2. Dose-dependent effects of HS, RS, or FS on the induction of NO synthesis in rIFN- $\gamma$ -treated macrophages (5 U/ml). After 48 h of culture, NO release was measured by the method of Griess (nitrite). Values are the means  $\pm$  SD of three experiments.

Table I. Effects of STSN or polymyxin B on the production of NO by rIFN- $\gamma$  plus HS - simulated murine peritoneal macrophages.

Treatment	substances		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> secretion ( $\mu$ M)
	STSN	Polymyxin B	
None	-	-	< 5
rIFN - $\gamma$	-	-	19 $\pm$ 3.6
	+	-	17 $\pm$ 1.2
	-	+	19 $\pm$ 1.1
rIFN - $\gamma$ plus HS	-	-	42 $\pm$ 5.8
	+	-	35 $\pm$ 3.5*
	-	+	25 $\pm$ 4.2*

TG-elicited macrophages were cultured for 6h with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml) in the presence (+) or

absence (-) of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml). The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> released by macrophages was measured after 48 h of incubation. Values are means  $\pm$ SD of three experiments.

\*p<0.05: significantly different from the control.

Table II. Effects of STSN or polymyxin B on the production of NO by rIFN- $\gamma$  plus RS-simulated murine peritoneal macrophages.

Treatment	substances		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> secretion ( $\mu$ M)
	STSN	Polymyxin B	
None	-	-	< 5
rIFN - $\gamma$	-	-	19 $\pm$ 3.6
	+	-	17 $\pm$ 1.2
	-	+	19 $\pm$ 1.1
rIFN - $\gamma$ plus RS	-	-	65 $\pm$ 6.8
	+	-	40 $\pm$ 6.7*
	-	+	35 $\pm$ 5.5*

TG-elicited macrophages were cultured for 6 h with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml) in the presence (+) or absence (-) of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml). The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> released by macrophages was measured after 48 h of incubation. Values are means  $\pm$ SD of three experiments.

\*p<0.05: significantly different from the control

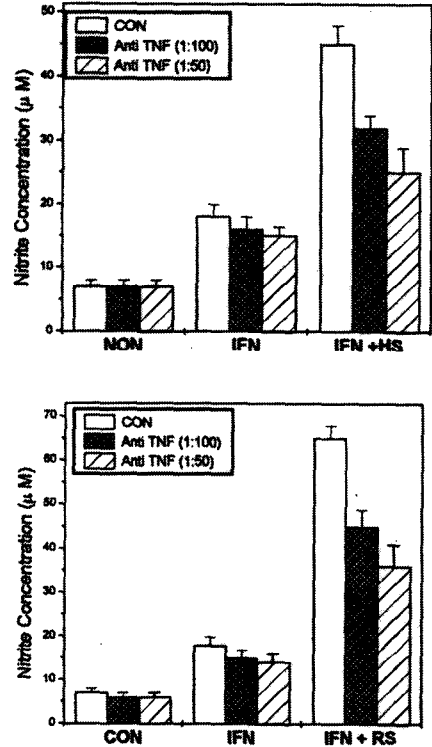
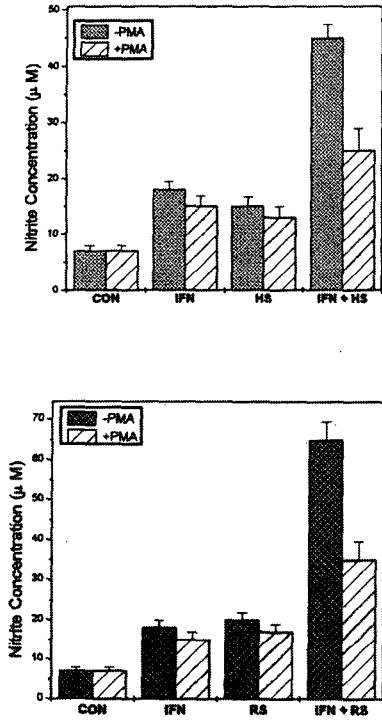


Figure 3. Effects of down-regulation of PKC on the synergistic cooperation between rIFN- $\gamma$  and HS or RS for the synthesis of NO from murine peritoneal macrophages. TG-elicited macrophages ( $2 \times 10^5$ ) were cultured 6 h without or with PMA (200 nM). A, Then, the cells were washed twice and stimulated with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml), HS (10  $\mu$ g/ml) or rIFN- $\gamma$  plus HS. B, the cells were washed twice and stimulated with rIFN- $\gamma$ , RS (10  $\mu$ g/ml) or rIFN- $\gamma$  plus RS. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> released was measured after 48 h of incubation. Values are the means  $\pm$  SD of three experiments.

Figure 4. Effects of anti-TNF- $\alpha$  neutralizing Abs on rIFN- $\gamma$  or rIFN- $\gamma$  plus HS or rIFN- $\gamma$  plus RS - induced NO synthesis in murine peritoneal macrophages. A, TG-elicited murine peritoneal macrophages were stimulated with rIFN- $\gamma$  plus HS ; the cells were then treated with anti - TNF -  $\alpha$  neutralizing Abs (dilution , 1:100 and 1:50). B, TG-elicited murine peritoneal macrophages were stimulated with rIFN- $\gamma$  plus RS ; the cells were then treated with anti - TNF -  $\alpha$  neutralizing Abs (dilution , 1:100 and 1:50).After 48 h of culture, NO release was measured by the method of Griess (nitrite). Values are the means  $\pm$  SD of three experiments.

Table III. Effects of STSN or polymyxin B on the secretion of TNF -  $\alpha$  by rIFN-  $\gamma$ , HS, RS, or IFN -  $\gamma$  plus HS or IFN -  $\gamma$  plus RS - stimulated murine peritoneal macrophages

Treatment	substances		TNF - $\alpha$ secretion (ng/ml)
	STSN	Polymyxin B	
None	-	-	0.267 $\pm$ 0.061
rIFN - $\gamma$	-	-	3.482 $\pm$ 0.055
	+	-	0.843 $\pm$ 0.088
	-	+	0.612 $\pm$ 0.092
HS	-	-	1.861 $\pm$ 0.036
	+	-	1.255 $\pm$ 0.095*
	-	+	1.005 $\pm$ 0.087*
RS	-	-	2.235 $\pm$ 0.076
	+	-	1.762 $\pm$ 0.069
	-	+	1.452 $\pm$ 0.045
rIFN - $\gamma$ plus HS	-	-	5.803 $\pm$ 0.066
	+	-	1.865 $\pm$ 0.027*
	-	+	1.456 $\pm$ 0.076*
rIFN - $\gamma$ plus RS	-	-	6.578 $\pm$ 0.065
	+	-	1.765 $\pm$ 0.027*
	-	+	1.456 $\pm$ 0.030*

TG-elicited macrophages were cultured for 6 h with rIFN-  $\gamma$  (5 U/ml) in the presence (+) or absence (-) of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml). The amount of TNF-  $\alpha$  secreted by macrophages were stimulated with HS (10  $\mu$ g/ml) or RS (10  $\mu$ g/ml) was measured after 24 h of incubation. Values are means  $\pm$ SD of two experiments. \*p<0.05: significantly different from the control.

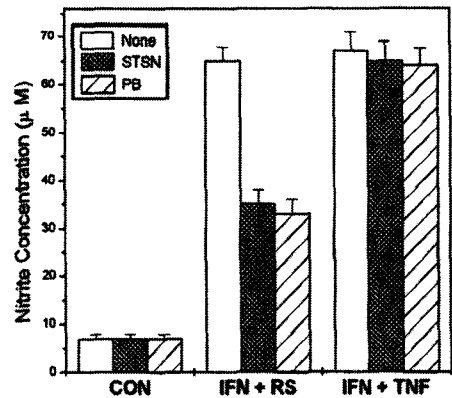
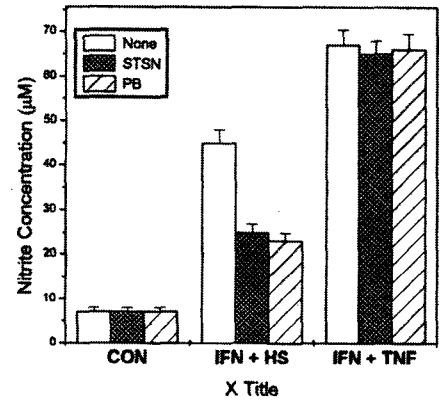


Figure 5. Effects of STSN or polymyxin B on the induction of NO synthesis induced by rIFN-  $\gamma$ , rIFN-  $\gamma$  plus HS, rIFN-  $\gamma$  plus RS. A, TG-elicited macrophages were cultured for 6h with rIFN-  $\gamma$  in the presence of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml) and the cells were then treated with or without HS, or TNF-  $\alpha$  (1000 U/ml). B, TG-elicited macrophages were cultured for 6h with rIFN-  $\gamma$



in the presence of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml) and the cells were then treated with or without RS, or TNF- $\alpha$  (1000 U/ml). The amount of NO released was measured after 48 h of incubation. Values are the means  $\pm$ SD of three experiments.

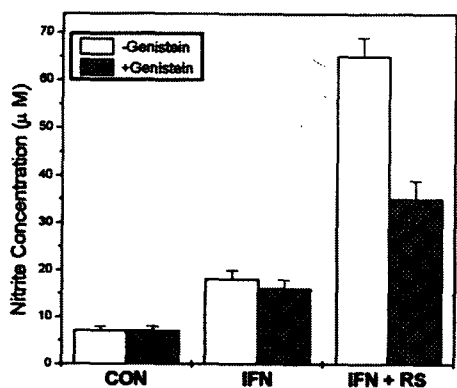
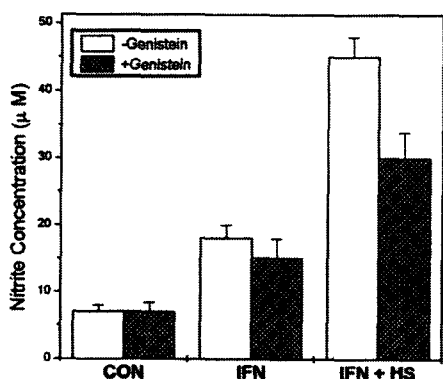


Figure 6. Effects of genistein on the induction of NO synthesis induced by rIFN- $\gamma$ , rIFN- $\gamma$  plus HS, rIFN- $\gamma$  plus

TG-elicited macrophages were cultured for 6 h with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml) in the presence (+)

RS. A, TG-elicited macrophages were cultured for 6h with rIFN- $\gamma$  in the presence of genistein (10 nM) and the cells were then treated with or without HS. B, TG-elicited macrophages were cultured for 6h with rIFN- $\gamma$  in the presence of genistein (10 nM) and the cells were then treated with or without RS. The amount of NO released was measured after 48 h of incubation. Values are the means  $\pm$  SD of three experiments.

Table IV. Effects of genistein on the secretion of TNF -  $\alpha$  by rIFN -  $\gamma$ , HS, RS, IFN -  $\gamma$  plus HS, or IFN -  $\gamma$  plus RS - stimulated murine peritoneal macrophages.

Treatment	substances genistein	TNF - $\alpha$ secretion (ng/ml)
None	-	0.267 $\pm$ 0.061
rIFN - $\gamma$	-	3.482 $\pm$ 0.055
	+	1.582 $\pm$ 0.065
HS	-	1.861 $\pm$ 0.036
	+	0.765 $\pm$ 0.035*
RS	-	2.235 $\pm$ 0.076
	+	1.007 $\pm$ 0.089*
rIFN - $\gamma$ plus HS	-	5.803 $\pm$ 0.066
	+	2.165 $\pm$ 0.078*
rIFN - $\gamma$ plus RS	-	6.578 $\pm$ 0.065
	+	1.867 $\pm$ 0.037*

or absense (-) of genistein (10  $\mu$ M). The amount of TNF- $\alpha$  secreted by macrophages were stimulated with HS (10  $\mu$ g/ml) or RS (10  $\mu$ g/ml) was measured after 24 h of incubation. Values are means  $\pm$ SD of two experiments.

\*p<0.05: significantly different from the control.

#### IV. 考 察

三白草는 《新修本草》에 처음으로 收載되었 고, 水木通<sup>15,16,17</sup>, 水牛草<sup>16,19</sup>, 白花蓮<sup>16,17</sup>, 白舌骨<sup>3,11</sup>, 白水鷄<sup>16,19</sup>, 白面姑<sup>3,4,16,19</sup>, 百節藕<sup>3,11</sup>, 田三白<sup>16,17</sup>, 三點白<sup>15,16</sup>, 五路白<sup>15,16</sup>, 五葉白<sup>17,19</sup>, 九節藕<sup>11,19</sup>, 天性草<sup>4,16</sup>, 塘邊藕<sup>3,4,18,24,25</sup>, 過塘蓮<sup>16,19</sup> 등의 異名이 있다. 三白草의 명칭은 잎 꽃 및 뿌리가 백색이기 때문에 또는 윗부분에 달린 2-3개의 잎이 희어지기 때문에 三白草라 하였다<sup>1)</sup>.

性味는 苦辛寒, 無毒<sup>15-23</sup>하여, 清熱解毒<sup>2,6,15,18,20</sup>, 利尿消腫<sup>2,10,12,13,15,17,28</sup>, 의 效能이 있어서 疔毒<sup>15,16,22</sup>, 黃疸<sup>15-17,19</sup>, 癰腫<sup>15-17,22</sup>, 小便不利<sup>9,17,20</sup>, 淋瀝澀痛<sup>4,5,18,34</sup>, 帶下<sup>9,15,16,22</sup>, 尿路感染<sup>4,5,18</sup>, 尿路結石<sup>4,18,26</sup>, 腎炎水腫<sup>6,7,12,13,15,16,24</sup>, 腳氣<sup>2,11,15,33-35</sup>, 肝 炎<sup>17,21</sup>, 蛇咬傷<sup>17</sup>, 外治로는 瘡瘍腫毒<sup>5,9,18</sup>, 濕疹<sup>4,6,13</sup>에 사용한다고 되어있다.

三白草에 대한 藥理學的인 研究보고로는 利尿, 鎮咳消炎, 血糖下降, 血小板凝集抑制 작용이 있음이 밝혀져있고<sup>38,40</sup>, 또한 황색포도상구균, 장티푸스균 (salmonella typhi)의 성장 억제작용이 보고되어 있다<sup>39</sup>. 현재 임상에서는 肝炎, 肝 癌, 腎臟癌, 膀胱癌, 前立腺癌, 子宮下垂등에 응용하고 있다<sup>40,41</sup>.

세포활성물질에 의해 활성화된 大食細胞에서 다량 생성된 NO는 암세포와 박테리아를 죽이는 역할을 할 수 있으며, 細胞內·外에서 혈관 확장, 혈소판 응집 방지, 신경전달, 또는 숙주방어작용과 같은 다양한 역할을 수행한다. NO는 NADPH 의존성 효소인 nitric oxide synthase

(NOS)에 의하여 L-arginine의 guanidino nitrogen 원자의 산화에 의하여 만들어지는데, 포유동물에서는 세가지 종류의 다른 NOS가 존재한다.

NOS의 유도에 연관이 있다고 밝혀진 PKC는 수용체와 신호전달기구와의 조절, 유전자의 발현과 細胞 增殖과 같은 다양한 기능을 한다. PKC와 second 전달자인 Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol과 arachidonic acid에 의해 유도되는 PKC의 활성화는 산화제의 산화 변형에 의해 활성화 될 수 있다. NO는 저농도에서는 세포의 방어와 조절 기능을 할 수 있지만, 고농도에서는 독성효과를 나타낼 수 있기 때문에 세포내에서 NO의 생성은 세밀하게 조절된다. NOS는 L-arginine으로부터 NO생성에 관여하며, PKC는 L-arginine을 인산화하여 NOS의 활성을 down-regulation할 수 있다<sup>38-40</sup>.

感染과 炎症 발생시에, NO생성은 inducible NO synthase (iNOS)에 의해서 조절되며, TNF는 숙주 염증반응에 다양한 효과를 미치고 다른 중개자 생성을 유도할 수 있는 前 炎症性 細胞 活性物質이다<sup>46</sup>.

본 연구에서는 三白草의 帶根全草·줄기·잎에 대한 腹腔 大食細胞의 NO생성과 TNF- $\alpha$ 유리에 대한 실험을 한 결과, 三白草의 帶根全草·줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리와 NO생성은 세포내 신호 전달계중 하나인 PKC활성과 연관이 있었다. 이와같은 결론은 다음의 관찰이 뒷받침한다. 첫째, 三白草의 帶根全草·줄기 단독으로는 소량의 NO 생성을 유도할 수 있으나, IFN- $\gamma$ 와 같이 사용하게 되면 많은양의 NO를 생성하였다. rIFN- $\gamma$ 를 처리한 大食細胞에 STSN 또는 polymyxin B를 처리하면 NO생성에 대한 三白草의 帶根全草와 줄기에 미치는 효과는 감소하였다. 하지만 rIFN- $\gamma$ 만 처리한 군에서는 NO생성에 미친 영향은 미비하였다 (Table I·II). 둘째, rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草·줄기를 처리하기 전에, PKC활성을

down-regulation하는 PMA를 장시간 처리하면, rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草·줄기는 腹腔 大食細胞의 NO생성 능력을 저하시켰다. 만약, PKC가 직접적으로 rIFN- $\gamma$ 에 의해 유도된 NO생성에 관여한다면, 大食細胞에PMA를 장시간 자극하면 PKC가 down-regulation되어서 rIFN- $\gamma$ 에 의해 유도된 NO생성을 억제했어야 하지만 (Figure 3), 腹腔 大食細胞에 PMA를 전처리해도 rIFN- $\gamma$  단독에 의한 NO생성에는 영향을 미치지 않았다. 그러나, rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草·줄기사이의 NO생성에 대한 상호 상승적 효과에는 영향을 미쳤다. 셋째, 腹腔 大食細胞에 STSN이나 polymyxin B를 처리하면, 三白草의 帶根全草·줄기에 의한 TNF- $\alpha$ 유리가 억제되었다. 활성화 신호에 의한 NO생성의 유도는 TNF- $\alpha$ 유리와 상호 연관성이 있기 때문에 (Figure 4A·4B), 三白草의 帶根全草·줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리의 억제가 NO생성을 저하시키는데 강력한 효과를 나타내었다.

in vitro와 in vivo에서 抗癌 활성이 있는 TNF- $\alpha$ 는 다양한 생물학적인 기능을 하는 細胞活性物質로 알려져있다<sup>47,48</sup>. in vitro에서 TNF- $\alpha$ 의 활성화는 細胞의 增殖·分化와 다양한 기능에 영향을 미친다. 최근까지, 細胞內 TNF- $\alpha$ 신호 전달 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만, 몇종의 細胞에서는 PKC활성화가 TNF- $\alpha$ 신호 전달 기작에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>49</sup>. STSN이나 polymyxin B가 rIFN- $\gamma$  존재하에 rTNF- $\alpha$ 로 腹腔 大食細胞를 자극하여도 NO생성을 억제하지는 못하였다. 이 결과는 PKC가 三白草의 帶根全草·줄기에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 유리와 관련이 있다는 것을 예시한 것이다.

본 실험의 결과들은 PKC가 三白草의 帶根全草·줄기에 의해 유도되는 신호전달에 관여하고 있다는 것을 강력하게 제시하고 있지만, 三白草의 帶根全草·줄기에 의해 유도되는 NO생성에 대한 정확한 기전은 아직 규명되지 않았다.

PKC활성제인 phorbol ester 단독으로는 NO생성을 유도할 수 없지만, phorbol ester와 rIFN- $\gamma$ 를 같이 처리하면 NO의 생성을 증가시킨다<sup>50</sup>. phorbol ester와 대조적으로, 三白草의 帶根全草·줄기는 LPS와 비슷한 작용을 나타내어 腹腔 大食細胞에서 NO생성을 유도할 수 있다. 위의 결과는 三白草의 帶根全草·줄기가 PKC활성화 이외에 다른 신호전달기전에도 관여한다는 것을 의미한다.

腹腔 大食細胞에 genistein으로 자극한 후 三白草의 帶根全草·줄기와 rIFN- $\gamma$ 로 처리하게 되면, TNF와 NO생성을 억제하였다 (Figure 6A·6B, Table IV). 이와는 대조적으로 rIFN- $\gamma$ 와 三白草의 帶根全草·줄기로 먼저 처리한 후에 genistein으로 자극하면 TNF생성 억제의 효과는 미비하였으나 NO의 생성은 억제되었다. 위의 결과는 腹腔 大食細胞에서 NO와 TNF생성은 다르게 조절되고<sup>51</sup>, tyrosine 인산화의 다른 경로가 관여 할 수 있다는 것을 시사한다.

tyrosine kinase 억제제들이 LPS와 rIFN- $\gamma$ 신호경로에 있어서 중요한 단백질 기질의 tyrosine 인산화를 방해함으로써 大食細胞에서 염증성 증개자의 생성을 억제 할것으로 생각되며, 몇몇 그룹에서 LPS에 의한 大食細胞의 활성화에 있어서 src-related kinases (*hck*와 *lyn*)가 중요한 역할을 한다고 보고했다<sup>52,53</sup>. 三白草의 帶根全草·줄기도 LPS와 비슷한 경향을 보이기 때문에 *hck*·*lyn* kinase의 관여 여부를 조사할 필요가 있다.

이상의 결과를 두고 볼때, 三白草는 疔毒, 癰腫, 淋瀝澀痛, 尿路感染, 腎炎水腫, 肝炎과 같은 염증성 질환에 쓰여왔고, 최근에는 抗癌에 대한 치료효과가 있는 것으로 알려지고 있는데, 본 실험은 臨床에서 抗炎症과 抗癌효과에 대한 것을 실험적으로 뒷받침하는 결과이다. 하지만 마우스 腹腔 大食細胞에서 한 실험이기 때문에 앞으로 더욱 많은 연구가 필요하다.

## V. 結 論

三白草의 抗炎症 및 抗癌 효과를 알아보기 위하여, NO와 숙주 염증반응에 다양한 효과를 가진 TNF를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 三白草의 帶根全草·줄기·잎은 腹腔 大食細胞에서 rIFN- $\gamma$ 와 같이 처리시 NO생성을 유도하였다.
2. 三白草의 帶根全草와 줄기는 腹腔 大食細胞에서 rIFN- $\gamma$ 와 같이 처리시 생성된 NO는 PKC억제제인 STSN 또는 polymyxin B, PKC down regulation, tyrosine kinase 억제제인 genistein에 의해서 억제되었다.
3. 三白草의 帶根全草와 줄기는 腹腔 大食細胞에서 PKC억제제인 STSN 또는 polymyxin B와 tyrosine kinase억제제인 genistein에 의해서 TNF 생성이 억제되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 三白草는 疔毒, 癰腫, 淋瀝澀痛, 尿路感染, 腎炎水腫, 肝炎등을 치료할 수 있는 한편 抗癌 작용이 있을 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 李昌福: 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 서울, p.252, 1980.
2. 貴州省中醫研究所: 貴州中藥名錄, 貴州人民出版社, 貴州, p.73, 1988.
3. 舒普榮: 中草藥彩色圖譜與驗方, 江西科學技術出版社, 南昌, p.60, 1992.
4. 葉銘洪: 七〇〇-治癌中藥及其處方, 萬葉出版社, 香港, pp.212-213.
5. 沈保安: 中國常用中草藥, 安徽科學技術出版社, 合肥, p.25, 1992.
6. 王岳寶 外 4名: 福建省中藥炮制規範, 福建科學技術出版社, 福州, pp.28-29, 1988.
7. 王冰: 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, 北京, p.65, 1992.
8. 李時珍: 本草綱目, 人民衛生出版社, 北京, p.1096, 1982.
9. 傳統醫學研究所: 本草藥材圖鑑, 成輔社, 서울, p.209, 1994.
10. 中國藥物大全編委會: 中國藥物大全 (中藥卷), 人民衛生出版部, 北京, p.153, 1993.
11. 中國醫學科學院藥物研究所: 中藥志 (第四冊), 人民衛生出版社, 北京, pp.156-160, 1988.
12. 中華人民共和國衛生部藥典委員會: 中華人民共和國藥典 1977년판 一部, 人民衛生出版社, 北京, p.22, 1978.
13. 中華人民共和國衛生部藥典委員會: 中華人民共和國藥典 1990년판 一部, 人民衛生出版社, 北京, p.8, 1990.
14. 河南省衛生廳: 河南省中藥材炮制規範, 河南科學技術出版社, 河南, p.298, 1983.
15. 全國韓醫科大學 本草學 教授 共編: 本草學, 永林社, 서울, pp.327-328, 1991.
16. 江蘇新醫學院: 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 上海, p.60, 1979.
17. 金在吉: 原色天然藥物大辭典 (下卷), 南山堂, 서울, p.174, 1984.
18. 黎光南: 雲南中藥志 (第一卷), 雲南科學技術出版社, 昆明, p.525, 1990.
19. 上海科學技術出版社, 中藥大辭典 第二卷, 小學館, 東京, pp.979-980, 1985.
20. 成都中醫學院: 中草藥, 上海科學技術出版社, 上海, p.204, 1982.
21. 吳盛義: 原色實用臺灣青草藥, 開山書店, 臺南, p.15, 1983.
22. 辛民教, 鄭普燮: 圖解鄉藥 (生藥)大辭典 (植物篇), 永林社, 서울, pp.813-814, 1990.
23. 中國本草圖錄 編寫委員會: 中國本草圖錄 卷四, 常務印書館有限公社, 臺北, p.51, 1989.
24. 戴新民: 中國方藥學, 啓業書局有限公社, 臺

- 北, p.367, 1985.
25. 林秀英: 治癌中草藥, 華聯出版社, 臺北, p.109, 1978.
26. 中國生草藥研究發展中心: 中國草藥手冊, 宏業書局有限公司, 臺北, p.710, 1977.
27. 孫昌高: 藥用植物種子手冊, 中國醫藥科技出版社, 北京, p.110, 1990.
28. 丁景和: 藥用植物學, 上海科學技術出版社, 上海, pp.108-109, 1985.
29. 劉善述: 草木便方, 重慶出版社, 重慶, pp.61-62, 1990.
30. 吳其濬: 植物名實圖攷長編(校印), 臺南北一出版社, 臺灣, 圖攷 pp.482-483, 長編 pp.334-335, 1974.
31. 蘇敬, 李勣: 唐·新修本草(輯復本), 安徽科學技術出版社, 安徽, P.286, 1981.
32. 辛民教: 臨床本草學(改訂增補版), 圖書出版永林社, 서울, pp.41-45, pp.573-574, 1997.
33. 廣東中醫學院: 新編中醫學概要, 常務印書館香港分館, 香港, p.369, 1976.
34. 福建省醫學研究所: 福建藥物志, 福建人民出版社, 福建省, p.16, 1979.
35. 甘偉松: 臺灣藥用植物誌(第一卷), 國立中國醫藥研究所, 臺北, pp.63-64, 1980.
36. 藥品植物學研究會: 新藥品植物學, 學窓社, 서울, p.237, 1991.
37. 陳貴廷: 本草綱目通釋, 學苑出版社, 北京, p.907, 1992.
38. 冉善德: 中華藥海, 哈欠濱出版社, 北京, p.149, 1993.
39. 黃泰康: 常用中藥成分與藥理手冊, 中國醫藥科技出版社, 北京, p.177, 1994.
40. 王本祥: 現代中藥藥理學, 天津科學技術出版社, 天津, p.588, 1997.
41. 劉春安, 彭明: 抗癌中草藥大辭典, 湖北科學技術出版社, 湖北, p.37, 1994.
42. Moncada, S., R. M. J. Palmer, and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43 : 109.
43. Lowenstein, C. J., and S. H. Snyder. 1992. Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell* 70 : 705.
44. Yui, Y., R. Hattori, K. Kosuga, H. Eizawa, K. Hiki, and C. Kawai, 1991. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.* 266 : 12544.
45. Green, L. C., D. A. Wanger, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrite, nitrate, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126 : 131.
46. Chida, K., N. Kato, and T. Kuroli. 1986. Down regulation of phorbol diester receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 13013.
47. Scuderi, P., R. E. Sterling, K. S. Lam, P. R. Finley, K. J. Ryan, C. G. Ray, E. Petersen, D. J. Slymen, and S. E. Salmon. 1986. Rasied serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 2 : 1364.
48. Raynor, R. L., B. Zheng, and J. F. Kuo. 1991. Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin: differential inhibition of protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na, K-ATPase, and Na<sup>+</sup> pump and differentiation of HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 266 : 2753.
49. Chida, K., N. Kato, and T. Kuroki. 1986. Down regulation of phorbol diester

- receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 13013.
50. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. 1989. *Annu. Rev. Immunol.*, 7 : 625.
51. Old, L. J. 1987. Tumor necrosis factor: polypeptide mediator network. *Nature* 326 : 330.
52. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79 : 319.
53. Schutze, S., S. Nottrott, K. Pfizenmaier, and M. Kronke. 1990. Tumor necrosis factor signal transduction: cell type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J. Immunol.* 144 : 2604.
54. Jun, C. D., B. M. Choi, H. Ryu, J. Y. Um, H. J. Kwak, B. S. Lee, S. G. Paik, H. M. Kim, and H. T. Chung. 1994. Synergistic cooperation between phorbol ester and interferon- $\gamma$  for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 153 : 3684.
55. Zhang X., Morrison D. C. 1993. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 177 : 511.
56. Zhang X., Morrison D. C. 1993. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 177 : 511.
57. Ihle J. N., Witthuhn B. A., Quelle F. W., et. al. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* 19 : 22.