

용담의 RAW 264.7 세포주에서의 Nitric Oxide 생성 저해물질

김나영, 강태현, 김도훈, 김윤철*

원광대학교 약학대학

A Nitric Oxide Synthesis Inhibitor from the Roots of *Gentiana scabra* in RAW 264.7 Cells

Na Young Kim, Tai Hyun Kang, Do Hoon Kim and Youn Chul Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – Bioassay-guided fractionation of a H₂O extract of the roots of *Gentiana scabra* has furnished 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (1) as an inhibitory compound for nitric oxide (NO) production in murine macrophage RAW 264.7 cells stimulated with interferon- γ plus lipopolysaccharide. Compound 1 showed the moderate inhibition of NO production with IC₅₀ value of 803 μ M.

Key words – *Gentiana scabra*; Gentianaceae; nitric oxide; inhibitor; RAW 264.7 cells.

Nitric oxide(NO)는 포유동물의 세포에서 생성되는 매우 작은 분자량의 물질로서 혈관확장, 신경전달기능, 항균작용 등의 다양한 생물학적 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 NO 생성 효소로는 constitutive nitric oxide synthase(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)의 2종류가 알려져 있으며, 이 중 macrophages 및 hepatocytes 등에 존재하는 iNOS에 의해 다량으로 생성되는 NO는 세포 괴사, 조직 손상 및 염증 등을 유발시키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 또한, macrophages에 있어서 이 효소는 cytokines인 interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor, interleukin-2 등에 의하여 그 활성이 유도된다.^{3,4)} 이와 같은 사실에 입각하여 현재 iNOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 새로운 염증치료제의 개발이 활발하게 진행되고 있다.⁵⁾ 본 연구는 생약으로부터 NO의 생성을 저해시키는 물질을 분리하고자 천연물을 검색하던 중 용담의 물 추출물이 효과를 나타냄을 발견하고 이로부터 활성물질의 분리를 시도하였다.

용담은 용담과(Gentianaceae)에 속하는 *Gentiana scabra* Bunge의 뿌리로서 한방에서는 清熱燥濕, 瀉肝膽火의 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 고미전위, 항염증의 목적으로 널리 사용되고 있다. 용담의 성분으로는 gentiopicroside를 비롯한 secoiridoid 배당체가 분리 보고되었다.⁶⁾ 용담 성분에 대한 최근의 약리작용에 대한 연구로는 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid glucose ester의 anti-platelet activating factor작용이 보고되었다.⁷⁾ 지금까지 용담에 대한 NO 생성 저해 활성에 대해서는 보고된 바 없어 본 연구에서는 용담의 물 추출물로부터 INF- γ 와 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화시킨 RAW 264.7 cells을 이용하여 NO 생성 저해활성을 추적해 가며 물질 분리를 시도하여 1종의 화합물을 분리, 동정하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기 – 용담은 전북생약농업협동조합(전주시)에서 구입하여 사용하였으며 증거표본

*교신저자 : Fax 0653-852-8837

(WP No. 307)은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다. Column chromatography용 담체는 silica gel(70-230 mesh, Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.2 mm, Merck)를 사용하였다. murine rIFN- γ 은 Genzyme (Munche, Germany), LPS (from *Escherichia coli*), N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, sodium nitrite, sulfanilamide는 Sigma (St. Louis, MO), L-arginine (84 mg/l)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 기타 조직배양시약은 Life Technologies로부터 구입하였다. ¹H-, ¹³C-NMR spectrum은 JEOL EX-400 spectrometer를 사용하여 측정하였다.

RAW 264.7 cells의 배양-Murine macrophage RAW 264.7 cells는 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2 mM)을 포함한 DMEM 배양액을 사용하여 상법에 따라 배양하였다.⁸⁾

Nitrite농도의 측정-세포 배양에 있어서 NO의 생성은 microplate assay 방법⁹⁾을 이용하여 nitrite로서 측정하였다. 즉, 배양액 중 100 μ l를 취하고 여기에 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 넣고 실온에서 10분간 방치한 다음 Titertek Multiskan(Flow Laboratories, Australia)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻는 sodium nitrite를 표준으로 측정하였으며, 각 측정치는 5-8 μ M의 NO₂⁻를 함유하는 cell-free 배양액의 흡광도치를 이용하여 보정하였다.

RAW 264.7 cells의 viability 측정-RAW 264.7 cells를 48시간 배양하고 세포생존율을 methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 시료의 RAW 264.7 cells에 대한 세포독성을 평가하였으며, 그 방법은 이전의 논문에 기재하였다.⁹⁾

추출 및 분리-건조 세절한 용담 1.2 kg을 증류수로 100°C에서 2시간 추출한 후 온시에 여과하였다. 여과한 여액에 n-BuOH를 가하여 용매분획하여

n-BuOH 가용부(54 g)와 물 가용부를 얻었다. n-BuOH 가용부는 감압농축하고 이를 CHCl₃과 60% 수성 MeOH로 분획하였다. 활성을 나타낸 CHCl₃분획(16.3 g)은 silica gel column chromatography(CHCl₃-MeOH, 40:1-20:1-9:1-4:1)를 시행하여 TLC의 양상에 따라 4개의 분획으로 나누었다. 활성물질이 이행된 소분획 2(3.7 g)에 대하여 silica gel column chromatography[(CHCl₃-EtOAc, 40:1-9:1-1:1) 및 (CHCl₃-acetone, 12:1-4:1-1:1)]을 반복 시행하여 화합물 1 (370 mg)을 얻었다.

화합물 1-흰색 분말, λ_{max} (MeOH) 220, 276 nm; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 9.43(1H, s, CHO), 7.15(1H, d, $J=3.4$ Hz, H-3), 6.42(1H, d, $J=3.4$ Hz, H-4), 4.59(2H, s, CH₂OH), 4.20(1H, brs, CH₂OH); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 177.97(CHO), 161.33(C-2), 152.16(C-5), 123.69(C-3), 110.08(C-4), 57.31(CH₂OH).

결과 및 고찰

화합물 1은 UV spectrum으로부터 220 및 276 nm에서 흡수 극대가 나타났으며, ¹H-NMR spectrum에서는 5개의 peak만이 관찰되어 분자량이 작은 물질로 추정되었다. 이 중 9.43(1H, s) ppm의 signal로부터 aldehyde기, 7.15(1H, d, $J=3.4$), 6.42(1H, d, $J=3.4$) ppm의 peak는 furan ring에 유래하는 protons로 생각되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 aldehyde기 유래의 signal을 포함한 6개의 carbon peaks의 존재를 확인하였고 이상의 결과를 검토한 결과 1의 구조를 숙지황의 제조과정 중 생성되는 것으로 보고되어진 5-(hydroxymethyl)-2-furfural¹⁰⁾로 추정하여 ¹H- 및 ¹³C-NMR spectral data를 문헌치¹⁰⁾ 및 표준품 (Sigma)의 spectral data와 비교하여 일치하였으므로 화합물 1을 5-(hydroxymethyl)-2-furfural로 동정하였다.

RAW 264.7 cells를 배양액 또는 IFN- γ (5 U/ml)와 LPS(10 ng/ml)을 함유하는 배양액 중에서 배양하고, 여기에 화합물 1을 10-100 μ g/ml의 농도로 처리한 다음 배양액 중으로 방출되는 NO의 양을 Griess방법⁹⁾(nitrite)에 따라 측정하였다 (Fig.

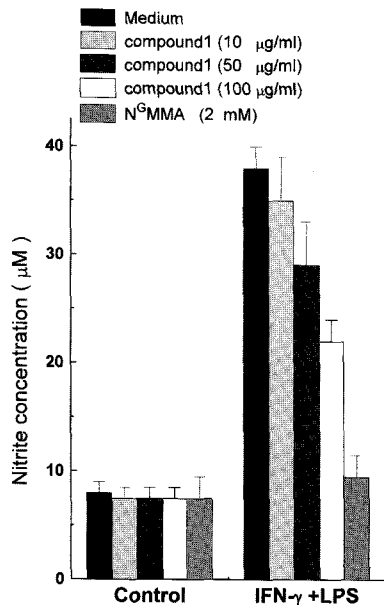


Fig. 1. Effects of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural(1) and N^GMMA on NO production by IFN-γ plus LPS-activated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10⁶ per well plate) were incubated with or without IFN-γ(5 U/ml) plus LPS(10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of compound 1 and N^GMMA at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess (nitrite). Data are means±SE of three independent experiments.

1). 화합물 1은 IFN-γ와 LPS로 활성화시킨 murine macrophage 264.7 cells에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해함을 알 수 있었으며, NO의 생성을 50% 저해하는 농도(IC₅₀)는 803 µM이었다. 이는 양성 대조약물로서 사용한 iNOS 저해제인 N^G-monomethyl-L-arginine (N^GMMA; IC₅₀=40 µM)에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 또한, MTT assay를 이용하여 화합물 1의 RAW 264.7 cells에 대한 세포독성을 검토하였다 (Fig. 2). 화합물 1은 NO 생성을 저해시키는 농도 범위 내에서는 세포독성을 나타내지 않았으므로 NO 생성 저해는 세포독성에 기인하지 않는 것으로 생각되었다.

용담의 주성분인 gentiopicroside가 carrageenin으로 유발시킨 흰 쥐 족적 부종시험에 있어서 항염증 효과를 나타낸다고 보고되었다.¹¹⁾ 본 연구를 통하여 NO 생성 저해물질로 밝혀진 5-(hydroxymethyl)-2-furfural 또한 용담의 항염증 활

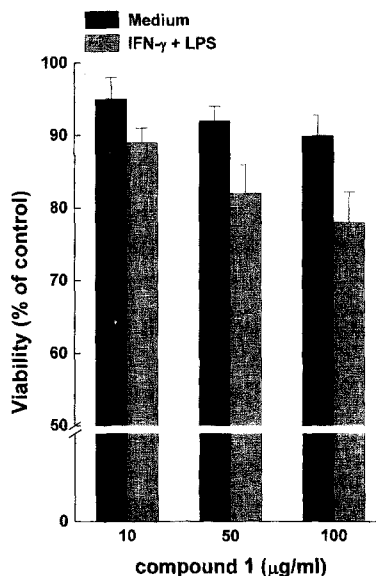


Fig. 2. The viability of RAW 264.7 cells in the presence or absence of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural(1). RAW 264.7 cells (1×10⁶ per well plate) were incubated with or without IFN-γ(5 U/ml) plus LPS(10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of compound 1 and N^GMMA at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay. Data are means±SE of three independent experiments.

성물질로 추정된다. 탄수화물의 열분해 산물중의 하나로 알려진 5-(hydroxymethyl)-2-furfural이 Chinese hamster V79 cells에 있어서 현저한 염색체 이상 유발과 유사분열 저해작용을 나타낸다고 보고된 반면,¹²⁾ 토끼를 이용한 생체내 실험에서는 일반독성이 관찰되지 않았다는 보고가 있다.¹³⁾ 5-(hydroxymethyl)-2-furfural은 지금까지 용담에서는 보고된 바 없으며, 유전독성물질로 알려진 이 물질이 NO의 생성을 저해하는 사실은 흥미롭다.

결론

천연물로부터 NO 생성 저해물질을 발견할 목적으로 용담 물 추출물의 활성분획인 n-BuOH 가용부를 대상으로 활성을 따라 silica gel column chromatography를 반복 실시하여 1종의 NO 생성 저해물질을 분리하고, UV, ¹H- 및 ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌 및 표준품의 spectra와 비교하여 그 구조를 5-(hydroxymethyl)-2-fur-

fural로 동정하였다. 이 물질은 IFN- γ 와 LPS로 활성화된 murine macrophage RAW 264.7 cells에서 803 μ M의 농도에서 NO의 생성을 50% 억제하였다.

사 사

이 논문은 한국과학재단 지정 의약자원연구센터 1999년도 연구비에 의해 지원되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Kuo, M. L., Chau, Y. P., Wang, J. H. and Shiah, S. G. (1996) Inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 502-508.
2. Geller, D. A., Silvio, M. D., Nussler, A. K., Wang, S. C., Shapiro, R. A., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. (1993) Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes *in vivo* during hepatic inflammation. *J. Surg. Res.* 55: 427-432.
3. Narumi, S., Finke, J. H. and Hamilton, T. A. (1990) Interferon- γ and IL-2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 7036-7041.
4. Cox, G. W., Melillo, G., Chattopadhyay, U., Mullet, D., Fertel, R. H. and Varesio, L. (1992) Tumor necrosis factor- α -dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN- γ plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol.* 149: 3290-3296.
5. Yu, S. M. (1994) Thaloporphine selective inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 303: 289-294.
6. Luo, J. P. and Luo, Z. C. (1986) Separation and identification of gentiopicroside, swertiamarin and sweroside in the traditional drug longdan, Radix Gentianae. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 17: 145-149.
7. Huh, H., Kim, H. K. and Lee, H. K. (1998) PAF antagonistic activity of 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid glucose ester from *Gentiana scabra*. *Arch. Pharm. Res.* 21(4): 436-439.
8. Jun, C. D., Pae, H. O., Kim, Y. C., Jeong, S. J., Yoo, J. C., Lee, E. J., Choi, B. M., Chae, S. W., Park, R. K. and Chung, H. T. (1998) Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 62: 129-135.
9. Jun, C. D., Choi, B. M., Ryu, H., Um, J. Y., Kwak, H. J., Lee, B. S., Paik, S. G., Kim, H. M. and Chung, H. T. (1994) Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN- γ for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 153: 3684-3690.
10. 홍선표 (1988) 숙지황의 특이성분 연구-생지황 및 건지황과의 비교 연구. 서울대학교 석사학위논문.
11. Zhu, Y. P. (1998) Chinese materia medica. 146-149, Harwood academic publishers, Amsterdam.
12. Nishi, Y., Miyakawa, Y. and Kato, K. (1989) Chromosome aberrations induced by pyrolysates of carbohydrates in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 227(2): 117-123.
13. Rasmussen, A., Hessov, I. and Bojsen-Moller, M. (1982) General and local toxicity of 5-hydroxymethyl-2-furfural in rabbits. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 50(2): 81-84.

(1999년 4월 1일 접수)