

원저

胡桃 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포주의 iNOS 발현 및 Superoxide 형성에 미치는 영향

文 九* · 高秀美*

ABSTRACT

Effects of Semen jugrandis on the iNOS Expression and Superoxide Formation in the RAW264.7 Cells

Goo-Moon*, Su-Mi, Ko*

*Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine University, Iksan. Korea

Nitric oxide(NO) is synthesized via the oxidation of L-arginine by a family of nitric oxide synthases(NOS), which are either constitutive(cNOS) or inducible(iNOS). The induction of iNOS in tissues can lead to the sustained production of high concentrations of NO which may exert pro-inflammatory effects including vasodilation, edema, cytotoxicity, and its activity can be mediated by various pro-inflammatory cytokine, including interferon γ (INF- γ), tumor necrosis factor, IL-1 and IL-6. The enzyme, iNOS, became a new target for pharmacological research with the aim to find new substances for the treatment of chronic inflammatory disorders. Murine macrophages produce large amounts of NO when activated with TFN- γ plus LPS. The murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, is a suitable cell model on which to perform vitro studies regarding the iNOS system.

Semen jugrandis is a fatty walnut seed found in Korea. The walnut have been used in foik medicine to improve virility, to relieved asthma, and to relieve constipation. Sesquiterpenelactones were isolated from this plant. In the course of screening for NO inhibitory activity from medicinal plants, the aqueous extract of this plant was found to have a significant activity.

The result are summarized as followings.

1. The viability of cells incubated in the presence of semen jugrandis increased mare than non incubated cells.
2. Semen jugrandis suppressed the production of NO in tissues dependent on density.
3. Semen jugrandis suppressed the induction of iNOS in tissues dependent on density can lead to reduced production of NO.
4. Semen jugrandis suppressed the production of superoxide in tissue depend on density.

According to the above mentioned results, semen jugrandis could be applied effectively the production of NO and superoxide can lead to reduction of chronic inflammatary.

And as a depence matter come into a virus of microbe and tumor cells.

Key Word : Semen jugrandis, Nitric Oxide(No), Superoxide, inflammatary, tumor improve

* 원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

접수일: 99. 5. 28 연락처: 교수미 T. 064-748-7001/2

I. 서 론

호도(Semen juglandis)는 胡桃科(호도과; Juglandaceae)에 속한 落葉喬木인 호도나무 果實의 種仁으로 核桃肉, 核桃仁, 唐楸子, 羌桃, 蝦蟆등의 異名을 가지고 있다. 호도는 甘, 微溫而潤, 無毒하고 肺, 腎, 三焦, 大腸에 작용하는 약물로서 補陽藥에 분류되며 補腎 強腰 膝 斂肺定喘, 潤腸한다¹⁻³⁾.

호도의 약리작용으로는 체중을 증가시키고 혈청단백질의 증가, 콜레스테롤 결석의 합성과 기화 및 배설에 영향을 미치며, 골수를 보강하여 빈혈을 다스린다. 또한 피부에 발생한 삼출물에 효과가 있으며 油膏한 약물로서 瘡瘍 및 腫瘍에 응용되어 좋은 효과를 나타낸다^{3,4)}.

한의학에서는 질병의 발생과정으로 素問<刺法論>^{5,6)}에 “正氣存內 邪不可干” <評熱病論>^{5,6)}에 “邪之所湊 其氣必虛” 라고 하여 正氣와 邪氣의 상호관계에 의한 병리를 나타내었다. 正氣는 人體 生命活動의 原動力이고 인체의 내외환경에 적응하여 病邪에 防禦하는 능력이며 發病 이후 健康恢復의 關鍵이 되기도 한다⁷⁾. 邪氣는 人體를 致病케 하는 各種 發病 要因과 病理的 損害因子를 말한다^{8,9)}. 이러한 正氣와 邪氣를 다스리는 扶正祛邪法은 韓醫學의 대표적인 治療原則중의 하나로 人體의 恒상성을 維持하도록 하는 免疫系의 기능과 부합되는 치료법이다¹⁰⁾.

免疫은 生體가 自己와 非自己를 식별하는 기능인데 外部로부터 침입하는 미생물 同種의 조직이나 體內에 생긴 불필요한 產物등을 非自己인 항원으로 인식하여 특이하게 반응하며, 항체를 생산하므로써 이를 排除하고 그 個體의 恒상성을 維持하는 것이다¹¹⁻¹²⁾.

Nitric oxide (NO)는 반감기가 매우 짧은 free-radical로서 주로 포유류의 세포에서 생성되어지며 혈관계, 신경계 및 면역계에서 다양한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려졌다¹³⁾. NO는 NO synthase (NOS)라는 효소에 의하여 L-arginine의 guanidine nitrogen group을 기질로 하여 발생되어진다. NOS는

크게 두 가지 type이 존재하는데 그 하나는 상존성 칼시움에 의존적인 효소로서 주로 신경계와 내피세포에서 발견된다. 반면 면역세포는 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되는 유도성이며 칼시움에 비의존적인 NOS로서 이는 주로 침입한 미생물이나 종양세포에 대해 방어 물질로서 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

생체 내에서 NO의 역할은 아주 다양하다. NO는 동맥이나 정맥 등 혈관의 이완 뿐만 아니라 자궁의 이완에 관여하며 신경계에서는 신호전달 물질로 작용하고 혈소판의 응집이나 염증세포가 혈관의 내피세포에 부착되는 것을 억제시킨다. NO는 세포 내에서 단백질의 기능에 영향을 주던가 유전자 발현의 조절에도 관여함이 밝혀졌다¹⁷⁻¹⁸⁾. 또한 단핵탐식세포계 (mononuclear phagocytic system : MPS) 등이 생산하는 다량의 NO는 세포내 기생 병원미생물 뿐만 아니라 같은 세포의 기생 병원미생물에 대한 방어 기능과 많은 종양세포들에 세포독성을 나타낸다¹⁹⁻²¹⁾. 그러나 병원미생물이 사멸된 뒤에도 계속해서 생성되는 NO는 숙주조직에 큰 손상을 가져올 수 있음이 증명되었다. 또한 NO는 면역세포의 분화 및 증식에도 관여하고 있으며 특정 세포에 대한 세포고사 (apoptosis) 현상을 유발하여 세포를 사멸시키는 특성을 갖고 있음이 thymocyte, spleen, 및 bone marrow 등에서 밝혀지게 되었다²²⁻²⁴⁾.

병원성 미생물 및 종양세포에 대한 방어 물질로 작용하는 것으로 알려져 있는 iNOS는 다량의 NO를 생성하여 주세포의 면역 작용에 중요한 역할을 수행하지만 필요이상으로 분비된 과량의 NO는 주 세포 및 표적 세포에 영향을 주어 만성적 염증을 유발한다. 이러한 만성적 염증을 개선하기 위해서는 iNOS의 발현이 적절하게 조절될 필요성이 있다²⁵⁻²⁷⁾.

Superoxide는 주로 NADPH oxidase에서 주로 분비되는 산화력이 큰 free radical로 알려져 있다. NO와 같이 superoxide는 면역세포의 면역작용에 중요한 역할을 수행하지만

과량으로 분비되는 경우 염증을 유발시킨다²⁸⁾

본 논문에서는 호도가 補陽藥에 속하여 補腎作用으로 正氣를 補하고 瘡瘍 및 腫瘍 등의 邪氣를 제거하여 扶正祛邪에 해당하는 치료 약물로서 면역조절의 기능을 할 수 있으리라 사료되어 염증의 원인이 되는 NO 및 superoxide의 생성을 효과적으로 조절할 수 있는지를 연구하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시 약

Recombinant mouse interferon gamma (IFN- γ)는 Genzyme사 (Munchen, F.R.G.) 제품을 사용하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), lipopolysaccharide (LPS), 등은 Sigma사 (St. Louis, MO) 제품을 사용하였으며, Fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone Laboratories (Logan, UT)로부터 구입하였다.

2. RAW 264.7 macrophage cell line의 배양
Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주의 배양은 10% FBS와 penicillin (50 U/ml) 및 streptomycin (250 ng/ml)이 포함된 DMEM에서 습기가 충분한 5% CO₂ 배양기에서 37°C를 유지하면서 배양하였으며, trypan blue exclusion 방법에 의해 세포의 생존도가 95% 이상인 것을 실험에 사용하였다.

3. 반응질소중간물질의 측정

Reactive nitrogen intermediate (RNI)는 특이적 또는 비특이적 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO₂⁻, NO₃⁻, NO 등이 있는데 이들은 세포배양액에서 NO₂⁻와 NO₃⁻의 형태로 측정되어 진다. 배양액에 녹아있는 NO₂⁻의 양의 측정은 Green 등²⁹⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cell/well 세포를 넣어준 다음 IFN- γ 나 LPS, 또는 다른 시약을 각각의 농도에 따라 배양 세포에 첨가하고 48시간동안 배양한 후에 각

well로부터 100 μ l씩의 배양액을 취하여 ELISA TiterTek plate에 옮긴 후 동량의 Griess Reagent (N-1-naphthylethylen diamine 0.1% in H₂O, sulfanilamide 1% in 5% H₃PO₄)를 첨가하고 10분간 실온에 두었다. 전체 RNI 생성정도는 TiterTek Multiscan MC/340 (Flow Lab)으로 540nm에서 흡광도를 측정했다. 이때 RNI 농도에 대한 표준곡선은 NaNO₂를 serial dilution하여 얻었다.

4. 반응 산소중간물질의 측정

호중구나 단핵구/대식세포에서 다량 생산되는 것으로 알려진 reactive oxygen intermediates (ROIs)인 O₂⁻ (superoxide anion)나 H₂O₂ (hydrogen peroxide)의 측정은 이들과 반응하여 chemiluminescence (CL)를 발하는 증폭제를 사용하여 luminometer로 측정하였다. 이때 amplifier로는 O₂⁻ (superoxide anion)에 대해 특이하게 반응하는 lucigenin (10, 10'-dimethyl-9, 9'-diacridinium)을 최종농도 0.3mM로 하여 사용하였다. 또한 이 세포들로 하여금 ROI를 생산하도록 phorbol ester 유도체인 PMA를 최종농도 150nM로 주어 세포를 자극시켰다. 호중구는 1×10⁶ cells/300 μ l 복강 대식세포는 1-2 ×10⁶ cells/300 μ l로 veronal buffer에 부유시켜 polystyrene luminescence tube (lumacuvette/Abimed, Dusseldorf FRG)에 넣어 증폭제를 가한 후 LB9505에 10분간 전 배양시킨 다음 각 channel에 PMA를 가하여 이때부터 생산되는 ROI를 cpm (counter per minute)값으로 측정하였다.

CL의 측정은 6 channel Biolumat LB9505 (Berthold, wildbad. FRG) luminometer로 수행하였으며 37°C를 유지시켜 60분간 측정하였다.

5. Cytotoxicity assay

RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cell/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24-well plate에 분주하고 여러 가지 세포활성물질을 첨가하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환

하여 4시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT (methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 1 mg/ml) 용액 50 µl/ml를 각 well에 넣고 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO (dimethylsulfoxide)를 200 µl/well씩 넣어 MTT formazan을 용해한 후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo Instruments, Inc., Japan)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁴⁾.

6. RNA 추출 및 Northern blotting

RAW 264.7 세포에서 RNA의 추출은 LiCl-urea 방법을 사용하였다¹⁵⁾. 20µg의 RNA에 premix solution (2 µl 10X MOPS running buffer, 3.5 µl formaldehyde, 10 µl foramide)를 가하여 20 µl로 만든 다음 65°C에서 10분간 방치하였다. 여기에 5 µl의 gel loading buffer (1.2 µg ethidium bromide, 0.24% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 50% glycerol)를 가하여 섞은 후, 1.2% 한천 겔에 부하하여 전기영동을 실시하였다. 겔을 증류수와 20X SSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate-2H2O)로 세척하고 세척된 겔은 16시간 동안 nylon membrane에 전위시킨 다음 80°C에서 2시간 동안 구웠다. 구운 필터를 플라스틱 백에 넣고 적당량의 hybridization buffer (6X SSC, 10X Denhardt's solution, 50% deionized formamide, 10mM NaHPO4, 0.5% SDS)를 가하고 42°C에서 3시간 방치한 후, iNOS probe를 섞고 42°C에서 16시간 동안 hybridization을 실시하였다. 필터를 세척액 (2X SSC, 0.5% SDS)으로 세척하고 이를 말린 다음 X-ray 필름에 감광시켰다.

7. Western blotting

Cell lysis buffer 300µl를 가한 후 잘 혼합하여 원심분리한다. 원심분리 후 상층액은 E-tube로 옮기고 침전물은 버린다. 상층액의 일부를 단백질 정량에 사용하고 나머지는 12% SDS-PAGE 방법에 의해 분리시킨 다음 Electrobolt system을 사용하여 transfer 완충

용액에서 250 mA로 1시간동안 nitrocellulose filter에 옮겼다. PBS 완충용액으로 5분간 씻고 blocking 용액에 1시간 정도 놓아두었다. 각각의 항체가 들어있는 antiserum을 blocking 용액에 1:1000으로 희석하여 처리하고 상온에서 90분 동안 흔들어 준 다음 200ml의 PBS 완충용액으로 5분간 3회 씻는다. Rabbit secondary antibody (ECL kit)를 blocking용액에 1:1000으로 희석한 용액을 처리하여 1시간 동안 서서히 흔들어 준 다음 PBS로 5분씩 3회 씻어준다. 암실에서 developing solution A와 B를 1:1로 혼합한 용액을 처리한 후 곧 바로 hyper film을 얹어 5분간 exposure시킨 후 현상하였다.

III. 실험성적

1. 호도의 추출 및 활성검증

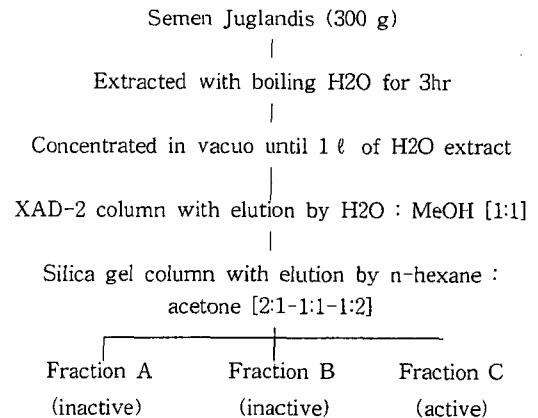


Figure 1.

Diagram of extractions of Semen Juglandis. Dried and pulverized aerial parts of Semen Juglandis (300 g) were extracted with boiling H2O (6 l) for 3 h and the extract concentrated in vacuo until 1 l of H2O extract was achieved. This was chromatographed on a Amberlite XAD-2 (Sigma Chemical Co., USA) column (15 × 100 cm) with elution by H2O (4 l) followed by MeOH (4 l) to afford an active fraction eluted with MeOH. This fraction was separated by silica gel (250 g) column chromatography [n-hexane: acetone (2:1 - 1:1 - 1:2)] to obtain 3 fractions. Each fraction was tested by the assay.

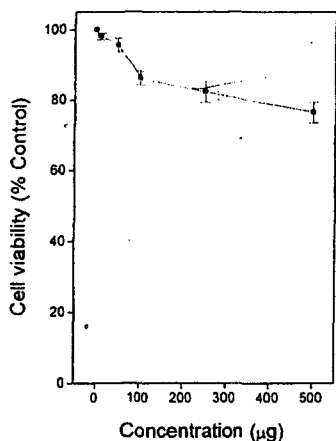


Figure 2.

Effects of Semen Juglandis on cell viability of the RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 per well plate) were incubated in the presence of different concentration of Semen Juglandis for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm SE of three independent experiments.

2. 호도 추출물에 의한 NO 생성 억제효과

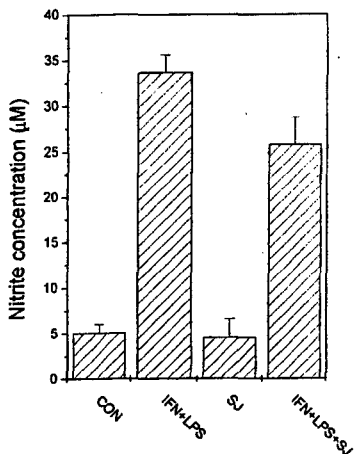


Figure 3.

Effects of Semen Juglandis on NO production by IFN- γ plus LPS-activated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 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 Semen Juglandis (100 μ g/ml). The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess (nitrite). Data are means \pm SE of three independent experiments.

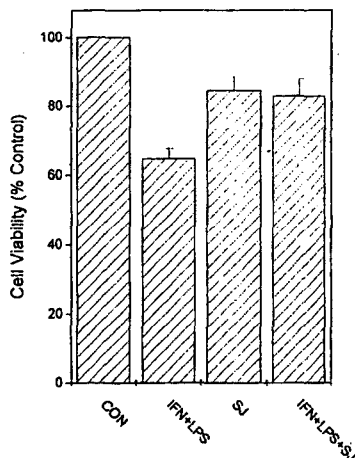


Figure 4.

Effects of Semen Juglandis on IFN- γ plus LPS-induced cell death in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 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 Semen Juglandis (100 μ g/ml). Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm SE of three independent experiments.

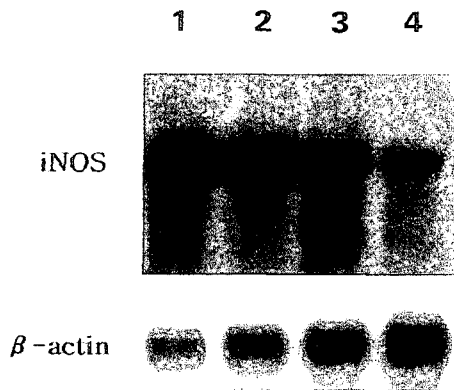


Figure 5.

Northern blot analysis of Semen Juglandis from cell lysates obtained from IFN- γ plus LPS-activated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 per well plate) were incubated with IFN- γ plus LPS in the presence or absence of Semen Juglandis for 12 h. Lane 1: IFN- γ + LPS, Lane 2: IFN- γ + LPS + 10 μ g/ml Semen Juglandis, Lane 3: IFN- γ + LPS + 50 μ g/ml Semen Juglandis, Lane 4: IFN- γ + LPS + 100 μ g/ml Semen Juglandis

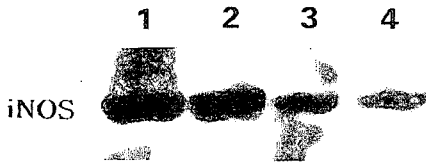


Figure 6.

Western blot analysis of Semen Juglandis from cell lysates obtained from IFN- γ plus LPS-activated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 per well plate) were incubated with IFN- γ plus LPS in the presence or absence of Semen Juglandis for 16 h. The cell lysates were analyzed by SDS-PAGE, and iNOS was visualized by Western blot analysis. Lane 1: IFN- γ + LPS, Lane 2: IFN- γ + LPS + $10 \mu\text{g/ml}$ Semen Juglandis, Lane 3: IFN- γ + LPS + $50 \mu\text{g/ml}$ Semen Juglandis, Lane 4: IFN- γ + LPS + $100 \mu\text{g/ml}$ Semen Juglandis

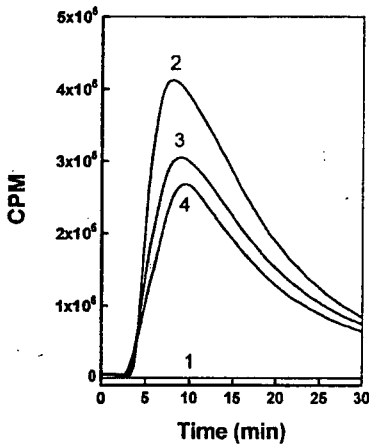


Figure 7.

Effects of Semen Juglandis on superoxide generation by PMA in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 per well plate) were incubated without or with Semen Juglandis at indicated doses for 6 h. Then cells were washed for three times with HBSS, resuspended in PBS containing $10 \mu\text{M}$ of lucigenin, and stimulated with PMA (200 nM). Superoxide formation was monitored by six-channel luminometer for 30 min

IV. 고 찰

疾病으로 인한 사망의 원인이 과거 傳染性疾患에서 成人病과 癌疾患, 등의 非傳染性疾患 및 免疫學的疾患으로 질병의 구조가 변

화하고 있으며 획기적인 최첨단 診斷機器와 手術 放射線治療 化學療法 등의 계속적인 발전에도 불구하고 치료에 대한 부작용과 더불어 한계를 느끼고 있다^{30,31)}.

우리나라의 경우 질병으로 인한 死因중 2位를 차지하는 癌은 최근 50년간 급진적으로 증가되어 왔는데, 그 치료에 대한 推移는 正常細胞에 대한 부작용을 최소화하면서 癌細胞에 선택적으로 特異的 破壞를 함으로써 完全殘滅을 할 수 있는 면역학적 治療방법이 중요한 治療법으로 擡頭되고 있는 實情이다^{31,32)}.

素問 <上古天真論>^{5,6)}의 “眞氣從之 精神內守 病安從來”, <刺法論>^{5,6)}에 “正氣存內 邪不可干”, <評熱病論>^{5,6)}에 “邪之所湊 其氣必虛” “邪氣所在 皆爲不足”이라 하여 모든 질병의 발생이 正氣 不足으로 야기되며 正氣는 發病 이후 건강회복능력의 關鍵이 되기도 하여 인체의 抗病能力에 결정적인 因素로서 정상적인 면역기능을 대표한다⁷⁾. 正氣는 原氣 혹은 眞氣라고도 하며 先天之本인 腎에서 주관하고 後天之氣에 의존하여 부단히 滋養되며 生命活動의 原動力으로 各種 臟腑, 組織, 機關의 功能활동을 정상적으로 유지하게 한다⁸⁾. 邪氣란 인체의 정상적인 生命活動을 阻害하고 인체와 외부환경 사이의 상대적 平衡상태를 파괴하는 각종 有害因子로 六淫外邪나 체내의 병리적 산물인 瘀血, 痰飲등을 지칭한다^{10,33)}.

楊⁹⁾은 “使祛邪而不傷正 扶正而不助邪”라고 하여 祛邪하되 인체의 正氣를 補益하고 正氣를 손상시키지 않는 扶正祛邪法을 가장 효과적인 방법으로 보았으며 이는 인체의 恒상성 유지를 목적으로 삼는 免疫학 이론과 부합되는 한의학의 중요한 治療원칙이다.

면역이란 인체내에서 어떤 요인으로 인해 서든지 異物의 침입이나 變異細胞가 발생하면 생체방어기구 즉 immune system이 관여하여 異物은 물론 새로이 발생된 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 恒상성을 유지하려는 기구이며³⁴⁾, 항원성 자극에 의해 항체가 만들어 지

는 면역반응을 體液性 免疫이라고 하고 항원 자극을 받은 T淋巴球나 T淋巴球가 만들어낸 여러 단백질에 의한 면역반응을 細胞性 免疫이라 한다¹¹⁾. 이러한 免疫學 理論과 관여하여 癌은 生體내 正常細胞가 發癌物質등의 環境的 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性 刺戟 및 突然變異등에 의하여 어떤 과정을 거쳐 癌細胞로 변형되면 癌細胞化와 癌成長 기전을 거쳐 자라나는데 소위 免疫監視機能이라는 個體防禦能力이 약화되어서 癌細胞化된 非正常細胞(非自己)의 破壞除去能力을 발휘하지 못하게 되면 正常細胞가 가진 細胞增殖 調節機能을 못하게 되어 제멋대로 성장하게 되는 것이다³¹⁾

補陽藥類는 일반적으로 溫腎壯陽, 補精髓, 強筋骨등의 작용을 하여 腎陽虛로 인한 전신의 기능쇠퇴를 호전시키고 성장발육을 촉진시키고 아울러 인체의 저항력을 증가시킨다¹⁾. 호도는 補陽藥에 속하여 溫腎壯陽, 補精髓, 命門을 통하게 하고 利三焦한다^{1,2)}. 油膏한 약물은 瘡瘍 및 腫瘍, 潰瘍단계에 많이 응용되는데 호도는 40-50%의 지방유를 함유하고 있으며 消堅開瘀의 효과가 있어 瘡瘍의 毒을 감소시켜 外耳道癰腫에 효과가 있고 피부염, 습진 등의 急性滲出瀰滿期와 亞急性期에 더 효과가 좋으며 尿路結石등에 효과가 있어 溶石작용이 입증되었다^{3,4,35)}. 또한 竇³⁵⁾의 보고에 의하면 신경긴장, 피로, 혈압변화가 뇌혈관과 신경계에 영향을 미쳐 발생한 耳腦鳴에 효과가 있었다. 따라서 호도는 補陽藥에 속하여 溫腎壯陽, 通命門作用으로 正氣를 補하고 한편으로는 瘡瘍, 瘀血, 痰飲등의 邪氣를 제거하므로 이는 扶正祛邪의 작용을 통하여 免疫調節의 기능을 할 수 있으리라 사료된다. 그러나 호도 추출물이 iNOS 발현 및 Superoxide 형성에 미치는 영향에 관해서는 아직 보고된 바 없다.

NO는 혈관계에서는 혈관내피세포에 의해 분비되어 인접한 근세포에 영향을 주어 혈관 이완과 혈류를 조절하는 신호전달자 (signalling molecule)로서 작용하며 면역계에 있어서는 활성화된 대식세포 (macrophage)나 중성구

(neutrophile) 등에 의해 생성되어 외부에서 침입한 미생물이나 내부에서 발생한 종양세포의 사멸에 영향을 주는 면역 방어 분자 (immune defence molecule)로서 인식되고 있다³⁶⁾. 또한 1988년에는 뇌조직에서 NO-like 인자가 동정되었으며 NO는 새로운 신경전달물질로서 이 분야에서 급속한 연구가 진행되고 있다²⁵⁾. 인체에 NO가 적용된 예는 1867년 glyceryl trinitrate가 angina에 있어서 효과적으로 사용되었었지만 그 당시에는 작용기전을 이해할 수 없었다. 현재는 NO에 의한 혈관벽의 확장에 의해 내부에서 생성되는 NO를 이러한 약물이 대신할 수 있는 것으로 생각되어지고 있다²⁶⁾.

NO가 면역계에서 중요한 방어분자로서 작용하고 있다는 것이 알려지면서 면역조절 분야에서는 유도성 NOS의 발현기전과 그 조절기전에 관하여 많은 연구자들이 관심을 갖게 되었다. 특히 T 세포에서 분비되는 세포활성물질인 인터페론-감마 (interferon-gamma)와 LPS에 의한 막을 통한 신호전달기전에 관한 연구는 생체에서 T 세포와 탐식세포간의 상호작용을 이해하는데 관건이 되는 연구일 뿐 아니라 탐식세포의 self-regulation의 기전을 이해하는데 중요한 자료가 되기 때문에 이 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다^{27,28)}. 한편, 신경세포계에서 발생되거나 혈관내피세포에서 생성되는 NO는 아주 소량이기 때문에 숙주에게 커다란 영향을 주지 않는 것으로 받아들여지고 있으나 면역계를 구성하는 세포에서 발생하는 NO는 한꺼번에 많은 양이 방출되기 때문에 미생물이나 종양세포 뿐 아니라 NO를 생성하는 세포 자신과 주위의 세포, 조직이나 기관에 심각한 손상을 초래할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다³⁷⁾. 예를들면 뇌의 소교세포 (microglia)는 단핵탐식세포계에 속하는 세포로서 대식세포가 갖는 특성을 소유하고 있기 때문에 외상이나 감염성 질환 등에 의하여 활성화 될 수 있으며 이때 생성된 NO는 주위의 신경세포의 수초를 degeneration 시킬 수 있는 것으로 보고되어지고 있다. 또한 간조직에서는 superoxide

radical과 반응하여 peroxinitrite를 형성하여 조직 손상을 초래하는 독성이 매우 강한 물질로도 변환되기도 한다³⁸⁾. 따라서 만일 생체에서 발생하는 필요이상의 NO를 억제한다면 생체에 많은 유익을 가져다 줄 수 있을 것이다. 특히 박테리아 세포벽 성분인 LPS와 같은 물질에 의해 유발되는 폐혈증과 같은 병은 그 원인이 면역반응의 부재현상에 기인하는 것이 아니라 오히려 이러한 병인에 대하여 과민하게 반응하는 면역계에 의해 유발되는 질병이다. 지금까지 밝혀진 바로는 LPS와 같은 병인을 인식한 주위의 면역세포가 분비하는 tumor necrosis factor (TNF)와 interleukin-1 (IL-1) 등에 의하여 자극된 내피세포나 탐식세포가 iNOS를 유도하게 되며 NO를 생성시킴으로서 과량의 NO에 의한 혈관확장 현상을 수반하게 되고 이것은 회복할 수 없을 정도의 혈압강하를 초래하게 되는 것으로 설명되고 있다³⁹⁾. 이러한 이유 때문에 생체에서 실질적으로 일어나는 iNOS의 발현과 조절기전의 연구는 NO의 임상적 응용 및 치료의 중요한 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다.

본 실험에서는 잘 건조된 호도 300 g의 농축액을 물-메탄올을 전개용매로 하는 XAD-2 칼럼으로 분리하여 16.4 g의 분획을 얻었다. 이 분획물은 다시 n-hexane : acetone [2:1-1:1-1:2]을 전개용매로 하는 실리카-겔 칼럼을 이용하여 3개의 분획을 얻은 후 각각 3개의 분획물에 대하여 세포독성을 검증하고 이들 분획물이 독성을 나타내지 않는 범위에서 NO의 활성 및 superoxide의 활성을 검증하였더니 3개의 분획 중에서 n-hexane : acetone의 비가 1:1에서 얻은 분획이 NO 및 superoxide의 생성을 억제시켰다 (Fig. 1). 3개의 분획 중에서 활성이 있는 추출 물질의 세포독성을 MTT assay 방법으로 검증하였더니 호도 추출물의 양이 250 µg/ml보다 높을 때 세포독성이 발견되었다.

호도 추출물질이 RAW 264.7 세포주의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였더니 NGMMA를 처리할 때와 같은 방법으로 호도 추출물 100 µg/ml 처리하였을 때 RAW

264.7 세포주의 NO 생성이 감소하였고, 호도 자체는 NO 생성이 대조군과 동일하게 나타났다 (Fig. 3). 호도 추출물질을 IFN-γ (10 U/ml) 및 LPS (10 ng/ml)와 같이 세포주에 처리하면 세포생존율이 추출물질을 처리하지 않을 때보다 거의 같거나 약간 증가됨을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

호도 추출물질이 NO의 생성을 억제시키는 지 아니면 생성된 NO를 제거시키는지 Northern 과 Western 방법으로 조사하였더니 그 결과 호도 추출물질은 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다 (Fig. 5, 6). 본 연구에서는 lucigenine을 이용한 화학발광법으로 호도 추출물이 RAW 264.7 세포주의 superoxide 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였더니 PMA에 활성화된 세포주는 다량의 superoxide를 분비하였다. 그러나, 호도를 전 처리한 세포주는 superoxide의 생성이 전 처리하지 않은 것과 비교하여 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 7).

이상의 결과로 볼 때 호도추출물은 NO 및 Superoxide의 생성을 효과적으로 조절할 수 있는 바, 만성염증의 개선 및 병원미생물과 종양세포에 대한 방어물질로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 호도가 활성화된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 및 superoxide의 생성을 조절할 수 있는지를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. IFN-γ (10 U/ml) 및 LPS (10 ng/ml)에 의해서 활성화된 RAW264.7 세포주는 24 시간 후에 세포생존율이 대조군과 비교하여 80 %로 감소하였으나, 호도 추출물질을 처리한 세포주의 세포생존율은 추출물질을 처리하지 않을 때보다 증가하였다.

2. 호도 추출물질은 활성화된 RAW264.7 세포주의 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시켰다.

3. 호도 추출물질은 RAW264.7 세포주의 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제시켜 NO의 생성을 감소시켰다.

4. 호도 추출물질은 RAW264.7 세포주의 superoxide 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 호도 추출물질은 NO 및 Superoxide의 생성을 효과적으로 조절할 수 있는 바, 만성염증의 개선 및 병원미생물과 종양세포에 대한 방어물질로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林社, pp 183, 194, 195, 1995.
2. 申佶求. 申氏本草學. 서울 : 壽文社, pp 63-65, 1989.
3. 新編中藥大辭典. 新文豐出版公社, pp 1348-1349, 1982.
4. 楊醫普. 中醫學 問答. 北京 : 人民衛生出版社, p 544(上), 365(下), 1985.
5. 서울대학교 의과대학. 中藥學. 서울 : 서울대학교출판부, p 130, 1986.
6. 王冰. 黃帝內經(素問). 서울 : 高文社, pp 91, 166, 229, 326, 1977.
7. 張慶榮 : 中醫“正氣”概念探析. 中醫雜誌 32(1) : 60, 1991.
8. 徐復霖. 脾胃理論與臨床. 湖南 : 湖南科學技術出版社, pp 5-8, 40-42, 327-330, 1990.
9. 楊寶仁. 臨床的中藥治療. 河北 : 河北科學技術出版社, pp 1-24, 1992.
10. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社, p 53, 1985.
11. 李淵臺. 최신 中藥學. 서울 : 集文堂, pp 5-8, 33, 204, 215, 382-384, 1982.
12. 이종훈. 병원미생물학. 서울 : 壽文社, pp 171-235, 1992.
13. Lin J. Y., and K. Chadee. : Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolyca* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol* 148 : 3999-4005, 1992.
14. Moncada S., R. M. J. Palmer, and E. A. Higgs. : Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 43 : 109-142, 1991.
15. Lowenstein C. J., and S. H. Snyder. : Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell* 70 : 705-707, 1992.
16. Knowles R. G., and S. Moncada. : Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci* 17 : 399-402, 1992.
17. Nathan, C., Xie, Q.-W. : Regulation of the biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem* 269 : 13725-13728, 1994.
18. Marletta, M.A. : Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem* 268 : 12231-12234, 1993.
19. Nathan, C.F., Hibbs, J., Jr. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol* 3 : 65-70, 1991.
20. Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D. : Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261 : 1445-1448, 1993.
21. Collotta F, Re F, Pollantaruti N, Sozani S, and Mantovani A. : Modulation of granulocytes survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80 : 2012, 1992.
22. Solary E, Bertrand R, Khon KW, and Pommier Y. : Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 81 : 1359, 1993.
23. Martin SJ, Bradley JG, and Cotter TG. : HL-60 cells induced to differentiate toward neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* 79 : 448, 1990.
24. Collins SJ. : The HL-60 promyelocytic leukaemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 70 : 1233, 1987.
25. Chao C. C., S. Hu, T. W. Molitor, E. G. Shaskan, and P. K. Peterson. : Activated microglia mediate neuronal cell injury via

- a nitric oxide mechanism. *J. Immunol* 149 : 2736-2741, 1992.
26. Flitney F. W., I. L. Megson, L. M. Thomson, G. D. Kennovin, and A. R. Butler. : Vasodilator response of rat isolated tail artery enhanced by oxygen-dependent, photochemical release of nitric oxide from iron-sulphur-nitrosyls. *Br. J. Pharmacol* 117 : 1549-1557, 1996.
 27. Manthey C. L., P. Y. Perera, C. A. Salkowski, and S. N. Vogel. : Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol* 152 : 825-831, 1994.
 28. Gebicke-Haerter P. J., J. Bauer, A. Schobert, H. : Northoff. Lipopolysaccharide-free conditions in primary astrocyte cultures allow growth and isolation of microglial cells. *J. Neurosci.* 9 : 183-194, 1989.
 29. Green S. J., R. M. Crawford, J. T. Hockmeyer, M. S. Meltzer, and C. A. Nacy. : Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol* 145 : 4290-4297, 1990.
 30. 안돈희 : 한국인의 사망원인. *대한의학협회지* 36(3) : pp 292-299, 1993.
 31. 김진복 : 암면역학과 면역요법. *대한면역학회지* 8(1) : pp 73-76, 1986.
 32. 김동길 : 면역요법의 최근동향. *대한의학협회지* 23(9) : p 762, 1980.
 33. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. *東醫病理學*. 서울 : 高文社, pp 68-90, 1990.
 34. 夏潤文 : 韓國正常人末梢血液淋巴球的 Natural Killer(NK) 活動値에 關한 研究. *대한의학협회지* 24(6) : pp 503-508, 1981.
 35. 寶國祥 : 胡桃仁治何種耳, 腦作鳴. *中醫雜誌* 32(5) : 57, 1991.
 36. Snyder S. H., and D. S. Bredt. : Biological roles of nitric oxide. *Scientific American Review* 28-35, 1992.
 37. Jun C. D., S. J. Park, B. M. Choi, H. J. Kwak, Y. C. Park, M. S. Kim, and H. T. Chung. : *Cell. Immunol* 176 : 41-49, 1997.
 38. Lin K. T., J. Y. Xue, F. F. Sun, and P. Y-K Wong. : Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 230 : 115-119, 1997.
 39. Lee S. C., W. Liu, D. W. Dickson, C. F. Brosnan, and J. W. Berman. : Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 β . *J. Immunol* 150 : 2659-2667, 1993.