

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

박정운 · 문석재 · 문 구 · 원진희*

Effects of Seman Armenicae and Radix Trichosanthis on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells

Joung-Un Pak, Seok-Jae Moon, Goo Moon, Jin-Hee Won*

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

Macrophage play a major role in host defence against infection and tumor development and this activity is regulated through the production of several mediators. In particular, the production of NO by macrophages mediates killing or growth inhibition of tumor cells, bacteria, fungi and parasites. However, over-expression of iNOS by various stimuli, resulting in over-production of NO, contributes to the pathogenesis of septic shock and some inflammator and auto-immune disease. Therefore, it would be valuable to develop potent and selective inhibitors of for potential therapeutic use. Thus the agent that suppres the expression of iNOS mRNA or enzyme protein will be usefull for the prevention of various diseases. We are intersted in identifying selective inhibitors of iNOS which might be useful intreating inflammatory human diseases.

In summary, we have demenstrated that scopoletin, isolated from Seman Armenicae and Radix Trichosanthis the production of NO induced by IFN- γ plus LPS in RAW 264.7 macrophages. The mechanism for the inhibition of NO production was due to suppression of the expression of iNOS mRNA or enzyme protein.

Key words : RAW 264.7, iNOS, Superoxide

* 원광대학교 한의과대학 비계내과학교실

I. 緒 論

행인(*Seman Armenicae*)은 架子科(가자과 : *Rosaceae*)에 속하는 落葉喬木인 살구나무 및 同屬 近緣植物의 成熟한 果實로 苦杏仁, 杏核仁, 杏子 等の 異名을 가지고 있다. 杏仁의 性味는 苦, 微溫, 小毒하고, 止咳定喘, 潤腸通便 等の 效能이 있어 風寒 및 風熱咳嗽, 燥熱咳嗽, 肺熱喘咳, 潤腸便秘 等の 病症을 치료한다¹⁻²⁾.

과루인(*Radix Trichosanthis*)은 葫蘆科(박과 : *Cucurbitaceae*)에 속한 多年生의 攀援性 草質 本人 하늘다리 및 同屬 近緣植物의 果根으로 天花粉, 樓根, 蕪根, 瑞雪, 百藥 等の 異名을 가지고 있다. 瓜蕪根의 性味는 苦, 微甘, 寒, 無毒하고 清熱生津, 清肺化痰, 消腫排膿 等の 效能의 있어 發病傷津, 口乾煩渴, 消渴, 肺熱燥咳, 癰腫瘡瘍 等の 病症을 치료한다¹⁻²⁾.

과루인은 *in vitro*에서 大腸菌, 痢疾菌, 變形菌에 대하여 抑制作用이 있고, 皮膚真菌에 대한 抑制作用이 있으며 煎劑(20%)는 복수암세포에 대하여 抗癌 및 殺傷作用이 있고, 행인은 寄生蟲을 殺滅하는 작용과 *in vitro*에서 장티푸스, 피리장티푸스 等の 殺菌作用이 있다고 보고되었다³⁾.

韓醫學에서의 疾病의 發生은 《黃帝內經·素問》 刺法論에 “正氣內存 邪不可干” 評熱病論에 “邪之所湊 其氣必虛”라 한 바와 같이 正氣는 人體의 正常的인 免疫機能을 代表하며 正氣가 虛하면 免疫機能도 저하된다. 따라서 질병의 發生은 外感이나 內傷七情, 飲食失調, 房勞過多 등과 관계가 있으며 그 病機는 人體臟腑陰陽氣血이 失調한데 外因이나 痰結, 濕聚, 氣滯, 血瘀 등이 相搏하여 發病한다고 보고 있다⁴⁻⁷⁾.

현재 밝혀진 Nitric oxide (NO)는 혈관계, 신경계 및 면역계에서 다양한 역할을 수행하고

있는 것으로⁸⁾ NO는 NO synthase(NOS)라는 효소에 의하여 발생된다. NOS는 크게 주로 신경계와 내피세포에서 발견되는 것과 주로 침입한 미생물이나 종양세포에 대해 방어 물질로서 작용을 하는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾.

생체 내에서 NO의 역할은 아주 다양하다. NO는 동맥이나 정맥 등 혈관과 자궁의 이완에 관여하며 신경계 및 면역작용과 유전자 발현의 조절에도 관여함이 밝혀졌다^{12, 13)}. 또한 다량의 NO는 세포내 기생 병원미생물 뿐만 아니라 같은 세포의 기생 병원미생물에 대한 방어 기능과 많은 종양세포들에 세포독성을 나타낸다¹⁴⁻¹⁶⁾. 그러나 병원미생물이 사멸된 뒤에도 계속해서 생성되는 NO는 숙주조직에 큰 손상을 가져올 수 있음이 증명되었다. 또한 NO는 면역세포의 분화 및 증식과 세포를 사멸시키는 특성을 갖고 있음이 thymocyte, spleen 및 bone marrow 등에서 밝혀지게 되었다¹⁷⁻²⁰⁾.

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 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

Superoxide는 주로 NADPH oxidase에서 주로 분비되는 산화력이 큰 free radical로 알려져 있다. NO와 같이 superoxide는 면역세포의 면역 작용에 중요한 역할을 수행하지만 과량으로 분비되는 경우 염증을 유발시킨다¹⁵⁾.

본 실험에서는 연구의 목적은 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포주를 대상으로 행인, 과루인 추출물이 염증의 원인이 되는 NO 및 superoxide의 생성을 효과적으로 조절할 수 있는지를 測定·評價하였던 바 有意性이 있었기

에 그 결과를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

Recombinant mouse interferon gamma(IFN- γ)는 Genzyme사(Munchen, F.R.G.) 제품을 사용하였고 Dulbecoo'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(250ng/ml)이 포함된 DMEM에서 습기가 충분한 5% CO₂ 배양기에서 37℃를 유지하면서 배양하였으며 trypan blue exclusion 방법에 의해 세포의 생존도가 95% 이상인 것을 실험에 사용하였다.

3. 반응질소 중간물질의 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 축적되어 진다. 배양액에 녹아있는 NO₂⁻의 양의 측정은 Green 등²¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1 × 10⁵cell/well 세포를 넣어준 다음 IFN- γ 나 LPS,

또는 다른 시약을 각각의 농도에 따라 배양세포에 첨가하고 48시간동안 배양한 후에 각 well로부터 100 μ 씩의 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. 이 때 amplifier로는 O₂⁻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 자극 시켰다. 호중구는 1 × 10⁶cells/300 μ l, 복강 대식세포는 1-2 × 10⁶cells/300 μ l 으로 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℃를 유지시켜 60분간 측정하였다.

5. Cytotoxicity assay

RAW 264.7 세포를 1×10^6 cell/well이 되도록 조절하여 1ml씩 24-well plate에 분주하고 여러 가지 세포활성물질을 첨가하여 37℃, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 1 mg/ml) 용액 50 μ l/ml를 각 well에 넣고 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 DMSO(dimethylsulfoxide)를 200 μ l/well씩 넣어 MTT formazan을 용해한 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo Instruments, Inc., Japan)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다²²⁾.

6. RNA 추출 및 Northern blotting

RAW 264.7 세포에서 RNA의 추출은 LiCl-urea 방법을 사용하였다. 20 μ g의 RNA에 premix solution(2 μ l 10×MOPS running buffer, 3.5 μ l formaldehyde, 10 μ l formamide)을 가하여 20 μ l로 만든 다음 65℃에서 10분간 방치하였다. 여기에 5 μ l의 gel loading buffer(1.2 μ g 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 20×SSC(3M NaCl, 0.3M sodium citrate-2H₂O)로 세척하고 세척된 겔은 16시간 동안 nylon membrane에 전위시킨 다음 80℃에서 2시간 동안 구웠다. 구운 필터를 플라스틱 백에 넣고 적당량의 hybridization buffer(6×SSC, 10×Denhardt's solution, 50% deionized formamide, 10mM NaHPO₄, 0.5% SDS)를 가하고 42℃에서 3시간 방치한 후, iNOS probe를 섞고 42℃에서 16시간 동안 hybridization을 실시하였다. 필터

를 세척액(2×SSC, 0.5% SDS)으로 세척하고 이를 말린 다음 X-ray 필름에 감광시켰다.

7. Western blotting

Cell lysis buffer 300 μ l을 가한 후 잘 혼합하여 원심분리한다. 원심분리후 상층액은 E-tube로 옮기고 침전물은 버린다. 상층액의 일부를 단백질 정량에 사용하고 나머지는 12% SDS-PAGE 방법에 의해 분리시킨 다음 Electrobolt system을 사용하여 transfer 완충용액에서 250mA로 1시간동안 nitrocellulose filter에 옮겼다. PBS 완충용액으로 5분간 씻고 blocking 용액에 1시간 정도 놓아두었다. 각각의 항체가 들어있는 antiserum을 blocking용액에 1:1000으로 희석하여 처리하여 상온에서 90분 동안 흔들여 준 다음 200ml의 PBS완충용액으로 5분간 3회 씻는다. Rabbit secondary antibody(ECL kit)를 blocking용액에 1:1000으로 희석한 용액을 처리하여 1시간 동안 서서히 흔들여 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. 結 果

1. 행인, 과루인의 추출 및 활성검증

잘 건조된 행인, 과루인 300g를 분쇄하여 각각 4l의 수용액으로 3시간 진탕하고 그 용액을 증발시켜 각각 1l의 농축액을 얻었다. 이 농축액은 물-메탄올을 전계용매로 하는 XAD-2 칼럼으로 분리하여 16.4g의 분획을 얻었다. 이 분획물은 다시 n-hexane : acetone [2:1-1:1-

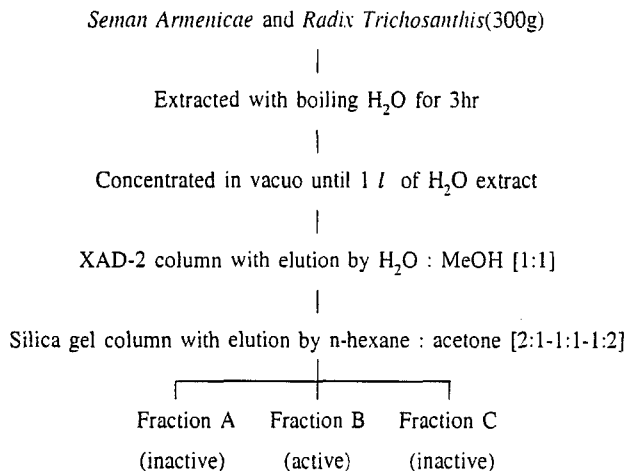


Fig 1. Diagram of extractions of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*. Dried and pulverized aerial parts of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*(300g) were extracted with boiling H₂O(6 l) for 3h and the extract concentrated in vacuo until 1 l of H₂O extract was achieved. This was chromatographed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

1:2)을 전개용매로하는 실리카-겔 칼럼을 이용하여 3개의 분획을 얻었다. 각각 3개의 분획물에 대하여 세포독성을 검증하고 이들 분획물이 독성을 나타내지 않는 범위에서 NO의 활성 및 superoxide의 활성을 검증하였다. 3개의 분획 중에서 n-hexane : acetone의 비가 1:1에서 얻은 분획이 NO 및 superoxide의 생성을 억제시켰다 <Fig. 1>. 따라서, 본 연구에서는 n-hexane : acetone의 비가 1:1에서 얻은 분획물에 대해서 NO 및 superoxide의 활성을 검증하였다.

3개의 분획 중에서 활성이 있는 추출 물질의 세포독성을 MTT assay 방법으로 검증하였다 <Fig. 2>. 행인, 과루인 추출물질을 RAW 264.7 세포주에 10µg/ml-500µg/ml를 24시간 동안 처리한 결과 행인, 과루인 추출물의 양이 250µg/ml보다 높을 때에 세포독성이 발견되었다. 따

라서, 본 연구에서는 추출물의 양이 100µg/ml를 초과하지 않는 범위에서 NO 및 superoxide의 활성을 검증하였다.

2. 행인, 과루인 추출물에 의한 NO 생성 억제효과

행인, 과루인 추출물질이 RAW 264.7 세포주의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. RAW 264.7 세포주는 IFN-γ(10U/ml) 및 LPS(10ng/ml)에 의해서 활성화되면 다량의 NO를 분비한다. 그러나 NO 생성을 저해하는 NGMMA를 IFN-γ(10U/ml) 및 LPS(10ng/ml)와 동시에 처리하면 NO의 생성량은 대조군과 동일하게 나타난다. NGMMA를 처리할 때와 같은 방법으로 행인, 과루인 추출물 100µg/ml를

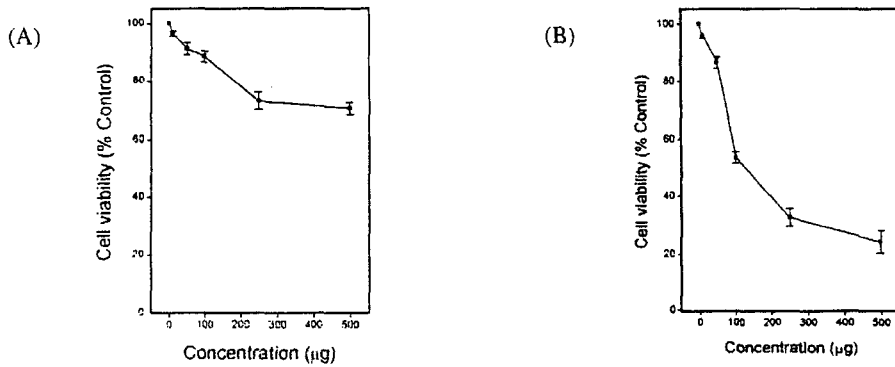


Fig 2. Effects of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) on cell viability of the RAW 264.7cells. RAW 264.7cells(1×10^6 per well plate) were incubated in the presence of different concentration of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis* for 24h. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm SE of three independent experiments.

처리하였을 때 RAW 264.7 세포주의 NO 생성이 감소하였고, 행인, 파루인 자체는 NO 생성이 대조군과 동일하게 나타났다<Fig. 3>. 이와 같은 결과는 행인, 파루인 추출물질이 NO의 생성을 억제하거나 또는 생성된 NO를 제거하는 작용을 하는 것으로 볼 수 있다.

RAW264.7 세포주를 IFN- γ (10 U/ml) 및 LPS(10ng/ml)로 활성화시키고 24시간 후에 세포 생존율을 대조군과 비교하였을 때 세포 생존율이 약 80% 정도로 감소하였다. 그러나 NO 생성을 저해하는 NGMMA를 동시에 첨가하면 세포생존율은 대조군과 동일하게 나타난다. 한

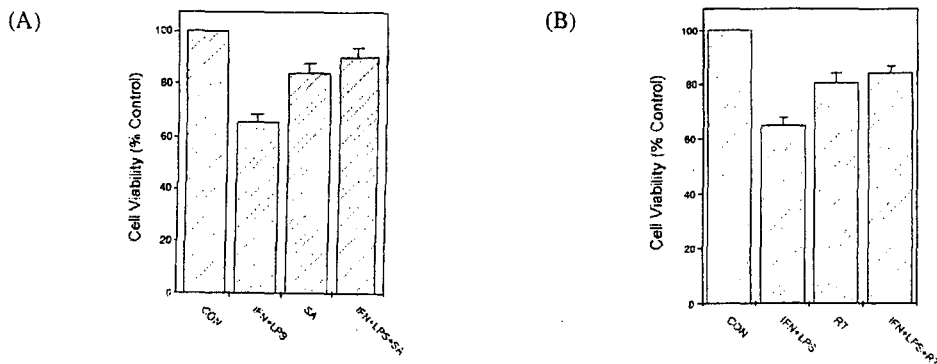


Fig. 3. Effects of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) on NO production by IFN- γ plus LPS-activated RAW 264.7cells. RAW 264.7cells(1×10^6 per well plate) were incubated with or without IFN- γ (5U/ml) plus LPS(10ng/ml) for 24h in the presence or absence of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*(100 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.

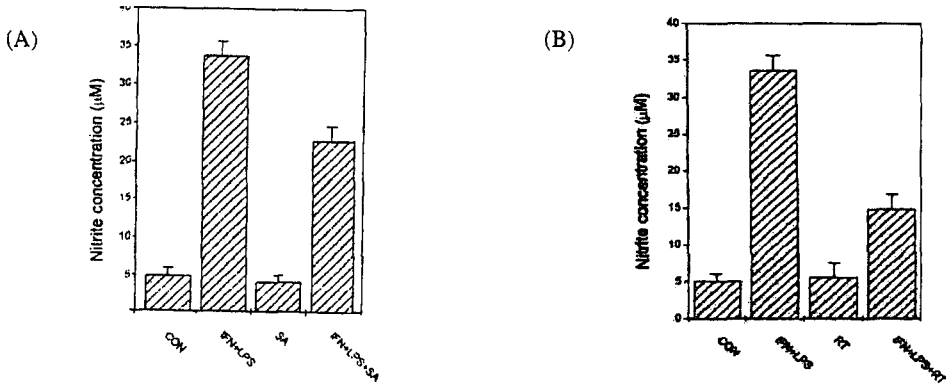


Fig. 4. Effects of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) on IFN- γ plus LPS-induced cell death in RAW 264.7cells. RAW 264.7cells(1×10^6 per well plate) were incubated with or without IFN- γ (5 U/ml) plus LPS(10ng/ml) for 24h in the presence or absence of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*(100 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.

편, 행인, 파루인 추출물질을 IFN- γ (10 U/ml) 및 LPS(10ng/ml)와 같이 세포주에 처리하면 세포 생존율이 추출물질을 처리하지 않을 때보다 거의 같거나 약간 증가됨을 볼 수 있었다<Fig. 4>. 이와 같은 결과가 얻어진 것은 행인, 파루인 추출물질이 NO 생성 억제제인 NGMMA와 동일한 작용을 나타내기 때문으로 생각되어 진다.

행인, 파루인 추출물질이 NO의 생성을 억제시키는지 아니면 생성된 NO를 제거시키는지 Northern 과 Western 방법으로 조사하였다. 그 결과 행인, 파루인 추출물질은 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다<Fig. 5, 6>. 즉, 행인, 파루인 추출물질은 다량의 NO를 생성하는 효소인 iNOS 발현을 효과적으로 억제시켜 NO의 생성이 감소되었던 것으로 사료된다.

염증상태에 있는 대식세포는 NO외에 다량의 superoxide를 생성한다. 이렇게 발생한 superoxide는 NO와 반응하여 보다 세포독성이 강한 peroxynite를 생성하여 주세포를 사멸시키거나 주위의 조직을 산화시킨다. Superoxide는 주세포에 존재하는 superoxide dismutase에 의

해서 H₂O₂로 전환되고 이것은 catalase에 의해서 무해한 H₂O로 전환된다. 그러나, 두 효소가 처리할 수 없을 정도의 다량의 superoxide가 생성되면 주세포에 큰 손상이 초래된다. 본 연구에서는 lucigenine을 이용한 화학 발광법으로

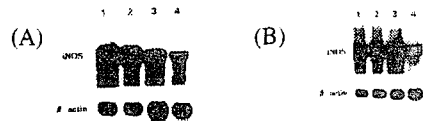


Fig. 5. Northern blot analysis of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) from cell lysates obtained from IFN- γ plus LPS-activated RAW 264.7cells. RAW 264.7cells(1×10^6 per well plate) were incubated with IFN- γ plus LPS in the presence or absence of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*(100 μ g/ml) for 12h. Lane 1: IFN- γ +LPS, Lane 2: IFN- γ +LPS+10 μ g/ml *Seman Armenicae*, Lane 3: IFN- γ +LPS+50 μ g/ml *Seman Armenicae*, Lane 4:IFN- γ +LPS+100 μ g/ml *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*.



Fig. 6. Western blot analysis of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) 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 *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis* (100 $\mu\text{g/ml}$) for 16h. 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 $\mu\text{g/ml}$ *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*, Lane 3; IFN- γ +LPS+50 $\mu\text{g/ml}$ *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*, Lane 4; IFN- γ +LPS+100 $\mu\text{g/ml}$ *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis*.

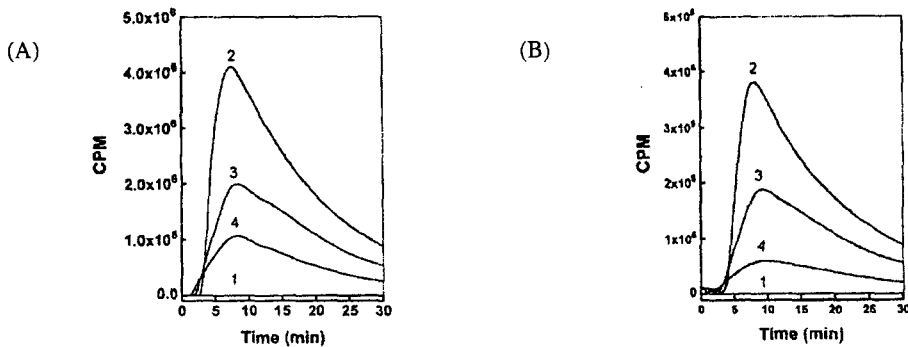


Fig. 7. Effects of *Seman Armenicae*(A) and *Radix Trichosanthis*(B) on superoxide generation by PMA in RAW 264.7. RAW 264.7 cells (1×10^6 per well plate) were incubated without or with *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis* at indicated doses for 6h. Then cells were washed for three times with HBSS, resuspended in VBS containing 10 μM of lucigenin, and stimulated with PMA (200 nM). Superoxide formation was monitored by six-channel luminometer for 30min.

행인, 과루인 추출물이 RAW 264.7 세포주의 superoxide 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. PMA에 활성화된 세포주는 다량의 superoxide를 분비한다. 그러나, 행인, 과루인을 전 처리한 세포주는 superoxide의 생성이 전 처리하지 않은 것과 비교하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 7).

IV. 고찰

疾病으로 인한 死亡原因이 過去の 傳染性疾患에서 成人病과 癌疾患 등의 非傳染性疾患으로 疾病의 構造가 變化하고 있으며, 특히 平均壽命의 增加, 環境的要因 등이 癌의 發生頻度を 높이고 있고, 診斷技術의 發達로 과거에는 찾아내지 못하던 다양한 癌疾患을 探出해 내고 있다^{21,22}.

질병은 正氣와 邪氣 사의의 평형이 결정하는데 대부분 正氣不足과 각 臟腑機能의 失調가

內在的인 根據이며, 邪氣는 다만 疾病發生의 중요한 조건이다²³⁻²⁵).

腫瘍發生도 주로 正氣가 不足하고 邪氣가 停滯함으로써 氣滯血瘀하고 痰凝毒聚하며 膠結하고 蘊鬱하여 마침내 腫塊가 되는 것이, 正氣가 虛損 특히 氣血陰陽의 허손이 주요한 원인이라 하였다^{26,27}).

免疫이란 外部에서 들어오는 異物質에 대해 宿主를 保護하려는 현상으로 抗原刺戟에 의해 抗體가 만들어지는 免疫反應을 抗體媒介免疫 또는 體液性免疫이라 하고 抗原刺戟을 받은 T 淋巴球가 만들어 낸 여러 단백질에 의한 免疫反應을 細胞媒介免疫 또는 細胞性免疫이라 한다. 免疫反應의 특수성은 自己와 非自己를 구별, 特異性, 그리고 記憶力인데, 自己와 非自己를 구별하는 능력이란 자신이 가지고 있는 물질에 대해서는 免疫反應을 일으키지 않고 異物質에 대하여만 免疫反應을 일으키는 能力이고 特異性이란 예를 들어 豫防接種을 받은 病原菌에 대해서만 예방능력을 가지는 特殊性을 의미하고, 記憶力이란 한번 경험한 異物質을 오랜 동안 또는 平生을 두고 잊지 못하는 현상이다. 行動分子로 抗體를 만들어 항원과 결합하면 輔體의 여러 성분들이 활성화되고 그 결과로 抗體가 결합된 세포 또는 세균이 破壞되거나 食細胞의 食食作用이 항진된다^{29,30}).

細胞媒介免疫反應의 中樞的 역할을 하는 세포는 T 淋巴球로서 보조(helper) T 淋巴球, 抑制(suppressor) T 淋巴球, 細胞毒性(cytotoxic) T 淋巴球 그리고 遲延型過敏反應(DTH) T 淋巴球 등으로 구성되어 있는데, 補助 T 淋巴球는 여러 종류의 cytokine을 생존하고 細胞毒性 T 淋巴球가 잘 생기도록 도와준다. 抑制 T 淋巴球는 필요이상으로 抗體 또는 細胞毒性 T 淋巴球가 생산되는 것을 牽制하며 적절한 免疫反應이 일어나도록 조절하는 기능을 갖고 補助 T 淋巴球와

抑制 T 淋巴球는 개체의 免疫反應을 조절하여 免疫學的 平衡을 유지하고 있어 이 平衡이 깨지면 疾病에 걸리게 된다. 細胞毒性 T 淋巴球는 표준이 되는 세포와 직접 접촉하여 標的細胞(target cell)를 파괴하는데 바이러스 감염세포나 암세포 등을 標的細胞로 공격한다. 遲延型過敏反應 T 淋巴球는 기능적으로는 巨食細胞單球系列 세포들을 염증부위로 끌어 모으고 活性化시켜 宿主防禦機轉의 일종인 遲延型過敏反應을 일으키게 하는 T 淋巴球이다^{28,29}).

抗體媒介免疫反應은 주로 외부물질에 효과적이며 細胞媒介免疫反應은 각종 기생충, 세포내감염, 암세포 등에 그 기능을 발휘하는데 이와 같은 免疫機構는 우리 몸을 계속적으로 감시하여 비정상적인 腫瘍細胞가 생기면 이 세포들을 인식하여 파괴시키는 免疫監視機能이 있다. 腫瘍면역에는 T 細胞 仲介免疫이 中樞的인 역할을 하며 細胞毒性 T 細胞, 自然殺害細胞, 巨食細胞 및 抗體가 관여한다^{27,29,30,34}).

免疫反應이 저하된 경우에 腫瘍發生빈도가 높은데, 韓醫學에서는 生體의 氣血과 經絡, 臟腑能力을 높여서 腫瘍細胞를 殺害하거나 抑制하는고자 한다. 따라서 腫瘍治療의 大原則은 扶正과 祛邪로 辨證을 통해 이 둘을 잘 결합하는 것은 腫瘍治療에 있어 중요한 方便이다. 扶正은 滋陰生津, 溫腎壯陽, 益氣健脾, 補血鎮精 등의 方法으로 扶正以祛邪하는 것이고 祛邪는 祛散風邪, 清熱解毒, 活血化瘀, 滌痰化濁, 利氣軟堅 등의 구체적 方法으로 邪祛正自安의 뜻이 있다^{25,26,32}).

NO는 혈관계에서는 혈관내피세포에 의해 분비되어 인접한 근세포에 영향을 주어 혈관이완과 혈류를 조절하는 신호전달자(signalling molecule)로서 작용하며 면역계에 있어서는 활성화된 대식세포(macrophage)나 중성구(neutrophile) 등에 의해 생성되어 외부에서 침

입한 미생물이나 내부에서 발생한 腫瘍細胞의 사멸에 영향을 주는 면역 방어 분자(immune defence molecule)로서 인식되고 있다³⁵⁾. 또한 1988년에는 뇌조직에서 NO-like 인자가 동정되었으며 NO는 새로운 신경전달물질로서 이 분야에서 급속한 연구가 진행되고 있다^{36,37)}.

현재는 NO에 의한 혈관벽의 확장에 의해 내부에서 생성되는 NO를 이러한 drug가 대신할 수 있는 것으로 생각되어지고 있다³⁸⁾. 뿐만 아니라 NO gas의 흡입으로 호흡기 질환과 관련된 고혈압을 치료하는 등 선진국에서는 이미 NO를 이용한 임상적 응용측면을 고려하고 있는 실정이다^{35,38)}.

NO가 면역계에서 중요한 방어분자로서 작용하고 있다는 것이 알려지면서 면역조절 분야에서는 유도성 NOS의 발현기전과 그 조절기전에 관하여 많은 연구자들이 관심을 갖게 되었다. 특히 생체에서 T 세포와 탐식세포간의 상호작용을 이해하는데 관건이 되는 연구일 뿐 아니라 탐식세포의 self-regulation의 기전을 이해하는데 중요한 자료가 되는 세포활성물질인 인터페론-감마(interferon-gamma)와 LPS의 신호전달기전에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다³⁹⁻⁴²⁾. 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 腫瘍細胞 뿐 아니라 NO를 생성하는 세포 자신과 주위의 세포, 조직이나 기관에 심각한 손상을 초래할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다⁴³⁾. 예를 들면 간조직에서는 superoxide radical과 반응하여 peroxinitrite를 형성하여 조직 손상을 초래하는 독성이 매우 강한 물질로 변환된다^{43,44)}. 따라서 만일 생체에서 발생하는 필요이상의 NO를 억제한

다면 생체에 많은 유익을 가져다 줄 수 있을 것이다. 특히 박테리아 세포벽 성분인 LPS와 같은 물질에 의해 유발되는 폐혈증과 같은 병은 그 원인이 免疫反應의 부재현상에 기인하는 것이 아니라 오히려 이러한 병인에 대하여 과민하게 반응하는 면역계에 의해 유발되는 疾病이다. 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 있다^{46,47)}.

본 실험에서는 잘 건조된 행인, 과루인 300g의 농축액을 물-메탄올을 전개용매로 하는 XAD-2 칼럼으로 분리하여 16.4g의 분획을 얻은 후 이 분획물은 다시 n-hexane : acetone [2:1-1:1-1:2]을 전개용매로하는 실리카-겔 칼럼을 이용하여 3개의 분획을 얻었다. 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 검증하였다. 행인, 과루인 추출물질을 RAW 264.7 세포주에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 24시간 동안 처리 한 결과 행인, 과루인 추출물의 양이 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 높을 때에 세포독성이 발견되었다<Fig. 2>.

행인, 과루인 추출물질이 RAW 264.7 세포주의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였더니 NGMMA를 처리할 때와 같은 방법으로 행인, 과루인 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때

RAW 264.7 세포주의 NO 생성이 감소하였고, 행인, 과루인 자체는 NO 생성이 대조군과 동일하게 나타났다<Fig. 3>.

RAW264.7 세포주를 IFN- γ (10 U/ml) 및 LPS (10ng/ml)로 활성화시키고 24시간 후에 세포 생존율을 대조군과 비교하였을 때 세포 생존율이 약 80% 정도로 감소하였다. 그러나 NO 생성을 저해하는 NGMMA를 동시에 첨가하면 세포생존율은 대조군과 동일하게 나타난다. 한편, 행인, 과루인 추출물질을 IFN- γ (10 U/ml) 및 LPS(10ng/ml)와 같이 세포주에 처리하면 세포 생존율이 추출물질을 처리하지 않을 때보다 거의 같거나 약간 증가됨을 볼 수 있었다<Fig. 4>.

행인, 과루인 추출물질이 NO의 생성을 억제시키는지 아니면 생성된 NO를 제거시키는지 Northern 과 Western 방법으로 조사하였더니 행인, 과루인 추출물질은 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다<Fig. 5, 6>.

Lucigenine을 이용한 화학 발광법으로 행인, 과루인 추출물이 RAW 264.7 세포주의 superoxide 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였더니 PMA에 활성화된 세포주는 다량의 superoxide를 분비한다. 그러나, 행인, 과루인을 전 처리한 세포주는 superoxide의 생성이 전 처리하지 않은 것과 비교하여 농도 의존적으로 감소하였다<Fig. 7>.

이러한 이유 때문에 생체에서 실질적으로 일어나는 iNOS의 발현과 조절기전의 연구는 NO의 임상적 응용 및 치료의 중요한 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 행인, 과루인이 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(10ng/ml)에 의해서 활성화된 RAW264.7 세포주는 24시간 후에 세포생존율이 대조군과 비교하여 80%로 감소하였으나, 행인, 과루인 추출물질을 처리한 세포주의 세포생존율은 추출물질을 처리하지 않을 때보다 증가하였다.
2. 행인, 과루인 추출물질이 활성화된 RAW264.7 세포주의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하여 행인, 과루인 추출물질이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 발견하였다.
3. 행인, 과루인 추출물질은 RAW264.7 세포주의 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제시켜 NO의 생성이 감소됨을 발견하였다.
4. 행인, 과루인 추출물은 RAW264.7 세포주의 superoxide 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.

참 고 문 헌

1. 辛民教：臨床本草學，永林社，pp.776-778，1997.
2. 申佶求：申氏本草學，壽文社，pp.283-284，564-565，1988.
3. 中藥大辭典：서울，도서출판 정담，p.471，5772，1998.
4. 楊維傑 編：黃帝內經素問靈樞註釋，서울，成輔社，pp.3. 266，1980.
5. 傅 芳：中醫免疫思想及成就，中醫雜誌，25(11)：55-58，1984.
6. 申天浩 譯：癌瘤防治研究，서울，新光文化史，pp.25-29，1984.

7. 上海中醫醫學原編：實用中醫內科學，上海。上海科學技術出版社，pp.621-635, 1981.
8. Lin J. Y., and K. Chadee : Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148:3999-4005, 1992.
9. Moncada S., R. M. J. Palmer, and E. A. Higgs: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142, 1991.
10. Lowenstein C. J., and S. H. Snyder : Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell* 70:705-707, 1992.
11. Knowles R. G., and S. Moncada: Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci.* 17:399-402, 1992.
12. Nathan, C., Xie, Q.-W. : Regulation of the biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728, 1994.
13. Marletta, M.A. : Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234, 1993.
14. Nathan, C.F., Hibbs, J., Jr. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 65-70, 1991.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Martin SJ, Bradly JG, and Cotter TG. : HL-60 cells induced to differentiate toward neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* 79:448, 1990.
19. Collins SJ. : The HL-60 promyelocytic leukaemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 70:1233, 1987.
20. 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.
21. 이문호 외 : 최근 한국의 질병변천, 대한의학협회지, 32(3) : 283-290, 1989.
22. 안돈희 : 한국인의 사마원인, 대한의학협회지, 36(3) : 292-299, 1993.
23. 김완희 외 : 한의학의 형성과 체계, 대구, 중문출판사, pp.192-200, 1991.
24. 김현재 외 : 한의학사전, 서울, 성보사, p.204, 1983.
25. 안덕균 역 : 면역과 한방, 서울, 도서출판 여린책들, pp.1-13, 1994.
26. 홍원식 역 : 현대중공의 암치료, 서울, 영문사, pp.286-287, 342-388, 1984.
27. 감상용 외 : 각종 암세포주에 대한 SB-31의 항암효과, 대한암학회지, 26(6) : 959-963, 1994.

28. 하대유 외 : 면역반응, 진균감염 및 종양증식에 있어서 Vinblastine 감수성 억제 T입파구의 역할, 대한면역학회지, 18 : 43-53, 1996.
29. 홍원선 : 비특이 면역증강제, 대한의학협회지, 36(8) : 949-954, 1993.
30. 홍원선 외 : 랫트의 다장기 발암모델에 있어 자연살해활성의 변화, 대한면역학회지, 13(1) : 43-50, 1991.
31. 吏知洪 : 淺談祖國醫學中正氣與現代免疫學的關係, 新中醫, 9期 : 1-2, 1988.
32. 徐用生 外 : 扶正培本法在腫瘤臨床的應用, 浙江中醫學院, 12(3) : 22-23, 1988.
33. 陳 騎 外 : 扶正抗癌液對移植瘤小鼠免疫功能的影响, 中國中西醫結合雜誌, 13(3) : 171-172, 1993.
34. Sell, S. : Cell-Mediated Immunity in Vitro in Immunology Immunopathology and Immunity(third edition), Maryland, Harper and Row Publishers, pp.144-166, 1980.
35. Snyder S. H., and D. S. Bredt : Biological roles of nitric oxide. Scientific American Review. 28-35, 1992.
36. Simmons M. L., S. Murphy : Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J. Neurochem. 59:897-905, 1992.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Notony A : Immune reactions elicited or modulated by endotoxin. In endotoxin research series, Vol.I. Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions. Nowtony A., J.J. Spizer, and E. J. Ziegler, editors Excerpta Medica, Inc., Belle Mead, NJ. 329-338, 1989.
42. Parker M. M., and parrillo J. E: Septic shock. Hemodynamics and pathogenesis. J. Am. Med. Assoc. 250:3324-3327, 1983.
43. 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.
44. 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.
45. Radi R., J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxydation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch. Biochem. biophys, 1991.
46. Munoz-Fernandez M. A., M. A. Fernandez, and M. Fresno : Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of

- intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 227:301-307, 1992.
47. 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.