

일부 한약재의 생쥐 대식세포 일산화질소와 TNF- α 생산 유도

이성태[†] · 정영란 · 하미혜* · 김성호** · 변명우*** · 조성기***

순천대학교 생물학과, *유용천연자원연구소

전남대 수의학과, *원자력연구소 방사선식품생명공학팀

Induction of Nitric Oxide and TNF- α by Herbal Plant Extracts in Mouse Macrophages

Sung-Tae Yee[†], Young-Ran Jeong, Mee-Hye Ha*, Sung-Ho Kim**,
Myung-Woo Byun*** and Sung-Kee Jo***

Dept. of Biology, and [†]Research Institute of Natural Resource, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

**College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

***Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

Abstract

In this experiment, we show the effects of herbal plant extracts on the production of nitric oxide (NO) and TNF- α . The extracts of *Angelica gigas*, *Astragalus membranaceus*, *Acanthopanax sessiliflorus* and *Houttuynia cordata* had no effect on NO synthesis by itself in mouse macrophage cell line (RAW264.7). However, the stimulation with these extracts in the presence of murine interferon- γ (mIFN- γ) resulted in increased NO synthesis. When these extracts were used in combination with mIFN- γ , there were a marked cooperative induction of NO and TNF- α synthesis in a dose-dependent manner. The same results were obtained in the mouse peritoneal macrophages used. The optimal concentration of these extracts on NO synthesis was shown at 100 μ g/mL with 100 U/mL of mIFN- γ . NO synthesis was inhibited by *N*^G-monomethyl-L-arginine. When cell lines were treated with extracts, the expression of inducible NO synthetase (iNOS) was markedly increased in RT-PCR analysis. In addition, synergy between mIFN- γ and extracts was dependent on extracts-induced tumor necrosis factor- α (TNF- α). These results suggest that water extracts of herbal plants can induce iNOS, NO and TNF- α synthesis of mouse macrophage cell line (RAW264.7) and peritoneal macrophages in combination with mIFN- γ .

Key words: nitric oxide, inducible nitric oxide synthetase, RAW264.7, TNF- α

서 론

일산화질소(nitric oxide)는 반감기가 6~60초 정도의 불안정한 무기가스로, 사람을 포함한 고등동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 합성되며, 합성된 일산화질소는 생체 내의 신호 전달 물질로 수많은 생리적 과정에 관여한다고 알려져 있다(1). 즉, 순환기계에서 혈관 확장 물질로 혈관을 확장하고 혈관 내피세포의 증식을 억제하며 혈소판의 기능을 막아 피가 응고되는 것을 방지하는 항동맥경화 작용, 중추 신경계와 말초 신경계에서 신경전달 작용, 면역계에서 종양세포나 세포내 기생생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질이다(2,3). 탐식작용을 일으킨 대식세포는 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthetase)를 유도하여 일산화질소를 생산한다(4). Nitric oxide 생성 유도인자는 그람양성균에 있어서 LPS이

며 그람음성균에 있어서는 대식세포의 표면에 존재하는 C3수용체에 작용할 수 있는 물질로 알려져 있다(5). 즉, 대식세포가 탐식한 바이러스(6), 원충, 진균, 리케치아, 세포내 기생성세균 등과 같은 여러 가지 종류의 병원체를 죽이는 과정에 L-arginine-NO계가 관여 한다는 것이 알려져 있다(7). 대식세포의 NOS는 항상 존재하는 것이 아니라 INF- γ , TNF- α 와 같은 여러가지 cytokine과 LPS의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 iNOS라고하며 L-arginine으로부터 다량의 NO를 생산하게 된다(8,9). 생성된 NO는 비특이적 면역세포를 포함한 주변 조직 세포들에 세포독성을 유발하며, 대식세포 자체도 내인성으로 생성된 NO에 의하여 apoptosis 과정의 세포 손상을 받으며, 이는 *N*^GMMA 같은 iNOS억제제에 의하여 차단됨이 보고되고 있다(10).

본 실험에서는 대식세포 생체방어 작용의 하나인 탐식

[†]To whom all correspondence should be addressed

작용 후, 병원체를 죽이는데 필요한 일산화질소 생산에, 한방에서 보편적으로 사용되고 있는 8가지 종류의 한약재가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용된 생쥐(BALB/c)는, 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 구입한 생후 8~12주된 암컷을 사용하였고, 고품사료와 1차증류수를 공급하면서 사육하였다.

세포주 배양법

생쥐 단핵/대식세포 계열의 세포주인 RAW264.7은 한국세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 RPMI1640 배지에 sodium bicarbonate(NaHCO₃, 2 g/L), 항생제(100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin), 50 μ M 2ME(2-mercaptoethanol), 10% FCS(fetal calf serum)를 첨가한 것을 이용하였다.

복강 대식세포의 분리

생쥐복강에 proteose peptone을 2 mL 주사하고 4일 후에 경추탈골로 희생시킨 후, 복강내로 PBS 10 mL을 넣어 세척하는 방법으로 복강내 세포들을 회수하였다. 모인 세포들은 1200 rpm에서 8분간 3번 원심분리하는 방법으로 세척하고, 10% FCS RPMI 1640 배지로 1×10^7 cells/mL로 희석시킨 후 24 well plate에 well당 1 mL씩 분주하여, 37°C CO₂ incubator에 2시간 배양하여 배양기에 부착하게 한 후, 비부착된 세포들은 제거하고 남은 부착세포만을 실험에 사용하였다.

사용시약

RPMI 1640배지, FCS(fetal calf serum)과 antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)회사 제품을 사용하였으며, proteose peptone과 LPS는 Difco Laboratories(Detroit, Michigan, USA)회사 제품을 사용하였다. 그외 시약인 N⁵MMA, 2ME(2-mercaptoethanol), sodium bicarbonate (NaHCO₃), N-1-naphthyl-ethylenediamine와 Sulfanilamide는 Sigma회사 제품을 사용하였다. 효소중합연쇄반응에 사용한 시약은 Promega회사 제품을, TNF α 와 IL-1 β 측정에 필요한 항체는 Pharmingen 회사제품을 사용하였다.

한약재의 추출법

한약재(가자, 당귀, 산사, 어성초, 오가피, 작약, 천궁, 황기)의 물추출물은 다음과 같은 방법에 따라 실시하였

다. 즉, 건조된 시료를 분쇄하고 0.42 mm 체를 통과시킨 다음, 200 g의 시료를 n-hexane으로 5회 반복 추출하여 hexane 추출물을 얻고, 남은 잔사를 상온에서 건조하여 탈지 시료로 사용하였다. 탈지시료의 용매별 추출은, 탈지시료를 methanol과 acetone(ME/AC) 1:1 혼합액 500 mL로 5회 추출하고, 6000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 여과하여 상층액과 잔사로 분리하였다. 이 상층액을 감압 농축하여 증류수 200 mL에 녹인 후, diethyl ether와 ethyl acetate(DE/EA) 1:1 혼합액으로 5회 추출하였으며, sodium sulfide anhydrous로 잔여수분을 제거하고 용매를 증발시켜 DE/EA 추출물을 얻었다. 한편 DE/EA로 추출하고 남은 수층은 농축하여 ME/AC 회분으로 하였다. 열수 추출물의 추출을 위하여 methanol/acetone으로 추출한 잔사를 60°C 열수로 추출한 다음 원심분리한 후 상층액을 농축하여 열수 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 열수 추출물을 동결건조 후, PBS로 50 mg/mL로 희석하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

NO 측정법

안정된 NO 산화물인 NO₂ (nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다(11). 세포배양 상층액을 flat bottom 96well plate에 100 μ L씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1:1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 32 μ M에서부터 0.25 μ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

LPS 농도 측정법

한약재 추출물에 포함되어 있을지도 모르는 LPS의 양은 Amebocyte lysate assay(E-TOXATE, Amebocyte lysate from *Limulus polyphemus*, Sigma)로 측정하였다. LPS농도의 측정 한계치는 10 μ g/mL이었고, 실험에 사용한 추출물 속에는 측정 한계치 이하의 LPS가 들어 있는 것으로 나타났다.

iNOS RT-PCR

대식세포를 한약재 추출물과 함께 4시간 배양한 다음, 세포를 모아 원심분리하여 상층액을 제거하고, RNAzol^B을 이용하여 total RNA를 추출하여 역전사반응에 사용하였다. 즉, total RNA 1 μ g을 75°C에서 5분간 변성시킨 후, dNTP(1 mM), oligo(dT)₁₅(0.5 μ g), reverse transcriptase (15 U), RNase inhibitor(0.5 U), RT buffer, MgCl₂(5 mM)와 DEPC처리된 증류수로 최종부피가 20 μ L되도록 하여, 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하여 PCR에 사용하였다. 효소중합연쇄반응은 합성된 2 μ L cDNA

를 주형으로 β -actin과 iNOS의 sense primer와 antisense primer(15 pmole/ μ L), *Taq* polymerase(0.5 U), polymerase buffer와 DEPC처리된 증류수로 최종부피가 20 μ L 되도록 하여 predenaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, 1분, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 35 cycles한 다음, postelongation을 72°C에서 5분하는 조건으로 수행하였다. 효소중합연쇄반응의 product는 20 μ L 씩 2% agarose gel에 loading하여 100V에서 40분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다. 각 primer의 염기서열은 다음과 같다.

iNOS sense 5'-CATGGCTTGCCCTGGAAGTT-TCTCTTCAAAG-3', antisense 5'-GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG-3'; β -actin sense 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', antisense 5'-TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'

TNF- α , IL-1 β 농도 측정

배양한 세포주를 IFN- γ 단독 또는 한약재 추출물과 같이 배양한 상층액을 24시간 후에 회수하여 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) kit로 상층액에 포함된 TNF- α 와 IL-1 β 의 양을 측정하였다. 이때 측정 한계치는 10 pg/mL이었다.

결 과

대식세포주 NO생산

대식세포주인 RAW264.7에 오가피를 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후, 배양액중 대식세포가 생산한 NO로부터 산화된 형태인 NO₂ 농도를 측정한 결과, 무처리 대조군에 비해 1, 10, 100 μ g/mL의 오가피로 처리한 실험군은 유의한 NO₂ 농도 차이가 없었다. 즉, 오가피 단독으로는 대식세포의 NO 생산을 유도할 수 없음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 다음으로, 대식세포의 NO 생산을 유도하는 것으로 알려진 LPS와 오가피를 함께 처리하였을 때 NO 생산이 증가하는지를 알아보았는데, LPS를 단독으로 처리하였을 때의 NO₂ 농도가 10 μ M 정도까지 증가하였지만, 오가피를 같이 처리하였을 때 NO₂ 농도는 높은 농도(10, 100 μ g/mL)에서 오히려 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 즉, 오가피는 LPS로 유도된 대식세포의 NO 생산에 대해 상승작용을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

IFN- γ 상승효과

NO 생산에 미치는 IFN- γ 와 오가피의 상승효과를 알아보기 위하여 IFN- γ 단독 또는 오가피를 같이 첨가하였을 때 NO₂ 농도를 측정하였다. 그 결과 IFN- γ 를 단독으로 처리하였을 때 보다 오가피를 같이 처리하였을 때 NO 생산이 더 많이 유도되었고, 오가피의 농도가 높아질수록

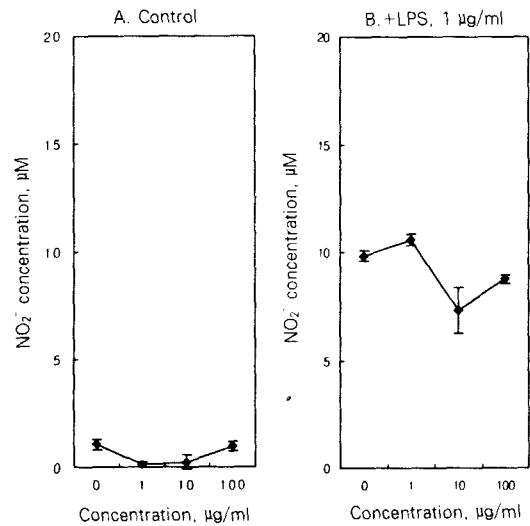


Fig. 1. Effects of *Acanthopanax sessiliflorus*-extract on NO synthesis in RAW264.7 cell lines.

The cells (5×10^5 /well) were cultured without (A) or with (B) LPS (1 μ g/mL). After 48 hr of culture, the amount of NO production was measured by the Griess method. Nitrite released into the medium is presented as the mean \pm S.D.

그 효과는 더 크게 나타나, 오가피 100 μ g/mL에서는 IFN- γ 를 단독으로 처리하였을 때 보다 NO₂ 농도가 약 15배 이상 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 또한 IFN- γ 와 오가피가 NO 생산에 서로 상승적 작용을 하는지 알아 보았다. 그 결과 우선 IFN- γ 가 100 U/mL 일 때 오가피의 농도가 1, 10, 100 μ g/mL로 증가할수록 NO₂ 농도가 현저하게 증가함을 볼 수 있었고, 오가피의 농도가 100 μ g/mL 일 때 IFN- γ 의 농도가 1, 10, 100 U/mL로 증가할수록 NO₂ 농도도 현저하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이것으로 오가피가 IFN- γ 에 의해 유도되는 NO 생산에 상승적 작용을 하는 것을 알 수 있었다.

NO 생산 억제

IFN- γ 와 오가피의 NO 생산에 대한 상승효과가, 오가피를 추출하는 과정에서 오염된 세균 유래의 LPS에 의한 결과 일 수도 있기 때문에, 추출물에 LPS가 혼합되었는지 여부를 검토하였다. 우선 LPS를 같이 첨가하여 상승효과가 있는지를 검토한 결과, 낮은 농도의 LPS와 오가피를 같이 첨가하여도 NO₂ 농도에 대한 상승효과가 나타나지 않았으며, 오가피의 농도가 증가하여도 LPS 단독으로 유도되는 NO₂ 농도보다 오히려 감소하는 경향을 볼 수 있었다(Fig. 3A). 그리고, 직접적으로 오가피 추출물에 대한 LPS 혼합 여부를 알아보기 위해 Amebocyte lysate assay(E-TOXATE, sigma)를 이용하여 LPS농도를 측정하였다(재료 및 방법 참조). 그 결과 오가피 추출물에는 측정 한계치인 10 pg/mL 이하의 LPS가 들어있는 것으로

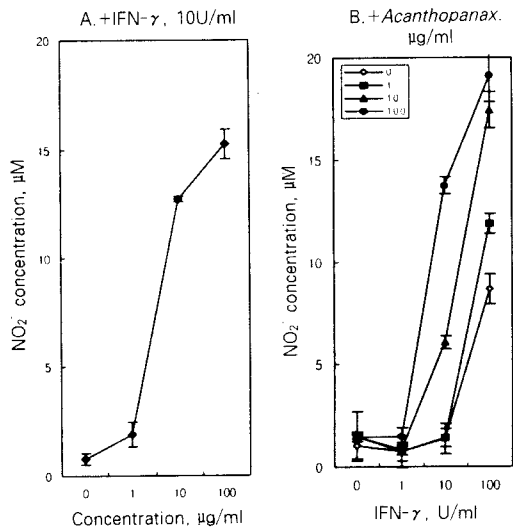


Fig. 2. Dose-dependent effects of *Acanthopanax sessiliflorus*-extract on NO synthesis in IFN- γ -treated RAW264.7 cell lines. The cells (5×10^4 /well) were cultured with various concentrations of extract (A) and IFN γ (B). After 48 hr of culture, the amount of NO production was measured by the Griess method. Nitrite released into the medium is presented as the mean \pm S.D.

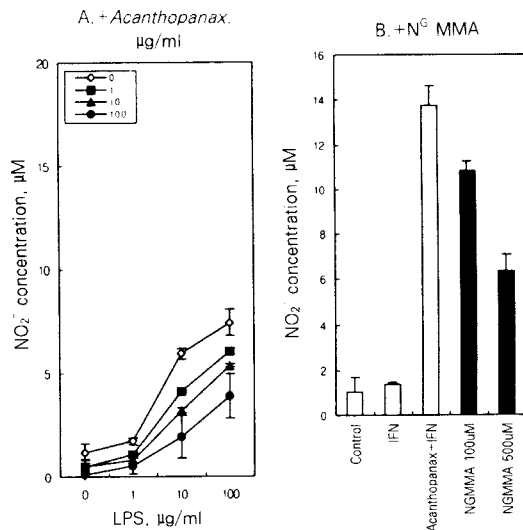


Fig. 3. Effects of *Acanthopanax sessiliflorus*-extract on NO synthesis in RAW264.7 cell lines with various concentrations of LPS (A) and NOS inhibitor. The cells (5×10^4 /well) were cultured with various concentrations of LPS (A) and N⁶MMA (B). After 48 hr of culture, the amount of NO production was measured by the Griess method. Nitrite released into the medium is presented as the mean \pm S.D.

나타났다. 따라서 IFN- γ 와 오가피의 NO 생산에 대한 상승효과는 오가피 추출물 내에 포함된 LPS에 의한 것이 아닌 것으로 생각된다. 다음으로 NO 합성효소(iNOS)의 억제제인 N⁶MMA를 처리하였을 때의 NO 생산을 알아

보았다. 그 결과 N⁶MMA의 농도가 높을수록 IFN- γ 와 오가피로 유도된 NO 생산이 억제되는 것으로 나타나 IFN- γ 와 오가피에 의한 NO 생산이 기존에 알려졌던 NO 생산 경로와 동일한 것으로 생각되었다(Fig. 3B).

당귀, 어성초, 황기의 NO 생산

이러한 결과가 오가피가 아닌 다른 한약재 추출물에 의해서도 나타나는지를 검토하였다. 즉, 오가피 이외의 7 가지 한약재(가자, 당귀, 산사, 작약, 어성초, 황기)를 조사한 결과, 그 중에서 당귀, 어성초, 황기가 동일한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉, 당귀, 어성초, 황기도 단독으로는 NO 생산을 유도하지 못하였지만, IFN- γ 와 같이 배양하였을 때는 상승적 효과를 나타내었다. 즉, IFN- γ 단독보다는 당귀, 어성초 또는 황기를 같이 첨가하였을 때, 각 추출물의 농도가 증가하고 IFN- γ 의 농도가 증가할수록 현저한 상승효과를 나타내었다(Table 1).

복강 대식세포의 NO 생산

이러한 결과가 시험관에서 배양하는 세포주가 아닌 생체내에 존재하는 복강 대식세포에서도 동일하게 나타나는지 살펴보았다. 그 결과 생쥐의 복강에서 분리한 대식세포를 사용하였을 때도 세포주를 이용한 실험과 마찬가지로 당귀, 오가피, 어성초, 황기 단독만으로는 NO 생산이 유도되지 않고, IFN- γ 를 같이 첨가했을 때만 NO 생산이 유도됨을 볼 수 있었다(Table 2). 따라서 세포주와 마찬가지로 복강 대식세포에서 당귀, 오가피, 어성초, 황기가 동일한 NO 생산 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

NO 합성효소 발현

다음으로 NO를 생산하는 효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthetase)의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR법을 이용하여 관찰하였다. 즉, 한약재 추출물과 함께 4시간 배양한 RAW264.7 세포주에서 total RNA를 추출하여 역전사효소로 cDNA를 합성한다음, iNOS의 primer를 이용하여 효소중합연쇄반응(PCR)법으로 iNOS의 mRNA 발현양을 증폭시켜 비교하였다(Fig. 4). 그 결과, 무처리군에서는 iNOS가 유도되지 않았고, IFN- γ 만을 처리한 군에서는 약하게 iNOS 발현이 유도되었다. 그리고, 한약재 추출물을 같이 처리한 군에서는 IFN- γ 만을 처리하였을 때보다, 많은 양의 iNOS 발현이 유도되는 것을 알 수 있었고, 이러한 결과는 NO 생산량과 일치하였다.

TNF- α 생산

한약재 추출물에 의한 NO 생산이, 직접적으로 대식세포의 NO 생산을 유도함으로써 일어나는지 또는 NO 생산을 유도하는 다른 물질의 생산을 유도한 간접적인 결과인

Table 1. Effects of herbal extracts on the NO production from RAW 264.7 cell lines

IFN- γ (U/mL)	<i>Angelica gigas</i> ($\mu\text{g/mL}$)			<i>Houttuynia cordata</i> ($\mu\text{g/mL}$)			<i>Astragalus membranaceus</i> ($\mu\text{g/mL}$)			
	0	1	10	100	1	10	100	1	10	100
0	1.04 \pm 0.63 ¹⁾	1.12 \pm 0.35	0.87 \pm 0.55	1.12 \pm 0.43	1.31 \pm 0.75	1.15 \pm 0.21	0.95 \pm 0.49	1.01 \pm 0.43	1.34 \pm 1.08	1.20 \pm 0.92
1	0.73 \pm 0.25	0.90 \pm 0.05	0.59 \pm 0.29	1.12 \pm 0.19	0.79 \pm 0.38	0.84 \pm 0.08	0.84 \pm 0.25	0.56 \pm 0.13	1.04 \pm 0.21	0.93 \pm 0.00
10	1.37 \pm 0.10	1.37 \pm 0.21	1.95 \pm 0.34	12.20 \pm 0.41	1.29 \pm 0.13	1.51 \pm 0.14	5.65 \pm 0.10	1.23 \pm 0.10	3.62 \pm 0.05	13.79 \pm 0.19
100	8.65 \pm 1.21	7.23 \pm 0.68	14.56 \pm 1.81	18.79 \pm 1.56	6.87 \pm 1.13	13.59 \pm 2.61	18.23 \pm 1.86	8.54 \pm 1.35	16.90 \pm 1.41	20.18 \pm 1.82

¹⁾Values are the mean \pm S.D. in triplicate experiments.

The cells (5×10^4 /well) were stimulated with various concentration of extracts in the presence or absence of IFN- γ . The amount of NO₂ released by RAW264.7 was measured after 48 hr of incubation by Griess method.

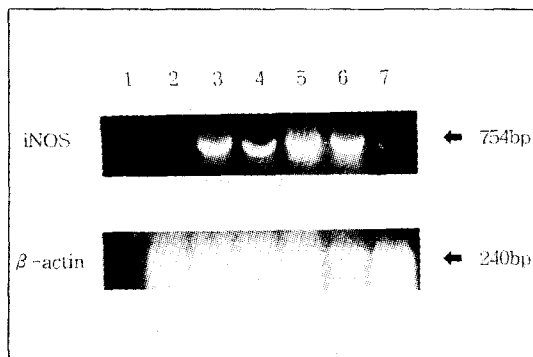
Table 2. Effects of herbal extracts on the NO production from mouse peritoneal macrophages

Herbal plants (100 $\mu\text{g/mL}$)	-	+IFN- γ (10 U/mL)	LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)+IFN (10 U/mL)
Control	1.80 \pm 0.19 ¹⁾	N.D. ²⁾	9.74 \pm 1.23
<i>Angelica gigas</i>	2.15 \pm 0.23	6.36 \pm 0.15	N.D.
<i>Houttuynia cordata</i>	1.65 \pm 0.19	4.46 \pm 0.46	N.D.
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	2.18 \pm 0.17	6.59 \pm 0.38	N.D.
<i>Astragalus membranaceus</i>	2.18 \pm 0.23	5.53 \pm 0.08	N.D.

¹⁾Values are the mean \pm S.D. in triplicate experiments.

²⁾N.D.: Not done.

The cells (5×10^4 /well) were stimulated with various concentration of extracts in the presence or absence of IFN- γ . The amount of NO₂ released by mouse peritoneal macrophages was measured after 48 hr of incubation by Griess method.

**Fig. 4. Effects of extracts on iNOS gene expression in RAW264.7 cell lines.**

The cells (5×10^6) were cultured with herbal plants extracts (100 $\mu\text{g/mL}$) for 4 hr in the presence of IFN- γ (10 U/mL). Total RNA was isolated and RT-PCR was performed. 1: Marker, 2: Control, 3: *Angelica gigas* + IFN- γ , 4: *Houttuynia cordata* + IFN- γ , 5: *Acanthopanax sessiliflorus* + IFN- γ , 6: *Astragalus membranaceus* + IFN- γ , 7: IFN- γ only.

지를 알아보기 위하여 대식세포가 생산하는 대표적인 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 양을 측정하였다. 그 결과 IFN- γ 만을 처리한 군에서 증가하는 TNF- α 의 양이 한약재 추출물을 같이 첨가했을 때는 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다(Table 3). 그리고, TNF- α 의 양은 생산되는 NO양과 일치하는 것으로 나타났다. 그러나, IL-1 β 의 양은 어떠한 조건에서도 검출되지 않았다(data not shown). 따라서, 한약재 추출물에 의한 NO 생산 유도는 추출물의 직접적인 작용에 의한 것이라기 보다는, TNF-

Table 3. Effects of herbal extracts on the secretion of TNF- α and NO₂

Conditions	TNF- α , pg/mL (24H)	NO ₂ , μM (48H)
Control	11.42 \pm 9.47	0.31 \pm 0.11
IFN- γ (10 U/mL)	23.08 \pm 14.22	3.07 \pm 0.22
IFN- γ + <i>Angelica gigas</i>	132.25 \pm 17.50	8.99 \pm 0.39
IFN- γ + <i>Houttuynia cordata</i>	56.42 \pm 2.89	8.16 \pm 0.61
IFN- γ + <i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	191.4 \pm 36.43	10.29 \pm 1.31
IFN- γ + <i>Astragalus membranaceus</i>	163.92 \pm 33.30	9.20 \pm 0.07

The RAW264.7 (5×10^4 /well) were cultured for 24 hr in medium contained IFN- γ (10 U/mL) in the presence or absence of extracts (100 $\mu\text{g/mL}$).

The amount of TNF- α secreted by RAW264.7 was measured by ELISA.

TNF- α released into the medium is presented as the mean \pm S.D. in triplicate experiment.

α 생산에 의한 간접적인 효과인 것으로 생각된다.

고 찰

이번 실험에서는 가자, 당귀, 어성초, 오가피, 산사, 황기, 천궁, 작약 등 8종류의 한약재 추출물이 대식세포의 NO 생산에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과 오가피, 당귀, 어성초, 황기의 추출물이 대식세포주와 생쥐 복강 대식세포의 NO와 TNF- α 생산을 유도한다는 것을 알았다. 각 한약재 추출물 단독으로는 NO 생산을 유도

하지 못하고, INF- γ 와 같이 배양하였을 때 농도 의존적으로 상승작용을 나타내었다. 이러한 결과는 직접 추출물 내의 LPS 농도를 측정하여 세균의 LPS에 의한 것이 아닌 것으로 확인하였고, 추출물에 의해 NO 생산을 유도하는 iNOS mRNA의 발현양이 증가하는 것도 확인하였다. 생산되는 NO는 L-arginine의 유도체이며 NOS 억제제인 N^GMMA에 의해 억제되었다. 추출물에 의한 NO 생산 유도는 추출물의 직접적인 작용이라기 보다는, 추출물에 의한 NO 생산이 유도될 때 TNF- α 에 대한 항체를 처리하면 NO 생산이 증가하지 않는다는 사실로 TNF- α 생산을 유도한 결과로 인한 간접적인 작용으로 생각된다(data not shown).

지금까지 결과만으로는 한약재로 유도되는 NO 생산 효과가 어떤 생리적 의미를 가지는지, 그리고 추출물을 구강으로 섭취하였을 때도 생체내에서 NO 생산을 유도하는지는 알 수가 없다. 그러나, 생쥐 복강 대식세포를 분리한 실험 결과를 보면, 사람 대식세포의 NO 생산을 유도할 가능성은 배제할 수 없다. 이때 유도된 NO는 인체 내에서 혈관이완작용, 신경정보전달작용, 세포성장조절작용, 항종양작용, 항바이러스작용, 기생충감염에 대한 방어작용 등의 효과를 나타낼 가능성은 충분하다고 생각된다(6, 12). 그러나, 대식세포의 NO에 관한 많은 연구는 생쥐 유래의 대식세포를 이용한 실험 결과로, 사람의 대식세포에는 IFN- γ 와 LPS를 처리하여도 확실한 NO 생산이 인정되지 않는다는 보고도 있다(13). 따라서, 이들 추출물이 사람의 대식세포에서도 동일한 효과를 나타내는지 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

일산화질소는 매우 불안정한 가스로, 산소나 superoxide (O₂⁻)와 반응하며, 이 반응은 superoxide dismutase(SOD) 또는 Fe³⁺에 의해 촉진된다. 이 과정에서 생기는 NO[·], NO₂, N₂O₃, N₂O₄, ONOO⁻, HO[·] 등이 금속이온이나 thiol기를 가진 단백질과 반응하여, 그 단백질의 작용을 방해하는 세포독성을 가진다(14,15). 그리고, 대식세포는 자극에 대해 반응으로 NO를 생산하여 다양한 미생물과 종양세포를 파괴한다. 그러나, NO의 영향을 잘 받지 않는 미생물과 종양세포도 존재한다는 보고도 있다(7). 대식세포는 NO 뿐만 아니라 항미생물질 항종양물질인 TNF- α , protease, lysozyme, 활성산소 등을 생산할 수 있기 때문에, NO의 작용만을 과대평가하는 것은 곤란하다.

대식세포의 NO는 IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 와 같은 사이토카인에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다(16,17). 따라서, IFN- γ 와 한약재 추출물을 같이 첨가했을 때, IFN- γ 에 의해 유도된 NO 생산이 뒤이은 TNF- α 생산에 의하여 유의하게 증가한 것으로 생각된다. 본 실험과 같은 단일 한약재가 아닌, 복합처방인 용담사간탕을 이용한 보고에 의하면, 추출물을 역시 IFN- γ 와 같이 처리하였을 때 생쥐 복강 대식세포의 NO생성을 유도하고, 이때 대식세포의 TNF- α 생산을 증가시킨다고 하였다(18). 이러한

결과는 본 실험의 결과와 매우 유사하며 사용한 농도도 매우 비슷하다. 특히 처방중에는 본 실험에서 사용한 당귀도 포함되어 있기 때문에 실험결과가 당귀성분에 의한 것일 가능성을 배제할 수 없다고 생각된다. 생약외에도 전통발효식품인 된장의 추출물이 복강대식세포의 IL-6와 TNF- α 생성을 증가시킨다는 보고(19)와 영지버섯 다당체를 IFN- γ , BCG와 동시에 처리하였을 경우 대식세포주 TIB71세포의 NO생성이 증가한다는 보고(20)도 있다. TNF- α 는 항원 자극을 받은 T세포, 활성화된 NK세포, 그리고 활성화된 비만세포도 분비하지만, 주된 세포는 LPS 등에 의해 자극받은 활성화된 대식세포이다(21). TNF- α 역시 NO와 마찬가지로 양면을 가진 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 즉, 소량이 생성되었을 경우는 국소적으로 내피세포에 대해 새로운 수용체를 발현하도록 하여 백혈구가 부착성을 가지게 하고, 호중구를 활성화시켜 미생물을 죽이도록 한다. 많은 양의 TNF- α 가 생성되면 내재성 발열원으로 작용하여, 뇌의 시상하부에 작용하여 열이 생기도록 하고, 간세포에 작용하여 혈청단백질의 합성을 자극하며, 골수 간세포의 분열을 억제하기도 한다(22,23). 따라서, 한약재에 의한 TNF- α 와 NO 생산을 반드시 긍정적인 효과로만 볼 수는 없다고 할 수 있다.

이상으로 당귀, 어성초, 오가피, 황기의 추출성분이 IFN- γ 처리로 유도된 생쥐 유래 대식세포주와 복강대식세포에서 TNF- α 의 생산을 유도하여 NO생산을 증가시킨다는 사실을 확인하였으며, 각 추출물의 어느 성분이 작용하며 어떠한 신호전달과정을 거쳐서 iNOS와 TNF- α 의 발현을 증가시키는가에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

본 실험에서는 일산화질소(nitric oxide)와 TNF- α 생산에 미치는 8가지 종류의 한약재를 조사하였다. 생쥐 대식세포주(RAW264.7)에 한약재 추출물인 당귀, 어성초, 오가피, 황기 등 4가지 종류의 한약재를 IFN- γ 와 처리했을 때 NO와 TNF- α 생산은 IFN- γ 와 추출물 농도에 의존적으로 유도되었지만, 이들 한약재만을 단독으로 처리했을 때는 NO와 TNF- α 생산을 유도하지 못하였다. 이런 결과는 세포주가 아닌 복강 대식세포에서도 동일하게 NO와 TNF- α 생성에 대한 상승효과가 나타났다. 최적 농도는 추출물이 100 μ g/mL일 때, IFN- γ 의 농도가 100 U/mL일 때였다. 그리고 NO 합성효소인 iNOS의 mRNA 발현양도 증가시켰다. 이때 IFN- γ 와 추출물로 유도된 NO는 NOS 억제제인 N^GMMA에 의해 억제되었다. 이러한 추출물의 NO 생산 유도는 TNF- α 생산을 증가시킨 결과로 인한 간접적인 효과로 생각된다. 이상의 결과로 당귀, 어성초, 오가피, 황기 추출물을 IFN- γ 와 동시에 처리하였을 때 생쥐 대식세포주와 복강 대식세포의 iNOS, NO,

TNF- α 합성을 유도하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 사업의 일환으로 수행되었음.

문헌

1. Snyder, S.H. and Bredt, D.S. : Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, **266**, 28-35 (1992)
2. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Woon, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. : Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9265-9269 (1990)
3. Moncada, S. and Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. : Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology (Pharmacological reviews). *Am. So. Pharm. and Exp. Therap.*, **43**, 109-142 (1991)
4. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, **6**, 3051-3064 (1992)
5. Goodrum, K.J., McCormick, L.L. and Schneider, R. : Group B *Streptococcus*-induced nitric oxide production in murine macrophages is CR3 (CD11b/CD18) dependent. *Infect Immun.*, **62**, 3102-3107 (1994)
6. Karupiah, G., Xie, Q.W. and Calaycar, J. : Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science*, **261**, 1445-1448 (1993)
7. Nakano, M.H. : Macrophage function and arginine-NO system. "Annual Review Immunology 1993" Chugaiigakusa, p.62-69 (1993)
8. Nathan, C.F. and Hibbs, J.B. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **1**, 65-70 (1991)
9. Hibbs, J.B., Jr., Vavrin, Z. and Taintor, R.R. : Expression of the macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, **138**, 550-565 (1987)
10. Messmer, U.K., Lapetina, E.G. and Bruene, B. : Nitric oxide-induced apoptosis in RAW264.7 macrophage is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 757-767 (1995)
11. Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, **141**, 2407-2412 (1988)
12. Amaro, M.J., Pardo, M., Cotonat, T., López-Farré, A. and Carreño, V. : Decreased nitric oxide production in chronic viral hepatitis B and C. *J. Medical Virology*, **51**, 326-331 (1997)
13. Denis, M. : Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J. Leukocyte Biol.*, **55**, 682-684 (1994)
14. Gross, S.S. and Wolin, M.S. : Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 737-769 (1995)
15. Stamler, J.S.L. Redox, signaling. : Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **78**, 931-936 (1994)
16. Nussler, A.K., Di Silvio, M., Billar, T.R., Hoffman, R.A., Geller, D.A., Selby, R., Madariaga, J. and Simmons, R.L. : Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Experimental Medicine*, **176**, 261-264 (1992)
17. Summersgill, J.T., Powell, L.A., Buster, B.L., Miller, R.D. and Ramirez, J.A. : Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon activated macrophages. *J. Leukocyte Biology*, **52**, 625-629 (1992)
18. Lee, E.H., Kim, N.K., Hwang, C.Y. and Kim, H.M. : Activation of inducible nitric oxide synthase by Yongdam-Sagan-Tang in mouse peritoneal macrophages. *J. Ethnopharmacology*, **60**, 61-69 (1998)
19. Lee, B.K., Jang, Y.S., Yi, S.Y., Chung, K.S. and Choi, S.Y. : Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. *Korean J. Immunol.*, **19**, 559-569 (1997)
20. Kim, S.W. : Nitric oxide production ability and its formation mechanisms in macrophage TIB 71 cell line by polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 333-337 (1998)
21. Schall, T.J. and Bacon, K.B. : Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current Opinion in Immunology*, **6**, 865-873 (1994)
22. Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Aral, N. and Yokota, T. : Cytokines : coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry*, **59L**, 783-836 (1990)
23. Beutler, B. : TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *Journal of Investigative Medicine*, **43**, 227-235 (1995)

(2000년 2월 16일 접수)