

원 저

## 丹蔘에 의한 NO 생성 및 NOS 유전자의 발현 유도 효과에 관한 연구

조현주, 원진희, 문 구, 문석재, 유기원<sup>1)</sup>, 유봉하<sup>1)</sup>

원광대학교 한의과대학 비계소화기내과학교실, 경희대학교 한의과대학 비계소화기내과학교실<sup>1)</sup>

### Studies on the NO Production and Expression Induction Effect of NOS Gene by *Salviae Radix*

Hyun-ju Jo, Jin-hee Won, Gu Moon, Seok-jae Moon, Gi-won Ryu<sup>1)</sup>, Bong-ha Ryu<sup>1)</sup>

Department of Digestive Internal medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
Department of Digestive Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University<sup>1)</sup>

**Objective :** This experiment was performed in order to study the effect of an aqueous extract of *Salviae radix* root(SRRAE) on NO production and NOS gene induction from macrophages

**Methods :** To investigate dose-dependent effects of SRRAE for NO release on the rIFN- $\gamma$ -treated macrophages, the cells were incubated for 6 hrs in a medium containing rIFN- $\gamma$  (5 U/ml), stimulated with SRRAE and incubated in a CO2 incubator.

The cells were treated with 5 U/ml rIFN- $\gamma$  plus 100 g/ml of SRRAE. Then, the cells were incubated with various concentrations of NGMMA at 37°C for 48 hrs.

**Results :** SRRAE had no effect on NO production by itself, whereas recombinant interferon- $\gamma$ (rIFN- $\gamma$ ) alone showed modest activity. When SRRAE was used in combination with rIFN- $\gamma$ , there was a marked cooperative induction of NO production in a dose-dependent manner. The optimal effect of SRRAE on NO production was shown at 6hrs after treatment with rIFN- $\gamma$ .

The SRRAE-induced production of NO was inhibited by NG-monomethyl- L-arginine(NGMMA) and arginase.

rIFN- $\gamma$  in combination with SRRAE showed a marked increase of the expression of the inducible NOS(iNOS) gene. In addition, the effect of SRRAE was mainly dependent on the SRRAE-induced tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) secretion.

**Conclusions :** SRRAE induces NO production from macrophages as a result of SRRAE-induced TNF- $\alpha$  secretion. SRRAE may provide a second signal for synergistic induction of NO production in macrophages already induced to express iNOS gene by rIFN- $\gamma$ . (J Korean Oriental Med 2000;21(3):20-30)

**Key Words:** *Salviae Radix*, NO, NOS gene, INF- $\gamma$  TNF- $\alpha$

## 서 론

종양의 발생이 면역기능과 상당히 밀접한 관계가

있는 것으로 점차 밝혀지고 있으며, 면역요법이 새로운 암의 치료법으로 관심을 끌고 있다<sup>1)</sup>. 한의학에서도 질병의 발생과 진전을 면역이론과 유사한 인체의 正氣와 邪氣의 투쟁과정으로 본 正邪論에서 그 연관성을 찾을 수 있다<sup>2)</sup>. 《素問·評熱病論》<sup>3)</sup>에 “邪氣所湊其氣必虛”라 하여 질병의 발생이 正氣虛弱과 관련이

· 접수 : 2000년 7월 2일 · 수정 : 10월 7일 · 채택 : 10월 6일  
· 교신저자 : 조현주, 원광대학교 한의과대학 비계소화기내과학교실  
(Tel. 062-226-1075)

있으며, 正氣가 邪氣侵入에 대한 방어작용에 중요함을 언급하였다.

Nitric oxide(NO, 산화질소)는 매우 불안정하며, 반응성이 강한 물질로서 생체내에서 다양한 작용을 하고 있다<sup>4)</sup>. NO를 합성하는 효소는 크게 구성성 효소(constitutive NO synthase, cNOS)와 유도성 효소(inducible NO synthase, iNOS)로 구분되며, 전자는 이미 세포내에 존재하는 단백질로 어떤 자극에 의하여 활성을 갖게 되는 것이고, 후자는 자극에 반응하여 새로운 단백질이 합성되는 것이다<sup>5)</sup>.

iNOS는 주로 침입한 병원성 미생물 및 종양세포에 대한 방어 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. iNOS는 다량의 NO를 생성하여 주세포의 면역작용에 중요한 역할을 수행하지만 필요이상으로 분비된 과량의 NO는 주세포 및 표적세포에 영향을 주어 만성적 염증을 유발한다<sup>7,8)</sup>. 이러한 만성적 염증을 개선하기 위해서는 iNOS의 발현이 적절하게 조절될 필요성이 있다.

丹蔘(*Salvia miltiorrhiza* BGE.)<sup>9)</sup>은 꿀풀과(脣形科, Labiatae)에 속한 다년생 초본인 丹蔘 및 同屬 近緣 植物의 근으로, 《神農本草經》<sup>10)</sup>에 “味苦微寒 主心腹邪氣 腸鳴幽 幽如走水 寒熱 積聚 破癥除瘕 止煩滿 益氣.” 라고 기미와 효능이 기록된 후 임상적으로 月經 不調, 血滯經閉, 產後腹痛, 癥瘕積聚, 瘡癰腫痛, 心悸失眠 등의 치료에 사용하고 있으며<sup>9)</sup>, 최근에는 면역증강<sup>11)</sup> 및 항암작용<sup>12)</sup> 등이 있는 것으로 보고되고 있다.

항암작용이 있는 NO의 작용기전에 대한 연구로, 전<sup>13)</sup>은 三白草로 NO의 유리기전을,朴<sup>15)</sup>은 茵陳을 이용하여 iNOS 발현에 미치는 영향을 보고하였다.

이에 저자는 丹蔘을 이용하여 생쥐 복강에서 분리한 대식세포를 rIFN- $\gamma$ 로 감작한 후 “second signal”로 작용하여 NO 생성과 iNOS 유전자의 합성을 증가시키는지, NO 발생 신호기전이 L-arginine 의존적 경로인가를 관찰하고, 또한 대식세포로부터 NO의 생성이 TNF- $\alpha$  생성에 의존적인지, 계속적으로 TNF- $\alpha$ 의 생성은 세포질내에 존재하는 중요한 신호전달 관련 효소인 protein kinase C(PKC) 활성화과의 밀접한 관련

성이 있는지 등을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 丹蔘(*RADIX SALVIAE MILTIORRHIZAE*, *Salvia miltiorrhiza* BGE)은 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 건조생약을 정선하여 70℃에서 5시간 동안 5배 용량의 증류수를 넣어 추출하였다. 그후 추출액은 0.45 $\mu$ m 여과지를 사용하여 여과하였고, 그 濾液을 동결건조하여 사용하였다.

#### 2) 시약

Murine recombinant IFN- $\gamma$  (rIFN- $\gamma$ ), murine recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$ (rTNF- $\alpha$ )와 rabbit anti-murine TNF- $\alpha$  항체는 Genzyme(Munchen, Germany)에서, RPMI 1640, L-arginine, arginase, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, sodium nitrite, sulfanilamide, polymyxin B, isoquinoline H-7, phorbol 12-myristate, 13-acetate(PMA), staurosporine (STS)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서, thioglycollate (TG)는 Difco Laboratories(Detroit, MI)에서, N<sup>G</sup>-monomethyl-L arginine (N<sup>G</sup>MMA)은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, 페트리 접시 등 배양용기는 Nunc (Naperville, IL)에서, Hank's balanced salt solution, agarose, phenol, moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, RNA inhibitor, DNA polymerase I, Taq polymerase, deoxynucleotide triphosphate, fetal calf serum 및 기타 試藥은 Life Technologies(Grand Island, NY)에서 구입하였다.

#### 3) 동물

생쥐(C57BL/6계)는 대한 실험동물 센터(음성, 충북)에서 구입한 8~12주 사이의 수컷으로 실험실 환경에서 2주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

약탕기에 약물 및 적량의 증류수를 넣고 70℃에서 5시간동안 끓인 후 추출하였다.

수침액은 0.45 m 여과지를 이용하여 여과한 다음 -80℃에서 냉동하고, Freeze Dry에서 건조농축하였다. 건조한 약물은 생리식염수 혹은 Tyrode buffer A(10mM HEPES, 130mM NaCl, 5mM KCl, 1.4mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5.6mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)를 사용하여 실험 전에 일정한 농도로 용해시켰다.

### 2) 대식세포의 배양

생쥐의 복강내에 4% thioglycollate(TG) 1ml를 주사하고 4일 후에 복강을 RPMI 1640으로 세척하여 얻은 다음 저장액 처리를 하여 적혈구를 제거하고 10% 우태혈청을 함유하는 RPMI 1640에 부유시켜, 96-well plate의 한 well 당 2×10<sup>6</sup> 세포, 혹은 10cm<sup>2</sup> 페트리 접시 당 1×10<sup>7</sup> 세포가 되도록 분주하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 약 3시간 후에 배양액을 교환하여 배양용기 표면에 부착되지 않은 세포는 제거하고, 부착된 대식세포만을 실험에 사용하였다.

### 3) NO 발생량 측정

대식세포에서 발생된 NO의 양은 배지에 축적된 NO 산화물인 nitrite를 Griess 반응으로 정량하였다<sup>6)</sup>. 즉, 0.1% naphthylethylene diaminedihydrochloride와 1% sulfanilamide를 같은 양으로 섞은 Griess reagent 50μl와 배양액 50μl를 섞은 다음 10분 후에 ELISA reader(Bio-Tek Instruments)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. nitrite의 농도 계산은 sodium nitrite를 표준물질로 사용하여 결정하였다.

### 4) TNF-α의 측정

TNF-α의 정량은 Scuderi 등<sup>7)</sup>이 보고한 방법인 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 수행하였다. 즉 항 TNF-α capture mAb는 flat-bottomed 96-well plate(Corning, Rochester, NY)에 코팅 완충액(0.02% sodium azide를 함유한 PBS)을 이용하여 각 well당 최종 농도 6.25ng으로 처리한 후 4℃에서 12시간 코팅하였다. 그 후 0.05% tween 20을 함유한 인

산 완충액(PBS)인 세척 완충액으로 4회 세척한 다음 비특이적 결합을 방지하기 위하여 2% BSA를 함유한 PBS(blocking buffer)를 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 세척 완충액으로 4회 세척 후 재조합 생쥐 TNF-α 표준액과 각 sample의 배양 상등액을 각 well에 100 l씩 가하고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 세척 완충액으로 4회 세척 후 토끼 항 TNF-α를 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 7.8ng/ml 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 세척 완충액으로 7회 세척 후 phosphatase가 결합된 염소 항 쥐 IgG (Sigma Co.)를 well당 10ng 농도로 처리한 다음 37℃에서 2시간 배양한 후 7회 세척하였다. 마지막 세척 후 0.05m M NaHCO<sub>3</sub>와 0.05mM MgCl<sub>2</sub>로 조성된 기질 완충액에 용해시킨 p-nitro phenyl phosphate 발색제를 각 well에 100 l씩 가하여 10분간 발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) Probe의 조제

iNOS mRNA 전사물을 검출하기 위하여 iNOS 유전자<sup>18)</sup>의 암호영역에 대한 sense 및 antisense oligonucleotide primer를 다음과 같이 제작하였다: forward primer, 5'-GGCCTTGGCTCCAGCATGTAC-3', 1856 - 1876; reverse primer, 5'-GCTGCCGCTCTCATCCAGAAC-3', 2395 - 2415. 생쥐의 복강에서 분리한 대식세포에 rIFN-γ와 LPS를 처리하여 활성화시킨 다음 total cellular RNA를 주형으로 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Sense 및 antisense primer를 첨가하여 증폭한 PCR 산물을 pBluescript II KS (-) plasmid EcoRV site에 subcloning 하였다. [<sup>32</sup>P] dCTP 와 함께 random priming 방법으로 Northern blotting을 위한 probe를 조제하였다.

### 6) RNA 분리 및 Northern blotting

Total RNA는 변형한 LiCl-urea 방법<sup>19)</sup>으로 분리하여 1% agarose - formaldehyde gel에 전기영동하고 nylon membrane에 전이시켰다. 50% formamide, 4×SSC, 0.5mg/ml sheared salmon sperm DNA 및 1×Denhardt's 용액을 함유한 완충용액에서 prehy-

bridization했다. Hybridization은 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP로 표지한 probe( $1 \times 10^6$ cpm/ml)를 함유하는 같은 완충용액에서 수행하였다. 여과지는 순차적으로  $2 \times$ SSC/0.1% SDS,  $1 \times$ SSC/0.1% SDS 용액으로 각각 55°C에서 20분 동안 세척한 다음 건조하여 자동방사선 사진술에 의해 분석하였다.

7) 통계학적 분석

모든 자료는 means  $\pm$  S.D.로 나타내었으며, 유의성 검사는 student's t-test로 시행하였다. 유의 수준은  $P < 0.01$ 로 하였다.

실험성적

1. rIFN- $\gamma$ 로 유도되는 NO 생성에 있어서 丹蔘의 효과  
 생쥐 복강 대식세포에 배지 단독 혹은 rIFN- $\gamma$  (5U/ml)를 함유한 배지에 丹蔘(100 g/ml)을 처리한 후 48시간 동안 배지에 축적된 nitrite의 양을 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 丹蔘만으로는 NO 합성이 거의 유도되지 않는 반면에, rIFN- $\gamma$ 와 함께

처리했을 때 NO 합성이 상승적으로 증가하였다. rIFN- $\gamma$ 만으로는 약간의 NO 생성 효과를 나타냈다.

丹蔘은 rIFN- $\gamma$  처리 6시간 후에 최대의 효과를 나타내었고, 12시간 후에는 감소하였다. 丹蔘의 농도 의존적 효과는 Fig. 1에 나타내었다. rIFN- $\gamma$ 를 처리한 대식세포에 100 g/ml의 丹蔘을 부가하였을 때 가장 큰 상승효과를 나타내었고 1 g/ml보다 적은 농도에서는 nitrite의 양이 현저하게 감소하였다.

2. N<sup>o</sup>MMA 혹은 arginase에 의한 丹蔘 유도성 NO 생성 억제 효과

丹蔘 유도성 NO 발생 신호기작이 L-arginine 의존적 경로인가를 밝히기 위하여 대식세포를 rIFN- $\gamma$ 와 N<sup>o</sup>MMA, 혹은 rIFN- $\gamma$ 와 arginase 존재하에서 6시간 동안 배양한 다음 丹蔘을 처리하여 다시 42시간 동안 배양하였다. 대식세포에서 rIFN- $\gamma$ 와 丹蔘에 의한 nitrite의 생성은 N<sup>o</sup>MMA, 혹은 arginase의 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다(Fig. 2, 3). 이러한 결과는 丹蔘의 NO 생성이 L-arginine을 경유하여 생성되

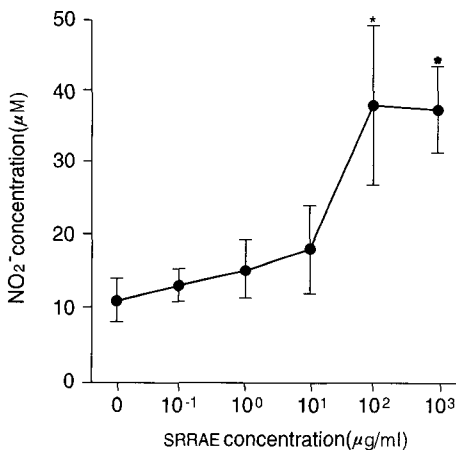


Fig. 1. Dose-dependent effects of SRRAE for NO release on the rIFN- $\gamma$ -treated macrophages. The cells were incubated for 6 hrs in medium containing rIFN- $\gamma$  (5 U/ml), stimulated with SRRAE and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator. NO synthesis was measured by the method of griess (nitrite). Values are means  $\pm$  S.D. of seven independent experiments. Significantly different from the control. \*;  $P < 0.01$ .

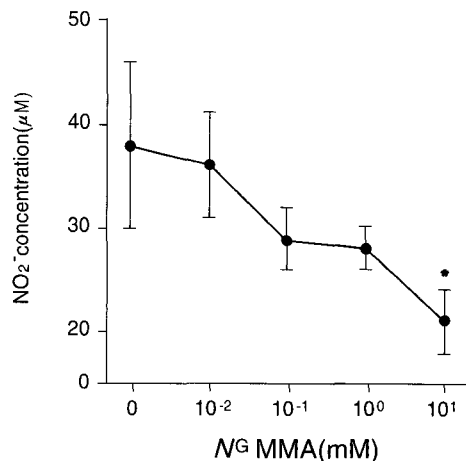


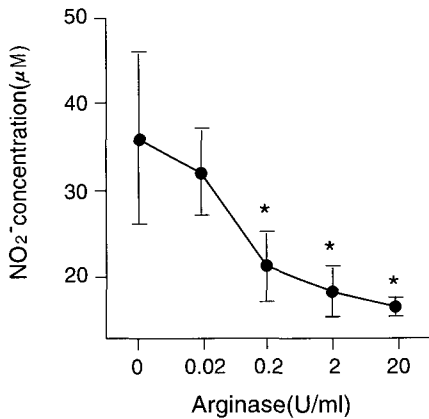
Fig. 2. Effects of N<sup>o</sup>MMA on NO synthesis from TG-elicited macrophages. The cells were treated with 5 U/ml rIFN- $\gamma$  plus 100 g/ml of SRRAE. Then, the cells were incubated with various concentrations of N<sup>o</sup>MMA at 37°C for 48 hrs. NO release was measured by the method of griess (nitrite). Values are means  $\pm$  S.D. of three experiments. Significantly different from the control. \*;  $P < 0.01$ .

**Table 1.** Synergistic Cooperation between rIFN- $\gamma$  Plus SRRAE to Induce NO Synthesis in Mouse Peritoneal Macrophages

Addition		Final concentration( $\mu$ M)
rIFN- $\gamma$	SRRAE	NO <sub>2</sub>
None	None	< 5
+	None	11 $\pm$ 3
None	+ ( 0 h)	< 6
+	+ ( 0 h)	22 $\pm$ 6*
+	+ ( 3 h)	23 $\pm$ 2*
+	+ ( 6 h)	38 $\pm$ 11*
+	+ ( 9 h)	35 $\pm$ 8*
+	+ (12 h)	26 $\pm$ 7*

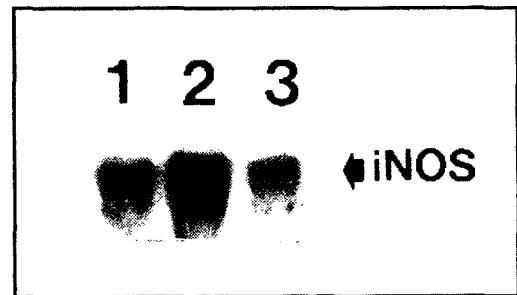
TG-elicited Macrophages( $2 \times 10^6$  cells/well) were cultured either in medium alone or in medium containing rIFN- $\gamma$ (5 U/ml). The cells were stimulated with SRRAE(100 g/ml) at various times after incubation. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> released by macrophages was measured after 48hrs of incubation. Values are Means  $\pm$  S.D. of three experiments.

\*P < 0.01 : Significantly different from the control group.



**Fig. 3.** Effects of arginase on NO synthesis from TG-elicited macrophages. The cells were treated with 5 U/ml rIFN- $\gamma$  plus 100 g/ml of SRRAE. Then, the cells were incubated with various concentrations of arginase at 37°C for 48 hrs. NO release was measured by the method of griess (nitrite). Values are means  $\pm$  S.D. of three experiments. Significantly different from the control.

\*; P < 0.01.



**Fig. 4.** Detection of iNOS mRNA in stimulated murine macrophages. Lane 1, rIFN- $\gamma$  alone; Lane 2, rIFN- $\gamma$  plus SRRAE (100  $\mu$ g/ml) at 6 hrs after incubation; Lane 3, rIFN- $\gamma$  plus SRRAE (100  $\mu$ g/ml) at 12 hrs after incubation. Total cellular RNA was hybridized to <sup>32</sup>P-labeled iNOS cDNA probe.

는 것을 보여주고 있다.

### 3. rIFN- $\gamma$ 유도성 iNOS 유전자 발현에 있어서 丹蔘의 효과

대식세포에서 丹蔘에 의한 NO의 생성 효과가 iNOS 유전자 발현과 관련성이 있는가를 검토하기 위해, rIFN- $\gamma$ 로 priming시킨 후 丹蔘을 6시간 혹은 12시간 처리한 다음 Northern blotting 방법으로 iNOS

mRNA 양을 분석하였다. Fig. 4의 자료에서 볼 수 있듯이, rIFN- $\gamma$  단독처리보다 rIFN- $\gamma$ 를 처리한 6시간 후에 丹蔘을 추가했을 때 iNOS 유전자 발현량이 현저하게 증가하였다. 그러나 12시간 후에 丹蔘을 추가했을 때는 6시간째보다 iNOS 유전자 발현량이 적었다. 이러한 결과는 Table 1의 NO 생성량과 일치하는 결과이다.

4. rIFN-γ로 유도되는 TNF-α 분비에 있어서 丹蔘의 효과

丹蔘에 의한 NO 생성 기작을 이해하기 위하여 rIFN-γ와 丹蔘을 처리한 생쥐 복강 대식세포에서 TNF-α 분비량을 분석하였다. 복강 대식세포에 배지 단독, rIFN-γ 단독, 혹은 丹蔘만을 단독으로 처리하여 24시간 후에 분석했을 때 TNF-α의 양은 매우 소량이 었다. 그러나 rIFN-γ와 丹蔘을 동시에 처리하고 배양 했을 때 상승적으로 많은 양의 TNF-α가 분비되었다 (Table 2).

5. 丹蔘 유도성 NO 생성에 있어서 STSN 혹은 polymyxin B의 억제 효과

丹蔘에 의해 유도되는 신호전달과정을 더욱 명확 하게 규명하기 위한 실험으로 세포내 중요한 신호전 달효소인 protein kinase C(PKC)가 관여하는가를 분

석하였다.

강력한 PKC 억제제인 STSN 혹은 polymyxin B를 IFN-γ와 함께 부가하였을 때 STSN 혹은 polymyxin B는 rIFN-γ와 丹蔘 유도성 NO 생성을 다소 억제하 는 결과를 나타냈다(Table 3). 그러나 STSN과 polymyxin B 모두 유의성있는 억제 효과를 나타내지 는 않았다. 더욱이 rIFN-γ 단독으로 유도되는 NO의 합성에는 거의 영향을 미치지 않았다.

6. 丹蔘 유도성 TNF-α 분비에 있어서 STSN 혹은 polymyxin B의 억제 효과

丹蔘 유도성 TNF-α 분비에 있어서 PKC가 관여하 는 가를 분석하였다. STSN과 polymyxin B는 丹蔘으 로 유도되는 TNF-α의 분비를 현저히 억제하였다 (Table 4).

PKC에 대한 비특이적 억제제로 알려진 isoquino-line H-7도 농도 의존적으로 TNF-α의 분비를 억제시 켜다(data not shown). 그러나 PKC 활성화제인 PMA 를 rIFN-γ와 丹蔘을 처리하기 전에 6시간동안 자극 하였을 때는 NO 및 TNF-α 생성에 큰 영향을 미치지 않았다(data not shown).

7. 丹蔘 유도성 NO 생성에 있어서 항 TNF-α 중화 항체의 효과

丹蔘으로 유도되는 NO 발생이 단삼에 의한 TNF-α 분비에 의존적인가를 실험하였다. Fig. 5에 나타낸 것 처럼 丹蔘으로 유도되는 NO 발생은 항 TNF-α 중화

**Table 2.** Synergistic Cooperation between rIFN-γ and SRRAE to Induce TNF-α Secretion in Mouse Peritoneal Macrophages

Treatment	TNF-α secretion (ng/ml)
None (Saline)	0.092±0.012
rIFN-γ	0.168±0.033
SRRAE	0.103±0.047
rIFN-γ + SRRAE	1.665±0.480*

TG-elicited macrophages (2×10<sup>6</sup> cells/well) were cultured with either in medium alone or in medium containing rIFN-γ(5 U/ml). These cells were then treated with SRRAE (100 g/ml), and cultured for 24 hrs. TNF-α released into the medium is presented as the Mean ± S.D. of three independent experiments.

\*P<0.01; Significantly different from the control group.

**Table 3.** Effect Of STSN Or Polymyxin B On NO Production By rIFN-γ Plus SRRAE

Treatment	Substances		Final concentration(μM)
	STSN	Polymyxin B	NO <sub>2</sub>
None	-	-	<5
rIFN-γ	-	-	12± 4
	+	-	11± 3
	-	+	11± 3
rIFN-γ plus SRRAE	-	-	36±12
	+	-	30± 8
	-	+	31± 6

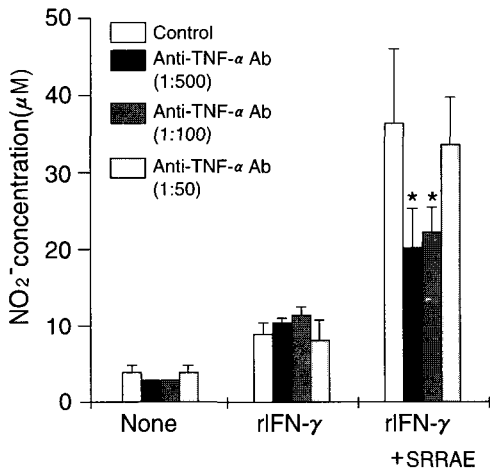
TG-elicited macrophages (2×10<sup>6</sup> cells/well) were cultured with either in medium alone or in medium containing rIFN-γ(5 U/ml) in the absence (-) or presence (+) of STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml). These cells were treated with SRRAE (100 g/ml), and cultured for 24 hrs. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> released by macrophages was measured after 48 hrs of incubation. Values are Means ± S.D. of three experiments.

**Table 4.** Effect Of STSN Or Polymyxin B On TNF- $\alpha$  Secretion By rIFN- $\gamma$  Plus SRRAE

Treatment	Substances		TNF- $\alpha$ secretion (ng/ml)
	STSN	Polymyxin B	
None	-	-	0.353 $\pm$ 0.014
rIFN- $\gamma$	-	-	0.869 $\pm$ 0.165
	+	-	0.494 $\pm$ 0.069*
rIFN- $\gamma$ plus SRRAE	-	+	0.567 $\pm$ 0.083*
	-	-	1.832 $\pm$ 0.362
	+	-	0.712 $\pm$ 0.144*
	-	+	0.768 $\pm$ 0.125*

TG-elicited macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/well) were cultured with either in medium alone or in medium containing rIFN- $\gamma$ (5 U/ml) in the absence (-) or presence (+) of STSN (200 nM) or Polymyxin B (100 U/ml). These cells were then treated with SRRAE (100 g/ml), and cultured for 24 hrs. TNF- $\alpha$  released into the medium is presented as the Mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

\* P < 0.01; Significantly different from the control group.



**Fig. 5.** Effect of anti-TNF- $\alpha$  neutralizing antibody on rIFN- $\gamma$  or rIFN- $\gamma$  plus SRRAE-induced NO synthesis in peritoneal macrophages. The cells were stimulated with rIFN- $\gamma$  (5 U/ml) or rIFN- $\gamma$  plus SRRAE (100 g/ml), the cells were then treated with anti-TNF- $\alpha$  polyclonal antibody (Dilution, 1:500, 1:100, 1:50). After 48 hrs of culture, NO release was measured by the griess method (nitrite). NO (nitrite) released into the medium is presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments each run in duplicate.  
\* : P < 0.01 ; Significantly different from the control.

항체에 의해 현저하게 억제되었다. 이러한 결과는 丹蔘 유도성 TNF- $\alpha$  분비가 생쥐 복강 대식세포에서 NO 합성의 상승적 유도에 결정적으로 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

## 고찰

문명의 발달로 인간의 평균수명은 점차 늘어나고 있으며 그로 인해 급성질환으로 인한 사망은 감소하고 있으나 만성병과 난치병은 크게 증가하고 있는 실정<sup>20)</sup>, 특히 종양발생의 빈도는 최근 50년간 급진적으로 증가하여 왔다<sup>21)</sup>.

현재 서양의학의 암 치료법으로는 수술, 방사선 및 항암화학요법 등이 병용되고 있지만 그와 병행되는 부작용과 치료효과가 한계점에 도달하고 있어 면역학적 치료법이 대두되고 있고<sup>22)</sup>, 화학요법도 약물의 독성문제와 부작용 때문에 현재 부작용이 적고 감수성이 높은 약물의 개발 및 효과적인 치료법이 절실한 실정이다<sup>23)</sup>.

한의학에서 종양은 商·周時代의 은허갑골문에서 '瘤' 라는 병명이 기재된 이래<sup>24)</sup> 積聚, 癥瘕, 腸覃, 石瘕, 癭瘤, 陰菌, 石疽, 惡核, 喉疔, 牙疔, 舌疔, 乳岩 등 종양의 위치와 병리적인 특징에 따라 기술하였다<sup>25)</sup>.

최근에 암을 동서의 결합치료로 수술후 합병증과 방사선, 화학요법의 부작용을 줄일 수 있고, 생존기간의 연장과 삶의 질 개선 및 치료율을 높일 수 있다고 보고하고 있다<sup>26)</sup>.

丹蔘(Salvia miltiorrhiza BGE.)은 赤蔘·山蔘·木羊乳·逐馬 등의 異名이 있고, 味는 苦, 性은 微寒無毒하며, 心·肝·腎에 歸경하여 血熱과 瘀血의 모든 병증에 活血祛瘀, 通利血脈, 除煩熱, 排膿生氣, 養血安神 등의 효과가 있어 임상적으로 心脈阻滯로 인한 心絞

痛에 사용하며, 氣滯血瘀로 인한 月經不調, 月經痛, 産後惡露停滯, 産後腹痛 등 婦人病에 응용되고, 신경쇠약으로 인한 心悸失眠, 煩躁 등 心血虛 증상에도 쓰이고, 癥瘕積聚, 瘡癰腫痛 등 積聚와 瘡瘍에도 사용하며, 뇌혈관질환이나 고혈압에도 활용되고 있다<sup>9)</sup>.

丹蔘의 약리작용은 혈류량을 증가시켜 미세순환을 개선하고<sup>13)</sup>, 간섬유조직의 증식을 억제하여 보간작용을 하며<sup>27)</sup>, 신기능의 회복을 강화하고<sup>28)</sup>, 소염·진통하며<sup>29,30)</sup>, 항균하고<sup>27,30)</sup>, 혈압을 강하시키며<sup>13,29,30)</sup>, 적혈구와 혈색소를 증가시켜 조혈을 하고<sup>30)</sup>, 최근에는 면역증강<sup>11,12)</sup> 및 항암작용<sup>12,13)</sup> 등이 있는 것으로 보고되고 있다.

항암작용이 있는 NO의 작용기전에 대한 연구로, 전<sup>14)</sup>은 三白草로 생쥐 복강 대식세포에서 rIFN- $\gamma$ 와 같이 처리시 NO가 생성되고, PKC 억제제인 STSN에 의해 NO 생성이 억제됨을 보고하여 NO의 유리기전을 밝혔고, 朴<sup>15)</sup>은 茵陳 추출물이 iNOS 발현을 농도의존적으로 억제시킨다고 보고하였다.

이에 저자는 항암작용이 있고 면역방어 분자로 인식되는 NO의 생성 기전을 밝혀 면역증강과 항암작용이 있는 단삼의 유효성을 입증하고자 본 실험을 실시하게 되었다.

NO는 리포다당(lipopolysaccharide, LPS)을 투여한 실험동물에서 많은 양의 nitrate가 배출된다고 알려진 후<sup>31)</sup>에, 대식세포가 재조합 인터페론 감마(recombinant interferon- $\gamma$ , rIFN- $\gamma$ )와 LPS에 의해 활성화되어 nitrite와 nitrate를 발생시키고, 이 nitrite와 nitrate는 대식세포에서 발생된 NO에서 유래하는 것이 증명되었다<sup>32)</sup>.

NO는 대식세포의 항미생물 작용과 항암작용의 중요한 매개물이라는 사실이 많은 연구자들에 의하여 밝혀졌고<sup>33)</sup>, 동물 및 사람 세포에서 항바이러스 효과도 있는 것으로 증명되었다. Croen<sup>34)</sup>은 쥐의 대식세포주에서 IFN- $\gamma$ 와 LPS의 자극으로 고농도의 NO 생성 및 herpes simplex virus-1의 복제를 1000배나 억제하는 것을 발견했다. 이러한 억제효과는 부분적으로 iNOS의 억제효과인 것을 관찰하였다. 대식세포에서 NO를 생성하기 위해서는 IFN- $\gamma$ 에 의한 priming 신호

가 선행된 다음, LPS, TNF- $\alpha$  등과 같은 2차 신호 자극이 필요하다<sup>35)</sup>.

NO가 혈관계에서는 혈관이완과 혈류를 조절하는 신호 전달자로서 작용하며, 면역계에서는 면역 방어 분자로서 인식되고 있다<sup>36)</sup>. 한편, NO는 숙주에게는 커다란 영향을 주지 않지만 한꺼번에 많은 양이 방출되면 미생물이나 종양세포 뿐만 아니라 NO를 생산하는 세포와 조직 및 기관에 심각한 손상을 초래할 수 있다고 보고되어지고 있다<sup>37)</sup>.

NOS 유도에 연관이 있다고 밝혀진 PKC는 수용체와 신호전달기구와의 조절, 유전자의 발현이나 세포 증식과 같은 다양한 기능을 하고, L-arginine으로부터 NO 생성에 관여하며, PKC는 L-arginine를 인산화하여 NOS 활성을 down-regulation 할 수 있다<sup>38)</sup>.

저자는 생쥐의 복강 대식세포에서 丹蔘을 rIFN- $\gamma$ 와 함께 투여했을 때 6시간후에, 용량은 100 $\mu$ g/ml를 부가했을 때 가장 많은 NO를 발생시키는 것을 발견하였다.

더욱이 丹蔘은 이러한 조건에서 TNF- $\alpha$  분비량도 증진시켰다. 이러한 결과는 丹蔘이 복강 대식세포에서 TNF- $\alpha$  분비를 촉진시켜 NO 발생을 증가시키는 것을 의미한다.

현재의 결과만으로 丹蔘에 의한 NO 발생의 정확한 기작 및 생리적 중요성은 정확하게 알 수 없으나 NO는 항박테리아 및 항암활성, 혈관확장, neural communication, 세포성장조절, 숙주보호 등 다양한 기능을 갖는 세포간 및 세포내의 중요한 조절분자이기 때문에 생체내의 기본적 작용과정의 국소적 조절에 관여할 것으로 사료된다.

丹蔘 유도성 NO발생신호기작이 L-arginine 의존적 경로인가를 밝히기 위하여 대식세포를 rIFN-r와 NGMMA, 혹은 rIFN-r와 arginine 존재하에 丹蔘을 처리한 결과 농도의존적으로 nitrite의 생성이 감소하였고, 丹蔘에 의한 NO의 생성효과가 iNOS 유전자 발현과 관련성이 있는가를 알아보기 위하여 rIFN-r로 priming 후 丹蔘을 처리한 결과 rIFN-r 단독처리시보다 丹蔘을 공동처리했을 때 iNOS 유전자 발현량이 현저하게 증가하였고 시간에 따라서는 6시간후



에 최대로 나타났다.

또한, 복강대식세포에 배지단독, rIFN- $\gamma$  단독, 혹은 丹蔘만을 처리하여 24시간후 TNF- $\alpha$ 의 양을 분석한 경우보다 rIFN- $\gamma$ 와 丹蔘을 동시에 처리하고 배양했을 때 상승적으로 많은 양의 TNF- $\alpha$ 가 분비되었다.

이어서 丹蔘의 NO 생성 기전을 규명하기 위하여 강력한 PKC 억제제인 STSN 혹은 polymyxin B, PKC 활성화제인 PMA 등을 이용하여 NO 및 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 단삼에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비에 있어서 PKC 억제제는 현저한 효과를 나타냈으나, 丹蔘에 의한 NO 생성 및 PMA에 의한 NO 혹은 TNF- $\alpha$  생성에는 별다른 영향을 미치지 못하는 것을 발견했다. 이러한 결과는 丹蔘에 의한 NO 생성에 있어서 부분적으로 PKC가 관여하고 있는 것을 암시하고 있다.

한편 丹蔘은 복강 대식세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진시키는데, TNF- $\alpha$ 는 그 자체가 항암활성을 나타낼 뿐만 아니라 다양한 생물학적 기능을 갖고 있는 것으로 인식되고 있다<sup>30)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 쥐에서 종양괴사를 야기시키는 혈청단백성분 실험에서 얻어진 이름으로, 대식세포와 림프구에서 분비되고, 암이나 육종을 불문하고 여러 종류의 악성종양에 효과가 있으며, 정상세포에 대해 거의 세포독성을 보이지 않는 이점이 있다<sup>30)</sup>. 그 동안 TNF- $\alpha$ 의 세포내 신호전달 과정에 대해서는 잘 알려져 있지 않았는데, 일부 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 신호전달 과정에 PKC 활성화가 결정적인 역할을 하는 것이 규명되었다<sup>30)</sup>. 본 연구에서 PKC 억제제인 STSN과 polymyxin B는 모두 NO 생성에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 생쥐 복강 대식세포에서 丹蔘에 의한 NO 합성유도에는 PKC가 직접 관련되어 있지 않고, 단지 丹蔘에 의한 TNF- $\alpha$  유도에만 관여하는 것을 의미한다.

이상의 결과로 단삼으로 유도되는 TNF- $\alpha$  분비에 PKC가 결정적인 역할을 하는 근거를 제공했지만 NO 합성에 있어서 세밀한 신호전달 기작을 완전하게 분석하지는 못했다. 이에 더욱 상세하게 丹蔘의 효능기전을 규명하기 위한 실험, 즉 각 PKC조절제들에 의한 iNOS 및 TNF- $\alpha$ , mRNA 발현수준변화 등을

직접적으로 검토할 필요가 있다. 또한 이들 PKC 조절제들이 생물학적 활성이 있는 TNF- $\alpha$  분비에 미치는 영향이나, NO 생성과 밀접한 관련성이 있는 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화에 미치는 丹蔘의 효과에 대해서도 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결론

면역증강과 항암작용이 있는 丹蔘의 유효성을 입증하고 임상에 활용도를 높이고자 항암작용이 있고 면역방어 분자로 인식되는 NO의 생성 기전에 대한 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 丹蔘만으로는 NO 합성이 거의 유도되지 않는 반면에, rIFN- $\gamma$ 와 함께 처리했을 때 NO 합성이 상승적으로 증가하였다. rIFN- $\gamma$ 만으로는 약간의 NO 생성 효과를 나타냈지만, 丹蔘을 rIFN- $\gamma$ 와 동시에 처리했을 때 6시간 후에 최대의 효과를 나타내었고, rIFN- $\gamma$ 를 처리한 대식세포에 100 $\mu$ g/ml의 丹蔘을 부가하였을 때 가장 큰 상승효과를 나타내었다.
2. 대식세포에서 rIFN- $\gamma$ 와 丹蔘에 의한 NO 생성은 NGMMA 혹은 arginase에 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다.
3. rIFN- $\gamma$  단독 처리보다 rIFN- $\gamma$ 를 처리한 6시간 후에 丹蔘을 부가했을 때 iNOS 유전자 발현량이 현저하게 증가하였으며, 12시간 후에는 6시간째보다 iNOS 유전자 발현량이 적었다.
4. IFN- $\gamma$ 와 丹蔘을 동시에 처리했을 때 각각을 단독으로 처리했을 때보다 상승적으로 많은 양의 TNF- $\alpha$ 가 분비되었다.
5. 강력한 PKC 억제제인 STSN 혹은 polymyxin B를 IFN- $\gamma$ 와 함께 부가했을 때 STSN 혹은 polymyxin B는 rIFN- $\gamma$ 와 丹蔘 유도성 NO 생성을 모두 유의 성있게 억제하는 효과를 나타내지는 않았다. 그러나 STSN과 polymyxin B는 丹蔘으로 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 현저하게 억제하였다.

6. 丹蔘으로 유도되는 NO 발생은 항 TNF- $\alpha$  중화 항체에 의해 현저하게 억제되었다.

이상의 실험결과로 볼 때 생체내에서 NO의 생리활성을 고려한 임상활용이 가능할 것으로 보이며, 또한, 인체의 대식세포를 이용한 지속적인 실험으로 丹蔘의 효능을 확인하는 연구가 필요하리라 사료된다.

### 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학. 免疫學. 서울:서울대학교 출판부. 1992:303-311,337-351.
2. 方葯中. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1988:12-16.
3. 楊維傑. 黃帝內經素問釋解. 서울:成輔社. 1980:266-267.
4. Brecht D. S. and Synder S. H.. Nitric oxide. a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992;8:3.
5. Nathan C. F., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051.
6. Solary E., Bertrand R., Khon K. W. and Pommier Y.. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 1993;81:1359.
7. 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*. 1996;117:1549-1557.
8. Mantney C L, P Y Perera, C A Salkowski and S N Volgel. Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol*. 1994;152:825-831.
9. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1982:519-521.
10. 神農氏. 神農本草經 卷1. 臺北:集文書局. 1979:29-30.
11. 安德均 譯. 면역과 한방. 서울:열린책들. 1992:80-85.
12. 楊藝 外. 丹蔘藥理作用近識. 湖北中醫雜誌. 1999;21(6):284-286.
13. 王浴生. 中藥藥理와 應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:223-227.
14. 전길환. 신민교. 송호준. 三白草가 腹腔大食細胞로부터 Nitric Oxide(NO) 遊離機轉에 대한 研究. 대한한의학회지. 1998;19(2):36-49.

15. 박진상. 菌蔭 抽出物이 마우스 大食細胞주인 RAW264.7 세포주의 iNOS 發現 및 superoxide 形成에 미치는 影響. 圓光大碩士學位論文. 1998.
16. Green L C, Wagner D A, Glogowski J, Skipper P L, Wishnok J S and Tannenbaum S R. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}$ N] nitrate in biologic fluids. *Anal. Biochem*. 1982;126:131.
17. Scuderi P, Sterling K E, Lam K S, Finley P R, Ryan K J, Ray C G, Petersen E, Slymen D J and Salmon S E. Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 1986;2:1364.
18. Xie Q-W, Cho H J, Calaycay J, Mumford R A, Swiderek K M, Lee T D, Ding A, Troso T and Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256:225.
19. Kim H M, Hirota S, Onoue H, Hirata T, Suzuki K, Ohno S, Kuroki T, Kitamura Y and Nomura S. Localization and developmental expression of novel protein kinase C  $\delta$  gene. *Dev. Brain Res*. 1992;70:239.
20. Barsky A J, Borus J F. Somatization and medicalization in the era of managed care. *JAMA*. 1995;274:1931-1934.
21. 이문호 외. 최근 한국의 질병 변천. 대한의학협회지. 1989;32(3):283-290.
22. 김동집. 免疫療法の 最近 動向. 대한의학협회지. 1980;23(9):762.
23. 孔慶德 外. 진행성 위암에 대한 5-FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과. 대한암학회지. 1990;22:144.
24. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 형림서원. 1995:19,32-42.
25. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 癌腫의 病因病理에 관한 文獻的 考察. 대한한방중앙학회지. 1995;1(1):83-101.
26. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료(I). 익산:원광대학교 출판국. 1999: 1-22,455-456,462-465.
27. 戴雲 外. 丹蔘對肝病營養調理作用. 江蘇中醫藥. 1990:39-42.
28. 張步振 外. 丹蔘對急性腎衰的療效觀察及機理研究. 中醫醫學學報. 1991;6(2):26-27.
29. 宋春浩. 丹蔘水鉀이 鎮痛 및 血壓降下에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1995;8: 205-217.
30. 周孜. 丹蔘의藥理作用及臨床應用. 1990;10(4):242-243.

31. Wagner D A, Young V R and Tannenbaum S R. Mammalian nitrate biosynthesis: Incorporation of  $^{15}\text{NH}_3$  into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983;78:7764.
32. Stuehr D JL, Gross S S, Sakuma I, Levi R and Nathan C F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* 1989;169:1011.
33. Hibbs J B Jr, Taintor R R and Vavrin Z. Iron depletion. possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;123:716.
34. Croen K D. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type I replication. *J. Clin. Invest.* 1993;91:2446.
35. Lee E H, and Kim H M. Activation of inducible nitric oxide synthase by human chorionadotropin in RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;59:1359.
36. Snyder S H, and D S Bredt. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American Review.* 1992;28:35.
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.* 1997;176:41-49.
38. Lowenstein C J, and S H Snyder. Nitric OXide. a novel biological messenger. *Cell.* 1992;70:705.
39. Old L J. Tumor necrosis factor. polypeptide mediator network. *Nature.* 1987;326:330.
40. Peng H B, Libby P, Liao J K. Incuction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of Nf-kappa. B. *J. Biol. Chem.* 1995;270:14214.