

# 香附子 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

이영선 · 한옥경 · 신상우<sup>1</sup> · 박종현<sup>1</sup> · 권영규<sup>2\*</sup>

(재)경북테크노파크, 대구한의대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원,  
1: 대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Water-Extracted Cyperus Rotundus on the Nitric Oxide Production and Cytokine gene Expression

Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Sang Woo Shin<sup>1</sup>, Jong Hyun Park<sup>1</sup>, Young Kyu Kwon<sup>2\*</sup>

*Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicines, Daegu Haany University,*

*1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University*

The present study was conducted to evaluate the regulation mechanism of nitric oxide(NO) by water-extracted Cyperus rotundus (WCR) in RAW 264.7 macrophages. We investigated the effects of cell proliferation in mouse spleen cell and RAW 264.7 macrophages cells. WCR enhanced mitogenic activity in the dose-response manner in mouse spleen cells and RAW 264.7 macrophages cells. In nitric oxide (NO) synthesis by WCR, WCR alone had an effect on NO synthesis. It was found that the production of NO of RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) could be markedly inhibited by WCR. Inhibition of NO production was achieved by reducing inducible nitric oxide synthases(iNOS) mRNA expression. The expression of IL-1 gene by WCR was investigated using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In RT-PCR, IL-1 family(IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ ) expressions were induced by WCR. These finding suggested that regulation of NO production by WCR may be, at least in part, associated with the regulation of iNOS mRNA expression and IL-1 family gene expression.

Key words : Cyperus rotundus, cell proliferation, NO, iNOS, IL-1

### 서 론

香附子是 莎草科(방동사니과; Cyperaceae)에 속한 多年生 草本인 莎草의 根莖을 乾燥한 것으로 疏肝理氣解鬱, 調經止痛의 要藥으로 활용되어 왔다<sup>1)</sup>. 『名醫別錄』에 처음 收載되었는데, 그 主治效能을 主胸中熱, 充皮毛, 久服利人益氣, 長髮眉라 하여 '益氣'의 效能을 강조하고 있으며, 이는 현대적인 관점에서 볼 때 免疫의 增強과 연계시켜 볼 수 있다<sup>2)</sup>. 대식세포는 자연 면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 reactive oxygen species(ROS) 와 IL-1, TNF  $\alpha$  및 IL-6와 같은

사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 그러나, 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 반응산소 중간 물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1, TNF  $\alpha$  및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>3-6)</sup>. 산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 nitric oxide synthetase (NOS)에 의해 합성되며 신체의 다양한 생리적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있다. cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ),

\* 교신저자 : 권영규, 대구광역시 수성구 상동 165번지, 대구한의대학교  
· E-mail : ykkwon@ik.ac.kr · Tel : 053-770-2242  
· 접수 : 2003/03/25 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/30

interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고 농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래 할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>9-13</sup>). 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제 등의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 Polygonum tinctorium<sup>15</sup>, Melia azedarach<sup>11</sup>, Cyperus rotundus<sup>16</sup>, Cudrania tricuspidata<sup>9</sup> 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 열수 추출된 향부자(WCR)의 NO 생성조절, iNOS 유전자 발현 및 IL-1 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 향부자의 준비

實驗에 使用된 藥材는 慶山大學校 附屬 韓方病院에서 구입하였고, 良質의 것을 精選하여 使用하였다. 향부자 40g을 증류수 1200ml를 첨가하여 2시간 동안 증탕하여 검액 700ml를 추출하였다. 추출한 검액은 멸균 거여즈를 이용하여 1차 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15분간 遠心分離를 실시하여 상층액만을 채취한 다음 이를 1.2 $\mu$ m와 0.45 $\mu$ m의 membrane filter(Milipore Co., USA)로 除菌하여 使用하였다.

### 2. 실험동물 및 처치

동물은 생후 6주령된 체중 28 g 정도의 웅성 ICR 마우스를 (주)대한 바이오링크로부터 구입하여 대구한의대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 습도: 50 $\pm$ 5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 전 기간 동안 물과 사료 (삼양유지사료(주), 강원도 원주시)는 제한 없이 공급하였다.

### 3. 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포주를 ATCC로부터 분양 받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 5% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin를 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

### 4. 비장세포 분리

에테르 마취 후 심장에서 혈액을 채취 후 70% 알코올로 분무한 후 무균적으로 비장을 적출 하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장 세포로 만든 후 4 $^{\circ}$ C, HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 용액으로 2회 세척하였다. ACK lysis 용액을 가하여 적혈구를 완전히 용혈 시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 배지로 한 번 더 세척한 후 10% FBS가

첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4% trypan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 살아 있는 비장 세포 수를 측정하여 사용하였다.

### 5. 비장세포 및 RAW 264.7 대식세포 증식능 실험

마우스 비장세포와 RAW 264.7 대식세포를  $2 \times 10^5$ /100  $\mu$ l 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100  $\mu$ l가 되게 조정하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 48시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96 $\oplus$  Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면 배양액 100  $\mu$ l에 시약을 20  $\mu$ l첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 1시간 30분 배양한 후 ELISA reader 490 nm에서 측정하였다. 임파구 증식 결과는 실험군의 [(평균 O.D.) - (평균 background O.D.) $\pm$ S.D] 값으로 표시하였다.

### 6. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

### 7. RT-PCR (역전사 증합효소 연쇄반응)

RNA분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 TRIzol 900  $\mu$ l를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100  $\mu$ l를 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5  $\times$  RT buffer 2  $\mu$ l, 10 mM dATP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dGTP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dTTP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dCTP 0.25  $\mu$ l, MMLV reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, RNase inhibitor (28 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, 50  $\mu$ M oligo dT primer 0.5  $\mu$ l, DEPC-DW 4  $\mu$ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controller; MJResearch, Inc.)에 넣어 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10 $\times$  PCR buffer 3  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8  $\mu$ l, 10 mM dATP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dGTP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dTTP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dCTP 0.3  $\mu$ l, 50  $\mu$ M sense 및 antisense primer 0.25  $\mu$ l, Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l,

Promega Co.) 0.25  $\mu$ l를 혼합하고, 여기에 D.W.를 넣어 최종 용액량이 20  $\mu$ l되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5  $\mu$ l를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에 3분간 1 cycle 반응 후, 94 $^{\circ}$ C 45초, 57 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초간 35 cycles 반응시켰으며, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequence used for detection of cytokine and inflammatory related gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-1 $\alpha$	5'-CAC TAT CTC AGC ACC ACT TG-3' 5'-CTG GAA GTC TGT CAT AGA GG-3'
IL-1 $\beta$	5'-CCG TGG ACC TTC CAG GAT GA-3' 5'-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GC-3'
iNOS	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

8. 통계 처리법

실험 결과는 mean  $\pm$  S.D 또는 mean  $\pm$  S.E로 나타내었으며, ANOVA test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

1. WCR이 RAW 264.7 대식세포 및 마우스 비장세포증식에 미치는 영향

WCR의 RAW 264.7 대식세포 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 WCR을 각 용량별 (0, 10, 100, 100  $\mu$ l/ml)로 48시간 배양하여 WCR의 대식세포증식에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 1).

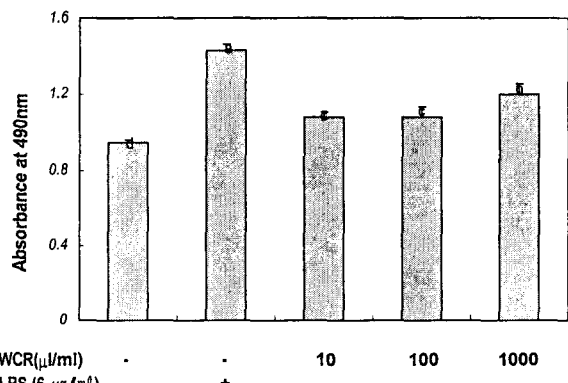


Fig. 1. Dose response of WCR on the proliferation of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were cultured with several concentration of WCR for 48 hr. Control group was incubated with DMEM only. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. in triplicate cultures.

RAW 264.7 대식세포의 증식능은 양성 대조군으로 사용한 LPS 자극에 의해서 유의성 있게 증가되었으며, WCR의 농도별 처리에 의해 대조군에 비해 유의성 있게 세포증식이 증가되었다. 또한 WCR의 정상 면역관련 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포의 증식 능을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 WCR의 처리시 비장세포의 증식능이 WCR 농도 100, 1000  $\mu$ l/ml의 농도에서 세포증식이 증가되었다(p<0.05)(Fig. 2).

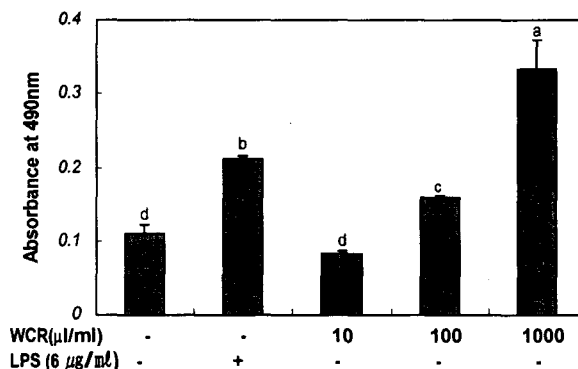


Fig. 2. Dose response of WCR on the proliferation of mouse spleen cell. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with several concentration (0, 1, 10, 100  $\mu$ l/ml) of WCR for 48hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates significant difference (p<0.05).

2. WCR의 NO 생성에 미치는 효과

WCR 자체의 NO 생성능을 살펴보기 위해서 WCR을 농도별로 RAW 264.7 대식세포에 처리하여 생성되는 NO 양을 측정하였다. 대조군에서 비하여 WCR 농도별(10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 및 1000  $\mu$ l/ml) 에서 각각 105%, 105% 및 131% 로 WCR 농도 의존적으로 NO 생성이 증가됨이 관찰되었다(Fig. 3).

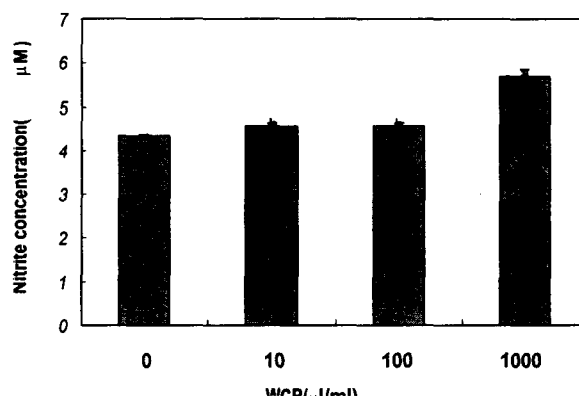


Fig. 3. Dose-dependent effect of WCR on NO synthesis in RAW 264.7 cells. The cells were incubated with 1  $\mu$ l/ml to 100  $\mu$ l/ml WCR for 24 h. NO synthesis was determined by measuring accumulation of nitrite in the incubation medium. The data present the means for triplicate, and the bars represent the standard deviation. \*p<0.05 compared with untreated samples.

3. WCR의 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성억제 효과

LPS 자극에 의해 과다하게 생성되는 NO 양에 WCR이 미치는 효과를 관찰하기 위하여 LPS 자극시 WCR을 첨가하여 NO생성에 미치는 효과를 조사하였다. LPS를 단독으로 처리하였을 경우  $13.97 \pm 0.24 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으나, LPS와 WCR을 혼합하여 배양된 세포에서 NO 생성량은 WCR 농도별 ( $10 \mu\text{l}$ ,  $100 \mu\text{l}$  와  $1000 \mu\text{l}/\text{ml}$ )에 따라 각각  $13.45 \pm 0.11$ ,  $13.08 \pm 0.39$  및  $11.56 \pm 0.12$  로 WCR 용량 의존적으로 LPS자극에 의한 NO 생성량이 억제됨이 관찰되었다(Fig. 4). 또한 WCR  $1000 \mu\text{l}/\text{ml}$ 를 LPS와 함께 처리하여 시간별에 따른 NO 생성에 관하여 실험한 결과, LPS 단독 처리 군에서는 다른 실험 군에 비해 12 시간부터 NO 생성량이 증가되었으나, WCR과 함께 처리함으로써 NO 양의 증가가 억제됨이 관찰되었다(Fig. 5).

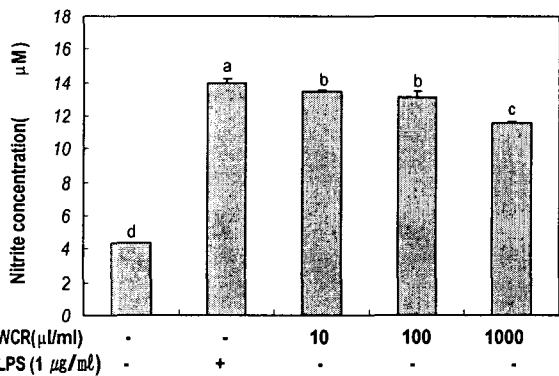


Fig. 4. Effect of WCR on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without lipopolysaccharide (LPS;  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hr in the presence or absence of WCR at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments

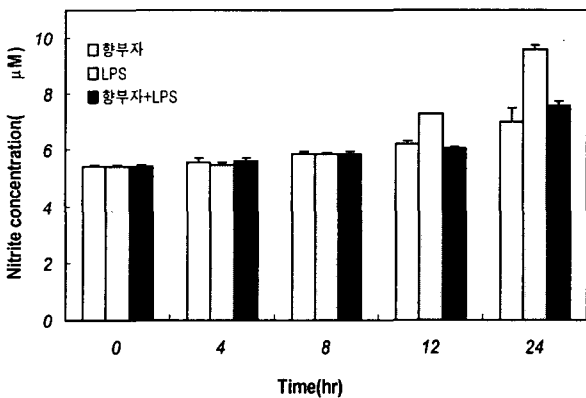


Fig. 5. Time kinetics of WCR on NO synthesis in RAW 264.7 cells. The cells were incubated with  $100 \mu\text{l}/\text{ml}$  WCR for various time points (1, 4, 8, 12, 24 hr) in the presence or absence of  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. NO synthesis was determined by measuring accumulation of nitrite in the incubation medium. The data present the means for triplicate.

#### 4. WCR에 의한 RAW 264. 7 세포에서 iNOS 유전자 발현

NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. WCR 단독 처리시  $1000 \mu\text{l}$ 에서는 iNOS

유전자 발현이 약하게 관찰되었다. 그리고, LPS 자극에 의해 iNOS 유전자 발현이 강하게 유도되었으나, LPS와 WCR을 동시에 처리시 WCR 농도 의존적으로 iNOS 유전자 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 6).

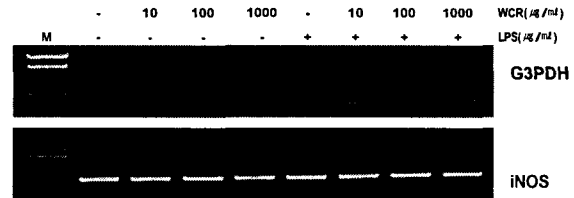


Fig. 6. Inhibition of iNOS mRNA expression by WCR in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS in the presence or absence of various concentrations of WCR for 24 hr. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes.

#### 5. WCR에 처리 시간별에 따른 iNOS 유전자 발현

WCR에 의한 시간별 iNOS유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 WCR 단독 및 LPS 와동시 처리하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. WCR( $1000 \mu\text{l}/\text{ml}$ ) 단독 처리시 4시간부터 iNOS 유전자 발현이 약하게 관찰되기 시작하여 시간이 경과함에 따라 iNOS 유전자 발현이 점점 증가됨이 관찰되었다. 그러나 LPS와 처리시 iNOS 유전자 발현은 8시간째 강하게 발현되었으나, 시간이 경과함에 따라 iNOS 유전자 발현이 감소됨이 관찰되었다(Fig. 7).

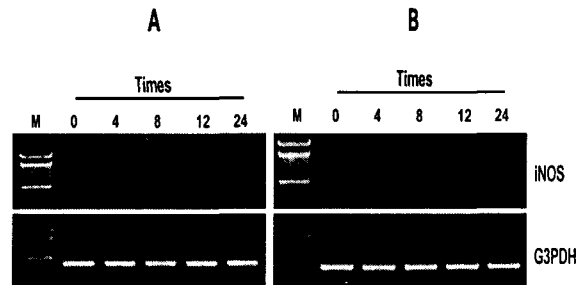


Fig. 7. Time kinetics of WCR on iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. The cells were incubated with  $1000 \mu\text{l}/\text{ml}$  WCR for various time points (1, 4, 8, 12, 24 h) in the absence(A) or presence(B) of  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes.

#### 6. WCR에 의한 RAW 264. 7 세포에서 IL-1 mRNA 유전자 발현효과

NO 생성에 IL-1 유전자 관여를 살펴보기 위하여 WCR을 농도별로 RAW 264. 7 세포에 처리한 후 IL-1 $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  유전자 발현을 관찰하였다. IL-1 $\alpha$  유전자 발현은 WCR( $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ )에서 양하게 발현되기 시작하여 농도 의존적으로 발현이 증가되었으며, IL-1 $\beta$  유전자 발현의 경우 WCR( $100, 1000 \mu\text{l}/\text{ml}$ )에서 약하게 발현이 관찰되었다. LPS 자극시 WCR에 의한 IL-1유전자 발현의 변화를 살펴본 결과 LPS 자극에 의해 유도된 IL-1 $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  유전자 발현은 WCR의 농도 의존적으로 이들의 유전자 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 8).

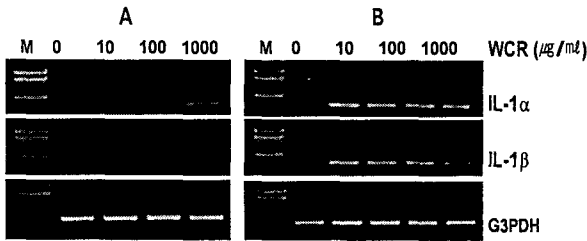


Fig. 8. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene expression in RAW 264.7 cells by AL. RAW 264.7 cells were stimulated with various amount of WCR in the absence(A) or presence(B) of 1 $\mu$ g/ml LPS for 24 hr. Total RNA was prepared from each sample and RT-PCR were performed as described in materials and methods. G3PDH was used as control genes.

## 고찰

香附子は 莎草科(방동사니과; Cyperaceae)에 속한 多年生 草本인 莎草의 根莖을 乾燥한 것으로 性은 平無毒하고 味는 辛微苦甘하며 肝, 脾, 三焦經으로 入한다<sup>1)</sup>. 疏肝理氣解鬱, 調經止痛의 효능으로 肝氣鬱滯로 인한 胸脇脘腹脹痛과 婦女の 月經不調, 痛經과 胎前諸疾을 치료하는 要藥으로 常用되어 왔는데, 처음 收載되었던 『名醫別錄』에서는 그 主治效能을 主胸中熱, 充皮毛, 久服利人益氣, 長髮眉라 하여 ‘益氣’의 效能을 강조하고 있다<sup>2)</sup>. 取象의 觀點으로 살펴보면, 香附子は 生長時에 줄기가 곧게 올라와서 이삭이 열리고 기장처럼 결실하면서 뿌리에도 양조(羊糞) 같은 열매가 계속 열리고 위에서 잎이 무성하게 나오면서 아래에도 실같은 뿌리가 많이 나오므로 ‘氣가 茂盛하다’고 할 수 있으며, 이를 통해 ‘益氣’의 효능이 설명될 수 있다<sup>14)</sup>. 이것은 현대적인 觀點에서 볼 때 免疫의 增強과 연계시켜 볼 수 있다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증등의 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>17-18)</sup>. 주로 대식세포에서 생성되는 NO는 작고 불안정한 무기가스로 이종적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다. 낮은 농도의 NO는 신경전달 물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고되고 있다<sup>7-12)</sup>. 대식세포에 의한 NO 생성은 다양한 요인에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는데, 최근의 연구 보고들에 의하면 주로 활성화된 대식세포에서 NO 생성 조절은 iNOS 유전자 발현에 의한 것으로 보고되고 있다. 김 등<sup>19)</sup>은 개나리의 열수추출물이 IFN $\gamma$ 와 LPS 자극에 의해 유도된 NO 생성을 감소시켰으며, 이러한 NO 생성의 감소가 iNOS 유전자 발현의 감소에 의한 결과임을 보고하였으며, 서 등<sup>9)</sup>은 ethyl acetate 추출로 얻어진 꾸지뽕나무의 추출액이 IFN $\gamma$ 와 LPS 자극된 RAW 264.7세포에서 NO 생성을 감소시켰으며, 이러한 NO의 감소는 iNOS mRNA 유전자 및 단백질 발현의 감소와 관련 있음을 보고하였다. 따라서 iNOS 유전자의 적절한 조절을 통한 NO 생성 조절제를 찾고자 하는 많은 연구들이 수행되고 있다<sup>11-13,15,16)</sup>. 이번 실험에서 WCR의 NO 생성 조절 및 기전을 살펴보기 위하여 먼저 WCR의 다양한 농도가 WCR의 대식세포와 임파구 증식에 미치는 영향을 조사

한 결과, WCR은 대식세포와 비장 임파구 세포의 증식을 농도 의존적으로 증가시켰는데, 이는 WCR이 직접 mitogen으로 작용하여 세포 증식을 활성화시킬 수 있음을 간접적으로 제시하는 결과라 할 수 있으며, WCR이 대식세포와 임파구세포에 독성 작용이 없음을 나타내 주는 결과라 할 수 있다. WCR에 의한 대식세포에서의 NO 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, WCR의 NO 생성은 WCR 농도 의존적으로 NO생성이 증가되었으며, LPS로 처리 시 과도하게 증가된 NO 생성은 WCR 농도 의존적으로 감소되었다. iNOS 유전자 발현 또한 WCR 농도 의존적으로 iNOS 유전자 발현이 관찰되었으며, LPS로 처리 시 강하게 발현된 iNOS 유전자 발현은 WCR 농도의존적으로 발현이 감소되었다. 이는 WCR의 NO 생성의 조절에 iNOS 유전자 발현이 관여하고 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다. IL-1은 처음에 림프구 증식을 활성화시키는 물질 즉 림프구 활성화인자(lymphocyte activating factor)라 불렸으며, 대식세포에서 생성 분비되는 것으로 확인되었고, 대표적인 d염증 매개 사이토카인으로 알려져 있으며, 활성을 나타내는 분자는 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  두 가지가 있는 것으로 알려져 있다<sup>20)</sup>. 활성화된 대식세포에서 생성된 IL-1은 iNOS를 발현시키고 NO 생성을 활성화시키는 것으로 최근 많은 연구에서 보고되고 있다<sup>5,21)</sup>. 윤 등<sup>22)</sup>은 열수출된 상백피의 LPS로 자극된 마우스 복강대식세포에서 IL-1생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 열수 추출된 상백피에 농도 의존적으로 IL-1 생산이 감소되는 것을 보고하였다. WCR의 대식세포에서 IL-1 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 WCR 농도 의존적으로 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 증가되었으며, LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 WCR 농도 의존적으로 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  유전자 발현이 감소되는 것이 관찰되었다. 이는 iNOS 유전자 발현과 NO 생성에 WCR에 의해 생성된 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  유전자 발현이 관여 할 수 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

이상의 실험결과를 볼 때 WCR은 대식세포의 NO 생성을 적절하게 유도 할 수 있으며, 과도하게 생성되는 NO 양을 조절하여 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 할 수 있는 생물 활성 조절자 (BMR) 뿐만 아니라, NO 생성 저해제의 후보 물질로 작용할 수 있음을 시사한다고 할 수 있다. 그러나, 항부자를 우수한 NO 생성 조절제로 사용하기 위해서는 항부자의 활성물질을 순수 분리하여 이들의 작용기전을 보다 구체적으로 밝히는 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

## 결론

열수 추출된 항부자(WCR)의 NO 생성조절, iNOS 유전자 발현 및 IL-1 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. WCR은 RAW 264.7 대식세포 및 비장세포의 증식 능을 WCR 농도 의존적으로 증가시켰다. WCR은 RAW 264.7 대식세포에서 WCR 농도 의존적으로 NO생성을 증가시켰으며, LPS로 처리에 의해 과도하게 증가된 NO 생성을 WCR 농도 의존적으로 감소시켰다. 이러한 NO 생성 및 억제에는 iNOS 유전자 발현 및 IL-1 사이토카인 유전자 발현이 관여함이 관찰되었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 WCR은 대식세포의 NO 생성을 조절하여 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 할 수 있으며, NO 생성 저해제의 후보 물질로 작용할 수 있으리라 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원 (02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著, 本草學, pp 354-5, 永林社, 서울, 1991.
2. 新文豐出版公司, 中藥大辭典, pp 1413-4, 新文豐出版公司, 臺北, 臺灣, 1982.
3. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 10, 8-15, 2000.
4. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 144, 1425-1431, 1990.
5. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211, 24-32, 1996.
6. Corbett JA, and Mac Daniel ML : Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J. Exp. Med. 181, 559-568, 1995.
7. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL : TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine, 6, 399-406, 1994.
8. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999.
9. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol 35, 21-28, 2000.
10. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci 69, 625-635, 2001.
11. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur J Pharmacol 406, 301-309, 2000.
12. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacol 76, 119-123, 2001.
13. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med 28, 217-226, 2000.
14. 鄒澍 著, 임진석 譯, 本經疏證, p 649, 아티진, 서울, 1998.
15. Ishihara T, Okura T, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J Ethnopharmacol 72, 141-150, 2000.
16. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 76, 59-64, 2001.
17. 박재승, 이정호, 하대유. Capsaicin 전처치가 마우스 대식세포의 기능에 미치는 영향. 대한면역학회지 22, 39-49, 2000.
18. Haslberger A, Romanin C, Koerber R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. Mol Biol Cell 3, 451-460, 1992.
19. Kim NY, Kang TH, Song EK, Pae HO, Chung HT, Kim YC. Inhibitory effects of butanol fraction of the aqueous extract of *Forsythia koreana* on the nitric oxide production by murine macrophage-like RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 73, 323-327, 2000.
20. 김세종, 면역학, p 148-161, 고려의학, 1994.
21. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG and Needleman P : nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. Pro. Natl. Aca. Sci. 90, 7240-7244, 1993.
22. 윤창용, 신동환, 홍충만, 이원규, 장동덕, 조재현 : 대식세포의 NO, TNF $\alpha$  및 IL-1 생산에 미치는 삼백피의 억제 효과. 한국수의공중보건학회지, 22, 281-292, 1998.