

# 곽향(*Agastache rugosa*)을 포함한 21종의 한약재가 대식세포주 RAW 264.7 세포의 nitric oxide(NO) 생산 조절에 미치는 효과

김승현 · 강미영<sup>1</sup> · 남석현\*

아주대학교 생명과학과, <sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과

## Modulatory Effects of 21 kinds of Medicinal Herbs Including Herba Pogostemi (*Agastache rugosa*) on Nitric Oxide Production in Macrophage Cell line RAW 264.7 cells

Seung Hyun Kim, Mi Young Kang<sup>1</sup> and Seok Hyun Nam\*

Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 18, 2005; Accepted October 20, 2005

Aqueous extracts were prepared from 21 medicinal herbs including Herba Pogostemi (*Agastache rugosa*) to examine their modulatory effects on NO production in mouse macrophage cell line RAW264.7 cells. While almost all medicinal herb extracts failed to show marked scavenging activities to NO produced by LPS stimulation, only Herba Pogostemi showed a rather strong induction of NO production in RAW264.7 cells without stimulation with LPS. When we treated the cell with 200 μM of N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (N<sup>G</sup>MMA), a NOS2 inhibitor, a significant reduction in NO production could be observed. Moreover, a treatment of 100 μM pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) led to about a 79% reduction of NO production. These results demonstrated that the aqueous extract of Herba Pogostemi might provide a second signal for the expression of NOS2 in RAW264.7 cells, and suggested that Herba Pogostemi induces NO production through L-arginine-dependent pathway.

**Key words:** Herba Pogostemi, *Agastache rugosa*, Nitric oxide, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, Pyrrolidine dithiocarbamate

### 서 론

일산화질소(NO)는 dioxygenase인 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 arginine이 citrulline으로 산화될 때 생산되는 반응성이 높은 라디칼로서,<sup>1)</sup> nitroglycerin과 동일하게 세포 내 cGMP의 생산을 유도하여 혈관내피 평활근의 이완을 일으키는 EDRF(endothelium-derived relaxing factor)로서 그 생리적 기능이 알려진 이래,<sup>2)</sup> 다양한 생물학적 효과를 나타내는 물질로 알려져 왔다.<sup>3)</sup> 즉, NO는 세균과 같은 감염성 병원체 및 종양을 억제할 수 있음이 밝혀짐으로서 독성물질로서 NO가 내재면역계에서 중요한 기능을 수행함이 알려졌을 뿐 아니라,<sup>4)</sup> 숙주 면역세포의 기능을 조절함으로써 결과적으로 감염체에 대한 특이적 면역의 성립에 기여함이 밝혀졌다. 또한, 천식과 같은 특정 염증질환에 있어서 NO가 대대적으로 발현되는 것으로 보아, 염

증을 유발시키는 인자로 생각되지만, 세포의 증식 및 신호전달 과정을 억제하거나 세포사를 유도시키는 방법을 통하여 오히려 염증을 억제하고 면역부전을 유발시키기도 한다. NO가 발현하는 기능의 다양성은 농도 및 표적세포의 활성화 여부 등에 따라 달라진다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 대식세포가 감염체에 의하여 활성화되면 NO 뿐 아니라 superoxide anion을 호흡폭발에 의하여 대량 생산되는데, NO 자신은 매우 약한 산화성을 가진 라디칼로서 오히려 vitamin E와 비슷하게 세포의 지질과산화물을 막는 항산화 기능도 수행한다는 결과도 보고되어 있는 것으로 볼 때,<sup>6)</sup> NO의 세포 독성은 근접한 장소에서 생성되는 superoxide anion과 반응하여 만들어진 peroxynitrite에 기인한 것으로 생각된다.<sup>7-9)</sup> 따라서 superoxide anion의 생성정도는 NO의 세포 독성과 NO가 유도하는 면역반응의 강도 조절에 매우 중요하며, peroxynitrite에 의한 세포 상해가 주 원인으로 생각되는 염증반응을 완화시키는데 있어서도 종래에 사용되어 온 NO를 소거하는 방식보다는 superoxide anion의 생성을 저해하거나 NADPH oxidase의 활성을 감소시키는 방법이 더욱 비중있게 다루어지고 있다.<sup>10)</sup>

\*Corresponding author

Phone: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

우리나라를 비롯하여 동양권에서 오랫동안 질병의 치료와 예방에 사용되어 온 한약재는 식물의 2차 대사산물의 생리활성 효과를 이용하는 천연소재로서 장기간에 걸쳐 경험적으로 선택·이용되면서 인체에 대한 안전성이 대체적으로 검증된 것들이라고 할 수 있다. 이와 같은 천연 생리활성 물질에 일반적으로 존재하는 항산화 활성을 이용하여 superoxide anion과 같은 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)을 적극적으로 소거하면서도 대식세포의 내재면역성 기작에 중요한 역할을 하는 humoral factor인 NO의 생산을 유도하는 물질의 탐색이 향후 면역증진을 통한 감염 저항성의 획득이나 염증반응의 완화 및 종양 형성의 저해제의 개발에 도움을 줄 것으로 본다. 따라서 본 연구에서는 저자들이 항산화효과를 검증한 130종의 한약재들<sup>11)</sup> 중에서 DPPH radical에 대한 전자공여능이 우수한 21종의 한약재를 선별하여 이들의 열수추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 생산을 유도는 활성을 측정하였고, NO의 생산기작을 추론하기 위하여 NOS2의 저해제인 *N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(*N*<sup>G</sup>MMA)와 NF- $\kappa$ B의 저해제인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC)가 시료에 의한 NO 생산에 미치는 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

**시료 및 시약.** 경기도 의왕시의 한의원에서부터 기증받은 21종의 한약재는 아주대학교 자연과학대학 식물분류학 실험실에서 한약재 식물종 진위여부를 판별한 다음,<sup>12)</sup> 빛이 차단된 4°C에 보관하며 사용하였다. Lipopolysaccharide(LPS), *N*<sup>G</sup>MMA (*N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine), sodium nitrite, PDTTC(pyrrolidine dithiocarbamate)와 기타 실험에 사용한 화학시약들은 모두 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. PCR에 사용된 primer는 Bioneer(Chungwon, Korea)에 제작을 의뢰하여 사용하였으며, AMV reverse transcriptase와 *Taq* polymerase는 모두 Takara Shuzo(Kyoto, Japan)의 제품을 구입하여 사용하였다.

**세포 배양.** 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 세포 배양에 사용된 배지인 RPMI 1640 medium (Eagle's MEM)과 fetal bovine serum(FBS), Hank's balanced salt solution(HBSS) 등은 모두 Hyclone(Logan, UT, USA)의 제품을 구입·사용하였다. RAW 264.7 세포주는 10% FBS와 100 unit의 penicillin과 streptomycin이 함유된 RPMI 1640 media를 사용하여 5%의 CO<sub>2</sub>를 포함한 37°C의 포화습도 공기 조건 하에서 배양하였다.

**시료의 제조.** 한약재 열수추출물은 이전에 보고한 방법에 따라 제조하였다.<sup>13)</sup> 간단히 설명하면, 12g의 건조 한약재를 잘게 분쇄한 다음 탈이온수를 증량 대비 10배량을 넣고 100°C에서 3시간 추출하였다. 추출물은 필터(Whatman paper no. 2, Whatmann International Ltd, Maidstone, UK)를 통과시켜 잔사를 제거한 다음 rotary evaporator(CVE-1000, EYELA, Tokyo, Japan)와 동결건조기(FD 2.5, Heto, Gydevang, Denmark)를 사용하여 고형물로 만든 후, 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하였다.

**Nitric oxide(NO) 생산량 측정.** NO 소거활성은 마우스의 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 지시세포로 이용하여 Murakami 등의 방법<sup>14)</sup>에 따라 측정하였다. RAW264.7 세포는 공급자의 지시대로 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 media에서 계대 배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 RAW264.7 세포를 96-well에 well 당  $1 \times 10^5$  cells을 분주한 다음, 시료를 10  $\mu$ g/ml 및 100  $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 48시간 동안 5% CO<sub>2</sub>의 공기조건에서 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 100 ng/ml의 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 활성화를 유도한 세포를 사용하였으며, NO 생성 억제제인 *N*<sup>G</sup>MMA와 PDTTC는 각각 200  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M의 조건에서 세포에 처리하여 그 효과를 측정하였다. 배양 후, 상징액 100  $\mu$ l를 회수하고 여기에 동량의 Griess solution을 첨가하여 15분간 방치한 다음 상징액의 발색도를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 570 nm 및 650 nm의 흡광도로 측정하였다. 세포가 생산한 NO를 정량하기 위하여 sodium nitrite를 사용하여 동일한 실험과정으로 표준곡선을 작성하였다.

**MTT assay에 의한 세포독성 검정.** Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다.<sup>15)</sup> RAW264.7세포를 microplate에 NO 측정과 같은 조건으로 분주하여 24시간 배양한 후, 10  $\mu$ g/ml 및 100  $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 시료를 첨가하였다. 배양이 끝나면 배양액에 2 mg/ml의 MTT용액(Sigma Chemicals)을 50  $\mu$ l 첨가하고, 37°C에서 3시간 처리한 다음 150  $\mu$ l의 DMSO를 첨가한 상태에서 10분간 진탕시켜 세포 내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 570 nm와 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료 무처리군에 대한 시료 처리군의 비율을 백분율로 계산한 세포 생존율로 나타내었다.

**Endotoxin 혼입량의 측정.** 각 한약재 열수추출물에 혼입될 수 있는 endotoxin의 양을 Sigma Chemicals에서 구입한 E-TOXATE kit로 제조사의 실험방법에 의거, 측정함으로써 endotoxin 혼입량의 실험적 허용한계를 결정하였다.

**RT-PCR.** *A. ruosa* 추출물 및 *N*<sup>G</sup>MMA, PDTTC 자극한  $1 \times 10^6$ 개의 RAW 264.7 세포에서 acid phenol-guanidinium thiocyanate-chloroform extraction 방법으로 세포 내 총 RNA를 추출하여 reverse transcription에 의한 cDNA 합성의 주형으로 사용하였다.<sup>16,17)</sup> 1  $\mu$ g의 RNA를 주형으로 AMV reverse transcriptase와 oligo(dT) 사용하여 cDNA를 합성하였으며, PCR에 사용한 cytokine primer set는 다음과 같다;  $\beta$ -actin sense primer 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3';  $\beta$ -actin antisense primer 5'-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'; NOS2 sense primer 5'-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3'; NOS2 antisense primer 5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3'. PCR 반응조건은 400  $\mu$ M dNTP mix에 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase를 넣고 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초의 순서로 thermocycler(PTC-200, MJ Research, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. PCR 로 증폭된 DNA는

1.5% agarose gel에서 전기영동을 하였고, 분획된 band intensity는 densitometer(Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

**통계분석.** 3회 이상 반복실험에서 얻어진 data는 Statistical Analysis System software package version으로 분석하였다. 실험의 평균값은 mean±SD로 표시하였으며 실험군과 대조군, 그리고 반복실험으로 얻어진 실험군 사이의 평균값의 유의적 차이는 Duncan's multiple range test에 의해서 검증하였고,  $p < 0.05$  수준에서 평균값사이의 유의적 차이를 구하였다.

**결과 및 토론**

**대식세포주에서 한약재 추출물의 NO 생산 효과.** 본 실험에 사용한 21종의 한약재를 Table 1에 정리하였다. 이 한약재들은 이미 저자들이 수행한 실험에서 실험적으로 생성시킨 DPPH 라디칼을 70% 이상 소거하는 것으로서,<sup>11)</sup> 조사한 130종의 한약재 중에서 라디칼 소거활성이 우수한 부류에 속하는 것으로 나타났다기 때문에 세포 수준에서도 독성을 가진 ROS를 효과적으로 소거할 것으로 추정되는 약재들이다(Table 2). 이와 같은 항산화성이 우수한 한약재들의 열추출물이 대식세포의 NO 생산능을 조절할 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 우선 한약재 열추출물의 NO 소거활성을 측정하였다. 지시세포는 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포를 사용하였고, 세포를 LPS로 자극했을 때 생성되는 NO가 각 시료의 첨가로 소거되는 수준으로 NO 소거능을 측정하였다. Table 3에 정리된 결과처럼, 100 µg/ml의 시료 농도에서 감초는 LPS의 자극으로 생성된 NO의 약 41%를 소거함으로써 조사한 한약재 중 가장 높은 수준의 효과를 보였지만, 그 다음으로 NO 소거효과가 높게 나타난 산사나 후박도 37에서 39% 정도의 소거활성 밖에 없는 것으로

**Table 2. Antioxidative activity of the medicinal herbs *in vitro*<sup>#</sup>**

Medicinal Herbs	Electron donating ability	
	OD at 517 nm	(% of scavenging)
Control	0.71±0.01	(0)
Semen Gleditsiae	0.11±0.01	(86)
Radix Linderae	0.13±0.01	(83)
Semen Alpiniae Katsumadaii	0.12±0.02	(83)
Frutus Crataegi	0.14±0.01	(82)
Rhizoma Sparganii	0.13±0.01	(82)
Radix Adenophorae	0.14±0.01	(81)
Cortex Acanthopanax	0.15±0.01	(80)
Pericarpium Arecae	0.14±0.02	(80)
Fructus Amomi Rotundi	0.15±0.04	(80)
Herba Pogostemi	0.18±0.02	(76)
Folium Eriobotryae	0.18±0.01	(76)
Flos Chrysanthemi	0.18±0.03	(76)
Cortex Magnoliae	0.18±0.01	(76)
Cortex Eucommiae	0.20±0.02	(75)
Exocarpium Citri Leiocarpae	0.19±0.03	(75)
Radix Dipsaci	0.20±0.02	(73)
Semen Amomi	0.20±0.01	(73)
Exocarpium Citri Leiocarpae unripe	0.14±0.01	(80)
Radix Angelicae	0.14±0.01	(80)
Rhizoma Atractylodis Lanceae	0.10±0.01	(86)
Radix Glycyrrhizae	0.22±0.02	(70)

<sup>#</sup>Data summerized from the previous report.<sup>11)</sup>

로 보아, 선정된 21종 한약재의 NO 소거효과는 높지 않은 것으로 조사되었다. 특히 백두구와 두충 및 진피는 거의 NO 소거활성을 나타내지 않는 것을 볼 때, 선발된 21종의 한약재들은 뚜렷하게 높은 NO 소거활성을 보유하지 않는다는 사실을

**Table 1. List of medicinal herbs tested**

Common name (Korean name)	Scientific name	Family name
Semen Gleditsiae (조각자)	<i>Gleditsia japonica</i> var. <i>koraiensis</i> Nakai	Leguminosae
Radix Linderae (오약)	<i>Lindera strychnifolia</i> (Sieb et Zucc. Villar)	Lauraceae
Semen Alpiniae Katsumadaii (초두구)	<i>Amomum globosum</i> Lour.	Zingiberaceae
Frutus Crataegi (산사)	<i>Crataegus oinnatifida</i> Bunge	Rosaceae
Rhizoma Sparganii (삼릉)	<i>Sparganium erectum</i> L.	Cyperaceae
Radix Adenophorae (사삼)	<i>Adenophora divaricata</i> Franch. et Savat. var. <i>manshurica</i> Kitagawa	Campanulaceae
Cortex Acanthopanax (오가피)	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seem.	Araliaceae
Pericarpium Arecae (빈랑)	<i>Areca catechu</i> L.	Zingiberaceae
Fructus Amomi Rotundi (백두구)	<i>Amomum cardamomum</i> L.	Zingiberaceae
Herba Pogostemi (곽향)	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Meyer) O. Kuntze	Labiatae
Folium Eriobotryae (비파엽)	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	Rosaceae
Flos Chrysanthemi (감국)	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	Compositae
Cortex Magnoliae (후박)	<i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wils.	Magnoliaceae
Cortex Eucommiae (두충)	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	Eucommiaceae
Exocarpium Citri Leiocarpae (진피)	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	Oleaceae
Radix Dipsaci (속단)	<i>Phlomis umbrosa</i> Turcz.	Labiatae
Semen Amomi (사인)	<i>Amomum villosum</i> Lour.	Zingiberaceae
Exocarpium Citri Leiocarpae unripe (청피)	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	Rutaceae
Radix Angelicae (당귀)	<i>Ligusticum acutilobum</i> (Sieb. et Zucc.) Kitagawa	Umbelliferae
Rhizoma Atractylodis Lanceae (창출)	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	Compositae
Radix Glycyrrhizae (감초)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Leguminosae

Table 3. Modulatory effects of the medicinal herb extracts on NO production in RAW264.7 cells<sup>5</sup>

Medicinal Herbs	μM of nitrite			
	LPS (+) <sup>a)</sup>		LPS (-) <sup>a)</sup>	
	10 μg/ml	100 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
Negative Control	1.533±0.975	1.533±0.975	1.533±0.975	1.533±0.975
Positive Control	32.348±1.587 <sup>ab</sup>	32.348±1.587 <sup>abc</sup>	32.348±1.587 <sup>a</sup>	32.348±1.587 <sup>a</sup>
Semen Gleditsiae	21.281±2.536(34.2) <sup>§,kl</sup>	22.010±0.470(31.6) <sup>jk</sup>	-0.057±0.230 <sup>gh</sup>	0.340±0.115 <sup>hjk</sup>
Radix Linderae	21.522±1.081(33.5) <sup>kl</sup>	22.672±0.416(29.9) <sup>ij</sup>	0.330±0.132 <sup>gh</sup>	0.439±0.150 <sup>hjk</sup>
Semen Alpiniae Katsumadaii	24.031±0.402(25.7) <sup>jk</sup>	29.432±1.315(9.1) <sup>de</sup>	-0.356±0.057 <sup>h</sup>	0.108±0.517 <sup>hjk</sup>
Frutus Crataegi	25.423±1.152(21.4) <sup>ghi</sup>	19.591±0.884(39.4) <sup>kl</sup>	-0.024±0.207 <sup>gh</sup>	0.075±0.304 <sup>hjk</sup>
Rhizoma Sparganii	28.173±0.639(12.9) <sup>defg</sup>	24.330±0.547(24.8) <sup>ghi</sup>	0.065±1.292 <sup>gh</sup>	-0.124±0.152 <sup>jk</sup>
Radix Adenophorae	22.640±2.009(30.0) <sup>kl</sup>	22.010±3.948(32.0) <sup>jk</sup>	-0.389±0.199 <sup>h</sup>	0.009±0.199 <sup>jk</sup>
Cortex Acanthopanax	24.727±0.547(23.6) <sup>hij</sup>	29.863±0.733(7.7) <sup>cde</sup>	0.108±0.358 <sup>gh</sup>	0.407±0.199 <sup>hjk</sup>
Pericarpium Arecae	25.920±0.470(19.9) <sup>ghi</sup>	27.577±0.470(14.7) <sup>ef</sup>	0.340±0.230 <sup>gh</sup>	0.672±0.207 <sup>ghj</sup>
Fructus Amomi Rotundi	27.146±1.093(16.1) <sup>efgh</sup>	31.553±1.495(2.5) <sup>bcd</sup>	1.898±0.605 <sup>de</sup>	3.057±1.035 <sup>c</sup>
Herba Pogostemi	31.056±0.705(4.0) <sup>abc</sup>	34.900±1.996(-7.9) <sup>a</sup>	4.515±0.304 <sup>b</sup>	29.499±0.582 <sup>b</sup>
Folium Eriobotryae	28.405±0.719(12.2) <sup>cdef</sup>	26.020±0.207(19.6) <sup>fgh</sup>	3.422±0.565 <sup>c</sup>	1.798±0.199 <sup>def</sup>
Flos Chrysanthemi	27.279±2.009(15.7) <sup>efgh</sup>	26.914±0.746(16.8) <sup>fg</sup>	3.720±0.304 <sup>bc</sup>	1.500±0.199 <sup>efg</sup>
Cortex Magnoliae	28.770±3.055(11.7) <sup>cde</sup>	20.287±2.412(37.3) <sup>ikl</sup>	1.136±0.304 <sup>def</sup>	2.593±0.199 <sup>cd</sup>
Cortex Eucommiae	33.375±2.909(-3.2) <sup>a</sup>	33.342±0.500(-3.1) <sup>ab</sup>	1.666±0.402 <sup>de</sup>	1.931±0.152 <sup>de</sup>
Exocarpium Citri Leiocarpae	33.707±1.642(-4.2) <sup>a</sup>	32.348±0.834(0.0) <sup>abc</sup>	2.030±0.230 <sup>d</sup>	2.262±0.115 <sup>cde</sup>
Radix Dipsaci	30.426±2.068(5.9) <sup>bcd</sup>	24.197±2.488(25.2) <sup>hi</sup>	1.533±0.250 <sup>de</sup>	2.229±0.207 <sup>cde</sup>
Semen Amomi	13.727±0.433(57.6) <sup>m</sup>	24.297±1.455(25.2) <sup>ghi</sup>	-0.389±0.172 <sup>h</sup>	-0.356±0.250 <sup>k</sup>
Exocarpium Citri Leiocarpae unripe	27.312±0.376(15.6) <sup>efgh</sup>	26.682±0.320(17.5) <sup>fgh</sup>	-0.057±0.402 <sup>h</sup>	0.970±0.376 <sup>gh</sup>
Radix Angelicae	21.712±0.414(32.9) <sup>kl</sup>	21.878±0.456(32.4) <sup>jk</sup>	0.440±0.250 <sup>gh</sup>	0.506±0.000 <sup>hjk</sup>
Rhizoma Atractylodis Lanceae	21.281±0.696(34.2) <sup>kl</sup>	21.215±0.490(34.4) <sup>ikl</sup>	0.208±0.172 <sup>gh</sup>	-0.057±0.057 <sup>jk</sup>
Radix Glycyrrhizae	20.718±1.350(36.0) <sup>l</sup>	18.995±0.994(41.3) <sup>l</sup>	0.937±0.414 <sup>efg</sup>	0.904±0.398 <sup>ghi</sup>

Values are expressed as mean ± SD.

<sup>a)</sup>LPS(-) or LPS(+) represents treatment of the extracts in the absence or presence of LPS.

<sup>§)</sup>Values in parentheses represent % of NO scavenging by the extracts.

알 수 있었다. 그러나 이 결과가 한약재 추출물에 LPS와 유사하게 대식세포를 자극하여 NO 생산을 유도시키는 물질의 존재에 기인했을 가능성을 부인할 수 없다. 따라서 이와 같은 가능성을 검증하기 위하여, 대식세포주를 한약재 열수추출물만으로 처리했을 때 NO 생산이 유도되는지 여부를 조사하였다. Table 3의 결과와 같이, 광향을 제외한 모든 시료는 그 자체로 NO 생산을 유도할 수 없었는데, LPS와의 동시처리에서 거의 NO 소거효과가 없었던 백두구, 두충 및 진피의 경우에도 기대와는 달리 NO 생산 유도효과가 관찰되지 않았다. 광향은 100 μg/ml의 농도에서 강한 NO 생산 유도효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었으며, 광향의 NO 생성유도효과는 양성대조구에서 LPS로 유도된 NO 생산량의 약 91% 수준이었다. 따라서 LPS와 시료의 공동처리를 통하여 NO 소거효과를 측정했을 때 광향에서 소거활성이 검출되지 않은 것은 광향 열수추출물에 LPS와 기능이 중복되는 물질이 함유되어 있기 때문으로 추론된다(Fig. 1). 광향에 의한 대식세포의 NO 생산 유도효과가 시료에 혼입된 endotoxin으로 인하여 일어났을 가능성을 배제하기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 E-TOXATE kit를 사용하여 시료의 endotoxin 혼입량을 측정하였다. 그 결과, endotoxin 함유량은 0.015 EU/ml 이하로서 혼입된 내재성 endotoxin에 의하여 RAW264.7 세포가 NO를 생산했을 가능성을 무시할 수 있었다. 따라서 광향의 열수추출물에는 LPS와

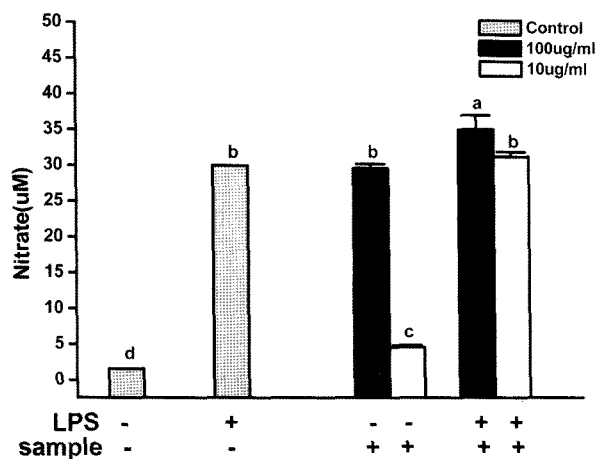
비슷하게 대식세포의 활성화를 통하여 NO 생산을 유도시키는 물질이 함유되어 있다고 생각되지만, 이 부분에 대해서는 향후 정확하게 구명될 필요가 있을 것으로 본다. 따라서 이후의 실험에서는 21종의 한약재 중 NO 생산을 뚜렷하게 유도하는 광향을 중심으로 실험을 수행하였다.

**<sup>N</sup>G<sup>M</sup>MMA가 광향이 유도하는 대식세포주의 NO 생산에 미치는 효과.** 광향이 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 NO 생산을 유도하는 현상이 유도성 NO 합성효소인 NOS2의 전사활화에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법으로 NOS2 mRNA의 발현수준을 측정하였다. Fig. 4에서 보듯이 광향 단독 처리만으로 LPS 처리 수준의 NOS2 mRNA의 발현이 유도되는 것으로 보아, 광향은 NO의 발현을 유전자 수준에서 조절한다는 사실을 알 수 있었다. 이미 기술한 바와 같이 NO는 arginine의 guanido nitrogen이 NOS에 의하여 산화될 때 발생한다. 이와 같이 L-arginine의 의존적 경로에 있어서 <sup>N</sup>G<sup>M</sup>MMA는 NO 생산의 특이적 억제제로 알려져 있다.<sup>18)</sup> 따라서 광향이 RAW264.7 세포에서 L-arginine 의존적 경로를 통하여 NO를 생산하는지 여부를 검증하기 위하여 <sup>N</sup>G<sup>M</sup>MMA 처리조건 하에서 광향으로 대식세포주를 활성화시킨 후, NO의 생산량을 정량하였다. 그 결과, 광향에 의한 NO의 생산량은 <sup>N</sup>G<sup>M</sup>MMA 처리농도의 증가로 감소하는 경향을 발견하였고, 특히 200 μM의 <sup>N</sup>G<sup>M</sup>MMA 처리시에 NO 생산은  $p < 0.05$  수준에서 유의적으로

**Table 4. Cytotoxicity of the aqueous extracts of medicinal plants on RAW 264.7 cells**

Medicinal Herbs	Cell survival (%)	
	10 µg/ml	100 µg/ml
Semen Gleditsiae	121.36±1.30	117.73±8.69
Radix Linderae	110.85±0.65	115.00±4.02
Semen Alpiniae Katsumadaii	95.58±4.82	95.89±5.35
Frutus Crataegi	92.07±3.99	96.82±11.13
Rhizoma Sparganii	111.85±2.34	109.45±6.11
Radix Adenophorae	106.58±4.97	110.53±2.96
Cortex Acanthopanax	95.36±12.39	127.85±3.14
Pericarpium Arecae	105.77±3.41	104.53±3.09
Fructus Amomi Rotundi	98.96±4.76	70.35±1.74
Herba Pogostemi	98.69±6.28	110.01±3.99
Folium Eriobotryae	99.34±5.40	91.23±7.94
Flos Chrysanthemi	100.34±3.23	112.05±8.92
Cortex Magnoliae	87.29±7.71	112.07±2.48
Cortex Eucommiae	98.69±6.28	105.77±8.57
Exocarpium Citri Leiocarpae	96.94±1.83	107.20±0.73
Radix Dipsaci	101.89±3.22	105.19±1.23
Semen Amomi	110.12±2.36	103.23±2.74
Exocarpium Citri Leiocarpae unripe	94.53±3.13	92.50±1.75
Radix Angelicae	88.54±17.99	94.66±11.03
Rhizoma Atractylodis Lanceae	93.07±6.68	104.35±1.63
Radix Glycyrrhizae	96.06±3.75	102.74±13.91

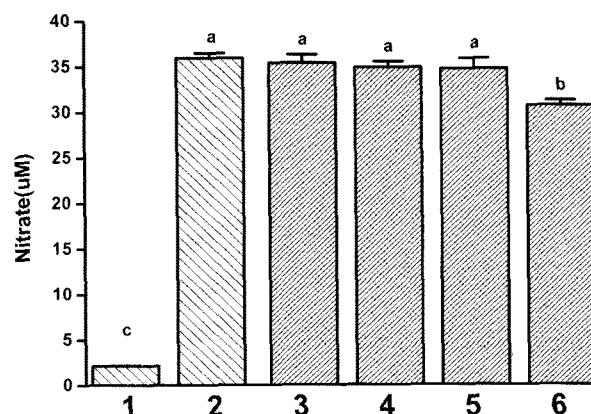
Values are expressed as mean ± SD.



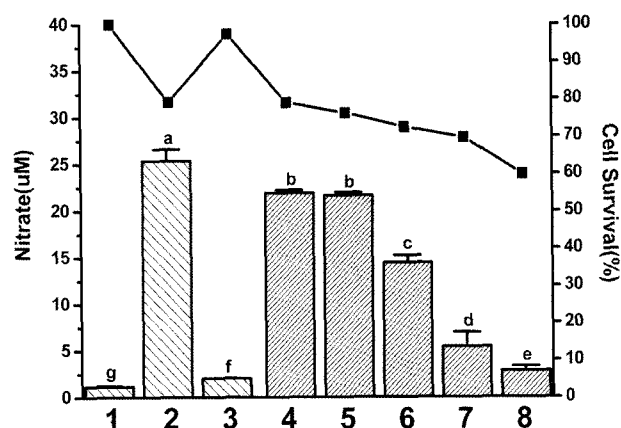
**Fig. 1. Effects of Herba Pogostemi extract on the production of nitrite accumulated in the cultured medium of RAW264.7 cells.** NO production is presented as the mean ± SD of triplicate independent experiment. Significant difference between NO values were tested at  $p < 0.05$ .

감소되는 것으로 볼 때(Fig 2), RAW264.7 세포에서 광항에 의한 NO 생산의 유도에 L-arginine 의존적 경로가 참여하고 있는 것으로 보인다.

**PDTC가 광항이 유도하는 대식세포주의 NO 생산에 미치는 효과.** 항산화 화합물인 PDTC가 전사조절인자인 NF-κB의 활성화를 저해한다는 사실이 이미 보고 되어있다.<sup>19)</sup> 광항에 의한 NO 생산 기작을 알기위한 실험으로서 NF-κB 저해제인 PDTC가 100 µg/ml의 광항을 처리한 RAW264.7 세포의 NO 생산에 미치는 효과를 측정하였다. Fig. 3에서 보듯이, PDTC의 농도를

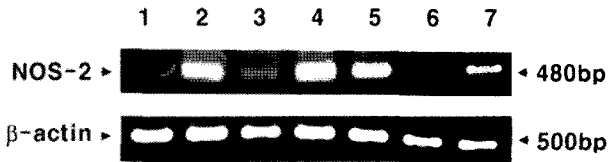


**Fig. 2. Effects of N<sup>6</sup>MMA on Herba Pogostemi extract-induced nitrite accumulation in the cultured medium of RAW264.7 cells.** Lane 1 and 2 represent negative control (without LPS treatment) and positive control (with 100 ng/ml LPS treatment), respectively. Lane 3 to 6 represents the treatment of N<sup>6</sup>MMA at concentrations of 1, 10, 100 and 200 µM, respectively. NO production is presented as the mean ± SD of triplicate independent experiment. Significant difference between NO values were tested at  $p < 0.05$ .



**Fig. 3. Effects of PDTC on Herba Pogostemi extract-induced nitrite accumulation in the cultured medium and cell viability of RAW264.7 cells.** Lane 1 and 2 represent negative control (without LPS treatment) and positive control (with 100 ng/ml LPS treatment), respectively. Lane 3 represents NO production and cell survival values at 200 µM PDTC treatment. Lane 4 to 8 represents the values obtained by the extract in the presence of PDTC at the concentration of 1, 10, 50, 100 and 200 µM, respectively. NO production is presented as the mean ± SD of triplicate independent experiment. Significant difference between NO values were tested at  $p < 0.05$ .

50 µM, 100 µM 및 200 µM로 증가시킴에 따라 RAW264.7 세포의 NO 생산은 각각 각각 43%와 79% 및 89% 감소하였다. PDTC 농도의 증가에 따른 NO 생산량의 감소 현상이 화합물에 의한 지시세포의 사멸 때문일 가능성을 알아보기 위하여 MTT assay법으로 세포독성을 측정하였다. 실험 결과, PDTC의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 다소 증가하였으나, NO 생산이 약 89%나 감소한 200 µM에서 세포생존율은 약 40% 정도의 감소에 그치고 있었다. 이와 같은 세포독성의 증가가 PDTC 자체에 의한 것인지를 조사하고자 200 µM의 PDTC만을 RAW264.7 세포에 처리하였으나 실험에 사용한 최고농도에서도 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 3, lane 3). 따라서 PDTC



**Fig. 4. Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of NOS2 gene expression.** Lanes in ethidium bromide-stained agarose gels represent as follows: lane 1, negative control (without LPS treatment); lane 2, positive control (with 100 ng/ml LPS treatment), lane 3, LPS plus PDTC (100  $\mu$ M) treatment; lane 4, Herba Pogostemi extract plus LPS (100 ng/ml) treatment; lane 5, Herba Pogostemi extract treatment; lane 6, Herba Pogostemi extract plus PDTC (100  $\mu$ M) treatment; lane 7, Herba Pogostemi extract plus LPS (100 ng/ml) plus PDTC (100  $\mu$ M) treatment.

처리에 의한 NO 생산의 감소현상은 세포의 생존을 감소가 원인이 아니며 NOS2 유전자의 전사활성에 참여하는 NF- $\kappa$ B의 불활성화로 인하여 표적 유전자의 전사가 저해 받았기 때문으로 생각된다.<sup>20)</sup> 이와 같은 PDTC처리에 의한 NO 생산의 변화가 NOS2 유전자의 전사수준에서 조절되는지 여부를 밝히기 위하여 RT-PCR로 NOS2 mRNA의 발현량을 조사하였고, 그 결과 PDTC 처리는 광항에 의한 NOS2 유전자의 발현을 현저히 저해한다는 사실이 나타났다(Fig. 4, lane 6). 이상의 실험은 RAW 264.7 세포에서 NO 생산이 광항에 의하여 유도되는 현상은 시료의 처리가 NF- $\kappa$ B의 활성화를 일으키고 그 결과 이 전사인자에 의하여 지배되는 NOS2 유전자의 발현이 활성화된 결과일 가능성을 보여주었다. 본 실험의 지지세포로 사용된 RAW264.7 세포는 LPS 자극에 의한 NOS2 유전자의 전사활성화에 NF- $\kappa$ B만이 관여한다는 보고<sup>21,22)</sup> 및 광항과 LPS의 동시 처리가 NO 생산을 상호보완적으로 증진시키지 않는다는 본 실험의 결과(Fig. 1)도 RAW264.7 세포에 있어서 광항에 의한 NO 생산의 유도가 NF- $\kappa$ B를 통한 신호전달 경로를 경유하여 일어났음을 나타낸다고 하겠다.

본 연구를 통하여 광항의 열수추출물은 RAW264.7 세포의 NO 생산을 유도할 수 있음을 알았다. 이와 같은 NO의 유도가 NOS2의 저해제인 N<sup>G</sup>MMA의 처리로 NO 생산이 감소하는 것으로 볼 때, 광항은 nitric oxide synthase가 관여된 L-arginine 의존적 경로를 통하여 NO를 생산하는데 필요한 이차적인 신호를 발생시키는 것으로 보인다. 이미 기술한 바와 같이 병원체나 종양에 대한 숙주 방어기작에 있어서 NO는 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐 아니라,<sup>4)</sup> 백혈구의 이동, 부착, 포식작용 등, 염증반응의 모든 경로에도 관여하고 있다.<sup>23)</sup> 감염 장소에서 NO 생산량이 증가하면 병원체균에 대한 살해작용이 증가하고, 염증에서의 회복이 수월해진다고 보고 되어있다. 그러나 NO 생산의 증가는 동일한 대식세포에서 생성되는 superoxide anion과 반응하여 강력한 세포독성을 가진 peroxynitrite의 생산을 촉진하는 결과도 가져오기 때문에, 특히 전신성 염증반응이나 자가면역질환에 있어서 ROS의 생산을 억제하거나 생성된 ROS를 소거하는 것이 내재면역계에서의 NO의 작용을 극대화하면서도 세포독성을 막는데 유효하다고 본다.<sup>10)</sup> 따라서, 본 실험의 결과 선발된 광항은 ROS 소거활성 뿐 아니라 직접적인 대식세포 활성화를 통한 NO 생성유도 활성도 우수하기 때문에 향후 내재

면역계 활성화를 통한 면역조절물질의 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 이를 위한 실험의 일환으로서, 마우스의 primary macrophage 세포를 대상으로 광항 열수추출물의 NO 생산유도 활성을 현재 조사 중에 있다.

## 초 록

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 광항(*Agastache rugosa*)을 포함한 21종의 한약재에서 제조한 열수추출물의 NO 생산에 대한 조절효과를 조사하였다. 모든 한약재 추출물은 LPS 자극으로 생산된 NO에 대하여 뚜렷한 소거활성을 보이지 않았으나, LPS 무처리 조건에서 광항이 RAW264.7 세포의 NO 생산을 강력하게 유도하였다. 200  $\mu$ M의 NOS2의 저해제인 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine(N<sup>G</sup>MMA)의 처리에 의하여 광항이 유도하는 NO 생산은 유의적으로 감소되었다. 또한 NF- $\kappa$ B 저해제인 pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)의 처리로 NO 생산이 100  $\mu$ M에서 약 79%까지 감소하였다. 이상의 실험 결과는 광항 열수추출물이 RAW264.7 세포의 NOS2 발현의 이차적인 세포 내 신호를 발생시킬 수 있으며, NO는 L-arginine 의존적 경로에 의하여 생성된다는 사실을 시사하였다.

**Key words:** 광항, *Agastache rugosa*, 일산화질소, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, Pyrrolidine dithiocarbamate

## 참고문헌

- Nathan, C. F. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
- Furchgott, F. R. and Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Guzik, T. J., Korbust, R. and Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune response. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Ross, R. and Reske-Kunz, A. B. (2001) The role of nitric oxide in contact hypersensitivity. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1469-1478.
- Gantt, K. R., Goldman, T. L., McCormick, M. L., Miller, M. A., Jeronimo, S. M., Nascimento, E. T., Britigan, B. E. and Wilson, M. E. (2001) Oxidative response of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* **167**, 893-901.
- Hogg, N., Kalyanaraman, B. and Darley-Usmar, V. (1995) In *The Oxygen paradox: Oxidant and antioxidant effects of nitric oxide and superoxide in the vasculature*. Cleup University Press, Paradona, Italy.
- Channon, K. M. and Guzik, T. J. (2002) Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 515-524.
- Ischiropoulos, H. and al-Mehdi, A. B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* **364**, 279-282.
- Samlowski, W. E., Peterson, R. Cuzzocrea, S., Macarthur, H.,

- Burton, D., McGregor, J. R. and Salvemini, D. (2003) A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase, M40403, inhibits dose-limiting hypotension associated with interleukin-2 and increase its antitumor effects. *Nat. Med.* **9**, 750-755.
10. van der Veen, R. C. (2001) Nitric oxide and T cell immunity. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1491-1500.
11. Nam, S. H. and Kang, M. Y. (2000) Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 141-147.
12. Ahn, D.-K. (1999) Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyohaksa, Seoul, Korea.
13. Nam, S. H., Jung, J. E. and Kang, M. Y. (1999) Screening of the mutagenicity and antimutagenicity of the hot-water extracts from medicinal plants. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 344-350.
14. Murakami, A., Gao, G., Kim, O. K., Omura, M., Yano, M., Ito, I., Furukawa, H., Jiwajinda, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. (1999) Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 333-339.
15. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
16. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
17. Kochanowski, B. and Reischl, U. (1999) In *Methods in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
18. Takao, Y., Tetsuro, U., Akemi, A. and Fujiro, S. (1997) Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN- $\gamma$ -activated rat neutrophils. *Int. J. Cancer* **71**, 223-230.
19. Schreck, R., Meier, B., Mannel, D. N., Droge, W. and Baeuerle, P. A. (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* **175**, 1181-1194.
20. Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W. and Murphy, W. J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9730-9734.
21. Matsuura, M., Saito, S., Hirai, Y. and Okamura, H. (2003) A pathway through interferon- $\gamma$  is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4016-4025.
22. Funatogawa, K., Matsuura, M., Nakano, M., Kiso, M. and Hasegawa, A. (1998) Relationship of structure and biological activity of monosaccharide lipid A analogues to induction of nitric oxide production by murine macrophage RAW264.7 cells. *Infect. Immun.* **66**, 5792-5798.
23. Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907-916.