

활성화한 RAW 264.7 세포주에서 8-*epi*-xanthatin의 Nitric Oxide 생성저해

이화진 · 정연수 · 류시용* · 류재하[†]

숙명여자대학교 약학대학 약학연구소, *한국화학연구소

(Received July 14, 1998)

Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by 8-*epi*-xanthatin in Activated RAW 264.7 Cells

Hwa Jin Lee, Yeon Su Jeong, Shi Yong Ryu* and Jae-Ha Ryu[†]

College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences,
Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract—The nitric oxide (NO) produced in large amounts by inducible nitric oxide synthase is known to be responsible for the vasodilation and hypotension observed in septic shock. We have found that 8-*epi*-xanthatin from *Xanthium strumarium* L. inhibited the production of NO in LPS-activated RAW 264.7 cells (IC₅₀ value was 1.5 μM). This activity was resulted from the suppressing of inducible nitric oxide synthase enzyme expression.

Keywords □ 8-*epi*-xanthatin, *Xanthium strumarium* L., nitric oxide, sesquiterpene, inhibitor, inducible nitric oxide synthase.

Nitric oxide(NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등에서의 역할이 알려지고 있다. 그런데 NO를 생성하는 효소(NOS: nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO생성을 담당하는 constitutive NOS(c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS(i-NOS)의 두가지로 크게 분류된다.^{1,2)} 이 중 c-NOS는 세포질내에 항상 미량 존재하는 효소로서 Ca²⁺/calmodulin 의존성이며 단시간 동안 소량의 NO를 방출한다. 한편 i-NOS는 Ca²⁺ 의존성이 없으며, 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이와 같은 i-NOS는 외부상처에 대한 반응 및 염증같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 in-

terleukin 1 이나 tumor necrosis factor, 염증원인 내독소(lipopolysaccharide : LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되는 것으로 알려져있다.^{3,4)} 특히 i-NOS에 의해 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은⁵⁾ 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 염증상태에서 i-NOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라,⁶⁾ cyclooxygenase를 활성화하여⁷⁾ prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 따라서 i-NOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 새로운 염증치료를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 각종 염증치료제와 항암제들이 i-NOS 저해활성을^{9,10)} 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구실에서 보고한 식물에서 유래한 i-NOS유도저해제인 yomogin,¹¹⁾ dehydrocostus lactone¹²⁾ 등은 공통적으로 α-methylene-γ-lactone 환을 가지며 이 구조가 활성을 나타내는 데

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9586 (팩스) 02-714-0745

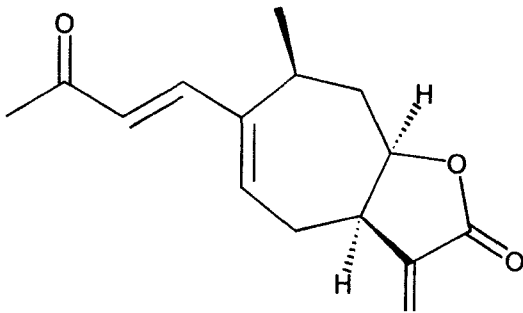


Fig. 1—Structure of 8-*epi*-xanthatin (1) isolated from *Xanthium strumarium* L.

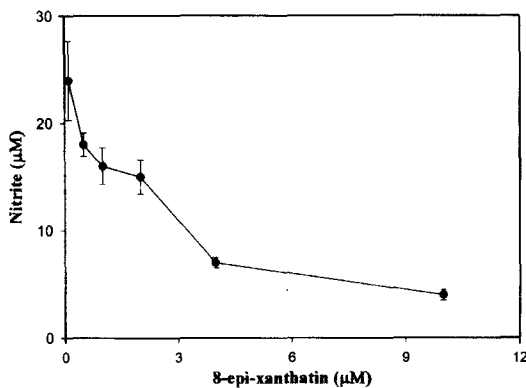


Fig. 2—8-*epi*-xanthatin inhibits the production of NO released into the media of LPS-activated RAW 264.7 cells. Conditioned media were collected after 20 hr activation and the NO₂⁻ levels were assayed. Results represent the mean±S.D. of three experiments.

있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 그런데 저자 등은 *Xanthium strumarium* L.로부터 분리한 8-*epi*-xanthatin이¹³⁾ 세포독성을 가지는 것으로 보고 하였으며, 이 화합물도 α-methylene-γ-lactone 환을 가지므로(Fig. 1), 이 화합물에 대한 i-NOS 저해활성에 대한 연구를 수행하였다. LPS로 macrophage 계열의 RAW 264.7 세포를 활성화할 때 시료가 세포에 의한 NO의 생성량에 미치는 영향을 평가하였으며¹¹⁾ NO의 양은 NO₂⁻의 형태로 Griess시약을¹⁴⁾ 이용하여 결정하였다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 LPS(1 µg/ml)를 이용하여 macrophage를 활성화 하면 세포배양액으로 유리되는 NO의 농도가 약 20~30 µM로 현저히 증가하였다. LPS로 활성화할 때 8-*epi*-xanthatin을 처리하면 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소하는 결과를 보여주었다(Fig. 2). NO의 생성을 50% 저해하는 농

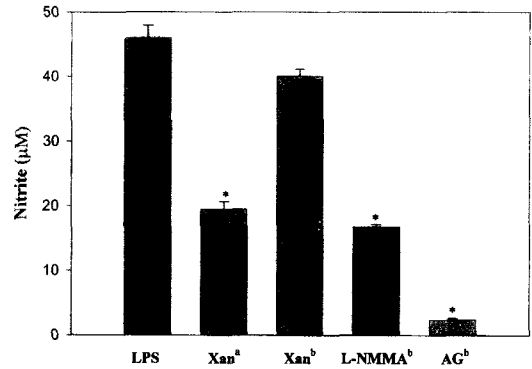


Fig. 3—Effects of 8-*epi*-xanthatin (5 µM), L-NMMA (0.1 mM) and aminoguanidine (AG, 1 mM) on the NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells. All the media was exchanged by fresh one after 18 hr LPS-activation. The NO₂⁻ levels were determined after another 18 hr incubation with fresh media and/or effectors. ^aIncubation with 8-*epi*-xanthatin during 18 hr LPS-activation. ^bIncubation with effectors for 18hr after LPS-activation. Results represent the mean±S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control. *p<0.001.

도를 IC₅₀으로 표현하였을 때, *Xanthium strumarium* 으로부터 분리한 8-*epi*-xanthatin의 IC₅₀값은 1.5 µM 이었다. 또한 다음과 같은 실험결과를 통하여 8-*epi*-xanthatin의 NO생성저해활성에 대한 기전을 규명하였다. Fig. 3은 LPS로 macrophage를 활성화할 때 8-*epi*-xanthatin을 처리하는 방법을 달리하였을 때의 결과이다. 즉, 8-*epi*-xanthatin를 LPS와 동시에 20시간 처리한 경우(병용처리)와, 세포를 LPS존재 하에 20시간 동안 배양하여 활성화를 완료한 후 LPS가 포함되지 않은 배양액으로 교체하고, 8-*epi*-xanthatin 또는 L-NMMA 및 aminoguanidine을 처리한 경우로(후처리) 나누어 관찰한 결과이다. 결과에서 보는 바와 같이 8-*epi*-xanthatin(5 µM)을 병용처리한 결과 LPS대조군에 대하여 71%의 NO생성저해활성이 관찰되었으나, 후처리의 경우 그 활성이 현저히 감소하였다. 한편, NOS의 기질인 L-arginine과의 기질경쟁으로 인하여 활성을 나타내는 L-NMMA(0.1 mM)와 i-NOS에 대한 선택적인 효소저해제인 aminoguanidine(1 mM)은 후처리의 경우에도 NO의 생성량을 현저히 감소시켰다. 이와 같은 결과로부터 8-*epi*-xanthatin은 LPS에 의한 세포의 활성화 단계에서(병용처리) i-NOS의 유도를 억제하는 활성을 가

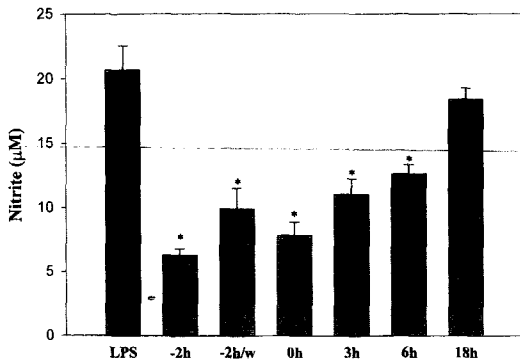


Fig. 4—Time course of inhibition of NO production by 8-*epi*-xanthatin (5 μM) in LPS-activated RAW 264.7 cells. 8-*epi*-xanthatin was treated to RAW 264.7 culture media at different times before/after activation with LPS. LPS: LPS alone. (-) 2 hr: treated at 2 hr before LPS-activation. (-) 2 hr/w: treated at 2 hr before LPS-activation and the media was exchanged by fresh one. 0 hr: co-treated with LPS. 3 hr (6 hr, 18 hr): treated at 3 hr (6 hr, 18 hr) after addition of LPS into culture media. After 20 hr LPS-activation, NO₂⁻ assay was performed. Results represent the mean±S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control. *p<0.05.

지며, 일단 활성화에 의해 i-NOS의 유도가 완료된 후에는(후처리) i-NOS에 대한 NO생성 저해효과는 없는 것으로 확인되었다. 한편 이와 같은 결과를 재확인하기 위하여 세포에 8-*epi*-xanthatin의 처리시간에 대한 시간의존성 실험을 행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. LPS를 처리하는 시점을 0시간으로 정하고 전처리를 (-)로 표현하였을 때 2시간 전처리와 병용처리의 경우에 가장 강한 활성을 나타내었고 후처리 시간이 길어질수록 즉, 세포를 LPS로 활성화하는 동안 시료의 처리 시간이 짧아질수록 NO생성저해활성도 약화되었다. 또한 시료를 2시간 처리한 다음 시료를 제거하고 LPS로 세포를 활성화한 경우에도 57%의 NO생성이 억제되었음을 관찰하였다. 이는 시료가 세포내로 유입되어 세포가 활성화될 때 i-NOS의 유도를 억제하는 활성을 나타낸 것으로 추정된다. 이와 같은 결과로부터 LPS로 활성화한 macrophage에서 8-*epi*-xanthatin이 NO의 생성을 저해하는 것은 목향(*Saussurea lappa*)의 dehydrocostus lactone¹²⁾과 쑥(*Artemisia princeps*)의 yomogin¹¹⁾과 같이 i-NOS의 유도 단계를 억제하는 활성에 기인하는 것으로 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년 숙명여자대학교 교비 연구비에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, 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. U.S.A.* **84**, 9265 (1987).
- 2) Angus, J. A. and Cocks, T. M.: Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* **41**, 303 (1989).
- 3) Knowles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S.: Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1042 (1990).
- 4) Rees, D. D., Celtek, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S.: Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 541 (1990).
- 5) Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
- 6) Aeberhard, E., Henderson, S. A., Arabolos, N. S., Griscavage, J. M., Castro, F. E., Barrett, C. T. and Ignarro, L. J.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 1053 (1995).
- 7) Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P.: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7240 (1993).
- 8) McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M.: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749 (1993).
- 9) Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. and Drapier, J. C.: Nicotineamide inhibits nitric oxide

- synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem. J.* **297**, 53 (1994).
- 10) Yu, S. M. : Thalporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **303**, 289 (1994).
- 11) Ryu, J.-H., Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Han, Y. N. : Yomogin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 481 (1998).
- 12) Lee, H. J., Kim, N. Y., Jang, M. K., Son, H. C., Kim, K. M., Sohn, D. H., Lee, S. H. and Ryu, J.-H. : A sesquiterpene lactone inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF α in LPS-activated macrophages. *Planta Medica*, in press.
- 13) Ahn, J.-W., No, Z., Ryu, S. Y., Zee, O.-P. and Kim, S.-K. : Isolation of cytotoxic compounds from the leaves of *Xanthium strumarium* L. *Natural Product Sciences* **1**, 1 (1995).
- 14) 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 biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131 (1982).