

호장근의 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 nitric oxide 생성 저해활성

노태철 · 최희철 · 이승웅 · 김영호¹ · 노문철 · 김영국 · 이현선*

한국생명공학연구원 순환기연구실, ¹충남대학교 약학대학

Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by Coumarins from *Polygonum cuspidatum* in LPS-Activated RAW 264.7 cells

Tae Cheol Rho, Hee Cheol Choi, Seung Woong Lee, Young Ho Kim¹,

Mun-Chual Rho, Young Kook Kim and Hyun Sun Lee*

Cardiovascular Research Laboratory, Korea Research Institute of
Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600,

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract – During the screening for inhibitors of nitric oxide production in LPS-activated macrophage, RAW 264.7 cells, two coumarins were isolated from chloroform extract of the root of *Polygonum cuspidatum*. They were identified as decursin (1) and decursinol angelate (2) on the basis of spectroscopic methods. The IC₅₀ values of these compounds on NO production were 0.76 μM (1) and 2.6 μM (2), respectively. However, the iNOS activity was not inhibited by treatment with these compounds. Their inhibitory effect on NO production seems to result from the suppression of iNOS induction through the suppression of NF-κB activity.

Key words – *Polygonum cuspidatum*, coumarin, macrophage, nitric oxide, iNOS, NF-κB.

Nitric oxide(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포로부터 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 합성된다^{1,2}). NOS는 크게 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있으며 이중 cNOS는 Ca²⁺/calmodulin 의존성이며 단시간 동안 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리기능을 담당한다³). 여기에 신경세포에 존재하는 neuronal NOS(ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitutive NOS(ecNOS)가 속한다. iNOS는 세포내 Ca²⁺의 농도에 비 의존성이며 대식세포, 혈관 평활근 세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ(IFN-γ), interleukin-1(IL-1)과 tumor

necrosis factor-α(TNF-α) 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 다량의 NO를 생성한다. 특히 대식세포는 생체 내에서 감염, 염증 등의 자극에 의해서 L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 NO를 생성하여 중앙세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 hypotension(혈관확장), 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다^{4,7}).

따라서 이런 증상에 대한 치료제를 개발할 목적으로, 최근에는 천연물로부터 NO 생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 그 대표적인 것으로는 *Evodia rutaecarpa*로부터 evodiamine과 dehydroevodiamine⁸)이, *Artemisia princeps*로부터 yomo-

*교신저자 : Fax : 042-861-2675

gin⁹⁾이, *Ginkgo biloba*로부터 EGb 761¹⁰⁾이, *Curcuma longa*로부터 curcumin¹¹⁾, *Peucedanum japonicum*의 뿌리로부터 쿠마린계 물질 등¹²⁾이 보고되어 있다. 본 연구실에서는 *Polygonum cuspidatum*의 뿌리(호장근)로부터 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서의 NO 생성 저해활성을 나타내는 2종의 쿠마린계 물질을 분리하여 이들의 구조와 NO 생성 저해활성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료, 기기 및 시약 - 본 실험에 사용한 호장근(*Polygonum cuspidatum*의 뿌리, Polygonaceae)는 1998년에 대전시 소재 일신약품에서 구입하였으며 충남대학교 약초원으로 부터 제공받은 호장근과 TLC, HPLC chromatogram을 비교·동정하여 사용하였다.

박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silica gel 60F₂₅₄(Merck, Art. 5554)와 RP-18F₂₅₄s(Merck)를 이용하여 실시하였고, 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel 60(70-230 mesh, Merck), YMC-gel(ODS-A, 60-230 mesh), Sephadex LH-20(Pharmacia)을 사용하였다. 물질의 순수 분리를 위해 분취 HPLC(column; J'sphere ODS-H80, 150×20 mm, 4 μm, 80 Å, SPD-10A UV detector, LC-6AD pump, Shimadzu)와 recycling HPLC(LC-908, UV detector 310, Japan Analytical Industry)을 사용하여 분리를 하였고, 분석용 HPLC(column; J'sphere ODS-H80, 250×4.6 mm, 4 μm, 80 Å, SPD-M10A Diodearray detector, CTO-10A column oven, LC-10AD pump, Shimadzu)을 사용하여 분리물질의 순도를 확인하였다. NMR은 Varian unity 300 spectrometer, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 이용하여 분리된 물질의 구조를 확인하였다.

Griess reagent로 N-(1-naphthyl)ethylenediamine·2HCl(Sigma)과 sulfanilamide(Sigma)를 사용하였고, 세포를 배양하기 위해 FBS(fetal bovine serum)와 DMEM(Gibco BRL)을 사용하였고, 양성 대조군으로 N^o-Monomethyl-L-arginine Monoacetate와 curcumin(Calbiochem)을 사용하였고, Griess 반응 후 흡광도의 측정에는 MR 700 microplate reader(Dynatech Laboratories, Inc.)를 PMS/MTS 반응 후 흡광도는 Model 3550 microplate reader(Bio-Rad)를 사용하였다.

추출 및 분리 - 건조된 호장근 600 g을 실온에서

메탄올을 사용하여 3일간씩 3회 추출하고 40°C 이하에서 감압·농축하였다. 메탄올 추출물 72 g을 얻어 CHCl₃, BuOH, H₂O로 순차적으로 용매분획 하였다. 활성이 가장 강한 CHCl₃ 추출물(14 g)을 혼합용매인 CHCl₃/MeOH(100:1→10:1)을 사용하여 1차 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 6개의 소분획으로 나누고, 이들 중 가장 활성이 강한 부분인 Fr. 1과 2를 모아 3 g의 활성분획을 얻었다. 이 분획을 혼합용매인 hexane/EtOAc(20:1→5:1)을 사용하여 2차 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 활성부분 700 mg을 얻었으며, 계속해서 Lobar ODS column chromatography(용매; 80% MeOH)를 행하여 활성부분을 분리하였다. 그러나 활성부분을 분석용 HPLC(column; J'sphere ODS-H80, 4 μm, 80 Å, 250×4.6 mm, flow rate; 1 ml/min, 용매; 70% MeOH, SPD-M10A Diode array detector)로 확인한 결과 2종의 물질이 혼합되어 있었다. 따라서 recyclic HPLC(column; J'sphere ODS-H80, 4 μm, 80 Å, 150×20 mm, flow rate; 5 ml/min, 용매; 80% MeOH, 254 nm)를 실시하여 2종의 물질 decursin (1), decursinol angelate (2)를 각각 2.8 mg, 2 mg으로 순수 분리 할 수 있었다.

Decursin (1) - C₁₉H₂₀O₅; MS (EI, 70 eV) *m/z* (rel. int.): 328 (M⁺, 3.4), 228 (29.1), 213 (100), 83 (84.3), 55 (58.2).

Decursinol angelate (2) - C₁₉H₂₀O₅; MS (EI, 70 eV) *m/z* (rel. int.): 328 (M⁺ 3.8), 228 (31.2), 213 (92.6), 83 (56), 55 (100).

세포배양 - Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM L-arginine 과 100 μg/ml의 penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 200 μl씩 분주하고 2시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 새로운 배지로 교환하였다. 각 well에 1 μg/ml의 lipopolysaccharide(*E. coli* serotype 055:B5, Sigma)와 검정시료용액 5 μl를 첨가하여 20시간 배양하였다.

Cell viability test - 분리된 활성물질들의 세포독성은 PMS/MTS(phenazine methosulphate/3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 방법에 의해 측정되었다¹³⁾. LPS와 활성물질들을 RAW 264.7 세포에 처리하여

20시간 동안 배양한 다음, PMS/MTS 혼합용액 50 μ l (25 μ l of PMS for every 975 μ l MTS)를 첨가하여 30분 동안 37°C에서 배양 후 490 nm(using a reference wavelength of 655 nm)에서 흡광도로써 세포의 독성을 측정하였다.

Nitrite assay - macrophage로부터 생성된 Nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다¹⁴⁾. 즉 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약 [0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine · 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O] 100 μ l를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 microplate reader(Dynatech, MR 700)로 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis - RAW 264.7 세포를 LPS (1 μ g/ml)와 검정시료용액을 첨가하여 20시간 동안 배양하였다. 세포들을 ice-cold PBS(Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline)로 세척 후 원심분리하여 상등액을 제거 후, 400 μ l의 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Noindet P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin and aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 용해시켰다. 이 세포 용해액을 원심분리(15,000 rpm, 4°C)하여 상등액을 얻어 Bradford 방법을 사용하여 단백질량을 정량한 후 8% SDS-PAGE(50 μ g/lane of protein)를 시행하고, 전개된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 Tris buffered saline (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 2시간 동안 세척 후 anti-inducible NOS antibody(rabbit, 1:2,000, Calbiochem)로 blotting하였다. Tris buffered saline으로 10분씩 3회, 20분씩 2회 세척 후 secondary antibody(G α -Rb Ig G-HRP, 1:2,000, Pierce)로 30분 동안 반응시켰다. Immunoreactive band는 ECL(Amersham, Buckinghamshire, UK)western blotting system으로 확인하였다.

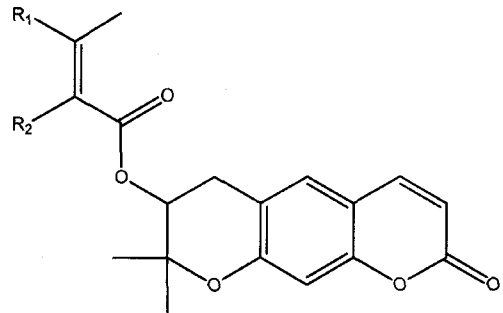
LPS에 의해 유도되는 NF- κ B 활성 측정¹⁵⁾ - Murine macrophage에 NF- κ B receptor construct을 transfection 시킨 세포(이하 RAW-NF- κ B 세포)를 500 μ g/ml의 G418이 함유된 DMEM에 배양한 후 세포를 수확하여 96-well plate에 세포 수를 5 \times 10⁴ cells/ml이 되도록 DMEM(with penicillin-streptomycin-glutamine, 0.5% FBS and 500 μ g/ml G418)로

조정하여 100 μ g/well을 분주하였다. 3시간 동안 세포를 부착시킨 후, 각 well당 LPS(1 μ g/ml)와 분리된 물질이 함유된 DMEM을 100 μ l씩 첨가하고, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 37°C에서 배양하고, 새로운 배지 200 μ l로 교환 한 다음 48시간동안 배양하였다. 배양 상등액 100 μ l을 새로운 96 well plate에 옮겨서 65°C에서 5분간 가열을 한 후, 2배 농도의 SEAP (secreted alkaline phosphatase) buffer(2 mM diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 20 mM L-homocitrinine)을 100 μ l씩 추가하여 37°C에서 10분간 배양하고, 기질인 120 mM PNPP(p-nitrophenylphosphate)을 20 μ l씩 추가하여 37°C에서 3시간 반응하였다. 반응액을 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 NF- κ B 활성을 관찰하였다⁴³⁾.

결과 및 고찰

생약자원으로부터 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 NO 생성을 저해하는 물질을 탐색하던 중, 호장근의 MeOH 추출물이 125 μ g의 농도에서 92%의 저해활성을 나타내었다. 용매분획 결과 CHCl₃ 분획으로 활성이 이행되었으며 이 분획으로부터 실리카겔, RP-18 컬럼크로마토그래피, semi-prep HPLC와 recyclic HPLC를 이용하여 2종의 쿠마린 유도체를 순수 분리하였다(Fig. 1).

물질 1과 2는 EI-MS와 ¹³C-NMR로부터 C₁₉H₂₀O₅ (M⁺: 328)의 동일한 분자식과 분자량을 갖는 물질로 밝혀졌다. 이 물질들은 ¹H-, ¹³C-, ¹H-¹H COSY,



1: R₁=CH₃, R₂=H (decursin)

2: R₁=H, R₂=CH₃ (decursinol angelate)

Fig. 1. The chemical structures of inhibitors on nitric oxide synthesis in LPS-activated murine macrophage from *Polygonum cuspidatum*.

HMQC와 HMBC를 포함하는 NMR 실험을 통하여 decursin (1)과 decursinol angelate (2)로 그 구조를 규명할 수 있었으며 기 보고된 문헌의 기기분석 data와 일치하였다^{16,17}.

물질 1과 2의 LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해활성 - iNOS에 의한 NO의 생성은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂⁻)의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 물질 1과 2를 처리하여 20시간 후 LPS에 의해 유도된 NO의 생성량을 조사하였으며, iNOS 저해제로 알려진 N^G-Monomethyl-L-arginine, Monoacetate (L-NMMA)를 양성 대조구로 사용하였다. 물질 1과 2를 LPS와 동시에 처리했을 때 농도 의존적인 저해활성이 관찰되었으며 물질 1과 2의 IC₅₀ 값은 0.76 μM (0.25 μg/ml)과 2.6 μM (0.85 μg/ml)로 나타났다. 이들 물질들은 positive control로 사용된 L-NMMA(IC₅₀; 1.0 μg/ml)보다 강한 저해활성을 보였다(Fig. 2). 또한 이들은 대조구에 비해 세포의 생존율에 큰 차이를 보이지 않았으며 물질 2의 경우 25 μg/ml의 농도에서 세포의 생존율이 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이 물질들은 세포의 생존에는 영향을 미치지 않고 NO 생성을 저해하였다.

물질 1과 2의 시간에 따른 NO생성 저해활성 -

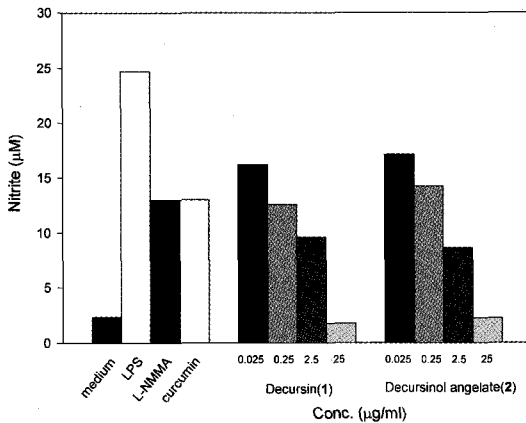


Fig. 2. The inhibitory effect for nitrite production by decursin (1) and decursinol angelate (2) in LPS-activated RAW 264.7 cells. Nitrite formation was measured in RAW 264.7 cells which were cultured in 96-well plates to confluence and incubated with LPS (1 μg/ml, for 20 hr). Depicted is nitrite formation by RAW 264.7 cells incubated with culture medium alone (control, medium) for 20 hr or cell treated with LPS alone (LPS) or with LPS plus treatment with L-NMMA (1.0 μg/ml), curcumin (2.2 μg/ml), decursin (1) and decursinol angelate (2).

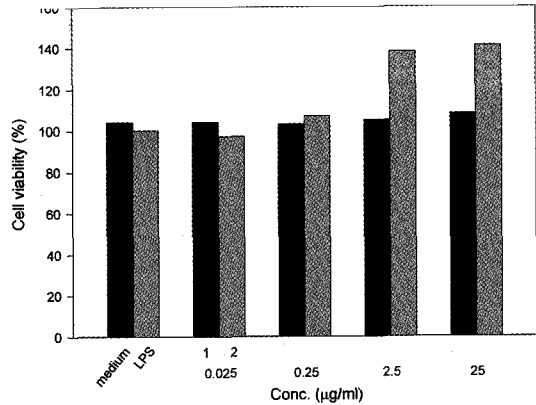


Fig. 3. Cell viability of decursin (1) and decursinol angelate (2). Conditioned media were collected after 20 hr LPS-activation and cell viability was measured by PMS/MTS assay.

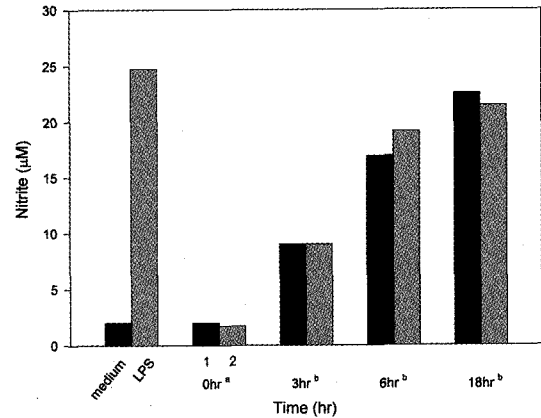


Fig. 4. Time course for the inhibition of NO production by decursin (1) and decursinol angelate (2) in LPS-activated RAW 264.7 cells. Nitrite formation was significantly increased in RAW 264.7 cells incubated with LPS (1 μg/ml for 20 h). In separate experiment, decursin (25 μg/ml) and decursinol angelate (25 μg/ml) were given either together with LPS (time 0 h) or at 3, 6 or 18 h after LPS. After 20 h LPS-activation, nitrite assay was performed. a Samples were co-treated with LPS. b Samples were treated at 3, 6 and 18 hour after LPS-activation.

LPS(1 μg/ml)로 활성화된 RAW 264.7 세포에 물질 1과 2를 시간에 따라 처리하여 NO생성 저해활성을 측정하였다(Fig. 4). 이 실험은 활성물질들이 iNOS mRNA가 발현되는 transcription단계를 지나서 translation단계에 이르는 과정동안 활성물질들이 어느 단계를 저해해서 NO생성을 억제하는지 알아보기 위해서 실시하였다. LPS를 처리하는 시간을 0시간으로 정하

고 전처리(-)로 나타냈으며, 후처리는 LPS를 처리한 후 3시간, 6시간 그리고 18시간에 각각 시료를 처리하고 병용처리(0시간)를 기준으로 20시간이 되었을 때 활성을 측정하였다. 물질(1과 2)과 LPS를 병용처리시(0시간), 92%(1)와 93%(2)로 강한 저해활성을 보였고, 또한 전처리(-2시간)의 경우에도 역시 강한 저해활성(1: 85% 저해, 2: 77% 저해)을 나타내었다. 그러나 LPS로 세포를 활성화시킨 후 물질 1과 2를 처리하였을 때 저해활성이 급격히 감소되어 6시간 후 처리시 32%(1)와 23%(2), 18시간 후 처리시 9%(1)와 14%(2)의 저해활성을 나타냈다.

LPS를 처리한 후 6-8시간이 경과되었을 때 iNOS mRNA가 증가하여 안정한 상태에 이르게 되고 그 후 NO생산이 일정한 수준으로 계속해서 16-20시간 지속된다¹⁸⁾. 따라서 LPS에 의한 iNOS 유도단계에 영향을 미치는 저해제들은 전처리나 병용처리가 후처리보다 더 강한 저해활성을 나타낸다. Fig. 4의 실험결과에서 보여주듯이 분리된 활성물질들은 iNOS 유도 단계를 억제하는 저해제들과 동일한 저해활성 경향을 나타내는 것으로 볼 때, 분리된 활성물질들은 LPS에 의해 세포가 활성화될 때 iNOS 유도단계를 억제한다는 것으로 추정할 수 있었다.

물질 1과 2의 iNOS 유도 후 단계에 대한 저해활성 - NO 생성 저해 기작을 알아보기 위해 먼저 효소에 대한 분리된 물질의 영향을 알아보았다. LPS로 활성화된 iNOS는 수 시간에서 수일까지 활성을 유지한다. 그러므로 LPS(1 µg/ml)로 RAW 264.7 세포를 20시간 동안 완전히 활성화시킨 후, 새 배지로 교환하고 분리된 물질들을 처리하였다. 20시간 후에 배양액 중에 생성된 nitrite량을 Griess 반응으로 측정하여, 세포내에 존재하는 iNOS에 대한 NO 생성저해를 조사하였다(Fig. 5). 양성대조구로 L-NMMA(IC₅₀=1.0 µg/ml)¹⁹⁾, aminoguanidine(AG, IC₅₀=30.7 µg/ml)²⁰⁾, curcumin(IC₅₀=2.2 µg/ml)²¹⁾을 사용하였다. L-NMMA는 L-arginine과의 기질경쟁에 의해 iNOS에 대해 저해활성을 나타내며, AG는 iNOS에 대하여 특이적인 저해활성을 나타낸다. 또한 curcumin은 iNOS 저해뿐만 아니라 iNOS 유도단계에서도 저해활성을 보인다고 알려져 있으나 iNOS 유도단계에서 더 강한 저해활성을 보인다.

Fig. 5에서 보여주듯이 활성물질들 모두가 iNOS의 유도가 완료된 후에는 NO생성 저해효과를 나타내지 않았다. 그러나 동일하게 처리한 양성대조구들, L-

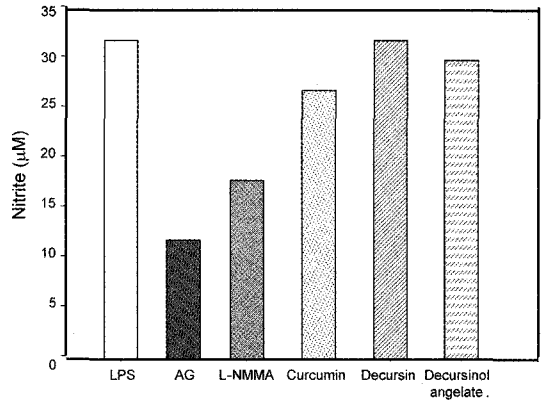


Fig. 5. Effects of decursin (25 µg/ml), decursinol angelate (25 µg/ml), aminoguanidine (AG, 307 µg/ml), L-NMMA (10 µg/ml), and curcumin (22 µg/ml) on nitrite production when RAW 264.7 cells were incubated with effectors for 20 hr after LPS-activation for 20 hr.

NMMA, AG, curcumin은 iNOS의 유도가 완료된 후에도 저해활성을 나타내었는데, AG은 307 µg/ml에서 62%, L-NMMA는 10 µg/ml에서 36%, curcumin은 22 µg/ml에서 20%의 활성을 나타내었다. 그리고 이 실험에서는 뚜렷한 저해활성을 보기 위해서 IC₅₀의 농도보다 높게 대조구들을 처리하였으며, 실제로 AG의 경우를 제외하고는 모두 50% 이하의 저해활성을 보였다. 따라서 호장근으로부터 분리된 물질들은 iNOS 유도 후 단계에서 세포내에서 완전히 활성화된 iNOS에 의한 NO생성을 저해하지 않고 iNOS 유도 억제에 기인된다는 것을 짐작할 수 있었다. 이 결과는 시간에 따른 NO생성 저해활성 실험결과와 일치하였다.

LPS로 활성화된 RAW 264.7에서의 iNOS 발현에 대한 물질 1의 효과 - 분리된 물질 중 decursin (1)과 LPS(1 µg/ml)을 병용 처리하여 20시간 후에 생

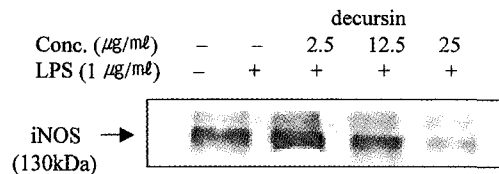


Fig. 6. Effect of decursin (1) on the expression of iNOS protein in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cells were incubated with or without LPS (1 µg/ml) in the presence of the indicated concentrations of decursin. Cellular protein were collected after 20 hr stimulation and then 6% SDS-PAGE was performed. The western blot was probed with a monoclonal antibody to iNOS.

성된 iNOS를 western blotting으로 확인하였다. Fig. 6에서 보듯이 decursin(1)은 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 iNOS 발현을 억제하고 있음을 보여주었다. 그 결과, decursin의 NO 생성 저해활성은 iNOS 유도를 억제하여 나타남을 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 decursin(1)과 decursinol angelate(2)에 대한 시간에 따른 NO생성 저해활성을 측정해 본 결과, LPS와 병용처리 시에 활성이 높았으며, LPS를 처리한 후 시간이 경과되어 분리된 물질을 처리하면 그 활성이 시간이 경과될수록 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 iNOS를 완전히 유도시킨 후 NO생성 저해활성을 측정해 본 결과, NO 생성 저해활성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과들로부터 이 물질들은 iNOS mRNA 전사단계에서 iNOS 유도를 억제하여 NO생성을 저해할 것이며, 특히 iNOS mRNA의 전사를 개시시키는 NF- κ B의 활성을 억제하여 NO생성을 저해할 것으로 추측된다.

Decursin(1)과 decursinol angelate(2)의 NF- κ B 저해활성 - 분리된 물질들의 작용 기작을 알아보기 위해 iNOS 단백질의 발현에 중요한 전사인자 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 보았다. NF- κ B receptor construct를 이용한 assay시스템에서 여러 농도의 decursin(1)과 decursinol angelate(2)를 처리하고 reporter gene인 SEAP(secreted alkaline phosphatase)의 활성에 미치는 두 화합물의 효과를 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, LPS에 의해 유도되는

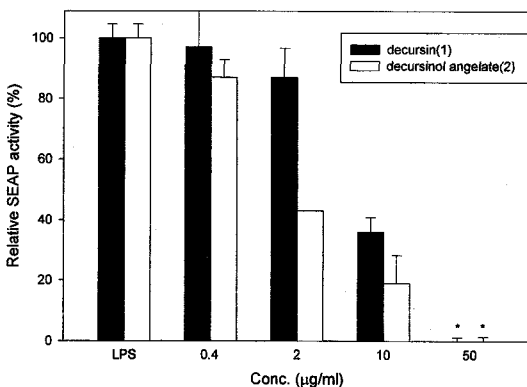


Fig. 7. Effect of decursin (1) and decursinol angelate (2) on the NF- κ B mediated SEAP activity. Transfected RAW 264.7 cells with plasmids containing 8 copies of κ B elements linked to SEAP gene were treated with the indicated concentrations. SEAP activity was measured with replaced and additional 48 h incubated medium after 6 h treatment with compounds. * weakly toxic effect

SEAP 활성을 살펴보면 decursin은 64%(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 13%(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3%(0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), decursinol angelate는 81%(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 57%(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 13%(0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 농도 의존적인 저해활성을 보였다. 그러나 두 물질은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 약간의 세포독성을 보였다. 그 결과 화합물 1, 2는 iNOS 전사 단계의 NF- κ B를 저해함으로써 NO 생성저해활성이 나타남을 확인할 수 있었다.

NF- κ B는 염증에 있어서 중요한 역할을 하는 세포 표면 수용체(SH2, SH3), 유착분자(ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; E-selectin; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) 및 cytokine(LPS, IFN- γ , IL-1, TNF), chemokine 등을 암호화하는 유전자들의 유도에 있어서 중요인자이다.²²⁾ 최근 iNOS 유도 저해제가 NF- κ B의 활성을 억제하여 NO생성을 저해한다는 사실이 보고되고 있는데, 그 예로는 은행 추출물인 EGb761¹⁰⁾, 비스테로이드계 항염증제(aspirin, ketoprofen, flurbiprofen, naproxen)²³⁾ 등이 있다. 비스테로이드계 항염증제는 염증 치료에 부분적인 효과를 거두고 있으며 주로 COX-1(cyclooxygenase-1)과 COX-2의 활성을 억제함으로써 염증유발 인자인 prostaglandins의 합성을 감소시킨다²⁴⁾. 그러므로 과도한 NO생성은 COX의 활성화를 촉진시키므로⁶⁾ NO생성 및 iNOS 저해제는 COX의 활성을 억제하여 염증을 억제할 수 있으리라 기대된다. 혈관벽에서 iNOS의 발현은 혈관확장을 일으키며, 혈관수축 인자에 대한 반응성을 현저히 감소시킨다. 이들 효과는 cGMP에 의해 조절되며 L-NMMA나 iNOS 저해제들에 의해 감소되었고, 과민성 쇼크(anaphylactic shock)를 보이는 마우스에서 iNOS 발현을 저해한 결과 치사율이 감소되었다.²⁵⁾

NO생성 및 iNOS 저해제들은 과도하게 생성된 NO로 나타나는 여러 증상들을 저해하는 염증 및 sepsis를 치료할 수 있는 약물로서 개발될 수 있는 가능성을 제시하고 있는 것이다. 따라서 iNOS에 대해서 더 선택적이며 활성이 강한 저해제들을 개발하는데 중점을 두어야 할 것으로 생각한다.

결론

호장근(*Polygonum cuspidatum*)으로부터 NO 생성 저해제로 2종의 쿠마린계 물질, decursin(1)과 decursinol angelate(2)를 분리하고 NO 생성 저해작용 기전

을 밝히고자 하였다.

본 실험에서 시간에 따른 NO생성 저해활성을 측정해 본 결과, LPS와 병용처리 시에 활성이 높았고, LPS를 처리한 후 시간이 경과되어 물질을 처리하면 그 저해활성이 시간이 경과될수록 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 iNOS를 완전히 유도시킨 후 NO생성 저해활성을 측정해 본 결과, 저해활성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한, iNOS 전사 단계의 NF- κ B를 저해함으로써 NO 생성저해활성이 나타남을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들로부터 분리한 2종의 coumarin계 물질인 decursin과 decursinol angelate의 NO 생성저해는 iNOS의 직접적인 저해작용이 아니라 iNOS mRNA 전사단계에서 iNOS 유도를 억제하여 NO생성을 저해하고 있으며, 특히 iNOS mRNA의 전사를 개시시키는 NF- κ B의 활성을 억제하여 NO생성을 저해할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국책 생명공학기술개발사업비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사 드리며, NMR과 MS를 측정해주신 한국생명공학연구원 생물분석실의 정동호, 박규환씨께도 감사의 말씀을 드립니다.

인용문헌

1. Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
2. Galla, H. J. (1993) Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 378-380.
3. Mehta, J. L., Chen, L. Y., Kone, B. C., Mehta, P. and Turner, P. (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 370-377.
4. Knowles, R. G. and Moncada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399-402.
5. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
6. Stuehr, D., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* 88: 7773-7777.
7. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749.
8. Chiou, W. F., Sung, Y. J., Liao, J. F. and Chen, C. F. (1997) Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. *J. Nat. Prod.* 60: 708-711.
9. Ryu, J. H., Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Han, Y. N. (1998) Yomogin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 21(4): 481-484.
10. Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M. T., Christen, Y. and Packer, L. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem. Pharm.* 53: 897-903.
11. Brouet, I. and Ohshima, H. (1995) Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 533-540.
12. Choi, H. C., Rho, T. C., Kim, B. Y., Ko, H. R., Oh, W. K., Seung, C. K., Ahn, J. S. and Lee, H. S. (1999) Inhibition of Nitric oxide production by coumarins from *Peucedanum japonicum* in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacog.* 30: 99-104.
13. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Feelisch, M. and Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research. *John Wiley & Sons.* 492-497.
15. Erkel, G., Anke, T., and Sterner, O. (1996) Inhibition of NF-kappa B activation by panepoxydone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226: 214-221.
16. Ryu, K. S., Hong, N. D., Kim, N. J., and Kong, Y. Y. (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. *Kor J Pharmacogn* 21: 64-68.
17. Hata, K., and Sano, K. (1966) The constitution of decursin, a new coumarin isolated from the root of *Angelica decursiva* Fr. et Sav. *Tetrahedron Lett.* 14: 1461-1465.
18. Xie, Q. W., Cho, H. J., and Calaycay, J. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256: 225-228.
19. Reif, D. W., and McCreedy, S. A. (1995) N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 320: 170-176.
20. Griffiths, M. J., Messent, M., MacAllister, R. J., and Evans, T. W. (1993) Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.*

- 110: 963-968.
21. Brouet, I., and Ohshima, H. (1995) Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 533-540.
 22. Baeuerle, P. A., and Henkei, T. (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179.
 23. Cirino, G., Wheeler-Jones, C. P. D., Wallace, J. L., Soldato, P. D., and Baydoun, A. R. (1996) Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by novel nonsteroidal anti-inflammatory derivatives with gastrointestinal sparing properties. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1421-1426.
 24. Meade, E. A., Smith, W. L., and DeWitt, D. L. (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 268: 6610-6614.
 25. Vallance, P., and Moncada, S. (1993) Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horizons.* 1 (February): 77-86.

(2001년 6월 8일 접수)