

원 저

白屈菜가 大食細胞의 NO 및 TNF- α 生成에 미치는 影響

김홍준, 문석재, 김동웅, 문구, 원경숙¹⁾, 윤준철, 김유경, 원진희
원광대학교 한의과대학 비계내과학교실, 계명대학교 의과대학 핵의학과²⁾

The Effects of *Chelidonium majus* on NO and TNF- α Production in Macrophages

Hong-Joon Kim, Seok-Jae Moon, Dong-Woung Kim, Goo Moon, Kyoung-Sook Won,
Jun-Chul Yoon, Yu-Kyung Kim, Jin-Hee Won

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Department of Nuclear Medicine, College of Medicine, Keimyung University²⁾

Objectives : In this study, we investigated the mechanism by which *Chelidonium majus* (CM) regulates nitric oxide (NO) production.

Methods : Using mouse peritoneal macrophages, the mechanism by which CM regulates NO or tumor necrosis factor- α (TNF- α) production was examined. NO release was measured by the Griess method. TNF- α production was measured by the ELISA method. The protein extracts were prepared and samples were analyzed for the inducible NOS(iNOS) expression and nuclear factor kappa B(NF- κ B) activation by Western blotting.

Results : When CM was used in combination with recombinant interferon- γ (rIFN- γ), there was a marked cooperative induction of NO production. CM had an effect on NO production by itself. The expression of the iNOS gene was increased in rIFN- γ plus CM-stimulated peritoneal macrophages and almost completely inhibited by pre-treatment with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- κ B. The NF- κ B activation was increased in rIFN- γ plus CM-induced peritoneal macrophages. The increased production of NO from rIFN- γ plus CM-stimulated peritoneal macrophages was decreased by the treatment with N^G-monomethyl-L-arginine (N^GMMA) or N-Tosyl-Phe chloromethyl ketone (TPCK), and was almost completely inhibited by pre-treatment with PDTC. Furthermore, treatment with CM alone or rIFN- γ plus CM in peritoneal macrophages caused a significant increase in TNF- α production. PDTC decreased CM-induced TNF- α production significantly. After CM treatment in HT-29 or AGS cells, cell viability decreased.

Conclusions : These findings demonstrate that CM increases the production of NO and TNF- α by rIFN- γ -primed macrophages and suggest that NF-B plays a critical role in mediating these effects of CM. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):138-147)

Key Words: *Chelidonium majus*, nitric oxide, tumor necrosis factor- α

서 론

- 접수 : 2003년 3월 4일 · 논문심사 : 2003년 3월 24일
- 채택 : 2003년 4월 25일
- 교신저자 : 김홍준, 원광대학교 광주한방병원 3내과
(Tel. 062-670-6527, Fax. 062-670-6529, E-mail: joungup@hanmail.net)
- 이 논문은 2003년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

白屈菜는 양귀비과(罂粟科, Papaveraceae)에 속하는 多年生 草本으로 애기똥풀(*Chelidonium majus* L.)의 帶花한 全草를 栽培기에 채취하여 건조한 것으로 우리나라 전국 각지와 중국, 일본, 유럽, 북미 등지의

기후가 온난하고 습윤한 기후의 지역에 주로 분포되어 있다^{1,2)}.

白屈菜의 性味는 苦辛, 微溫或冷, 有毒하며, 肝·脾·胃經에 歸經하여 주로 鎮痛, 止咳, 利尿, 清熱解毒, 消炎, 消腫, 抗癌 등의 效能이 있어^{2,4)}, 胃脘疼痛, 下痢腹痛, 細菌性痢疾, 小兒腹瀉, 水腫黃疸, 慢性氣管支炎, 百日咳, 食道癌, 直腸癌, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷 등에 사용된다^{3,4)}.

白屈菜의 主成分은 chelidone, homochelidone, berberine, sanguinarine 등으로 밝혀졌으며⁵⁾, 藥理 作用에 관한 報文으로 Lenfeld 등이 白屈菜의 成分 중 quaternary benzophenanthridine alkaloids가 항암작용의 모체라고 보고하였다⁶⁾.

NO(nitric oxide, 산화질소)는 생체내의 신호 전달 물질로 수많은 생리적 과정에 관여하는데⁷⁾, 그 중 면역계에서 대식세포의 항암작용⁸⁾과 항미생물작용^{2,5,6)}의 중요한 매개물이라는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 탐식작용을 일으킨 대식세포는 iNOS(inducible NO synthase, 유도성 산화질소 합성 효소)를 유도하여 NO를 생산한다⁸⁾. 대식세포의 NOS는 항상 존재하는 것이 아니라 rIFN- γ (recombinant interferon- γ), TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 같은 여러가지 cytokine과 LPS(lipopolysaccharide)의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 iNOS라고 하며 L-arginine으로부터 다량의 NO를 생산하게 된다⁹⁾. 또한 생성된 NO는 N^oMMA(N^o-monomethyl-L-arginine)나 iNOS 억제제인 TPCK(N^o-Tosyl-Phe Chloromethyl Ketone)에 의해 억제됨이 보고되고 있다¹⁰⁾.

염증성 세포활성 물질인 TNF- α 는 조직의 염증이 나 미생물에 의한 감염에 대응해서 전신적인 반응을 조절하는 물질이다¹¹⁾. TNF- α 의 생성 역시 IFN- γ 에 의해서 증가되며 증가된 TNF- α 는 다시 대식세포를 자극해 NO 생성을 증폭시킨다¹²⁾. 대식세포는 다양한 전사인자를 유도하는데, 특히 NF- κ B(nuclear factor kappa B)는 TNF- α , iNOS, IL-6(interleukin-6)의 전사를 조절하는 유전자에 붙어 전사를 조절한다¹³⁾. NF- κ B의 활성화는 PDTC(pyrrolidine dithiocarbamate)에 의해 억제된다.

NO 생성 효과가 있는 한약 單味에 대한 報文으로는 三白草¹⁴⁾, 茵陳¹⁵⁾, 丹蓼¹⁶⁾ 등에 대한 보고가 있다.

白屈菜에 대한 성분 및 약리작용에는 韓¹⁷⁾의 보고가 있으며, 白屈菜의 鎮痛效果, 抗癌效果, 抗炎效果, 抗胃潰瘍效果로는 趙¹⁸⁾, 金¹⁹⁾, 蘇²⁰⁾, 金²¹⁾ 등의 보고가 있다. 또한 Sokoloff²²⁾는 白屈菜의 惡性腫瘍에 대한 細胞毒作用을 보고한 바 있다. 그러나 白屈菜의 NO와 TNF- α 생성효과에 대한 실험적 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 消炎作用과 抗癌作用이 있는 白屈菜가 복강 대식 세포에서 NO와 TNF- α 생성에 미치는 효과 및 NF- κ B 활성화 여부를 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

白屈菜는 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하여 그 기원을 우석대학교 약대 신태용 교수가 검증하였다. 사용된 한약재(NO. 02-06-28)는 원광대학교 약학대학 식물표본실에 보관하였으며 내독소에 의한 오염을 방지하기 위해서 가능한 모든 기구는 baking하여 사용하였다. 건조된 약재는 내독소가 없는 증류수에 넣고 100℃에서 3시간 煎湯한 후 0.2 μ m filter로 여과하였다. 그 후 그 여과액을 동결건조하여 사용하였다.

2) 시약 및 동물

Murine rIFN- γ 는 Genzyme(Munich, Germany)으로부터 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, LPS (lipopolysaccharide), sodium nitrite, PDTCT는 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. iNOS에 대한 rabbit polyclonal antisera는 Transduction Laboratories(Lexington, KY)에서 구입하였다. rTNF- α , biotinylated TNF- α , anti-murine TNF- α 는 R&D systems Inc.(Minneapolis, MN)에서 구입하였다.

N^oMMA는 Calbiochem(San Diego, CA)에서 TG(thioglycollate)는 Difco Laboratories(Detroit, MI)

에서 구입하였다. 0.2 μ m syringe filter와 96 wells, 4 wells, 100-mm diameter dishes는 Nunc(Naperville, IL)에서 구입하였다. L-arginine(84mg/l)을 함유한 DMEM, HBSS(Hanks balanced salt solution), FBS(fetal bovine serum)등은 Life Technologies(Grand Island, NY)에서 구입하였으며, 생쥐(수컷, C57BL/6 계)는 다물 사이언스(대전, 한국)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 복강대식세포 배양

복강대식세포는 Narumi 등²³⁾의 방법을 이용하여 배양하였다. 간략하게 설명하면, 3~4일 전에 생쥐 복강에 TG를 2.5ml 주입한 후, 10U/ml의 heparin이 첨가된 8ml HBSS를 복강에 주입하고 세포를 주사기로 취했다. 800rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM을 이용해 4 wells에 3×10^6 cells씩 분주했다. CO₂ 배양기에서 3시간 배양한 후 HBSS로 3번 세정해서 붙지 않은 세포를 떼어낸 다음 10% FBS가 첨가된 DMEM을 이용해 배양했다.

2) NO 농도 측정

복강대식세포(3×10^6 cells/well)에 rIFN- γ (10U/ml)를 처리한 6시간 후에 여러가지 농도의 白屈菜(0.01~1 mg/ml)를 처리하고 48시간 후에 Xie 등²⁴⁾의 방법에 준하여 NO 산화물인 nitrite(NO₂⁻)의 농도를 측정하였다. 간략하게 설명하면, 배지 100 μ l에 Griess 시약을 동량 섞어 상온에서 10분간 반응시킨 후, Titertek Multiskan(Flow Laboratories, North Ryde, Australia)을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻ 농도는 sodium nitrite를 standard로 사용하여 환산하였다. 세포가 없는 배지에서 5~8 μ M의 NO₂⁻를 함유하기 때문에 각 실험에서 이 값을 감하였다.

3) TNF- α 의 측정

복강대식세포(3×10^6 cells/well)를 rIFN- γ (10U/ml), 白屈菜 단독, 여러가지 농도의 白屈菜(0.01~1 mg/ml) + rIFN- γ (10U/ml)를 처리하고 24 시간 동안 배양한 후에 배지를 취하여 -70℃에 보관하였다. TNF- α 농도의 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)방법²⁵⁾을 이용하였다. 간략하게 설명하면,

ELISA 용 96-wells plates에 TNF- α 특이적인 단클론 항체를 코팅하고 4℃에서 약 12시간 방치하였다. 실험 중간 중간에 0.05% Tween-20이 함유된 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세정한다. 각 측정 단계에서의 반응은 37℃에서 2시간 동안 수행했으며 rTNF- α 를 standard로 사용하였다. 측정용 plates에 alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 처리하고 Titertek Multiskan으로 405nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4) 핵단백질 추출

핵 추출물의 정제방법은 다음과 같다. 세포를 활성 화시키고 1×10^7 세포를 PBS로 세정한 후 1000 \times g에서 5분간 원심 분리한다. 400 μ l의 저장액으로 다시 부유시켜 얼음에 10분 동안 유지시키고 15,000 \times g에서 5분간 원심 분리하였다. 핵단백질이 있는 상등액을 액체질소로 얼린 후 -70℃에 저장하였다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid 단백질 정량법²⁶⁾으로 수행했다.

5) Western blot analysis

복강대식세포(5×10^6 cells/well)에 rIFN- γ (10U/ml)를 처리한 다음, 6시간 후에 白屈菜 또는 LPS로 12시간 동안 자극하였다. 모든 세포 용해물은 완충액 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, and 10% 2-mercaptoethanol에서 조제했다. 세포 용해물인 단백질은 7% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하고 nitrocellulose paper에 옮겼다. membrane을 5% skim milk가 함유된 PBS-Tween20으로 상온에서 1시간 block시키고, anti-iNOS 및 p65 항체를 처리하였다. PBS-Tween20으로 3번 세정하고 2차 항체를 30분간 처리하였다. 항체 특이 단백질은 chemiluminescence detection system을 통해 확인하였다.

6) MTT assay

암세포주인 HT-29, AGS를 4well에 각각 2.5×10^5 씩 깔고 白屈菜를 농도별로 처리한 후 48시간동안 배양하였다. 20 μ l의 5mg/ml MTT 시약을 처리한 후 4 시간 이상 배양하였다. Fomazon을 확인한 후 c-tube에 옮겨 15,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상

등액을 제거한 후 demethyl sulfoxide에 녹여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 내독소(endotoxin) 검사

실험에 사용한 白屈菜 엑스는 E-TOXATE kit(Sigma)를 사용해 내독소 유무를 확인하였다.

8) 통계학적 분석

결과는 각 실험에서 mean \pm S.E.로 나타내었으며 두 집단간의 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였다.

실험성적

1. 白屈菜에 의한 NO 생성 유도 효과

복강대식세포에서 白屈菜에 의한 NO 생성 효과를 밝히기 위해, rIFN- γ 로 자극하지 않은 세포와 rIFN- γ (10U/ml)로 자극한 후 6시간 동안 여러가지 농도의 白屈菜(0.1~1mg/ml)로 처리한 세포를 48시간 후에 Griess method에 의하여 NO 생성량을 비교하였다. 白屈菜 단독 처리에 의해서도 NO 생성을 현저하게 증

가시켰으나, 白屈菜 단독보다는 rIFN- γ 와 白屈菜 동시 자극시에 그 효과가 더욱 현저했으며, 특히 rIFN- γ 와 白屈菜 0.1mg/ml를 동시 자극한 대식세포에서 약 60 μ M의 NO를 생성시켰다(Fig. 1).

2. 白屈菜에 의한 iNOS의 발현 유도 효과

복강대식세포에서 白屈菜에 의해 생성되는 NO가 iNOS의 발현과 관련성이 있는지를 실험하였다. 대식세포를 rIFN- γ (10U/ml)로 priming시킨 후 白屈菜(1mg/ml)나 LPS(10 μ g/ml)로 12시간동안 자극한 다음 Western blotting 방법으로 iNOS 발현량을 분석하였다(Fig. 2A). 白屈菜를 단독처리한 경우에는 iNOS가 약하게 발현하였으나 rIFN- γ + 白屈菜 또는 대조군인 rIFN- γ + LPS로 자극 시에는 iNOS의 발현량이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한 rIFN- γ + 白屈菜 + PDTC (100 μ M) 처리시에는 iNOS의 발현량이 급격히 감소되었다. Fig. 2B는 Fig. 2A의 data를 상대값으로 나타낸 것이다.

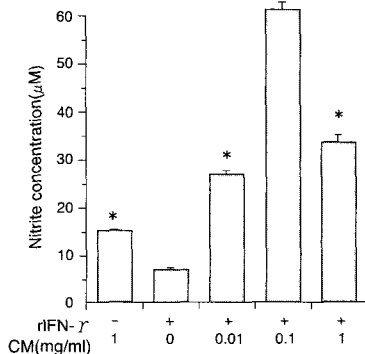


Fig. 1. Dose-Dependent Effect of *Chelidonium Majus*(CM) on NO Synthesis in rIFN- γ -Treated Peritoneal Macrophages. Peritoneal macrophages(3×10^6 cells/well) were cultured with rIFN- γ (10U/ml). The peritoneal macrophages were then stimulated with various concentrations of *Chelidonium majus* for 6hr after incubation. After 48hr of culture, NO release was measured by the Griess method (nitrite). NO (nitrite) released into the medium is presented as the mean \pm S. E. of five independent experiments duplicate in each run.

* $p < 0.001$; significantly different from the control.

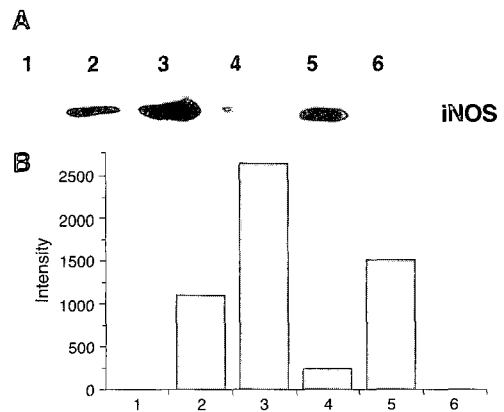


Fig. 2. Effect of *Chelidonium Majus* on the Expression of iNOS by rIFN- γ Plus *Chelidonium Majus*-Induced Peritoneal Macrophages.

Peritoneal macrophages(5×10^6 cells/well) were incubated for 6hr with rIFN- γ (10U/ml). The peritoneal macrophages were then stimulated *Chelidonium majus*(1mg/ml) or LPS(10 μ g/ml) for 12hr. The protein extracts were prepared and samples were analyzed for iNOS expression by Western blotting as described in the method (A). The iNOS levels were quantitated by densitometry (B). 1, unstimulated cell; 2, rIFN- γ ; 3, rIFN- γ + LPS; 4, *Chelidonium majus*; 5, rIFN- γ + *Chelidonium majus*; 6, rIFN- γ + *Chelidonium majus* + PDTC (100 μ M).

3. NF- κ B 활성화를 통한 NO 생성 효과

白屈菜가 어떤 신호전달 경로를 통해 NO 생성을 증가시키는가를 실험하기 위해 NF- κ B 활성화를 측정하여 보았다. 대식세포를 rIFN- γ (10U/ml)로 6시간 동안 배양한 후, 白屈菜(1mg/ml)나 LPS(10 μ g/ml)로 1 시간동안 자극하였다. 핵단백질을 추출한 후 western blotting을 통하여 NF- κ B의 subunit인 p65 활성화를 분석하였다. 대조군인 rIFN- γ 처리 후에 LPS를 자극하면 NF- κ B가 증가하는 것과 유사하게 rIFN- γ 처리 후에 白屈菜(1mg/ml)를 처리했을 경우에도 NF- κ B 활성이 증가하였다(Fig. 3).

4. N^GMMA, TPCK, PDTC에 의한 NO 생성 억제 효과

白屈菜에 의해 생성되는 NO가 L-arginine 의존적 경로에 의한 것인 지를 확인하기 위해 대식세포를 rIFN- γ (10U/ml)와 N^GMMA(0.001~0.1mM) 또는 rIFN- γ (10U/ml)와 TPCK(40 μ M) 존재하에서 6시간 배양한



Fig. 3. Effect of *Chelidonium Majus* on the NF- κ B(p65) Activation by rIFN- γ Plus *Chelidonium Majus*-Induced Peritoneal Macrophages.

Peritoneal macrophages(5×10^6 cells/well) were incubated for 6hr with rIFN- γ (10U/ml). The peritoneal macrophages were then stimulated *Chelidonium majus*(1mg/ml) or LPS(10 μ g/ml) for 1hr. Nuclear protein extracts were prepared and samples were analyzed for NF- κ B activation by Western blotting as described in the method. 1, unstimulated cell; 2, rIFN- γ ; 3, *Chelidonium majus*; 4, rIFN- γ + *Chelidonium majus*; 5, rIFN- γ + LPS.

다음 白屈菜(1mg/ml)를 처리하여 다시 48시간동안 배양하였다. 白屈菜에 의한 NO 생성은 N^GMMA농도에 비례하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 4). TPCK 역시 白屈菜에 의한 NO 생성을 유의성 있게 감소시켰다(Table 1). 白屈菜에 의한 NO 생성 기전을 밝히기 위해, rIFN- γ + 白屈菜 처리군에 NF- κ B 억제제인 PDTC(100 μ M)를 처리했을 경우 NO 생성이 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다(Table 1). N^GMMA, TPCK, PDTC가 세포독성을 나타내는지 MTT assay로 측정한 결과 세포독성은 발견되지 않았다(data not shown).

5. rIFN- γ 와 白屈菜 자극에 의한 TNF- α 생성 효과

rIFN- γ 와 白屈菜 자극에 의한 대식세포의 TNF- α 생성 효과를 분석하였다. 대식세포를 rIFN- γ (10U/ml)로 처리한 후, 6시간동안 여러가지 농도의 白屈菜(0.01~1mg/ml)로 자극한 다음 24시간동안 배양하여 ELISA method에 의하여 TNF- α 생성량을 측정하였다. rIFN- γ 단독이나 배지 단독에서 TNF- α 의 생성은 매우 낮았다. 그러나 白屈菜 1mg/ml만을 단독 처리한 결과 rIFN- γ 처리 때보다 TNF- α 생성량이 약간 증가하였다. 白屈菜와 rIFN- γ 를 동시에 처리했을 경우에는 白屈菜 농도에 의존적으로 TNF- α 생성량이 급격히 증가하였다(Table 2).

6. PDTC 또는 TPCK에 의한 TNF- α 생성 억제 효과

rIFN- γ 와 白屈菜 자극에 의한 대식세포의 TNF- α 생성 효과 기전을 밝히기 위해 대식세포에 PDTC(100 μ

Table 1. Effect of TPCK or PDTC on rIFN- γ Plus *Chelidonium Majus*-Induced NO Production in Peritoneal Macrophages

Addition		TPCK(40 μ M)	PDTC(100 μ M)	Nitrite concentration (μ M)
rIFN- γ (10U/ml)	<i>Chelidonium majus</i> (1mg/ml)			
-	-	-	-	<5
+	-	-	-	6.28 \pm 0.1
+	+	-	-	33.2 \pm 1.5
+	+	+	-	10.45 \pm 0.5*
+	+	-	+	6.0 \pm 0.1*

Peritoneal macrophages(3×10^6 cells/well) were stimulated with *Chelidonium majus*. The amount of nitrite released by peritoneal macrophages was measured after 48hr of the Griess method. Values are the mean \pm S.E. of three independent experiments duplicate in each run.

* $p < 0.01$, significantly different from the control.

M) 또는 TPCK(40 μ M)를 전처리 하였다. 그리고 rIFN- γ (10U/ml)로 처리하고, 6시간동안 白屈菜(1mg/ml)로 자극한 다음 24시간동안 배양하여 ELISA method로 TNF- α 생성량을 측정하였다. rIFN- γ 와 白屈菜에 의해 증가된 TNF- α 는 PDTC를 처리했을 경우 현저하게 감소하였으나 TPCK처리에 의해서는 영향이 없었다(Table 3).

7. 白屈菜가 암세포에 직접적으로 미치는 효과

白屈菜가 암세포의 성장에 미치는 영향을 보기 위하여 대장암 세포주인 HT-29 세포, 위암세포주인 AGS 세포에 여러가지 농도의 白屈菜(0.01~1mg/ml)를 처리한 다음 24시간 후에 MTT assay를 시행하였다. 白屈菜 1mg/ml에서 HT-29 세포의 생존율은 70.6%였으며, AGS 세포의 생존율은 83.5%로 白屈菜가 암세포의 생존을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

Table 2. Dose-Dependent Effect of *Chelidonium Majus* on TNF- α Production in rIFN- γ -Treated Peritoneal Macrophages

Addition		TNF- α secretion (ng/ml)
rIFN- γ (10U/ml)	<i>Chelidonium majus</i> (mg/ml)	
+	-	0.08 \pm 0.01
-	+	1.23 \pm 0.31*
+	+	0.66 \pm 0.23*
+	+	1.37 \pm 0.20*
+	+	3.12 \pm 0.87

Peritoneal macrophages(3×10^5 cells/well) were cultured with rIFN- γ (10U/ml). The peritoneal macrophages were then stimulated with various concentrations of *Chelidonium majus* for 6hr after incubation. After 24hr of culture, TNF- α production was measured by the ELISA method. TNF- α released into the medium is presented as the mean \pm S. E. of five independent experiments duplicate in each run.

* $p < 0.05$; significantly different from the control.

Table 3. Effect of PDTC or TPCK on rIFN- γ Plus *Chelidonium Majus*-Induced TNF- α Production in Peritoneal Macrophages

Addition		PDTC(100 μ M)	TPCK(40 μ M)	TNF- α secretion(ng/ml)
rIFN- γ (10U/ml)	<i>Chelidonium majus</i> (1mg/ml)			
-	-	-	-	0.07 \pm 0.01
+	-	-	-	0.08 \pm 0.01
+	+	-	-	3.12 \pm 0.87
+	+	+	-	0.11 \pm 0.01*
+	+	-	+	4.14 \pm 0.35

Peritoneal macrophages(3×10^5 cells/well) were cultured with rIFN- γ (10U/ml). The peritoneal macrophages were then stimulated with *Chelidonium majus* for 6hr after incubation. After 24hr of culture, TNF- α production was measured by the ELISA method. TNF- α released into the medium is presented as the mean \pm S. E. of five independent experiments duplicate in each run.

* $p < 0.05$; significantly different from the control.

고찰

白屈菜는 양귀비과(罂粟科, Papaveraceae)에 속하는 多年生 草本으로 애기똥풀(*Chelidonium majus* L.)의 帶花한 全草를 개화기에 채취하여 건조한 것으로 우리나라 전국 각지와 중국, 일본, 유럽, 북미 등지의 기후가 온난하고 습윤한 기후의 지역에 주로 분포되어 있다^{1,2)}.

《救荒本草》에 “味苦微辣”이라고 최초로 수록되어 있으며, 土黃連, 牛金花, 斷腸草, 雄黃草, 山黃連, 假黃

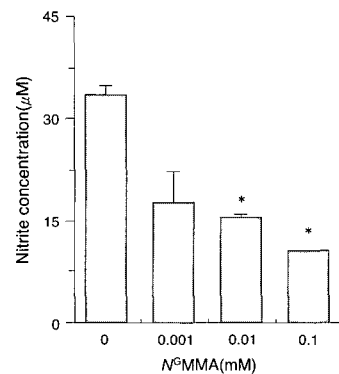


Fig. 4. Effects of N^GMMA on *Chelidonium Majus*-Induced Nitrite Accumulation in the Cultured Medium of Peritoneal Macrophages.

Peritoneal macrophages(2.5×10^5 cells/well) were incubated for 6 hr with rIFN- γ (10U/ml) plus various concentrations of NGMMA. The peritoneal macrophages were then treated with *Chelidonium majus*(1mg/ml) and cultured for 48hr. NO release was measured by the Griess method. NO(nitrite) released into the medium is presented as the mean \pm S. E. of three independent experiments duplicate in each run.

* $p < 0.05$ compared to control (absence of N^GMMA).

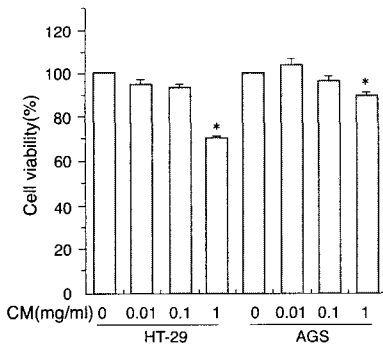


Fig. 5. Effect of *Chelidonium Majus* in HT-29 or AGS cells.

Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay at 24hr after *Chelidonium majus* treatment in HT-29 or AGS cells. The percentage of viable cells was over 98% in each condition. Data represent the mean \pm S. E. of three independent experiments.

* $p < 0.01$ compared with control value.

連, 地黃連, 八步緊, 山西瓜, 小野人血草 등의 異名을 가지고 있다²⁾. 性味는 苦辛, 微溫或冷, 有毒하며, 肝·脾·胃經에 歸經하여 주로 鎮痛, 止咳, 利尿, 清熱解毒, 消炎, 消腫, 抗癌 등의 效能이 있어^{2,4)}, 急性性胃炎, 胃潰瘍, 胃癌, 胃腕疼痛, 下痢腹痛, 細菌性痢疾, 小兒腹瀉, 水腫黃疸, 慢性氣管支炎, 百日咳, 食道癌, 直腸癌, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷 등에 사용된다^{3,4)}.

白屈菜의 성분에는 chelidoneine, homochelidoneine, berberine, sanguinarine, protopine, stylopine, allocryptoline 등이 있으며, 약리작용에 대하여 家兎 소장의 평활근에 대한 억제작용, 중추신경 억제작용, 항암작용, 항균작용, 심혈관계에 대한 작용, 장운동 및 진통 효과에 대한 연구보고가 있다^{2,5,17,18)}. 그리고 白屈菜 성분 중 각종 alkaloids에 thiophosphoric acid를 합성시킨 ukarain이라는 유도체가 개발되었으며, ukarain이 전립선암 세포에서 세포고사(apoptosis)를 유도하며, HIV 환자에 투여할 경우 백혈구 수가 증가한다는 것이 보고되었다²⁷⁾.

NO는 반감기가 6~60초 정도의 불안정한 무기가스로서, 사람을 포함한 고등동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 합성되며, 합성된 NO는 생체내의 신호 전달 물질로 수많은 생리적 과정에 관여한다⁷⁾. 즉 순환기계에서 혈관 확장 물질로 혈관을 확장하고 혈관 내

피세포의 증식을 억제하며 혈소판의 기능을 막아 피가 응고되는 것을 방지하는 항동맥경화 작용, 중추신경계와 말초 신경계에서 신경전달 작용, 면역계에서 종양세포나 세포내 기생생물에 대한 방어작용을 하는 중요한 신호 전달 물질이다²⁸⁾. 더욱이 최근에는 NO가 생쥐나 사람에서 항 바이러스 효능을 나타낸다고 보고되어졌다. Croen²⁹⁾은 rIFN- γ 와 LPS 자극으로 인한 NO생성이 herpes simplex virus-1의 증식을 1,000배 억제한다고 보고하였고, Eroglu 등³⁰⁾은 종양에서 혈관내피성장인자와 NO의 생성이 증가한다고 보고하였다. 또한 Klotz 등³¹⁾은 방광암 세포 조직에서 iNOS가 높게 발현되나 양성 종양에서는 그렇지 않다고 보고하였다.

NO를 합성하는 효소는 크게 構成性 산화질소 합성 효소(constitutive NO synthase, cNOS)와 誘導性 산화질소 합성효소(inducible NO synthase, iNOS)로 구분되며, 前者는 이미 세포내에 존재하는 단백질로 어떤 자극에 의하여 활성을 갖게 되는 것이고, 後者는 자극에 반응하여 새로운 단백질이 합성되는 것이다⁸⁾. iNOS는 주로 침입한 병원성 미생물 및 종양세포에 대한 방어물질로 작용하는 것으로 알려져 있다³²⁾. iNOS는 다량의 NO를 생성하여 주세포의 면역작용에 중요한 역할을 수행하지만 필요이상으로 분비된 과량의 NO는 주세포 및 표적세포에 영향을 주어 만성적 염증을 유발한다³³⁾. 이러한 만성적 염증을 개선하기 위해서는 iNOS의 발현이 적절하게 조절될 필요성이 있다.

탐식작용을 일으킨 대식세포는 iNOS를 유도하여 NO를 생산한다⁸⁾. 대식세포의 NOS는 항상 존재하는 것이 아니라 일차적으로 rIFN- γ 의 자극이 필요하며 LPS, TNF- α 등에 의한 2차 자극으로 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 iNOS라고 하며 L-arginine 으로부터 다량의 NO를 생산하게 된다^{8,9)}. 또한 대식세포는 rIFN- γ 자극 후 LPS 처리에 의해 NF- κ B를 활성화시켜 NO를 생성시키는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. NF- κ B는 대식세포에서 항상 발현하고 있으며 면역반응, 염증과정을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있으며³⁵⁾, iNOS는 NF- κ B의 활성화를 통하여 발현된다.

주로 대식세포에서 분비되는 염증성 세포활성 물질인 TNF- α 는 그 자체가 항암활성을 나타낼 뿐만 아니라 다양한 생물학적 기능을 갖고 있는 것으로 인식되고 있다³⁶⁾. 특히 암종이나 육종을 불문하고 여러 종류의 악성종양에 효과가 있으며, 정상세포에 대해 거의 세포독성을 보이지 않는 이점이 있다³⁷⁾. TNF- α 의 생성 역시 IFN- γ 에 의해서 증가되며 증가된 TNF- α 는 다시 대식세포를 자극해 NO 생성을 증폭시킨다¹²⁾.

본 연구에서는 白屈菜와 rIFN- γ 를 대식세포에 동시 자극하여 NO와 TNF- α 의 생성 증가와 NF- κ B 활성화를 유도하는지 확인하기 위하여 실험한 결과, 모두 유의성 있는 효과를 나타내었다. 白屈菜는 rIFN- γ 자극시 0.1mg/ml 농도에서 가장 강력한 활성을 나타냈다. 이런 결과는 白屈菜가 대식세포에서 NO를 생성하는 2차 자극제 역할을 하는 것을 의미한다(Fig. 1). 다음으로 白屈菜에 의한 NO 생성이 어떤 신호전달 경로를 통하는지 알아보기 위하여, rIFN- γ 로 자극한 대식세포에 白屈菜를 처리한 결과 iNOS 발현량이 급격히 증가하였으며(Fig. 2), NF- κ B가 활성화되었다(Fig. 3). 또한 L-arginine 유사체인 N^GMMA와 iNOS 억제제인 TPCK10), NF- κ B억제제인 PDTC 처리에 의해서 白屈菜에 의한 NO 생성이 억제되는 것을 확인하였다. N^GMMA와 TPCK에 의한 NO 억제 현상은 白屈菜에 의한 NO 생성이 NOS를 매개로 한 경로임을 의미하며, PDTC에 의한 NO 억제현상을 통하여 백굴채가 NF- κ B의 활성화를 통하여 NO를 생성함을 알 수 있다(Fig. 4, Table 1).

현재 白屈菜에 의해 증가된 NO가 인체 내에서 어떤 반응을 나타내는지는 명확히 밝혀지지 않았지만, 대식세포에서 유도된 NO는 여러 가지 형태의 박테리아, 기생충, 암세포 등에 강력한 효과를 나타내는 물질로 알려져 있기 때문에 이러한 임상적 상황에 적용 가능성을 예상할 수 있다³⁸⁾. iNOS에 의해 생성되는 NO는 대식세포에 세포독성을 나타내며, 종양에 의해 유도되는 면역저하에도 영향을 미친다. 白屈菜에 의한 NO의 생성효과는 in vivo 모델에서 白屈菜가 항박테리아, 항암, 항바이러스 등의 다양한 활성을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 세포 안과 밖에서

혈관 확장, 신호전달, 세포성장 조절, 병원체 방어 등 다양한 작용을 하므로²⁸⁾ 국소에서 다양한 기초 대사 조절에 관여할 것으로 예상된다.

rIFN- γ 와 白屈菜 자극에 의한 대식세포의 TNF- α 생성 효과를 분석한 결과 白屈菜의 농도 의존적으로 TNF- α 생성량이 증가하였다. 이는 白屈菜가 rIFN- γ 의 자극하에 대식세포의 NO 생성을 증가시켰던 결과를 결부시켜 볼 때, 白屈菜가 대식세포의 TNF- α 분비를 촉진시켜 NO 발생을 증가시킨다는 것을 의미한다 (Table 2).

白屈菜와 rIFN- γ 자극에 의한 TNF- α 생성이 PDTC와 TPCK 처리에 의해 억제되는지를 확인해본 결과 PDTC를 처리했을 경우 TNF- α 생성이 억제되었으나, TPCK 처리에 의해서는 억제되지 않았다. 이에 대하여 Mathys 등³⁹⁾은 TPCK 100ng/ml까지는 TNF- α 생성에 아무런 영향이 없으나 1 μ g/ml 농도에서는 TNF- α 생성을 급격히 감소시켰다고 보고하였다. 본 연구에서는 40 μ M의 TPCK를 사용하였으며, 이외 다른 농도의 TPCK를 처리하였을 때 TNF- α 생성이 억제되는지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다(Table 3).

또한 위암 세포주와 대장암 세포주를 이용한 세포 생존을 실험을 통하여 白屈菜가 일부 암세포에 세포독성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이는 NO 생성에 의한 항암 작용 외에 白屈菜 자체로도 암세포에 영향을 미침을 의미한다(Fig. 5).

결론적으로 본 연구를 통하여 白屈菜가 rIFN- γ 로 자극한 대식세포에서 NF- κ B를 활성화시켜 NO와 TNF- α 생성을 증가시키며 白屈菜 단독으로도 일부 암세포에 세포독성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 白屈菜에 의한 NO와 TNF- α 생성 효과는 다양한 암 치료에 좋은 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 그러나 白屈菜에 의한 NO와 TNF- α 생성 기전에 대한 자세한 연구가 필요하며, 또한 효능 활성 물질을 분리하여 in vivo와 in vitro에 적합한 농도 등을 찾는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

消炎作用과 抗癌作用이 있는 白屈菜가 복강 대식세포에서 NO와 TNF- α 의 생성에 미치는 효과 및 NF- κ B활성 여부를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白屈菜 단독 처리에 의해서도 NO 생성이 현저히 증가하였으며, rIFN- γ 와 白屈菜를 함께 처리했을 때 NO 생성이 더욱 현저히 증가하였다. rIFN- γ 만으로는 약간의 NO 생성 효과만을 나타냈으며, 특히 rIFN- γ 를 처리한 대식세포에 0.1mg/ml 농도의 白屈菜를 부가하였을 때 가장 큰 상승효과를 나타내었다.
 2. rIFN- γ 단독 처리보다 rIFN- γ 를 처리한 6시간 후에 白屈菜를 부가했을 때 iNOS 발현량이 현저하게 증가하였으며, PDTC 처리에 의하여 iNOS 발현은 현저하게 감소하였다.
 3. rIFN- γ 와 白屈菜를 동시에 처리했을 때 NF- κ B 활성이 증가하였다.
 4. 대식세포에서 rIFN- γ 와 白屈菜에 의한 NO 생성은 N^oMMA에 농도 의존적으로 현저하게 감소하였으며, TPCK나 PDTC 처리에 의해서도 NO 생성은 유의성있게 감소하였다.
 5. rIFN- γ 단독 처리보다 白屈菜를 단독 처리하였을 때 TNF- α 생성량이 높았으며, 白屈菜와 rIFN- γ 동시 처리했을 경우 TNF- α 생성량이 급격히 증가하였다. 이때 TNF- α 생성량은 PDTC를 처리했을 경우 현저하게 감소하였으나, TPCK처리에 의해서는 영향이 없었다.
 6. 白屈菜는 대장암 세포주인 HT-29 세포, 위암세포주인 AGS 세포의 생존을 억제하였다.
- 이상의 결과로 볼 때 白屈菜에 의한 NO와 TNF- α 생성 효과는 다양한 암치료에 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료되며, 白屈菜가 NO와 TNF- α 생성을 증가시키는 기전에 대한 더욱 심도있는 연구가 필요하리라 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

참고문헌

1. 新文豐出版公司. 新編中藥大辭典. 臺北:新文豐出版公司. 1982:725-727.
2. 江蘇新醫學院. 中藥大事典. 서울:成輔社. 1982:725-727.
3. 李尙仁. 本草學. 서울:수서원. 1981:532-533.
4. 徐樹楠. 中藥臨床應用大全. 石家莊:河北科學技術出版社. 1998:347-348.
5. 生藥學研究會. 現代生藥學. 서울:학창사. 1997:352.
6. Lenfeld J, Kroutil M, Marsalek E. Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthidine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta. Med.* 1981;43(2):161-165.
7. Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American.* 1992;266:28-35.
8. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
9. Nathan CF, Hibbs JB. Roles of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 1991;1:65-70.
10. Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215(2):721-729.
11. Tracey K, Cerami A. Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 1994;45:491-503.
12. Lee EH, Kim NK, Hwang CY, Kim HM. Activation of inducible nitric oxide synthase by Yongdam-Sagan-Tang in mouse peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol.* 1998;60:61-69.
13. Kuprash DV, Udolova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene : distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages.

- Oncogene*. 1995;11:97-106.
14. 全吉煥. 三白草가 腹腔 大食細胞로부터 Nitric oxide(NO) 遊離 機轉에 대한 研究. 圓光大學校 大學院 博士學位論文. 1997.
15. 朴진상. 茵蔯 抽出物이 마우스 大食細胞주인 RAW 264.7 세포주의 iNOS發現 및 superoxide 形成에 미치는 影響. 圓光大學校大學院 碩士學位論文. 1998.
16. 曹賢珠. 丹蔘에 의한 NO 生成 및 NOS 遺傳子의 發顯 誘導 效果에 관한 研究. 圓光大學校大學院 博士學位論文. 1999.
17. 韓宗鉉. 白屈菜의 藥理作用에 관한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1985;6(2):128-133.
18. 趙州掌. 白屈菜水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文. 1989.
19. 金龍得, 權奇祿, 李俊茂. 白屈菜水鍼, 煎湯液 投與 및 鍼刺가 Indomethacin으로 誘發된 白鼠의 胃潰瘍에 미치는 影響. 大韓針灸學會誌. 1995;12(2):177-192.
20. 蘇鎮伯, 金護哲, 安德均. 白屈菜的 抗癌 效果에 관한 研究. 大韓本草學會誌. 1997;12(2):63-72.
21. 金永玉. 國產 白屈菜 엑기스의 急性 經口毒性和 抗炎 作用에 관한 研究. 圓光大學校 大學院 藥學科 碩士學位論文. 1986.
22. Sokoloff B. The oncostatic and oncolytic factors present in certain plants. *Oncology*. 1968;22(1):49.
23. Narumi S, Finke JH, Hamilton TA. Interferon gamma and interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem*. 1990;265(12):7036-7041.
24. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256:225-228.
25. Kim HM, Kim KS, Lee EH. Specific inhibition of immunoglobulin E-mediated allergic reaction using antisense Fc epsilon RI alpha oligodeoxynucleotides. *Immunology*. 1998;93:589-594.
26. Schoonbroodt S, Legrand-Poels S, Best-Belpomme M, Piette J. Activation of the NF-kappaB transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem J*. 1997;321:777-785.
27. Roublevskaia IN, Haake AR, Ludlow JW, Polevoda BV. Induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP by Ukrain. *Drugs Exp Clin Res*. 2000;26(5-6):141-7.
28. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : Physiology, pathophysiology and pharmacology (Pharmacological reviews). *Am. So. Pharm and Exp. Therap*. 1991;43:109-142.
29. Croen KD. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J Clinical Invest*. 1993;91:2446-2452.
30. Eroglu A, Demirci S, Ayyildiz A, Kocaoglu H, Akgul H, Elhan HA. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and nitrite as an estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer. *Br J Cancer*. 1999;80:1630-1634.
31. Klotz T, Bloch W, Jacobs G, Niggemann S, Engelmann U, Addicks K. Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology*. 1999;54:416-419.
32. Solary E, Bertrand R, Khon KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*. 1993;81:1359.
33. Flitney FW, Megson IL, Thomson LM, Kennovin GD, Butler AR. Vasodilator response of rat isolated tail artery enhanced by oxygen-dependent, photochemical release of nitric oxide from iron-sulphurhemosyls. *Br. J. Pharmacol*. 1996;117:1549-1557.
34. Kim HK, Lee HS, Chang KT, Ko TH, Baek KJ, Kwon NS. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor-kappa B. *J Immunol*. 1995;154:4741-4748.
35. Sha WC. Regulation of immune responses by NFkB/Rel transcription factors. *J Exp Med*. 1998;187:143-146.
36. Old LJ. Tumor necrosis factor, polypeptide mediator network. *Nature*. 1987;326:330.
37. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료(1). 익산:원광대학교 출판국. 1999:1-22, 455-456, 462-465.
38. Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 1991;3:65-70.
39. Mathys JM, Melanson SM, Schiffer-Alberts DJ, Ioannidis JP, Koziel H, Skolnik PR. NF-kappa B modulates TNF-alpha production by alveolar macrophages in asymptomatic HIV-seropositive individuals. *J Immunol*. 2000;164(3):1588-94.