

## Lipopolysaccharide로 활성화시킨 흰쥐 혈관의 iNOS 발현에 대한 Higenamine의 효과

강영진 · 이균우 · 구의본 · 이희영 · 장기철

경상대학교 의과대학 약리학교실, 심혈관연구소

**Inhibition by Higenamine of Lipopolysaccharide-induced iNOS mRNA Expression and NO Production in Rat Aorta.** Young Jin Kang, Goun Woo Lee, Eui Bon Ku, Hoi Young Lee, and Ki Churl Chang Department of Pharmacology and Cardiovascular Research Institute, College of Medicine, GyeongSang National University, Chinju 660-280, Korea

Higenamine was widely used as traditional remedy for the treatment of rheumatoid arthritis. Nitric oxide(NO) may be a critical mediator in this inflammatory disease. Synovial tissue from humans with inflammatory arthritis expresses NOS2(iNOS) mRNA and protein, and generates NO in vitro. We therefore, investigated the effect of higenamine on the induction of nitric oxide synthase(NOS) promoted by lipopolysaccharide(LPS). Prophylactic application of higenamine selectively prevented LPS-primed initiation of L-arginine-induced relaxation and restored phenylephrine(PE)-induced contraction in rat aorta. LPS-stimulated nitrite production in the incubation medium was reduced by higenamine. Furthermore, RT-PCR and Northern analysis indicated that higenamine reduced iNOS expression primed by LPS in rat aorta. These results suggest that higenamine prevents LPS-promoted induction of NOS in vascular smooth muscle.

**Key Words:** Higenamine, Nitric oxide, Rheumatoid arthritis, Lipopolysaccharide, iNOS mRNA, Rat, Aorta

### 서 론

류마치스성 관절염(Rheumatoid arthritis, RA)은 관절의 염증과 연골의 점진적 소실을 특징으로 하는 만성적 전신성 질환이다(Harris, 1993). Nitric oxide(NO)는 이 질환의 염증성 반응단계에 있어서 중요한 매개체이며(Nathan, 1992; Clancy & Abramson, 1995), NO는 생체내에서 L-arginine이 산화되어 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성된다(Palmer et al, 1987). 이 반응은 NO합성효소(NOS)라는 효소에 의해 촉매가 되며 현재까지 알려진 NOS에는 3가지 형태가 있다. 즉, 뇌에서 발견되는 neuronal nNOS(NOS1), 내피세포에 존재하는 eNOS(NOS3) 및 외부 자극에 의해 유도되는 iNOS(NOS2)가 있다(Moncada et al, 1991). NOS2 발현의 증가나 NO생성의 증가는 관절염 모델의 실험동물에서 증가되어 있으며 NOS 억제제들은 이러한 조건에서 관절염을 줄이는 것으로 보고되고 있다

(Clancy & Abramson, 1995; Ialenti et al, 1993; Stefanovic-Racic et al, 1994; Evans et al, 1995; Connor et al, 1995). In vitro에서 관절염 환자의 활액조직에는 NOS2 mRNA나 단백질의 발현이 보고되고 있다(Sakurai et al, 1995). 한편 Higenamine은 전통적으로 한방에서 강심, 이뇨, 진통제로 사용되고 있을뿐 아니라 RA의 치료제로 사용되고 있다(Deng, 1990). 지금까지 higenamine의 강심작용에 관한 연구는 많이되어 있으나(Chang et al, 1986, 1992, 1994) RA에 사용되는 그 이유에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않다. 특히 higenamine은 lipopolysaccharide(LPS)에 의한 사망률을 mouse 모델에서 줄였으며(Yun-Choi & Kim, 1994) 또한 higenamine과 구조적으로 매우 유사한 bis-benzylalkaloid 화합물들이 LPS에 의한 간독성을 줄이고(Kondo et al, 1993), higenamine과 같이 중국에서 전통적으로 RA치료에 사용되는 tetrandrine은 흰쥐 폐 대식세포에서 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B활성화를 억제한다는 사실(Chen et al, 1997)은 higenamine의 작용기전에 NOS에 대한 억제 작용이 있을 가능성을 시사하고 있다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 활성화 시킨 흰쥐의 흉부대동맥에서 higena-

mine의 효과를 관찰하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

LPS, L-arginine, propranolol, phenylephrine, indomethacin U46619, Formaldehyde, sulfanilamine, naphthylethylenediamine, phosphoric acid, sodium nitrite은 Sigma chemical Co.(USA)로부터 구입하였다. Trizol, penicilline, streptomycin, agarose superscript II reverse transcriptase, oligodT, Taq polymerase은 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였고 nylon membrane은 schleicher & schuell (Keene, MD, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

## 실험 방법

### 혈관 표본처리

암·수 구분없이 250 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 흉부대동맥을 척출한후 혈관주위의 연조직과 지방을 제거하고 약 4~5 mm 크기의 혈관고리를 만들고 내피세포는 Chang 등(1992)의 방법으로 제거하였다(1마리당 8개의 조각을 얻었다). 1회 실험시 4마리를 사용하여 Krebs용액이 담겨있는 4개의 10 ml 용기에 각각 나누어 넣고 대조군(4조각), LPS(300 ng)처리군(4조각), LPS(300 ng)+Higenamine(10  $\mu$ M or 30  $\mu$ M) 처리군(4조각) 및 LPS(300 ng)+Higenamine(0.1 mM or 0.2 mM)처리군(4조각)으로하여 각 용기에 100 mU/ml의 penicillin과 100 mg/ml의 streptomycin의 항생제를 처리한 다음 37°C와 95%의 산소가 공급되는 조건에서 10시간 배양하였다. 일부 실험에서는 higenamine 처리시 propranolol(10 nM)을 동시에 처리하였다.

### 혈관의 등장성 수축 및 이완 측정

등장성 수축과 이완 측정을 위해 Chang 등(1992)의 방법으로 organ bath에 현수하였다. 1g의 표준장력을 부과한후 약 1시간에 걸쳐 평형을 유지시키고 20분 간격으로 새로운 Krebs용액으로 갈아 주었다. Krebs용액은 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 연속 공급하였고 37°C로 유지하였다. Phenylephrine(PE)에 의한 수축반응을 보기위하여 혈관고리를 indomethacin(1  $\mu$ M)으로 처리한후 10분 뒤에 PE(1 nM~10  $\mu$ M)을 누적적으로 첨가하였다. L-arginine투여에 의한 이완 반응을 측정하기 위하여 U46619(20 nM) 최대 수축을 유지한 상태에서 L-arginine(1  $\mu$ M~0.1 mM)을

투여하였다.

### Northern에 의한 iNOS mRNA발현

2항에서 수축과 이완반응을 실험한 혈관을 그룹별로 모아 -70°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. Total RNA는 Trizol용액을 이용하여 추출하고 Formaldehyde agarose gel상에서 전기영동후 nylon membrane에 transfer하였다. iNOS cDNA를 함유한 probe를 이용하여 hybridization함으로써 iNOS mRNA 발현정도를 비교하였다.

### RT-PCR을 통한 iNOS mRNA발현

Total RNA를 1  $\mu$ M의 oligo(dT)<sub>18</sub>, Gibco-BRL의 Superscript II RNase H reverse transcriptase로 70°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 만든다. iNOS cDNA 증폭은 Taq DNA-polymerase와 20 ng의 cDNA, 200 pmol의 sense primer, 5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3', antisense primer, 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'를 사용하여 PCR반응을 94°C에서 44초, 60°C에서 40초, 70°C에서 90초 반응시킨후 증폭된 DNA를 1.4% agarose gel에 전개시켜 비교하였다.

### Nitrite/nitrate 측정

1항에서 처치한 혈관의 배양액 100  $\mu$ l씩을 취하여 Griess reagent(1% Sulfanilamine, 0.1% naphthylethylenediamine, 2% phosphoric acid) 100  $\mu$ l를 넣고 상온에서 약 10분간 반응후 ELIZA reader의 540 nm에서 흡광을 측정하였다. NO의 양은 Sodium nitrate의 표준용액의 값으로부터 산출하였다.

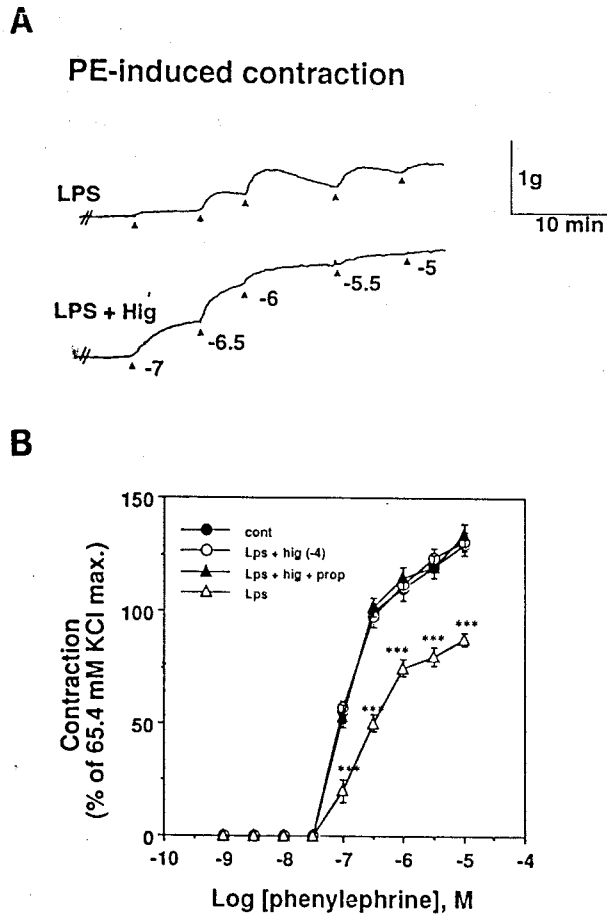
### 통계처리

결과분석은 평균±표준편차로 나타내고 각군간에 유의성 검정은 Student-t test와 ANOVA분석을 하고 P<0.05인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

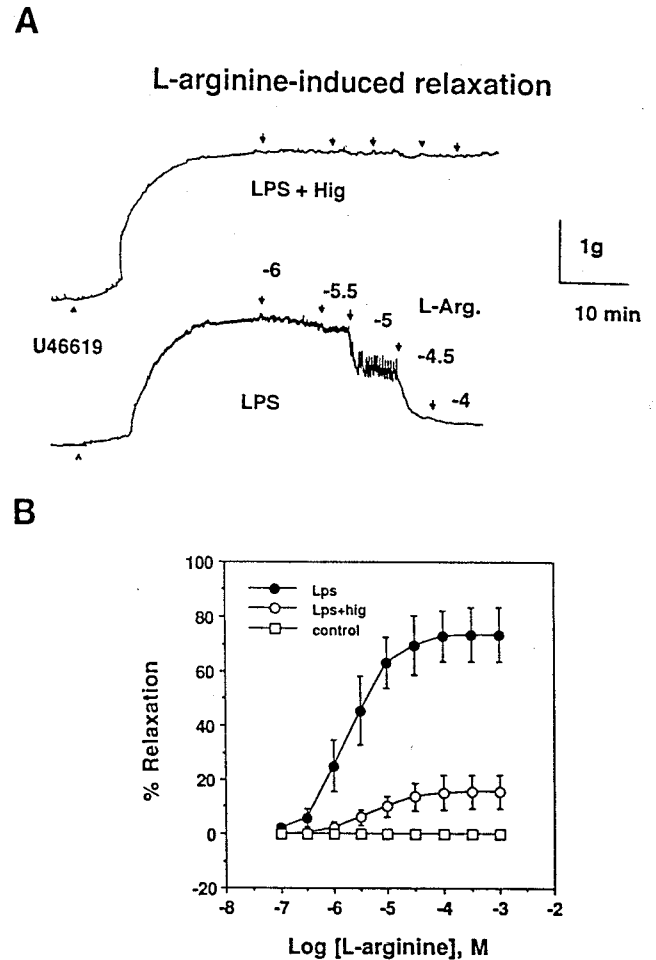
## 결 과

### Phenylephrine에 의한 흰쥐 대동맥의 수축반응

Fig. 1A에서 보이는 바와 같이 LPS를 단독 투여한 혈관에서 PE에 의한 최대 수축력이 저하되었으나 higenamine을 동시 투여한 혈관에서는 LPS만 투여한 혈관에서 보다 뚜렷한 수축력의 증가가 관찰되었다. 이를 도식화하여 그림 1B에 나타내었다.



**Fig. 1.** Phenylephrine (PE)-induced contraction in rat thoracic aorta which had been incubated with lipopolysaccharide (LPS, 300 ng/ml) or with coincubation of LPS and higenamine (hig, 0.1 mM). (A) Typical tracing of contraction in which arabic numbers indicate molar concentration of PE. (B) Concentration response curves of PE-induced contraction in rat aorta in the presence or absence of higenamine with LPS.



**Fig. 2.** Effects of higenamine on L-arginine-induced relaxation of LPS-primed rat aorta in which U46619 was used for contraction. (A) Typical tracings of relaxation response to L-arginine rat aorta. (B) Concentration response curves of L-arginine induced relaxation of LPS-primed rat aorta.

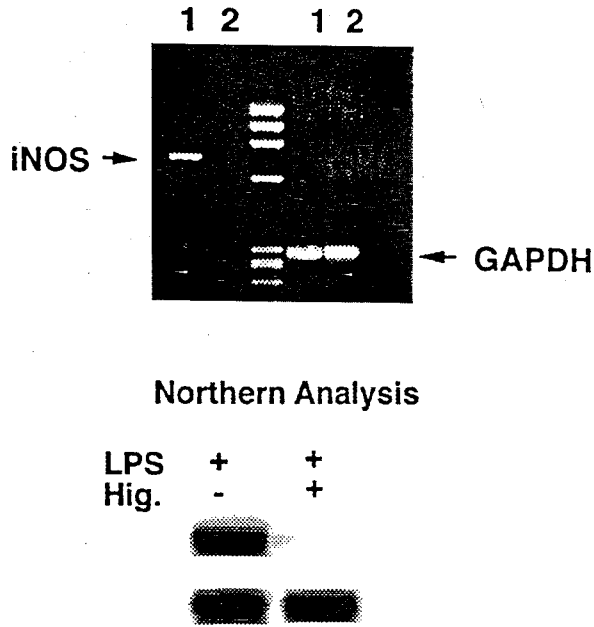
L-arginine에 의한 혈관 이완반응

LPS 단독 투여한 혈관군에서 L-arginine에 의한 용량-의존적 이완을 보이지만 대조군과 higenamine 동시투여 혈관군에서는 L-arginine에 의한 이완반응이 줄어들음을 알 수있다.  $\beta$ -blocker인 propranolol(10 nM)을 전처치하여  $\beta$ -adrenergic작용에 의한 이완작용이 아님을 확인하였다 (Fig. 2A, B). 한편 D-arginine을 투여시에는 LPS단독 투여한 혈관군에서도 이완반응이 나타나지 않았다. 이러한 작용이 L-arginine에 대한 선택성이 있는지 확인하기위하

여 Sodium nitroprusside(SNP)를 첨가시 모든 혈관에서 이완됨을 관찰하였다.

LPS에 의한 iNOS발현에 대한 higenamine의 효과

수축과 이완반응을 검토한뒤 방법항에 따라 total RNA를 추출하고 Northern blot을 시행하였다. Fig. 3에서와 같이 higenamine을 처리한 혈관에서 NOS2 mRNA발현이 줄어들었다. 아울러 RT-PCR을 행한 경우도 Northern blot에서와 같이 LPS에 의한 iNOS발현이 Higenamine에 의해 줄어들음을 관찰하였다(Fig. 3).



**Fig. 3.** RT-PCR (upper) and northern (lower) analysis of iNOS expression of rat aorta by LPS. Higenamine (0.1 mM) clearly diminished iNOS expression in both RT-PCR and northern analysis. 1:LPS only 2:LPS + higenamine.

**Table 1.** Effects of higenamine on nitrite and nitrate production in rat thoracic aorta incubated with lipopolysaccharide(300 ng/ml) for 10 hours

Treatment	nitrite/nitrate ( $\mu\text{M}$ )
Control	$2.4 \pm 0.64$
LPS	$18.7 \pm 1.83$
LPS + higenamine	$4.7 \pm 1.21$

#### Nitrite/Nitrate생성

Table 1에서와 같이 LPS 단독투여시 nitrite/nitrate양의 현저한 증가를 확인할 수 있었으나 higenamine 동시처리로 인하여 NO발생이 줄어들었다. Higenamine 자체로는 Griess반응에 영향이 전혀 없었다.

#### 고 찰

본 연구에서 higenamine은 혈관이나 대식세포에서 LPS

에 의한 iNOS mRNA 발현의 억제와 nitrite/nitrate양의 생성을 억제함을 확인할 수 있었다. LPS는 혈관과 대식세포에서 iNOS발현을 유도하는 물질로서 G(-)균이 생성하는 endotoxin이다. 따라서 이 물질은 실험적으로 폐혈성 쇼크를 만들기 위해 동물에 투여된다(Thiemerman et al, 1995). 본 연구에서 higenamine의 iNOS 억제효과를 혈관 반응을 통한 기능적 연구를 통하여 볼 때 LPS에 의한 혈관의 수축력 억제작용을 회복시켰으며 더군다나 L-arginine투여에 의한 이완작용이 higenamine 전처리에 의해 억제됨을 확인하였다. 이러한 현상은 혈관에서 LPS에 의한 iNOS 발현이 줄어든 결과로서 해석되며 실제 혈관조직에서 iNOS mRNA 발현정도를 비교시 확인할 수 있었다. 또한 혈관에서와 유사하게 마우스의 복강대식세포에서 LPS에 의한 iNOS mRNA 발현이 higenamine 처리로 인해 줄어듦을 확인하였다(Lee et al, 1997). Higenamine은 isoquinoline계 alkaloid로서 강심작용을 나타내며 그 작용은  $\beta$ -수용체의 활성화에 기인함이 알려져 있다(Park et al, 1984, Chang et al, 1992). 그러나 본 연구에서 iNOS발현억제는  $\beta$ -수용체를 통한 작용일 것 같지는 않다. 왜냐하면  $\beta$ -작용을 억제하기 위하여 propranolol을 전처리한 혈관에서도 PE수축과 L-arginine에 의한 이완작용에 higenamine 단독 처리군과 비교할 때 변화가 없었다. 이러한 사실은 higenamine의 작용기전에는  $\beta$ -수용체를 통한 작용 이외에 또 다른 작용이 있음을 암시하는 결과로 해석된다. 최근 Yun과 Kim은(1994) higenamine이 mouse에서 LPS에 의한 endotoxic shock에 사망률을 줄였다는 보고를 하였으나 그 원인은 밝히지 못하였다. 그러나 본 연구결과로 미루어 볼 때 iNOS 억제효과로 생각된다. 또한 NO가 RA의 매개체로서 중요한 역할을 담당하고 있음을 생각할 때 higenamine은 NO 생성을 억제함으로써 관절염의 치료에 사용하는 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다. 더군다나 higenamine과 구조적으로 유사한 benzylisoquinoline계 화합물들이 마우스에서 LPS에 의한 간독성을 억제(Kondo et al, 1993)하고 tetrandrine은 NF $\kappa$ B 활성화를 억제 하였음을(Chen et al, 1997)비교할 때 iNOS발현 억제에 benzylisoquinoline구조와 관련한 연구가 뒷받침되어야 할 것이다. 한편, 폐혈성 쇼크시에는 심근 수축력 저하, 혈관 확장 등 여러장기의 기능장애(multiple organ failure)등이 나타나는데 higenamine은 자유 라디칼을 청소하여 지질산화를 방지한다는 보고(Zhang & Chen, 1985)와 또한 강심작용을 갖고 있는 특성으로 미루어 볼 때 폐혈성 쇼크에도 효과가 있을 것으로 사료된다. 아울러 higenamine은 구조적으로 dobutamine과도 유사하다. 최근 내독소 쇼크시 dobutamine과 NOS억제제의 동시투여로 심혈관계 기능이 호전되었다(Kilbourn et al, 1994)는 보고

도 있으므로 향후 higenamine의 내독소 쇼크시 심혈관계 기능회복 여부에 관한 실험이 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서 사용한 higenamine의 농도가 심장에 대한 약리효과를 나타내는 농도보다 약 10~200까지 높게 사용되었다는 점에서 효율성 여부가 논란의 여지는 있다. Higenamine은 경구투여시 마우스 혈전증 및 내독소 쇼크 모델에서 12.5 mg~200 mg/Kg의 용량에서 42~100%의 생존율을 보이며(Yun-Choi & Kim, 1994) 또한 생체내에서 6, 7위치의 -OH가 -OCH<sub>3</sub> 대사되는 점(Ryu et al, 1995)을 생각할 때 in vivo는 in vitro에서의 환경과는 다를것으로 간주된다.

결론적으로, 본 연구에서 higenamine은 혈관 평활근에서 iNOS발현과 NO생성을 억제함을 관찰하였으며 이러한 작용기전이 higenamine의 관절염 치료에 사용되는 이유일 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

저자들은 iNOS probe를 제공하여준 성균관대학의 홍성렬 교수께 감사드립니다.

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 기초의학 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

### 참 고 문 헌

Chang KC, Chong WS, Lee IJ. Efferent pharmacological characteristics of structurally similar benzylisoquinoline analogs, papaverine, higenamine, and GS 389, on isolated rat aorta and heart. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 327-334, 1994

Chang KC, Lim JK, Park CW. Synthesis of higenamine and its cardiovascular effects in rabbit: evidence for  $\beta$ -adrenoceptor agonist. *Korean J Pharmacol* 22: 96-104, 1986

Chang KC, Park CW, Lim JK. Pharmacological evaluation of GS389, a novel tetrahydroisoquinoline analog, related to higenamine on vascular smooth muscle. *Life Sci* 51: 67-74, 1992

Chen F, Sun S, Kuhn DC, Lu Y, Gaydos LJ, Shi X, Demers LM. Tetrandrine inhibits signal-induced NF-kB activation in rat alveolar macrophages. *Biochem and Biophys Res Comm* 231: 99-102, 1997

Clancy RM, SB Abramson. Nitric oxide-a novel mediator of inflammation [Review]. *Proc Soc Exp Biol Med* 210: 93-101, 1995

Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adju-

vant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 273: 15-24, 1995

Deng WL. Antinflammatory agents from traditional chinese drugs. *Correlates in Pharmacostructures* 809-816, 1990

Evans CH, M Stefanovic-Racic, Lancaster. Nitric oxide and its role in orthopaedic disease [Review]. *Clin Ortho Rel Res* 312: 275-294, 1995

Harris ED, Jr. *Textbook of Rheumatology*. 4th ed. W B Saunders Company, Philadelphia 1942pp, 1993

Ialenti A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 110: 701-706, 1993

Kilbourn RG, Cromeens DM, Chelly FD, Griffith OW. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide formation, acts synergistically with dobutamine to improve cardiovascular performance. *Critical Care Medicine* 22: 1835-1840, 1994

Kondo Y, Takano F, Hojo H. Suppression of lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis and tumor necrosis factor production by bisbenzylisoquinoline alkaloids in bacillus calmette-fuerintreated mice. *Biochem Pharmacol* 46: 1861-1863, 1993

Lee HY, Kang YJ, Chang KC. The mechanism of the anti-inflammatory action of tetrahydroisoquinoline drugs 기초의학 학술대회 초록집 374-376, 1997

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064, 1992

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endotheliumderived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987

Park CW, Chang KC, Lim JK. Effects of higenamine on isolated heart adrenoceptor of rabbit. *Arch Int Pharmacodyn* 267: 279-288, 1984

Ryu JC, Chang KC, Kim DJ, Yun HS. Tctrahydroisoquinoline (THI)계 심부전증의 치료제 개발. 보건의료기술연구개발사업 연구결과보고서, 1995

Sakurai H, Kohaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 96: 2357-2363, 1995

Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum* 37: 1062-1069, 1994

Thiemermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The multiple

- organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 116: 2845–2851, 1995
- Yun HS, Kim MH. Higenamine reduced mortalities in the mouse models of thrombosis and endotoxic shock. *Kor Pharmacol* 38: 191–196, 1994
- Zhang JJ, Chen WW. Protection of synovial fluid by higenamine. *Acta Pharmaceutica Sinica* 20: 423–426, 1985