

황기의 다당체가 큰포식세포로부터 일산화질소 생성유도

전영진¹, 윤상필², 유호진^{1,4}, 장인엽^{3,4}

¹조선대학교 의과대학 약리학교실, ²서남대학교 의과대학 해부학교실,

³조선대학교 의과대학 해부학교실, ⁴단백질소재 연구센터

간추림 : 황기 (*Astragalus membranaceus*)는 국내에서 오래 전부터 광범위하게 사용되는 식물 중의 하나로서 항암 활성과 항암치료과정에서 발생하는 부작용을 완화시키는 작용이 보고되었다. 지금까지의 연구 결과 황기의 여러 성분들, 특히 다당체가 면역증강활성을 나타냄이 알려져 있으나 그 작용기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 황기에서 추출한 다당체가 큰포식세포를 활성화시키는 기전을 밝혀내기 위하여 iNOS를 이용한 큰포식세포 면역형광염색을, iNOS mRNA의 변화를 보기 위한 RT-PCR을 실시하였다.

황기에서 추출한 다당체를 마우스 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에 24시간 처리한 결과, 용량의존적으로 NO 생성을 증가시켰다. iNOS에 면역형광염색을 실시한 결과, 세포질에서 소량 발현되던 iNOS 단백질이 APS를 처리한 후에는 다량 발현됨을 알 수 있었다. 또한 RT-PCR을 실시한 결과 APS를 처리한 RAW264.7세포에서 iNOS mRNA의 생성이 용량의존적으로 증가함을 알 수 있었다.

결론적으로, 황기에서 분리한 다당체의 작용은 iNOS 유전자의 발현을 통하여 일산화질소의 생성을 증가시키며, 이러한 큰포식세포의 활성화가 항암활성과 관련이 있는 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 황기, 큰포식세포, iNOS

서론

천연 식물로부터 나온 다당체는 면역시스템에 많은 영향을 줄 수 있으며, 면역조절물질로 사용하여 다양하게 임상에 적용이 가능하다 (Tzianabos 2000). 예를 들면, 식물, 곰팡이 및 세균의 세포벽으로부터 분리한 β -glucan은 항종양활성과 더불어 병원균의 감염 억제 효과를 나타내는 것으로 보고 되었다 (Kataoka 등 2002, Brown과 Gordon 2003). 또한, 식물로부터 분리한 다당체가 시험관이나 생체에서 면역증강활성을 나타낸다는 보고들이 있었다 (Sonoda 등 1998, Liu 등 1998). 복령에서 추출한 다당체는 큰포식세포활성화를 통하여 항종양활성을 나타내는

것으로 알려져 있다 (Kaminaga 등 1996, Ukiya 등 2002). 복령 및 그 추출물에 대한 항종양 활성기전이 비록 잘 밝혀지지는 않았지만, 면역계 활성을 통해 숙주의 방어 기전을 한층 더 강하게 해줄 것으로 추측되고 있다. 복령균핵 (*Poria cocos sclerotium*)에서 정제된 다당체인 PCSC22는 B 림프구의 항체 생산을 자극하고, 큰포식세포계통인 RAW 264.7세포들로부터 일산화질소의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Rhee 등 1999, Lee와 Jeon 2003).

숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하는 큰포식세포가 활성화되면, 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제한다. 이 과정 중에 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다 (Palmer 등 1988). Lipopolysaccharide와 interferon- γ 에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도하는데, 이 효소가 L-arginine과 분자산소로부터 많

*이 논문은 2004년도 조선대학교 연구보조비 지원으로 연구되었음

교신저자: 장인엽 (조선대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편: iyjang@chosun.ac.kr

은 양의 일산화질소 생성을 촉진시킨다 (Hibbs 등 1987). 생쥐에 NOS억제제를 투여했을 때 이식한 종양의 성장을 촉진시켰으며 (Yim 등 1993, Farias-Eisner 등 1994), iNOS cDNA로 핵산전달감염된 멜라닌종양세포는 성장이 억제되고, 전이가 잘 되지 않는 것으로 알려져 있다 (Xie 등 1995).

황기 (*Astragalus membranaceus*)는 국내에서 오래 전부터 한약재로 사용되는 식물 중의 하나이다. 지금까지의 연구 결과 황기의 여러 성분들, 특히 다당체가 면역증강활성을 나타냄이 알려져 있다 (Shimizu 등 1991, Bedir 등 2000). 또한 황기는 항암 효과가 보고 되었으며 (Cui 등 2003), 항암치료과정에서 발생하는 부작용을 완화시키는 작용도 보고 되었다 (Zee-Cheng 1992). 그러나, 황기의 약리작용을 설명할 수 있는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 황기에서 추출한 다당체 astragalus polysaccharide (APS)가 큰포식세포 기능에 미치는 영향을 알아보았다. 면역형광염색 및 Western immunoblot assay 방법을 이용하여 APS 처리에 의한 일산화질소의 생성, 큰포식세포의 활성화, iNOS의 유전자발현 등을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

한국산 황기를 경동시장 (Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 황기에서 다당체 추출은 Shao 등 (2004)의 방법을 이용하였다. 요약하면, 황기뿌리를 섭씨 95도의 증류수로 세 차례 추출한 상층액을 DEAE-Sephacel 칼럼 크로마토그래피 등 일련의 과정을 통하여 활성산물인 APS를 분리하였다. 최종산물은 97% 이상이 다당체였으며, 단백질과 핵산의 오염은 무시할만한 수준이었다. 당은 galactose가 84%를 차지하였으며, 기타 xylose, glucose, mannose, fructose가 각각 3.2, 9.2, 1.5, 2.1% 포함되어 있었다.

2. 세포배양

RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (Bethesda, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포들은 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum), 2 mM의 L-glutamine, 100 U/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium으로 배양하였다. 세포들은 37°C에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다. 세포배양에 사용된 물질들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)에서 구입하였다.

3. 아질산염 (nitrite) 측정

세포들은 96-well 배양접시를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조절하여 0.1 mL씩 분주한 다음, 24시간 동안 37°C에서 APS로 자극시켰다. 분리된 상층액과 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)을 같은 부피로 섞고 실온에서 10분 동안 배양시켰다. 표준곡선을 만들기 위해 NaNO₂를 사용하고, 아질산염 생산은 550 nm에서 흡광도로 판독해서 측정하였다 (Green 등 1982).

4. 면역형광염색

배양된 세포를 0.01 M 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 세 차례 세척 한 후, 4% paraformaldehyde로 실온에서 10분 동안 고정시켰다. 다시 PBS로 세척한 다음, 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS로 실온에서 20분 동안 반응시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 PBS로 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. Anti-iNOS (Upstate biotechnology, Lake Placid, USA)를 1% BSA가 함유된 PBS용액에 1:200으로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. PBS로 세 차례 세척한 후 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate IgG (Molecular Probe, Eugene, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 대조군으로는 제1항체를 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다. 면역형광염색된 조직표본을 공초점주사현미경 (FV300, Olympus, Japan)를 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로 488 nm을 FITC용으로 사용하였다. Flow view software program (Olympus, Japan)을

사용하여 최종 3차원적 영상으로 재조립하였다.

5. RT-PCR

RNA의 분리는 이전에 기술한 바와 같이(Chomczynski and Mackey 1995) Tri Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 사용하였다. Primer염기 서열은 다음과 같다. iNOS: 5'-CTG CAG CAC TTG GAT CAG GAA CCT G-3', 5'-GGG AGT AGC CTG TGT GCA CCT GGA A-3', β -actin: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. 동량의 RNA를 oligo(dT)15 primer를 사용해 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 cDNA와 각 primer를 이용하였다. 94°C에서 5분간 가열한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1.5분, 72°C에서 1분 순서로 30회 반복하고, 이후에 72°C에서 5분간 추가 단계를 거쳤다. PCR 생성물들은 3% NuSieve 3:1 gels (FMC Bioproducts, Rockland, USA)에서 전기영동시키고 ethidium bromide 염색시켰다. iNOS와 β -actin primer는 각각 311 bp, 349 bp 크기로 증폭되었다.

6. 통계처리

각각의 실험군은 평균±SD로 통계처리하였다. 처리군은 Dunnett's two-tailed *t* test를 사용해 vehicle control과 비교하였다(Dunnett 1955).

결 과

1. APS가 큰포식세포의 일산화질소 생성에 미치는 영향

종양세포와 병원체에 대한 숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하는 일산화질소의 생성에 대한 APS의 영향을 조사하기 위해 본 실험에서는 Griess reagent함유 배양액에서 일산화질소의 안정화된 최종산물인 아질산염의 축적된 양을 측정하였다. APS에 의해 유발된 아질산염의 생성은 쥐의 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에서 용량의존적으로 증가

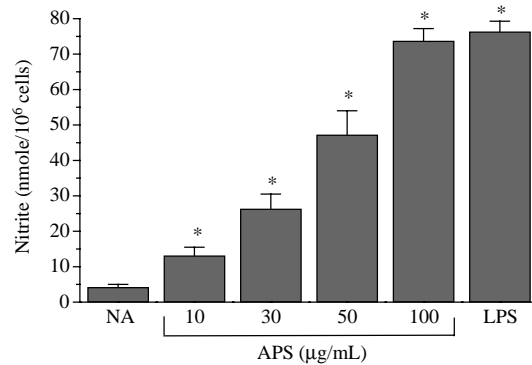


Fig. 1. Effect of APS on the nitrite production by RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of APS or LPS (1 μ g/mL) for 24 hr. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Each value shows the mean \pm S.D. of triplicate determinations. An asterisk denotes response that is significantly different from the control group as determined by Dunnett's two-tailed *t*-test at $p < 0.05$.

하였다(Fig. 1). 큰포식세포를 활성화 시켜 일산화질소의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있는 그람 음성균의 세포벽성분인 LPS(Hibbs 등 1987)를 양성대조군으로 사용한 결과 APS를 100 μ g/mL로 처리했을 때와 유사한 정도로 일산화질소를 생성하였다.

2. APS에 의한 iNOS 단백질의 생성증가

APS에 의한 큰포식세포활성화 기전을 알아보기 위해, iNOS유전자의 발현산물인 iNOS 단백질의 생성을 측정하였다. APS를 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에 24시간 동안 처리한 후 현미경하에서 관찰한 결과 자극을 받은 실험군에서 큰포식세포의 크기가 현저히 증가하였다. 또한 iNOS의 항체를 이용한 면역형광염색 소견을 보면, APS를 처리한 실험군에서 iNOS의 발현이 증가하였다. 자극되지 않은 RAW 264.7 세포에서의 iNOS의 발현은 대부분 세포질에서 미약하게 나타난 반면, APS를 24시간 처리한 후 면역형광염색을 실시한 결과 iNOS의 발현이 증가하여 세포질에서 농도가 매우 높아져 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 APS에

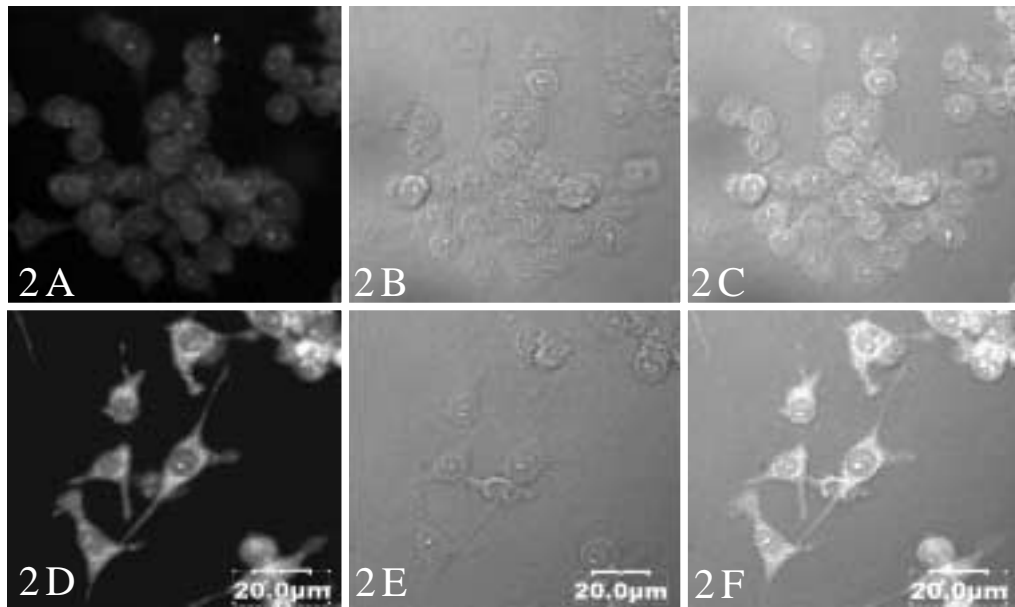


Fig. 2. Immunohistochemical staining of iNOS in RAW 264.7 cells. Cells (5×10^5 cells/mL) were incubated with APS for 24 hr on cover slide in 12 well plates. Immunoreactivity of iNOS was localized along the margin of the cytoplasm of in control (Fig. 1A-C). After incubation with the Astragalus polysaccharide, the expression of iNOS was strongly revealed in the elongated ramified cell processes and the cytoplasm of activated RAW 264.7 cells (Fig. 1D-F). A/D: confocal image, B/E: light microscopic image, C/F: merge of confocal and light microscopic image.

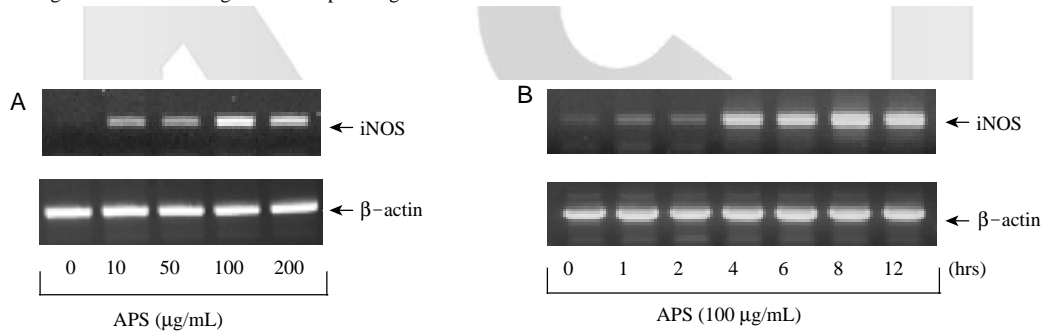


Fig. 3. Activation of iNOS gene expression by Astragalus polysaccharide (APS) in RAW 264.7 cells. Cells (5×10^5 cells/mL) were incubated with APS (10, 50, 100 or 200 $\mu\text{g/mL}$) for 8 hr (A) or incubated with 100 $\mu\text{g/mL}$ APS for the indicated times (hr) (B). Total RNA was then isolated and analyzed for the magnitude of mRNA expression of iNOS using RT-PCR.

의한 일산화질소의 생성증가는 iNOS 단백질의 생성 증가에 기인한 것임을 시사한다.

3. APS에 의한 iNOS mRNA의 생성증가

APS에 의한 iNOS 증가가 iNOS 유전자의 발현에

의한 결과인지 알아보기 위해, iNOS mRNA의 생성에 대한 영향을 실험하였다. APS를 RAW 264.7 세포에 24시간 동안 처리한 후 전체 RNA를 추출하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS mRNA를 측정하였다. RAW 264.7세포에 APS를 처리하면 iNOS mRNA의

양이 용량의존적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3A). RAW 264.7세포에 APS (100 µg/mL)를 처리한 후 시간대별로 iNOS mRNA의 발현 정도를 측정할 결과, iNOS mRNA의 양이 약 1시간 이후부터 약간 증가하다가 4시간 이후에는 유의하게 증가되어 12시간까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 3B). 이러한 결과들로 미루어 볼 때 APS에 의한 일산화질소 생성 증가는 iNOS유전자발현에 기인한 것임을 알 수 있었다.

고 찰

APS가 쥐의 큰포식세포 RAW 264.7세포군에서, iNOS유전자 발현을 통해 일산화질소 생성을 유도하였다. APS 처리 후 면역형광염색결과 iNOS 단백질이 세포질에서 증가함을 확인하여 APS가 큰포식세포를 활성화시키는 것을 증명하였다. 큰포식세포는 숙주방어기전에서 중요한 역할을 한다. 큰포식세포가 활성화되면, 큰포식세포들은 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제하는데 이 과정에서 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다(Palmer 등 1988). LPS와 IFN- γ 에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 iNOS를 발현시키는데, 이 효소는 L-arginine과 분자산소로부터 많은 양의 NO생성을 촉진시킨다(Hibbs 등 1987). 기니픽 L10 간종양세포나 생쥐 L1210 림프종양세포에 있어서, LPS/IFN- γ 를 통해 활성화된 생쥐 일차배양 큰포식세포의 세포용해작용은 NO 생산의 억제물질인 N^G-methyl-L-arginine (NMA)에 의해 차단되고, NO기체나 산성화된 NO₂⁻는 유사하게 작용하며, iNOS 유전자결함(iNOS^{-/-})을 보이는 생쥐의 큰포식세포에서는 세포용해작용이 나타나지 않는다(Hibbs 등 1987, Stuehr와 Nathan 1989, MacMicking 등 1995). 생쥐에 NOS억제제를 투여했을 때 이식한 종양의 성장을 촉진시켰으며(Yim 등 1993, Farias-Eisner 등 1994), iNOS cDNA에 transfection된 멜라닌 종양세포는 성장이 억제되고, 전이가 잘 되지 않는 것으로 알려지고 있다(Xie 등 1995).

APS와 같이 큰포식세포를 활성화시키는 물질로 LPS가 알려져 있다. APS와 LPS는 모두 큰 분자크기를 갖고 있고, 세포 안으로 침투하지 못한다. LPS 분자는 CD14와 결합하고, protein kinase C와 protein kinase A와 같은 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Novotney 등 1991, Muroi와 Suzuki 1993). 일련의 신호전달경로를 통해서 iNOS 유전자의 전사활성화를 유도한다. APS의 막수용체는 아직 알려지지 않았지만, 몇몇 막단백질들이 큰포식세포의 수용기로 작용하는 것으로 추정된다. 예를 들면, CD14, CR3, Toll-like receptors (TLRs) 등이다. CD14는 단핵구와 호중구에서 잘 발현되는 55-kDa의 glycosylphosphatidylinositol-anchored protein으로(Goyert 등 1988) LPS수용기라고 알려져 있으며, LPS와 강하게 결합한다. 보체수용체 CR3 (Mac-1, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$ -integrin라고도 함)는 β -glucans에 대한 백혈구막수용기로 알려져 있는데(Thornton 등 1996), 호중구, 단핵구, 큰포식세포, 자연살해세포(natural killer cell)의 표면에서도 발현되고, 수많은 세포-세포사이 및 세포-기질 사이의 작용에 연관되어있는 것으로 알려져 있다(Hynes 1992). TLRs는 포유류 막투과성단백질군을 구성하고, 신생면역인식에서 중요한 역할을 한다(Kopp과 Medzhitov 1999).

결론적으로 본 실험은 APS가 큰포식세포를 자극하여 iNOS유전자발현유도를 통하여 일산화질소를 생성하게 한다는 것을 보여주었다. APS의 큰포식세포 활성화 작용은 이 APS를 면역증강제로 활용할 가능성을 시사해 준다.

참 고 문 헌

- Bedir E, Pugh N, Calis I, Pasco DS, Khan IA : Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from astragalus species. *Biol Pharm Bull* 23 : 834-837, 2000.
- Brown GD, Gordon S : Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19 : 311-315, 2003.
- Chomczynski P, Mackey K : Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA

- isolation. *Anal Biochem* 225 : 163–164, 1995.
- Cui R, He J, Wang B, Zhang F, Chen G, Yin S, Shen H : Suppressive effect of *Astragalus membranaceus* bunge on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 51 : 75–80, 2003.
- Dunnett M : A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Statistics Assoc* 50 : 1096–1121, 1955.
- Farias-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, Chaudhuri G : Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 9407–9411, 1994.
- Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM : The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239 : 497–500, 1988.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126 : 131–138, 1982.
- Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z : Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235 : 473–476, 1987.
- Hynes RO : Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11–25, 1992.
- Kaminaga T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M : Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 53 : 382–385, 1996.
- Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K : Activation of macrophages by linear (1–3)- β -D-glucans. *J Biol Chem* 277 : 36825–36831, 2002.
- Kopp EB, Medzhitov R : The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11 : 13–18, 1999.
- Lee KY, Jeon YJ : Polysaccharide isolated from *Poria cocos* sclerotium induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 3 : 1353–1362, 2003.
- Liu M, Li J, King F, Lin J, Gao Y : Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelis of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 40 : 187–198, 1998.
- MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS : Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81 : 641–650, 1995.
- Muroi M, Suzuki T : Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF- κ B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal* 5 : 289–298, 1993.
- Novotney M, Chang ZL, Uchiyama H, Suzuki T : Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry* 30 : 5597–5604, 1991.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 : 664–666, 1988.
- Rhee SD, Cho SM, Park JS, Han SB, Jeon YJ, Kim HM, Kim GP : Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos* sclerotium. *Kor J Mycol* 27 : 293–298, 1999.
- Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM : A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun* 320 : 1103–1111, 2004.
- Shimizu N, Tomoda M, Kanari M, Gonda R : An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Astragalus mongholicus*. *Chem Pharm Bull* 39 : 2969–2972, 1991.
- Sonoda Y, Kasahara T, Mukaida N, Shimizu N, Umoda M, Takeda T : Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacology* 38 : 287–294, 1998.
- Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543–1555, 1989.
- Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD : Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 156 : 1235–1246, 1996.
- Tzianabos AO : Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13 : 523–533, 2000.
- Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Hirano M, Oshikubo M, Nobukuni Y, Kimura Y, Tai T, Kondo S, Nishino H :

- Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos*. *J Nat Prod* 65 : 462-465, 2002.
- Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ : Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 181 : 1333-1343, 1995.
- Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB, Jr., Samlowski WE : Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res* 53 : 5507-5511, 1993.
- Zee-Cheng RK : Shi-quan-da-bu-tang (ten significant tonic decoction), SQT. A potent Chinese biological response modifier in cancer immunotherapy, potentiation and detoxification of anticancer drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 14 : 725-736, 1992.

K C I

Abstract

iNOS Induction by Polysaccharide Isolated from *Astragalus membranaceus*

Young-Jin Jeon¹, Sang-Pil Yoon², Ho-Jin You^{1,4}, In-Youb Chang^{3,4}

¹Department of Pharmacology, College of Medicine, Chosun University,

²Department of Anatomy, College of Medicine, Seonam University,

³Department of Anatomy, College of Medicine, ⁴Research center for proteinous Materials,
Chosun University

Astragalus membranaceus is used as a natural herbal medicine in East Asia for preventing carcinogenesis and reducing side effects induced by chemotherapy in cancer patients. Although the mechanism of anti-tumor activity is not known, the polysaccharides may potentiate the host defense mechanism through the activation of immune system. The objective of this study is to investigate the mechanism by which APS activates macrophages.

To analyze macrophage activation and iNOS gene expression, we performed nitrite generation assay, immunohistochemistry, and RT-PCR.

In the present study we show that a polysaccharide isolated from the *Astragalus membranaceus* (Astragalus Polysaccharide, APS) significantly induces nitric oxide (NO). Immunohistochemical staining of inducible NO synthase (iNOS) showed that the increase of NO was due to the induction of iNOS production. To further study the mechanism responsible for the induction of iNOS, we investigated the effect of APS on the iNOS mRNA expression. RT-PCR analysis showed that APS produced significant induction of iNOS gene expression.

In conclusion, we demonstrate that a polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus* stimulates macrophages to generate NO through the activation of iNOS gene expression.

Key words : *Astragalus membranaceus*, Macrophages, iNOS