대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthrop
17(3): 241 ~ 248, 2004

복령다당체에 의한 큰포식세포 활성화

이건영, 전영진, 오재희[1], 장인엽[2]
조선대학교 의과대학 약리학교실, [1]방사선과학교실, [2]해부학교실

간추림 : 복령균핵(sclerotium of *Poria cocos*)은 투여시 진정효과와 이뇨작용, 항경련작용, 항염증작용 등이 있는 것으로 밝혀졌다. 최근의 항종양작용도 있다는 보고로 미루어, 이러한 작용들은 면역계 활성을 통해 숙주의 방어 기전을 강화시켜주는 것으로 추측된다. 복령균핵으로부터 정제된 다당체인 PCSC22가 큰포식세포를 활성화시켜 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. p38 kinase는 inducible NO synthase (iNOS)의 유전자 발현에 중요한 신호전달 단백질 중 하나이다. 본 실험에서는 복령균핵이 큰포식세포를 활성화시키는 기전을 밝혀내기 위하여 iNOS를 이용한 큰포식세포 면역형광염색을, p38의 변화를 보기위한 Western immunoblot assay를 실시하였다. PCSC22를 마우스 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에 24시간 처리한 결과, 용량 의존적으로 NO 생성을 증가 시켰다. iNOS에 면역형광염색을 실시한 결과, 세포질에서 소량 발현되던 iNOS 단백질이 PCSC22를 처리한 후에는 다량 발현됨을 알 수 있었다. 또한 Western immunoblot assay를 실시한 결과 PCS22를 처리한 RAW264.7세포에서 p38 kinase의 인산화가 유도되었으며, p38 kinase의 특이적 억제제인 SB203580을 전처리 하였을 때 PCSC22에 의한 NO 생성이 억제됨을 알 수 있었다. 결론적으로, PCSC22의 큰포식세포에 대한 작용은 p38 kinase 경로의 활성화를 통하여 iNOS 유전자의 발현을 자극하며, 이러한 큰포식세포의 활성화가 항암활성과 관련이 있는 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 복령, 큰포식세포, iNOS, p38 kinase

서 론

소나무 뿌리에서 자라는 복령균핵은 항진정과 이뇨, 항경련, 항궤양효과, 위산분비억제효과가 있는 것으로 알려져 있다(Hikino 1985, Chang과 But, 1987). 또한 콩팥염증의 완화(Hattory 등 1992)와 항구토(Tai 등 1995), 항염증(Schinella 등 2002) 등의 효과도 있는 것으로 보고되었다. 또한 미확인 성분은 항종양 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kaminaga 등 1996, Ukiya 등 2002). 복령균핵에서 분리된 triterpene산을 생쥐피부에 발생한 종양 2기 암세포에 투여하면, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)에 의한 종양성장을 강력하게 억제하고, TPA에 의한 Epstein-Barr 바이러스의 조기항원활성에도 강한 억제효과를 보였다(Kaminaga 등 1996, Ukiya 등 2002). 복령균사에서 추출된 다당체는 실험적으로 피부밑에 이식된 sarcoma 180과 Ehr-lich carcinoma에 대해 강한 항종양활성도를 보였다 (Kanayama 등 1986). 복령 및 그 추출물에 대한 항종양 활성기전이 비록 잘 밝혀지지는 않았지만, 면역계 활성을 통해 숙주의 방어 기전을 한층 더 강하게 해줄 것으로 추측되고 있다. 복령균핵에서 정제된 다당체인 PCSC22는 B림프구의 항체생산을 자극하고, 큰포식세포계통인 RAW 264.7세포들로부터 NO의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Rhee 등 1999, Lee와 Jeon 2003). 복령추출물이 사람 말초혈액 단핵구에 작용하여 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 면역자극효과를 가진 물질들의 분비를 증가시키고, 면역억제물질

*이 논문은 2002년도 조선대학교 연구보조비 지원으로 연구되었음.
교신저자 : 장인엽(조선대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : iyjang@chosun.ac.kr

인 TGF-β의 분비는 억제한다고 알려져 있다(Yu와 Tseng 1996).

숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하는 큰포식세포가 활성화되면, 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제한다. 이 과정 중에 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다(Palmer 등 1988). LPS와 IFN-γ에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현을 유도하는데, 이 효소가 L-arginine과 분자산소로부터 많은 양의 일산화질소생성을 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).

p38 kinase는 iNOS를 포함한 많은 유전자에 존재하는 조절단백질 중 하나로, 주로 면역반응과 염증반응에 관여한다(Lee와 Young 1996). 자극받지 않은 상태에서 p38 kinase는 큰포식세포 세포질에 존재하며, 외부자극에 의해 큰포식세포가 활성화되면 세포질 속 p38 kinase의 인산화가 초래되어 활성화된다. 활성화된 p38 kinase는 iNOS를 포함한 다양한 유전자의 발현을 자극하게 된다(Lee와 Young 1996). 본 실험에서는 PCSC22로 유도된 면역자극의 기전을 밝혀내기 위하여, PCSC22가 큰포식세포기능과 세포 내 신호전달에 미치는 영향을 알아보고자 한다. 생쥐 큰포식세포를 이용하여 PCSC22처치에 의한 유도된 일산화질소의 생성, 큰포식세포의 활성, iNOS의 유전자발현에 관여하는 p38에 대해 면역형광염색 및 Western immunoblot assay 방법을 이용하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

PCSC22는 이미 기술된 방법으로 정제하였다(Rhee 등 1999). 요약하자면, 복령균핵을 1% 탄산나트륨으로 추출한 다음, 에탄올 침전물과 DEAE-셀룰로스와 Sephadex G-50 칼럼 크로마토그래피 등 일련의 과정을 통하여 활성산물인 PCSC22를 정제하였다. PD98059 (2′-amino-3′-methoxyflavone)와 SB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole) 은 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 물질들은 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다.

2. 세포배양

RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (Bethesda, MD)에서 구입하여 사용하였다. 세포들은 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 2 mM의 L-glutamine, 100 U/μL 페니실린과 100 μg/μL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM으로 배양하였다. 세포들은 37°C에서 5% CO_2 존재 하에 배양하였다.

3. 아질산염(nitrite) 측정

세포들은 96-well 배양접시를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조절한 다음, 24시간동안 PCSC22로 자극시켰다. 분리된 상층액과 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylenthylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)을 같은 부피로 섞고 실온에서 10분동안 배양시켰다. 표준곡선을 만들기 위해 $NaNO_2$를 사용하고, 아질산염 생산은 550 nm에서 흡광도로 판독해서 측정하였다(Green 등 1982).

4. 면역형광염색

배양된 세포를 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 수 차례 세척 한 후, 4% paraformaldehyde로 실온에서 10분동안 고정시키고 다시 PBS로 세척한 다음, 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS로 실온에서 20분동안 반응시킨 후, 1% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 PBS로 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. anti-iNOS (Upstate biotechnology, USA)를 1% BSA가 함유된 PBS용액에 1:200으로 희석하여 4°C에서 24

시간 반응시켰다. PBS로 수 차례 세척한 후 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate IgG (Molecuar Probe, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간동안 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 Softwave program (Olympus, Japan)을 사용하여 최종 3차원적 영상으로 재조립하였다.

5. Western immunoblot assay

세포를 용해시킨 후 단백질(20 μg)을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 nitrocellulose 막(Amersham International, Buckinghamshire, UK)으로 electro-transfer하였다. 0.05% Tween-20와 3% bovine serum albumin (BSA)을 포함한 Tris-buffered saline (TBS, pH 7.6)에 실온에서 1시간동안 반응시킨 후, Nitro-cellulose 막들을 phospho p38 항체 또는 p38 항체에 반응시켰다. 면역반응 띠들은 horseradish peroxidase가 붙어있는 항토끼 IgG (Amersham International)를 이용하여 검출하였고, 화학발광시약물(ECL™ Che-miluminescent Western Blotting Detection Reage-nts, Amersham International)로 확인하였다.

6. 통계처리

각각의 실험군은 평균±SD로 통계처리하였다. 의미있는 차이가 존재했을 때, 처치군은 Dunnett's two-tailed *t* test를 사용해 Vehicle control과 비교하였다(Dunnett, 1955).

결 과

1. PCSC22가 큰포식세포의 일산화탄소 생성에 미치는 영향

PCSC22가 일산화탄소 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 본 실험에서는 Griess reagent함유 배양액에서 일산화탄소의 안정화된 최종산물인 아질산염의 축적된 양을 측정하였다. PCSC22에 의해 유발된 아질산염의 생성은 쥐의 큰포식세포류계열인 RAW 264.7세포에서 용량의존적으로 증가하였다(Table 1).

Table 1. Activation of NO production by PCSC22 in RAW 264.7 cells

Treatment	Nitrite (nmole/10^6 cells)
Vehicle (saline)	3.4±0.7
PC (10 μg/mL)	14.6±2.2
PC (30 μg/mL)	24.7±5.4
PC (50 μg/mL)	45.3±5.3
PC (100 μg/mL)	60.2±0.8

Cells were treated with the indicated concentrations of PCSC for 24 hr. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Each value shows the mean±S.D. of triplicate determinations.

2. PCSC22에 의한 iNOS 단백질의 생성증가

PCSC22매개에 의한 큰포식세포활성화 기전을 알아보기 위해, iNOS유전자의 발현산물인 iNOS 단백질의 생성에 대한 영향을 실험하였다. PCSC22를 큰포식세포주인 RAW 264.7세포에 24시간동안 처리한 후 현미경하에서 관찰한 결과 자극을 받은 실험군에서 큰포식세포의 크기가 현저히 증가하였다. 또한 iNOS의 항체를 이용한 면역형광염색 소견을 보면, PCSC22를 처치한 실험 군에서 iNOS의 발현이 세포질에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 자극되지 않은 RAW 264.7세포에서의 iNOS의 발현은 대부분 세포질에서 미약하게 나타난 반면, PCSC22를 24시간 처리한 후 면역형광염색을 실시한 결과 iNOS의 발현이 증가하여 세포질에서의 농도가 매우 높아져 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

3. PCSC22에 의한 p38 kinase의 활성화

p38 kinase가 iNOS를 포함한 많은 유전자의 발현을 조절하는 중요한 신호전달 단백질로 알려져 있으므로(Lee와 Young 1995), Western blot analysis를 이용하여 p38 kinase의 인산화 정도를 측정하였다.

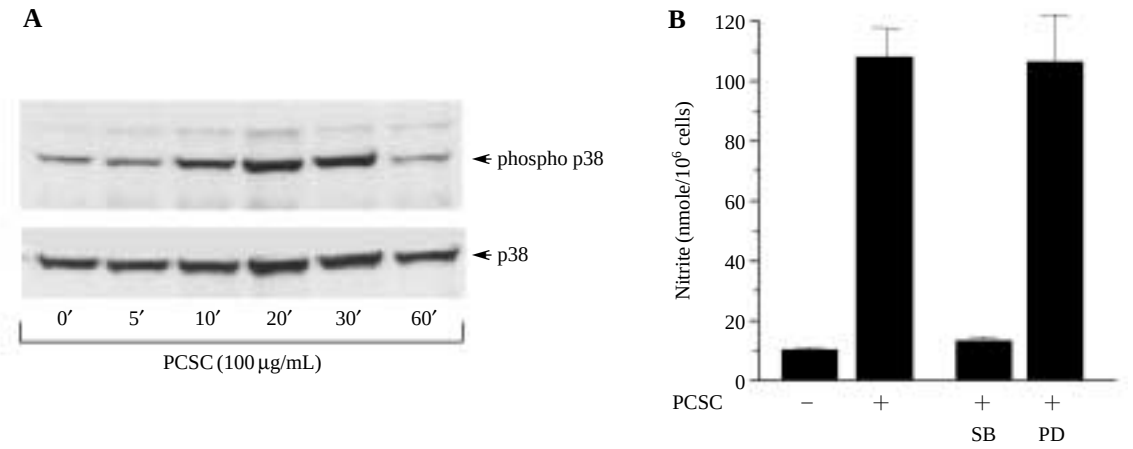


Fig. 2. Activation of p38 by PCSC in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were stimulated with PCSC (100 μg/mL) for the indicated times. Cell extracts were then prepared and subjected to Western immunoblotting using antibodies specific for p38 or phosphorylated form of p38. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with SB203580 (30 μM) or PD98059 (50 μM) for 30 min before incubation with PCSC (100 μg/mL) for 24 hr. Nitrite generation was determined from the culture supernatant.

RAW 264.7세포에 PCSC22를 처리하면, 약 10분 후에 p38 kinase의 인산화가 나타나며, 20분에 최고점을 형성한 후, 30분까지 지속되다가, 60분 후에 바닥상태로 돌아옴을 확인하였다(Fig. 2A). p38 kinase에 대한 Western blot assay를 수행하여, 인산화되지 않은 p38 kinase의 양에는 변화가 없음을 확인하였다.

PCSC22에 의해 유도된 일산화탄소 생성에 p38 kinase 활성화가 연관되어 있는지를 알아보기 위해, p38 kinase 억제제인 SB203580이 PCSC22에 의해 자극된 RAW 264.7세포들의 일산화탄소 생성에 미치는 효과를 조사하였다. SB203580은 bicyclic imidazole 화합물로 p38 kinase의 특이적 저해작용이 알려져 있다(Cuenda 등 1995). SB203580으로 RAW 264.7세포를 전처치한 결과, PCSC22에 의한 일산화탄소 생성을 차단하였다(Fig. 2B). ERK1/2경로 차단제인 PD98059 (Dudley 등 1995)는 PCSC22에 의한 일산화탄소 생성에 대하여 아무런 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 p38 kinase가 PCSC22에 의한 iNOS유전자발현의 활성에 중요한 역할을 담당한다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험에서 PCSC22의 처치는 쥐의 큰포식세포 RAW 264.7세포군에서, p38 kinase의 활성을 통해 일산화탄소 생성과 iNOS전사를 유도한다는 것을 밝혀내었다. 본 실험에서는 면역형광염색결과 iNOS 단백질이 세포질에서 증가함을 확인하여 복령추출 다당체인 PCSC22가 큰포식세포를 활성화시키는 것을 증명하였다. 본 연구에서의 다른 중요한 발견은 PCSC22가 확실히 p38 kinase의 활성화를 유도하였다는 것이다. p38 kinase는 면역반응과 염증반응에 관여하는 세포 내 신호전달 단백질의 하나로, iNOS를 포함한 많은 유전자의 발현에 관여한다(Lee와 Young 1996). p38 kinase는 세포질에 존재 하고 있으며, 외부자극에 의해 큰포식세포가 활성화되면 p38 kinase의 인산화가 초래되어 활성화된다. 활성화된 p38 kinase는 신호전달경로를 통하여 전사촉진제를 자극함으로써 iNOS를 포함한 다양한 유전자의 발현을 자극하게 된다. 본 연구에서 p38 kinase가 PCSC22에 의한 iNOS유전자발현에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 이를 뒷받침하는 몇 개의 실험적 근거들을 보면 다음과 같다. 첫째, PC

SC22는 p38 kinase를 매우 활성화시켰다. Wes-tern blot assay결과 PCSC22가 p38 kinase의 인산화를 유도 하였다(Fig. 2A). 둘째, p38 kinase의 특이적 억제제는 PCSC22에 의한 일산화탄소 생성을 확실하게 억제시켰다(Fig. 2B). p38 kinase의 특이적 억제제인 SB 203580으로 처치한 RAW 264.7세포에서 효과적으로 일산화탄소 생성활성이 억제되었다.

PCSC22와 같이 큰포식세포를 활성화시키는 물질로 LPS가 알려져 있다. PCSC22와 LPS는 모두 큰 분자크기를 갖고 있고, 세포 안으로 침투하지 못한다. LPS분자는 CD14와 결합하고, PKC와 PKA와 같은 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Novotney 등 1991, Muroi와 Suzuki 1993). 일련의 신호전달경로를 통해서 iNOS유전자의 전사활성화를 유도한다. PCSC22의 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, and $\alpha_M\beta_2$-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(Kopp와 Medzhitov 1999).

결론적으로 본 실험은 PCSC22가 큰포식세포를 자극하여 iNOS유전자발현유도를 통하여 일산화질소를 생성하게 한다는 것을 보여주었다. 이런 생물학적인 효과를 설명할 수 있는 가장 가능성 있는 기전은 p38 kinase의 활성을 통한 신호전달이라고 사료된다.

참 고 문 헌

Chang H-M, But PP-H : Pharmacology and applications of Chinese material medica,World Scientific, vol 2, Singapore pp. 875-877, 1987.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF : SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1, FEBS Lett 364 : 229-233, 1995.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR : A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade, Proc Natl Acad Sci USA 92 : 7686-7689, 1995.

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.

Hattory T, Hayashi K, Nagao T, Furuta K, Ito M, Susuki Y : Studies of antinephritic effects of plant components (3). Effects of pachyman, a main component of Poria cocos Wolf on original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms, Jpn J Pharmacol 59 : 89-96, 1992.

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.

Hikino H : Recent research on oriental medicinal plants. In : Wagner H, Hikino H, Farnsworth, NR (Eds.), Economic and Medicinal Plant Reseacrh, vol 1 Academic Press, London pp. 64-65, 1985.

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.

Kanayama H, Togami M, Adachi N, Fukai Y, Okumoto T :

Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of Poria cocos Wolf. III. Antitumor activity against mouse tumors, Yakugaku Zasshi 106 : 307−312, 1986.

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−κB/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages, Int Immunopharmacol 3 : 1353−1362, 2003.

Lee JC, Young PR : Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS−and cytokine signaling mechanisms, J Leukc Biol 59 : 152−157, 1996.

Muroi M, Suzuki T : Role of protein kinase A in LPS−induced activation of NF−kappa 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.

Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich D, Rios JL : Antioxidant activity of anti−inflammatory plant extracts, Life Sci 70 : 1023−1033, 2002.

Tai T, Akita Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Watanabe K : Anti−emetic principles of Poria cocos, Planta Med 61: 527−530, 1995.

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.

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.

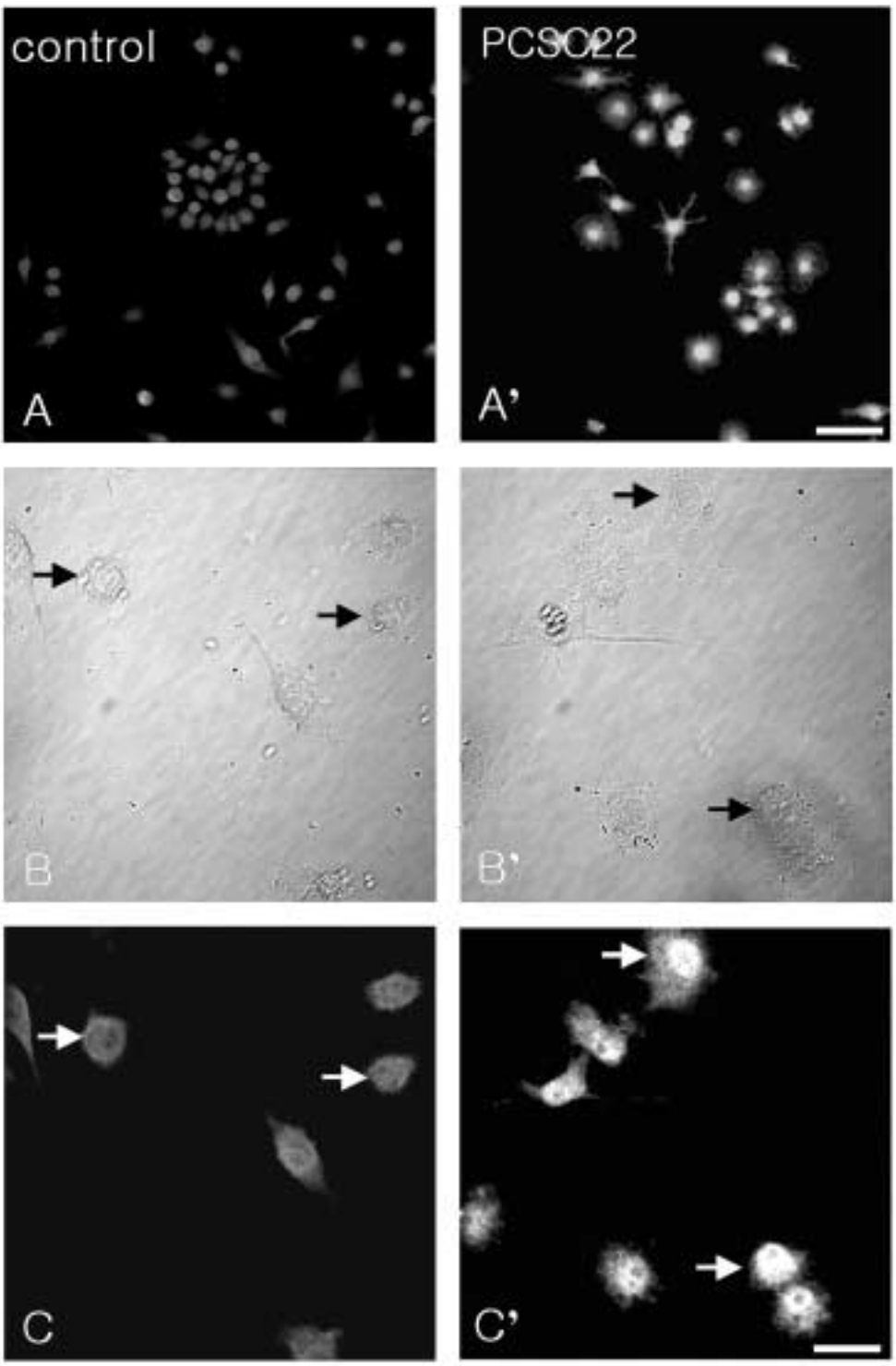
Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ : Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K−1735 murine melanoma cells, J Exp Med 181 : 1333−1343, 1995.

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.

Yu SJ, Tseng J: Fu−Ling, a Chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes, Int J Immunopharmacol 18 : 37−44, 1996.

Legends for Figures

Fig. 1. Immunohistochemical staining of iNOS in RAW 264.7 cells. Cells (5×10^5 cells/ml) were incubated with PCSC22 for 24 hr on cover slide in 6 well plates. Immunohistochemical staining of iNOS showed expression of iNOS gene. Immunoreactivity of iNOS was localized along the margin (arrows) of the cytoplasm of in control (Fig. 1A−C). After incubation with PCSC22, expression of iNOS (arrows) was strongly expressed in the cytoplasm of activated RAW 264.7 cells (Fig. 1A′−C′). Scale bar in A, A′ 60 μm and B, B′, C, C′ 20 μm.


control
PCSO22
A
A'
B
B'
C
C'

Korean J Phys Anthrop
17(3): 241 ~ 248, 2004

Abstract

Activation of Macrophage by PCSC22 Isolated from *Poria cocos* Sclerotium

Kun-Young Lee, Young-Jin Jeon, Jae-Hee Oh[1] , In-Youb Chang[2]

Department of Pharmacology, [1]Department of Radiology,
[2]Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

The sclerotium of *Poria cocos* Wolf, which grows on the roots of pine trees, has long been used as a sedative, diuretic, and anti-inflammatory agent. The accumulating data revealed that certain ingredients of the sclerotium of *Poria cocos* showed anti-tumor activities. Although the mechanism of anti-tumor activity is not known, the polysaccharides may potentiate the host defense mechanism through the activation of immune system. In the present study we show that PCSC22, a polysaccharide isolated from the sclerotium of *Poria cocos* with one percent sodium carbonate, 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 gene expression, we investigated the effect of PCSC22 on the activation of p38 kinase, which is important in the gene expression of inflammatory cytokines including iNOS. Western blot assay showed that PCSC22 produced phosphorylation of p38 kinase. In conclusion, we demonstrate that PCSC stimulates macrophages to express iNOS gene through the activation of p38 kinase.

Key words : Sclerotium of *Poria cocos*, Macrophages, iNOS, p38 kinase

Correspondence to : In-Youb Chang (Deparment of Anatomy, College of Medicine, Chosun University)
E-mail : iyjang@chosun.ac.kr