

數種의 生藥에 對한 抗癌效果의 實驗的 研究 (I)

白鼠의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響

姜允皓 · 金秉雲 · 河潤文* · 朴在庚** · 南相潤** · 崔圭鐵** · 崔龍默**

慶熙大學校 漢醫科大學 · 慶熙大學校 醫科大學* · 慶熙醫療院 癌센터 免疫研究室**

Experimental Studies on Antitumor Activity of Herb Drugs (I)

Effectiveness on Rat Natural Killer Cell Activity

Yun Ho Kang, Byung Woon Kim, Youn Mun Ha*,

Jai Kyung Park**, Sang Yun Nam**, Kyu Chul Choi** and Yong Mook Choi**

School of Oriental Medicine, Kyung Hee University, *School of Medicine, Kyung Hee University and

**Immunology Research Laboratory, Cancer center, Kyung Hee University Medical Center, Seoul 131, Korea

Abstract—Natural Killer cells are considered to play an important role in antitumor immune surveillance mechanism. In this study, 21 putative anticancer drugs selected from reference were assessed by evaluating the effect on rat Natural Killer cell activity (NKCA). All 21 herb drugs were extracted in boiling water, lyophilized, autoclaved, and then used for experiment. Culture supernatant of concanavalin-A (Con-A)-stimulated rat spleen cells as a source of lymphokine was also used as a control of comparison. Rat spleen cells were used as effector and NKCA was measured in 4 hr ⁵¹Cr-release assay against Yac-1 mouse lymphoma cell line. In order to determine the optimal conditions for NKCA augmentation, effector cells were treated with 3 different concentrations of each drug for 24, or 48 hrs before testing of NKCA. In optimal conditions determined from previous results, the effect of herb drugs on NKCA were assessed in 3 to 5 experiments. NKCA was significantly enhanced by treatment with 4 herb drugs (Ponciri Fructus, Houttuyniae Herba, Aurantii Pericarpium, Nepetae Herba). Culture supernatant of Con-A-stimulated spleen cells also augmented the rat NKCA more significantly. The results show that 4 of the herb medicines supposed to display anticancer effect may have activity as a biological response modifier through augmentation of NKCA.

Keywords—Pinelliae Tuber · Coicis Semen · Ginseng Radix · Cratagegi Fructus · Armeniacae Semen · Raphani Semen · Scirpi Tuber · Artemisiae iwaiyomogis Herba · Atractylodes Rhizoma · Amomi Semen · Ponciri Fructus · Aurantii Percarpium · Sanguisorbae Radix · Nepetae Herba · Hoelen · Glycyrrhizae Radix · Lonicerae Flos · Manitis Squama · Zedoariae Rhizoma · Polyporus · Houttuyniae Herba · natural killer cell activity · 4 hr ⁵¹Cr-release assay

현재 한방의료에서 악성종양(이하 종양으로 약함)의 치료에 이용되고 있는 약물은 수십종에 달하고 있으나 이들 약물의 작용기전은 대부분 밝혀지지 않고 있으며 특히 종양에 관여하는 세포성 면역에 미치는 영향에 대해서 밝혀진 사실은 많지 않다.

종양에 대한 세포성 면역기전에 관여하는 작동세포(effector cells)들로는 감각된 T 림프구, 즉 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)¹⁻³⁾, 항체의존성 세포파괴능(antibody dependent cellular cytotoxicity)을 지닌 K(killer) 림프구⁴⁻⁶⁾, 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte)⁷⁻⁸⁾, 대식세포(macrophage)⁹⁻¹⁰⁾ 및 사전 감각없이도 종양세포를 파괴할 수 있는 자연 살해세포(natural killer cell; NK 세포)^{11,12)} 등이 있다. 특히 NK 세포는 비교적 최근에 그 존재가 인정되었으나^{11,12,13)} 지난 10여년 동안 많은 연구가 집중되어, NK 세포의 특성 및 역할 등에 관하여 많은 사실이 알려지게 되었다.

즉 이들 NK 세포는 비 부착성으로¹⁴⁾ 표면 면역글로부린이나 전형적인 T 세포 항원도 갖고 있지 않아 "null" 세포로 생각되었으나^{14,15)} 일부는 면양 적혈구에 대한 수용체를 갖고 있으며¹⁶⁾ 몇몇 T 세포 항원¹⁷⁻¹⁹⁾ 및 대식세포와 다형핵 백혈구 항원과도 반응하기 때문에^{20,21)} NK 세포는 이질적인 세포군(heterogeneous population)이 아닌가 생각되고 있다.^{22,23)} 다만 형태학적으로는 말초혈액 림프구의 약 5%를 점유하는 large granular lymphocyte에 의해 NK 활성이 매개된다는 사실이 증명된 바 있다.^{24,25)}

또한 NK 세포는 사전 감각이 필요하지 않다는 점과 항체의 도움을 요구하지 않는다는 점에서 종양발생을 초기에 감시하는 역할을 수행하며 NK 세포의 활성도와 종양 발생을 간에 유의한 상관관계가 있다는 보고와²⁶⁻²⁸⁾ 종양을 유발시킨 동물에 NK 세포에 대한 항체를 투여하면 생체내에서의 종양세포의 생존이 연장된다는 사실로²⁹⁾ NK 세포의 생체내 작용이 입증되고 있다. 이와 같은 NK 세포의 활성을 증가시켜주는 것으로는 바이러스³⁰⁻³²⁾, 리보핵산^{32,33)}, 세균 및 세균유래 내독소³⁴⁻³⁶⁾, 종양세포³⁷⁻³⁸⁾ 등이 보고되어 있으며 인터페론^{36,39,40)}, 인터로킨-2^{41,42)}

등의 생체내 인자들이 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 현재 한방의료에서 종양 환자에게 투여되고 있는 21종의 생약을 문헌 고찰에 의하여⁴³⁻⁴⁵⁾ 선정하여 이들이 면역세포 특히 종양면역에 관여하는 NK 세포의 활성에 미치는 영향을 조사하여 봄으로서 종양치료를 위한 이들 약제의 임상응용 가능성을 검토하였기에 보고하는 바이다.

실 험 방 법

1. 실험 동물

경희대학교 의과대학 미생물학 교실에서 계대 사육되고 있는 8~10주령의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

2. 생약 및 시료의 조제

선정된 생약은 Table I과 같다. 시중에서 구입하여 엄선한 각 생약 40g을 600ml의 증류수에 넣고 증류 농축기로 3시간 가열 추출한 용액을 3점으로된 거즈에 통과 시켰다. 그 여액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 분리하였고 분리된 상청액을 -60° 에서 24시간 냉동시킨후 냉동 건조기[Virtus, Freeze mobile 24, USA]에서 48시간 건조시켜 얻은 분말을 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용할 때에는 일정량을 고압증기멸균하여 사용하였다

3. 림프구 배양 상청액(Conditioned media)

대조실험을 위해 사용된 흰쥐 림프구 배양 상청액은 Gills⁴⁶⁾의 방법에 따라 생산하였다. 즉 하기과정 5에서와 같이 흰쥐의 비장세포 부유액을 준비하되 5% FCS가 첨가된 RPMI 1640[Gibco, Grand Island, NY]조적 배양액에 5×10^6 cells/ml 농도로 조정된 후 Con-A[Gibco]를 $5 \mu\text{g/ml}$ 농도가 되게 가하였다. 이를 직경 100mm의 플라스틱 페트리 접시[Costar 3100, Mass, CA]에 부어넣고 37° , 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 그 상청액을 취하였다.

4. 표적세포(Target cell)

생쥐 유래의 Yac-1 림프종 세포주⁴⁷⁾를 표적세포로 사용 하였으며 10%의 FCS가 첨가된 RPMI 1640 조적배양액으로 계대 배양하여 사용하였다.

5. 작동세포(Effector cell)의 준비 및 시료의 처리

회주의 복부를 알코올로 적신후 절개하여 비장을 적출하였다. 적출된 비장을 항생제 [페니실린 10,000 μ /ml, 스트렙토 마이신 10,000 μ g/ml, 편지존 25 μ g/ml; Gibco]를 4%되게 가한 Hank's balanced salt solution [HBSS, Gibco]으로 2회 세척한 후, HBSS를 5 ml 가한 직경 60 mm 페트리 접시 [Costar 3,060]에 옮겼다. 옮긴 비장을 잘게 썰 후 유리막대를 이용하여 비장 세포를 유

리시켰다. 이렇게하여 얻어진 비장 세포를 nylon mesh에 통과시켜 세포 debris를 제거하고 15 ml 원심용 시험관 [Falcon 2095, oxnard, CA]에 옮겨 냉동 원심분리기 [Beckman TJ-6R, Palo Alto, CA]로 1,200 rpm에 10분간 원심분리 하였다. 세포를 2회 세척한 후 10% FCS가 첨가된 RPMI 1640조각 배양액에 항생제와 L-glutamine [Gibco]을 각각 1%가 되게 가한 완전 배양액 (complete media)에 2.0×10^6 cells/ml 농도로 부유시켰다. 이를 다시 새로운 플라스틱 페트리 접시에 옮겨

Table I. Drugs concentrations for rat NK cell ativation and effect of drugs on rat NKCA¹⁾

No	Name	concentration (μ g/ml)	% Specific lysis ²⁾
	Control	0	34.4 \pm 2.3 ³⁾ 9.7 \pm 6.6*
1.	Pinelliae Tuber(半夏)	0	27.6 \pm 3.8
2.	Coicis Semen(薏苡仁)	1	31.0 \pm 0.9
3.	Ginseng Radix(人蔘)	10	12.5 \pm 7.8*
4.	Crataegi Fructus(唐山楂)	10	32.2 \pm 4.4
5.	Armeniaca Semen(杏仁)	100	34.0 \pm 4.9
6.	Raphani Semen(萊菔子)	10	36.5 \pm 7.9
7.	Scirpi Tuber(三稜)	10	33.7 \pm 8.5
8.	Artemisiae iwayomogis Herba(韓國茵陳)	100	32.7 \pm 8.3
9.	Atractylode Rhizoma(白朮)	0.1	32.3 \pm 9.4
10.	Amomi Semen(貢砂仁)	100	10.6 \pm 4.6*
11.	Ponciri Fructus(枳實)	10	39.7 \pm 2.8 ⁶⁾
12.	Aurantii Pericarpium(青皮)	1	40.6 \pm 3.3 ⁵⁾
13.	Sanguisorbae Radix(地榆)	10	32.9 \pm 9.9
14.	Nepetae Herba(荳蔻)	10	37.8 \pm 2.9 ⁴⁾
15.	Hoelen(白茯苓)	1	32.3 \pm 0.4
16.	Glycyrrhizae Radix(甘草)	1	37.9 \pm 3.5
17.	Lonicerae Flos(金銀花)	1	15.1 \pm 10.6*
18.	Manitis Squama(穿山甲)	10	34.4 \pm 3.5
19.	Zedoariae Rhizoma(蓬朮)	10	39.3 \pm 4.9
20.	Polyporus(猪苓)	1	31.2 \pm 2.7
21.	Houttuyniae Herba(魚腥草)	1	41.9 \pm 4.0 ⁶⁾
22.	Conditioned media ^{a)}	50**	40.2 \pm 2.3 ⁷⁾

1) Effector cells were treated with drugs for 24hr or 48hr*

2) Effector to target cell ratio, 40 : 1.

3) Data are means of 3 to 5 experiments of triplicate tests.

4) Significantly higher than the mean of the control ($0.025 < p < 0.05$)

5) Significantly different from that of the control ($0.01 < p < 0.025$)

6) Significantly different from that of the control ($0.005 < p < 0.01$)

7) Significantly different from that of the control ($p < 0.005$)

** % in volume

a) The Culture supernatant of concanavalin-A stimulated rat spleen cells.

고 37°, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 방치하여 부착성 세포를 부착시킨 후 비 부착성 세포는 재부유시켜 새로운 원심용 시험관에 옮겨 완전 배양액으로 세포 농도를 1.0×10⁶ cells/ml 농도로 조정하였다.

시료의 처리를 위해 상기 비장 세포 부유액을 6 ml 배양용 시험관[Costar 2022]에 각각 2 ml씩 분주하였다. 여기에 예비실험에 의해 결정된 3가지 농도의 시료들을 가하고 1농도당 2개씩의 시험관을 준비하여 하나는 24시간후 나머지 하나는 48시간후 1회 원심 세척하여 다시 완전 배양액으로 세포 농도를 1.0×10⁶ cells/ml로 조정하였다. 적정 처리조건이 결정된 후에는 시료당 1농도만을 같은 방법으로 반복실험 하였다.

6. 표적세포의 방사능 표지(labeling) 및 세포 파괴능 검사

표적세포의 방사능 표지 및 세포 파괴능 검사는 Tondal⁴⁸⁾ 및 Burton⁴⁹⁾ 등의 방법을 다소 수정한 夏⁵⁰⁾ 등의 방법을 이용하였다. 즉 6×10⁶ cells/ml의 농도로 조정된 Yac-1 세포 부유액 0.5 ml에 200 μci의 Na₂⁵¹CrO₄[에너지 연구소, 서울]를 가하여 37°, 5% CO₂ 배양기내에 90분간 방치(매 15분 마다 진탕)하여 표지 시켰고 표지가 끝난 세포는 5% FCS가 첨가된 RPMI 1640 조적 배양액으로 5회 원심세척하여 완전 배양액으로 세포농도를 1.0×10⁶ cells/ml로 조정하였다.

세포 파괴능 검사를 위해서 표적세포 부유액을 V자형 microplate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 well당 10 μl씩 분주하고 상기와 같이 준비된 작동세포 부유액을 well당 200 μl씩 가하되 3배수(triplicate)로 실험 하였다.

Spontaneous release(SR)의 측정을 위해서는 작동세포 부유액 대신 동량의 완전 배양액을, maximal release(MR)의 측정을 위해서는 동량의 1% Triton X-100 용액을 가하였다. 그후 microplate를 700 rpm에서 5분간 원침하고 37°, 5% CO₂ 배양기내에서 4시간 배양한 후 각 well의 상청액 100 μl를 5 ml 플라스틱 시험관[green tube, 녹십자, 서울]에 취하여 감마 방사능 측정기[Gamma 5500, Beekman]를 이용 방사능을 측정 하였다.

방사활성 측정치로 부터 % specific lysis를 아래식에 따라 계산하였다.

$$\% \text{specific lysis} = \frac{\text{CPM of Test} - \text{CPM of SR}}{\text{CPM of MR} - \text{CPM of SR}} \times 100$$

7. 통계학적 분석

약제의 처리효과 분석은 Student's t-test 방법에 의하였으며 P 값이 0.05이하일때 유의성이 있는 것으로 간주 하였다.

실 험 결 과

1. 시료의 적정 처리조건

흰쥐의 비장 림프구에 각 시료를 3종류의 농도로 가하여 24시간 및 48시간 작용시킨 후 NKCA를 측정한 결과는 Figure-1과 같다.

1) 반하 : 0.1, 1 및 10 μg/ml의 농도로 처리하였던 바 모두 NKCA가 저하되었으며, 그중 1.0 μg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우의 NKCA가 가장 높았다.

2) 의이인 : 0.1, 1 및 10 μg/ml의 농도로 처리한 결과 모두 NKCA가 저하되었으며 그중 10 μg/ml 농도로 24시간 처리한 경우에 가장 높은 NKCA를 보였다.

3) 인삼 : 1, 10 및 100 μg/ml의 농도로 처리하였던 바 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으나 10 μg/ml의 농도로 48시간 처리한 경우에 대조군보다 다소 높은 NKCA를 나타내었다.

4) 당산사 : 1, 10 및 100 μg/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으며 100 μg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에는 대조군과 비슷한 NKCA를 보였다.

5) 행인 : 1, 10 및 100 μg/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으나 10 μg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 대조군보다 높은 NKCA를 나타내었다.

6) 라복자 : 100 및 500 μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 대부분 NKCA가 저하되었으나 10 μg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 대조군보다 높은 NKCA를 나타내었다.

7) 삼능 : 10, 100 및 500 μg/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 다소 저하되

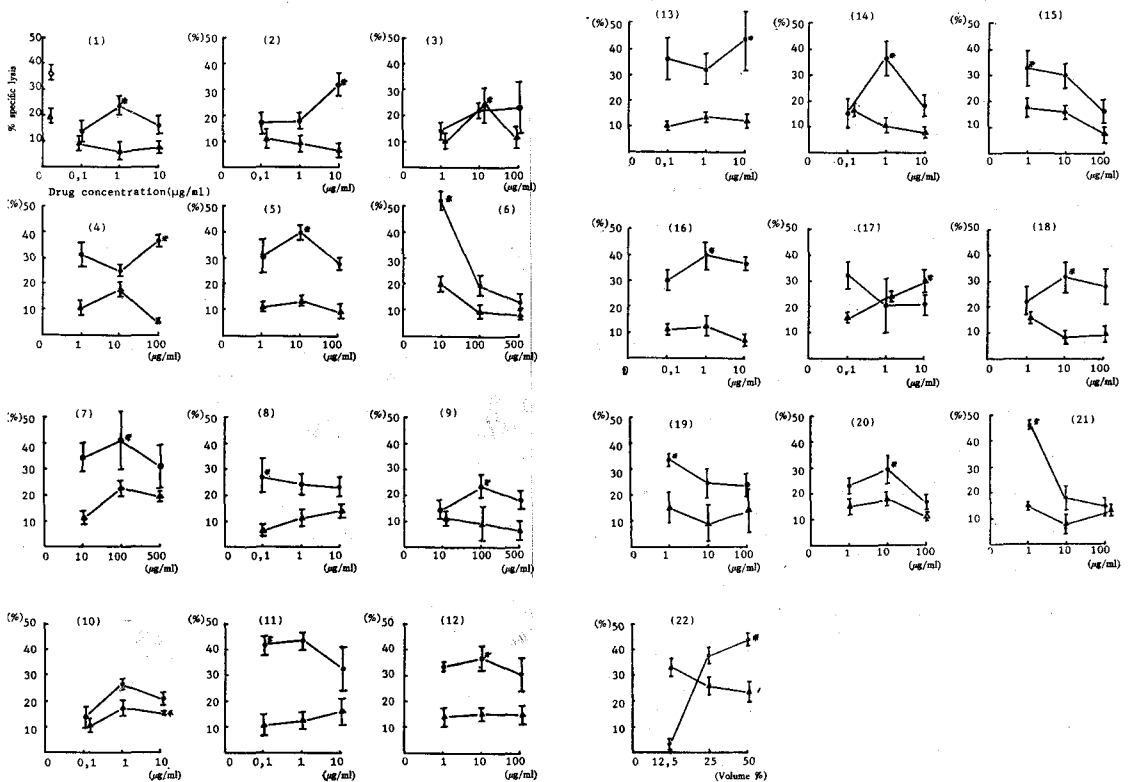


Fig. 1. Effect of drug extracts on NKCA. Rat spleen cells were incubated at 3 different concentrations of drug extracts for 24 hr(●) or 48 hr(▲). Cytotoxicity of the drug treated spleen cells were tested in 4hr-⁵¹Cr release assay using ⁵¹Cr-labeled Yac-1 target cells at E/T, 40 : 1. Optimal concentration(*) of drug and NKCA of normal rat spleen cells(○, △) were represented and this normal NKCA (control) were applied to all data with drugs tested. The vertical bars represent the S.E. of the mean values of triplicate determinations.

있으며 100 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에는 약간 증가된 NKCA를 나타내었다.

8) 인진 : 0.1, 1 및 10 µg/ml의 농도로 처리한 결과 NKCA는 모두 저하되었으며 그중 0.1 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 가장 높은 NKCA를 보였다.

9) 백출 : 10, 100 및 500 µg/ml의 농도로 처리한 경우 모두 NKCA가 저하되었으며 100 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에 가장 높은 NKCA를 나타내었다.

10) 공사인 : 0.1, 1 및 10 µg/ml의 농도로 처리한 결과 모두 NKCA가 저하되었으며 10 µg/ml의 농도로 48시간 처리한 경우에 가장 높은 NKCA를 나타내었다.

11) 지실 : 0.1 및 1 µg/ml의 농도로 24시간

처리한 경우에 NKCA가 비슷한 정도로 증가되었으며 10 µg/ml의 농도로 24시간 처리하거나 0.1~10 µg/ml의 농도로 48시간 처리한 경우에는 NKCA가 저하되었다.

12) 청피 : 1, 10 및 100 µg/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 다소 저하되었으며 10 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에는 약간 증가되었다.

13) 지유 : 0.1 및 10 µg/ml의 농도로 24시간 처리하였을때 NKCA가 증가되었으며 10 µg/ml의 농도로 처리한 경우 가장 높은 NKCA를 나타내었다. 1 µg/ml의 농도로 처리하거나 0.1~10 µg/ml의 농도범위로 48시간 처리한 결과 모두 대조군보다 낮은 NKCA를 나타내었다.

14) 형개 : 1 µg/ml의 농도로 24시간 처리하였

을때 NKCA가 다소 증진되었으며 0.1 및 10 μ g/ml의 농도로 24시간 처리하거나 0.1, 1 및 10 μ g/ml의 농도로 48시간 처리한 경우에는 NKCA가 저하되었다.

15) 백복령 : 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으며 그중 1 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 NKCA가 가장 높았다.

16) 감초 : 1 및 10 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 NKCA가 다소 증진되었으며 0.1 μ g/ml의 농도로 24시간 처리하거나 0.1~10 μ g/ml의 농도범위로 48시간 처리한 경우 NKCA는 저하되었다.

17) 금은화 : 0.1, 1 및 10 μ g/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으나 10 μ g/ml의 농도로 48시간 처리한 경우에는 NKCA가 증진되었다.

18) 천산갑 : 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도범위에서 모든 경우 NKCA가 저하되었으며 10 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에 NKCA가 그중 높았다.

19) 봉출 : 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도범위로 처리한 결과 NKCA가 모두 저하됨을 보였으며 그중 1 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 NKCA가 가장 높았다.

20) 저령 : 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도범위에서 NKCA는 모두 저하되었으며 10 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우 NKCA가 가장 높았다.

21) 어성초 : 1, 10 및 100 μ g/ml의 농도로 처리한 결과 대부분의 경우 NKCA가 저하되었으나 1 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 경우에는 NKCA가 증가됨을 보였다.

22) Con-A 자극 림프구 배양 상청액 : 12.5%, 25% 및 50%의 농도로 가하여 24시간 배양한 결과 대부분의 경우 NKCA가 증가되었으며 50%의 농도로 가하였을때 NKCA가 가장 높았다.

상기 결과에 따라 각 약물처리의 적정농도는 Table 1과 같다. 적정농도는 0.1~100 μ g/ml로 다양하였으며 3종의 생약(인삼, 공사인, 금은화)의 경우에는 48시간으로, 나머지 생약은 24시간으로 적정 처리시간을 결정하였다.

2. 흰쥐 비장세포에 대한 시료 처리효과

상기와 같이 결정된 적정조건에 따라 시료 처리된 비장 세포의 NKCA 측정결과는 Table 2에 요약 하였다. 그중 통계학적으로 유의한 증가효과를 보인 약제는 4종의 생약으로서 지실, 청피, 형개, 어성초 등이었으며 특히 지실($t=3.76$, $0.05 < p < 0.01$), 청피($t=3.55$, $0.01 < p < 0.025$), 어성초($t=4.08$, $0.005 < p < 0.01$)는 통계학적으로 매우 유의하게 증가된 NKCA를 보였다.

또한 기대한 바와 같이 Con-A 자극 림프구 배양 상청액에 의해서도 NKCA가 매우 유의하게 증가 되었다($t=4.74$, $p < 0.005$).

고 찰

종양면역에 주로 관여하는 NK세포의 특성 및 기능에 대해서는 많은 지견들이 발표되고 있다. 특히 NKCA와 종양발생간에는 유의한 상관관계가 있으며²⁶⁻²⁸ 종양환자에서의 NKCA는 정상인에 비하여 유의하게 저하되어 있다는 사실이 보고된 바 있다.⁵¹⁻⁵³ 따라서 항 종양효과가 있을 것으로 기대되는 생약들이 NKCA에 미치는 영향을 알아보는 것은 이들 생약의 항 종양기전을 밝히기 위해서도 의미있는 일이라 생각된다.

본 연구에 사용된 생약은 모두 한방에서 항 종양효과가 있는 것으로 알려져 있는⁴³⁻⁴⁵ 생약들이며 이중 봉출⁵⁴, 인삼^{55,56}, 백출⁵⁷ 등의 항 종양효과는 동물모델을 이용한 실험에 의해서도 관찰된 바 있고 비교실험을 위해 사용된 림포카인의 NKCA증진효과도 이미 보고된 바 있다.^{41,42}

실험결과 Yac-1 표적세포에 대한 흰쥐 비장 세포의 NKAC는 배양 24시간후 34.4 \pm 2.3% (mean \pm S.D)(작동세포 : 표적세포비, 40 : 1)였으며, 배양 48시간후에는 9.7 \pm 6.6%로 크게 저하되었다.

Bartlett 등은⁵⁸ 생쥐를 이용한 실험에서 Yac-1 세포를 표적세포로 이용할 경우 48시간 배양후의 NKCA가 24시간 배양한 비장 세포의 NKCA에 비하여 저하됨을 보고한 바 있으며 본 실험에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 이와 같은 NKCA 저하 현상의 이유로서 림프종 표적 세포를 주로 살해하는 NK 세포아군(Subpopula-

tion)이 48시간 이내에 그 활성을 잃기 때문에 설명하였다.⁵⁸⁾ 따라서 이와 같은 배양시간에 따른 NKCA의 변화는 표적세포의 종류에 따라 그 양상이 상이함을 밝힌 바 있다.

본 연구결과 실험에 사용된 대부분의 생약에서 NKCA 증진효과는 보여주지 못하였을 뿐만 아니라 오히려 감소시키는 결과를 얻을 수 있었는데 이는 생약에 의한 특이적인 NKCA의 억제 효과라기 보다는 생약의 직접적인 세포독성 때문이 아닌가 사료된다. 그러나 21종의 생약중 4종의 생약에 의해서는 흰쥐 NKCA가 유의하게 증진됨을 보였다. 즉 청피($0.01 < p < 0.025$), 형개($0.025 < p < 0.05$)는 유의한 NKCA 증진효과가 인정되었으며 지실 및 어성초($0.05 < p < 0.01$)에 의해서도 매우 유의한 NKCA 증가를 볼 수 있었다.

본 연구의 목적은 종양치료에 사용되어온 수종의 약제들이 어떠한 기전을 통해 항 종양효과를 나타내는지 알아보기 위한 방법의 일환으로 NKCA 증진효과 여부를 판별하고자 하는 것이었으며 본 실험으로서 NKCA 증진기전까지는 밝힐 수 없었다. 인터페론의 경우 현재까지 알려진 바에 의하면 NKCA의 증진은 표적세포와의 결합(binding)을 촉진시키거나 결합된 표적세포의 살해가 가능한 NK 세포로의 활성화, NK 세포의 표적세포 살해능력의 가속화(acceleration), 제 2, 제 3의 표적세포를 살해할 수 있도록 "recycling" 능력을 증진시키는것 등으로 설명되고 있는 바⁵⁹⁻⁶⁰⁾ 그 기전은 유사할 것으로 생각된다.

NK 세포는 종양세포 파괴 이외에도 미생물 및 바이러스 감염세포의 파괴^{14, 61, 62)}, 골수이식에도 관여함이 보고되어 있어^{14, 63)}, NKCA 증진효과를 지닌 약제는 다양한 생물학적 활성을 나타낼 수 있을 것으로 생각되는 바, 본 연구에서 선정된 생약들에 대한 생체내 효과를 확인하고 그 기전을 밝히는 연구가 계속되어 이들의 임상응용이 더욱 확대 되기를 기대하는 바이다.

결 론

자연 살해세포 즉 natural kill cell(NK세포)

은 사전 감각없이도 종양세포를 파괴할 수 있는 림프구의 일종으로서 종양발생에 대한 면역감시기전에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 지금까지 종양치료에 이용되어온 21종의 생약을 문헌고찰에 의해 선정하고 이들이 NK 세포활성(NKCA)에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보고자 하였다. 각 생약은 증류수에서 가열 추출한 후 그 여액을 냉동건조하여 분말상태로 사용하였다. 또한 비교실험을 위해 NKCA를 증진시키는 림포카인(lymphokine)으로서 Con-A 자극 흰쥐 비장세포 배양 상청액을 사용하였다.

NKCA 측정을 위해서는 4시간 크롬 방출법을 이용하였으며 작동세포로는 흰쥐 비장 림프구를, 표적세포로는 생쥐 림프종 유래 Yac-1 세포주를 사용하였다.

적정 처리조건을 알아보고자 생약마다 3가지 농도로 24 및 48시간동안 처리한 결과 적정농도는 $0.1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 로 다양하였으며 적정 처리시간은 21종의 생약중 19종의 생약은 24시간에 더 높은 효과를 나타내었다.

적정 처리조건에 따라 3~5회 반복실험하여 그 평균치로서 시료처리를 하지 않은 대조군과 비교한 바 지실($0.005 < p < 0.01$) 및 어성초($0.005 < p < 0.01$)는 통계학적으로 매우 유의한 NKCA 증진효과를 보였으며, 청피($0.01 < p < 0.025$), 형개($0.025 < p < 0.05$) 등도 유의한 NKCA 증진효과를 나타내었다.

Con-A 자극 흰쥐 림프구 배양 상청액에 의해서도 NKCA는 매우 유의하게 증가되었으며($p < 0.005$) 시료처리의 경우 보다도 높았다.

본 연구는 항 종양효과가 있을 것으로 추측된 여러종류의 생약중에서 NKCA 증진효과를 지닌 생약을 선별하는데 그 목적이 있었으며 선별된 이들 약제의 NKCA 증진기전, 생체내에서의 효능여부 등을 밝히는 실험이 계속되어야 할 것으로 생각되는 바이다.

감사의 말씀—저자들은 본 연구를 수행하는 동안 세포배양을 위해 수고해 준 경희의료원 암센터 면역연구실의 윤선휘, 최영주 양에게 감사하는 바이다.

〈1987년 1월 17일 접수; 4월 11일 수리〉

문 헌

1. Gillis, S, Baker, P.E. Ruscetti, E.W. and Smith, K.A. and Smith, K.A.: *J. Exp. Med.* **148**, 1093 (1978).
2. Yron, J. Wood, J.A. Spiess, P.J. and Rosenberg, S.A.: *J. Immunol.* **125**, 1093 (1980).
3. Ebrlein, T.J, Rosenstein, M. and Rosenberg, S.A.: *J. Exp. Med.* **156**, 385 (1982).
4. Moller, E.: *J. Exp. Med.* **112**, 11 (1965).
5. Wisloff, F. Froland, S.S. and Michaelsen, T.J.: *Int. Arch. Allergy. Appli. Immunol.* **47**, 139 (1974).
6. Greenberg, A.H., Shen, L. and Medley, G.: *Immunology.* **29**, 719 (1975).
7. Gale, R.P. and Zigelboim, J.: *J. Immunol.* **114**, 1047 (1975).
8. Clark, R.A. and Klebanoff, S.J.: *J. Immunol.* **119**, 1413 (1977).
9. Kovithavongs, T. Rice, G. Thong, K.L. and Dossetor, J.B.: *Cell, Immunol.* **18**, 167 (1975).
10. Walker, W.S. and Demus, A.: *J. Immunol.* **114**, 765 (1975).
11. Rosenberg, E.B. Herberman, R.B. Levine, P.H. Halterman, R.H. McCoy, J.L. and Wunderlich, J.R.: *Int. J. Cancer.* **8**, 648 (1972).
12. Herberman, R.B., Nunn, M.E. Lavrin, D.H. and Asofsky, R.: *J. Natl. Cancer. Inst.* **51**, 1509 (1973).
13. Oldham, R.K., Siwarski, D., McCoy, J., L. Plata, E.J. and Herberman, R.B.: *Natl. Cancer. Inst. Mongr.* **37**, 49 (1973).
14. Herberman, R.B. and Holden, H.T.: *Advance In Cancer Res*, Vol. 27. Academic Press. NY. p. 305 (1978).
15. Herberman, R.B., Djiu, J.Y., Kay, H.D. Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.D., Holden, H.T. Fagnani, R., Santoni, A. and Puccetti, P.: *Immunol. Rev.* **44**, 43 (1979).
16. West, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: *J. Immunol.* **118**, 355 (1977).
17. Pollack, S.B., Tam, M.R., Nowinski, R.C. and Emmons, S.L.: *J. Immunol.* **123**, 1818 (1979).
18. Kaplan, J. and Callewaert, D.M.: *J. Natl. Cancer. Inst.* **60**, 961 (1978).
19. Fast, L.D., Hansen, J.A. and Newman, W.: *J. Immunol.* **127**, 448 (1981).
20. Kay, H.D. and Horwitz, D.A.: *J. Clin. Invest.* **66**, 847 (1980).
21. Zarling, J.M., Clouse, K.A., Biddison, W.E. and Kung, P.C.: *J. Immunol.* **127**, 2575 (1981).
22. Minato, N., Reid, L. and Bloom, B.: *J. Exp. Med.* **154**, 750 (1981).
23. Fitzgerald, P.A., Evans, R., Kirkpatrick, D. and Lopez, C.: *J. Immunol.* **130**, 1663 (1983).
24. Timonen, T., Saksela, E., Ranki, A. and Hayry, P.: *Cell. Immunol.* **48**, 133 (1979).
25. Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B.: *J. Exp. Med.* **153**, 569 (1981).
26. Hanna, N.: *Int. J. Cancer.* **26**, 675 (1980).
27. Karre, K., Klein, G.O., Kiessling, R., Klein, G. and Roder, J.C.: *Nature.* **284**, 624 (1980).
28. Talmadge, J.E., Meyer, K.M. Prieur, D.J. and Starrkey, J.R. *Nature.* **284**, 622 (1980).
29. Barlozzari, T., Reynolds, C.W. and Herberman, R.B.: *J. Immunol.* **131**, 1024 (1983).
30. Gidlund, D., Orn, A. and Wigzell, H.: *Nature.* **273**, 759 (1978).
31. Santoli, D., Trinchieri, G. and Koprowski, H.: *J. Immu, nol.* **121**, 532 (1978).
32. Trichieri, G., Santoli D. and Koprowski, H.: *J. Immunol.* **120**, 1849 (1978).
33. Zarling, J.M.: Augmentation of human natural killer cell activity by purified interferon and polyribonucleotides in natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press. NY. pp. 687-706 (1980).
34. Peter, H.H., Dalliiggl, H., Euler, S.: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity. Academic Press. NY. pp. 609-632 (1980).
35. Wolfe, S.A., Tracey, D.E. and Henney, C.S.: *Nature.* **262**, 584 (1976).
36. Djeu, J.Y., Heinbaugh, J.A., Holden, H.T. and Herberman, R.B.: *J. Immunol.* **122**, 175 (1971).
37. Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., Staal, S. and Djeu, J.Y.: *Int. J. Cancer.* **19**, 555 (1977).

38. Trinchieri, G. and Santoli, D.: *J. Exp. Med.* **147**, 1314 (1978).
39. Santoli, D., Trinchieri, G. and Koprowski, H.: *J. Immunol.* **121**, 532 (1978).
40. Einhorn, S., Blomgren, H. and Strader, H.: *Int. J. Cancer.* **22**, 405 (1978).
41. Henny, C.S., Kuribayashi, K., Mern, D.E. and Gillis, S.: *Nature.* **291**, 335 (1981).
42. Domzig, W., Stadler, B.M. and Herberman, R.B.: *J. Immunol.* **130**, 1970 (1983).
43. 王浴生: 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京 (1983).
44. 張代釗: 中西醫結合治療癌症, 山西人民出版社, 山西 (1984).
45. 陸昌洙: 漢藥의 藥理成分 臨床應用, 癸丑文化社, 서울 (1982).
Yoon, T.K.: *Korean. Biochem. J.* **18**, 31 (1985).
46. Gillis, S., Smith, K.A. and Watson, J.: *J. Immunol.* **124**, 1954 (1980).
47. Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* **5**, 112 (1975).
48. Jondal, M. and Pross, H.: *Int. J. Cancer.* **15**, 596 (1975).
49. Burton, R.C., Thompson, J. and Warner, N.L.: *J. Immunol. Method.* **8**, 133 (1975).
50. 하윤문, 김광혁, 전무형, 우중실, 임수덕: 대한의학회지, **24**, 503 (1981).
51. Pross, H.F. and Baines, M.G.: *Int. J. Cancer.* **18**, 593 (1976).
52. Kadish, A.S., Doyl, A.T., Steinhauer, E.H. and Ghossein, N.A.: *J. Immunol.* **129**, 1817 (1981).
53. 임수덕, 김광혁, 남상윤: 대한암학회지, **15**, 1 (1983).
54. Moon, C.K., Park, K.S., Lee, S.H. and Yoon, Y.P.: *Arch. Pharmacol. Res.* **8**, 42, 44 (1985).
55. Moon, C.K., Sim, K.S., Lee, S.H., Park, K.S., Yoon, Y.P., Ha, B.J. and Lee, J.C.: *Arch. Pharmacol. Res.* **6**, 123, 131 (1983).
56. Yun, Y.S., Jo, S.K., Moon, H.S., Kim, Y.J., Oh, Y.R. and Yoon, T.K.: *Korean. Biochem. J.* **18**, 31 (1985).
57. Tang, D., Hao, Y., Liu, Z., Miao, S., Wei, H. and W.J.: *Yaoxue Tongbao.* **19**, 555, 558 (1984).
58. Bartlett, S.P. and Burton, R.C.: *J. Immunol.* **128**, 1070 (1982).
59. Targan, S. and Dorey, F.: *J. Immunol.* **124**, 2157 (1980).
60. Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B.: *J. Immunol.* **128**, 2514 (1982).
61. Brooks, C.G., Rees, R.C. and Leach, R.H.: *Eur. J. Immunol.* **9**, 159 (1979).
62. Santoli, D., Trinchieri, G. and Leifn, F.S.: *J. Immunol.* **121**, 526 (1978).
63. Savary, C.A. and Lotzova, E.: *J. Immunol.* **120**, 239 (1978).