

들깨잎에서 동정한 Phytol의 항암 및 면역활성증강 효과*

김광혁 · 장명웅 · 박건영** · 이숙희** · 류태형*** · 선우양일****

고신대학교 의학부 미생물학교실
부산대학교 식품영양학과, ** 생물학과***
동아대학교 생물학과****

Antitumor Activity of Phytol Identified from Perilla Leaf and its Augmentative Effect on Cellular Immune Response

Kim, Kwang Hyuk, Chang, Myung Woong, Park, Kun-Young**

Rhee, Sook-Hee,** Rhew, Tae Hyong,*** Sunwoo, Yangil****

Department of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan, Korea

Department of Food Science and Nutrition,** Biology,*** Pusan National University, Pusan, Korea

Department of Biology,**** Dong-A University, Pusan, Korea

ABSTRACT

Several studies have shown that extracts from yellow-green vegetables reveal antitumor activities. In the present study we investigated the effect of phytol in order to elucidate the immunological mechanism of antitumor activity of this substance. The results obtained from the experiment as follows :

- 1) Phytol showed cytotoxic effect on sarcoma 180 cells *in vitro*.
- 2) When phytol was injected into the peritoneal cavity of mice transplanted with sarcoma 180 cells, the average survival time(24.0 days) tended to increase as compared with the non-treated control(19.2 days).
- 3) When sarcoma 180 cells were injected subcutaneously into the right groin of mice, and then phytol was injected into the peritoneal cavity, the tumor inhibition ratio was 33%.
- 4) The natural killer(NK) cell activity was significantly augmented by phytol *in vitro* and *in vivo*. Similar augmentations of NK cell activity were obtained with culture supernatants of phytol exposed spleen cells and peripheral blood mononuclear cells.
- 5) Phytol on the macrophage from peritoneal cavity showed a higher effectiveness *in vivo* than *in vitro*.

These results indicate that phytol shows the inhibitory effect for growth of sarcoma 180 cells *in vitro*, also it can augment macrophage and NK cell activities *in vivo*.

KEY WORDS : phytol · antitumor activity · cytotoxicity · natural killer cell.

채택일 : 1993년 6월 8일

*본 연구는 한국과학재단 연구비(과제번호 : 90-0500-03)의 지원으로 이루어진 것임.

서 론

녹황색채소류에서 분리된 물질가운데 항돌연변이효과와 항암효과를 나타내는 물질들이 존재하고 있음이 보고되고 있다¹⁻⁵⁾. 이들중 몇몇 유리지방산은 정상 혹은 악성종양세포에 작용하여 해를 끼치거나 사멸시킨다⁶⁻¹¹⁾. 지방산의 세포독성은 비특이적 방어기전으로서 세포에 직접적으로 손상을 주는 경우뿐만 아니라 동물생체내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대하여 세포독성효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포독성효과를 항진시키는 것으로 보고되고 있다¹²⁾.

들깨잎에서 분리동정된 물질가운데는 비타민 A, C뿐만이 아니라 K, Ca, Mg와 같은 무기물과 lysine, linolenic acid 등이 풍부하게 포함된 것으로 알려지고 있다. 들깨잎은 여러 녹황색 채소류중에서 강한 항돌연변이 효과 및 사람의 위암세포 등에서도 암세포 성장 억제 효과를 크게 나타내었다¹⁾²⁾. 그리고 들깨잎 매탄올 추출물에서 분리동정된 phytol은 항돌연변이 물질로서 그 효과가 지대하였음이 밝혀진 바 있다¹³⁾. Phytol은 보통 엽록소내에 에스테르로 존재하는 불포화지방족 알콜의 일종으로서 비타민 E의 제조에도 사용되는 식물성 알콜이다.

본 실험에서는 *in vitro*에서의 항돌연변이 및 항암효과¹⁾²⁾가 다른 실험계의 *in vitro*와 *in vivo*에서도 나타나는지 또는 이런 항암효과가 면역활성 증가와 관련있는지를 검토하고자 하였다. 먼저 phytol의 종양세포에 대한 시험관내 세포독성효과를 관찰함으로써 직접적인 독성효과를 관찰하고자 하였고 또한 암세포를 이식시킨 동물에 phytol을 투여하여 봄으로서 생명연장효과 및 국소종양조직형성에 미치는 효과를 측정코저 하였다. 그리고 면역계에서 세포성 면역에 관여하는 세포집단중에서 natural killer(NK)세포와 대식세포와 같이 세포독성을 나타내는 세포들에 phytol을 작용시켜 작동세포의 활성화 가능성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 암컷 Balb/c 마우스로서 생후 8주

내외, 체중 25g내외의 것을 한국생명공학센터(경북 대구)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 시 료

Phytol은 Aldrich Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

3. 복수암세포 및 표적 세포

Sarcoma 180세포는 한국생명공학센터에서 구입하여 Balb/c마우스의 복강내에 일주일 간격으로 암세포 부유액을 접종하여 계대배양하면서 동계의 마우스 복수암유발 및 암조직형성에 사용하였다. 세포독성측정용 표적세포인 Yac-1 세포주는 경희대학교 의과대학 부속병원 면역학연구실 조경삼교수로부터 분양받아 계대배양하여 사용하였다.

4. 세포독성 항종양시험

Phytol의 직접적인 세포살해능을 보기 위한 시험관내 viability시험과 종양세포가 이식된 마우스에 phytol을 투여한 후의 생존일수측정시험을 하였다.

1) 생세포수 검사

계대한지 7일이 된 마우스 복강내 sarcoma 180 세포(2.5×10^5 세포)를 5ml의 조직배양액에 부유시킨 다음 phytol을 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 μ g을 각각 작용시켜 5% CO₂와 37°C의 조건에서 배양하였다. 24시간후 phytol이 포함되어지 않은 배지에 배양된 세포와 viability를 비교하기 위하여 세포를 trypan blue로 염색하였다. 세포배양에 사용된 배지는 Eagle's minimum essential medium(EMEM, GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)였으며 fetal calf serum(FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 20% 추가하여 사용하였다. 염색시간은 2~3분으로 하였으며 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수와 염색되어진 세포(non-viable cell) 그리고 염색되지 않은 세포(viable cell)의 수를 측정하여 viability를 결정하였다¹⁴⁾¹⁵⁾.

2) 생존기간 검사

생존기간 검사는 Maeda 등의 방법¹⁴⁾에 의거 다음과 같이 시행하였다. 계대한지 7일이 경과된 sarcoma 180세포(1×10^6 세포)를 마우스 복강내에

접종하였다. 종양세포를 이식시켜 24시간이 경과된 마우스의 복강내로 phytol(50µg/kg)을 매일 1회씩 20회를 투여하였다. 생존기간은 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하였으며 시험군과 대조군은 각각 10마리로 하였다.

5. 숙주 증개성 항종양시험

숙주증개성 항종양시험은 Suga 등의 방법¹⁶⁾에 의거 다음과 같이 시행하였다. 마우스 복강내에 계대 접종한 후 7일이 경과된 sarcoma 180세포(6×10⁶ 세포)를 마우스의 오른쪽 서혜부에 피하로 접종하였다. Phytol의 투여량과 기간은 4의 2)와 같이 실시하였다. 종양세포를 이식한 지 5주가 지난 다음 각 마우스군들을 희생시켰으며 서혜부의 암조직을 분리한 다음 그 무게를 측정하였다. 시료가 투여되었던 마우스의 암조직무게는 시료를 투여하지 않은 대조군 마우스의 암조직과 비교하여 종양억제비(%)를 구하였으며 그 공식은 다음과 같았다.

$$\text{종양억제비} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A는 대조군의 평균종양무게이고 B는 시료투여군의 평균종양무게이다. 각 시험군과 대조군의 마우스는 10마리씩으로 하였다.

6. 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포의 분리는 Mishell 등의 방법¹⁵⁾에 따라 시행하였다. 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution(HBSS, GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포 부유액을 15ml 원심관(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에 옮긴 후 2~3분 동안 실온에 방치한 다음 세포 부유액의 상층액을 새로운 15ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 300×g에서 5~10분 원심분리한 후 HBSS로 1회 원심세척한 다음 증류수와 10× 농축 phosphate buffered saline(PBS)를 이용하여 혼합된 적혈구를 용해한 후 HBSS로 2회 원심세척

하여 사용하였다.

7. 비장세포 배양 상층액의 준비

비장세포 배양 상층액의 준비는 Weir 등의 방법¹⁷⁾에 따라 시행하였다. 6에서와 같이 준비된 비장세포 부유액을 10%가 되게 FCS를 가한 RPMI 1640(GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 배지(10%FCS RPMI 1640)로 5×10⁶세포/ml가 되도록 조절하여, 이 세포 2ml당 phytol을 1.25µg 첨가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24, 48, 72시간 배양하여 수거하였다. 이것을 300×g에서 10분간, 10,000×g에서 30분간 원심시킨 후 그 상층액을 수거하여 배양 상층액의 NK세포활성과 대식세포독성 증강 효과 측정에 사용하였다.

8. 말초혈액 단핵구 배양 상층액의 준비

에텔로 마취시킨 마우스 심장에서부터 혈액을 채취하여 헤파린으로 처리한 후 Ficoll-Hypaque 비중원심법¹⁵⁾에 의하여 단핵구를 분리하였다. 상기 방법으로 얻어진 단핵구를 10%FCS RPMI 1640 배지로 3×10⁶세포/ml이 되게 조절하여 2ml당 phytol을 1.25µg 첨가한 다음 37°C, CO₂ incubator에서 24, 48, 72시간 동안 각각 배양하였다. 7에서와 같이 그 상층액을 수거하여 배양 상층액의 NK세포 활성화 및 대식세포독성 증강 효과측정에 사용하였다.

9. Natural Killer(NK)세포활성의 측정을 위한 시험

NK세포활성의 측정은 널리 이용되고 있는 방법¹⁷⁻²³⁾에 따라 다음과 같이 시행하였다.

1) 작동 세포(Effector cell)

6항에 기술된 바와 같이 준비한 비장세포를 10% FCS RPMI 1640 배지에 부유시킨 다음 75cm²의 조직배양병에 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후 가볍게 흔들어 부착되지 않는 세포(non-adherent cells)만을 수거하여 4×10⁶세포/ml로 만들어 작동세포로 사용하였다. *In vitro*에서 phytol의 투여는 상기와 같이 준비된 세포 1ml에 대하여 0.5, 1.0, 5.0, 10.0µg을 각각 작용시킨 다음 4시간 후에 PBS로 3번 원심 세척한 후 사용하였다. *In vivo*에서 phytol의 투여는 마우스 당 1.25µg을 복

강내로 투여한 후 24시간이 경과한 다음 마우스를 희생시켜 비장을 분리하였다. 각 군당 3마리씩으로부터 분리한 비장은 상기에서와 같이 비장세포 부유액을 만들었다. 비장세포 배양 상층액과 말초 혈액 단핵구 배양 상층액이 나타내는 NK세포 활성화에 미치는 효과를 보기 위한 시험은 7과 8에서 준비한 상층액을 각각 1/100 부피되게 작동세포액에 가하였다. 즉, 작동세포 4×10^6 세포/ml인 세포 ml당 배양 상층액 10 μ l를 각각 작용시켜 4시간 동안 배양한 다음 PBS로 3번 원심 세척하여 사용하였다.

2) 표적 세포(Target cell)

표적세포로 사용한 Yac-1 세포(2×10^5 세포/0.1ml)에 10 μ Ci의 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Du pont, Billerica, MA, U.S.A.)를 가하여 가볍게 섞어 준 후 37 $^\circ\text{C}$, CO_2 incubator에서 1시간 표지화(labeling)시켰다. 표지된 세포를 10%가 되게 FCS를 작용시킨 RPMI 1640배지로 3회 원심 세척한 후 1×10^5 /ml 세포되게 10% FCS RPMI 1640 배지에 부유시켰다.

3) NK세포의 활성 측정

^{51}Cr 이 표지된 Yac-1세포를 96 wells microplate (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 well당 1×10^4 세포/0.1ml되게 분주하고, 작동세포와 표적세포의 비율이 40 : 1이 되도록 작동세포를 4×10^5 세포/0.1ml되게 추가 분주하여 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 16시간 작용시켰다. 이때 최대방출량(maximum release)를 측정하기 위해서는 1N HCl 0.1ml씩을 가하였고, 자연방출량(spontaneous release)을 측정하기 위해서는 배지 0.1ml씩을 가하였다. 각 시험당 시험 well은 4개씩 시행하였다. 작용 16시간 후 각 well의 상층액 0.1ml씩을 수거하여 gamma counter (Packard Cobra Co., U.S.A.)로 유출되는 방사능을 측정하였으며 NK세포의 활성은 다음과 같이 산출하였다.

% Specific lysis

$$= \frac{\text{c.p.m. in experiment} - \text{c.p.m. spontaneous release}}{\text{c.p.m. maximum release} - \text{c.p.m. spontaneous release}} \times 100$$

10. 마우스 복강 대식세포의 세포독성 효과 측정을 위한 시험

1) 마우스 복강 대식세포의 분리

마우스 복강 대식세포의 분리는 Mishell 등의 방법¹⁵⁾에 따라 시행하였다. 마우스의 복부를 절개한 후 4 $^\circ\text{C}$ 의 PBS로 복강을 세척하여 복강 삼출액을 취하였다. 수거한 복강액을 500 \times g로 10분간 2회 원심 세척한 후 10% FCS RPMI 1640 배지에 4×10^6 세포/ml이 되게 하였다. 부착성 대식세포만을 분리하기 위하여 10cm 직경의 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 세포 부유액을 분주하고 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 1시간 동안 방치시켰다. 시간이 경과된 후 비부착성 세포(non-adherent cells)를 제거하고 PBS로 3번 세척하여 부착성 세포(adherent cells)만을 남겼다. 부착성 세포는 cell scraper(Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)로 수회 긁어 낸 후 4 $^\circ\text{C}$ 의 10% FCS RPMI 1640배지에 부유시켜 세포수를 다시 4×10^6 세포/ml이 되게 하여 사용하였다. Phytol의 투여는 *in vitro*와 *in vivo* 모두 9-1)에서와 같이, 투여량과 작용시간을 마찬가지로 하였다. 또한 비장세포 배양 상층액과 말초혈액 단핵구 배양 상층액이 나타내는 복강 대식세포 활성화에 미치는 효과를 보기 위한 시험도 9-1)과 같은 방법으로 하였다.

2) 표적세포(Target cell)

표적세포 또한 9-2)에서와 같이 Yac-1 세포를 사용하여 ^{51}Cr 로 표지화시킨 후 세포수를 4×10^4 세포/ml되게 10% FCS RPMI 1640 배지에 부유시켜 사용하였다.

3) 대식세포의 세포독성 효과 측정

^{51}Cr 이 표지된 Yac-1세포를 96 wells microplate (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.)에 well당 4×10^3 세포/0.1ml되게 분주하고, 대식세포와 표적세포의 비율이 100 : 1이 되도록 대식세포를 4×10^5 세포/0.1ml되게 추가 분주하여 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 16시간 작용시켰다. 이 시험방법은 9-3)의 시험방법에 준하였다.

11. 통계 분석

실험 data로부터 대조군과 처리군들 사이를 각각 Student's t-test하였으며 P값이 0.05이하일때 유의 있는 차로 간주하였다.

결 과

1. 종양세포에 대한 phytol의 직접적 세포살해 작용

Phytol의 종양세포에 대한 직접적인 세포살해효과를 보기 위하여 여러 농도로 배지에 배양하여 24시간 후에 종양세포의 생존율을 관찰하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 1.0µg/5ml에서 98.7%가 생존하여 phytol을 포함시키지 않은 대조군에서의 99.2%와 큰 차이를 나타내지 않았지만 총세포수는 크게 감소하였다. Phytol농도의 증가에 따라 생존율과 총세포수가 감소를 보이다가 50.0µg/5ml에서는 91.3%의 생존율과 14.8×10^4 의 총세포수를 나타냈다.

2. 종양세포 이식 마우스의 생명연장효과

정상 마우스에 종양세포를 이식시킨 후 phytol을

투여했을 때 phytol로 인한 생명연장효과를 보기 위하여 복강내로 sarcoma 180세포를 이식한 다음 매일 1회씩 20일간 시료를 복강내로 투여하였다. 생명연장효과는 Table 2에 나타난 바와 같았다. 50 µg/kg 투여군에서 평균생존일수가 24.0일을 나타냄으로서 phytol을 투여하지 않은 대조군의 19.2일보다는 높았으나 통계학적 유의성은 없었다.

3. 숙주 증개성 항종양 활성화 작용

In vivo에서 phytol에 의한 항종양효과를 보기 위하여 마우스의 오른쪽 서혜부 피하로 고농도의 sarcoma 180세포부유액을 접종한 후 phytol을 복강으로 매일 1회씩 20일간 투여하였다. 이로부터 2주일이 지난 다음 마우스를 희생시키고, 서혜부의 암조직을 적출하여 그 무게를 달았다. 대조군은 종양세포를 이식하고 시료를 투여하지 않으면서 5주일이 지난 다음 마찬가지로 암조직을 적출하였다. 종양억제비(%)는 시험군의 암조직부게와 대조군의 암조직무게를 비교하여 산출하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 phytol 50µg/kg 투여에서 평균암조직무게가 4.56g을 나타냄으로써 phytol을 투여하지 않은 대조군의 6.85g에 비하여 33%의 저해효

Table 1. Viability of sarcoma 180 cells in a culture medium containing phytol(Pt)

Samples	Dose (µg/5ml medium)	Number of petri dishes	Total cells ($\times 10^4$)	Average viability of tumor cells(%)
Pt	1.0	3	18.5	98.7
	5.0	3	16.3	96.5
	10.0	3	15.0	95.3
	50.0	3	14.8	91.3
Control		3	54.3	99.2

25×10^4 sarcoma 180 cells were cultivated in 20% FCS containing Eagle's minimum essential medium(EMEM) in the presence of various concentrations of Pt for 24hr. Viable cells were counted by trypan blue dye exclusion method.

Table 2. Effects of phytol(Pt) on survival of Balb/c mice transplanted I.P. with sarcoma 180 cells

Samples	Dose (µg/kg)	Number of tumor cells	Number of mice	Average survival time(days)
Pt	50	1×10^6	10	24.0 ± 6.4
Control		1×10^6	10	19.2 ± 2.7

Balb/c mice were intraperitoneally injected with 1.0ml(1×10^6 cells) of ascites tumor cells(7-day-old sarcoma 180). 50µg/kg of Pt was I.P. injected once a day for 20 days from 24 hr following transplantation, and the survival time of the mice was recorded. The number of animal was 10 in each group.

Data represent mean \pm S.D. of 10 mice in each group.

Phytol의 항암 및 면역활성증강 효과

Table 3. Antitumor activity of phytol(Pt) on sarcoma 180 in Balb/c mice

Samples	Dose (µg/kg)	Number of tumor cells	Number of mice	Average weight of tumor(g)	Tumor inhibition ratio(%)
Pt	50	6×10 ⁶	10	4.56±2.85	33
Control		6×10 ⁶	10	6.85±3.59	

7 day-old sarcoma 180 ascites cells(0.5ml, 6×10⁶cells) were s.c. transplanted into the right groin of the inbred strain. 50µg/kg of Pt or the equal volume of buffered saline was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following transplantation. All mice were sacrificed at 5 weeks following transplantation, and tumor weights were measured.

과를 나타냈으나 통계학적 유의성은 없었다.

4. NK세포의 활성화에 미치는 영향

Phytol이 NK세포의 활성화도에 미치는 효과를 보기 위하여 정상마우스의 비장세포로부터 분리한 비부착성 세포(non-adherent cell)를 작동세포(effector cell)로 하고, 표적세포(target cell)로서는 Yac-1세포에 방사성 동위원소를 표지화한 다음, 이 두 세포군을 혼합 배양시켰다. 이때 작동세포에 의해서 표적세포가 용해될 때 용출되어 나타나는 방사성 물질을 counter로 측정하였다. 4×10⁶세포/ml의 세포 부유액 ml당 phytol을 0.5, 1.0, 5.0, 14.0µg되게 첨가시켰을 때 NK세포의 표적세포살해능력은 시료에 노출시키지 않은 대조군의 9.00%에 비하여 1.0, 5.0µg의 phytol 투여군들에서 유의성있는 상승을 나타냈다(Table 4).

*In vivo*에서 phytol이 NK활성도에 미치는 효과를 보기위하여 정상마우스 복강내로 phytol을 1.25µg 투여하여 24시간이 경과된 다음 분리한 비장세포를 작동세포로 사용한 결과 *in vitro*에서의 NK세포활성증강효과보다 더 크게 활성화시켰다. 즉 대조군의 NK세포활성인 7.38%에 비하여 phytol투여군은 50.78%를 나타냄으로서 매우 유의한 상승을 나타냈다(Table 5).

시료를 세포나 동물에 직접 노출시켜 작동세포를 만들지 않고 먼저 세포 부유액에 시료를 작용시켜 배양했을 때 세포가 자극받아 분비하는 물질이 포함되어 있을 것으로 생각되는 세포 배양 상층액을 준비하여 이를 비장세포 부유액에 1/100부피로 가하여 4시간동안 배양한 후의 세포를 작동세포로 사용하였다. 즉, 5×10⁶세포/ml의 비장세포 2ml당 phytol을 1.25µg 작용시킨 후 24, 48, 72시간 후에

Table 4. Effects of phytol(Pt) on the cytotoxicity of natural killer cell in the spleen cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/ml)	Cytotoxicity to Yac-1(%)
Pt	0.5	7.48±1.29
	1.0	14.74±2.78*
	5.0	14.30±0.54**
	10.0	8.20±1.21
Control		9.00±0.86

Non-adherent spleen cells(4×10⁶cells/ml) were exposed at 0.5, 1.0, 5.0, or 10.0 µg of Pt for 4hr. After 3 times washing with PBS effector cells were suspended with Yac-1 target cells(1×10⁵/ml). The Effector/Target ratio was 40/1.

* and **: significantly different from the control at the p<0.05 and p<0.005 levels, respectively.

Table 5. Effects of phytol(Pt) on the cytotoxicity of natural killer cell in the spleen cell of Pt-injected Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/mouse)	Cytotoxicity to Yac-1(%)
Pt	1.25	50.78±2.70**
Control		7.38±2.51

3 mice each were injected with 1.25µg of Pt and the equal volume of buffered saline(control). After 24hr mice were sacrificed and non-adherent spleen cells were isolated. Effector cells(4×10⁶cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(1×10⁵cells/ml). The Effector/Target ratio was 40/1.

** : significantly different from the control at the p<0.005 level.

배양 상층액을 수거하였다. 이 배양 상층액을 사용한 경우 NK세포활성은 대조군의 4.48%에 비하여 24시간째는 23.13%로 유의성있는 증강효과를 나

타냈으며 48시간, 72시간째에서도 2배 이상의 증강효과를 보였다(Table 6).

Table 7은 마우스의 말초혈액내 단핵구를 분리하여 준비한 3×10^6 세포/ml의 세포 부유액 2ml당 phytol을 비장세포 배양 상층액을 준비할 때와 같은 농도로 가하여 배양한 후 그 상층액을 수거하여 작동세포에 대한 자극물질로 사용한 실험 결과이다. 24, 48, 72시간째의 모든 상층액에서 대조군에서 보다 유의있게 높게 나타났다.

5. 대식세포의 세포독성효과에 미치는 영향

Phytol을 대식세포에 노출시켰을 때 대식세포의 표적세포에 대한 살해능력의 변화를 조사하기 위하여 미리 준비한 마우스복강내 부착성 세포에 시료를 노출시킨 후 표적세포살해능을 측정된 결과는 Table 8과 같다. 이때 표적세포로는 Yac-1에 ^{51}Cr 를 표지하여 사용하였다. 4×10^6 세포/ml 농도의 부착성세포 ml당 phytol을 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 μg 씩 가하고 4시간 동안 배양한 다음 작동세포로 이용하였고, 여기에 표적세포를 일정비율로 가하여 혼

합배양하였다. 이때 작동세포에 의해서 파괴되어 표적세포로부터 유리되어 나오는 ^{51}Cr 의 양을 측정하여 세포살해능을 비교하였다. 대식세포의 살해능은 phytol을 작용시킨 모든 시험군에서 대조군의 19.17%보다 증가되었다.

세포에 phytol을 가하여 배양시킨 배양 상층액이 표적세포에 대한 대식세포의 살해능에 미치는 효과를 보기위하여 비장세포 부유액(5×10^6 세포/ml) 2ml당 phytol을 1.25 μg 가하여 24, 48 및 72시간동안 배양한 후 그 배양 상층액을 수거하였다. 이 배양 상층액을 작동세포에 일정비율로 가하고 4시간 배양한 후 세포를 수거하여 표적세포와 일정비율로 혼합배양한 다음 표적세포살해능을 측정된 결과는 Table 9와 같다. 1.25 μg 을 작용시킨 후 24, 48 및 72시간째의 배양 상층액에서 모두 표적세포살해능이 대조군의 19.17%를 능가하였으며 72시간째에서 상승효과가 가장 컸다.

마우스말초혈액내 단핵구(3×10^6 세포/ml) 2ml당 1.25 μg 의 phytol을 작용시켜 24, 48, 72시간동안 배양한 후 수거된 배양 상층액으로 복강내 대식

Table 6. Effects of phytol(Pt)-culture supernatant on the cytotoxicity of natural killer cells in the spleen cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose ($\mu\text{g}/2\text{ml}$)	Harvest of culture supernatant		
		24hr	48hr	72hr
Pt	1.25	23.13 \pm 7.00*	9.78 \pm 4.80	11.08 \pm 3.96
Control		4.48 \pm 0.63		

2ml of spleen cells(5×10^6 /ml) were exposed with 1.25 μg of Pt for 24, 48, or 72hr. Culture supernatants were harvested by centrifugation. Each culture supernatant was added to effector cells(v/v=1/100). After 4hr exposure effector cells(4×10^6 cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(1×10^5 cells/ml). The Effector/Target ratio was 40/1.

* : significantly different from the control at the $p < 0.05$ level.

Table 7. Effects of phytol(Pt)-culture supernatants of peripheral blood mononuclear cell on the cytotoxicity of natural killer cells in the spleen cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose ($\mu\text{g}/2\text{ml}$)	Harvest of culture supernatant		
		24hr	48hr	72hr
Pt	1.25	29.58 \pm 7.05**	19.62 \pm 6.63*	16.91 \pm 3.60**
Control		4.48 \pm 0.63		

2ml of peripheral blood mononuclear cells(3×10^6 /ml) were exposed with 1.25 μg of Pt for 24, 48, or 72hr. Culture supernatants were harvested by centrifugation. Each culture supernatant was added to effector cells(v/v=1 : 100). After 4hr exposure effector cells(4×10^6 cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(1×10^5 cells/ml). The Effector/Target ratio was 40/1.

* and **: significantly different from the control at the $p < 0.05$ and $p < 0.01$ levels, respectively.

Phytol의 항암 및 면역활성증강 효과

세포를 자극시켰을 때 표적세포살해능을 측정된 결과는 Table 10과 같다. 비장세포 배양 상층액을 작용시켰을 때와 마찬가지로 모든 시험군에서 대조군(19.17%)보다 높았지만 48시간째에서 가장 높게 나타났다.

Table 8. Effects of phytol(Pt) on the cytotoxicity of peritoneal adherent cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/ml)	Cytotoxicity to Yac-1 (%)
Pt	0.5	29.68 ± 2.31*
	1.0	33.73 ± 12.45
	5.0	24.69 ± 5.65
	10.0	32.11 ± 3.17**
Control		19.17 ± 5.02

Peritoneal adherent cells(4×10⁶cells/ml) were exposed at 0.5, 1.0, 5.0, 10.0µg of Pt for 4hr. After 3 times washing with PBS effector cells were suspended with Yac-1 target cells(4×10⁴cells/ml). The Effector/Target ratio was 100/1.

* and **: significantly different from the control at the p<0.01 and p<0.005 levels, respectively.

Table 9. Effects of phytol(Pt)-spleen cell culture supernatants on the cytotoxicity of peritoneal adherent cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/2ml)	Harvest of culture supernatant		
		24hr	48hr	72hr
Pt	1.25	28.21 ± 5.04	35.11 ± 8.17	33.05 ± 2.58**
Control		19.17 ± 5.02		

2ml of spleen cells(5×10⁶cells/ml) were exposed to 1.25µg of Pt for 24, 48, or 72hr. Culture supernatants were harvested by centrifugation. Each culture supernatant was added to effector cells(v/v=1/100). After 4hr exposure effector cells(4×10⁶cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(4×10⁴cells/ml). The Effector/Target ratio was 100/1.

** : significantly different from the control at the p<0.01 level.

Table 10. Effects of phytol(Pt)-peripheral blood mononuclear cell culture supernatants on the cytotoxicity of peritoneal adherent cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/2ml)	Harvest of culture supernatant		
		24hr	48hr	72hr
Pt	1.25	29.00 ± 3.32*	33.16 ± 1.57**	32.01 ± 0.52**
Control		19.17 ± 5.02		

2ml of peripheral blood mononuclear cells(3×10⁶cells/ml) were exposed to 1.25µg of Pt for 24, 48, or 72hr. Culture supernatants were harvested by centrifugation. Each culture supernatant was added to effector cells(v/v=1/100). After 4hr exposure effector cells(4×10⁶cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(4×10⁴cells). The Effector/Target ratio was 100 : 1.

* and **: significantly different from the control at the p<0.05 and p<0.005 levels, respectively.

*In vivo*에서 phytol이 복강내 대식세포의 표적세포살해능력에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스 복강내로 1.25µg을 투여한 후 24시간이 지난 다음 복강내 대식세포를 분리하여 4×10⁶세포/ml당 4×10⁴세포/ml의 표적세포를 작용시켰을 때 얻은 결과는 Table 11과 같다. 대조군(19.17%)에 비해 시험군은 53.39%를 나타냄으로서 유의성있는 상승을 보였다.

고찰

숙주에서 종양세포 등의 병적인자에 대한 방어력증강은 매우 긴요한 일이라 하겠으며 특히 종양면역에서 결정적 역할을 수행하고 있는 숙주세포의 방어력증강을 위한 시도가 과거 수십년동안 부단히 진행되어 왔다. 숙주세포중에서도 표적세포를 살해할 수 있는 대식세포나 NK세포의 세포독성효과를 향진시키는 물질들이 그동안 다수 발견되어 현재는 팔목할 성과를 거두고 있다. 어떤 미생물 그 자체, 미생물의 추출물이나 산물, cyto-

Table 11. Effects of phytol(Pt) on the cytotoxicity of peritoneal adherent cell of Balb/c mice against Yac-1 target cell

Samples	Dose (µg/ml)	Cytotoxicity to Yac-1(%)
Pt	1.25	53.39± 10.94*
Control		19.17± 5.02

3 mice were injected with 1.25µg of Pt and the equal volume of buffered saline(control). After 24hr exposure mice were sacrificed and peritoneal adherent cells were isolated. Effector cells(4×10⁶cells/ml) were suspended with Yac-1 target cells(4×10⁴cells/ml). Effector/Target ratio was 100/1.

* : significantly different from the control at the p<0.05 levels.

kine, 특정종양세포, 특정화학물질 등¹⁸⁾¹⁹⁾²⁴⁻³⁵⁾이 대식세포나 NK세포에 작용하면 세포는 활성화되고 활성화된 그 결과로 signal물질의 생성과 세포독성 자체의 향진이 나타난다. 본 실험에서는 *in vitro*에서 비장세포내 NK세포에 여러가지 농도의 phytol을 노출시켰을 때 그 활성도가 크게 증가되었다(Table 4). *In vivo*에서는 정상마우스복강내에 phytol을 투여한 후 마우스를 희생시켜 준비한 비장세포내 NK세포의 활성도에서 *in vitro*에서의 증강효과보다 훨씬 크게 나타남으로서 생체내 작용효과가 더욱 팔뚝할만한 것임을 알 수 있었다(Table 5). 또한 정상마우스의 비장세포 부유액에 미리 phytol을 첨가시켜 배양한 후 그 배양 상층액을 NK세포에 작용시켰을 때 NK세포활성도는 48시간 동안이나 72시간 동안 phytol에 노출된 배양 상층액보다 24시간 동안 노출된 배양 상층액에 의해서 그 활성 증강효과가 더 크게 나타나는 것으로 미루어 보아 NK세포활성증강효과물질이 배양초기에 생성되는 것으로 보인다(Table 6). 말초혈액단핵구에 phytol을 작용시켰을 때 그 배양 상층액이 NK세포에 미치는 효과는 비장세포 배양 상층액과 유사한 양상을 보였다(Table 7).

마우스대식세포의 표적세포살해능 향진효과를 보기 위한 실험에서는 phytol에 의한 NK세포향진 때와는 다른 양상으로 표적세포살해능을 증가시켰다. 즉, 농도가 증가되면서 활성도가 증강되는 경향을 보였다(Table 8). Phytol을 비장세포 부유액에

작용시켜 배양한 후 수거한 상층액에서는 NK세포 자극 때와는 다르게 24시간째에 증가를 보이다가 48시간째에 더 큰 증가를 나타냈으며 이러한 효과는 72시간째에도 그대로 유지되었다(Table 9). 즉, 복강내 대식세포의 경우, 비장세포 배양 상층액내에 유리된 활성화자가 48시간과 72시간사이에는 그대로 역가가 유지됨과 아울러 초기보다는 후기에서 대식세포활성증강물질이 양적으로 증가되었음을 의미한다.

말초혈액단핵구를 phytol로 반응시켜 수거한 24, 48, 72시간째의 상층액 모두에서 대식세포활성을 유의하게 향진시킨 것도 비장세포 배양 상층액에서 나타난 결과와 유사한 양상(Table 10)을 보임으로서 NK세포나 대식세포의 활성화는 별개의 신호전달물질이 관여할 가능성을 시사한다 하겠다.

*In vivo*에서 phytol이 복강내 대식세포의 세포살해능에 미치는 효과를 보기 위해 정상마우스에 phytol을 복강내로 투여한 다음 복강대식세포를 수거하여 그 활성도를 측정된 결과(Table 11)에서는 phytol에 의해 활성도가 대조군에 비하여 유의하게 향진되었다.

본 실험들에서 나타난 바와 같이 종양세포에 대한 생체내 작동세포로서 세포독성효과를 발휘하는 NK세포나 대식세포의 활성화에 있어서 phytol은 상당한 증강효과를 보인다. 따라서 phytol의 자극을 받아 세포가 생성해 내는 작동세포활성화물질의 동정이 앞으로 진행시킬 연구과제라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 녹황색채소류의 엽록소내에 존재하는 불포화지방족알콜의 일종인 동시에 들깨잎에서 항발암 활성을 나타낸 phytol이 종양세포에 작용되었을 때 나타내는 종양세포성장억제 및 세포사멸효과를 관찰하고자 하였다. 또한 phytol이 동물생체내 NK세포나 대식세포와 같은 면역담당세포에 작용됨으로서 이들 세포들이 본래 지니고 있는 종양세포에 대한 세포독성기능을 향진 혹은 저해시키는지를 측정함으로써 세포성면역계에 미치는 효과를 보고자 하였다. 본 연구결과를 요약하면

다음과 같다.

- 1) Phytol은 sarcoma 180 세포에 대한 직접적인 세포증식억제효과가 큰 것으로 나타났다.
 - 2) Sarcoma 180 세포를 복강내로 이식시킨 Balb/c 마우스에 phytol을 투여하였을 때 평균수명이 24.0 일로서 대조군의 19.2일보다 다소 연장되었다.
 - 3) 마우스서혜부에 sarcoma 180 세포부유액을 주사한 후에 phytol을 투여하여 종양억제비를 보았을 때 33%의 종양세포성장저해효과를 나타냈다.
 - 4) 마우스비장내 NK세포의 활성은 *in vitro*, *in vivo*에서 모두 증가되었으나 특히 *in vivo*에서 현저히 증가하였다.
 - 5) 마우스복강내 대식세포의 활성도 *in vitro*보다는 *in vivo*에서 증강효과가 컸다.
- 이상의 결과로 미루어 볼 때 phytol은 종양세포에 대한 직접적인 세포증식 억제효과를 나타낼 뿐만 아니라 종양세포에 대해서 작동세포가 되고 있는 NK세포나 대식세포의 활성을 크게 항진시키는 것으로 생각된다.

Literature cited

- 1) 박건영 · 이경임 · 이숙희. 녹황색 채소류의 돌연변이유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장저해 효과. *한국영양식량학회지* 21(2) : 149-153, 1992
- 2) 이경임 · 박건영 · 이숙희. 아플라톡신 B₁과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지* 21(2) : 143-148, 1992
- 3) 이정규 · 박수완 · 정해영 · 양한석 · 서석수 · 박건영. 비파옆의 Ursolic Acid 성분의 항암작용기전. *대한암학회지* 23(2) : 206-210, 1991
- 4) 하재청 · 최은상 · 류태형 · 양한석 · 박건영. Sarcoma 180에 대한 약용식물성분의 항암효과. *대한암학회지* 23(2) : 197-205, 1991
- 5) Brown RE, Steele RW, Marmer DJ, Hudson JL, Brewster MA. Fatty acids and the inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation by leukemic serum. *J Immunol* 131 : 1011-1016, 1983
- 6) Fischer SM, Leyton J, Lee ML, Locniskar M, Belury MA, Maldve RE. Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and

- mammary carcinogenesis. *Cancer Res(SUPPL)* 52 : 2049s-2054s, 1992
- 7) Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Letters* 33 : 279-285, 1986
- 8) Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50 : 1097-1101, 1990
- 9) Leyton J, Lee ML, Locniskar M, Belury MA, Slaga TJ, Bechtel D. Effects of type of dietary fat on phorbol ester-elicited tumor promotion and other events in mouse skin. *Cancer Res* 51 : 907-915, 1991
- 10) Zhu YP, Su ZW, Li CH. Growth-inhibition effects of oleic acid, linoleic acid, and their methyl esters on transplanted tumors in mice. *J Nat Cancer Inst* 81 : 1302-1306, 1989
- 11) Morton DL, Holmes EC, Eilber FR, Wood WC. Immunological aspects of neoplasia. A rational basis for immunotherapy. *Ann Internal Med* 74 : 587-604, 1971
- 12) 정준현 · 김광혁 · 장명웅 · 이승도 · 서재관. Linoleic acid와 Ursolic acid가 마우스복강대식세포에 미치는 효과. *대한면역학회지* 15(1) : 53-60, 1993
- 13) Lee, KI, Rhee, SK, Park, KY, Kim, JO. Antimutagenic compounds indentified from perilla leaf. *J Korean Soc Food Nutr* 21 : 302-307, 1992
- 14) Maeda YY, Chihara G. The effect of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethylpachymaran and zymosan, and their effects on various immune responses. *Int J Cancer* 11 : 153-161, 1973
- 15) Mishell BB, Shiigi SM. Selected methods in cellular immunology pp4-27, WH Freeman and Co., San Francisco, 1980
- 16) Suga T, Shijo T, Maeda YY, Chihara G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 44 : 5132-5137, 1984
- 17) Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzen-

- berg LA. Handbook of experimental immunology. pp60.1-60.11 Blackwell scientific publications, Boston, 1986
- 18) 임수덕 · 김광혁 · 남상윤. 인터페론 Alpha, Gamma 존재하에 NK 세포가 암세포 파괴에 미치는 영향에 대한 연구. *대한암학회지* 15(1) : 1-13, 1983
 - 19) 최민순 · 이정호 · 소준노 · 김종면. Lentinan이 면역활성에 미치는 영향. *대한면역학회지* 12(2) : 235-249, 1990
 - 20) 하윤문 · 김광혁 · 전무형 · 우종설 · 임수덕. 한국 정상인 말초혈액임파구의 Natural Killer(NK) 활성치에 관한 연구. *대한의학협회지* 24(6) : 503-508, 1981
 - 21) Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cell depletion virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. *J Immunol* 131 : 1531-1538, 1983
 - 22) Hana N, Burton RC. Definitive evidence that natural killer(NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J Immunol* 127 : 1754-1758, 1981
 - 23) Merluzzi VJ. Comparison of murine lymphokine-activated killer cells, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes. *Cell Immunol* 95 : 95-104, 1985
 - 24) Bowlin TL, Rosenberger A, Stemerick D, Edwards ML. Potentiation of natural killer cell activity and tumor immunity by diacetylputrescine. *Cancer Res* 50 : 5460-5463, 1990
 - 25) Bradner WT, Clarke DA, Stock CC. Stimulation of host defense against experimental cancer. LZymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Res* 18 : 347-351, 1958
 - 26) Denis M. Activated murine natural killer cells control growth of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse macrophages ; *in vitro* and *in vivo* evidence. *Int J Immunopharm* 13 : 881-887, 1991
 - 27) Fernandez-cruz E, Halliburton B, Feldman JD. *In vivo* elimination by specific effector cells of an established syngeneic rat moloney virus-induced sarcoma. *J Immunol* 123 : 1772-1777, 1979
 - 28) Gidlund M, Orn A, Wiggzell H. Enhanced NK cell activity injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 273 : 759-761, 1978
 - 29) Hebert JR, Barone J, Reddy MM, Backlund JC. Natural killer cell activity in a longitudinal dietary fat intervention trial. *Clin Immunol Immunopathol* 54 : 103-116, 1990
 - 30) Herberman RB, Nunn ME, Helden HT, Staal S, Djeu JY. Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. *Int J Cancer* 19 : 555-564, 1977
 - 31) Karupiah G, Coupar BEH, Andrew ME, Boyle DB, Phillips SM, Mullbacher A, Blanden RV, Ramshaw IA. Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2. *J Immunol* 144 : 290-298, 1990
 - 32) Lee SY, Kim YC. Cytocidal effect of immune lymphocyte on transplantable target tumor cells(Ehrlich Carcinoma and Sarcoma 180) *in vitro*. *Korean J Pathol* 4 : 91-97, 1970
 - 33) Markovic SN, Murasco DM. Anesthesia inhibits poly I : C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice. *Clin Immunol Immunopathol* 56 : 202-209, 1990
 - 34) Oehler JR, Lindsay LR, Nunn ME, Holden HT, Herberman RB. Natural cell-mediated cytotoxicity in rats. II. *In vivo* augmentation of NK-cell activity. *Int J Cancer* 21 : 210-220, 1978
 - 35) Talcott PA, Exon JH, Koller LD. The effect of methylnitrosourea(MNU) on natural killer(NK) cell cytotoxicity and cytokine production in rats. *Carcinogenesis* 11 : 829-834, 1990