

암세포주에 대한 유근피 *n*-BuOH 분획과 항암제의 병용효과

은 재 순 · 송 원 영
전주우석대학교 약학과

The Combined Effects of *n*-BuOH Fraction of Ulmi Cortex and Anticancer Drugs on Cancer Cell Lines

Jae Soon Eun and Won Young Song

Department of Pharmacy, Chonju Woosuk University, Chunju 565-800, Korea

Abstract—The combined effects of Ulmi Cortex and some anti-cancer drugs on the proliferation of HeLa cells, Hep G2 cells and S 180 cells were estimated by MTT colorimetric assay. The *n*-BuOH fraction(UBF) of Ulmi Cortex inhibited the proliferation of HeLa cell at 10^{-3} g/ml, Hep G2 cell at 10^{-5} g/ml and S 180 cell at 10^{-3} g/ml. The inhibitory effects of mitomycin C(MMC), cisplatin(CPT) and 5-fluorouracil (5-FU), respectively, on Hep G2 cell was increased by the UBF. The UBF did not influence the proliferation of Balb/c 3T3 cells at concentrations of 10^{-6} to 10^{-4} g/ml, but increased the proliferation of T cells at concentrations of 10^{-5} to 10^{-4} g/ml. The UBF did not influence the number of leukocyte, and on the thymus weight of mice. The UBF increased the number of total-peritoneal cells of mice. In conclusion, the results suggest that the UBF have anti-cancer activity without the side effect, such as leukopenia and immunosuppression, and increase the inhibitory activity of the anti-cancer drugs on Hep G2 cells.

Keywords—HeLa · Hep G2 · S180 · mitomycin C · cisplatin · 5-fluorouracil · MTT assay · Ulmi Cortex

유근피(楡根皮)는 느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 비술나무(*Ulmus pumila* L.)의 코르크층을 벗긴 수피 및 근피를 건조한 것으로,¹⁾ 楡(根)白皮, 白楡皮, 楡皮, 零楡(皮), 楡錢樹라고도 한다.^{2,3)}

유근피의 성분으로는 methylpentosan, fructose, tannin, glucose,⁴⁾ resin, fatty oil, β -stigmasterol,⁵⁾ catechin, catechin-5-O- β -apiofuranoside⁶⁾ 및 manosonone C, G, 7-hydroxycadalenal, 3-methoxy-7-hydroxy-cadalenal,⁷⁾ fridelin, epifridelanol, taraxerol⁸⁾ 등이 알려져 있으며, Ulmaceae에 속하는 종들은 대개 물추출시 돌이나 그 이

상의 polyuronide로 구성된 다량의 점액질을 내기 때문에 emolient, demulcent, 영양물질의 성질을 가지고 있다.⁹⁾ 유근피를 민간에서는 利水, 水腫, 癰腫, 乳腺炎, 關節炎, 胃潰瘍 및 肝癌 등의 치료에 단방으로 또는 한방처방에 섞어서 사용하고 있으며,¹⁰⁻¹²⁾ 진통, 항부종, 항균 및 백혈구 유주억제작용¹³⁾과 그 열매에는 구충작용¹⁴⁾이 있음이 보고되었다.

최근 암에 사용되고 있는 화학요법제의 부작용 때문에, 새로운 항암제의 개발 및 기존 화학요법제와 병용하여 항암성을 증강시키고 부작용을 줄일 수 있는 방법들이 시도되고 있다.¹⁵⁻¹⁹⁾

본 실험에서는 유근피 *n*-BuOH분획의 항암작용 및 기존 항암제와 병용처리의 효과를 세포실험을 통하여 측정하였으며, 세포실험 및 동물실험을 통하여 부작용을 검토한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

검액조제—본 실험에 사용한 유근피 (*Ulmus pumila* L.)는 전북 완주군에서 봄에 채취하여 건조하여 사용하였다. 유근피 900 g을 MeOH 4 l로 5시간 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축하여 엑스를 얻었다. MeOH 엑스를 물과 *n*-BuOH(1:8)로 분획하여 rotary evaporator로 농축하여 *n*-BuOH분획 25 g (UBF)을 얻어 실험에 사용하였다. 동물실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포실험시에는 PBS용액에 용해시켜 여과멸균하여 사용하였다.

실험동물—본 실험에 사용한 mouse는 6~8 주령 ICR계 및 C₃H계(T 세포 실험시)를 구입하여, 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기구—실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), RPMI 1640(Gibco), mitomycin C(MMC, Sigma), cisplatin(CPT, Il Dong Pharm. Co.), 5-fluorouracil(5-FU, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), trypsin(Gibco), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), penicillin-streptomycin(Sigma), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) 등이며, 사용기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96-well, Nunc), disposable pipette(Bellco), disposable pasteur pipette(9 inch, Sigma), ELISA-Reader(Dynatech), CO₂ incubator(Vision Scientific Co.), inverted microscope(Nicon Co.), spectrophotometer(B&L) 등을 사용하였다.

세포주 및 세포배양조건 및 MTT 법에 의한 세포성장을 측정—전보¹⁶⁾와 동일한 방법으로 실시하였다.

HeLa, Hep G2 및 S 180 세포증식에 미치는 각 항암제의 IC₅₀ 농도 측정—세포증식을 50% 억제할 수 있는 각 항암제의 농도를 구하기 위해, mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil를 다양한 농도로 배양액에 희석하고 여과멸균시켜 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 부착된 세포에 처리하였다. 세포의 증식능에 미치는 각 항암제의 효과는 MTT 법으로 측정된 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 산정하였다.

HeLa, Hep G2 및 S 180 세포증식에 미치는 유근피의 직접효과 및 각 항암제와의 병용투여 영향—유근피 *n*-BuOH 분획을 다양한 농도로 배양액에 희석하여 각 세포에 처리하였으며, 항암제와 병용효과를 측정할 때는 유근피의 다양한 농도에 세포증식을 50% 억제할 수 있는 각 항암제의 농도를 동시에 부착된 세포에 처리하였다. 세포의 증식능에 미치는 각 항암제의 효과는 MTT 법으로 측정된 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 산정하였다.

마우스 섬유아세포(Balb/c 3T3) 증식에 미치는 유근피의 영향—Balb/c 3T3 세포의 증식능 측정은 세포를 96-well plate에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하여 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 유근피 *n*-BuOH분획을 배양액으로 희석하여 각 well에 처리하고, 48시간을 배양하였다. 세포배양 종료 4시간 전에 MTT 용액을 첨가하였으며(20 μ l/well), 배양종료 후 세포배양액을 제거하고 100 μ l의 0.04 N HCl-isopropanol을 첨가하여 세포에 의해 생성된 청색결정의 formazan을 용해시켰다. Formazan이 용해된 배양 plate의 각 well의 흡광도는 Microplate Reader로 570 nm에서 측정하여, 측정된 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 산정하였다.

T 임파구증식능의 측정—C₃H mouse를 경추탈구하여 비장을 적출하여 비장세포 부유액을 조제한 후, 비장세포 부유액을 96 well plate에 각 well당 5×10^5 세포가 되도록 조정하여, concanavalin A 1 μ g/ml, MMC 0.0625 μ g/well 및 각 농도의 유근피 *n*-BuOH 분획을 첨가한 후 37°C

의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양종료시 0.01 N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 다시 첨가하고 빛이 차단된 상태에서 37°C CO₂-incubator에서 18시간 처리한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장율을 %로 환산하였다.^{20,21)}

백혈구수의 측정—백혈구수를 측정하기 위해 mouse(숫컷) 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였으며, MMC투여군에는 mitomycin C 3 mg/kg을 복강에 1회 투여하였고, 실험군은 MMC투여군에 유근피 *n*-BuOH 분획을 100 mg/kg씩 7일간 1일 1회씩 경구투여하면서, 약물투여 전, 투여 후 1일, 3일, 5일 및 7일에 각각 mouse의 꼬리를 절단하여 heparinized microtube로 채혈한 후, 10 배량의 türk 액을 가하여 염색한 다음, hemocytometer로 백혈구수를 계산하였다.

간장, 비장 및 흉선의 중량 측정—마우스(숫컷) 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였으며, MMC투여군에는 mitomycin C 3 mg/kg을 0일째와 7일째 복강에 투여하였으며, 실험군에는 MMC투여군에 유근피 *n*-BuOH분획을 100 mg/kg을 생리식염수에 용해시켜 1일 1회씩 14일간 경구투여 후 장기의 중량을 측정하였다.

마우스 복강세포수 측정—유근피 *n*-BuOH분획을 100 mg/kg을 생리식염수에 용해시켜 마우스 9마리를 1군으로 하여 각각 3일간 1일 1회씩 경구로 투여하였으며, 대조군에는 생리식염수만을 투여하였다. 약물투여 3일 후 1, 2 및 4일째 복강세포수를 측정하였다. 마우스를 경추탈골하여 복강액을 DPBS 5 ml를 가하여 혼합한 다음 회수하여, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이를 DPBS에 부유시켜 hemocytometer로 복강세포수를 측정하였다.

Evans blue에 의한 모세혈관 투과성실험—마우스(암컷) 8마리를 1군으로하여, Whittle²²⁾ 및 Shimomura²³⁾의 방법에 따라, 대조군에는 생리식염수만을 실험군에는 유근피 *n*-BuOH분획을

100 mg/kg을 각각 경구투여하였고, 1시간 후에 1% Evans blue 5 ml/kg을 꼬리정맥에 주사하였다. 주사 후 즉시 0.6% acetic acid 10 ml/kg을 복강내에 주사하고, 1시간 후에 복강액을 생리식염수 5 ml로 세척하여 회수한 다음, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 620 nm에서 흡광도를 측정하여, 미리 작성한 검량선에 의해 누출된 Evans blue의 양을 비색정량하였다.

실 험 결 과

HeLa, Hep G2 및 S 180 세포에 미치는 유근피의 *n*-BuOH 분획의 직접효과—*n*-BuOH로 분획을 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ 및 10⁻³ g/ml의 농도로 가하고 배양하여 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때, HeLa세포에 대해서는 100.2±4.1, 100±6.2, 100±3 및 39.4±3.6%로 10⁻³ g/ml 이상 농도에서 암세포 증식억제작용이 유의성 있게 나타났으며, Hep G2 세포에 대하여는 99.8±1.8, 89.4±2.8, 56.4±3.3 및 43.9±4.1 %로 10⁻⁵ g/ml 이상 농도에서, S180 세포에 대하여는 97.6±1.1, 99.2±0.6, 97.6±2.2 및 84.8±3.5%로 10⁻³ g/ml 이상 농도에서 암세포 증식억제작용이 유의성 있게 나타났으며, 특히 HeP G2세포에 대하여 강력한 작용이 나타났다(Fig. 1).

HeLa, Hep G2 및 S180 세포를 50% 억제하는 각 항암제의 농도—각 세포를 50% 억제할 수 있는 각 항암제의 농도를 정하기 위해 각 well 당 세포 1×10⁴개를 넣고, mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil을 HeLa, Hep G2 및 S180세포에 대해 일정 농도간격으로 각각 가하고 배양하여 각 암세포를 50% 억제하는 농도를 얻어 이후의 실험에 사용하였다(Table I).

HeLa, Hep G2 및 S180 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C의 병용투여 효과—각 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C의 병용투여 효과를 알아보기 위해 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml를 각각 가하고 mitomycin C 농도를 HeLa 세포일 때는 0.31 μ g/ml를, Hep G2 세포일 때는 1.91 μ g/ml를, S180 세포일 때는 4.12 μ g/ml를 병용

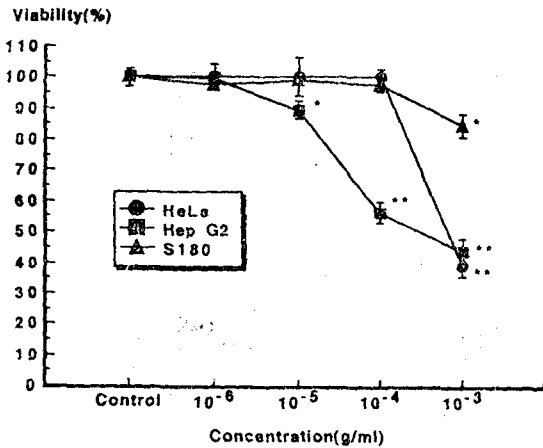


Fig. 1. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on HeLa, Hep G2 and S180 cells
Each bar represents the mean±S.E. of 4 assays.
; Significantly different from the control group(; p<0.05, **; p<0.001)

Table I. IC₅₀ of anti-cancer drugs on HeLa, Hep G2 and S 180 cells

Drugs	IC ₅₀ (μg/ml)		
	HeLa	Hep G2	S 180
Mitomycin C(MMC)	0.31	1.91	4.12
Cisplatin(CPT)	0.57	4.34	10.38
5-Fluorouracil(5-FU)	28.35	169.80	140.45

하여 배양하였다. Mitomycin C만 처리한 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때, 병용투여군은 HeLa 세포에서는 94.3±2.3, 96.5±2.2, 105.9±0.7 및 114.1±3.2%로 유의성이 없었으나, Hep G2 세포에서는 92.3±2.9, 79±1.7, 56.5±2.6로 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁶ g/ml 이상일 때 S 180 세포에서는 84±7.3, 80.1±3.8, 87±4.6%로 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁵ g/ml 이상일 때 암세포 증식억제작용이 mitomycin C만 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. 이는 Hep G2 세포나 S 180 세포에서는 mitomycin C만 처리하는것 보다 유근피 *n*-BuOH 분획을 병용하는 것이 더 효과적임을 의미하는 것이다(Fig. 2).

HeLa, Hep G2 및 S 180 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 cisplatin의 병용투여 효

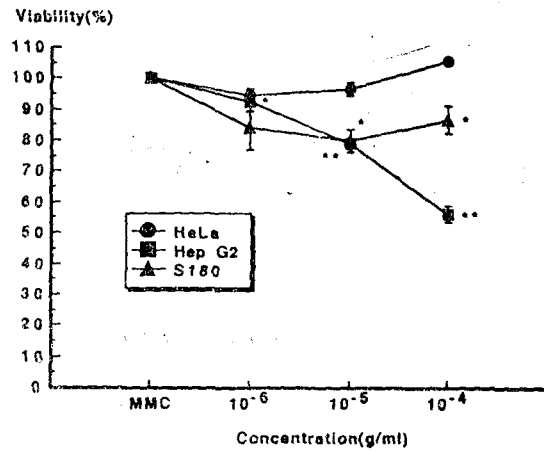


Fig. 2. The combined effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex and IC₅₀ of mitomycin C (MMC) on HeLa, Hep G2 and S180 cells
Each bar represents the mean±S.E. of 4 assays.
; Significantly different from the MMC treated group(; p<0.05, **; p<0.001).
IC₅₀ of MMC(HeLa 0.31, Hep G2 1.91, S180 4.12 μg/ml)

과—각 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 cisplatin의 병용투여 효과를 알아보기 위해 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml를 각각 가하고 cisplatin 농도를 HeLa 세포일 때는 0.57 μg/ml를, Hep G2 세포일 때는 4.34 μg/ml를, S 180 세포일 때는 10.38 μg/ml를 병용하여 배양하였다. cisplatin 만 처리한 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때, 병용투여군은 HeLa 세포에서는 101.1±1.0, 103.2±0.8 및 108±2.2%로, S 180 세포에서는 110.5±5.8, 113.5±6.7 및 113.7±6%로 유의성이 없었으나, Hep G2 세포에서는 102.8±2.1, 92.9±1.6 및 59.9±3.0%로 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁵ g/ml 이상 농도일 때 암세포 증식억제작용이 cisplatin만 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. 이는 Hep G2 세포에서는 cisplatin만 처리하는것 보다 유근피 *n*-BuOH 분획을 병용하는것이 더 효과적임을 의미하는 것이다(Fig. 3).

HeLa, Hep G2 및 S 180 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 5-fluorouracil의 병용투여 효과—각 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획과 5-fluorouracil의 병용투여 효과를 알아보기

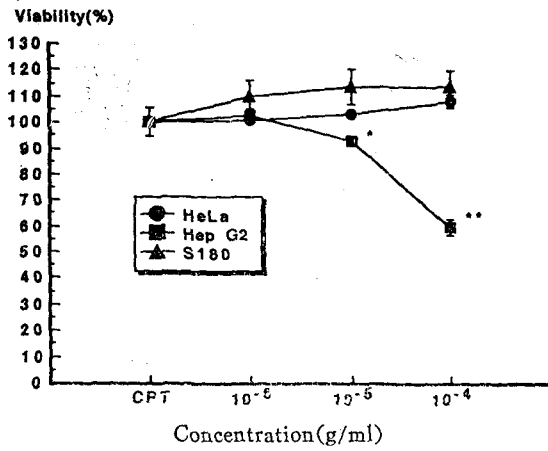


Fig. 3. The combined effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex and IC₅₀ of cisplatin(CPT) on HeLa, Hep G2 and S180 cells. Each bar represents the mean±S.E. of 4 assays. *; Significantly different from the CPT treated group(*; p<0.05, **; p<0.001). IC₅₀ of CPT(HeLa 0.57, Hep G2 4.34, S180 10.38 µg/ml)

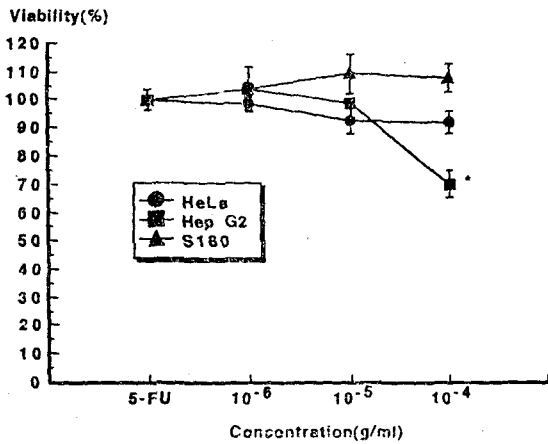


Fig. 4. The combined effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex and IC₅₀ of 5-fluorouracil (5-FU) on HeLa, Hep G2 and S180 cells. Each bar represents the mean±S.E. of 4 assays. *; Significantly different from the 5-FU treated group(p<0.01). IC₅₀ of 5-FU(HeLa 28.35, Hep G2 169.8, S180 140.45µg/ml)

위해 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml를 각각 가하고 5-fluorouracil 농도를 HeLa 세포일 때는 28.35 µg/ml를, Hep G2 세포일 때는 169.80 µg/ml를, S 180 세포일 때는 140.45

µg/ml를 병용하여 배양하였다. 5-Fluorouracil만 처리한 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때, 병용투여군은 HeLa 세포에서는 98.8±2.5, 92.6±4.5 및 91.6±3.9%로, S180 세포에서는 103.8±7.8, 109.2±7.1 및 107.7±4.9%로 유의성이 없었으나, Hep G2 세포에서는 103.4±2.5, 98.5±0.3 및 70.1±4.9%로 유근피 *n*-BuOH 분획 10⁻⁴ g/ml일 때, 암세포 증식억제작용이 5-fluorouracil만 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다. 이는 Hep G2 세포에서는 5-fluorouracil만 처리하는것 보다 유근피 *n*-BuOH 분획을 병용하는것이 더 효과적임을 의미하는 것이다 (Fig. 4).

Balb/C 3T3 세포에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 효과—3T3 세포의 증식에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 영향을 알아보기 위하여 유근피 각 분획을 처리하지 않은군을 100%로 하였을 때, 유근피 *n*-BuOH 분획의 농도가 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ 및 10⁻³ g/ml일 때 각각 102±1.8%, 98.7±2.2%, 92.5±3.8% 및 80.2±3.1%로 10⁻³g/ml 이상의 농도일 때 세포증식이 억제되었다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획이 고농도에서 정상세포의 증식을 억제할 수 있음을 의미하는 것이다 (Fig. 5).

T 임파구 증식능에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 효과—마우스의 비장세포 배양제를 이용하

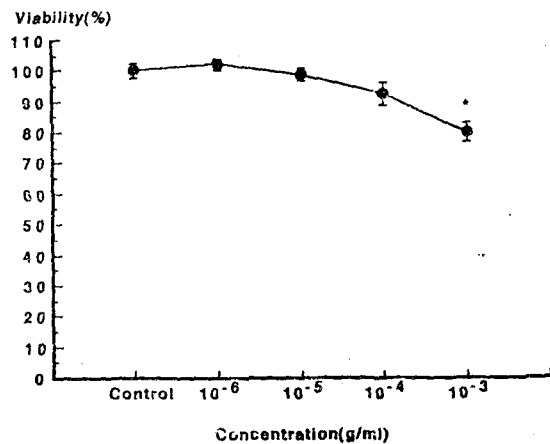


Fig. 5. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on Balb/c 3T3 cells. Each bar represents the mean±S.E. of 4 assays. *; Significantly different from the control group(p<0.01).

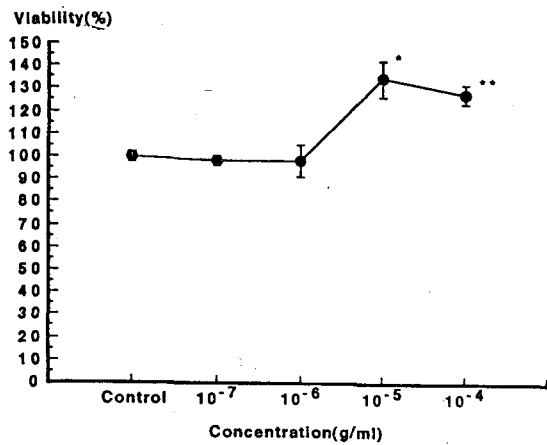


Fig. 6. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on T lymphocyte proliferation activity. Spleen cells obtained from C₃H mice were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS. Concanavalin A (1 μg/ml) was added with various dilution of the BuOH fraction at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C-CO₂ incubator for 48 hrs, followed by the addition of 20 μl of MTT and further incubation for 4 hrs. At the termination of culture, and 100 μl of 10% SDS and then culture plate was incubated for 18 hrs. Each bar represents the mean ± S.E. of 4 assays.

; Significantly different from the control group (; p<0.05, **; p<0.01).

여 T림파구 mitogen인 concanavalin A (1.0 μg/ml)를 첨가하여 배양한 뒤, MTT법으로 측정된 결과 Con A를 첨가한 대조군의 O.D.를 100%로 환산하였을 때, Con A를 첨가하지 않았을 경우에는 75.8 ± 2.0%이었으며, 유근피 n-BuOH 분획 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml을 가하였을 때, 98.6 ± 1.8, 98.5 ± 6.9, 134.9 ± 8.4 및 128.2 ± 4.2%로 10⁻⁵ g/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이는 유근피 n-BuOH 분획이 T림파구 증식능이 있음을 의미하는 것이다 (Fig. 6).

Mitomycin C 투여 mouse의 백혈구수에 미치는 유근피 n-BuOH 분획의 효과—유근피 n-BuOH 분획만을 투여 후 1, 3, 5 및 7일에 혈중 백혈구수를 측정된 결과, 유근피 n-BuOH 분획 투여 전의 백혈구수는 10840 ± 320 cells/ml 이었고, 투여 1일에 9660 ± 840 cells/ml, 3일에 10000

± 840 cells/ml, 5일에 12670 ± 810 cells/ml, 7일에 10400 ± 110 cells/ml로 정상치와 별 차이가 없었다 (Fig. 7).

Mitomycin (MMC) 투여 전, 투여 후 1, 3, 5 및 7일에 혈중 백혈구수를 측정된 결과, MMC

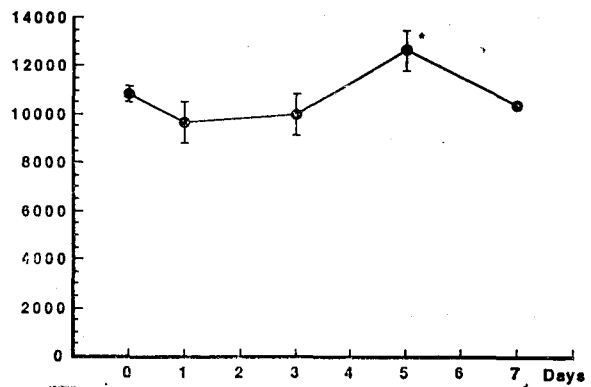


Fig. 7. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on WBC number in mice. Mice were administered 100 mg/kg/day of the BuOH fraction orally for 7 days. Each bar represents the mean ± S.E. of 10 mice.

*; Significantly different from the control group (p<0.05).

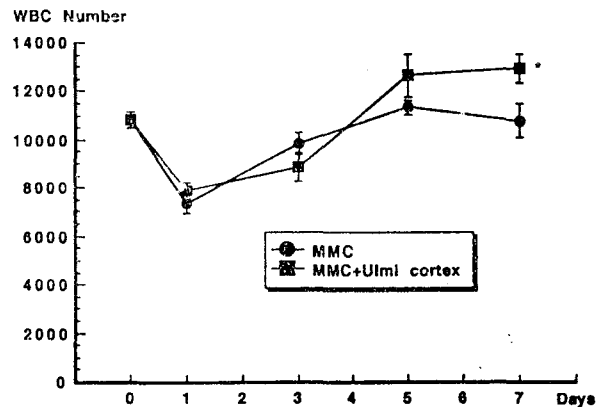


Fig. 8. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on leukopenia by MMC in mice. Mice were administered 100 mg/kg/day of the BuOH fraction orally for 7 days and were injected i.p. with 3 mg/kg of MMC only at 1st day. Each bar represents the mean ± S.E. of 10 mice.

*; Significantly different from the control group (p<0.05).

투여시 투여 전의 백혈구수는 10840 ± 320 cells/ml 이었고, MMC 투여 1일 후에 7360 ± 400 cells/ml 로 감소되었다가, 3일 후에 9860 ± 450 cells/ml, 5일 후 부터는 11350 ± 310 cells/ml로, 7일 후에는 10810 ± 720 cells/ml로 정상치로 회복되는 경향이었고, MMC와 유근피 *n*-BuOH 분획을 병용 시에는 투여 1일후에 7580 ± 330 cells/ml로 감소되었다가, 3일 후에 8870 ± 570 cells/ml, 5일후에 12660 ± 880 cells/ml, 7일후에 12960 ± 610 cells/ml로 MMC 투여군과 별 차이가 없었다(Fig. 8).

Mitomycin C 투여 mouse의 간장, 비장 및 흉선의 중량에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 효과—간장무게는 대조군이 1436 ± 116.0 mg, 유근피 *n*-BuOH 분획투여군은 1585.9 ± 112.5 mg, mitomycin C투여군은 1460.6 ± 130.5 mg, 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin 병용투여군은 1159.8 ± 75.1 mg로 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin 병용투여군에서 대조군에 비해 간장무게가 유의성있게 감소하였으며, 비장무게는 대조군이 191.8 ± 22 mg, 유근피 *n*-BuOH 분획투여군은 192.4 ± 17 mg, mitomycin C투여군은 166.4 ± 30 , 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin 병용투여군은 153.1 ± 20 mg으로, 대조군에 비해 별 변화가 없었으며, 흉선의 무게는 대조군 39.2 ± 3.4 mg인데 비해 유근피 *n*-BuOH 분획투여군은 41.1 ± 7 mg, mitomycin C투여군은 21.5 ± 3.1 mg, 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C 병용투여군은 27.6 ± 1.9 mg으로 mitomycin C 단독투여군과 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C 병용투여군 모두에서 대조군에 비해 감소하였다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획이 간장독성을 일으킬 수 있음을 의미하는 것이며, mitomycin C에 의한 흉선의 왜축현상을 회복시켜 주지 못함을 의미하는 것이다(Table II).

Mouse 복강세포수에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 효과—유근피 *n*-BuOH 분획을 투여하지 않은 대조군의 복강세포수($\times 10^6$)는 0, 1, 2 및 4일 후 각각 0.99 ± 0.07 , 1.08 ± 0.14 , 2.01 ± 0.09 및 2.86 ± 0.24 cells/ml로 점차 증가하였으나, 유근피 *n*-BuOH 분획 투여군은 각각 0.99 ± 0.07 , 1.23 ± 0.19 , 3.02 ± 0.16 및 2.97 ± 0.26 cells/ml로 2일째 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하

Table II. Effect of UBF and mitomycin C(MMC) on organ weight in mice

Samples	Liver(mg)	Spleen weight(mg)	Thymus (mg)
Control	1436.0 ± 116.0	191.8 ± 22	39.2 ± 3.4
UBF	1585.9 ± 112.5	192.4 ± 17	41.1 ± 7
MMC	1460.6 ± 130.5	166.4 ± 30	$21.5 \pm 3.1^*$
UBF+MMC	$1159.8 \pm 75.1^*$	153.1 ± 20	$27.6 \pm 1.9^*$

Mice were administered 100 mg/kg/day of UBF orally for 14 days, and were injected i.p. with 3 mg/kg of MMC at 1 and 7 days.

The data represents the mean \pm S.E. of 10 mice.

*; Significantly different from the control group. ($p < 0.05$)

UBF; *n*-BuOH fraction of Ulmi Cortex

MMC; mitomycin C(3 mg/kg)

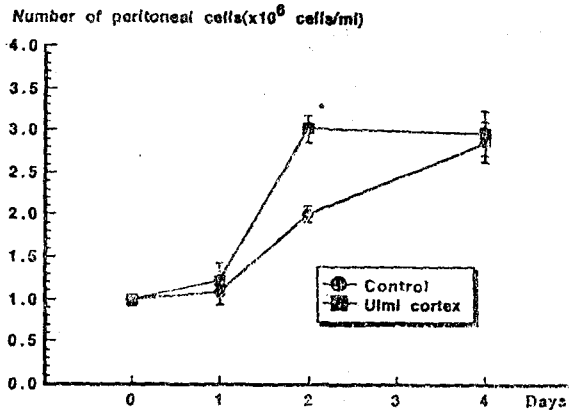


Fig. 9. Effect of the BuOH fraction of Ulmi Cortex on the number of peritoneal exudate cells in mice

Mice were administered 100 mg/kg/day of the BuOH fraction orally for 3 days.

Each bar represents the mean \pm S.E. of 9 mice.

*; Significantly different from the control group($p < 0.001$).

였다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획 투여군이 면역세포의 활성화에 영향을 줄 수 있음을 의미하는 것이다(Fig. 9).

Evans blue에 의한 모세혈관 투과성에 미치는 유근피 *n*-BuOH 분획의 효과—대조군의 Evans blue 누출량은 12.46 ± 2.3 μ g/ml인데 비해, 검액 100 mg/kg 투여군은 5.83 ± 0.78 μ g/ml로 유의성 있게 억제되었다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획이 모세혈관 투과성 억제작용이 있음을 의미한다(Table III).

Table III. Inhibitory rate of UBF on the permeability of Evans blue into peritoneal cavity by 0.6% acetic acid in mice

Drug	Dose(mg/kg, p.o.)	Leakage of E.B. ($\mu\text{g/ml}$)
Control	—	12.46 \pm 2.3
UBF	100	5.83 \pm 0.78*

; Mean \pm S.E. of 8 mice.; Statistically significant compared with the control group($p < 0.05$).

고 찰

유근피 *n*-BuOH 분획은 HeLa 세포와 S180 세포에서 10^{-3} g/ml 이상의 고농도에서 암세포증식을 억제하는데 비해, 간암세포인 Hep G2 세포에서는 10^{-5} g/ml 이상의 농도에서 암세포 억제작용을 강력하게 나타내어 간암세포에 특이성이 있음을 알 수 있었다. 또한 유근피 *n*-BuOH 분획 각 농도와 각 암세포를 50% 억제하는 항암제의 농도를 병용처리시, HeLa 세포에서는 mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil을 각각 병용시각 항암제 단독처리군에 비해 별 차이가 없었으나, 간암세포인 Hep G2 세포에서는 mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil을 각각 병용시각 항암제 단독투여군에 비해 항암작용이 강력하여졌다. S180 세포에서는 mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil을 각각 병용시각 mitomycin C와 병용시각만 mitomycin C 단독투여군에 비해 항암작용이 강력하여졌다. 이 결과에서도 유근피 *n*-BuOH 분획이 간암세포에 특이성이 있음을 알 수 있었다.

이러한 항암작용을 나타내는 유근피 *n*-BuOH 분획이 정상세포에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여, 마우스 섬유아세포인 Balb/c 3T3 세포에 처리한 결과 10^{-3} g/ml의 고농도에서만 대조군에 비해 *n*-BuOH 분획이 80.2%로 정상세포에 약간의 독성을 나타냈으나 저농도에서는 별영향이 없었다.

일반적으로 항암제들은 면역세포에 독성을 나타내어 면역능 저하현상을 나타내기 때문에, 유근피 *n*-BuOH 분획의 T림파구에 미치는 영향을 살펴 보았다. 유근피 *n*-BuOH 분획은 10^{-5} g/ml

농도 이상에서 T림파구 증식능을 촉진시켜 기존 항암제들이 나타내는 면역능 저하 현상을 나타내지 않았으나, 또다른 면역능에 대하여는 차후 검토 하여야 할 것이다.

또한 항암제 사용시 부작용으로 나타나는 백혈구수 감소에 대한 유근피 *n*-BuOH 분획의 영향을 살펴 본 결과 단독 투여시에는 백혈구수에 별 영향을 주지 않았으며, 항암제 mitomycin C와 병용시에는 mitomycin C에 의한 1일째의 백혈구 감소 현상을 회복시켜 주지는 못 하였다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획을 암치료에 사용시 백혈구수 감소를 야기시키지 않음을 의미한다 할 수 있으나 투여 용량 및 기간에 따른 변화를 검토하여야 할 것이다.

약물에 의해 독성을 받기 쉬운 간장 및 면역기능을 관찰하는 비장과 흉선의 중량측정에서는 유근피 *n*-BuOH 분획 자체적으로는 간장, 비장, 흉선의 중량에 별 영향을 주지 않았으며, mitomycin C 단독 투여군은 간장의 중량에 별 영향을 주지 않았으나 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C 병용투여군은 간장의 중량을 mitomycin C 단독투여군에 비해 유의성 있게 감소시켰는데 이는 mitomycin C의 간장독성을 증가시킬 수 있음을 의미한다. 세포에 대한 작용에서도 간암세포에서 특히 강력한 작용을 나타낸 점을 연관시켜볼 때 유근피가 간에 대한 친화성이 있음을 시사하는 것이라 할 수 있으나 자세한 기전은 추후 연구 검토되어야 할 것이다. 또한 mitomycin C 단독 투여군 및 유근피 *n*-BuOH 분획과 mitomycin C 병용투여군은 비장의 중량에는 별 영향을 주지 않았으나, 흉선의 중량은 유의성 있게 감소시켰다. 이는 유근피 *n*-BuOH 분획이 mitomycin C의 독성에 별 영향을 주지 못함을 의미하는 것이라 할 수 있다.

복강세포에는 lymphocyte, macrophage 및 polymorphonuclear leukocyte(PMN) 등이 존재하고 있으며²⁴⁾, 유근피 *n*-BuOH 분획이 총 복강세포수를 증가시켰다는 것은 면역세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다. 유근피 *n*-BuOH 분획에 의해 총 복강세포수가 증가하는 현상이 기염성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 Evans blue에 의한 모세혈관투과

성실험을 실시한 결과 유근피 *n*-BuOH 분획은 모세혈관을 수축시키는 작용을 나타냈으며, 이는 유근피 *n*-BuOH 분획의 총복강세포수 증가가 기염성에 의한 것이 아님을 의미하는 것이다.

결 론

HeLa 세포, Hep G2 세포 및 S 180 세포에 대한 유근피 *n*-BuOH 분획의 항암작용 및 기존항암제인 mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil 과 병용시의 효과에 대한 실험결과는 다음과 같다.

1. HeLa, Hep G2 및 S 180 세포의 증식을 50% 억제하는 항암제의 농도는 각각 mitomycin C 0.31, 4.12 및 1.91 μ g/ml, cisplatin 0.57, 10.38 및 4.34 μ g/ml, 5-fluorouracil 28.35, 140.45 및 169.80 μ g/ml 이었다.

2. 유근피 *n*-BuOH 분획은 HeLa 세포 및 S 180 세포를 10^{-3} g/ml 농도에서, Hep G2 세포를 10^{-5} g/ml 이상의 농도에서 세포 증식을 억제하였다.

3. 유근피 *n*-BuOH 분획은 mitomycin C, cisplatin 및 5-fluorouracil 단독처리시 보다, 이들 항암제와 병용 처리시 Hep G2 세포 증식 억제 작용을 증강시켰다.

4. 유근피 *n*-BuOH 분획은 Balb/c 3T3 세포에 저농도에서는 별 영향을 주지 않았으며, T 입과구증식능은 증가시켰다.

5. 유근피 *n*-BuOH 분획은 백혈구수, 간장, 비장 및 흉선의 중량에는 별 영향을 주지 않았으며, 총복강 세포수는 증가시켰다.

이상의 실험결과 유근피 *n*-BuOH 분획은 암세포, 특히 간암세포인 Hep G2 세포 증식 억제 작용이 강력하였으며, 정상세포인 Balb/C 3T3 세포와 면역세포인 T 세포에 별 영향을 주지 않았고, 항암제와 병용시 항암제의 작용을 증강시켰다.

(1994년 3월 12일 접수 : 3월 26일 수리)

참 고 문 헌

1. 保健社會部 : 大韓藥典外 生藥規格集(韓藥), p. 215

- (1987).
2. 金在佶 : 原色 天然藥物大事典(下卷), 連明出版社, p. 154 (1984).
 3. 辛民教 : 原色臨床本草學, 永林社, p. 615 (1984).
 4. 宋柱澤, 金炳友, 鄭炫培, 秦熙成 : 韓國植物大寶鑑(上卷), 第一出版社, p. 168 (1987).
 5. 小學館編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, pp. 2294, 2592, 2772(昭和 60年).
 6. Son, B.W., Park, J.H. and Zee, O.P.: *Arch. Pharm. Res.* 12, 219 (1989).
 7. Chen, F.C., Lin, Y.M. and Chen, A.H.: *Phytochemistry* 11, 1190 (1972).
 8. Kim, S.H., Hwang, K.T. and Park, J.C.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 229 (1992).
 9. Trease, G.E. and Evans, W.C.: *Pharmacognosy*, Bailliere Tindall, 12th, pp. 173, 367 (1985).
 10. 許 浚 : 東醫寶鑑, 東方書店, p. 1216 (1960).
 11. 黃度淵 : 證脈 方藥合編, 南山堂, p. 235 (1989).
 12. 文化放送 : 民間療法大全, 금박출판사, p. 305 (1987).
 13. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식 : 생약학회지 21, 217 (1990).
 14. Tsusa, Y., Goto, Y., Mikage, M., Kondo, K.: *Shoyakugku Zasshi* 45, 270 (1991).
 15. Ahn, M.S., Kim, S.G., Eun, J.S., Lim, J.P., Yum, J.Y., Suh, E.S., Oh, C.H. and So, J.N.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 158 (1992).
 16. Eun, J.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 248 (1992).
 17. Eun, J.S. and So, J.N.: *Chunju Woosuk Univ.* 14, 45 (1992).
 18. Eun, J.S., Kim, H.W., So, J.N. and Lee, S.J.: *Chunju Woosuk Univ.* 15, 62 (1993).
 19. Komiyama, K., Hirokawa, Y. and Yang, Z.B.: *Japan J. Cancer Chemother.* 15, 1715 (1988).
 20. Madwell, B.R.: *Tumor Immunol.* 69, 213 (1982).
 21. Mizel, S.B., Opeheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: *Immunol.* 120, 1497 (1979).
 22. Whittle, B.A.: *Brit. J. Pharmacol.* 22, 246 (1964).
 23. Shimomura, K.: *J. Pharm.* 2A, 837 (1972).
 24. Godon, S.: *Handbook of experimental immunology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford (1978).