

## Sarcoma-180 유발 생쥐에 대한 Cyclophosphamide, Picibanil 및 Tubercin-3의 투여 효과

이인선<sup>†</sup> · 김혁일 · 황 기

계명대학교 식품가공학과

### Anti-Tumor Effect of Cyclophosphamide, Tubercin-3, and Picibanil on Sarcoma-180 Bearing Mice

In-Seon Lee<sup>†</sup>, Hyuk-Il Kim and Key Whang

Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

#### Abstract

This study was carried out to determine the efficacy of combined treatment of cyclophosphamide with tubercin-3 and or picibanil. One hundred sixty sarcoma-180 bearing mice were divided eight groups. Each group received saline, tubercin-3, picibanil, and cyclophosphamide alone and/or received cyclophosphamide with tubercin-3, with picibanil or with both tubercin-3 and picibanil, respectively. Average surviving time of each group of animals was as follows : control was 10.9days, tubercin-3 was 15.1days, picibanil was 12.6days, and cyclophosphamide was 17.9days. In combined therapy that cyclophosphamide injected with tubercin-3, the surviving time was 26.8days and in the case of other therapy that cyclophosphamide injected with picibanil, the surviving time was 21.9day and cyclophosphamide treated with both tubercin-3 and picibanil, the surviving time was found to be 18.2days. Conclusively, the therapeutic potentiation seemed to be extended when combined treatment of the chemotherapeutics cyclophosphamide with either one of immunotherapeutics tubercin-3 or picibanil was tried. Combination of tubercin-3 and picibanil showed to be antagonistic each other. Yield of ascites fluid were determined 7days after injection of sarcoma-180 ascites tumor cells. Administration of cyclophosphamide, tubercin-3, and picibanil alone and their various combinations reduced the yield of ascites fluid except for picibanil group.

**Key words** : sarcoma-180, cyclophosphamide, picibanil, tubercin-3

#### 서 론

현재 암의 치료는 수술적, 화학적 그리고 면역학적 치료법의 3종을 각각 또는 병합으로 사용하고 있다. 고형 종양의 치료에 있어서 병합요법의 주된 개념은 수술이나 방사선 치료 등 국소적 치료에 화학요법이나 면역요법을 보조적으로 사용하는 것이다. 그 중 면역요법은 가장 부작용이 없는 방법으로 생각되나 종류가 다양하여 그 작용기전이 상이한 면역요법제의 병합사용의 여부가 검토되고 있다<sup>1)</sup>. Balner 등<sup>2)</sup>은 실험동물에 유도된 암에 BCG 접종이 유효하다고 보고하였으며 이 연구 결과를 기반으로 Morton<sup>3)</sup>과 Mathe<sup>4)</sup>도 인체암의

치료에 BCG 접종을 시도하여 좋은 성과를 거두었다. 현재 세계 여러지역에서는 BCG 접종을 암의 치료 목적으로 여러 환자에게 실시하고 있으며 이러한 시도에 관한 긍정적인 평가도 적지않게 보고되고 있다<sup>5)</sup>. 그러나, BCG의 접종은 때때로 오한, 발열, 전신권태 등의 부작용과 주사부위의 동통 또는 국소 염증 반응 등이 문제점으로 보고되고 있어 비교적 느리게 진행되는 암 환자의 치료 시에는 좋은 효과를 거두지 못하고 있다. 이런 문제점을 극복하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며 Weiss 등<sup>6)</sup>은 BCG균을 methanol로 추출하여 그 잔사를 methanol extracted residue(MER)이라 하고 암 치료에 사용하기 시작하였고 일본의 Azuma 등<sup>7)</sup>은 BCG균의 세포막 물질을 분리하여 사용하였다. 1973년 정<sup>8)</sup>은 사람에게 발생하는 유독 결핵균 H37 RV에서 복합 단

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

백물질인 tubercin-3를 분리하여 이를 여러 암환자와 동물 등에 사용하였을 때 BCG의 접종시 나타나는 부작용을 극소로 감소시켰다고 보고하였다. 일반적으로 BCG계의 물질은 그 작용 기전이 T-세포를 활성화시키는 것으로 밝혀지고 있다<sup>9)</sup>.

한편 *Streptococcus hemolyticus*에서 생성되는 streptolysin S가 carcinoma의 이식을 억제한다는 보고를 Koshimura<sup>10)</sup>가 하였으며 Sakurai 등<sup>11)</sup>은 penicillin을 처리한 *Streptococcus* 균체 (group A)를 OK-432라 명명하고 생체와 실험적 동물암 및 조직배양에서 항암효과가 있다고 보고하고 이를 임상에서 사용하기 위해 개발하고 있다. OK-432는 약간의 백혈구 감소 및 빈혈을 야기시킨다고 하나 그 부작용은 미미하여 실지로 임상에 많이 사용되고 있다. OK-432의 작용기전에 관하여서는 많은 연구가 진행되고 있으며 Ishii 등<sup>12)</sup>의 보고에 의하면 그 주된 작용점은 T 세포와 macrophage의 활성화에 있다고 한다. Cyclophosphamide는 가장 오래된 항암 화학요법제의 하나로 알킬화를 하며 세포의 전주기에 동일하게 작용하는 것으로서 비교적 부작용이 적고 안전성이 있어 여러종류 암에 사용되고 있다. Maulight와 Hersh 등<sup>13)</sup>은 화학요법제와 면역요법제의 병합투여가 이들을 단독으로 사용하였을 때 보다 그 치료 효과를 증가시킨다고 보고하였다. 최근에는 이러한 약제들의 부작용을 해결하기 위해 식용식물이나 약용식물 중의 성분이 항암 작용 상승효과가 있는지를 연구하거나 또는 quercetin 등의 flavonoid가 암의 promotion 억제에 어떠한 영향을 미치는 가를 연구하고 있다<sup>14-16)</sup>. 본 연구에서는 생쥐에 Sarcoma-180을 유발하여 이에 대한 각각 그 작용기전이 상이한 tubercin-3와 OK-432를 병합하여 투여함으로써 생존연장에 대한 효과를 검토하고자 하였으며 아울러 화학요법제인 cyclophosphamide 와도 병합사용하여 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 시약

평균 체중 30g 전후의 Swiss Webster종 마우스를 화학연구소로부터 분양받아 사용하였다. 이들 동물은 정기적인 검사에서 드물게 *Staphylococcus epidermidis*가 발견 될 뿐 그외의 세균, 마우스의 바이러스, 마이코플라즈마 그리고 기생충은 가지고 있지 않았다. Cyclophosphamide는 일본 시오노기 제약 회사제, picibanil은 중외제약 제품, 그리고 tubercin-3는 정<sup>8)</sup>의 방법에 따라 제조한 것을 각각 사용하였다.

### 종양세포

종양세포는 sarcoma-180 복강암세포(이하 종양세포)를 사용하였고 10<sup>4</sup>개의 종양세포를 증식시켰으며 20일 간격으로 계대 배양하였다. 준비된 암세포 원액은 Hank's balanced salt solution(HBSS, GIBCO, USA)를 이용하여 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 활성종양 세포수의 계측은 세포현탁액과 0.4% trypan blue(GIBCO, USA)액을 동량 혼합하여 혈구계산기로 현미경 관찰하였다.

### 실험군 분류와 항암제 투여

모든 실험 동물은 15% sarcoma-180 암세포 부유액 0.2ml를 복강내에 주입함으로써 복수암을 유발하였다. 대조군을 포함해서 각 실험군을 면역요법제와 화학요법제를 단독 혹은 병합투여하는 8개군으로 나누어 20마리씩 분리 수용하였다. 실험군에 대한 처치는 암세포 접종 후 48시간 경과 후 부터 시작하여 격일로 1일 1회씩 3회 실시하였다. Tubercin-3는 0.5 $\mu$ g, picibanil은 0.1mg, 그리고 생리식염수는 0.2ml를 각각 피하에 주사하였으며 cyclophosphamide는 3.0mg을 복강내에 주사하였다. 동물에 암세포를 이식한 후 12시간 간격으로 복수암이 발전하는 양상을 조사하고 생존시간을 기록하였다.

### 복수액의 채취

마우스의 복수액은 sarcoma-180 암세포 이식 후 7일 부터 게체별로 채취하여 처리 보존하였다. 실험군의 분류와 처치는 생명연장 실험과 같이하고 19gauge 주사침을 가능한 한 복벽 가까이 낮게 삽입하여 자연적으로 유출되는 복수액을 얼음편축에 보존된 MacCartney병에 직접 받아서 정치하고 세포성분과 지방층을 제거한 후 5°C에서 보존하였다.

## 결과 및 고찰

생쥐에 sarcoma-180 복수암세포를 이식한 후 면역요법제인 tubercin-3와 picibanil 그리고 화학요법제인 cyclophosphamide를 투여하고 그 생존 연장효과를 관찰하였다. 대조군은 sarcoma-180 세포를 이식한 후 평균 10.9일까지 생존하였고 tubercin-3를 단독으로 투여한 군은 15.1일 까지 생존함으로써 tubercin-3 단독 투여로서도 대조군에 비하여 약 39%의 생존기간이 연장됨을 볼 수 있었고 picibanil 단독 투여군에서도 생존일수의 평균이 12.6일로서 대조군에 비하여 약 16%

정도 연장되었다(Table 1, Fig. 1). 면역요법제들과 화학요법제를 복합적으로 사용한 경우의 실험 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Tubercin-3와 picibanil을 병합하여 투여한 동물군의 평균 생존일수는 8.3일로서 24% 정도 생존일수가 단축됨으로써 면역요법제의 단독투여군이나 대조군에 비하여 오히려 생존일수가 짧아졌다. 화학요법제인 cyclophosphamide를 단독으로 투여한 동물군의 평균 생존일수는 17.9일로서 이었으며, 64

%의 생존 연장이 있었다. 화학요법제인 cyclophosphamide와 면역요법제인 tubercin-3를 병합하여 투여한 동물군의 평균 생존일수는 26.8일로서 대조군에 비하여 146%의 연장을 보였고 cyclophosphamide와 picibanil을 병합한 군의 생존일수는 21.9로서 대조군에 비하여 101%의 연장을 보이고 있다. Cyclophosphamide의 투여에 대하여 tubercin-3와 picibanil을 동시에 투여시 평균 생존일수는 18.2일로서 cyclophosphamide

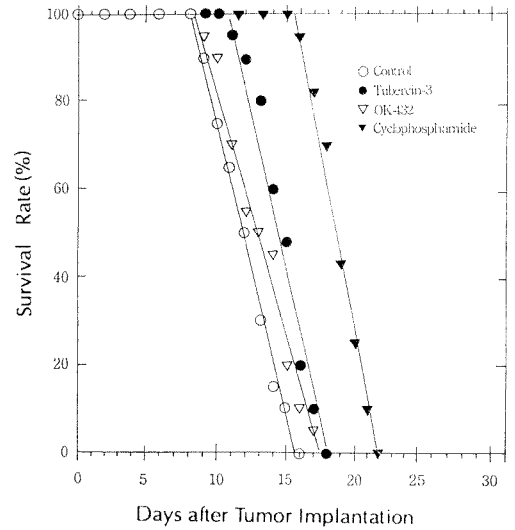
**Table 1. Effect of the tubercin-3, picibanil and cyclophosphamide administration on the average surviving times and amount of ascitic fluids obtained from sarcoma-180 ascites tumor**

Experimental group <sup>a</sup>	Life span (days)	Survival rate (%)	Ascitic fluids (ml) <sup>b</sup>
I	10.9±2.1	100	8.61±2.89 <sup>c</sup>
II	15.1±2.0	139	7.24±1.79
III	12.6±2.1	116	8.13±4.82
IV	17.9±1.6	164	5.30±2.82
V	8.3±1.5	76	6.92±3.76
VI	26.8±1.5	246	3.79±2.35
VII	21.9±2.2	201	4.25±3.19
VIII	18.2±1.7	167	4.37±2.46

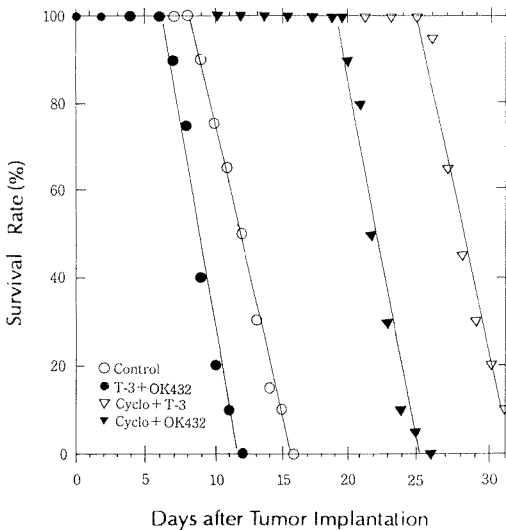
<sup>a</sup> Experimental group indicates the control (I), tubercin-3 (II), picibanil (III), cyclophosphamide (IV), tubercin-3 + picibanil (V), cyclophosphamide + tubercin-3 (VI), cyclophosphamide + picibanil (VII), and cyclophosphamide + tubercin-3 + picibanil (VIII)

<sup>b</sup> Yield of ascites fluid were determined to injection of sarcoma-180 ascites tumor cells after 7days

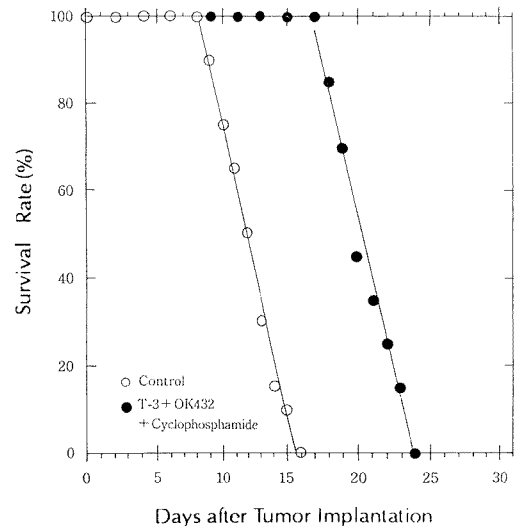
<sup>c</sup> Values are mean±S.D from 20mice



**Fig. 2. Cumulative mortality for groups with two treatment combination.**  
Experimental conditions are the same as Table 1.



**Fig. 1. Cumulative mortality for groups with single treatment.**  
Data for all experiments represent survival rate(%) of 20 mice with sarcoma-180 ascites tumor cells. Experimental conditions are the same as Table 1.



**Fig. 3. Cumulative mortality for groups with three treatment combination.**  
Experimental conditions are the same as Table 1.

와 picibanil의 투여 또는 cyclophosphamide와 tubercin-3 투여군에 비하여 짧았으나 대조군에 비하여서는 약 67%의 연장을 보였다(Fig. 3). 그러나, cyclophosphamide와 tubercin-3와 picibanil을 동시에 투여한 동물군의 생존일수는 cyclophosphamide 단독 투여군과 같았다.

Sarcoma-180을 복강내에 주사한 후 일주일 부터 생존일수내에 채취된 복수액의 양을 조사하였다. Picibanil 및 tubercin-3 단독투여군은 대조군에 비해 약간 감소하였으며 다른 군에서는 약 50% 정도 복수량이 감소하였고 복수량이 많아질수록 생존일수가 반비례적으로 감소함을 관찰할 수 있었다. 대조군의 복수액 생산량은 Tung<sup>15)</sup>의 Koyhole limpet homocyanin에 대한 성적에 비하여 낮았다. 대조군에서의 복수량이 연구자에 따라 차이가 나는 것은 실험동물이나 시술의 차이에 의한 것으로 추정된다. 일찌기 Old 등<sup>17)</sup>은 동물에 화학약품을 사용하여 유발한 암에 대하여 불포화지방산을 주사한다는지 피부에 약한 X-선을 조사함으로써 발생한 암의 일시적 감소내지 치유함을 관찰하고 이들 지방산과 X-선의 조사로 일어나는 조직 파괴물이 망상내피계(reticulo endothelial system) 세포들을 자극하여 암 조직의 감소를 일으킨다고 주장함으로써 암 치료에 있어서의 비특이적 면역요법의 가능성을 소개하였다. Morton 등<sup>18)</sup>은 BCG의 접종이 동물에 이식한 암종을 치료하였다고 주장하였고 그 후 Mathe 등<sup>19)</sup>은 BCG를 인체에 발생한 암종, 특히 백혈병과 악성 흑색종의 치료에 사용하여 그 유효성을 입증함으로써 현재 세계 여러 곳에서 BCG 접종을 항암 목적으로 각종 암환자들에게 사용되고 있으며 그 작용기전에 관하여서도 많은 연구가 진행되고 있다. 한편, BCG의 접종으로 발생하는 발열, 전신 권태, 과민반응 등의 부작용을 극복하기 위한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 그 예로서 Weiss 등<sup>6)</sup>의 methanol 추출물(MER), Azuma 등<sup>7)</sup>의 세포막 물질(CWS), 정<sup>8)</sup>의 tubercin-3의 연구 결과가 보고되고 있으며 이의 실용화도 적극 검토중이다. 이러한 BCG계 물질의 항암 기전은 망상내피 세포계 중 주로 T세포계를 자극하고 더불어 macrophage도 활성화시키기 때문이라고 보고되고 있다<sup>9)</sup>. 이 외에도 현재 시판되고 있는 세균성 비특이적 면역요법제의 하나인 picibanil(일명 OK-432)은 *Streptococcus hemolyticus*의 일종의 건조균체로서 일본의 Sakurai 등<sup>11)</sup>이 개발한 것이며 Koshimura 등<sup>10)</sup>은 단독(丹瀆)에 걸린 암환자의 암종이 쇠퇴함을 관찰하고 단독균이나 그 균의 배설물이 암종 치료에 사용할 수 있을 것으로 보고하여

*Streptococcus hemolyticus*의 항암성이 연구되고 있다. 최근에 picibanil의 작용은 역시 비특이적 면역 자극에 있으며 그 작용의 주요한 점은 macrophage의 활성화에 있다고 한다<sup>12)</sup>. T세포에 주 작용점이 있는 tubercin-3와 macrophage, T세포 및 B세포 전반에 관하여 작용한다는 picibanil의 병합치료가 각각 면역요법제의 단독 치료에 비하여 더욱 유효할 것을 기대하여 실시한 본 연구에서 두가지 면역요법제의 병합투여가 한가지씩 단독으로 투여한 군에 비하여 오히려 나쁜 결과를 보여 주어 이는 대단히 흥미있는 결과라고 생각한다. 본 실험에서 사용한 화학요법제 cyclophosphamide는 가장 오래된 항암 화학요법제의 하나로 비교적 부작용이 적고 안전성이 있으며 그 작용이 광범위하여 여러가지 암종에 사용되어왔다. Pantarotto 등<sup>20)</sup>은 cyclophosphamide는 생체내 항암효과를 가지는 물질로서 활성 알킬화대사산물(active alkylating metabolite)의 혈액, 각종 장기 및 종양내 농도를 측정된 결과 반감기가 1시간 이내에 최고 1~5% 정도 농도가 감소함을 보고하였다. Maulight와 Hersh<sup>13)</sup>은 화학요법제와 면역요법제의 병합 사용이 각각 단독 요법 보다 좋은 효과를 낸다는 것을 발표하였다. 본 실험에서도 cyclophosphamide와 tubercin-3, 또는 picibanil과의 병합요법을 실시한 동물군은 cyclophosphamide나 면역요법을 각각 단독으로 실시한 동물군에 비하여 그 생존기간이 길었다. 그러나 cyclophosphamide와 두가지 면역요법제를 겸용한 동물군의 생존 연장은 cyclophosphamide 단독 치료군과 별 차이를 나타내지 못한 것은 약물 역동학에 영향을 주는 인자가 많고 약물효과에 대한 정확한 생화학적 기전이 알려지지 않았기 때문에 투여량, 조직내 농도, 치료효과 사이의 상관 관계는 대단히 복잡한 때문이다. 두가지 면역요법제의 병합치료는 앞으로 여러가지 암종류와 생쥐 외의 동물에서도 재검토하여야 하며 나아가서는 식용식물이나 약용식물의 항암성내지는 면역증강물질의 *in vivo* 실험의 기초가 되리라 사료된다.

## 요 약

생쥐에 sarcoma-180을 유발시키고 각각 그 작용기전이 상이한 면역요법제 tubercin-3와 picibanil의 단독 요법과 병합 요법 그리고 화학요법제 cyclophosphamide와의 병합 사용의 효과를 검토하였다. Sarcoma-180 유발 후의 생쥐의 생존일수의 평균치는 대조군이 10.9일, tubercin-3 투여군이 15.1일, picibanil 투여군이 12.6일, 그리고 tubercin-3와 picibanil의 병합 투여군은

8.3일 이었다. Cyclophosphamide 단독 투여군의 생존 일수는 17.9일이었고 cyclophosphamide와 tubercin-3 병합군은 26.8일, cyclophosphamide와 picibanil 병합군은 21.9일로서 상당히 연장되었으나 cyclophosphamide와 두가지 면역요법제를 같이 사용한 동물군의 생존일은 평균 18.2일로서 면역요법제를 사용하지 않은 군과 같았다. Sarcoma-180을 복강내에 주사하고 7일 후 생존일수 내에 채취된 복수액의 양을 조사한 결과 picibanil 및 tubercin-3 단독투여군은 대조군에 비해 약간 감소하였으며 cyclophosphamide 및 병합투여군에서는 약 50%정도 복수량이 감소하였다.

## 문 헌

- Old, L. J., Clark, D. A. and Benacerraf, B. : Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* infection on transplanted tumor in the mouse. *Nature*, **184**, 291 (1959)
- Balner, H., Old, L. T. and Clarke, D. A. : Accelerated rejection of male skin isografts by female C-57 BL mice infected with *Bacillus Calmette-Guerin*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **62**, 1095 (1962)
- Morton, D. L. : Immunological studies with human neoplasms. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **10**, 137 (1971)
- Mathe, G. : BCG and cancer immunotherapy. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **39**, 107 (1973)
- Bast, J., Zbar, B., Borsos, T. and Rapp, H. T. : BCG and cancer. *New Eng. J. Med.*, **290**, 1413 (1974)
- Weiss, D. W., Bonhag, R. S. and Parks, J. A. : Studies on the heterologous immuno-genecity of a methanol-insoluble fraction of attenuated tubercle bacilli (BCG). *J. Exp. Med.*, **119**, 53 (1964)
- Azuma, I., Yammamura, Y. and Fukushi, K. : Fraction of mycobacterial cell wall. *J. Bacteriol.*, **96**, 1885 (1968)
- 정태호 : 결핵균체에서 추출한 단백복합물질 tubercin-3의 등전점 분획상과 그 물질의 항암 결과에 관하여. 대한의학회지, **17**, 427 (1974)
- Hersh, E. M., Gutterman, J. U. and Mavligit, G. M. : BCG as adjuvant immuno-therapy for neoplasia. *Ann. Rev. Med.*, **28**, 489 (1979)
- Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Barro, Y. and Hirata, R. : Experimental anticancer studies Part III. On the influence of living hemolytic streptococci carcinoma in mice. *Japan J. Exp. Med.*, **45**, 93 (1975)
- Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. and Takagaki, Y. : Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemother. Res.*, **56**, 9 (1972)
- Ishii, Y., Yamaska, H., Toh, K. and Kikuchi, K. : Inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* by macrophages from mice treated with a streptococcal preparation, OK-432. *Gann*, **67**, 115 (1976)
- Maulight, G. M. and Hersh, E. M. : Chemoimmunotherapy of human solid tumors. *Med. Clin. North. Am.*, **60**, 441 (1976)
- Murakami, A., Tanaka, S., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. : Chalcone tetramers, lophirachalcone and alatachalcone, from *Lophira alata* as possible anti-tumor promoters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 769 (1992)
- Tung, A. S. : Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins, and other serum proteins in ascitic fluids of individual mice and guinea pigs. *Immunological Techniques*. Academic Press, New York, p.13 (1987)
- Mohrotra, R., Rawat, S., Kulshreshtha, D. K., Patnait, G. K. and Dhawan, B. N. : *In vitro* studies on the effect of certain natural products against hepatitis B virus. *Indian J. Med. Res.*, **92**, 133 (1990)
- Old, L. J., Benacerraf, B., Clark, D. A., Carswell, E. A. and Stocket, E. : The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.*, **41**, 1281 (1981)
- Morton, D. L., Eilber, F. R. and Malmgren, R. A. : Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*, **78**, 158 (1980)
- Mathe, G., Amiel, J. L., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Ctian, A., Schlumberger, J. R., Hayat, M. and de Vassa, F. : Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*, **21**, 697 (1989)
- Pantarotto, C., Martini, A. and Belvedere, G. : Studies on the disposition of cyclophosphamide in tumor bearing mice by means of gas chromatography-chemical ionization-mass fragmentography. *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 493 (1986)

(1994년 9월 5일 접수)