

시호 추출물이 면역계 세포의 활성화에 미치는 영향

조정곤 · 김종면

전북대학교 수의과대학
(1994년 9월 16일 접수)

Effect of *Bupleurum falcatum* on the immune system

Jeong-gon Cho, Jong-myeon Kim

College of Veterinary medicine, Chonbuk National University

(Received Sept 16 1994)

Abstract : The root of *Bupleurum falcatum* L.(BF) has been widely used in oriental medicine as a major component in many prescriptions for chronic hepatitis, renal disease, tuberculosis and some other infectious diseases. Many attempts have done to investigate the therapeutic effects of these principles. However, any kinds of screening on immune regulatory- and antitumor- effects of BF has not been reported. The present study, therefore, was undertaken to investigate the BF-effects on cellular- and humoral-immune responses, phagocytic activities of macrophages, lymphokine- and Immunoglobulin(Ig)-production of lymphocytes, tumorigenesis of implanted sarcoma 180 cells and B16 melanoma cells, and proliferations of some tumor cell lines(Fsa II, 3LL and EL4). BF increased phagocytic activities of mouse peritoneal macrophages in a dose- and time-dependent fashion. Arthus reaction and antibody responses to SRBC were slightly enhanced but delayed hypersensitivity was depressed when BF was injected before- and after-SRBC sensitization. BF inhibited the proliferative responses of human tonsillar lymphocytes to PHA- and Con A-stimulation but slightly augmented the response of these cells to *Staphylococcus aureus* Cowan 1(SAC)-activation. Ig secretion of human mononuclear cells activated with SAC was slightly increased by BF. BF significantly augmented the SAC-induced IL 6 production of human mononuclear cells but not influenced Con A-induced IL 2 secretion. NK cell activities of mouse splenocytes were somewhat increased when BF was pretreated and this responses were due to the increment of binding affinities of effector cells to target cells and of lytic activities of effector cells against target cells. *In vitro* BF significantly inhibited the proliferations of cancer cells such as Fsa II, 3LL and EL4 strains. BF decreased not only the frequency of tumor induction but also the tumor size per sarcoma 180 or B16 cell-implanted mouse. Taken together, these results indicate that BF is one of the potential immunomodulator, and suggest its possibility to be used as a desirable antitumor agent.

Key words : *Bupleurum falcatum*, immune responses, antitumor activity

서 론

생물학적 반응조절제(biological response modifiers, BRM)는 생체 반응을 조절하거나 종양세포의 성장정지, 용해, 분화성숙 조절효과를 갖는 물질을 일컫는다¹. 숙주의 암에 대한 저항성은 주로 면역계에서 이루어지며, 현재 시도되고 있는 BRM요법 또한 면역계의 활성화에 가장 큰 비중을 두고 있다². 따라서 면역계의 활성을 가지는 새로운 물질을 탐색하고자 하는 노력이 활발하다. 그중에서도 생약은 생체의 건강을 보호 유지한다는 개념으로 전통적으로 이해되어 복용되어 왔다. 이는 체내의 저항성 증가 즉 면역계의 활성화로 인한 결과³라고 이해되어 식물추출물에 대한 생물학적, 면역학적 연구는 매우 활발하게 진행되었고⁴ 이들로부터 다양한 천연산물이 추출되었으며, 그 일부는 구조와 생화학적 특성은 물론 작용기전까지도 연구되고 있다⁵.

시호(柴胡: *Bupleurum falcatum* L)는 미나리과(Umberlliferae)에 속하는 식물이며 그 뿌리는 한방에서 중요한 약재로서 폐질환, 간질환등의 예방과 치료에 필수적인 약제중의 하나로 이용되고 있다⁶. 시호에 대한 연구는 항염작용⁷, 항육아종성작용¹², 해열작용⁸, 진경작용⁹, 항폐양작용⁷, 방사선 조사에 대한 보호효과¹¹, 혈장 콜레스테롤 저하 작용¹², 해독작용¹³, 진해작용⁸, 거담작용¹⁴, 신 및 간기능 보호^{15,16}, 홍역바이러스와 단순포진 바이러스 불활화효과¹⁷, 성분분석¹⁰ 등 많은 보고가 있으나 시호가 면역계에 미치는 영향과 항종양작용을 구명하기 위한 연구보고는 흔하지 않다.

이에 저자는 시호 뿌리의 수용성 추출물을 얻어 면역계의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대식세포의 탐식능, 생체의 지연성 과민반응과 항체 생산능, 시험관내 림프구의 증식능, 림포카인 생산능(IL2, IL6) 및 Ig 생산능 그리고 NK 세포의 활성능을 측정하였다. 한편 시호추출물의 항종양작용을 평가하고자 시험관내 종양세포주(Fsa II, 3LL 및 EL4)의 증식능을 측정함과 아울러 sarcoma 180 세포 및 B16 흑색종 세포를 마우스에 이식한 후 종양 발생률과 그 크기 그리고 이식 암 종세포의 전이를 측정하였다.

재료 및 방법

시호추출물 : 시호는 한약 재료상에서 약용으로 시판하는 자연산을 구입하여 사용하였다. 민간요법에서 사용하는 방식대로 시호의 뿌리를 깨끗이 세척하여 건조한 다음 그 무게의 10배에 해당하는 증류수에 넣고

15시간 정도 중탕하여 감압 농축하고 수용성 추출액을 얻었다. 그 후 여과(0.2 μ m)한 다음 냉동건조시켜 균질한 분말로 만들었다. 시호추출물은 생리식염수 또는 RPMI 1640(Gibco)에 적절한 농도로 용해, 재여과에 사용하였다.

마우스 : 생후 7-8주 된 ICR마우스를 암수 구별없이 사용하였으나 실험군 및 대조군은 동성(sex-matched)의 마우스를 사용하였다. 이들 실험 동물은 수도물과 마우스용 사료를 공급하고 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 사육 하였다.

즉적종창반응 검사와 응집소 역가측정 : 본 실험에서는 면역적혈구(SRBC)를 항원으로 사용하여 전보⁴⁰에서와 같은 방법으로 측정하였다.

대식세포 탐식능 측정 : 본 실험에서는 마우스의 복강 대식세포를 효과세포로, *Candida albicans*를 표적세포로 사용하여 전보⁴¹에서와 같은 방법으로 측정하였다.

단핵세포 및 림프구의 준비 : 단핵 세포 준비는 편도 적출술 환자의 편도선 및 마우스의 비장을 HBSS에서 조심스럽게 teasing하여 세포부유액을 만든 다음 통상의 Ficoll-hypaque(Sigma) 밀도구배 법에 의하여 단핵세포만을 분리하고 이를 2회 HBSS로 세척한 후 2mM의 glutamin과 80 μ g/ml의 gentamicin 그리고 우태아혈청(FCS)이 10% 함유되어 있는 RPMI 1640에 2x10⁵ cells/ml의 농도로 부유하여 만들었다. 또한 림프구의 분리는 사람편도선으로부터 얻은 단핵세포를 plastic culuture dish(10x20mm, Costar)에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간씩 2회 방치하여 단핵구의 부착을 유도하여 제거하였다.

림프구의 증식능 검사 : 사람 편도선 림프구 증식능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 준비된 림프구를 RPMI 1640에 1x10⁶ cells/ml되게 부유하여 자극하지 않거나 또는 PHA(5 μ g/ml, Sigma), Con A(5 μ g/ml, Sigma) 및 *S aureus* Cowan 1(SAC, 0.0075% v/v, Calbiochem)으로 자극하여 flat bottomed 96-well microculture plate(Nunclon)의 각 well에 0.1ml씩 분주한 다음 여러 농도(0, 0.1, 1, 10 μ g/ml)의 시호추출물을 가하여 well당 총량이 0.2ml씩 되도록 조정하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 넣어 72시간 배양하였다. 배양 세포에의 [³H]-thymidine([³H] TdR, specific activity; 20Ci/mmol, New England Nuclear)의 pulse는 0.5 μ Ci [³H]TdR를 각 well에 배양종료 12시간 전에 가하여 실시하였으며, [³H]TdR의 incorporation 측정에는 multiple cell harvester로 glass-fiber에 세포를 수확한 후 liquid scintillation counter(Packard)를 이용하였다.

단핵세포의 Ig 생산 : 사람 편도선 단핵세포 부유액 (2×10^6 cell/ml)을 SAC(0.0075% v/v)로 자극하여 그 0.1ml를 round bottomed 96 well culture plate(Dinatech)의 각 well에 분주한 다음 IL2(Cetus)를 10 unit/ml의 농도로 가하거나 또는 여러 농도의 시호 추출물을 가하여 well당 총량이 0.2ml되게 하였다. 그 후 plate를 37°C, 5% CO₂배양기에 7일간 배양하였으며, 배양액의 harvest는 배양 종료 후 각 plate를 원심하여 세포를 침전시킨 다음 그 상층만을 취하였으며, 배양액내의 분비된 Ig함량은 ELISA법을 이용하여 측정하였다.

IgG 함량의 측정 : 배양여액내의 IgG함량의 측정은 avidin-biotin system에 준한 sandwich ELISA법으로 실시하였다. 간기하면, plate의 각 well을 rabbit anti-human IgG(1:300)로 coating-세척하고 여기에 2배 계열 희석한 각 시료를 넣어 2시간 작용-세척하였다. 이어 biotin-conjugated goat anti human-IgG(1:4000)를 넣어 1시간 작용-세척 한 다음 horseradish peroxidase conjugated avidin(1:2000)으로 45분간 작용-세척하였다. 여기에 phosphate citrate buffer로 용해한 ortho-phenylenediamine을 가하여 20분간 발색을 유도한 후 4N H₂SO₄로 정지시켜 492nm파장에서 ELISA reader (BioRad Laboratories)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 여액내의 IgG 함량은 가검시료의 흡광도치를 표준 혈청치의 표준곡선에 대비시켜 산출하였다.

Lymphokine(IL2, IL6) 생산능 측정 : 시호 추출물 (0, 0.1 또는 1mg/ml)의 첨가에 의한 사람 편도선 단핵세포(2×10^6 cells/ml)의 IL2생산은 Con A-sepharose(10µg/ml)로, IL6생산은 SAC(0.0075% v/v)으로 각각 자극하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 40시간 배양하였다. 그 후 이를 500g로 30분간 원심하여 상층액을 얻어 역가 검사에 사용하였다. 배양액내의 IL2함량측정은 IL2의존성 세포주인 마우스 유래의 CTLL2 세포를, IL6함량측정은 MH60BSF2 세포를 사용하였다. 이들 세포를 RPMI 1640으로 3회 원심 세척한 다음 5% FCS-RPMI 1640에 CTLL2 세포는 5×10^5 cells/ml 농도로, 그리고 MH60BSF2 세포는 1×10^5 cell/ml로 부유한 후 여기에 계열 희석한 위의 배양 상층액을 각각 가하고 그 0.1ml를 flat bottomed culture plate의 각 well에 가하여 총량이 0.2ml/well이 되게 하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 48시간 배양하였다. [³H] TdR의 pulse는 배양종료 4시간 전에 실시하였으며 pulse의 량, harvest 및 counting 방법은 정상 림프구 증식능 측정과 같은 방법으로 실시하였다¹⁹.

NK 세포의 활성능 측정 : NK세포의 활성능 측정은 single cell level assay에 준하여 실시하였다²⁰.

세포주의 증식능 측정 : 계대보존종인 FsaII, 3L1 및 E1A세포를 2×10^6 cells/ml로 희석하여 그 0.1ml를 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 시호추출물(1µg/ml)을 가하여 총량이 0.2ml이 되게 하였다. 그 후 plate를 37°C, 5% CO₂배양기에 20시간 배양하였다. 배양종료 후 plate를 원심하여 상층액을 제거하고 3-[4, 5-dimethyl(thiazol-2-yl)-3, 5-diphenyl] tetradium bromide(MTT) 150µl(5mg/ml)를 각 well에 가한 후 37°C, 5% CO₂배양기에 방치한 후 MTT액을 제거하고 150µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well에 가하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 이들 세포에 대한 증식능을 검사하였다²¹.

마우스에 이식된 sarcoma 180 세포의 증식능 측정 : 시호추출물(1mg)을 생리 식염수에 희석하여 매일 일정 시간에 7일간 복강내로 투여하였으며 대조군은 생리식염수만을 투여한 후 HBSS에 부유한 1×10^6 개의 sarcoma 180 세포를 마우스의 복강에 주사하였다. 그 후 6일 간격으로 36일째까지 종양발생도와 종양의 크기를 조사하였다.

B16 흑색종 세포의 종양발생도와 전이율 측정 : 시호추출물(0, 1, 5mg)을 PBS에 희석하여 일주일에 3회, 6주간을 ICR마우스에 경구 투여하였으며 계대보존종인 B16 흑색종 세포를 HBSS에 부유하여 마우스의 발바닥에 피내주사하거나 미정맥 주사하였다. 이때 접종량은 1×10^5 개의 세포로 하였다. 주사 6주후 마우스를 희생시켜 마우스의 발바닥에 흑색종을 형성한 마우스의 수와 그 크기를 측정하여 종양발생률을 조사하였고 또한 마우스의 폐를 적출하여 전이된 흑색종의 집락수를 산출하여 전이율을 구하였다.

결 과

대식세포의 탐식능에 미치는 영향 : 마우스의 복강내 식세포를 시호추출물(1, 25, 50, 100µg/ml) 존재하에서 5시간 배양한 후 *C albicans*를 접종하고 대식세포의 탐식능을 평가하였던 바 Fig 1과 같은 성적을 얻었다. 즉, 대식세포 탐식능은 접종 3시간 및 6시간 측정치 공히 대조에 비하여 추출물로 전처리한 군에서 증가되었으며 이러한 증가는 농도 및 시간 의존성이었다.

즉적종창반응과 항체 생산에 미치는 영향 : 시호추출물을 마우스에 SRBC로 면역하기 전 또는 후 4일간 복강내로 투여하고 면역 4일에 야기주사하여 발현되는 즉적종창반응과 혈청 항체를 측정하였던 바 Table 1과 같은 성적을 얻었다. 즉, 야기주사 3시간에 측정된 Arthus

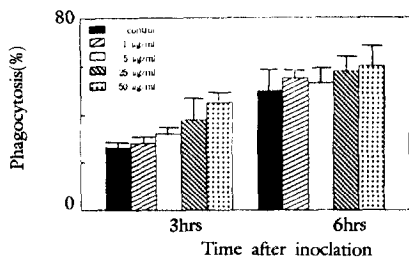


Fig 1. Effect of *B falcatum* extract on phagocytosis of macrophage. Peritoneal macrophages(2×10^6 cells/ml) from ICR mice were cultured in the presence or absence of *B falcatum* extract(1, 5, 25, 50 μ g/ml) for 5hrs. The cultures were washed and inoculated with *C albicans*(4×10^6 cells/ml). Phagocytosis of cultured macrophage against *C albicans* was assayed at 3 and 6 hrs after inoculation.

* Each bar represent the means of 5 experiments \pm SD.

반응은 면역 4일간 투여한 군 공허 대조군에 비하여 약간 증가하였으나, 야기주사 24시간 후에 측정된 지연형 과민반응은 면역 전 또는 면역 후 투여한 군 모두 감소하였으며, 면역 7일에 측정된 SRBC에 대한 응집 항체가 큰 면역 전 또는 면역 후 투여군 모두 증가하였다.

림프구 증식능에 미치는 영향 : 사람 편도선 림프구를 SAC, PHA 및 Con A 등으로 자극 배양시 여러 농도의 추출물을 첨가하였던 바 Table 2와 같은 성적을 얻었다. 시호추출물은 SAC자극 편도선 림프구의 증식을 다소 항진시켰으나, PHA와 Con A 자극시에는 오히려 그 증식능이 다소 억제 되었으며, 비자극 림프구의 증식능에는 시호 추출물이 영향을 미치지 않았다.

단핵세포의 IgG생산에 미치는 영향 : 사람 편도선 단핵세포를 SAC으로 자극하여 IL2의 존재 또는 비존재 하에서 배양시 여러 농도의 시호 추출물을 첨가하여 단핵세포의 Ig 생산능에 미치는 영향을 평가하였던 바 그 결과는 Table 3과 같다. 즉, SAC자극 단핵세포의 Ig생산능은 IL2첨가 및 비첨가군 모두에서 시호 추출물첨가에 의해 미약하게 증가하였고, 특히 IL2의 첨가에 관계없이 1 μ g/ml의 농도에서 현저히 증가하였다.

Table 1. Effect of *B falcatum* extract on the footpad swelling reaction and antibody production to sheep red blood cells in ICR mice

Time of extract treatment relative to SRBC-sensitization	Footpad thickness(1/10mm) at		Hemagglutinin titer(log ₂)
	3h(Arthus)	24h(DTH)	
Untreated control	7.5 \pm 0.4	10.4 \pm 0.3	3.2 \pm 0.1
4 days before SRBC	9.5 \pm 0.3	8.8 \pm 0.2	4.6 \pm 0.1
4 days after SRBC	8.6 \pm 0.2	9.0 \pm 0.2	4.4 \pm 0.3

Mice were sensitized with 1×10^7 SRBC on day 0 and challenged with 0.03ml of 20% SRBC on day 4. *B falcatum* extract was injected i p for the indicated days(daily 1mg/mouse). Footpad thickness was measured at 3 and 24 hr after challenge. All mice were assayed for hemagglutinin antibodies at 7 days after sensitization.

Table 2. Effect of *B falcatum* extract on the proliferation responses of human tonsillar lymphocytes

Extract (μ g/ml)	[³ H] TdR uptake(cpm)			
	Med	SAC	PHA	Con A
0	1,724	18,950	57,593	42,896
0.1	2,129	20,772	47,663	39,968
1	1,740	20,162	48,475	38,019
10	1,709	18,416	56,811	42,086

Human tonsillar lymphocytes(1×10^6 cell/ml) were activated with *S aureus* Cowan 1(SAC, 0.0075% v/v), PHA(5 μ g/ml) or Con A(5 μ g/ml) and cultured for 72 hrs in the presence or absence of varying concentration of *B falcatum* extract. [³H] TdR(0.5 μ Ci/well) was pulsed at last 12hr before culture termination.

lymphokine생산에 미치는 영향 : 사람 편도선 단핵 세포를 여러 농도의 시호 추출물 존재하에서 Con A 또는 SAC으로 자극 배양한 후 이들 배양액내의 IL2와 IL6의 농도를 측정하였던 바 Table 4에서와 같다. 즉, IL2농도는 시호추출물 첨가군에서 농도와 관계없이 감소하였으나, IL6의 농도는 시호 추출물 첨가군에서 농도와 관계없이 증가하였다.

Table 3. Effect of *B falcatum* extract on the IgG secretion of human tonsillar mononuclear cells.

Extract ($\mu\text{g/ml}$)	Ig secretion(ng/ml)	
	SAC	SAC+IL2
Control	68	374
0.1	92	486
1	116	518
10	73	454

Human tonsillar mononuclear cells(2×10^6 cells/ml) activated with *S aureus* Cowan 1(SAC, 0.0075% v/v) were culture in the presence or absence of IL2($10 \mu\text{g/ml}$) for 7 days. *B falcatum* extract was added into the culture at initiation. Culture-sup was assayed for Ig content by ELISA.

Table 4. Effect of *B falcatum* extract on the lymphokine-production of human tonsillar mononuclear cells

Extract ($\mu\text{g/ml}$)	% of control	
	IL 2	IL 6
0.1	98	128
1	90	132
10	95	104

Human tonsillar mononuclear cells(2×10^6 cells/ml) were activated with Con A($10 \mu\text{g/ml}$, for IL2 production) or with *S aureus* Cowan 1(SAC, 0.0075% v/v, for IL6 production), and cultured for 48 hrs in the presence of varying concentration of extract such as IL2 and IL6 using corresponding target cells. Results are normalized as % of control.

NK 세포의 활성에 미치는 영향 : 마우스의 비장세포를 여러농도의 시호 추출물로 전처리하여 NK 세포의 활성에 미치는 시호 추출물의 효과를 평가하였던 바 Table 5와 같다. 즉, 시호 추출물을 첨가함으로써 작동세포와 표적세포의 결합능 및 표적세포의 용해능이 미약하게 항진되어 NK 세포의 활성도 역시 미약하게 항진되었다.

세포주의 증식에 미치는 영향 : 수종의 세포주(FsaII, 3LL 및 EL4)를 시호 추출물($1 \mu\text{g/ml}$)로 처리하여 배양하고 MTT방법을 이용하여 이들 세포의 증식에 미치는 시호의 영향을 조사하였던 바 Table 6과 같다. 즉, 시호 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 FsaII는 10.3%, 3LL세포는 14.6%, EL4는 11.8%의 증식억제를 보였다.

Table 5. Effect of *B falcatum* extract on NK cell activities of mouse spleen cells against target Yac-1 cells

Extract ($\mu\text{g/ml}$)	% of		
	Conjugated effector cells	Conjugated target cell lysed	NK cells
Control	1.7 ± 0.09	52.0 ± 2.7	0.88
1	1.9 ± 0.11	52.3 ± 2.1	0.99
5	1.8 ± 0.08	58.5 ± 4.7	1.05
25	2.0 ± 0.06	56.0 ± 3.0	1.17
50	1.9 ± 0.14	56.2 ± 2.3	1.06

Results were the average percentage and standard error of the values from 7-10 experiments below for 1:1 effector and target cells ratio. Effector cells were pre-treated for 1hr at 37°C with above concentration of *B falcatum* extract just before the addition of target cells. % of NK cells = % of conjugated cells x % of conjugated target cell lysed/100

Table 6. Effect of *B falcatum* extract on the proliferation on various cells

Cell strains	% of control
FsaII	$89.7 \pm 7.9^*$
3LL	85.4 ± 6.3
EL4	88.2 ± 9.8

Each cell strains(2×10^6 cells/ml) was culture in the presence of *B falcatum* extract($1 \mu\text{g/ml}$) for 20 hrs. The proliferation response of each culture was measured by MTT assay.

* Mean \pm SD.

마우스에 이식된 sarcoma 180 세포의 증식에 미치는 영향 : 마우스에 시호추출물 1mg씩 7일간 투여한 후 sarcoma 180 세포를 이식하고 유도되는 종양발생율과 그 크기를 관찰한 바 Table 7과 같다. 즉, 시호 추출물을 투여하지 않은 대조군에서는 종양발생율이 6일째에 80%, 12일째와 18일째에 90%로 증가하다가 그 후 쇠퇴되어 36일째는 20%까지 감소되었으나, 시호추출

물 처리군에서는 6일째 20%, 12일째 40%, 18일째 50%로 증가되어 그 정도가 대조군에 비하여 현저히 낮았다. 또한 유도된 종양의 크기는 대조군에서는 시간의존적으로 증가되어 36일째에 66.0mm²에 이른 반면, 시호추출물 투여군에서는 36일째 17.5mm²로서 시호추출물은 sarcoma 180세포의 생체내 증식을 현저히 억제하였다.

Table 7. Effect of *B. falcatum* extract on tumorigenesis of sarcoma 180 cell-implanted mice

Days after implantaion	Extract	% of induction	Tumor size/TBM(mm ²)
6	-	80	3.8
	+	20	2.3
12	-	90	9.6
	+	40	3.2
18	-	90	12.4
	+	50	3.6
24	-	30	40.6
	+	20	4.5
30	-	20	57.2
	+	10	6.5
36	-	20	66.0
	+	10	17.5

Mice received *B. falcatum* extract(daily 1mg/mouse for 7 days) or saline(as a control) were sc implanted sarcoma 180 cells(1x10⁶ cells/mouse) and then at the various time of interval, the frequency of tumor induction was observed and the tumor size of tumor-bearing mice(TBM) was measured.

B16 흑색종 세포의 자연발생적 전이에 미치는 영향 : B16 흑색종 세포 1x10⁵개를 마우스의 미정맥에 주사

하고 여러농도의 시호 추출물(0, 1, 5mg/mouse)을 일주일에 3회, 6주간 투여한 후 자연발생적 전이에 미치는 영향을 조사하였던 바 그 결과는 Table 8과 같다. 즉, 마우스의 폐에 흑색종이 발생한 결과는 시호 추출물을 투여하지 않은 대조군에서 10마리중 10마리가 발생하였으나(100%), 1mg과 5mg 투여군 공히 8마리중 6마리(75%)가 발생되었으며, 또한 폐에 발생한 흑색종 집락수는 대조군에서 53.00개, 1mg투여군은 37.67개, 5mg투여군은 23.25개로서 시호 추출물은 B16흑색종 세포의 자연발생적 전이를 현저히 억제하였다.

Table 8. Spontaneous metastatic behavior of B16 melanoma cells in ICR mice

Extract (mg/mouse)	Number of mice bearing pulmonary tumor	Number of tumors colonies	
		Median	Range
0	10/10	53.00	17-108
1	6/ 8	37.67	14-57
5	6/ 8	23.25	3-48

Mice were given injection in the tail vein of 1x10⁵ B16 melanoma cells and were orally administered with *B. falcatum* extract(0, 1, 5mg/mouse, 3 times a week) for 6 weeks. The number of pulmonary tumor colonies was determined under dissecting microscope.

B16 흑색종세포의 종양 발생률과 전이율에 미치는 영향 : 여러 농도의 시호 추출물(0, 1, 5mg/mouse)을 일주일에 3회, 6주간 투여하고 1x10⁵개의 B16 흑색종 세포를 마우스의 발바닥에 피내주사하여 발바닥에 유도되는 종양 발생률과 폐에 전이되는 비율을 조사하였던 바 Table 9와 같다. 즉, 마우스의 발바닥에 유도된

Table 9. Metastasis and tumorigenesis of B16 melanoma cells-implanted ICR mice

Extract (mg/mouse)	Tumorigenesis		Metastasis		
	No of mice bearing footpad tumor	Diameter of footpad tumor(mm)	No of mice bearing pulmonary tumor	No of pulmonary tumor colonies	
				Median	Range
0	8/8	87.9±9.7	4/8	6.0	2-12
1	9/10	80.2±6.5	3/9	4.0	2-9
5	7/7	78.4±3.7	3/7	4.0	1-7

Mice were injected intradermal into the footpad of hind leg with 1x10⁵ B16 melanoma cells and were orally administered with *B. falcatum* extract(0, 1, 5 mg/mouse, 3 times a week) for 6 weeks. The number of pulmonary tumor colonies was determined under dissecting microscope.

종양발생물에서는 대조군(8마리중 8마리), 1mg투여군(10마리 중 9마리), 5mg투여군(7마리 중 7마리) 공히 큰 변화가 관찰되지 않았으나, 그 크기는 대조군(87.9mm)에 비하여 1mg 투여군에서는 80.2mm, 5mg 투여군에서는 78.4mm로 감소되어 농도의존적 경향을 보였다. 또한, 종양발생된 마우스에서 폐로 전이되는 마우스의 수는 대조군에서 8마리 중 4마리, 1mg 투여군에서는 9마리 중 3마리, 5mg 투여군에서는 7마리 중 3마리였으며, 마우스의 폐에 발생된 흑색종 집락수에 있어서도 대조군에서는 6개, 1mg 투여군과 5mg 투여군에서는 4개로서 시호 추출물은 B16 흑색종 세포의 전이를 억제시켰다.

고 찰

생물학적 반응조절제(BRM)를 생체내에서 작용하는 역할에 따라 분류하면 다음과 같이 나눌 수 있다. 1) 생체의 면역반응을 조절하여 생체의 작용을 강화시키거나, 숙주의 방어체계를 활성화하는 매개물을 회복시키거나 증가시킴으로써 숙주의 종양에 대한 저항력을 증가시키는 것. 2) 자연 혹은 재조합 물질의 형태로 항암 활성을 높이는 생리반응의 매개물을 보충하는 것. 3) 종양세포의 숙주 면역 기구에 대한 감수성을 높여 항암 작용의 효과를 높이는 것. 4) 종양세포의 형질전환을 감소시키거나 종양세포의 분화를 촉진하여 분열되지 않는 성숙된 세포로 만들거나(분화유도), 5) 숙주가 기존의 치료방법인 화학요법 혹은 방사선치료에 적응이 쉽도록 하는 것 등이 있다². BRM은 합성된 화학요법제와는 달리 주로 숙주의 생리활성을 조절해 줌으로써 효과를 나타내므로 치료시 부작용을 줄일 수 있고 그 치료효과도 생체내에 존재하는 BRM의 수용체 등을 매개로 하여 나타난다. 따라서 항암효과를 나타내는 BRM을 탐색 개발할 경우 그 가능성은 화학적으로 합성된 항암제의 경우보다 높을 것으로 판단되어 여러 연구자들의 집중적인 노력의 결과로 다양한 종류의 천연산물이 추출되었으며 이들 천연산물의 일부는 그 구조와 화학적인 특성이 명확히 밝혀져 있다⁵. 특히 세포분열 및 기능의 변화와 관련된 일부의 천연산물은 중요한 BRM으로 취급되어 그 특성은 물론 작용과정에 대하여 자세히 연구되어 오고 있으며 이러한 경향으로 식물 추출물에 대한 연구가 활발하며 특히 한방에서 사용되는 여러가지 생약에 대하여 집중적으로 연구되고 있다.

시호(柴胡: *Bupleurum falcatum* L.)는 미나리과에 속하는 식물이며 그 뿌리는 한방에 폐질환, 간질환 등의

치료와 예방에 필수적인 성분중의 하나이다⁶. 그러나 한방에서는 임상적인 경험을 토대로 사용되어 왔기 때문에 시호에 대한 과학적이고 체계적인 자료는 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 시호 뿌리의 수용성 추출물을 대상으로 면역 조절 작용 및 항종양 작용을 평가하였다. 시호 추출물이 생체내에서 특이 항원에 대한 세포 및 체액성 면역반응에 미치는 직접적인 영향을 평가하고자 마우스를 대상으로 T세포 의존성 항원인 SRBC로 면역하고 즉척 종창 반응으로 발현되는 지연형 과민반응과 항체 반응을 측정하였다(Table 1). 그 결과 시호 추출물을 면역전 또는 면역후에 투여하면 지연형 과민반응은 억제되었으나 항체반응은 항진된 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 Con A 자극 림프구의 증식능은 감소되었으나 SAC자극 림프구의 증식능은 항진된 성적(Table 2)과 부합됨을 알 수 있었다. 그러나, 그 작용과 기전은 면역반응 특히 생체 면역반응은 T세포, B세포 그외의 수종의 세포와 여러 인자에 의하여 좌우되는 복잡한 현상이기 때문에 본 실험 성적만으로는 이를 설명하기는 미흡하다.

대식세포는 세균, virus 등 외부물질을 파괴하는 탐식능을 가지고 있으며 superoxide anion(O₂⁻)과 hydrogen peroxide(H₂O₂) 등 reactive oxygen species(ROS)와 lysosomal효소 뿐 아니라 monokine과 같은 물질을 생성하여 염증반응을 유도하며 종양세포를 제거하는 기능도 가지고 있다²¹. 시험관내에서 마우스 복강 대식세포와 *C. albicans*를 3시간, 6시간 배양한 후 대식세포의 탐식능을 관찰한 결과(Fig 1) 대조군에 비해 시호 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라 탐식능의 점진적인 증가를 보였으며 배양시간이 경과함에 따라 대조군에 비하여 더욱 증가되는 경향이였다. 이러한 결과는 시호 추출물 성분인 saikosaponin과 saikosaponin d로 처리하였을 경우 acid phosphatase(lysosomal enzyme)의 상승^{22,23,24}, IL1의 증가²², Fc 수용체²⁴와 Ia 항원 발현의 증가²³ 및 골기체의 형태학적 발달에 따라 활성화된 대식세포의 탐식능이 증가한다는 보고와 일치한다.

Nowell²⁵에 의하여 mitogen에 의한 림프구의 증식능이 최초로 보고된 이래 림프구의 증식능 측정은 면역활성의 지표로서 응용되고 있다. 림프구의 증식은 어떤 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA합성과 더불어 세포 분열의 결과로 나타나는 하나의 과정이다. 본 실험에서 시호 추출물을 비자극 림프구의 증식능에는 영향을 미치지 못하여 시호 추출물 자체의 mitogenic effect는 없었으며, SAC으로 자극된 림프구의 증식능은 다소 항진시켰으나 PHA와 Con A자극시에 그 증식능

이 감소되었다(Table 2). 특히 시호 추출물에 의한 SAC자극 림프구의 증식촉진은 시호 추출물 존재하에서 SAC자극 단핵세포의 IL6의 분비가 항진된 본 실험 성적(Table 4)으로 미루어 시호 추출물이 B림프구를 성숙 변화시켜 IL6의 생산량 증가에 의하여 그 증식이 촉진되었을 가능성도 있다.

사람 단핵세포를 SAC으로 자극하여 여러농도의 시호 추출물 존재하에서 배양한 후 시호 추출물이 B세포의 분화에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 시호 추출물을 가지지 않은 대조군보다 시호 추출물을 처리한 군에서는 Ig생산능이 첨가농도에 따라 일정한 비율로 증가하지는 않았지만 전반적으로 시호 추출물을 가한 군에서 다소 높았다(Table 3). 또한, SAC자극 단핵세포를 IL2의 존재하에 배양시 시호 추출물 첨가는 Ig생산을 더욱 항진시켰다. 이러한 반응은 Ig분비에 미치는 IL2의 작용이 시호추출물 첨가에 의하여 더욱 항진되었기 때문이라 사료된다.

IL6는 B세포의 분화인자(B cell differentiation factor : BCDF)로서 B세포의 Ig생산을 촉진시키며 T세포의 증식과 분화과정에 제2신호 전달계로 작용하여 IL2의 생산을 자극하는 등 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{26,31}. 본 실험에서 사람 단핵세포를 SAC으로 자극 배양시 시호 추출물을 가하면 IL6의 생산이 증가하였고 Con A로 자극된 단핵세포는 IL2의 생산을 억제하였다(Table 4). 이러한 결과는 시호추출물 존재하에서 Con A와 PHA로 자극된 림프구의 증식이 억제되어 IL2의 생산을 자극하지 못한 결과라 사료된다.

세포성 면역반응에 중요한 역할을 하는 작동세포중 자연 살해 세포는 대과립성 림프구(large granular lymphocyte)의 일종으로 종양면역 감시기전에 중요하며 숙주의 비특이적 면역반응을 측정하기 위한 면역학적 지표로 이용된다. 이 자연살해세포는 종양에 대하여 자연 살해 세포능을 가지며 바이러스 및 세균에 감염된 세포를 파괴하는 활성을 가지며, IL2 및 인터페론에 의해서 활성이 증가된다^{32,33}. NK세포가 표적세포를 파괴하는 기전에 대해서는 확실하게 알려져 있지는 않으나, 1) 표적세포를 인식하여 결합하는 시기, 2) 융해기전을 활성화 시키는 시기, 3) NK-lymphotoxin이 유리되는 시기, 4) 표적세포의 사멸 시기로 나눌 수 있다³⁴. 본 실험에서는 마우스의 비장세포를 작동세포로, Yac-1세포를 표적세포로 하여 자연살해세포의 활성능을 조사한 결과 시호 추출물로 전처리시 NK세포의 표적세포와의 결합능은 물론 결합된 표적세포의 융해능이 촉진된 성적(Table 5)을 보였는데 이와같은 결과는 시호 추출물

이 NK세포가 표적세포를 파괴하는 4단계의 전과정을 항진시킨 결과로 인정된다.

살아있는 세포의 mitochondria에서 분비되는 succinate-dehydrogenase는 tetrazolium salt MTT를 formazan으로 변환시키는 성질을 가지고 있으며 이러한 성질을 이용하여 세포의 생존율과 증식능을 측정할 수 있다³⁵. 시험관 내에서의 시호 추출물을 첨가(1μg/ml)하여 수종의 종양세포주(FsaII, 3LL 및 EL4)를 배양하여 MTT방법을 이용하여 증식능을 조사한 결과(Table 6) 대조군에 비하여 억제되었다. 그러나, 증식이 억제된 정확한 기전은 본 실험만으로는 알 수 없었으며 앞으로 연구되어야 할 과제라고 사료된다.

마우스에 시호 추출물 1mg씩 7일간 투여한 후 sarcoma 180 세포를 이식하고 종양으로 유도되는 정도와 그 크기를 관찰하였다. 시호 추출물 처리군은 대조군에 비하여 종양으로 유도되는 정도가 현저히 낮았으며 그 종양의 크기도 현저히 낮았다(Table 7). 종양의 전이는 최초로 발병된 장기로부터 직접 연결되지 않은 원격장기로 이동하는 현상이다¹². 환언하면, 숙주의 일부분에 최초의 신생물이 발생하고 혈관이 형성되고(vascularization), 림프관, 정맥, 모세혈관에 침입하여 순환되며 원격장기의 모세혈관상(capillary bed)에 정지하여 혈관내에 부착되고 혈관으로부터 원격장기의 조직내로 유출(vascultation)되어 착상하여 증식되는 전과정을 말한다³⁶. 시호 추출물이 종양원성과 전이에 미치는 영향을 조사하기 위하여 폐세포에 친화성이 높으며 침습성이 강력한 B16 흑색종 세포주를 사용하여 조사하였다. 마우스에서 B16 흑색종 세포의 주사에 의한 종양발생 및 전이율은(Table 8) 대조에 비하여 시호 추출물 투여군에서 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 대식세포의 탐식능 증가, B세포의 증식 및 Ig 생산량 증가, IL6의 생산량 증가, NK세포의 활성도 증가, 종양세포의 증식능 억제 등의 본 실험 성적을 고려한다면 이들의 복합적인 작용에 의한 결과로 사료된다. 특히 NK세포는 초기에 종양을 인식하고 그 증식과 확산을 저지한다는 보고³⁷, 전이병소의 형성을 억제하고 혈액 내 종양세포의 생존율은 숙주의 NK세포의 활성과 반비례한다는 보고³⁸ 그리고 시호 추출물이 NK세포의 활성을 항진시킨 본 실험결과(Table 5)로 미루어 시호 추출물에 의한 종양 전이의 억제에는 NK세포의 항진과 밀접한 관계가 있으리라 사료된다.

이상의 실험결과 시호추출물은 효과적인 면역조절제일 뿐만 아니라 강력한 항종양작용을 보임을 알 수 있었다.

결 론

시호는 미나리아에 속하는 식물이며 그 뿌리는 한방에서 간질환, 폐질환 등의 치료에 필수적인 약제로 사용되고 있으나 면역계에 미치는 영향과 항종양작용에 대한 실험보고는 희박하다. 따라서 이를 밝히기 위한 실험으로 대식세포의 탐식능, 생체내 지연성 과민반응과 항체 생산능 그리고 시험관내 림프구의 증식능 및 림포카인의 생산능(IL2, IL6), B림프구의 IgG생산능, NK세포의 활성화 등을 측정하여 시호가 면역계의 활성화에 미치는 전반적인 영향을 평가하였고 또한 수종의 종양 세포주의 시험관 및 생체내 증식능 및 전이율등을 측정하여 이의 항종양 작용 평가하였던 바 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 시호 추출물은 *Candida albicans*에 대한 복강 대식세포의 탐식능을 증가시켰다.
 2. 면역 적혈구에 대한 Arthus반응과 응집 항체가 증가되었으나 지연형 과민반응은 저하되었다.
 3. 시호 추출물은 비자극 림프구의 증식에는 영향을 미치지 않았으나 SAC자극 림프구의 증식을 항진시켰고 PHA와 Con A 자극시에는 그 증식을 억제시켰다.
 4. 시호 추출물은 단핵세포의 Ig생산을 증가시켰다.
 5. 시호 추출물은 단핵세포의 IL6의 생산을 현저히 항진시켰으나 IL2의 생산은 다소 억제시켰다.
 6. 시호추출물은 NK세포의 표적세포와의 결합능과 결합된 표적세포의 용해능을 항진시켰다.
 7. 시험관 내에서 시호 추출물은 종양 세포주(FsaII, 3LL, EL4)의 증식을 억제하였다.
 8. 시호 추출물은 마우스에 이식된 sarcoma 180 세포의 증식을 현저히 억제하였다.
 9. 시호 추출물은 B16 흑색종 세포에 대한 자연발생적 전이를 현저히 억제하였다.
 10. 시호 추출물은 B16 흑색종 세포에 대하여 종양 발생율과 전이율을 감소시켰다.
- 이상의 결과로 시호 추출물은 면역계 세포에 직간접으로 작용하여 생체 면역 반응을 조절함을 알 수 있었으며 종양세포의 증식과 전이를 억제하는 강력한 항종양 작용이 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 변광호. Human B림프구의 증식과 분화에 영향을 주는 생체반응 조절 물질(BRM)의 검색방법. 신물질 창출을 위한 생물활성 연구법, 한국생화

학회편. 1990; 421-432.

2. 최인성. BRM의 분리정제. 신물질 창출을 위한 생물활성 연구법, 한국생화학회편. 1990; 433-442.
3. 박승용, 문은이, 지옥표 등. 생약추출물의 면역 조절작용(I)-도꼬마리 추출물의 면역 억제작용. 대한면역학회지 1990; 12: 119-130.
4. 문혜선, 함용표, 정인성 등. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향. 대한면역학회지 1990; 12: 113-118.
5. 최민순, 이정호, 김종면 등. Lentinan이 면역활성에 미치는 영향. 대한면역학회지 1990; 12:235-249.
6. 육창수, 양한석 등. 현대생약학. 생약학연구회. 학창사. 1992; 405-407.
7. Takagi K, Shibata M. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. I. Acute toxicity and central depressant action of crude saikosides. *Yakugaku Zasshi* 1969; 89: 712-720.
8. Shibata M, Yoshida R, Motohashi S, et al. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. IV. Some pharmacological effect of crude saikosids, saikogenin A and syrupy residue. *Yakugaku Zasshi* 1973; 93: 1660-1667.
9. Shibata M. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. III. Correlation between experimental pharmacological results and clinical applications of *Bupleurum*. *Yakugaku Zasshi* 1970; 90: 398-404.
10. Shibata S, Kitagawa I, Fujimoto H. The chemical studies on oriental plant drugs. XI. On the constituents of *Bupleurum* Spp. (2) The structure of saikogenin A, a saikogenin of *Bupleurum falcatum* L. *Chem Bull* 1966; 14: 1023-1033.
11. Wang CM, Ohta S, Shinoma M. Studies on chemical protectors against radiation. XXXIV. Survival effects of aqueous extracts of various chinese traditional medicines on radiation injury. *Yakugaku Zasshi* 111; 322-328, 1991.
12. Yamamoto M, Kumagai A, Yamamura Y. Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol lowering action. *Arzneim Forsch* 1975; 25: 1240-1243.
13. Lin CC, Chiu HF, Yen MH, et al. The pharmacological and pathological studies on taiwan fork

- medicine(III): The effects of *Bupleurum Kaei* and cultivated *Bupleurum falcatum* var. *Komarowi*. *Am J Chines Med* 1990; 18: 105-112.
14. Shimako A, Seo S, Minato H. Saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. component of saikosaponin b. *J Chem Soc Perkin* 1975; 1: 2043.
 15. Abe H, Konishi H, Arichi H, et al. Effects of saikosaponin d on amino nucleoside nephrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 1986; 120: 171-178.
 16. Abe H, Sakaguchi M, Yamada M, et al. Pharmacological actions of saikosapoin isolated from *Bupleurum falcatum* L. Effect of saikosaponins on liver function. *Planta Med* 1980; 40: 366-372.
 17. Ushio Y, Abe H. Inactivation of measles virus and herpes simplex virus by saikosaponin d. *Planta Med* 1992; 58: 171-173.
 18. Ha TY, Lee JH. Effect of varing dose of sheep red blood cells on delayed hypersensitivity and antibody production in mice. *The Junbuk Univ Med J* 1979; 3: 95.
 19. 이정호, 김종민, 하대유. Interleukin6의 B세포의 분화작용. *대한면역학회지* 1988; 10: 105.
 20. 하대유, 정을삼, 이정호. 마우스의 자연세포독성 림파구의 관한 면역생물학적 연구. *대한면역학회지* 1988; 6: 11.
 21. Synons R, Alexander P. Immunology of the macrophage, In Nelson DS, New York: Academic Press 1976; 535.
 22. Ushio Y, Oda Y, Abe H. Effect of saikosaponin on the immune responses in mice. *Int J Immunol Pharmacol* 1991; 13:501-508.
 23. Kumazawa Y, Takimoto H, Nishimura C, et al. Activation of murine peritoneal macrophages by saikosaponin-a, saikosaponin-d and saikogenin-d. *Int J Pharmacol* 1989; 11: 21-28.
 24. Ushio Y, Abe H. The effects of saikosaponin-d on yeast phagocytosis and degradation in peritoneal macrophages: Related increase in Fc receptor expression and altered cytoplasmic organization. *Japan J Pharmacol* 1991; 56: 167-175.
 25. Nowell PL. Phytohemagglutinin; an indicator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 1960; 20: 462.
 26. Muragughi A, Hirano T, Tang B, et al. The essential role of B cell stimulatory factor 2(BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988; 167: 332.
 27. Hirano T, Taga T, Nakano N, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor(BCDF or BSF_r-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5490.
 28. Takasaki F, Okano A, Suzuki C, et al. Human IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1988; 141: 3072.
 29. Hodkin PD, Bond MW, O'garra A, et al. Identification on IL-6 as a T cell derived factor that enhances the proliferative responses of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *J Immunol* 1988; 141: 151.
 30. Lee F, Yokoda T, Otsuka T, et al. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that express BSF-1 activities and T cell-and mast cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci UAS* 1986; 83: 2061.
 31. Lotz M. B cell stimulating factor 2/ IL-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 1253.
 32. Suzuki R, Hand K, Itoh K. Natural killer cells as a responder to interleukin-2 I.Proliferative responses and establishment of cloned cells. *J Immunol* 1983; 130: 981
 33. Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cell, there roll in defence against disease. *Science* 1981; 214: 24.
 34. Targan S, Brivan L, Dorey E. Activation of NKCA by moderate exercise: Increased frequency of NK cells with enhanced capability of effector-target lytic interactions. *Clin Exp Immunol* 1981;45: 452.
 35. Denizot F, Lang R. Rapid chlorimetric assay for growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Method* 1986; 89: 271-277.
 36. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978; 38: 2651-2660.
 37. Lewis CE, McGee JOD. The natural killer cell. Oxford University Press, London 1992; 177-181.
 38. Herberman RB, Gorelic E. Role of the natural im-

- mune system in the control of primary tumors and metastasis. In: Herberman RB, Ed. Functions of the natural immune system. Plenum, New York. 1989; 3-37.
39. Zhu D, Cheng CF, Pauli BU. Mediation of lung metasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9568-9572.
40. 김종면, 최민순, 조정곤 등. 화살나무 및 느릅나무 추출물이 면역계 세포의 활성화에 미치는 영향. *대한수의학회지*. 1994; 34(2): 307-313.
41. 최민순, 이정호, 소준노 등. Lentinan이 면역활성에 미치는 영향. *대한면역학회지* 1990; 12(2): 235-249.
-