

天門冬이 抗癌 및 免疫細胞에 미치는 影響

鄭 鉉 雨 · 趙 鈴 林*

초 록 : 東醫學에서는 질병의 발생에 대하여 正氣의 強弱에 그 關鍵이 있다하였다. 그리하여 모든 질병의 치료에 있어서도 正氣의 회복에 중점을 두는 扶正法이나 祛邪法을 사용하면서도 正氣에 損傷을 입히지 않도록 많은 관심을 기울이고 있다.

癌의 치료 또한 正氣가 얼마만큼 보충되는가에 따라 抗病能力이 亢進된다할 수 있을 것이다. 현재 國內外的으로 惡性腫瘍을 치료하기 위하여 다방면으로 연구를 하고 있으며, 또한 실제로 사용하고 있는 치료방법들로는 手術療法 · 放射線療法 · 免疫療法 · 化學療法등이 있지만 아직까지는 미흡한 상태라 할 수 있을 것이다.

현재 일반적으로 抗癌劑를 이용한 化學療法 등이 사용되고 있고, 免疫療法을 위한 많은 방법들이 연구되고 있어 본 著者들은 天門冬이 免疫細胞의 增殖을 촉진시켜주면서 抗癌作用이 있을 것으로 思料되는 바 皮膚癌細胞인 A431 cell line과 骨髓癌細胞인 KHOS-NP cell line에 天門冬을 投與하여 癌細胞의 增殖을 살펴보고, 免疫細胞인 T cell과 B cell의 增殖을 살펴보았다. 또한 腹腔內 macrophage에서 분비되는 NO의 量을 In vitro와 In vivo實驗을 통하여 살펴보았고, T cell의 apoptosis 및 subpopulation의 量을 관찰하였다.

이 結果 天門冬은 A431 cell 및 KHOS-NP cell에 抗癌作用을 보였고, T cell의 增殖을 촉진시켰으며, 마우스 腹腔內 macrophage에서 分泌되는 NO의 量을 감소시켰고, T cell의 apoptosis에 있어서는 對照群에 비하여 有意性있게 增加시켰으며, subpopulation에서는 T_H cell을 增加시켰다. 그리하여 天門冬은 抗癌作用 뿐만아니라 免疫細胞의 增殖에도 관여하는 藥物로 認定할 수 있을 것으로 思料된다.

중심단어 : 天門冬, 正氣, 扶正, 祛邪, A431 cell, KHOS-NP cell, 면역세포, NO, apoptosis, subpopulation

I. 緒 論

正氣는 인체의 生體代謝를 촉진시켜주면서 生命을 延長시켜주고, 疾病의 원인에 대해 防禦하는 機能을 하고 있으며, 邪氣는 질병 발생의 原因으로 人體에 모든 疾病을 誘發시킨다. 癌도 또한 하나의 邪氣 侵犯으로 東醫學에서는 癌의 發生에 대하여 飲食不節, 外邪, 七情鬱結 및 臟腑의 機能失調 등의 病因으로 各種의 全身症狀과 胃腸障礙, 骨髓造血障礙 및 神經損傷에 影響을 미치기 때문에(29,31-32) 正氣補養 및 補血을

爲主로하면서 破積 · 活血 · 解鬱 · 行氣등의 治法들을 兼用하고 있다(29-30,33-35). 또한 西醫學에서는 癌을 治療하기 위하여 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法과 遺傳子療法등을 使用하나 癌腫에 따른 感受性과 治療 後의 經過 그리고 副作用이 각기 다르고, 또 이에 따른 많은 문제점들을 안고 있는 것이다.

癌細胞의 增殖을 抑制하는 方法에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, apoptosis란 癌細胞를

*동신대학교 한의과대학 병리학교실

직접적으로 死滅시키는 necrosis와는 對照되는 用語로 癌細胞를 自然死시키는 방법이라 말할 수 있으며, 이러한 apoptosis는 macrophage에서 분비되는 각종 cytokine에 의해 일어나거나, cytotoxic T-lymphocyte에 의해 일어나고¹³⁾, 抗癌劑들의 부작용 및 tumor regression과 관계가 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 한편 nitric oxide(NO)는 활성화된 macrophage 및 여러 세포에서 발견되는 것으로¹⁹⁾, macrophage가 생산하는 NO가 抗癌作用이 있다고 최초로 보고²⁰⁾한 이래 NO가 生體內에서 癌細胞를 공격하여 傷害시키는 癌 免疫의 effector로서 그 역할을 하고 있어 腹腔 macrophage에서 분비되는 NO가 癌細胞의 增殖을 抑制할 것으로 보인다.

현재까지 癌細胞에 대한 研究로는 多方面(36-42)으로 이루어지고 있는데, 滋陰清熱하면서도 潤燥生津하는 天門冬이 中國等地에서는 人體內 免疫能力을 增強시켜주고, 또한 各種 癌腫細胞의 活性을 抑制하는 작용이 있어^(1,43) 癌細胞 增殖 抑制作用과 免疫細胞 增強作用을 糾明코자 In vitro上에서 MTT法으로 A431 cell line과 KHOS-NP cell line의 抗癌作用 및 免疫細胞인 마우스 胸腺 및 脾臟細胞의 增殖을 살펴보고, 마우스 腹腔內 macrophage의 nitric oxide 生成과 apoptosis 및 subpopulation의 影響을 고찰한 결과 다음과 같은 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材 料

1) 動 物

實驗에 使用한 動物은 生後 8주령된 BALB/c계 實驗 마우스를 使用하였으며, 動物 飼育條件은 溫度 20 ± 2 °C, 濕度 55 ± 3 %, light/dark(12hrs.)으로 하였다.

2) 材 料

本 實驗에 使用한 天門冬 50g에 증류수 500 ml를 가하여 가열 추출한 후, 여과하여 濾液을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말을 얻었다(Table I). 그 후 細胞실험시에 증류수에 용해시킨 뒤 membrane filter(d 0.45 μ m)로 여과 멸균하여 사용하였다.

Table I Yield of Samples

韓藥材	生 藥 名	Yield(%)
天門冬	Asparagi Tuber	33.9

2. 方 法

1) 細胞柱 및 細胞 培養條件

A431 및 KHOS-NP 細胞柱는 DMEM 배지를, 마우스 胸腺 및 脾臟細胞는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100units/ml, 100 μ g/ μ l)을 첨가하여 사용하였다. 계대 배양은 1:10~1:20 비율로 3일 간격으로 하였고, 細胞 증식에 미치는 天門冬의 影響을 관찰하기 위한 實驗은 계대배양 2일째의 細胞를 사용하였다.

2) MTT法에 의한 細胞 增殖率 測定

本 實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann²⁾이 개발하여 Kotnik^{등3)}이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 細胞 부유액 100 μ l(2×10^5 cells/ml)를 접종하여 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 농도별로 희석된 天門冬 100 μ l를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 은막지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 배양액을 제거한 후 생성된 formazan crystal을 DMSO 100 μ l로 溶出시킨 다음 發色된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader를 이용하여 570nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 細胞 증식율을 백분율로

환산하였다.

3) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞의 分離

마우스의 胸腺 및 脾臟細胞 分離는 Wysocki⁴⁾ 및 Mizel^{등5)}의 방법을 이용하였다. Balb/c 3T3 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 적출한 胸腺 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음 10ml 주사기로 조심스럽게 細胞부 유액을 취하여 1500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 細胞를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 胸腺 및 脾臟細胞를 분리하였으며, 분리한 胸腺 및 脾臟細胞의 생존율 및 총 細胞數를 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

4) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 영향

胸腺 및 脾臟細胞 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1.2×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 Concanavalin A $1 \mu\text{g/ml}$ 및 天門冬를 첨가한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS $100 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 發色된 각 well의 흡광도를 Microplate-Reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

5) 마우스 복강 macrophage의 분리 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향

In vitro 실험에서는 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하고 3일후에 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 복강에 cold PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척한 후 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO₂-incubator에서 배양시키고 2시간후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한

macrophage를 cell scraper로 분리하여 macrophage를 24 well plate에 well당 1×10^6 cells을 분주한 후 각 well에 天門冬 $50 \mu\text{g/ml}$, LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 와 γ -IFN 25units/ml를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군으로 분류하여, 37 °C CO₂-incubator에서 24시간 배양한 후에 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess 법⁶⁾으로 측정하였다.

배지 $100 \mu\text{l}$ 와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) $100 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

In vivo 실험에서는 天門冬 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하고 8일째 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하였다. 3일후에 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 복강에 cold PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하여 동일한 방법으로 실험하여 NO양을 측정하였다.

6) T-lymphocytes의 apoptosis와 subpopulation에 미치는 영향

天門冬 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하고 8일째 경추탈골하여 흉선세포현탁액을 조제하였다. 이렇게 조제한 마우스의 T-lymphocyte를 96 well plate에 well당 1×10^5 cells을 분주하여, 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 天門冬 $10 \mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 12시간 배양하였다. 배양 후 세포를 수거하여 eppendorf tube에 넣어 5분간 원심분리(4°C, 2,500 rpm)한 후, 세포를 모아 PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide($10 \mu\text{g/ml}$) $20 \mu\text{l}$ 를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후 flow cytometer로 sub-G1 peak를 관찰하였다⁷⁾.

또한 조제한 세포현탁액을 96 well plate에 1×10^6 cells씩 분주하고, 형광항체인 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로

二重染色하여 4°C에서 反應시킨 다음, flow cytometer(excitation: 488nm, emission: 525nm-FITC, 575nm-PE)를 利用하여 胸腺 세포중의 subpopulation을 測定하였다).

7) 統計處理

統計的 有意性 檢討는 對照群에 대한 變動을 “one way ANOVA test”로 하였으며, p값이 5% 미만일 때는 統計的으로 有意性이 있다고 判定하였다.

III. 實驗結果

1. MTT法에 의한 癌細胞 增殖率 測定

天門冬이 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line과 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP cell line에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각각의 細胞에 1, 10, 100µg/ml의 농도별로 투여하였다. 그 결과 天門冬을 투여하지 않은 A431細胞의 對照群을 100(%)로 하였을 때 天門冬을 투여한 實驗群들은 모두 對照群에 비하여 有意性있는 抗癌作用을 보였고, KHOS-NP細胞의 경우에 있어서도 對照群에 비하여 癌細胞의 增殖을 抑制하는 有意性을 보였다(Table II).

Table II. The Cytotoxic effects of Asparagi Tuber on A431 and KHOS-NP cell lines

Cancer cell line	Cytotoxicity(%)			
	Control	1µg/ml	10µg/ml	100µg/ml
A431	100±0.7	91.5±0.9**	89.9±1.5**	87.9±0.8**
KHOS-NP	100±1.9	90.3±1.8*	90.1±1.7*	88.2±1.4**

*; P<0.01, **; P<0.001

2. 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 影響

天門冬이 免疫細胞의 增殖에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 胸腺 및 脾臟細胞를 분리한 다음 각각의 세포에 1, 10, 100µg/ml의 농도별로 투여한 결과 다

음과 같았다. 胸腺細胞는 Concanavalin-A 1µg/ml를 처리한 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 Con-A를 처리하지 않은 群의 細胞生存率은 85.2±1.5(%)로 감소하였지만 天門冬을 투여한 實驗群들중 10µg/ml를 投與한 實驗群에서 부터 모두 對照群에 비하여 免疫細胞의 活性이 增加되었다. 그러나 有意性은 認定되지 않았다. 또한 脾臟細胞의 경우에 있어서는 Lipopolysaccharide 10µg/ml를 투여한 對照群의 細胞生存率을 100(%)로 하였을 때 LPS를 투여하지 않은 群의 細胞生存率은 83.9±1.7(%)로 감소하였고, 天門冬을 투여한 모든 實驗群에서는 對照群에 비하여 1~5%정도의 免疫細胞 活性化을 抑制하였다 (Table III).

Table III. Effect of Asparagi Tuber on the proliferation of Immunocytes

Immunocytes	Cytotoxicity(%)			
	Control	1µg/ml	10µg/ml	100µg/ml
Thymocytes	100±1.8	99.7±1.9	101.9±2.0	103.7±1.6
Splenocytes	100±1.6	99.5±1.9	96.0±2.8	95.8±1.8

Thymocytes: Con A non-treated group 85.2±1.5%

Splenocytes: LPS non-treated group 83.9±1.7%

3. 마우스 腹腔 macrophage의 nitric oxide 生成에 미치는 영향

天門冬이 免疫細胞의 增殖에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 腹腔內에 있는 macrophage의 NO를 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. In vitro上에서 NO의 量은 LPS만을 투여한 對照群은 0.76±0.1(%)인데 반하여 LPS와 IFN를 투여한 對照群은 21.2±0.5(%)였지만 天門冬 1, 100µg/ml을 투여한 實驗群에서는 control(+)에 비하여 21.1±0.03(%), 20.6±0.3(%)으로 減少하였다. In vivo上에서는 LPS만을 對照群이 4.2±0.2(%)인 반면 LPS와 IFN를 투여한 對照群은 15.5±1.0(%)으로 현저히 증가하였으나 天門冬을 투여한 實驗群에서는 control(+)보다 NO의 量이 유의성

있게 현저한 감소현상을 보였다(Table IV).

Table IV. Effect of Asparagi Tuber on nitric oxide production from mice peritoneal macrophage in vitro and in vivo

	Cytotoxicity(%)	
	In vitro	In Vivo
Control (+)	21.2±0.5	15.5±1.0
Control (-)	0.76±0.1***	4.2±0.1**
AT 1μg/ml	21.2±0.03	
AT 10μg/ml	22.0±0.3	
AT 100μg/ml	20.6±0.3	
A T		8.6±1.4**

** ; P<0.01, *** ; P<0.001 vs control(+)
In Vivo : Asparagi Tuber(500mg/kg) were administered p.o. for 7 days.

4. T 림프구의 apoptosis와 subpopulation에 미치는 天門冬의 영향

天門冬이 마우스 胸腺細胞의 apoptosis와 subpopulation에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 胸腺細胞에 天門冬을 각각 濃度別로 투여한 결과 다음과 같았다. Apoptosis의 경우 天門冬을 투여한 實驗群은 對照群보다 증가하였고, Subpopulation의 경우에 있어서는 對照群에 비하여 CD4+로 전처치한 T_H cell이 有意性있게 增加한 반면 CD8+로 전처치한 T_C/T_S cell은 有意性있는 減少現象을 나타내었다(Table V).

Table V. Effect of Asparagi Tuber on T-lymphocyte apoptosis and subpopulation in mice

	Apoptosis(%)	CD4+(%)	CD8+(%)
Control (+)	4.3±0.4	8.0±0.7	2.4±0.3
Asparagi	12.5±0.4**	15.6±0.4**	1.6±0.4*

* ; P<0.05, ** ; P<0.01
Asparagi Tuber(500mg/kg) were administered p.o. for 7 days.

IV. 考 察

癌은 지금까지 알려져 있는 死亡原因中 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 이를 정복하려는

노력 또한 국내외적으로 다양하게 진행되고 있다. 그리하여 西醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法과 遺傳子療法등을 사용하나 手術療法과 放射線療法은 局所的인 治療法이기 때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 현재로서는 治療方法이 定立되어 있지 않은 상태이기 때문에 化學療法の 發展만이 癌治療率을 向上 시킬수 있는 것이나 化學療法自體도 化學 藥材의 毒性問題를 해결하지 못하고 있는 실정이다(24-28). 즉, 外科的 處置法, 放射線 治療法, 化學療法, 免疫療法등이 癌腫에 따른 感受性과 治療 後의 經過 그리고 副作用이 각기 다르고, 또 이에 따른 많은 문제점들을 안고 있는 것이다.

東醫學에서는 癌의 發生, 症狀 및 治療에 대하여 飲食不節, 外邪, 七情鬱結 및 臟腑의 機能失調 등의 病因으로 頭暈, 失眠, 多夢, 大小便失調 등의 全身症狀과 胃腸障礙, 그리고 백혈구감소, 혈소판감소, 골수생성억제등 骨髓造血障礙등이 발생하고, 또한 疼痛이나 肢體麻木 등의 신경손상 및 각 臟器·皮膚·毛髮등에도 영향을 끼치게 되기 때문에(29,31-32) 正氣補養 및 補血을 爲主로 하면서 破積·活血·解鬱·行氣등의 治法들을 兼用하고 있으며, 현재 中國등에서는 各種의 腫瘍 治療法으로 清熱解鬱法등의 祛邪法과 함께 扶正培本法들을 利用하고 있다(29-30,33-35).

東醫學에서는 모든 疾病의 發生을 正邪의 觀點에서 설명하고 있는데, 특히 正氣의 強弱에 의해 질병이 好轉되고 惡化된다고 하였다. 다시 말해 正氣가 強하면 強할수록 邪氣에 대한 抵抗力이 強해져 비록 邪氣가 침범하여도 正氣가 이를 방어하고, 正氣가 弱하면 弱할수록 邪氣에 대한 對處能力이 저하되어 쉽게 發病한다고 하였다. 그리하여 疾病을 치료하는데 있어서도 正氣를 補強하는 治療法을 위주로 사용하면서 邪氣를 제거할 수 있는 方法을 모색하게 된 것이다.

正氣는 인체의 生體代謝를 촉진시켜주면서 生命을 延長시켜주고, 疾病의 原因에 대해 防禦하는 필수불가결한 因子이고, 邪氣는 人體의 生

命을 위협하는 因子로써 모든 질병 발생의 原因이라 할 수 있다. 그리하여 癌의 발생도 하나의 邪氣 侵犯으로 간주할 수 있고, 癌을 치료하려는 抗癌劑 또한 각종의 副作用을 나타내기 때문에 邪氣中의 하나로 인정할 수 있다 하겠다.

지금까지 사용되고 있는 抗癌劑나 免疫療法들을 고려할 때 癌細胞의 發生을 邪氣로 볼 경우 正氣인 免疫細胞의 增殖이 強하면 強할수록 間接적으로 癌細胞의 增殖을 抑制하거나 또는 直接的으로 癌細胞에 細胞毒性을 나타내 癌細胞의 增殖을 抑制할 수 있는 韓藥材가 있을 것으로 思料된다. 그리하여 正氣인 免疫細胞 增殖의 活性化를 促進시키면서 邪氣인 癌細胞의 增殖을 抑制할 수 있는 韓藥材의 作用料明 및 抗癌治療의 機轉을 糾明하고자 한다.

癌細胞의 增殖을 抑制하는 方法에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, apoptosis란 necrosis(세포괴사)와는 대조되는 용어로 초기에 핵의 응축, 세포질의 응축, 수포상의 세포돌기 형성 등이 관찰되지만 necrosis는 독성물질이나 산소부족에 의하여 세포막투과성이 항진되어 세포내로 물이 들어가서 팽윤되며 mitochondria 내로 Ca^{2+} 유입이 일어나 ATP 생성이 저하되어 에너지 부족의 결과에 의해 세포사가 일어난는 것으로 알려져 있다(9-12). 生體內의 腫瘍에서 발견되는 apoptosis는 macrophage에서 분비되는 각종 cytokine에 의해 일어나거나, cytotoxic T-lymphocyte에 의해 일어나는 것으로(13) 抗癌劑들의 부작용 및 tumor regression과 관계가 있는 것으로 알려져 있으며(14-15), apoptosis에 의해 抗癌劑의 치료효과가 mediate될 수 있다는 연구들이 많이 보고되고 있지만(16-18), 아직까지 抗癌劑의 apoptosis 기전에 대해서는 명확하지 않다.

한편 nitric oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthetase (NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 NOS는 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS(iNOS) 2 종류가 있으며 cNOS는 vascular endothelium 및 brain에서 iNOS는 활성화된 macrophage 및 여러 세포에서 발견되었다(19).

Macrophage가 생산하는 NO가 抗癌作用이 있다고 최초로 보고한 것은 1987년 Hibbs등(20)이 마우스에 BCG를 접종 후 macrophage를 분리하여 LPS를 첨가하여 배양하였을 때 腫瘍細胞의 增殖이 抑制되고, 여기에 N-MMA를 가하면 抗癌作用이 없어진다고 하였다. 이것은 여러 자극제에 의해 活性化된 macrophage가 정상세포보다는 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophage-mediated tumor cytotoxicity는 중요한 의미가 있다(21). 이러한 NO는 生體內에서 癌細胞를 공격하여 傷害시키는 癌 免疫의 effector로서 그 역할을 하고 있어 腹腔 macrophage에서 분비되는 NO가 癌細胞의 增殖을 抑制할 것으로 보인다. 그러나 NO의 이러한 공격을 피하는 癌細胞들은 惡性化될 가능성도 시사되고 있기 때문에 NO의 裏面性이라 불리고 있다(22).

현재까지 癌細胞에 대한 研究로는 多方面으로 이루어지고 있는데, 鄭(36)은 內託羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 영향을 실험적으로 관찰하였고, 沈(37)은 白鼠를 이용하여 穿山甲의 抗癌效果를 관찰하였으며, 金(38-39)은 伏梁丸과 肥氣丸등이 各種 癌細胞柱의 成長에 阻礙가 되어 抗癌效果가 있었음을 밝혔고, 鄭(40-41)등은 單一藥物로 金銀花 및 魚腥草 그리고 白鮮皮·穿山甲가 抗癌效果가 있음을 밝혔으며, 李(42)는 增損五積丸을 이용하여 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 영향을 報告하였다.

天門冬은 滋陰清熱하면서도 潤燥生津하는 藥物로 百合科에 속한 多年生 天門冬 塊根을 사용하고 있는데, 臨床적으로 各種의 陰虛內熱과 肺燥로 인한 咳血등에 사용되고 있고, 또한 中國等地에서는 人體內 免疫能力을 增強시켜주는 효과가 있으면서 各種 癌腫細胞의 活性을 抑制하는 작용이 있어 乳腺癌이나 白血病등에 이용되고 있다(1,43). 天門冬의 이러한 作用 때문에 本 研究에서는 天門冬의 癌細胞 增殖 抑制作用과 免疫細胞 增強作用을 糾明코자 In vitro上에서 MTT法으로 測定한 결과 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line과 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP

cell line에 天門冬은 有意性있게 抗癌作用을 나타내었고, 또한 免疫細胞의 增強에 미치는 작용을 살펴보기 위하여 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 天門冬을 투여한 결과 T cell은 對照群보다 약간 增加하는 추세를 보였지만 B cell의 경우에 있어서는 對照群보다도 5%정도의 減少하는 現象을 보였다. 天門冬이 免疫細胞의 增減외에도 현재 各方面에서 研究중인 NO·apoptosis·subpopulation에 어떠한 影響을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스 腹腔內 macrophage의 nitric oxide 生成과 apoptosis 및 subpopulation의 影響을 고찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉 In vitro上에서는 NO의 量은 LPS와 IFN를 동시에 투여한 對照群보다 天門冬1, 100 μ g/ml을 投與한 實驗群이 對照群보다 약간 減少되었지만 10 μ g/ml을 投與한 實驗群에서는 增加하는 現象을 보였으나 모두 有意性은 認定되지 않았고, 또한 In vivo上에서는 control(+)보다는 有意性있는 減少를 보였으며, T 림프구의 apoptosis는 對照群보다 有意性있는 增加를 나타내었다. 또한 T cell의 subpopulation에서는 天門冬이 T cell의 보조 세포항체인 CD4+를 처리한 결과 T_H cell은 有意性있게 增加되었고, 이에 반해 억제세포항체인 CD8+로 처리한 결과 T_C/T_S cell은 有意性있게 減少되었다.

이러한 결과들을 綜合할 때 天門冬은 T cell의 免疫力 增強시킬 수 있는 藥材일 뿐만 아니라 抗癌作用이 있는 藥物로 臨床에서 使用할 수 있을 것으로 思料되지만 T cell의 apoptosis가 增加한 것에 대하여 考察하여 볼 때 腹腔內 macrophage에서 分泌되는 NO의 量보다는 다른 機轉이 있을 것으로 思料되어 이에 대한 研究가 더욱 進行되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

以上과 같이 天門冬이 癌細胞의 增殖에 미치는 影響과 免疫細胞에 미치는 影響을 살펴본

結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 天門冬은 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line의 增殖을 抑制하였다.
2. 天門冬은 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP cell line의 增殖을 抑制하였다.
3. 天門冬은 對照群에 비하여 胸腺細胞의 增殖을 增加시켰다.
4. 天門冬은 對照群보다 脾臟細胞의 增殖을 抑制시켰으나 有意性은 認定되지 않았다.
5. 天門冬은 In Vitro上에서 LPS와 IFN을 동시에 투여한 對照群보다 마우스의 腹腔內 NO의 量을 減少시켰다.
6. 天門冬은 In Vivo上에서 LPS와 IFN를 동시에 투여한 對照群보다 마우스의 腹腔內 NO를 減少하였다.
7. 天門冬은 마우스 胸腺細胞의 apoptosis를 증가시켰다.
8. 天門冬은 마우스 胸腺細胞에 있는 T_H cell의 subpopulation를 對照群보다 有意性있게 增加시켰다.
9. 天門冬은 마우스 胸腺細胞에 있는 T_C/T_S cell의 subpopulation를 對照群보다 有意性있게 減少시켰다.

參 考 文 獻

- 1) 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, pp. 51~52, 1987
- 2) Mosmann, T.: J. Immunol. methods. 65, 55~63 (1983).
- 3) Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : J. Immunol. methods. 129, 23 (1990).
- 4) Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2844 (1978).
- 5) Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. : J. Immunol. 120, 1497 (1979).
- 6) Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B.

- and Clark, I.A. : Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9), 3280 (1991).
- 7) Tomei, L.D., Cauter, P. and Wenner, C.E. : Inhibition of radiation induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 324 (1988).
 - 8) Shortman, K. and Backson, H. : The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulation of mouse thymus cells. *Cell. Immunol.*, 12, 230, 1974.
 - 9) Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, E., Jenkinson, J. and Owen, J.J.T. : Antibodies to CD/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337, 181 ~184 (1989)
 - 10) Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C. Vayssiere, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G. : Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, 181, 1661~1672 (1995)
 - 11) Zhou, T., Edwards, C.K. and Mounts, J.D. : Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 182, 129~137 (1995)
 - 12) McConkey, D.J. et al : Cellular signaling in programmed cell death(apoptosis). *Immunol. Today.*, 11, 120~121 (1990)
 - 13) Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, et al : The topoisomerase II inhibitor teniposide(VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, 200, 416~424 (1992).
 - 14) Hickman JA : Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, 11, 121~139 (1992).
 - 15) Collins MKL, Marvel J, Malde P and Lopez-Rivas A : Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J. Exp. Med.*, 17, 1043~1051 (1992).
 - 16) Lotem J and Sachs L : Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*, 80, 1750~1757 (1992).
 - 17) Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, et al : Bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.*, 53, 3321~3326 (1993).
 - 18) Okamoto, A., Okabe, M. and Gomi, K. : Analysis of DNA Fragmentation in Human Uterine Cervix Carcinoma HeLa Cells treated with Duocarmycins or other Antitumor agents by Pulse Field Gel Electrophoresis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 93~98 (1993)
 - 19) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6, 3051~3064 (1992).
 - 20) Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235, 473 (1987).
 - 21) Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uno, K. and Sasada, M. : Leukemic cell lysis by activated human macrophages. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 1174~1180 (1993).
 - 22) Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland,

- H.E.Jr., Gilleland L.B., Abell, C.L. and Yamada, T.: Neutrophil-mediated nitrosamine formation: Role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology*, 103(4), 1260~1266 (1992).
- 23) Thomsen, L.L., Ching, L.M. and Baguley, B.C.: Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. *Cancer Res.*, 51, 6073~6078 (1991).
- 24) Fish B: Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer*, 54:2609, 1984.
- 25) Kim, SH: Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J. Kor. Cancer Assoc.*, 21: 11, 1989.
- 26) Park CG, Lim DK, Kook YH, Cha CR, and Paik CG: In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J. Kor. Cancer Assoc.*, 22: 61, 1990.
- 27) Willson JK, V, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, & Weese JL: Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *Cancer Res*, 47: 2704, 1987.
- 28) 이창해·이봉기·이원형·김주덕: 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성, 연세의대 논문집, 16: 180, 1983.
- 29) 錢伯文: 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 1~10, 1980
- 30) 李 岩: 腫瘤病, 北京, 人民衛生出版社, pp. 2~8, 1982
- 31) 郁仁存: 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp. 1~10, 1983
- 32) 金完熙·崔達永: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp. 140~42, 168~70, 281~84, 1985
- 33) 崔昇勳: 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, pp. 37~42, 1995
- 34) 李 岩: 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp. 11~26, 1983.
- 35) 張代釗: 中西醫結合治療癌證, 山西, 山西人民出版社, pp. 11~19, 1984.
- 36) 鄭鉉雨: 內託羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 實驗的 研究, 益山, 圓光大學校 大學院, 1996
- 37) 沈載然: 白鼠를 이용한 枳實 魚腥草 穿山甲 및 豬苓의 抗癌效果에 관한 研究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1988
- 38) 金剛山: 伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1989.
- 39) 金剛山: 肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1992.
- 40) 鄭鉉雨·崔政和·陳千植: 金銀花 및 魚腥草가 癌細胞柱에 미치는 影響, 東醫病理學會誌 10卷 Vol 1, pp. 126~132, 1996
- 41) 鄭鉉雨·田炳薰: 白鮮皮와 穿山甲이 人體 癌細胞柱에 미치는 細胞毒性的 效果 東醫病理學會誌, 11卷 Vol 1, pp. 58~64, 1997
- 42) 李竝求: 增損五積丸(脾積方)이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果, 益山, 圓光大學校 大學院, 1993
- 43) 辛民教: 臨床本草學, 서울, 南山堂, pp. 231~232, 1986

Abstract

The effect of Asparagi Tuber on Anti-cancer and Immunocytes

Jeong Hyun Woo, Cho Young Lim
Dept. of Pathology, Oriental Medical college
of DongShin University

To investigate effect of water extract of

Asparagi Tuber(天門冬) on human cancer cell-lines and immunocytes, this research estimated proliferation of A431 cell line, KHOS-NP cell line, mouse thymocytes and mouse splenocytes, Nitric Oxide(NO) from macrophage, apoptosis and subpopulation of the mouse thymocytes.

The result were obtained as follows ;

1. Asparagi Tuber inhibited the proliferation of A431 cell line.
2. Asparagi Tuber inhibited the proliferation of KHOS-NP cell line.
3. Asparagi Tuber accelerated the proliferation of mouse thymocytes.
4. Asparagi Tuber inhibited the proliferation of mouse splenocytes.
5. Asparagi Tuber 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited the production of NO from macrophages in vitro, being compared NPS+IFN treated group.
6. Asparagi Tuber inhibited the production of NO from macrophages in vivo, being compared LPS+IFN treated group.
7. Asparagi Tuber accelerated the induction of apoptosis of the mouse thymocytes.
8. In subpopulation Asparagi Tuber increased T_H of the mouse thymocytes, but decreased T_C/T_S of the mouse thymocytes

Key word : Asparagi Tuber, A431 cell, KHOS-NP cell, immunocytes, Nitric Oxide(NO), apoptosis, subpopulation, T_H cell, T_C/T_S cell