

# 상륙이 생쥐에 이식된 L1210 세포의 증식에 미치는 영향

한미숙 · 오찬호<sup>1</sup> · 은재순\*

우석대학교 약학대학, 1: 우석대학교 이공대학

## Effect of *Phytolaccae Radix* on the Proliferation of Transplanted-L1210 cells in Mice

Mi Sook Han, Chan Ho Oh<sup>1</sup>, Jae Soon Eun\*

College of Pharmacy, 1: College of Science and Technology, Woosuk University

Cellular death by apoptosis is an active process, depending on gene transcription and protein synthesis. It was reported that nitric oxide can induce apoptosis in several cancer cell-lines. We studied effects of *Phytolacca esculentum* van Houtt (*Phytolaccaceae*) Radix water extract (PRE) on the proliferation of transplanted-L1210 cells in mice. When PRE (500 mg/kg) was administered orally once a day for 7 days after transplantation of L1210 cells to mice, DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells was induced and mitochondrial transmembrane potential of those cells was reduced. Additionally, DNA fragmentation of L1210 cells was induced by the treatment of PRE *in vitro*. Also, DNA fragmentation of L1210 cells was enhanced by co-culture with the peritoneal macrophages obtained from PRE-administered mice and was partly inhibited by L-NMMA *in vitro*. PRE enhanced the production of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from peritoneal macrophages. These results suggest that PRE induces apoptosis of transplanted-L1210 cells via directive action on L1210 cells and stimulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from macrophages.

Key words : *Phytolaccae Radix*, L1210 cells, apoptosis, nitric oxide, TNF- $\alpha$ .

### 서 론

상륙 (*Phytolacca esculentum* van Houtt)은 상륙과 (*Phytolaccaceae*)에 속하며, 성분으로는 quercimetricin, jaligonic acid, esculentic acid, acinosolic acid, phytolaccoside B, pentacyclic triperpenoid, phytolaccagenic acid 등 다양한 성분이 밝혀졌으며<sup>1-4)</sup>, 약리작용으로는 소염작용<sup>5)</sup>, 및 혈압하감작용<sup>6)</sup> 등이 보고되었다. Nitric oxide (NO)는 L-arginine에 NO synthetase (NOS)가 작용하여 생성되며, 생성된 NO는 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. Macrophage에서 생성된 NO는 mitochondria function 및 DNA synthesis를 억제하여 다양한 cytostatic 및 cytotoxic effect를 나타내며<sup>8)</sup>, 또한, apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되었다<sup>9)</sup>. 본 연구자들은 감초의 주성분인 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid가 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 이식된 암세포의 apoptosis를 촉진함을 보고하였으며<sup>10,11)</sup>, 자근<sup>12)</sup>, 조각자<sup>13)</sup> 및 오미자<sup>14)</sup> 추출물도 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 이식된 암세포의

apoptosis를 촉진함을 이미 보고한 바 있다. 최근, 강<sup>15)</sup>은 상륙 물 추출물을 생쥐에 투여하였을 때 복강 macrophage로부터 NO 생성이 촉진됨을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 상륙 물 추출물이 암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하고자, 백혈병 세포주인 L1210 세포를 이식한 생쥐에 상륙 물 추출물을 1주일간 경구투여한 후 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation을 측정하였다. 또한 이의 작용기전을 확인하고자 macrophage로부터 분리되는 nitric oxide 및 tumor necrosis factor- $\alpha$ 의 양을 측정하여 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷 6 주령을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20±2 °C, 습도 50±5%, dark/light 12 시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### 2. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1569  
· 접수: 2002/02/08 · 수정: 2002/03/15 · 채택 : 2002/03/28

medium (DME), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, O55:B5),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN), N-naphthylethylenediamine · 2HCl, MTT, propidium iodide, carbamoyl cyanide m-chlorophenylhydrazon (mCICCP), N<sub>G</sub>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), ethidium bromide, agarose, sulfanilamide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>)는 Molecular Probes Co. mouse tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) immunoassay kit는 R&D Co. 제품을, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다. 사용 기기는 microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 상륙 (Phytolaccae Radix)은 시중 건재상에서 구입하여 엄선하여 사용하였으며, 상륙 100 g을 증류수 1,000 ml로 2회 가열추출한 후 여액을 모아 rotary evaporator로 감압농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 13.5 g (이하 PRE라 함)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 4. DNA fragmentation 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 1마리 당 L1210 세포를  $2 \times 10^6$  cells 씩 복강에 이식하고 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 복강 macrophages에서 NO 생성을 촉진할 수 있는 용량<sup>15)</sup>인 PRE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 5 ml를 복강에 주입하여 잘 섞은 다음 복강액을 분리하여 원심분리 (1,500 rpm, 5 분, 4 °C) 하였다. 침전된 세포를 petri dish로 옮겨 약 2 시간 동안 배양 한 후, 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 원심분리 (1,500 rpm, 5 분, 4 °C) 하였다. 침전된 세포분획을 모아 PI buffer (0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide (10  $\mu$ g/ml) 20  $\mu$ l를 넣어 4 °C에서 30 분간 염색한 후, flow cytometer로 DNA fragmentation (sub-G1 peak)을 측정하였다<sup>16)</sup>. *In vitro* 실험에서는 PRE 1,000, 500, 100 및 50  $\mu$ g/ml를 L1210 세포에 처리하고 48 시간 배양한 후 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였다.

### 5. Mitochondrial transmembrane potential 측정

동일한 방법으로 분리한 L1210 세포를  $1 \times 10^6$  cells/well로 조제한 후 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>)를 최종 농도가 40 nM이 되도록 PBS에 희석하여 염색하고 37 °C에서 15 분간 반응시킨 다음 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm)로 측정하였으며, 이때 negative control로는 uncoupling agent로 carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazon (mCICCP) 50  $\mu$ M을 가하여 동일한 방법으로 측정하였다<sup>17)</sup>.

### 6. Co-culture에 의한 DNA fragmentation 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 PRE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 최종 투여 3일 전에 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고, 3일 후에 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 10 ml를 복강에 주입하여 복강세포를 수집하고, 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리한 다음, RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 배양 후 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다. 분리한 macrophage를 24-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하고, 1 시간 후에 L1210 세포를 well당  $1 \times 10^5$  cells씩 transwell에 넣어 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 co-culture 하였다. Co-culture 후 L1210 세포를 수거하여 위와 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였다. Nitric oxide synthetase (NOS) inhibitor인 L-NMMA는 0.5 mM/well을 사용하였다.

### 7. Nitric oxide의 측정

동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주한 후, 각 well에 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37 °C CO<sub>2</sub>-incubator에서 24 시간 배양한 후 NO양을 Griess 시약으로 측정하였다<sup>18)</sup>. 즉, 배지 100  $\mu$ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylene -diamine · 2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96-well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

### 8. Cytokines 측정

동일한 방법으로 분리한 복강 macrophages를  $1 \times 10^7$  cells/ml로 조제하여, 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500 rpm, 5 분, 4 °C)한 다음, 상등액을 취하여 복강 macrophages에서 분비되는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 양을 mouse immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 상등액 50  $\mu$ l에 assay diluent 50  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 배양한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse TNF- $\alpha$  conjugate concentrate 100  $\mu$ l를 가하여 실온에서 2 시간 배양한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100  $\mu$ l를 혼합하여 30 분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100  $\mu$ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 TNF- $\alpha$ 의 양을 환산하였다.

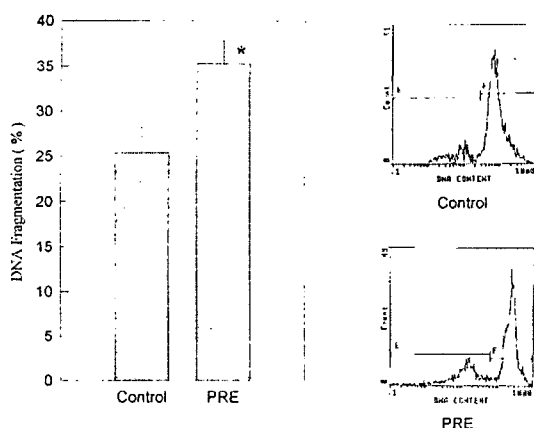
### 9. 통계처리

모든 실험결과들은 mean  $\pm$  SE로 나타내었고 통계처리는 student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험성적

### 1. L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐 복강에 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에서  $25.4 \pm 2.8\%$  이었으나, PRE 투여군에서는  $35.3 \pm 2.5\%$ 로 증가하였다 (Fig. 1). *In vitro* 실험에서 대조군의 DNA fragmentation은  $10.6 \pm 1.2\%$  이었으나, PRE 1,000, 500, 100 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리한 군은  $28.3 \pm 2.1$ ,  $17.6 \pm 1.8$ ,  $12.7 \pm 1.5$  및  $11.3 \pm 1.7\%$ 로 500  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 증가하였다 (Table 1).



**Fig. 1.** Effect of *Phytolacca esculentum* van Houtt Radix water extract (PRE) on DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells. PRE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days after the transplantation of L1210 cells ( $2 \times 10^6$  cells/mouse, *i.p.*) to mice. The collected L1210 cells were lysed in a hypotonic solution containing propidium iodide. DNA contents of the nuclei were determined by a laser flow cytometry and % of hypodiploidy fragmented DNA were calculated. The data represents the mean  $\pm$  SE from 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Effect of PRE on DNA fragmentation of L1210 cells *in vitro*

Samples	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	DNA fragmentation (%)
Control	-	$10.6 \pm 1.2$
PRE	1,000	$28.3 \pm 2.1^{**}$
PRE	500	$17.6 \pm 1.8^*$
PRE	100	$12.7 \pm 1.5$
PRE	50	$11.3 \pm 1.7$

L1210 cells were treated with PRE (1,000, 500, 100 and 50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 48 h *in vitro*. The collected L1210 cells were lysed in a hypotonic solution containing propidium iodide. DNA contents of the nuclei were determined by a laser flow cytometry and % of hypodiploidy fragmented DNA were calculated. The data represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. \*: Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

### 2. L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential에 미치는 효과

생쥐 복강에 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential은 대조군에서  $82.4 \pm 2.7\%$  이었으나, PRE 투여군에서는  $70.3 \pm 2.4\%$ 로 감소하였다 (Table 2).

### 3. 복강 macrophage와 L1210 세포의 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐의 복강 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을

때 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에서  $21.7 \pm 2.1\%$  이었으며, PRE 투여군에서는  $38.4 \pm 2.5\%$ 로 증가하였으나, NOS inhibitor인 L-NMMA를 처리시에는 DNA fragmentation이  $31.8 \pm 1.8\%$ 로 일부 억제되었다 (Table 3).

**Table 2.** Effect of PRE on mitochondrial transmembrane potential of transplanted-L1210 cells

Samples	Mitochondrial transmembrane potential (%)
Control	$82.4 \pm 2.7$
PRE	$70.3 \pm 2.4^*$

PRE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days after the transplantation of L1210 cells ( $2 \times 10^6$  cells/mouse, *i.p.*) to mice. The collected cells were stained with DiOC<sub>6</sub> and the potential was determined by a laser flow cytometry. The data represents the mean  $\pm$  SE from 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Effect of PRE on DNA fragmentation in co-culture of L1210 cells and peritoneal macrophages obtained from PRE-administered mice *in vitro*

Samples	DNA fragmentation (%)
Control	$21.7 \pm 2.1$
PRE	$38.4 \pm 2.5^*$
PRE + L-NMMA	$31.8 \pm 1.8^*$

PRE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and peritoneal macrophages were collected. The co-culture of L1210 cells and macrophages were conducted in the presence of LPS and  $\gamma$ -IFN. The data represents the mean  $\pm$  SE from 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ). \*\*: Significantly different from PRE-treated group ( $p < 0.05$ ). L-NMMA: 0.5 mM/well

### 4. L1210 세포 이식시 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성에 미치는 효과

PRE 투여에 의해 복강 macrophage로부터 생성되는 NO양을 측정하기 위해 LPS 및  $\gamma$ -IFN을 처리하여 NO양을 측정하였다. 대조군에서 생성되는 NO양은  $11.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$  ( $\text{in } 1 \times 10^6$  cells) 이었으나, L1210 세포를 이식한 군은  $29.2 \pm 2.5 \mu\text{M}$ 로, PRE 투여군은  $18.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$ 로 증가하였으며, L1210 세포를 이식한 군에 PRE를 투여한 군은  $48.8 \pm 3.2 \mu\text{M}$ 로 증가하였다 (Table 4).

**Table 4.** Effect of PRE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages.

Samples	Nitric oxide ( $\mu\text{M}/1 \times 10^6$ cells)
Control	$11.8 \pm 1.2$
L1210-Transplantation	$29.2 \pm 2.5^{**}$
PRE	$18.7 \pm 2.4^*$
L1210-Transplantation + PRE	$48.4 \pm 3.2^*$

PRE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days after the transplantation of L1210 cells to mice. The collected peritoneal macrophages were cultured for 24 h in the presence of LPS and  $\gamma$ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean  $\pm$  SE from 5 mice. \*: Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ). \*: Significantly different from L1210-transplantation group ( $p < 0.001$ ).

### 5. L1210 세포 이식시 복강 macrophages로부터 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 효과

PRE 투여에 의해 복강 macrophages에서 생성되는 tumor necrosis factor- $\alpha$ 의 양을 측정할 결과, 대조군에서 생성되는 TNF- $\alpha$  양은  $352.8 \pm 12.4 \text{ pg/ml}$  이었으나, L1210 세포를 이식한 군은  $568.7 \pm 13.8 \text{ pg/ml}$ 로 대조군에 비해 증가하였고, L1210 세포를 이식한 군에 PRE를 투여한 군은  $684.5 \pm 12.5 \text{ pg/ml}$ 로 L1210 세포를 이식한군에 비해 증가하였다 (Table 5).

**Table 5. Effect of PRE on the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages.**

Samples	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (pg/ml)
Control	352.8 $\pm$ 12.4
L1210-Transplantation	568.7 $\pm$ 13.8*
L1210-Transplantation + PRE	684.5 $\pm$ 12.5 <sup>#</sup>

PRE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days after the transplantation of L1210 cells to mice. The collected peritoneal macrophages were cultured for 72 hours in CO<sub>2</sub>-incubator. The level of TNF- $\alpha$  was determined with ELISA kit. The data represent the mean  $\pm$  SE from 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ). <sup>#</sup>: Significantly different from L1210-transplantation group ( $p < 0.05$ ).

## 고찰

Apoptosis는 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 DNA가 180~200개의 염기로 절단 (DNA fragmentation) 되는 것이다<sup>19</sup>. Apoptosis는 programmed cell death에 동반하여 관찰되는 cell death의 형태이지만 항암제 또는 방사선 등과 같은 외부의 요인에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다<sup>20,21</sup>. PRE를 투여하였을 때 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation이 증가되었고, PRE를 L1210 세포에 *in vitro*에서 처리시 DNA fragmentation이 증가되었다는 것은 PRE가 L1210 세포에 직접작용하여 apoptosis를 유도하고 있음을 의미하는 것이다. 생체에서 세포사의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데 respiratory chain이 저해되어 ATP가 제거되고, mitochondrial transmembrane potential이 감소된 다음 막투과성이 변화되어 mitochondrial swelling이 일어나면서 세포사가 진행되는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>. PRE 투여에 의해 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential이 감소되었다는 것은, PRE가 mitochondrial transmembrane potential을 감소시켜 L1210 세포의 apoptosis를 유도하고 있음을 시사하는 것이다. PRE 투여에 의해 유도되는 L1210 세포의 apoptosis에 대한 간접작용을 규명하고자, PRE를 생쥐에 투여하고 분리한 복강 macrophages와 L1210 세포를 *in vitro*에서 co-culture 하였다. 생쥐의 복강 macrophage를 transwell을 이용하여 L1210 세포와 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation은 PRE 투여군에서 대조군에 비해 증가하였다. 또한, NOS inhibitor인 L-NMMA에 의해 L1210 세포의 apoptosis가 약 17% 억제되었다. 이는 PRE가 생체 내에서 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하는데, macrophage로부터 분비되는 NO 뿐만 아니라 다른 factor들이 더 많이 관여하고 있음을 시사하는 것이다. Exogenous NO는 농도의존적으로 종양세포의 apoptosis를 유도하며<sup>22</sup>, 복강 macrophage로부터 생성된 NO도 종양세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>23,24</sup>. 따라서 PRE 투여에 의해 복강 macrophage로부터 NO가 생성되는지의 여부를 관찰하기 위해 LPS 및  $\gamma$ -IFN을 처리하여 NO양을 측정된 결과, L1210 세포를 이식한 군 및 PRE 투여군은 대조군에 비해 NO 생성이 증가하였으며, L1210 세포를 이식한 군에 PRE를 투여한 군은 NO 생성이 더욱 증가하였다. 이러한 결과는 PRE 투여에 의해 생성된 NO가 이식된 L1210 세포의 apoptosis에 일부 관여하고 있음을 확인하여 주는 결과라 할 수 있다. 이러한 결과는 antitumor agents인 flavone-8-acetic acid와 xantherone-4-acetic acid가 macrophage

로부터 NO 생성을 촉진하여 항암작용을 나타낸다는 실험 결과<sup>25</sup> 및 생쥐에 BCG를 투여하고 macrophage를 분리하여, LPS를 첨가하고 배양하면 종양세포의 증식이 억제되며, L-NMMA를 가하면 항암작용이 없어진다는 실험결과<sup>10</sup>와도 비슷한 결과라 할 수 있다. 생체에서 암세포의 apoptosis를 유도하는 것은 NO 뿐만 아니라, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 cytokines 들도 관여하고 있기 때문에<sup>26</sup> macrophage에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정된 결과, PRE 투여에 의해 macrophage에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 의 양이 증가하였다. Macrophage에서 생성되는 TNF- $\alpha$ 는 단독으로는 NO 생성을 촉진하지 않으나,  $\gamma$ -IFN에 의한 NO 생성은 촉진하며, 암세포의 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. PRE 투여에 의해 TNF- $\alpha$ 의 양이 증가하였다는 것은 PRE가 macrophage로부터 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하여 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 촉진할 수 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다. 이들 실험 결과는 PRE가 macrophage로부터 NO 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하여 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하고 있음을 시사하는 것이다.

## 결론

L1210 세포를 이식한 생쥐에 상록 물 추출물 (PRE)을 투여하면 L1210 세포에 대한 PRE의 직접작용과 복강 macrophage로부터 NO 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하여 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하고 있다고 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. 生藥學研究會著: 現代生藥學, p.474, 學窓社, 1994.
2. Woo, W.S., Kang, S.S., Wagner, H. and Chari, V.M.: Tetrahedron Letts. 3239, 1978.
3. Lin, L.J., Meksuriyen, D., Cordell, G.A., Woo, W.S. and Lee, C.K.: Kor. J. Pharmacogn. 18(2), 94, 1987.
4. Woo, W.S.: Phytochemistry, 13, 2887, 1974.
5. Woo, W.S.: Yakhak Hoeji, 15, 95, 1971.
6. 船山: 日本生藥學會 第26回年會講演要旨, 13, 1979.
7. 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.
8. Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB, J., 6, 3051, 1992.
9. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B. and Reichner, J. S.: Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. J. Immunol., 150, 5080, 1993.

10. Eun, J. S., Kwon, J. and Oh, C. H.: Effect of glycyrrhizin on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji*, 42(3), 324, 1998.
11. Eun, J. S., Kwon, J., Yum, J. Y. and Oh, C. H.: Effect of glycyrrhetic acid on the cell death of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji*, 42(6), 583, 1998.
12. Won, K.S., Kim, D.K., Oh, C.H., So, J.N. and Eun, J.S.: Apoptosis of L1210 cells induced by Lithospermi Radix in mouse leukemia cell-line. *Kor. J. Oriental Med. Phys. & Path.*, 15(6), 936, 2001.
13. Cho, S.K., Eun, J.S., Kim, D.K., So, J.N., Oh, C.H. and Song, J.M.: Effect of Gleditsiae Spina on proliferation of transplanted-L1210 cells in mice. *J. Kor. Oriental Med.*, 22(4), 37, 2001.
14. Kwon, J., Lee, S.J., So, J.N. and Oh, C.H.: Effects of *Schizandra chinensis fructus* on the immunoregulatory action and apoptosis of L1210 cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33(3), 384, 2001.
15. Kang, S.Y.: Effect of several crude drugs on Hep G2 cells, mouse peritoneal macrophage and human polymorphonuclear cells. Woosuk University, Thesis, 1997.
16. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139, 271, 1991.
17. Zamzami, N., 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, 1991.
18. Rockett, K. A., Auburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A.: Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9), 3280, 1991.
19. Suda, S., and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873, 1994.
20. Kaufmann, S. H.: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionally note. *Cancer Res.*, 49, 5870, 1989.
21. Bertand, R., Sarang, M. and Jenkin, J.: Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res.*, 51, 6280, 1991.
22. Motomu, S., Tetsuya, I., Akitoshi, O., Nobuyuki, T., Takashi, M., Takashi, H. and Ikuto, Y.: NOC, A nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophage. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 209(2), 519, 1995.
23. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B. and Reichner, J. S.: Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, 150(11), 5080, 1993.
24. Shijun, C., Jonathan, S. R., Romeo, B. M. and Jroge, J. A.: Activated Murine Macrophages Induce apoptosis in tumor cells through Nitric oxide-dependent or independent mechanisms. *Cancer Res.*, 54, 2462, 1994.
25. 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, 1991.
26. Nagata, S.: Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355, 1997.
27. Goureau, O., Lepoivre, M. and Courtois, Y.: Lipopolysaccharide and cytokine induce a macrophage-type of nitric oxide synthetase in bovine retina. *Bio. Chem. Biophys. Res. Commun.*, 186(2), 854, 1992.