

백작약 조다당분획에 의한 대식세포 활성화를 통한 암세포 증식 억제

박혜란 · 정우희 · 정일윤 · 이성태* · 조성기†

한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발팀
*순천대학교 생물학과

Inhibition of Tumor Growth through Macrophage Activation by Polysaccharide Fraction from *Peonia japonica* (PJ-P)

Hae-Ran Park, Uhee Jung, Ill-Yun Jeong, Sung-Tae Yee* and Sung-Kee Jo†

Radiation Food Technology and Bioscience Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea
*Dept. of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

The immunomodulatory activity of PJ-P, a polysaccharide fraction extracted from *Paeonia japonica*, were reported in our previous paper. In the present study, we investigated that PJ-P inhibited cancer growth through activation of macrophages. The activities of peritoneal macrophage to induce tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 (IL-1) β , interleukin-6 (IL-6) and interleukin-12 (IL-12) as well as to ingest fluorescence-latex microbeads were enhanced by treatment of PJ-P. Direct cytotoxic activity of PJ-P against cancer cells was not shown. However, *in vitro*, peritoneal macrophages treated with PJ-P had an activity to kill cancer cells. Furthermore, PJ-P significantly prolonged the survival of mice implanted intraperitoneally with B16F0 mel-anoma cells. These results suggest that PJ-P could be a useful immunomodulator and assistant of anti-tumor agent.

Key words: *Paeonia japonica*, immunomodulator, polysaccharide, activated macrophage, cytokine inducer

서 론

백작약은 수천년 전부터 동양에서 보혈에 사용되어 온 상 등 약재로써 미나리아재비과 Ranunculaceae *Paeonia* 속에 속한다. 백작약의 주요 성분으로서 paeoniflorin이 1960년대에 분리 보고되었다(1,2). 백작약의 주요효과로는 항염증 작용, 항스트레스효과 및 항경련효과 등이 여러 연구진들에 의해서 이미 보고되었다(3,4). 그러나 현재까지의 많은 연구에도 불구하고 백작약의 면역증진 작용에 관한 체계적인 연구결과는 국내·외에서 아직 보고된 바가 없다. 이에 저자 등은 선행 연구에서 백작약의 면역증진효과에 대한 연구의 일환으로 백작약 조다당분획에 의한 B세포 증식의 특성에 관하여 보고한 바가 있다(5). 즉, 백작약 조다당분획이 직접적으로 B세포를 증식시키지는 않았으며, 대신에 대식세포와 T 세포를 자극함으로써 여러 cytokine생성을 유도시켜 B 세포를 증식시키는 확인하여, 면역조절물질로 활용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

암을 정복하기 위하여 그 발생 기전과 치료방법에 관한 많은 연구에도 불구하고 암은 아직 난치병에 속하고 있다. 이와 같은 기존의 불완전한 치료를 극복하기 위하여 유전자 요법 등이 제시되고 있으며, 한편으로는 천연물로부터 부작용이

거의 없는 새로운 항암제의 개발을 도모하고 있다. 그 중 천연생리활성물질을 이용하여 면역기능을 증가시켜 암세포와 대응케 함으로써 암을 억제할 수 있는 방법 즉, 면역요법이 최근의 대체의학 관점에서 주목받고 있다.

암에 대한 면역요법은 NK세포와 대식세포를 활성화시키는 비특이적 방법과 cytotoxicity T 세포를 활성화시키는 특이적 방법이 있다. 여러 자극물질에 의해 활성화된 대식세포들은 암세포성장에 대하여 일차적으로 숙주를 방어하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(6). 대식세포는 비특이적으로 이물질(異物質, foreign material)을 탐식할 수 있는 기능이 있다. 이러한 기능 때문에 대식세포는 생체에서 일차 면역계를 이루는 대표적인 세포이다. 또한, 활성화된 대식세포가 분비하는 cytokine들 즉, interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin-6(IL-6)과 interleukin-12(IL-12)는 암세포 사멸에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다(7-9). 또한 TNF- α 와 IL-1에 의해 활성화된 대식세포가 분비하는 nitric oxide는 불안정한 radical로서 암에 대한 면역반응을 조절하는데 중심적인 역할을 한다(10). 또한 대식세포를 활성화시키는 데는 이차면역계를 담당하는 여러 면역세포들에 의해서도 이루어지며, 반대로 활성화된 대식세포는 이차면역세포들을 활성화시키기도 한다. 이와

†Corresponding author. E-mail: skjo@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8063. Fax: 82-42-868-8043

같이 대식세포는 면역기능의 조절에 중요한 역할을 하고 있으므로 면역요법제 개발시 중심적으로 생각할 수 있다. 이에 본 연구에서는 백작약 조다당분획으로 면역세포들을 활성화 시킴으로써 암세포 생장을 억제할 수 있는 지를 알아보려고 하였다. 즉, 백작약에 의해 대식세포의 탐식작용 증가와 여러 cytokine 및 NO의 생성 정도를 측정하였으며, 대식세포 매개 암세포생장 억제 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 C57BL/6 생쥐는 한국 대한실험동물센터에서 특정병원체 부재(SPF) 상태로 번식 사육한 것을 구입하여 사용하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 55~60%로 유지되며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되는 환경에서 키우고 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

시료제조

백작약은 전라남도 보성에서 구입하여 사용하였다. 백작약의 10배 무게의 증류수로 2회 열수 추출하고 여과한 후 감압농축하였다. 물추출물에 80% ethanol을 가해 4°C 에서 24시간 방치하여 생긴 침전물을 수거하여 조다당분획(PJ-P)으로 사용하였다. 각 시료는 limulus amebocyte lysate(E-TOXATE, Sigma) test를 이용하여 시료내에 lipopolysaccharide(LPS)가 혼입되지 않았음을 확인한 후 사용하였다(11).

세포배양배지

실험에 사용한 세포 배양액은 RPMI1640(Rosewell Park Memorial Institute; GIBCO)에 2 mg/mL sodium bicarbonate(GIBCO), 2×10^{-2} M HEPES buffer(GIBCO), 5×10^{-3} N HCl(GIBCO), 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS; GIBCO), 100 U/mL penicillin(GIBCO), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin(GIBCO), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol(Sigma)를 첨가하여 완전배지로 사용하였다.

면역세포(비장립프구, 복강대식세포) 분리

생쥐를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% ethanol로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하여 멸균된 Hank's balanced salt solution(HBSS; GIBCO)이 담긴 petri-dish에서 세척후, 5% FBS-HBSS가 담긴 petri-dish로 옮겨, 멸균된 수술용 칼로 칼집을 낸 뒤 핀셋으로 지분거려 세포를 부유시킨 후 약 1분간 정치시켜 조직파편을 제거한 후 500 g에서 10분간 원심침전시켰다. 혼입된 적혈구를 제거하기 위하여 cell pellet을 ACK buffer(Tris-NH₄Cl)에 현탁하여 1분간 정치한 뒤 FBS 10 mL을 첨가하였다. 그리고 PBS로 2회 세척하고 trypan blue 염색법으로 살아있는 세포수를 계수한 후 완전배지에 적정 농도로 조정하였다. 복강세포는 thioglycollate 1.5 mL을 생쥐의 복강에 주사 후 4일 후 생쥐를 경추탈골로 희생시킨 다음 pasteur pipet을 이용하여 PBS로 복강을 잘

세척하여 복강세포를 수거하였다.

복강대식세포의 탐식능 측정

대식세포의 탐식능 측정은 Iwao Suzuki의 방법을 변형하여 수행하였다(12). 생쥐의 복강에서 세포를 수거하여 계수 후 dish에서 2일 동안 배양하였다. 그 후 dish에 부착하지 않은 세포는 PBS로 2번 세척하여 버리고 5×10^7 fluorescent microbeads(1 μm , Polysciences)/ 1×10^6 cells를 넣고 45분 간 배양하였다. 배양 후, 비탐식 부유입자(microbead)를 PBS로 3번 세척하여 제거하고 세포 표면에 붙은 비탐식 부유입자를 세척하기 위하여 trypsin을 1분간 처리하고 3번을 세척하였다. 그 후 부착되어 있는 세포를 떼어서 tube에 옮긴 다음 현광현미경을 통하여 세포 안에 탐식된 microbeads를 세었으며, 각 시험군 당 총 300개의 세포를 관찰하였다.

대식세포에서 일산화질소 생성 측정

대식세포에 의해 생산된 일산화질소는 Green 등의 방법(13)을 약간 수정하여 측정하였다. 대식세포의 세포주인 RAW264.7 세포를 96-well plate의 well 당 5×10^4 개씩 분주하고, PJ-P를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 well로부터 100 μL 씩의 배양액을 취하여 ELISA Titer Tek plate에 옮긴 후 동량의 Griess reagent(1 : 1, V/V, N-naphthylethylenediamine 0.1% in H₂O, sulfanilamide 1% in 5% H₃PO₄)를 첨가하고 10분간 실온에 방치한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 NaNO₂의 연속 희석액을 이용하여 결정하였다.

RT-PCR법에 의한 cytokine mRNA의 발현 분석

백작약 조다당분획 PJ-P 처리로 유도되는 cytokine을 알아보기 위하여 RT-PCR법으로 cytokine의 mRNA 양을 분석하였다. PJ-P와 함께 배양한 대식세포를 수거하여 냉장 PBS로 세척한 다음 RNAzol B(Biotecx lab)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. RNA는 추출한 다음 정량하여 약 5 μg 의 RNA와 random primer를 함께 70°C 에서 10분간 정치시킨 후 ice에서 급속히 냉각시켰다. 여기에 10 mM dNTPs 5 μL , $5 \times$ RT buffer 4 μL 와 200 U/ μL MMLV-reverse transcriptase(RTase) 1 μL 를 첨가한 완충 반응액(Promega, USA)을 넣어 37°C 에서 약 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였고 70°C 에서 10분간 처리하여 RTase를 불활성화시켰다. 합성된 template DNA 2 μL 는 $10 \times$ PCR buffer 3 μL , dNTPs 1 μL , 5 U/ μL Taq polymerase(Neurotics, Korea) 0.2 μL 와 각각의 cytokine primer(Bioneer, Korea; Table 1)를 혼합하여 94°C 에서 1분간, 55°C 에서 1분간, 72°C 에서 1분간씩으로 33 cycle의 PCR을 수행하였다. Cytokine primer는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 full-length cDNA sequence를 얻은 후 primer3-input(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>) 프로그램을 이용하여 제작하였다. 이렇게 증폭된 유전자를 ethidium bromide(0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 첨가된 1% agarose gel에 전기영동 한 후 UV-

Table 1. Oligonucleotide primers used in the reverse transcription-polymerase chain reactions

| Gene | Sense/antisense | Primer sequence |
|----------------|-----------------|---------------------------------|
| IL-6 | Sense | 5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3' |
| | Antisense | 5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3' |
| IL-18 | Sense | 5'-ACTGTACAACCGCACTAATACGG-3' |
| | Antisense | 5'-AGTGAACATTACAGATTTATCCC-3' |
| IL-12 | Sense | 5'-ACCTCAGTTTGGCCAGGGTC-3' |
| | Antisense | 5'-GTCACGACGCGGGTGGTGAAG-3' |
| IL-1 | Sense | 5'-AAGCTCTCCACCTCAATGGA-3' |
| | Antisense | 5'-TGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3' |
| iNOS | Sense | 5'-GGATAGGCAGAGATTGGAGG-3' |
| | Antisense | 5'-AATGAGGATGCAAGGCTGG-3' |
| β -actin | Sense | 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' |
| | Antisense | 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3' |

lamp하에서 관찰하였다.

Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)에 의한 cytokine 측정

복강대식세포를 조다당분획 PJ-P와 함께 배양하였을 때 생산되는 cytokine 양을 ELISA로 측정하였다. 대식세포를 24-well plate에 2.5×10^6 cells/well씩 분주하고 PJ-P 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가하여 배양하였다. 배양 후 24시간째에 각각 원심분리에 의하여 배양상등액을 준비하여 -80°C 에서 cytokine의 측정 시까지 보관하였다. 대식세포에서 PJ-P에 의해 유도된 IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kits(Endogen)를 사용하여 측정하였다. 실험은 kits의 manuals에 따라 수행하였다. 흡광도는 450 nm에서의 값으로부터 550 nm의 값을 뺀 값으로 하였으며, microplate reader(Molecular Devices)로 측정하였다. 같은 방법으로 표준 cytokine 용액 농도별 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하고, 시험군의 흡광도를 대입하여 배양상등액에 포함된 cytokine의 양을 산출하였다.

대식세포 매개 암세포 살해능

복강세포를 수거하여 96-well plate에 2×10^5 cells/well씩 분주하여 2시간 배양한 후 PBS로 2번 세척하여 well에 부착하지 않은 세포는 버렸다. 그 후 well에 세포배양액을 200 μL 씩 분주하고 PJ-P를 농도별로 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 각 well을 3번 세척한 후, target cell로서 Cr^{51} 으로 표지(labelling)한 암세포인 YAC-1 세포를 5×10^3 cells/well씩 분주하여 E:T ratio가 약 40:1이 되게 하였다. YAC-1 세포를 Cr^{51} 으로 표지하는 방법은 2×10^6 개의 YAC-1 세포에 40 μCi Cr^{51} 을 넣고 37°C 항온조에서 1시간 동안 표지 하였다. 암세포인 YAC-1 세포를 target cell로 첨가한 후 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 각 well의 상등액 100 μL 씩을 취하여 시험관에 분주하고, 암세포가 살해되어 배양액으로 유리된 Cr^{51} 의 양을 γ -counter에서 cpm으로 측정하였다.

암세포 증식 억제능

PJ-P의 항암 효과는 Yoshinori 등의 방법(14,15)을 응용

하여 측정하였다. 생쥐(BDF1, 7주령)에 1×10^5 cells의 흑색종양세포(B16F0 melanoma cells)를 복강주사하였다. 암세포를 복강으로 주사하여 이식한 후 다음날부터 PJ-P(50 mg/kg body weight)를 10일간 복강주사하였다. 그 후 시일 경과에 따라 생존 생쥐의 수를 매일 확인하였다.

결과 및 고찰

복강대식세포의 탐식능 증가 효과

본 연구자들의 선행된 연구에서 백작약 조다당분획은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 높은 비장면역세포의 증식효과를 보였으며(5), 이에 따라 본 연구에서 백작약 조다당분획의 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 선정하여 대식세포활성에 미치는 영향을 조사하였다. 백작약 조다당분획 PJ-P가 대식세포의 탐식능에 미치는 영향을 알아보기 위하여, PJ-P를 첨가하여 배양한 대식세포가 탐식한 fluorescent microbeads 수를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군에서는 microbead를 하나도 탐식하지 않은 세포가 약 59.5%이었으며, 1~5개, 6~10개, 11~

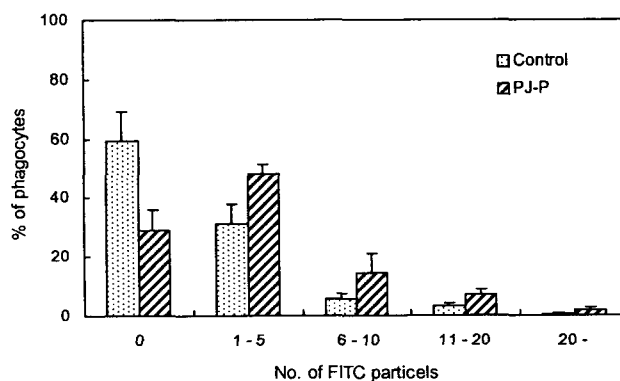


Fig. 1. Effect of PJ-P on phagocytic activities of peritoneal macrophages.

Peritoneal macrophages were cultured with or without PJ-P (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then FITC-latex microbeads were added to the cultures. The macrophages phagocytosed FITC-latex microbeads were counted by fluorescence microscope. Values are mean \pm standard deviation.

20개, 20개 이상을 탐식한 세포가 각각 31.1%, 5.5%, 3.5%, 0.6%이었다. 이에 비해서 PJ-P를 첨가하여 배양한 대식세포 중에서는 microbead를 하나도 탐식하지 않은 세포가 29.2%이었으며, 1~5개, 6~10개, 11~20개, 20개 이상을 탐식한 세포가 각각 48.3%, 14.7%, 7.0%, 2.0%이었다. 이 결과에 나타난 바와 같이 PJ-P를 첨가함으로써 microbead를 하나도 탐식하지 못한 세포의 비율이 29.2%로 대조군의 59.5%에 비해 낮아지고, 1개 이상을 탐식한 세포가 71.0%로 대조군의 40.5%에 비해 현저하게 증가하였다. 이 결과로 보아 백작약 조다당분획은 대식세포의 탐식능을 향상시켰음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 OK-432 처리 시 대식세포의 탐식능 측정에서 2~7개의 bead를 탐식한 세포가 약 85%였음을 보고한 논문(11)과 비교해 보면 본 연구에서 PJ-P 첨가 시 1~10개의 microbeads를 탐식한 대식세포가 약 65%로 나타나 PJ-P가 탐식능 증가효과 측면에서는 약간 떨어지나, 임상적용 측면에서 보면 OK-432는 심한 독성을 나타내어 적용에 한계를 보이는 반면 PJ-P는 독성이 거의 없어 실용성이 더 높은 것으로 판단된다.

활성화된 대식세포의 nitric oxide 및 cytokine 생성 유도 효과

탐식기능이 있는 대식세포들은 여러 가지 가수분해 효소 등을 함유하고 있는 세포소체를 가지고 있어 탐식된 미생물을 살해할 수 있지만 병원성이 강한 미생물들은 그러한 유해 작용에도 불구하고 생존할 수 있게 저항성을 보유하고 있다. 그러나 어떠한 물질에 의해 대식세포가 활성화되면 superoxide 나 hydrogen peroxide와 같은 반응성이 강한 산소중간물질(reactive oxygen intermediated: ROI)이나 nitric oxide(NO)와 같은 물질들을 생성함으로써 탐식한 미생물을 효과적으로 사멸시키거나 아니면 번식을 억제할 수 있게 된다(16,17). 한편, Farias-Eisner 등(18)에 의해 NO가 생체의 종양살해능(tumoricidal activity)에 있어서 중요한 매개 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 본 실험에서 PJ-P 100 µg/mL를 첨가하여 대식세포를 배양한 결과 세포가 활성화되어 Fig. 2에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 약 6배 정도 많은 NO를 생성하여 방출하였다.

또한, 활성화된 대식세포에서 분비되는 cytokine들이 종양살해능을 나타낸다는 것이 많은 연구들에 의해 보고되고 있다(19). 따라서 본 실험에서는 PJ-P가 대식세포를 활성화시켜 이들 cytokine의 생성을 유도하는지를 알아보기 위하여 관련 유전자들의 발현정도를 RT-PCR로, 배양액 내로 분비된 cytokines의 양을 ELISA로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3 및 4에 나타난 바와 같이 PJ-P는 대식세포를 활성화시켜 IL-6, IL-18, IL-12, IL-1, iNOS과 TNF α의 생성을 유도하였다. 이들 cytokine들 중 IL-6, TNF α, IL-12과 IL-1은 대식세포 매개 암세포 성장 억제에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며(20), IL-6는 cyostatic/cytocidal factor들 중의 하나로 알려져 있다(21). 또한, IL-18은 대식세포가 어

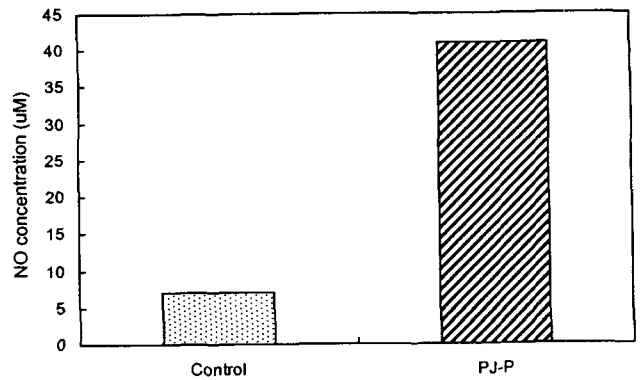


Fig. 2. Effect of PJ-P on NO secretion of macrophages. The RAW264.7 macrophages were cultured with PJ-P at a final concentration of 100 µg/mL. After incubation, NO concentration in culture supernatant was measured by Griess reagent. The NO concentration of LPS-treated group was 128 µM.

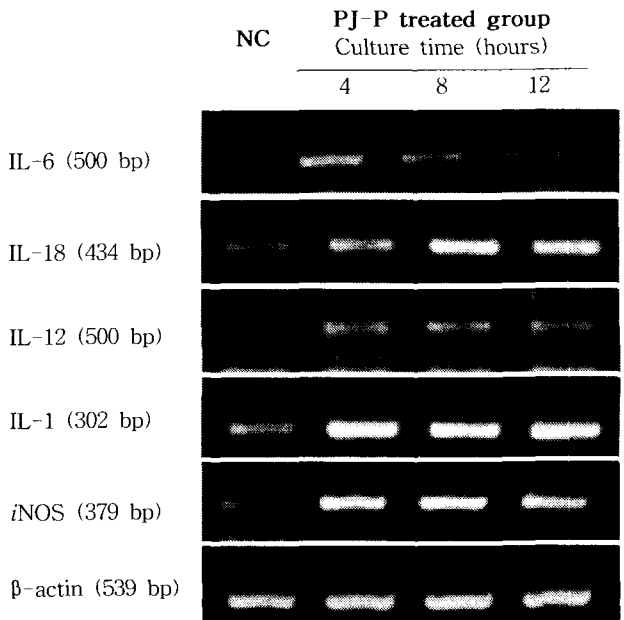


Fig. 3. Effects of PJ-P on the cytokine gene expression of macrophages.

Peritoneal macrophages were cultured for 4, 8 and 12 hr with PJ-P. After incubation upto 12 h, total RNA was isolated and the level of mRNA expression of each cytokine was evaluated by RT-PCR. NC: negative control.

떠한 물질에 의해 활성화되어 생산되며 T helper 1 type 세포에 영양을 미쳐 IFN-γ를 생산케 하는 interferon-gamma inducing factor(IGIF)로 알려져 있다. IL-12도 T helper 1 type 세포를 활성화시키는 데 중요한 매개 역할을 한다(22). 한편, 본 연구자들은 선행 연구에서 PJ-P에 의해 활성화된 대식세포가 IL-18과 IL-12를 분비시킴으로써 T helper 세포를 활성화시키고 이로써 B세포가 증식됨을 보고(5)한 바 있다.

대식세포 매개 암세포 억제 증가 효과

PJ-P는 직접적으로 암세포의 성장을 억제하는 효과(direct cytotoxic effect)는 없는 것으로 나타났다(결과미제시).

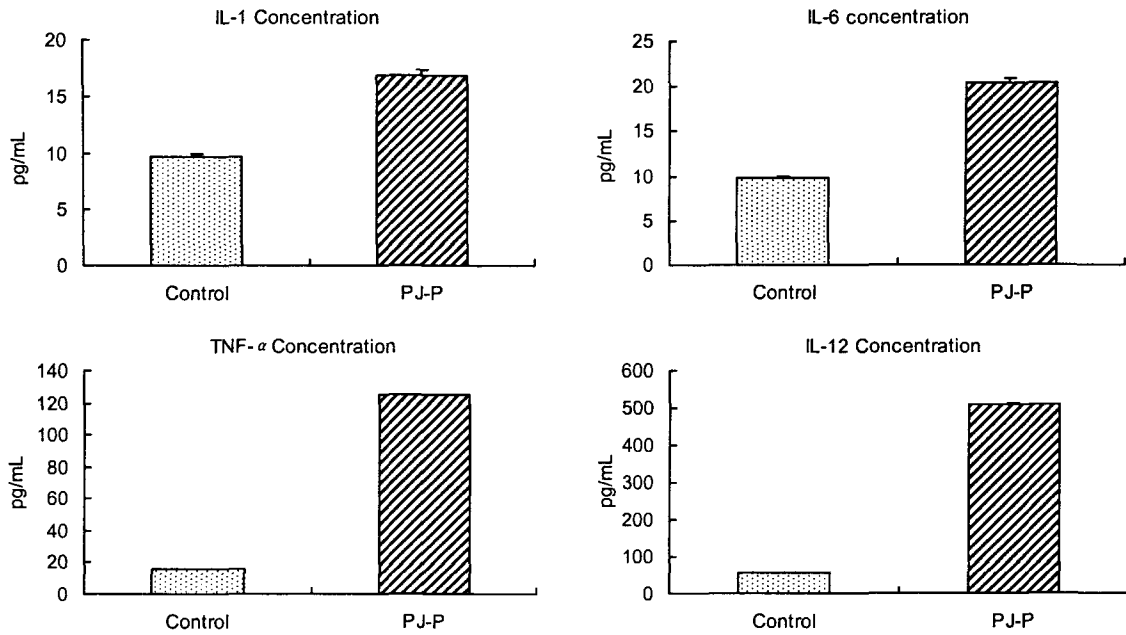


Fig. 4. Effect of PJ-P on cytokine secretion of macrophages.

Thioglycollate stimulated total peritoneal macrophages were cultured with PJ-P at a final concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. After incubation (24 hours), supernatant was collected and the level of IL-1, TNF- α , IL-6 and IL-12 was determined by ELISA.

그러나 위의 결과들에서 볼 수 있듯이 PJ-P는 대식세포를 활성화시켜 여러 cytokine들과 NO들을 생성케 하였으며, 탐식능 또한 증가시킴으로써 암세포의 성장을 억제할 수 있을 것으로 추측하였다. 활성화된 대식세포의 항종양작용 증진은 세포내 lysosome에 있는 다양한 가수분해 효소의 증가, NADH oxidase 활성화에 의한 ROI의 생성, NO와 같은 질소산화 대사산물 생성 및 여러 cytokine의 생성에 의하는 것으로 알려져 있다(22,23). 이러한 보고들을 참작하여 볼 때 PJ-P는 항종양작용을 증진시키는 여러 조건들은 갖추고 있음을 알 수 있었다.

이에 PJ-P가 대식세포를 활성화시켜 암세포를 살해할 수 있는지 알아보기 위하여, YAC-1 암세포에 대한 살해능을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 PJ-P에 의해 활성화된 대식세포는 표적세포인 암세포를 대조군에 비해 약 5배정도의 살해능을 나타내었으며, 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 PJ-P 농도 범위에서 거의 비슷한 효과를 보였다.

또한, 마우스에서 암세포 성장에 대한 PJ-P의 억제 효과를 확인하기 위하여, 흑색종양 세포(B16F0 melanoma cells)를 복강내 이식한 마우스에 PJ-P를 투여한 다음 생존기간을 측정하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이, PJ-P는 암세포 이식 마우스의 생존기간을 약 20% 연장시키는 효과를 나타내었

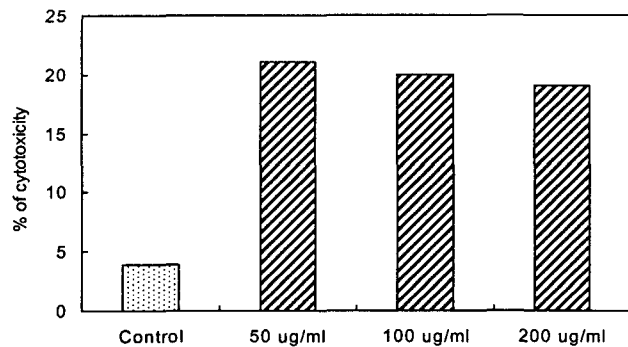


Fig. 5. The cytotoxic activities of macrophages against cancer cells were enhanced by PJ-P.

Peritoneal macrophages from C57BL/6 (H-2^b) mice were cultured in medium containing PJ-P (100 $\mu\text{g/mL}$) on 96 well culture plates in tetraplicate. On day 2 of culture, the activated macrophages were co-incubated with ⁵¹Cr-labeled YAC-1 (H-2^d) cells. After 24 hours of incubation, the cytotoxicity was determined by measuring the radioactivity of ⁵¹Cr released in the culture supernatant.

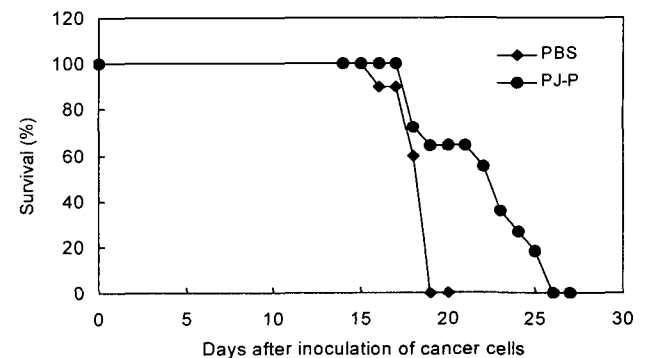


Fig. 6. Growth inhibition of B16F0 melanoma by PJ-P. DBF1 mice were intraperitoneally implanted with B16F0 melanoma cells on day 0. PJ-P was intraperitoneally administered at 50 mg/kg B.W. for 10 days beginning at one day after cancer inoculation. Mice of the control group were given PBS. Ten mice were used in each group.

다. 이 결과와 앞의 결과들을 종합하여 볼 때, PJ-P는 대식세포를 활성화시킴으로써 생체가 암에 대해 저항하는 능력을 증강시킬 수 있음을 추측케 한다.

요 약

백작약은 한의학에서 보가·보혈을 위한 당제에 이용되는 구성 생약재 중의 하나로서 본 연구에서는 백작약이 면역세포를 활성화시켜 암세포의 성장을 억제할 수 있는 능력이 있는지를 확인하고자 하였다. 그 결과 백작약 조다당분획(PJ-P)는 대식세포를 활성화시켜 그 고유기능인 탐식기능을 향진시켰다. 또한 암세포를 저해하는데 중요한 작용을 하는 NO와 TNF- α , IL-1 그리고 IL-6의 분비를 향상시켰다. 이렇게 PJ-P에 의해 활성화된 대식세포는 cytokine들과 NO를 생산함으로써 시험관 내에서 암세포를 살해하였으며, 또한 PJ-P는 암세포를 이식한 마우스의 생존기간을 연장시켰다. 이 같은 실험결과는 백작약의 조다당분획이 항암보조제 및 면역반응조절제로 활용될 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Aimi N, Inaba M, Watanabe M, Shibata S. 1969. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXIII. Paeoniflorin, a glucoside of Chinese paeony root. *Tetrahedron* 25: 1825-1838.
- Egger K, Keil M. 1969. Flavone glycosides in the flowers of *Paeonia arborea* and *P. suffruticosa*. *Planta* 88: 154-156.
- 김도순. 1990. 시호·백작약의 항스트레스효과에 관한 실험적 연구. 석사학위논문, 원광대학교.
- 정동주. 1986. 백작약수침이 생쥐의 진통 및 항경련효과에 미치는 영향. 석사학위논문, 대구한의과대학.
- Park HR, Ham YH, Yee ST, Paik SG, Jo SK. 2001. Characteristics of B cell proliferation by polysaccharide fraction of *Paeonia japonica* miyabe. *Official J Korean Assoc Immunobiol* 1: 126-134.
- Cavaillon JM. 1994. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48: 445-453.
- Arden L, Lansdorp P, De Groot E. 1985. A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. *Lymphokines* 10: 175-185.
- Arenzana-Seisdedos F, Virelizier J. 1983. Interferons as macrophage activating factors. II. Enhanced secretion of interleukin 1 by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Eur J Immunol* 13: 437-440.
- Choriki M, Freudenberg M, Calanos C, Pondron P, Bartholeyns J. 1989. Antitumoral effects of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, interferon and activated macrophages: synergism and tissue distribution. *Anticancer Res* 9: 1185-1190.
- Stuehr DJ, Marletta MA. 1987. Synthesis of nitrite and nitrate in macrophage cell lines. *Cancer Res* 47: 5590-5594.
- Yin ET, Galanos C, Kinsky S. 1972. Picogram-sensitivity assay for endotoxin; Gelatination of *Limulus polyphemus* blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Acta* 261: 284-289.
- Iwao S, Hideki T, Yoshiyuki A, Toshiro Y. 1988. Rapid measurement of phagocytosis by macrophages. *Chem Pharm Bull* 36: 4871-4875.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum JS. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Yoshinori U, Uutaka K, Sumio S, Yoshinori I, Minoru T, Yasuo H, Yoshiro N. 1994. Immunotherapy in B-16-melanoma-cell-transplanted mice with combinations of interleukin-2, cyclophosphamide, and PSK. *Oncology* 51: 296-302.
- Han SB, Lee CW, Heon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol* 41: 157-164.
- Ding A, Nathan CF, Steuhr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412.
- Segan AW. 1989. The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 83: 1785-1793.
- Farias-Eisner R, Sherman MP, Aerberhard E, Chaudhuri G. 1994. Nitric oxide is an important mediator of tumoricidal activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 91: 9407-9411.
- Adams DO, Hamilton TA. 1884. The cell biology of macrophage activation. *Annual Review Immunology* 2: 283-318.
- Balkwill FR, Maylor MS, Malik S. 1990. Tumor necrosis factor as an anticancer agent. *Eur J Immunol* 26: 641-644.
- Hamilton TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophage activation. *Immunol Today* 8: 151-158.
- Mateo RB, Reichner JS, Albina JE. 1996. NO is not sufficient to explain maximal cytotoxicity of tumoricidal macrophages against an NO-sensitive cell line. *J Leukoc Biol* 60: 245-52.
- Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin C. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94.

(2002년 10월 2일 접수; 2002년 12월 10일 채택)