

黃精으로부터 유래한 조다당류의 선천면역 활성화에 의한 유방암 세포주 전이 억제 효과

¹경희대학교 대학원 임상한의학과, ²경희대학교 한의과대학 부인과교실
지해리¹, 황덕상², 이창훈², 장준복², 이진무²

ABSTRACT

Antimetastatic Effects of Crude Polysaccharide Isolated from *Polygonati Rhizoma* on 4T1 Breast Cancer Cells by Activation of Innate Immune System

Hae-Ri Ji¹, Deok-Sang Hwang², Chang-Hoon Lee²,
Jun-Bok Jang², Jin-Moo Lee²

¹Dept. of Clinical Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

²Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objective: This study is aimed to investigate the anti-tumor metastasis by innate immunomodulating effects of crude polysaccharide isolated from *Polygonati Rhizoma* (CP-PR) on 4T1 breast cancer cells.

Methods: CP-PR was isolated from *Polygonati Rhizoma*. Antimetastatic experiments were conducted *in vivo* mouse model by using 4T1 breast cancer cells. The cell viability of CP-PR was tested with normal spleen and 4T1 breast cancer cells. To observe the activation of macrophages with/without 4T1 breast cancer cells, production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-10 and IL-12 were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. In addition, the lysis of YAC-1 cells and the production of granzymes were measured to observe the activation of natural killer (NK) cell.

Results: Intravenous administration of CP-PR significantly inhibited metastasis of 4T1 breast cancer cells. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, CP-PR affected the growth of normal spleen and 4T1 breast cancer cells above specific concentration. The production of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 were significantly increased in macrophages with CP-PR. As compared with control, CP-PR showed significantly higher production of TNF- α , IL-10 and IL-12 in macrophages co-cultured with 4T1 breast cancer cells. The lysis of YAC-1 cells and the production of granzymes were significantly up regulated by CP-PR.

Conclusion: CP-PR appears to have considerable activity on the anti-metastasis by activation of innate immune system.

Key Words: *Polygonati Rhizoma*, Polysaccharide, Breast Cancer, Anti-tumor Metastasis, Innate Immune System

“본 논문은 2019년도 경희대학교 석사학위 졸업논문임.”

I. 서 론

암은 우리나라 사망 원인 1위로 2015년 기준으로 인구 10만 명당 421.4명이 이로 인해 사망하였다. 국내 암발생률은 위암, 대장암, 갑상선암, 폐암, 유방암 순으로 나타나 organization for economic co-operation and development(OECD) 가입 회원국의 대부분에서 유방암과 대장암이 가장 높은 발생률을 보임을 참고하였을 때 우리나라의 경우도 비만의 증가 및 식생활의 서구화로 해당 암의 발생이 더욱 증가할 것으로 예측되고 있다¹⁾.

기존에 암의 치료를 위해 외과적 수술 요법, 항암 화학요법, 방사선요법 등이 단독 혹은 복합적으로 시도되어 왔으나 치료의 한계 및 부작용 등으로 인해 최근 항암 면역요법이 대안적 치료법으로 기대를 모으고 있다²⁾. 대식세포³⁾ 및 natural killer(NK) 세포⁴⁾는 암세포에 대해 살해력을 가지는 대표적인 면역세포로 면역 조절 물질에 의해 활성화되어 암의 증식 및 전이를 유의하게 억제하는 것으로 보고되고 있다.

한의학에서 유방암은 乳癰, 乳巖 등으로 기술되고⁵⁾ 憂怒抑鬱이 장기간 지속되어 脾氣와 肝氣가 불균형해진 것을 가장 큰 원인으로 본다. 《東醫寶鑑》에 따르면 肝鬱氣滯, 熱毒蘊結, 衝任失調, 氣血兩虛, 脾胃虛弱, 肝腎陰虛로 나누어 변증시치하고 종괴가 未破한 것은 치료 가능하지만 破해서 瘡을 이룬 것은 치료가 어렵다고 하였다⁶⁾. 현재 다수의 한약 단미제⁷⁻⁹⁾ 및 처방¹⁰⁻²⁾이 면역 활성화를 통해 유방암에 유효한 항암 효과를 나타낸다는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

黃精은 나리과(Liliaceae)에 속한 다년생 초본인 층층갈고리동굴레(Polygonatum sibiricum Redoute)의 근경으로 한의학적으로 임상에서 補氣養陰, 健脾, 潤肺益腎하는 효능을 가지며 죽상동맥경화증, 관상동맥 질환, 만성 간염, 백일해, 만성 기관지염, 발기부전, 고지혈증 등의 치료에 사용되고 있다. 黃精에서 기능성을 가지는 유용 성분으로는 다당류(polysaccharide) A, B, C, 올리고당(oligosaccharide) 및 아미노산 등이 보고되어 있다¹³⁾. 黃精에 대한 실험적 연구는 주로 항산화와 지질 분해 측면에서 이루어지고 있으며^{14,15)} 黃精의 면역 및 항암 효과에 대한 연구는 아직 그 수가 미비한 실정이다.

이에 저자는 黃精의 선천면역계 활성화에 따른 항암 효과를 알아보고자 4T1 유방암 세포주를 이용하여 정맥 투여에 의한 종양세포의 전이 억제와 대식세포의 cytokine 분비, NK 세포 활성화에 대한 실험을 실시한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

증류수를 이용하여 잘 세척하고 건조시켜 만든 黃精분말(10 g, 건조 기준)에 10배 중량의 증류수를 가하여 100℃에서 2시간 추출하였고 이를 동결 건조하여 95% 에탄올(300 ml)을 처리하고 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 원심분리(3,000 rpm/25분)를 통하여 침전물을 회수하고 증류수를 통한 투석(MWCO: 12,000-14,000, Spectrum Laboratory Inc., Rancho Dominguez, CA,

USA)을 실시하여, 저분자물질을 선택적으로 제거하였다. 최종적으로 다시 동결건조를 시행하여 黃精의 열수 추출 조다당류 시료인 crude polysaccharide isolated from *Polygonati Rhizoma*(CP-PR)을 획득하였다.

2) 동 물

생후 6-8주령의 雌性 BALB/c(20 g±1 g)를 새론 바이오(Saeronbio. Ltd., Korea)에서 분양 받아 사육조에 5마리씩 넣어 정수된 물과 실험동물용 펠렛 사료(Samyang Co. Ltd., Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 실험실 환경은 온도 22°C, 습도 50% 및 12시간 간격으로 자동 조명되는 조건에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

3) 시 약

종양세포의 배양을 위한 roswell park memorial institute(RPMI)-1640 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, L-glutamic acid 및 thioglycollate 등은 Gibco사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

4) 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 종양세포는 미국 american type culture collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였고 4T1 유방암 세포주, YAC-1 cell line, primary peritoneal macrophages 및 splenocytes는 7.5% FBS 및 L-glutamine가 함유된 RPMI-1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 조건을 가진 세포배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양되었다.

2. 방 법

1) 종양 전이 모델

5, 50 및 500 µg의 CP-PR을 종양 접종

2일 전에 1회 정맥주사하고 4T1 유방암 세포주를 각각 정맥주사한 14일 후에 마우스를 희생시키고 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다. CP-PR에 의한 종양 전이 억제 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였다.

2) 세포 독성 측정

CP-PR의 세포 독성을 확인하기 위해, 정상 비장세포(1×10^5 cells/well) 및 4T1 유방암 세포주(1×10^4 cells/well)를 6-well flat-bottomed plates에서 72시간 동안 1,000 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.01 µg/ml까지 처리한 CP-PR과 함께 배양하였다. 세포 독성은 cell counting kit-8 assay(CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하였으며 제조사의 지침에 따라 평가 하였다.

3) 대식세포의 cytokine 분비 측정

BALB/c 마우스에 3% thioglycollate를 1 ml 복강주사하고 3일 후에 경추 분리법으로 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 ml를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells, PEC)를 수집하였다. 수집된 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10^6 /ml의 농도로 조정하여 분주한 후, 2시간 동안 배양하여 대식세포를 plate에 부착하고 배양액으로 세척하였다. 이후 부착되지 않은 세포를 제거하고 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 CP-PR을 단독 혹은 4T1 유방암 세포주(1×10^3 cells/well)와 동시에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후, 배양 상등액에 유도 분비된 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-6(IL-6), IL-10 및 IL-12의 측정은 각 cytokine에 대한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

kit(Pharmingen, San Jose, CA, USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

4) NK 세포 활성 측정

6주령의 BALB/c 마우스에 200 µg의 CP-PR을 정맥주사하고 3일 후에 마우스의 비장을 멸균적으로 획득하여 비장세포(effector cells: E)를 준비하였다. U-bottomed 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포와 NK-sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포(target cells: T)를 E/T 비가 2.5:1, 5:1 및 10:1이 되도록 조정하여 6시간 동안 공동 배양하였다. 배양종료 후에 원심분리를 통하여 배양 상등액을 취한 후 손상된 YAC-1 세포가 유리한 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 kit를 이용하여 제조사(Promega, Fitchburg, WI, USA)의 지침에 따라 측정하였다. 동시에 granzyme assay kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 배양 상등액에 생산된 granzyme의 양을 측정하였다.

3. 통계 처리

실험 결과에 대한 통계 처리는 SPSS for windows(version 13.0)을 이용하였고 실험군과 대조군의 비교는 student's two-tailed *t*-test로 분석하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 종양 전이 억제 효과

마우스 모델에서 4T1 유방암 세포주에 대한 전이 억제 효과를 알아보기 위해 종양 접종 전에 5, 50 및 500 µg의 CP-PR을

정맥 투여하여 폐에 전이된 종양의 개수를 측정한 결과 50 µg/ml 및 500 µg/ml에서 각각 32.8개 및 14.6개로 대조군의 60.7개에 비해 통계적으로 유의하게 (**p*<0.05) 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 1).

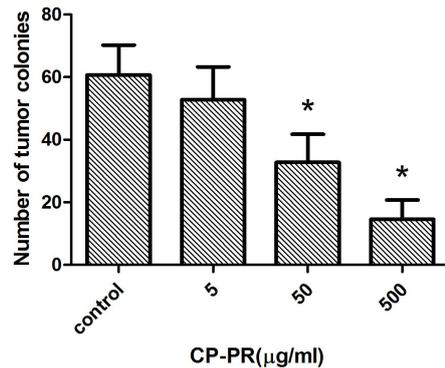


Fig. 1. Prophylactic effect of CP-PR on tumor metastasis of 4T1 breast cancer cells (**p*<0.05).

2. 세포 독성

1) 종양세포

4T1 유방암 세포주에 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml 및 1000 µg/ml의 CP-PR을 첨가하여 세포 생존율을 측정한 결과 각각 102.1±2.2%, 96.0±7.2%, 101.2±2.5%, 100.3±2.0%, 100.9±8.9% 및 90.7±6.9%로 나타났다(Fig. 2).

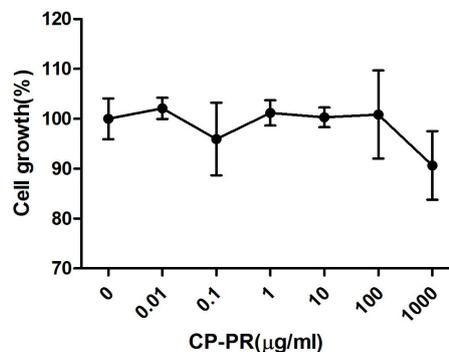


Fig. 2. Cytotoxicity of CP-PR on 4T1 breast cancer cells.

2) 비장세포

정상 비장세포에 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml 및 1000 µg/ml의 CP-PR을 첨가하여 세포생존율을 측정 한 결과 각각 100.9±2.6%, 102.6±3.7%, 105.7±8.3%, 112.8±4.5%, 107.9±7.0% 및 88.2±8.6%로 나타났다(Fig. 3).

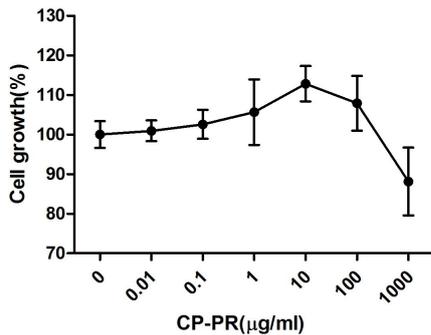


Fig. 3. Cytotoxicity of CP-PR on normal spleen cells.

3. 대식세포의 cytokine 생산 효과

1) TNF-α

대식세포에 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 TNF-α의 분비를 관찰한 결과, 대조군 45.1 ± 0.6 pg/ml에 비하여 100 µg/ml 농도에서 348.9 ± 40.6 pg/ml로 통계적으로 유의하게 (**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 4).

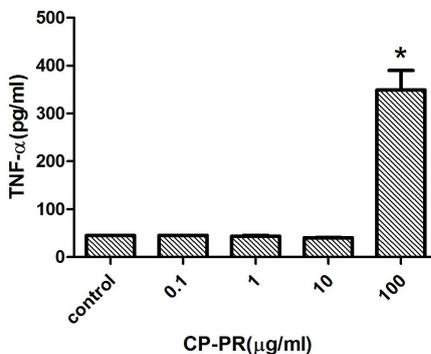


Fig. 4. Production of TNF-α from Peritoneal Macrophages stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

2) IL-6

대식세포에 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-6의 분비를 관찰한 결과, 대조군 167.3 ± 12.0 pg/ml에 비하여 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서 각각 519.6 ± 33.3 pg/ml 및 1709.6 ± 341.2 pg/ml로 통계적으로 유의하게 (**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 5).

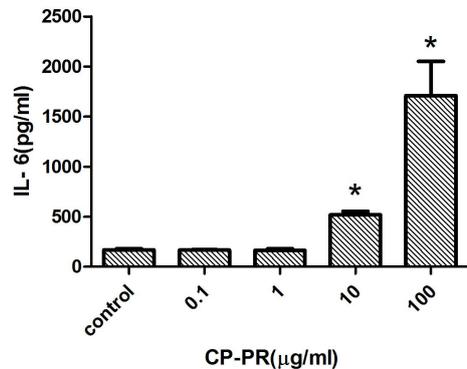


Fig. 5. Production of IL-6 from Peritoneal Macrophages stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

3) IL-10

대식세포에 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-10의 분비를 관찰한 결과, 대조군 98.0 ± 10.6 pg/ml에 비하여 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서 각각 180.8 ± 21.3 pg/ml, 523.1 ± 32.5 pg/ml 및 1972.9 ± 46.3 pg/ml로 통계적으로 유의하게 (**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 6).

4) IL-12

대식세포에 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-12의 분비를 관찰한 결과, 대조군 27.6 ± 1.3 pg/ml에 비하여 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서 각각 39.8 ± 1.3 pg/ml, 66.3 ± 1.4 pg/ml, 273.6 ± 31.3

pg/ml 및 482.6 ± 3.7 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($*p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7).

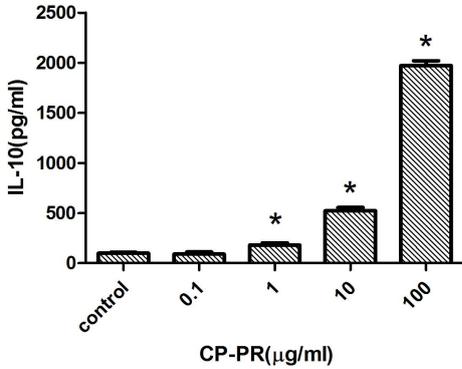


Fig. 6. Production of IL-10 from Peritoneal Macrophages stimulated by CP-PR ($*p < 0.05$).

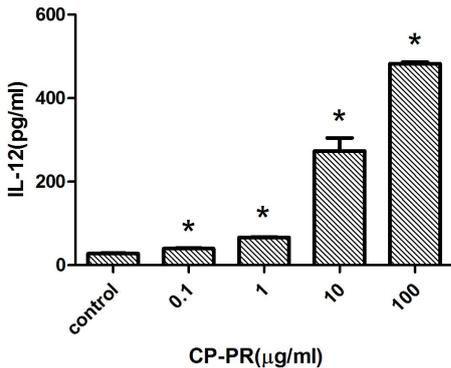


Fig. 7. Production of IL-12 from Peritoneal Macrophages stimulated by CP-PR ($*p < 0.05$).

4. 대식세포의 tumoricidal 활성화 효과

1) TNF-α

대식세포와 4T1 유방암 세포주의 동시 배양에서 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 TNF-α의 분비를 관찰한 결과, 대조군 44.9 ± 0.3 pg/ml에 비하여 100 µg/ml 농도에서 237.2 ± 36.0 pg/ml로 통계적으로 유의하게 ($*p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 8).

2) IL-6

대식세포와 4T1 유방암 세포주의 동시

배양에서 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-6의 분비를 관찰한 결과, 대조군 955.0 ± 47.0 pg/ml에 비하여 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서 각각 1968.1 ± 411.6 pg/ml 및 1980.4 ± 400.7 pg/ml로 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 9).

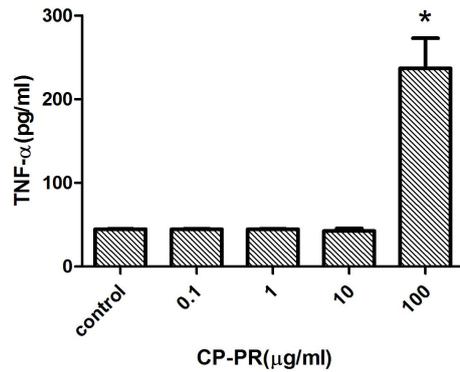


Fig. 8. Production of TNF-α from Peritoneal Macrophages co-cultured with 4T1 breast cancer cells, stimulated by CP-PR ($*p < 0.05$).

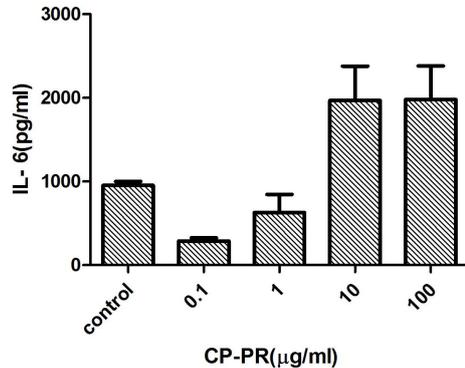


Fig. 9. Production of IL-6 from Peritoneal Macrophages co-cultured with 4T1 breast cancer cells, stimulated by CP-PR.

3) IL-10

대식세포와 4T1 유방암 세포주의 동시 배양에서 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-10의 분비를 관찰한 결과, 대조군 1842.7 ± 184.0

pg/ml에 비하여 100 µg/ml 농도에서 3946.3 ±424.2 pg/ml로 통계적으로 유의하게(**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 10).

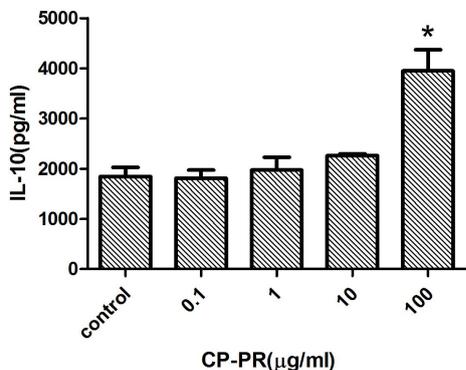


Fig. 10. Production of IL-10 from Peitoneal Macrophages co-cultured with 4T1 breast cancer cells, stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

4) IL-12

대식세포와 4T1 유방암 세포주의 동시 배양에서 CP-PR을 100 µg/ml부터 10배 희석법으로 0.1 µg/ml까지 처리한 후 IL-12의 분비를 관찰한 결과, 대조군 258.7±25.7 pg/ml에 비하여 10 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서 각각 404.1±16.2 pg/ml 및 432.4±33.1 pg/ml로 통계적으로 유의하게(**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 11).

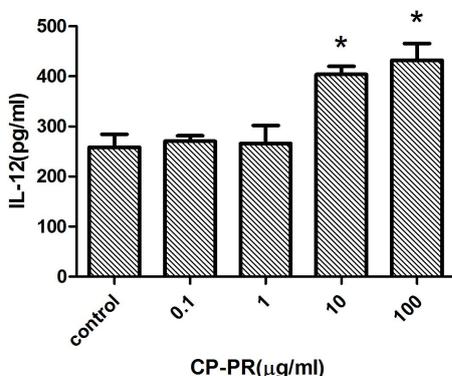


Fig. 11. Production of IL-12 from Peitoneal Macrophages co-cultured with 4T1 breast cancer cells, stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

5. NK 세포 활성화 효과

1) YAC-1 세포 살해 활성화

YAC-1 세포에 대한 비장세포의 비를 2.5:1, 5:1 및 10:1로 하여 YAC-1 세포 유리 비율을 측정된 결과 2.5:1, 5:1 및 10:1에서 각각 대조군 4.8±2.0%, 13.1±2.0% 및 14.2±1.1%에 비해 16.7±4.0%, 42.4±2.3% 및 72.1±10.7%로 통계적으로 유의하게(**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 12).

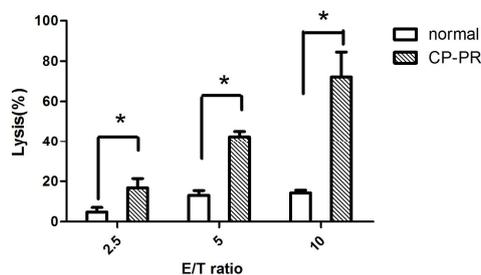


Fig. 12. Lysis of YAC-1 cells stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

E : normal spleen cells, T : YAC-1 cells

2) Granzyme

YAC-1 세포에 대한 비장세포의 비를 2.5:1, 5:1 및 10:1로 하여 granzyme를 측정된 결과 5:1 및 10:1에서 각각 대조군 154.8±39.9 pg/ml 및 201.2±51.8 pg/ml에 비해 355.8±24.8 pg/ml 및 839.6±86.2 pg/ml로 통계적으로 유의하게(**p*<0.05) 증가하였다(Fig. 13).

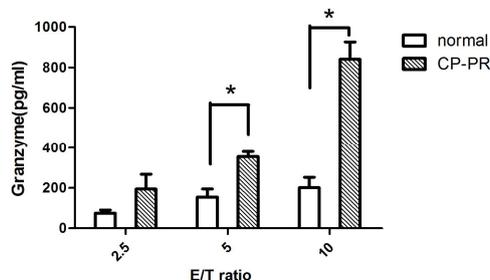


Fig. 13. Production of Granzymes stimulated by CP-PR (**p*<0.05).

E : normal spleen cells, T : YAC-1 cells

IV. 고찰

외과적 절제술, 항암 화학요법, 방사선 요법 등 기존 항암요법이 정상 세포에 대한 부작용 및 치료적 한계를 가짐에 따라 최근에는 저하되어 있는 암 환자의 면역 기능을 도와서 암세포에 특이적인 면역 반응을 유발하여 항암 작용을 가지는 항암 면역요법의 유용성이 대두되고 있다²⁾. 선천면역계에서 대식세포³⁾ 및 NK 세포⁴⁾를 통한 세포 면역 기능의 활성화가 종양세포를 인지하고 살해시키는 데에 주된 역할을 담당하며 대식세포가 생산하는 다양한 cytokine은 면역세포 간의 신호전달, 면역세포의 증식 및 작동세포의 활성화 조절에 의한 면역 반응 조절 등에 관여한다¹⁶⁾.

한의학적으로 유방암은 乳癰, 乳巖, 乳癖, 乳痰 등의 질환과 유사한데 특히 이 중 乳巖과 가장 유사하다. 《東醫寶鑑》⁶⁾에 따르면 乳巖은 肝氣鬱滯, 憂怒抑鬱, 憂鬱傷肝 및 思慮傷肝 등의 七情損傷으로 증상이 發한 것 혹은 이것이 오래되어 장부 기능이 失調된 것이 원인이며 치료 초기에는 肝鬱氣滯로 인한 것으로 보고 疏肝解鬱, 疏氣行血하는 治法을 이용하고, 오래된 경우 大補氣血하는 治法을 사용해야 한다. 유방암에 대해 국내에 보고된 논문을 살펴보면 단일약물로는 黃芩⁷⁾, 薑黃⁸⁾, 三稜⁹⁾ 등의 효과가 증명되었고, 처방으로는 加味雙和湯¹⁰⁾, 益氣養榮湯¹¹⁾, 歸朮破癥湯¹²⁾ 등에서 유방암의 암세포 성장 억제 효과가 밝혀져 있다.

黃精은 임상에서 질병 후의 쇠약, 피로감, 脾胃虛弱으로 인한 小食, 消渴, 폐가 허약해서 생긴 마른기침 등의 치료에 활용되고 있다. 黃精과 관련된 최근 연구 동향

은 주로 항산화와 지질 분해 측면에서 이루어지고 있는데 강 등¹⁷⁾은 黃精이 피부에 항산화 효과를 가진다고 하였고 노 등¹⁵⁾은 黃精이 고지혈증을 완화시키는 효과가 있다고 하였다. 이에 반해 黃精의 면역 및 항암 효과에 대한 연구 수는 미미한 편으로 黃精의 면역 효과를 관찰한 실험 연구에 따르면 黃精은 IL-2의 증가를 유발하였고¹⁸⁾ 黃精의 주요 성분인 kaempferol은 폐암¹⁹⁾ 및 간암 세포주²⁰⁾에서 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

한약재에서 유래한 다당류는 종양세포에 대한 세포 독성 활성화, 탐식 활성화, 산화질소 생성 및 cytokine/chemokine 분비 등을 통해 대식세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 비교적 독성이 없어 세균 유래 다당류나 합성물질로 만든 면역 조절 물질에 비해 부작용이 적다²¹⁾. 黃芪²²⁾에서 유래한 다당류는 TNF- α 및 산화질소 생성을 유발하였고 桔梗²³⁾ 및 가시오가피²⁴⁾에서 유래한 다당류는 TNF- α , 산화질소 및 IL-6의 증가를 유도하였으며 이외에도 當歸^{25,26)}, 人蔘²⁷⁾, 蓬朮²⁸⁾ 등의 한약재에서 유래한 다당류가 대식세포의 활성화를 유발하여 면역 활성화 효과를 나타낸다는 실험 연구가 보고되어 있다.

黃精에서 유래한 조다당류인 CP-PR의 면역 활성화와 항암 효과의 기전을 확인하고자 CP-PR의 4T1 유방암 세포주에 대한 종양 전이 억제 효과를 관찰한 후 정상 비장세포 및 4T1 유방암 세포주에 대한 세포 독성과 대식세포에서 분비되는 cytokine, YAC-1 세포 유리 및 granzyme의 양을 측정하여 대식세포 및 NK 세포 활성화에 의한 항암 효과에 대해 알아보았다.

CP-PR의 정맥투여를 통해 4T1 유방암 세포주의 전이에 미치는 영향을 알아본

결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 CP-PR 투여 시 통계적으로 유의한 종양 전이 억제 효과를 보였다. CP-PR의 종양 전이 억제 효과가 시료의 자체적인 세포 독성으로 인한 것인지 대식세포 혹은 NK 세포 활성화를 통한 선천면역계 작용에 의한 것인지 확인하기 위해 CP-PR의 세포 독성 여부를 확인한 결과 4T1 유방암 세포주에서 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 및 1-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 CP-PR은 100%에 가까운 세포 증식을 나타내었고 정상 비장세포에 대한 세포 독성을 확인한 결과, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 용량 의존적인 세포 증식을 유도하였으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 100%에 가까운 세포 증식을 나타내어 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 유의한 세포 독성이 없는 것으로 관찰되었다. 이에 CP-PR의 4T1 유방암 세포주에 대한 종양 전이 억제 효과는 직접적인 세포 독성이 아닌 것으로 판단되며 이는 암세포가 증식되기 전에 투여된 CP-PR로 인해 활성화된 대식세포, NK 세포 등 다양한 면역세포의 작용에 의한 것으로 사료된다.

선천면역계에서 대식세포가 생산하는 다양한 cytokine의 분비를 관찰함으로써 CP-PR의 대식세포 활성화를 확인한 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 TNF- α , IL-6, IL-10 및 IL-12, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IL-6, IL-10 및 IL-12, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IL-10 및 IL-12 그리고 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IL-12가 모두 유의하게 증가하였다. 대식세포는 Th1 면역 작용에 영향을 받아 TNF- α , IL-6 및 IL-12를 분비하는 M1 대식세포와 Th2 면역 작용에 영향을 받아 IL-10을 분비하는 M2 대식세포로 분류되는데 TNF- α 는 대표적인 multi-functional cytokine으로 면역 관련 세포를 염증부위에 모이게 하며 T

세포의 분화와 증식에 관여함으로써 암의 억제에 있어 중요한 역할을 하고²⁹⁾ IL-6은 염증을 유발하여 대식세포를 포함한 phagocyte의 탐식작용 및 보체의 생산을 증가시킴으로써 면역 작용을 한다³⁰⁾. IL-10은 T세포 및 대식세포 등에서 합성되어 강력한 항염증작용을 나타내고³¹⁾ IL-12는 세포 매개 면역의 매개자로서 암세포가 존재하는 경우 암세포에 작용하는 NK 세포의 활성화에 직접 관여함으로써 항암 활성을 유도한다³²⁾.

CP-PR이 cytokine inducer로서 활성이 있음을 확인한 바, 대식세포 및 4T1 유방암 세포주의 동시 배양에서 CP-PR의 투여가 cytokine 분비에 미치는 영향에 대해 확인한 결과 CP-PR은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-6을 제외한 TNF- α , IL-10 및 IL-12를 유의하게 증가시켰고 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 IL-12를 유의하게 증가시켰다. 악성 종양이 발생하는 경우 대식세포는 암세포를 살해하는 역할을 하는 전통적인 대식세포(classical macrophage)에서 종양세포의 증식, 이동, 침략 및 혈관 신생을 유도하는 종양관련 대식세포(tumor-associated macrophage, TAM)로 분화한다³³⁾. *In vivo* 연구에 따르면 TAM은 염증의 주요 매개체로 작용함으로써 암을 유발하고 원발성 종양 혹은 전이 부위에 종양을 촉진하는 역할을 한다³⁴⁾. TAM의 활성화는 유방암³⁵⁾ 및 자궁내막암³⁶⁾의 불량한 예후와 관련되어 있으며 특히 활성화된 TAM에서 분비되는 IL-10은 대식세포가 항원을 제시하거나 T세포를 자극하는데 필요한 major histocompatibility complex(MHC) II의 발현을 방해하여 T세포 및 NK 세포에 의한 항암 효과 반응을 둔화시키는 면역 억제 환경을 조성하는 것으로 알려져 있

다³⁷⁾. TNF- α 및 IL-12와 길항적으로 작용하는 IL-10의 활성 증가는 종양 미세 환경에서 CP-PR의 투여가 종양을 억제하는 고전적인 대식세포에 효과적으로 면역 효과를 가지지 못함을 의미할 수도 있어 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

NK 세포는 바이러스 감염세포 혹은 암 세포 등 비자기 세포를 살해하는 세포성 면역 활성을 가지고 있으며 IL-12에 의하여 종양세포를 살해하는 작동력을 획득한다. NK 세포에 의한 암세포 살해는 퍼포린(perforin)을 통해 암세포의 세포막에 구멍을 내고 그 구멍을 통해 단백질 분해효소인 granzyme을 분비함으로써 수행된다^{38,39)}. *In vivo* 연구에 따르면 NK 세포가 결핍된 마우스에서 암의 성장 및 전이가 증가하였으며 반대로 활성화된 NK 세포는 종양의 전이를 감소시켰다^{40,41)}. CP-PR의 NK 세포 활성 효과를 알아보기 위해 YAC-1 세포 살해 활성 및 granzyme 생산을 관찰한 결과 YAC-1 세포에 대한 비장 세포의 비인 E/T 비에 의존적으로 LDH 유리 및 granzyme의 양이 유의하게 증가하였다. 이는 CP-PR의 정맥투여가 대식세포 외에도 NK 세포를 활성화함에 따라 선천면역계의 활성을 유발하는 것을 의미한다.

이상의 실험 결과에서 CP-PR은 정맥투여로 유의한 항암 효과를 나타내었기에 향후 기존의 항암 치료 방법과 병용되어 상승작용을 유도할 수 있는 가능성을 보여준다. 그러나 본 연구는 대식세포 및 NK 세포 위주의 선천면역계 활성 측면만을 다루었다는 한계가 있어 적응면역계에 대한 추가적 확인이 요구되며 종양 미세 환경에서 CP-PR의 면역 기전에는

TNF- α 및 IL-12이 주로 관여할 것으로 생각됨에 따라 IL-10의 증가 의의에 대해서 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 조다당류 외에 黃精에서 기능성을 가지는 유용 성분 분리 및 각각의 기전에 대해 자세히 밝히고 다른 한약재와의 조합을 통한 한약 처방 연구가 지속적으로 이루어진다면 黃精이 한의학적 항암 치료에 효용성이 큰 약재로서 응용 가능할 것으로 판단된다.

V. 결 론

CP-PR이 암에 미치는 영향을 알아보고자 종양세포의 전이 억제, 대식세포의 cytokine 분비 및 tumoricidal 활성, NK 세포 활성 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 4T1 유방암 세포주의 정맥투여를 통한 종양 전이 억제 효과를 측정할 결과 CP-PR은 50 μg 및 500 μg 에서 유의한 종양 전이 억제를 나타내었다.
2. 세포 독성을 평가한 결과, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CP-PR은 정상 비장세포 및 4T1 유방암 세포주 모두에서 세포 독성을 나타내지 않았다.
3. 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 효과를 조사한 결과 CP-PR 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 TNF- α , IL-6, IL-10 및 IL-12, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IL-6, IL-10 및 IL-12, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IL-10 및 IL-12 그리고 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IL-12가 모두 유의하게 증가하였다.
4. 대식세포의 tumoricidal 활성 효과를 조사한 결과, CP-PR 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 TNF- α ,

IL-10 및 IL-12 그리고 10 µg/ml에서 IL-12가 모두 유의하게 증가하였다.

5. NK 세포 활성화 효과를 측정된 결과 CP-PR 은 YAC-1 세포 살해 활성을 E/T비 2.5:1, 5:1 및 10:1에서 유의하게 증가시켰고, granzyme의 생산을 E/T비 5:1 및 10:1에서 유의하게 증가시켰다.

Received : Sep 25, 2019

Revised : Oct 22, 2019

Accepted : Nov 29, 2019

References

1. South Korean National Statistical Office. Cancer incidence and Mortality. Available from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2 770.
2. Kim JP. Immunology and Immunotherapy of Cancer. Korean Journal of Immunology. 1986;8(1):73-83.
3. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. Cancer Research. 2016;76(3):513-6.
4. Cheng Min, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cellular & molecular immunology. 2013;10(3):230.
5. Kim JJ, Lee KS, Song BK. A bibliographic study on the treatment of the breast mass. The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology. 1998;11(2):29-43.
6. Heo J. Donguibogam. Kyung Nam: Donguibogam. 2006:683.
7. Yong HS, Ko SG. Inhibition of cellular proliferation and apoptosis by *Scutellaria Baicalensis* in MDA-MB-231 breast cancer cells. The Journal of Internal Korean Medicine. 2004;25(3):451-60.
8. Jo SI, et al. Inhibition of Cellular Proliferation by *CURCUMAE LONGAE Rhizoma* Extracts on MCF-7. The Korean Journal of Herbology. 2006;21(1):71-7.
9. Jung GA, Park KM, Cho SH. Anti-proliferative effect of Sam-nueng(*Sparganii Rhizoma*) extract on MCF-7 cells. The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology. 2006;19(1):166-77.
10. Hyun DH, et al. Inhibition of growth of the established 3-methyl-DAB-induced mammary cancer in mice and lung endothelial cells by *Gamissangwha-tang*. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 1997;11(2):108-12.
11. Lee JA, Park KM, Cho SH. Antioxidative and Anti-proliferative Effects on MCF-7 Human Breast Cancer Cells of *Ikiyangyoung-Tang*. The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology. 2007;20(1):32-49.
12. Ban HR, Cho SH, Park KM. Anti-proliferative effect of *Guichulpajing-Tang* extract on MCF-7 cells. The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology. 2006;19(1):155-65.
13. Chinese Materia Medica Committee. Chinese Materia Medical. Shanghai :Shanghai Science and Technology Publishing Co. 1999:143-8.
14. Kim JS, et al. Antioxidant and Anti-physical fatigue Effects of *Polygonati Rhizoma* and steamed *Polygonati*

- Rhizoma*. The Korean Journal of Herbology. 2006;31(3):49-57.
15. Roh SW. Effects of *polygonati Rhizoma* on the Diet-induced hyperlipidemia in rats. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(5):1147-51.
 16. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. Annual Review of Immunology. 2006;24:287-320.
 17. Gang MW, et al. Antioxidative effects of water Extracts from steamed *polygonati Rhizoma*. The Korean Journal of Herbology. 2017;32(1):33-40.
 18. Park SD, et al. Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Adenophorae Radix*, *Liriopsis Tuber*, *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma* and *Polygonati Rhizoma*. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2007;21(2):414-24.
 19. Jeong YS, Jeong JC. Antitumor Effect of Kaempferol A component of *polygonati Rhizoma* in Lung cancer cells. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2001;25(5):816-22.
 20. Joo YJ, Jeong JC. Anti-Growth Effect of Kaempferol, a Major Component of *Polygonati Rhizoma*, in Hepatocarcinoma Cells. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2012;26(4):519-26.
 21. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. International immunopharmacology. 2006;6(3):317-33.
 22. Shao BM, et al. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004;320(4):1103-11.
 23. Han SB, et al. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. International immunopharmacology. 2001;1(11):1969-78.
 24. Han SB, et al. Toll-likie receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. International Immunopharmacology. 2003;3(9):1301-12.
 25. Jeon YJ, et al. Differential activation of murine macrophages by angelan and LPS. Immunopharmacology. 2000;49(3):275-84.
 26. Han SB, et al. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas Nakai*. Immunopharmacology. 1998;40(1):39-48.
 27. Shin JY, et al. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2002;24(3):469-82.
 28. Kim KI, et al. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2001;65(11):2369-77.
 29. van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF- α in cancer treatment:
-

- molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*. 2006;11(4):397-408.
30. Macatonia SE, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of TH1 cells from naive CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology*. 1995;154(1):5071-9.
31. Sanjabi S, et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(4):447-53.
32. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *The Journal of Immunology*. 2000;165(5):2665-70.
33. Mantovani A, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
34. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*. 2013;35(5):585-600.
35. Leek RD, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research*. 1996;56(20):4625-9.
36. Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *International Journal of Cancer*. 1999;84(5):539-43.
37. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(5):1043-51.
38. Kodama T, et al. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *European journal of immunology*. 1999;29(4):1390-6.
39. Cao X, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.
40. Talmadge JE, et al. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature*. 1980;284(5757):622-4.
41. Smyth MJ, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*. 2005;42(4):501-10.