

사물탕이 L1210 세포 이식 및 항암제를 투여한 마우스의 면역세포에 미치는 영향

은재순*, 유동화, 권 진, 오찬호¹
우석대학교 약학대학, ¹자연과학대학

Effects of Sa-Mul-Tang on Immunocytes of L1210 Cells-transplanted or Antitumor Drugs-administered Mice

Jae-Soon Eun*, Dong-Hwa Yu, Jin Kwon and Chan-Ho Oh¹

College of Pharmacy and ^{}College of Natural Sciences, Woosuk University,
Samrye 565-701, Korea*

Abstract - Sa-Mul-Tang(SMT) consist of *Rehmanniae Radix Preparata*, *Paeoniae Radix Alba*, *Cnidii Rhizoma* and *Angelicae Gigantis Radix*. In L1210 cells-transplanted BALB/c mice, T-lymphocyte apoptosis, CD8⁺T_C cells population in thymocyte and nitric oxide production in macrophage were enhanced, but phagocytic activity was decreased. SMT suppressed T-lymphocyte apoptosis and enhanced CD4⁺T_H cells population, but did not affect nitric oxide production and phagocytic activity in L1210 cells-transplanted mice. In antitumor drugs-injected mice, T-lymphocyte apoptosis was enhanced, but CD4⁺T_H/CD8⁺T_C cells population and T-lymphocyte proliferation were decreased. SMT suppressed T-lymphocyte apoptosis, and enhanced CD8⁺T_C cells population, T-lymphocyte proliferation and phagocytic activity in vincristine-injected mice. These results suggest that SMT enhances T cell-mediated immunity in L1210 cells-transplanted mice, and enhances T cell-mediated immunity and phagocytic activity in vincristine-injected mice.

Key words - Sa-Mul-Tang; L1210 cells; anti-tumor drugs; T-lymphocyte; apoptosis; macrophage; phagocytosis; nitric oxide.

그동안 항암제의 개발 방법들은 주로 세포독성이 강한 물질을 찾는 것이었지만, 최근에는 세포독성은 약하지만 기존 항암제와 병용시 항암작용을 증강시키거나 부작용을 감소시킬 수 있는 물질,^{1,2)} 생체의 면역기능을 향진시킬 수 있는 물질^{3,4)}을 개발하기 위해 노력하고 있다.

본 연구자들은 마우스 leukemia cell인 L1210

세포를 이식한 마우스에 사물탕, 사군자탕, 십전대보탕 및 보중익기탕을 투여하였을 때 사물탕 및 사군자탕이 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 촉진함을 이미 보고한 바 있다.^{5,6)}

따라서 본 실험에서는 암세포 이식 또는 항암제 투여에 의해 변화되는 면역능을 정상으로 회복시킬 수 있는 약물을 찾기 위한 연구의 일환으로, 암세포를 이식한 마우스 또는 항암제를 투여한 마우스에 사물탕을 투여하여 변화되는 T-lymphocyte 및

*교신저자 : Fax 0652-290-1567

macrophage의 면역능을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 사물탕(Sa-Mul-Tang, 이하 SMT라 함)의 처방구성은 방약합편⁷⁾에 준하였으며, 처방구성은 熟地黄(Rehmanniae Radix Preparata), 白芍藥(Paeoniae Radix Alba), 川芎(Cnidii Rhizoma), 當歸(Angelicae Gigantis Radix)를 동량으로 하여 증류수로 3시간씩 2회 가열 추출한 다음 여과하고 여액을 감압농축한 후, 동결건조하여 분말(수득율 32.7%)을 얻어 실험에 사용하였다.

실험동물 - 실험에 사용한 mouse는 BALB/c계 18±2 g의 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 22±2°C, 습도 55±5%, light/dark 12시간의 사육조건에서 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기구 - 사용한 시약은 etoposide, vincristine, doxorubicin, DME medium, MTT, lipopolysaccharide(LPS, 055:B5), interferon- γ (γ -IFN, Hu γ -IFN), zymosan, sulfanilamide, lucigenin, propidium iodide, N-Naphthylethylenediamine · 2HCl는 Sigma Co., RPMI 1640, FBS, trypsin, thioglycollate는 Difco Co., PE/FITC conjugated-anti CD4 and anti CD8 antibody는 Molecular probes Co.의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate(96-well and 24-well, Costar), microplate reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), luminometer(Berthold 96LP), flow cytometer(Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

T-lymphocytes의 DNA fragmentation 측정 - L1210 세포 이식시에는 첫날 마우스당 L1210 세포를 2×10⁶ cells씩 복강에 이식하였고, 항암제 투여시에는 etoposide 6 mg/kg, vincristine 0.005 mg/kg, doxorubicin 0.2 mg/kg을 각각 2회(1일 및 3일째) 복강에 주사하였으며, SMT 500 mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후, 8일째 마우스의 흉선을 적출하여 T-lymphocytes를 분리하였다. T-lymphocytes 분리는 Wsocki와

Sato⁸⁾ 및 Mizel 등⁹⁾의 방법을 이용하였다. 즉 적출한 흉선을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 분리한 T-lymphocytes의 생존율 및 총세포수를 0.2% trypan blue exclusion법으로 hemocytometer로 측정하였다.

T-lymphocytes에 PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 μ g/ml) 20 μ l를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 측정하였다.¹⁰⁾

T-lymphocytes의 subpopulation 측정 - 위와 동일한 방법으로 T-lymphocytes를 분리한 후, T-lymphocytes 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1×10⁶ cells/ml 농도로 분주하여 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로 이중염색하여 4°C에서 반응시킨 다음, flow cytometer(excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 subpopulation을 측정하였다.¹¹⁾

T-lymphocytes의 proliferation 측정 - 위와 동일한 방법으로 실험하여 T-lymphocytes를 분리한 후, T-lymphocytes의 proliferation을 MTT법^{12,13)}으로 측정하였다.

T-lymphocytes 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.2×10⁶ cells/ml 농도로 접종하여 Concanavalin A(Con A) 1 μ g/ml를 첨가한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료시 0.01 N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

복강 macrophage의 phagocytic activity 측정 - L1210 세포 이식시에는 마우스당 L1210 세포를 2×10⁶ cells씩 1일째 복강에 이식하였고, 항암제 투여시에는 etoposide 6 mg/kg, vincristine 0.005 mg/kg, doxorubicin 0.2 mg/kg을 각각 2회(1일

및 3일째) 복강에 주사하였으며, SMT 500 mg/kg 을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하였다. 4일째 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고, 8일째 마우스를 경추탈골하여 도살하였다. 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양한다. 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다.

Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다.^{14,15} 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 세포부유액 50 µl와 lucigenin 용액 50 µl를 넣고 37°C에서 15분간 전처리한 후 zymosan 용액 30 µl를 첨가하여 5분 간격으로 60분 동안 lucigenin chemiluminescence를 측정하였다.

복강 macrophage의 nitric oxide 측정 - 위와 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24-well plate에 well당 1×10^6 cells을 분주한 후 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37°C CO₂-incubator에서 24 시간 배양한 후 생성된 nitric oxide(NO)양을 Griess 시약으로 측정하였다.¹⁶ 배지 100 µl와 Griess reagent(1% sulfanilamide+0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl+2.5% H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

통계처리 - 통계처리는 Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 이하를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

L1210 세포를 이식한 마우스 T-lymphocytes의 DNA fragmentation에 미치는 효과 - T-lymphocytes의 DNA fragmentation는 대조군에서 $5.9 \pm 0.8\%$ 이었으며, L1210 세포를 이식한 군은 $25.4 \pm 3.8\%$ 로 T-lymphocytes의 DNA fragmentation이 촉진되었고, L1210 세포를 이식한 군에 SMT를 투여한 군은 $9.3 \pm 2.4\%$ 로, L1210 세포를 투여한

군에 비해 DNA fragmentation이 감소되었다 (Fig. 1). 생체에 있어 apoptosis는 항상성 유지에 필수적이며 apoptosis의 감소 및 촉진은 암, 자가면역질환 및 바이러스 감염증 등에 걸리기 쉽게 된다.¹⁷ Apoptosis는 programmed cell death에 동반하여 관찰되는 cell death의 형태이지만, 항암제 또는 방사선과 같은 외부의 요인에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다.¹⁸ 암세포인 L1210 세포의 이식에 의해 T lymphocyte의 apoptosis가 촉진되는 기전은 정확히 설명할 수 없으나, T lymphocyte가 apoptosis에 의해 사멸하게 되면 T cell mediated immunity가 저하될 수 있는데 이를 SMT가 일부 회복시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

L1210 세포를 이식한 마우스 T-lymphocytes의 subpopulation에 미치는 효과 - T-lymphocytes의 subpopulation은 대조군에서 CD4⁺ 세포는 $12.7 \pm 2.2\%$, CD8⁺ 세포는 $4.9 \pm 0.1\%$ 이었으며, L1210을 이식한 군은 CD4⁺ 세포는 $14.7 \pm 0.5\%$, CD8⁺ 세포는 $8.1 \pm 0.9\%$ 로 CD4⁺ 세포는 별 차이가 없었으나, CD8⁺ 세포는 증가되었다. L1210을 이식한 군에 SMT를 투여한 군은 CD4⁺ 세포는 $23.5 \pm 2.1\%$, CD8⁺ 세포는 $9.1 \pm 1.1\%$ 로 L1210 세포를 이식한

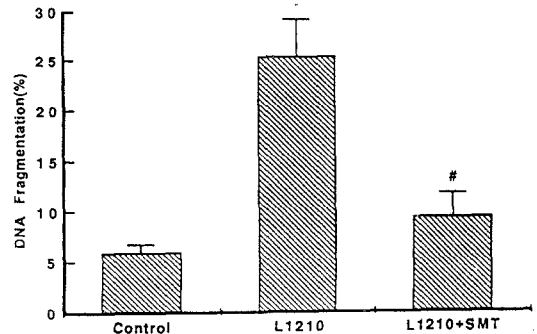


Fig. 1. Effect of SMT on T-lymphocyte apoptosis of L1210 cells-transplanted mice. L1210 cells (2×10^6 cells/mouse) were injected i.p. one time, and SMT (500 mg/kg) was administered p.o. for 7 days. T-lymphocytes were prepared from BALB/c mice thymus. The cells were sedimented by centrifugation, and were lysed in a hypotonic solution with propidium iodide. DNA fragmentation was measured with a flow cytometer. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. *: Significantly different from control group ($p < 0.01$). #: Significantly different from L1210-treated group ($p < 0.05$).

군에 비해 CD4⁺ 세포는 증가되었으며, CD8⁺ 세포는 L1210 세포를 이식한 군에 비해 별 차이가 없었다 (Fig. 2A, 2B). L1210 세포가 이식되었을 때 CD8⁺

T_C 세포가 증가되는 것은 외부에서 침입된 세포를 파괴하기 위한 과정이라 사료되며, L1210 세포를 이식하고 SMT를 투여하면 L1210 세포의 이식에 의해 증가된 CD8⁺T_C 세포에는 별 영향을 주지 않고, CD4⁺T_H 세포를 증가시켰다. SMT만을 투여하였을 때도 CD4⁺T_H 세포가 증가하였는데 (data not shown), 이는 SMT가 생체에서 interferon- γ 또는 IL-2와 같은 다양한 lymphokine을 분비하게 함으로써 면역능을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

L1210 세포를 이식한 마우스 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과-복강 macrophage의 phagocytic activity를 측정된 결과, 대조군에 비해 L1210을 이식한 군은 phagocytic activity가 감소되었으며, L1210을 이식한 군에 SMT를 투여한 군은 L1210 세포만을 이식한 군에 비해 phagocytic activity가 별 차이가 없었다 (Fig. 3). 이는 SMT가 L1210 세포 이식에 의해 감소된 macrophage의 phagocytic activity를 회복시킬 수 없음을 의미하는 것이다.

L1210 세포를 이식한 마우스 macrophage의

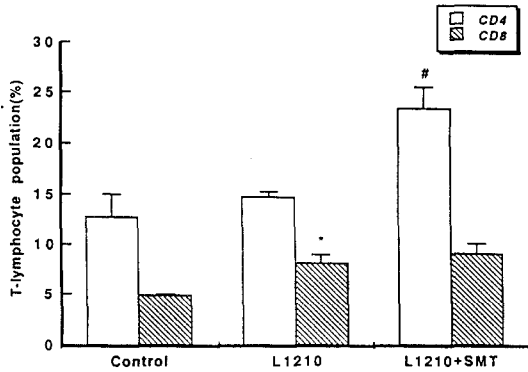


Fig. 2A. Effect of SMT on T-lymphocyte subpopulation of L1210-transplanted mice. T-lymphocytes subpopulation were measured with a flow cytometer after staining with CD4-PE and CD8-FITC mAbs. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$). #: Significantly different from L1210-treated group ($p < 0.05$).

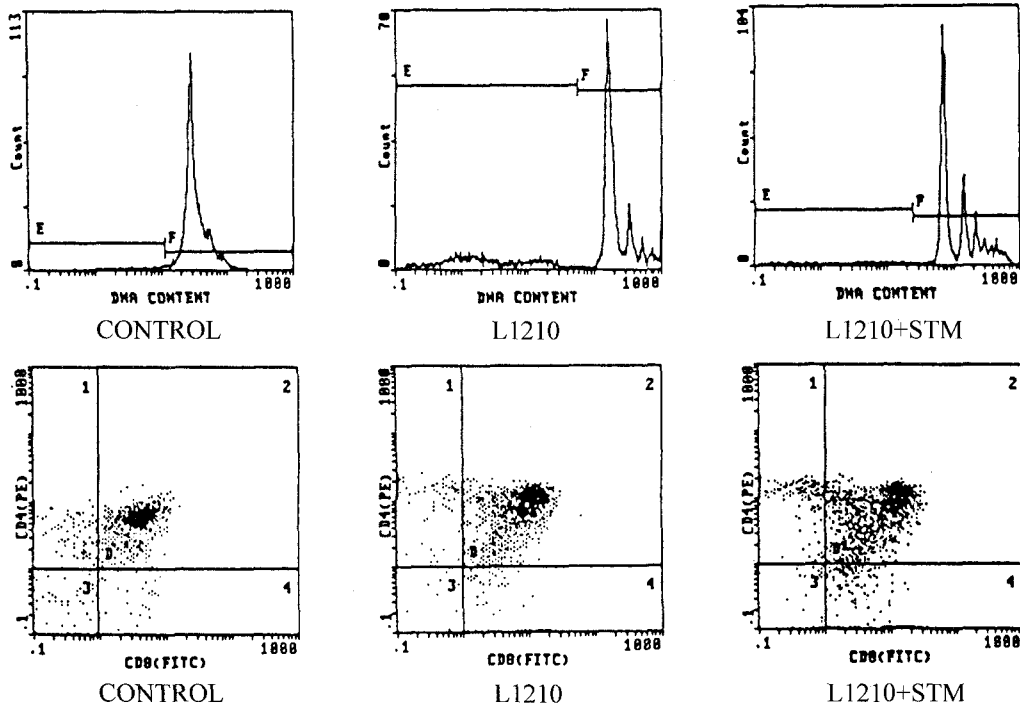


Fig. 2B. Histogram of T-lymphocytes DNA fragmentation and subpopulation of L1210 transplanted mice. DNA fragmentation: excitation: 488 nm, emission: 620 nm. Subpopulation: excitation: 488 nm, emission: FITC-525 nm, PE-575 nm.

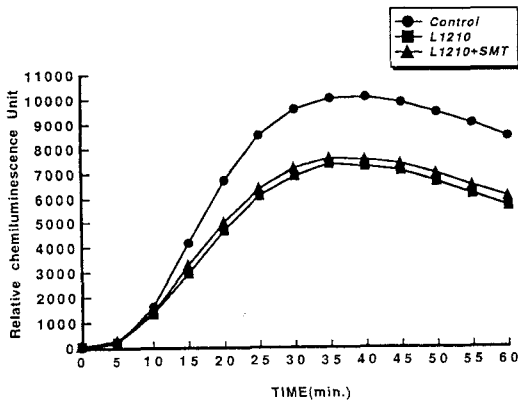


Fig. 3. Effect of SMT on phagocytic activity of peritoneal macrophages derived from L1210-transplanted mice. SMT was administered p.o. for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i. p. at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in DME media (without phenol red) with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 60 minutes. Other procedures were described as detailed in the materials and methods section. Each point represents the mean from 5 experiments.

nitric oxide 생성에 미치는 효과 - 복강 macrophage에서 생성되는 NO 양은 대조군에서 LPS와 γ -IFN를 첨가하지 않았을 때는 $1.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 이였으며, LPS와 γ -IFN를 첨가하였을 때는 $10.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 이였고, L1210을 이식하였을 때는 $49.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 NO 생성이 현저히 증가되었으며, L1210을 이식한 마우스에 SMT를 투여한 군은 $45.3 \pm 2.8 \mu\text{M}$ 로 L1210 세포만을 이식한 군에 비해 생성되는 NO의 양이 별 차이가 없었다(Fig. 4). NO는 혈관확장, 신경전달 및 세포독성 등 다양한 생리작용이 있으며, 또한 NO는 in vivo에서 T-lymphocyte의 apoptosis¹⁹⁾ 및 T-lymphocyte에서 생성되는 lymphokines을 조절²¹⁾하는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과 L1210 세포를 이식하였을 때 T-lymphocytes의 apoptosis가 촉진되었는데, 이 현상이 L1210 세포를 이식하였을 때 macrophage로부터 생성된 NO에 기인된 것인지 또는 macrophages에서 생성된 NO가 T-lymphocytes의 apoptosis에 영향을 줄 수 있는지의 여부는 추후 연구되어야 할 것이다. 한편 macrophage로부터 생성되는 NO가 phagocytic activity를

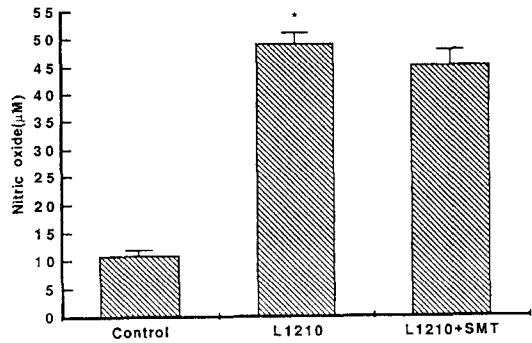


Fig. 4. Effect of SMT on nitric oxide production from peritoneal macrophage of L1210-transplanted mice. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured for 24 hours in RPM1640 medium with LPS and γ IFN. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

감소시킨다는 보고²⁰⁾와 비교하였을 때 L1210 세포 이식에 의해 증가된 NO가 phagocytic activity를 감소시켰을 것이라 추정되며, L1210 세포를 이식하고 SMT를 투여하였을 때 L1210 세포만을 이식한 군에 비해 phagocytic activity가 별 변화가 없었다는 것은, SMT가 L1210 세포 이식에 의해 증가된 NO 생성을 억제하지 못한 결과라 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

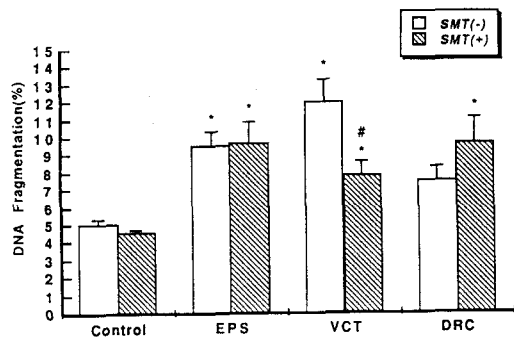


Fig. 5A. Effect of SMT on T-lymphocyte apoptosis of anti-tumor drugs administered mice. Anti-tumor drugs were injected i.p. a first and third day, and SMT was administered p.o. for 7 days. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$). #: Significantly different from SMT non-treated group ($p < 0.05$). EPS: Etoposide (6 mg/kg), VCT: Vincristine (0.005 mg/kg), DRC: Doxorubicin (0.2 mg/kg), SMT(-): SMT non-treated group, SMT(+): SMT treated group.

SMT와 항암제 병용투여시 T-lymphocytes의 apoptosis에 미치는 효과-항암제인 etoposide는 topoisomerase II inhibitor로, vincristine은 mitotic inhibitor로, doxorubicin은 intercalator로 작용하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ T-lymphocytes의 apoptosis 발생율은 대조군에서 $5.0 \pm 0.3\%$ 이었으며, 항암제인 etoposide 투여군은 $9.5 \pm 0.8\%$ 로, vincristine 투여군은 $12.0 \pm 1.3\%$ 로, doxorubicin 투여군은 $7.5 \pm 0.8\%$ 로, 대조군에 비해 etoposide 및 vincristine 투여군에서 T-lymphocytes의 apoptosis가 증가되었으나, SMT만 투여한 군은 $4.5 \pm 0.2\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다. SMT와 etoposide 병용 투여군은 $9.7 \pm 1.2\%$

로, SMT와 vincristine 병용 투여군은 $7.8 \pm 0.8\%$ 로, SMT와 doxorubicin 병용 투여군은 $9.7 \pm 1.4\%$ 로 SMT와 vincristine 병용 투여시 vincristine 단독 투여군에 비해 T-lymphocytes의 apoptosis가 억제되었다(Fig. 5A, 5B). 이 결과는 항암제들이 투여되었을 때 T-lymphocytes의 apoptosis가 촉진되어 T cell mediated immunity가 저하될 수 있음을 의미하는 것이며, SMT와 vincristine 병용시 vincristine에 의해 저하되는 T cell mediated immunity를 회복시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

SMT와 항암제 병용 투여시 T-lymphocytes의 subpopulation에 미치는 효과-T-lymphocytes의 subpopulation은 CD4⁺ 세포는 대조군에서 10.3

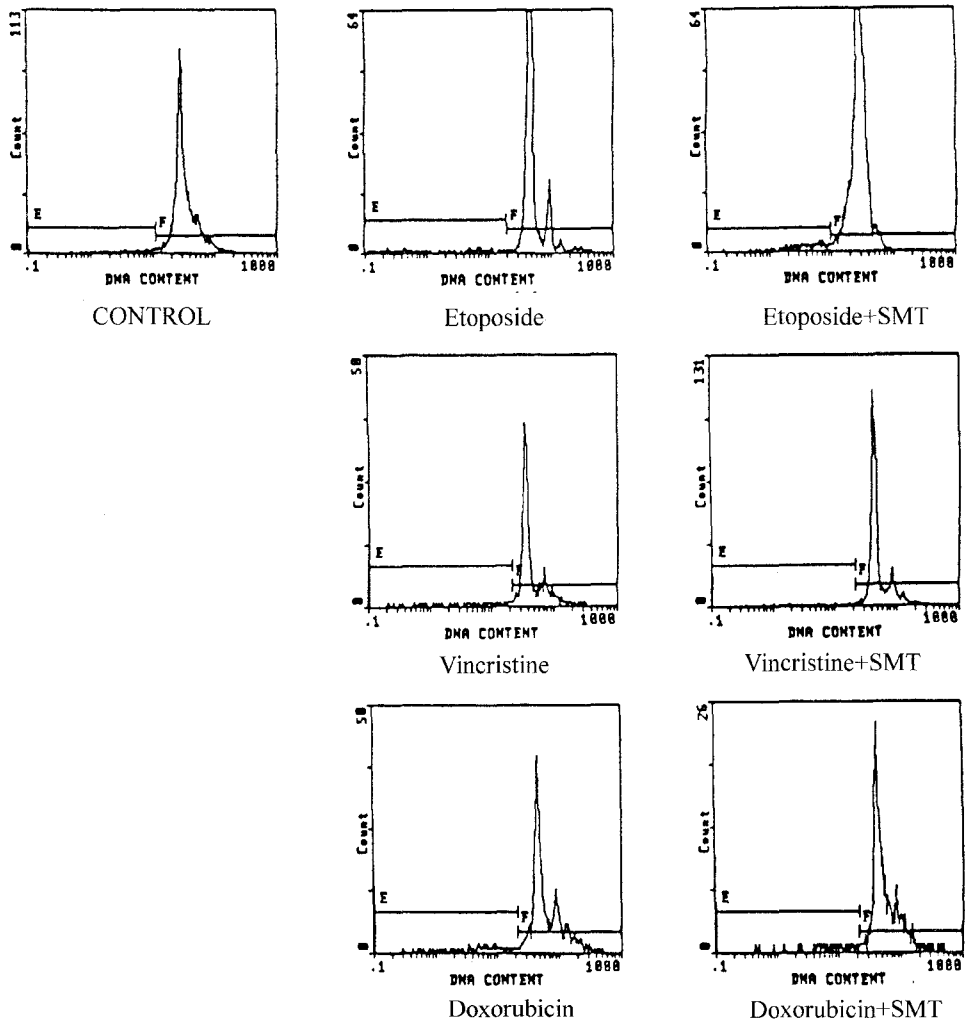


Fig. 5B. Histogram of T-lymphocytes DNA fragmentation of anti-tumor drugs administered mice.

$\pm 0.7\%$ 이었으며, 항암제인 etoposide 투여군은 $4.7 \pm 0.8\%$ 로, vincristine 투여군은 $8.1 \pm 0.5\%$ 로, doxorubicin $12.5 \pm 1.2\%$ 로 대조군에 비해 etoposide 및 vincristine 투여군은 $CD4^+$ 세포의 population이 감소되었으나, SMT만 투여한 군은 $11.7 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. SMT와 etoposide 병용 투여군은 $5.1 \pm 0.3\%$ 로, SMT와 vincristine 병용 투여군은 $8.5 \pm 0.8\%$ 로, SMT와 doxorubicin 병용 투여군은 $10.9 \pm 0.5\%$ 로 SMT와 항암제 병용 투여시 항암제 단독 투여군에 비하여 별 차이가 없었다.

$CD8^+$ 세포는 대조군에서 $2.9 \pm 0.4\%$ 이었으며, 항암제인 etoposide 투여군은 $1.5 \pm 0.3\%$ 로, vin-

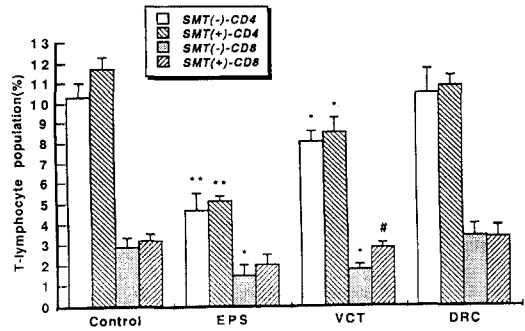


Fig. 6A. Effect of SMT on T-lymphocyte subpopulation of anti-tumor drugs administered mice. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. *: Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). #: Significantly different from SMT non-treated group ($p < 0.05$).

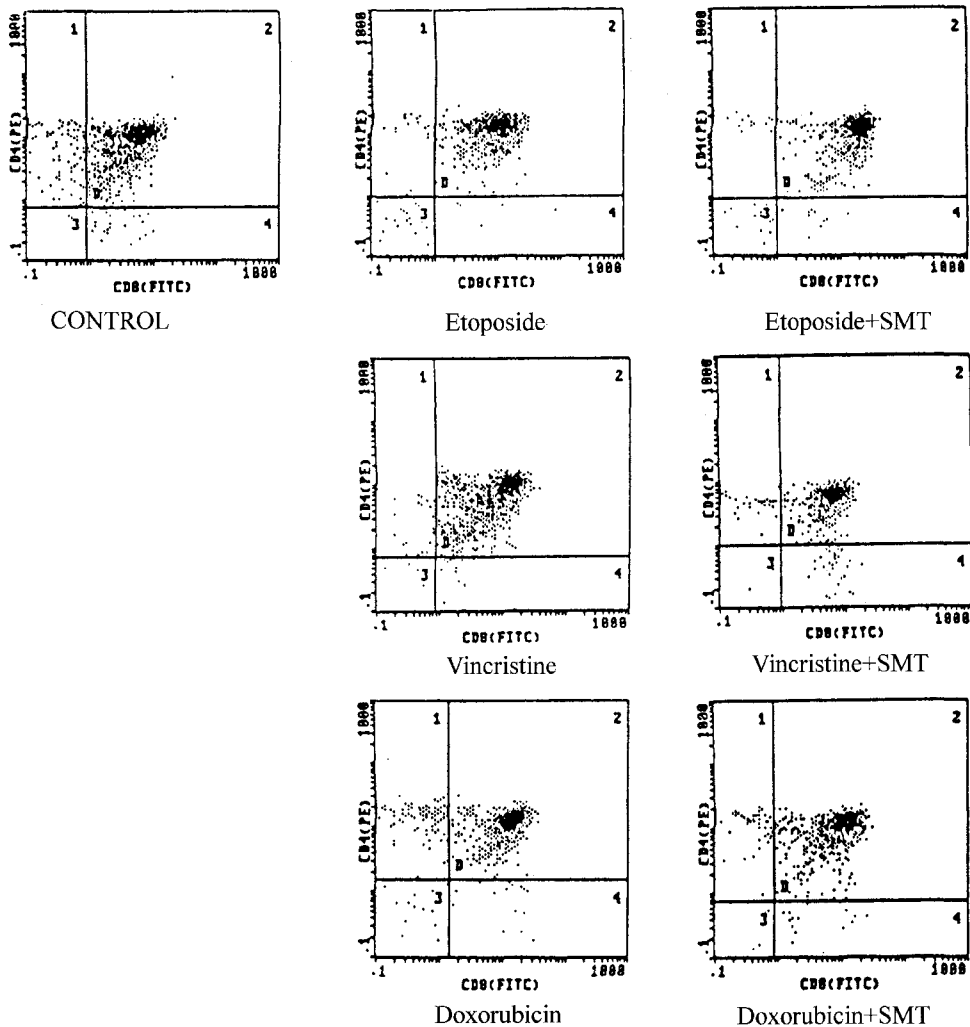


Fig. 6B. Histogram of T-lymphocytes subpopulation of anti-tumor drugs administered mice.

cristine 투여군은 $1.7 \pm 0.2\%$ 로, doxorubicin 투여군은 $3.4 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 etoposide 및 vincristine 투여군은 $CD8^+$ 세포의 population이 감소되었으나, SMT만 투여한 군은 $3.2 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. SMT와 etoposide 병용 투여군은 $2.0 \pm 0.5\%$ 로, SMT와 vincristine 병용 투여군은 $2.8 \pm 0.3\%$ 로, SMT와 doxorubicin 병용 투여군은 $3.3 \pm 0.6\%$ 로 SMT와 vincristine 병용 투여시 vincristine 단독 투여군에 비해 증가되었다(Fig. 6A, 6B). 항암제인 etoposide 및 vincristine 투여시 $CD4^+T_H$ 세포 및 $CD8^+T_C$ 세포의 population이 모두 감소하였으나, SMT를 병용시 vincristine에 의해 저하되는 $CD8^+T_C$ 세포의 population은 정상치로 회복되었다는 것은, SMT가 vincristine에 의해 저하되는 T cell mediated immunity를 회복시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

SMT와 항암제 병용 투여시 T-lymphocytes의 proliferation에 미치는 효과-T-lymphocytes에서 Con A를 처리한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않은 군의 세포생존율은 $68.6 \pm 0.8\%$ 로 감소되었으며, 항암제인 etoposide 투여군은 $87.5 \pm 1.0\%$ 로, vincristine 투여군은 $89.7 \pm 1.7\%$ 로, doxorubicin 투여군은 $51.1 \pm 1.0\%$ 로 대조군에 비해 T-lymphocytes의 pro-

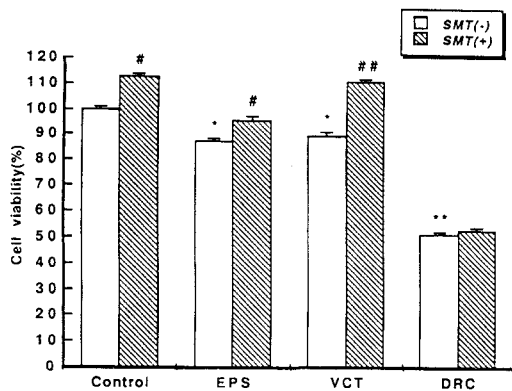


Fig. 7. Effect of SMT on T-lymphocyte proliferation of anti-tumor drugs administered mice. *: Significantly different from control group (*: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$). #: Significantly different from SMT non-treated group (#: $p < 0.01$, ##: $p < 0.001$). The proliferation (%) of Con A non-treated group: 68.6 ± 0.8 . Control: Concanavalin A treated group.

liferation이 감소되었으나, SMT만 투여한 군은 $112.5 \pm 1.2\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다. SMT와 etoposide 병용 투여군은 $95.9 \pm 1.7\%$ 로, SMT와 vincristine 병용 투여군은 $111.2 \pm 0.9\%$ 로, SMT와 doxorubicin 병용 투여군은 $52.8 \pm 0.8\%$ 로 SMT와 etoposide 및 vincristine 병용 투여군은 etoposide 및 vincristine만 투여한 군에 비해 proliferation이 증가되었으나, SMT와 doxorubicin 병용 투여군은 doxorubicin만 투여한 군에 비해 별 차이가 없었다(Fig. 7). SMT는 etoposide 및 vincristine 투여에 의해 감소되는 T-lymphocytes의 증식능을 증가시켰다. 항암제 투여시 전반적으로 T-lymphocytes의 증식이 억제되고 apoptosis가 촉진된다는 것은 항암제가 투여되었을 때 생체내에서 T cell mediated immunity가 감소될 수 있음을 시사하는 것이며, SMT 투여에 의해 T cell mediated immunity가 일부 회복될 수 있다는 결과라 사료된다.

SMT와 항암제 병용 투여시 마우스 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과-복강 macrophage의 phagocytic activity를 측정 한 결과, 대조군에 비해 etoposide 및 doxorubicin 투여군은 phagocytic activity가 증가되었으나, vincristine 투여군은 감소되었다. Etoposi-

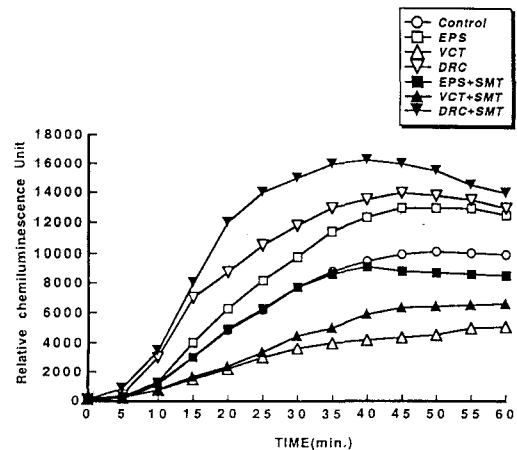


Fig. 8. Effect of SMT on phagocytic activity of peritoneal macrophages derived from antitumor drugs administered mice. The procedures were described as detailed in the materials and methods section. Each point represents the mean from 5 experiments.

de와 SMT 병용 투여시 etoposide 단독 투여군에 비해 phagocytic activity가 감소되었으나, vincristine 및 doxorubicin과 SMT 병용 투여시에는 항암제 단독 투여군에 비해 증가되었다(Fig. 8). 이는 SMT가 vincristine 및 doxorubicin 병용 투여시 macrophage의 phagocytic activity를 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

결 론

마우스에 암세포인 L1210 세포를 이식하거나 항암제인 vincristine을 주사하면 T cell-mediated immunity와 macrophage의 phagocytic activity가 감소되었다. L1210 세포를 이식하고 사물탕을 투여하면 T cell-mediated immunity는 증가되었으나 phagocytic activity는 영향이 없었으며, 항암제인 vincristine을 주사하고 사물탕을 투여하면 T cell-mediated immunity 및 phagocytic activity가 증가되었다.

사 사

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Eun, J. S., Cho, H. J., Yang, J. H., Jeon, H. and Kim, Y. A. (1994) Cytotoxicity of reaction-precipitate from *Coptidis rhizoma* and *Glycyrrhizae radix* aqueous mixture. *Kor. J. Pharmacogn.* 25: 356-362.
- Eun, J. S. and Song, W. Y. (1994) The combined effect of *n*-BuOH fraction of *Ulm*i cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* 25: 144-152.
- Oldham, R. K. (1983) Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 789-792.
- Masaki, A. (1988) Protective effects of Juzen-Tai-Ho-Toh against adverse reactions associated with mitomycin C. Recent advances in the pharmacology of kampo medicines, *Excerpta Medica* 275-280.
- Han, J. H., Kang, S. Y., Jung, H. W., Oh, C. H., Kwon, J. and Eun, J. S. (1997) Effect of several kinds of tonifying prescriptions on the regulation and apoptosis in immune cells. *J. of Herbology* 12: 85-93.
- Eun, J. S., Kim, D. K., Yu, D. H., Kwon, J., Suh, Y. H., So, J. N., Jeon, H. and Oh, C. H. (1998) Effects of Sa-Kunja-Tang on immune cells of L1210 transplanted mice. *Woosuk Bull. Pharm. Sci.* 2: 11-18.
- 申載鏞(1988): 方藥合編解說, 62. 成輔社, 서울.
- Wysocki, L. J. and Sato, V. L. (1978) Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2844-2848
- Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L. (1978) Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 120: 1497-1503.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, G. and Riccardi, C. A. (1991) Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.
- Suda, T. and Nagata, S. (1994) Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. (1990) A simple and rapid method to determine hematoopoietic growth factor activity. *J. Immunol. Methods* 129: 23-30.
- Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. (1988) Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods* 112: 163-168.
- Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. (1994) Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* 174: 259-268.
- Rockett, K. A., Awburn, M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity* 59: 3280-3283.
- Willie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980) Cell death: The significance of apop-

- tosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
18. Martin, S. J. and Green, D. G. R. (1995) Apoptosis and cancer. The failure of control on cell death and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 18: 137-154.
 19. Okuda, Y., Sakoda, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T. (1996) Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. *Immunology Letters* 52: 135-138.
 20. Jun, C. D., Park, S. K., Kim, J. M., Kim, J. D. and Chung, H. T. (1996) Inhibition of phagocytic activity by nitric oxide in murine peritoneal macrophages. *Kor. J. Immunol.* 18: 625-634.
 21. Craig, C. R. and Stitzel, R. E. (1994) *Modern pharmacology*, 4th, 687-694. Little, Brown and Company, USA.

(1998년 4월 30일 접수)