

龍角散의 면역조절 및 백혈병세포의 아폽토시스에 미치는 효과

오찬호* · 권진¹ · 이광규²

우석대학교 생명공학부, 1: 군장대학교 보건행정과, 2: 우석대학교 한의과대학

Effect of Yonggak-san on the Immuno-regulatory and Apoptosis of Leukemia cells

Chan Ho Oh*, Jin Kwon¹, Kwang Gyu Lee²

Division of Biotechnology, Woosuk University, 1: Department of Health Administration, Kunjang College, 2: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effect of Yonggak-san (YGS) on the immune reaction and apoptosis of leukemia cells. Administration of YGS(500 mg/kg) enhanced proliferation of splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells, and also YGS accelerated subpopulation of splenic B and T, thymic T and mesenteric lymph node-T lymphocytes, especially significantly increased CD4⁺-TH cells in BALB/c mice. YGS accelerated phagocytic activity and production of nitric oxide in peritoneal macrophages. YGS induced apoptosis of transplanted-L1210 cells in vivo, increased apoptotic cell death of cultured-L1210 and/or Molt4 human leukemia cells, decreased of mitochondrial transmembrane potential of both cells in vitro. These results suggest that YGS have an immuno-regulatory effect and anti-cancer property.

Key words : Yonggak-san(龍角散), Immune reaction, apoptosis, leukemia cells, phagocytic activity

서론

疾病의 발생과 進展은 정상적인 陰陽 氣血 臟腑 및 經絡의 기능을 바탕으로 하는 '正氣'와 각종 발병인자를 치장으로 하는 '邪氣'와의 투쟁관계 즉 正邪相爭에 의한 正·邪간의 消長進退과정의 병리다¹⁾²⁾. 그 중에서도 發病因子인 邪氣보다는 防禦因子인 正氣에 달려있다고 보아 正氣의 虛損을 더욱 중요시하였는데, 《素問·刺法論》³⁾에 "正氣存內 邪不可干"이라 하여 正氣가 발병의 根本이고 邪氣가 발병의 條件임을 나타내고 있다. 때문에 正氣不足은 發病의 根據로, 病邪는 發病의 條件으로 작용한다고 하였다⁴⁾. 이런 이유로 正氣가 허약할 때는 補益을 위주로 하는 '扶正法'을, 邪氣가 강할 때는 清熱, 解毒, 涼血하는 '祛邪法'을 이용하여 왔다⁵⁾. '正氣'에 대한 개념을 서양의학적으로 살펴보면 백혈구가 체내로 침입해 들어 온 자기의 조직(self)과 다른 비자기(non-self)를 인식하여 그것을 파괴하고 소멸시키는 체계⁶⁾인 면역이라는 개념을 통해서 알 수 있다. 면역계는 호중구와 대식

세포 등의 식세포와, 세포상해활성을 가진 NK세포 등이 주된 임무를 담당하는 선천성 면역(비특이적)과 T임파구 및 B임파구 등이 반응의 주역인 후천성 면역(특이적)으로 구분되며, 이 중 후천성 면역은 T임파구 등의 세포가 반응을 담당하는 세포성 면역과 체액성 면역으로 분류된다⁶⁾. 溫陽藥物인 桂心과 炮薑 炙甘草 및 收斂固澀藥물인 龍骨로 구성된 龍角散은 太平聖惠方⁷⁾에 처음 수록된 처방으로 "虛勞失精, 百法未效"에 사용되는 처방으로, 오늘날에는 久瀉虛寒, 腹中冷痛 등 전형적인 陽虛證에 활용된다고 보고되었다. 이에 저자는 龍角散이 면역반응에 미치는 영향을 관찰하고자 脾臟, 胸腺, 腸間膜 淋巴節세포의 증식반응 및 아군의 측정, 복강 대식세포의 탐식능과 대식세포에서의 nitric oxide의 생성량을 측정하였으며 항암능력을 검정하기 위하여 생쥐(L1210세포) 및 사람 백혈병세포(Molt4세포)의 apoptosis에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 음성(8주령, 20±2

* 교신저자 : 오찬호, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 생명공학부

E-mail : choh@woosuk.ac.kr, Tel : 063-290-1431

· 접수: 2002/07/12 · 수정: 2002/08/31 · 채택 : 2002/09/23

g), 흰쥐는 SD계통의 웅성(8주령, 150±10g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide, ethidium bromide, triton X-100, RNase A, proteinase K, sodium dodesyl sulfate, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC6), Concanavalin A, lipopolysaccharide, sulfanilamide, carbamoyl-cyanide, lucigenin, zymosan, m-chlorophenylhydrazone (mCICCP), thioglycolate(TG) 등은 Sigma Co., PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 antibody 등은 Caltag Co., 기타 시약은 특급시약 및 세포 배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로서는 culture flask(Nunc), 96well microtiter plate(Costar Co.), micrometer(Mitutoyo Co.), inverted microscope(Zeiss), laser flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), ELISA reader(Dynatech, MR5000), luminometer (Berthold, 96LP), 그 외 centrifuge(VS-15000CF), CO₂ incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision Scientific Co.의 제품을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 龍角散의 구성은 「太平聖惠方」에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 4첩 분량(163.5 g)을 증류수 2000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 46 g(수득율: 28.1%)을 얻어 (이하 YGS라 함), 동물실험시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 龍角散 1貼의 처방 구성내용은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Yonggak-san

韓藥名	生藥名	重量(g)
龍骨	Fossilia Ossis Mastodi	37.5
桂心	Cinnamomi	1.125
炮薑	Zingiberis Rizoma	1.125
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	1.125
總量		40.875

4. MTT法에 의한 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 증식반응 측정

생쥐에 YGS(500 mg/kg body weight)를 7일 동안 경구 투여(p.o)한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장, 흉선 및 장간막 임파절을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여 1×10⁶cells/well이 되도록 세포수를 조정하고 비장세포 부유액에는 LPS(5 µg/ml), 흉선 및 장간막 세포 부유액에는 Con A(0.5 µg/ml)를 첨가하여 48시간 동안 37℃의 CO₂배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하

였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 µl를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 µl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁸⁾.

5. 비장, 흉선 및 장간막 임파절 세포의 아군(Subpopulation) 측정

생쥐에 YGS(500 mg/kg body weight)를 7일 동안 경구 투여(p.o)한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장, 흉선 및 장간막 임파절을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여 1×10⁶cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody (1:40 dilution)로 이중 염색하여 4℃에서 30분간 반응시키고 laser flow cytometer(excitation: 488 nm. emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 lymphocyte의 아군을 측정하였다⁹⁾.

6. 복강 대식세포의 탐식능(Phagocytosis) 측정

BALB/c 생쥐에 YGS(500 mg/kg body weight)를 매일 경구 투여(p.o)하면서 4일 째에 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주사하고 다시 3일이 경과한 후, 경추 탈구시켜 5 ml의 cold-PBS를 복강에 주입하여 복강삼출세포를 수집하고 원심분리(1,500rpm, 5분)한 후, RPMI1640 배지에 부유시켜 petri dish에 넣고 CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 다음, petri dish 밑면에 부착한 대식세포를 scrapper로 모아 원심 분리(1,500 rpm, 5분)해서 세포수를 1×10⁷cells/ml가 되도록 DME(0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH7.2)에 부유시켜 사용하였다. Zymosan용액의 제조는 zymosan 67 mg을 10 ml의 PBS에 넣어 37℃에서 30분간 방치한 후 동일한 양의 PBS로 2회 세척하고 FBS가 10% 첨가된 10 ml의 DME에 재부유시켜 사용하였다. Lucigenin용액의 10 ml의 PBS에 용해한 후 여과 멸균하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 사용 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence측정은 luminometer를 이용하여 37℃에서 측정용 microplate well (white well)에 준비된 세포부유액 50 µl와 lucigenin 50 µl를 주입하고 37℃에서 15분 동안 전 처리한 후, zymosan용액 30 µl를 첨가하여 최종량이 200 µl가 되도록 한 후, 5분 간격으로 60분간 chemiluminescence를 측정하였다¹⁰⁾.

7. 복강 대식세포에서의 nitric oxide(NO) 측정

생쥐의 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 복강주사하고 3일 후에 생쥐를 경추 탈구하여 복강 내에 cold PBS 5 ml를 주입, 복강 삼출세포를 수집하고 RPMI1640 배지로 2회 세척(1,500 rpm, 10분, 4℃)한 다음, petri dish에 부착시켜 부착한 세포만 cell scraper로 모아 24 well culture plate에 1×10⁶ cells/well로 분주하였다. 각 well에 YGS를 농도 별(1, 10 및 100 µg/ml)로 처리하고 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 첨가하여 배양하고 배

양 24시간 후에 생성된 NO양을 Griess법으로 측정하였다. 배지 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well에 넣고 570 nm에서 microplate-ELISA reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO양을 산정하였다¹¹⁾.

8. 복강에 이식한 L1210세포의 flow cytometer에 의한 apoptosis 측정(in vivo)

생쥐에 5 \times 10⁶cells/ml의 L1210(mouse leukemia)세포를 복강 내 주사(i.p)한 다음 YGS(500 mg/kg body weight)를 7 일간 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 복강에서 L1210세포를 무균적으로 수집하고 세포부유액을 조제해서 세정(\times 3회, PBS)한 후, 1 \times 10⁶cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원심분리(250g, 10분, 4 $^{\circ}$ C)하고 침전시킨 세포분획에 PI(10 μ g/ml)를 20 μ l/1 \times 10⁶ 세포의 농도로 염색(4 $^{\circ}$ C, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다¹²⁾.

9. 백혈병세포의 DNA fragmentation 측정(in vitro)

계대배양 중인 L1210세포 및 Molt4(human lymphoblastic leukemia)세포를 96 well culture plate에 1 \times 10⁶cells/well이 되도록 세포를 조정한 다음, 1, 10 및 100 μ g/ml의 YGS를 첨가하여 24시간 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 PI로 염색하여 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다. 단편화된 DNA의 확인은 동일한 검체에 100 μ l의 nuclear lysis buffer(50mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치한 후, 16,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 다음, 상층액을 별도의 원심관에 취한다. RNase A(20 mg/ml) 2 μ l를 가해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 다시 20 mg/ml의 proteinase K액 2 μ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하고 5M NaCl 20 μ l와 isopropyl alcohol 120 μ l를 가해 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight시킨다. 16,000 rpm으로 20분간 원심분리해서 상층액을 제거한 다음, TE buffer 20 μ l에 용해하고 1.2% agarose gel 전기영동(minigel: Mupid-II, 50V, 2시간)을 해서 ethidium bromide(10 μ g/ml)로 염색한 다음 단편화된 DNA를 정성적으로 확인하고 gel documentation reader로 판독하였다¹³⁾.

10. Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi$ m) 측정

계대배양한 L1210세포 및 Molt4세포를 96 well micro culture plate에 1 \times 10⁶cells/well이 되도록 주입하여 YGS(1, 10 및 100 μ g/ml)를 첨가한 후, 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C의 CO₂배양기 내에서 배양한 다음, 각각의 세포를 eppendorf tube에 수집하고 원심분리(250g, 10분)해서 침전시킨 세포분획에 DiOC6(최종농도: 40nM)로 염색시켜 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm emission: 525 nm)로서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\psi$ m)을 측정하였으며, 이때 negative control로서는 uncoupling agent로서

carbamoyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone(mCICCP, 50 μ M)을 가하여 동일한 방법으로 측정하였다¹⁴⁾.

11. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

1. YGS가 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 증식에 미치는 효과
YGS를 7일 동안 생쥐에 경구 투여하고 비장, 흉선 및 장간막 임파절내의 면역세포의 증식반응을 측정된 결과, 생쥐 비장세포에서 대조군(생리식염수 투여군 + LPS(5 μ g/ml) 처리)에서의 증식력을 100%로 하였을 때, YGS를 투여한 군에서 117.5 \pm 4.9%로 비장세포의 증식을 촉진시켰으며, 흉선세포와 장간막 임파절 세포에서도 대조군(생리식염수 투여군 + Con A(0.5 μ g/ml)처리)을 100%로 하였을 때 YGS첨가군에서 각각 110.3 \pm 3.6% 및 124.1 \pm 4.7%로 흉선세포 및 장간막 임파절세포의 증식 유의성있게 촉진시켰다(Table 2). 이는 YGS가 특히 비장, 흉선 및 장간막 임파절 등의 주요 면역장기를 구성하는 면역세포의 증식을 촉진하여 면역력을 증강시키는 효과를 가지고 있음을 시사한다.

Table 2. Effect of lymphocyte proliferation on the YGS-administered mouse splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells in vivo.

Cells	Splenocytes(%)	Thymocytes(%)	mesenteric lymph node cells (%)
	LPS(+)	Con A(+)	Con A(+)
Treatment			
CONTROL	100.0 \pm 2.7	100.0 \pm 1.2	100.0 \pm 1.9
YGS	117.5 \pm 4.9*	110.3 \pm 3.6*	124.1 \pm 4.7*

YGS(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter the each cells were collected, and splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells incubated for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *: Significantly different from normal saline-treated control group(*p<0.05).

2. YGS가 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 아군(subpopulation)에 미치는 효과

YGS를 투여(p.o.)한 생쥐의 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 아군변화를 살펴보면, 비장세포는 대조군에서 B, T세포가 각각 43.9 \pm 1.3% 및 25.9 \pm 2.5%이고 YGS투여군에서 각각 49.6 \pm 1.9% 및 34.1 \pm 2.7%로 B 및 T세포의 수가 증가하였으며, 비장내 T세포 중 대조군에서의 TH세포가 16.9 \pm 1.5%, Tc세포는 8.3 \pm 0.7%이고 YGS처리군은 각각 23.8 \pm 1.9% 및 11.3 \pm 0.6%로 TH세포 및 TC세포가 유의성있게 증가하였다. 흉선세포는 대조군에서 TH세포가 14.5 \pm 1.3%, Tc세포는 5.7 \pm 0.4%인데 비하여 YGS투여군은 각각 17.8 \pm 1.1% 및 5.6 \pm 0.5%로 TH세포가 증가하였다. 또한 장간막 임파절은 대조군에서 B세포가 23.4 \pm 1.5%, T세포가 41.2 \pm 2.1%인데 비하여 YGS처리군은 각각 24.9 \pm 1.9% 및 48.7 \pm 2.7%로 T세포가 증가하였다(Table 3). 이상의 결과에서 YGS은 주요 면역장기인 비장, 흉선 및 장간막 임파절 내의 B 및 T세포를 증가시켰으며 특히 비장에서는 T세포 아군분석 결과 TH 및 TC세포의 population이 모두 증가되었고, 흉선 내 T세포 중에서

는 TH세포가 증가되었으며 장간막 임파절에서도 특히 T임파구를 증가시켜 생체 면역능을 증강시키는 것으로 추정된다.

Table 3. Lymphocyte subpopulation change of splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells in YGS-administered mice.

Treatment	Splenocytes(%)			
	B cell	T cell		
		TH	TC/TS	
CONTROL	43.9±1.3	16.9±1.5	25.9±2.5	8.3±0.7
YGS	49.6±1.9*	23.8±1.9*	34.1±2.7*	11.3±0.6*

Treatment	Thymocytes(%)		mesenteric lymph node cells(%)	
	TH	TC/TS	B cell	T cell
CONTROL	14.5±1.3	5.7±0.4	23.4±1.5	41.2±2.1
YGS	17.8±1.1*	5.6±0.5	24.9±1.9	48.7±2.7*

YGS(500 mg/kg body weight) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter each cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. Each data represents the mean±SE of 5 mice. *: Significantly different from control group(*p<0.05).

3. YGS가 복강 대식세포의 탐식능에 미치는 효과

생쥐에 YGS(500 mg/kg)를 7 일간 투여하여 lucigenin chemiluminescence 측정법을 이용하여 복강 삼출세포를 수집한 다음, 복강 대식세포의 탐식능을 살펴본 결과(Fig. 1), zymosan만 처리한 대조군에 비하여 YGS 투여군에서 복강 대식세포의 탐식력이 증가하였는데 이러한 결과는 YGS가 체내 조직으로 유입해 들어온 항원물질을 제거하는 탐식작용을 보유하는 대식세포의 활성을 촉진하고 있다고 추정된다.

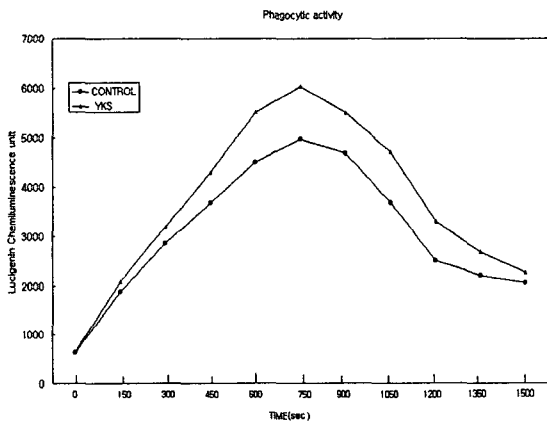


Fig. 1. Phagocytic activity of peritoneal macrophage in YGS-administered mice. YGS(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the peritoneal macrophages were collected and cultured in RPMI1640 media mixed with opsonized zymosan. lucigenin chemiluminescence was measured 5 min. intervals for 60 minutes. The data represents the mean of 3 experiments.

4. YGS가 복강대식세포에서의 nitric oxide(NO)생성에 미치는 효과

생쥐의 복강 대식세포를 수집해서 LPS와 γ -interferon을 첨가, 배양하면서 YGS(1, 10 및 100 μ g/ml)를 가하여 대식세포가 생성하는 nitric oxide(NO)양을 살펴본 결과(Fig. 2), 대조군(LPS와

γ -interferon만 첨가)에 비하여 특히 100 μ g/ml의 YGS 첨가에 의해 NO생성이 증가하였다. NO생성이 촉진된 결과는 NO가 생체 내에서 암세포를 상해시키는 면역계의 effector로써 역할을 하고 있음이 추정된다 .

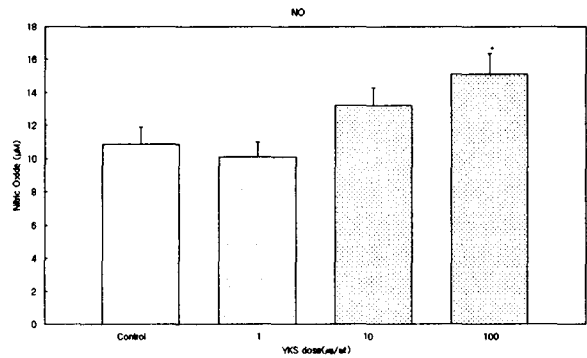


Fig. 2 Effect of YGS on the nitric oxide production from peritoneal macrophage. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI1640 media with LPS(1 μ g/ml) and γ -IFN(25 units/ml). Cells were cultured with YGS(1-100 μ g/ml) in a 5% CO2 incubator at 37°C for 24 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate ELISA reader. Nitric oxide standard curve were measured with NaNO2. Each bar represents the mean±SE of 3 experiments. LPS: lipopolysaccharide, γ -IFN: γ -interferon. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

5. YGS가 이식된 L1210세포의 apoptosis에 미치는 효과(in vivo)

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포를 생쥐의 복강에 이식하고 YGS를 7 일간 경구 투여한 다음 복강에 이식된 L1210세포를 수집하여 sub-G1 peak를 측정 한 결과, 대조군은 13.5±1.5%인데 비해 YGS를 투여한 군에서는 39.7±3.4%로 복강에 이식한 L1210세포의 apoptosis가 촉진되었다(Fig 3).

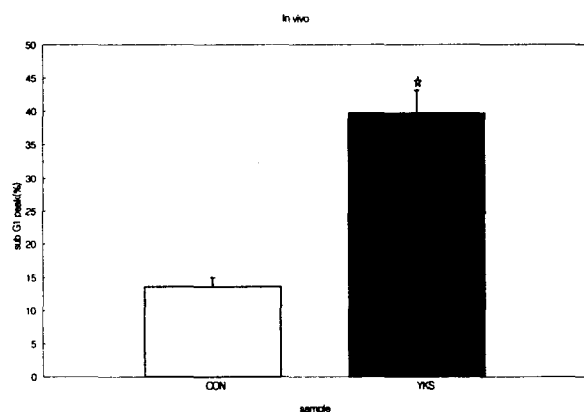


Fig. 3. Effect of YGS on the apoptosis of transplanted-L1210 leukemia cells. L1210 leukemia cells transplanted to peritoneal cavity of BALB/c mouse. YGS(500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. Transplanted-L1210 cells were collected from peritoneal cavity and sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. *: Significantly different from control group(*p<0.05).

6. YGS가 배양시킨 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 효과(in vitro)

L1210세포 배양계에 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 YGS를 첨가해서 24시간 동안 배양한 결과, 대조군에서 $14.7 \pm 1.1\%$ 인데 비하여 각 농도의 YGS첨가군에서 각각 24.1 ± 2.2 , 33.1 ± 2.7 및 $43.9 \pm 3.1\%$ 로서 L1210세포의 apoptotic cell death가 농도의존적으로 촉진되었으며 또한 사람의 백혈병세포주인 Molt4 세포에서도 24시간 배양한 결과, 대조군에서 $15.8 \pm 1.4\%$ 에 비하여 각각의 농도의 YGS첨가에 의해 각각 21.7 ± 2.0 , 29.5 ± 2.3 및 $37.4 \pm 2.9\%$ 로 YGS 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 apoptosis가 촉진되었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effect of YGS on the apoptosis of cultured-L1210 and Molt4 leukemia cells.

Treatment($\mu\text{g/ml}$)	Apoptotic cell death(%)	
	L1210 cells	Molt4 cells
CONTROL	14.7 ± 1.1	15.8 ± 1.4
YGS(1)	$24.1 \pm 2.2^*$	21.7 ± 2.0
YGS(10)	$33.1 \pm 2.7^*$	$29.5 \pm 2.3^*$
YGS(100)	$43.9 \pm 3.1^{**}$	$37.4 \pm 2.9^{**}$

YGS(1-100 $\mu\text{g/ml}$) was treated with cultured L1210 or Molt4 cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean \pm SE of 5 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01).

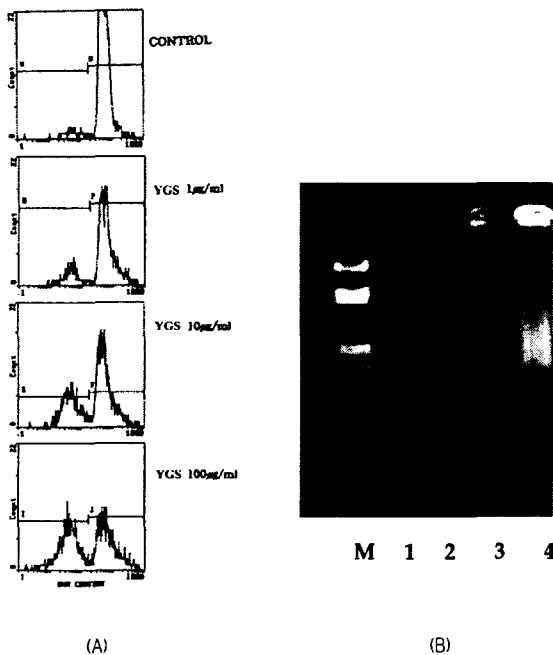


Fig. 4. Effect of YGS on the sub-G1 peak and DNA fragmentation of cultured-L1210 leukemia cells. YGS(1-100 $\mu\text{g/ml}$) was treated with cultured L1210 leukemia cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and (A) sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. (B)Agarose gel electrophoresis pattern of fragmented-DNA from L1210 cells cultured for 24hours with YGS (M: molecular marker, 1: none, 2: 1 $\mu\text{g/ml}$, 3: 10 $\mu\text{g/ml}$, 4: 100 $\mu\text{g/ml}$)

7. YGS가 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)에 미치는 효과

細胞死의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있으며 ATP가 제거되고 난 이후에 mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단

계에서 mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)의 감소가 선행되어 일어난다는 보고²⁹⁾를 확인하기 위하여 L1210세포 및 Molt4세포배양계에 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 YGS를 첨가해서 배양한 L1210세포 및 Molt4세포의 apoptosis유도시 $\Delta\Psi\text{m}$ 의 변화를 검토한 결과 대조군에 비하여 각 농도의 YGS 첨가군에서 농도의존적으로 $\Delta\Psi\text{m}$ 가 유의하게 감소하는 것을 관찰하였다(Table 5). 이 결과는 YGS가 백혈병세포의 apoptosis를 확실하게 유도하고 있음을 확인시키는 결과이다.

Table 5. Effect of YGS on the mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$) of cultured-L1210 and Molt4 leukemia cells

Treatment($\mu\text{g/ml}$)	Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi\text{m}$)	
	L1210 cells	Molt4 cells
CONTROL	86.5 ± 6.2	84.1 ± 5.2
YGS(1)	74.0 ± 5.3	80.4 ± 4.7
YGS(10)	$68.2 \pm 4.8^*$	$73.2 \pm 5.1^*$
YGS(100)	$59.9 \pm 4.5^{**}$	$67.6 \pm 3.8^{**}$

YGS(1-100 $\mu\text{g/ml}$) was treated with cultured L1210 or Molt4 leukemia cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and the $\Delta\Psi\text{m}$ was measured by a laser flow cytometer staining with DiOC6 (40nM). The data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01)

고찰

면역의 주된 기능으로는 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데 첫째, 방어기능은 외부로부터의 면역자극에 대한 반응을 나타내는 기능으로, 미생물의 자극에 대한 방어기능이 비정상적으로 과도하게 나타나면 알레르기 반응을 보이고, 반대로 비정상적으로 낮게 나타나는 경우에는 건강인에게는 전혀 문제가 되지 않는 미생물에 대해서도 감염되는 소위 "기회감염"을 일으키게 된다. 둘째, 항상성 유지기능이란 생체의 내부환경을 항상 평형상태로 유지시켜주는 기능으로, 어떤 면역자극에 의해 이 기능이 지나치게 커지게 되면 면역계 교역의 기능인 "자기"와 "비자기"를 판별할 능력을 잃게 되어 소위 "자기면역질환"을 일으키게 된다. 셋째, 감독기능이란 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이를 일으킨 세포를 제거하도록 하는 기능으로서, 감독기능이 제대로 되지 못할 경우에는 변이된 세포를 제거하지 못하는 결과를 초래하여 악성종양을 일으킬 수 있다⁷⁾. 면역세포의 주역인 T임파구 중 CD4⁺세포인 TH세포는 비자기를 인식해서 그 정보를 B임파구에 전달하고, 그 미생물에 대하여 특이한 항체를 혈청 속에 만들어 내도록 촉진하는 중요한 기능을 가지고 있다. 그 항체를 만들어 내는 수순이 면역계에 기억되어, 동일한 미생물이 다시 침입해 들어오는 경우에는 이 항체가 동원되어 그 미생물을 효과적으로 재빨리 처리하는 면역체계를 체액성 면역이라 한다⁶⁾. 본 연구에서 면역에 대한 실험으로는 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 증식반응, 임파구 아군측정, 백혈병세포의 apoptosis유도, 대식세포의 탐식활성 및 nitric oxide생성능 등을 관찰하였는데, 龍角散은 주요 면역장기인 비장, 흉선 및 장간막 임파절의 임파구의 증식을 촉진시켰으며 또한 비장, 흉선 및 장간막 임파절세포의 아군을 분석한 결과, 비장의 B 및 T임파구의 population을 증가시켰고, T세포 중 특히 TH세포 및 TC세포를 증가시켜 면역력을 조절하는 것으로 사료된다. 아울러

흥선 중 TH세포, 임파절 내의 T세포를 증가시키는 작용이 관찰되었다. 또한 대식세포의 활성을 lucigenin chemiluminescence로 측정하였는데 龍角散은 대식세포의 탐식작용을 촉진시키는 활성을 보유하는 것으로 나타났으며, 이러한 대식세포의 기능항진은 T, B림파구의 활성화에도 영향을 준다. Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 vasodilating agent, neuro-transmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 면역반응을 하는 효능물질로 잘 알려져 있으며, 특히 생쥐에서는 대식세포와 호중구 등의 탐식작용을 하는 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며, T림파구에서 분비하는 cytokine을 조절하는 인자로도 알려져 있는데 龍角散은 복강 대식세포에서 생성하는 nitric oxide의 생성을 증가시켰다. 이상의 결과로 보아 龍角散은 주요 면역세포의 활성을 항진시키는 면역조절능력이 있는 것으로 추정된다. 한편, apoptosis 이전에 異常이 발생하면 암이나, 자가면역질환, 퇴행성 질환 및 AIDS 등의 질환을 초래한다고 알려져 있으며 특히 각종 항암요법제들은 이러한 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾¹⁶⁾. 본 실험 결과에서도 龍角散이 생쥐의 복강 내에 이식한 L1210세포의 apoptotic cell death를 유도하는 작용이 관찰되었으며 세포배양계에서 검토한 결과, 생쥐 백혈병세포주인 L1210세포와 사람 백혈병세포주인 Molt4세포의 apoptosis의 유도를 촉진하는 작용이 확인되었다. 이러한 결과는 龍角散이 백혈병세포의 apoptosis를 촉진하여 anti-carcinogenic 작용이 있음을 나타낸다. 이는 백혈병환자의 화학요법 시행시 용각산을 병용요법으로 투여할 수 있음을 의미하는데 용각산은 면역력을 조절하면서 그 자체로서도 암세포의 대한 살상능력이 있음이 관찰되어 추후 항암병용 요법제로서의 가능성을 구체적으로 살펴볼 필요가 있다고 생각된다.

결 론

龍角散(YGS)을 생쥐 및 흰쥐에 투여하고 각종 면역반응, 백혈병세포의 아폽토시스에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다. YGS는 in vivo 실험에서 비장, 흥선 및 장간막 임파절세포의 증식을 촉진시켰으며, 아군분석결과, 비장의 B 및 T세포를 유의하게 증가시켰고 T세포 중 CD4⁺인 TH세포와 CD8⁺ 세포인 Tc/Ts 세포가 모두 증가하였으며, 흥선에서는 TH세포가 유의하게 증가하였고 장간막 임파절에서도 T세포가 증가하였다. YGS는 복강 대식세포의 탐식작용을 촉진시켰으며, 대식세포에서의 nitric oxide의 생성을 증가시켰다. 또한 백혈병세포주인 L1210세포와 Molt4세포의 아폽토시스를 촉진시키는 항암작용을 보유하고 있었다.

감사의 글

본 논문은 우석대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음

참고문헌

1. 대한동의생리학회·대한동의병리학회; 동의생리병리학회지 15권 5호 p739, 2001.
2. 上海中醫學院, 中醫學基礎, 商務印書館香港分館, 香港, p109, 1975.
3. 楊維傑: 黃帝內經素問解釋, 서울, 成輔社, p3, 266, 1980.
4. 成肇智, 中醫病機論, 中國醫藥科機出版社, 北京, p13-137, 1997.
5. 광동중의학원: 중의방약학, 중국, 광동인민출판사, P7, 1973.
6. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Poper, J.S.: Cellular and molecular immunology. 2: 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A 1994.
7. 太宗命, 太平聖惠方, 翰成社, p864, 1978.
8. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65: 55-63, 1983.
9. Shortman, K. and Backson, H.: The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. Cell. Immunol., 12: 230-246, 1974
10. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112: 163 1988.
11. Kondo, Y, and Takano, F., Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with glycyrrhizin. Biol. Pharm. Bull., 17(5), 759-761, 1994.
12. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, 139: 271-279, 1991.
13. Telford, W.G., King, L. E. and Fraker, P.J.: Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. Cell Prolif., 24: 447-459 1991.
14. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L. Petit, P.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.
15. Nagata, S.: Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355-365, 1997.
16. D'Amico, A.V. and McKenna, W.G.: Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. Radiotherapy & Oncology 33(1): 3-10, 1994.