

방사선이 조사된 오갈피 나무의 추출물이 생쥐의 복강암 및 면역세포에 미치는 영향

김형우 · 조수인 · 김계엽¹ · 전병관² · 조영림³ · 정현우^{3*}

동신대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 물리치료학과, 2: 환경공학과, 3: 한의과대학 병리학교실

Effects of Extracts from *Acanthopanax sessiliflorus* SEEM Following Gamma-ray Irradiation on Solid Tumor and Immune Cells in Mice

Hyung Woo Kim, Su In Cho, Gye Yeop Kim¹, Byung Gwan Jeon², Young Lim Cho³, Hyun Woo Jeong^{3*}

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, 1: Department of Physical Therapy,

2: Department of Environmental Engineering, 3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Acanthopanax sessiliflorus SEEM extracts(AS) have been used to treat patient with diseases including cancer in Oriental countries. Recently, AS was known to have anti-cancer and immuno-stimulating activities. For these reasons, we investigated the effects of AS following gamma-ray irradiation on cytotoxicity for solid tumor cell line (S-180) and immuno-potentiating ability such as proliferation of thymocytes and splenocytes. Finally we also investigated tumor weight and survival rate in tumor bearing mice. In our results, Treatment with AS suppressed proliferation of solid tumor cells (S-180) effectively. Treatment with AS accelerated thymocyte and splenocyte proliferation in tumor bearing mice. In addition, Treatment with AS reduced tumor weight and prolonged life of tumor bearing mice. In conclusion, we demonstrate that AS following gamma-ray irradiation is useful to treat patients with cancer, and also demonstrate that AS have both direct cytotoxic ability for cancer cells and indirect immuno-stimulating action for thymocytes and splenocytes.

Key words : *Acanthopanax sessiliflorus*, immuno-stimulating, anti-Cancer, gamma-ray irradiation

서 론

최근 들어 항암 치료에 대한 새로운 견해들이 대두 되면서 고전적인 양약(western drug)의 발전 뿐 만 아니라 식이요법을 포함한 자연 요법들이 새롭게 조명 받고 있다. 고전적인 항암 치료는 암세포의 성장 및 전이를 직접적으로 억제 것과 인체 면역계, 특히 Th1 관련 반응(Th1 skewing reaction)을 항진 시켜 궁극적으로 암세포를 제거하는 두 가지 방법으로 대별된다. 이 중, 더욱 각광받고 있는 분야는 단연 후자로 면역 기능의 증진을 통하여 암세포를 제거하는 방법은 훨씬 더 효율적이고 넓은 적용범위를 가진다. 면역 기능의 증진을 위하여 최근 서방의 국가들은 보완, 대체 요법(CAM, Complementary and Alternative Medicine)에 특별한 관심을 기울이고 있으며, 특히 전통 의학(TM,

Traditional Medicine)에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁾.

오갈피 나무는 두릅나무과에 속한 낙엽 관목으로 한의학에서는 오갈피 나무의 근피를 건조한 것을 오가피(五加皮, *Acanthopanax sessiliflorus*)라 하여 사용하고 있으며, 그 효능이 거풍습(祛風濕), 강근골(強筋骨) 보간신(補肝腎)하여 관절염, 근골무력, 위약 등에, 화습소종(化濕消腫)하여 수종 및 소변불리 등에 활용되어 왔다^{2,3)}.

1967년, 뿌리에서 라이간드(lignan)계 배당체의 분리와 adaptogen으로서의 면역활성 및 성분 물질로 인삼이 지니는 adaptogenic activity를 증가한다는 사실이 알려진 이후⁴⁾ 생리활성 물질을 검증하려는 노력이 계속되어 왔으며⁵⁾, 최근에는 오가피에는 acanthosides, eleutherosides, senticoside, triterpenic saponin, flavone, vitamins 및 minerals 등의 유효 물질이 함유되어 있다고 보고되었다⁶⁾. 오가피의 효능 연구로는 면역 및 항암작용, 항스트레스 작용, 항당뇨 효과, 항방사능, 항바이러스 작용 및 류마티드 관절염에 대한 각종 보고가 발표되었다⁷⁻¹¹⁾.

본 연구자들은 이러한 오가피에 방사선을 조사하여 마우스

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 대호동 252, 동신대학교 한의과대학

· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2007/04/13 · 채택 : 2007/05/31

의 면역 활성화에 미치는 영향을 조사한 바 있다¹²⁾. 상기한 연구에 이어, 본 저자들은 오갈피 나무의 수피에 전자빔 10 kGy와 100 kGy를 조사한 다음 추출한 추출물이 생쥐의 복강암(Solid tumor)과 면역 세포에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주 및 배양환경

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 복강암 세포주인 Sarcoma-180세포를 사용하였다. Sarcoma-180 세포주와 면역세포(흉선세포, 비장세포)는 RPMI 1640 (Sigma R4130) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco, LOT# 1006842)과 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하여 사용하였다. 세포주와 면역세포는 37°C, 5% CO₂ 환경하에 유지 하였다.

2) 동물

면역 세포 분리를 위하여 (주) 다물 사이언스에서 구입한 balb/c계 8 주령된 수컷 생쥐를 사용하였고, 복강 고형암 이식에는 화인 실험 동물 센터에서 구입한 ICR계 20±1 g의 수컷 생쥐를 이용하였다. 사육 조건은 온도 20±3°C, 습도 55±5%, light/dark 12 hr하에서 1 주일 이상 적응시키면서 고형 pellet 사료와 물을 자유로이 섭취케하였다.

3) 시료

연구에 사용된 오갈피 나무²⁾(*Acanthopanax sessiliflorus* SEEM)는 동신대학교 묘목장에서 재배되는 것을 사용하였다. 오갈피 나무 줄기 200 g을 2 차 파쇄한 후 10 kGy의 전자빔을 조사한 10AS (*Acanthopanax sessiliflorus* SEEM), 오갈피 나무 줄기 200 g을 2 차 파쇄한 후 100 kGy의 전자빔을 조사한 100 AS를 준비하여 100°C 증류수로 추출한 다음 여과지로 여과한 후 5,000 rpm으로 30 분 원심 분리시켜 상청액을 취하였다. 그 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에 넣어 감압 농축한 검액을 얻었다.

2. 방법

1) S-180 복강암 세포주의 증식률 측정

96-well plate에 1.0×10⁴cells/well 의 농도로 세포주를 분주한 다음, 1 mg/ml, 10 mg/ml 100 mg/ml 농도로 약물을 투여하고, 37°C의 5% CO₂환경에서 48시간 동안 방치한 다음 MTT 법으로 증식율을 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

2) 고형암의 유발 및 실험군 선정

S-180 세포주를 ICR계 생쥐 1마리당 2×10⁶ 을 200 ml 의 PBS에 풀어준 다음, 복강에 1회 주사하여 고형암을 유발 하였다. 제 1 실험군(10 AS)은 10 kGy의 감사선을 조사한 오가피로부터 제조된 시료를 500 mg/kg의 분량으로 15일간 투여하였고, 제 2 실험군(100 AS)은 100 kGy의 감사선을 조사한 오가피로부터 제조된 시료를 500 mg/kg의 분량으로 15일간 투여하였다. 실험 대

조군(Control)은 같은 부피의 증류수를 15일간 투여하였다. 면역 세포의 증식률 측정을 위하여 S-180 세포주를 balb/c계 생쥐 1마리당 2×10⁶ 을 복강 주사하고, 10 AS와 100 AS를 500 mg/kg의 분량으로 7일간 투여하고 8일 째에 면역세포를 분리하였다.

3) 면역세포 분리 및 증식률 측정

상기 방법과 같이 실험군을 분류한 후 연구가 종료된 다음 마우스의 흉선 및 비장 세포의 분리를 Wysocki¹³⁾ 및 Mizel¹⁴⁾ 등의 방법에 의하여 실시하였다. 분리된 흉선 및 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10⁶ cells/ml 농도로 접종한 다음 흉선 세포에는 concanavalin A (Con A) 5 µg/ml와, 비장 세포에는 LPS 5 µg/ml를 첨가한 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 MTT 법으로 흉선 및 비장세포의 증식율을 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

4) 고형암의 무게 및 체중 측정

15일간의 약물 투여가 끝난 후, 16일 째에 생쥐를 경추 탈구로 희생시킨 후, 고형암을 적출하였다. 고형암과 체중은 전자저울을 이용하여 측정하였으며, 각각의 생쥐에 대하여 체중에 대한 고형암의 무게 비율로 나타내었다.

5) 생존율 관찰

생존율 측정을 위하여 10 AS와 100 AS를 500 mg/kg의 분량으로 15일동안 투여 후, 날짜별로 사망하는 생쥐의 수를 확인하였다. 통계적 유의성은 Median survival time 을 계산하여 확인하였다. Median survival time의 계산 공식은 아래와 같다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

X : 생존수가 전체동물수의 1/2 이 되는 최초의 시간(일)
Y : 생존수가 전체동물수의 1/2 에서 1 일 째 최초의 시간(일)
단, 전체동물의 수가 홀수인 경우는 Median survival time은 X/2가 된다.

3. 통계처리

대조군과 실험군간의 통계적 차이는 ANOVA test를 SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 시행하였으며, p-value값이 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다.

결 과

1. S-180 복강암 세포주의 증식률에 미치는 영향

10 AS와 100 AS가 S-180 복강암 세포주의 증식률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각각의 약제를 농도별로 S-180 복강암 세포주에 처리하고 증식률을 관찰하였다. 실험 결과를 살펴보면, 10 AS, 100 AS 두 종류의 시료에서 모두 농도에 관계없이 S-180 복강암 세포주의 증식률을 감소시켰다. 대조군의 Cytotoxicity를 100%로 하였을 때, 10 AS와 100 AS 모두 80% 대의 증식률을 보였고, 특히 100 AS군에서는 농도에 비례하여 더 강한 효과를 보였다. 100 AS를 100 µg/ml의 농도로 투여한 결과 81.5%의 증식률을 보였다(Fig. 1)

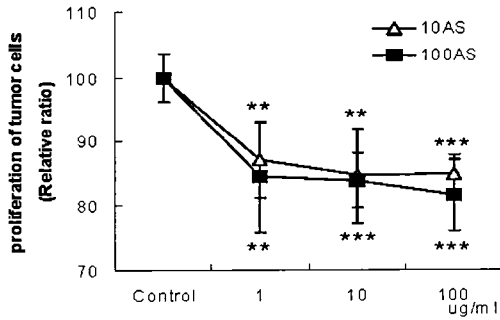


Fig. 1. Effects of AS on proliferation of tumor cells *in vitro*. S-180 Cells were attached 96-well plate, and added 10 AS, 100 AS as indicated concentrations respectively. After 48 hr incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. Values are expressed as percentage of control. Result are presented as mean \pm SEM. ** P < 0.01, and *** P < 0.001 vs. Control. (n=6)

2. 암유발 생쥐에서 면역세포의 증식률에 미치는 영향

재료 및 방법에서 논술 한 대로 암증을 유발하고 약물의 투여를 마친 다음, 흉선 세포 및 비장세포를 분리하여 증식률을 측정하였다. 대조군의 Cytotoxicity를 100%로 하였을 때, 흉선 세포와 비장 세포 모두가 10 AS, 100 AS 두 가지 시료 모두에 의해 증식률이 증가되었다. 100 AS는 흉선세포의 증식률을 효과적으로 증가시키는데 반해, 10 AS는 흉선세포의 증식을 약간 증가시키는 듯한 결과를 보였지만, 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2A).

비장세포는 10 AS, 100 AS 두 시료 모두에 의하여 통계적으로 유의한 증식률의 증가를 보였다(Fig. 2B). 또 다른 이전의 실험을 통하여, 암증을 유발하지 않은 정상 생쥐에서도 10 AS, 100 AS 모두 흉선세포와 비장세포의 증식률을 증가시키는 효과가 있음을 확인한 바가 있다(data not shown).

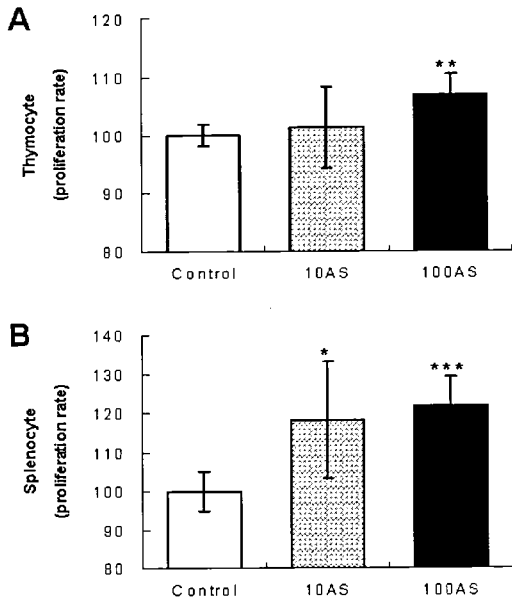


Fig. 2. Effects of AS on proliferation of immune cells *in vivo*. Primary cells were isolated from tumor bearing mice on day 8. Proliferation rates were measured using MTT methods. Control: D/W treated group, 10 AS: 500 mg/kg of 10 AS treated group, 100 AS: 500 mg/kg of 100AS treated group. Values are expressed as percentage of control. Result are presented as mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001 vs. Control. (n=6)

3. 암유발 생쥐의 체중 및 고형암 무게에 미치는 영향

S-180을 복강 주사하여 암을 유발하고, 15일간의 약물 투여를 마친 후, 16일 째에 생쥐로부터 체중과 고형암의 무게를 측정하였다. 100 AS를 투여한 군은 체중에 대한 고형암의 비율(w/w)이 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 그리고, 10 AS를 투여한 군에서는 체중에 대한 고형암의 비율(w/w)이 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3).

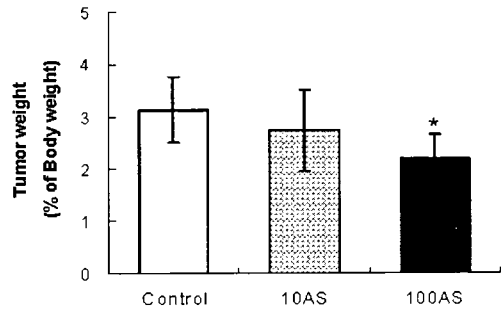


Fig. 3. Effects of AS on weight of solid tumor in tumor bearing mice. Tumor and Body weight were measured on day 16. Control: D/W treated group, 10 AS: 500 mg/kg of 10AS treated group, 100 AS: 500 mg/kg of 100AS treated group. Values are expressed as ratio between tumor and body weight (w/w). Results are presented as mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. Control. (n=6)

4. 암유발 생쥐의 생존률에 미치는 영향

S-180을 복강 주사하여 암을 유발하고, 15일간의 약물 투여를 마친 후, 16일 째부터 30일까지 사망 개체수를 관찰하였다. 결과를 살펴보면, 10 AS, 100 AS 모두에서 통계적으로 유의한 생존기간의 연장을 보였다. Median survival time을 보면, 대조군은 9.5일인데 반해 10 AS 군과 100 AS군은 각각 23.5일, 24.5일이었다. 각 군의 평균 생존 기간은 대조군 21.4일, 10 AS군은 25.0일 100 AS군은 25.6일이었다(Fig. 4).

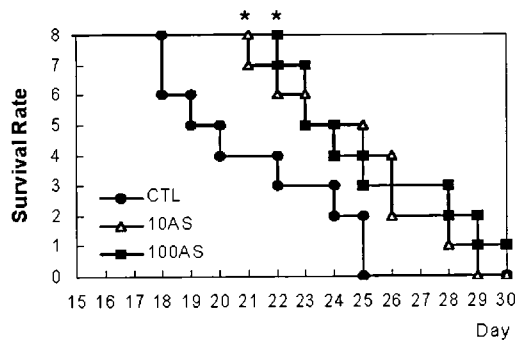


Fig. 4. Effects of AS on survival rate in tumor bearing mice. After 15 day treatment, Survival rate was observed for 15 days. Control: D/W treated group, 10 AS: 500 mg/kg of 10 AS treated group, 100 AS: 500 mg/kg of 100AS treated group. Values are expressed as number of live animal. P value was calculated with survival days of each mice in tree different groups. * P < 0.05 vs. Control. (n=6)

고찰

세계적으로 전통의약에 대한 관심이 높아지는 가운데, 우리나라에서도 웰빙 바람이 불면서 건강에 대한 관심이 대폭 증가

하고 있다. 이러한 기류에 편승하여 한국의 생명과학계도 한약·생약 관련 물질의 기능을 재조명하기 위한 연구가 대대적으로 진행되고 있다. 이러한 기류에 편승하여 오가피에 대한 다양한 연구 결과들이 발표되고 있다. 최근의 연구에서 오가피 열 추출물은 T 세포와 B 세포를 포함한 면역 기능에 영향을 미침이 밝혀졌다¹⁵⁾. 또한, 오가피 추출물에서 강력한 NO 생성 능력을 보이는 폴리머가 분리 동정되었다¹⁶⁾. 면역 세포들 중 NK 세포와 대식세포를 강력하게 흥분시켜 폐암에 보조제로 사용할 수 있다는 발표가 있었는데¹⁷⁾, 최근 이러한 기전이 오가피에서 추출한 당지질들에 의해서 이루어질 가능성 높음을 시사하는 증거도 발표되었다¹⁸⁾.

본 논문의 결과에서 오가피에 감마선을 조사한 후, 추출한 추출물은 직접적으로 암세포의 증식을 억제하는 결과를 보였고, 암증을 접종한 생쥐에서 흥선세포와 비장세포 같은 면역세포의 증식을 증가시키는 결과를 보였다. 이러한 기전들을 통하여 오가피 추출물은 궁극적으로 생쥐에서 암증의 크기를 줄이고, 생존 기간을 연장 시키는 결과를 얻었다.

본 저자들의 이전 논문들의 결과와 본 논문의 결과를 종합하여 보면, 오가피 추출물은 고형암 세포, 뿐만 아니라 백혈암(L1210) 세포의 증식을 감소시키는 작용도 있는 것으로 보이며, 정상 생쥐와 암을 유발한 생쥐 모두에서 흥선세포와 비장세포의 증식을 증가시키고, 복강에서 분리한 대식세포로부터 NO 생성량을 증가시키는 등 면역 기능의 향진에 관여하는 것으로 보여진다. 이러한 결과는 현대 항암치료의 두 가지 축인, 직접적 암세포 살해와 인체의 면역체계 향진을 통한 간접적 항암치료의 기전을 모두 가지고 있는 것으로 해석될 수 있다.

본 논문의 결과에서 흥선 세포 보다도 오히려 비장세포의 증식이 더욱 현저하게 증가하였다. 비장세포는 대부분 B 세포로 이루어져 있으므로 비장세포의 증식은 체액성 면역 기능의 판단 지표라고도 할 수 있다. 이러한 결과는 전반적인 면역기능 증가라는 면에서 긍정적으로도 해석 가능하지만, 인체의 면역 반응은 Th1 또는 Th2 한쪽으로 기울어 특성이 있고, 또한 Th2 면역 반응의 향진은 알레르기나 자가면역 질환을 더욱 부추길 수 있는 가능성이 있다¹⁹⁾는 면에서 더욱더 많은 연구와 고찰이 필요하다고 생각된다.

결론적으로 본 논문의 저자들은 오가피에 감마선을 조사하여 얻은 추출물이 직접적으로 고형암의 증식을 억제하고, 간접적으로 면역기능을 증진시킴을 보였고, 아울러 오가피의 항암제로서의 가능성을 천명하는 바이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 동신대학교산학협력단 부설 산업융합속기이용생물연구센터(RIC)로부터 연구비의 일부를 지원 받고 또한, 지역 혁신 인력 양성 사업의 연구 결과로 수행되었음.

참고문헌

1. Wen, M.C., Wei, C.H., Hu, Z.Q., Srivastava, K., Ko, J., Xi,

S.T. Efficacy and tolerability of anti-asthma herbal medicine intervention in adult patients with moderate-severe allergic asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 116: 517-524, 2005.

2. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 永林社, 서울, pp 283-284, 1999.

3. 康秉秀, 金永坂 共編著. 方劑의 體系的 構成을 위한 臨床配合 本草學. 永林社, 서울, pp 644-645, 1996.

4. Brekhman, I.L., Dardymov, I.V. "Nauka" Publishers Leningrad through 1st International Symposium of gerontology Lugano. *Lloydia* 32: 46, 1969.

5. 이인중, 김길웅. 약용식물(읍나무, 오가피)로부터 생리활성 물질 검정. *한국잡초학회* 7(3):289-299, 1987.

6. Davydov, M., Krikorian, A.D. *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol* 72: 345-393, 2000.

7. Park, M.S., Kim, Y.J., Park, H.K., Chang, Y.S., Lee, J.H. Using air temperature and sunshine duration data to select seed production site for *Eleutherococcus Senticosus* Max. *Korean J. Crop Sci.* 40: 444-450, 1995.

8. Park, H.K., Park, M.S., Kim, T.S., Kim, S., Choi, K.G., Park, K.H. Characteristic of embryo growth and dehiscence during the after-rip-ening period in *Eleutherococcus senticosus*. *Korean J. Crop Sci.* 42: 673-677, 1997.

9. Tkhor, L.F., Taranenko, G.A., Kozlov, Yu. P., Tr. Mok. *Obshchest 1 spyt Prir. Otd Biol* 16: 73-77, 1966, *Chem Abstr* 66: 779e, 1967.

10. 정종운, 이윤호, 강성길. 가시오가피 약침이 당뇨유발 억제 및 신장보호 활성에 미치는 영향. *대한침구학회지* 20(3):1-14, 2003.

11. 김호철, 이상인, 안덕균. Human Monocyte의 IL-8 생산억제에 미치는 류마티이드관절염 치료제로서의 오가피의 효과. *대한본초학회지* 10(1):49-59, 1995.

12. 김계엽, 김경윤, 정현우. 방사선 조사 마우스에서 오가피의 면역활성 효과. *동의생리병리학회지* 20(3):670-674, 2006.

13. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. "Planning" for lymphocytes ; A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(6):2844-2848, 1978.

14. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. Regulation of lymphocyte-activating factor (LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF. *J. Immunol. Methods* 122(6):2173-2179, 1979.

15. 임종순. 오가피(*Acanthopanax cortex*)추출물을 첨가한 발효 김치의 급여가 생쥐의 면역작용에 미치는 영향. *대전대학교 한의학 논문집* 12(1):1-9. 2004.

16. Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B.K., Song, C.H. Chemical characteristics and immuno-stimulating properties of biopolymers extracted from *Acanthopanax sessiliflorus*. *J. Biochem Mol Biol.* 39(1):84-90, 2006.

17. Huang, D.B., Ran, R.Z., Yu, Z.F. Effect of Acanthopanax senticosus injection on the activities of human tumor necrosis factor and natural killer cell in blood in the patients with lung cancer. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 30(8):621-624, 2005.
18. Ha, E.S., Hwang, S.H., Shin, K.S., Yu, K.W., Lee, K.H., Choi, J.S., Park, W.M., Yoon, T.J. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from Acanthopanax senticosus, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res*. 27(2):217-224, 2004.
19. Renauld, J.C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J. Clin Pathol*. 54(8):577-589, 2001.