

ANTIGENICITY TEST OF COPTIS RHIZOME AND CROTON TIGLIUM L. EXTRACTS(CP-2) IN GUINEA PIG AND RABBITS

Kyung-Sun Kang¹, Jae-Jin Cho¹, Bae-Hwan Kim¹, Hyung-Ook Kim¹,
Dong-Jin Shin¹, Yong-Soon Lee¹ and Yoon-Kyu Lim²

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
441-744, Suwon, Korea

²College of Agriculture, Cheju National University, Cheju, Korea

(Received June 12, 1992)

(Accepted June 23, 1992)

ABSTRACT: Antigenicity tests-ASA(Active Systemic Anaphylaxis), PSA(Passive Systemic Anaphylaxis), PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)- of CP-2(Green cross Co.) were performed according to the established regulations of National Institute of Safety Research.

The results were as follows.

1. No specific clinical signs related anaphylaxis were observed, therefore, it was considered that CP-2 had not antigenicity in guinea pigs and rabbits.
2. No blue spots were observed on the back of guinea pig in the PCA test; CP-2 related IgE was not produced.

Key Words: Antigenicity, CP-2

서 론

생약제인 *Coptis rhizome* 및 *Croton tiglium L.* 추출물인 CP-2가 *in vitro*에서 PO-GS5(난세포암주), SP 2/0(마우스 골수종), SNU-C3A(결장암), 3B(간암), SNU-1(위암), MCF7(유방암 세포주)에서 각각 현저한 암세포의 증식을 억제하는 것이 발견 되었다. 또한 *in vivo*에서 ddy mouse를 이용한 S-180육종, Ehrlich 종양에 대해 단독 투여시 종양증식 억제 작용 및 연명효과가 있었으며, BDF1 mouse를 이용한 흑색종과 DBA/2 mouse를 이용한 P3A 유방암 및 임파선 및 골수성 백혈병에서 단독 투여시 종양증식 억제 작용 및 연명효과를 발휘하였다(자료 제시안함). 따라서 본 시험은 이렇게 항암성이 뛰어난 CP-2가 항암제로 실제 임상에 사용하기에 앞서, 국립보건안전연구원 예규에 따라 비임상 실험의 일환으로 기니픽에서의 항원성을 알아 보기 위하여 본 시험을 수행 하였다.

재료 및 방법

시험물질

Coptis rhizome 을 정선하여 약전통척 분말도에 따라 조말로한 160 g과 *Croton tiglium L.*을 정선하여

접질을 벗긴 후 조말로한 다음 핵산으로 반복처리하여 실온에서 풍건시킨 가루 160 g을 혼합한 후 증류수를 가하여 100°에서 추출 농축한 다음 여과시킨다.

이 여과액을 고압처리한 다음 하루밤 방치시킨 후 원심여과한다. 원심여과액에 CHCl_3 을 넣고 3분간 진탕 추출하여 수층을 취한다. 수층에 다시 ether을 넣고 3분간 진탕 추출한 후 ether층을 버린다. 이 과정을 2회 반복한다. 수층을 취하여 잔존 ether을 완전히 제거한 다음 농축시킨다. 이 농축액을 탈크 및 membrane filter장치로 여과하여 추출액을 얻는다. 이 액을 멸균처리 후 동결건조시켜 CP-2 최종제품을 제조한후 냉암소에 보관하면서 시험에 사용하였다.

실험동물

순계 배양된 New Zealand White계 백색 토끼 암수 각각 6마리(3개월령, 체중 2.0-2.5 kg)와 England Hartley계 백색 기니픽 암수 각각 21마리 (3개월령, 체중 500-600g)를 가축위생 연구소 및 실험동물 연

별표 1) 기니픽의 시험군

시험계	군	성별	동물수	동물번호	감작투여	유발투여
ASA	I	M	6	ASAM1-6	BSA* 24 mg/kg	BSA* 24 mg/kg
		F	6	ASAF1-6	(sc)	(iv)
	II	M	6	ASAM7-12	CP-2 1 mg/kg	CP-2 1 mg/kg
		F	6	ASAF7-12	(sc)	(iv)
	III	M	6	ASAM7-12	CP-2 10 mg/kg	CP-2 1 mg/kg
		F	6	ASAF7-12	(sc)	(iv)
	IV	M	6	ASAM13-18	DDW 0.5 ml	DDW 0.2 ml
		F	6	ASAF13-18	(sc)	(iv)
PSA	I	M	1	PASM1	저용량 기니픽항혈청	CP-2 1 mg/kg
		F	1	PASF1	(0.2 ml, iv)	(iv)
	II	M	1	PASM1	고용량 기니픽항혈청	CP-2 1 mg/kg
		F	1	PASF1	(0.2 ml, iv)	(iv)
	III	M	1	PASM2	고용량 토끼항혈청	CP-2 1 mg/kg
		F	1	PASF2	(0.2 ml, iv)	(iv)
	IV	M	1	PASM2	저용량 토끼항혈청	CP-2 1 mg/kg
		F	1	PASF2	(0.2 ml, iv)	(iv)
PCA	I	M	1	PCAM1	저용량 토끼항혈청	CP-2 1 mg/kg + EB
		F	1	PCAF1	($\times 100$, 0.1 ml, ic)	(1 ml, iv)
	II	M	1	PCAM2	고용량 토끼항혈청	CP-2 1 mg/kg + EB
		F	1	PCAF2	($\times 100$, 0.1 ml, ic)	(1 ml, iv)
	III	M	1	PCAM3	저용량 기니픽항혈청	CP-2 1 mg/kg + EB
		F	1	PCAF3	($\times 100$, 0.1 ml, ic)	(1 ml, iv)
	IV	M	1	PCAM4	고용량 기니픽항혈청	CP-2 1 mg/kg + EB
		F	1	PCAF4	($\times 100$, 0.1 ml, ic)	(1 ml, iv)

BSA: Bovine serum albumin, EB: evans blue(10 mg/ml), sc: subcutaneous, iv: intravenous

별표 2) 토끼를 이용한 항혈청 생산군

군	성별	동물수	동물번호	투여량
I	M	1	R1	BSA 24 mg/kg, sc
II	M	1	R2	CP-2 1 mg/kg, sc
III	M	1	R3	CP-2, 10 mg/kg, sc
IV	M	1	R4	DDW 0.5 ml, sc

구소에서 분양받아 1주간 실험실 환경에 순환시킨 다음 실험에 사용하였다. 토끼용 스테인레스 케이지(명진기계 제작)에 기니피그는 3마리씩 토끼는 1마리씩 넣어 환경조건(온도, $23\pm 3^{\circ}\text{C}$; 상대습도, $60\pm 10\%$; 명암주기, 12시간)을 조절한 다음 음수와 사료(퓨리나사료, 양배추)를 자유급식 시켰다.

투여량 및 시험군의 구성:(별표 1. 및 별표2에 요약되어 있다.)

본 시험물질은 60 mg/1 ml/60 kg 근육주사가 사람에서의 최적임상용량으로 추정되고 있다. 기니피그와 토끼 모두에 임상용량을 기준으로하여 저용량은 임상용량인 1 mg/kg으로 하고 고용량은 임상용량의 10 배인 10 mg/kg으로 하여 투약하였다.

군 분리 및 동물식별은 기니피그와 토끼 모두 순화기간중에 건강하다고 판단된 동물을 체중측정을 하여 평균 체중에 가까운 개체들이 골고루 들어가도록 무작위법으로 군분리를 하였다. 동물개체식별은 피모색소 마킹법과 Tag 표시법으로 하였다.

시험물질의 투여

투여액의 조제 및 조제빈도는 CP-2 분말을 사람에서의 용법에 따라 주사용 증류수에 용해하여 조제 하였으며, 동물의 견갑간부 피하에 주사기를 이용하여 시험물질을 체중용량별로 투여하였다.

Active Systemic Anaphylaxis(ASA) 시험은 제1일과 제4일에 피하로 감작투여하고, 제14일과 제24일에 정맥내 주사로 유발투여 하였으며, Passive Systemic Anaphylaxis(PSA)시험은 기니피그와 토끼에서 생산된 항혈청을 정맥주사한 후 18시간 경과하였을 때 CP-2를 정맥내 주사하였다.

Passive Cutaneous Anaphylaxis 시험은 생리식염수로 100배 희석한 항혈청을 피내로 주사하고 3시간 후에 CP-2와 Evans blue 혼합액을 각각 이개정맥내로 주사하여 피하의 주사부위의 변화를 관찰 하였다(강과 이, 1991a).

관찰 및 검사항목

1) 일반상태 관찰:

가. ASA, PSA 시험시 임상관찰: 활동성, 진신떨림, Rubbing nose, 재채기, 기침, 배뇨, 호흡곤란, 도약 및 돌진, 비틀기, 경련, 사망등

나. PCA 시험시 투여부위의 관찰: 주사부위에서 관찰되는 청색반점의 생성여부를 관찰.

2) 체중측정: 동물입고시, 시험처치시.

3) 항혈청 생산: 기니피그 및 토끼를 이용하여 CP-2에 대한 항체를 생산하였다. 토끼에서는 임상용량 및 10배의 CP-2를 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)와 섞어 각각 피하주사한 후 10일후에 이개정맥에서 채혈하여 혈청을 얻고, 기니피그에서는 ASA 실험에서와 동일하게 면역한뒤 심장채혈하여 혈청을 얻었다.

4) 항체가 측정: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 법으로 측정하였다. 96 well microplate에 CP-2가 $10\ \mu\text{g}$ 되게 Carbonate buffer (pH 9.6)로 용해하여 흡착시킨후 감작된 동물들의 혈청을 1%의 Gelatin이 용해된 PBS-1로 계단희석하여 반응 시키고 나서 Horseradish Peroxidase (HRP)가 접합된 Protein G로 반응 시킨후 ABTS로 발색시켜 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

관찰자료의 해석 및 평가(강과 이, 1991b)

1) ASA, PSA: Anaphylaxis의 유무를 활동성, 진신떨림, rubbing nose, 재채기, 기침, 배뇨, 호흡곤란, 도약 및 돌진, 비틀기, 경련, 사망등으로 관찰하고 종합적으로 shock 정도에 따라 음성, 경중, 중등도, 중중, 사망등으로 판정하였다.

2) PCA: 주사부위에 관찰되는 청색반점의 생성여부를 관찰하여 청색반점이 관찰될때 Anaphylaxis와 관련이 있는 IgE가 생성되었던 것으로 판정하였다.

3) 항체가 측정: 각 혈청을 단계별로 희석하여 산출된 표준곡선의 종말점이 생리식염 Blank 값과 같아질 때의 희석배수를 항체가로 결정하였다.

Table 1. Symptoms of each groups of Guinea pig after first injection.

Symptoms	Group			
	I	II	III	IV
Restlessness	-	+	-	-
Trembling	-	-	-	-
Rubbing nose	-	-/+	-	-
Sneezing & Cough	-/+	-	-	-
Urination	-	-	-	-
Respiratory depress	-	+	-	-
Jumping & Rushing	-	-	-	-
Gasping & Writhing	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-
Death	-	-	-	-
Evaluation of the intensity	0	II	0	0

0; normal, I; mild, II; moderate, III; severe

Table 2. Symptoms of each groups of Guinea pig after second injection.

Symptoms	Group			
	I	II	III	IV
Restlessness	-	/+	-	-
Trembling	-	-	-	-
Rubbing nose	-	-/+	-	-
Sneezing & Cough	-/+	-	-	-
Urination	-	-	-	-
Respiratory depress	-	+	-	-
Jumping & Rushing	-	-	-	-
Gasping & Writhing	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-
Death	-	-	-	-
Evaluation of the intensity	0	I	0	0

0; normal, I; mild, II; moderate, III; severe

Table 3. Experimental results of PSA test

Group	Antiserum	Antigen	Results
I	Guinea pig anti CP-2	(1 mg/kg) CP-2 (1 mg/kg)	normal
II	Guinea pig anti CP-2	(10 mg/kg) "	normal
III	Rabbit anti CP-2	(1 mg/kg) "	normal
IV	Rabbit anti CP-2	(10 mg/kg) "	normal

결과 및 고찰

1) Active Systemic Anaphylaxis

각군의 기니픽을 2회 감작시키고 14일, 24일 2회에 걸쳐 정맥주사(marginal ear vein)로 유발투여를 한 결과는 Table 1, 2와 같다.

첫번째 정맥 주사에서는 Table 1에서와 같이 양성대조군인 BSA투여군이 보통의 anaphylatic shock를

Table 4. Experimental results of PSA test

Sensitization		PCA Reaction Positive/Recipients	Extravasated Dye
Anti CP-2 (1 mg/kg)	from Rabbit	0/2	0
Anti CP-2 (10 mg/kg)	from Rabbit	0/2	0
Anti CP-2 (1 mg/kg)	from Guinea pig	0/2	0
Anti CP-2 (10 mg/kg)	from Guinea pig	0/2	0

보였고, 암수 구분없이 group중 반수 정도가 불안상태와 기침 혹은 호흡곤란을 보였다. CP-2투여군에서는 14일째 및 24일째의 유발투여시 anaphylaxis라 할 수 있는 어떠한 임상에도 관찰되지 않았다.

2) Passive Systemic Anaphylaxis

토끼 및 기니픽에서 분리한 항혈청과 CP-2를 이용하여 검사한 결과는 Table 3와 같다.

3) Passive Cutaneous Anaphylaxis (Table 4)

ASA 시험중 실제 형성된 IgE량을 측정하기 위해 PCA시험을 하였다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사 하고 항원과 Evan's blue 혼합용액을 정맥주사한 결과는 Table 4와 같다.

어떠한 군에서도 색소 침착이 일어나지 않은 것으로 보아 CP-2 specific IgE가 형성되지 않았다고 생각되었다.

4) 항체가 측정

실험에 사용한 항혈청의 항체가를 측정한 결과는, 기니픽에서 CP-2에 대한 항체의 형성이 인정되지 않았고, 토끼에서의 항체가는 1:1280이상으로 매우 높았다.

참 고 문 헌

- 강경선, 이영순 (1991a): 기니픽과 토끼에서 소성장홀몬(BST)의 항원성에 관한 시험, *Kor. J. Food Hygiene*, **6**, 179-183.
- 강경선, 이영순 (1991b): 기니픽과 토끼에서 PDT-Hepa의 항원성 시험, *Environmental Mutagen & Carcinogenesis*, **11**, 141-147.
- 국립보건안전 연구원 예규, 독성시험에 관한 지침 (1988).