

인삼 추출물이 Cyclophosphamide에 의해 손상된
흰쥐 비장조직의 회복에 미치는 영향.

김진택* · 김동환* · 안상현* · 윤식**

The Effects of *Panax ginseng* on the Side Effects
of Cyclophosphamide to the Spleen in the Rat.

Jin-Taek Kim · Dong-Hoan Kim · Sang-Hyun Ann · Sik Yoon

* Department of Pathology, Oriental Medical College, Dongguk University

** Department of Anatomy, Medical College, Pusan National University

ABSTRACT

This study were performed for the effects of *Panax ginseng* on the side effect of Cyclophosphamide to splenic tissue in the Rats. The experimental animals were divided into control group, test group by the way of the method treatment of the drug.

Each group was sacrificed and stained in accordance with the schedule and observed under light microscope.

The results of this study were as follows :

1. After the ginseng extract administration rat's weight and volume were similarly increased than normal and control group.
2. The decrease of the numbers of the splenic tissue after treatment of cyclophosphamide(CP) were recovered with prescription of the ginseng extract; the decrease of white pulp, red pulp, marginal zone were recovered.
3. Increased macrophage in red pulp of splenic tissue with administration of CP were disappeared after treatment of ginseng extract.

* 동국대학교 한의과대학 해부학교실

** 부산대학교 의과대학 해부학교실

서 론

Cyclophosphamide(CP)는 신생물질환(neoplastic disease)의 치료뿐만 아니라 그 세포독성 및 면역억제 작용으로 인하여 immunologically mediated disease의 치료와 장기 이식(organ transplantation)의 거부반응 억제등에 널리 사용되고 있는 약물이다. 따라서 이약물은 신생물질환인 Hodgkin병, Burkitt 임파종, 소아의 급성림파아구성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 임성 백혈병, 폐암, 유방암, 자궁경부암 및, 난소종양, 신경아세포종, 망막아세포종의 치료와 유방암의 수술 후 보조요법 등에 널리 사용되고 있다^{1,2,3)}.

또한 이 약물의 면역억제 작용 때문에 장기이식 후 거부반응의 조절⁴⁾과 류머티스 관절염^{5,6)}등과 같은 altered immune activity로 인한 non-neoplastic disorder의 치료에도 사용되고 있다. 그러나 CP는 이러한 약리작용 외에 급성 독작용, 불임증, 기형발생, 돌연변이 등의 부작용이 보고되어 있다^{3,7)}.

이러한 부작용은 alkylating agent인 CP가 간에서 4-hydroxy-cyclo-phosphamide로 전환되며 이는 세포내에서 특히 임파구에서 phosphoramidate mustard와 acrolein으로 분해되어 DNA상해를 일으켜^{2,5,8)} 임파구의 파괴를 유발하게 되며 이는 면역성의 감소를 유발하게 되는 것이다. 그리고 임파구에 대해 인삼추출물이 비장의 무게, 백혈구의 수 감소를 억제시킨다는 보고가 있다¹¹⁾. 또한 saponin이 소량의 CP와 함께 항암효과를 촉진시킨다는 보고도 있다¹²⁾. 이러한 인삼의 효과는 CP와 같은 alkylating agent에 의해 상해를 입은 DNA의 회복에 관여하는 것으로 보고되고 있으며¹³⁾ 이와 같은 항암제제의 부작용을 완화시켜 준다는 보고가 있다¹¹⁾.

본 연구에서는 CP의 부작용에 대한 인삼의

효과를 조직수준에서 관찰하였으며 특히 T- 및 B- 임파구가 혼재되어 있는 비장에서 이들 두 종류의 세포들에 대한 영향을 서로 비교하고 임파구외에도 대식세포에 관한 영향도 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 2개월 가량 된 체중 200g의 건강한 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 동일 조건하에서 사육시켜 정상군, CP투여대조군, CP투여 후 인삼추출물 투여실험군으로 구분하여 각 군은 5마리씩 배정하여 사용하였다.

2. 한약재의 제조

건조된 인삼 200g을 등근 플라스크에 넣고 증류수 1500ml을 넣어서 3시간동안 환류추출한 후 여과한 다음 여과액을 감압농축하고 농축액을 냉동건조기에 넣어서 건조된 분말 40g을 만들었다.

3. Cyclophosphamide의 조제

CP(Sigma chemical Co.U.S.A) 1g을 멸균된 증류수 20ml에 용해시킨(50mg/ml) 후 syringe filter로 멸균하였다. 신선함을 유지하기 위해 용액은 투여하기 직전에 제조하여 사용하였다.

4. 약물투여

대조군은 1회 CP(150mg/kg) 투여후 14일간 자연방치 하였고 실험군은 대조군과 동일한 방법으로 CP를 투여한 후 매일 인삼추출물(60mg/200g)을 14일 동안 경구투여후 희생시켰다.

5. 조직표본작성

고 찰

Pentobarbital sodium (Somnoplex, Pitman-moore, Inc.)으로 마취된 흰쥐의 흉강을 열고 10%중성 포르말린으로 관류고정한후 비장을 적출하였다. 비장의 중간 부위를 절취한후 10% 중성포르말린 용액으로 4°C에서 48시간 후 고정을 하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 4 μ m두께의 연속절편을 만들었다. 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

결 과

정상군에 비하여 대조군은 체중의 감소를 보였고 활동이 느려졌으며, 실험군은 대조군과 달리 정상군과 거의 차이가 없었다. 비장의 평균무게는 정상군이 1.83g인데 비해 대조군은 많이 감소한 0.77g이었고 실험군은 오히려 증가한 2.15g이었다.

대조군에서는 정상군(fig.1)에 비하여 백수의 변화가 현저하여 크기와 세포의 밀도가 감소하였다(fig.2, 5). 그리고 백수를 구성하는 동맥주위 임파초 및 임파소절등이 소실되거나 크기가 감소하는 변화를 보였다(fig.2, 5). 그리고 변연대를 이루는 세포들이 정상군에서는 몇층의 T-임파구로 구성되어 있으나(fig.4, 7) 대조군에서는 거의 소실되었고(fig. 8) 반면 실험군에서는 정상군과 비슷한 양상의 두꺼운 층을 보였다(fig.9).

실험군에서는 대조군에서 관찰되었던 비장의 손상이 관찰되지 않았으며 백수의 크기 및 세포 그리고 변연대가 모두 정상에 가깝게 회복되었다(fig.3, 6). 적수에서도 정맥동 및 비색이 정상과 유사한 모양을 보였고 대식세포도 소실되어 관찰되지 않는 정상과 유사한 모양으로 관찰되었다(fig.9).

Cyclophosphamide(CP)는 임상에서 암의 치료를 위하여 널리 사용되고 있는 약물이다. 그러나 CP는 골수억제(myelosuppression)과 면역억제(immunosuppression)등의 부작용을 일으키는 것으로 알려져있다¹⁰⁾. 이러한 부작용은 암치료에 CP의 사용을 제한하고 있다. 면역계에 대한 CP의 효과는 CP자체 보다는 CP의 대사산물에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. CP는 먼저 간에서 cytochrome P-450에 의해 aldophosphoramidate로 환원된다. Aldophosphoramidate는 β -elimination을 진행하여 acrolein과 phosphoramidate mustard (PAM)을 만들게 된다. CP의 이들 두가지 대사산물은 sulfhydryl기와 DNA에 결합하게 된다. DNA와 결합한 PAM은 DNA상해를 유발하게 되고 이것에의해 세포의 증식을 억제한다. 반대로 세포내 거대분자의 sulfhydryl기와 결합한 acrolein의 결합은 Ts의 생성을 방해 하게된다. 이러한 대사산물의 작용에 의해 CP가 항암과 면역억제의 효과를 나타내게 된다^{2,3,15,16,17)}.

이러한 CP의 부작용을 줄이거나 없애는 방법이 고안 되었는데 BCG, *Corynebacterium parvum*, maleic anhydride divinyl ether copolymer(MVE-2)등은 비특이적 면역자극제로 사용되고 있다. 또한 fungal glucan은 항암제로써 면역계를 자극하여 암의 면역성치료에 사용되고 있다. 그리고 인삼이 5-fluorouracil, mitomycin C, CP와 같은 항암제의 부작용을 감소시켜준다는 보고가 있다^{11,18)}.

인삼의 CP 부작용인 spleen의 크기감소를 억제하고 백혈구의 감소를 억제한다는 보고가 있다. 인삼의 성분중 polysaccharide fraction(PF)과 saponin이 CP의 부작용중 백혈구

의 감소를 크게 억제시키는 것으로 보고되어 있다. PF는 immunomodulating, antitumor, hypoglycemic, anti-complementary activity의 효과를 보이며, saponin은 PFC/spleen과 Hb를 증가시킨다는 보고와 함께 항암의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다^{11,12)}.

이러한 인삼 분획물의 효과가 보고되고 있으나 이는 분획물의 일부에 지나지 않는 것이며 PF와 saponin의 효과가 각각 다른 효과를 보이는 것으로 미루어 전체적인 비교가 필요할 것으로 사료되고 있다. 본 연구에서 보인 백수의 감소는 CP에 의한 임파구의 감소이며 특히 변연대에서 T-임파구의 감소는 CP의 분해산물인 acrolein에 의한 작용으로 saponin에 의해 회복되었으리라 사료된다. 그러나 변연대의 회복이 saponin만으로 회복된 것인지 아직 정확하지는 않으나 PF의 위와 같은 작용으로 변연대의 회복에 작용했을 것으로 사료된다. 그리고 대식세포가 인삼추출물 투여군에서 나타나지 않게 되는데 이는 이물질의 감소나 파괴된 혈구세포의 감소를 나타내는 것으로 인삼 분획물에 의한 실험으로는 아직 보고되지 않은 것으로 다만 CP 투여시 비장에서 증가한다는 보고가 있다⁷⁾. 이러한 대식세포의 감소는 인삼추출물의 복합적인 기능에 의한 비장의 회복에 기인하는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 인삼추출물이 Cyclophosphamide가 흰쥐의 비장에 미치는 부작용의 회복을 알아보기 위해 실시되었다. 실험동물은 약물을 투여한 방법에 따라 대조군과 실험군으로 나누었다. 통상적인 방법으로 조직을 처리하여 광학현미경으로 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 비장의 전체적인 크기가 인삼 투여군이 대조군보다 크며 정상군과 유사했다.
2. 대조군보다 변연대, 백수, 적수 등이 인삼 투여군에서는 거의 정상과 같았다.
3. 대조군에 나타났던 대식세포가 인삼 투여군에는 없어졌다.

참 고 문 헌

1. Gilman, A.G., Goldman, L.S., Rall, T.W. et al. : The Pharmacologic basis of therapeutics. 7th ed., p.1257, Macmillan Publishing Co., New York, 1985.
2. Haskell, C.M. : Cancer treatment. 2nd ed., p.47, W.B.Saunders, Philadelphia, 1985.
3. Grahame-Smith, D.G. and Aronson, J.K. : Oxford textbook of clinical pharmacology and drug therapy. 1st ed., p.670, Oxford university press, Oxford, 1984.
4. Jeffery, J.R., Downs, A.R., Lye, C. et al. : Immunosuppression with azathioprine, prednisone, and cyclophosphamide. Transplantation, 28 : 10, 1979.
5. Novack, S.N. and Person, C.M. : Cyclophosphamide therapy in Wegner's granulomatosis. New Engl. J Med., 284 : 938, 1971.
6. Karnovsky, J. : Clinical pharmacology and toxicology of cyclophosphamide : Emphasis on use in rheumatic diseases. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 12 : 4 : 359~372, 1983.
7. Karnovsky, D.A. : Late effects of immunosuppressive anticancer drugs. Federation Proceedings, 26 : 925, 1967
8. Cox, P.J., Phillips, B.J., and Thomas, P. : The enzymatic basis of the selective action

- of cyclophosphamide. *Cancer Res.*, 35 : 3755, 1975.
9. 윤석 : Cyclophosphamide가 흰쥐 비장에 미치는 영향에 대한 조직학적연구. 부산대학교 대학원, 1989.
 10. Stoychkov, J.N., Schultz, R.M., Chirigos, M.A. et al. : Effects of adriamycin and cyclophosphamide treatment on induction of macrophage cytotoxic function in mice. *Cancer Res.*, 39 : 3014, 1979.
 1. Kim, Y.S., Kang,K.S., Kim,S.I. : Effects of Ginseng components on Immunotoxicity of cyclophosphamide. *Korean J. Ginseng Sci.*, 1991
 2. 전해경, 김세창, 정노팔, : 생쥐의 대식세포 증양치사활성과 항암효과에 미치는 Saponin분획물과 Cyclophosphamide의 영향. *Korean J. Ginseng Sci.* 15, 2, 99~105, 1991.
 3. 김영수 : Effects of saponin and inhibitors of DNA polymerase and DNA topoisomerase on SCEs and chromosome aberrations induced by adriamycin in CHO cells. 동아대학교 대학원 1989.
 4. Alfred,G.G.,Louis,S.G. and Alfred,G. : The pharmacological basis of the therapeutics. 6th ed. Maximillan Co. New York, p.1264, 1975.
 5. Sladek,N.E. : Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of its metabolism. *Cancer Res.*, 32 : 535, 1972.
 6. Sladek,N.E. : Metabolism of cyclophosphamide by rat hepatic microsomes. *Cancer Res.*, 31 : 901, 1971.
 7. Brock,N. and Hohorst,H.J. : Metabolism of cyclophosphamide. *Cancer*, 20 : 900, 1967.
 18. Kim,S.Y., and Park,C.S. : Effect of polysacchride K(copolang) and low dose cyclophosphamidecombination therapy on the cell-mediated immunity in cancer patients. *Chungnam Med. J.*, 15,2 : 762~769, 1988.

Legends of Figure.

Fig.1. Normal structure of the spleen. x100. H&E.

Fig.2. 15days after administration of 150mg/Kg of cyclophosphamide. The numbers of lymphocytes in marginal zone are decreased. x100. H&E.

Fig.3. 15 days after administration of cyclophosphamide with daily Panax ginseng extract. x100. H&E.

Fig.4. Normal structure of marginal zone. x200 H&E.

Fig.5. 15 days after administration cyclophosphamide. The marginal zone are decreased and shown macrophage in red pulp. x200. H&E.

Fig.6. 15 days after administration of cyclophosphamide and daily Panax ginseng extract. Marginal zone are appeared. x 400. H&E.

Fig.7. Normal structure of marginal zone. x 400. H&E.

Fig.8. 15 days after administration cyclophosphamide. The marginal zone are decreased and shown macrophage in red pulp. x400. H&E.

Fig.9. 15 days after administration of cyclophosphamide and daily Panax ginseng extract. Greatist marginal zone are appeared. x400. H&E.

[6]

인삼 추출물이 Cyclophosphamide에 의해 손상된 흰쥐 비장조직의 회복에 미치는 영향

