약학회지 제40권 제 2 호. 202~211(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 2

아미그달린의 투여경로에 따른 면역생물학적 연구

김정훈# · 강태욱 · 박찬봉 · 차광재 · 안영근
원광대학교 식품약품안전성연구소
(Received October 11, 1995)

Immunobiological Studies on Route of Administration of Amygdalin

Joung Hoon Kim#, Tae Wook Kang, Chan Bong Park, Kwang Jae Cha and Young Keun Ahn
Center for Food and Drug Safety, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—Experiments were performed on male Sprague-Dawley rats to investigate the immunobiological effects on route of administration of amygdalin (AM). Rats were administered orally at 12.5, 25, or 50 mg/kg/day of AM or injected with 25, 50, or 100 mg/kg/day of AM intravenously for 2 weeks. Rats were immunized and challenged with sheep red blood cells (SRBC). The results of this study were summarized as follows; (1) In oral administration of AM, body weight gains were significantly increased by 50 mg/kg AM as compared with controls, the relative weights of liver and thymus also were significantly increased by 12.5 and 25 mg/kg AM. However, 2-mercaptoethanol-resistant hemagglutination titer (2-MER HA), Plaque forming cells (PFC) and rosette forming cells (RFC) were non-dose dependently decreased. Phagocytic activity and delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction also were significantly decreased by 50 mg/kg AM. (2) In intravenous injection of AM, body weight gains, hemagglutination titer (HA), 2-MER HA, DTH reaction, PFC, RFC and circulating leukocytes were not influenced by AM. However, the relative weights of liver, spleen and thymus were significantly enhanced by 100 mg/kg AM. These results indicated that oral administration of AM non-dose dependently suppresses humoral and cell-mediated immunity in SD rats, and that intravenous injection of AM is unaffected humoral and cell-mediated immunity, however, the high dose of it significantly enhances phagocytic activity.

Keywords □ Amygdalin, immunobiological response, SRBC, SD rat.

Amygdalin은 bitter almonds, 살구, 복숭아 등과 같은 장미과 식물의 견과, 핵, 뿌리, 줄기, 잎에 널리 존재하는 주성분으로 청산배당체의 일종이다.[1,2] 예로부터 도인은 어혈의 적체로 인한 폐경, 타박상에 의한 동통, 산후어혈의 정체에 의한 통증 및 관절통 등의 질환에 사용되는 한방약이고[3], 행인 및 bitter almonds 등은 진해제 및 말기의 암환자의 치료약으로 사용되어 왔다.[4,5] Amygdalin은 Fig. 1에서와 같이 두개의 glucose, benzaldehyde 및 cyanide로 구성되어 있고, 열, mineral oil 및 혈액중 과량의 ascorbic acid 존재시 쉽게 가수분해된다.[1,2,5] 또한 amygdalin은 β-glucosidase에 의해 mandelonitrile-β-glucoronide(prunasin)와 glucose로 분해되고, 다시 prunasin은 mandelonitrile과 glucose로 가수분해되며[1,2,5,6], 그 대사물질인 mandelonitrile은 nitrile lyase에 의해 benzaldehyde와 hydrogen cyanide로 가수분해된다.[7]

Carter등[8]은 시판흰쥐와 무균흰쥐에 각각 amygdalin을 경구투여시 시판흰쥐에서 만이 cyanide의 독성이 있음으로 인해 장내미생물에 존재한 β-glucosi-

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-50-6816 (팩스) 0653-54-7286

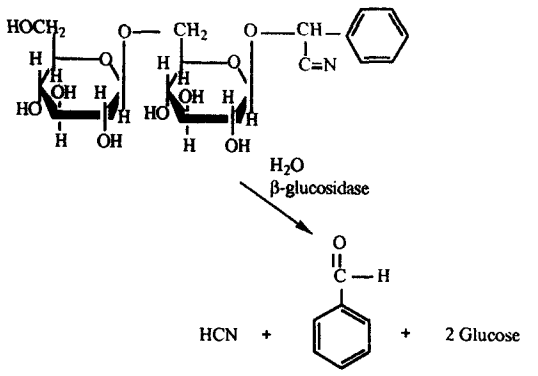

Fig. 1 — Metabolic profile of amygdalin.

dase가 amygdalin을 분해한다고 보고하였다.

한편, amygdalin은 미국에서 70～80년대초에 Laetrile이란 제제로 암치료제로써 인정받기도 하였으나[9,10], Laetrile을 복용한 후 cyanide의 중독으로 인해 사망한 임상보고가 있다.[11,12] Cyanide의 급·만성중독으로는 구토, 오심, 경련, 마비, 혼수, 심근허탈 및 사망에 이르고[7,13,14], 독성발현기전으로는 cyanide가 전자수송계에서 cytochrome a_3에서 cytochrome a_3로의 전자수송에 장해를 주어 산소결핍등을 유발하여 사망한다고 보고하였다.[12,15,16] Lea등[17]은 thiocyanate와 cyanate가 BUF흰쥐의 이식종양에서 DNA내로의 인산염과 thymidine(^{3}H)의 유입에 대한 억제효과가 있으나 정상세포에도 작용하여 신경독을 유발한다고 보고하였다.[18,19] 그러나 Chitnis등[20]은 P388와 P815종양을 이식한 BDF1생쥐에게 고용량의 amygdalin 200～2000 mg/kg의 복강내투여시 수면연장 및 cyanide의 독성이 없다고 보고하였고, Stock등[21]은 흰쥐에 있어서 고용량의 amygdalin을 복강내투여시 sarcoma 180, plasma cell tumor LPC-1, leukemia L1210, Mecca lympho sarcoma 등의 이식종양에 대해 영향이 없다고 보고하였고, 또한 Stock등[22]은 AKR생쥐와 CD_8F생쥐에 있어서 자가발생백혈병의 진행에 대해 치료와 예방효과가 없다고 하였으며, Mortel등[23]은 암환자에게 amygdalin을 경구투여시 암의 안정화, 증세의 개선 등의 치료 및 생명연장에 효과가 없을 뿐만아니라 amygdalin으로 인한 cyanide독성만 유발된다고 보고하였다. 그러나 Ames등[24]은 암환자에게 amygdalin을 4.5 g/m^{2}을 정맥주사하고, 500 mg정제를 경구투여시 환자로부터 아무런 독성증상이 없었으나, cyanide의 방출속도가 암치료에 있어서 유효하다고 보고하였다. 또한 Takeuchi등[25]은 무화과 나무에서 추출된 benzaldehyde가 amygdalin의 항암효과에 관여한다고 하였으며, Kochi등[26]은 banzaldehyde의 유도체가 항암활성이 있다고 보고하였다.

그래서 본저자들은 amygdalin의 투여경로에 따른 독성과 약리작용에 상이한 차이가 있다고 사료됨에 따라 amygdalin의 투여경로에 따른 면역생물학적 효과도 차이가 있을 것으로 생각되어, 본 연구를 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물 – 생후 4～5주령, 체중 100～150 g 수컷 Spraque-Dawley 흰쥐를 대륙 실험동물개발 에서 분양받아 시판사료(신촌 실험동물사료 제품; 조지방 3.5%이상, 조섬유 7.0%이하, 조단백질 22.5%이상, 조회분 9.0%이하, 인 0.5%이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후, 10마리를 1군으로 하고 전체를 8군으로 나누어 23±2°C에서 2주간 사육하였다.

시약의 조제 및 투여 – Amygdalin (Sigma Co., M. O., U.S.A.)를 주사용 생리식염수에 용해시켜 경구투여군은 흰쥐체중 kg당 12.5, 25 및 50 mg을 2주간 1일 1회 경구투여하였고, 정맥투여군은 25, 50 및 100 mg를 2주간 1일 1회 정맥주사하였다. 그리고, 각 대조군은 주사용 생리식염수를 위와 같은 방법에 따라 투여하였다.

체중 및 장기의 중량계측 – 실험동물의 체중은 공시약물투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 최종 약물투여 1일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 적출하여 그 중량을 측정하여 대 체중 백분율을 구하였다.

먹이 섭취량과 음수량 – 먹이섭취량과 음수량을 매일 일정시간에 측정하였고, 사료는 약물투여 1시간 전 2시간 후까지 절식시킨 후 공급하였고, 음수는 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

항원조제 – 면양적혈구(Sheep red blood cell; SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 웅성면양의 경동맥으로부터 heparin처리 주사기로 채혈한 후 동량의 Alserver's액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는

사용 직전 phosphate-buffered saline(이하 PBS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution (HBSS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다.

면역 - 원심 세척한 SRBC를 Reed등[27]의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10^8 cells/m*l*의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 m*l*(1×10^7 cells)를 흰쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였고, 지연형 과민반응을 위해 면역 4일 후에 흰쥐의 좌측후지족척내에 2×10^9 cells/m*l* 부유액 0.05 m*l*(1×10^8 cells)를 주사하였다.

혈청의 분리 및 불활성화 - 생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 불활성화시킨 후 4°C에서 보존하였다.

적혈구응집소가(Hemagglutination titer; HA titer)의 측정[28,29] - SRBC의 응집소가를 microtitration trays (Limbro Chemical Co., Inc. New Haven, C. T., U.S.A.)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 불활성화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% SRBC 0.025 m*l*를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집유형을 관찰판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

2-Mercaptoethanol(2-ME) 내성 적혈구 응집소가의 측정 - 각 혈청의 2-ME 내성 응집소가를 판정하기 위하여 0.15 N 2-ME (Sigma, Co., Ltd., U.S.A.)로 혈청을 처리하여, 2-ME 내성 항체를 immunoglobulin G (Ig G) 항체로, 2-ME로 처리하기 전의 항체를 2-ME감수성 항체 또는 Ig M항체로 판독하였는데, 판독방법은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 0.15 N 2-ME가 함유된 HBSS로 혈청을 희석하고, 증발하지 않도록 microplate를 밀봉하여, 37°C에서 30분간 방치한 후, SRBC를 가하여 응집소가를 위와 동일한 방법으로 검사하였다.

족척종창반응의 측정(Footpad swelling test) - 지연형과민반응 (delayed-type hypersensitivitity reaction: DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai등[30]이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 면역 4일 후에 SRBC 0.05 m*l*(1×10^8 cells)를 흰쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper (Mitutoyo Mfg. Co., Ltd., Japan)로 측정하였으며, 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정한 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto등[31]의 판독기준에 따라, 다음과 같이 24시간 경과 후의 반응을 DTH로 간주하였다.

$$\text{Footpad swelling index} = \frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

비장세포 부유액의 조제[27] - 비장을 흰쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium (MEM: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 한냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포수가 2×10^7 cells/m*l*가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험때마다 비장세포의 생존율 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 m*l*의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 m*l*의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정한 후, 그 백분율을 계산하였다.

비장세포의 rosette 형성세포수(Rosette forming cells; RFC)의 측정 - 비장세포의 rosette형성세포수의 검사는 Garvey등[32] 및 Elliott등[33] 이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 비장세포 부유액(2×10^7 cells/m*l*) 0.25 m*l*를 시험관에 넣은 후, HBSS에 부유한 SRBC(2×10^8 cells/m*l*) 0.25 m*l*를 넣고 혼합하여 200×g에서 12시간 원심분리한 후, 4°C에서 2시간 방치하였다. 그 후 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후, 이 부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨려 RFC를 검경관찰하였다. 검경시 비장세포에 SRBC가 3개이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cells (\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cells}}{10^2 \text{ spleen cells} \times \text{\% viability}} \times 100$$

비장세포의 용혈반형성세포수 (Plaque forming cells; PFC)의 측정 - 1) 비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham[34]의 방법을 이용하여 다음과 같이 행하였다. 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, 400×g에서 5분간

원심분리하였다. 상등액을 제거 후 37°C의 0.83% NH_4Cl용액에 부유시켜 3분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 PBS에 부유시켜 적혈구 제거 비장세포수를 혈구계산판에서 검경 관찰하였다. 2) SRBC를 PBS로 4회 세척하고(400×g, 5분) 마지막 세척 후 PBS에 4×10^9 cells/m*l*의 농도로 부유시켰다. 3) 4×10^9 SRBC 250 μ*l*, guinea pig complement(Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.) 500 μ*l*를 혼합하여 ice bath 상에서 30분간 정치 후 사용하였다. 4) 위의 guinea pig complement 와 4×10^9 SRBC혼합액 150 μ*l*, 비장세포 부유액 650 μ*l*를 잘 혼합하여 microchamber (Takahashi Giken Glass 76×26 mm)에 100 μ*l*씩 주입하고 wax-vaseline (1 : 1)으로 밀봉하여 CO_2 incubator (37°C)에서 1시간 배양 후 형성된 용혈반 (Plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다. 5) 백만개의 비장세포 중 용혈반 형성세포수 (PFC/10^6 spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C.Vm.a} \times 10^6$$

단, $a = \frac{650}{800}$(배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 m*l* of spleen cell suspension

Vm : volume of incubation mixture filled into a microchamber (m*l*)

대식세포활성도의 측정 – 대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi등[35]이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물투여 2일 후에 Rotring ink를 1% gelatin수용액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소현탁액을 흰쥐 체중 g당 0.01 m*l*씩 꼬리정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부정맥혈관총 (retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube (20 μ*l* : microhematocrit)로 천자하여 20 μ*l*의 혈액을 10, 20 및 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate용액 2 m*l*가 든 test tube에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼화하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coeficient와 corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B : Body weight

L : Liver weight

S : Spleen weight

K : Phagocytic coefficient (측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph곡선)

말초순환백혈구수의 측정 – 흰쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 Türk액으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

통계학적 분석 – 모든 자료는 mean±standard error (S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 Student's *t*-test로 행하였다.

결 과

체중의 변화 – 각군의 체중의 변화는 Table I과 같다. 경구투여군에서는 대조군의 체중증가율이 13.16±1.64%인데 비해 amygdalin 50 mg/kg 투여군에서는 21.26±2.41% ($P<0.05$)로 유의한 증가를 보였고, 정맥투여군에서는 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서는 유의성 없는 증감을 보였다.

먹이섭취량과 음수량 – 각군의 먹이섭취량과 음수량은 Table II와 같다. 먹이섭취량은 경구투여군과 정맥투여군에 있어서는 각각의 대조군에 비해 amygdalin

Table I—The effect of amygdalin on body weight in rats

Group (mg/kg)	Body wt. gain (%)
Control (*p.o.*)	13.16±1.64
AM 12.5 (*p.o.*)	16.63±3.22
AM 25 (*p.o.*)	16.90±2.41
AM 50 (*p.o.*)	21.26±2.41*
Control (*i.v.*)	17.45±2.78
AM 25 (*i.v.*)	22.87±3.19
AM 50 (*i.v.*)	20.28±2.49
AM 100 (*i.v.*)	20.81±2.36

Amygdalin (AM; 12.5, 25 and 50 mg/kg for p.o. or 25, 50 and 100 mg/kg for *i.v.*, respectively) was administered to rats daily for 14 consecutive days. Each value represents the mean±S.E. of 7~10 rats. The significances of difference as compared with control (*p. o.*) group: * $P<0.05$.

투여군에서는 유의한 차이가 없었고, 또한 음수량도 각각의 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의한 차이가 없었다.

간장, 비장 및 흉선의 중량변화 - 각군의 비장, 간장 및 흉선의 중량비는 Table III과 같다. 각군의 간장 중량비는 경구투여군에 있어서 대조군이 3.00±0.27%인데 비해 amygdalin 25 mg/kg 경구투여군에서는 3.75±0.19%로 유의성 있는 증가를 보였다. 또한, 정맥투여군에 있어서는 대조군이 2.83±0.12%인데 비해 amygdalin 50 mg/kg정맥투여군에서는 3.19±0.19% ($P<0.05$)로 유의성 있는 증가를 보였다. 비장의 중량비는 경구투여군에서는 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군은 유의성 있는 증가는 없었고, 정맥투여군에서는 대조군이 0.41±0.03%인데 비해 amygdalin 50 mg/kg투여군은 0.61±0.04% ($P<0.01$)로 유의성 있는 증가를 보였다. 한편, 흉선의 중량비는 경구투여대조군의 0.10±0.01%에 비해 amygdalin 12.5 및 25 mg/kg 투여군에서는 각각 0.17±0.01% ($P<0.05$) 및 0.16±0.01% ($P<0.05$)로 유의성 있는 증가를 보였고, 정맥투여군에 있어서는 대조군이 0.11±0.02%인데 비해 amygdalin 50 mg/kg 투여군에서는 0.20±0.00% ($P<0.01$)로 유의성 있는 증가를 보였다.

적혈구응집소가와 2-mercaptoethanol(2-ME)내성 응집소가 및 용혈반 형성세포수에 미치는 영향 - 각 군의 적혈구응집소가, 2-ME내성응집소가 및 용혈반형성세포수의 결과는 Table IV와 같다. 적혈구응집소가는 경구투여군과 정맥투여군에서는 각각의 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의성 있는 차이가 없었지만, 2-ME 내성 응집소가는 경구투여군에서는 대조군이 7.80±0.59인데 비해 amygdalin 12.5, 25 및 50 mg/kg 투여군은 각각 4.40±0.25 ($P<0.001$), 4.40±0.40 ($P<0.001$) 및 3.30±0.33 ($P<0.001$)로 유의성 있는 차이가 없었다. 또한 10^6의 비장세포에서의 용혈반형성세포수는 경구투여군에서는 대조군이 1,210±115인데 비해 amygdalin 25 및 50 mg/kg 투여군에서는 각각 415±128 ($P<0.01$) 및 677±128 ($P<0.05$)로 유의성 있는 감소를 보였으나, 정맥투여군에서는 대조

Table II — The effect of amygdalin on diet and water intakes in rats

Group (mg/kg)	Food intake (g/rat/day)	Water intake (ml/rat/day)
Control (*p. o.*)	11.41±0.39	24.38±1.06
AM 12.5 (p. o.)	11.12±0.63	22.66±0.68
AM 25 (*p. o.*)	10.88±0.25	22.29±0.62
AM 50 (*p. o.*)	12.11±0.82	27.32±1.32
Control (*i. v.*)	12.34±0.60	25.09±0.94
AM 25 (*i. v.*)	12.95±0.82	27.04±1.27
AM 50 (*i. v.*)	11.35±0.55	23.83±0.84
AM 100 (*i. v.*)	10.90±0.54	22.45±1.05

Each value represents the mean±S.E. of 7 ~ 10 rats.

Table IV — The effect of amygdalin on antibody production in rats

Group (mg/kg)	HA# titer (log_2)	MER HA# (log_2)	PFC#/10^6 spleen cells
Control (*p. o*)	6.00±0.40	7.80±0.59	1,210±115
AM 12.5 (*p. o*)	6.75±0.48	4.40±0.25***	903±228
AM 25 (*p. o*)	6.80±0.38	4.40±0.40***	415±128**
AM 50 (*p. o*)	4.67±1.85	3.30±0.33***	677±128*
Control (*i. v.*)	6.20±0.38	4.33±0.33	662±110
AM 25 (*i. v.*)	7.25±0.48	4.60±0.25	451±74
AM 50 (*i. v.*)	5.00±0.41	3.50±0.29	410±74
AM 100 (*i. v.*)	6.00±0.32	3.50±0.25	400±31

HA# : Hemagglutination, MER-HA# : 2-mercaptoethanol-resistant HA. PFC# : plaque forming cells. Rats were immunized *i. v.* with 10^7 SRBC 4 days prior to assay. Each value represents the mean±S.E. of 4 ~ 6 rats. The significances of difference as compared with control (*p. o.*) group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Table III — The effect of amygdalin on organ weight in rats

Group (mg/kg)	$\frac{\text{Liver wt.}}{\text{Body wt.}} \times 100(\%)$	$\frac{\text{Spleen wt.}}{\text{Body wt.}} \times 100(\%)$	$\frac{\text{Thymus wt.}}{\text{Bodywt.}} \times 100(\%)$
Control (*p. o.*)	3.00±0.27	0.49±0.03	0.10±0.01
AM 12.5 (*p. o.*)	3.18±0.13	0.56±0.06	0.17±0.01*
AM 25 (*p. o.*)	3.75±0.19*	0.54±0.03	0.16±0.01*
AM 50 (*p. o.*)	3.37±0.28	0.46±0.09	0.08±0.01
Control (*i. v.*)	2.83±0.12	0.41±0.03	0.11±0.02
AM 25 (*i. v.*)	2.86±0.10	0.46±0.05	0.13±0.01
AM 50 (*i. v.*)	3.19±0.07#	0.61±0.04##	0.20±0.00##
AM 100 (*i. v.*)	3.18±0.08	0.52±0.44	0.14±0.01

Each value represents the mean±S.E. of 4 ~ 6 rats. The significances of difference as compared control (*p. o.*) group: * $P<0.05$. The significances of difference compared with control (*i. v.*) group: #$P<0.05$, ## $P<0.01$.

Table V — The effect of amygdalin on rosette forming cells (RFC) in rats

Group (mg/kg)	RFC (%)
Control (*p. o*)	7.20±0.95
AM 12.5 (*p. o*)	1.56±0.26***
AM 25 (*p. o*)	1.24±0.41***
AM 50 (*p. o*)	1.49±0.73***
Control (*i. v.*)	2.23±1.09
AM 25 (*i. v.*)	1.95±0.13
AM 50 (*i. v.*)	1.99±0.01
AM 100 (*i. v.*)	2.30±1.27

RFC assay was performed 4 days after immunization.

$$\text{RFC (\%)} = \frac{\text{No. of rosette forming cells}}{10^2 \text{ spleen cells} \times \text{\% viability}} \times 100$$

Each values represents the mean±S.E. of 4 ~ 6 rats. The significances of difference as compared with control (*p. o.*) group; *** $P<0.001$.

Table VI — The effect of amygdalin on delayed type hypersensitivity (DTH) reaction in rats

Group (mg/kg)	FPSI (%)
Control (*p. o.*)	19.08±1.75
AM 12.5 (*p. o.*)	24.55±2.93
AM 25 (*p. o.*)	9.45±2.21
AM 50 (*p. o.*)	3.63±2.97***
Control (*i. v.*)	13.21±1.20
AM 25 (*i. v.*)	13.46±1.43
AM 50 (*i. v.*)	15.22±2.55
AM 100 (*i. v.*)	15.90±1.19

Rats were challenged with 10^8 SRBC on left hind footpad 4 days after immunization. Footpad thickness was measured immediately before challenge and 24 hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index (FPSI)} = \frac{T_{24} - T}{T} \times 100$$

Where, T is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T_{24} is the left hind footpad thickness 24 hr after challenge. Each value represents the mean±S.E. of 7 ~ 10 rats. The significances of difference as compared with control (*p. o.*) group ; *** $P<0.001$.

군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의한 감소는 없었다.

비장세포의 rosette형성능 (RFC)에 미치는 영향 – 각군에서 관찰한 비장세포의 RFC를 %로 환산측정한 결과는 Table V와 같다. 경구투여군에서는 대조군이 7.20±0.95%에 비해 amygdalin 12.5, 25 및 50 mg/kg 투여군에서는 각각 1.56±0.26% ($P<0.001$), 1.24±0.41% ($P<0.001$) 및 1.49±0.73% ($P<0.001$)로 유의성 있는 감소를 보였으나, amygdalin의 정맥투여군은 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의성 있는 감소는 없었다.

Table VII — The effect of amygdalin on phagocytic activity in rats

Group (mg/kg)	Corrected phagocytic index
Control (*p. o.*)	6.80±0.77
AM 12.5 (*p. o.*)	5.75±0.76
AM 25 (*p. o.*)	4.68±0.67
AM 50 (*p. o.*)	4.40±0.30*
Control (*i. v.*)	3.82±0.53
AM 25 (*i. v.*)	4.77±0.37
AM 50 (*i. v.*)	4.50±1.28
AM 100 (*i. v.*)	5.70±0.26#

Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the liver and spleen. Each value represents the mean±S.E. of 3 ~ 5 rats. The significances of difference as compared with control (*p. o.*) group; * $P<0.05$. The significances of difference as compared with control (*i. v.*) group ; #$P<0.05$.

Table VIII — The effect of amygdalin on the number of circulating leukocyte in rats

Group (mg/kg)	Number of circulating leukocyte (/mm³)
Control (*p. o.*)	10,229± 788
AM 12.5 (*p. o.*)	9,560±1,140
AM 25 (*p. o.*)	9,400±1,020
AM 50 (*p. o.*)	9,867±1,061
Control (*i. v.*)	11,025± 446
AM 25 (*i. v.*)	10,700± 550
AM 50 (*i. v.*)	9,000± 934
AM 100 (*i. v.*)	9,967± 474

Each value represents the mean±S.E. of 7 ~ 10 rats.

지연형 과민반응에 미치는 영향 – 지연형 과민반응에 미치는 결과는 Table VI와 같이, 경구투여군에서는 대조군이 19.08±1.75%에 비해 amygdalin 50 mg/kg 투여군은 3.63±2.10% ($P<0.001$)로 유의한 감소를 보였고, 정맥투여군에서는 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의한 증가는 없었다.

대식세포의 활성에 미치는 영향 – 대식세포의 탐식능을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table VII과 같이, 경구투여군에서는 대조군이 6.80 ±0.77인데 비해 amygdalin 50 mg/kg 투여군에서는 4.40±0.30 ($P<0.05$)로 유의성 있는 감소를 보였으나, 정맥투여군에서는 대조군이 3.82±0.53에 비해 amygdalin 100 mg/kg투여군은 5.70±0.26 ($P<0.05$)으로 유의성 있는 증가를 보였다.

말초순환백혈구수에 미치는 영향 – 말초순환백혈구수에 대한 결과는 Table VIII과 같다. 경구투여군과 정맥투여군에서는 각각의 대조군에 비해 amygdalin 모든 투여군에서 유의성 있는 차이가 없었다.

고 찰

amygdalin은 장관에서 장내미생물에 존재하는 β-glucosidase에 의해 2분자의 glucose, benzaldehyde 및 HCN으로 분해되고, cyanide는 무색, 무취로서 25.5°C에서 기화되어 장관벽을 통하여 신속히 흡수된다.[1,2,5] Newton등[36]은 경구투여 흰쥐에 있어서 amygdalin의 LD_{50}이 522 mg/kg으로 보고하였으나, Adewusi등[37]은 경구투여 흰쥐에 있어서 LD_{50}이 880 mg/kg으로 보고하였다. 이러한 차이의 발생은 간에서 cyanide가 rhodanese (mitochondria sulfur transferase)에 의해 thiocyanate로 무독화되는데, 특히 황함유 amino acid인 cysteine과 methionine 등이 cyanate의 독성을 저하시킨다고 보고하였으나[14,16], Basu[10]는 guinea pigs에게 ascorbic acid와 amygdalin을 동시투여할때 ascorbic acid가 대사시 황을 필요로 하기 때문에 cyanide가 thiocyanate로 전환하는데 장해를 주어 amygdalin의 독성을 증가시킨다고 보고하였고, Adewusi등[37]은 흰쥐에 amygdalin 200, 400 및 600 mg/kg을 각각 경구투여한 후 11.7, 18.6 및 12.4%의 비변화형 amygdalin을 뇨중에서 검출하였고, 또한 Adewusi등[38]은 흰쥐에 amygdalin 30 mg을 경구투여 1시간 후에 위에서 0.89 mg, 소장에서 0.79 mg, 비장에서 0.36 mg, 대장에서 0.30 mg, 신장에서 0.19 mg, 간에서 0.10 mg, 혈청에서 5.6 μg/ml를 검출하였고, 2시간 후에는 대장에서 가장 많은 양의 0.79 mg을 검출하였다. 또한 Ames등[24]은 암환자에게 amygdalin을 정맥투여시 2시간 후에는 65.8%가, 경구투여시는 19.1%가 뇨중에서 검출되고, thiocyanate가 증가되었으나, 정맥주사시는 thiocyanate의 증가가 없다고 보고하였다.

이상의 보고들로 미루어, 본 실험에서 amygdalin의 경구투여는 면역계에 amygdalin의 자체의 작용보다는 amygdalin의 대사물인 benzaldehyde, HCN, thiocyanate 등이 작용하는 것으로 사료되나, 정맥투여시는 대사산물의 작용보다는 amygdalin의 그 자체 작용으로 사료된다. 인체에 적은 양의 amygdalin을 장기간 경구투여시 식욕의 감소와 체중의 감소를 Herbert[12]은 보고하였으나, 본 실험에서 amygdalin 50 mg/kg의 경구투여는 Table II에서 본 바와 같이 단기간의 경구투여로 식이량의 과다섭취로 인해 체중이 증가된 것으로 사료된다. 또한 amygdalin 25 mg/kg 경구투여군에 있어서는 간장, 비장 및 흉선의 중량비가 증가하였으나, 50 mg/kg 경구투여군은 유의성 없는 증감을 보인 것은 amygdalin의 용량증가에 따라 간에 독성을 증가시켜 사망으로 인해 유의성이 없는 것으로 보이며, 또한 guinea pigs에 있어서 cyanide을 thiocyanide로의 전환으로 인해 간에 독성이 유발된다는 Basu[10]의 보고와 환자에 amygdalin이 함유된 제제를 복용시킨 후 간 손상으로 인해 사망했다는 보고로 미루어[39], 본 실험의 amygdalin 경구투여군에 있어서 2-ME 내성 응집소가, 용혈반형성세포수, rosette 형성세포수의 체액성 면역의 감소는 amygdalin이 인체에 있어서 complement 3 (C3)의 역가감소와 체액성 항체생산에 손상을 준다는 Harkness등[40]의 보고와 cyanide의 3주간 투여로 간에서 rhodanese에 의해 cyanide가 thiocyanate로 축적되어 갑상선기능의 저하로 면역기능이 저하되었다는 Littleton[41]의 보고로 미루어, 고용량의 amygdalin경구투여는 amygdalin의 대사산물인 thiocyanate등이 보체 및 항체를 억제시켜 체액성 면역을 저하시킨 것으로 생각된다.

지연형 과민반응은 세포성 면역의 평가방법으로, 감작임파구에 의한 lymphokine 등이 화학적 전달인자의 유리에 의해 성립되며, 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험의 지연형 과민반응에서 저용량의 amygdalin경구투여는 고용량의 정맥투여보다 지연형 과민반응을 더욱 저하시켰다. 이는 흰쥐에 amygdalin 80 mg/kg을 복강내 투여하여 carrageenin으로 유도한 지연형 과민반응의 억제가 없었다는 Arichi등[3]의 보고와 상반된 점으로 미루어, amygdalin의 경구투여는 amygdalin이 장내 flora에 의해 분해되어 흡수된 cyanide의 대사산물인 thiocyanate 등이 lymphokines의 생성을 억제시켜 세포성 면역을 저하시킨 것으로 사료된다.

대식세포의 활성은 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukines의 분비에 중요한 역할을 하여 그 탐식능이 망상내피계에 영향을 끼쳤는 가를 측정하는 지표로서 이용되는 바, 본 실험에서 고용량의 amygdalin의 정맥투여는 대식세포의 활성을 유의하게 증가시킨데 반해, 경구투여는 대식세포의 활성을 유의하게 억제시켰다. 이러한 결과는 Table VIII의 amygdalin을 경구 또는 정맥투여시 말초순환 백혈구수에는 유의한 영향이 없다는 실험결과와 amygdalin의 경구투여시 대식세포의 활성을 억제시켰다는 Table VII의 실험결과와 함께

생각해 볼 때, amygdalin의 경구투여는 대사산물인 thiocyanate 등이 임파구 활성의 억제보다는 lymphokines의 생성을 억제시켜 대식세포의 활성이 감소된 것으로 사료된다.

따라서 amygdalin에 의한 면역치료시 경구투여에 의한 그 대사산물의 면역독성의 방지를 위해 정맥투여가 바람직하다고 생각되고, 이에 대한 정확한 면역작용기전은 앞으로 진행될만한 연구과제인 것으로 사료된다.

결 론

흰쥐에 있어서 amygdalin의 투여경로에 따른 면역생물학적 반응에 미치는 실험결과는 다음과 같다. 1) 경구투여에 있어서 amygdalin 25 및 50 mg/kg/day 투여군은 정상대조군에 비해 체중 증가율, 간장 및 흉선의 중량비를 유의성 있게 증가시켰으나, 적혈구 응집소가, 용혈반 형성세포수 및 로젯 형성능은 용량비의존적으로 감소시켰고, 특히 대식세포의 활성과 지연형 과민반응은 amygdalin 50 mg/kg/day 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. 2) 정맥투여에 있어서 amygdalin투여군은 정상대조군에 비해 체중 증가율, 적혈구 응집소가, 지연형 과민반응, 로젯 형성능, 백혈구수에는 영향이 없었으나, amygdalin 50 mg/kg/day투여군에서는 간장, 비장 및 흉선의 중량비를 유의성 있게 증가시켰고, 특히 고용량인 amygdalin 100 mg/kg/day투여군은 대식세포의 활성을 유의성 있게 증가하였다.

문 헌

1) Conn, E. E. : Cyanogenetic glycosides. In: *Toxicants Occurring Naturally in Foods* (2nd) edited by the Committee on Food protection, Food and Nutrition Board, National Research Council, Washington, D. C., *National Academy of Science*, 1973, P. 299

2) Windholz, M. and Rahway, N. J. : The Merck Index (9th, ed.), Merck and Co., INC. Entries No. 630 (Amygdalin), 1057 (Benzaldehyde), 4688 (Hydrogen cyanide), 5197 (Laetrile), 1979.

3) Arichi, S., Kubo, M., Tani, T., Nanba, K., Nagamoto, N., Noguchi, H., Nakamura, H. and Nishimura, M. : Studies on Persicae Semen. I. Studies on active principles having anti-inflammatory and analgesic activity. *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 129 (1986).

4) Miyagoshi, M., Amagaya, S., and Ogihara, Y. : Antitussive effects of L-ephedrine, amygdalin, and makyokansekito (Chinese traditional medicine) using a cough model induced by sulfur dioxides gas in mice. *Planta Medica.*, **4**, 275 (1986).

5) Backer, R. C. and Herbert, V. : Cyanide production from Laetrile (amygdalin) in the presence of megadoses of ascorbic acid. *JAMA*, **241**, 1891 (1979).

6) Baselt, R. C. and Cravey, R. H. : Disposition of toxic drugs and chemicals in man. *Year Book Med. Pub. INC*, **3**, 54 (1993).

7) Frakes, R. A., Sharma, R. P. and Willhite, C. C. : Comparative metabolism of linamarin and amygdalin in hamsters. *Fd. Chem. Toxicol.*, **24**, 417 (1986).

8) Carter, J. H., McLafferty M. A. and Goldman, P. : Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (Laetrile)-induced cyanide toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 301 (1980).

9) Schmidt, E. S., Newton, G. W., Sanders, S. M., Lewis, J. P. and Conn, E. E. : Laterile toxicity studies in dogs. *JAMA*, **239**, 943 (1978).

10) Basu, T. K. : High-dose ascorbic acid decrease detoxification of cyanide derived from amygdalin (Laetrile) : Studies in guinea pigs. *Can. J. Pysiol. Pharmcol.*, **61**, 1426 (1983).

11) Smith, F. P., Buttler, T., Cohan, S. and Schein, P. S. : Laetrile Toxicity; A report of two cases. *JAMA*, **238**, 1361 (1977).

12) Herbert, V. : Laetrile; The cult of cyanide promoting poison for profit. *Am. J. Cl. in Nutr.*, **32**, 1121 (1979).

13) Dreisbach, R. H. : Cyanides, sulfides and carbon monoxide. In: *Handbook of Poisoning; Diagnosis and Treatment*. Los Altos, Calif., Large Medical Publishers, 1977, p.241.

14) Nickerson, M. and Reudy, J. L. : Antihypertensive agents and drug therapy of hypertension. In: *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, edited by Good, L. S. and Gillman, A. New York, Mac-

millan, 1975, p. 717.

15) Klaassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J. : Toxic effects of plant toxins. *New York, Macmillan Pub.* Chap. **23**, (1986).

16) Gillman, A. G., Goodman, L. S. and Gillman, A. : The pharmacological basis of therapeutics. *New York, Macmillan Pub.*, **6**, 1651 (1980).

17) Lea, M. L. and Koch, M. R. : Effects of cyanate, thiocyanate and amygdalin on metabolite uptake in normal and neoplastic tissue of the rat. *JNCI*, **63**, 1279 (1979).

18) Shaw, C. M. and Papyannopoulous, G. : Neuropathology of cyanate toxicity in rhesus monkey. *Pharmacology*, **12**, 166, (1974).

19) Peterson, C. M., Tsairis, R. A., Lu, Y. S., Grady, R., Cerami, A. and Dyck, P. J. : Sodium cyanate induced polyneuropathy in patients with sickle cell diseases. *Ann. Internal Med.*, **81**, 152 (1974).

20) Chitnis, M. P., Adwankar, M. K. and Amonkar, A. J. : Studies on high doses chemotherpy of amygdalin in murin P 388 lymphocytic leukemia and P 815 mast cell leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **109**, 208 (1985).

21) Stock, C. C., Tarnowski, G. S., Schmid, F. A., Hutchison, D. J. and Teller, M. N. : Antitumor tests of amygdalin in transplantable animal systems. *J. Surg. Oncol.*, **10**, 81 (1978).

22) Stock, C. C., Martin, D. S., Kanematsu, S., Fugmann, R. A., Mountain, I. M., Elisabeth, S., Schmid, F. A. and Tarnowski, G. S. : Antitumor tests of amygdalin in spontaneous animal tumor systems. *J. Surg. Oncol.*, **10**, 89 (1978).

23) Mortel, C. G., Fleming, T. R., Rubin, J., Kvols, L. K., Sarna, G., Koch, R., Currie, V., Young, C. W., Jones, S. E. and Davingnon, J. P. : A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 201 (1982).

24) Ames, M. M., Moyer, T. P., Kovach, J. S., Mortel, C. G., and Rubin, J. : Pharmacology of amygdalin (Laetrile) in cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **6**, 51 (1981).

25) Takeuchi, S., Kochi, M., Sakaguchi, K., Nakagawa, K. and Mizutani, T. : Benzaldehyde as a carcinostatic principle in a pigs. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1449 (1978).

26) Kochi, M., Isono, N., Niwayma, M. and Shirakabe, M. : Antitumor activity of a benzaldehyde derivative. *Cancer Treat. Rep.*, **65**, 533 (1985).

27) Reed, N. D., Crowie, P. K. and Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immunodeficient animals. *B. Ssordeted. Karger Baselip*, 184 (1984).

28) Coombs, R. R. A. and Flset, M. L. : Detection of complete antibodies to egg albumin by means of sheep red cell egg albumin antigen unit. *Brit. J. Exp. Path.*, **35**, 472 (1954).

29) Stavistaky, A. B. : Micromethods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).

30) Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effect of stimulation and blokade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunology*, **38**, 577 (1976).

31) Sugimoto, M., Kojima, A. M., Yaginuma, K. and Gashira, Y. E. : Cell-mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 32 (1975).

32) Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussclorf, D. H. : Methods in immunology. *Benjamin*, **3**, 499 (1980).

33) Elliott, B. E. and Haskill, J. S. : Characteristics of thymus-derived bone marrow-derived rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973).

34) Cunningham, A. : Plaque assay for antibody producting cells. *Allergy*, **17**, 5 (1973).

35) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B. N. : Etude quantitative du l'acivite granulopexique du systeme reticuloenthelial chezla souris. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 43 (1945).

36) Newton, G. W., Schmict, E. S., Lewis, J. P., Conn, E. E. and Lawrence, R. : Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanide poisoning in man. *West. J. Med.*, **134**, 97 (1981).

37) Adewusi, S. R. and Oke, O. L. : On the meta-

bolism of amygdalin. I. The LD_{50} and biochemical changes in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, 1080 (1984).

38) Adewusi, S. R. and Oke, O. L. : On the metabolism of amygdalin. II. The distribution of β-glucosidase activity and orally administered amygdalin in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, 1084 (1984).

39) Leor, R., Michaeli, J. M., Brezis, M. and Stessman, J. : Laetrile intoxication and hepatic necrosis: A possible association. *South Med. J.*, **79**, 259 (1986).

40) Harkness, D. R. and Roth, S. : Clinical evaluation of cyanate in sickle cell anemia. *Prog. Jematol.*, **9**, 157 (1975).

41) Littleton, M. : AMA department of drugs. Sodium nitroprusside. *Publishing Science Group, INC.*, **3**, 74 (1977).