

으기피로부터 분리된 조다당 분획물의 면역자극활성 및 Cisplatin 과의 병용에 의한 항암 상승작용의 유도

하은숙 · 황수현* · 유광원** · 신광순* · 조형민* · 김창한*** · 박우문 · 윤택준**
(주) 구푸, *경기대학교 식품생물공학과, **청주과학대학 김치식품학과, ***건국대학교 동물자원연구소
(Received May 27, 2003; Revised June 16, 2003)

Immunostimulation Activity of the Crude Polysaccharides Fractionated from *Eleutherococcus senticosus*, and its Application to Prevent of Tumors by Combination Therapy with Cisplatin

E. S. Ha, S. H. Hwang*, K.-W. Yu**, K.-S. Shin*, H. M. Cho*,
C. H. Kim***, W.-M. Park and T. J. Yoon**

Research Team, GOOFOO Inc.

*Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University

**Dept. of Kimchi & Food Science, Chongju National College of Science & Technology

***Animal Resource Research Center, Konkuk University

Abstract — In order to study the clinical usefulness of crude polysaccharides fractionated from *Eleutherococcus senticosus*, EN-3, in eliminating tumors, we have investigated the effect of combination therapy on the murine tumor metastasis and growth models. In experimental metastasis of colon26-M3.1 cells, prophylactic intravenous (i.v.) administration of EN-3 (0.5, 5, and 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) inhibited tumor metastasis compared with tumor control group in 33.6, 66.8, and 81.8% respectively. The administration of EN-3 (50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) also exhibited a 66.1% therapeutic effect on lung tumor metastasis. Although EN-3 induced no toxic effect on both tumor cell and normal splenocyte in the concentration below 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in *in vitro*, it induced significant proliferating activity on normal splenocyte in the concentration-dependent manner. In an analysis of NK-cell activity, i.v. administration of EN-3 (4~100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) significantly augmented NK cytotoxicity to YAC-1 tumor cells. The combination treatments of cisplatin (10 μg) and EN-3 (5 μg) induced synergistic effect on the inhibition of tumor metastasis in experimental tumor metastasis model produced by colon26-M3.1 cells. In addition, the combination treatments also exhibited prolongation of lifespan in S-180 tumor bearing mouse for over the 60 days. Even though cisplatin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) exhibited cytotoxicity to tumor cells and inhibited tumor growth over 95% in *in vitro*, combination treatment with EN-3 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was induced splenocyte proliferation and produced cytokines, such as TNF- α , IL-1 and IL-12, from the macrophages. These results suggested that EN-3 stimulate immune system non-specifically and apply to the biological response modifiers (BRM) in chemo-immunotherapy for tumor prevention.

Keywords □ *Eleutherococcus senticosus*, BRM, tumor metastasis, immunostimulation activity, chemo-immunotherapy

익신종양 즉, 암의 극복을 위한 방법으로 수술요법(surgery), 방사선요법(radiation therapy), 약물요법(chemotherapy) 및 면역요법(immunotherapy) 등이 이용되고 있으나 악성종양의 억제 및 재발의 문제는 여전히 심각하게 대두되고 있는 실정이다. 또한, 실질적으로 종양의 치료에서도 1차종양은 수술요법을 통하여 제거될 수 있으나, 수술부위에 남겨진 소량의 암은 다시 성장하면

서 암 자체의 특성상 전이력을 획득할 수 있고, 이렇게 성장하여 악성화 된 종양은 면역요법, 약물요법 혹은 방사선요법 단독으로는 임상에서 치료효과의 한계를 보이고 있다. 따라서 많은 학자들은 이러한 종양 극복의 어려움을 해소하기 위한 방법으로 면역요법을 포함하는 병용 투여법에 기대를 가지고 있으며,^{1,2)} 본 연구 또한 이러한 항암 상승작용을 유도하는 biological response modifier(BRM) 활성물질의 연구에 관하여 진행되었다. 동물실험 모델이나 임상에서의 화학요법은 전이암 혹은 고형암에 대하여 일부 치료활성을 유도하기는 하지만 만족할 수준의 치료효과를 유도하기 위하여 농도를 높일 경우, 화학요법 자체가 가지는 조

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-245-7096 (팩스) 031-253-1165
(E-mail) yoon_tj@hanmail.net

혈계, 면역계 및 대사관련 장기손상 등의 심각한 부작용을 야기하여 결국 외형적으로 심한 체중감소 등의 부작용이 유도된다.³⁾ 특히, cisplatin은 종양세포를 이용한 항종양 실험에서 항암활성이 강한 물질로 나타났으며^{4,5)} 임상시험에서도 우수한 효과가 인정되어 고환암, 난소암, 방광암, 자궁암 및 전립선암 등의 고형암 치료제로서 지금까지 널리 사용되고 있다.^{3,6)} 그러나 cisplatin은 강한 신독성과 오심, 구토 및 내이신경독성 등의 부작용을 나타내기 때문에 그 사용에 상당한 제약을 받고 있다.^{7,8)} 한편, BRM 활성을 가지는 물질들은 동물실험모델에서 주로 예방적인 암 증식 억제활성을 유의하게 유도는 하지만 연명을 실험에서 완벽한 치료효과를 기대하기는 어렵다.⁹⁾ 따라서 종양의 치료효과에 대한 증진차원에서 BRM 활성을 나타내는 물질의 탐색은 약물요법과의 병용투여에 의하여 효율적인 치료효과를 유도를 위하여 중요한 의미를 갖는다고 볼 수 있다.^{10,11)}

오가피(*Eleutherococcus senticosus*)는 예로부터 한방에서 강장(強壯), 강정(強精) 또는 신경통, 관절염 등과 같은 염증작용과 관련된 질병 및 증풍과 당뇨에 이용되는 등 한방에서는 그 활성범위가 매우 넓은 약재로 인식되어 사용되어 왔다. 한편, 오가피에 대한 과학적 연구는 주로 러시아와 유럽에서 시작되었고, 최근에 Davydov¹²⁾에 의하여 오가피의 생리활성은 주로 항피로효과, 대사 촉진작용, 수면연장작용 등에 탁월한 활성이 있는 adaptogenic activity와 항알러지효과,¹³⁾ 항산화작용,¹⁴⁾ 항암작용¹⁵⁾ 및 면역계의 기능조절 및 면역증강효과¹⁶⁾도 있다고 보고하였다. 특히, 오가피의 면역계에 미치는 활성은 주로 cytokine의 inducer로서의 작용¹⁷⁾ 및 비특이적 면역자극효과에 관한 것^{18,19)} 등이 발표되고 있으나 그 활성에 기인되는 종양의 억제활성에 관한 것은 상대적으로 적은 실정이다.²⁰⁾ 또한 발표된 종양의 억제활성에 관련된 것도 과거에 주로 러시아에서 항방사선 활성²¹⁾ 및 발암억제²²⁾의 측면에서 임상조사를 실시한 것이 주를 이루고 있으며, 항암제와의 병용투여에 대한 논문은 오가피의 현대적 실험초기인 1960년대에 수행된 것 이외에는 없는 것으로,^{23,24)} 악성종양의 치료에 있어서 항암제와의 병용투여에 의한 상승작용의 유도는 오가피의 임상적용 가능성 제시에 있어서 중요한 의의를 가진다고 사료된다.

따라서, 본 실험에서는 오가피의 열수추출물로부터 조제된 조다당 획분인 EN-3의 면역자극활성을 조사함으로써 BRM로서의 가능성을 확인하였으며, EN-3와 cisplatin과의 병용투여에 의한 항암 증진효과를 조사함으로써, 종양에 대한 chemo-immunotherapy(화학-면역요법)에 적용가능한 면역조절제, BRM로서의 개발 가능성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

오가피의 열수추출물로부터 조다당 획분(EN-3)의 조제
건조된 오가피 100 g에 증류수 2 l를 첨가하고 증류수가 반으

로 감소될 때까지 100°C에서 추출한 후 금속체를 이용하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고 7,000 rpm에서 30분간의 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 오가피의 열수추출물로 하였다. 열수추출물은 다시 5 l의 메탄올로 1시간씩 5회에 걸쳐 환류를 거친 후 원심분리하여 메탄올 가용성 획분과 불용성 획분으로 분리하였다. 메탄올 불용성 획분은 증류수에 재용해시킨 후 4배의 에탄올을 첨가하고 12시간 교반, 원심분리하여 메탄올-불용성/에탄올-가용성 획분을 분리하고 침전물은 증류수에 재용해시키고 투석한 후 원심분리, 농축, 동결건조를 거쳐 조다당 획분(EN-3)으로 조제하였다.

실험동물

생후 6~8주령의 자성 Balb/c 또는 ICR 마우스를 (주)대한바이오링크에서 분양 받아 경기대학교 식품생물공학과 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5~10마리씩 넣어 정수 된 물과 실험 동물용 펠릿사료(삼양사료주식회사)를 자유 공급하였고, 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

시약 및 세포배양

본 실험의 재료 물질인 오가피(중국산)는 대효제약(수원)에서 구입하여 사용하였으며, 종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco사에서, ⁵¹Cr(25 mR/hr/mCi)는 Dupont사에서 구입하였다. 실험에 적용한 항암제는 cisplatin(Sigma, Ltd.)을 사용하였으며 종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 S-180 sarcoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를 YAC-1 cell은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기에서 배양하였다.

Colon26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델

시료의 항종양 효과는 colon26-M3.1 lung carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다.²⁶⁾ 실험 동물로 Balb/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 2.7×10⁴의 colon26-M3.1 lung carcinoma 세포를 정맥주사(i.v.) 하였다. 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고, EN-3 단독의 활성은 종양접종 2일 전 혹은 1일 후에 1회 정맥주사 하였으며, cisplatin은 종양 접종 1일 후에 1회 주사하였다.

EN-3의 종양세포주에 대한 세포독성 조사

종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma는 $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ 의 밀도로 96-well plate의 각 well에 plating 하였고 여러 농도로 조정된 EN-3 및 cisplatin을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 2일간 배양하였다. 각 물질의 세포독성 효과는 MTT assay법²⁵⁾으로 조사하였다.

NK Cell Activity

6~8주령의 Balb/c 마우스에 EN-3을 정맥주사하고 3일 후에 마우스의 비장을 멸균적으로 취하여 비장세포를 조제했다. 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포(effector cell; E)와 NK-sensitive 세포로 알려진 ⁵¹Cr이 표지된 YAC-1 세포(target cell; T)를, E/T 비가 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1이 되도록 조정하여 6시간 동안 공동 배양하였다. 배양종료 후 NK 세포의 활성측정을 위하여 원심분리(900 rpm/5분)에 의해 배양상등액을 취하고, gammacounter(Packard)를 이용하여 표적세포(YAC-1)로부터 유리된 ⁵¹Cr의 양을 측정하였으며(⁵¹Cr-release 법²⁶⁾) NK 세포의 종양세포 살해능은 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{NK 세포 활성(\%)} = \frac{[(\text{실험방출량} - \text{자연방출량})]}{(\text{최대방출량} - \text{자연방출량})} \times 100$$

Sarcoma-180에 대한 생명연명율

6주령의 ICR 암컷 마우스에 5×10^5 의 Sarcoma-180(S-180) 세포를 복강 주사한 후 측정 시료로서 EN-3 혹은 cisplatin을 종양접종 후 1, 4, 7, 10, 13일에 걸쳐 총 5회 복강주사하고 60일간 마우스의 생존 여부를 조사하였다.

EN-3의 비장세포증식효과

6~8주령의 Balb/c 마우스에서 멸균적으로 비장세포(splenocyte)를 회수하여 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 조정 후 96-well plate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 plating 하였다. 그 후 여러 농도로 조정된 EN-3을 등량 첨가하고 3일간 배양함으로써 정상세포에 미치는 EN-3의 활성을 조사하였다. 대조군으로는 T-cell의 mitogen인 concanavallin-A(Con-A)를 최종농도가 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였으며, EN-3에 의한 비장세포의 증식활성은 MTT assay²⁵⁾법으로 수행하였다.

Macrophage로부터 cytokine의 유도분비 조사

Balb/c 마우스에 1% thioglycollate를 1ml 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10ml을 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수확한 PEC을 24 well culture plate에 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지

않은 세포를 제거하였다. 그 후 적정농도로 조정된 EN-3를 단독 혹은 cisplatin과 동시에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후, macrophage의 배양상등액을 회수하였고 배양 상등액에 유도 분비된 TNF- α , IL-1, IL-12 등의 cytokine 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Phamingen, USA)을 구입하여 조사하였다.

실험결과

EN-3의 예방적 암전이 억제 활성

오가피의 열수추출물로부터 조제된 조다당 분획물질인 EN-3의 선천적 면역(innate immunity) 증진활성을 조사하기 위하여 colon26-M3.1 lung carcinoma를 이용한 동물실험모델에서 종양 전이에 미치는 활성을 측정하였다(Table I). 종양접종 2일전에 0.5, 5 및 50 μg 의 EN-3를 각각 1회 정맥 투여한 결과, 33.6, 66.8 및 81.1%의 유의한 예방적 전이억제 활성을 보였다. 한편, 종양접종 1일 후에 EN-3를 동일한 농도로 투여한 결과는 예방적 투여의 결과에 비하여는 낮은 활성을 보였으나 50 μg 의 투여군은 통계적인 유의성이 없었다. 이러한 결과로 EN-3의 투여가 동물의 항원 비특이적인 면역자극활성을 유도한다는 것을 알 수 있었으며,²⁶⁾ 실험에 적용한 농도에서 외형상 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다.

EN-3의 lymphocytes 증식활성 및 종양세포주에 대한 세포독성 효과

Fig. 1의 결과에 제시한 바와 같이 EN-3는 *in vitro*에서 비장세포를 직접 자극하여 증식활성을 높이는 mitogenic effect가 있

Table I – Anti-metastasis effect of EN-3 on lung metastasis produced by i.v inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells

I) Prophylactic effect		
Treatment dose (ug/mouse)	No. of lung metastasis (Inhibition %) of colon26-M3.1	
	Mean±SD	Range
Tumor control (untreated)	163.6±33.4	137~221
0.5	108.7±15.0 (33.6)	94~124
5	54.3±6.6 (66.8)	50~62
50	31±8.2 (81.1)	24~43
II) Therapeutic effect		
Treatment dose (ug/mouse)	No. of lung metastasis (Inhibition %) of colon26-M3.1	
	Mean±SD	Range
Tumor control (untreated)	50.8±15.0	42~77
0.5	49.4±6.0	40~55
5	38.6±5.1 (24.0)	33~44
50	17.2±6.3 (66.1)	12~27

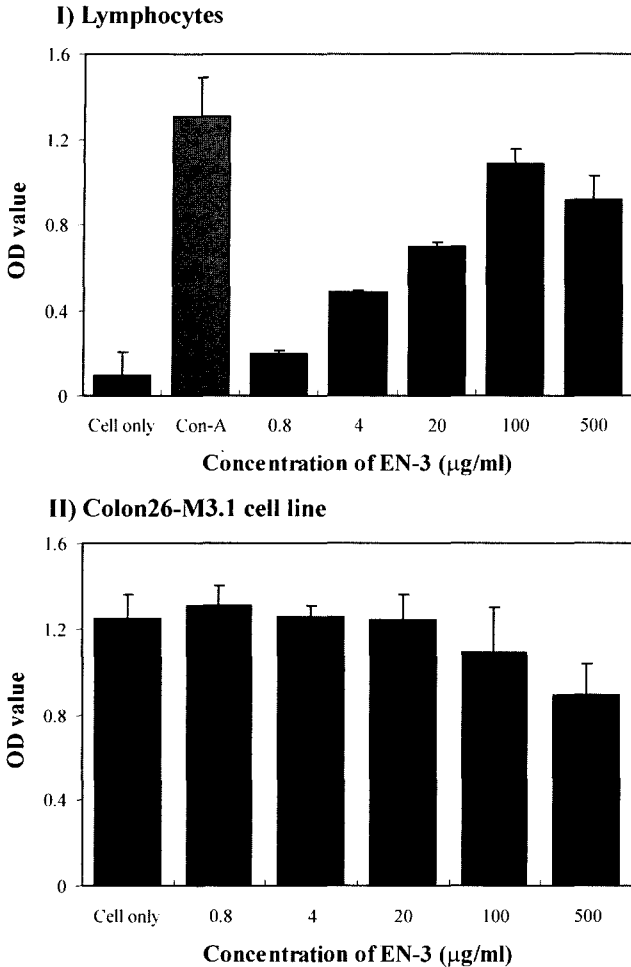


Fig. 1 – Effect of EN-3 on the normal splenocyte and the tumor cells *in vitro*.

음을 확인하였고, 그 활성은 100 µg/ml에서 최고를 보였다. 한편, 종양세포에 대한 세포독성 효과를 조사한 결과, 100 µg/ml까지의 농도에서는 종양세포에 직접적인 독성을 나타내지 않는 결과를 보였고, 500 µg/ml의 고농도에서도 일부의 증식 억제활성(약 23% 억제)만 보임으로서 EN-3는 종양세포를 직접 살해하는 독성효과는 매우 낮은 결과를 보였다.

EN-3의 NK 세포 활성

EN-3의 NK 세포 활성의 증식효과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이, EN-3를 정맥주사하고 2일이 경과된 군의 비장세포는 대조군에 비하여 YAC-1의 살해효과가 증강되었다. 즉, EN-3가 투여된 마우스의 비장세포는 투여된 EN-3의 농도 및 E/T ratio에 의존적으로 YAC-1 세포의 살해활성을 보였으며, NK 세포를 활성화시키는 EN-3의 농도는 마우스에서 20 µg까지 유효한 결과를 나타냈다.

Cisplatin에 의한 종양전이 억제효과에서 EN-3의 상승작용

본 실험은 종양전이 실험모델에서 항암제인 cisplatin에 의한

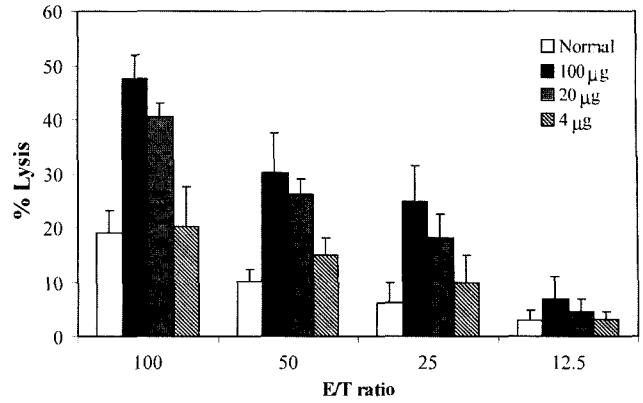


Fig. 2 – Effect of EN-3 on the enhancement of NK-cell activity.

전이억제효과의 유도 및 EN-3의 병용투여에 의한 치료활성의 상승효과를 조사하기 위하여 수행하였다. 종양접종 1일 후 5 µg의 EN-3 단독투여는 일부 암전이 억제활성을 유도하였으나, 통계적인 유의성은 없는 결과를 보임으로서 Table I의 결과와 같은 경향을 보였다. 한편, 동일한 시기에 cisplatin 단독 80 µg의 투여는 약 95%의 종양전이 억제활성을 유도하였으나, 1마리가 폐사하였으며 나머지는 극심한 체중감소현상(약 20±5%)을 보였다. 또한 부작용을 나타내지 않는 농도인 10 µg의 투여는 체중감소 현상인 외형적인 부작용은 관찰되지 않았으나, 통계적인 유의성이 없이 종양의 전이를 증진하는 결과를 보였다. 비록 결과에 제시하지는 않았지만 20 µg의 cisplatin 투여는 더한 종양의 전이를 증진시켜 대조군에 비하여 30% 정도의 종양전이 증진효과를 보였다. 또한 5 µg의 EN-3 단독 투여는 종양의 전이를 약 20% 억제하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 한편, 유의한 활성을 나타내지 않은 5 µg의 EN-3와 10 µg의 cisplatin을 병용 투여한 결과, 73% 이상의 높은 항종양 전이 활성이 유도되었다 (Fig. 3).

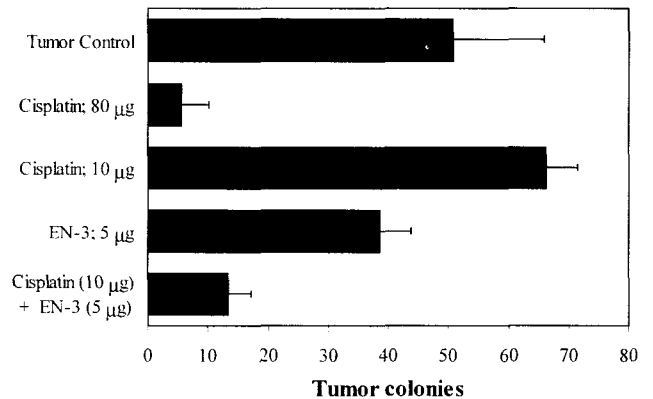


Fig. 3 – Induction of synergistic effect of EN-3 on the therapeutic anti-metastatic activity in tumor inoculated mouse treated with cisplatin.

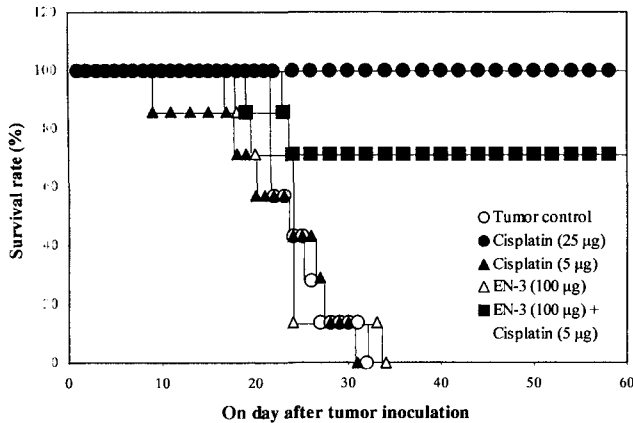


Fig. 4 - Antitumor effect of the combination therapy in S-180-bearing mice.

EN-3의 투여가 복강암을 이식한 마우스의 연명율에 미치는 효과
 복강암이 증식하고 있는 ICR 마우스를 이용하여 EN-3와 cisplatin의 병용 투여에 의한 수명 연장 효과 실험을 실시하였다. S-180 tumor cell을 복강 주사 한 후, +1, +4, +7, +10, +13 일에 EN-3와 cisplatin을 동시 투여하고 60일간의 생명 연장율을 조사하여 Fig. 4와 같이 얻을 수 있었다. 복강암의 증식억제에서 cisplatin 및 EN-3의 활성은 전이암의 경우와는 다른 경향을 보여 cisplatin의 경우 25 µg의 복강투여는 담낭숙주에서 100%의 생명연장율을 유도하였다. 그러나 전이암에서의 결과와는 달리 100 µg의 EN-3의 복강투여도 복강암에서 유의한 항암활성을 유도하지 못했다. 그러나 암증식 억제활성을 유도하지 못했던 5 µg의 cisplatin과 100 µg의 EN-3 병용투여는 암의 증식 억제에 상승작용이 유도되어 70% 이상의 마우스에서 60일 이상의 생명연장이 유도되었다(Fig. 4).

EN-3와 Cisplatin의 동시배양에 의한 비장세포의 증식효과

오가피 열수추출물의 조다당 분획물질인 EN-3는 마우스 비장세포의 증식을 유도하는 mitogenic effect가 있음을 이미 확인하였다. 본 실험은 *in vitro*에서 정상마우스의 비장세포와 cisplatin 단독 및 Con-A(2 µg/ml) 또는 EN-3(100 µg/ml)를 동시에 배양할 때의 비장세포의 증식활성을 조사한 것이다(Fig. 5). Cisplatin은 암세포에 대하여 높은 세포독성효과를 보여 암세포의 증식을 50% 억제하는 ED₅₀ 값이 약 0.5 µg/ml 수준이었고 2.5 µg/ml의 농도 이상에서 생존하는 암세포는 없었다. 한편, cisplatin을 정상 마우스의 비장세포에 처리한 결과에서 비장세포의 독성효과는 휴지기의 비장세포이기 때문에 스스로 증식활성이 없어서 MTT 용액과 반응성이 낮게 나타나서 정상비장세포의 MTT assay는 cisplatin의 정확한 독성효과를 측정할 수 없었다. 그러나 mitogen인 Con-A와 시료인 EN-3를 첨가하고 배양한 결과는 흥미로운 사실을 제공하였다. 암세포의 증식을 100% 억제했던 10 µg/ml의 cisplatin

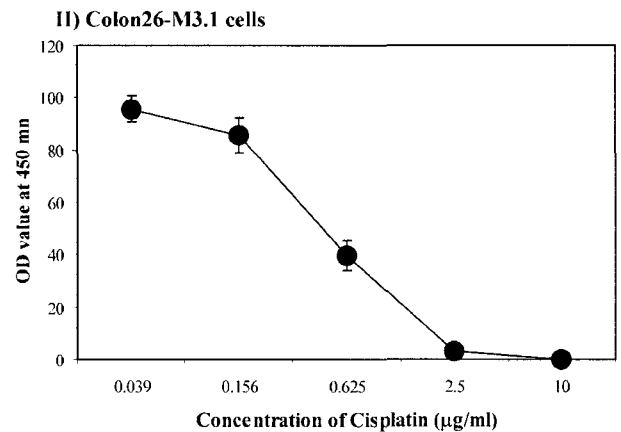
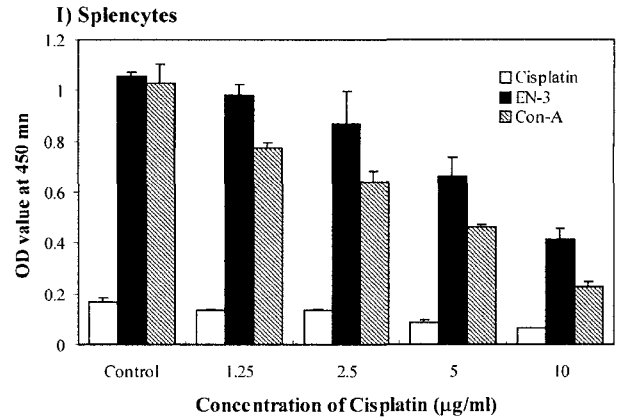


Fig. 5 - Effect of combination treatment by EN-3 and cisplatin on splenocytes.

을 처리한 농도에서도 Con-A 혹은 EN-3가 첨가된 경우에는 비장세포의 증식활성이 유도되었고, 암세포의 증식을 약 80% 억제하는 1.25 µg/ml의 cisplatin의 농도에서도 비장세포는 cisplatin 무처리 대조군의 증식활성과 동일한 활성을 보였다. 즉, EN-3 혹은 cisplatin과의 동시배양은 Con-A의 경우와 유사하게 항암제인 cisplatin이 면역세포에 대하여 작용할지라도 작동세포로의 전환을 유도할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 그 이유는 이들 시료의 mitogenic 활성이 cisplatin의 약리작용에 우선하여 작동하거나 cisplatin 처리하고 생존한 비장세포에 대하여 증식활성을 유도한 것으로 생각되는 바, 이후 결과에 대한 자세한 연구가 요구되었다.

Cisplatin과 EN-3의 동시배양에 의한 macrophage로부터 cytokine의 유도

활성화된 macrophage는 여러가지 cytokines을 유도하고 이들은 면역조절능력을 가진다는 것은 잘 알려져 있다.²⁷⁾ 또한 macrophage는 특정 자극을 받으면 종양세포에 대한 작동세포(killer)로의 기능을 획득한다고 보고되고 있다.²⁷⁾ 따라서 cisplatin에 노출된 macrophage의 종양에 대한 반응성에서 EN-3의 역할을 cytokines 측정으로 조사하였다(Fig. 6). Macrophage를 어

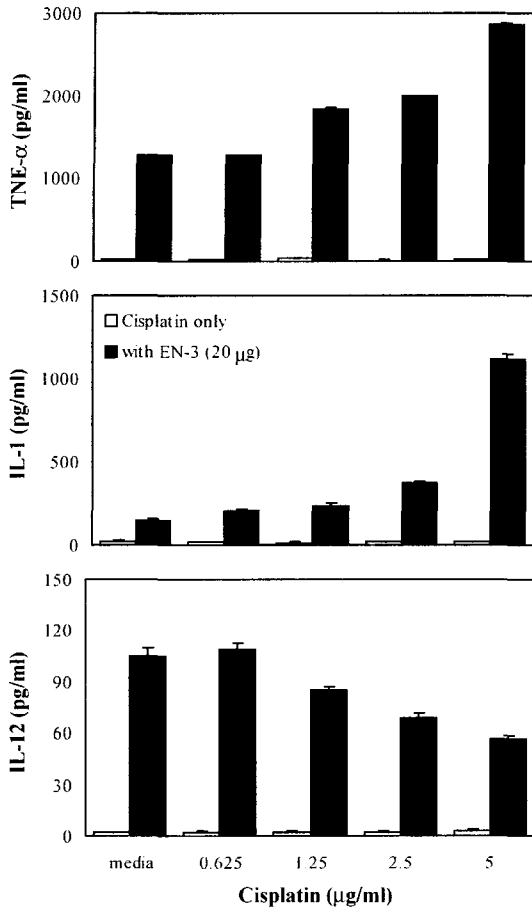


Fig. 6 – Induction of cytokines from peritoneal macrophage stimulated with combination treated by EN3 and Cisplatin.

떠한 자극 없이 배양배지로만 배양한 상등액 및 단독으로 처리한 여러 농도의 cisplatin(0.625~5 μg/ml)군의 경우에는 실험에 적용된 TNF-α, IL-1β 및 IL-12의 모든 cytokines에서 생산성이 없었으나 EN-3와 cisplatin과 동시배양 상등액은 모두 cytokine에서 높은 생산성을 보여 EN-3의 macrophage의 자극능이 있음을 확인할 수 있었다. 즉, EN-3는 macrophage를 직접 자극하여 cytokines를 생성하는 능력이 있고, macrophage가 독성을 나타내는 cisplatin에 노출될 경우에도 macrophage가 생존하는 동안은 유의한 cytokines의 생산성을 나타나게 하는 활성이 있다.

고찰

화학요법에 사용되는 항암제는 대부분 면역억제작용이 있기에, 면역자극제 혹은 조절제를 이용하여 병용 투여하는 방법(chemo-immunotherapy)은 성공적인 임상예의 적용을 위하여 필수적인 요소로 고려되고 있다.^{1,2)} 본 논문은 유의한 종양증식 혹은 전이의 억제제를 위하여 보다 우수한 화학-면역요법의 방법을 찾기 위하여 면역자극활성이 있는 EN-3의 응용가능성을 조사하고자 실

시하였다. 본 실험에 사용된 BRM은 오가피의 열수추출물로부터 얻어진 조다당 분획물질인 EN-3를 이용하였고, 화학요법을 위한 항암제로는 임상에서 여러 종류의 암에 대하여 광범위하게 사용하는 대표적인 항암제의 하나인 cisplatin^{4,8)}을 사용하였다. 여러 BRM 활성을 가지는 물질은 항암제의 종양치료에서 그 면역 자극활성에 기인되는 상승활성을 유도한다는 것은 잘 알려져 있다.^{1,2,9)} 그러나 본 실험에 사용된 EN-3 분획물질에 대한 보고는 거의 없는 실정하기에, 1차적으로 EN-3의 면역자극활성과 유효농도 및 그에 기인되는 종양의 예방 및 치료활성을 동물실험모델을 이용하여 조사하였다. Colon26-M3.1 lung carcinoma 및 기타 전이암 모델에서 면역자극물질의 전신투여에 의한 암전이 억제활성은 주로 비특이적인 면역자극 활성에 의하여 유도된다는 것은 잘 알려져 있다.^{26,28)} Table I에서 EN-3는 치료적으로 50 μg의 농도에서, 예방적으로는 5~50 μg의 투여에서 유의한 전이억제 활성을 보였으며, macrophage를 직접 자극하여 IL-1β 및 TNF-α, IL-12 등의 cytokine을 생산하는 cytokine inducer로의 활성도 확인되었다(Fig. 6). 이러한 염증성 cytokine은 종양에 살해효과를 가지는 macrophage 혹은 NK 세포의 분화에 직간접적으로 작용하는 것으로 보고되고 있다.²⁶⁻²⁹⁾ 특히, IL-12는 면역반응의 초기단계에서 생산되는 cytokine으로서 IFN-γ의 생산에 직접 관여하며, 따라서 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte; CTL)을 유도하는 세포성 면역의 매개자로서의 역할 뿐 아니라 암세포의 존재 시 암세포에 작용하는 NK-cell의 활성화에 직접 항암활성의 유도에서 가장 중요한 cytokine의 하나로 인정되고 있다.²⁹⁾ 본 실험에서도 4~100 μg의 EN-3가 투여된 마우스의 비장세포는 NK-sensitive cell인 YAC-1의 살해효과를 농도 의존적으로 높임으로서 암세포에 살해활성을 가지는 NK-cell이 유도된다는 것이 확인되었고(Fig. 2), 또한 4~500 μg/ml의 농도에서 정상비장세포에 대한 mitogenic effect가 있음을 확인하였다(Fig. 5). 동물실험에서 치료적인 목적으로 50 μg의 EN-3 투여는 colon26-M3.1 lung carcinoma의 암전이를 유의하게 억제하였다. 종양에 대한 세포독성 실험에서 EN-3는 동물실험에서 적용한 colon26-M3.1 cell에 대한 세포독성 효과가 500 μg/ml에서는 일부(약 25%), 100 μg/ml의 농도 이하에서는 유의한 독성 효과가 유도되지 않음으로 EN-3의 동물에서의 항종양 효과는 종양세포에 대한 세포독성이 아니라 면역세포의 자극에 기인된 것으로 생각되었다. 혈관을 통하여 전이되는 암은 숙주로부터 암의 제거에 작용하는 NK-cell, monocytes 및 lymphocytes 등과 접촉하게 된다.³⁰⁾ EN-3의 항종양 활성이 치료적인 것보다 예방적인 면에서 높은 활성을 유도한 것(Table I)은 접촉된 암세포가 목표기관(target organ)인 폐에 접촉(adhesion)하여 증식되기 전에 이미 활성화된 종양관련 작동세포가 혈관으로 접촉된 암세포와의 접촉이 유도됨으로서 일어나는 현상으로 사료된다.

복강 내 고형암의 증식은 항암제 단독으로 100%의 치료효과

가 유도되거나 체중감소의 부작용이 유도되며, 이러한 부작용의 극복을 위하여 병용 투여하는 여러 물질들이 보고되었으나,^{1,2,9)} 여러 동물모델에서 BRM 단독으로 고형암의 증식을 완전하게 억제하는 것은 잘 유도되지 않는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 따라서 항암제와의 병용투여에서 화학요법에 의한 암세포의 살해활성은 항암작용에서 가장 직접적인 요소로 간주되고 있다.^{1,2,9)} 결국 유의한 항암활성을 도출하기 위한 병용투여의 목적은 임상에서 가장 우수한 항암활성의 유도에 있다. 즉, 병용 투여제가 항암제의 부작용을 억제 혹은 완화시키거나, 항암제 단독으로는 유의한 항암활성을 유도하지 못하는 낮은 농도의 항암제와 병용 투여제를 동시 투여시 항암활성의 상승효과가 유도된다면 병용투여제로의 의의가 있다고 사료된다.^{1,2,9)} Fig. 3의 전이암 억제에의 결과는 이러한 측면에서 매우 중요한 사실을 제시하였다. 즉, 이 결과는 항암제 치료 시 EN-3 병용투여는 종양에 대하여 상승적인 치료활성이 유도됨을 보여주었고, 따라서 부작용을 가지는 화학요법에 EN-3의 응용은 유의한 결과를 얻을 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한 종양증식의 억제를 연명율로 표시한 Fig. 4의 결과도 유사한 결과를 나타냈다. 이런 수명 연장 효과는 EN-3의 복강 투여에 의한 결과로 면역 초기 단계의 면역세포인 macrophage 나 T cell, B cell 등의 활성화에 의한 여러 가지 cytokine의 분비, 촉진 등에 의하여 암세포의 성장을 방해하거나 cisplatin의 독성에 의한 부작용을 경감하는 효과를 가져왔고, 특히 NK cell의 활성화가 진행되면서 복강에서 자라는 S-180의 성장을 방해하여 생명을 연장시키는 효과를 가져왔을 것으로 사료된다. 이상 전이암과 복강 고형암의 결과에서 EN-3는 낮은 농도의 항암제와 병용 투여시 항암제 단독의 경우에 비하여 높은 항암활성의 상승효과를 유도함으로써 항암제와 병용투여가 가능한 물질로 응용 가능함이 증명되었다. Fig. 5의 결과는 *in vitro*에서 암세포의 증식을 99% 억제한 2.5 µg의 cisplatin을 정상비장 세포에 적용 시 EN-3의 병용처리는 약 100%의 비장세포 증식활성을 유도하였고, 또한 cisplatin이 처리된 macrophage도 EN-3의 동시 배양은 유의한 항암활성을 가지는 작동세포의 분화에 작용하는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-12 등의 cytokine의 생산을 유도하였다(Fig. 6). 이 결과는 동물에서 cisplatin의 투여에 의한 면역억제능이 EN-3에 의하여 회복될 수 있음을 보여주는 결과로서 EN-3의 강한 면역작용 부활능을 증명하는 결과로 사료되었다.^{26,27)}

결론적으로 오가피의 열수추출물로부터 조제된 조다당 분획물질인 EN-3는 동물실험에서 강한 면역자극활성을 유도하며, 항암제와 병용 투여시 항암제의 활성을 증진시키는 상승작용이 유도됨으로써 고형암에 대한 chemo-immunotherapy의 면역자극제로서 응용 가능한 물질로 사료되었다. 현재 EN-3의 세포성 면역계에 미치는 활성과 기전의 연구와 더불어 자세한 물질의 규명 및 다른 종류의 고형암에 대하여도 동일한 활성이 유도되는지에 대한 연구를 수행 중에 있다.

결 론

오가피의 열수추출물로 부터 용매분획을 통하여 조제된 조다당 분획물질인 EN-3는 colon26-M3.1 lung carcinoma를 이용한 실험동물모델에서 종양의 전이를 유의하게 억제하였다. 종양접종 1일 전에 0.5, 5, 50 µg의 EN-3를 투여한 결과 각각 33.6, 66.8 및 81.8%의 높은 전이억제활성을 보였고, 종양접종 1일 후의 EN-3 투여는 50 µg의 투여에서 66.1%의 종양전이 억제활성을 보였다. EN-3는 100 µg/ml 이하의 농도에서 비장세포에 대하여는 농도 의존적인 세포증식활성을 보였고, colon26-M3.1 lung carcinoma 주에 대하여도 직접적인 독성활성은 없었다. 비장세포의 NK-cell 활성을 YAC-1의 살해효과로 조사한 결과, 20~100 µg의 EN-3가 투여된 마우스의 비장세포는 정상마우스의 비장세포에 비하여 2배 이상 높은 NK-cell 활성이 증진되었다. 종양전이 모델에서 항종양 활성을 가지지 않는 농도의 cisplatin(10 µg) 및 EN-3(5 µg)의 동시투여는 약 75%의 높은 종양전이 억제활성을 유도하였다. S-180이 접종된 ICR 마우스에서 생존율을 증진시키지 못한 농도의 cisplatin(5 µg)과 EN-3(100 µg)의 동시투여는 종양접종 60일까지 70% 이상의 생존율을 유도하였다. 종양세포에 독성을 나타내는 농도의 cisplatin과 EN-3 100 µg/ml를 비장세포에 첨가하고 배양한 결과 EN-3에 의한 비장세포의 증식활성이 유도되었다. 세포독성을 야기하는 농도의 cisplatin 단독으로는 macrophage로부터 cytokine이 유도되지 않았으나 EN-3가 동시에 배양된 경우는 유의한 TNF- α , IL-1 β 및 IL-12 등의 cytokine이 유도되었다. 이상의 결과 오가피의 열수추출물로부터 조제된 조다당 분획물질인 EN-3는 면역자극활성을 가지는 BRM 활성이 있었고, 항암제와 병용 투여하는 chemo-immunotherapy의 물질로 응용가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(벤처 및 중소기업기술개발지원 연구개발사업; HMP-01-PJ4-PG4-01VN01-0375)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Kudo, C., Saito, M. and Yoshida, T. : The inhibitory effect of preoperative immunochemotherapy on the lymph node metastasis of murine MM48 tumor. *Immunopharm.* **30**, 139 (1995).
- 2) Kadhim, S., Penney, C., Lagraoui, M., Heibein, J., Attardo, G., Zacharie, B., Connolly, T. and Gagnon, L. : Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. *Int. J. Immunopharmacol.* **22**, 659

- (2000).
- 3) Kociba, R. J. and Sleight, S. D. : Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diaminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. *Cancer Chemother. Rep.* **55**, 1 (1971).
 - 4) Rosenberg, B., Van-Camp, L. and Krigas, T. L. : Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* **205**, 698 (1965).
 - 5) Rosenberg, B., Van-Camp, L., Grimley, E. B. and Thomson, A. J. : The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J. Biol. Chem.* **242**, 1347 (1967).
 - 6) Connors, T. A., Johns, M. and Ross, W. C. J. : New platinum complexes with antitumor activity. *Chem. Biol. Interact.* **5**, 415 (1972).
 - 7) Kociba, R. J., Sleight, S. D. and Rosenberg, B. : Inhibition of dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cis-diaminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep.* **54**, 325 (1970).
 - 8) Ward, J. M. and Fauve, K. A. : The nephrotic effects of cis-diaminedichloroplatinum (II) (NSC-119875) in male F-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **38**, 535 (1976).
 - 9) Kudo, C., Saito, M. and Yoshida, T. : Curative treatments of murine colon26 solid tumors by immunochemotherapy with G-CSF and OK-432. *Immunopharm.* **29**, 235 (1995).
 - 10) Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E. : *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine* 291 (1988).
 - 11) Takemoto, N., Maruyama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M., Hosoya, E., Yamada, H., Kiyohara, H. and Cyong, J. C. : *Recent advances in the Pharmacology of Kampo Medicine* 345 (1988).
 - 12) Davydov, M. and Krikorian, A. D. : *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (*Araliaceae*) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 345 (2000).
 - 13) Yi, J. M., Hong, S. H., Kim, J. H., Kim, H. K., Song, H. J. and Kim, H. M. : Effect of *Acanthopanax senticosus* stem on mast cell-dependent anaphylaxis. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 347 (2002).
 - 14) Lin, C. C. and Huang, P. C. : Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acanthopanax senticosus*. *Phytother. Res.* **14**, 489 (2000).
 - 15) Hacker, B. and Medon, P. : Cytotoxic effects of *E. senticosus* aqueous extract against L1210 leukemia cells. *J. Pharm. Sci.* **73**, 270 (1984).
 - 16) Cheng, X. J., Li, P. Z., Sheng, X. H., Li, B. J. and Zhu, C. L. : Antitumor and immunological activities of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms polysaccharides. *Chinese J. Cancer.* **3**, 191 (1984).
 - 17) Schmolz, M. W., Sacher, F. and Aicher, B. : The synthesis of Rantes, G-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 and IL-13 in human whole-blood cultures is modulated by an extract from *Eleutherococcus senticosus* L. roots. *Phytother. Res.* **15**, 268 (2001).
 - 18) Steinmann, G. G., Esperester, A. and Joller, P. : Immunopharmacological *in vitro* effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. *Arzneimittelforschung.* **51**, 76 (2001).
 - 19) Bohn, B., Nebe, C. T. and Birr, C. : Flow-cytometric studies with *Eleutherococcus senticosus* extract as an immunomodulatory agent. *Arzneimittelforschung.* **37**, 1193 (1987).
 - 20) Kupin, V. I., Polevaia, E. B. and Sorokin, A. M. : Immunomodulating action of an *Eleuterococcus* extract in oncologic patients. *Sov. Med.* **5**, 114 (1987).
 - 21) Minkova, M. and Pantev, T. : Effect of *Eleutherococcus* extract on the radioprotective action of adeturone. *Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.* **13**, 66 (1987).
 - 22) Choi, Y. E., Katsumi, M. and Sano, H. : Triodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant. Sci.* **160**, 183 (2001).
 - 23) Monakhov, B. V. : Extract of *Eleutherococcus senticosus* maxim and the therapeutic activity of cyclophosphane, ethymidine, and benzo-TEPA. *Vopr. Onkol.* **13**, 94 (1967).
 - 24) Monokhov B. V. : Influence of the liquid extract from the roots of *Eleutherococcus senticosus* on the toxicity and antitumor activity of cyclophosphan. *Vopr. Onkol.* **11**, 60 (1965).
 - 25) Gerlier, D. and Thomasset, N. : Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* **94**, 57 (1986).
 - 26) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Baek, Y. J., Song, S. K., Lee, K. H., Azuma, I. and Kim, J. B. : Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int. J. Immunopharm.* **20**, 163 (1998).
 - 27) Saiki, I., Saito, S., Fujita, C., Ishida, H., Iida, J., Murata, J., Hasegawa, A. and Azuma, I. : Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine* **6**, 238 (1988).
 - 28) Yoo, Y. C., Saiki, I., Sato, K. and Azuma, I. : MDP-Lys (L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice. *Vaccine* **12**, 175 (1994).
 - 29) Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S. and Eigler, A. : Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* **62**, 2347 (2002).
 - 30) Fidler, I. J. : Macrophage and metastasis-a biological approach to cancer therapy: presidential address. *Cancer Res.* **45**, 4714 (1985).