

시스플라틴에 의한 세포고사에서 榆根皮의 효과

문미현, 전지영, 이선아, 신용진, 고석재, 문 구
원광대학교 한의과대학 내과학교실

ABSTRACT

Ulmi Cortex Prevents Cisplatin-Induced Apoptosis in Mice

Mi-Hyun Moon, Ji-Young Jeon, Seon-Ah Lee, Yong-Jeen Shin, Seok-Jae Ko, Goo Moon
Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effect of *Ulmi Cortex*(UC) on the cisplatin-induced cell death.

Materials and Methods : I examined several kinds of cell populations such as CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, macrophages and dendritic cells in spleen.

Result : When cisplatin was injected to mice, UC recovered total number of cells in spleen and also the number of T cells, macrophages and dendritic cells. UC also effected the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells such as CD25⁺, CD69⁺ cells. To further investigate the effect of UC on the cisplatin-induced cell death, I examined the death of splenocyte and total T cells. UC inhibited cisplatin-induced cell death.

Conclusion : Taken together, my results suggest that UC may be a beneficial oriental medicine for side effects during anti-tumor therapy.

-
- 교신저자 : 문 구
 - 전북 전주시 덕진구 덕진동 142-1번지 원광대학교 부속 전주한방병원 3내과
 - Tel : 063-270-1014 E-mail : gmoon@wonkwang.ac.kr
 - 접수 : 2008/ 10/ 13 수정 : 2008/ 12/ 12 채택 : 2008/ 12/ 22
 - 이 논문은 2007년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨

Key word : *Ulm*i Cortex, cisplatin-induced cell death, macrophages, dendritic cells. T cells(CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD69⁺)

1. 緒 論

癌은 정상세포가 여러 가지 자극으로 인해 유전 형질전환이 발생하여 세포의 형태학, 생물학, 화학, 물리학, 면역학적인 행동이 변한 변형세포가 유전적으로 무절제한 증식을 하여 형성된 변형된 세포 집단을 말하는 것¹⁻⁵⁾으로 이러한 癌의 발생 기전과 종류는 매우 다양하며 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法를 병행하여 치료하고 있다⁶⁾.

그 중 化學療法은 전신 요법으로 수술 전 일차 치료로 미세 전이 병소를 조기에 제거하고, 국소 종양의 크기를 축소 또는 소실시켜 수술이나 방사선요법의 효과를 극대화시키거나, 癌의 근치적 수술 후 잔류 세포암이나 미세전이 암세포의 완전한 파괴, 사멸을 위해 사용되고 있다⁷⁾. 그러나 화학요법에 사용되는 약물은 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 세포분열이 활발한 정상세포에도 손상을 입히기 때문에 골수기능저하, 간장기능장애, 신장 기능장애, 위장장애, 탈모증 등 여러 부작용을 일으킨다^{6,8)}.

이러한 화학요법의 대표적인 약물로 알려진 시스플라틴은 두면부, 목, 난소, 정자 등에 발생하는 다양한 악성 종양에 널리 사용되는 효과적인 항암제로 세포분열을 저해하고 세포고사를 유도하여 항암작용을 나타내는 약물로 알려져 있다^{9,10)}. 그러나 그 효능만큼 다양한 부작용이 있는데 그 중에 가장 많은 부분을 차지하는 것이 신장독성이다¹¹⁾.

시스플라틴을 투여한 환자 중 25~30%의 환자

가 신장독성을 보이고 있는데¹²⁾ 시스플라틴에 의한 신장 독성은 활성산소¹³⁾, caspase의 활성화¹⁴⁾, DNA 손상 및 미토콘드리아의 손상¹⁵⁾에 의해 나타난다는 보고가 있다. 따라서 시스플라틴에 의한 신장 독성은 세포고사, 세포괴사 및 염증이 중요한 기전으로 인식되고 있다^{16,17)}.

韓醫學에서 癌은 病程의 발생과 진행과정에 따라 昔瘤, 腸覃, 石瘕, 積聚, 癥瘕, 噎膈, 反胃 등의 다양한 病症으로 표현되어 왔으며, 癌의 發病要因에 대하여 <素問 評熱病論>에 “邪氣所湊 其氣必虛”¹⁸⁾, <素問 刺法論>에 “正氣在內 邪不可干”¹⁸⁾이라 하여 邪氣의 침입에 대한 正氣의 抗病能力에 따라 疾病의 발생과 진행이 결정된다고 인식하였다. 암치료시에는 發病機轉을 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 臟腑失調, 氣血虧虛 등으로 인식하였으며 邪實과 正虛의 단계에 따라 養血, 助陽, 益氣 등의 扶正法과 淸熱, 解毒, 化痰 등의 祛邪法을 함께 배합하여 사용하였다.⁷⁾

韓醫學에서 癌治療는 癌에 대한 인체의 방어능력을 강조하여 인체의 내적 환경과 조건을 변화시킴으로써 癌을 억제할 수 있으나 치료효과가 완만하고 病所部位를 제거하기 어려우며 癌細胞 살해능력이 강하지 않는 결점이 있다. 반면에 西洋醫學의 수술, 방사선, 화학요법 등은 癌의 病所를 제거해 癌의 진행을 제어할 수 있으나, 癌細胞를 제거함과 동시에 수술후유증, 면역기능억제, 정상세포독성, 다른 癌種 유발 등의 부작용을 야기할 수 있다. 따라서 인체의 면역력을 강화시키는 동시에 암세포에 대한 직접적인 치료효과를 높이면서, 서양의학의 부작용인 정상세포나 조직에 대한 독성

은 거의 보이지 않는 새로운 치료법을 韓醫學에서 모색하는 연구가 시도되고 있다.¹⁹⁾

榆根皮는 祛邪 작용이 강한 항암 약물로서 利水, 通淋, 消癰腫, 滲濕熱, 行津液 등의 효과가 있어¹⁸⁾ 임상에서 癌治療에 많이 응용되고 있다.榆根皮에 대한 실험적 연구로 항암효과²¹⁻²⁴⁾, 항산화효과^{25,26)}, 면역증진²⁷⁾, 진통²⁸⁾, 항염증²⁷⁻³⁰⁾, 항균효과³¹⁻³⁴⁾ 등에 대한 연구가 진행되어 왔다.

본 연구에서는 한양방협진에 의한 항암효과를 구명하기 위한 실험의 일환으로 위에서 언급한 榆根皮의 효과가 시스플라틴에 의한 세포 고사에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위해 榆根皮 추출물을 마우스에 경구 투여한 후 세포수의 변화와 세포 활성도를 조사한 in vivo 실험과 榆根皮의 농도를 각각 다르게 전처리한 세포에 시스플라틴을 처리하여 榆根皮의 농도에 따른 세포고사의 정도를 조사한 in vitro 실험을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 材

실험에 사용한 榆根皮는 움니허브(경북, 영천)에서 구입하여 물 1L에 100g을 넣고 2시간 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다.

2) 시 약

Anti-mouse CD4, CD8, CD25, CD44, CD69, CD62L, Mac-1, CD11c Ab은 BD Pharmingen (San Diego, CA)에서 구입하였다. 그 외의 시약들은 SIGMA(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

3) 실험 동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에서 구입하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 榆根皮의 투여 및 in vivo, in vitro 실험 모델

In vivo 실험의 경우, 榆根皮를 구강으로 각각 100mg/kg, 500mg/kg을 5일간 투여한 후, 시스플라틴을 복강으로 10mg/kg을 주사하고 3일 후 비장을 추출하여 실험하였다.

In vitro 실험의 경우, 비장 세포를 단일 세포로 만든 후 10% FBS media 1시간 동안 배양한 후 榆根皮를 각각 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml 전처리한 후 시스플라틴을 각각 2μM, 20μM, 200μM 주입하였다.

2) T 세포의 분리

마우스에서 비장을 채취하여 단일세포로 만든 후, RBC를 제거하였다. 이 세포를 MHC-Class II, NK-1.1, CD11c, CD11b, CD19 microbead를 이용하여 negative sorting하여 FACs flow로 T 세포의 순도를 조사하였다. 실험에 사용한 T 세포의 순도는 98% 이상이었다.

3) 유식세포 분석

비장 세포를 단일 세포로 만든 후에 항체를 이용하여 염색하였다. 먼저 비장 세포를 4°C에서 20분간 염색한 후 세척하였다. 세포 분석은 FACs flow를 이용하였으며 CellQuestPro 프로그램을 이용하여 분석하였다.

4) 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타냈으며, Student's *t* test를 이용하여 유의성을 평가하였고, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. 榆根皮가 시스플라틴 유도성 비장 세포의 고사에 미치는 영향(in vivo)

榆根皮를 구강으로 각각 100mg/kg, 500mg/kg을 5일간 투여한 후, 시스플라틴을 복강으로 10mg/kg

을 주사하고 3일 후 비장을 추출하여 전체 비장 세포의 수를 조사하였다. 대조군으로는 생리식염수 투여한 마우스의 비장 세포와 시스플라틴 10mg/kg을 주사한 마우스의 비장 세포를 사용하였다.

시스플라틴을 주사한 마우스의 비장은 현저하게 비장 세포가 감소하였으나, 楡根皮를 5일간 경구 투여한 후 시스플라틴을 복강 주입한 실험군에서는 정상 수준으로 비장 세포수가 회복되었다 (Fig. 1).

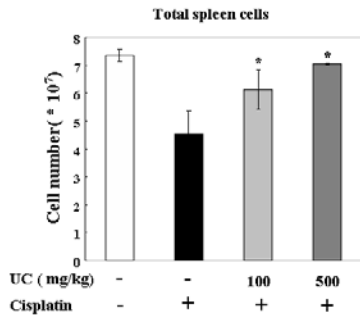


Fig. 1. UC inhibited Cisplatin-induced spleen cell death.

UC was orally given to mice (n=6 per group) at 100 mg/kg and 500 mg/kg for 5 day. The spleen were taken from the mice at 3 day after i.p. injection of cisplatin (10 mg/kg). The number of total spleen cells was measured. Data represent the mean \pm SEM of two separate experiments performed in duplicate. (*p<0.05)

2. 楡根皮가 시스플라틴 유도성 T 세포의 고사에 미치는 영향

비장에는 다양한 세포들이 존재한다. 그 중에서도 T 세포는 면역 조절 및 암세포의 고사를 유도하는데 중요한 의미를 갖기 때문에 본 실험에서도 T 세포의 수를 조사하였다. 시스플라틴만 주사한 집단에서는 T 세포수가 현저하게 감소하였으나, 楡根皮를 경구 투여한 후 시스플라틴을 주사한 집단에서는 농도 의존적으로 T 세포수가 회복되는 양상을 보였다(Fig. 2A).

다음은 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 수를

조사하였다. 시스플라틴만 주사한 집단에서는 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포 수가 감소하였으나, 楡根皮를 투여한 집단에서는 모두 농도 의존적으로 회복되었다(Fig. 2B, C).

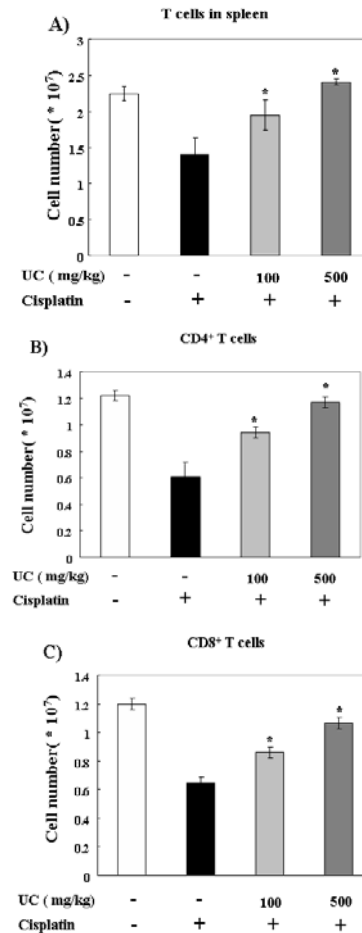


Fig. 2. UC inhibited Cisplatin-induced T cells death.

UC was orally given to mice (n=6 per group) at 100 mg/kg and 500 mg/kg for 5 day. The spleen were taken from the mice at 3 day after i.p. injection of cisplatin (10 mg/kg). The cells from spleen were analysed by Flow cytometer. The numbers of (A) total T cells, (B) CD4⁺ and (C) CD8⁺ T cells were measured. Data represent the mean \pm SEM of two separate experiments performed in duplicate. (*p<0.05)

3. 楡根皮가 시스플라틴 유도성 T 세포의 활성화에 미치는 영향

다음은 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 T 세포의 활성화 수용체들을 분석하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 시스플라틴은 CD4⁺ T 세포를 활성화시켜 CD25⁺, CD69⁺ T 세포의 비율을 증가시켰으나, 楡根皮를 투여한 집단에서는 정상 수준으로 활성화가 억제되었다(Fig. 3). 또한 CD8⁺ T 세포의 활성화 정도를 조사한 결과 楡根皮를 투여한 집단에서 CD8⁺ T 세포의 활성화가 억제되었다(Fig. 3).

또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 T 세포의 활성화 marker인 CD44, CD62L 수용체의 발현에는 영향을 미치지 못했다(Fig. 4).

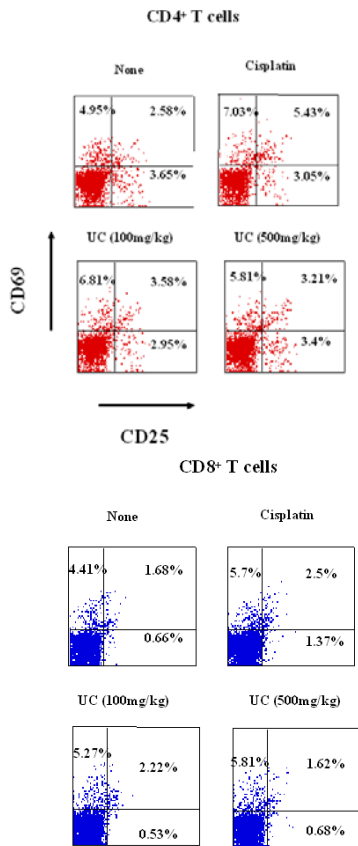


Fig. 3. UC inhibited Cisplatin-induced T cells activation.

UC was orally given to mice (n=6 per group) at 100 mg/kg and 500 mg/kg for 5 day. The spleen were taken from the mice at 3 day after i.p injection of cisplatin (10 mg/kg). T cells from spleen were stained with FITC-CD4 Ab, APC-CD8, PE-CD25, and PerCP-CD69 and then analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

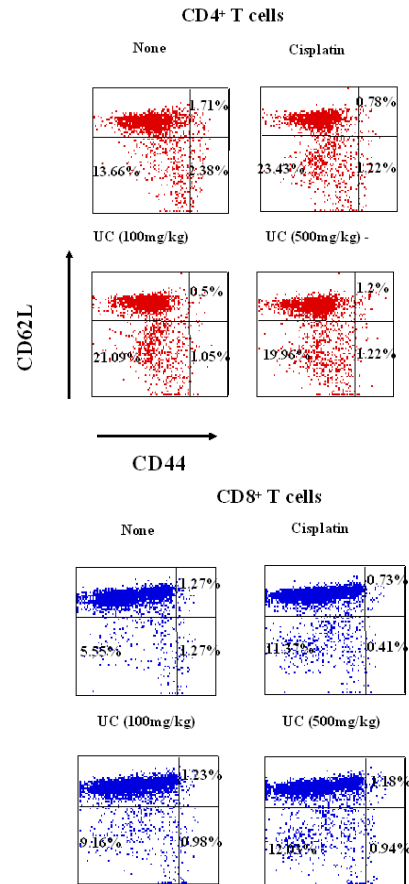


Fig. 4. UC inhibited Cisplatin-induced T cells activation.

UC was orally given to mice (n=6 per group) at 100 mg/kg and 500 mg/kg for 5 day. The spleen were taken from the mice at 3 day after i.p injection of cisplatin (10 mg/kg). T cells from spleen were stained with FITC-CD4 Ab, APC-CD8, PE-CD44, and PerCP-CD62L and then analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

4. 榆根皮가 시스플라틴 유도성 항원제시세포의 고사에 미치는 영향

시스플라틴을 투여한 마우스의 비장 세포와 T 세포의 수는 현저하게 감소하였으므로 다음 실험에서 T 세포의 활성화에 중요한 역할을 하는 항원제시세포의 수를 분석하였다. 항원제시세포를 분석하기 위하여 5일간 榆根皮를 경구 투여한 후 시스플라틴을 복강에 주입하고 3일 후 비장에서 대식 세포와 수지상 세포를 분석하여 그 수를 조사하였다.

Fig. 5와 같이 榆根皮를 투여한 집단이 시스플라틴에 의한 대식 세포와 수지상 세포의 고사를 억제시켰음을 보여주고 있다. 수지상 세포의 경우 농도 의존적으로 고사가 억제되었으나 대식세포의 경우 50mg/ml가 투여된 것이 100mg/ml 투여된 것보다 억제효과가 적었다(Fig. 5).

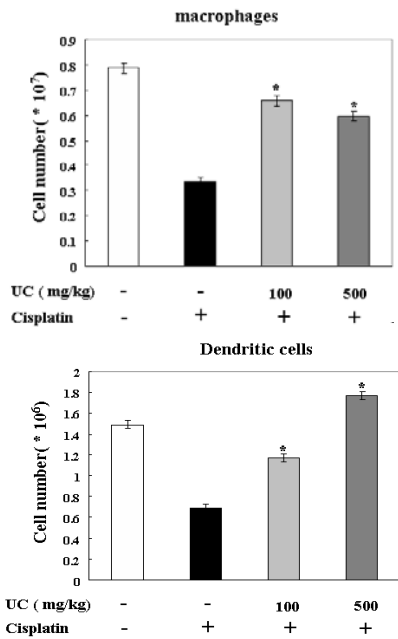


Fig. 5. UC recovered Cisplatin-induced antigen presenting cells death.

UC was orally given to mice (n=6 per group) at 100 mg/kg and 500 mg/kg for 5 day. The spleen were

taken from the mice at 3 day after i.p injection of cisplatin (10 mg/kg). The total cell number of macrophages and dendritic cells from spleen was analysed by Flow cytometer. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate. (*p<0.05)

5. 榆根皮의 시스플라틴 유도성 비장 세포의 고사에 미치는 영향(in vitro)

비장 세포에 榆根皮를 각각 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml 전처리하고 1시간 후에 시스플라틴을 2μM, 20μM 처리하였다. 榆根皮와 시스플라틴을 처리한 비장 세포를 24시간 배양한 후 비장 세포의 고사를 조사하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 榆根皮는 0.1mg/ml, 0.5mg/ml에서는 농도 의존적으로 시스플라틴에 의한 세포고사를 억제하였으나, 1mg/ml에서는 시스플라틴 단독 처리한 것보다 더 많은 세포고사를 보였다. 즉, 고농도에서는 榆根皮가 세포 독성을 보였음을 알 수 있다(Fig. 6).

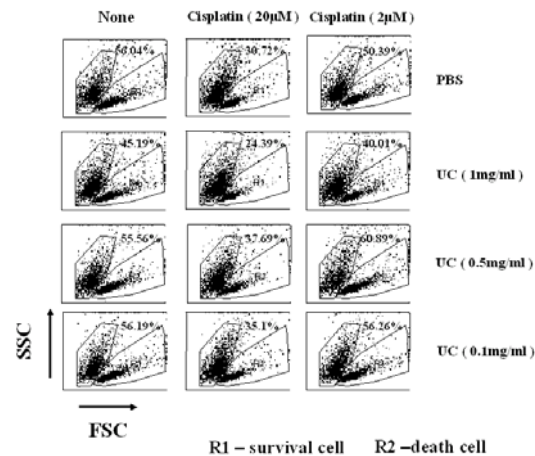


Fig. 6. UC prevented Cisplatin-induced cell death.

Splenocyte was treated cisplatin with or without UC for 24 hrs. The cells were analyzed using flow cytometer. Live and dead cells were distinguished with FSC and SSC. Data represent the mean ± SEM of two separate experiments performed in duplicate.

또한 비장에서 T 세포만을 추출하여 위와 같은

방법으로 각각 楡根皮를 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.5mg/ml 전처리하고 시스플라틴을 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M 처리하여 T 세포의 고사를 조사한 결과, 시스플라

틴을 2 μ M, 200 μ M 투여한 집단에서 농도 의존적으로 세포고사가 억제되었다(Fig. 7).

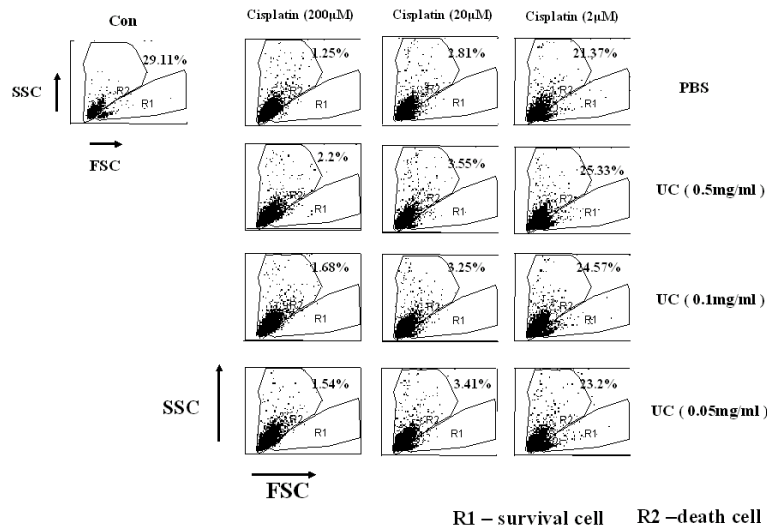


Fig. 7. UC prevented Cisplatin-induced T cells death.

T cells were treated cisplatin with or without UC for 24 hrs. The cells were analyzed using flow cytometer. Live and dead cells were distinguished with FSC and SSC. Data represent the mean \pm SEM of two separate experiments performed in duplicate.

IV. 考 察

癌의 서양의학적 治療法은 外科的 處治法, 放射線 處治法, 化學療法 및 免疫療法 등이 대표적인데 이러한 治療法들은 癌種에 따른 감수성, 治療 후의 경과와 부작용이 각기 다르며 이에 따른 많은 문제점이 있다³⁵⁻³⁸⁾.

그 중 化學療法은 암세포의 각종 대사경로에 침입하여 주로 DNA와 직접 작용하고 DNA 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 핵산의 합성을 방해하고, 세포분열을 저해하여 나타나는 항암세포에 대한 세포독성을 이용하는 것이다. 그러나 化學療法에 쓰이는 약제는 정상세포에도 영향을 주어 정상세포에 대한 세포독성이나 골수억제, 오심, 구

토, 구내염, 탈모증, 신장 독성 등의 부작용이 보고되고 있는 실정이다^{39,40)}.

이러한 化學療法의 부작용을 억제하면서 암세포에 대해서는 항암제의 독성을 유지시키거나 증가시킬 수 있는 약제에 대한 연구가 진행되고 있으며⁴¹⁻⁴³⁾, 이에 대한 연구는 매우 의미 있는 일이라 하겠다.

대표적인 항암제인 시스플라틴은 고환암, 난소암, 방광암, 자궁암, 전립선암등의 치료제로서 널리 사용되고 있으나⁴⁴⁻⁴⁶⁾ 이독성, 신장 독성, 골수 독성, 위장관 장애 및 알러지 등의 부작용 때문에 임상적 활용이 제한을 받고 있다⁴⁷⁾.

시스플라틴에 의한 신장 독성은 세포고사 또는 세포괴사 및 활성 산소에 의한 것으로 알려져 있

으며^{13,16)} 시스플라틴에 의한 신장 독성을 염증성 측면에서 접근할 때 adhesion molecule, TNF- α 등의 염증성 물질들이 관여하는 것으로 보고되고 있다⁴⁸⁻⁵²⁾. 신장 독성을 비롯한 시스플라틴의 이러한 부작용에 대해 억제효과를 가지고 있는 약제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나⁵³⁻⁵⁶⁾ 아직은 미흡한 실정이다.

韓醫學에서는 癌이란 體內에 發現되는 腫塊, 表面高低不平, 質의 堅硬, 腫氣등을 총 지칭하는 것으로⁵⁷⁻⁵⁹⁾, ‘積聚’, ‘腫瘍’, ‘腫瘤’, ‘癥瘕’, ‘腸覃’, ‘痰癖’, ‘痞塊’, ‘石瘕’, ‘血蟲’, ‘反胃’, ‘石疽’, ‘石癰’, ‘骨疽’, ‘瘡毒’과 연관된 질환으로 인식되고 있다⁶⁰⁻⁶⁴⁾.

癌 發生의 氣機는 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪氣 등으로 개체의 臟腑機能과 氣血循環이 失調되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻의 病理 變化가 나타나고 이런 變化가 慢性的으로 단독 혹은 相好錯雜하여 癌이 形成된다^{59,65-67)}.

또한 疾病의 發生과 發展이 모두 正·邪氣의 消長으로 결정된다고 인식하고 있어 治療는 患者의 狀態와 病程에 따라 ‘虛則補之 實則瀉之’, ‘補後天之本 固先天之本’, ‘內治와 外治의 結合’, ‘扶正治療와 祛邪治療’등을 치료원칙으로 한다. 따라서 治療의 근본목표는 邪氣를 물리치고 正氣를 회복시켜서 疾病을 치유되는 방향으로 전환시키는 것이다^{7,68)}.

扶正은 正氣를 扶助하는 藥物과 治療方法을 사용하는 것으로 補法을 말한다. 扶正治療는 正氣가 虛한 암환자에게 적용된다. 祛邪는 攻逐毒邪하는 藥物과 治療方法을 사용하는 것으로 瀉法을 말한다. 祛邪治療는 正氣가 盛한 암환자에게 적용된다. 扶正과 祛邪는 相補相成의 관계에 있는데, 扶正은 正氣를 강화하여 인체의 면역력을 강화시키고, 抗毒, 抗癌을 도와 祛邪를 유리하게 하며 祛邪는 癌細胞를 죽이거나 癌細胞의 성장을 억제해서 正氣의 보존과 회복을 유리하게 한다⁷⁾.

榆根皮는 榆(根)白皮, 白榆皮, 榆皮 등으로 불

리며 느릅나무과에 속하는 비술나무의 코르크층을 벗긴 樹皮 및 根皮를 건조한 것이다²⁰⁾. 性味는 甘, 平, 滑利, 無毒하고 效能은 <神農本草經>에서 “主大小便通利, 利水道, 除邪氣”, <名醫別錄>에서 “主腸胃邪熱氣, 消腫, 療小兒頭瘡”, <藥性論>에서 “主利五淋, 治不眠, 療齕”, <本草綱目>에서 “利竅, 滲濕熱, 行津液, 消癰腫”이라 했다^{20,69-72)}.

榆根皮에 대한 실험적 연구로는 항암효과²¹⁻²⁴⁾, 항산화효과^{25,26)}, 면역증진²⁷⁾, 진통²⁸⁾, 항염증²⁷⁻³⁰⁾, 항균효과³¹⁻³⁴⁾ 등에 대한 연구가 진행되어 왔고 이러한 연구들을 통해 榆根皮가 항암, 항염, 항균에 뛰어난 효과를 가지고 있음이 실험적으로 밝혀졌다.

본 연구에서는 이러한 효과가 있는 榆根皮가 시스플라틴으로 유도된 세포의 고사에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

榆根皮는 시스플라틴에 의해 유도된 비장 세포의 고사를 억제시켰으며 특히 T 세포의 감소를 억제하였다(Fig. 1, 2A). 이러한 T 세포의 고사에는 여러 가지 인자가 작용하는데 지금까지 알려진 경로는 시스플라틴에 의한 DNA의 직접적인 손상, caspase의 활성화 유도로 인한 세포 고사, 세포고사에 영향을 주는 인자의 발생에 의한 것 등이 있다^{13-15,73,74)}. 상기의 실험 결과는 榆根皮가 위의 경로 중 하나 이상을 억제하여 나타난 것일 가능성이 있으며, 이와 관련된 실험이 榆根皮과 시스플라틴의 실험적 연구에 많은 도움이 될 것으로 보인다.

In vivo 실험에서 비장세포와 T 세포의 고사 억제 작용은 100mg/kg보다 500mg/kg에서 더 강하게 나타났으며(Fig. 1, 2A) CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포에서도 같은 양상을 보였다(Fig. 2B, 2C).

최근 보고에 따르면 CD4⁺ T 세포가 시스플라틴에 의한 신장독성을 매개하는 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다⁷⁵⁾. 이에 따라 T 세포에서 유래된 세포 활성화물질 중에서 어떤 물질이 榆根皮에 의해 활성화되는지 알아보려고 T 세포의 활성화를 나타내는 표면 표지자인 CD25, CD69, CD62L,

CD44 T 세포에 대한 영향을 조사하였다. 실험 결과 CD25, CD69에서는 효과를 보였으나 CD62L, CD44는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3, 4). 이는 楡根皮가 T 세포 활성화 인자에 선택적으로 영향을 줄 수도 있음을 나타내며, 추후 다른 종류의 T 세포 활성화 물질에도 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

楡根皮 자체의 세포독성에 대한 연구^{23,24}가 있었으며, 시스플라틴에 의해 유도된 비장 세포와 T 세포의 고사에서 楡根皮의 효과가 농도 의존적인 경향을 보여 시스플라틴과 楡根皮의 농도변화에 따른 세포고사 억제를 *in vitro* 실험을 통해 알아 보았다.

비장 세포에 楡根皮를 0.1mg/ml, 0.5mg/ml 투여하고 시스플라틴을 처리했을 때의 살아남은 세포의 수는 시스플라틴을 단독 처리했을 때보다 더 많았으나 1.0mg/ml을 처리했을 때는 시스플라틴을 단독 처리했을 때보다 더 적어진 것을 볼 수 있었다(Fig. 6). 좀 더 세밀한 실험을 위해 T 세포에 0.5mg/ml 이하의 농도로 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.5mg/ml 처리하고, 투여한 시스플라틴의 농도도 처음의 2 μ M, 20 μ M에서 2 μ M, 20 μ M, 200 μ M로 세분화하여 처리하였다. 그 결과, 시스플라틴을 단독 처리한 집단에서는 시스플라틴의 농도에 의존적으로 세포의 수가 감소하였고, 楡根皮를 전처리한 경우, 시스플라틴을 2 μ M, 200 μ M 처리한 집단에서 楡根皮 농도에 의존하여 세포고사가 억제되는 경향을 보이고 있다(Fig. 7).

이는 동일한 양의 시스플라틴을 처리한 경우, 楡根皮의 투여량이 일정량 이상이면 시스플라틴과 더불어 세포고사를 촉진하는 방향으로 진행되나, 일정량 이하에서는 시스플라틴의 세포고사를 억제하고 있음을 나타낸다. 또한 시스플라틴의 투여량에 따라 세포고사의 억제 정도가 楡根皮의 농도에 의존될 수도 있음을 알 수 있다. 이 것은 楡根皮의 단독투여 했을 때의 종양 성장 억제 효과²³와

楡根皮와 항암제를 병용투여 했을 때의 세포의 증식 억제 효과²⁴에 대한 보고와도 그 결과가 일치한다.

이러한 결과는 楡根皮가 일정량 이상 투여될 때 楡根皮의 항암, 항염증 효과가 발현되어 시스플라틴의 세포고사를 촉진하여 나타난 것으로 보이며, 楡根皮의 농도에 따른 시스플라틴의 세포고사 억제 기전에 대한 세밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 항암치료 중 化學療法 제제의 부작용을 억제하기위해서 楡根皮와 같이 항암, 항염증 효과가 있는 약물을 사용할 경우, 실험 및 임상에서 적정 용량을 찾아내는 연구가 반드시 동반되어야 할 필요가 있음을 상기시키고 있다.

이상의 실험 결과, 楡根皮는 시스플라틴 유도성 비장 세포 및 CD4⁺, CD8⁺ T 세포, 항원제시세포의 고사를 억제하였으며, 이에 따라 앞으로 楡根皮가 시스플라틴에 의해 유도된 T 세포의 고사, 시스플라틴 유도성 비장 세포 및 CD4⁺, CD8⁺ T 세포, 항원제시세포의 고사를 어떻게 억제하는가에 대한 기전의 연구 및 이를 통해 시스플라틴에 의해 발생하는 신장 독성에 미치는 영향, 그리고 楡根皮와 시스플라틴의 농도에 따른 세포고사 억제 기전의 차이에 대해 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

항암제로 널리 쓰이고 있는 시스플라틴에 의한 세포고사에 楡根皮가 미치는 영향을 알아보기 위해 楡根皮를 투여한 마우스에 시스플라틴을 주사하여 비장 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 대식 세포, 수지상 세포에 미치는 영향을 조사한 *in vivo* 실험과 비장 세포와 T 세포에 유근피를 농도별로 전처리하고 시스플라틴을 투여하여 그 영향을 조사한 *in vitro* 실험을 실시하여 다음과 같은

결과를 얻었다.

1. 榆根皮는 시스플라틴으로 유도된 비장 세포의 고사를 억제하였다.
2. 榆根皮는 시스플라틴으로 유도된 T 세포의 고사를 억제하였다.
3. 榆根皮는 시스플라틴으로 유도된 항원 표지 세포의 고사를 억제하였다.
4. 榆根皮는 시스플라틴으로 유도된 T 세포 활성화 세포 중 CD 25⁺, CD 69⁺ T 세포에는 효과를 보였으나 CD 44⁺, CD 62L⁺ T 세포에는 효과를 보이지 않았다.
5. 榆根皮는 시스플라틴으로 유도된 대식세포와 수지상세포의 고사를 억제하였다. 수지상세포의 경우 농도의존적으로 고사가 억제되었으나 대식세포의 경우 500mg/ml가 투여된 것이 100mg/ml가 투여된 것보다 억제효과가 적었다.
6. 비장세포에 유근피를 전처리하고 1시간 후에 시스플라틴을 처리한 결과 유근피는 0.1mg/ml, 0.5mg/ml에서는 농도의존적으로 시스플라틴에 의한 세포고사를 억제하였으나 대용량인 1mg/ml에서는 시스플라틴을 단독처리한 것보다 더 많은 세포고사를 보였다. T세포에서는 농도의존적으로 세포고사가 억제되었다.

이상의 결과로 榆根皮가 시스플라틴으로 유도된 세포의 고사를 억제할 수 있다는 것을 알 수 있으며 추후 榆根皮가 세포고사를 억제하는 기전에 대한 연구와 세포고사를 위한 榆根皮의 적정 농도에 대한 임상 실험이 추가된다면 앞으로 化學療法으로 인한 항암치료의 부작용을 억제하는 약제 개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울:도서출판정담. 1997:1963.
2. 이중달. 그림으로 설명한 病理學. 서울:高麗醫學. 1990:169-71.
3. 대한병리학회. 病理學. 서울:高文社. 1994:213-22.
4. 李岩. 腫瘤學. 北京:人民衛生出版社. 1985:2-5.
5. 李岩. 腫瘤臨證備要. 北京:人民衛生出版社. 1983:11-5.
6. 鞠永棕. 고오스 藥理學. 汎文社. 1986:711.
7. 문 구 外. 암 동서의 결합치료 1권. 익산:원광대학교 출판국. 1999:253-92, 413, 414, 461-2.
8. 久保道德 外. 漢方醫藥學. 서울:東南出版社. 1985:177, 193.
9. Warmann S, Hunger M, Teichmann B, Flemming P, Gratz KF, Fuch J. The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma. *Cancer*. 2002;95(8):1795-801.
10. Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, Nakagawa K, Nagashima G, Nagasaka Y, Ohno K, Yamamoto K, Hirakawa K. Sensitization of human malignant glioma cell lines to tumor necrosis factor-induced apoptosis by cisplatin. *J Neurooncol*. 2001, Mar;52(1):23-36.
11. Schrier RW. Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest*. 2002;110:743-5.
12. Ries F, Klastersky J. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis*. 1986;8:368-79.
13. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;131:518-26.
14. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation oh caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular

- epithelial cells. *Kidney Int.* 2001;60:1726-36.
15. Leibbrandt ME, Wolfgang GH, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* 1995;48:761-70.
 16. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: Apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 1996;270:F700-8.
 17. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimoto Y, Inui K. Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:195-201.
 18. 楊維傑. 黃帝內經素問譯釋. 서울:成輔社. 1980;349, 469.
 19. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울:행림출판. 1995:142-3.
 20. 신민교 편저. 임상분초학. 영림사. 2000:668, 669.
 21. 공광훈, 한기정, 이광수, 조성희. 楡根皮 내의 matrix metalloproteinase-9의 활성 억제제에 관한 연구. *분석화학.* 2005;18(2):104-11.
 22. 양영렬 외. 유근피(楡根皮)로부터 단백당체의 분리 및 항암 면역활성 연구. *한국생물공학회지.* 2001;16(6):547-53.
 23. 이선영 외. 유근피(楡根皮), 비파엽(枇杷葉) 및 인진호(茵陳蒿) 추출제제의 Nude Mice 종양 성장 억제 효과. *대한암예방학회지.* 2001;6(1):19-25.
 24. 은재순, 송원영. 암세포주에 대한 유근피 n-BuOH 분획과 항암제의 병용효과. *생화학회지.* 1994;97:144-52.
 25. 이영주. 유근피와 유백피 추출물의 항산화 및 항균효과. *대구 가톨릭대학 대학원 학위논문(박사).* 2001.
 26. 이경행, 전은경, 유시영, 오만진. 유백피(*Ulm cortex*) 추출물의 항산화 활성. *농산물저장유통학회지.* 2000;7(4):373-9.
 27. 이환용. 유근피의 소염 및 면역 증진 효과. *경희대 대학원 학위논문(박사).* 2005.
 28. 申延祥 外. 楡白皮의 抗炎 및 組織再生에 對한 實驗的 研究. *大韓外官科學會誌.* 2001;14(1):190-208.
 29. 盧石善. 楡根皮가 抗炎作用에 미치는 影響. *大田大學校韓醫學研究所 韓醫學論文集.* 1998;13:837-52.
 30. 변혁, 박인식, 조현석, 김갑성, 이승덕. 유근피(楡根皮) 약침이 Lipopolysaccharide 유발 류마티스 관절염 모델에서 MIF 활성 억제에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2006;23(6):117-32.
 31. 박주성 외. 유백피(*Ulm cortex*)의 항균 활성. *한국식품영양화학회지.* 1999;28(5):1022-8.
 32. 李興鎔. 楡白皮 抽出物의 抗細菌 效果에 관한 연구. *忠北大 大學院 學位論文(석사).* 1991.
 33. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주. 유백피 추출물의 항세균 작용. *산업미생물학회지.* 1992;20(1):1-15.
 34. 尹宗鉉. 유근피 수추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과. *원광대학교 대학원 학위논문(석사).* 2006.
 35. 공격덕, 이상욱, 한병훈, 서승연, 허만하, 박병채. 진행성 위암에 대한 5-FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과. *대한암학회지.* 1990;22:144.
 36. KURT J. ISSELBACHER 외. HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE. Thirteenth Edition Volume 2. United States of America:Monotype Composition Company. 1994:1814, 1815.
 37. John Dyson. CECIL TEXTBOOK OF MEDICINE. United States of America:W.B.Saunders Company. 1992:669, 670.
 38. 李家康. 中醫腫瘤防治大全. 中國:科學技術文獻

- 出版社. 1994:142-50.
39. 김용범 외. Cisplatin을 포함한 항암화학요법 치료 시 환자에서 발생하는 오심 및 구토에서의 정맥주사용 및 경구용 tropisetron과 ondansetron의 비교연구. 대한산부회지. 1998;41(10):2544-50.
 40. 이린화 외. 부인과 악성종양 환자에서 복합 항암화학요법에 따른 세포독성에 대한 amifostine의 임상효과에 관한 연구. 대한산부회지. 2001;44(11):1961-7.
 41. 표명윤, 윤지현. Aloe vera가 항암제의 세포독성에 미치는 영향. 약학회지. 1999;43(1):104-11.
 42. 정세영. Cisplatin의 신장독성 발현 기전 및 그 억제제 개발연구. 한국응용약물학회 추계 심포지움. 1995.
 43. 노영범. Cisplatin 副作用에 對한 補益劑의 實驗的 研究. 원광대학교 대학원 학위논문(박사). 1994.
 44. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds : A new class of potent antitumor agent. Nature. 1969;223:385-6.
 45. Connor TA, Johns M, Ross WCJ. New platinum complex with anti-tumor activity. Chem Biol. Interact. 1972;5:415-24.
 46. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. Cancer. 1985;55:2303-6.
 47. 정세영. 천연성분을 이용한 Cisplatin 신장독성 억제물질 개발 : 전통약물로부터 신약개발. 서울:경희대학교 경의동서약학연구소. 1994:71-9.
 48. Ramesh G, Reeves WB. TNF alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. J Clin Invest. 2002;110:835-42.
 49. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediates apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. Am J Physiol. 2003;285:610-8.
 50. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H. Identification of the CD4(+) Tcell as a major pathogenicfactor in ischemic acute renal failure. J Clin Invest. 2001;108:1283-90.
 51. Laight DW, Lad N, Woodward B, Waterfall JF. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. Eur J Pharmacol. 1994;292:81-8.
 52. Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB, Williams WW, Bonventre JV. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. Kidney Int. 1999;56:922-31.
 53. 박선영, 정세영. 오미자성분 Schizandrin의 Cisplatin유도 신장 독성에 대한 억제효과. KOR. J. ENVIRON. TOXICOL. 1998;13(3-4):125-31.
 54. 김성훈 외. Cisplatin 유도 신장독성에 대한 보정방암당 에탄올층의 보호효과. 동의생리병리학회지. 2007;21(1):28-32.
 55. 박찬희, 이정환, 이상현. 시스플라틴 이독성에서 사물당의 보호효과. 동의생리병리학회지. 2007;21(1):214-8.
 56. 박성주, 전병훈, 김성훈, 안규석, 송호준. 시스플라틴의 세포고사에 대한 보정방암당 에탄올 추출물의 효과. 大韓本草學會誌. 2007;22(1):89-94.
 57. 白洪龍. 辨證診治概要. 人民出版社. 1984:502.
 58. 勵暢. 癌의 中醫治療. 東洋醫學 1992;18(1):56-63.
 59. 박종욱. 巴豆加大黃의 抗腫瘍效果와 자연 살해 세포의 活性에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 1995.
 60. 王冰. 黃帝內經. 서울:高文社. 素問 1997;91, 166, 229, 326, 靈樞 76, 88.
 61. 李竝求. 八珍湯合化積丸과 Adriamycin의 병용 처리시 나타나는 synergistic 抗腫瘍 效果에 관한 作用機轉 研究. 圓光大學校 大學院. 2000.

62. 金圭東. 東醫內科學. 서울:麗江出版社. 1992;221-3.
63. 성재환. 五加皮 抽出液이 마우스의 抗腫瘍 면역반응에 미치는 영향. 圓光大學校 大學院. 1994.
64. 김군택. 加味夏枯草散이 抗癌劑의 抗腫瘍效果和 腫瘍細胞에 미치는 영향. 圓光大學校 大學院. 1994.
65. 김창중. 病態生理學. 서울:癸丑文化社. 1988;72-4.
66. 文濬典 외. 東醫病理學. 서울:高文社. 1990;78-90.
67. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 北京:科學出版社. 1997;12-24.
68. 조종관. 韓方臨床腫瘍學. 大田:周珉出版社. 2001;82-132.
69. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982;2039-42.
70. 최옥자. 약초의 성분과 이용. 서울:일월서각. 1991;143, 144.
71. 朴鍾甲. 增補本草備藥. 大邱:東洋綜合通信教育院出版社. 1985;123.
72. 金昌謙. 本草從新. 서울:杏林書院. 1982;124.
73. Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p2WAF2/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affect the course of cisplatin-induced acute renal failure. J Clin Invest. 1998;101:777-82.
74. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimizu K, Ozawa T. Adverse effect of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity. Biochem Biophys Res Commun. 1989;159:1121-7.
75. Manchang Liu, Chu-Chun Chien, Melissa Burne-Taney, Roshni R. Molls, Lorraine C. Racusen, Robert B. Colvin and Hamid Rabb. A Pathophysiologic Role for T Lymphocytes in Murine Acute Cisplatin Nephrotoxicity. J Am Soc Nephrol. 2006;17:765-74.