

종양 유발 마우스의 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF-α+ 비장세포에 인진쑥 methanol 추출물이 미치는 영향

김흥태* · 구세광** · 김주완 · 진태원 · 임미경*** · 김지은**** · 도윤정*****
여상건 · 장광호 · 오태호 · 이근우¹

경북대학교 수의과대학, *부산광역시 보건환경연구원, **대구한의대학교 한의과대학
경북대학교 생활과학대학, *대구대학교 생명공학과, *****국립축산과학원

(게재승인 : 2008년 9월 26일)

Effects of *Artemisia capillaris* Methanol Extract on CD3+, CD4+, CD8+ and TNF-α+ Splenic Cells in Tumor Cells Inoculated Mice

Hong-Tae Kim*, Sae-Kwang Ku**, Ju-Wan Kim, Tae-Won Jin, Mee-Kyung Lim***, Ji-Eun Kim****, Yoon-Jung Do*****, Sang-Geon Yeo, Kwang-Ho Jang, Tae-Ho Oh and Keun-Woo Lee¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea,
*Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea,
**College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea,
***College of Human Ecology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea,
****Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea,
*****National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Korea

Abstract : The *Artemisia capillaris* THUNB is a perennial herb that belongs to the family *Compositae spp* and probably the most common plant among the various herbal folk remedies being used in the treatment of abdominal pain, hepatitis, chronic liver disease, jaundice and coughing in Korea. Recently the biological and pharmacological actions of herb have been studied well such as antibacterial, antidiabetic and antitumor activities. This experiment was conducted to investigate antitumor and immunomodulatory effects of *Artemisia capillaris* extracts against Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180 cancer cells in *in vivo* experimental tests. In *in vivo* experimental tests using 210 ICR mice, based on flow cytometry, CD3+, CD4+, CD8+ and TNF-α+ splenocytes were significantly ($p < 0.05$) reduced in the Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180 inoculated vehicle controls, HP and SP, compared to those of the intact vehicle control on both the 28th day and the 42nd day, respectively. These decreases of CD3+, CD4+, CD8+ and TNF-α+ cells induced by tumor inoculations were significantly ($p < 0.05$) inhibited by mACH treatment regardless of the type of experiments and tumor cells inoculated. The results suggest that *Artemisia capillaris* methanol extracts have prominent antitumor effects on the cancer cell lines Hepa-1c1c7 and Sarcoma 180.

Key words : *Artemisia capillaris*, extract, Hepa-1c1c7, Sarcoma 180, antitumor effect, flow cytometry.

서 론

인진쑥(*Artemisia capillaris* Thunb)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로서 생약명으로는 인진, 인진호 또는 추호라 불린다(18).

인진쑥은 우리나라의 전통 민간요법에서 복통, 간염, 만성 간질병, 황달, 천식 등의 치료에 사용되어진 약용 식물 중 가장 흔한 식물로 일반 쑥과는 달리 특히 황달, 간염, 간경

화에 효과적이고 간기능 향진에 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다(9,19).

지금까지 인진쑥의 항균, 항당뇨병, 항암효과와 같은 생물학적 연구와 약리학적인 연구가 잘 되어왔지만 직접적으로 간암주를 이용하여 인진쑥 추출물의 항암효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰한 예는 아직 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인진쑥 methanol 추출물의 암세포 증식 억제제를 통한 항암효과와 면역활성 효과를 알아보고자 김 등(19)의 연구에서 보고한 인진쑥 추출물의 시험관내(*in vitro*) 항암효과 검사 결과를 참고하여 항암작용 기전 중 T

¹Corresponding author.
E-mail : kwolee@knu.ac.kr

림프구 및 TNF- α 생산 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 ICR계 마우스에 암종 세포주(Hepa-1c1c7)와 육종 세포주(Sarcoma 180)를 접종·이식하여 종양을 유발시킨 다음, FITC와 결합한 일차 항혈청을 이용하여 flow cytometry법을 통해 인진속 methanol 추출물이 암이 유발된 마우스의 비장 내 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α 세포에 미치는 영향을 관찰하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

암세포주

실험에 사용되어진 암세포주는 Hepa-1c1c7 (KCLB 22026, 마우스 간암 세포)과 Sarcoma 180 (KCLB 40066, 마우스 육종 세포)으로 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받아 사용하였다.

Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대한 세포배양 배지로서 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며 여기에 streptomycin (100 μ g/mL)과 penicillin (100 U/mL)을 첨가하였다.

Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주 배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 실시하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

마우스에 접종하기 위해서 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주를 마우스 복강 내에 2×10^7 cells/mL 농도로 이식하여 일주일간 계대배양하였으며 이식한 마우스에서 복수액을 취하여 4°C에서 생리식염수에 현탁하고 2000 rpm으로 원심분리한 침전액을 2회 반복하여 세척한 후 0.4% trypan blue로 염색하여 2×10^7 cells/mL이 되도록 제조하였다.

실험동물

생후 5주령의 평균 체중 25 ± 5 g인 ICR계 실험용 마우스 210두를 구입하여 사육하며 일주일이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육조건은 동물 사육실에서 항생제 무첨가 생쥐용 사료(슈퍼피드)와 음수섭취는 자유 급식을 실시하였으며, 동물 사육실내는 항온항습 장치를 이용하여 실내온도를 22 ± 2 °C, 습도를 50%로 유지하였으며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

인진속 추출물의 조제 및 농도 설정

대구광역시 약령시장의 한약 건재상에서 2004년 5월부터 2006년 5월까지 건조된 인진속을 구입하여 이물질을 제거하고 깨끗이 한 다음 제분기로 분쇄하여 분말을 얻었다. 이러한 인진속 분말 100 g에 methanol 1000 mL을 가하여 항온수조(37°C)에서 140 rpm으로 24시간 진탕한 후 저온 원심분리기(4°C)에서 3,000 rpm으로 20분간 원침하였다. 이 후 각 상층액을 여과한 추출물을 회전 진공 농축기(Heidolph®, Laborota 4000, Germany)에서 농축하여 완전 건조시킨 후 동결건조시켜 인진속 methanol 추출물을 얻었으며 농도(용량)는 3.125 mg/mL (25 mg/kg), 12.5 mg/mL (100 mg/kg)로 설정하였다.

실험군 설정, 종양세포 이식 및 인진속 추출물의 투여

- 1) 정상군 : 정상 대조군(n=30)
- 2) HP-대조군 : Hepa-1c1c7 세포 이식 매체 대조군(n=30)
- 3) SP-대조군 : Sarcoma 180 세포 이식 매체 대조군(n=30)
- 4) H1 : Hepa-1c1c7 세포 이식 후 25 mg/kg의 인진속 추출물(mACH) 투여 군(n=30)
- 5) H2 : Hepa-1c1c7 세포 이식 후 100 mg/kg의 인진속 추출물 투여 군(n=30)
- 6) S1 : Sarcoma 180 세포 이식 후 25 mg/kg의 인진속 추출물 투여 군(n=30)
- 7) S2 : Sarcoma 180 세포 이식 후 100 mg/kg의 인진속 추출물 투여 군(n=30)

실험은 ICR계 마우스 90두에 각각 Hepa-1c1c7 세포 부유액을 간엽에, Sarcoma 180 세포 부유액은 경부 피하에 0.2 mL(4×10^6 cells/mouse)씩 각각 이식하고, 이식 1일 후부터 28일간 인진속 추출물 또는 생리식염수를 복강 투여하였다. 이 후 휴약에 따른 변화를 관찰하기 위하여 14일간 즉 42일까지는 전 실험군에 아무런 투여를 하지 않았다.

Flow cytometry

1) 비장 세포 준비

Flow cytometry 검사를 하기 위한 부검은 각 군의 마우스 중 평균 3두 이상을 추출물 투여 시작일, 인진속 추출물 투여 후 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49일에 마취시킨 후 경추탈골법에 의해 희생시킨 다음 실시하였다. 본 실험에서 결과 성적은 28일에 정상군 3두, HP-대조군 5두, H1군 4두, H2군 5두, SP-대조군 3두, S1군 3두, S2군 3두, 42일에 정상군 3두, HP-대조군 4두, H1군 3두, H2군 4두, SP-대조군 4두, S1군 3두, S2군 3두를 부검하여 실험하였다. 이 때, 비장 실질 조직(10~20 mg)의 일부를 채취하여, 4°C 상태에서 RPMI-1640 (Gibco BRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어있는 petri dish에서 비장 소편을 준비한 다음 균질화하여 비장세포를 부유시켰다. 준비된 부유액을 스테인레스 철판(mesh No. 100, Sigma, USA)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포덩어리를 제거하고 RPMI-1640으로 다시 1회, HBSS (Hanks Balanced Salt Solution; Gibco BRL, USA)로 2회 세척하였다. 이 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10배 희석한 HBSS로 2회 세척하고 RPMI-1640배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco BRL, USA)가 첨가된 혼합배지에 비장세포를 재 부유하여 사용하였다.

2) 형광항체 염색

1×10^6 개의 비장 세포를 10 μ L의 1% bovine serum albumin 및 0.02%의 azide가 함유된 minimal essential medium (MEM)에 재 부유시킨 다음, FITC conjugate 일차 항체와 5°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

적용된 항체(FITC-conjugated 일차 항체)는 다음과 같다.

- (1) CD3 : Anti-mouse CD3 (17A2), 555274, BD Biosciences/

Pharmingen, CA, USA. Dilution 1 : 100

(2) CD4:Anti-mouse CD4 (L3T4), 553651, BD Biosciences/ Pharmingen, CA, USA. Dilution 1 : 100

(3) CD8:Anti-mouse CD8 (Ly-2), 553031, BD Biosciences/ Pharmingen, CA, USA. Dilution 1 : 100

(4) TNF-α: Anti-mouse TNF-α, 554418, BD Biosciences/ Pharmingen, CA, USA. Dilution 1 : 100

3) 형광반응세포의 관찰

형광 염색된 세포는 형광 filter가 부착된 FACStar flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 argon laser를 488 nm로 여기(excitation)하여, 총 1 × 10⁶개의 비장 세포 중 각각의 항체에 면역반응을 나타내는 비장세포의 비율을 계산하여 평균 ± 표준편차로 계산하였다.

또한 추출물의 유효성을 판단하는데 도움을 주고자 HP 및 SP 매체 대조군과 비교한 변화율(%)을 아래와 같은 공식으로 계산하였다.

% Changes vs vehicle controls (%) = [(Data of test groups - Data of vehicle controls) / Data of vehicle controls] × 100]

통계학적 처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차(n=5)로 나타냈으며, 통계학적 유의성 검정은 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test (MW test) with SPSS for Windows (Release 6.1.3., SPSS Inc., USA)에 의해 비교 검정하였고 p value<0.05를 유의성 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Flow cytometry 조건

1) CD3+ 세포 수 변화

28일에 실험군의 경우, 비장 내 CD3+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군 (44.03 ± 0.67)에 비하여 각각 26.38 ± 5.93 (-40.09%) 및 23.50 ± 3.86 (-46.63%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25

및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 37.48 ± 5.29 (42.06%) 및 42.42 ± 1.88 (60.80%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 35.20 ± 4.71 (49.79%) 및 39.17 ± 5.19 (66.67%)의 변화를 나타내었다.

42일에 실험군의 경우, 비장 내 CD3+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군 (45.10 ± 4.92)에 비하여 각각 22.00 ± 2.13 (-51.22%) 및 20.80 ± 0.68 (-53.88%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 33.63 ± 4.77 (52.88%) 및 39.25 ± 5.92 (78.41%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 29.27 ± 3.46 (40.71%) 및 40.00 ± 1.49 (92.31%)의 변화를 나타내었다(Table 1).

2) CD4+ 세포 수 변화

28일에 실험군의 경우, 비장 내 CD4+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군 (22.00 ± 2.76)에 비하여 각각 10.08 ± 2.00 (-54.16%) 및 8.70 ± 1.93 (-63.33%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 16.48 ± 1.94 (63.44%) 및 19.50 ± 2.52 (93.45%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 15.00 ± 2.86 (85.95%) 및 19.67 ± 1.78 (143.80%)의 변화를 나타내었다.

42일에 실험군의 경우, 비장 내 CD4+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군 (26.90 ± 2.80)에 비하여 각각 13.13 ± 3.55 (-51.21%) 및 12.53 ± 1.67 (-53.44%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여

Table 1. Changes on the number of CD3+ splenocytes in tumor inoculated mice at flow cytometrical observation

Group ID	Day 28	Day 42
Intact vehicle control	44.03 ± 0.67 (n=3)	45.10 ± 4.92 (n=3)
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups		
vehicle control : HP	26.38 ± 5.93* (n=5)	22.00 ± 2.13* (n=4)
25 mg/kg of mACH : H1	37.48 ± 5.29* (n=4)	33.63 ± 4.77*.# (n=3)
100 mg/kg of mACH : H2	42.42 ± 1.88# (n=5)	39.25 ± 5.92# (n=4)
Sarcoma 180 cell inoculation groups		
vehicle control : SP	23.50 ± 3.86* (n=3)	20.80 ± 0.68* (n=4)
25 mg/kg of mACH : S1	35.20 ± 4.71*.# (n=3)	29.27 ± 3.46*.# (n=3)
100 mg/kg of mACH : S2	39.17 ± 5.19*.# (n=3)	40.00 ± 1.49# (n=3)

Mean ± S.D. of percentages of FITC positive cells (%/1 × 10⁶ splenocytes); * p<0.05 compared to that of intact vehicle control; # p<0.05 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

Table 2. Changes on the number of CD4+ splenocytes in tumor inoculated mice at flow cytometrical observation

Group ID	Day 28	Day 42
Intact vehicle control	22.00±2.76 (n=3)	26.90±2.80 (n=3)
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups		
vehicle control : HP	10.08±2.00* (n=5)	13.13±3.55* (n=4)
25 mg/kg of mACH : H1	16.48±1.94*. ^{##} (n=4)	22.63±2.61 ^{##} (n=3)
100 mg/kg of mACH : H2	19.50±2.52 ^{##} (n=5)	24.63±4.33 ^{##} (n=4)
Sarcoma 180 cell inoculation groups		
vehicle control: SP	8.70±1.93* (n=3)	12.53±1.67* (n=4)
25 mg/kg of mACH : S1	15.00±2.86*. ^{##} (n=3)	20.10±1.80*. ^{##} (n=3)
100 mg/kg of mACH : S2	19.67±1.78*. ^{##} (n=3)	20.63±3.62*. ^{##} (n=3)

Mean ± S.D. of percentages of FITC positive cells (%/1 × 10⁶ splenocytes); * p<0.05 compared to that of intact vehicle control; ^{##} p<0.05 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

Table 3. Changes on the number of CD8+ splenocytes in tumor inoculated mice at flow cytometrical observation

Group ID	Day 28	Day 42
Intact vehicle control	17.17±2.12 (n=3)	18.53±1.46 (n=3)
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups		
vehicle control : HP	6.24±2.48* (n=5)	10.78±1.44* (n=4)
25 mg/kg of mACH : H1	11.73±1.80*. ^{##} (n=4)	16.10±2.42 ^{##} (n=3)
100 mg/kg of mACH : H2	12.18±1.15*. ^{##} (n=5)	17.60±3.32 ^{##} (n=4)
Sarcoma 180 cell inoculation groups		
vehicle control: SP	4.47±0.67* (n=3)	9.00±3.93* (n=4)
25 mg/kg of mACH : S1	7.00±1.21*. ^{##} (n=3)	16.40±3.46 ^{##} (n=3)
100 mg/kg of mACH : S2	9.37±2.39*. ^{##} (n=3)	19.97±1.60 ^{##} (n=3)

Mean ± S.D. of percentages of FITC positive cells (%/1 × 10⁶ splenocytes); * p<0.05 compared to that of intact vehicle control; ^{##} p<0.05 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

22.63 ± 2.61 (72.44%) 및 24.63 ± 4.33 (87.62%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 20.10 ± 1.80 (60.48%) 및 20.63 ± 3.62 (64.74%)의 변화를 나타내었다(Table 2).

3) CD8+ 세포 수 변화

28일에 실험군의 경우, 비장 내 CD8+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군 (17.17 ± 2.12)에 비하여 각각 6.24 ± 2.48 (-63.65%) 및 4.47 ± 0.67 (-73.98%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 11.73 ± 1.80 (87.90%) 및 12.18 ± 1.15 (95.19%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 7.00 ± 1.21 (56.72%) 및 9.37 ± 2.39 (109.70%)의 변화를 나타내었다.

42일에 실험군의 경우, 비장 내 CD8+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군에 비하여 각각 10.78 ± 1.44 (-41.86%)

및 9.00 ± 3.93 (-51.44%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 16.10 ± 2.42 (49.42%) 및 17.60 ± 3.32 (63.34%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 16.40 ± 3.46 (82.22%) 및 19.97 ± 1.60 (121.85%)의 변화를 나타내었다(Table 3).

4) TNF-α+ 세포 수 변화

28일에 실험군의 경우, 비장 내 TNF-α+ 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군(14.13 ± 1.46)에 비하여 각각 4.64 ± 1.69 (-67.17%) 및 6.60 ± 0.82 (-53.30%)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 8.33 ± 1.93 (9.42%) 및 9.80 ± 1.72 (111.21%)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진쑥 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 10.20 ± 1.90 (54.55%) 및 11.60 ± 1.30 (75.76%)의 변화를 나타내었다.

Table 4. Changes on the number of TNF- α + splenocytes in tumor inoculated mice at flow cytometrical observation

Group ID	Day 28	Day 42
Intact vehicle control	14.13 \pm 1.46 (n=3)	14.13 \pm 0.67 (n=3)
Hepa-1c1c7 cell inoculation groups		
vehicle control : HP	4.64 \pm 1.69* (n=5)	4.50 \pm 1.07* (n=4)
25 mg/kg of mACH : H1	8.33 \pm 1.93*.# (n=4)	10.30 \pm 0.87*.# (n=3)
100 mg/kg of mACH : H2	9.80 \pm 1.72*.# (n=5)	15.53 \pm 3.24# (n=4)
Sarcoma 180 cell inoculation groups		
vehicle control : SP	6.60 \pm 0.82* (n=3)	2.50 \pm 0.72* (n=4)
25 mg/kg of mACH : S1	10.20 \pm 1.90*.# (n=3)	5.70 \pm 1.93*.# (n=3)
100 mg/kg of mACH : S2	11.60 \pm 1.30# (n=3)	6.43 \pm 0.76*.# (n=3)

Mean \pm S.D. of percentages of FITC positive cells (%/1 \times 10⁶ splenocytes); * p<0.05 compared to that of intact vehicle control; # p<0.05 compared to those of equal tumor cell inoculated vehicle controls by MW test.

42일에 실험군의 경우, 비장 내 TNF- α + 세포의 수가 Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상군(14.13 \pm 0.67)에 비하여 각각 4.50 \pm 1.07 (-68.16 %) 및 2.50 \pm 0.72 (-82.31 %)의 변화를 나타내었으나, Hepa-1c1c7 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 HP 매체 대조군에 비하여 10.30 \pm 0.87 (128.89 %) 및 15.53 \pm 3.24 (245.00 %)의 변화를 나타내었으며, Sarcoma 180 세포를 이식한 후 인진썩 추출물 25 및 100 mg/kg 투여 군에서는 각각 SP 매체 대조군에 비하여 5.70 \pm 1.93 (128.00 %) 및 6.43 \pm 0.76 (157.33 %)의 변화를 나타내었다(Table 4).

고 찰

지금까지 인진썩 추출물의 직간접적인 항암 활성화에 관하여서는 보고되어 있으며(5), 김 등(19)의 실험에서도 인진썩 추출물의 종양 증식 억제 효과 또는 전이 억제 효과를 관찰하였으나, 정확한 기전에 관하여서는 아직 불명확한 상태이다.

성숙한 T 세포에서는 CD4나 CD8 중 어느 하나가 발현되지만, 미분화한 T 세포에서는 CD4와 CD8가 동시에 발현된다. 일반적으로 CD4+ 세포는 helper T 세포로, CD8+ 세포는 cytotoxic T 세포로 불려진다(1).

종양으로 유발된 면역억제는 주로 T 세포나 대식세포들의 수 및 활성의 감소에 의하는 것으로 알려져 있으며(7,15), 면역억제는 종양 환자에서 일반적으로 관찰된다(3,12).

본 연구에서 flow cytometry법을 이용한 실험 결과, 인진썩 추출물 투여 후 7, 14, 21일까지 실험군의 경우, HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비하여 유의성 있는 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α + 세포의 수적 감소가 관찰되지 않았다. 하지만 28일 및 42일에 실험군 모두, Hepa-1c1c7 및 Sarcoma 180 세포를 이식한 HP 및 SP 매체 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α + 세포의 수적 감소가 관찰되었으나, 이러한 면역 세포들은 인진썩 추출물

투여에 의해 투여 용량 의존적으로 매체 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 증가되었다. 즉, 인진썩 methanol 추출물이 종양 이식에 의한 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 세포 수(비율)의 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다.

따라서, Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포를 마우스에 이식하여 마우스 생체 내에 종양이 유발됨에 따라 이러한 종양세포를 각각의 T세포 및 TNF- α + 분비세포가 감지하여 수가 많아지는데 이 때 인진썩 추출물의 투여가 이런 반응을 활성화시키기 때문에 수적인 증가를 보였다고 사료된다. 아울러, 인진썩 추출물의 투여에 따라 pan T(CD3+), helper T(CD4+), suppressor T(CD8+) 및 TNF- α + 분비세포의 수가 증가하게 되었으며 이러한 T세포와 TNF- α + 분비세포가 증가됨에 따라 면역반응을 활성화시켜 종양세포를 억제시키는 것으로 사료된다.

그러므로 이러한 결과는 앞에서 보고한 인진썩 methanol 추출물의 종양 증식 억제 및 전이 억제 활성이 T 세포를 통한 면역조절 효과에 의해 일어나는 것을 직접적으로 나타내는 것으로 생각된다.

한편 수많은 천연 유래 면역 조절체들이 CD4+, CD8+ T 림프구를 매개로 하여 전이 억제 활성을 가진다고 보고되었으며(2,4,8) 이들의 항암 활성화 중 일부는 종양에 의해 억제된 면역 반응의 증가에 의한것이라고 알려져 있다(11).

비장 세포를 포함하여 다양한 세포에 의해 생성된 cytokine의 일종인 종양괴사인자(TNF- α)는 T-계통(lineage) commitment(수행)와 분화를 유도하는 인자로 발견되어졌으며(13), 생체 내에서 매우 낮은 용량으로 면역 반응을 증진시킬 수 있으며, 그 결과 체중 감소나 조직 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 T 세포와 B 세포의 분아증식을 높이고, cytotoxic T 세포의 발생을 증진시킨다. 또한, interleukin (IL)-2로 유도된 immunoglobulin 생산을 증진시키고, IL-2로 자극받은 natural killer 세포의 활성화와 단핵구(monocytes)의 증식을 증대시킨다(6). 따라서 인진썩 methanol 추출물의 처치에 의한 TNF- α + 세포 증가는 T 세포의 증가에 따라 2차적인 반응으로 유발될 수도 있으나,

TNF- α 의 감소 역시 종양 환자에서 일반적으로 관찰되고 (10), 일부 항암제가 TNF- α 의 활성을 매개하여 항암활성을 나타낸다고 알려져 있어(14,15,17), 본 실험 결과에서 인진쑥 methanol 추출물이 직접적으로 TNF- α + 세포 증식을 촉진 시킨 것으로 사료된다. 즉, 인진쑥 추출물 투여에 따라 비장세포에서 TNF- α + 분비세포가 많아지게 되면 주요 면역기관의 활성을 항진시켜, 염증반응에 대한 반응속도를 상승시키고 항원에 대한 항체 생성능을 증강시킴으로서 면역증강효과를 보여 종양이 억제되는 것으로 사료된다.

본 연구에서 flow cytometry법을 이용한 결과에서 인진쑥 methanol 추출물이 종양 이식 후 시간에 관계없이, 28일과 42일에 모두 양호한 면역조절 효과를 나타내었기 때문에, 인진쑥 methanol 추출물은 초기 또는 어느 정도 진행된 종양 모두에 대해서 종양 전이 억제 및 항암 활성을 보일 것으로 기대된다.

따라서 인진쑥 추출물의 항암활성 및 면역 증진을 나타내는 유효 성분들에 대한 동정, 생리활성 평가, 작용기전 규명 및 동물실험 모델에서의 면역조직화학적 소견을 통한 항암 효과 확인, cytokine 함량 측정을 통한 면역활성효과 확인 등이 계속 연구되어야 할 것으로 생각된다.

아울러, 인진쑥 메탄올 추출물의 주요한 화학적 성분(정확한 약효 성분)을 분석하고 이를 토대로 더 나아가 다른 종류의 암들에 대한 연구를 할 필요가 있다고 생각된다.

결 론

인진쑥은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 전통 민간요법에서 복통, 간염, 만성 간질병, 황달, 천식 등의 치료에 사용되어진 약용 식물 중 가장 흔한 식물이다.

인진쑥 methanol 추출물은 flow cytometry법을 이용하여 210두의 ICR계 마우스를 이용한 본 동물실험의 결과에서 종양에 의한 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α + 세포 수의 감소를 투여 용량 의존적으로 억제하는 것으로 관찰되었다. 즉, 이러한 종양세포에 대한 전이 억제 효과 또는 항암효과는 인진쑥 methanol 추출물의 투여로 인해 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α + 세포에 대하여 면역활성을 증가시켜 일어나는 것으로 판단된다. 또한 28일 및 42일 실험군 모두에서 종양에 의한 면역억제를 차단하는 것으로 관찰되어, 인진쑥 추출물은 초기 및 어느 정도 진행된 종양 모두에 대하여 종양 전이 억제 및 증식 억제 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

따라서 본 실험에서도 인진쑥 추출물의 항암 효과를 확인할 수 있었다.

결론적으로 인진쑥 메탄올 추출물이 Hepa-1c1c7과 Sarcoma 180 세포주에 대해 유의한 항암 효과를 가진다고 사료되므로 인진쑥 추출물은 수의와 인의 임상에서 생약으로 개발하여 임상적으로 적용해볼 가치가 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Burnet M. The Helper T-Cell Responses. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia: Saunders. 1995: 139-154.
2. Hayakawa Y, Fujii H, Hase K, Ohnishi Y, Sakukawa R, Kadota S, Namba T, Saiki I. Antimetastatic and immunomodulating properties of the water extract from *Celosia argentea* seeds. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 1154-1159.
3. Hsieh CL, Chen DS, Hwang LH. Tumor induced immunosuppression: a barrier to immunotherapy of large tumors by cytokine secreting tumor vaccine. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 681-692.
4. Hu X, Cao BN, Hu G, He J, Yang DQ, Wan YS. Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garlic extract in rat sarcoma cells. *Int J Mol Med* 2002; 9: 641-643.
5. Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 113-117.
6. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia: Saunders. 1995: 155-169.
7. Jaffe ML, Arai H, Nabel GJ. Mechanisms of tumor induced immunosuppression: evidence for contact-dependent T cell suppression by monocytes. *Mol Med* 1996; 2: 692-701.
8. Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic activities of 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots. *Planta Med* 2004; 70: 211-219.
9. Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, Watanabe N, Oshima Y, Konno C, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. *Planta Medica* 1984; 50: 81-85.
10. Naama HA, Mack VE, Smyth GP, Stapleton PP, Daly JM. Macrophage effector mechanisms in melanoma in an experimental study. *Arch Surg* 2001; 136: 804-809.
11. Pal S, Bhattacharyya S, Choudhuri T, Datta GK, Das T, Sa G. Amelioration of immune cell number depletion and potentiation of depressed detoxification system of tumor-bearing mice by curcumin. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 470-478.
12. Riccobon A, Gunelli R, Ridolfi R, De Paola F, Flamini E, Fiori M, Saltutti C, Petrini M, Fiammenghi L, Stefanelli M, Granato AM, Cuzzocrea DE, Amadori D. Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest* 2004; 22: 871-777.
13. Samira S, Ferrand C, Peled A, Nagler A, Tovbin Y, Ben-Hur H, Taylor N, Globerson A, Lapidot T. Tumor necrosis factor promotes human T-cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells* 2004; 22: 1085-1100.
14. Singh N, Singh SM, Shrivastava P. Immunomodulatory and antitumor actions of medicinal plant *Tinospora cordifolia* are mediated through activation of tumor-associated macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2004; 26: 145-162.
15. Singh SM, Singh N, Shrivastava P. Effect of alcoholic extract of Ayurvedic herb *Tinospora cordifolia* on the proliferation and myeloid differentiation of bone marrow precursor cells in a tumor-bearing host. *Fitoterapia* 2006; 77: 1-11.

16. Wang RF. Immune suppression by tumor specific CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 73-79.
17. Yang Y, Liu SZ, Fu SB. Antitumor effects of pNEgr-mIL-12 recombinant plasmid induced by X-irradiation and its mechanisms. *Biomed Environ Sci* 2004; 17: 135-143.
18. 김태정. 한국의 자원 식물 IV. 서울: 서울대학교 출판부. 1996: 259.
19. 김홍태, 김주완, 임미경, 진태원, 여상건, 장광호, 오태호, 이근우. 인진쑥 추출물의 세포독성효과. *한국임상수의학회지* 2007; 24(3): 367-371.