

免疫活性에 의한 夏枯草의 癌轉移 抑制 效果

경희대학교 한의과대학 한방부인과교실

허자경, 이진무, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Effect of *Prunellae Spica* Extracts on Anti-tumor Metastasis by Immune Activity

Ja-Kyung Heo, Jin-Moo Lee, Chang-Hoon Lee,
Jung-Hoon Cho, Jun-Bok Jang, Kyung-Sub Lee
Dept. of Oriental Gynecology, Kyung-hee University

Purpose: This study was designed to investigate the anti-tumor metastasis by immunomodulating effects of extracts of *Prunellae Spica*.

Methods: Antimetastatic experiment was conducted *in vivo* by using colon 26-M3.1 carcinoma. And we observed cytotoxicity of *Prunellae Spica* on colon 26-M3.1 carcinoma, L5178Y-R lymphoma cell, hela cell and macrophage. To observe the immunomodulating effects of *Prunellae Spica*, we estimated IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α from peritoneal macrophages. And we evaluated the activation of NK cell by using anti-asialo-GM1 serum.

Results: We found that the administration of *Prunellae Spica* extracts significantly inhibited tumor metastasis *in vivo*. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, cell growth are closer to 100% in case of colon 26-M3.1 carcinoma, L5178Y-R lymphoma cell, hela cell at low concentration. In case of macrophage, cell proliferation is closer to 100% less than 62.5 μ g/ml of *Prunellae Spica* extracts. The level of cytokine such as IL-6, IL-10, IL-12 which stimulates *Prunellae Spica* extracts was increased in dose-dependent manner compared to the control group. TNF- α is hardly secreted less than 250 μ g/ml. The depletion of NK cells by anti-asialo GM1 serum partly abolished the inhibitory effect of *Prunellae Spica* on tumor metastasis.

Conclusion: *Prunellae Spica* appears to have considerable activity on the anti-metastasis by activation the immune system such as macrophage and NK cell.

Key Words: *Prunellae Spica*, anti-metastasis, immune system

I. 緒 論

감염성질환 치료와 심혈관질환 예방의 발전으로 惡性腫瘍이 선진국의 3대 사망원인 중 하나가 되었으며¹⁾, 국내에서도 2005년 이후 여성 사망원인 2위로 보고되고 있다²⁾.

惡性腫瘍의 치료에는 수술요법, 방사선요법 및 화학요법 등이 사용되나, 수술요법은 轉移腫瘍 치료에 한계가 있으며, 방사선요법은 정상조직에 대한 부작용이 존재한다. 화학요법은 全身 轉移에 사용가능한 장점이 있으나, 오심, 구토, 구내염 및 탈모증 등의 부작용과 아울러 인체 면역기능을 담당하는 세포에도 독성을 가진다는 한계가 있다³⁾.

惡性腫瘍의 발생 이론 중 하나가 인체 면역기능의 감소라는 점³⁾과 화학요법의 이러한 부작용을 해결하기 위해, 최근에는 인체의 면역기능 활성화를 통한 항암효과를 가진 새로운 약물에 대한 관심이 증가하고 있다⁴⁻⁸⁾.

《靈樞》⁹⁾에 腸覃, 石瘕 및 積聚 등의 腫瘍과 관련된 병명이 기재된 이래, 한의학에서는 癥瘕, 癭瘤, 石癰, 緩疽 및 石疽 등으로 腫瘍을 인식하였다¹⁰⁾. 腫瘍에 대한 한의학적 치료는 祛邪法과 扶正培本 및 兩者를 兼하는 扶正祛邪法으로 분류되며¹¹⁾, 각 치료법을 활용한 韓藥과 處方의 항암효과에 대한 연구가 이루어지고 있다¹²⁻¹⁵⁾. 祛邪法 중 하나인 清熱解毒法을 통한 항암효과에 대해서도 연구가 진행된 바 있으나^{16,17)}, 면역기능 활성화를 통한 항암연구는 이루어진 바 없다.

夏枯草는 脣形科에 속한 多年生 本草인 꿀풀의 果穗를 건조한 것으로, 性味가 寒無毒 辛苦하고 清肝散結하는 효능

이 있어 瘰癧, 癭瘤, 乳癰 및 乳癌 등의 종양치료에 사용되어 왔다¹⁸⁾. 실험적으로 유방암 예방효과¹⁹⁾, 갑상선항진증 개선효과²⁰⁻²²⁾가 보고된 바 있으며, 항염증효과²³⁾ 및 면역증강효과²⁴⁾가 보고된 바 있어 면역기능 활성화를 통한 항암효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 清熱散結의 효능을 가진 夏枯草의 免疫 活性化를 통한 癌轉移 抑制 效果를 알아보려고, macrophage 및 NK cell 활성화와 관련된 전이억제 효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 藥 材

한국식물추출물은행에서 脣形科 (꿀풀과: Labiatae)에 속한 多年生 本草인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* NAKAI의 건조된 果穗를 HPLC (methanol, 50°C)로 추출하여 tube에 분주 후 45°C에서 감압 농축법으로 제조한 추출물 (CW04-060)을 구매하여 사용하였다.

2) 動 物

생후 6-8주령의 雌性 BALB/c 마우스를 (주)중앙실험동물 (Seoul, Korea)에서 분양 받아 사육조에 각 군별로 5마리씩 배정하였다. 정수된 물과 사료 (Samyang Co. Ltd., Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50% 및 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 무균상태로 사육하였다.

2. 方 法

1) 試藥

종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640 과 Eagle's minimal essential medium (이하 EMEM) 배지, fetal bovine serum (이하 FBS), vitamin, non-essential amino acid, L-glutamic acid 및 thioglycollate 등은 Gibco사 (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 細胞培養

Colon26-M3.1 carcinoma cell의 배양은 7.5% FBS, vitamin, sodium pyruvate, non-essential amino acid 및 L-glutamine 이 함유된 EMEM 배지를, L5178Y-R lymphoma cells, Hela cells 및 macrophage 의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기 (Thermo, MA, USA)에서 배양하였다.

3) 腫瘍轉移 모델

夏故草의 암전이 예방효과를 *in vivo* 에서 확인하기 위하여 5마리의 BALB/c 마우스에 夏故草 추출물 10, 50 및 250 μg 을 1일 1회 1일간 정맥주사 하였으며, 대조군은 동일한 용량과 방법으로 생리 식염수를 정맥주사 하였다. 정맥주사 2일 후, 각 마우스 당 2.7×10^4 cells의 colon26-M3.1 carcinoma 세포주를 꼬리 정맥에 정맥주사로 접종하였다. 접종 14일 후 경추분리법으로 마우스를 희생시킨 후 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정하고 종양의 군집 수를 측정하였다.

4) 腫瘍細胞에 대한 細胞毒性

(1) Colon26-M3.1 carcinoma cell에 대한 細胞毒性

$1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 농도의 colon26-M3.1 carcinoma cell을 96-well plate의 각 well에 100 μl

씩 분주한 후, 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 3배 희석법으로 8.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 희석한 夏故草 검액 100 μl 를 각각 첨가하고 2일간 배양하였다. 배양 완료 2-4시간 전에 cell counting kit (Wako, Japan) 용액을 well당 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 후, 생존세포가 생산한 수용성 formazan의 양을 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(2) L5178Y-R lymphoma cell과 Hela cell에 대한 細胞毒性

$1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 농도의 L5178Y-R lymphoma cell을 96-well plate의 각 well에 100 μl 씩 분주한 후, 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 희석한 夏故草 검액 100 μl 를 각각 첨가하고 2일간 배양하였다. Hela cell 역시 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 농도로 96-well plate의 각 well에 100 μl 씩 분주한 후, 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 3배 희석법으로 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 희석한 夏故草 검액 100 μl 를 각각 첨가하여 2일간 배양하였다. 배양 완료 2-4시간 전에 cell counting kit (Wako, Japan) 용액을 well당 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 후, 생존세포가 생산한 수용성 formazan의 양을 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

5) Macrophage에 대한 影響

(1) Macrophage 收集

BALB/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 ml 복강주사하고 3일 후에 경추 분리법으로 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 ml을 주입하여 복강 내 세포 (peritoneal exudative cells: 이하 PEC)를 수집하였다. 수집된 PEC를 24 well

culture plate에 $1.5 \times 10^6/ml$ 의 농도로 조정하여 분주 후, 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착하고 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다.

(2) Macrophage에 대한 細胞毒性

$1 \times 10^5/ml$ 의 macrophage를 96-well plate의 각 well에 100 μl 씩 분주한 후, 4,000 $\mu g/ml$ 부터 4배 희석법으로 1.0 $\mu g/ml$ 까지 희석한 夏枯草 검액 100 μl 를 첨가하고 2일간 배양하였다. 배양 완료 2-4시간 전에 cell counting kit (Wako, Japan) 용액을 well당 10 $\mu g/ml$ 첨가 후, 생존세포가 생산한 수용성 formazan의 양을 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

(3) Macrophage의 cytokines 測定

Macrophage를 24시간 동안 배양 후, 배양 상등액을 회수하였다. 배양 상등액에 유도 분비된 interleukin (이하 IL)-6, IL-10, IL-12 및 tumor necrosis factor (이하 TNF)- α 의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit (Pharmingen, San Jose, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며, 각 cytokines의 양은 각각에 대한 표준곡선에 대입하여 계산하였다.

6) NK cell 關聯 腫瘍 轉移 모델

20마리의 BALB/c 마우스를 NK cell 제거군과 비제거군에 각각 10마리씩 무작위 배정 후, NK cell 제거군은 종양 접종 3일전 및 1일전에 50배 희석된 anti-asialo GM1 항체를 마우스당 500 μl 씩 총 2회 복강 주사하였다. NK cell 제거군과 비제거군 마우스 중 각각 5마리를 무작위로 선택하여 夏枯草 추출물 250 μg 을 1일 1회 정맥주사 하고, 나머지

는 동일한 용량과 방법으로 생리식염수를 정맥주사 하였다. 정맥주사 2일 후, 각 마우스 당 2.7×10^4 cells의 colon26-M3.1 carcinoma 세포주를 꼬리정맥에 정맥주사로 접종하였다. 접종 14일 후 경추분리법으로 마우스를 희생시킨 후 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정하고 종양의 군집 수를 측정하였다.

7) 統計處理

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS for windows (version 12)를 이용하였다. 실험군과 대조군의 비교는 Student's *t*-test로 분석하였고, $p < 0.05$ 이하인 경우를 유의한 것으로 하였다.

III. 結 果

1. 腫瘍 轉移 抑制에 미치는 影響

마우스 모델에서 colon26-M3.1 carcinoma cell 전이에 미치는 영향을 알아보기로자 10, 50 및 250 μg 夏枯草 추출물을 투여한 결과, 50 μg 과 250 μg 夏枯草 추출물 투여 시 종양 군집수가 각각 19.0 ± 11.7 과 12.2 ± 5.0 으로 대조군의 85.0 ± 11.5 에 비하여 통계적으로 유의한 ($p < 0.01$) 종양 전이 억제 효과를 보였다(Fig. 1).

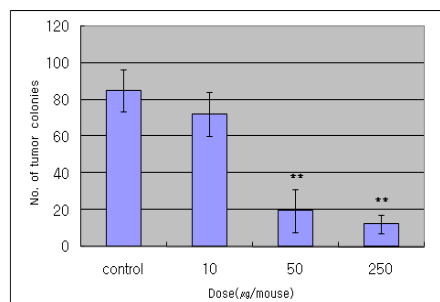


Fig. 1. Effect of *Prunellae Spica* on lung metastasis produced by colon26-M3.1 carcinoma cells.

2. 腫瘍 細胞에 대한 細胞毒性

1) Colon26-M3.1 carcinoma cell에 대한 細胞毒性 效果

夏枯草 추출물을 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 3배 희석법으로 8.2 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 colon26-M3.1 carcinoma cell의 증식을 관찰한 결과, 666.7 $\mu\text{g/ml}$ 부터 서서히 증가되어 74.1 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 100%에 가까운 세포증식을 나타내었으며, IC_{50} 은 270 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 2).

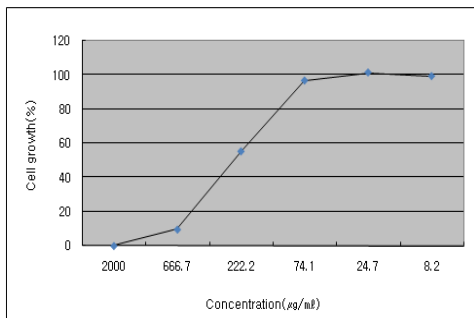


Fig. 2. Cytotoxic effect of *Prunellae Spica* on colon26-M3.1 carcinoma cell *in vitro*.

2) L5178Y-R lymphoma cell에 대한 細胞毒性 效果

夏枯草 추출물을 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 L5178Y-R lymphoma cell의 증식을 관찰한 결과, 625 $\mu\text{g/ml}$ 부터 서서히 증가되어 156.3 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 100%에 가까운 세포증식을 나타내었으며, IC_{50} 은 350 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 3).

3) Hela cell에 대한 細胞毒性 效果

夏枯草 추출물을 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 3배 희석법으로 0.9 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 Hela cell의 증식을 관찰한 결과, 222.2 $\mu\text{g/ml}$ 부터 서서히 증가되어 74.1 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 100%에 가까운 세포증식을 나타내

었으며, IC_{50} 은 140 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 4).

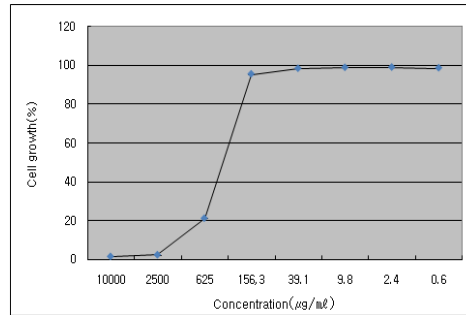


Fig. 3. Cytotoxic effect of *Prunellae Spica* on L5178Y-R lymphoma cell *in vitro*.

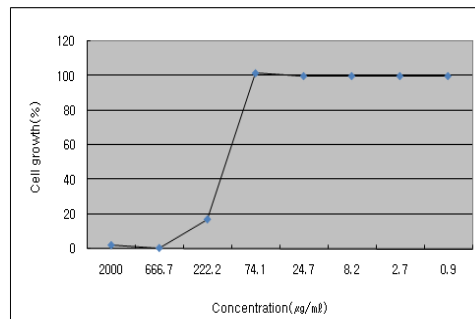


Fig. 4. Cytotoxic effect of *Prunellae Spica* on Hela cells *in vitro*.

3. Macrophage에 미치는 影響

1) Macrophage에 대한 細胞毒性 效果

夏枯草 추출물을 4,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 macrophage의 증식을 관찰한 결과, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 서서히 증가되어 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 100%에 가까운 세포증식을 나타내었으며, IC_{50} 은 610 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 5).

2) IL-6의 分泌

夏枯草 추출물을 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 macrophage의 IL-6의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 250 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-6 분비 증가가 관찰되었다.

이 때, 양성대조군으로 사용한 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS의 경우 853.5 ± 960.5 pg/ml이었다 (Fig. 6).

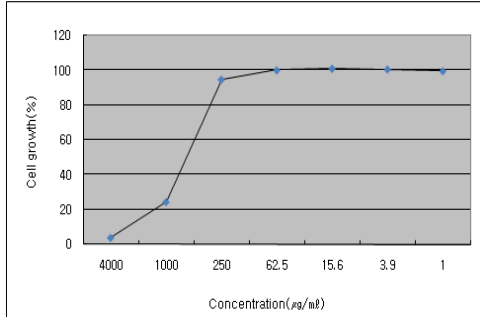


Fig. 5. Cytotoxic effect of *Prunellae Spica* on macrophage in vitro.

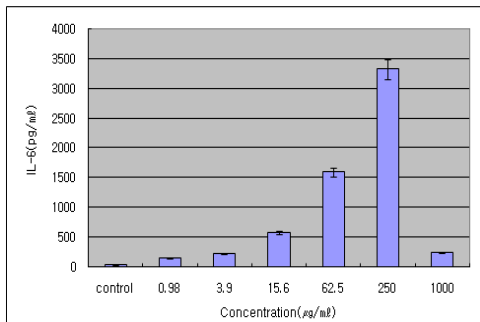


Fig. 6. Production of IL-6 from peritoneal macrophages stimulated by *Prunellae Spica*.

3) IL-10의 分泌

夏枯草 추출물을 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 macrophage의 IL-10의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-10 분비 증가가 관찰되었다. 이 때, 양성대조군으로 사용한 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS의 경우 520.0 ± 46.0 pg/ml이었다 (Fig. 7).

4) IL-12의 分泌

夏枯草 추출물을 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후

macrophage의 IL-12의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-12 분비 증가가 관찰되었다. 이 때, 양성대조군으로 사용한 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS의 경우 177.5 ± 10.9 pg/ml이었다 (Fig. 8).

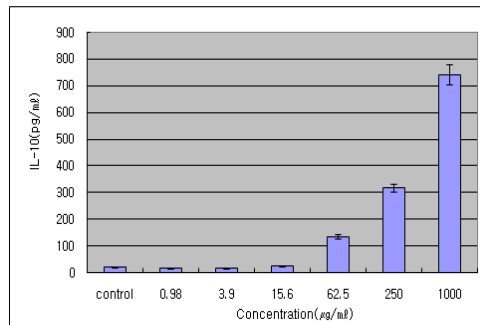


Fig. 7. Production of IL-10 from peritoneal macrophages stimulated by *Prunellae Spica*.

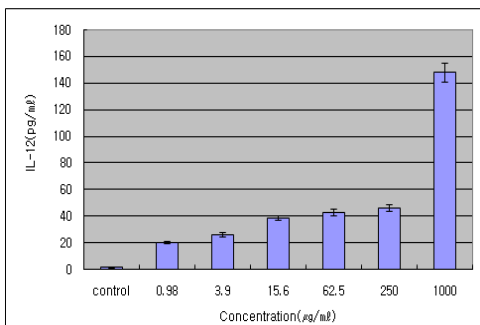


Fig. 8. Production of IL-12 from peritoneal macrophages stimulated by *Prunellae Spica*.

5) TNF- α 의 分泌

夏枯草 추출물을 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 4배 희석법으로 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 후 macrophage의 TNF- α 의 분비를 관찰한 결과, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 TNF- α 분비가 거의 관찰되지 않았다. 이 때, 양성대조군으로 사용한 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS의 경우 455.9 ± 6.1 pg/ml이었다 (Fig. 9).

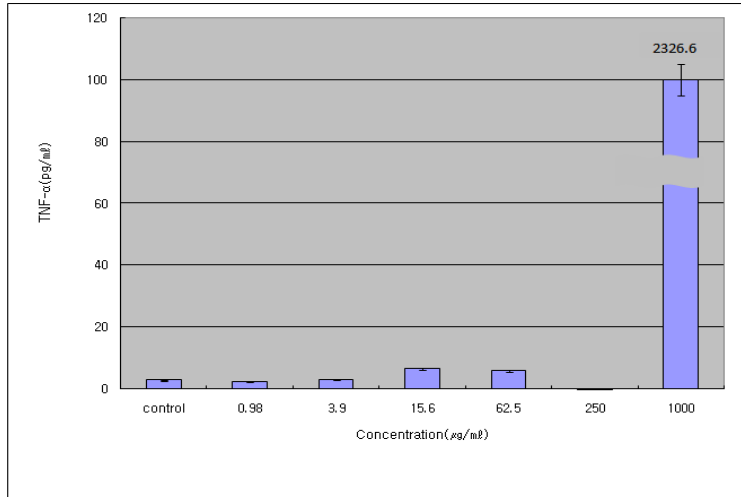


Fig. 9. Production of TNF-α from peritoneal macrophages stimulated by *Prunellae Spica*

4. NK cell 活性에 미치는 影響

NK cell의 활성화에 따른 colon26-M3.1 carcinoma cell 전이에 미치는 영향을 알아보기 위하여 250 μg 夏枯草 추출물을 투여한 결과, anti-asialo-GM1 항체 처리군에서는 夏枯草 투여군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었으나, anti-asialo-GM1 항체 비처리군에서는 夏枯草 투여군이 4.8±2.9로 대조군의 41.8±12.3에 비하여 통계적으로 유의한 (p<0.01) 중앙 억제 효과를 보였다(Fig. 10).

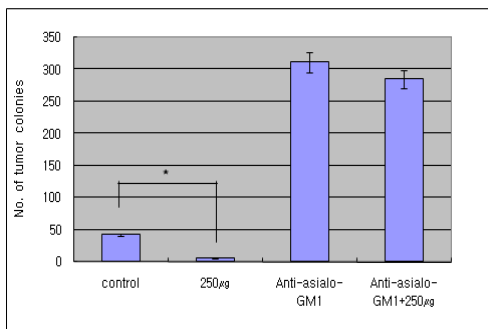


Fig. 10. Effect of NK cell depletion on *Prunellae Spica*-induced inhibition of lung metastasis.

IV. 考 察

惡性腫瘍이란 신체의 거의 모든 세포에서 발생하여 목적 없이 무질서하게 비가역적으로 증가하며, 정상적인 생화학적 및 물리학적 제약을 받지 않고 스스로 발육하여 정상 조직을 파괴하며 轉移能을 나타내는 질환이다^{3,25,26}.

惡性腫瘍에 대한 치료법으로 서양의학에서는 수술요법, 방사선요법 및 화학요법이 활용된다^{3,27}. 그러나 수술요법은 轉移된 腫瘍의 치료가 불가능하다는 한계가 있으며, 방사선요법은 局所的 浸潤性 腫瘍의 치료에는 유효하나 轉移 腫瘍의 경우에는 치료에 제한이 있으며, 정상 조직의 손상과 골수 조혈기능 장애, 탈모, 피부이상 및 장기손상 등의 부작용이 있다³.

화학요법은 全身的 轉移의 경우 사용 가능한 치료법이지만, 화학 항암제들은 腫瘍細胞뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어 腫瘍細胞를 사멸하는 동시

에 骨髓造血機能을 억제하고 소화기관 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하며, 인체의 면역기능을 저하시키는 문제가 있다^{3,25}. 惡性腫瘍 환자에서 T세포, B세포 및 macrophage의 기능 저하가 있다는 점³과 더불어 화학요법의 이러한 부작용을 해결하기 위해, 면역 항암 요법이 여러 방면으로 시도되고 있고^{1,25,27}, 韓藥에 대한 연구⁴⁻⁸) 또한 활발히 진행되고 있다.

한의학에서는 腫瘍에 대해 《靈樞》⁹⁾에서 腸覃, 石瘕 및 積聚 등으로 인식한 이래 巢¹⁰⁾는 癥瘕, 癭瘤, 石癰, 緩疽 및 石疽 등으로, 李²⁸⁾는 癥積, 瘕聚로, 張²⁹⁾은 積聚 등으로 인식하였다. 腫瘍 발생의 病因病機는 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪毒 등의 유발요인에 의하여 개체의 臟腑機能과 氣血이 실조되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒溫結, 正氣虛弱 및 經絡瘀阻 등의 병리변화가 나타나고, 이러한 변화가 單獨 혹은 相好錯雜되면서 氣機가 不通되고 오래되면 發癌하게 된다³⁰⁾.

腫瘍에 대한 한방치료는 淸熱解毒, 活血化瘀, 化痰消癥 및 理氣消腫 등의 祛邪法과 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽 및 健脾益腎 등의 扶正培本法 및 兩者를 兼하는 扶正祛邪法으로 구분된다¹¹⁾. 이 중 祛邪法은 淸熱解毒과 活血化瘀로 大別되고, 祛邪法 중 하나인 淸熱解毒法을 통한 항암효과에 대한 연구가 진행된 바 있으나^{16,17)}, 면역기능 활성화를 통한 항암연구는 이루어진 바 없다.

夏枯草는 唇形科 (꿀풀과: Labiatae)에 속한 多年生 本草인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* NAKAI의 果穗를

건조한 것이다. 性味が 苦寒하여 泄熱하고 辛味는 散結하여 주로 肝經에 들어가 肝火를 淸하고 鬱結을 散하는 효능으로 肝熱과 痰, 火가 鬱結되어 나타나는 질환을 치료하는 要藥이 되어 瘰癧, 癭瘤, 目赤腫痛, 頭痛 및 眩暈 등에 사용하여 왔다¹⁸⁾. 또한 실험적으로 유방암 예방효과¹⁹⁾, 갑상선항진증 개선효과²⁰⁻²²⁾가 보고된 바 있으며, 항염증효과²³⁾ 및 면역증강효과²⁴⁾가 연구된 바 있어 면역기능 활성화를 통한 항암효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 夏枯草의 면역 기능 활성화에 의한 암전이 억제효과를 알아보기 위하여, colon26-M3.1 carcinoma cell을 이용한 종양 전이 모델에 대한 夏枯草 추출물의 영향을 알아본 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 투여군에서 통계적으로 유의한 종양 전이 억제 효과가 나타났다. 이러한 夏枯草 투여에 따른 종양 전이 억제 효과의 기전으로 夏枯草 추출물에 의한 직접적인 細胞毒性 또는 종양세포에 대한 면역계 활성화를 생각할 수 있었다.

夏枯草 추출물의 종양세포에 대한 직접적인 細胞毒性 여부를 확인한 결과, colon26-M3.1 carcinoma cell의 IC_{50} 은 270 $\mu\text{g/ml}$ 로, L5178Y-R lymphoma cell의 IC_{50} 은 350 $\mu\text{g/ml}$ 로, Hela cell의 IC_{50} 은 140 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. 이러한 결과는 鬱金¹²⁾, 知母¹⁶⁾와 같은 직접적 細胞毒性을 갖는 약물들에 비하여 현저히 높은 농도에서의 細胞毒性으로, 夏枯草의 종양전이 억제효과가 직접적 細胞毒性에 의한 것은 아닐 것으로 사료된다.

면역기능에 대한 夏枯草의 효과를 조사하기 위하여 macrophage에 대한 細胞毒性 효과를 알아본 결과, 夏枯草 추출

물의 IC₅₀은 610 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 종양 세포에 대한 직접적인 세포독성보다는 높은 IC₅₀을 나타내었다.

IL-6은 T 및 B 세포, 단핵구, 대식세포, 혈관내피세포 및 섬유모세포 등에서 합성되는 26-kDa의 단백질로, B 세포의 분화를 촉진시키고, 면역글로불린의 합성을 증진하며, 다른 cytokine과 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 작용을 한다³¹⁾. 夏枯草 추출물에 의한 macrophage의 IL-6의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 250 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-6 분비 증가가 관찰되었다.

IL-10은 T세포, 단핵구 및 대식세포 등에서 합성되는 35~40-kDa의 단백질로 강력한 항염증작용이 있으며, 여러 가지 염증성 cytokine 생성의 균형을 조절하는 cytokine이다³¹⁾. 夏枯草 추출물에 의한 macrophage의 IL-10의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-10 분비 증가가 관찰되었다.

IL-12는 단핵구와 대식세포 등에서 합성되는 70-kDa의 단백질로, CD4+ 및 CD8+T세포와 NK cell을 활성화시키는 작용을 한다³¹⁾. 夏枯草 추출물에 의한 macrophage의 IL-12의 분비를 관찰한 결과, 0.98 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도 의존적인 IL-12 분비 증가가 관찰되었다.

TNF는 단핵구와 대식세포에서 주로 생성되는 17-kDa의 pro-inflammatory cytokine이다. TNF- α 는 직접적인 세포 독성 효과를 나타내기도 하고 세포의 증식 및 분화를 조절하며, 만성 염증이나 감염에서도 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 夏枯草 추출물에 의한 macrophage

의 TNF- α 의 분비를 관찰한 결과, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 TNF- α 분비가 거의 관찰되지 않았다.

腫瘍免疫에서는 細胞性 免疫이 주된 역할을 한다고 알려져 있고, macrophage, NK cell 및 T 림프구 등의 세포가 腫瘍免疫과 관계된다. 그러므로 이러한 세포들의 활성화는 腫瘍의 발생과 진행 및 예후와 밀접한 관계가 있다고 보고되어 있다^{1,32)}. 이 중 활성화된 macrophage는 TNF- α 와 IL-12와 같은 cytokine들을 생산하여 암세포 혹은 미생물 등을 살해하는 NK-cell과 같은 면역세포의 활성화에 기여하며 결국 항원에 대한 적응면역을 개시하게 된다³³⁾.

夏枯草 추출물을 투여한 macrophage에서 IL-6, IL-10 및 IL-12 생성이 cytokine 종류에 따라 다소 차이를 보이는 하지만, 농도 의존적으로 증가하여 夏枯草가 macrophage와 같은 선천적 면역계 활성화 기능이 있음을 확인하였다. 그러나, 夏枯草 추출물 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 TNF- α 는 거의 분비되지 않았다.

NK cell은 B 세포도 T 세포도 아닌 림프구이며, 종양세포 살해능을 가지고 있다. NK cell 활성화는 생체에서 항종양 효과를 발휘한다고 생각되는데, 그 근거는 T세포가 관여 않는 동물에서 NK cell 활성을 높이면 腫瘍의 퇴축을 가져온다는 점, 그리고 Chediak-Higashi 증후군은 NK cell 활성이 낮아 림프구계 종양의 발생 빈도가 높다는 점 등이다¹⁾.

夏枯草 추출물의 NK cell에 대한 활성을 알아본 결과, macrophage가 존재하는 종양전이 모델에서는 夏枯草 추출물 250 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 대조군에 비해 통계적

으로 유의한 종양억제가 나타났으나, anti-asialo-GM1 항체를 처리하여 NK cell이 제거된 군에서는 夏枯草 투여군의 종양 억제 효과가 나타나지 않아, 夏枯草 추출물의 암전이 억제 효과는 NK cell 활성화를 통해 나타난 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 夏枯草 추출물이 세포 매개 면역반응에 관계하여 세포성 면역을 활성화시켜 암의 전이를 억제하는 작용이 있음을 시사하며, 향후 夏故草를 응용한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

夏枯草의 免疫 活性化를 통한 癌轉移 抑制 效果를 알아보고자, macrophage 및 NK cell 활성화와 관련된 전이억제 효과를 in vitro와 in vivo에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Colon26-M3.1 carcinoma cell에 50 μg 과 250 μg 夏枯草 추출물 투여시 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 종양 전이 억제 효과가 나타났다.
2. Colon26-M3.1 carcinoma cell, L5178Y-R lymphoma cell 및 Hela cell에 대한 夏枯草 추출물의 IC_{50} 은 각각 270 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.
3. 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 夏枯草 추출물은 macrophage에 대하여 세포독성을 보이지 않았고, 夏枯草 추출물 투여 후 macrophage의 IL-6, IL-10 및 IL-12는 夏枯草 추출물에 농도의존적인 분비 증가를 나타내었으며, TNF- α

의 경우, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서는 거의 분비되지 않았다.

4. Colon26-M3.1 carcinoma cell 전이는 anti-asialo-GM1 항체 비처리군에서만 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 억제되었다.

參考文獻

1. Janeway CA, Travers P. Immunobiology: the immune system in health and disease (2nd ed). New York: Garland Pub. 1996;12:17-25.
2. 통계청. www.kosis.kr. 성별 사망원인 별 통계조사. 2005.
3. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학(2). 서울:정담. 1997;1963, 1972, 1978-1990.
4. 이현. 白鼠의 中腕에 施術한 靑風藤藥 鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2004;21(6):85-102.
5. 박정현 등. 白鼠의 B16-F10 Melanoma에 대한 旱蓮草藥 鍼의 抗癌 및 免疫 增強效果. 大韓鍼灸學會誌. 2004;21(6):63-84.
6. 오치석 등. 中腕에 施術한 紅花藥 鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2004;21(5):205-218.
7. 박재영, 박희수. 敗醬藥 鍼의 암전이 억제 및 면역 조절 효과에 관한 실험적 연구. 大韓鍼灸學會誌. 2006;23(4):187-203.
8. Iizuka N et al. Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. Cancer Lett.

- 2000;158(1):35-41.
9. 河北中醫學院 校釋. 靈樞經校釋(下). 北京: 人民衛生出版社. 1995;37, 142, 144, 255.
 10. 巢元方. 諸病源候論校注(下). 北京: 人民衛生出版社. 1994;856-858, 879, 893-911.
 11. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울: 행림출판. 1995;84-92.
 12. 조유경 등. 鬱金이 胃癌細胞에 미치는 影響. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2003;9(1):15-37.
 13. 박미령 등. 活血化瘀法의 抗腫瘍 및 血行 轉移에 對한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2003;9(1):53-63.
 14. 이진화 등. 數種 補氣補血 韓藥의 血管新生 抑制效果. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2002;8(1):79-92.
 15. 윤성우 등. 익기양음해독탕의 항암 및 항전이효과에 관한 연구. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2003;9(1):1-14.
 16. 김형우 등. 知母 추출물이 MCF-7 세포의 생존율에 미치는 영향. 大韓韓方內科學會誌. 2007;28(3):608-614.
 17. 조훈 등. L1210 및 P388D₁ 에 대한 고삼 추출물의 세포독성에 관한 연구(II). 生藥學會誌. 1999;30(4):351-354.
 18. 전국한의과대학 본초학교수 공저. 本草學. 서울: 영림사. 2000;169-170.
 19. 남경수, 김한규, 손윤희. 하고초 에탄올추출물이 유방암 예방효소계에 미치는 영향. 生藥學會誌. 2003;34(2):161-165.
 20. 변부형, 임사비나. 덩싸리夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(1):503-511.
 21. 이운섭, 한상원. 꿀꿀과 및 덩싸리 夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(1):494-502.
 22. 김호진, 김선희. 덩싸리夏枯草가 甲狀腺機能亢進症 白鼠에 미치는 影響. 東西醫學. 1993;18(1):23-37.
 23. 고인자, 유승조, 이은방. 韓國産 夏枯草類의 藥物學的 研究(I): 消炎作用에 대하여. 生藥學會誌. 1986;17(3):232-241.
 24. 서부일, 김선희. 夏枯草의 免疫調節作用 및 알레르기 低減化에 關한 研究. 大韓本草學會誌. 1997;12(1):7-18.
 25. Cecil RL, Wyngaarden JG, Smith LH. Cecil textbook of medicine(1). Philadelphia: WB Saunders Co. 1998;1082-1084, 1115-1129.
 26. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease (6th ed). Philadelphia: WB Saunders. 1999;261-268.
 27. 민영돈 등. 암이란 무엇인가. 광주: 조선대학교 출판부. 2003;195, 230-232.
 28. 李梴. 醫學入門. 서울: 翰成社. 1983;483-484.
 29. 張介賓. 景岳全書. 서울: 大成文化社. 1988;475-483.
 30. 李岩. 腫瘤臨證備要 第2版. 北京: 人民衛生出版社. 1989;19-28.
 31. 대한진단검사의학회. 임상병리학(3판). 서울: 고려의학. 2001;429-433.
 32. Brunschwig A, Southam CM, Levin AG. Host resistance to cancer: clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leucocytes. Ann Surg. 1965;162(3):416-425.

33. Shin JY et al. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2002;24(3):469-482.