

대식세포에서 국산약용식물의 항암 및 항Virus에 대한 효과

엄성희 · 김대근 · 곽종환 · 이강노 · 이동권 · 표석능 · 지옥표
성균관대학교 약학대학

Antiviral and Antitumoral Activities of Domestic Medicinal Plants in Macrophages

Sung Hee Um, Dae Keun Kim, Jong Whan Kwak, Kang Ro Lee,
Dong Kwon Rhee, Suhkneung Pyo and Ok Pyo Zee
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Su Won 440-746, Korea

Abstract—In the present work, 70 extracts from 23 plants have been determined to induce cytotoxic and antiviral activities of macrophages using both MTT assay and neutral red dye uptake assay. We show that 13 extracts have induced cytotoxic activities and 5 extracts induced antiviral activity in mouse peritoneal macrophages. Among 13 extracts, macrophages treated with extracts from *Salvia plebeia* have demonstrated significant cytotoxicity but not antiviral activity. The present findings indicate that extracts from plants can stimulate macrophages to become resistant to virus and to kill tumor cells.

Keywords—Cytotoxicity · antiviral activity · plant extract · macrophage

복잡한 면역계의 구성성분은 면역조절작용에 따라 많은 기능을 나타내고 있는데 항원에 대한 면역계의 반응은 다양하여 특이하게 활성화된 면역세포나 활성인자 또는 이들 두가지의 생성을 초래한다¹⁻⁴⁾. 면역계의 다양한 구성인자 사이의 상호작용과 관계에 대한 정보는 면역계가 갖는 병원체에 대한 방어기능을 이해하는데 중요한 자료가 될 것 이다⁴⁾. 결과적으로 손상된 면역기능을 회복하고 숙주의 방어기능을 조절할 수 있는 면역조절 물질을 개발하는 것이 검토되어야 할 것이다¹⁻⁷⁾. 면역작용을 조절하기 위해서 다양한 면역조절제를 사용해왔으나 임상시험에서는 좋은 효과를 가져 오지 못하였다. 그러나 최근에 개발된 기술에 의하여 순도가 높은 물질의 생산이 가능하게 되어 면역조절제에 대한 관심이 높아가고 있다. 대다수의 면역조절제는 cytokines, 미생물로부터 얻어진 물질 또는 합성물질등이며 면역작

용을 증가시키거나 억제하는데 사용되고 있는데 그밖에 새로운 물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 그러나 천연물질의 면역조절작용에 대한 연구는 초보단계이다. 천연물로부터 면역조절제의 개발은 최근 들어서 큰 관심을 갖고 연구하는 한 분야로서, 이는 비교적 독성이 적으면서도 암을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 암치료제 및 항virus제의 개발이 매우 중요한 과제이기 때문일 것이다. 따라서 직접적인 세포독성보다는 생체의 방어기전, 즉 면역조절작용을 이용하여 항암 및 항virus 효과를 갖는 물질을 천연물로부터 개발하려는 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다. 전통적으로 3000여종의 이상의 생약이 항암제로 사용되고 있는것으로 알려지고 있으며, 이들을 성분별로 구분하여 보면 alkaloid, quinoid, terpenoid, lignan, coumarin 및 polysaccharide 등이다^{8,9)}. 현재 10여종의 활성 물질

들이 전임상 및 임상 연구중에 있는 것으로 보고 되고 있다.^{10,11)}

본연구는 국내에서 널리 자생되며 한방에서 많이 사용되어 오는 생약 80여종을 채집하여 용매 분획한 후 이들 분획에 대한 면역활성 효과를 일차적으로 23종 생약의 70 시료에 대하여 neutral red dye uptake assay와 MTT 검색법을 이용하여 세포성 면역의 중요한 역할을 하는 대식세포에서 virus의 cytopathic effects와 세포독성을 측정할 수 있도록 개발한 *in vitro* 방법을 이용하여 검색하였다^{12,13)}. 검색결과가 비교적 양호하다고 사료 되어 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험동물 및 Virus 균주 - 본 실험에 사용된 CD-1 생쥐는 국립보건원으로 부터 구입하였으며 Herpes simplex virus의 KOS 균주는 미국 South Carolina 대학의 Nachtigal 박사로부터 분양 받았다.

사용시약 및 식물 - 특별히 언급하지 않는한 모든 시약은 Sigma (St Louis, MO)로 부터 구입하였으며, 본 실험에서 사용된 식물들은 오대산, 제주도, 지리산, 설악산, 속리산, 울릉도, 선유도, 경기도 뱀봉, 운길산, 도동산, 수원및 부곡 일대에서 건조중량으로 약 100 g씩 채집하여 반 건조시킨후에 세절하여 실험에 사용하였다.

추출 및 용매분획 - 채집된 각 생약을 음건하여 세말로 한다음, 약 50 g씩을 MeOH 300 ml로 50°C 이하에서 5시간 동안 추출하고, 여과한 여액을 감압농축하여 MeOH 엑스(T)를 얻었다. MeOH 엑스를 증류수 50 ml로 현탁시킨 다음 극성에 따라 methylene chloride(MC), *n*-BuOH 각 50 ml로 계통 추출하여 MC 엑스(A), *n*-BuOH 엑스(B) 및 물층(C)를 각각 얻었으며, MeOH로 추출하고 남은 잔사는 증류수를 가하여 100°C에서 10시간 동안 가열하여 물엑스(D)를 얻어 실험에 사용하였다.

대식세포의 분리 - CD-1 (4-6 주) 생쥐의 복강내에 1 ml의 thioglycollate (Difco Laboratories, Detroit, MI)를 주사하고 3일 후에 RPMI 1640 배양액으로 복강을 세척하여 복강 세포를

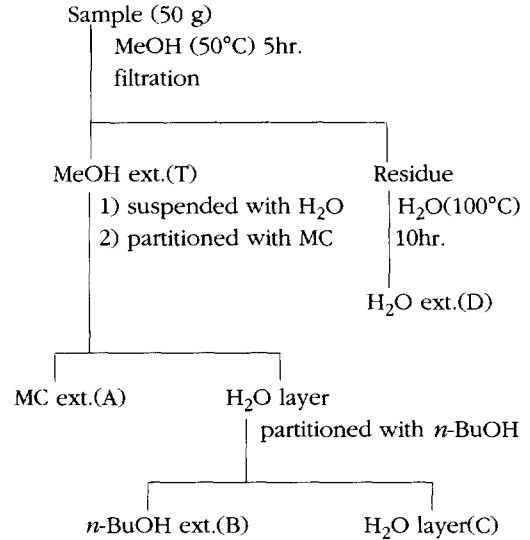


Fig. 1. Solvent fractionation of plants

수확 한후 두번 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)를 함유한 RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY)(RPMI-FBS)에 부유한다. 복강 세포로부터 대식세포를 Klimetzek이 서술한 방법에 의해 분리하였다¹⁴⁾. 복강 세포를 5-6 x 10⁵ 세포/cm² 농도로 teflon-coated petri dishes에 넣고 37°C의 95% air/5% CO₂ 배양기에서 2-3시간 동안 부착 시킨다. 비부착 세포를 배양액으로 세척하여 제거한후 10 ml의 배양액을 넣고 4°C에서 10분 동안 배양한다. 상층액을 제거하고 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco)으로 다시 세척한후 1.5% FBS를 함유한 차가운 PBS (15 ml)와 0.3 ml의 0.1 M EDTA (pH 7.0)를 넣는다. 15분 동안 실온에서 배양하고 10 ml 주사기를 이용하여 10회 세척하여 대식세포를 제거한다. 분리한 대식세포의 생존능은 trypan blue exclusion에 의해 결정하였으며, 세포의 생존능은 >95%이다.

식물추출물에 의한 대식세포의 처리 - 복강 대식세포를 2 x 10⁵세포/well의 농도로 96 well tissue culture plate (Nunc, Denmark)에 넣고 1시간 배양한후, 비부착 세포를 RPMI-FBS로 2회 세척하여 제거하고 다양한 농도의 식물 추출물을

첨가하여 12시간 배양하였다. 식물추출물을 제거하기 위해 대식세포를 RPMI-FBS로 세척하고 아래 서술한 방법에 따라 virus로 감염시켰다. 물층(C)과 물추출물(D)은 배양액 RPMI-1640에 용해시키고 나머지는 DMSO에 용해시켜서 실험에 응용하였다.

HSV-1에 의한 대식세포의 감염 - 7 m.o.i.의 HSV-1 KOS strain으로 대식세포를 감염시키고 1시간 후 비흡수된 virus는 RPMI-FBS로 세척하여 제거하고 48시간 동안 배양하였다. Cytopathic effects (CPE)는 neutral dye uptake 시험법으로 결정하였다¹³⁾.

Neutral red dye uptake 시험 - Virus CPE를 측정하기 위해 식물추출물로 처리한 대식세포를 세척한 후 virus로 감염시킨 대식세포를 배양액으로 2회 세척하고 0.02% neutral red dye로 염색한다. 염색된 세포를 배양액으로 세척하고 50% ethanol을 함유한 0.2 ml의 Sorensen citrate 완충액(pH 4.1)을 사용하여 neutral red dye를 추출한 후 Molecular Device microplate reader (Menlo, CA)를 이용하여 540 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다. Virus CPE는 Viability Index 계산에 의해 평가하였다.

$$\text{Viability Index(\%)} = \frac{\text{Virus가 감염된 세포의 OD}}{\text{비감염된 세포의 OD}} \times 100$$

암세포에 대한 대식세포의 세포독성시험 - 분리한 대식세포에 다양한 농도의 식물추출물을 가하고 암세포(B16)와 함께 37°C의 95% air/5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 25 μ l의 MTT(2 mg/ml)를 가하고 다시 4시간 동안 배양하였다. Plate를 200 x g에서 5분간 분리한 후 50 μ l만을 남기고 상층액을 제거한 후 formazan 결정을 용해하기 위해 150 μ l의 DMSO를 가하고 10분간 진탕한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정하고 다음식을 이용하여 세포독성을 계산하였다.

$$\text{세포독성(\%)} = 100 - \frac{\text{OD(대식세포+암세포)} - \text{OD(대식세포)}}{\text{OD(암세포)}} \times 100$$

실험결과 및 고찰

대식세포는 다양한 물질에 의해 활성화 되고 이러한 물질들을 동물에 투여하였을 때 virus나 암에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다^{15, 16, 17, 18, 19)}. In vitro에서 대식세포의 항 virus 작용이 천연물질에 의해 활성화 될 수 있는지를 측정하기 위해 대식세포에 식물로부터 추출한 150종의 물질을 각각 20 μ g/ml 및 200 μ g/ml로 첨가하여 12시간 동안 배양하였으며, 양성 대조군으로는 inteferon 유도물질로 알려진 poly I:C (10 g/ml)를 첨가하여 같은 조건하에서 배양한 후 HSV-1로 세포를 감염시키고 48시간 후에 cytopathic effect(CPE)를 neutral red dye uptake assay를 이용하여 측정하였다.

추출물로 처리하지 않은 음성 대조군의 viability index와 비교하여 천연물질에 의해 유도되는 대식세포의 항virus 작용에 대한 결과를 Table 1에 유(+)-무(-)로 표시하였다. 또한 MTT 검색법을 사용하여 추출물에 의한 대식세포의 항암 작용 유도에 대한 효과를 측정하기 위해 앞에서 사용한 동일한 농도로 대식세포를 처리하고 동시에 암세포와 같이 48시간동안 배양하였으며, 양성대조군으로는 항암작용을 유도하는 lipopolysaccharide (100 ng/ml)과 interferon- γ (100 unit/ml)로 처리한 후 음성대조군과 비교하여 Table 1에 유(+)-무(-)로 표시하였다. 실험에 사용된 추출물의 고농도(200 μ g/ml)에서는 모두 세포독성을 나타내어 항virus작용 및 항암 작용을 측정하기 어려웠다. 그러나 시험 추출물질중 대사초의 물추출물, 모감주나무의 butanol추출물, 아카시아꽃의 물층과 methanol추출물, 쉬땅나무 buthanol추출물이 저농도(20 μ g/ml)에서 유의성 있게 대식세포의 항virus 작용을 활성화하였으나 methanol추출물, 쉬땅나무 buthanol추출물은 대식세포의 항암작용을 유도하지 못하였다. 한편 대식세포의 항암작용 활성을 유도한 추출물들은 배암차즈기의 buthanol 추출물, 물층 및 물추출물, 마편초의 물층, 대사초의 물추출물, 아카시아꽃의 물층, 쉬땅나무의 물층과 물추출물, 어성초의 methanol추출물을 제외한 모든추출물에

Table 1. Antitumoral and Antiviral activities of peritoneal macrophages induced by extracts from plants

학 명 (식 물 명)	과 명	Antitumoral activity					Antiviral activity				
		A ^{a)}	B	C	D	T	A	B	C	D	T
<i>Actinidia arguta</i> (다래)	Actinidiaceae	-b)	ND ^{c)}	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND
<i>Salvia plebeia</i> (배암차즈기)	Labiatae	-	+	++	++	ND	-	-	-	-	ND
<i>Verbena officinalis</i> (마편초)	Verbenaceae	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND
<i>Angelica decursiva</i> (바디나물)	Umbelliferae	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
<i>Carpesium divaricatum</i> (긴담배풀)	Compositae	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	ND
<i>Amorpha fruticosa</i> (쪽제비싸리)	Leguminsae	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
<i>Spiraea salicifolia</i> (꼬리조팝나무)	Rosaceae	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-
<i>Staphylea bumalda</i> (고추나무)	Staphyleaceae	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND
<i>Alangium platanifolium</i> (박쥐나무)	Alangiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oenothera erythrosepala</i> (달맞이꽃)	Onagraceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carex siderosticta</i> (대사초)	Cyperaceae	-	-	ND	+	-	-	-	ND	+	-
<i>Lysimachia vulgaris</i> (좁쌀풀)	Primulaceae	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND
<i>Humulus japonicus</i> (환삼덩굴)	Cannavaceae	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-
<i>Hemerocallis fulva</i> (원추리)	Liliaceae	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-
<i>Koelreuteria paniculata</i> (모감주나무)	Sapindaceae	ND	+	ND	ND	-	ND	+	ND	ND	-
<i>Robinia pseudoacacia</i> (leaves) (아카시잎)	Leguminosae	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
<i>Robinia pseudoacacia</i> (flowers) (아카시꽃)	Leguminosae	ND	ND	+	ND	-	ND	ND	+	ND	+
<i>Sorbaria sorbifolia</i> (취망나무)	Rosaceae	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Artemisia stolonifera</i> (넓은잎외잎쑥)	Compositae	-	-	ND	-	ND	-	-	ND	-	ND
<i>Patrina saniculaefolia</i> (금마타리)	Valerianaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peucedanum terbintha-</i> <i>ceum</i> (기름나물)	Umbelliferae	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-

Table 1. Continued

학 명 (식 물 명)	과 명	Antitumoral activity					Antiviral activity				
		A ^{a)}	B	C	D	T	A	B	C	D	T
<i>Lobelia chinensis</i> (수염가래꽃)	Campanulaceae	-	-	-	ND	-	-	-	-	ND	-
<i>Houttuynia cordata</i> (어성초)	Saururaceae	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

a) Fraction obtained from plants: 20 µg/ml of each extract was used to assess antitumoral or antiviral activity in macrophages. A: Methylenechloride extracts, B: n-Butanol extracts, C: Water layer, D: Water extracts, T: Methanol extracts

b) -: negative, +: weakly positive, ++: strongly positive c) ND: not determined

서 관찰되었으며 특히 배암차즈기 식물에서 물에 의해 추출된 물질 및 물층은 강력한 항암작용을 유도하였다. 일부분의 추출물이 대식세포의 항 virus 작용과 항암작용의 활성을 함께 유도하지만 대부분의 추출물은 대식세포의 항virus와 항암작용을 다르게 유도하므로 항virus와 항암작용을 유도하는기전이 다르다고 추정된다. 또한 본 실험에서 사용한 system은 면역조절 후보물질의 항virus 및 항암효과를 평가할 수 있는 유용한 system이라고 할 수 있고 다른 면역세포에 대한 영향을 연구 할 수있는 자료를 제공 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀 - 본연구는 과학재단 특정연구과제(93-0400-07-01-3)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비지원에 감사드립니다.

〈1995년 7월 20일 접수〉

참고문헌

- Georgiev, V. ST.: New synthetic immunomodulating agents. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 446 (1988).
- Georgiev, V. ST.: Synthetic immunomodulating agents. *Med. Res. Rev.* **10**, 371 (1990).
- Georgiev, V. ST.: Immunomodulating activity of small peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 373 (1990).
- Georgiev, V. ST.: Immunomodulating peptides of natural and synthetic origin. *Med. Res. Rev.* **11**, 81 (1991)
- Georgiev, V. ST.: Survey of drug research in immunologic disease. Noncondensed aromatic derivatives. Part V. Vol. 6. S. Karger. Basel. (1985).
- Georgiev, V. ST.: Survey of drug research in immunologic disease. Noncondensed aromatic derivatives. Part VI. Vol. 7. S. Karger. Basel. (1986).
- Georgiev, V. ST.: Survey of drug research in immunologic disease. Noncondensed aromatic derivatives. Part VII. Vol. 8. S. Karger. Basel. (1987).
- Jung, J.H.: Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum* L. (Annonaceae), Dissertation, Purdue University, p.41 (1990).
- Potier, P. Search and discovery of new antitumor agents, *Chem. Soc. Rev.* **21**, 113 (1992).
- Cordell, G.A., Kinghorn, A.D. and Pezzuto, M., Separation, structure elucidation, and bioassay of cytotoxic natural products, In Colegate, S. M. and Molyneux, R. S. (eds), bioactive natural Products detection, isolation and structure determination, CRC press p. 195. (1993).
- Suffness, M. and Dourose, J.: Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* **45**, 1. (1982).
- Pyo, S., Gangemi, J.D., Ghaffar, A. and Mayer, E.P.: Poly I:C-induced anti-herpes simplex type 1 activity in inflammatory macrophages is mediated by induction of interferon-β *J. Leukocyte Biol.* **50**, 479. (1991).
- Pyo, S., Gangemi, J.D., Ghaffar, A. and Mayer, E.P.: Poly I:C-induced antiviral and cytotoxic activities are mediated by different mecha-

- nisms. *Int. J. Immunopharmac.* **15**, 477. (1993).
14. Klimetzek, V. and Remold, H.G.: The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immun.* **53**, 257. (1980).
 15. Campbell, M.W., Scholley, M.M. and Miller, G. A.: Macrophage heterogeneity in tumor resistance; cytostatic and cytotoxic activity of *Corynebacterium parvum*-activated and proteose peptone rat macrophages against Moloney sarcoma tumor cells. *Cell. Immun.* **50**, 153. (1980).
 16. Gangemi, J. D., Nachtigal, M., Barnhart, D., Krech, L. and Jani, P.: Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated ribavirin and muramyl tripeptide in experimental infection with influenza and herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* **155**, 510. (1987).
 17. Glasgow, L. A., Fischbach, J., Bryant, S. M. and Kern, E. R.: Immunomodulation of host resistance to experimental viral infections in mice: effects of *C. acnes*, *C. parvum*, and bacille Calmette-Guerin. *J. Infect. Dis.* **135**, 763. (1977).
 18. Sarzotti, M., Coppenhaver, D.H., Singh, I.P., Poast, J. and Baron, S.: The in vivo antiviral effect of CL246, 738 is mediated by the independent induction of interferon-alpha and interferon-beta. *J. Interferon Res.* **9**, 265. (1989)
 19. Singh, I.P. Coppenhaver, D.H., Sarzotti, M., Sriyuktasuth, P., Poast, J., Levy, H.B. and Baron, S.: Postinfection therapy of arbovirus infections in mice. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **33**, 2126. (1989)