

數種의 生藥에 對한 抗癌效果의 實驗的 研究 (II)

藥物에 對한 癌細胞의 感受性分析

任宰訓 · 禹弘楨 · 金秉雲 · 河潤文* · 李承薰* · 南相潤** · 崔龍默**

慶熙大學校 漢醫科大學 · 慶熙大學校 醫科大學* · 慶熙醫療院 癌센터 免疫研究室**

Experimental Studies on Antitumor Activity of Herb Drugs (II)

Sensitivity Testing of Tumor Cell to Drugs

Jai Hoon Yim, Hong Jung Woo, Byung Woon Kim, Youn Mun Ha*,

Seung Hoon Lee*, Sang Yun Nam** and Yong Mook Choi**

School of Oriental Medicine, Kyung Hee University,

School of Medicine, Kyung Hee University* and Immunology Research Laboratory,

Cancer Center, Kyung Hee University Medical Center, Seoul 131, Korea**

Abstract—*In vitro* sensitivity testing was performed for 21 kinds putative anticancer drugs selected from references and information. Cellular damage of P815 mastocytoma cells following exposure to water extracts of drugs was evaluated by colony formation assay. Highly effective drugs with more than 50% inhibition of colony formation were seven (Houttuyniae Herba, Sanguisorbae Radix, Nepetae Herba, Manitis Squama, Lonicerae Flos, Amomi Semen, Polyporus), though not more effective than BCNU. According to the results of ³H-thymidine incorporation assay for determination of selective cytotoxicity, 3 of these drugs (Houttuyniae Herba, Polyporus, Manitis Squama) were found to be low cytotoxic to normal mouse lymphoid cells. These findings suggest that the above 3 drugs may be used for effective anticancer drugs *in vivo*.

Keywords—Pinelliae Tuber · Coicis Semen · Ginseng Radix · Crataegi Fructus · Armeniacae Semen · Raphani Semen · Scirpi Tuber · Artemisiae iwayomogis Herba · Atractylodes Rhizoma · Amomi Semen · Ponciri Tructus · Aurantii Percarpium · Sanguisorbae Radix · Nepetae Herba · Hoelen · Glycyrrhizae Radix · Lonicerae Flos · Manitis Squama · Zedoariae Rhizoma · Polyporus · Houttuyninae Herba · sensitivity · colony formation assay · ³H-thymidine incorporation assay, BCNU

암의 치료를 위한 화학요법은 지속적인 발전을 거듭하여 현재에는 알킬화제(alkylating agents), 항대사물질(antimetabolites), 항생제(antibiotics), 효소제제(enzymes), 호르몬, 알칼로이드, 방사성동위원소 등 수많은 종류의 약제들이 사용되고 있으며, 그 작용기전 또한 다양하다.^{1,2)}

근래 藥物의 항암효과에 대한 보고로는 金 등³⁾이 人蔘 · 鹿茸으로 제암제 및 glucocorticoid의 항체생산 억제작용의 실험에서 항체생산 억제를 완화시킨다는 결과를 보고하였고, 文 등⁴⁻⁷⁾은 蓬朮 등 수종의 한약물에서 추출한 다당류의 항암 및 면역기능에 대한 실험에서 괄목할만한 제암효과를 보였다고 하였으며, Tang⁸⁾ 등은 白朮

이 강력한 제암효과가 있다 하였고, Sasaki⁹⁾는甘草가, Odajima¹⁰⁾는 人蔘이 각각 상당한 항암효과가 있다고 하였다.

이들 항암제의 암세포 감수성검사 방법에 대해서는 약제의 선정 및 예후 추정을 위해 많은 연구가 축적되어 왔다. 즉, 색소배제법(dye exclusion)^{11,12)} 및 크롬방출법(⁵¹Cr-release assay)^{13,14)}은 세포막 손상이나 세포의 상해여부를 판별할 수 있으며 방사성동위원소(³H)로 표식된 티미딘흡수법(³H-thymidine incorporation assay)은 DNA합성 정도를 측정할 수 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾

이 외에도 항세포 증식수를 측정하거나¹⁸⁾ 항세포의 군락형성수(colony formation; CF)를 측정하는 방법이 있다.^{19,20)} 특히 Roper 등²¹⁾은 대사불능(metabolic death)이 아닌 증식불능(reproductive death)이 정확한 세포의 치사기준이라는 판단하에 CF측정법과 기타 다른 방법을 비교한 결과, CF측정법이 세포의 치사를 판정하는 가장 신뢰할 수 있는 방법임을 제시한 바 있다. Salmon 등²²⁾은 CF측정법에 의한 약제의 감수성 실험결과와 실제 임상결과간에 유의할 상관관계가 있음을 보고하였고 이후 다수의 연구자들에 의해 이와 같은 결과가 확인되었다.²³⁻²⁷⁾

이에 저자들은 한방 입장에서 상용되고 있는 21종의 생약을²⁸⁻³⁰⁾ 선정하여 이들이 시험관내에서 암세포의 증식억제에 미치는 영향과 정상면역세포에 대한 세포독성을 관찰하여 항암제로서의 임상응용 가능성을 알아보고자 본 실험을 착수하였다.

실 험 방 법

1. 생약 및 시료의 조제

실험에 사용된 생약은 아래와 같다.

- 1) Pinelliae Tuber(半夏)
- 2) Coicis Semen(薏苡仁)
- 3) Ginseng Radix(人蔘)
- 4) Crataegi Fructus(唐山楂)
- 5) Armeniacae Semen(杏仁)
- 6) Raphani Semen(萊菔子)
- 7) Scirpi Tuber(三稜)
- 8) Artemisiae iwaiyomogis Herba(韓國茵陳)

- 9) Atractylodis Rhizoma(白朮)
- 10) Amomi Semen(貢砂仁)
- 11) Ponciri Fructus(枳實)
- 12) Aurantii Pericarpium(青皮)
- 13) Sanguisorbae Radix(地榆)
- 14) Nepetae Herba(荊芥)
- 15) Hoelen(白茯苓)
- 16) Glycyrrhizae Radix(甘草)
- 17) Lonicerae Flos(金銀花)
- 18) Manitis Squama(穿山甲)
- 19) Zedoariae Rhizoma(蓬朮)
- 20) Polyporus(猪苓)
- 21) Houttuyniae Herba(魚腥草)

각 생약 40 g을 600 ml의 증류수에 넣고 증류농축기로 3시간 가열 추출한 용액을 3겹으로 된 거즈에 통과시켰다. 그 여액을 10,000 rpm에서 20분간 원침하여 그 상청액을 취하였다. 이를 -60°에서 냉동시킨 후 냉동건조기[Virtus, Freeze mobile 24, USA]에서 48시간 건조시켜 얻은 분말을 실험용 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 때에는 일정량을 증기고압멸균하여 사용하였다.

아울러 대조실험을 위해 항암제로 널리 사용되고 있는 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea [BCNU, Bristol Lab., Syracuse, NY, USA]를 함께 시험하였다. BCNU는 실험 당일 최소량의 메탄올에 용해시켜 phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4용액에 적정농도가 되게 희석한 후, 0.22 μ m여과막[Gelman, Ann Arbor, Mich. USA]으로 여과멸균하여 사용하였다.

2. 실험동물

경희대학교 의과대학 미생물학교실에서 계대 사육되고 있는 체중 20~30 g 정도의 Balb/C종 생쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

3. 표적세포

표적세포로 사용한 암세포는 생쥐 유래 P815 비만세포종 세포주(mastocytoma cell line)³¹⁾로 Commonwealth Serum Laboratories[CSL, Melb, Australia]에서 구입하였다. 이는 생쥐 및 사람의 자연살해세포(natural killer cell)에 의해 파괴되지 않는 세포이며, 배양액으로는, 10%의 우태아혈청(fetal calf serum; FCS)[CSL]이 첨

가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) [GIBCO, Grand Island, NY, USA]이 사용되었다.

4. 시료의 처리 및 CF측정실험

시료의 처리 및 CF측정실험은 Courtenay³²⁾의 방법을 다소 수정하여 시행하였다. 즉, P815세포배양액에 세포농도를 $3 \times 10^4/\text{ml}$ 로 조정된 후 세포부유액 0.9 ml씩을 6 ml세포배양용 튜브 [Costar 2022, Cambridge, Mass. USA]에 분주하였다. 여기에 예비실험에서 결정된 시료당 3종의 농도가 되도록 0.1 ml씩의 시료를 가하고 1시간 동안 37°, 5% CO₂배양기내에 두었다.

한천배양액을 만들기 위해서는 5g의 한천 [Bacto-agar, Difco, Detroit, Mich. USA]을 100 ml의 증류수에 넣고 증기압멸균하여 5%의 한천 용액을 만들었다. 이를 60°로 냉각한 후 44° 항온수조에서 1.1배 농축된 DMEM배양액으로 10배 희석하여 0.5% 한천배양액을 만들었다.

한천 base층을 만들기 위해 6 well microplate [Costar 3406]의 각 well에 0.6 ml씩의 0.5% 한천-배양액을 분주하여 4°에서 5분간 응고시켰다.

한천-세포부유액을 만들기 위해서는 37°로 유지된 10% FCS/DMEM 세포배양액 0.9 ml과 약 물켜리된 세포부유액 0.1 ml을 새로운 6 ml 튜브 내에서 혼합하였다. 여기에 44°로 유지된 0.5% 한천-배양액 1.5 ml을 가하고 피펫을 이용하여 완전히 혼합한 후 plate well의 한천 base층위에 1 ml씩 분주하되 각 실험은 2배수(duplicate)로 실시하였다. 이를 실온에서 응고시키되 CO₂를 주입한 통안에 두어 pH가 높아지지 않도록 하였다.

한천-세포부유액이 완전히 응고되면 plate를 37°, 5% CO₂ 배양기에 옮겨 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 도립현미경 [Olympus IM, Japan]상에서 관찰하여 50개 이상의 세포수로 증식된 것만을 생존한 세포군락으로 간주하여 측정하였다.

5. 정상세포 증식에 미치는 영향

CF측정실험 결과에 따라 P815비만세포종세포주의 군락형성을 50% 이상 억제시키는 시료의 농도를 선정하여 정상세포의 증식에 미치는 영

향을 실험하였다. 표적세포로는 Concanavalin-A (Con-A)로 자극 배양한 생쥐의 비장세포를 이용하였으며 간단하게 기술하면 다음과 같다.

생쥐로부터 비장을 적출하여 4%(v/v)농도의 항생제(페니실린, 10,000 u/wl; 스트렙토마이신, 10,000 µg/wl; 편지론, 25 µg/wl) [GIBCO]를 가한 Hank's balanced Salt Solution(HBSS) [GIBCO]으로 2회 세척한 후, 직경 60 mm페트리접시 [Costar 3060]에 옮겼다. 여기에 5 ml의 HBSS를 가하고 유리막대를 이용하여 비장세포를 유리시킨 후 nylon mesh에 통과시켜 세포 debris를 제거하였다. 이 세포부유액을 15 ml 원침용 튜브 [Falcon 2095, Oxnard, CA. USA]에 옮겨 HBSS로 세포를 2회 원침세척한 후 10%의 FCS와 1%의 항생제 및 1%의 Lglutamine [GIBCO]을 가한 RPMI 1640조각배양액 [GIBCO], 즉 완전배양액 (complete media)에 2×10^6 cells/ml 농도로 부유시켰다. 이를 25 cm²세포배양용 플라스크 [Falcon 3013]에 옮기고, Con-A [GIECO]를 5 µg/ml 농도가 되게 가한 다음 37°, 5% CO₂배양기 내에서 배양하였다.

48시간 동안 배양한 후 세포를 수거하여 완전배양액내에서 1×10^6 cells/ml의 세포농도로 조정된 후 6 ml배양용 튜브 [Costar 2022]에 1 ml씩 분주하였다. 여기에 적정농도의 시료를 가한 후 1시간 동안 37° 배양기 내에 두었다. 1시간 후 이들 세포를 RPMI 1640 조각배양액으로 1회 원침세척하고 다시 완전배양액에 1×10^6 cells/ml 농도로 조정하였다. 이 세포부유액을 round bottom 96 well microplate [Corning 25850, Corning, NY. USA]에 well당 0.2 ml씩, 3배수(triplicate)로 분주하고, ³H-thymidine [New England Nuclear, Boston, Mass. USA]을 well당 1 µCi씩 가하였다. 이 microplate를 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 18시간 배양한 후 세포수거기 [Flow Lab. Syshore, Scotland]를 이용하여 glass fiber filter [Gelman 61638, Ann Arbor, Mich. USA]에 세포를 수거하였다. 이 fiber disc를 60°에서 1시간 건조시킨 다음 Scintillation vial에 넣고 toluene cocktail용액을 5ml씩 가한 후 β-scintillation counter [Beckman 8,000, Irvine, CA. USA]를 이용하여 그 방사활성을 측정 비교하

실험 결과

1. P815비만세포종세포의 생약에 대한 감수성

21종의 생약과 항암제 BCNU에 대하여, 정상 세포에 대한 독성을 고려, 각각 3종의 농도를 선택하고, 이들에 대한 P815세포의 감수성을 세포군락형성(CF)실험으로 측정하였다.

P815세포의 세포군락형성률은 약 26.1%(282/1080)였으며, 각 약물로 1시간 처리한 후 형성된 세포군락수를 Fig. 1에 요약하였다.

1) 半夏; 1, 10 및 100 µg/ml 농도로 처리한 결과 형성된 세포군락수는 각각 268±18(mean±SP, 92.2%), 233±19(82.6%) 및 236±48(83.7%)로 전농도에서半夏에 대한 P815세포의 감수성은 비교적 낮았다.

2) 薏苡仁; 1, 10 및 100 µg/ml의 세가지 농도로 처리하였으며, 형성된 세포군락수는 각각 251±14(89.0%), 200±14(70.9%) 및 187±12(66.3%)로 농도가 높아짐에 따라 P815세포의 감수성도 높아졌으나 전체적으로 薏苡仁에 대한 감수성은 높지 않았다.

3) 人蔘; 10, 100 및 500 µg/ml의 세가지 농도로 처리하였으며 형성된 세포군락수는 각각 228±10(70.9%), 201±17(71.3%) 및 163±10(57.8%)로서 500 µg/ml 농도에서 다소 높은 감수성을 보였다.

4) 唐山楂; 10, 100 및 500 µg/ml 농도로 처리한 결과 형성된 세포군락수는 각각 214±24(75.9%), 188±4(66.7%) 및 166±11(58.8%)로서 500 µg/ml 농도에서 다소 감수성이 높았다.

5) 杏仁; 10, 100 및 500 µg/ml 농도로 처리한 결과 각각 192±34(68.1%), 179±39(63.5%) 및 158±28(56.0%)개의 세포군락이 형성되어 500 µg/ml의 농도에서 다소 높은 감수성을 보였다.

6) 萊菔子; 10, 100 및 500 µg/ml의 세가지 농도로 처리하였으며 각각 215±24(76.2%), 188±27(66.7%) 및 163±11(57.8%)개의 세포군락의 형성되어 역시 500 µg/ml 농도에서 다소 높은 P815

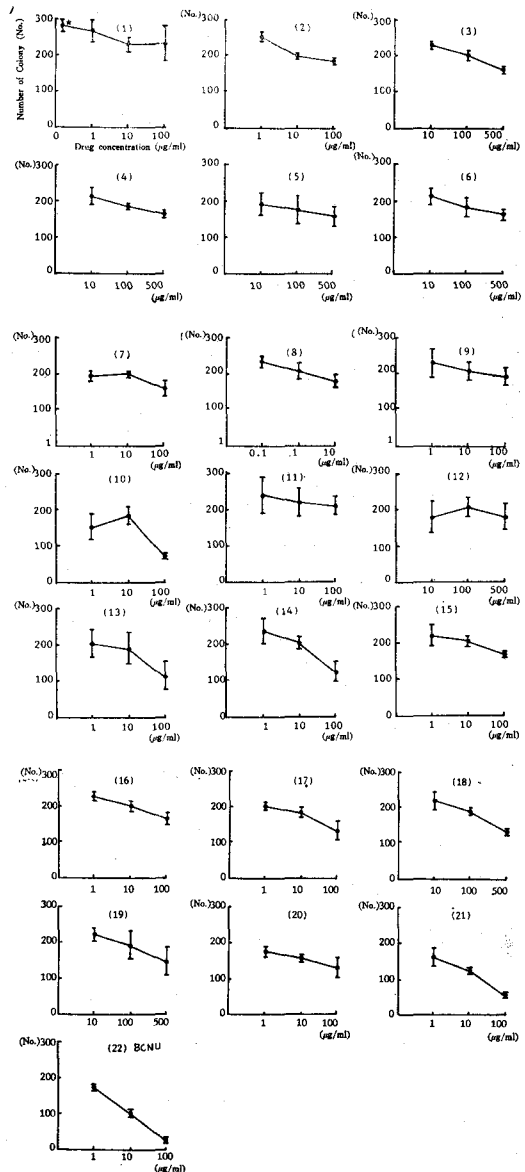


Fig. 1. Colony formation of P815 cell following drug exposures. Data shown are mean values(●) and SD (I) of 4 experiments with duplicate samples. Drug number was represented in parentheses. *; control (282±19).

세포군락형성억제효과를 보였다.

7) 三稜; 1, 10 및 100 µg/ml의 농도로 처리한 결과 형성된 세포군락수는 각각 196±12(69.5%), 199±7(70.6%) 및 158±24(56.0%)개로 100 µg/ml 농도에서 다소 높은 감수성을 보였다.

8) 韓國茵陳; 0.1, 및 1 10 µg/ml의 농도로 처

리하였으며 각각 236 ± 14 (83.7%), 208 ± 27 (73.8%), 184 ± 14 (65.2%)개의 P815세포군락이 형성되어茵蔯에 대한 P815세포의 감수성은 낮았다.

9) 白朮; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 세가지 농도로 처리한 결과 각각 228 ± 38 (80.9%), 204 ± 26 (72.3%), 192 ± 25 (68.1%)개의 세포군락이 형성되어 白朮의 P815세포군락형성억제효과는 낮았다.

10) 貢砂仁; 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 252 ± 40 (89.4%), 185 ± 5 (65.6%)개의 세포군락이 형성되었으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 71 ± 7 (25.2%)개의 세포군락이 형성되어 P815세포의 감수성이 매우 높았다.

11) 枳實; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 형성된 P815세포군락수는 각각 242 ± 41 (85.8%), 218 ± 43 (77.3%) 및 208 ± 26 (73.8%)개였으며 枳實에 대한 감수성은 비교적 낮음을 보였다.

12) 靑皮; 10, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 P815세포군락이 각각 179 ± 42 (63.5%), 205 ± 29 (72.7%) 및 180 ± 37 (63.8%)개 형성되어 군락형성 억제효과가 낮았다.

13) 地榆; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 세가지 농도로 처리한 결과 각각 250 ± 41 (72.7%), 193 ± 42 (68.4%) 및 114 ± 43 (40.4%)개의 세포군락이 형성되었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 地에 대한 P815세포의 감수성은 다소 높았다.

14) 荊芥; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 세가지 농도로 처리한 결과 각각 237 ± 37 (84.0%), 205 ± 20 (72.7%) 및 123 ± 31 (43.6%)개의 세포군락이 형성되어 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 荊芥에 대한 P815세포의 감수성이 높은 것으로 나타났다.

15) 白茯苓; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였던 바, 형성된 세포군락수는 각각 224 ± 32 (79.4%), 206 ± 24 (73.0%), 168 ± 16 (59.0%)으로 P815세포군락형성 억제효과는 낮았다.

16) 甘草; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 세가지 농도로 처리하였으며 형성된 세포군락수는 각각 230 ± 10 (81.6%), 201 ± 13 (71.3%) 및 168 ± 16 (59.6%)으로 甘草에 대한 P815세포의 감수성은 낮았다.

17) 金銀花; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처

리한 결과 각각 201 ± 12 (71.3%), 182 ± 16 (64.5%) 및 135 ± 32 (47.9%)개의 세포군락이 형성되어 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 P815세포의 감수성이 높게 나타났다.

18) 穿山甲; 10, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였으며 형성된 세포군락수는 219 ± 24 (77.7%), 191 ± 7 (67.7%) 및 132 ± 9 (46.8%)개로 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 다소 높은 감수성을 보였다.

19) 蓬朮; 10, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과 각각 220 ± 22 (78.0%), 191 ± 44 (67.7%) 및 148 ± 40 (52.5%)개의 세포군락이 형성되어 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 다소 높은 감수성을 보였다.

20) 猪苓; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 세가지 농도로 처리하였으며 각각 178 ± 13 (63.1%), 158 ± 10 (56.0%) 및 136 ± 22 (48.2%)개의 세포군락이 형성되어 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 猪苓에 대한 P815세포의 감수성이 높은 것으로 나타났다.

21) 魚腥草; 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였던 바, 156 ± 31 (55.3%)개의 세포군락이 형성되어 억제효과가 낮았으나, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 각각 123 ± 11 (43.6%) 및 56 ± 8 (19.9%)개의 세포군락이 형성되어 높은 감수성을 보였다.

22) BCNU; 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과 형성된 세포군락수가 172 ± 6 (61.0%), 105 ± 8 (37.2%), 30 ± 3 (10.6%)로 매우 높은 감수성을 나타내었다.

P815세포군락형성에 대한 억제효과를 쉽게 보기 위하여 각 생약으로 처리한 후 형성된 세포군락수를 백분율로 나타낸 결과를 Fig. 2에 요약하였다.

대부분 약물의 농도가 높아짐에 따라 P815세포의 감수성도 높아지는 것으로 나타났으며, 특히 貢砂仁(100 $\mu\text{g/ml}$, 25.2%), 地榆(100 $\mu\text{g/ml}$, 40.4%), 荊芥(100 $\mu\text{g/ml}$, 43.6%), 金銀花(100 $\mu\text{g/ml}$, 47.9%), 穿山甲(500 $\mu\text{g/ml}$, 46.8%), 苓(100 $\mu\text{g/ml}$, 48.2%), 魚腥草(10 $\mu\text{g/ml}$, 43.6%; 100 $\mu\text{g/ml}$, 19.9%) 등은 형성된 세포군락수가 50%미만으로 이들에 대한 P815세포의 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다. 항암제 BCNU는 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 37.2%, 10.6%의 세포군락이 형성되어 약물보다 높은 감수성을

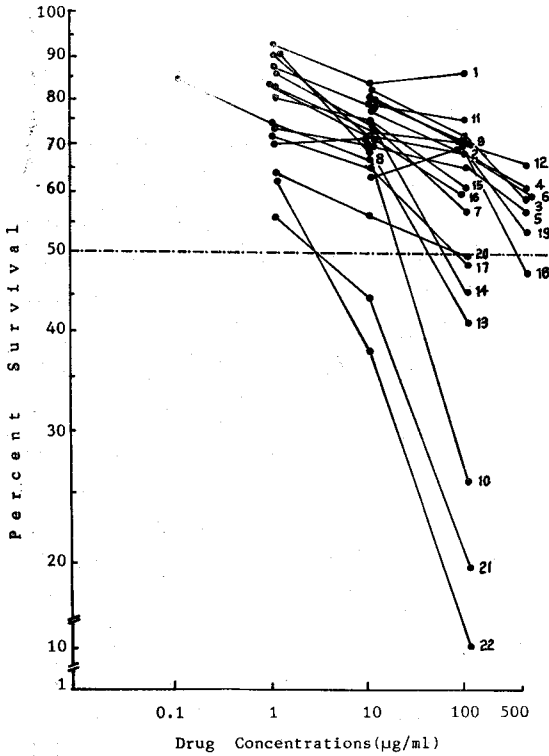


Fig. 2. Survival of P81 cells exposed to 3 different concentrations of drugs as determined by colony formation assay. Data represent mean values of 4 experiments.

보였다.

2. 감수성이 높은 생약이 정상면역세포의 증식에 미치는 영향

상기 결과에 따라 50%이상의 P815세포군락형성 억제효과를 보인 생약에 대하여 정상면역세포에 미치는 영향을 비교하고자 Con-A로 자극한 생쥐 비장림프구의 증식에 대한 억제효과여부를 ³H-thymidine incorporation assay방법으로 실험하였다. 그 결과를 약물로 처리하지 않은 대조군에 대하여 % inhibition으로 표시하였다(Fig. 3).

貢砂仁(70.9%), 地榆(87.1%), 荆芥(76.5%), 金銀花(55.6%)와 100 µg/ml농도의 BCNU(70.2%)는 생쥐 비장림프구의 증식에 대해서도 강한 억제효과를 나타내었으며, 穿山甲(23.1%), 猪苓(15.1%), 魚腥草(10 µg/ml, 2.4%; 100 µg/ml, 48.8%) 등은 생쥐 비장 림프구의 증식에 미치는 영향이 비교적 낮았다. 항암제 BCNU도 10

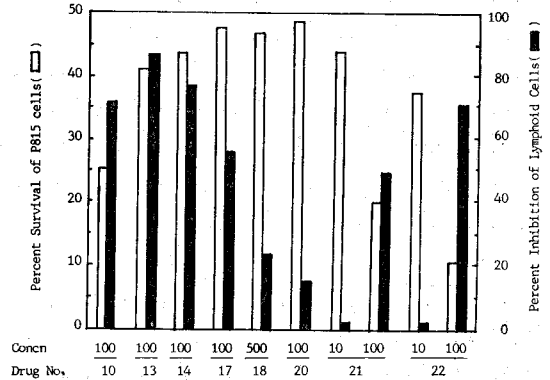


Fig. 3. Survival of P815 cells (□) and inhibition of proliferation (■) of normal mouse lymphoid cells exposed to drugs. Percent survival was determined by colony formation assay. Percent inhibition of lymphoid cells was assessed by ³H-thymidine incorporation assay of mouse spleen cells stimulated with Con-A.

µg/ml농도에서는 림프구 증식에 거의 영향을 주지 않았다(3.3%).

고 찰

항암제에 대한 시험관내에서의 암세포 감수성 실험결과가 임상효과와 유의한 상관관계가 있음은 이미 널리 알려진 사실이며²²⁻²⁷⁾, 세포군락형성측정법은 항암제에 대한 감수성을 측정하는데 있어 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 평가되고 있다.²¹⁾

저자들은 21종의 생약에 대한 암세포의 감수성을 선별시험(screening test)하고자 CF측정법을 이용하여 실험하였다.

표적세포로 사용된 생쥐유래 P815비만세포종 세포주는 세포군락형성이 우수하며, 자연살해세포에 의해서 파괴되지 않는 암세포주로서, 시험관내에서 용이하게 다룰 수 있을 뿐 아니라 다른 암세포에 비해 안정된 특성을 가지고 있어 본 실험에 사용되었다.

저자들의 실험 결과에 의하면 거의 모든 생약이 P815세포의 군락형성을 억제하였으나(Fig. 2), 이들 생약중 Salmon 등²²⁾과 같이 P815세포 군락 형성을 50%이상 억제한 경우를 유효한 것으로 간주하였던 바, 貢砂仁, 地榆, 荆芥, 金銀

花, 穿山甲, 猪苓, 魚腥草 등 7종의 생약에 대한 P815세포의 감수성이 높은 것으로 나타났다. 또한 양성대조군으로 사용한 항암제 BCNU에 대한 감수성도 매우 높은 것으로 나타나, 임상 응용의 BCNU항암제가 P815세포에 대해 강한 증식억제작용을 가지고 있음을 보여주었다.

이들 생약에 대해 림프구 증식에 미치는 영향을 실험한 것은 이들의 선택독성을 고려하고자 함이었다. 암의 화학요법에 이용되는 약물들은 대부분 정상세포에 대한 독성을 수반하므로 이들의 독성정도는 반드시 고려되어야 할 문제로 지적되고 있다.^{1,2)33)} 항암제의 독성은 신체의 각 장기에 미치며^{34~38)}, 특히 골수^{39~41)} 및 면역계에 대한 악영향은^{42,43)} 환자의 치료에 매우 중요한 변수로 작용한다. 이에 저자들은 P815세포의 감수성이 높은 약물농도에 대해 정상림프구 증식에 미치는 영향을 실험하였다. 정상세포로서 림프구를 사용한 것은 림프구가 항체생산 뿐만 아니라 변이세포의 제거에도 직접 또는 간접으로 작용하는 면역계의 주된 세포이기 때문이었다. 본 연구에서는 Con A로 자극된 생쥐의 비장 림프구를 사용하였으며 세포의 증식은 DNA합성을 측정하는데 보편적으로 이용되고 있는 ³H-thymidine incorporation assay방법으로 비교하였다.

7종의 생약중 4종은 모두 생쥐림프구의 증식을 50%이상 억제하였으며, 穿山甲, 猪苓, 魚腥草 3종의 약물은 정상세포의 증식억제효과가 낮은 것으로 나타났다. BCNU는 100 µg/ml농도에서는 림프구 증식에 대해 높은 억제효과를 보였으나(70.2%), 10 µg/ml의 저농도에서는 거의 영향을 주지 않았다(3.3%).

비교실험을 위해 사용된 BCNU는 알킬화제제로⁴⁴⁾ DNA 및 RNA합성을 모두 억제하는 것으로 생각되고 있다.⁴⁵⁾ 본 연구결과 같은 농도로써 비교할 때 암세포증식 억제효과가 BCNU보다 강력한 것은 없었으나, BCNU는 순수한 정제품이며, 저자들이 사용한 생약들은 많은 성분의 혼합·복합체일 것으로 추측되므로 성분의 순수 분리후 비교실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결과에서 나타난 바와 같이 貢砂仁, 魚腥草와

같은 생약은 BCNU에 비금가는 P815세포의 감수성을 보였으며, 특히 魚腥草는 정상면역세포에 대한 독성이 비교적 낮은 것으로 나타나 면역감시계에 피해를 주지 않는 항암제로서의 임상응용이 기대되는 약물로 인정된다. 다만 세포군락형성 측정방법에 있어서 사용된 암세포종에 따른 약물의 처리방법, 감수성 판별기준 등이 표준화 되어 있지 않다는 문제가 있으므로, 이들 선정된 생약에 대하여 더 깊은 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 암치료에 사용되어온 수종의 생약을 대상으로 암세포의 감수성이 높은 생약을 선별하고자 하는 것이 목적이었으며, 본 연구결과에 따라 선정된 생약들의 성분규명 및 임상효과 등의 실험이 계속되기를 기대하는 바이다.

결 론

암치료를 위한 화학요법에는 다양한 종류의 약제들이 사용되고 있으며 이들 약제에 대한 암세포의 감수성은 시험관 내에서 확인되고 있다. 암의 치료에 사용되어 온 많은 생약에 대하여 생체실험 결과가 보고되어 왔으나, 시험관내에서 직접적인 암세포 감수성을 실험한 연구 결과는 없었던 점에 착안하여, 본 연구에서는 21종의 생약을 선정, 이들 약물에 대한 암세포의 감수성을 실험하였다.

각 생약은 증류수 중에서 가열 추출한 후 냉동 건조하여 사용하였고, 비교실험을 위해 항암제 BCNU를 함께 사용하였다. 감수성 실험을 위해서는 암세포의 군락형성(colony formation) 측정방법을 이용하였으며, 생쥐유래 P815비만세포종 세포주를 표적세포로 사용하였다.

각 약제마다 세가지 농도로 처리하여 실험한 결과를 비교한 바, 대부분의 생약이 농도가 높아질수록 P815세포군락 형성을 더욱 억제하였으며, 그중 50%이상 억제시킨 고감수성 약제는 7종으로 魚腥草(10 µg/ml, 43.6%; 100 µg/ml, 19.9%), 地榆(100µg/ml, 40.4%), 荆芥(100 µg/ml, 43.6%), 穿山甲(500 µg/ml, 46.8%), 金銀花(100 µg/ml, 47.9%), 貢砂仁(100 µg/ml, 47.9%), 猪苓(100 µg/ml, 48.2%)의 순이었다.

이들 고감수성 약물에 대해 정상세포증식에 미치는 영향을 알아보고자, Con-A로 자극시킨 생쥐 비장림프구를 상기 약물 농도로 처리하여 ^3H -thymidine incorporation 방법으로 비교한 바, 地榆, 荊芥, 金銀花, 貫砂仁 등은 정상세포에 대해서도 50% 이상의 증식억제효과를 보였으며, 魚腥草(10 $\mu\text{g/ml}$, 3.4%; 100 $\mu\text{g/ml}$, 48.8%), 穿山甲(500 $\mu\text{g/ml}$, 22.1%), 猪苓(100 $\mu\text{g/ml}$, 15.1%)은 50%이하의 낮은 억제효과를 보였다.

이상의 결과로써 魚腥草, 穿山甲, 猪苓 등은 효과적인 암치료제로 임상응용이 가능할 것으로 기대되며, 생체내에서의 효능 여부를 확인하는 실험이 계속되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀—저자들은 본 연구를 수행하는 동안 함께 수고해 준 경희의료원 암센터 면역연구실의 윤선혜, 최영주, 최미경양에게 감사하는 바이다.

〈1987년 1월 17일 접수 : 4월 11일 수리〉

문 헌

- Calabresi, P., and Parks, R.E.: Chemotherapy of neoplastic diseases in Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman, L.S., and Gilman, A. Eds. Macmillan Pub. Co., New York, pp.1248-1307 (1975).
- Haskell, C.M.: Cancer Treatment. 2nd Ed., W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp.21-134 (1985).
- 김광호, 문준전, 안규석; 趙永植博士 華甲紀念 論文集, pp.104-50 (1981).
- Chang, K.M., Lee, B.G., Lee, S.H., and Kang, T.L.: *Arch. Pharmacol. Res.* 8, 277 (1985).
- Chang, K.M., Park, K.S., Lee, S.H., Ha, B.J., and Lee, B.K.: *Arch. Pharmacol. Res.* 8, 31 (1985).
- Chang, K.M., Park, K.S., Lee, S.H. and Yoon, Y.P.: *Arch. Pharmacol. Res.* 8, 42 (1985).
- Chang, K.M., Sim, K.S., Lee, S.H., Park, K.S., Yoon, Y.P., Ha, B.J., and Lee, C.C.: *Arch. Pharmacol. Res.* 6, 123 (1983).
- Tang, D., Hao, Y., Liu, Z., Miao, S., Wei, H., Wu, J.: *Yaoxue Tongbao*, 19, 555 (1984).
- Sasaki, S.: Jpn. Kokai Tokyo koho Jp. pp.58-820 (1983).
- Odajima, Y.: Effects of Ginseng on Cancer Cell, Yakuyo Nijin Sono Kenkyu to Shinpo, pp. 198-209 (1981).
- Hoskins, J.M., Meynell, G.G., and Sanders, F.K.: *Exp. Cell Res.* 11, 297 (1956).
- Phillips, H.J., and Terryberry, J.E.: *Exp. Cell Res.* 13, 341 (1957)
- Brunner, K.T., Mael, J., Cerotoni, J.C., and Chapus, B.: *Immunology*, 14, 181 (1968).
- Fass, L., and Feter, A.: *J. Immunol.* 109, 749 (1972).
- Brereton, H.D., Bryant, T.L., and Young, R.C.: *Cancer Res.* 35, 2420 (1975).
- Murphy, W.K., Livingston, R.B., Ruiz, V.G., Gercovich, F.G., George, S.L., Hart, J.S., and Freireich, E.J.: *Cancer Res.* 35, 1438 (1975).
- Sky-peck, H.H.: *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 34, 197 (1971).
- Hirshaut, Y., Weiss, G.H., and Perry, S.: *Cancer Res.* 29, 1732 (1969).
- Hamburger, A.W., and Salmon, S.E.: *Science*, 197, 461 (1977).
- Puck, T.T., and Marcus, P.I.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41, 432 (1965).
- Roper, P.R., and Drewinko, B.: *Cancer Res.* 36, 218 (1976).
- Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B., Durie, B.G., Alberts, D.S., and Moon, T.E.: *N. Engl. J. Med.* 298, 1321 (1978).
- Alberts, D.S., Chen, H.S.G., Soehnlen, B., Salmon, S.E., Surwit, E.A., Young, L., and Moon, T.E.: *Lancet*, 2, 340 (1980).
- Bertelsen, C.A., Sondak, V.K., Mann, B.D., Korn, E.L., and Kern, D.H.: *Cancer*, 53, 1240 (1984).
- Mann, B.D., Kern, D.H., Giuliano, A.E., Burk, M.W., Campbell, M.A., Morton, D.L.: *Arch. Surg.* 100, 33 (1932).
- Meyskens, F.L., Moon, T.E., Dana, B., Gilmartin, E., Cosey, W.G., Chen, H.S.G., Franks, D.H., Young, L., and Salmon, S.E.: *Br. J. Cancer*, 44, 787 (1981).
- Von Hoff, D.D., Cowan, J., Harris, G., Reisdorf, G.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 6, 265 (1981).

28. 王浴生; 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京 (1983).
29. 張代釗; 中西醫結合治療癌症, 山西人民出版社, 山西 (1984).
30. 陸昌洙; 漢藥의 藥理成分 臨床應用, 癸丑文化社, 서울 (1982).
31. Dunn, T.B., and Potter, M.: *J. Natl. Cancer Inst.* **18**, 587 (1957).
32. Courtenay, V.D.: *Br. J. Cancer*, **34**, 39 (1976).
33. Tattersall, M.H.N.: *Lancet*, **2**, 1071 (1976).
34. Griner, P.F., Elbadawi, A., and Packman, C.H.: *Ann. Int. Med.* **85**, 578 (1976).
35. McIntyre, R.E., Magidson, J.G., Austin, G.E., and Gale, R.P.: *Am. J. Clin. Pathol.* **75**, 614 (1981).
36. Oliverio, V.T.: *Cancer. Rep.* **4**, 13 (1973).
37. Richiter, J.E., Hastdt, R., Dalton, J.F., Marshall, D., and Raymond, L.W.: *Cancer*, **43**, 1607 (1979).
38. Wasserman, T.H., Slavik, M., and Carter, S.K.: *Cancer*, **36**, 1258 (1975).
39. Weinberger, A., Pinkhas, J., Sandbank, U., Shaklai, M., and de Vries, A.: *J. Am. Med. Assoc.* **231**, 495 (1975).
40. Rosner, F.: *Cancer*, **37**, 1033 (1976).
41. Stavem, P., and Harboe, M.: *Scand. J. Haematol.* **8**, 375 (1971).
42. Buckner, H.W., Mokyr, M.B., and Mitchell, M.S.: *Cancer Res.* **34**, 181 (1974).
43. Hitchings, G.H., and Elison, G.B.: Chemical suppression of the immune response, *Pharmacol. Rev.* **15**, 365 (1963).
44. Wheeler, G.P., and Chumley, S.: *J. Med. Chem.* **10**, 259 (1967).
45. Wheeler, G.P., and Bowden, B.J.: *Cancer Res.* **25**, 1770 (1965).