

抗癌劑 Mitomycin C 와 數種 補益劑의 併用投與 效果에 대한 研究

圓光大學校 韓醫科大學 內科學教室

安文生 · 文炳淳 · 金世吉

I. 緒 論

現代醫學에서 難治性 疾病中에 하나인 癌의 治療를 위한 效率性 높은 여러 方法의 開發에 많은 研究가 있어 왔다. 그 結果 外科의 處置法, 放射線療法, 免疫療法 및 많은 化學療法劑가 開發되었으나 아직도 癌種에 따른 感受性, 治療後의 豫後, 副作用 등이 각기 多樣하여 이에 따른 問題點들을 안고 있다^{1,2)}.

現在 開發되어 利用되고 있는 抗癌劑들도 生體에 對한 毒性이 심하여 正常的인 細胞의 代謝를 크게 抑制하거나, 細胞의 突然變異 또는 癌化를 助長할 수 있기 때문에 抗癌劑의 使用에 있어 커다란 障礙로 指摘되고 있다³⁾. 이러한 問題點을 解決하기 위하여 副作用이 적고 抗癌性을 나타내는 天然物質에 對한 研究, 藥劑學的인 研究(drug delivery system) 등 새로운 抗癌劑의 開發이 시도되고 있으나⁴⁻⁸⁾, 既存 抗癌劑를 능가하고 副作用이 極小화된 癌治療 方法은 아직 開發되지 않았다.

한편, 數千年동안 使用되어 온 韓方製劑들을 癌治療時 既存 抗癌劑와 併用投與하여 抗癌劑의 副作用인 白血球數 및 體重의 減少와 免疫能低下 등을 最小化하려는 試圖들이 進行되고 있으며, 몇가지 韓方製劑들이 癌을 移植한 實驗動物의 生命을 延長시켰다는 報告가 있는데⁹⁻¹⁵⁾, 이 때 使用된 韓方製劑들에는 癌에 대한 免疫體系를 調節함으로써 癌에 대한 患者의 生體反應을 調節하여, 癌의 增殖을

抑制할 수 있다는 生體反應調節物質(Biological Response Modifiers, BRM)이 含有된 것으로 보고 있다¹⁶⁾.

韓醫學에서 무릇 疾病이 發生하는 主要한 原因은 黃帝內經¹⁷⁻¹⁸⁾에서 “正氣存內 邪不可干”, “邪之所湊 其氣必虛”라 한 바와 같이 正氣가 虛함에 있다고 하였는데, 癌의 發生에 대한 韓醫學的인 見解로 姜¹⁹⁾은 正氣가 虛할 때 客邪가 留滯함으로써 氣滯血瘀하고 邪毒 積聚가 塊를 이루어 形成된다 하였고, 李²⁰⁾도 “積之成也 正氣不足 而後邪氣踞之”라 하여, 發病의 原因이 亦是 正氣가 虛함에 있음을 強調하고 있으며, 그 治法에 있어서도 初期에는 邪氣가 아직 깊게 들어가지 않아 正氣가 比較的 강한 편이므로 攻法을 爲主로 하되, 時日이 좀 더 經過하여 病邪가 더욱 깊이 浸透한 中期에는 相對的으로 正氣가 虛弱해지므로 攻法과 補法을 兼施하라 하였으며, 正氣가 消殘해져버린 晚期에는 오직 補法만을 爲主로 하라고 하였다²¹⁻²²⁾. 또한 李¹⁸⁾는 攻法과 補法을 適切하게 交代로 施行하되, 補法을 써서 神이 壯하기를 기다렸다가 다시 攻法을 쓰라고 하였는데, 神이 壯하기를 기다린다고 한 바와 같이 神은 모든 生命 活動을 主宰하여 發生의 기틀이 되므로 形의 肥瘦, 榮衛血氣의 盛衰를 반드시 살피서 決定해야 한다는 뜻으로 볼 수 있다²⁴⁻²⁵⁾.

이와같이 韓醫學에서는 癌을 한낱 局所的인 疾患으로 보지않고 全身性 疾患이 局部的

으로 表出된 것으로 보았으므로, 既存 抗癌劑로서 攻法을 쓰되 그 副作用을 減少시키고 癌患者의 生命을 延長시키기 위해서는 補法을 兼用하여 扶正昌神함이 마땅하나, 補益法을 運用할 때는 各各의 病理 情況을 根據로 하여 施治해야 하기때문에 投與할 抗癌劑가 決定되면 과연 어떠한 補益劑들을 併用하는 것이 適合한지 檢討해 볼 必要가 있다.

따라서 本 實驗에서는 既存 抗癌劑로서 DNA合成을 阻害하는 mitomycin C(MMC)²⁷⁾를 選擇하여, 사람의 白血球癌 細胞인 MOLT-4 및 사람의 正常 淋巴球에 補益法²⁸⁾의 分類를 考慮한 9種의 補益劑들(養心湯, 補中益氣湯, 四物湯, 八味地黃湯, 六味地黃湯, 四君子湯, 十全大補湯, 生脈散, 歸脾湯)을 併用投與하였고 그 效果를 MTT 法으로 screening하였으며, 效果가 認定되는 處方들에 대해서는 DNA 合成能을 測定함으로서 그 作用機轉을 살펴본 후, 動物實驗을 통하여 mitomycin C에 의해 惹起되는 白血球數 및 體重의 減少와 免疫能의 低下에 대한 影響을 살펴본 結果, 若干의 知見을 얻었으므로 이에 報告하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 實驗動物

實驗에 使用한 動物은 ICR系統의 雄性 마우스 6-8周齡 되는 것을 使用하였다.

2) 檢液調劑

各 方劑의 構成은 東醫寶鑑²⁹⁾에 의하여 하였고, 藥材들은 圓光大學校 附屬 全州韓方病院에서 購入하여, 各 5 貼分을 蒸溜水 2,000 ml로 5 時間 加熱抽出한 後 濾過하였으며, 그 濾液을 濃縮하여 엑스를 얻어서 實驗에 使用

하였는데, 細胞 實驗時에는 PBS溶液에 溶解시켜 autoclave에서 121 °C, 20 分間 滅菌처리하였고, 經口投與時에는 0.9% 生理食鹽水에 溶解하여 使用하였다.

Sample 1. Prescription of Yang Sim Tang(YST)

韓藥名	生藥名	重量(g)
白茯苓	Hoelen Alba	3.75
茯神	Radix Hoelen Cum	3.75
當歸	Radix Angelicae gigantis	3.75
生地黃	Radix Rehmanniae	3.75
黃耆(蜜炙)	Radix Astragali	3.0
遠志(薑汁炒)	Radix Polygalae	3.0
川芎	Rhizoma Cnidii	2.625
柏子仁	Semen Thujae	2.625
酸棗仁(炒)	Semen Zizyphi Spinosi	2.625
半夏	Tuber Pinelliae	2.25
人蔘	Radix Ginseng	1.875
肉桂	Cortex Cinnamomi loureirii	1.125
五味子	Fructus Schizandrae	14 枚
生薑	Rhizoma Zingiberis	3 片
Ext. Yield		5.9 %

Sample 2. Prescription of Bo Jung Yik Ki Tang(BYT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
黃耆	Radix Astragali	5.625
人蔘	Radix Ginseng	3.75
白朮	Rhizoma alba Atractylodis	3.75
甘草	Radix Glycyrrhizae	3.75
當歸	Radix Angelicae gigantis	1.875
陳皮	Pericarpium Aurantii nobilis	1.875
升麻	Rhizoma Cimicifugae	1.125
柴胡	Radix Bupleuri	1.125
Ext. Yield		20.0 %

Sample 3. Prescription of Sa Mul Tang(SMT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae preparata	4.6875
當歸	Radix Angelicae gigantis	4.6875
川芎	Rhizoma Cnidii	4.6875
白芍藥	Radix alba Paeoniae	4.6875
Ext. Yield		28.1 %

Sample 4. Prescription of Pal Mi Ji Hwang
Tang(PJT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae preparata	15.0
山藥	Rhizoma Dioscoreae	7.5
山茱萸	Corni Fructus	7.5
白茯苓	Hoelen Alba	5.625
牡丹皮	Radicis Cortex Moutan	5.625
澤瀉	Rhizoma Alismatis	5.625
肉桂	Cortex Cinnamomi loureirii	1.875
附子(包)	Tuber Aconiti	1.875
Ext. Yield		8.9 %

Sample 5. Prescription of Yuk Mi Ji Hwang
Tang(YJT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae preparata	15.0
山藥	Rhizoma Dioscoreae	7.5
山茱萸	Corni Fructus	7.5
白茯苓	Hoelen Alba	5.625
牡丹皮	Radicis Cortex Moutan	5.625
澤瀉	Rhizoma Alismatis	5.625
Ext. Yield		12.3 %

Sample 6. Prescription of Sa Kun Ja Tang(SKT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
人參	Radix Ginseng	4.6875
白朮	Rhizoma alba Atractylodis	4.6875
茯苓	Hoelen	4.6875
甘草(炙)	Radix Glycyrrhizae	4.6875
Ext. Yield		21.2 %

Sample 7. Prescription of Sip Jeon Dae Bo
Tang(SDT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Radix Rehmanniae preparata	3.75
當歸	Radix Angelicae gigantis	3.75
川芎	Rhizoma Cnidii	3.75
芍藥	Radix Paeoniae	3.75
人參	Radix Ginseng	3.75
白朮	Rhizoma alba Atractylodis	3.75
茯苓	Hoelen	3.75
甘草	Radix Glycyrrhizae	3.75
肉桂	Cortex Cinnamomi loureirii	3.75
黃耆	Radix Astragali	3.75
生薑	Rhizoma Zingiberis	3 片
大棗	Fructus Zizyphi	2 枚
Ext. Yield		8.0 %

Sample 8. Prescription of Saeng Maek San(SMS)

韓藥名	生藥名	重量(g)
麥門冬(去心)	Tuber Liriodis	7.5
人參	Radix Ginseng	3.75
五味子	Fructus Schizandrae	3.75
Ext. Yield		31.5 %

Sample 9. Prescription of Kwi Bi Tang(KBT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
人參	Radix Ginseng	3.75
白朮	Rhizoma alba Atractylodis	3.75
茯苓	Radix Hoelen Cum	3.75
酸棗仁(炒)	Semen Zizyphi Spinosi	3.75
龍眼肉	Longanae Arilus	3.75
黃耆	Radix Astragali	3.75
當歸	Radix Angelicae gigantis	3.75
遠志(製)	Radix Polygalae	3.75
木香	Saussureae Radix	1.875
甘草	Radix Glycyrrhizae	1.125
生薑	Rhizoma Zingiberis	5 片
大棗	Fructus Zizyphi	2 枚
Ext. Yield		6.5 %

3) 試藥 및 器具

實驗에 사용한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Gibco), RPMI 1640 (Gibco), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma), mitomycin C(MMC, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), ³H-thymidine(³H-TdR, Sp.act. 50 Ci/m mol, ICN), Insta-gel (Packard), Ficoll-Hypaque(Sigma), Trypsin (Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A, Sigma)等이며, 使用器具는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96,48,24-well, Costa), disposable pipette(Bellco), disposable pasteur pipette(9inch, Sigma), hemocytometer (Neubauer), cell-harvester(Nunc), ELISA-Reader(Dynatech), liquid scintillation counter(Packard), CO₂ incubator(vision scientific Co.), clean bench(vision scientific Co.), autoclave(Dong Yang scientific Co.),

PH meter(Hanna instruments), centrifuge (Hanil Co.), inverted microscope(Nicon Co.) 등이다.

4) 細胞培養液製造및器具滅菌

本實驗에 사용된 細胞培地및 試藥은 脫이온 蒸溜水(3차蒸溜水)에 溶解시켜, filter(pore size, 0.2 um)로 濾過滅菌하였으며, 器具는 121°C, 15 psi.下에서 高壓滅菌하여 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 細胞株및 細胞培養條件

MOLT-4(human leukemia cell)細胞를 本實驗에 使用하였다. MOLT-4 細胞는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 ug/ml)이 含有된 RPMI-1640(FBS-RPMI 1640)에서 培養하였으며, 繼代培養條件은 1:10-1:20 比率, 3日 間隔으로 하였다. 細胞增殖에 미치는 MMC 및 複合生藥劑의 影響을 觀察하기 위한 實驗에는 繼代培養 2日째의 細胞를 使用하였다.

2) 淋巴球의 分離

Ficoll-Hypaque 溶液을 3 ml씩 分주한 15 ml 試驗管을 준비하고, 정상인의 靜脈으로 부터 heparin 처리된 注射器로 血液을 採取하여 血液量의 1.5 倍 되는 DPBS-A와 混合한 다음, 8-10 ml를 취하여 Ficoll-Hypaque 溶液 위에 조심스럽게 올려 놓고, 室溫에서 400 g 로 30 分間 遠心分離한 後, pasteur pipett을 利用하여 Ficoll-Hypaque溶液 바로 위층에 密集된 單核細胞를 얻어 5倍 부피의 DPBS-A 溶液에 再浮遊시킨 뒤, 250 g로 10分間 遠心分離하여 細胞를 3回 洗滌하였다. 最終 洗滌 後, hemocytometer를 利用하여 細胞의 生存率및 總細胞數를 測定하고 實驗에 必要한 適定細胞數로 FBS-RPMI 1640 에 再浮遊시켜 使用하였다³⁰⁾.

3) MTT 法에 의한 細胞成長率 測定

本實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann³¹⁾이 開發하여 Kotnik等³²⁾이 變形시킨 方法을 利用하였다. 즉 96-well plate의 各 well에, 各 濃度別로 稀釋된 複合生藥劑 抽出液 50 ul, MMC 50 ul 및 細胞浮遊液 50 ul를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 培養하였다. 培養 終了 4 時間前에 5 mg/ml 濃度로 DPBS-A 에 稀釋된 MTT溶液 20 ul를 各 well에 添加하고, 培養終了時까지 은박지로 빛을 遮斷시켜 培養하였다. 培養 終了時 0.1 N HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 ul 를 各 well에 다시 添加하고 빛이 遮斷된 狀態에서 37°C CO₂ incubator 에서 18時間 처리한 後, 發色된 各 well의 吸光度를 microplate reader(Dynatech)를 利用하여 570 nm에서 測定하고, 對照群의 吸光도와 比較하여 細胞成長率을 % 로 換算하였다.

4) DNA 合成能 測定

細胞內로 流入된 ³H-TdR 量으로 測定한 DNA 合成能은 MTT 法에 의한 細胞成長率 測定時와 같은 條件에서 MOLT-4 細胞를 培養하면서 培養終了 6 時間前에 ³H-TdR을 添加하여 培養終了時까지 pulse시켜 調査하였다. 培養終了 後 cell harvester를 利用하여 glass filter에 各 well의 細胞를 收去한 다음, glass filter disk를 counting vial에 옮기고 cocktail 溶液인 Insta-gel을 添加하여 liquid scintillation counter로 測定하였다³³⁾.

5) 白血球數의 測定

白血球數를 測定하기 위해 mouse(숫컷) 10 마리를 1群으로 하여, 對照群에는 0.9% 生理食鹽水만을 經口投與 하였으며, MMC投與群에는 mitomycin C 3 mg/kg을 腹腔에 1回 投與하였고, 實驗群은 MMC投與群에 各 檢液을 2g/kg씩 7日間 1日 1回씩 經口投與하면서, 藥物投與 前, 投與 後 1日, 3日, 5日 및 7日에 各各 mouse의 꼬리를 切斷하여 heparinized

microtube로 採血한 後, 10倍量의 turk 液을 가하여 染色한 다음, hemocytometer로 白血球數를 計算하였다.

6) 體重 測定

Mouse(숫컷) 10마리를 1群으로 하여, 對照群에는 0.9% 生理食鹽水만을 經口投與 하였고, MMC投與群에는 mitomycin C 3mg/kg을 0 日째와 7 日째 腹腔에 投與하였으며, 實驗群에는 MMC投與群에 各 檢液 2g/kg을 1日 1回씩 14日間 經口投與 하면서 體重을 測定 하였다.

7) 抗體生成細胞(PFC)數의 測定

Mouse (숫컷) 5 마리를 1群으로 하여, 對照群에는 0.9% 生理食鹽水만을 經口投與 하였고, MMC 投與群에는 mitomycin C 1 mg/kg 을 1 日 1回씩 7日間 腹腔投與 하였으며, 實驗群에는 MMC投與群에 各 檢液 2g/kg을 1日 1回씩 11日間 經口投與 하였다. 藥物投與 8日 째 1×10^6 개 SRBC 0.2 ml를 꼬리 靜脈에 注入하였고, 12日째 PFC測定을 위해 mouse를 頸椎 脫臼하여 屠殺한 後, 脾臟을 摘出하여 cold PBS(-) 溶液을 넣은 petri dish에 浸漬시켰다. 摘出した 脾臟은 clean bench內에서 手術用 가위와 pincette를 使用하여 分節한 後, 壓迫하면서 脾臟細胞를 PBS 溶液에 漏出시켰다. 新鮮한 PBS溶液으로 3回 洗淨(遠心分離 $250 \times g$, 5分間, $4^\circ C$)하여 脾臟細胞 懸濁液을 調劑한 後, MEM으로 2.5×10^6 cell/ml가 되도록 細胞數를 調整하였다. 別途로 抗原으로 使用한 SRBC를 PBS로 50% (v/v)溶液으로 調劑하여 eppendorf tube에 50ul를 넣은 後, complement(guinea pig 新鮮血清) 50ul를 注入하고, 미리 調劑한 脾臟細胞 懸濁液 0.4ml 및 MEM 0.1ml를 添加하여 pipette로 混合시켰다. 混合된 液을 0.1ml를 取하여 미리 製作한 Cunningham chamber의 3室에 均一하게 注入시켰다. 注入 後 chamber의 양쪽 끝을 加溫 溶解한 流動

paraffin으로 密封한 後, $37^\circ C$ 의 incubator에서 1時間 동안 培養하고 곧 바로 $4^\circ C$ 의 cold chamber에서 30分間 넣어 反應을 終結시켰다. 反應이 終結된 chamber內의 plaque數를 1×10^6 개의 脾臟細胞當 抗體生成 細胞數로 換算하였다^{34,35}).

8) T 淋巴球增殖能의 測定

위에서 調劑한 脾臟細胞 浮遊液을 microculture plate(96 well)에 各 well當 5×10^5 細胞가 되도록 調整하여, concanavalin A 0.2 ug/ml를 가하고 $37^\circ C$ 의 CO_2 incubator에서 48時間 培養한 後, 培養終了 4時間 前에 MTT試藥을 加한뒤, 3)과 同一한 方法으로 實驗하여 control群의 O.D.를 100%으로 換算하여 各 實驗值를 算定하였다^{36,37}).

III. 實驗成績

1. MOLT-4 細胞의 細胞數 및 培養時間과의 關係

細胞數와 培養時間과의 關係를 알아보고자 MOLT-4 細胞 0.5×10^3 , 1.6×10^3 , 5×10^3 및 1.5×10^4 개를 各 well에 넣고 1, 3 및 5日을 各各 培養하였을 때, 5×10^3 cells/well에서 3日 以上 培養時 대수 증식기에 도달하였기에, 本 實驗에서는 細胞數를 5×10^3 개로 하였으며, 培養日은 4日로 定하였다(Fig. 1).

2. MOLT-4 細胞에 미치는 mitomycin C의 影響

MOLT-4 細胞를 50 % 抑制할 수 있는 mitomycin C의 濃度를 定하기 위해, 各 well 당 細胞 5×10^3 개를 넣고, mitomycin C 0, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016 및 0.032 ug/well을 各各 加하고 4日 培養하였을 때 0.004 ug/well의 濃度에서 약 50%의 抑制 效果가 나타났기 때문에, 本 實驗에 使用한 mitomycin

C의 濃度는 0.004 ug/well로 하여 이후의 실험에 사용하였다(Fig.2).

3. 數種補益劑 및 mitomycin C 併用投與가 MOLT-4 細胞(5×10^3 cells/well) 및 Normal human lymphocyte에 미치는 影響

9 種의 補益劑와 MMC의 併用投與 效果를 觀察하기 위해 MMC 0.004 ug/well과 各 補益劑 10^{-7} , 10^{-5} 및 10^{-3} g/ml 를 well에 各 各 混合하여 MOLT-4 細胞 및 human lymphocyte에 미치는 影響을 살펴 본 結果 養心湯(YST)은 MOLT-4 細胞에 대해 直接作用이 없었고, MMC와 併用時 MOLT-4 細胞를 10^{-7} 및 10^{-5} g/ml 濃度에서 增加시켰으며, normal lymphocyte에는 影響을 주지 않았다(Fig. 3).

補中益氣湯(BYT), 四物湯(SMT), 八味地黃湯(PJT) 및 六味地黃湯(YJT)은 單獨使用時 10^{-7} 및 10^{-5} g/ml 濃度에서 MOLT-4 細胞를 增加시켰으며, MMC와 併用時에도 MMC 單獨投與時에 비해서는 약하지만 增加시켰고, normal lymphocyte를 減少시켰다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7).

四君子湯(SKT)은 單獨使用時 10^{-3} g/ml의 濃度에서 MOLT-4 細胞를 增加시켰으나, MMC와 併用時에는 MOLT-4 細胞를 10^{-7} 및 10^{-5} g/ml濃度에서 減少시켰으며, normal lymphocyte도 減少시켰다(Fig. 8).

十全大補湯(SDT), 生脈散(SMS) 및 歸脾湯(KBT)은 單獨投與時 10^{-7} , 10^{-5} g/ml 濃度에서 MOLT-4 細胞를 增加시켰으며, MMC와 併用時에도 增加시켰으나, 單獨使用時에 비하여는 增加되는 傾向이 약하였고, normal lymphocyte는 濃度增加에 따라 增加시켰다(Fig. 9, Fig. 10, Fig.11).

4. MOLT-4 細胞(1×10^4 cells/well)에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 mitomycin C의 併用投與 效果

위의 實驗結果를 確認하기 위해 MOLT-4 細胞의 數를 2倍 增加시켜 1×10^4 cells/well로 하고, 各 藥物의 濃度를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 各well에 MMC와 混合하였을 때, 十全大補湯(SDT), 生脈散(SMS) 및 歸脾湯(KBT)은 單獨使用時 MOLT-4 細胞를 增加시키는 傾向이었으며, MMC와 併用時에는 別다른 影響을 주지 못했으나, 歸脾湯 10^{-4} g/ml 濃度에서는 有意性있게 減少되었다(Fig.12, Fig.13, Fig.14).

5. DNA 合成能에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 mitomycin C의 併用投與 效果

위의 實驗結果와 DNA合成能의 關係를 알아 보기 위해 MOLT-4 細胞의 數를 1×10^4 cells/well로 하고, 各 藥物의 濃度를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 各 各 加하고 ^3H -thymidine uptake되는 量을 測定한 結果, 十全大補湯(SDT)은 單獨使用時 10^{-6} g/ml에서 增加시키고 10^{-4} g/ml에서는 減少시켰으며, MMC와 併用時에는 別다른 影響을 주지 못했는데(Fig. 15), 生脈散(SMS)은 單獨使用時와 MMC 併用時 別다른 影響을 주지 못했다(Fig. 16). 한편 歸脾湯(KBT)은 10^{-4} g/ml 에서 單獨使用時와 MMC併用時 모두 有意性 있게 減少시켰다(Fig 17).

6. DNA 合成能에 미치는 四君子湯과 mitomycin C의 併用投與 效果

前 實驗에서 四君子湯의 濃度가 10^{-7} 및 10^{-5} g/ml 일때 MMC와 併用時 抗癌作用이 強力하였기 때문에 이의 作用과 DNA合成能과의 關係를 알아 보고자 MOLT-4 細胞의 數를 1×10^4 cells/well로 하고 藥物의 濃度를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 各 各 加하고 ^3H -thymidine uptake되는 量을 測定한 結果 10^{-7} 및 10^{-6} g/ml 濃度에서 DNA 合成能을 有意性 있게 減少시켰다(Fig. 18).

7. Mitomycin C 投與 mouse의 白血球數에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯의 影響

MMC 投與 前, MMC 投與 後 1, 3, 5 및 7 日에 白血球數를 測定한 結果, MMC 投與 前의 白血球數($\times 10^3$)는 14.16 ± 1.2 개 이었고, MMC 投與 1日 後에 5.8 ± 0.29 개로 減少하였다가 9.71 ± 0.32 , 11.47 ± 0.56 및 13.42 ± 0.65 로 7日 後에는 거의 正常值로 回復되었다. MMC를 投與하고 十全大補湯(SDT)을 投與하였을 때는, 1日 後에 7.09 ± 0.61 개, 3日 後에 12.95 ± 0.73 개, 5日 後에 13.5 ± 1.0 개 및 7日 後에 16.82 ± 0.71 개로 MMC 投與群에 비해 有意性 있게 白血球數가 增加 하였으며, 生脈散(SMS) 投與群은 6.06 ± 0.3 , 10.48 ± 0.72 , 12.27 ± 0.64 및 14.49 ± 0.4 개로 MMC 投與群에 비해 增加하는 傾向이었으나 有意性은 없었고, 歸脾湯(KBT) 投與群에서는 6.01 ± 0.41 , 13.94 ± 0.62 , 15.59 ± 1.0 및 17.18 ± 0.63 개로, MMC 投與群에 비해 3日 後 부터 有意性 있게 增加하였다(Fig.19).

8. Mitomycin C 投與 mouse의 體重에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯의 影響

藥物 投與하기 前의 體重을 100%으로 하였을 때, 正常群은 14日 後에 106.4%로 體重在 增加하였으나, MMC 投與群은 藥物 投與 5日 後에 93.5%, 8日 後에 92.3%, 13日 後에는 91.8%로 體重在 減少하였으며, MMC와 十全大補湯(SDT) 投與群은 2日 後에 96.7%로 若干 減少하였으나, 14日 後에는 106.6%로 正常群의 體重까지 回復되었다. MMC와 生脈散(SMS) 投與群은 MMC 投與 7日 까지는 正常群과 別 差異가 없었고, MMC 2回 投與 後 부터는 正常群에 비해 體重在 약간 減少 하였으나 MMC 投與群에 비하여는 體重在 增加 하였으며, MMC와 歸脾湯(KBT) 投與群은 MMC 投與群과 거의 類似하게 體重在 減少하였다(Fig. 20).

9. 抗體生成細胞(PFC)數 에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 Mitomycin C 併用投與 效果

對照群의 PFC 숫자는 10^6 細胞當 1203 ± 228 개이었으며, 十全大補湯(SDT), 生脈散(SMS) 및 歸脾湯(KBT) 單獨 投與群은 各各 1438 ± 269 , 1282 ± 180 및 1125 ± 150 개로 對照群에 비해 別 差異가 없었으나(Fig. 21), MMC 投與群은 750 ± 84 개로 對照群에 비해 顯著히 減少하였다. MMC와 各 藥物을 併用 投與 하였을 때는 各各 1219 ± 180 , 788 ± 67 및 913 ± 71 개로서, 十全大補湯을 併用하였을 경우에만 MMC 單獨 投與群에 비해 有意性 있게 增加되었다(Fig. 22).

10. T 淋巴球增殖能에 미치는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 mitomycin C의 併用投與 效果

藥物 投與한 마우스의 脾臟細胞 培養系를 利用하여 T 淋巴球 mitogen인 Concanavalin A(2.5ug/ml)를 添加하여 培養한 뒤, MTT法으로 測定한 結果 對照群의 O.D.를 100%으로 換算하였을 때, 十全大補湯(SDT), 生脈散(SMS) 및 歸脾湯(KBT) 單獨 投與群은 各各 97.7 ± 1.8 , 100.7 ± 3.2 및 $103.7 \pm 5.0\%$ 로 對照群에 비해 別 差異가 없었으나(Fig. 23), MMC 投與群은 $58.2 \pm 5.3\%$ 로 顯著히 減少하였으며, MMC와 各 藥物을 併用 投與 하였을 때는 88.5 ± 3.4 , 83.0 ± 2.3 및 $78.0 \pm 1.9\%$ 로 MMC 投與群에 비해 모두 有意性 있게 增加 되었다(Fig. 24).

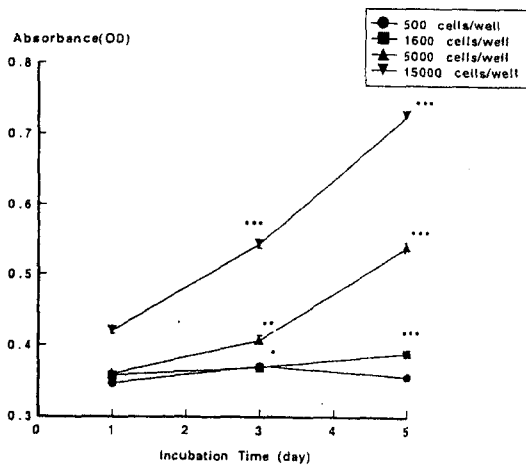


Fig. 1. The growth curve of MOLT-4 cells. The OD of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Dynatech MR700) at 570nm.

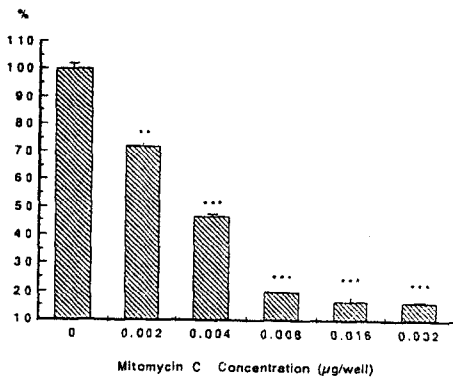


Fig. 2. Effect of Mitomycin C on MOLT-4 cell (5×10^3 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the MMC non-treated group, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

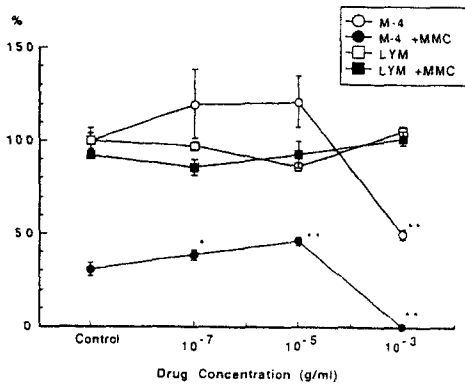


Fig. 3. Effect of Yang Sim Tang (YST) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay.

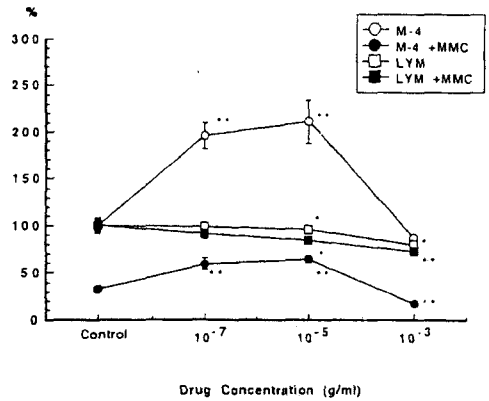


Fig. 4. Effect of Bo Jung Yik Ki Tang (BYT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$.

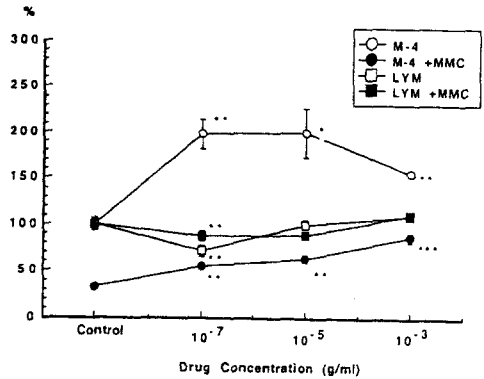


Fig. 5. Effect of Sa Mul Tang (SMT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$, ****: $p < 0.001$.

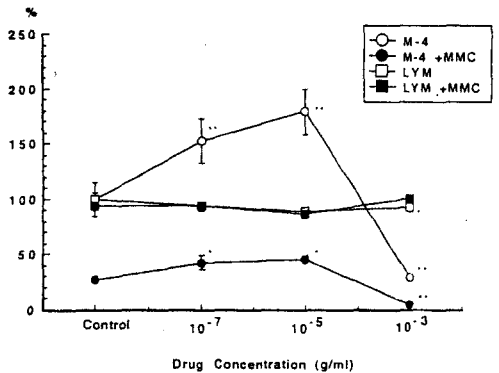


Fig. 6. Effect of Pai Mi Ji Hwang Tang (PJT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$.

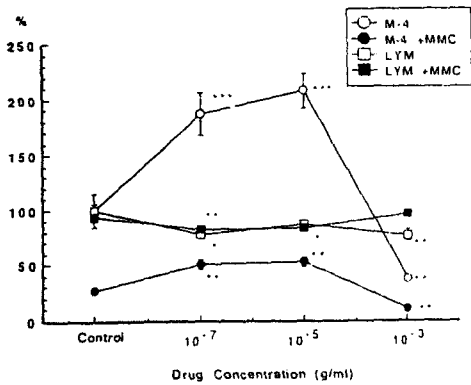


Fig. 7. Effect of Yuk Mi Ji Hwang Tang (YJT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

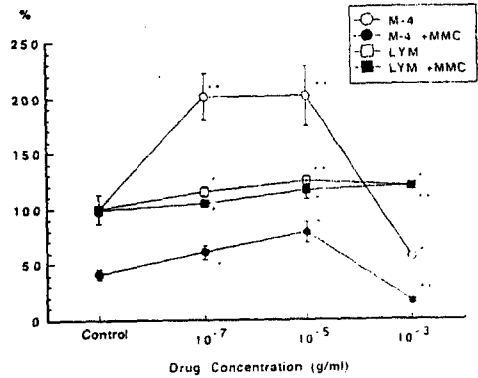


Fig. 10. Effect of Saeng Maek San (SMS) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

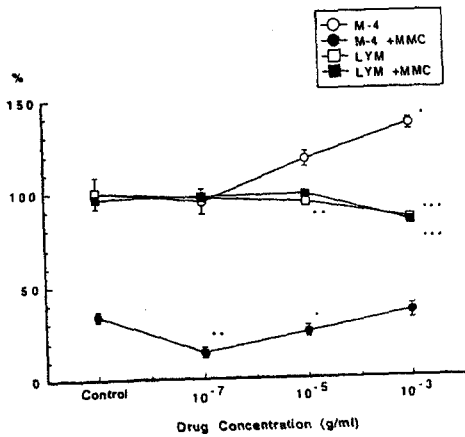


Fig. 8. Effect of Sa Kun Ja Tang (SKT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

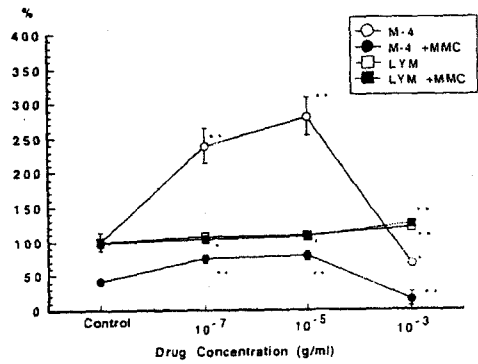


Fig. 11. Effect of Kwi Bi Tang (KBT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

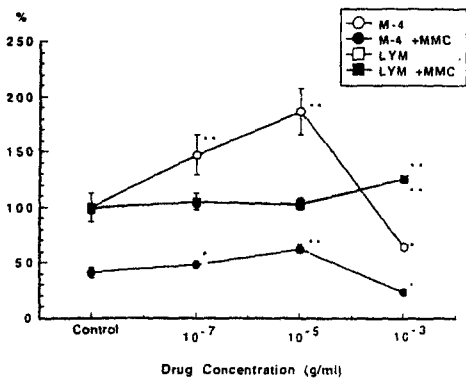


Fig. 9. Effect of Sip Jeon Dae Bo Tang (SDT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell and human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay. Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

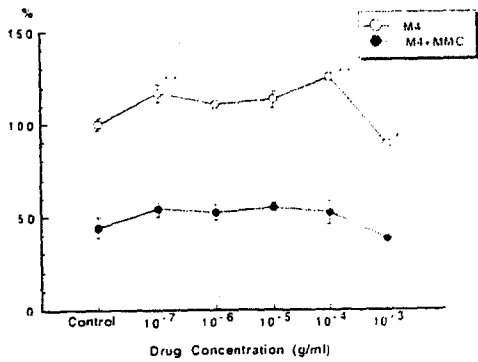


Fig. 12. Effect of Sip Jeon Dae Bo Tang (SDT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean±SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group. *: p<0.05. **: p<0.01. ***: p<0.001.

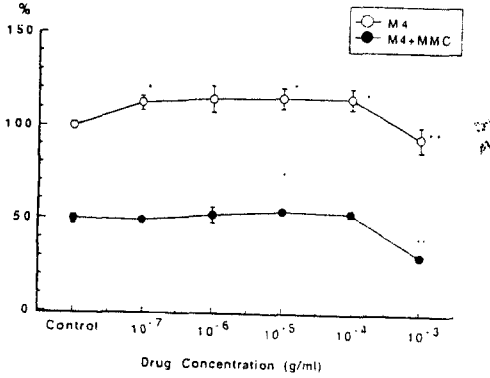


Fig. 13. Effect of Saeng Maek San (SMS) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

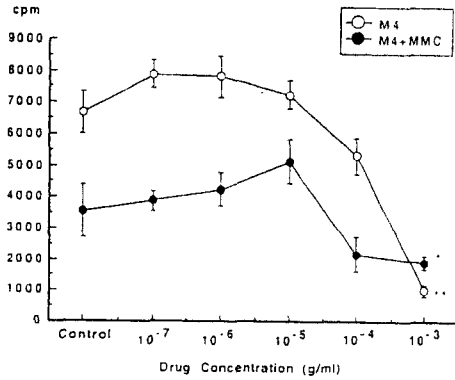


Fig. 16. Effect of Saeng Maek San (SMS) extract and Mitomycin C on [3 H]-thymidine incorporation into MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

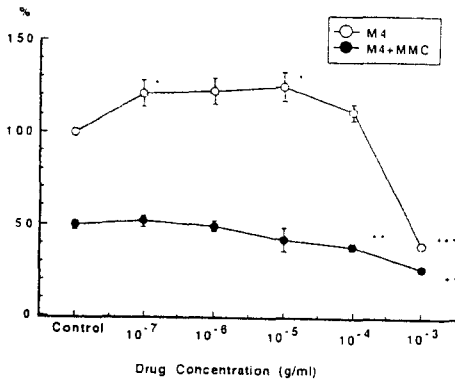


Fig. 14. Effect of Kwí Bi Tang (KBT) extract and Mitomycin C on MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

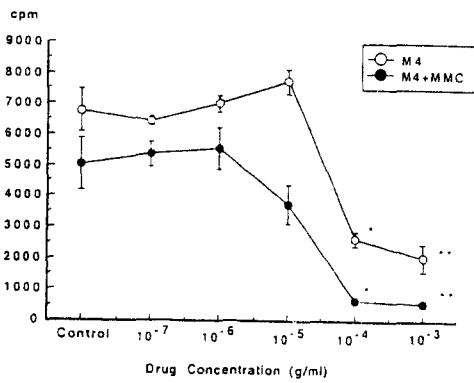


Fig. 17. Effect of Kwí Bi Tang (KBT) extract and Mitomycin C on [3 H]-thymidine incorporation into MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

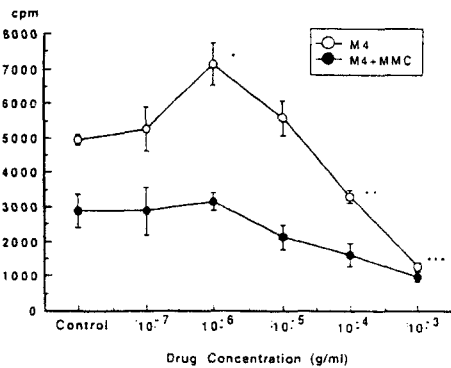


Fig. 15. Effect of Sip Jeon Dae Bo Tang (SDT) extract and Mitomycin C on [3 H]-thymidine incorporation into MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

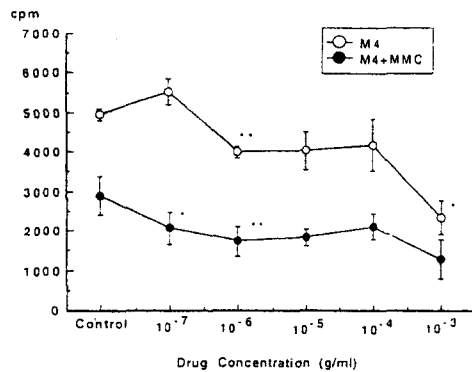


Fig. 18. Effect of Sa Kun Ja Tang (SKT) extract and Mitomycin C on [3 H]-thymidine incorporation into MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well). Each bar represents the mean \pm SE of 4 assays. *: Significantly different from the control group, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

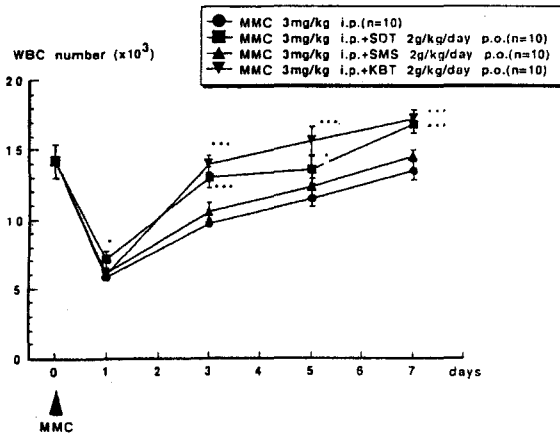


Fig. 19. Effect of SDT, SMS and KBT extract on leukopenia by MMC in tumor free ICR mice.
 : Significantly different from the MMC-treated group. (: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$)

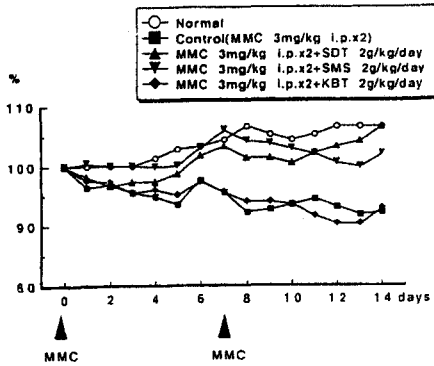


Fig. 20. Effect of SDT, SMS and KBT extract on weight loss caused by MMC in tumor-free ICR mice.

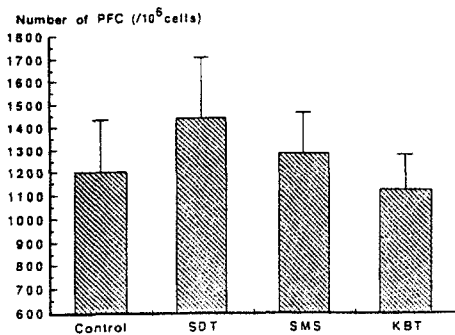


Fig. 21. Effect of SDT, SMS and KBT on PFC induction in mice.

Mice were given 2g/kg/day SDT, SMS and KBT respectively, orally for 11 days. At the 8th day, mice were injected i.v. with 1×10^8 cells/0.2 ml of SRBC, and after 4 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FBS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay.
 Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice.

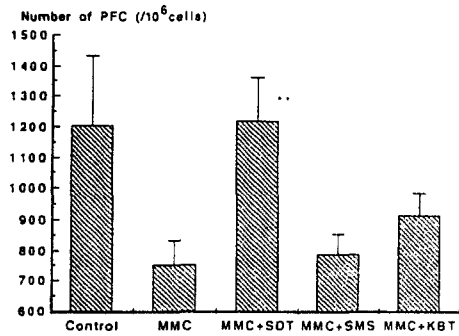


Fig. 22. Effect of SDT, SMS and KBT on PFC induction in MMC injected mice.

Mice were given 2g/kg/day SDT, SMS and KBT respectively, orally for 11 days and injected i.p. with 1 mg/kg of MMC per day for 7 days. At 8th day, mice were injected i.v. with 1×10^8 cells/0.2 ml of SRBC, and after 4 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FBS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay.
 Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice.

**: Significantly different from the MMC-treated group ($p < 0.01$).

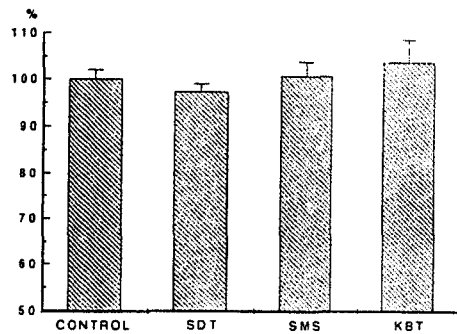


Fig. 23. Effect of SDT, SMS and KBT on Concanavalin A (2.5ug/ml) treated lymphocyte blastogenesis of spleen cells in mice.

Mice were treated with SDT, SMS and KBT as described in Fig. 21.

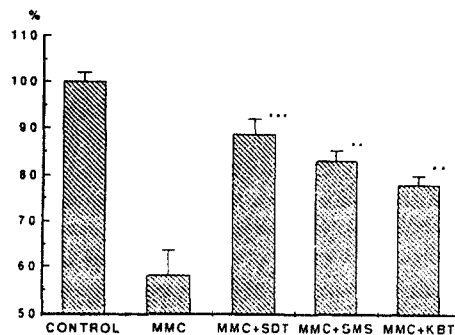


Fig. 24. Effect of SDT, SMS and KBT on concanavalin A (2.5ug/ml) treated lymphocyte blastogenesis of spleen cells in MMC injected mice.

Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice.

*: Significantly different from the MMC-treated group. (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

IV. 考 察

韓醫學에서 現代醫學의 癌과 關聯된 疾病은 “疔瘡”, “積聚”, “癥瘕” 및 “乳岩” 등이 있다고 하였다³⁸⁾. 이러한 疾病들의 治療時에는 治法의 選擇이 重要한데, 初期에는 攻法 爲主로, 中期에는 攻補兼施 爲主로, 晩期에는 補法 爲主로 治療하여야 한다고 하였다²¹⁻²²⁾. 現代醫學에서 癌의 治療法은 韓醫學的인 觀點에서 볼 때는 主로 攻法 爲主라 할 수 있는데, 이 때 使用하는 藥材들이 너무 강력하여 生體에 많은 副作用을 惹起시킨다고 볼 수 있다. 따라서 現代醫學에서 癌을 治療하고자 할 때 抗癌劑들의 副作用을 減少시키는데 攻補兼施의 治法을 利用하는것이 奏效 할 것으로 豫想할 수 있다. 現在 利用되고 있는 抗癌劑들의 生體에 대한 副作用을 減少시키기 위한 여러 試圖 中에 生體反應을 調節하여 副作用을 감소시키는 天然物質(BRM)에 대한 研究¹⁶⁾가 進行되고 있으며, 특히 抗癌劑 mitomycin C와 陳³⁹⁾이래로 歷代 醫家들⁴⁰⁻⁴⁵⁾에 의하여 氣血雙補의 代表方으로 使用되어진 十全大補湯을 併用投與한 결과, 抗癌劑의 副作用인 白血球 減少, 體重減少 및 免疫能 低下 등이 顯著히 減少되었다는 報告들⁶⁻¹⁵⁾은 바로 이러한 治法이 臨床的으로 有用할 것이라는 點을 示唆하고 있다.

따라서 本 實驗에서는 補氣劑로서 四君子湯과 補中益氣湯, 補血劑로서 四物湯, 氣血雙補劑로서 十全大補湯, 歸脾湯 및 養心湯, 補陰劑로서 六味地黃湯, 氣陰雙補劑로서 生脈散, 그리고 補陽劑로서 八味地黃湯을 選擇하여, 抗癌劑인 mitomycin C와 併用投與할 때, 攻補兼施의 治法에 合當한 補益劑를 찾고자 實驗하였다.

動物細胞의 增殖을 試管内에서 測定하는데에는 實驗目的에 따라 多樣한 方法들이 適用되고 있는데⁴⁶⁾, 이들 中 大量의 試料을 빠른 時間內에 測定할 수 있으며 再現성이 높

고, 특히 藥物들의 癌細胞 增殖에 미치는 效果의 檢索에 널리 利用되고 있는 MTT法을 利用하여 사람의 白血球癌 細胞株인 MOLT-4 細胞의 增殖率을 測定한 結果 各 well當 5,000 개 以上에서 3日 以上 培養時 代數增殖期에 到達하였기에, 細胞數를 各 well當 5,000 개로 하여 4日間 培養하면서 各 補益劑에 대한 影響을 觀察하였다.

韓方製劑와 MMC의 併用投與 效果를 測定하고자 할 때는 MMC의 濃度에 따라 그 效果가 變化될 수 있기때문에, 癌細胞에 대한 MMC의 感受性 및 50% 增殖 抑制 濃度를 定하는 것이 重要하다. 따라서 本 實驗에서는 MMC의 濃度를 0.004 ug/well로 하였는데, 이 濃度는 MOLT-4 細胞를 50% 增殖抑制할 수 있는 濃度이다.

MOLT-4 細胞에 補益劑만을 單獨 處理하였을 때는 全般的으로 癌細胞의 增殖을 促進시켰다. 臨床에서 癌患者에게 補益劑를 單獨으로 投與하는것은 大實之症이 兼했을 때 補法만을 使用한 境遇에 比喩될 수 있는데 그리하면 오히려 疾患을 더욱 惡化시키는 結果가 온다²¹⁾. 그러나 抗癌劑 MMC와 補益劑를 併用投與時에는 補益劑 單獨投與에 비하여는 약하지만 若干 增加시키는 傾向이었는데, 四君子湯은 다른 補益劑와는 달리 MMC의 抗癌作用을 亢進시키는 結果를 나타내었다. 사람의 正常 淋巴球에 補益劑 單獨 및 MMC併用 處理하였을 때, 養心湯은 별다른 變化를 주지 못했으며, 補中益氣湯, 四物湯, 八味地黃湯, 六味地黃湯 및 四君子湯은 약한 細胞毒性을 나타내었으나, 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯은 淋巴球를 活性化시켰다. 다만 MMC를 입과구에 處理時 影響을 주지 못한 結果는, 淋巴球 培養時 淋巴球 增殖誘導物質인 Con A등⁴⁷⁾을 處理하지 않았기 때문으로 思料된다. 四君子湯이 抗癌劑의 抗癌效果를 亢進시킨 作用은 注目할 만한 것이고, 그의 作用機轉은 DNA合成能의 抑制에 起因된 것이라 생각되나, 淋巴球에 대하여 細胞毒性을 나타냈

기 때문에 本 實驗에서는 動物實驗을 하지 않았다. 이에 대하여는 追後 研究 檢討할 만 한 價値가 있다고 思料된다.

以上の 實驗에서 有意性이 나타난 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯을 살펴보면 十全大補湯은 陳³⁹⁾의 太平惠民和劑局方에 收錄된 處方으로서 氣血을 雙補하며 男子婦人諸虛不足 五勞七傷 不進飲食 久病虛損 등의 증에 活用하여 왔고⁴⁸⁾, 生脈散은 李⁴⁹⁾의 “內外傷辨惑論”에 처음 收錄된 處方으로 暑熱에 傷하여 津液이 耗損되고 元氣가 低下되어 오는 氣短, 倦怠, 口渴, 汗出 등 증과 肺虛에서 오는 喘咳를 治療하는데 使用되어 왔다⁵⁰⁾. 歸脾湯은 嚴⁵¹⁾의 濟生方에 처음으로 記載된 處方으로서 思慮過多로 心脾를 傷하여 發生된 健忘 怔忡을 治療할 目的으로 立方되었으며, 危⁵²⁾는 嚴의 主治症外에 思慮로 脾를 傷하여 脾가 統血하지 못함으로서 생기는 血病을 治療하였다⁵³⁾. 그리고 그 特性을 大別하면 十全大補湯 및 歸脾湯은 氣血雙補劑이고 生脈散은 氣陰雙補劑로서 補氣劑에 補血 또는 補陰을 겸한 處方들인데, 素問 刺法論⁵⁴⁾에 “正氣存內 邪不可干”이라 하여 正氣를 疾病에 대한 抵抗力으로 보았고, 素問 上古天真論에 “眞氣從之 精神內守 病安從來”라 하여 氣와 神이 있으면 發病되지 않는다고 하였으며, 衛氣는 靈樞 本藏篇⁵⁵⁾에 “衛氣者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 司開闔”이라 하여 皮膚 粘膜의 防禦作用을 한다 하였고, 戴 等⁵⁶⁻⁵⁷⁾은 臟器 組織에 溫煦 保護作用도 한다고 하였으므로, 抗癌劑의 副作用을 減少시키는데는 補氣가 그 基本이 될 수 있다고 생각되어 진다.

9 種의 補益劑中 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯은 抗癌劑의 作用을 阻害하지 않으면서 淋巴球를 活性化시키는 作用을 나타내었으므로, 이를 確認 檢討하기 위해 MOLT-4 細胞의 數를 well當 10,000개로 增加시키고, 各 藥物의 濃度를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 影響을 살펴 본 結果 앞의 結果와 類似하였으며, DNA 合成能에 미치는 影

響을 살펴 본 結果도 同一하였다. 十全大補湯 單獨處理時 癌細胞 增殖의 促進作用은 DNA 合成能 增加에 起因되었으나, 生脈散 및 歸脾湯의 單獨處理時 癌細胞 增殖의 促進作用은 DNA合成에 기인된 것이라기 보다는 RNA나 protein합성에 기인된 것이 아닌가 思料되며, 특히 歸脾湯은 10^{-4} g/ml 濃度以上에서 MMC와 併用時 細胞毒性을 나타냈는데, 이는 DNA 合成을 抑制한 結果라 推定된다.

이러한 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯에 대한 結果는 臨床的으로 重要한 意味를 가질 수 있기 때문에, 抗癌劑 投與時 副作用으로 나타날 수 있는 白血球減少, 體重減少 및 免疫能低下에 대하여 이들 藥物의 影響을 살펴 보기위해 動物實驗을 實施하였다.

MMC를 마우스에 投與하면 1日 後에 白血球數가 顯著히 減少하여 7日 後에는 거의 正常으로 되었으나, MMC와 十全大補湯 및 歸脾湯을 併用投與하였을 때, 十全大補湯 併用 投與群은 1日 後 부터 歸脾湯 併用投與群은 3日 後부터 有意性 있게 白血球數가 增加하였으며, MMC와 生脈散 併用 投與群은 白血球數에 影響을 미치지 못하였는데, 效果가 없는 生脈散은 氣陰雙補劑인 反面에 效果가 認定된 十全大補湯과 歸脾湯은 氣血雙補劑라는 점과 白血球가 血의 한 成分임을 考慮하여 追後 研究해볼 必要가 있다고 思料된다.

MMC를 實驗 開始日 및 7日에 投與하고 마우스의 體重을 測定한 結果 顯著히 減少하였으나, MMC와 十全大補湯 및 生脈散 併用 投與群은 거의 正常群의 體重과 비슷하였으며, MMC와 歸脾湯 併用 投與群은 MMC投與群의 體重 變化와 類似한 減少를 보였는데, 歸脾湯은 補氣劑인 四君子湯과 補血劑인 當歸補血湯에 安神시키는 遠志 酸棗仁 龍眼肉과 理氣시키는 木香이 加味된 處方임을 考慮할 때 補氣劑 및 補血劑 外의 藥物中에 體重의 增加를 阻害하는 要素가 있지 않나 推定된다.

抗體生成細胞(PFC)에 미치는十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯의 單獨 投與群의 作用을 檢討한 結果 抗體生成에 별 影響을 주지 못하였다. 그러나 MMC 投與時에는 抗體生成이 正常群에 비해 顯著히 減少하였고,十全大補湯 併用 投與群은 MMC 單獨投與群에 비하여 有意性 있게 抗體生成細胞數를 增加시키는데 반해, MMC와 生脈散 및 歸脾湯의 併用 投與群은 별 效果가 없었다.

T 淋巴球 增殖能에 미치는十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯의 單獨 投與群의 作用을 檢討한 結果 淋巴球增殖에 影響을 미치지 못하였다. 그러나 MMC 投與時에는 淋巴球增殖能이 正常群에 비해 顯著히 減少하였고, MMC와十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯 併用 投與群은 MMC 單獨投與群에 비하여 有意性 있게 淋巴球增殖能을 增加시켰다.

十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯의 單獨 投與群에서는 免疫增強作用이 나타나지 않았으나, MMC에 의하여 免疫能이 低下된 狀態에서는 이들 藥物이 免疫能을 增強시켰다는 結果는, 韓方製劑가 必要할 때만 選擇의 作用하여 平氣를 維持시킨다는 尙害承制論의 論理와 脈絡을 같이한다고 할 수 있다. 또한 細胞性免疫의 增強作用이 體液性免疫增強作用 보다 強하였다는 結果는, 補益劑에서 全般的으로 細胞性免疫增強作用이 뚜렷하게 나타났다는 劉⁵⁸⁾의 報告와도 類似한 結果이었다.

BRM이란 人體의 生理反應에 關여하는 物質들로서 生體反應을 調節하던가 아니면 直接的으로 腫瘍細胞(tumor cell)에 作用하여 이들 細胞의 成長停止(cytostatic), 또는 溶解(cytolytic)를 일으켜 癌治療劑로서 使用될 수 있는 物質을 말한다. BRM을 生體 內에서 하는 役割에 따라 分類하면 大略 5가지로 分類할 수 있는데, 첫째 生體의 免疫反應에 도움이 되는 生體의 作用(effector mechanism)을 強化시키거나 宿主의 防禦體系를 增加시킴으로써 宿主의 癌에 대한 抵抗力을 增加시키는 것, 둘째 自然 혹은 再組合 物質의 形態로 抗癌

活性을 增加시키는 生理反應의 媒介物을 補充하는 것, 셋째 癌細胞의 宿主 免疫機構에 대한 感受性を 增加시켜 抗癌作用을 增強시키는 것, 넷째 癌細胞의 transformation을 減少시키거나 癌細胞의 分化를 促進하여 分裂하지 않는 成熟된 細胞로 만들거나(induction of differentiation), 다섯째 宿主가 既存 治療方法인 抗癌化學療法 혹은 放射線治療에 더욱 잘 適應하도록 하는 것 등이 있다¹⁶⁾.

現在 免疫治療에 使用되고 있는 BRM에는 alkyllysophospholipids(ALP), BCG, bostatin, Corynebacterium parvum, endotoxin, levan, muramyl dipeptide(MDP), picibanil, tuftsin 등의 免疫調節 내지는 增強製劑들⁵⁹⁾, interferons (α, β, γ) 등을 포함한 cytokines⁶⁰⁾, poly IC-LC, tilorones, Brucella abortus 등 interferon 誘導物質들, 胸腺 hormone製劑⁶¹⁾ 들 및 anti-T cell, anti-T suppressor cell, anti-tumor antibody, anti-idiotypic antibody, mono clonal antibody⁶²⁾, tumor-associated antigen 및 tumor-specific antigen 등이 있다.

現在 開發되어 있는 거의 모든 生體反應調節物質들은 정도의 差異는 있지만 B淋巴球의 增殖과 分化에 影響을 미치는 것으로 알려져 있는데, 특히 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IFN- γ 등은 B 淋巴球의 增殖 및 分化 效果가 주된 機能中의 하나이다.

本 研究中에 使用된 MMC의 抗癌力을 發揮하는데 있어서 各種 補益劑와의 併用投與로 인하여 그 副作用이 減少되는 現狀도 補益劑內의 BRM이 作用하여 이루어진 結果라고 推定되어진다. 또한 이로부터 MMC와 數種補益劑의 併用投與에 의하여 癌治療에 따르는 細胞毒性에 대한 正常細胞의 피해를 輕減시킴으로서 癌(腫瘍)의 治療에 대한 개체의 忍耐性を 增加시키는 方法⁶³⁾으로서 上述한 BRM의 效果가 認定될 것이다.

우리나라에서도 最近 癌의 治療를 위하여 哺乳動物의 遺傳子 產物인 生體反應 物質(Biologicals, BLG)이나 外部에서 얻어지는

生體反應 調節物質(BRM)에 대한 關心이 高潮되고 있으며, 이러한 原因은 그동안 脚光 받아 오던 癌患者에 있어서의 免疫療法이 癌의 退治에 失敗한 때문이며, 그것은 免疫療法 自體가 效果細胞의 活動 強化에만 집중해온 때문이라 思料된다.

그러나 近者에 이르러 免疫系의 效果細胞가 癌細胞를 認識하는데 있어서의 癌細胞에 特徵적인 새로운 抗原외에도 正常細胞에서 發現되는 여러 移植 抗原이 관여함으로 알려졌다^{64,65)}. 이러한 BLG나 BRM은 여러가지 作用機轉으로 生體反應을 亢進시키는 것으로 알려져 있으며⁶⁶⁾, 새로운 BLG 혹은 BRM을 開發시키는 일이 各種 腫瘍 免疫에 있어서의 抗癌 또는 抗腫瘍 療法の 一環으로서 時急한 일이라 할 수 있다.

우리나라에서도 脊椎動物뿐 아니라 無脊椎動物 및 植物體內에서 BRM으로 利用될 수 있는 物質을 抽出하거나 生成하려는 試圖가 많이 이루어지고 있는 實情이며⁶⁷⁾, 本 研究 結果는 이러한 觀點에서 폭넓은 知見을 提供할 수 있으리라 思料된다.

또한 本 研究에서는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯이 마우스 體內 免疫反應에 미치는 影響을 檢討하였다. 이제까지 各種 生藥劑의 生體防禦 反應으로서의 免疫調節作用을 檢討한 結果는 많이 報告되어 있지만⁶⁸⁻⁷⁰⁾, 本 研究와 같이 抗癌劑의 抗癌성을 維持내지는 強化시키면서 細胞毒성과 같은 副作用을 減少시키는 외에 藥物 그 自體가 體內 免疫力를 增強시키는 作用을 研究 檢討한 結果는 아직 찾아 볼 수 없다.

本 研究의 免疫實驗에서는 T 淋巴球가 主導하는 細胞性 免疫反應 및 B 淋巴球가 生成하는 抗體生成 能力을 檢討하였는데, T 淋巴球의 幼弱化 反應에 미치는 效果에 있어서 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 MMC를 併用投與 하였을 때 MMC 單獨 投與群에 비하여 顯著한 免疫增強反應을 보임으로서 上記 藥物의 併用投與는 體內免疫反應을 上昇시키는

데 主要한 機能을 가진다고 思料되며, 또한 抗體生成細胞(PFC)에 미치는 影響은 특히 十全大補湯에서 가장 效果가 있었다. 그러나 이외에도 免疫反應 變調能을 보다 다각적으로 檢討하는 問題(NK cell activity, macrophage function 등)가 追後에 檢討할 必要가 있으리라 생각된다.

以上の 實驗結果 抗癌劑 MMC의 副作用들이 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯과 같은 補益劑가 併用投與됨으로서 減少될 수 있다는 事實은 注目할 만한 結果이다. 그러나 抗癌劑의 種類는 多樣하며 그 副作用 또한 多樣하기 때문에, 追後 폭 넓은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

本 研究는 補益劑(養心湯, 補中益氣湯, 四物湯, 八味地黃湯, 六味地黃湯, 四君子湯, 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯)와 抗癌劑로 使用되고 있는 Mitomycin C(MMC)를 併用投與함으로서 抗癌劑의 副作用을 輕減시킬 수 있는지의 與否를 確認하기 위하여, 白血球癌 細胞인 MOLT-4 및 사람 正常淋巴球에 대한 影響을 MTT法으로 檢索하였으며, 效果가 認定되는 3種의 處方(十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯)과 MMC를 實驗動物에 併用投與함으로서 MMC에 의하여 惹起되는 副作用에 대한 影響을 살펴 본 結果는 다음과 같다.

1. 補益劑와 MMC의 併用處理時 補益劑는 MMC의 細胞增殖 抑制作用을 沮害하지 않는 傾向이었으나, 補益劑만을 單獨處理 하였을 때는 細胞의 增殖을 全般的으로 增加시켰다.

2. 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯은 淋巴球를 活性化시키는 作用을 나타내었다.

3. 四君子湯은 癌細胞의 DNA合成能을 抑制하였다.

4. 마우스에 MMC를 單獨 投與하였을 때, 投與 1日 後 白血球數는 顯著히 減少하였고 7日 後에는 거의 正常으로 回復되었으나, MMC와 十全大補湯 및 歸脾湯을 併用投與하였을 때는 十全大補湯은 投與 1日 後 부터 歸脾湯은 投與 3日 後 부터 減少된 白血球數를 有意하게 增加시켰다.

5. 마우스에 MMC를 單獨 投與하였을 때 顯著的 體重減少가 있었으나, MMC와 十全大補湯 및 生脈散을 併用投與 하였을 때는 體重이 正常群과 비슷하게 維持되었다.

6. 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯 單獨投與 群들은 抗體生成細胞 數 및 T淋巴球 增殖能에 影響을 미치지 못했다.

7. 마우스에 MMC를 單獨 投與하였을 때 抗體生成細胞 數가 顯著하게 減少되었으나, MMC와 十全大補湯을 併用投與하였을 때는 MMC에 의해 減少된 抗體生成細胞 數가 有意하게 增加되었다.

8. 마우스에 MMC를 單獨 投與하였을 때 T淋巴球 增殖能이 顯著하게 低下되었으나, MMC와 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯을 併用投與하였을 때는 MMC에 의해 減少된 T淋巴球 增殖能이 有意하게 增加되었다.

以上과 같은 結果는 十全大補湯, 生脈散 및 歸脾湯 등이 癌細胞 增殖을 抑制하는 MMC의 作用을 阻害하지 않으면서, 生體投與時 MMC에 의해 惹起되는 體重減少, 白血球 數減少 및 免疫能 低下 등의 副作用을 效果의으로 回復시켜 주는 것을 示唆한다고 思料된다.

參考文獻

1. Hersh, E.M. and Ereish, E.J.: Host defence mechanisms and their modification by cancer chemotherapy, In methods in Cancer Research, New York Academic Press, p.335, 1986.
2. Madewell, B.R.: Tumor immunology and immunotherapy, Tumor Immunol, 69, p.213, 1982.
3. Ruddon, R.W.: Chemical carcinogenesis; In Principles of drug action- The basis of pharmacology(3rd ed.), Churchill Livingstone, pp.735-773, 1990.
4. Ito, N. and Shimura, K.: Studies on antitumor activity of traditional Chinese medicines, Japan J. Cancer Chemother. 12, p.2149, 1985.
5. Koriyama, K., Hirokawa, Y. and Yang, Z.B.: Potentiation of chemotherapeutic activity by a Chinese herb medicine Juzen-Tai-Ho-Toh, Japan J. Cancer Chemother. 15, p.1715, 1988.
6. Masaki Aburada: Protective effects of Juzen-Taiho-Toh against adverse reactions associated with mitomycin C. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.275, 1988.
7. Hitoshi Ito and Keishiro Shimura: Antitumor effects of Juzen-taiho-to and other Kampo Medicines, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.281, 1988.
8. Hideki K., Norito T., Hirofumi M., Yasuhiro K., Masaki A. and Eikichi H.: Effect of Juzen-taiho-to on immune responses in mice, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.291, 1988.
9. Hirofumi MM., Hideki K., Norito T., Yasuhiro K., Masaki A. and Eikichi H.:

- Effect of Juzen-taiho-to on phagocytes, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.297, 1988.
10. Ruriko H., Hideyuki O., Ritsuko H., Song Ja H., Ai Min L., Shigeki N., Nobuko S., Akiko S. and Katsuyuki H.: Antitumor activity of combination therapy with Kampo prescriptions and anticancer agents, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.304, 1988.
 11. Iwao U. and Kanki K.: Potentiation of the chemotherapeutic activity of antineoplastic agents by Juzen-taiho-to. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.320, 1988.
 12. Makoto H., Yumiko M., Shohei H., Shoji S. Yih-chi T. and Nobuo Y.: Effect of Juzen-taiho-to on various immune responses in tumor bearing mice, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.328, 1988.
 13. Haruki Y., Hiroaki K., Jong-chol C., Norito T., Yasuhiro K., Masaki A. and Eikichi H.: Fractionation and chemical characterization of the immunologically active substances in Juzen-taiho-to, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.336, 1988.
 14. Norito T., Hirofumi M., Hideki K., Yasuhiro K., Masaki A., Eikichi H., Haruki Y., Hiroaki K. and Jong-chol C.: The B cell-mitogenic activity of Juzen-taiho-to, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.345, 1988.
 15. Osamu T., Yuichi F., Masaki A. and Eikichi H.: Protective effects of Juzen-taiho-to against the adverse effects of some antitumor agents, Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine, p.353, 1988.
 16. Oldham, R.K.: Biological Response Modifiers, J. Natl. Cancer Inst. 70, p.789, 1983.
 17. 高士宗: 黃帝素問直解, 北京, 河南科學技術出版社, p.530, 1982.
 18. 馬元臺, 張隱庵: 黃帝內經(素問), 臺北, 臺聯國風出版社, p.241, 1977.
 19. 姜廷良外 7人: 六味地黃湯防治腫瘤的實驗研究, 北京, 中醫雜誌, p.471, 1983.
 20. 李中梓: 醫宗必讀, 臺南, 綜合出版社, pp.255-256, 1976.
 21. 程國彭: 醫學心悟, 香港, 友聯出版社, pp.28-29, 40-41, 1961.
 22. 王龍寶: 胃癌的辨證施治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 10:6, 1987.
 23. 程士德: 素問注釋匯粹(上), 北京, 人民衛生出版社, pp.196-198, 1982.
 24. 梁運通: 黃帝內經類析, 內蒙古, 人民出版社, p.40, 1986.
 25. 楊維傑: 黃帝內經 素問譯解, 臺北, 樂群出版事業有限公司, p.226, 1977.
 26. 錢伯文: 運用補益藥治療腫瘤的經驗, 上海, 上海中醫藥雜誌, 8:6, 1984.
 27. 李尙仁: 天真處方解說, 서울, 成輔社, pp.31-94, 1987.
 28. A. Goodman Gilman: The pharmacological basis of therapeutics, 8th, Pergamon Press, p.1247, 1991.
 29. 許浚: 東醫寶鑑(新增版), 서울, 南山堂, pp.90, 97, 98, 113, 147, 410, 434, 447, 1987.
 30. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular immunology, W.H. Freeman and Company, pp.186-208, 1979.
 31. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, J. Immunol. methods. 65, pp.55-63, 1983.
 32. Kotnik, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hemattopoietic growth factor activity, J. Immunol. Methods, 129, p.23, 1990.

33. Freshney, R.I.: Culture of animal cells: A manual of basic technique(2nd), Alan R. Liss Inc., pp.227-256, 1987.
34. Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells, *Immunology*, 14, p.599, 1968.
35. Gilbert, K. and Dresser, D.W.: In lymphocyte A practical approach, Klaus G.G. BIRL Press, p.109, 1987.
36. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line, P 388D1. *J. Immunol.* 120, p.1497, 1979.
37. Janossay, G., Greaves, M.F., Doenhoff, H.J. and Snajdr, J.: *Clin. Exp. Immunol.* 14, p.581, 1973.
38. 白洪龍: 辨症診治概要, 云南, 人民出版社, p.502, 1984.
39. 陳師文: 太平惠民和劑局方, 臺北, 旋風出版社, 5:9, 1975.
40. 劉完素: 劉河間36書, 서울, 成輔社, p.82, 1976.
41. 朱震亨著 方廣註: 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, p.683, 1982.
42. 李 梴: 醫學入門, 서울, 南山堂, VI:418, 1980.
43. 公靖賢: 增補萬病回春(上卷), 臺北, 大中國圖書公司, p.190, 1985.
44. 張介賓: 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, p.1125, 1983.
45. 黃度淵: 方藥合編, 서울, 南山堂, p.157, 1980.
46. Cook, J.A. and Mitchell, J.B.: Viability measurement in mammalian cell system. *Anal. Biochem.* 179, pp.1-7, 1989.
47. Coligan J.E. et al: Current protocols in immunology, Wiley Interscience, 3.12:1, 1991.
48. 黃忠淵: 十全大補湯加鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 1988.
49. 李東垣: 十種醫書, 서울, 大成文化社, pp.41, 90, 339, 1983.
50. 金世吉: 生脈散이 白鼠의 心血關係에 미치는 影響에 관한 研究, 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 1985.
51. 嚴用和: 嚴氏濟生方, 北京, 人民衛生出版社, p.117, 1980.
52. 危亦林: 世醫得效方(文淵閣本), 서울, 麗江出版社, 7:36, 1986.
53. 朴恩貞: 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 1989.
54. 洪元植: 精校黃帝內經 素問, 서울, 東洋醫學研究院出版部, pp.124, 285, 1985.
55. 張隱庵外: 黃帝內經, 臺北, 臺聯國風出版社, 素問 pp.4, 303, 靈樞 pp.295, 434, 439, 1977.
56. 戴新民: 中醫免疫學, 臺北, 啓業書局, pp.1-30, 1985.
57. 傅 芳: 中醫免疫思想及成就, 中醫雜誌, 11:55, 1984.
58. 劉正才 外: 中醫免疫, 四川省, 重慶出版社, pp.54, 62, 1983.
59. Oldham, R. K. and Smalley, R. V.: The rationale for design of a screening procedure for the assesment of biological response modifiers for cancer treatment, *J. Biol. Resp. Modif.* 1, p.15, 1982.
60. Cheever, M.A., Greenberg, P.D. and Fefer, A.: *J. Biol. Resp. Modif.* 3, p.113, 1984.
61. Goldstein, A.L. and Chirigos, M.A.: *Progr. Cancer Res. Ther.* 20, p.1, 1982.
62. Mitchell, M. and Oetgen, H.F.: *Progr. Cancer Res. Ther.* 21, p.1, 1982.
63. Killion, J.J.: Immunotherapy with tumor cell population, *Cancer Immunol. Immunother.* 4, p.115, 1978.
64. Mazurek, N., Bashikin, P. and Pecht, I.: Restoration of calcium influx and degranulation capacity of variant RBL-2H3 cells upon implantation of isolated cromolyn

- binding protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, p.6014, 1983.
65. Whitney, R.B. and Sutherland, R.M.: Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes, Cell Immunol. 5, p.137, 1972.
 66. Goldin, A., Schepartz, S., Venditti, J. and Devita, V.: Histological development and current strategy of the NCI drug development program, Methods Cancer Research, 16, p.165, 1978.
 67. 조미경, 정규선, 박철휘, 이연태: 황금빨나팔 버섯이 암세포(S-180)증식에 미치는 영향, 大韓免疫學會紙, 13(2):215, 1991.
 68. Han, J.H., Oh, C.H. and Eun, J.S.: Effect of Glycyrrhizae Radix on the Immune Responses(I), Yakhak Hoeji, 35(3):154, 1991.
 69. Han, J.H., Oh, C.H. and Eun, J.S.: Effect of Glycyrrhizae Radix on the Immune Responses(II), Yakhak Hoeji, 35(3):174, 1991.
 70. Klein, T., Specter, S. Friedman, H. and Szentivanyi, A.: Biological response modifiers in human oncology and immunology, Adv. Exp. Med. Biol. 166, p.1, 1983.

ABSTRACT

A Study on the Combined Effects of Several Kinds of Tonifying Prescriptions and Mitomycin C

Mun-saeng Ahn, Byung-soon Moon, Seh-Gil Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental
Medicine, Wonkwang University Iri, Korea

The studies were conducted to investigate the combined effects of Tonics and Mitomycin C(MMC). The effects of Tonics and MMC on the proliferation of Molt-4 cells, human leukemic cell line, and activation of human lymphocytes were estimated by MTT colorimetric assays. Selected medicines among 9 kinds of Tonics by results of MTT assays were treated with MMC in mice.

The Tonics itself enhanced the proliferation of Molt-4, but the anti-proliferative effect of MMC was not intercalated by the combined treatment of Tonic and MMC. Inhibitory action of MMC was augmented by Sa Kun Ja Tang(SKT). This result was due to the inhibition of DNA synthesis. Among 9 kinds of Tonics, Sip Jeon Dae Bo Tang(SDT), Saeng Maek San(SMS) and Kwi Bi Tang(KBT) did not inhibit the action of MMC, but activated lymphocytes.

When the mice were treated by MMC, the number of leukocytes was decreased significantly at the 1st day, but recovered at the 7th day. In the groups of MMC treated with SDT or KBT, the number of leukocytes was increased significantly than the group of MMC treated only at the 3rd day.

Combined treatment of the Tonics(SDT, SMS) and MMC retained the body weight of mice at the level of normal mice.

SDT, SMS and KBT did not change the number of plaque forming cells(PFC), but MMC treated group decreased the number of PFC. The combined treatment of MMC and SDT increased the number of PFC significantly than the MMC treated group.

SDT, SMS and KBT did not influence the proliferation of T cells, but MMC treated group decreased the proliferation of T cells. The combined treatment of MMC and those tonics increased the T cell proliferation significantly than the MMC treated group.

In conclusion, the results presented in this paper suggest that SDT, SMS and KBT can recover the side effects of MMC, such as weight loss, leukopenia and immunosuppression, without any intercalating the anti-proliferative action of MMC in vivo.