Mouse 종양세포주 성장억제에 미치는 巴豆의 효과

李權益 · 徐榮培 · 成樂箕*

Ⅰ. 緖 論

東醫學的으로 癌은 體內에 發現되는 腫塊, 質의 堅硬, 岩石과 같은 腫氣 등을 指稱하는 것인데, 이는 주로 氣血의 阻滯·血瘀·痰凝에 의해 발생되기 때문에 氣無力하고, 全身倦怠感, 食慾不振, 消化不良, 惡心嘔吐, 心窩部飽滿感, 不眠, 脈無力細, 上腹部에 腫塊物의 觸知 등의 症狀을 보인다. 治療法으로는 補陽正氣하는 藥劑를 爲主로 破積·活血·解鬱·行氣·補血하는 藥劑를 兼하여 活用하고 있으나, 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등을 사용하여 왔다[1-4].

巴豆는 大戟科(벗들옷과)에 속한 식물의 성숙된 종자로서 主成分은 독성이 강한 단백으로 crotine, crotonglobulin, crotonalbumin 등을 함유하고 있으며[5], 辛熱有大毒하고 瀉下祛積 祛痰蝕瘡하는 작용이 있어 肺癰 등에 사용하는 藥物로 현대에는 抗病原生物作用과 抗腫瘤作用 등에 이용되고 있다.

近來에 正常細胞에 대한 毒作用이 적은 韓藥劑의 抗癌效果에 대한 硏究가 활발히 진행되고 있는데, 韓藥 單一藥物의 抗癌效果에 대한 實驗的 報告로 金[6] 등은 人蔘, 鹿茸이 抗體生産 抑制를 緩和시킨다고 하였으며, 任[7]은 魚腥草, 鹿血, 猪苓, 穿山甲 등이 강력한 抗癌效果 뿐만 아니라 正常 免疫細胞에 대해서는 毒作用을 거의 나타내지 않는다고 報告하였으며, 복합제제 약물의 연구로는 姜[8]은 息賁丸 및 肥氣丸으로, 韓[9]은 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫 患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果 등의 연구로 韓藥이 癌細胞에 미치는 영향을 관찰하였고, 金[10,11] 등은 伏梁丸과 肥氣丸 및 消積正元散으로 各種癌細胞株의 成長沮碍에 미치는 影響을 硏究하였다.

이에 著者는 抗癌效果가 있을 것으로 思料되는 巴豆의 抗癌效果를 일차적으로 규명하기 위하여 癌에 대한 細胞毒性 效果를 점검하고 抗癌療法시 藥物用量과 藥劑選定의 기초자료를 활용할 목적으로 실험동물인 마우스와 원숭이의 종양세포주를 이용하여 각각의 細胞株에 따른 成長沮碍에 미치는 抗癌效果를 시험관내에서 Colony形成抑制 實驗과 惡性腫瘍 細胞內의 代謝變化를 이용한 SRB assay 등의 large-scale screening을 통하여 관찰한 결과 몇가지 지견을 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 藥材 및 腫瘍細胞

1) 藥材

實驗에 使用한 藥材는 市中에서 購入하여 鑑定하고 膜心과 白膜을 제거하고 종이에 包하여 打壓한 다음 淨油를 버리고 巴豆霜으로 제조하여 使用하였다.

2) 腫瘍細胞

實驗에 使用한 腫瘍細胞株는 韓國細胞株銀行(Korea Cell Line Bank), 日本理硏細胞銀行(Riken Cell Bank) 및 국립보건원에서 분양된 세포를 계대하여 사용하였

* 大田大學校 韓醫科大學 本草學敎室

다. 본 실험에 사용된 세포주는 COS-1(kidney, SV40 transformed, frican green monkey, Cercopithecus aethiops), Sarcoma 180(Sarcoma, mouse), LL/2(Lewis lung carcinoma, mouse) 등이다.

Table 1. Cell Lines used in this Experiment

Name	Source	ATCC
COS-1	kidney, SV40 transformed African green monkey Cercopithecus aethiops	CRL 1650
Sarcoma 180	Sarcoma, mouse	CCL 8
LL/2	Lewis lung carcinoma, mouse	CRL 1642

3) 實驗動物

체중 20±2g의 ICR마우스를 사용하여 일반배합사료(삼양사료: 조단백질 22.1% 이상, 조지방 3.5%이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4이상)로 1주간 이상 사육한 후 실험실 환경에 적응시켜 실험에 이용하였다. 동물 사육실의 환경은 온도 22±1℃, 상대습도는 65±5%로 유지하였으며, 명암은 12시간(08:00-20:00) 간격으로 조절하였다. 실험기간 동안 물과 기본배합식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液調製

제조한 파두상 100g을 증류수 1000㎖와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 電熱器로 加熱하여 煎湯한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 上淸液을 取한 다음 濾過紙로 濾過한 濾液을 減壓回轉蒸發器를 이용하여 減壓濃縮한 감압건조기에서 완전히 증류하여 건조엑기스를 15.4g(수율 15.4%) 제조하였다. 이 건조엑기스를 증류수로 재조정하여 사용하였으며, 試料를 細胞에 접종하기 전에 0.2㎛ pore size의 micro filter (Milipore)를 이용하여 여과멸균하였다. 또한 파두를 40℃로 가열된 中湯에서 2시간 동안 침출하여 상기의 방법대로 추출하여 2가지의 검액을 제조하여 사용하였다.

2) 細胞培養 및 器具滅菌

實驗에 사용된 腫瘍細胞柱들은 Roswell Park Memorial Institude 1640(RPMI 1640)과 Dulbeco's modification of Eagles's medium (DMEM, USE) 등의 培養液으로 1주일에 1내지 2회씩 계대배양하면서 사용하였다. Medium은 5%의 heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)이나 10% 또는 20%의 FBS를 보충하여 사용하였으며, antibiotic-antimy -cotic(GIBCO)을 처리하였다. 2 내지 3일에 1회씩 배지를 교환하였으며 약 1週日에 1회씩 0.25% trypsin EDTA(GIBCO) 溶液으로 處理하여 細胞를 탈착시키고 계대배양하였다. 餘分의 細胞는 nitrogen tank에 凍結保存한 다음 필요에 따라 解凍하여 사용하였다.

本 實驗에 사용된 細胞培養液 및 試藥은 DDW(deionized distilled water)를 사용하여 製造하였으며 micro-filter(pore size 0.2㎛)를 이용하여 濾過滅菌하여 사용하였고, 器具는 121℃, 15psi 下에서 高壓濕熱滅菌하거나 160℃ dry oven에서 2時間以上 乾熱滅菌하여 사용하였다.

3) 腫瘍細胞의 Colony形成抑制實驗

검액이 Sarcoma180(Sarcoma, mouse), LL/2(Lewis lung carcinoma, mouse) 등의 종양세포에 미치는 cytotoxicity를 알아보기 위하여 Hamburger 등의 方法을 變形한 semisolid double layer agarose法을 이용하여 실시하였다. 즉 0.5% agarose, 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640 배지 1㎖씩을 35×10mm plastic petri dish에 분주하여 응고될 때까지 실온에 방치하여 기저아가층(basal soft agarose layer)을 준비하였다.

시험관내에서 계대배양시킨 腫瘍細胞를 5×10^5cells/ml로 조정한 시험관에 검액을 10mg/ml의 濃度로 증류수로 조정하여 10× 연속희석하여 37℃ 6% CO_2 培養器에 넣어 培養하였다. 培養 2時間 後 培養液을 遠心分離하여 上淸液을 버린후 pellet을 잘 분산시켜 0.3% agarose, 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640배지 1ml에 腫瘍細胞柱들을 1×10^5cells/ml로 조정하여 넣은 후 이미 응고된 0.5% basal soft agarose layer위에 중층한다. 그 후 37℃ 6% CO_2 培養器에 집락의 出現與否를 관찰하면서 약 10일간 배양하였다. 50개 이상의 腫瘍細胞가 모여있는 것을 細胞塊로 判定하여 colony數를 도립현미경 ×200배율하에서 계산하였다.

4) SRB(sulforhodamine B) assay

COS-1(kidney, SV40 transformed, African green monkey, Cercopithecus aethiops)cell line을 25cm 250ml culture flask(Nunclon)를 이용하여 37℃ 5% CO_2 배양기에서 subconfluent monolayers로 유지하면서 RPMI 1640과 Dulbeco's modification of Eagles's medium(GIBCO) 등의 배양액으로 1주일에 1 내지 2회씩 계대배양하면서 사용하였다. medium은 5%의 heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)이나 10% 또는 20%의 FBS를 보충하여 사용하였다. contamination을 방지하기 위하여 antibiotic -antimycotic(GIBCO)을 처리하였다. 계대수는 분양받은 후 5 내지 20차례의 범위에서 제한하여 細胞를 사용하였다.

배양한 細胞는 지수함수 배양기에 0.25% trypsin EDTA(GIBCO) 溶液으로 trypsinization하여 細胞를 탈착시키고, trypan blue를 이용하여 hemocytometer chamber로 細胞數를 계산하고 medium에 잘 분산하여 5×10^5cells/ml로 조정하고 96-well flat-bottomed microtitre plate (Nunclon)에 well당 200μl씩 세포현탁액을 분주하고 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양한다. 24시간 경과후 각 well의 medium을 제거하고 검액을 medium에 10mg/ml의 濃度로 조정한 stock solution을 10× 연속희석하여 각 well에 200μl씩 분주하여 다시 37℃ 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양한다. 배양후 cold trichloroacetic acid(TCA)를 最終濃度 10%가 되도록 50% TCA를 50μl씩 각 well에 분주하여 단백질을 침전시켜 細胞를 고정한 후 4℃에서 1시간동안 방치한다. 常水로 5回 세척한 후 건조시킨다. 건조된 각 well에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB용액을 50μl씩 가하여 常溫에서 20분 동안 염색을 한 후 1% acetic acid로 4회 세척하여 細胞에 부착하지 않은 SRB를 제거한다. plate를 잘 건조하여 150μl의 10mmol/l의 unbuffered Tris base [tris (hydroxymethyl) amino methane]를 加하여 bound protein stain을 녹여낸다. 각 well의 OD는 510nm의 wave length에서 測定한다. 대조군은 calcium과 magnesium이 없는 DPBS로 처리하였다. 모든 실험은 6개의 ell을 사용하여 평균치를 구하였고, 동시에 동일실험을 3차례 실시하여 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 %생존율을 아래의 동식에 의하여 구하였다.

%생존율 = (실험군의 평균OP-기준OP)×100/(대조군의 평균OP-기준OP)

p: optical density

5) Sarcoma180의 고형암세포 성장에 미치는 영향

실험동물은 20g 내외의 雄性 ICR mouse를 사용하였으며, 마우스의 피하에 이식한 Sarcoma180 고형암에 대한 종양억제효과를 실험하였다. 실험에 사용한 암

세포는 Sarcoma180세포를 매주 mouse에 계대배양한 것을 이용하였다. 실험 개시 1주일 전에 암세포가 이식된 mouse를 경추탈구법으로 처치하여 복부를 절개한 후 복강에서 암세포를 채취한 다음 적혈구 등을 제거하고 hemocyto-meter로 Sarcoma 180 세포를 1.0×10^6/0.1ml로 조정하여 실험동물의 왼쪽 서혜부 피하에 이식하고 검액을 0.1ml씩 매일1회로 총 12회 복강내에 투여하였다. 투여농도는 100, 50, 10mg/ml 로 조정하였으며, 암세포 이식 20일 만에 실험동물을 희생하여 그로 부터 고형암을 적출하고 종양저지율을 산출하였다.

% 종양저지율 = (Tc - Tt/Tc)× 100%

Tc: 생리식염수투여대조군의 평균종양중량

Tt: 검액투여군의 평균종양중량

6) 統計處理

實驗結果의 統計處理는 Mac Stat View TM+512를 이용하여 unpaired t-test에 準하였고, 實驗値의 表現은 Mean±SE으로 하였다.

Ⅲ. 實 驗 成 績

1. 종양세포의 colony형성억제실험

파두의 물추출엑기스가 in vitro상에서 성장하는 종양세포의 survival rate에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Sarcoma 180세포와 LL/2(Lewis lung carcinoma) 세포를 이용하여 배지에서의 colony형성억제정도를 관찰하였다. Sarcoma180세포를 이용한 colony형성억제실험은 STE 100실험군에서는 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0㎍/ml 의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 62.8±4.2, 87.6±5.2, 92.7±4.8, 95.3±3.2%의 colony형성억제효과를 나타내었다. STE40 실험군에서는 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0 ㎍/㎖ 의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 52.3±3.7, 84.6±4.7, 92.5±5.1, 94.9±4.2%의 colony형성억제효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. The effect of the aqueous extract of Semen tiglii on the growth inhibition of mouse tumor cell line, Sarcoma 180, measured by colony forming efficiency

Experimental Group	Dose Concentration (㎍/㎖)	% of control (colony forming efficiency)
STE 100	$1x10^3$	62.8 ± 4.2
	$1x10^2$	87.6 ± 5.2
	$1x10^1$	92.7 ± 4.8
	$1x10^0$	95.3 ± 3.2
STE 40	$1x10^3$	52.3 ± 3.7
	$1x10^2$	84.6 ± 4.7
	$1x10^1$	92.5 ± 5.1
	$1x10^0$	94.9 ± 4.2

Colony forming efficiency was measured in the cultured Sarcoma180 cells was measured for the cytotoxic and antitumor effect of semen tiglii extract.

STE100 was extracted at the water of 100℃, and STE40 extacted at the water of 40℃. The data are represented as the mean±SEM of 6 samples.

LL/2(Lewis lung carcinoma)세포를 이용한 colony형성억제실험은 STE100 실험군에서는 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0㎍/㎖ 의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 59.7±6.2, 85.6±5.4, 90.2±4.7, 96.5±2.3%의 colony형성억제효과를 나타내었다. STE40실험군에서는 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0 ㎍/㎖ 의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 54.7±5.2, 81.4±4.6, 91.2±5.2, 95.4±3.7%의 colony형성억제효과를 나타내어 Sarcoma180세포에 대한 colony형성억제효과가 비슷한 양상을 보였다(Table 3).

Table 3. The effect of the aqueous extract of Semen tiglii on the growth inhibition of mouse tumor cell line, LL/2(Lewis Lung carcinoma), measured by colony forming efficiency

Experimental Group	Dose Concentration ($\mu g/m\ell$)	% of control (colony forming efficiency)
STE 100	$1x10^3$	59.7 ± 6.2
	$1x10^2$	85.6 ± 5.4
	$1x10^1$	90.2 ± 4.7
	$1x10^0$	96.5 ± 2.3
STE 40	$1x10^3$	54.7 ± 5.2
	$1x10^2$	81.4 ± 4.6
	$1x10^1$	91.2 ± 5.2
	$1x10^0$	95.4 ± 3.7

Colony forming efficiency was measured in the cultured Sarcoma180 cells was measured for the cytotoxic and antitumor effect of semen tiglii extract.

STE100 was extracted at the water of 100℃, and STE40 extacted at the water of 40℃. The data are represented as the mean±SEM of 6 samples.

2. SRB assay에 의한 종양세포 성장억제효과 측정

COS-1세포에 대한 성장억제효과는 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, $1\times10^0\mu g/m\ell$의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 42.6±5.2, 77.6±6.3, 94.8±5.2, 97.6±2.1%의 흡광도 감소가 관찰되었다(Table 4).

Table 4. The survival rate of COS-1 mouse tumor cell lines following continous exposure to the aqueous extract of Semen tiglii (STE 100) measured by SRB assay

Mouse Tumor Cell Lines	Dose Concentration ($\mu g/m\ell$)	% of control (SRB assay)
COS-1	$1x10^3$	42.6 ± 5.2
	$1x10^2$	77.6 ± 6.3
	$1x10^1$	94.8 ± 5.2
	$1x10^0$	97.6 ± 2.1

STE100 was extracted at the water of 100℃, and STE40 extacted at the water of 40℃. The data are represented as the mean±SEM of 6 samples.

STE40의 SRB assay결과는 COS-1세포에 대해서 sms 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, $1\times10^0\mu g/m\ell$의 각 농도에서 각각 대조군에 비하여 38.7±2.4, 72.8±5.2, 84.7±3.7, 93.2±2.3%의 흡광도 감소가 관찰되었다(Table 5).

Table 5. The survival rate of COS-1 mouse tumor cell lines following continous exposure to the aqueous extract of Semen tiglii (STE 40) measured by SRB assay

Mouse Tumor Cell Lines	Dose Concentration ($\mu g/m\ell$)	% of control (SRB assay)
COS-1	$1x10^3$	38.7 ± 2.4
	$1x10^2$	72.8 ± 5.2
	$1x10^1$	84.2 ± 3.7
	$1x10^0$	93.2 ± 2.3

STE100 was extracted at the water of 100℃, and STE40 extacted at the water of 40℃. The data are represented as the mean±SEM of 6 samples.

3. Sarcoma180의 고형세포종양의 성장에 미치는 영향

Sarcoma180세포를 ICR마우스의 left groin에 피하주사하여 고형암을 유발한 후 매일 1회씩 12회에 걸쳐 검액을 투여한 후 종양세포의 피하이식 후 20일 만에 종양을 적출하여 중량을 측정하였다. STE 100검액을 100, 50, 10mg/kg 투여한 마우스의 종양의 중량은 1.57±0.31, 1.74±0.41, 1.92±0.38로 나타나 정상 생리식염수를 투여한 마우스의 종양중량인 2.14±0.37에 비하여 각각 26.6, 18.7, 10.3%의 종양성장억제효과를 보였다. 또한 STE40검액을 100, 50, 10 mg/kg 투여한 마우스의 종양의 중량은

1.51±0.40, 1.72±0.31, 1.84±0.39로 나타나 정상생리식염수를 투여한 마우스의 종양중량인 2.14±0.37에 비하여 각각 29.4, 19.6, 14.0%의 종양성장억제효과를 보였다(Table 6).

Colony forming efficiency was measured in the cultured Sarcoma180 cells was measured for the cytotoxic and antitumor effect of semen tiglii extract.

STE100 was extracted at the water of 100℃, and STE40 extacted at the water of 40℃.

Table 6. The in vivo antitumor effect of the aqueous Semen tiglii (STE 100, STE 40) measured by the growth inhibition of subcutaneously implanted sarcoma 180 in ICR mice

Experimental Group	Dose Concentration(㎎/㎏)	Tumor Weight(g)	% Inhibition of tumor growth
CONT	saline	2.14 ± 0.37	-
STE 100	100	1.57 ± 0.31*	26.6
	50	1.74 ± 0.41	18.7
	10	1.92 ± 0.38	10.3
STE 40	100	1.51 ± 0.40*	29.4
	50	1.72 ± 0.31	19.6
	10	1.84 ± 0.39	14.0

The data are represented as the mean±SEM of 6 samples. The control group was treated with normal saline as a vehicle. The statiatic analysis between vehicle control group and experimental group was perfromed by student's t-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and experimental groups.

* P<0.05 **P<0.01

Ⅳ. 考 察

癌은 今世紀 중반부터 死因의 上位를 차지해 오고 있으며 診斷 및 治療方法의 向上으로 生存率 延長에는 다소 도움이 되었지만 아직 根本的인 解決策은 마련되지 못했다. 그 가장 큰 이유는 1차 豫防을 가능하게 해주는 癌의 原因이 밝혀지지 않았기 때문이며, 다른 疾患과는 달리 일반적으로 發病初期에 自覺症狀이 거의 없기 때문에 오랜 시일이 經過된 후에 症狀이 나타나므로 早期診斷이 어렵기 때문이다.

최근 癌을 治療하기 위하여 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등이 사용되고 있으나 手術療法 및 放射線療法과 같은 局所療法은 분명한 한계점이 있으며, 全身療法인 免疫療法도 현재로는 治療方法이 定立되어 있지 않는 상태이다. 따라서 앞으로의 癌治療率의 向上은 抗癌療法의 向上에 달려있다 해도 過言이 아니다[12-16].

癌이란 惡性新生物(malignant neoplasia)을 의미하며 自律性을 가진 組織이 過剩發育된 現象으로 간단히 정의할 수 있다. 細胞分裂을 지배하는 조절기능의 결함이나 惡性腫瘍遺傳子를 억제하는 능력의 상실 등으로부터 발생하는 비정상적 세포의 增殖을 良性과 惡性으로 분류하여 惡性新生物을 癌이라 한 것이다[17,18].

東醫學에서 癌의 範疇에 속하는 것은 積聚·癥瘕·反胃·癭瘤·石疽·石癰 등으로[1,19,20], 原因은 瘀血, 憂思忿怒의 情緖로 因한 氣鬱血瘀, 飮食不節로 因한 宿滯食積, 酒色亂用으로 因한 陰不足 陽有餘 등에 의하여 氣血이 不循됨으로써 經絡과 血脈이 阻滯되어 氣聚血凝으로 腫塊가 형

성된다고 하였으며, 또한 腫塊는 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나누어지는데 癌은 惡性腫瘍의 一種으로 人體의 健康에 影響을 미쳐 생명을 危急하게 하는 것이다.

癌의 治療에 있어서 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등을 使用하나 手術療法과 放射線療法은 局所的인 治療法이기때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 현재로는 治療方法이 定立되어 있지 않은 상태이다. 그렇기 때문에 化學療法의 發展만이 癌治療率을 向上 시킬수 있는 것이나 化學藥材의 毒性問題를 해결하지 못하고 있다[22-31].

抗癌劑의 抗癌效果 程度를 檢査하는 方法은 크게 5가지로 分類되는데, 하나는 細胞를 藥劑에 노출시킨 후 현미경을 통하여 나타난 形態學的 變化[32]를 가지고 藥劑의 效果程度를 決定하는 方法이고, 둘째는 Dye exclusion assay[33] 方法과 Crrelease assay[34]가 있으나 세 가지 方法 모두 현재 사용되고 있지는 않다. 셋째로는 細胞 代謝의 妨害程度[35]를 測定하거나 細胞內 放射性 同位元素의 流入妨害 程度[36]를 測定하는 方法이 있고, 넷째로는 本實驗에서 사용한 方法으로 stem cell assay라고도 하는 clonogenetic assay가 있는데, 이는 細胞를 藥劑에 노출시킨 후 soft agar에 single cell suspension으로 培養하여 그 細胞의 分裂 增殖 能力을 測定하는 方法이다. 이 方法은 특히 成長 特性이 다른 腫瘍細胞의 경우 個個 細胞에 대한 藥劑效果를 反映할 수 있어서 腫瘍細胞의 異質性에 따른 差異點을 補整할 수 있는 方法이며, 1971年 Park[37] 등이 마우스 骨髓腫 細胞에 대한 stem cell assay를 施行해 본 結果 in vivo에서의 結果와 잘 一致하여 그 이후로는 腫瘍細胞에 대한 抗癌劑의 藥劑 感受性檢査에 많이 사용되고 있다.

巴豆는 大戟科에 속한 식물의 열매로 辛熱大毒하고 瀉下祛積·逐水退腫·祛痰蝕瘡하여 肺癰·咳嗽·胸痛과 瘡瘍 등에 利用되고, 現代的으로는 抗病原生物作用과 抗腫瘤作用 그리고 鎭痛作用이 있어 腸閉塞·膽道蛔蟲症·蘭尾炎 등에 使用한다[37]. 즉 巴豆는 여러가지 成分으로 형성되어 그 중에서도 phorbol은 發癌物質로서 작용한다는 說과 免疫性을 低下시키고 細胞의 物質代謝를 妨害하기 때문에 癌細胞의 發生을 抑制한다는 說이 있다[38,39,40].

現在 積聚에 대한 硏究와 癌의 治療法, 그리고 積聚와 癌에 關한 硏究가 活潑히 이루어지고 있는데, 金[6] 등은 人蔘과 鹿茸 그리고 白朮·甘草 등 韓藥의 單一藥物을 사용하여 抗癌效果 뿐만아니라 正常免疫細胞에 대해서도 毒作用을 나타내지 않는다고 보고하였고, 또한 複合製劑로 金[10,11] 등은 伏梁丸과 肥氣丸 및 消積正元散과 痞氣丸·息賁丸 등을 이용하여 各種 癌細胞株의 成長沮碍에 미치는 影響과 白血病 및 淋巴腫의 癌細胞에 대한 影響 등을 硏究하였고, 趙[41]는 腫瘍에 대한 文獻的 考察을 통하여 眞性腫瘍들의 病因을 三因說에 準하여 分類한 것이 現代病理學的 分類法과 類似하다 하였으며, 또한 金[42] 등은 積聚의 病因을 飮食內傷·寒濕凝聚·氣滯血瘀라 하면서 症狀과 治療法을 提示하였고, 裵[43]는 癌의 韓洋方併用治療에 대한 報告에서 癌類가 갑자기 發生한 것이 아니고 처음에는 感氣에서부터 炎症으로, 그리고 慢性的(潰瘍, 痛症, 肥大, 浸潤, 腫瘤, 癌의 順)으로 發生되는 것으로 思料되기 때문에 一般人의 方劑에 抗癌·抗腫瘤藥을 虛實과 體質에 따라 二~三藥을 加하면 本來의 疾病이 治癒됨은 물론 癌의 豫防도 可能하다고 하였다. 또한 厲[44]는 癌의 中醫治療에 대한 報告에서 扶正이 主이고, 祛邪는 補助的인 治療法이라고 하였다.

한편, 本 實驗 方法으로 使用된 SRB (sulforhodamine B) assay는 最近 旣存의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetazolium bromide) assay가 細胞의 濃度가 높을 때는 細胞의 數와 一致하지 않는 結果를 보이며, 細胞柱마다 tetrazolium을 foramazan으로 환원시키는 能力이 다르게 나타나고, 또한 MTT assay와 SRB assay의 比較實驗에서 結果가 같게 나타나기 때문에 protein-binding dye인 SRB의 사용에 근거한 대체 assay가 수행되었던 것이다. Tetrazolium assay의 경우 foramazan형성의 수준을 잘못 제시할 실험시약에 의한 tetrazolium의 화학적 환원과 tetrazolium의 세포환원에 대한 화학적 장애, 그리고 tetrazolium을 foramazan으로 환원시키는데 영향을 끼치는 다양한 대사환경 등의 문제점들을 않고 있으며, MTT assay의 경우는 세포의 농도가 높을 때는 세포수와 일치하지 않는 결과를 보이고 세포주마다 tetrazolium을 foramazan으로 환원시키는 능력이 다르기 때문에 Protein assay法인 SRB assay는 MTT assay와 tetrazolium assay보다 실질적으로 實驗段階에서의 잇점과 生物學的인 長點을 具備하고 있고, 또한 culture well에 있는 細胞는 檢査의 마지막 時點에 화학적으로 固定되며, 동시에 染色과 時間의 경과에 따라 변화없는 많은 量의 plate를 處理할 수 있는 것이어서 large scale in vitro drug-screening를 遂行하는데는 SRB assay를 勸奬한다[45-47].

종양세포의 colony형성억제 효과를 살펴보기 위하여, Sarcoma180과 LL/2세포를 이용하여, STE100과 STE40의 검액을 각기 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0 μg/ml농도로 투여한 결과 다음과 같은 효과를 나타내었다.

STE100 실험군은 Sarcoma180에서 대조군의 95.3±3.2에 비하여 62.8±4.2, 87.6±5.2, 92.7±4.8, 95.3±3.2%의 colony형성을 억제하는 결과를 나타내었고(Table 2), LL/2에서 대조군의 96.5±2.3에 비하여 59.7±6.2, 85.6±5.4, 90.2±4.7, 96.5±2.3%의 colony형성억제 효과를 나타내었다(Table 3).

STE40 실험군은 Sarcoma180에서 대조군의 94.9±4.27에 비하여 52.3±3.7, 84.6±4.7, 92.5±5.1, 94.9±4.2%의 colony형성억제효과를 나타내었고(Table 2), LL/2에서 대조군의 95.4±3.7에 비하여 54.7±5.2, 81.4±4.6, 91.2±5.2, 95.4±3.7%의 colony형성억제효과를 나타내었다(Table 3).

이상의 결과로 볼때 Sarcoma180과 LL/2에 대한 colony형성억제효과는 STE100에서 보다, STE40에서의 효과가 좋은 것으로 나타났지만, 어느 것이나 10^3μg/mℓ에서의 억제효과가 50%를 초과하기 때문에 생약의 항암효과로서는 유의성이 없는 것으로 사려되었다.

SRB assay에 의한 COS-1세포의 성장억제효과는, 검액을 각기 1×10^3, 1×10^2, 1×10^1, 1×10^0μg/mℓ 의 농도로 투여한 결과, STE100 실험군은 대조군의 97.6±2.1에 비하여 42.6±5.2, 77.6±6.3, 94.8±5.2, 97.6±2.1%의 흡광도 감소가 관찰되었으며(Table 4), STE40 실험군은 대조군의 93.2±2.3에 비하여 38.7±2.4, 72.8±5.2, 84.7±3.7, 93.2±2.3%의 흡광도 감소가 관찰되어(Table 5), 모두 대조군에 비하여 성장억제효과를 나타내었으나, 10^3μg/mℓ의 농도에서 STE100 의 42.6±5.2% 억제효과와 STE40의 38.7±2.4% 억제효과로는 항암제로서의 유의성은 없다고 볼 수 있다.

動物實驗은 ICR마우스의 left groin에 Sarcoma180세포를 피하주사하여 유발된 고형암의 중량을 측정 함으로써 함암성을

살펴보았는데, STE100 검액을 100, 50, 10mg/kg 투여한 마우스의 종양의 중량은 1.57±0.31, 1.74±0.41, 1.92±0.38 gdm로 나타나 대조군의 2.14±0.37g에 비하여 각각 26.6, 18.7, 10.3%의 종양 성장억제효과를 보였다. 또한 STE40 검액을 100, 50, 10mg/kg 투여한 마우스의 종양의 중량은 1.51±0.40, 1.72±0.31, 1.84±0.39g으로 나타나 대조군의 2.14±0.37g에 비하여 각각 29.4, 19.6, 14.0%의 종양성장억제효과를 보임으로서 (Table 6), 10mg/kg의 농도에서 STE100과 STE40에서 모두 유의한 결과를 보였다.

이상과 같이 Sarcoma180, LL/2, COS-1 등을 이용한 巴豆의 종양억제효과를 살펴본 결과, 시험관내 실험 보다 동물실험에서의 항암효과가 좋을 것으로 사려되며, 앞으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 結 論

1. Sarcoma180 세포와 LL/2 세포의 colony형성을 억제효과는 40℃의 물에서 추출한 검액은 100℃ 물에서 추출한 검액보다 약간 높은 colony형성억제율을 보였으나, 40℃ 추출액도 10^3μg/mℓ농도에서 각기 52.3±3.7, 54.7±5.2%의 colony 형성을 억제하는 결과를 나타내어 생약의 항암효과는 없는 것으로 사려되었다.

2. SRB assay에의한 COS-1세포의 성장억제효과에서, 40℃의 물에서 추출한 검액이 100℃에서 추출한 검액보다 종양세포의 성장억제효과가 높게 나타났으나, 40℃에서 추출한 검액은 103μg/mℓ의 농도에서 38.7±2.4%의 성장억제효과를 나타냈어 항암효과는 없는 것으로 사려되었다.

3. Sarcoma180 세포에 의한 고형암의 형성은 100℃와 40℃에 추출한 검액에 의하여 100mg/kg를 12회 투여하였을 때 각각 26.6%와 29.4%의 성상억제효과를 보여 유의성있는 결과를 보였다.

이상과 같이 Sarcoma180, LL/2, COS-1 등을 이용한 巴豆의 종양억제효과를 살펴본 결과, 시험관 내 실험보다 동물실험에서의 항암효과가 좋을 것으로 사료되며, 앞으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

參 考 文 獻

1. 錢伯文: 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-10, 1980.

2. 李岩編: 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp.11-26, 1983.

3. 劉正村尤煥文: 中醫免疫, 四川省, 重慶出版社, p.57, 1983.

4. 張代釗: 中西醫結合治療癌證, 山西, 山西人民出版社, pp.11-19, 1984.

5. 赤松金芳: 和漢藥, 義齒藥出版, 東京第一版, 昭和 45年, p.275.

6. 金光湖外: 數種 漢藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲紀念論文集, pp.1041-1050, 1981.

7. 任宰訓: 數種의 漢藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙韓醫大 論文集, Vol.9, pp.242-266, 1986.

8. 姜大根: 息賁丸 및 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 이리, 원광대학교 대학원, 1991.

9. 韓相日: 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1991.

10. 金剛山: 伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效

果, 裡里, 圓光大學校, 大學院, 1989.

11. 金剛山: 肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞株의 成長沮碍에 미치는 效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1992.

12. 陳師文: 太平惠民和劑局方, 上海校經山局成記發行, P.115, 1924.

13. 裴元植: 癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告, 大韓韓醫學會誌, 10, p.53, 1986.

14. 서울대학교 의과대학, 종양학, 서울대학교 출판부, p.1, 1985.

15. 洪思奭: 李宇柱의 藥理學講義, 벽일문화사, pp.602-629, 1987.

16. 유근영: 종양의 발생원인 및 위험요인, 서울대학교 의과대학편, 종양학, 서울대학교 출판부, pp.31-44, 1989.

17. 金承濟: 腫瘍學의 發展을 中心으로 한 個個腫瘍의 文獻的 考察, 現代醫學 別冊, 7(5), 1967.

18. 大韓病理學會編: 病理學, 서울, 高文社, p.225, 1990.

19. 郁仁存: 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學出版社, pp.1-11, 1983.

20. 賈堃: 癌瘤中醫防治研究, 陝西, 陝西科學技術出版社, pp.1-3, 1983.

21. Fish B: Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, Cancer, 54: 2609, 1984.

22. Kim, S. H: Clinical comparison with drug sensistivities by the human tumor clonogenic assay, J. Kor, Cancer Assoc, 21: 11, 1989.

23. Park c G, Lim D K, Kook Y H, Cha C R, and Paik C G: In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, J. Kor. Cancer Assoc, 22: 61, 1990.

24. Willson J K, V. Bittner G N, Oberley T D, Meisner L F, & Weese J, L: Cell culture human colon adenomas and carcinomas. Cancer Res, 47: 2704, 1987.

25. Teicher B A, Holden S A, Kelly M J, Shea T C, Cucchi C A, Rosowsky A, Henner W D, & Frei E: Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistent to cis diammine dichloroplatinum (II), Cancer Res, 46: 388, 1987.

26. Lee, N K: The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drug A comparison of coloney formation assay and isotope uptake assay, JKMA, 31: 435, 1988.

27. Hongo T, Fujii Y, & Igarashi Y: An In vitro chemosensitivity test for screening anticancer drug in childhood leukemia Cancer, 65: 1263, 1990.

28. 이창혜 · 이봉기 · 이원형 · 김주덕: 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성, 연세의대 논문집, 16: 180, 1983.

29. 공경덕 · 이상욱 · 한병훈 · 서승연 · 허만하 · 박병채: 진행성 위암에 대한 5-FU, Adria-mycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과, 대한암학회지, 22: 144, 1990.

30. Goodman G E, Yen Y P, Cox T C, & Crowlry J: Effect of verapamilon in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cell, Cancer Res, 47: 2295, 1987.

31. Wrigth J C, Plummer-Cobb J, Gumport S, Golomb F M, Sfadi D: Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to hemotherapeutic agents on hyman cancer. N Engl J Med 257: 1207, 1957.

32. Fass L, Fefer A: The application of an in vitro cytotoxicity test to studies the effects of drugs on the cellular immune response in mice: 1. Primary response. J Immunol 109: 749, 1972.

33. Brunner K T, Mauel J, Cerotorn J C, Chapuis B: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51Cr labeled allogenic target cells in vitro inhibition by isoantibody and by drugs. Immunol 14: 181, 1968.

34. Laszlo J, Stengle J, Wight K, Vurk D: Effects of chemotherapeutic agents on metabolism of hyman acute leukemia cells in vitro. Proc Soc Exp Biol Med 97: 127, 1958.

35. Bickis I J, Henderson M D, Quastel J H: Biochemical studies of hyman tumors: II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents. Cancer 19: 103, 1966.

36. Park C H, Bergasgel D E, McCulloch E A: Mouse myeloma tumor stem cells. A primary cell culture assay. J Natol Cancer Inst 28: 844, 1971.

37. 辛民敎: 原色 臨床本草學, 서울, 永林出版社, pp.489-490, 1991.

38. Duuren and A. Sivak: Tumor -promoting agents, from croton Tiglium L. and their mode of action. Cancer Res, 28: 2349-2356, Nov, 1968.

39. Joyce Liegel and Charles Heidelberger: The refractoriness of the skin of hairless mice to chemical carcinogenesis. Cancer Res, 30: 2590 -2595, Oct. 1970.

40. 佐藤一二: 脾臟外分泌, 京腑醫大, 13: 710, 1936.

41. 趙起東: 漢醫學에 있어서의 腫瘍의 病因說에 關한 硏究, 裡里, 圓光大學校 漢醫學科 學位論文集 第3輯, pp.1-33, 1983.

42. 金英鎭·金東圭: 積聚에 關한 文獻的 考察, 서울, 東西醫學, p.9, 3, pp. 51-63, 1984.

43. 裴元植: 癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告, 서울, 大韓韓醫學會誌 第7卷, 第2號, pp.53-57, 1986.

44. 厲暢: 癌의 中醫治療, 서울, 東洋醫學, 第18卷, 第1號, 通卷51號, pp. 56-63, 1992.

45. Rubinstein L V, Shoemaker R H, Paull K D, Simon R M, et al: Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetra zolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 82: 1113-1118, 1990.

46. Mosman T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth 65: 55-63, 1983.

47. Weislow O S, Kiser R, Fine D L, dt al: New soluble foramazan assay for HIV-1 cytophatic effects: Application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-anti-viral activity. J Natl Cancer Inst 81: 577-586, 1989.