

# 逍遙散加味方이 抗癌化學療法劑의 抗腫瘍效果 및 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes에 미치는 影響

曹賢珠·元秦喜·文九·文錫哉·田炳薰\*

## ABSTRACT

### Effects of Soyosangamibang on antitumor chemotherapy and lysosomal enzymes of tumor cel

Cho hyun-ju et al\*

\*College of Oriental Medicine, Workwang University, Iksan, Korea

In order to investigate the effects of Soyosangamibang Extract(逍遙散加味方抽出液) on antitumor effects after human cell lines(A549, hep3B, Caki-1, Ehrlich) transplantation into the peritoneal cavity or right groin in mice induced by RPMI1640 and GIBCO etc., the extracts of its herbal medicines were orally administered for 10 or 12 days.

Experimental studies were performed for measurance of antitumor effect of MMC(Mitomycin C) and lysosomal enzyme's activities using colony forming efficiency, SRB assay which were regarded as a valuable method for antitumor effects of unknown compound on tumor cell lines.

The results obtained in this studies were as follows :

1. The change of colony-forming efficiency and SRB assay of Caki-1 cells, hep3B and A549 cells after exposure to the extract of Soyosangamibang extract depressed the growth of tumor cells by concentration of Soyosangamibang.
2. Antitumor activity of the ethanol extract from Soyosangamibang extract and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice is a little improved. Especially mean survival times of the group of 200mg/kg and MMC 0.1mg/kg is improved over 50%.

\* 圓光大學校 韓醫科大學 病理學教室, 科學財團指定 醫藥資源研究센터  
※ 이 논문은 1997년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨

3. When Soyosangamibang extract and MMC are administrated together, the weight of tumor is more decreased than MMC alone.
4. The lysosomal enzyme's activities of the Soyosangamibang extract and MMC are more significantly improved than MMC alone.

According to the above results, it could be suggested that Soyosangamibang extract has indirect antitumor effect by strengthen the effect of MMC.

## I. 서론

오늘날 科學技術이 發展하고, 生活과 醫療水準의 向上에도 불구하고 環境汚染과 心理的 스트레스의 增加 등으로 인해 癌의 發生頻度는 높아지고 있는 實情이다<sup>1,2)</sup>.

韓醫學에서 癌은 積聚<sup>3~4,16,19,38,47)</sup>, 腫瘍<sup>3~4,38)</sup>, 腫瘤<sup>3~4,16,38,47)</sup>, 癥瘕<sup>3~4,16,19,38)</sup>, 疝瘕<sup>3~4,19,38)</sup>, 腸覃<sup>3~4,19,38)</sup>, 痞塊<sup>3~4,38)</sup>, 石瘕<sup>3~4,38)</sup>, 血蠱<sup>3~4,38)</sup>, 反胃<sup>3~4,12,38)</sup>, 石疽<sup>3~4,16,38)</sup>, 石癰<sup>3~4,38)</sup> 등과 關聯된 疾患으로 認識되고 있다. 原因은 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 火의 六淫之邪에 해당하는 外因과, 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 邪毒鬱熱, 臟腑失調, 氣血虧虛의 內因 및 七情不舒, 飲食不節, 過度한 疲勞 등의 不內外因으로 發生한다<sup>6)</sup>. 治療法으로는 辨證施治에 根據하여 初期의 積塊不大, 正氣未虛한 경우에는 行氣活血, 軟堅消積法을, 中期의 積塊漸大, 正氣漸傷하여 邪盛正虛한 경우에는 攻補兼施法을, 末期의 積塊堅硬, 正氣損傷이 甚한 경우에는 扶正培本法을 사용하고 있다<sup>7~8)</sup>.

西醫學에서는 癌이란 組織의 自律的인 過剩性 成長이며, 이것은 개체에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대하여 破壞的인 것이라고 定義하고 있으며, 그 發生原因과 機轉이 명백히 밝혀져 있지 않은 疾病이다<sup>1)</sup>. 治療方法으로 手術療法, 放射線療法, 化學療法과 免疫療法 등이 주로 活用되고 있고, 그중 化學療法의 活用度가 높으나 많은 副作用과 그 治療限界 때문에 抗癌效果를 높이는 治療方法 및 免疫療法과의 併合療法 등에 대한 研究가 절실하게 요구

되고 있다<sup>9~11)</sup>. 따라서, 이러한 抗癌治療의 副作用 때문에 最近에는 東西醫結合에 의한 治療方法으로 抗癌效果가 있는 韓藥材 및 複合處方을 利用한 實驗的 研究가 많이 행해지고 있으며<sup>49~56)</sup>, 그 결과 癌細胞의 動物移植에 대한 實驗, 化學的 發癌原에 의한 肉腫에 대한 效果, 培養한 腫瘍細胞 등에 대한 實驗에서의 東醫와 西醫의 併用治療가 단독치료시보다 더 좋은 抗癌效果가 있음이 報告되고 있다<sup>67~70)</sup>. 그러나, 正常細胞에는 損傷을 주지 않고 오직 癌細胞만을 殺傷하는 抗腫瘍性 藥物은 아직까지 開發되지 않은 現時點에서 抗腫瘍效果를 上昇的으로 增進시키고 副作用을 줄이는 抗腫瘍性 藥物의 開發이 切實하다고 思料된다.

이에, 著者は 우리나라의 癌의 發生原因 중 스트레스, 즉 憂思惱怒로 인한 七情不舒로 肝氣가 鬱結되어 發生하는 癌의 發生頻度가 높아지고 있으나<sup>12~15)</sup>, 그에 대한 治療處方의 實驗的 研究가 이루어지지 않은 것에 着眼하여, 本論文에서는 疏肝解鬱과 健脾養血하는 效能이 있는 逍遙散<sup>21~27,29~31,35,38)</sup> 中の 白朮, 白芍藥, 元柴胡, 當歸에 抗癌效果가 있는 瓜蒌仁, 威靈仙, 半夏(薑), 鬱金, 川練子, 山豆根, 半枝蓮<sup>33~34,36,37,39)</sup>을 加味한 逍遙散加味方을 利用하여 Colony 形成抑制實驗, SRB (sulforhodamine B) assay, Ehrlich carcinoma의 solid tumor와 ascites tumor에 대한 抗腫瘍效果 및 lysosomal enzymes의 活性에 대한 MMC (Mitomycin C), 및 MMC와의 병용투여시의 效果 등을 觀察하였는 바, 유의한 效果가 있어 이에 報告하는 바이다.

## II. 실험재료와 방법

### 1. 實驗材料

#### 1) 藥材

實驗에 사용한 藥材는 市中에서 購入하여 圓光大學校 全州韓方病院에서 嚴選하여 使用하였다. 逍遙散加味方의 處方內容은 常見腫瘤診治指南<sup>6)</sup>의 辨證處方을 基本으로하여 構成하였다. (Table 1)

Table 1. Prescription of Soyosangamibang

本草名	生藥名	重量(g)
白朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	5
白芍藥	Radix Paeoniae Lactiflorae	7.5
元柴胡	Radix Bupleuri	5
當歸	Radix Angelicae Gigantis	5
瓜蒌仁	Semen Trichosanthis	7.5
威靈仙	Radix Clematidis	7.5
半夏(薑)	Tuber Pinelliae	5
鬱金	Rhizoma Curcumae Aromaticae	5
川楝子	Fructus Meliae Toosendan	5
山豆根	Radix Sophorae Subprostratae	5
半枝蓮	Herba Scutellariae	15
Total amount		72.5

#### 2) 檢液調製

逍遙散加味方 5貼 分量을 증류수 2000ml와 함께 환저플라스크에 넣은 후 냉각기를 부착하여 2시간동안 電熱器로 煎湯하였다. 煎湯한 韓藥液을 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 上清液을 取한 다음, 濾過紙로 濾過한 濾液을 減壓回轉蒸發器를 利用하여 減壓濃縮하였다. 그 후 濃縮液

을 減壓乾燥器에서 완전히 증류하여 건조엑기스를 製造하였다. 이 건조엑기스를 증류수로 재조정하여 使用하였으며, 試料를 細胞에 接種하기 전에 1.2, 0.8, 0.45, 0.2 $\mu$ m pore size의 micro filter(Milipore)를 利用하여 여과멸균하였다.

#### 3) 腫瘍細胞

實驗에 使用한 腫瘍細胞柱는 韓國細胞柱銀行(Korea Cell Line Bank) 및 日本理研細胞銀行(Riken Cell Bank)에서 분양받아 使用하였다 (Table 2).

Table 2. Human tumor cell lines used in this experiment

Name	Source	Reference
A 549	Lung Carcinoma, human	OCL 185
Caki-1	Clear cell carcinoma, consistent with renal primary, metastasis to skin, human	HTB 46
hep3B	Hepatocellular carcinoma	TB 8064
Ehrlich	Carcinoma cell	

#### 4) 細胞培養 및 器具滅菌

實驗에 使用된 腫瘍細胞柱들은 Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI 1640)과 Dulbecco's modification of Eagles's medium (GIBCO) 등의 培養液으로 1주일에 1내지 2회씩 계대배양하면서 使用하였다.

Medium은 5%의 heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)이나 10% 또는 20%의 FBS를 보충하여 使用하였으며, antibiotic-antimycotic (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 必要에 따라 解凍하여 使用하

였다.

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  $0.2\mu\text{m}$ )를 利用하여 濾過滅菌하여 사용하였고, 器具는  $121^{\circ}\text{C}$ , 15psi 下에서 高壓濕熱滅菌하거나  $160^{\circ}\text{C}$  dry oven에서 2 時間 以上 乾熱滅菌하여 使用하였다.

### 5) 實驗動物

實驗動物은 18-20g의 ICR female mice를 사용하였으며, 腫瘍細胞는 Ehrlich carcinoma의 ascites tumor cells을 매 7일 간격으로 새로운 마우스의 腹腔에 定期的으로 移植하며 維持하였다.

## 2. 實驗方法

### 1) In vitro assay

#### ① 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗<sup>71)</sup>

逍遙散加味方 각각의 시료가 腫瘍細胞에 미치는 cytotoxic effect를 알아보기 위하여 Hamburger 등의 方法을 變形한 semisolid double layer agarose法을 利用하여 實施하였다. 즉 0.5% agarose, 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640 배지 1ml씩을  $35\times 10\text{mm}$  plastic petri dish에 분주하여 응고될 때까지 室溫에 방치하여 기저아가층(basal soft agarose layer)을 준비하였다. 시험관내에서 계대 배양시킨 腫瘍細胞를  $5\times 10^5$  cells/ml로 조정 한 시험관에 逍遙散加味方 건조엑기스를 Table 3과 같이  $640\mu\text{g/ml}$ ,  $320\mu\text{g/ml}$ ,  $160\mu\text{g/ml}$ ,  $80\mu\text{g/ml}$ ,  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ 의 濃度로 넣어  $37^{\circ}\text{C}$  6%  $\text{CO}_2$  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 버린 후 pellet을 잘 분산시켜 0.3% agarose, 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640배지 1ml에 腫瘍細胞柱들을  $1\times 10^5$  cells/ml로 조정하

여 넣은 후 이미 응고된 0.5% basal soft agarose layer위에 증층하였다. 그 후  $37^{\circ}\text{C}$  6%  $\text{CO}_2$  培養器에 집락의 出現與否를 관찰하면서 약 10일간 培養하였다. 50개 이상의 腫瘍細胞가 모여있는 것을 細胞塊로 判定하여 colony數를 도립현미경  $\times 200$ 倍率下에서 計算하였다.逍遙散加味方 抽出液 各 濃度에서의 結果의 判定은 무처리 對照群의 colony數를 100%로 하여 藥劑에 反應시킨 腫瘍細胞柱의 colony數를 算出하였다. 各 群의 colony數는 群當 4개의 petri dish의 colony數의 平均値를 利用하여 評價하였다.

#### ② SRB(sulforhodamine B) assay<sup>72-73)</sup>

Human epitheloid carcinoma(HeLa) cell line, Colon adeno -carcinoma(HCT-15) cell line, Hepatocellular carcinoma(Hep3B) cell line 등을 25cm 250ml culture flask (Nunclon)를 利用하여  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 subconfluent monolayers로 유지하면서 RPMI 1640과 Dulbecco's modification of Eagles's medium (GIBCO) 등의 培養液으로 1주일에 1 내지 2회씩 계대배양하면서 使用하였다. medium은 5%의 heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)이나 10% 또는 20%의 FBS를 보충하여 使用하였다. contamination을 방지하기 위하여 antibiotic -antimycotic (GIBCO) 을 처리하였다. 계대수는 분양받은 후 5 내지 20 차례의 범위에서 제한하여 細胞를 使用하였다.

배양한 細胞는 지수함수 배양기에 0.25% trypsin EDTA(GIBCO)溶液으로 trypsinization하여 細胞를 탈착시키고, trypan blue를 利用하여 hemocytometer chamber로 細胞數를 계산하고 medium에 잘 분산하여  $5\times 10^5$  cells/ml로 조정하고 96-well flat-bottomed microtitreplate(Nunclon)에 well당  $200\mu\text{l}$ 씩 細胞懸탁액을 분주하고  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 24시간 경과후 각 well의 medium을 제거하고 각각의 건조엑기스를 medium에 Table 4와 같이  $640\mu\text{g/ml}$ ,  $320\mu\text{g/ml}$ ,  $160\mu\text{g/ml}$ ,  $80\mu\text{g/ml}$ ,  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ 의 濃

도로 조정하여 각 well에 200 $\mu$ l씩 분주하여 다시 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양후 cold trichloroacetic acid(TCA)를 最終濃度 10%가 되도록 50% TCA를 50 $\mu$ l씩 각 well에 분주하여 단백질을 침전시켜 細胞를 고정한 후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치하였다. 常水로 5회 세척한 후 건조시켰다. 건조된 각 well에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB용액을 50 $\mu$ l씩 가하여 常溫에서 20분동안 염색을 한 후 1% acetic acid로 4회 세척하여 細胞에 부착하지 않은 SRB를 제거하였다. plate를 잘 건조하여 150 $\mu$ l의 10m mol/l의 unbuffered tris base [tris (hydroxymethyl) amino methane]를 가하여 bound protein stain을 녹여냈다. 각 well의 OD는 510 nm의 wave length에서 測定하였다.

## 2) In vivo assay

### ① 抗腫瘍實驗

逍遙散加味方 抽出液의 抗腫瘍實驗은 Ehrlich carcinoma의 solid tumor와 ascites tumor에 대하여 실시하였다. ascites형은 마우스에 5 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 세포를 복강내에 주사하였으며, 逍遙散加味方 抽出液은 腫瘍細胞移植後 2일째부터 10일동안 날마다 50, 100, 200 mg/kg씩을 경구투여하였다. 抗腫瘍效果는 생존율로 판정하였으며, 30일 동안의 평균생존기간으로 판정하였다.

survival rate =

$$\frac{\text{mean survival time of treated mice}}{\text{mean survival time of control}} \times 100$$

solid tumor의 경우에는 5 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 腫瘍세포를 마우스의 서혜부에 피하이식하였다. 逍遙散加味方 抽出液은 腫瘍세포이식후 2일째부터 12일동안 날마다 50, 100, 200 mg/kg씩을 경구투여하였다. 이식 후 16일 째에 마우스를 희생시키고 腫瘍성장억제효과는 대조군에 대한 실험군의 腫瘍의 증량으로 결정하였다. 항암화학요법제인

MMC는 腫瘍이식 후 2일부터 6일동안 격일로 복강내 투여하였다.

### ② 효소활성의 결정

5 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 腫瘍세포를 복강내에 이식하고 이식후 6일부터 10일동안 1일 1회씩 逍遙散加味方 抽出液을 50, 100, 200 mg/kg씩을 경구투여하였다. MMC는 이식후 6, 8, 10일에 1일 1회씩 복강내에 주사하였다. 이식 후 10일에 각 실험군의 ascites 腫瘍세포를 수집하여 腫瘍세포수가 1 $\times$ 10<sup>7</sup>개/ml가 되도록 조절한 후 균질화하였다. 세포액은 10분동안 600g에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이것을 40분동안 75,000g에서 원심분리하여 침전층과 불침전층을 분획하였다. 각각의 불침전층의 분획에서 acid deoxyribonuclease,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase 등의 효소활성을 0.2% Triton X-100을 처리한 효소용액에서 Shimanoto 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소활성은 107개의 세포당 값으로 표현하였다.

### ③ 세포배양

Ehrlich ascites 세포를 4 $\times$ 10<sup>5</sup>개/ml로 조절하여 EMEM에 부유시키고 37 $^{\circ}$ C에서 逍遙散加味方 抽出液을 첨가한 후에 30분 동안 MMC(0.05 $\mu$ g/ml)로 처리하였다. 처리한 세포는 Hank's solution으로 세척한 후 10%의 FCS를 포함한 EMEM에 부유시키고 35mm petri dish를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 배양 후 살아있는 세포는 0.2% trypan blue로 염색한다.

### ④ 통계처리

實驗結果의 統計處理는 Mac Stat View TM+512를 利用하여 unpaired t-test에 準하여 處理하였고, 實驗値의 表現은 Mean $\pm$ SE으로 하였으며, p-value가 最大値 0.05(p<0.05)以下인 境遇를 有意한 것으로 判定하였다.

### III. 실험성적

#### 1. In vitro 抗腫瘍效果

##### 1) 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗

逍遙散加味方 抽出液이 Caki-1 cell 및 hep3B cell과 A549 cell의 成長에 미치는 影響을 colony 形成實驗을 통하여 觀察한 結果, 증류수를 投與한 對照群에서는 정상에 比하여 colony 形成이 각각  $96.5 \pm 2.7\%$ ,  $97.1 \pm 3.2\%$ ,  $97.7 \pm 2.3\%$ 로 나타난 데 比하여, 逍遙散加味方 抽出液을 投與한 實驗群에서는 농도의 增加에 따른 腫瘍細胞의 콜로니 形成抑制 效果가 나타났다. 逍遙散加味方 抽出液 10에서  $20\mu\text{g/ml}$ 의 投與는 colony 形成抑制 效果를 뚜렷하게 나타내지는 못하였지만,  $160\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 각각  $69.8 \pm 3.2\%$ ,  $64.8 \pm 3.1\%$ ,  $66.3 \pm 3.1\%$ 의 colony 形成抑制 效果를 보였으며,  $640\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각  $54.4 \pm 3.3\%$ ,  $51.4 \pm 3.3\%$ ,  $53.2 \pm 2.7\%$ 의 colony 形成抑制를 나타내 농도증가에 따른 抗癌效果를 보인 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. The change of clone-forming efficiency of Caki-1 cells, hep3B and A549 cells after exposure to the extract of Soyosang-amibang(SYS)

Concentration of SYS extract( $\mu\text{g/ml}$ )	Colony-forming Efficiency(%)		
	Caki-1	hep3B	A549
DDW	$96.5 \pm 2.7$	$97.1 \pm 3.2$	$97.7 \pm 2.3$
SYS 10	$93.8 \pm 2.4$	$92.1 \pm 2.9$	$93.3 \pm 3.1$
SYS 20	$91.9 \pm 2.8$	$89.3 \pm 2.6$	$88.6 \pm 3.5$
SYS 40	$89.3 \pm 2.4$	$84.7 \pm 3.2$	$86.4 \pm 3.6$
SYS 80	$85.4 \pm 3.3$	$82.5 \pm 3.1$	$83.2 \pm 3.3$
SYS 160	$69.8 \pm 3.2$	$64.8 \pm 3.1$	$66.3 \pm 3.1$
SYS 320	$61.2 \pm 3.1$	$59.2 \pm 3.2$	$61.2 \pm 3.4$
SYS 640	$54.4 \pm 3.3$	$51.4 \pm 3.3$	$53.2 \pm 2.7$

Each value represents mean and standard error of 6 replicates

DDW : deionized distilled water

SYS : extract of the prescription of Soyosangamibang

##### 2) SRB assay에 의한 實驗

逍遙散加味方 抽出液이 Caki-1 cell, hep3B cell 및 A549 cell의 成長에 미치는 影響을 SRB assay 實驗을 통하여 觀察한 結果, 증류수를 投與한 對照群에서는 510nm에서 흡광도가 각각  $98.1 \pm 3.3\%$ ,  $96.7 \pm 3.2\%$ ,  $98.3 \pm 3.5\%$ 로 나타났으나, 逍遙散加味方 抽出液을 投與한 實驗群에서는 농도의 增加에 따른 腫瘍細胞의 成長抑制로 인하여 단백질 부착색소인 SRB 흡광도가 濃度依存的으로 減少하는 傾向을 뚜렷하게 나타났다. 逍遙散加味方 抽出液 10에서  $80\mu\text{g/ml}$ 까지의 投與에서는 흡광도의 減少率이 현저하지는 않지만 減少하는 傾向을 보였으며,  $160\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 각각  $78.2 \pm 3.5\%$ 이하,  $75.6 \pm 3.4\%$ 이하,  $77.1 \pm 3.5\%$ 이하의 흡광도를 보여 癌細胞成長을 抑制하는 效果를 농도증가에 따라 현저하게 나타냈으며,  $640\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각  $59.7 \pm 4.3\%$ ,  $56.6 \pm 3.3\%$ ,  $58.4 \pm 3.3\%$ 의 흡광도를 보여 抑制效果가 가장 뚜렷하게 나타나는 結果를 보였다 (Table 4).

Table 4. The Change of antitumoral cytotoxicity of Caki-1 cells, hep3B and A549 cells after Exposure to the extract of Soyosang-amibang(SYS) in SRB assay

Concentration of SYS extract( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage of Optical Density(510nm)		
	Caki-1	hep3B	A549
DDW	$98.1 \pm 3.3$	$96.7 \pm 3.2$	$98.3 \pm 3.5$
SYS 10	$95.3 \pm 3.5$	$94.2 \pm 3.4$	$94.5 \pm 3.4$
SYS 20	$91.3 \pm 3.4$	$89.8 \pm 3.4$	$91.2 \pm 3.6$
SYS 40	$89.2 \pm 3.6$	$86.7 \pm 3.1$	$88.4 \pm 3.3$

Concentration of SYS extract( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage of Optical Density(510nm)		
	Caki-1	hep3B	A549
SYS 80	84.5 $\pm$ 3.4	82.3 $\pm$ 3.3	83.4 $\pm$ 3.1
SYS 160	78.2 $\pm$ 3.5	75.6 $\pm$ 3.4	77.1 $\pm$ 3.5
SYS 320	68.8 $\pm$ 4.2	66.6 $\pm$ 3.5	68.2 $\pm$ 3.4
SYS 640	59.7 $\pm$ 4.3	56.6 $\pm$ 3.3	58.4 $\pm$ 3.3

Each value represents mean and standard error of 6 replicates

DDW : deionized distilled water

SYS : extract of the prescription of Soyosangamibang

## 2. In vivo 抗腫瘍效果

### 1) Ehrlich carcinoma의 ascites form에 대한 抗腫瘍效果

마우스에서 ascites form of Ehrlich carcinoma에 대한 逍遙散加味方 抽出液과 Mitomycin C(MMC)의 抗腫瘍效果에 대한 실험을 실시하였다. 腹水癌細胞腫瘍의 경우에 逍遙散加味方 抽出液만을 투여한 실험군에서는 약간의 평균수명의 연장효과를 나타냈으나 뚜렷한 抗腫瘍效果를 나타내지는 못하였다(Table 5). 화학항암요법제인 MMC 0.1mg/kg을 투여한 결과 마우스의 평균생존기간을 32% 연장하는 효과를 나타냈으며, 30일 이상 생존한 마우스는 2마리였다(Table 6).

Table 6. Antitumor activities of the ethanol extract of Soyosangamibang(SYS) on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

Dose (mg/kg)	Ad. Route	Mean survival days <sup>a</sup>	T/Cb	30 days survival/No.of tested mice
0	P.O.c	19.1 $\pm$ 1.0	100	0/12
50	P.O	20.3 $\pm$ 0.9	106	0/12
100	P.O	20.5 $\pm$ 0.7	107	0/12
200	P.O	20.8 $\pm$ 0.8	109	0/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells( $5 \times 10^6$ ). SYS was orally administered daily for 10 days from the second day after the tumor transplantation.

a Each value represents the mean $\pm$ SE of 12 mice

b Mean survival time of treated mice/mean survival time of control $\times$ 100

c Water was orally administered

Table 7. Antitumor activities of MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

Dose (mg/kg)	Ad. Route	Mean survival days <sup>a</sup>	T/Cb	30 days survival/No. of tested mice
0	I.P.c	18.7 $\pm$ 0.7	100	0/12
0.01	I.P.	19.1 $\pm$ 1.3	102	0/12
0.05	I.P.	21.1 $\pm$ 1.4	107	0/12
0.1	I.P.	24.7 $\pm$ 1.5	132	2/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells( $5 \times 10^6$ ). MMC was administered intraperitoneally on alternate days for 6days from the second day after the tumor transplantation.

a Each value represents the mean $\pm$ SE of 12 mice

b Mean survival time of treated mice/mean survival time of control  $\times$  100

c Saline was intraperitoneally administered

ascites form of Ehrlich carcinoma에 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병용투여한 후 30일 동안 관찰한 결과 逍遙散加味方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간 증가하는 경향을 보였으며, 30일 이상 생존하는 마우스도 늘어나는 결과를 나타냈다. 특히, 逍遙散加味方 抽出液 200mg/kg와 MMC 0.1mg/kg를 투여한 군에서는 마우스의 평균생존기간이 51% 증가하였으며, 30일 이상 생존한 마우스도 9/12로 증가하는 결과를 보였다.(Table 7, 8)

Table 8. Antitumor activities of the ethanol extract of Soyosangamibang(SYS) and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

SYS+MMC Dose(mg/kg)	Ad. Route	Mean survival daysa	T/Cb	30 days survival/No. of tested mice
0+0	P.O+I.P.c	19.1±0.9	100	0/12
0+0.05	P.O+I.P.	20.3±1.4	106	1/12
0+0.05	P.O+I.P.	21.6±1.3	113	3/12
100+0.05	P.O+I.P.	22.8±1.4	120	3/12
200+0.05	P.O+I.P.	23.6±1.5	124	4/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10<sup>6</sup>). SYS was orally administered daily for 10 days from the second day after the tumor transplantation. MMC was administered intraperitoneally on alternate days for 6days from the second day after the tumor transplantation.

- a Each value represents the mean±SE of 12 mice
- b Mean survival time of treated mice/mean survival time of control × 100
- c Water was orally and saline was intraperitoneally administered

Table 9. Antitumor activities of the ethanol extract of Soyosangamibang(SYS) and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

SYS+MMC Dose(mg/kg)	Ad. Route	Mean survival daysa	T/Cb	30 days survival/No. of tested mice
0+0	P.O+I.P.c	19.0±1.2	100	0/12
0+0.1	P.O+I.P.	21.4±1.1	113	3/12
50+0.1	P.O+I.P.	24.7±1.5	131	6/12
100+0.1	P.O+I.P.	26.6±1.4	139	7/12
200+0.1	P.O+I.P.	28.7±1.3	151	9/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10<sup>6</sup>). SYS was orally administered daily for 10 days from the second day after the tumor

transplantation. MMC was administered intraperitoneally on alternate days for 6days from the second day after the tumor transplantation.

- a Each value represents the mean±SE of 12 mice
- b Mean survival time of treated mice/mean survival time of control × 100
- c Water was orally and saline was intraperitoneally administered

2) Ehrlich carcinoma의 solid form에 대한 抗腫瘍效果

逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果를 마우스의 solid form of Ehrlich carcinoma에 실시한 결과, 腫瘍세포를 이식한 후 16일 후 腫瘍을 적출하여 腫瘍의 중량을 측정 한 결과 대조군에서는 2.65±0.23g이었다.

逍遙散加味方 抽出液의 투여량을 증가할수록 腫瘍의 크기가 감소하는 효과를 나타냈으며, 특히 200mg/kg의 逍遙散加味方 抽出液을 투여하였을 때 37%의 腫瘍크기 감소율을 나타내었다. MMC의 단독투여시에도 0.2mg/kg, 0.5mg/kg을 투여하였을 때 유의하게 腫瘍의 크기가 감소하는 결과를 보였다.(Table 9)

逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 병용투여시는 이들 각자를 단독투여하거나 특히 MMC를 단독으로 투여하였을 때보다도 抗腫瘍效果가 뚜렷하게 나타나 腫瘍의 크기를 현저하게 감소시키는 결과를 보였다.(Table 10)

Table 10. Antitumor activities of the ethanol extract of Soyosangamibang(SYS) and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Ad. Route	Average tumor weight(g)a
SYS	0	P.Ob	2.65±0.23
SYS	50	P.O	2.27±0.18*
SYS	100	P.O	1.98±0.14*



Treatment	Dose (mg/kg)	Ad. Route	Average tumor weight(g) <sup>a</sup>
SYS	200	P.O	1.72±0.22**
MMC	0	I.P.c	2.78±0.21
MMC	0.05	I.P	2.52±0.23
MMC	0.1	I.P	2.39±0.26
MMC	0.2	I.P	2.17±0.17*
MMC	0.5	I.P	1.71±0.22**

Tumor cells were inoculated subcutaneously into the right groin of mice. SYS was administered orally to the mice, daily for 12 days from the second day after the tumor inoculation. MMC was administered intraperitoneally on the alternate days for the 6 days from the second day after tumor transplantation.

a Each value represents the mean±SE of 10 mice

b Water was orally administered

c Saline was intraperitoneally administered

\*, \*\*: significant different from the control p<0.05, p<0.01

Table 12. Antitumor activities of the ethanol extract of Soyosangamibang(SYS) and/or MMC on solid form of Ehrlich carcinoma in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Ad. Route	Average tumor weight(g) <sup>a</sup>
SYS+MMC	0+0	P.Ob+I.P.c	2.79±0.23
SYS+MMC	0+0.1	P.O+I.P.	2.45±0.21
SYS+MMC	50+0.1	P.O+I.P.	2.04±0.19
SYS+MMC	100+0.1	P.O+I.P.	1.75±0.20*
SYS+MMC	200+0.1	P.O+I.P.	1.44±0.21**
SYS+MMC	0+0	P.Ob+I.P.c	2.73±0.22
SYS+MMC	0+0.2	P.O+I.P.	2.23±0.25
SYS+MMC	50+0.2	P.O+I.P.	1.72±0.17*
SYS+MMC	100+0.2	P.O+I.P.	1.37±0.24**
SYS+MMC	200+0.2	P.O+I.P.	1.11±0.18**

Tumor cells were inoculated subcutaneously into the right groin of mice. SYS was administered orally to the mice, daily for 12 days from the second day after the tumor inoculation. MMC was administered intraperitoneally on the alternate days for the 6 days from the second day after tumor transplantation.

a Each value represents the mean±SE of 10 mice

b Water was orally administered

c Saline was intraperitoneally administered

\*, \*\*: significant different from the MMC value, p<0.05, p<0.01

### 3) Lysosomal enzymes에 대한 효과

逍遙散加味方 抽出液과 mitomycin C의 투여로 인한 Ehrlich ascites carcinoma cell의 lysosomal enzymes에 대한 변화는 107 개의 세포로부터 얻어진 결과로 표현하였다. 원심분리로부터 얻은 비침전층 분획에 나타난 acid deoxyribonuclease, β-glucuronidase, acid phosphatase의 총 활성도는 MMC의 단독투여, 또는 逍遙散加味方 抽出液의 단독투여보다 현저하게 증가하였으며, MMC와 逍遙散加味方 抽出液을 병용투여한 경우에는 증가하는 효과가 더욱 현저하게 나타났다.(Table 11)

## IV. 고 찰

癌은 現在 人類의 健康을 威脅하는 主要한 疾病의 하나로, 전염성질환이 기본적으로 해결된 國家에서는 心腦血管疾患과 더불어 死亡原因의 首位를 차지하고 있다<sup>2,45)</sup>. 이러한 癌 發生의 原因은 現代醫學的으로 遺傳, 人種과 地理學的 要因, 年齡, 免疫學的 因子 等の 內的 因子와 化學的 發癌物質, 物理的 發癌物質(紫外線照射, 石棉, 異物質, 放射線照射 等), 바이러스와 같은 外的 因子로 나누고 있다<sup>46)</sup>. 그러나 갈수록 복잡해지는 産業社會에서의 各種 精神的인 緊張, 人口의 增加, 汚染, 産業化의 加速化, 生活環境의 多變化

Table 13. Effects of the ethanol extract from Soyosangamibang(SYS) and/or MMC on the activity of lysosomal enzymes in Ehrlich ascites carcinoma cell

Treatment	Dose (mg/kg)	Activities of lysosomal enzymes <sup>a</sup>		
		acid deoxyribonuclease	$\beta$ -Glucuronidase	Acid phosphatase
SYS+MMC	0b+0b	6.3±0.6	12.6±0.9	21.6±1.7
SYS+MMC	100+0	7.5±0.7	14.1±1.1	25.7±1.4
SYS+MMC	200+0	8.6±0.5c	16.5±0.8c	27.5±0.9c
SYS+MMC	0+0.1	7.2±0.8	13.6±1.1	23.4±1.3
SYS+MMC	100+0.1	9.3±1.1	17.7±1.0*	28.5±1.5*
SYS+MMC	200+0.1	11.3±1.0*	21.5±1.4**	30.4±1.4**
SYS+MMC	0+0.2	8.4±0.8	14.8±1.5	25.8±1.2
SYS+MMC	100+0.2	10.5±1.1	19.9±1.1*	29.3±1.1*
SYS+MMC	200+0.2	13.2±0.9**	22.4±1.2**	32.1±1.3**

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells. SYS was orally administered to the mice once a day on days+6 to+10 after the tumor transplantation. MMC was intraperitoneally administered to the mice once two days on days+6,+8,+10 after transplantation.

a Each value represents the mean±SE of 12 mice. Enzyme activity:acid deoxyribonuclease in  $\mu\text{g}$  total P liberated/107 cells/15min,  $\beta$ -glucuronidase in  $\mu\text{g}$  p-nitrophenol liberated/107 cells/15min, acid phosphatase in  $\mu\text{g}$  inorganic P liberated/107 cells/15min.

b Control was orally administered water and intraperitoneally administered saline.

c Significantly different from the control value,  $p<0.05$

\*, \*\* Significantly different from the MMC value,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$

等에서 癌의 發生이 增加한다<sup>2)</sup>고 報告되고 있으며, 특히 精神的인 스트레스와 관련이 있는 憂思 惱怒로 因한 七情不舒로 肝氣가 鬱結되어 發生 하는 癌의 頻度가 높아지고 있는 趨勢이다<sup>12~15)</sup>.

이렇듯 癌은 發生原因과 機轉이 명백히 밝혀져 있지 않고, 또, 그 生物學的 性狀이 복잡하기 때문에 적절한 定義를 내리기는 어렵다. 그러나 一般의으로 定義한다면, 腫瘍이란 組織의 自律的인 過剩性 成長이며, 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대하여 破壞的인 것을 말한다<sup>1)</sup>. 病理學的으로 腫瘍은 個體를 構成하는 正常細胞가 여러 가지 刺戟에

의하여 遺傳子의 形質轉換이 發生하고 그 결과 細胞의 形態學, 生物學, 化學, 物理學, 免疫學的 行動이 變換 變形細胞가 遺傳的으로 代를 이어 無節制한 增殖을 함으로써 形成된 變形細胞集團, 즉 새로이 생긴 腫瘍을 뜻하고, 이를 構成하는 細胞의 形態와 行動樣相에 따라 陽性腫瘍과 惡性腫瘍으로 區分하며, 그 중 惡性腫瘍을 癌이라 한다<sup>46)</sup>.

癌의 治療法으로 西醫學에서는 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 및 手術療法 등이 주로 活用되고 있고, 그 중 化學療法의 活用度가 높으나 많은 副作用과 그 治療限界 때문에 抗癌效果를 높

이는 방법과 免疫療法과의 併合療法 등에 대한 연구가 절실하게 요구되고 있는 실정이다<sup>9-11)</sup>.

이러한 要求에 副應하여 近來 韓藥劑의 抗癌效果에 대한 연구가 활발하게 進行되고 있는데, 單一藥物의 抗癌效果에 대한 實驗的研究로 金等<sup>49-50)</sup>은 人蔘, 鹿茸의 抗體生産 抑制 緩和效果를, 任<sup>51)</sup>은 魚腥草, 鹿血, 豬苓, 穿山甲等이 正常 免疫細胞에는 거의 毒作用을 일으키지 않으면서 強力한 抗癌效果가 있음을, 金等<sup>53-56)</sup>은 紫菀, 東風菜, 靈芝, 仙鶴草, 巴豆 등이 抗癌作用과 免疫反應에 效果를 미친다고 報告하였다.

複合製劑藥物에 대한 연구로는 姜等<sup>58-60)</sup>이 息賁丸, 肥氣丸 및 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 대한 抗癌效果를, 金等<sup>59,61)</sup>은 伏梁丸, 痞氣丸 및 消積正元散이 각종 癌細胞柱의 成長阻礙效果를, 尹等<sup>52,57,62-64,66)</sup>은 六君子湯, 小建中湯, 四妙湯, 大柴胡湯, 防毒湯, 半夏白朮天麻湯, 巴豆를 加味한 四君子湯, 消積保中丸 및 四物湯 등의 抗癌作用 및 免疫反應에 대한 效果를 報告하였다.

또한, 最近에는 東西醫結合에 의한 治療方法으로 抗癌化學療法劑와 韓藥의 병용투여가 西醫나 東醫의 단독투여보다 더 좋은 治療效果가 있음이 報告되고 있다<sup>67-70)</sup>.

그러나, 갈수록 增加하고 있는 心理的, 精神的 스트레스로 因한 癌의 治療에 效果가 있을 것으로 보이는 逍遙散을 利用한 實驗的 報告는 없었다. 이에 저자는 逍遙散中の 白朮, 白芍藥, 元柴胡, 當歸에 瓜蒌仁, 威靈仙, 半夏(薑), 鬱金, 川練子, 山豆根, 半枝蓮을 加한 逍遙散加味方의 抗腫瘍效果와 抗癌化學療法劑의 細胞毒性에 미치는 影響을 觀察하였다.

逍遙散은 宋代 太平惠民和劑局方<sup>20)</sup>에 처음 記載된 것으로서, 疏肝解鬱, 健脾養血, 調經<sup>21-27,29-31,35,38)</sup>시키는 效能이 있어 諸鬱症을 解한다.

개개의 藥物에 대한 性味, 歸經 및 效能과 具體的으로 實驗을 통해 報告된 藥物들의 藥理作用을 살펴보면 다음과 같다.

白朮은 甘, 苦, 微溫하고, 脾, 胃經으로 入하며, 補脾益氣, 燥濕利水와 固表止汗의 效能이 있다<sup>32-34)</sup>. 主成分은 Atractylol, Atractylon, Atractylon, Vit. A 등이고, 藥理學的으로 ethylalcohol로 抽出한 物質은 小鼠肉瘤에 대한 抑制率이 22.8%이고, 熱水로 抽出한 物質은 抑制率이 32.1%이다. 體外實驗에 따르면 白朮의 揮發成分은 食道癌細胞에 대해 뚜렷한 抑制作用이 있고, 小白鼠肉瘤 180, Ehrlich腹水癌 및 淋巴肉瘤腹水型에 모두 抑制作用이 있다. 白朮이 腫瘤를 抑制하는 機轉은 癌細胞의 增殖率을 降下시키는 同時에 腫瘤組織의 侵襲性을 減低시켜서 機體의 腫瘤에 抵抗하는 能力 및 腫瘤細胞에 대한 細胞毒作用을 올리는 것과 關係가 있다<sup>37)</sup>.

白芍藥은 酸, 苦, 微寒하고, 肝, 脾經으로 入하며, 柔肝止痛, 養血斂陰과 平抑肝陽의 效能이 있다<sup>32-34)</sup>. 主成分은 Paeoniflorin, Paeonol, Paeonin 이고, 藥理學的으로 鎮痙, 鎮痛, 抗菌과 鎮靜하는 作用이 있다<sup>33)</sup>. 動物實驗에 의하면 白芍藥은 胃液分泌를 抑制하고, rat의 stress性潰瘍의 發生을 豫防할 수 있으며, 淋巴母細胞의 轉化를 促進하고, 腫瘤의 生長을 抑制한다. 또, 細胞免疫 및 体液免疫에 모두 促進作用이 있다<sup>34)</sup>. 특히, Paeoniflorin이 中樞神經興奮을 抑制하여 鎮痛, 鎮痙, 鎮靜作用을 하는데, 末梢血管과 冠狀動脈을 擴張하여 末梢와 心筋細胞에 血流, 營養供給을 增進시키고, 骨格筋, 平滑筋의 彈力細胞間에 張力を 強化하여 筋肉의 下垂症狀을 改善하며, 筋肉의 痙攣을 緩和하고, 消化管蠕動運動能을 亢進하여 消化와 吸收를 增進한다. Endocrine腺의 收斂能을 增加시켜 桂枝와 함께 止汗作用을 하기도 한다<sup>35)</sup>.

元柴胡는 苦, 寒하고, 心包, 肝, 三焦, 膽經으로 入하며, 解表和裏, 疏肝解鬱, 升舉中氣와 解熱의 效能이 있다<sup>33-34,36)</sup>. 主成分은 Bupleurumol, Oleic acid, Linolenic acid, Plamitic acid, Saikosaponin a,c,d, Stearic acid, Lingnoceric acid 등이고, 藥理學的으로 解熱, 鎮靜, 鎮痛, 抗癌活性, 抑制腫瘤生長作用, 免疫增強作用과 體液性 및 細胞性免

疫機能을 增強시키는 作用이 있다<sup>33~34,36)</sup>. 특히 Saponin A, D에는 뚜렷한 抗癌活性作用이 있어서 動物에 대하여 脫毛, 體重下降, 食慾減退 등의 副作用을 없게 하고<sup>34)</sup>, Saponin D를 小鼠의 Ehrlich ascites carcinoma에 灌服 혹은 腹腔內 注射하면 腫瘤의 生長作用을 抑制하며, 또 動物의 生存時間을 延長시킨다<sup>34)</sup>.

當歸는 甘, 辛, 溫하고, 心, 肝, 脾經으로 入하며, 補血行血, 潤燥滑腸과 調經止痛<sup>33~34,36)</sup>의 效能이 있다. 主成分은 n-Valerophenone-o-carboxylic acid, Butylidene phthalide 등이고, 藥理學的으로 子宮筋收縮作用, 血管收縮作用, 降低血素板凝集, 抗血栓作用, 降血脂作用, 抗炎鎮痛作用, 抗菌作用과 鎮靜作用<sup>33~34,36)</sup>이 있다. Vitamin B12, Folic acid와 철분이 있어서 造血作用을 하므로 血虛를 개선하고, 혈액의 Hematocrit치를 높이며, 精油는 血管을 擴張하여 血壓을 낮추고 腦血流을 增進시키며, 末梢血管을 擴張하여 血流을 원활히 함으로써 末梢循環障礙를 改善한다. Falcarindiol, Falcarinolone 등은 鎮靜, 鎮痛作用을 하여 神經痛, 關節痛 등의 痛症을 緩和하고,  $\beta$ -Sitosterol-O-Glucoside는 抗炎作用이 있어서 關節염 등 각종 염증을 억제한다<sup>35)</sup>.

瓜蒞仁은 苦, 寒하고, 肺, 胃, 大腸經으로 入하며, 清熱化痰, 利咽喉, 潤肺燥, 滑腸通便과 止消渴의 效能이 있다<sup>34,36,40~41)</sup>. 主成分은 3 Terpenes Saponin, 有機酸, 鹽類, kaempferitrin 등이고, 藥理學的으로 抗菌, 抗癌作用이 있으며<sup>34,36,40)</sup>, 動物實驗을 통하여 肉腫과 腹水癌細胞에 대하여 낮지만 一定한 抑制作用이 있는 것으로 나타났다<sup>34,36)</sup>. 瓜皮의 에테르 침출액의 抗癌作用보다 皮中 內含된 種子 즉, 瓜蒞仁이 더 强하며, JTC-26 세포 抑制率이 90%이상이다<sup>34,37)</sup>.

威靈仙은 辛, 溫하고, 膀胱經으로 入하며, 祛風濕, 通經絡, 散癥積하는 效能이 있다<sup>33~34,36)</sup>. 主成分은 anemonin, anemond, 糖類, Vitamin, 有機酸 등이고, 藥理學的으로 鎮靜, 軟化, 抗菌, 抗癌과 降血糖하는 作用이 있으며<sup>33,34,36)</sup>, 五臟을 宣通

시켜 久積癥瘕癰氣塊를 없앤다고 하였다<sup>42)</sup>. 특히, 食道癌에 대하여 비교적 뛰어난 抗癌作用을 가지고 있다<sup>34)</sup>.

半夏(薑)은 辛, 溫, 有毒하고, 脾, 胃經으로 入하며, 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫과 除癰癭氣의 效能이 있다<sup>32~33,36,41~43)</sup>. 主成分은 揮發油, 脂肪酸 등이고, 藥理學的으로 制吐, 鎮靜, 眼壓低下, 鎮咳祛痰과 抗癌하는 作用이 있다<sup>33,36)</sup>. 總細胞容積法을 사용하여 腹水型肉瘤인 흰 쥐의 腹腔에 本品을 熱水로 抽出한 뒤의 에칠알콜침전물을 매일 100mg/kg, 연속 5일 注射하였을 경우 腫瘍細胞生長의 抑制率이 69%이었고<sup>34,37,39)</sup>, 작은 쥐 子宮頸部癌-14, 肉瘤-180, 肝實體型 및 Hela 細胞에 均一하게 抑制作用이 있었다<sup>37)</sup>. JTC-26에 대한 體外試驗에서 미약한 抑制作用이 있고, 正常細胞에 대해서는 전혀 抑制作用이 없는 것으로 나타났다<sup>37)</sup>.

鬱金은 辛, 苦, 涼하고, 心, 肝, 肺經으로 入하며, 理氣, 祛痰, 止痛, 行氣解鬱과 涼血破瘀의 效能이 있다. 主成分은 d-Camphene, d-Camphor, Curcumin, Demethoxycurcumin 등이고, 藥理學的으로 抗癌, 抗菌, 健胃, 利尿와 鎮痛하는 作用이 있다<sup>33~34)</sup>. 사람의 子宮頸部癌 JTC-26細胞에 대해 抑制率이 50-70%인 것으로 報告되었고, 鬱金の 揮發成分중 특히, curcumin은 膽汁의 分泌를 促進시키며 癌細胞에 대하여 抑制作用을 가진다<sup>34)</sup>.

川練子는 苦, 寒, 有毒하고, 肝, 心包, 小腸, 膀胱經으로 入하며, 理氣止痛과 殺蟲의 效能이 있다<sup>33,40)</sup>. 主成分은 醋酸, caproic acid 등의 揮發性 脂肪酸이고, 藥理學的으로 鎮痛, 驅蟲과 抗真菌의 作用이 있다<sup>33,40)</sup>. in vitro에서 돼지의 蛔蟲, 지렁이, 거머리에 대해 殺蟲作用이 있고, 鐵銹色 白黴菌에 대하여 抑制作用이 있다<sup>33,40)</sup>.

山豆根은 苦, 寒하고, 心, 肺, 大腸經으로 入하며, 清熱解毒, 利咽喉, 通便, 消腫止痛, 保肺氣, 瀉心火와 平喘하는 效能이 있다<sup>33,36~37,41~43)</sup>. 主成分은 matrine, oxymatrine, anagryrine, methylcytisine

등이고, 藥理學的으로 消炎, 抗癌, 升高白細胞, 抗菌과 平喘作用이 있다<sup>36,37)</sup>. 動物實驗을 통해 惡性腫瘍에 대한 抑制作用이 있고, 肺癌, 喉頭癌의 初期에 補助藥으로 쓰인다. 또, 癌에 대하여 類似免疫作用이 있으며, 그 抽出液은 子宮頸癌에 대하여 顯著한 抑制作用이 있다. 특히, 苦參鹼과 氧化苦參鹼은 小鼠의 肉瘤-180에 대해 그 死亡作用을 緩解시키는 效能이 있으며, 큰쥐의 吉田肉瘤와 腹水型肝癌에 투여한 결과 實驗治愈率이 60%以上이었고, 死亡에 直面한 大鼠의 生命年長, 抑瘤效果가 있다고 報告되고 있다. 이 治療에서 大鼠의 혈청중에는 抗腫瘍抗体가 存在한다는 事實이 확인되었고, 이 腫瘍抗体는 遺傳的 傾向을 띠는다고 하였다. 氧化苦參의 化學治療係數는 MMC의 7-8배이다<sup>37)</sup>.

半枝蓮은 甘, 辛, 平하고, 心, 小腸, 肺經으로 入하며, 利水消腫, 清熱解毒, 活血祛瘀와 抗癌의 效能이 있다<sup>19,41~44)</sup>. 主成分은 Falavonoid glycoside, phenol類, steroid 등이고, 藥理學的으로 解毒, 腫脹消退, 利尿와 抗癌의 作用이 있다<sup>37,40)</sup>. 肺癌, 子宮頸癌, 直腸癌, 食道癌, 胃癌, 乳腺癌 등의 治療에 應用하는데, 특히 豆芽法을 이용한 抗癌藥草 試驗에서 抗癌 活性作用이 있고<sup>34,37,39)</sup>, 小鼠肉瘤-180에 대한 體內實驗에서 Ehrlich腹水癌과 腦瘤 B22에 대하여 抑制作用이 있다<sup>37)</sup>.

以上을 살펴보면, 逍遙散加味方은 扶正시키는 白朮, 當歸, 白芍藥, 清熱解毒시키는 半枝蓮, 山豆根, 活血祛瘀시키는 當歸, 芍藥, 化痰散結시키는 半夏(薑), 瓜蒌仁, 川練子, 威靈仙, 그리고 疏肝理氣시키는 元柴胡, 鬱金이 配合되어 辨證에 따른 治療法이 多樣하게 活用되고 있음을 알 수 있다. 특히, 實驗을 통하여 直接的인 抗癌效果가 있는 것으로 報告된 元柴胡, 白朮, 瓜蒌仁, 威靈仙, 半夏(薑), 鬱金, 山豆根, 半枝蓮 등으로 構成되어 있고, 또한, 白朮, 半夏(薑), 當歸에는 放射線 및 化學療法의 副作用에 대해서도 治療 및 減少效果가 있는 것으로 나타나고 있다<sup>47)</sup>.

따라서, 逍遙散加味方은 疏肝理氣, 健脾養血의

效能이 있어서 最近에 癌의 發生要因의 多數를 차지하고 있는 精神的, 心理的 스트레스에 대하여 解鬱시켜주는 效能이 있으며, 抗癌作用을 가지는 元柴胡, 白朮, 瓜蒌仁, 威靈仙, 半夏(薑), 鬱金, 山豆根, 半枝蓮 등에 의해 抗腫瘍效果를 上昇의으로 增進시키는 동시에 放射線化學療法의 副作用을 減少시키는 白朮, 半夏(薑), 當歸 등의 作用으로 抗癌化學療法劑로 因한 副作用의 問題點을 줄일 수 있을 것으로 思料된다. 이에 저자는 抗癌化學療法劑인 mitomycin C(MMC)와의 比較 및 併用投與와 關聯된 實驗을 實施하였다.

本 實驗에서는 逍遙散加味方의 腫瘍細胞에 대한 增殖抑制作用을 觀察하고자 in vitro test인 colony形成抑制實驗과 SRB assay를 利用하였는데, 逍遙散加味方의 抽出液이 腫瘍細胞의 成長을 抑制하는 效果가 濃度依存的으로 增加하는 結果를 보여 抗腫瘍의 效果가 있음을 나타냈고(Table 3, 4), 小鼠에서 ascites form of Ehrlich carcinoma에 대한 逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果에 대한 실험을 실시하여 腹水癌細胞腫瘍의 경우에 逍遙散加味方 抽出液만을 투여한 실험군에서는 별다른 抗腫瘍效果를 나타내지 못하였고(Table 5). 抗癌化學療法劑인 MMC 0.1mg/kg를 투여한 결과 小鼠의 평균생존기간을 32% 연장하는 效果를 나타냈으며, 30일 이상 생존한 小鼠는 2마리였다(Table 6).

ascites form of Ehrlich carcinoma에 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병용투여하여 30일 동안 관찰한 결과 逍遙散加味方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간 증가하는 경향을 보였으며, 30일 이상 생존하는 小鼠도 늘어나는 결과를 나타냈다. 특히, 逍遙散加味方 抽出液 200mg/kg와 MMC 0.1mg/kg를 투여한 군에서는 小鼠의 평균생존기간이 51% 증가하였으며, 30일 이상 생존한 小鼠도 9/12로 증가하는 결과를 보였다.(Table 7, 8)

逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果를 小鼠의 solid form of Ehrlich carcinoma에 실

시하였는데, 腫瘍세포를 이식한 후 16일 후 腫瘍을 적출하여 腫瘍의 重量을 측정된 결과 대조군에서는  $2.65 \pm 0.23g$ 이었으며, 逍遙散加味方 抽出液의 투여량을 증가할수록 腫瘍의 크기가 감소하는 효과를 나타냈다. 특히 200mg/kg의 逍遙散加味方 抽出液을 투여하였을 때 37%의 腫瘍크기 감소율을 나타내었다. MMC의 단독투여시에도 0.2mg/kg, 0.5mg/kg을 투여하였을 때 유의하게 종양의 크기가 감소하는 결과를 보였다.(Table 9) 逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 병용투여시는 이들 각자를 단독투여하거나 특히 MMC를 단독으로 투여하였을 때보다도 抗腫瘍 효과가 뚜렷하게 나타나 腫瘍의 크기를 현저하게 감소하는 결과를 보였다.(Table 10)

逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 투여로 인한 Ehrlich ascites carcinoma cell의 lysosomal enzymes에 대한 변화는 107 개의 세포로부터 얻어진 결과로 표현하였다. 원심분리로부터 얻은 비침전층 분획에 나타난 acid deoxyribonuclease,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase의 총 활성도는 MMC의 단독투여보다 逍遙散加味方 抽出液을 투여한 뒤에 현저하게 증가하였으며, MMC 또는, 逍遙散加味方 抽出液의 단독투여보다 MMC와 逍遙散加味方 抽出液을 병용투여한 경우에 증가하는 효과가 더욱 현저하게 나타났다.(Table 11)

본 연구를 통하여 逍遙散加味方 抽出液은 MMC의 抗腫瘍 효과를 증가시키는 효과를 보였다. 또한 逍遙散加味方 抽出液은 마우스에서 solid form of Ehrlich ascites carcinoma의 증가를 억제시키는 효과를 나타내었으나 ascites form의 腫瘍에 대해서는 억제효과가 관찰되지 않았다. 생존기간 실험에서는 逍遙散加味方 抽出液과 MMC의 병용투여시 ascites tumor에 대하여 MMC를 단독으로 투여하였을 때와 비교하여 유의하게 억제작용을 증가시키는 결과를 보였다. 또한 solid tumor에 대해서는 오직 부가적인 효과만을 보였다. Shimanoto등은 생존실험에서

plasmin이 抗腫瘍 효과를 보이지는 않았지만 plasmin과 MMC를 병용투여하였을 때는 MMC를 단독으로 투여하였을 때보다도 생존기간을 더욱 연장하는 효과를 보였다. 이러한 작용의 기전에 대하여 plasmin은 in vivo상태에서 腫瘍의 lysosomes을 불안정화시키고, plasmin의 병용투여로 lysosomal enzymes의 유리를 증가시키므로써 MMC의 세포독성효과를 향상시키는 것으로 결론지었다. 또한, 逍遙散加味方 抽出液이 urokinase에 의하여 plasminogen을 plasmin으로의 전환을 증가시킨다는 보고도 있었다. 그러므로 逍遙散加味方 抽出液이 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes을 불안정화시킨다는 것을 예측할 수 있다. Lysosome은 용해소체라고도 하며, 막으로 싸인 세포질내의 소체로서 직경은  $0.2-0.8\mu m$ 이고, 그 기질에는 acid phosphatase, glucuronidase, sulfatase, ribonuclease, collagenase를 비롯한 약 70여종의 가수분해효소를 함유하고 있다. 그 기능은 세포내 이입과정(endocytosis)을 통해 세포 밖에 있는 물질을 섭취하는 과정인 異形食食機能(heterophagocytosis)과 자가세포내에서 국소적인 상해를 받았을 때 그 세포가 정상기능을 유지하기 위해서 손상된 세포소기관을 섭취하는 自家食食機能(autophagocytosis)이 있다. 또한, lysosome은 세포내에서 형성된 비정상적인 찌꺼기, 특히 세포가 충분히 대사될 수 없어서 남게 된 거대분자를 흡수하는 쓰레기통과 같은 역할을 하기도 한다<sup>46)</sup>. 이러한 lysosome의 정상적인 기능이 손상을 받게 되면 함유된 여러 가수분해효소가 세포내로 유리되어 세포에 손상을 주며, 세포내의 찌꺼기를 처리하지 못함으로써 질병이 유발되는 것이다. 逍遙散加味方 抽出液은 예상했던대로 lysosomal enzymes의 활성을 증가시켰으며, 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병용투여하였을 때 腫瘍세포의 상층액부분에서 lysosomal enzymes활성이 MMC를 단독투여하여 얻어진 것보다 훨씬 강하게 나타났다.

結論적으로 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병

용투여하였을 때 ascites tumor에 대한 抗腫瘍 효과가 나타나는 것은 적어도 부분적으로는 逍遙散加味方 抽出液의 lysosomal labilizing action에 기인한다고 생각된다.

이러한 結果로부터 逍遙散加味方 抽出液이 현저한 抗腫瘍 효과가 없다고 할지라도 逍遙散加味方 抽出液이 MMC의 효과를 항진시키는 것으로 보여진다. 앞으로 逍遙散加味方 抽出液의 活性轉에 대한 研究가 계속되어야 할 것으로 思料된다.

癌의 發生原因 중 스트레스, 즉 憂思惱怒로 인한 七情不舒로 肝氣가 鬱結되어 發生하는 癌의 發生頻도가 높아지고 있으나 그에 대한 治療處方의 實驗的 研究가 이루어지지 않은 것에 着眼하여 疏肝解鬱과 健脾養血하는 效能이 있는 逍遙散 中の 白朮, 白芍藥, 元柴胡, 當歸에 抗癌 효과가 있는 瓜蒌仁, 威靈仙, 半夏(薑), 鬱金, 川練子, 山豆根, 半枝蓮을 加味한 逍遙散加味方 抽出液으로 colony 形成抑制實驗과 SRB assay 및 抗癌化學療法劑인 MMC의 抗腫瘍效果의 증진여부와 Ehrlich ascites carcinoma cell의 lysosomal enzymes에 대한 활성 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 逍遙散加味方 抽出液을 Caki-1 cell, hep 3B 및 A549에 투여한 결과, colony형성억제실험과 SRB assay에서 농도의존적으로 腫瘍세포의 성장을 억제하였다.
2. Ascites form of Ehrlich carcinoma에 대한 抗腫瘍效果 實驗에서 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병용투여한 결과, 逍遙散加味方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간 증가하는 경향을 보였다.
3. Solid form of Ehrlich carcinoma에 대한 抗腫瘍效果 實驗에서 逍遙散加味方 抽出液과

MMC를 병용 투여하였을 경우, MMC를 단독 투여하였을 경우보다 腫瘍의 크기가 현저하게 減少하였다.

4. Ehrlich ascites carcinoma cell에 逍遙散加味方 抽出液과 MMC를 병용 투여하였을 경우, MMC를 단독 투여하였을 경우보다 lysosomal enzymes의 활성이 훨씬 강하게 나타났다.

이상의 結果로부터 逍遙散加味方 抽出液이 직접적으로 현저한 抗腫瘍效果가 없다고 할지라도 逍遙散加味方 抽出液이 MMC의 효과를 항진시키는 것으로 보아 間接적인 抗腫瘍效果가 있는 것으로 思料된다.

### 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교출판부, pp. 1~2, 27, 1990.
2. 김정순 : 疫學原論, 서울, 신광출판사, pp.233~254, 1990.
3. 錢伯文 : 腫瘤的辨証施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 1~10, 161~162, 220~222, 1980.
4. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, pp. 2~11, 131~135, 166~171, 1992.
5. 賈旁 : 癌瘤中醫防治研究, 陝西, 陝西科學技術出版社, pp. 1~3, 1983.
6. 孫桂芝 : 常見腫瘤診治指南, 北京, 中國科學技術出版社, pp. 1~12, 45, 1991.
7. 李岩 : 腫瘤臨症備要, 北京, 人民衛生出版社, pp.7~10, 15~17, 19, 25, 39, 1979.
8. 王龍寶 : 胃癌的辨証施治, 上海, 上海中醫藥雜誌, pp. 6~7, 1987.
9. 朴文鎬 外 : 內科學, 서울, 博愛出版社, pp. 2446~2450, 2466~2475, 1976.
10. 張代釗 : 中西醫結合治療癌症, 山西, 山西人民出版社, pp. 1~20, 25, 1984.

- Z11. 鄭顯明：扶正培本法在癌症治療的應用和地位，雲南中醫雜誌(第14卷4期)，1994.
12. 金圭東：東醫內科學，서울，麗江出版社，pp. 221~223, 1992.
13. 朱甲惠：國譯萬病回春，서울，癸丑文化社，pp. 301~310, 1973.
14. 陸錦燧：早溪醫述，紹興醫藥學報社，pp. 54~55, 1977.
15. 陳存仁.余符初：神經衰弱神經病及諸虛損百驗方(中國名醫驗方彙編之一)，홍콩，香港震旦圖書公司，pp.154~156, 1984.
16. 顧伯康：中醫外科學，上海，上海科學技術出版社，p. 105, 107, 1989.
17. 國際韓醫學學生會：東洋醫學叢書，서울，一中社，pp. 105~107, 1990.
18. 廣東中醫院 編著：惡性腫瘤放化療毒副反應的，1993.
19. 裴元植：痛의 韓洋方併用治法에 對한 報告，大韓韓醫學會誌，2:53~57, 1986.
20. 陳師文：太平惠民和劑局方(卷九)，北京，人民衛生出版社，p. 308, 1985.
21. 江克明,包明惠：簡明方劑辭典，上海，上海科學技術出版社，pp. 896~897, 1989.
22. 陳偉,路一平：方劑學，上海，上海中醫學院出版社，pp. 98~100, 1990
23. 宗金和：中醫方劑通譯，河北，河北科學技術出版社，pp. 216~217, 1995.
24. 趙世衡：素虛後世處方學，서울，癸丑文化社，p. 223, 1984.
25. 鄭津牟：中醫處方解說·臨床應用，서울，癸丑文化社，pp. 296~297, 1973.
26. 江克明,包明惠：簡明方劑辭典，上海，上海科學技術出版社，pp. 896~897, 1989.
27. 康舜洙：方劑學，서울，癸丑文化社，pp. 99~100, 1991.
28. 安英中：古今實驗方，서울，翰成社，p. 39, 41, 1977.
29. 申載鏞：方藥合編解說，서울，成輔社，pp. 193~195, 1989.
30. 陸昌洙：現代方藥合編，서울，癸丑文化社，pp. 222~223, 586~587, 1973.
31. 尹吉榮：東醫方劑學，서울，高文社，pp. 124~125, 1971.
32. 辛民教：臨床本草學，서울，南山堂，pp. 172~173, 221~224, 330~331, 400~401, 455~456, 508~509, 538~540, 556~558, 563~564, 687, 1986.
33. 李尚仁 外 2人：漢藥臨床應用，서울，成輔社，p. 74, 96, 160, 198, 204, 270, 309, 336, 358, 399, 402, 500, 515, 1982.
34. 劉春安,彭明：抗癌中草藥大辭典，湖北，湖北科學技術出版社，pp. 323~326, 340~349, 375~376, 442, 616, 728~729, 825~826, 1994.
35. 朴榮順：漢方의 藥理解說，서울，翰成社，pp. 37~41, 1991.
36. 王浴生：中藥藥理與應用，北京，人民衛生出版社，pp. 326~328, 98~101, 317~318, 352~353, 424~425, 427~430, 775, 886~888, 890~891, 383~384, 1983.
37. 常敏毅：抗癌本草，서울，도서출판 바람과 물결，pp.53~57, 165~168,190~191, 171~173, 1992.
38. 許 浚：東醫寶鑑，서울，南山堂，pp. 446~447, 1979.
39. 常敏毅：抗癌本草，湖南，湖南科學技術出版社，pp. 28~29, 53~55, 105~107, 109~112, 122~123, 1987.
40. 陸昌洙 外：韓藥의 藥理·成分·臨床應用，서울，癸丑文化社，p. 440, 496, 581, 654, 850, 1026, 1027, 1973.
41. 楊今祥：抗癌中草藥製劑，北京，人民衛生出版社，p. 50, 68, 88, 112,1984.
42. 葉銘洪：治癌中藥及處方，臺北，華聯出版社，p. 70, 99, 108, 125, 130, 1983.
43. 孟林升：中醫治癌大成，北京，北京科學技術出版社，pp. 208~209, 233~235, 243~244,



- 1995.
44. 李相漸 : 現代韓藥藥物學, 서울, 杏林書院, p. 215, 1974.
45. 안돈희 : 한국인의 사망원인, 大韓醫學協會誌, 36(3) : 292~299, 1993.
46. 大韓病理學會編 : 病理學, 서울, 高文社, pp. 57, 225, 239~256, 1990.
47. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 台中, 昭人出版社, pp. 6~12(卷19), 11~16(卷37) 1958.
48. 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 181~183, 232~234, 670~675, 706~707, 783~784, 775~779, 876~879, 1316~1318, 1632~1635, 1780~1782, 1832~1837, 1972.
49. 하대유 外 : 고려인삼이 3-Methylcholanthrene의 發癌能에 미치는 影響, 대50. 한의학 협회지, 27(6) : 541, 1984.
51. 金光湖 外 : 數種 韓藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲記念論文集, pp.1041~1050, 1981.
52. 任宰訓 : 數種의 韓藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 1986.
53. 尹相協 : 六君子湯, 小元柴胡湯, 魚腥草 및 加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實驗的研究, 서울, 慶熙大學校大學院, 1991.
54. 金尙勳 : 紫菀이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 1990.
55. 李學喆 : 東風菜가 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 1990.
56. 吳千植 : 靈芝 山慈姑 仙學草 卷柏 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 1987.
57. 趙誠珪 : 修治巴豆 및 巴豆加黃連의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 關한 實驗的研究, 圓光大學校 大學院, 1994.
58. 金漢燮 : 四妙湯 大元柴胡湯 및 構成藥劑들의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實驗的研究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1989.
59. 姜大根 : 息賁丸 및 肥氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 圓光大學校 大學院, 1991.
60. 金剛山 : 肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果, 圓光大學校 大學院, 1992.
61. 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, 圓光大學校 大學院, 1991.
62. 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, 圓光大學校 大學院, 1989.
63. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 實驗的研究, 大田大學校 大學院, 1993.
64. 白泰鉉 : 半夏白朮天麻湯과 半夏白朮天麻湯加味方의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 實驗的研究, 慶熙大學校 大學院, 1994.
65. 李永燦 : 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 抗癌效果에 對한 研究, 圓光大學校 大學院, 1993.
66. 魯勳政 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 關한 研究, 圓光大學校 大學院, 1995.
67. 陳長懷 外 : 養正消瘤湯伍用化療治療中晚期胃腸癌臨床觀察, 論文選集, 中國中醫研究院廣安門醫院, pp. 86~88, 1993.
68. 陳長懷 : 清開靈灌湯治療化療所致轉氨酶異常, 論文選集, 中國中醫研究院廣安門醫院, pp. 88~89, 1993.
69. 劉炳學 外 : 二朮鬱靈丹伍用化療治療食管癌 30例療效觀察, 醫中西醫結合腫瘤新進展研討會論文集, 中國中西醫結合學會腫瘤專業委員會, 中國中醫研究院廣安門醫院, pp. 33~35.
70. 程劍華 外 : 芪苓湯豫防順鉑腎毒性和治療化療性腎功能衰竭的臨床研究, 中醫中西醫結合腫瘤新進展研討會論文集, 中國中西醫結合學會腫瘤專業委員會, 中國中醫研究院廣安門醫院, pp. 78~80.

71. Lee N. K. : The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drug a comparison of colony formation assay and isotope uptake assay, JKMA, 31 : 435, 1988.
72. Ysukagoshi S. : Fundamental approaches to cancer immunotherapy using a protein bound polysaccharide Ps. K. with special reference to its clinical application in Mizuno D., Chihara G., Fukuoka F., Yamamura Y., eds "Host defence against cancer and its potentiation" University of Tokyo Press, Tokyo 365, 1975.
73. Rubinstein L. V., Shoemaker R. H., Paull K. D., Simon R. M. : Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, J. Natl. Cancer Inst. 82 : 1113~1118, 1990.