

人蔘百合湯이 B16세포에 대한 세포독성능 및 C57BL/6계 생쥐의 폐전이암의 억제에 미치는 영향

Cytotoxicity and Antitumor Effects of Insambaekhaptang on C57BL/6 Mice Melanoma-induced Lung Metastasis

黃鎬俊 · 河智容

尙志大學校 韓醫科大學 病理學教室

ABSTRACT

Oriental medicine as a candidate for effective cancer treatment recently gain positive concerns in fields of therapeutic oncology. that is why some herbal medicines have been empirically safer in toxicity than anticancer drugs used in western medicine, and to show excellent therapeutic efficacy in human trial. Thus, these effects by clinically applied-herbs have not yet fully demonstrated in experimental tumor model.

This study was initiated to evaluate the antitumor effect of Insambaekhaptang as candidate of antitumor-herbal agent against B16 melanoma metastasized into C57BL/6 mice lung.

In experiment to test whether Insambaekhaptang can directly kill cancer cells in vitro or not, Insambaekhaptang showed direct killing action in concentration or higher against B16 melanoma cells using MTT assay, and showed lower IC50. Another experiment to know whether Insambaekhaptang can inhibit growth and metastasis of cancer cell or not, Insambaekhaptang significantly inhibited Solid tumor by intraperiperal injected-melanoma and lung metastasis induced by intravenous injected-melanoma in inbred C57BL/6 mice. When quantitative survival time increasing, we could obtain results that increased 113% in treated by Insambaekhaptang.

These results show that Insambaekhaptang can inhibit growth of B16 melanoma cells through various biological mechanisms.

Key word:

Insambaekhaptang, C57BL/6, Lung metastasis, cytotoxicity, melanoma.

국문요약

연구배경

종양은 그 발생원인과 성장기전이 자세히 밝혀져 있지 않은 질병으로 최근 사망원인의 제1원인으로 급격히 발생빈도가 증가하고 있다. 종양환자의 수는 점점 증가하는 추세이며, 그에 따른 사망자의 수도 늘고 있다. 종양을 치료하는 방법으로 수술요법·면역요법·방사선요법·화학약물요법·골수이식·호르몬요법등이 사용되어 왔으며, 최근에는 전통적인 한약재를 이용한 종양과괴 및 종양의 성장을 억제하는 약재의 연구가 활발히 시도되고 있다.

본 연구에서는 '노수토홍(勞嗽吐紅)'에 사용되는 인삼백합탕(人蔘百合湯)을 사용하여 종양과괴 및 종양의 성장억제능을 연구하고자 하였다.

연구방법

인삼백합탕을 전이암 실험에 다용(多用)되는 B16세포를 대상으로 세포독성을 MTT검사법에 의하여 실험한 후 IC_{50} 을 측정하였다. 그 후 동물실험으로 C57BL/6에 B16세포를 주입시킨 후 고형암의 중량과 폐에 전이된 흑색종의 집락의 수를 측정하였고, 생존기간의 연장정도를 측정하였다.

연구결과

인삼백합탕 구성약물의 시험관내 세포독성을 측정하기 위하여 MTT검사법으로 측정한 결과 농도에 비례하여 생존율은 감소하였고, IC_{50} 을 산출한 결과 백출, 홍화, 계피, 인삼등이 낮은 수치를 나타내었다. 인삼백합탕엑스의 시험관내 세포독성은 농도에 비례하여 생존율이 감소하였고, IC_{50} 은 $0.0002437\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내었다. B16세포를 C57BL/6의 복강에 주입시켜 고형종양의 무게를 측정한 결과 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 보였다($P<0.05$). B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥에 주입하여 폐전이암을 유발시킨 후 폐의 표면에 생긴 집락의 수를 측정한 결과 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 보였다($P<0.001$). B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥에 주입하여 폐전이암을 유발시킨 후 생존일수를 측정한 결과 평균치가 대조군은 23일, 투여군은 26일을 나타내어 113%의 증가를 보였다.

중심어

인삼백합탕, B16, C57BL/6, MTT, IC_{50} , Metastasis(전이), 세포독성, Melanoma(흑색종)

I. 서론

암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉 성장이며, 이것은 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의¹⁾되어 있다.

서양의학의 암 치료방법은 외과적 수술·방사선요법·화학요법·약물요법·골수이식요

법·호르몬 요법·면역요법등이 사용되며, 이러한 다양한 치료법 선택의 기준은 암의 전이 유무와 부작용의 정도에 따라 결정된다²⁾.

암의 특징중에 전이의 성질이 있는데, 전이는 원발부위를 벗어나 신체의 다른 부위에 암이 이동되어 증식되는 것이다. 암전이의 초기 단계는 원발부위로부터의 유리이며, 그 이후에는 표적기관의 혈관 상피세포에 부착한 후 침

운을 이룬 후 혈관이나 림프관을 타고 이동되는 것이다^{3,4)}.

악성종양 혹은 암에 대한 한의학적 인식은 오래 전부터 시작되었으며, 많은 한의학 문헌에서 종양에 대한 내용을 찾아볼 수 있으며, 각종 병명 안에 내포되어 있고, 경우에 따라 서양의학의 암증(癌症)과 그 묘사가 일치하고 있다⁵⁾.

한의학에서의 암의 발생은 질병발생의 일반적인 규율⁶⁾과 마찬가지로 원발성 원인으로 풍(風)·한(寒)·서(暑)·습(濕)·조(燥)·화(火)의 외감원인과 정지울결(情志鬱結)·음식상(飮食傷)·과로(過勞)의 내상원인이 있고, 속발성 원인으로 담음(痰飲)·어혈(瘀血)로 분류하고 있다⁷⁾.

한의학에서의 암에 대한 치료법으로 공(攻)·소(消)·산(散)·제(制)·보(補) 등의 방법이나⁷⁾, 서간리기(舒肝理氣)·강역지구(降逆止嘔)·활혈화어(活血化瘀)·이기화결(理氣化結)·건비조습(健脾燥濕)·화담산결(化痰散結)·양음청열(養陰清熱)·생진화담(生津化痰)의 방법을 사용하고 있다⁸⁾.

B16 흑색종은 C57BL/6 생쥐의 귀 표면에서 자연 발생된 흑색종에서 유래한 세포로서⁹⁾, 폐에 대한 전이로 고정화되어진 세포이다. 또한 인위적인 전이암 발생 실험에 많이 이용되고 있다¹⁰⁾.

폐암은 한의학에서 구체적인 병명은 없으나, 폐적(肺積)·식분(息賁)·해수(咳嗽)·천식(喘息)·흉통(胸痛)·노수(勞嗽)·담음(痰飲)의 범주에 속한다고 할 수 있다. 임상적으로는 해수(咳嗽)·객혈(咯血)·혈담(血痰)·흉통(胸痛)·기단(氣短)·발열(發熱) 등의 증상을 나타낸다⁵⁾.

인삼백합탕은 '치(治) 노수(勞嗽) 토홍(吐紅)'에 사용되는 처방으로 백출, 백복령, 백합,

야교주, 천문동, 백작약, 인삼, 오미자, 황기, 반하, 행인, 세신, 홍화, 계피, 감초 등의 15종의 약재로 구성되어 있으며¹¹⁾, 16종 해수 중 혈수(血嗽)에 사용되었으며, 허준 자신의 경험방으로 여겨진다¹²⁾. 폐암의 일반적인 증상과 비교하여 볼 때 인삼백합탕이 폐암에 사용될 수 있을 것으로 판단되며, 이에 대한 연구는 아직 진행되지 않았다.

따라서 혈수(血嗽)에 사용되는 인삼백합탕을 이용하여, B16세포에 대한 세포독성능 및 IC₅₀(50% Inhibition concentration)와 B16세포를 C57BL/6에 주입시켜 발생한 복부 고형암 및 전이된 폐암의 저지효과와 생존기간 연장의 효과를 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 대한실험동물센터에서 4주령의 체중 25g 내외의 C57BL/6계의 수컷 생쥐를 분양 받아 항생제가 첨가되지 않은 고형사료(삼양사료(주), 한국) (Table 1)를 수돗물

Table 1. Composition of Pellet

Composition	%
Crude protein	22.1
Crude Fat	3.5
Crude fiber	5.0
Crude ash	8.0
Ca	0.6
P	0.4
Others	60.4
Total	100.0

과 함께 충분히 공급하면서 1주일간 본 실험실의 항온항습기(명진기계 MJ-721cs, 한국)에서 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다.

2) 실험약재

실험에 사용된 인삼백합탕을 구성하는 약재를 시중 건재상에서 건조된 상태로 구입하여 잡질을 제거하고 형태가 완전한 것만을 정선하여 사용하였다. 인삼백합탕의 구성약재와 1첩분량은 Table 2와 같다.

Table 2. Prescription of Insambaekhaptang

한약명	생약명	중량(g)
백출	ATARCTYLODIS MARCROCEPHALAE RHIZOMA	3.75
백복령	PORIA	3.75
백합	LILII BULBUS	3.75
아교주	ASINI GELATINUM	3.75
천문동	ASPARAGI RADIX	3.75
백작약	PAEONIAE RADIX ALBA	2.62
인삼	GINSENG RADIX	2.62
오미자	SCHIZANDRAE FRUCTUS	2.62
황기	ASTRAGALI RADIX	2.62
반하	PINEKIAE RHIZOMA	2.62
행인	ARMENIACAE AMARUM SEMEN	2.62
세신	ASARI HERBA CUM RADICE	1.12
홍화	CARTHAMI FLOS	1.12
계피	CASSIAE CORTEX	1.12
감초	GLYCYRRHIZAE RADIX	1.12
총량		38.95

2. 실험방법

1) 인삼백합탕의 제조

실험에 사용할 10첩분량의 인삼백합탕 389.5g을 3000ml의 둥근 플라스크에 증류수

1500ml과 함께 넣어 3시간동안 전탕 한 후 8접의 거즈로 여과하였다. 그 후 여액을 증발농축기(Yamato, Japan)에서 농축하고, 다시 동결건조기(일신 Engineering Co., 한국)에서 -40℃로 72시간 동안 완전히 건조시켜, 58.8g(득수율 15.09%)의 엑스를 얻었다.

시험관내 독성실험에 필요한 경우는 건조된 엑스를 실험당일 필요한 농도가 되도록 하여 사용하였다. 동물의 전이억제능과 항암능을 측정하기 위하여는 건조된 엑스를 실험에 필요한 농도가 되도록 Phosphate Buffer Saline에 녹여 Media Bottle(Nalgene, USA)에 넣어 4℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험 도중에 생긴 침전물은 수시로 Vortex-mixer(Maxi II, USA)로 충분히 흔들어 원액이 골고루 섞이도록 하였으며, 부유물이 생기면 건조엑스를 적정 농도로 새로 만들어 실험에 사용하였다.

인삼백합탕 각각의 구성약재를 시험관내 독성실험을 위하여, 약재 5g씩을 100ml의 증류수와 함께 250ml 비커에 넣어 알코올 램프에서 30분간 전탕한 후 각각의 농도를 계산하여 실험에 임하였다.

2) 배지의 구성

(1) 기본배지

RPMI 1640(Life Technologies, Inc. USA)에 Sodium bicarbonate(Shinyo-pure Chemicals Co., LTD., Japan)2.2g과 Fungizone(Gibco, USA)4cc/l, Penicillin (100 I. U./ml, Sigma, USA)1ml와 Streptomycine(100µg/ml, Sigma, USA) 0.8ml을 증류수 1000ml에 넣고, pH를 7.2로 한 후 여과하여 사용하였다.

(2) 혼합배지

FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco. USA)를 58℃에서 30분간 Inactivation시킨 후 RPMI 1640 기본배지에 10%의 농도로 조정하여 사용하였다.

10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 혼합배지는 암세포의 배양전반에 사용되었다.

3) 암세포의 배양

C57BL/6 생쥐에 흑색종을 유발시키기 위한 암세포주는 연세대학교 미생물학교실에서 분양 받은 B16세포주로서, 동결상태로 분양 받아 본 실험실에서 40℃의 물에 빠르게 녹인 후 RPMI 1640 기본배지에 2회 세척하였다. 그 후 RPMI 1640 혼합배지와 함께 세포배양용 플라스크(Falcon, USA)에 넣어 5% CO₂ 배양기(존샘, 한국)에 넣어 배양하였다. 암세포의 증식상태는 매일 위상차현미경(HUND, Germany)으로 관찰하였고, 적정밀도로 증식된 세포는 0.5% Trypsin(Gibco, USA)으로 처리하여 단세포상태로 수거하여 RPMI 1640 기본배지로 2회 세척 후에 새로운 세포배양용 플라스크에 분주시켜 배양하였다. 이때 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 혼합배지를 이용하여 2일에서 3일 간격으로 갈아주었다.

동물실험을 하기 위하여는 생체내에서 계대 배양된 B16세포를 이용하였다. 즉, 적정밀도로 증식된 B16세포를 2×10⁶Cells/ml로 조정된 뒤 C57BL/6계 생쥐의 복강에 0.2ml씩 투여하고, 14일 후에 고형암의 상태로 배양된 세포군을 무균적으로 적출 하였다. 적출된 세포군은 100mesh(Sigma, USA)에 잘게 갈아 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, USA)로 2회 세척한 뒤 동물 실험에 임하였다.

4) 실험군의 선정 및 암의 유발

(1) 고형암의 무게측정 실험

고형암을 유발시켜 고형암의 무게를 측정하기 위하여 대조군과 인삼백합탕투여군으로 나누었다. B16세포를 C57BL/6의 복강에 이식시킨 후 대조군은 0.85%의 생리식염수를 80ml/kg

(BW)씩 주었고, 인삼백합탕투여군은 100mg/kg(BW)을 주었다. 각 군의 개체수는 6마리씩으로 선정하였다.

(2) 폐전이 흑색종의 집락수 측정 실험

B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥을 통하여 이식시킨 후 폐에 전이되어 발생한 흑색종의 군집수를 측정하였다. B16세포를 1×10⁴Cells/ml로 조정된 뒤, 26×½" gauge의 주사기로 0.2ml씩 꼬리정맥에 주입하였다. 대조군은 0.85%의 생리식염수를 80ml/kg(BW)씩 주었고, 인삼백합탕투여군은 100mg/kg(BW)을 주었다. 각 군의 개체수는 6마리씩으로 선정하였다.

(3) 생존기간 연장효과 측정실험

생존기간의 측정을 위하여는 폐에 B16세포를 전이시킨 뒤, 측정하였다. 대조군은 0.85%의 생리식염수를 80ml/kg(BW)씩 주었고, 인삼백합탕투여군은 100mg/kg(BW)을 주었다. 각 군의 개체수는 10마리씩으로 선정하였다.

3. 검사항목 및 방법

1) 구성약재의 시험관내 세포독성실험

인삼백합탕을 구성하는 각각의 약재들의 세포독성능을 측정하기 위하여 Mosmann등이 개발한 MTT검색법¹³⁾을 변형하여 실시하였다. 즉, 지수증식기의 B16세포를 1×10⁴Cells/ml로 조정된 다음, 96well 미세세포배양판(Falcon, USA)에 180μl의 세포부유액과 20μl의 약물을 처리하였다. 각 약물들의 농도는 최초에 5000 μg/ml로 조정된 후 10배씩 희석시켜 최종농도가 0.005 μg/ml이 되게 하였다. 각 약물들은 미세세포배양판에 분주 직전에 0.22 μm의 Syringe filter(Wattman, Germany)로 여과하여 사용하였다. 이후 2~3일간 37℃, 5% CO₂의 배양기에서 배양하면서 세포의 증식정도를 위상차현미경으로 수시로 관찰하였다.

약물이 처리되지 않은 대조well의 세포들이 충분히 성장한 후, 원심분리기(한일, 한국)에서 520×g의 속력으로 5분간 원심 분리시켜 배양액을 제거하고 각 well에 PBS에 녹인 20 μ l의 MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA)을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 배양기에서 3시간 배양하였다. 그 후 100 μ l의 0.04M HCl(in propane-2-ol)을 넣어 세포가 MTT용액과 반응하여 생긴 푸른색의 formazan결정을 녹인 후 30분 안에 ELISA 판독기(Emax precision microplate reader, Molecular devices, USA)로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 참고파장으로 650nm를 이용하였다.

각 실험은 4개의 well을 사용하였으며, 그 평균치를 구하였고, 동시에 동일 실험을 반복하여 두차례 실시 후 아래의 공식과 같이 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{실험군의} \sim \text{평균흡광도} - \text{기준흡광도}}{\text{대조군의} \sim \text{평균흡광도} - \text{기준흡광도}} \times 100$$

또한 적정농도를 구하기 위하여 IC₅₀(50% Inhibition Concentration)을 구하였다. 즉, MTT 검색법에서 흡광도가 대조 well에 비하여 50% 감소하는 값을 의미하는 IC₅₀은 약물의 농도를 X축으로 하고, 각 well의 흡광도에서 환산한 생존율을 Y축으로 설정하여 다중회귀분석에 의하여 산출하였다.

2) 인삼백합탕의 시험관내 세포독성실험 및 IC₅₀의 측정

인삼백합탕의 시험관내 세포독성의 측정은 MTT검색법을 변형하여 사용하였다. 그 방법은 인삼백합탕을 구성하는 약물들의 세포독성실험과 같다. 약물의 농도는 최초에 10000 μ g/ml로

조정한 후 10배씩 희석시켜 최종농도가 0.0001 μ g/ml이 되게 하였다. MTT검색법을 도식화하면 다음과 같다(Fig. 1).

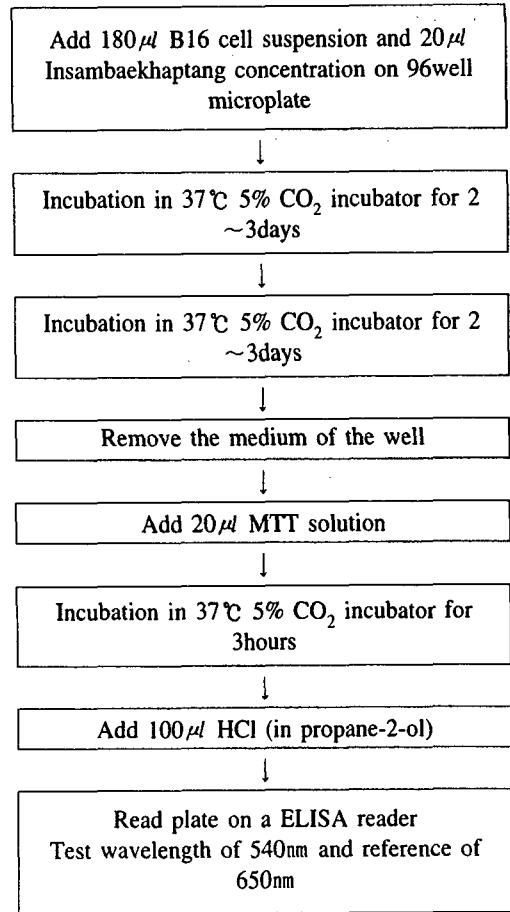


Fig. 1 Flow chart for measurement of cytotoxicity in vitro

3) 고형종양의 무게 측정

B16세포를 C57BL/6에 이식시켜 고형암을 유발시킨 후, 실험 14일째에 경추탈구로 치사시킨 후 복벽 내부에 생긴 검은색의 고형암을 되도록 타 장기조직과 섞이지 않게 적출한 뒤,

전자저울(Mettler, germany)로 측정하였다.

4) 폐전이 흑색종 집락의 수 측정

B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥을 통하여 폐에 전이시킨 후, 14일째에 경추탈구로 치사시킨 C57BL/6에서 폐를 적출하여 폐의 표면에 생긴 흑색종 집락의 수를 측정하였다. 이때 경계가 불분명한 집락은 한 개로 간주하였다.

5) 생존기간 관찰

폐에 B16세포를 전이시킨 후, C57BL/6의 생존여부를 매일 오전과 오후 비슷한 시각에 관찰하였다. 이때 사망의 여부는 심장의 박동 유무에 따라 결정하였다.

4. 통계처리

시험관내 독성에 의한 IC_{50} 의 측정은 ELISA 판독기에서 읽은 수치를 일반통계처리 후, Graphpad PRISM(Version 2.0, Graphpad Software, Inc., USA)를 이용하여 다중회귀분석을 실시하여 산출하였다.

고형종양의 무게와 폐전이 흑색종의 집락의 수는 SPSS for Windows (Release 5.0.2 Copyright (C) SPSS Inc.)를 이용하여 Levene's 검정으로 각 실험군의 동질성 여부를 확인 한 후 그에 합당한 Independent-Sample t-test의 양측검정으로 처리하였다. 그 결과 95%신뢰수준에서 유의수준이 0.05미만인($P < 0.05$) 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

생존기간은 측정은 SPSS for Windows (Release 5.0.2 Copyright (C) SPSS Inc.)로서 생존표를 작성 후 산출하였고, 생존기간이 125% 이상인 경우를 유의성¹⁴⁾이 있는 것으로 판정하였다.

III. 실험결과

1. 인삼백합탕 구성약물의 시험관내 세포독성

인삼백합탕을 구성하는 약재 15종을 B16세포에 대하여 시험관내 세포독성을 측정하였다. 측정결과 세포들의 생존율은 농도에 비례하여 감소하였다(Fig. 2).

생존율에 의거하여 다중회귀분석을 실시후 각 약물들의 IC_{50} 을 구하였다(Table 3). 그 결과 백출은 $50.80 \mu\text{g/ml}$, 홍화는 $57.54 \mu\text{g/ml}$, 계피는 $87.32 \mu\text{g/ml}$, 인삼은 $151.4 \mu\text{g/ml}$, 천문동은 $399.4 \mu\text{g/ml}$, 세신은 $875.2 \mu\text{g/ml}$, 아교주는 $1317 \mu\text{g/ml}$, 백복령은 $1997 \mu\text{g/ml}$, 반하는 $3394 \mu\text{g/ml}$, 감초는 $6032 \mu\text{g/ml}$, 행인은 $6518 \mu\text{g/ml}$, 황기는 $17670 \mu\text{g/ml}$, 백작약은 $11590 \mu\text{g/ml}$, 오미자는 $17880 \mu\text{g/ml}$, 백합은 $65110 \mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 을 나타내었다.

2. 인삼백합탕의 시험관내 세포독성

인삼백합탕 복합처방을 이용하여 B16세포에 대한 시험관내 세포독성을 측정 한 농도에 비례

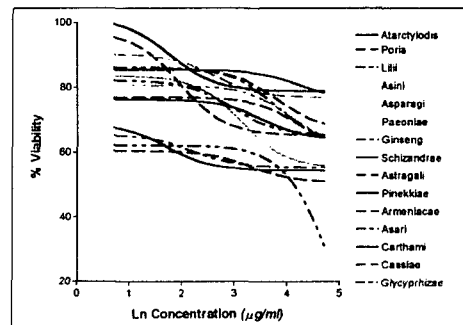


Fig. 2. % Viability of each herb in Insambaekhaptang

Ln : Natural logarithm of Insambaekhaptang concentration

Table 3. IC₅₀ of each herb in Imsambaek-haptang

약재명	생약명	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
백출	ATARCTYLODIS	
	MARCEPHALAE RHIZOMA	50.80
백복령	PORIA	1997.00
백합	LILII BULBUS	65110.00
아교주	ASINI GELATINUM	1317.00
천문동	ASPARAGI RADIX	399.40
백작약	PAEONIAE RADIX ALBA	11590.00
인삼	GINSENG RADIX	151.40
오미자	SCHIZANDRAE FRUCTUS	17880.00
황기	ASTRAGALI RADIX	17670.00
반하	PINEKIAE RHIZOMA	3394.00
행인	ARMENIACAE AMARUM SEMEN	6518.00
세신	ASARI HERBA CUM RADICE	875.20
홍화	CARTHAMI FLOS	57.54
계피	CASSIAE CORTEX	87.32
감초	GLYCYRRHIZAE RADIX	6032.00

하여 생존율은 감소하였다(Fig. 3).

생존율에 의한 IC₅₀은 0.0002437($\mu\text{g/ml}$)을 나타내었다.

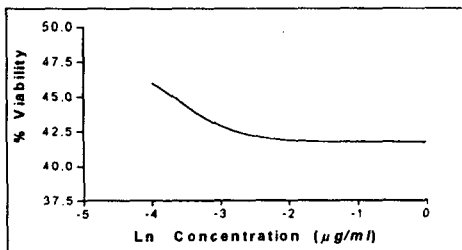


Fig 3. % Viability in B16 melanoma cells after treated by Imsambaekhaptang in vivo

Ln : Natural logarithm of Imsambaekhaptang concentration

3. 고형종양의 무게측정

고형종양의 성장 저지율을 측정하기 위하여 B16세포로 발암시킨 C57BL/6 생쥐로부터 검은색의 종양을 적출하여 중량을 측정한 결과 대조군 $1.38 \pm 0.24\text{g}$, 실험군(인삼백합탕투여군)은 $1.11 \pm 0.13\text{g}$ 을 나타내어 19.39%의 유의성있는($P < 0.05$) 감소를 보였다(Table 4, Fig. 4).

4. 폐전이 흑색종 집락의 수 측정

B16세포를 C57BL/6생쥐의 꼬리정맥에 주입하여 폐에 전이된 집락수를 측정한 결과, 대조군은 71.67 ± 12.30 개를 나타내었으며, 실험군(인삼백합탕투여군)은 42.83 ± 7.91 개를 나타내어 유의성있는($P < 0.001$)결과를 나타내었다(Table 5, Fig. 5, 6).

Table 4. Inhibition of Solid Tumor Weight in C57BL/6 mice by B16 cell after administration of Imsambaekhaptang

Group	Administration	Solid Tumor weight(g) ^{a)}	Inhibition rate ^{b)}
Control group	Vehicle 0.85%	1.38 ± 0.24	
	Saline solution		
Experimental group	Imsambaekhaptang 100mg/kg(BW)/day	1.11 ± 0.13	19.39*

Control group : Treated with vehicle 0.85% Saline solution

Experimental group : Treated with Imsambaekhaptang by 100mg/kg/day

a) : Mean \pm Standard Deviation

b) :
$$\text{Inhibition-rate} = \frac{\text{control group} - \text{experimental group}}{\text{control group}} \times 100$$

* : $P < 0.05$

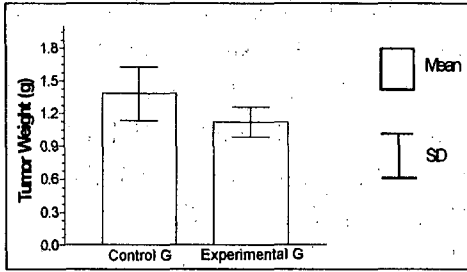


Fig. 4. Inhibition of Solid tumor weight in C57BL/6 mice by B16 melanoma cell after administration of *Insambaek-haptang*

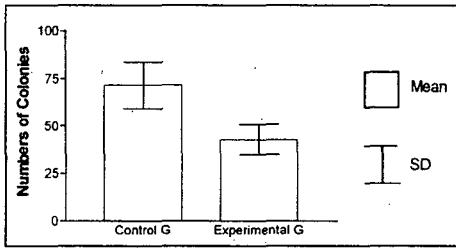


Fig. 5. Inhibition of lung metastasis by B16 melanoma cell after administration of *Insambaek-haptang*

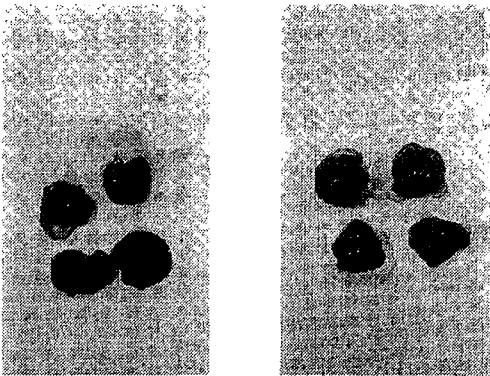


Fig. 6. Photograph of lung metastasis by B16 melanoma control group(Left), experimental group(Right)

Table 5. Inhibition of lung metastasis by B16 melanoma cell after administration of *Insambaek-haptang*

Group	Administration	Colony numbers ^{a)}	Inhibition rate ^{b)}
Control group	Vehicle 0.85% Saline solution	71.67 ± 12.30	
Experimental group	<i>Insambaek-haptang</i> 100mg/kg(BW)/day	42.83 ± 7.91	40.23**

** : P<0.001

5. 폐전이암 생쥐의 생존기간 연장효과

B16세포를 C57BL/6 생쥐의 꼬리정맥에 주입하여 생존기간을 측정한 결과 대조군은 23일의 중앙치를 나타내었고, 실험군(인삼백합탕투여군)은 26일의 중앙치를 나타내어 113%의 생존기간의 연장을 보였다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Survival time of lung metastasis by B16 melanoma cell after administration of *Insambaek-haptang*

Group	Administration	Median Survival time(days)	Extended Survival duration(%) ^{a)}
Control group	Vehicle 0.85% Saline solution	23	
Experimental group	<i>Insambaek-haptang</i> 100mg/kg(BW)/day	26	113

a) : Extended~Survival~Duration = $\frac{\text{experimental group}}{\text{control group}} \times 100$

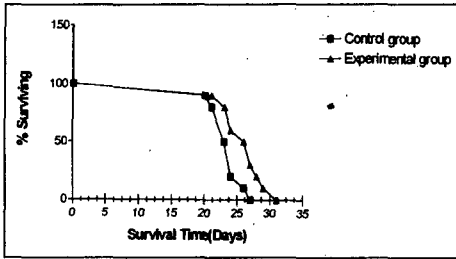


Fig. 7. Survival times of lung metastasis by B16 melanoma cell after administration of Insambaeckhaptang

IV. 고찰

1990년 자료에 의하면 35~60세까지의 장년층의 연간 암 발생률이 10만 명당 108.3명의 수준을 나타내고 있으며, 전체적인 암 사망률은 10만 명당 약 130명 전후로 보고되었으며¹⁾, 연령 단계별 5대 사망순위에서 각종 암에 대한 사망이 1위로 보고되고 있다¹⁵⁾. 1993년의 보고에 의하면 우리나라의 5대 사인중 암 질환이 2위를 차지하고 있고, 발생부위별로는 위암이 남녀 공히 많고, 남자의 경우 위암에 이어 간암, 폐암, 식도암, 췌장암의 순이고, 여자의 경우는 위암에 이어 자궁암, 폐암, 유방암의 순이다¹⁶⁾.

종양의 치료법은 수술요법·방사선요법·화학요법·약물요법·골수이식·호르몬요법 등이 사용된다. 외과적 수술요법이나 방사선요법은 국소의 종양을 완전히 제거할 수 있는 장점이 있으나, 종양을 모두 제거해야만 2차적인 전이를 막을 수 있고, 종양을 확진하는 시점이 발암 초기이어야 하는 문제가 있다. 암 환자의 70%정도가 종양이 전이된 이후에 확진되는 경우가 대부분이어서 수술요법만으로는 치료를 불가능하게 한다. 따라서 방사선요법이나 화학요법을 동시에 수행하게 된다. 방사선요법은 발암초기의 국소통이나 수술하기 곤란한 초기

의 암에 사용된다. 특히 기도암·식도암·자궁경부암·구강암·Hodgkin's Disease의 경우 수술요법보다 여러 면에서 효과적이다. 그러나 정상세포의 유전자에 영향을 주어 돌연변이를 일으킬 수 있는 단점이 있다. 화학요법은 전이 중인 극소수의 세포를 제거하지만 종양세포에 대한 특이성이 강하고, 때로는 화학약물에 대항하는 세포들이 있어 다른 종양세포들이 제거되더라도 계속해서 활동하여 최초로 실시했던 화학요법이 불가능한 경우도 있다. 이런 부작용을 보완하기 위하여 골수이식을 실시한다. 골수이식은 화학요법 이전에 환자의 골수를 채취하여 실험실에서 성장시켜 환자에게 다시 이식하는 것인데, 이때 골수에 종양세포가 없어야 하며, 골수이식 이전에 종양이 제거되어야 한다. 종양의 성장이 정상세포처럼 정상적으로 조절되지 않지만, 많은 경우에는 성장세포의 성장에 관여하는 어떤 인자들의 조절을 받는다고 한다. 또한 어떤 종양은 steroid 호르몬의 영향을 받는다. 따라서 호르몬의 양을 조절하는 것이 종양치료에 의미 있는 영향을 주기도 한다. 면역요법은 임파종에 특이성을 갖는 요법이다. 그러나 면역요법의 주목적은 환자의 면역반응을 자극하여 비특이적으로 종양에 대항케 하는 것이다. 하지만 이러한 여러 치료법이 완전하게 정해진 것은 아니며, 아직도 연구과정에 있다. 또한 이러한 여러 치료법을 선택하는 관건은 전이의 유무와 그 정도이다²⁾.

암세포가 자신의 원발부위를 벗어나 주위조직으로 침범하여 독자적인 성장을 하는 것을 전이라 한다¹⁷⁾. 악성종양의 전이는 임파선 전이, 혈행성 전이, 파종성 전이, 다식성 전이가 대부분이다. 그중 혈행성 전이는 동맥보다 정맥이 더 쉽게 관통되며, 정맥성 침윤의 경우에는 혈액내의 종양세포들이 종양부위를 관류하는 정맥혈류를 따라 전이함으로 간장이나 폐장

이 가장 빈번한 2차성 침범부위가 된다¹⁸⁾.

한의학에서 종양에 대한 명칭은 내경(內經) 이후로 적취(積聚)·징가(癥瘕)·석가(石瘕)·유(溜)·유(瘤)·오장지적(五臟之積) 등에 대하여 구체적으로 언급한 이래 역대의서에서 종양의 위치와 병리적 특성에 따라 영유(癭瘤)·음균(陰菌)·석저(石疽)·실영(失榮)·악핵(惡核)·후감(喉疔)·아균(牙菌)·설감(舌疔)·토순(兔脣)·결분저(缺盆疽)등으로 다양하게 기술되어 있다¹⁹⁾. 특히 암(癌)에 대한 기술은 송대(宋代)의 동헌거사(東軒居士)²⁰⁾는 의서중에서 최초로 암(癌)이란 명칭을 사용하였으나, 응저(癰疽)에 가까운 병증으로 보았다²¹⁾.

1930년대 이전만 하더라도 폐암에 의한 사망은 드문 일이었다. 그러나 흡연인구의 증가이후 폐암은 빠른 속도로 증가되고 있다²²⁾. 한의학적으로 발병과정 및 증상면에서 해수(咳嗽), 폐적(肺積), 폐저(肺疽), 폐위(肺痿), 폐옹(肺癰), 객혈(咯血)등에서 현대의 폐암과의 유사점을 찾을 수 있다²³⁾. 내경(內經)에 '대골고호(大骨枯槁), 대육함하(大肉陷下), 흉중기만(胸中氣滿), 천식불편(喘息不便), 내통인경항(內痛引頸項), 신열탈형과곤(身熱脫形破困)', '대육이탈(大肉已脫), 구후수조자유사시야(九候雖調者猶邪是也)'²⁴⁾라 하였고, 천금방(千金方)에는 '해타농혈(咳唾膿血)'²⁴⁾이라 하였고, 제생방(濟生方)에는 '식분지상(息賁之狀), 좌우협하(左右脇下), 복대여배(腹大如杯), 천식분일시위폐적(喘息奔溢是爲肺積), 진기맥부이모(診其脈浮而毛), 기색백(其色白), 기병기역(其病氣逆), 배통소기(背痛少氣), 희망목명(喜忘目暝), 부한(膚寒), 피중시통(皮中時痛), 흑여슬록(或如虱緣), 흑여침자(或如鍼刺)'²⁶⁾라 하였는데, 이러한 증상과 말기 폐암의 증상 및 예후는 서로 흡사하다²⁷⁾.

최근에 한의학에서는 종양연구에 대한 관심이 집중되고 있는데, 대부분 실험연구로서 한

약의 투여와 비약물요법을 이용한 항암능의 증진에 있다. 근래에는 약침을 이용한 항암능실험이 보고되고 있다²⁸⁾.

특히 폐암에 관한 연구로는 오 등²⁹⁾의 '폐암에 대한 동서의학적 고찰'을, 한 등³⁰⁾의 '폐적, 폐옹, 폐저, 폐암의 문헌적 고찰'을, 윤 등³¹⁾의 '식분탕이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향'을, 강 등³²⁾의 '반하후박탕의 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향'을, 이³³⁾의 '이공산이 마우스 흑색종의 폐전이억제에 미치는 항암 및 면역작용에 관한 연구' 등이 있다.

인삼백합탕은 동의보감¹¹⁾에 혈수(血嗽)를 치료하는 조문(條文)에 있으며, 노수(勞嗽)·토홍(吐紅)을 치료하는 처방이다. 따라서 이 처방은 오래된 해수환자증에서 피를 토하는 증증의 경우에 사용될 수 있을 것이다. 또한 구성약물 중 백출, 백복령, 백합, 천문동, 인삼, 황기, 반하, 홍화, 감초는 임상적, 실험적으로 항암효능이 있는 것으로 알려져있다³⁴⁾.

B16세포는 C57BL/6에서 자연 발생된 암종으로, 숙주의 폐에 전이가 잘되는 암종이다. 인위적 전이암의 경우 B16세포를 이용하는 경우가 많다^{9, 10)}. 항암제의 효능검사에서 시험관내 실험으로 수년전 부터 MTT검사법¹³⁾을 이용한 항암능의 측정이 이루어지고 있다. 이는 짧은 기간 안에 항암후보물질의 효능을 검색하는데 다용되고 있다¹⁴⁾. 본 실험에서는 인삼백합탕을 이용하여 시험관내실험으로 B16세포에 대하여 MTT검사법에 의한 세포독성능을 실험하였고, 그에 따라 IC₅₀을 산출하였다. 동물실험으로는 B16세포를 C57BL/6에 주입한 후 고형암의 중량과 폐에 전이된 흑색종의 집락수, 생존연장 효과 등을 측정하였다.

그 결과 인삼백합탕을 구성하는 각 약물들을 여러 농도로 하여 측정 한 세포독성능은 약물의 농도에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으

며, IC₅₀의 경우 백출은 50.80 $\mu\text{g/ml}$, 홍화는 57.54 $\mu\text{g/ml}$, 계피는 87.32 $\mu\text{g/ml}$, 인삼은 151.4 $\mu\text{g/ml}$, 천문동은 399.4 $\mu\text{g/ml}$, 세신은 875.2 $\mu\text{g/ml}$, 아교주는 1317 $\mu\text{g/ml}$, 백복령은 1997 $\mu\text{g/ml}$, 반하는 3394 $\mu\text{g/ml}$, 감초는 6032 $\mu\text{g/ml}$, 행인은 6518 $\mu\text{g/ml}$, 황기는 17670 $\mu\text{g/ml}$, 백작약은 11590 $\mu\text{g/ml}$, 오미자는 17880 $\mu\text{g/ml}$, 백합은 65110 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

천연물의 항암능을 검색한 천 등^{35, 36}의 논문에서 의하면 SNU-1, SNU-C4세포를 대상으로 한 경우의 유의성있는 IC₅₀을 230 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 판단하였는데, 본 실험의 경우 백출, 홍화, 계피, 인삼은 낮은 IC₅₀을 나타낸 것으로 생각된다. 다만, 대상 세포의 종류가 다르므로 항암활성의 정도를 단정하기는 곤란하다. 인삼백합탕액기스의 세포독성측정에서도 농도에 비례하여 B16세포의 생존율은 감소하였으며, IC₅₀은 0.0002437 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다. 이러한 결과는 아마도 한약재에 포함된 polysaccharide에 의한 것³⁷에 기인 한 것으로 생각된다.

고형암의 중량은 대조군의 경우 1.38 \pm 0.24g, 인삼백합탕투여군의 경우 1.11 \pm 0.13g을 나타내어 유의성있는 감소를 나타내었다(P<0.05). 폐전이 흑색종의 집락의 수는 대조군이 71.67 \pm 12.30개, 인삼백합탕 투여군이 42.83 \pm 7.91개를 나타내어 유의성있는 감소를 나타내었다(P<0.001).

생존연장효과는 중앙치(Median survival time)로 검정하였는데, 대조군은 23일, 인삼백합탕 투여군은 26일을 나타내어 인삼백합탕투여군이 대조군에 비하여 113%의 생존기간의 연장을 보였으나, 일반적인 천연물의 항암활성 수준인 125%¹⁴)에는 미치지 못하였다.

폐암의 병리기전을 한의학에서는 기혈내상(氣血內傷)으로 기혈(氣血)이 실상(失常)되고, 장부기능(臟腑機能)이 실상(失常)한데 외기(外

氣)의 사독(邪毒)이 폐를 침범하여 폐기(肺氣)의 숙강작용(肅降作用)이 상실되어서 기기(氣機)가 불창(不暢)하고 진액(津液)이 불포(不布)하고 기체담응(氣滯痰凝)하여 혈행(血行)이 저체(阻滯)됨으로 기(氣), 담(痰), 어(瘀)가 상결(相結)하고 혹은 화열(火熱)하고 쌓여서 폐적(肺積)을 형성하고 병리변화의 상호작용에 의해 시일이 지나면서 점점 암유(癌瘤)가 형성된다고 볼수 있으며²⁹), 인삼백합탕은 그 중 시일이 경과되어 허증(虛症)을 나타낸 경우에 사용될 수 있을 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 인삼백합탕은 B16세포에 대하여 직접적인 세포독성을 나타내며, C57BL/6에 발생시킨 흑색종에 대하여는 종양의 성장을 억제하는 효능을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 종양성장의 억제에 의하여 생존기간도 연장된 것으로 생각된다. 그러나 이러한 효능이 종양에 대한 약물자체의 직접적인 효과인지, 다른 항암활성기능을 자극하여 일어난 결과인지는 앞으로 계속된 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

인삼백합탕이 B16세포와 B16세포에 의하여 유발된 고형암과 폐전이암에 대한 항암능을 측정하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인삼백합탕의 구성약물의 시험관내 세포독성을 측정하기 위하여 구성약물 각각을 5000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로부터 10배씩 희석시켜 최종농도를 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 하여 MTT검사법으로 측정한 결과 농도에 비례하여 생존율은 감소하였고, IC₅₀을 산출한 결과 백출은 50.8 $\mu\text{g/ml}$, 홍화

는 57.54 $\mu\text{g/ml}$, 계피는 87.32 $\mu\text{g/ml}$, 인삼은 151.40 $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내어 다소 낮은 결과를 보였다.

2. 인삼백합탕액의 시험관내 세포독성 측정을 위하여 10000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로부터 10씩 희석시켜 최종농도가 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 하여 MTT검사용으로 생존율을 측정된 결과 농도에 비례하여 생존율이 감소하였고, IC₅₀은 0.0002437 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

3. B16세포를 C57BL/6의 복강에 주입시켜 고형종양을 만든 후 14일째에 적출하여 무게를 측정된 결과 대조군에 비하여 유의 있는 감소를 보였다(P<0.05).

4. B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥에 주입하여 폐전이암을 유발시킨 후 14일째에 폐를 적출하여 폐의 표면에 생긴 집락의 수를 측정된 결과 대조군에 비하여 유의 있는 감소를 보였다(P<0.001).

5. B16세포를 C57BL/6의 꼬리정맥에 주입하여 폐전이암을 유발시킨 후 생존일수를 측정된 결과 중앙치가 대조군은 23일, 투여군은 26일을 나타내어 113%의 증가를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 인삼백합탕은 B16세포에 대하여 직접적인 세포독성능을 나타내며, 구성약재중 백출, 홍화, 계피, 인삼등이 더욱 강한 세포독성능을 가진 것으로 추정된다. 또한 고형암의 증식억제와 폐전이암의 전이 및 증식을 억제하는 것으로 생각된다. 따라서 구체적인 전이억제 기전과 세포독성에 관련된 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울대학교 출판부, pp1~3, 137~143, 225~234,

1992.
 2. Geoffrey M. Cooper : Elements of human cancer, Jones and Bartlett publishing Inc., pp202~216, 240~259, 1992.
 3. Fider, I. J. : General consideration for studies of experimental cancer metastasis, Methods cancer Res. No. 15, pp399~439, 1978.
 4. Liotta, L. A. : Tumor invasion and metastasis-roll of the extracellular matrix, Rhods memorial award lecture, Cancer Res. No. 46, pp1~7, 1986.
 5. 최승훈 : 동의종양학, 행림서원, p19, 24, pp 207~218, 1995.
 6. 김완희 : 한의학원론, 성보사, p191, 1990.
 7. 姜延良 : 六味地黄湯方法腫瘤的實驗研究, 中醫雜誌, pp471~474, 1983.
 8. 안규석, 최승훈, 김정범, 박종현 : 한의학적 진단모형에 따른 한방 제제의 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 동의병리학회지, Vol. 9, No. 1, p1~20, 1994.
 9. Ishokawa, M., Hosokawa, M., Oh-hara, N., Niho, Y. and Kobayashi, H. : Marked granulocytosis in C57BL/6 mice bearing a transplanted BMT-11 fibrosarcoma, J. Natl. Cancer Inst. No. 78, pp567~571, 1987.
 10. Tsutomu Tsuroka, et al. : Inhibition of pulmonary Metastasis and Tumor cell invasion in experimental tumor by Sodium D-Glucaro- δ -lactam(ND2001), JPA. J. Cancer Res. No. 86, 41~47, 1995.
 11. 허준 : 동의보감, 남산당, p473, 1979.
 12. 권학철 : 동의보감을 통한 허준의 의학사상에 관한 고찰, 경희대학교 대학원, p24, 1992.
 13. Mosmann, T. : Rapid colormetric assay for cellular growth and survival ; Application to

- proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, pp55~63, 1983.
14. 한국생화학회 : Proceeding of symposium an Biochemical methods for research and development of Bioactive substances, The Biological Society of the Republic of Korea, pp25~29, 1990.
 15. 통계청 : 사망원인통계연감 Vol. 11, pp21~36, 1990
 16. 안돈희 : 한국인의 사망원인, 대한의학협회지, Vol.36 No. 3, pp292~299, 1993.
 17. Bruce albert : *Molecular biology of the cell*, Garland publishing, Inc., pp1200~1201, 1989.
 18. T. R. Harrison., et. al : *Harrison' s Principles of internal medicine*, Mcgrawhill, Inc., p1817, 1994.
 19. 김의태 : 광항정기산과 광항정기산합수점산의 항암 및 면역조절작용에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 박사학위논문, p29, 1994.
 20. 東軒居士 : 衛濟寶書(中國醫學大系), 정담 도서출판사, 9권, p817, 1987.
 21. 백태현, 유봉하, 박동원, 유기원 : 반하백출천마탕과 반하백출천마탕가미방의 항암효과 및 면역반응에 관한 실험적 연구, 대한한방종양학회지 Vol.1 No.1, p150, 1995.
 22. Bruce E. Johnson M. D., Davis H. Johnson M. D. : *Lung cancer*, Wiley-liss Inc., pp8~9, 1995.
 23. 北京中醫學院 編 : 中醫學臨床病理, 성보사, p572, 1983.
 24. 馬蒔, 張志聰 ; 黃帝內經素問靈樞合編, 台灣國風出版社, 1977.
 25. 孫思邈 : 備急千金要方, 일증사, pp309~315, 1989.
 26. 嚴用和 : 濟生方, 인민위생출판사, p542, 1985.
 27. 최승훈 : 암에 대한 한의학적 인식 및 실험적 연구에 관한 고찰, 대한한방종양학회지, Vol. 1, No.1, p17, 1995.
 28. 공현식, 류봉하, 박동원, 유기원 : 한국한의학의 종양연구에 대한 현황, 대한한방종양학회지, Vol.1, No. 1, p77, 1995.
 29. 오태환, 정승기, 이연구 : 폐암에 관한 동서의학적 문헌고찰, 대한한의학회지 제12권 제2호, pp52~65, 1991.
 30. 한재수 외 : 폐적 폐용 폐저 폐암에 관한 문헌적 고찰(원인 증상을 중심으로), 대한한의학회지 제15권 제1호. pp26~35, 1994.
 31. 윤성묵, 하지용 : 식분당이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 한방종양학회지 제2권 제1호, pp25~42, 1996.
 32. 강재만, 강재춘, 하지용 : 반하후박탕이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 한방종양학회지 제2권 제1호, pp57~73, 1996.
 33. 이선구 : 이공산이 마우스 흑색종의 폐전이 억제에 미치는 항암 및 면역작용에 관한 연구, 상지대학교 대학원, 1995.
 34. 常敏毅 : 항암본초, 도서출판 바람과 물결, p20, 32, 40, 61, 66, 67, 76, 86, 94, 1992.
 35. 현지원 외 13인 : 전통약용식물 및 각종식물의 항암효과에 대한 연구, 생약학회지, 제25권, 제2호, pp171~177, 1994.
 36. 현지원 외 14인 : 전통약용식물 및 각종식물의 항암효과에 대한 연구, 생약학회지, 제25권, 제4호, pp382~387, 1994.
 37. C. K. Wong, et al. : Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from Medical plants, *The journal of International medical research* 22, pp209~312, 1994.