大韓韓方腫瘍學會誌
J. of Kor. Oriental Oncology
Vol.3, No.1, 1997

竹葉石膏湯加減方이 抗癌化學療法劑의 細胞毒性과 腫瘍細胞의 라이소솜에 미치는 影響

Effects of Jukyeopseokgotanggagambang on Anti-tumor Chemotherapeutic Cytotoxicity and Lysosomal Enzymes of Tumor Cell

田承勳 · 田炳薰 · 元秦喜 · 文 九 · 文錫哉
圓光大學校 韓醫科大學 脾系內科學敎室

ABSTRACT

In order to investingate the effects of *Jukyeopseokgotanggagambang* Extract on antitumor effects after human cell lines(A549, hep3B, Caki-1, Ehrlich) transplantation into the peritoneal cavity or right groin in mice induced by RPMI 1640 and GIBCO etc., the extracts of its herbal medicines were orally administered for 10 or 12days.

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. According to the change of colony-forming efficiency and SRB assay of Caki-1 cell, hep3B and A549 cells after exposure to the extract of *Jukyeopseokgotanggagambang* extract, that extract depressed the growth of tumor cells depending on its concentration.

2. Antitumor activities of the ethanol extract from *Jukyeopseokgotanggagambang* extract and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice is a little improved. Especially mean survival times of the group of *Jukyeopseokgotang-gagambang* extract 200mg/kg and MMC 0.1mg/kg is improved over 30%.

3. When *Jukyeopseokgotanggagambang* extract and MMC are administerated together, the weight of tumor is more decreased than MMC alone.

4. The effects of the *Jukyeopseokgotanggagambang* extract and MMC on the lysosomal enzymes in Ehrlich ascites carcinoma cell are more significantly improved than MMC alone.

5. *Jukyeopseokgotanggagambang* extract also increased the uptake of MMC into Ehrlich carcinoma cells.

According to the above results, it could be suggested that *Jukyeopseokgotanggagambang* extract has indirect autitumor effects by strengthening the effects of MMC on tumor cells.

Ⅰ. 緖 論

一種의 全身性 疾患인 癌은 局部에서 浸潤生長하거나 다른 부위로 擴散과 轉移를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴할 뿐 아니라 壓迫, 硬阻, 感染, 出血 등을 惹起하며, 숙주에게 일련의 代謝障碍와 營養障碍 등을 일으켜 抗病力을 弱化시키고, 종래에는 體內環境失調가 代償되지 못하게 하여 사망케 하는 질병이다[2,44,61].

癌은 韓醫學에서 噎膈, 反胃, 癥積, 脾積, 肝積, 肺積, 心積, 失營, 石疽, 乳岩, 石癭, 腎岩, 舌菌, 喉白葉, 五色帶下, 骨疽, 石瘕, 腸覃, 肉瘤 등과 관련된 질환[5,6,7,8,9,11,36,56,61]으로 인식되고 있다. 이는 人體臟腑의 陰陽氣血이 失調된 상태에서 外因이나 痰結, 濕聚, 血瘀 등이 相搏하여 發生한다[8]. 또한, "正氣存內 邪不可干", "邪氣所湊 其氣必虛"[1]에서 보듯이 正氣가 虛弱하여 抗病力이 低下되면 癌의 罹患 可能性이 높아진다.

癌의 治療에는 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과 放射線療法은 局所的인 治療法이기 때문에 限界性이 있고, 전신적인 免疫療法도 아직까지 治療방법이 정립되어 있지 않기 때문에, 현재로서는 化學療法의 발전이 중요한 반면, 化學療法의 毒性문제를 해결하지 못하고 있다[12,13,45,46,47,59,60].

韓醫學에서는 癌의 病理機轉을 辨證論治와 審證求因에 근거하여 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 臟腑失調, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 등으로 보고 있으며[61], 이를 바탕으로 病程에 따라 初期에는 攻法을, 中期에는 攻補兼施를, 末期에는 扶正을 위주로 治療한다[13,36,49,61].

본 논문과 관련된 硏究 論文들로는, 抗癌 化學療法劑 및 放射線療法의 副作用에 대한 韓方療法의 影響[63,64,65,66,67], 각종 韓方處方의 抗癌效果[65-75] 등에 대한 硏究報告가 있었다.

臨床 觀察에 의하면 腫瘍환자에게 熱鬱火毒의 實熱證候가 나타나면 腫瘍이 進展되고 있음을 의미하는데, 이러한 病程이 오래되면 熱傷陰津의 상태가 초래되며, 또한 化學療法이나 放射線療法 등은 生體의 陰津을 灼傷하여 火毒에 해당하는 副作用을 同伴한다[38,39,40,41,60,76,78] 고 報告되고 있다.

竹葉石膏湯은 淸熱生津, 益氣和胃시키는 處方으로 본래 傷寒에 餘熱이 未淸하고 氣陰耗傷하여 虛熱이 있는 경우에 사용하였고[23], 최근에는 孫[7]이 陰津의 損傷에 力點을 두어 竹葉石膏湯合養陰湯을 구성하여 熱毒傷陰型의 腫瘍에 활용하였는데, 熱毒內蘊의 病機를 거쳐 耗傷陰津된 癌症의 경우에 養陰淸熱하는 治療法은 중요한 의미가 있다고 思料된다.

이에 著者는 養陰淸熱과 抗癌解毒의 효과가 인정된 약물 등이 加味된 竹葉石膏湯加減方을 구성하여 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗, SRB assay를 通한 癌細胞 成長抑制效果, 抗癌化學療法劑인 MMC(Mitomycin C)와의 單獨 및 併用投與를 통한 Ehrlich carcinoma의 solid tumor와 ascite tumor에 對한 抗腫瘍效果, 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes의 活性에 미치는 影響, MMC uptake에 대한 效果 등에 대하여 연구한 결과, 有意性있는 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 藥 材

實驗에 使用한 藥材는 市中에서 購入하여 圓光大學校 附屬韓方病院에서 鑑定하고 嚴選하여 使用하였으며, 竹葉石膏湯加減方의 處方構成은 孫[7]의 處方을 基本으로 加味構成하였다 (Table 1).

Table 1. Prescription of *Jukyeopseokgotang-gagambang*

本草名	生 藥 名	重量(g)
石 膏	Gypsum Fibrosum	5.5
麥門冬	Radix Ophiopogonis	4.0
生地黃	Rhizoma Rehmanniae	4.5
玄 蔘	Radix Scrophulariae	4.5
沙 蔘	Radix Adenophorae	5.5
天花粉	Radix Trichosanthis	5.5
夏枯草	Herba Prunellae	5.5
女貞子	Fructus Ligustri	5.5
枸杞子	Fructus Lycii	11.0
金銀花	Flos Lonicerae	11.0
龍 葵	Herba Solani Nigri	11.0
鬼箭羽	Lignum Suberalatum Euonymi	11.0
Total amount		84.5

2) 檢液調製

竹葉石膏湯加減方 10貼 845g을 증류수 3000 *ml*와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 電熱器로 煎湯하였다. 이를 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 利用하여 減壓濃縮한 후 냉동건조기에서 완전히 건조하여 건조엑기스 107.6g을 製造하였다. 이 건조엑기스를 증류수로 재조정하여 使用하였으며, 試料를 細胞에 접종하기 전에 1.2, 0.8, 0.45, 0.2㎛ pore size의 micro filter(Milipore)를 利用하여 여과멸균하였다.

3) 腫瘍細胞

實驗에 使用한 腫瘍細胞株는 韓國細胞株銀行(Korea Cell Line Bank) 및 日本理硏細胞銀行(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
Erlich	Carcinoma cell	

4) 細胞培養 및 器具滅菌

實驗에 사용된 腫瘍細胞株들은 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)과 Dulbeco's modification of Eagles's medium (DMEM, 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 사용하였으며, antibiotic-antimycotic (GIBCO.)을 처리하였다. 2내지 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하였다.

本 實驗에 사용된 細胞培養液 및 試藥은 DDW(deionized distilled water)를 使用하여 製造하였으며 micro-filter(pore size 0.2㎛)를 利用하여 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 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[86]

① 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗

竹葉石膏湯加減方 抽出液의 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 1㎖씩을 35×10mm plastic petri dish에 분주하여 응고될 때까지 室溫에 방치하여 기저아가층(basal soft agarose layer)을 준비하였다. 시험관내에서 계대배양시킨 腫瘍細胞를 5×10^5 cells/㎖로 조정한 시험관에 竹葉石膏湯加減方 건조분말을 Fig. 1과 같이 0.5㎎/㎖, 0.1㎎/㎖, 0.05㎎/㎖, 0.01㎎/㎖, 5×10^{-3}㎎/㎖, 10^{-3}㎎/㎖, 10^{-4}㎎/㎖, 10^{-5}㎎/㎖, 10^{-6}㎎/㎖, 10^{-7}㎎/㎖의 濃度로 넣어 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 버린 후 pellet을 잘 분산시켜 0.3% agarose, 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640배지 1㎖에 腫瘍細胞柱들을 1×10^5 cells/㎖로 조정하여 넣은 후 이미 응고된 0.5% basal soft agarose layer위에 중층하였다. 그 후 37℃ 6% 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×200倍率下에서 計算하였다. 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 각 濃度에서의 結果의 判定은 무처치 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[87,88]

Human epitheloid carcinoma(HeLa) cell line, Colon adenocarcinoma(HCT-15) cell line, Hepatocellular carcinoma(Hep3B) cell line 등을 25cm 250㎖ culture flask (Nunclon)를 利用하여 37℃ 5% CO_2 배양기에서 subconfluent monolayers로 유지하면서 RPMI 1640과 Dulbeco's modification of Eagles' 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 5내지 20차례의 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 hemocyto-meter chamber로 細胞數를 계산하고 medium에 잘 분산하여 5×10^5 cells/㎖로 조정하고 96-well flat-bottomed microtitre plate (Nunclon)에 well당 200㎕씩 細胞현탁액을 분주

하고 37℃ 5% CO_2배양기에서 배양하였다. 24시간 경과 후 각 well의 medium을 제거하고 각각의 건조엑기스를 medium에 Fig. 2와 같이 0.5 mg/ml, 0.1mg/ml, 0.05mg/ml, 0.01mg/ml, 5×10^{-3}mg/ml, 10^{-3}mg/ml, 10^{-4}mg/ml, 10^{-5}mg/ml, 10^{-6}mg/ml, 10^{-7}mg/ml의 濃度로 조정하여 각 well에 200μl씩 분주하여 다시 37℃ 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 후 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 방치하였다. 常水로 5回 세척한 후 건조시켰다. 건조된 각 well에 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB용액을 50μl씩 가하여 常溫에서 20분동안 염색을 한 후 1% acetic acid로 4회 세척하여 細胞에 부착하지 않은 SRB를 제거하였다. plate를 잘 건조하여 150μl의 10mmol/l의 unbuffered tris base [tris(hydroxymethyl) amino methane]를 加하여 bound protein stain을 녹여 냈다. 각 well의 OD는 510nm의 wave length에서 測定하였다.

2) In vivo assay

① 抗腫瘍實驗

竹葉石膏湯加減方 抽出液의 抗腫瘍實驗은 Ehrlich carcinoma의 solid tumor와 ascites tumor에 대하여 실시하였다. ascites형은 마우스에 5×10^6개의 細胞를 腹腔內에 주사하였으며, 竹葉石膏湯加減方 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 또는 60일 동안의 평균생존기간으로 판정하였다.

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

solid tumor의 경우에는 5×10^6개의 腫瘍細胞를 마우스의 서혜부에 皮下移植하였다. 竹葉石膏湯加減方 抽出液은 腫瘍細胞移植 後 2일째부터 12일동안 날마다 50, 100, 200mg/kg씩을 경구투여하였고, 抗癌化學療法劑인 MMC는 腫瘍이식 후 2일부터 6일동안 격일로 腹腔內 투여하였으며, 이식 후 16일째에 마우스를 희생시켰다. 腫瘍成長抑制效果는 대조군에 대한 실험군의 腫瘍중량으로 결정하였다.

② 효소활성의 결정

5×10^6개의 腫瘍細胞를 腹腔內에 移植하고 이식 후 6일부터 10일동안 1일 1회씩 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 100, 200mg/kg씩을 경구투여하였다. MMC는 이식 후 6, 8, 10일에 1일 1회씩 腹腔內에 주사하였다. 이식 후 10일에 각 실험군의 ascites 腫瘍細胞를 수집하여 腫瘍細胞수가 1×10^7/ml가 되도록 조절한 후 균질화하였다. 細胞液은 10분동안 600g에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이것을 40분동안 75,000g에서 원심분리하여 침전층과 불침전층을 분획하였다. 각각의 불침전층의 분획에서 acid deoxyribonuclease, β-glucuronidase, acid phophatase 등의 효소활성을 0.2% Triton X-100을 처리한 효소용액에서 Shimanoto 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소활성은 10^7개의 細胞당 값으로 표현하였다.

③ 細胞培養

Ehrlich ascites 細胞를 4×10^5/ml로 조절하여 EMEM에 부유시키고 37℃에서 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 첨가한 후에 30분 동안 MMC(0.05mg/ml)로 처리하였다. 처리한 細胞는 Hank's solution으로 세척한 후 10%의 FCS를 포함한 EMEM에 부유시키고 35mm petri dish를 이용하여 37℃에서 2일간 CO_2 배양기에서 배양한다. 배양 후 살아있는 細胞는 0.2% trypan blue로 염색한다.

④ MMC 함량의 측정

細胞를 PBS에 용해시킨 각 농도의 竹葉石膏湯加減方 抽出液으로 10분동안 37℃에서 처리한 후 MMC(0.01㎎/㎖)에 30분 동안 노출하였다. 노출 후 냉각시키고 원심분리하였다. 상층액에서 MMC의 함량은 microplate reader (Molecular devices)를 이용하여 360nm에서 MMC의 quinone form의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

⑤ 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±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. 實驗成績

1. In vitro 抗腫瘍效果

1) 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗

竹葉石膏湯加減方 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, 98.5, 95.4%로 나타난 데 比하여, 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 投與한 實驗群에서는 농도의 增加에 따른 腫瘍細胞의 colony形成抑制效果가 나타났다. 竹葉石膏湯加減方 抽出液 10^{-7}에서 10^{-3} ㎎/㎖의 投與는 colony形成抑制效果를 뚜렷하게 나타내지는 못하였지만, 0.01㎎/㎖이상의 농도에서는 63.4, 73.2, 71.2%의 colony形成抑制效果를 보였으며, 0.05㎎/㎖의 농도에서는 각각 62.7, 69.3, 68.4%의 colony形成抑制를 나타내 농도증가에 따른 抗癌效果를 보인 것으로 나타났으며, 0.1㎎/㎖의 농도에서는 대략 60% 정도의 癌細胞成長抑制效果를 보였다(Fig. 1).

2) SRB assay에 의한 實驗

竹葉石膏湯加減方 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, 증류

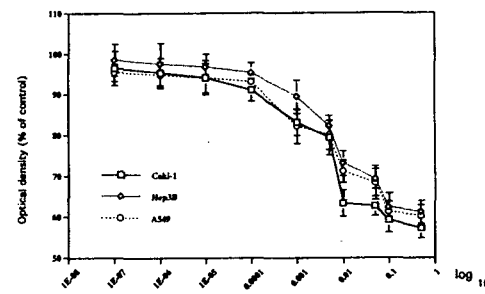


Fig. 1. The change of colony forming efficiency of Caki-1 cells, hep3B and A549 cells after exposure to the extract of JST. Values are expressed as percentages of control levels. n=9

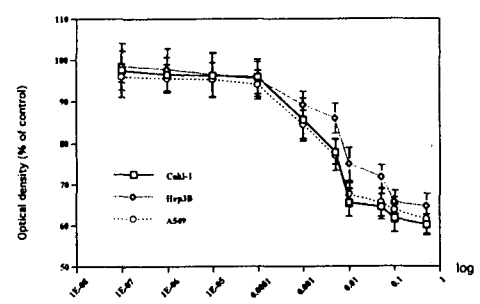


Fig. 2. The change of antitumoral cytotoxicity of Caki-1 cells, hep3B and A549 cells after exposure to the extract of JST. Values are expressed as percentages of control levels. n=9.

수를 投與한 對照群에서는 510㎚에서 흡광도가 각각 97.5, 98.4, 95.9%로 나타났으나, 竹葉石膏湯加減方 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 나타냈다. 竹葉石膏湯加減方 抽出液 10^{-7}에서 10^{-3}㎎/㎖의 投與는 흡광도의 減少率이 현저하지는 않지만 減少하는 傾向을 보였으며, 0.05㎎/㎖ 농도에서는 각각 64.2, 71.4, 65.2%의 흡광도를 보여 癌細胞成長을 抑制하는 效果를 농도증가에 따라 현저하게 나타냈으며, 0.1㎎/㎖의 농도에서는 각각 대조군에 비하여 61.4, 65.3, 63.4%의 흡광도를 보여 抑制效果가 뚜렷하게 나타나는 結果를 보였다(Fig. 2).

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 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果에 대한 실험을 실시하였다. 腹水癌細胞腫瘍의 경우에 竹葉石膏湯加減方 抽出液만을 투여한 실험군에서는 약간의 평균수명 延長效果를 나타냈으나 뚜렷한 抗腫瘍效果를 나타내지는 못하였다(Table 3). 抗癌化學療法劑인 MMC 0.5㎎/㎏을 투여한 결과, 마우스의 평균생존기간을 26% 延長하는 效果를 나타냈으나 30일 이상 생존한 마우스는 1마리도 나타나지 않았다(Table 4).

ascites form of Ehrlich carcinoma에 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC을 併用投與한 후 30일 동안 관찰한 결과 竹葉石膏湯加減方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간 증가하는 경향을 보였으며, 30일 이상 생존하는 마우스도 늘어나는 결과를 나타냈다. 60일 동안 관찰한 결과에서도 비슷한 결과를 보였으며, 특히 竹葉石膏湯加減方 抽出液 200㎎/㎏와 MMC 0.1㎎/㎏를 투여한 군에서는 마우스의 평균생존기간이 35% 증가하였으며, 또한 각각 200㎎/㎏과 0.05㎎/㎏을 투여한 군에서는 30일이상 생존한 마우스가 5/12로 증가하는 결과를 보였다(Table 5, 6).

Table 3. Antitumor activities of the ethanol extract of JST on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

Dose(㎎/㎏)	Ad. Route	Mean survival days[a]	T/C[b]	30 days survival/ No. of tested mice
0	P.O.[c]	19.7±0.8	100.0	0/12
50	P.O	20.4±0.8	103.5	0/12
100	P.O	20.9±0.9	106.1	0/12
200	P.O	22.3±0.7*	113.2*	0/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10^6). JST was orally administered daily for 10days 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.

JST : aquaous extract of *Jukyeopseokgotanggagambang*

[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 administered

* : Significantly different from the control, $p < 0.05$

Table 4. Antitumor activities of MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

Dose(mg/kg)	Ad. Route	Mean survival days[a]	T/C[b]	30 days survival/ No. of tested mice
0	I.P.[c]	18.9±0.8	100	0/12
0.01	I.P.	19.3±1.1	102	0/12
0.1	I.P.	21.5±1.0*	113.8*	0/12
0.5	I.P.	23.8±1.8**	126.0**	0/12

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10^6). JST was orally administered daily for 10days 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.

JST : aquaous extract of *Jukyeopseokgotanggagambang*

[a] Each value represents the mean±SE of 12 mice

[b] Mean survival time of treated mice/mean survival time of control × 100

[c] Saline was intraperitoneally administered

*, ** : Significantly different from the control, $p < 0.05$, $p < 0.01$

Table 5. Antitumor activities of the ethanol extract of JST and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

JST + MMC Dose(mg/kg)	Ad. Route	Mean survival days[a]	T/C[b]	30 days survival/ No. of tested mice
0+0	P.O+I.P.[c]	19.5±0.9	100.0	0/12
0+0.05	P.O+I.P.	20.1±1.1	103.1	0/12
50+0.05	P.O+I.P.	21.3±1.4	109.2	0/12
100+0.05	P.O+I.P.	23.5±1.2 *	120.5 *	3/12 *
200+0.05	P.O+I.P.	25.1±1.7 **	128.7 **	5/12 **

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10^6). JST was orally administered daily for 10days 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.

JST : aquaous extract of *Jukyeopseokgotanggagambang*

[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

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

2) Ehrlich carcinoma의 solid form에 대한 抗腫瘍效果

竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果를 마우스의 solid form of Ehrlich carcinoma에 실시한 결과, 腫瘍細胞를 이식한 16일 후 腫瘍을 적출하여 腫瘍의 중량을 측정한 결과 대조군에서는 2.71±0.20g이었으며, 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 투여량을 증가할수록 腫瘍의 크기가 감소하는 效果를 나타냈다. 특히 200mg/kg의 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 투여하였을 때 28.4%의 腫瘍크기감소율을 나타내었다.

Table 6. Antitumor activities of the ethanol extract of JST and MMC on ascites form of Ehrlich carcinoma in mice

JST + MMC Dose(mg/kg)	Ad. Route	Mean survival days[a]	T/C[b]	30 days survival/ No. of tested mice
0 + 0	P.O + I.P.[c]	19.4±1.1	100.0	0/12
0 + 0.1	P.O + I.P.	21.6±1.0	111.3	0/12
50 + 0.1	P.O + I.P.	24.1±1.5	124.2	1/12
100 + 0.1	P.O + I.P.	25.1±1.9*	129.4 *	2/12 *
200 + 0.1	P.O + I.P.	26.2±2.3**	135.1 **	3/12 **

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells(5×10^6). JST was orally administered daily for 10days 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.

JST : aquaous extract of Jukyeopseokgotanggagambang

[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

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

Table 7. Antitumor activities of the ethanol extract of JST or MMC on solid form of Ehrlich carcinoma in mice

Treatment	Dose(mg/kg)	Ad. Route	Average tumor weight(g)[a]
DDW	0	P.O[b]	2.71±0.20
JST	50	P.O	2.31±0.16*
JST	100	P.O	2.14±0.11*
JST	200	P.O	1.94±0.13**
DDW	0	I.P.[c]	2.73±0.12
MMC	0.05	I.P	2.46±0.21
MMC	0.1	I.P	2.34±0.22
MMC	0.2	I.P	2.13±0.14*
MMC	0.5	I.P	1.83±0.12**

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

JST : aquaous extract of *Jukyeopseokgotang-gagambang*

[a] Each value represents the mean±SE of 10 mice

[b] Water was orally administered

[c] Saline was intraperitoneally administered

*, ** : Significantly different from the control $p<0.05$, $p<0.01$

MMC의 單獨投與시에도 0.5mg/kg를 투여하였을 때 유의하게 腫瘍의 크기가 감소하는 결과를 보였다(Table 7).

竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 併用投與시는 이들 각자를 單獨投與하였을 때보다도 抗腫瘍效果가 뚜렷하게 나타나 腫瘍의 크기가 현저하게 감소하는 결과를 보였다(Table 8).

3) Lysosomal enzymes에 대한 效果

竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 투여로 인한 Ehrlich ascites carcinoma cell의 lysosomal enzymes에 대한 변화는 10^7개의 細胞로부터 얻

Table 8. Antitumor activities of the ethanol extract of JST and/or MMC on solid form of Ehrlich carcinoma in mice

Treatment	Dose(㎎/kg)	Ad. Route	Average tumor weight(g)[a]
JST+MMC	0+0	P.O[b]+I.P.[c]	2.75±0.21
JST+MMC	0+0.1	P.O+I.P.	2.42±0.22
JST+MMC	50+0.1	P.O+I.P.	2.12±0.16
JST+MMC	100+0.1	P.O+I.P.	1.86±0.14*
JST+MMC	200+0.1	P.O+I.P.	1.56±0.15**
JST+MMC	0+0	P.O[b]+I.P.[c]	2.75±0.21
JST+MMC	0+0.2	P.O+I.P.	2.15±0.21
JST+MMC	50+0.2	P.O+I.P.	1.87±0.16*
JST+MMC	100+0.2	P.O+I.P.	1.67±0.15**
JST+MMC	200+0.2	P.O+I.P.	1.56±0.14**

Tumor cells were inoculated subcutaneously into the right groin of mice. JST was administerd 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.

JST : aquaous extract of *Jukyeopseokgotang-gagambang*

[a] Each value represents the mean±SE of 10 mice

[b] Water was orally administered

[c] Saline was intraperitoneally administered

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

Table 9. Effects of the ethanol extract from JST and/or MMC on the activity of lysosomal enzymes in Ehrlich ascites carcinoma cell

Treatment	Dose(㎎/kg)	Activities of lysosomal enzymes[a]		
		acid deoxyribonuclease	β-Glucuronidase	Acid phosphatase
JST+MMC	0[b]+0[b]	6.5±0.5	12.1±0.7	21.5±1.8
JST+MMC	100+0	7.4±0.6	13.9±0.8	25.2±1.5
JST+MMC	200+0	8.4±0.5c	15.4±0.7[c]	26.6±1.0[c]
JST+MMC	0+0.1	7.1±0.7	13.5±1.2	24.1±1.2
JST+MMC	100+0.1	9.2±0.9	17.4±0.9*	28.1±1.2*
JST+MMC	200+0.1	11.1±0.8*	21.2±1.1**	30.1±1.1**
JST+MMC	0+0.2	8.6±0.9	14.9±1.1	25.6±1.3
JST+MMC	100+0.2	10.3±1.0	17.8±1.0*	27.1±1.0*
JST+MMC	200+0.2	12.8±0.6**	21.3±0.9**	33.2±1.2**

Mice were inoculated intraperitoneally with tumor cells. JST 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.

JST : aquaous extract of Jukyeopseokgotanggagambang

[a] Each value represents the mean±SE of 12 mice. Enzyme activity;acid deoxyribonuclease in ㎍ total P liberated/107 cells/15min, β-glucuronidase in ㎍ p-nitrophenol liberated/107 cells/15min, acid phosphatase in ㎍ inorganic P liberated/107 cells/15min.

[b] Control was orally administered water and intraperitoneally administered saline.

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

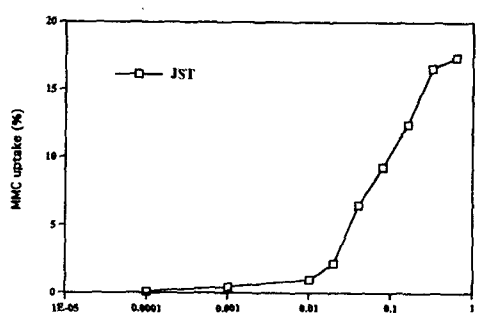
*, ** Significantly different from the MMC value, $p<0.05$, $p<0.01$

어진 결과로 표현하였다. 원심분리로부터 얻은 비침전층 분획에 나타난 acid deoxyribonuclease, β-glucuronidase, acid phosphatase의 총 활성도는 MMC 또는 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 單獨投與보다 MMC와 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 併用投與한 경우에 증가하는 效果가 더욱 현저하게 나타났다(Table 9).

4) MMC uptake에 대한 效果

MMC를 單獨으로 腫瘍細胞에 투여하였을 때, MMC는 서서히 腫瘍細胞내로 uptake되는 결과를 나타내었으며, 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 併用投與하였을 때는 용량의존적으로 MMC의 uptake가 약간 증가하는 양상을 보였다.

MMC는 0.05㎎/㎖의 농도에서 細胞毒性效果를 나타냈으며, 같은농도의 竹葉石膏湯加減方 抽出液은 單獨으로는 거의 細胞毒性效果가 效果的으로 나타나지 않았다. 10분동안 竹葉石膏湯加減方 抽出液로 전처리한 다음 MMC에 노출하면 MMC의 毒性效果가 증가하는 결과를 보였다(Fig. 3).



Concentration of JST (㎎/㎖)

Fig. 3. Effect of the JST aquaous extract on the uptake of MMC into Ehrlich carcinoma cells. Cells were incubated with varying concentrations of JST for 10min and then exposed to MMC(0.01㎎/㎖) for 30 min. *Each value represents the mean of 6 experiments.*

Ⅳ. 考 察

惡性腫瘍을 가리키는 癌은 어떠한 原因에 의해 生體의 調化가 무너져 결국 체내 細胞의 일부가 癌細胞로 轉化되어 그 癌細胞의 增殖에 의해서 숙주가 여러가지 害를 받게 되는 질병이다[2,42,44,48].

腫瘍의 原因에 있어서 西洋醫學에서는 癌의 發生과 進展에 대해 많은 경우 外因에 着眼하여 自然環境 가운데 있는 發癌物質의 硏究에 力點을 두고 있으며, 여기에 內分泌學, 免疫學, 遺傳子學 등 內因과 관련시켜 硏究를 하고 있는데[49], 韓醫學에서는 情緖의 過度한 變化와 傷害가 臟腑機能의 失調를 일으키는 것을 가장 중요한 癌發生의 病因으로 생각하고 있다[49].

最近 癌의 治療는 手術療法, 放射線療法 등의 局所的 療法과 化學療法, 免疫療法 등 全身療法으로 분류할 수 있는데[2,16,85], 化學療法은 전신적인 治療로써 活用度가 비교적 높은 반면, 癌細胞 뿐만 아니라 正常細胞에까지도 毒性을 나타내는 등 적지 않은 문제를 갖고 있다[12,13,14,45,46,47,59,60].

韓醫學에서 癌의 治療는 氣滯, 血瘀, 痰飮, 濕聚, 熱毒 등의 證型에 따른 活血化瘀, 化痰軟堅, 淸熱解毒, 行氣散結, 以毒攻毒 등의 祛邪法과 健脾益氣, 滋補肝腎, 滋陰溫陽, 理氣和血 등의 扶正法을 응용하는데, 病程에 따라 初期에는 攻法을, 中期에는 攻補兼施를, 末期에는 扶正을 治療원칙으로 한다[5,8,9,10,11,13,37,61,62].

癌進展의 病機나 病程에 있어서 火와 熱毒으로 因한 耗傷陰津 등의 病證은 흔히 볼 수 있다

38,39,40,41,76,78). [素問 至眞要大論][77]에서 '諸痛瘍瘡 皆屬于心' 이라하여 腫瘍을 火를 主官하는 心과 聯關시켰고, 金元代의 劉河間[79,82]은 '瘡瘍者 火之屬' 이라하여 瘡, 瘍, 痒, 腫이 모두 火毒과 有關함을 밝혔다. 또한 대다수의 腫瘍은 感情의 抑鬱로 火가 생기고, 그 鬱火가 血瘀와 凝結되어 發生된다고 인식하고 있는데, 임상적으로 腫瘍환자에게 熱鬱火毒의 實熱證候가 나타나면 腫瘍이 進展되고 있음을 의미한다[61]. 腫瘍환자에게 있어서 熱毒은 자주 볼 수 있는 증후 중 하나인데, 熱毒이 內蘊하면 陰을 損傷시키고 臟腑와 營血을 灼傷하며, 특히 化學療法 이후에 口腔咽喉部 乾燥, 粘膜 爛潰瘍, 大便乾燥, 舌紅少津, 脈細, 皮膚發赤, 發熱疼痛, 局部紅腫疼痛, 咳嗽少痰, 胸悶心悸, 煩燥不安 등의 辨證上 熱毒過盛, 津液受傷이 초래되는 경우가 적지 않다[36,37,38,39,40,41]. 이처럼 癌 자체에 基因하건 抗癌化學療法劑의 副作用으로 加重되건, 熱毒은 그 자체로나 2차적인 波及影響으로나 생체에 매우 불리한 요소임에 틀림없다.

이에 著者는 熱毒이 內蘊하여 陰津이 耗損되고 氣陰兩傷된 경우에 韓醫學的인 독특한 治療法인 養陰生津法이 중요한 의미가 있을 것으로 생각하였다.

이와 관련된 報文으로 張[83]은 養陰生津法이 腫瘍治療의 중요한 방법이라고 하였고, 徐[84]도 癌治療의 大法은 養陰生津法을 爲主로 하면서 理氣散結, 軟堅化痰, 益氣化瘀, 溫腎納氣 등으로 補佐한다고 하였으며, 張[85]은 癌症이 日久하여 陰虛津虧하면 養陰生津法을 活用해야 하는데, 玄蔘, 天門冬, 麥門冬, 百合, 天花粉, 生地黃, 玉竹, 西洋蔘 등을 選用한다 하였다. 한편程[84]은 肺癌과 같은 胸部腫瘤에 放射線治療로 放射線性 肺炎이 나타나는 경우에 抗生劑나 호르몬劑 모두 無效하였으나 竹葉石膏湯을 투여한 결과 양호한 효과를 나타내었다고 보고하였다.

竹葉石膏湯은 東漢代 張[22]의 〈傷寒論〉의 處方으로 熱病 後 餘熱이 내려가지 않고 氣陰兩傷한 경우 淸熱生津, 益氣和胃시키므로 消渴病, 小兒의 夏季熱, 肺炎, 麻疹, 百日咳, 日射病, 氣管支喘息, 肺氣腫 등에 應用하며[17,18,19,20,21,22,23], 최근에는 癌症에도 活用하고 있다[7, 84].

竹葉石膏湯加減方의 構成藥物에 대해 살펴보면, 石膏는 淸熱降火, 除煩止渴하여 急性肺炎 등 肺熱로 因한 喘證과 熱毒壅盛의 癰疽瘡瘍에 응용하고[24,25,26,27], 麥門冬은 滋陰淸熱, 潤肺生津, 强心利尿하여 陰虛內熱, 津枯口渴, 熱病傷津한 燥咳, 痰稠, 腸燥便秘 등에 응용한다[24,25,26,27].

生地黃은 淸熱凉血, 生津止渴의 효능이 있으며[24], 일체 癌證의 貧血, 衰弱症에 응용한다[25].

天花粉은 淸熱生津, 淸肺化痰, 消腫排膿의 효능으로써[24] 熱病傷津口渴, 肺熱咳嗽에 適用하며 熱病의 後期에 竹葉石膏湯의 보조약으로써 사용하여 降火, 生津, 潤燥하는데[26,35], 近來에는 動物實驗에서 乳腺癌 등에 대해 抑制作用이 있어 惡性葡萄胎, 絨毛膜上皮癌 등의 腫瘍에 應用한다[4].

沙蔘은 潤肺止咳, 養胃生津하여 肺陰虛의 咳嗽, 發熱性 疾患 回復期의 衰弱, 脫水, 胃陰虛의 증상이 있을 때 應用하며[24,26], 玄蔘은 養陰生津, 瀉火解毒의 효능이 있어, 頸部 淋巴腺結核, 肺熱咳嗽, 肺結核, 모든 癰腫, 瘰癧 등에 이용한다[22,24,26,35].

夏枯草는 淸熱散結, 淸肝明目, 利尿, 消炎, 消腫의 효능이 있으며[26,27,30,35], 水煎液 농축물의 JTC-26에 대한 抑制率이 50 70%였고, 일반적인 湯液은 小鼠肉瘤-180과 Ehrlich 腹水癌의 生長에 대해 抑制작용이 있다[30].

枸杞子는 滋補肝腎, 益精明目하여 특히 陰虛인 경우에 사용되며 免疫작용과 造血기능을 증진시키고[31,32,33,3435], 女貞子는 滋補肝腎시켜 免疫기능을 증가시키며, 抗癌의 효능도 있다[26,31,32,33,34].

金銀花는 淸熱解毒, 凉血止痢, 散風熱의 효능이 있어 熱毒으로 인한 瘡癰, 內癰, 瘤, 瘰癧, 痔漏 등에 응용하는데[22,24,26,30,35], 연구보고[30]에 의하면 체외의 平板法 實驗에서 腹水癌細胞에 대해 抑制작용이 있고, 또한 박테리오파아지 抑制작용이 있는데, 이는 腫瘍抑制活性이 있음을 보여준다. 體內實驗에서 小鼠肉瘤-180에 대한 抑制率이 22.2%로 나타났으며, 鼻腔腺癌, 乳腺癌, 子宮頸部癌과 그 轉移癌에 응용하고 있다.

龍葵는 淸熱解毒, 散結消腫, 和血의 효능이 있으며 咽喉腫痛, 癰腫, 각종 瘤, 胃癌, 食道癌, 喉頭癌, 鼻癌, 乳腺癌등 각종 癌에 응용한다[26,27,30,35]. 또한 Ehrlich 腹水癌, 淋巴性白血病, 肉瘤-180, 肉瘤-37 등의 腫瘍細胞를 접종한 흰생쥐에게 投與하여 모든 腫瘍에 대해 抑制作用이 있었으며, 動物體內實驗에서 胃癌抑制作用이 있었고, 메틸블루 시험관 실험에서 白血病 등 腫瘤細胞에 抑制作用이 있었다[30]. 또한 半枝蓮과 紫草를 배합한 處方으로 惡性葡萄胎를 治療했고, 수술절제와 화학방사선요법을 배합하여 子宮絨毛膜癌, 卵巢腫瘍, 肝癌 등에 응용하여 治療한 예가 있으며, 單味로써 纖維肉瘤에 응용하여 1년 동안 재발하지 않게 한 예도 있다[35].

鬼箭羽는 破血, 通經, 殺蟲의 효능으로 瘀血停滯, 婦人月經不調, 癥瘕 등에 적용하며, 근래에는 肝癌, 乳癌, 子宮癌 등의 癌腫에 응용되고 있다[24,35].

즉, 竹葉石膏湯 加減方은 淸熱生津, 益氣和胃시키는 효능으로 氣陰耗傷하여 虛熱이 발생하는 病證에 적용하는 竹葉石膏湯중에서 肺·胃經으로 入하여 淸熱降火·除煩止渴시키는 石膏와[24] 心·肺·胃經으로 入하여 滋陰淸熱·潤肺生津시키는 麥門冬을 取하고[24], 여기에 養陰生津시키어 退虛熱시킬 수 있는 生地黃, 沙蔘, 玄蔘과 降火淸熱시킬 수 있는 天花粉, 金銀花, 生地黃, 夏枯草, 滋補肝腎시킬 수 있는 枸杞子, 女貞子와 抗癌효과가 있는 것으로 보고되고 있는 生地黃, 天花粉, 夏枯草, 女貞子, 龍葵, 鬼箭羽 등을 가미하여 주로 肺胃經에 歸屬될 수 있는 癌症 中에서 熱毒內蘊의 病程을 거치며, 더불어 抗癌化學療法劑의 副作用으로 因하여 耗傷陰津의 상태가 더욱 加重된 경우에 養陰淸熱, 抗癌解毒하는 方劑로서 임상응용의 타당성이 있을 것으로 여겨진다.

이에 著者는 竹葉石膏湯加減方의 抗癌效果를 究明하고자 抗癌化學療法劑인 MMC와의 比較 및 併用投與와 關聯된 實驗을 實施하였다.

本 實驗에서는 竹葉石膏湯加減方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, 竹葉石膏湯加減方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 나타냈다(Fig. 1, 2).

마우스에서 ascites form of Ehrlich carcinoma에 대한 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果에 대한 실험을 실시하였는데, 腹水癌細胞腫瘍의 경우에 竹葉石膏湯加減方 抽出液만을 투여한 실험군에서는 별다른 抗腫瘍效果를 나타내지 못하였다(Table 3). 抗癌化學療法劑인 MMC 0.5㎎/㎏을 투여한 결과 마우스의 평균생존기간을 26% 연장하는 效果를 나타냈으나 30일 이상 생존한 마우스는 1마리도 나타나지 않았다(Table 4).

Ascites form of Ehrlich carcinoma에 竹葉石膏

湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하여 30일 동안 관찰한 결과 竹葉石膏湯加減方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간증가하는 경향을 보였으며, 30일 이상 생존하는 마우스도 늘어나는 결과를 나타냈다. 60일 동안 관찰한 결과에서도 비슷한 결과를 보였으며, 특히 竹葉石膏湯加減方 抽出液 200㎎/kg과 MMC 0.1㎎/kg를 투여한 군에서는 마우스의 평균생존기간이 35% 증가하였으며, 각각 200㎎/kg과 0.05㎎/kg을 투여한 군에서는 30일이상 생존한 마우스가 5/12로 증가하는 결과를 보였다(Table 5, 6).

竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 抗腫瘍效果를 마우스의 solid form of Ehrlich carcinoma에 실시한 결과 腫瘍細胞를 이식하고 16일 후에 腫瘍을 적출하여 腫瘍의 중량을 측정한 결과 대조군에서는 2.71±0.20g이었으며, 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 투여량을 증가할수록 腫瘍의 크기가 감소하는 效果를 나타냈다. 특히 200㎎/kg의 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 투여하였을 때 28%정도의 腫瘍크기감소율을 나타내었다. MMC의 單獨投與시에도 0.5㎎/kg를 투여하였을 때 유의하게 腫瘍의 크기가 감소하는 결과를 보였다(Table 7). 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 併用投與시는 이들 각자를 單獨投與하였을 때보다도 抗腫瘍效果가 뚜렷하게 나타나 腫瘍의 크기를 현저하게 감소시키는 결과를 보였다(Table 8).

竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 투여로 인한 Ehrlich ascites carcinoma cell의 lysosomal enzymes에 대한 변화는 10^7개의 細胞로부터 얻어진 결과로 표현하였다. 원심분리로부터 얻은 비침전층 분획에 나타난 acid deoxyribonuclease, β-glucuronidase, acid phophatase의 총 활성도는 MMC 또는 竹葉石膏湯加減方의 單獨投與보다 MMC와 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 併用投與한 경우에 증가하는 效果가 더욱 현저하게 나타났다(Table 9).

한편 MMC uptake에 대한 효과에서는 MMC를 單獨으로 腫瘍細胞에 투여하였을 때는 MMC가 서서히 腫瘍細胞내로 uptake되는 결과를 나타내었으며, 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 併用投與하였을 때는 용량의존적으로 MMC의 uptake가 약간 증가하는 양상을 보였다. MMC는 0.05㎎/㎖의 농도에서 細胞毒性效果를 나타냈으며, 같은 농도의 竹葉石膏湯加減方 抽出液은 單獨으로는 거의 細胞毒性效果가 效果적으로 나타나지 않았다. 10분 동안 竹葉石膏湯加減方 抽出液으로 전처리한 다음 MMC에 노출하면 MMC의 毒性效果가 증가하는 결과를 보였다(Fig. 3).

본 연구를 통하여 竹葉石膏湯加減方의 ethanol 抽出液은 MMC의 抗腫瘍效果를 증가시키는 效果를 보였다. 또한 竹葉石膏湯加減方 抽出液은 마우스에서 solid form of Ehrlich ascites carcinoma에 대한 腫瘍抑制效果를 나타내었으나 ascites form의 腫瘍에 대해서는 뚜렷한 抑制效果가 관찰되지 않았다. 생존기간 실험에서는 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與시 ascites tumor에 대하여 MMC를 單獨으로 투여하였을 때와 비교하여 유의하게 생존기간이 증가되는 결과를 보였다. Shimanoto[89] 등은 생존율실험에서 plasmin이 抗腫瘍效果를 보이지는 않았지만 plasmin과 MMC를 併用投與하였을 때는 MMC를 單獨으로 투여하였을 때보다도 생존기간을 더욱 연장하는 效果를 보였는데, 이러한 작용의 기전에 대하여 plasmin은 in vivo상태에서 腫瘍의 lysosomes을 불안정화시키고, plasmin의 併用投與로 lysosomal enzymes의 유리를 증가시키므로써 MMC의 細胞毒性效果를 향상시키는 것으로 결론지었다. 또한 이와 같은 맥락에서 竹葉石膏湯加減方 抽

出液이 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes을 불안정화시킨다는 것을 예측할 수 있겠다. Lysosome은 細胞質 속에 있는 膜으로 둘러싸인 球形의 小胞로써 細胞內外의 필요없게 된 物質을 加水分解시키는 acid phosphatase, glucuronidase, sulfatase, ribonuclease, collagenase 등 약 70여종의 효소를 함유하고 있다. 이와 같은 효소는 細胞以外의 부분에 있어서는 有害한데, lysosome의 기능이 손상받게 되면 함유된 효소가 細胞內로 유리되어 細胞에 손상을 주며, 細胞內의 쓰레기를 처리하지 못함으로써 個體에 不利한 環境이 造成되는 것이다[81]. 竹葉石膏湯加減方 抽出液은 예상했던대로 lysosomal enzymes의 활성을 증가시켰으며, 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하였을 때 腫瘍細胞의 상층액부분에서 lysososmal enzymes활성이 MMC單獨投與하여 얻어진 것보다 훨씬 강하게 나타났다.

결론적으로 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하였을 때 ascites tumor에 대한 抗腫瘍效果가 나타나는 것은 적어도 부분적으로는 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 lysosomal labilizing action에 기인한다고 생각되며, 또한 竹葉石膏湯加減方 抽出液이 MMC의 腫瘍細胞 내로의 침투를 증가시켜 MMC의 細胞毒性效果를 증가시킨 결과로 思料된다.

이러한 결과로부터 竹葉石膏湯加減方 抽出液이 현저한 抗腫瘍效果가 없다고 할지라도 竹葉石膏湯加減方 抽出液이 MMC의 抗癌效果를 향진시키거나 그 副作用을 감소시켜 生存率을 높이는 것으로 생각된다. 앞으로 MMC의 副作用에 대한 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 效果와 竹葉石膏湯加減方 抽出液의 活性機轉에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 結　論

竹葉石膏湯加減方 抽出液의 腫瘍細胞의 形成과 成長抑制에 미치는 效果를 알아보기 위하여 colony形成抑制實驗과 SRB assay를 시행하고, 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC의 單獨 혹은 併用投與가 Ehrlich carcinoma cell에 미치는 抗腫瘍效果, 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes의 活性에 미치는 影響, MMC의 uptake에 대한 效果 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 竹葉石膏湯加減方 抽出液을 投與한 Caki-1 cell, hep3B 및 A549에 대한 colony形成抑制實驗과 SRB assay에서는 竹葉石膏湯加減方 抽出液이 농도의존적으로 腫瘍細胞의 成長을 抑制한 것으로 나타났다.

2. Ascites form of Ehrlich carcinoma에 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與한 결과, 竹葉石膏湯加減方 抽出液에 의하여 MMC의 抗腫瘍效果가 약간 증가하는 경향을 보였으며, 30일 이상 생존하는 마우스도 늘어나는 결과를 나타냈다. 특히 竹葉石膏湯加減方 抽出液 200mg/kg과 MMC 0.1mg/kg을 투여한 군에서는 마우스의 평균생존기간이 35%이상 증가하였다.

3. Solid form of Ehrlich carcinoma에 대한 抗腫瘍效果 실험에서 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하였을 경우, MMC를 單獨投與하였을 경우보다 腫瘍의 크기가 현저하게 감소하였다.

4. Ehrlich ascites carcinoma cell에 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하였을 경우, MMC를 單獨投與하였을 경우보다 lysosomal enzymes의 활성이 훨씬 강하게 나타났다.

5. 竹葉石膏湯加減方 抽出液과 MMC를 併用投與하였을 경우, MMC의 腫瘍細胞로의 uptake가 약간 증가하였다.

이상의 결과로부터 竹葉石膏湯加減方 抽出液이 자체로는 현저한 抗腫瘍效果가 없다고 할지라도 MMC의 효과를 항진시키며 腫瘍을 발생시킨 마우스의 생존율을 증가시키는 것으로 보아 간접적인 抗腫瘍效果가 있는 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 楊維傑 : 黃帝內經素問靈樞譯解, 서울, 成輔社, p.3, 266, 1980.
2. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.1~2, p.27, 95, 96, 126, 1992.
3. 姜錫峰 : 白何首烏와 黃精이 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 석사학위논문, 1986.
4. 歐明 外 : 抗腫瘤本草圖譜, 香港, 商務印書館, p.10, 1990.
5. 安徽中醫學院 : 中醫臨床手冊, 서울, 成輔社, p.219, 1983.
6. 崔昇勳 : 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論, 서울, 大韓韓方腫瘍學會誌 1(1):11 26, 1995.
7. 孫桂芝 : 常見腫瘤診治指南, 北京, 中國科學技術出版社, p.25, 1991.
8. 上海中醫學院 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.621~635, 1986.
9. 楊寶仁 : 癌症的中醫治療, 河北省, 河北科學技術出版社, pp.1, 6~7, 12~22, 1992.
10. 郁仁存 外 : 癌症診治康復 350問, 北京, 金盾出版社, pp.98~105, 1989.
11. 陳貴廷 外 : 實用 中西醫結合診斷治療學, 北京, 中國科學技術出版社, pp.1370~1400, 1991.
12. 朴文鎬 外 : 內科學, 서울, 博愛出版社, pp.2446~2450, 1976.
13. 張代劍 : 中西醫結合治療癌症, 山西省, 山西人民出版社, pp.1~20, p.25, 1984.
14. 崔昇勳 : 암은 중의약으로 치료될 수 있는가?, 中國國家中醫藥管理局 編, p.6.
15. 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.
16. 허만석 : 조기위암에 관한 임상적 고찰, 대한암학회지, 22(2):334~340, 1990.
17. 冉小峰 : 歷代名醫良方注釋, 科學技術文獻出版社, pp.126~127, 1983.
18. 汪 昂 : 國譯醫方集解, 大星出版社, pp.451 452, 1984.
19. 江克明 · 包明蕙 : 方劑大辭典, 서울, 醫聖堂, p.431, 1991.
20. 姜鎭春 · 金弘起 : 傷寒學, 서울, 一中社, pp.268~270, 1992.
21. 康舜洙 外 : 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp.191~192, 1992.
22. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, p.358, 1988.
23. 蔡仁植 : 傷寒論譯詮, 서울, 高文社, p.495, 575, 1991.
24. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 永林出版社, pp.229, 283~284, 297~299, 321, 481, 1989.
25. 申佶求 : 申氏本草學, 壽文社, pp.88~89, 1988.
26. 陸昌洙 外 : 韓藥의 藥理 · 成分 · 臨床用, 서울, 癸丑文化社, pp.380~382, 392~395, 419~420, 746~751, 766, 852~854, 986, 1031, 1982.

27. 金在佶 : 原色天然藥物大辭典 上卷, 南山堂, p.155, 171, 1989.
28. Bridges B.A. : Short term screening tests for carcinogens. Nature, 261:195 200, 1976.
29. Heidelberger C. : Chemical carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem, 44:79 121, 1975.
30. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, p.103, 185, 232, 1987.
31. 明 · 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp.2101~2102, 2111~2114, 1980.
32. 中華人民共和國衛生部 : 中華人民共和國藥典, 北京, 人民衛生出版社, p.31, 199, 1985.
33. 廣東中醫學院 : 中醫方藥學, 廣東省, 廣東人民衛生出版社, pp.179, 463~464, 1976.
34. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.130~133, 344~349, 1983.
35. 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.237, 325, 592, 630, 769, 1403, 1518, 1695, 1827, 1978.
36. 李 岩 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp.11~26, 1983.
37. 孟琳升 : 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, p.149, 197, 232, 1995.
38. 鞠永棕 : 고오스 약리학, 서울, 汎友社, pp.107~109, 1986.
39. 서울대의과대학 약리학교실 : 약리학, 서울, 고려의학, pp.667~703, 1994.
40. 金在完 外 : 醫藥品의 副作用과 相互作用, 서울, 三英社, pp.421~426, 1977.
41. 文國鎭 : 藥害, 서울, 一潮閣, pp.114~115, 1992.
42. 이중달 : 기본병리학, 서울, 고려의학, pp.163~171, 1991.
43. 朴春赫 : 黃花敗醬과 白花敗醬이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 博士學位論文, 1991.
44. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, pp.57~58, 225~256, 1991.
45. Fish B : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, Cancer, 54:2609, 1984.
46. Kim, S · H : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, J. Kor, Cancer Assoc, 21;11, 1989.
47. 공경덕 · 이상욱 · 한병훈 · 서승연 · 허만하 · 박병채 : 진행성 위암에 대한 5 FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과, 대한암학회지 22:144, 1990.
48. 景鴻基 : 癌은 완치될 수 있는가, 서울, 햇빛출판사, pp.22~24, 42, 191~193, 1987.
49. 余桂清 : 中醫와 中西醫 結合에 依한 癌의 豫防治療에 對한 硏究槪況, 서울, 東洋醫學, 22(3):68 74, 1996.
50. 孫泰重 : 病理學槪論, 서울, 高文社, p.227, 1979.
51. 金昌種 : 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72~74. 1988.
52. 洪元植 : 現代中共의 癌治療, 서울 英文社, pp.304~329, 378, 1980.
53. 王琦外 : 黃帝內經素門今釋, 서울, 成輔社, p.60, 182, 1983.
54. 河北醫學院 : 靈樞經 校釋, 中國, 人民衛生出版社, p.44, 66, 142, 246, 1982.
55. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.486~496, 720, 1988.
56. 申天浩 : 癌瘤 防治 硏究, 서울 成輔社, pp.25~29, 1984.
57. 錢伯文 : 腫瘤的 辯證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1~10, 48~63, 1980.
58. 郁仁存 : 中醫腫瘤學 上冊, 北京, 科學技術出版社, p.1~9, 1983.
59. 박재갑 : 인간생명과학, 서울, 서울대학교

출판부, pp.622~666, 1994.
60. 李文浩 外 : 內科學, 서울, 學林社, pp.2446 2479, 1986.
61. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, pp.19~31, 37~42, 72, 84~93, 121, 153~159, 1995.
62. 姜廷良 外 : 六味地黃湯防治腫瘤的 實驗研究, 中醫雜誌, 22(6):473~474, 1983.
63. 具立本 外 : 腫瘍의 化學療法治療에 따른 副作用에 대한 東醫學的 硏究, 서울, 東醫病理學會誌, 9(2):163~195, 1995.
64. 곽계호 外 : 腫瘍의 化學療法과 放射線療法의 副作用에 대한 韓方藥物療法, 東醫病理學會誌, 9(2):45~87, 1995.
65. 李丞燁 外 : 消積白朮散이 doxorubicin의 副作用 및 抗癌效果에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1996.
66. 曺賢珠 : 抗癌化學療法劑의 細胞毒性 및 腫瘍細胞의 라이소솜에 미치는 消遙散加味方의 影響, 圓光大學校 大學院, 1996.
67. 李炯柱 : 十全大補湯加味方이 抗癌化學療法劑의 細胞毒性 및 腫瘍細胞의 라이소솜에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1996.
68. 文炳河 外 : 氣丸이 抗 腫瘍 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):167~190, 1995.
69. 白泰鉉 外 : 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 관한 實驗的 硏究, 大韓韓方種藥學會誌, 1(1):141~166, 1995.
70. 尹星默 外 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):25~42, 1996.
71. 魯勳政 外 : 消積保中丸의 抗腫瘍 效果에 대한 實驗的 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):43~56, 1996.
72. 李淵月 外 : 消積白朮散을 投與한 各種 癌患者 242例에 대한 臨床的 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):101~112, 1996.
73. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 實驗的 硏究, 大田大學校 大學院, 1993.
74. 金剛山 : 氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長沮碍에 미치는 效果, 圓光大學校 大學院, 1992.
75. 李永燦 : 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 抗癌效果에 대한 硏究, 圓光大學校 大學院, 1993.
76. 賈立群 : 中醫藥防治癌症患者化療毒副反應的概況, 遼寧中醫雜誌, 4(1):44~47, 1989.
77. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學硏究院, p.177, 1981.
78. 張支義 外 : 惡性腫瘤化學治療, 上海, 上海科學技術出版社, p.192, 1981.
79. 李聰甫 外 : 金元四大醫家 學術思想의 硏究, 北京, 人民衛生出版社, pp.18~19, 1983.
80. 이문호 外 : 최근 한국의 질병변천, 대한의학협회지, 32(3):283~290, 1989.
81. 朴東基 : 生化學, 서울, 柳韓文化社, p.46, 1986.
82. 曹公壽 : 素問玄機原病式, 北京, 人民衛生出版社, p.34, 133, 1983.
83. 張毓玲 : 養陰生津法在腫瘤病治療中的應用, 浙江中醫學院學報, 14(1):20, 1990.
84. 程劍華 : 經方治療化療毒副反應, 中醫雜誌, 34(2):111~112, 1993.
85. 최정양 外 : 조기 위암, 대한 소화기병학회지, 25(5):853~859, 1993.
86. 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.

87. 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, p.365, 1975.

88. 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 tumor cell lines, J. Natl. Cancer Inst. 82 : 1113~1118, 1990.

89. Shimanoto M., Niitani H., Taniguchi T., Inagaki J., Kimura K. : Gann 60;33, 1969