

원저

蔘苓白朮散加味方の 抗癌 및 抗轉移 活性에 關한 研究

金聖勳* 全基石**

ABSTRACT

Study on Antitumor and Antimetastatic Effects of Samryongbakchulsankamibang

Sung-Hoon, Kim*, Ki-Seok, Jeon**

* Graduate School of East-West Medical School, Kyunghee University

** Oriental Medical College, Taejon University

To evaluate the antitumor activity, antimetastatic and immunomodulatory effects of samryongbakchulsankamibang(SBSK) studies were done experimentally. In cytotoxicity against P388, A549, SK-OV-3, B16-F10 and SK-MEL-2, concentration inhibiting cell growth up to below 40% of control was recognized at 10^{-3} g/ml of SBSK. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, the IC_{50} was shown 200-400 μ g/ml of SBSK. The T/C was 154% in SBSK-treated group in S-180 bearing ICR mice. The concentration inhibiting adhesion of A549 and B16-F10 to complex extracellular matrix up to below 30% of control was recognized at 5×10^{-4} , 1×10^{-3} g/ml of SBSK. In pumonary colonization assay with B16-BL/6, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in SBSK-treated group as compared with control group. In hematological changes in B16-BL/6 injected C57BL/6, numbers of WBC and platelet were not changed significantly in SBSK-treated groups.

In CAM and in vitro neovascularization assay, angiogenesis was inhibited significantly in SBSK-treated group as compared with control group. From above results it was concluded that SBSK could be usefully applied for the prevention and treatment of cancer.

Key Word : Samryongbakchulsankamibang, DNA topoisomerase-I, pulmonary colonization assay, T/C%, Chorioallantoic membrane assay

* 경희대학교 동서의학대학원

** 대전대학교 한의과대학

접수: 99. 7. 14 채택: 99. 8. 24 연락처: 김성훈 T. (02)961-9231

※ 본 연구는 1997년도 한의학연구원 2010 project 7-08-2-52-31 과제로 한의학연구원 연구비의 일부로 수행되었음

I. 緒 論

腫瘍이란 “個體를 構成하는 正常細胞가 여러 刺戟에 의해 遺傳子의 形質轉換이 發生하여 無節制한 增殖을 함으로써 形成된 變形細胞의 集團이라고 定義되며, 腫瘍細胞의 形態와 行動樣相에 따라 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 區分되는데 癌은 바로 惡性腫瘍에 해당한다²⁾. 癌은 1997년 韓國人 疾病 死因分類中 循環器 疾患에 이어 2位를 차지하는 難治病으로 認定되어 이 疾患의 退治를 위해 많은 勞力이 이루어져 왔다¹⁾.

西洋醫學에서는 癌 퇴치를 위해 直接的인 細胞毒性, 自然殺害(apoptosis), 細胞老化(cell senescence), 細胞週期(cell cycle), 細胞分化(cell differentiation) 및 免疫調節(immune modulation) 등의 研究를 通하여 多樣한 抗癌治療法의 開發을 試圖하여왔다^{2,39)}. 現在는 放射線療法, 化學療法이 一般的으로 癌細胞 抑制效果가 優秀하여 手術療法과 함께 癌治療에 가장 많이 活用되고 있다¹⁾.

그러나 이들은 治療效果와 더불어 人體의 正常組織과 器官에 對한 毒性이 強하여 患者에게 消化器 障礙, 骨髓機能抑制, 免疫機能低下, 炎症反應, 身體衰弱 等の 二次的인 副作用을 誘發하는 短點³⁰⁾이 있어 최근에는 韓藥으로부터 抗癌^{3,14)}, 抗轉移^{4,20)} 및 化學療法^{5,15)}과 放射線療法의 副作用 抑制效果^{6,11)} 등에 關한 研究가 比較的 活發히 進行되고 있다.

韓醫學에서는 癌의 治療에 關하여 《內經》⁷⁾의 “正氣存內 邪不可干”, “邪之所湊 其氣必虛”와 《外證醫安》¹⁶⁾의 “正氣虛則成岩” 등을 根據하여 正氣를 補強하는 扶正法이 자주 活用되고 있다. 扶正法은 辨證施治에 따라 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎 및 健脾益腎 등으로 區分되는데^{8,12)}, 癌患者에는 脾虛證으로 因한 消化障礙와 免疫機能低下가 많다^{31,32)}는 점에서 健脾益氣法이 자주 活用되고 있다. 中國에서는 四君子湯을 消化器癌⁹⁾과 肝癌⁸⁾에, 六君子湯을 未分化形肺癌¹¹⁾에, 益氣煎을 婦人科 癌³²⁾에, 理胃化結湯을 胃癌³¹⁾에 活用하여 有效했음을, 우리나라에서는 趙 等

¹⁴⁾이 蓼芩白朮散에 바탕을 둔 消積白朮散의 抗癌效果와 cisplatin에 대한 副作用 抑制效果를 報告하였으며, 臨床的으로도 蓼芩白朮散을 基本方으로 有效한 癌 治療 結果를 報告¹⁵⁾한 바가 있다.

蓼芩白朮散은 宋代 陳¹⁶⁾의 《太平惠民和劑局方》에서 “能補氣健脾 滲濕和胃 治脾胃氣虛而挾濕之證 飲食不消 或吐瀉 形體虛弱 四肢無力”이라고 收載된 以來 主로 脾胃虛弱으로 인한 病證에 應用되고 있다. 蓼芩白朮散의 實驗的 研究로 宋¹⁷⁾이 胃腸管運動 改善作用을, 李¹⁸⁾는 免疫調節機能을, 韓¹⁹⁾은 抗癌效果를, 李²⁰⁾ 等도 蓼芩白朮散에 數種의 藥物을 加味한 消積白朮散의 抗癌效果를 報告한 바가 있지만, 癌에 대해 보다 有效한 韓方療法을 開發하기 위해서는 既存의 處方보다 優秀한 蓼芩白朮散加味方의 開發이 切實한 實情이다.

이에 著者는 蓼芩白朮散 本方에 仙鶴草, 魚腥草, 白花蛇舌草 등을 加味한 蓼芩白朮散加味方의 抗癌 및 抗轉移 效果를 實驗的으로 究明하고자, 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生存比, A549와 B16-BL6 癌株에 대한 附着 沮止作用, 血管形成 沮害作用, 肺癌轉移 抑制效果 等を 測定하여 抗癌活性을 評價하였던 바 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A), C57BL/6 및 BALB/C 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(抗生劑 無添加, 三養飼料 Co.)와 물을 充分히 供給하고 室溫 22 ± 2℃를 계속 維持하면서 2 週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬

韓方病院에서 購入하여 精選한 것을 使用하였으며, 處方의 內容은 《方藥合編》²¹⁾에 기재된 蓼芩白朮散을 基本으로 加味 構成하였으며, 한 첩 分量은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of Kamisamyongbakchulsan(SBSK)

韓藥	生藥名	用量(g)
白朮	Atracylodes Rhizoma	5.625
白茯苓	Hoelen	5.625
人參	Ginseng Radix	5.625
甘草	Glycyrrhizae Radix	5.625
山藥	Discoreae Radix	5.625
白扁豆(炒)	Dollichoris Semen	2.81
蓮子肉	Nelumbinis Semen	2.81
薏苡仁	Coicis Semen	2.81
貫砂仁	Amomi semen	2.81
桔梗	Platycodi Radix	2.81
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusae Herba	8.0
魚腥草	Houttuniae Herba	6.0
仙鶴草	Agrimoniae Herba	6.0
總量		62.175

2. 方法

A. 抗癌性 探索

1) 試料의 製造

上記한 蓼芩白朮散味方의 2貼 分量(124.35g)을 各各 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000 ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24時間 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12時間을 凍結 乾燥하여 49.9g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter (0.22µm, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 P388(ATCC CCL 219) 白血病癌株와 A549 (ATCC CCL185) 肺癌株, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌株, SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 黑色腫 및 B16-F10 melanoma (ATCC CRC 6322)를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두

L-glutamine이 包含된 RPMI 1640培地에 5 6℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 포함하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10⁴units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) P388 癌株에 對한 細胞毒性 測定^{22,23)}

細胞毒性 實驗에서 logarithmic phase에 도달한 P388 細胞를 얻기 위하여 實驗 24 時間前에 36~37℃로 加溫한 medium을 넣은 culture dish에 P388 細胞를 2~3×10⁵cells/ml 濃度가 되게 調整하여 1日間 培養시킨 後, 約 0.8~1.0×10⁶cells/ml의 濃度가 되도록 P388 細胞 懸濁液을 만들었다. 細胞 懸濁液(4×10⁴cells/ml)을 100µl씩 96well plate에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에 培地에 溶解시키고 20分間 sonication한 後 試料를 0.25, 0.5, 1mg/ml등之 濃度로 만든 試料溶液 100µl를 加하여 實驗群으로 하였으며, 對照群 well(2√n : n=試料數)에는 細胞 懸濁液만을 넣고 37℃, CO₂ incubator에서 48時間 培養 후 MTT²²⁾法에 의하여 細胞數를 計算하였다.

4) A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989年에 美國의 國立癌研究所에서 藥物의 in vitro 抗癌活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B (SRB) assay 法²³⁾을 使用하였다. 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2×10⁴개가 되도록 분주하였다. 분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 後, medium에 濃度別(0.25, 0.5, 1mg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 各各 20µl씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다. 試料는 加하기 前에 0.22µm filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48時間 培養이 끝난 後, 各 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100µl씩

加하여 4°C에서 1時間 동안 放置하여 細胞들
을 plate의 바닥 면에 固定시켰다. 細胞의 固
定이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여
남아 있는 TCA 용액을 完全히 除去하고 室
溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全
히 乾燥된 plate는 well당 250 μ l의 1% acetic
acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을
加하여 30分間 細胞를 染色하고 다시 1%
acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에
結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥
시킨 후, control의 O.D. (optical density) 값
이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도
록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여
낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을
구하여 ED₅₀값을 얻었다.

5) DNA topoisomerase I assay 方法^{24,34)}

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는
calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C
600에서 유래된 것으로 topoisomerase I 阻
害 IC₅₀값을 결정하기 위해 relaxation assay
를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와
Miller의 方法⁴⁴⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂,
0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine,
0.01% bovine serum album, 0.5 μ g pBR 322
DNA와 酵素(1 unit)만 加하여 總 反應液을
20 μ l가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試
料를 加하여 總 反應液을 20 μ l되게 한 것을
試驗群으로 하여 이들을 37°C에서 30分間 培
養하였다. 反應은 2% SDS (sodium dodecyl
sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol
blue를 包含하는 溶液 5 μ l를 添加하여 反應을
終結시키고, 이를 TBE running buffer
(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM
EDTA)로 平衡된 1% agarose gel에 전기영
동을 한 後 agarose gel을 0.5 μ g/ml의
ethidium bromide 溶液에서 1時間동안 染色,
紫外線 下에서 寫眞을 찍은 다음 scanner를
使用하여 活性 밴드를 測定했다. 이때 topo
I 의 1 unit는 37°C에서 30分間 反應시킬 때
supercoiled pBR 322 DNA를 100%
relaxation을 觸媒하는 酵素의 量을 意味한다.

6) A549, B16-F10 癌株의 附着 阻止 實驗²⁵⁾

A549, B16-F10 細胞를 cell culture dish에
monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면
서 키웠다. 癌細胞는 2% FBS로 調節한 培地
에 懸濁시켜 96 well plate의 각 well에 100 μ l
씩 가한(5 \times 10⁴cells/well). 후 0.25, 0.5, 1mg/
ml 濃度의 試料를 녹인 培地 100 μ l를 加하고
5% CO₂, 37°C 에서 培養하였다. 3時間 後 培
養液을 除去시키고 96 well plate의 바닥을
2% FBS로 洗滌한 다음 24時間 培養시킨 후
SRB法³⁶⁾에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數
를 觀察하였다.

7) 肺癌 轉移抑制 作用 測定

(1) Pulmonary colonization 測定²⁶⁾

In vitro에서 繼代培養한 B16-BL6 肺癌細
胞를 實驗에 使用하였다. 즉, 繼代中인 이들
細胞들을 實驗에 使用하기 위하여
trypsin-EDTA 溶液으로 附着面으로부터 分
離시켜 HBSS 溶液으로 細胞數가 2 \times 10⁴
cells/ml이 되도록 細胞懸濁液을 만들었다.
18-20g인 C57BL/6에 細胞懸濁液 0.2ml을 尾
靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를
移植한 後 24時間 부터 1日 1回씩 12mg
/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4°C에
서 保管하면서 7日間 每日 zonde를 使用하여
經口 投與하였다. 癌移植 21日 後에 cervical
dislocation으로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에
轉移된 癌細胞 colony를 計算하였다.

(2) 白血球數와 血小板數에 미치는 影響 測定

C57BL/6 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg,
중의제약)으로 麻醉하고 미리 heparin이 들어
있는 1回用 注射器(23G \times 1 $\frac{1}{4}$, Samwoo Co.)
로 心臟 穿刺하여 血液을 採取하고 血小板數,
白血球數를 Finio法²⁷⁾에 準하여 Minos-ST로
測定하였다.

8) 血管 形成 抑制作用 測定

(1) In vivo CAM(chorioallantoic membrane)
assay^{38,39)}

-1日째(0日胚) : 受精卵을 培養基에서 孵化
시켰다. 이 때 培養基의 溫度는 37-38°C, 濕
度는 90% 以上 維持되도록 隨時로 確認하였
다. 여기에서 0日胚란 受精卵이 産卵되어 1

8°C에서 保管된 지 3-4日 以內的 것을 말한다.

-3日째(2日胚) : 受精卵의 뾰족한 끝 部分에 칼로 흡을 낸 후 水平으로 누어놓고 5ml 注射器로 구멍을 낸 다음 알부민을 3-5ml 정도 뽑아내었다. 受精卵이 乾燥되지 않고 또 感染되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 培養시켰다.

-4日째(3日胚) : 受精卵의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 培養시켰다. 참고로, 圓形 window를 내는 方法은 날카로운 칼로 受精卵의 겹질 위에 圓形으로 흡을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이 때 겹질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 受精卵이란 window를 냈을 때 십자가형의 가는 血管이 보이는 것을 意味한다.

-5日째(4.5日胚) : 이 時期가 되면 CAM이 生成되며, 그 直徑이 2-5mm 정도 된다. 샘플을 적당한 溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4등분된 thermanox coverslip 위에 10ul씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight 시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로 消毒하여 사용하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 소독하여 사용하였다. 기타 實驗機具들도 受精卵이 감염되지 않도록 주의하면서 사용하였다.

-7日째(6.5日胚) : 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. 注射器로 intralipose(fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 部分에 注入한다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 血管을 觀察할 수 있었다. 注射器로 intralipose로 注入할때는 血管이 다치지 않도록

注意하였다. 觀察이 끝난 受精卵은 카메라로 近接 撮影하였다.

(2) In vitro neovascularization assay³⁷⁾

人間的 胎盤에서 臍帶靜脈 內皮 細胞에서 (HUVEC)에서 起原한 血管新生 內皮細胞인 ECV 304 細胞의 血管을 形成시키기위해서 Schnaper²⁹⁾ 등의 方法에 準하여 basement membrane인 matrigel을 이용하여 新血管 形成을 誘導한다. Ice bath上에서 96-well plate에 matrigel을 50 μ l씩 넣어준다. matrigel이 gel과 같은 상태로 되도록 37°C에서 30분에서 한시간 사이의 時間동안 incubation한다. 그동안 ECV 304 細胞 數를 세어서 Well당 2 \times 10⁴cells이 되도록 한다. 數를 셴 ECV 304 細胞를 Matrigel이 덮인 96well plate에 넣고, ECV 304 細胞에 對한 細胞毒性 檢査를 한 SBSK 0.25 μ g/ml를 곧바로 處理하고, 血管形成 活性物質인 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) 8ng을 處理한 ECV 304 細胞를 陽性 對照群으로 하여 時間別로 Matrigel위에서 ECV 304 細胞의 新血管이 形成되는 模樣을 電子顯微鏡을 使用하여 血管形成 有無를 判讀하였다.

9) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400 \times g로 2分間 遠心 分離하여 細胞 沈澱物을 分離했다. 分離된 細胞 沈澱物을 冷滅菌 生理食鹽水에 浮遊시켜 다시 遠心分離하여 上澄液을 除去한 後 혼재된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 10⁷cells/ml의 濃度가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植後 24時間부터 各 群을 8마리로 配定하였다. 試料는 生理食鹽水로 溶解시켜 保存溶液(12 mg/20g/day)을 만든 후 4°C에 保存하였으며 0.2ml씩 經口로 1週日간 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水液을 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式에 따라 計算하였다.

III. 實驗成績

A. 抗癌性 探索

■ In vitro

1. P388, A549 및 SK-OV 癌株에 對한 細胞毒性

P388 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 各各 細胞生存率 이 104±5.1, 85±4.6, 51±2.1%로 1mg/ml의 高濃度에서만 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였 고(Table II), A549 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 各各 細胞成長率 이 82±1.6, 69±2.5, 44±3.6%로, 0.5mg/ml 濃度 以上에서 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였 으며(Table III), SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml에서 細胞成長率 이 各各 93±4.0, 71±4.8, 58±2.4%로 1mg/ml의 高濃度에서만 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制 하였다(Table II).

Table II. Cytotoxic Effect of SBSK on P388, A549 and SK-OV P388 Cells

Concentration (mg/ml)	%Control vs P388	%Control vs A549	%Control vs SK-OV
Control	100±0.2	100±2.1	100±4.6
0.25	104±5.1	82±1.6	93±4.0
0.5	85±4.6	69±2.5	71±4.8
1	51±2.1	44±3.6	58±2.4

Control: Non-treated group, 0.25: 0.25mg/ml SBSK treated group
 0.5: 0.5mg/ml SBSK treated group, 1: 1mg/ml SBSK treated group
 : 30%이상 細胞毒性 濃度

2. B16-F10와 SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性

B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 各各 101±1.8, 84.9±1.4, 44.25±4.2%로, 1mg/ml의 高濃度에서만 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였 고(Table V), SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 各各 93±1.4, 83±2.5, 58±2.5%로, 1mg/ml의 濃度에서만 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table III).

Table III. Cytotoxic Effect of SBSK on B16-F10 Cells

Concentration (mg/ml)		
Control	100±6.5	100±3.6
0.25	108±1.5	93±1.4
0.5	76±2.6	83±2.5
1	25±2.9	58±2.5

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

3. A549와 B16-F10 癌株에 對한 附着阻止 效果

A549 細胞에 對한 附着阻止 實驗을 한 結果 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 各各 103±4.9, 59±1.7, 35±6.7%로 0.5mg/ml 濃度 以上에서 40% 以上 細胞附着阻止 效果가 나타내 였고(Table VII), B16-F10세포에 對한 附着阻止 實驗을 한 結果 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃도에서 各各 108±1.5, 76±2.6, 25±2.9%로 1mg/ml의 高濃度에서 70% 以上 細胞附着阻止 效果를 나타내었다(Table IV).

Table IV. Inhibitory Effect of SBSK on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration (mg/ml)	% control vs A549	% control vs B16-F10
Control	100±6.3	100±6.5
0.25	103±4.9	108±1.5
0.5	59±1.7	76±2.6
1	35±6.7	25±2.9

: 30% 이상 細胞 附着 阻止 效果를 나타낸 濃度

8. DNA topoisomerase I 에 미치는 影響

50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總反應液을 20μl가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總反應液을 20μl되게 한 것을 試驗群으로 하여 活性을 測定했다. 전기영동을 實施하여 寫眞 撮影한 結果 figure 1에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다. 이에 비해

實驗群은 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 抑制 하였다 (Fig. 1).

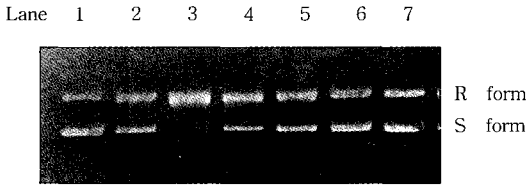


Fig. 1 Effect of SBSK on the DNA topoisomerase I from calf thymus

- Lane 1 : DNA (0.5 μg) only
- Lane 2 : DNA + DNA topoisomerase I (0.5 unit)
- Lane 3 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit)
- Lane 4-7 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SBSK

■ In vivo

1. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

SBSK을 S-180이 移植된 생쥐에 10日間 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바 腹水癌으로 因한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 10日에 급격히 增加하여 22日에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 18.3 日, SBSK 投與群은 28.3日로 나타나, T/C%는 154%로 나타났다(Table V).

Table V. Effect of SBSK on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%) ^a
Control	8	18.3	100
SBSK	8	28.3	154

2. 肺癌 轉移 抑制에 미치는 效果

1) Colony 形成 抑制에 미치는 效果

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 후 21日째에 實施한 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果, 對照群은 49.7 \pm 3.27(개)이었는데 比해서 SBSK 投與群은 38.5 \pm 4.53(개)로써 22.5%의 有意性있는(P<0.05) 肺癌轉移

抑制效果를 보였다(Table VI).

Table VI. Inhibitory Effect of SBSK of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	8	49.7 \pm 3.27 ^{a)}
SBSK	8	38.5 \pm 4.53*

a) : Mean \pm standard error

* : Statistically significant value compared with control data(P<0.05)

2) 白血球數와 血小板數에 미치는 效果

正常群의 白血球, 血小板數는 各各 6.7 \pm 0.09($10^3/\text{mm}^3$), 879.4 \pm 25.9 ($10^3/\text{mm}^3$)인데 比해서 對照群의 白血球, 血小板數는 各各 10.3 \pm 0.48 ($10^3/\text{mm}^3$), 521.5 \pm 28.2($10^3/\text{mm}^3$)를 보였다. 이에 比해서 SBSK 投與群의 白血球, 血小板數는 各各 9.43 \pm 0.92($10^3/\text{mm}^3$), 529.7 \pm 32.9 ($10^3/\text{mm}^3$)로 나타나 血液學的 變化에는 影響을 미치지 않았다(Table VII, VIII).

Table VII. Effect of SBSK on the White Blood Cells in C57BL/6 after i.v. Injection of B16-BL6

Group	No. of animals	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	P value
Normal.	8	6.7 \pm 0.09	
Control	8	10.3 \pm 0.48	
SBSK	8	9.43 \pm 0.92	-

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group after i.v. injection of B16-BL6

SBSK : 12mg/20g/day SBSK treated group after i.v. injection of B16-BL6

Table VIII. Effect of SBSK on the Number of Platelet in C57BL/6 after i.v. Injection of B16-BL6

Group	No. of animals	Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	P value
Normal.	8	879.4 \pm 25.9	
Control	8	521.5 \pm 28.2	
SBSK	8	529.7 \pm 32.9	-

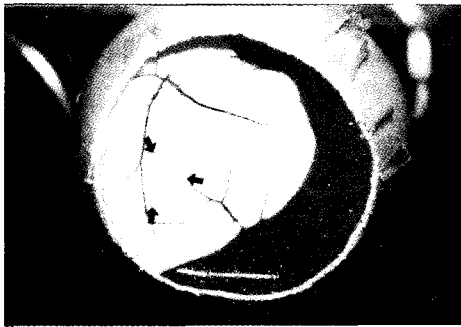
2. 血管形成 抑制效果

1) in vivo CAM assay

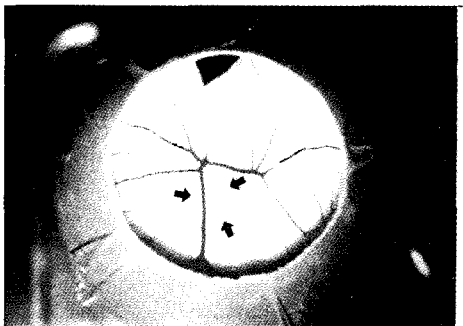
CAM assay를 통한 血管形成 抑制效果는 實驗에 使用된 受精卵 10개중 6개에서 血管形成 抑制效果가 나타나 60%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table IX, Fig. 2).

Table IX. Antiangiogenic Activity of SBSK in a CAM Assay

Sample	Dose($\mu\text{g}/\text{egg}$)	No. of CAM (avascular/total)
SBSK	15	6/10



Control



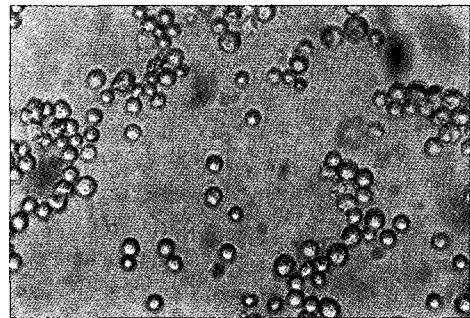
SBSK group

Fig. 2 . Antiangiogenic Activity of SBSK in a CAM Assay

2) ECV 304 細胞에 의한 lumen 形成 抑制效果

ECV 304 內皮細胞의 新生血管 形成에서 對照群에서는 matrigel위에서 ECV 304 內皮細胞가 plating 後 1-2時間에 matrigel 위에 附着하고 3-5時間에 cell clustering이 形成되

고, 7-10時間에 cell cord를 形成하여 血管을 形成할 준비를 하며 12-18時間에는 內腔을 갖는 毛細血管이 形成되었으나, SBSK 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 가한 實驗群에서는 fig. 3에서와 같이 lumen 形成이 抑制되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3).



Control group



SBSK treated group

Fig. 3 . Photography of in vitro neovascularization by ECV 304 in control and SBSK treated group.

IV. 考 察

惡性腫瘍인 癌은 正常 組織에 대해 破壞의 일뿐 아니라, 正常的인 成長과는 달리 獨立의 으로 자라 周圍 組織을 浸潤하고 다른 組織으로 轉移되는 一種의 組織의 過剩成長¹⁾으로 오늘날 人類가 克服해야 할 難治病중의 하나이다. 癌細胞는 正常細胞와는 달리 非正常的의 으로 突然變異된 形態를 지니며 形態가 매우 不規則하니, 癌細胞의 核은 크고 多樣하며 核小體가 뚜렷한데 이는 癌細胞가 合成能力이 뛰어난 未成熟된 胎兒細胞로 끊임없이 細胞

分裂을 일으키면서 成長한다는 것을 의미한다²⁾.

韓醫學에서 ‘癌’字는 宋代의 《衛濟寶書》에 最初로 記載되어 있는데, 現在의 惡性腫瘍과는 證候上 유사하며, ‘癌’字는 ‘嵬’ 즉 ‘岩’字에 疾病附를 붙인 것으로, 그 腫塊가 岩石과 같이 단단하고 形狀이 불규칙적이어서 붙은 이름이다³¹⁾. 癌의 病因에 關하여 《外證醫安》¹⁶⁾의 “正氣虛則成岩” 등에 準하여, 주로 正氣가 不足한 狀態에서 各種 外感六淫, 七情內傷, 飲食內傷 및 邪毒 等の 邪氣가 侵襲하여 發生되는 것으로 認識하여³²⁾, 癌의 治療에 있어 正氣를 補強하는 扶正法을 基本法으로 자주 活用하고 있다¹⁰⁾. 扶正法은 辨證施治에 따라 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎 및 健脾益腎 等으로 區分되는데¹²⁾, 癌患者 혹은 腫瘍治療(手術治療, 藥物治療)시에 脾虛證으로 인한 食慾不振, 納少, 惡心, 嘔吐, 泄瀉 및 腹部脹滿 等の 消化障礙와 免疫機能低下가 많이 나타난다³⁰⁾는 점에서 扶正法中에서도 健脾益氣法이 자주 활용되고 있다. 一例로 癌患者의 證型에 關하여 郁³²⁾은 初期에는 氣虛가 爲主로 나타나 運化機能이 失常되어 小腸의 吸收機能이 低下된다 하였다.

蓼芩白朮散은 宋代 陳¹⁶⁾의 《太平惠民和劑局方》에서 “能補氣健脾 滲濕和胃 治脾胃氣虛而挾濕之證 飲食不消 或吐瀉 形體虛弱 四肢無力”이라고 收載된 以來 主로 脾胃虛弱으로 인한 各種 病證에 應用되고 있다. 蓼芩白朮散의 實驗的 研究로 宋¹⁷⁾이 胃腸管運動 改善作用을, 李¹⁸⁾는 免疫調節機能을, 韓¹⁹⁾은 抗癌效果를, 李 等²⁰⁾도 蓼芩白朮散에 數 種의 藥物을 加味한 消積白朮散의 抗癌效果를 報告한 바가 있지만, 癌에 대해 보다 有效한 韓方療法을 開發하기 위해서는 既存의 處方보다 有效한 蓼芩白朮散加味方의 開發이 切實하다.

이에 著者는 蓼芩白朮散에 抗癌效果를 나타내는 仙鶴草, 魚腥草, 白花蛇舌草를 加味한 蓼芩白朮散加味方의 抗癌活性과 免疫調節作用을 實驗的으로 究明하고자 實驗에 着手하였다.

蓼芩白朮散加味方을 構成하는 藥物의 實驗的 抗癌研究로 人蔘은 實驗的 肺腺腫, Ehrlich 腹水癌 및 Walker carcinoma 肝癌에, 白朮은 消化器腫瘍에, 薏苡仁은 肺癌, 腸癌, 胃癌, 子宮頸部癌, 絨毛膜上皮癌 等に, 甘草와 白茯苓은 消化器 腫瘍에, 半夏는 子宮頸部癌, 食道癌, 胃癌, 舌癌 等に, 石菖蒲는 子宮頸癌에, 桔梗은 肺癌, 咽喉癌 等に, 遠志는 肺癌, 甲狀腺癌등에, 白花蛇舌草는 肺癌, 食道癌, 胃癌, 直腸癌 等に, 魚腥草는 扁桃腺癌 肺癌에, 仙鶴草는 惡性腫瘤 等に 有效하다는 報告가 있다³³⁾.

이에 著者는 이러한 藥物로 構成된 蓼芩白朮散加味方을 試料로 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生存比, A549와 B16-BL6 癌株에 대한 附着 沮止作用, 血管形成 沮害作用, 肺癌轉移 抑制效果 等を 測定하여 抗癌과 抗轉移 效果를 評價하였다.

細胞毒性 評價는 癌細胞 成長抑制를 測定하는 MTT 법과 SRB 方法^{22,23)}을 使用하여 P388, A549, SK-OV-3, B16-F10, SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性을 測定하였는데, 蓼芩白朮散加味方 高濃度인 1mg/ml 濃度에서만 40% 以上の 細胞成長抑制 效果를 나타내었다(Table II-III).

DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 對한 影響을 미친다^{24,34)}. 細胞內의 DNA는 negatively supercoiled되어 있는데, negative supercoiling은 duplexed DNA helix가 덜 감겨(under wound)있다는 것을 意味한다. DNA topoisomerase는 이런 DNA supercoiling state를 調節하므로써, 複製, 轉寫의 initiation의 效率性에 影響을 준다. DNA topoisomerase는 그 촉매기작에 따라 두 형태로 분류되는데, 그 중 topoisomerase I은 DNA duplex의 한 가닥을 phosphodiester bond에서 끊고, 切斷된 한 끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한바퀴 회전시킨 후, 끊어졌던 부분을 다시 연결한다.

本 實驗에서는 DNA만을 處理한 實驗群은 大部分 supercoiled form으로 나타났고(L1), DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다(L3). 이에 比해서 SBSK 投與群은 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml 濃度에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 抑制하여, 本 試料가 DNA topoisomerase I에 의한 癌細胞의 分列을 抑制하여 抗癌效果를 나타내는 것으로 볼 수 있는데(Fig. 1), 최근 趙³⁵⁾도 topoisomerase poison 探索을 주로 活血化痰藥에서 연구하여 有意性있는 結果를 報告하였는데 補益藥에 清熱解毒藥을 加味한 處方에서도 效果의임을 알 수 있어 向後 이들 個別 藥物에 대한 研究도 必要하다고 思料된다.

In vivo에서 S-180을 이용한 抗癌 實驗에서는 SBSK를 10일간 經口 投與한 後 體重增加를 測定하였는데, 腹水癌으로 인한 體重增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 10일에 급격히 增加하여 22일에 모두 死亡하여 對照群의 MST는 18.3일, SBSK 投與群은 28.3일로, T/C%(生存比)는 154%로 效果的인 生命延長效果를 나타냈다(Table V).

癌細胞가 二次的으로 다른 部位에 傳變되어 癌의 症狀를 惡化시킴으로써 결국 死亡에 이르게 한다는 점에서, 重要하게 認識되고 있는 轉移에 대한 實驗으로 in vitro에서 A549 癌株와 B16-F10 癌株를 이용하여 複合基質에 대한 細胞附着 沮止作用을 評價하였는데 A549 癌株는 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 B16-F10 癌株는 1mg/ml의 SBSK 高濃度에서만 有意性있는 細胞附着沮止 效果가 나타내었다(Table IV). 이는 尹⁸⁵⁾이 A549 癌株에 대해 蔘苓白朮散加味方의 構成藥物중 甘草, 桔梗, 白朮, 白茯苓, 山藥, 白扁豆, 薏苡仁, 蓮子肉 등이 모두 1mg/ml 高濃度에서 25% 가량의 細胞附着沮止 效果가 있었다고 報告한 內容과 거의 一致한다.

B16-BL6 癌株를 이용한 動物實驗에서는, 肺臟의 colony數를 계산하였는데, SBSK 投與群에서 22.5%의 有意性(P<0.05)있는 肺癌 轉移 抑制效果를 보였다(Table VI). 이들의

血液檢査에서는 白血球와 血小板 數를 測定하였는데 對照群에서 白血球數가 異常增加하고 血小板이 減少한 반면 SBSK 投與群에서는 白血球가 減少하고 血小板이 增加하는 傾向을 보였지만 有意性은 인정되지 않았다(Table VII, VIII).

血管形成(angiogenesis)은 新生血管(new blood vessel)이 生成되는 根本的인 過程으로써 既存의 細靜脈 바깥쪽에 存在하는 기저막(basement membrane)이 蛋白質 分解酵素인 collagen, plasminogen과 같은 活性因子들에 의해서 部分的인 分解가 일어난 후 內皮細胞(endothelial cell)가 새로운 血管形成의 誘導物質(angiogenic factor)를 향해 移動하는 것으로 시작한다. 以後 移動한 細胞들은 서로 連結되어 solid sprout가 생기고 이어서 各各의 內皮細胞들에 彎曲(curvature)이 일어나서 lumen이 生成된다. 이후 內皮細胞들의 增殖이 일어나 sprout의 길이가 增加되며 두 끝이 둥글게 結合함으로써 loop를 形成하게 되고 이 곳으로 血液이 흐르게 된다^{38,39)}. 血管形成은 癌의 成長(growth)과 invasion, metastasis에 重要的 段階로 알려져 있다. 즉, 癌은 成長을 위해 새로운 微細血管을 자기 쪽으로 誘導함으로써 營養分을 供給받고 老廢物을 排出하는 通路로 이용하고, 癌細胞에 連結된 새로운 血管을 이용해 循環器를 通하여 肝, 肺, 뼈조직 등으로 移動하게 된다. 그러므로 癌細胞 周圍로 新生血管이 形成되지 않으면 大部分의 癌細胞는 直徑 1mm 以上을 자라지 못하며, 다른 곳으로도 轉移되지 못한다. 그러나 일단 새로운 微細血管이 形成되면, 이 癌細胞는 급속히 자라게 되며, 營養分의 供給源인 새로운 微細血管이 그 周圍를 둘러싸고 결국 轉移가 일어나게 된다³⁷⁾. 따라서 angiogenesis의 過程을 抑制하면 癌을 治療할 수 있으리라는 것을 豫상할 수 있으며, 實際로 1971년에 Folkman에 의해서 처음으로 antiangiogenic therapy가 癌治療를 위한 하나의 意味있는 手段³⁹⁾으로써 등장한 以來로 많은 研究가 이루어지고 있다.

이 中 CAM은 鷄胚의 發生 3-4日째에 生

成되는 胚外膜(extra-embryonic membrane)으로써 毛細血管과 다른 血管들을 뚜렷이 區別할 수 있어서 血管移動과 形態形成에 影響을 주는 因子를 研究하는데 適當한 모델로 使用되고 있는데, 本 실험에서는 受精卵 10개 중 6개에서 血管形成 抑制效果를 나타내어 60%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다 (Table IX, Fig. 2).

또한 in vitro에서 ECV 304 內皮細胞의 新生血管 形成 抑制實驗에서는 對照群에서는 12-18時間에는 內腔을 갖는 毛細血管이 形成된 반면, SBSK를 投與한 實驗群에서는 fig. 7에서와 같이 對照群에 비하여 lumen 形成이 抑制됨으로써 癌轉移에 必須的인 血管形成 抑制作用을 나타내었다(Fig. 3).

蔘苓白朮散加味方이 細胞 毒性이 弱하고, CAM assay 등에서 血管形成抑制 效能을 나타낸 점으로 보아 現在 細胞毒性이 없으면서 血管形成을 抑制하는 物質을 찾는 점을 考慮하면 蔘苓白朮散加味方의 抗轉移劑로의 活用 可能性을 提示한다.

以上の 內容을 綜合하면 蔘苓白朮散加味方은 癌細胞에 대한 細胞毒性은 약했지만 topoisomerase I 阻害作用이 있고, A549와 B16-F10 癌株의 附着 阻止, 血管形成 阻害 및 肺癌轉移 抑制作用에서 有意한 結果를 나타내어 癌 治療에 活用可能함을 示唆하고 있다.

V. 結 論

蔘苓白朮散加味方의 抗癌活性和 免疫調節 效果를 實驗的으로 究明하고자, 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生存比, A549와 B16-BL6 癌株에 對한 附着 阻止作用, 血管形成 阻害作用, 肺癌轉移 抑制效果 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 細胞毒性 測定에서 P388, A549, SK-OV-3, B16-F10 및 SK-MEL -2 癌株에 對해 10⁻³g/ml 高濃度에서만 40% 以上の 細胞毒性 效果를 나타내었다

2. DNA topoisomerase assay에서 濃度依

存的으로 DNA topoisomerase-I의 活性을 抑制하였다.

3. 抗癌 動物實驗에서 S-180이 이식된 생쥐에 대해 生存比(T/C%)가 154%로 有效한 生命延長效果를 나타내었다.

4. 細胞附着 阻止測定에서 A549와 B16-F10 細胞에 대해 0.5mg/ml과 1mg/ml의 濃度에서 有意性 있는 細胞附着阻止 效果를 나타내었다.

5. 肺癌轉移 抑制效果에서 B16-BL/6가 이식된 對照群에 비해 22.5%의 肺臟 colony 抑制效果를 보였으나, 血液變化에서는 白血球數와 血小板數는 對照群에 비해 큰 變化가 없었다.

7. CAM assay에서는 對照群에 비해 60%의 血管形成 抑制效果를 나타냈으며, ECV 304에 의한 新生血管形成에서도 對照群에 비해 lumen 形成을 抑制하였다.

以上の 結果를 보아 蔘苓白朮散加味方은 抗癌 및 抗轉移 效果가 있어 癌治療에 널리 活用 可能할 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 大韓病理學會 : 病理學(第3版), 高文社, 201, 1998.
2. Vincent T. DeVita, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg : Newer approaches to cancer treatment, Cancer(4th ed.), 2598-730, 1993.
3. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果和 免疫反應에 관한 實驗的研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1), 245-63, 1995.
4. 나기환, 안圭錫 : 活絡效靈丹이 angiogenesis 抑制機轉에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 韓醫學博士 學位論文, 1998.
5. 張中植, 金聖勳 : 蔘茸湯이 S-180에 대한 항종양효과와 Cyclophosphamide에 의한 副作用 減少에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 13(1), 313-22, 1992.
6. 吳敬亮:參射湯治療鼻咽癌放射治療中不良反應의 臨床觀察, 신중의, 2, 40-1, 1991.
7. 洪元植 編 : 黃帝內經 素問, 서울, 東洋醫學

- 研究院, 14, 124, 285, 1981.
8. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, 1-2, 1988.
 9. 梁興才 : 健脾補氣常用藥防治癌症研究綜述, 中醫藥信息 3, 17-9, 1988.
 10. 林宗光 : 扶正培本法治療晚期原發性肝癌31例, 上海中醫藥雜誌 5, 7, 1984.
 11. 高令仙 : 未分化型小細胞肺癌治驗病例紹介, 上海中醫藥雜誌 1, 9-10, 1985.
 12. 陳炳旗 : 扶正法在腫瘤治療中的臨床運用, 浙江中醫學院學報, 17(4) 20- 21, 1993.
 14. 趙成基 : 消積白朮散의 抗癌, 免疫增強效果 및 Cisplatin副作用에 미치는 影響에 關한 研究, 大田大學校 韓醫科大學 博士學位 論文, 1993.
 15. 趙珍浩 : 癌患者 77例에 對한 消積白朮散이 抗癌劑 副作用 減少에 미치는 效果에 關한 臨床的 考察, 大田大附屬韓方病院, 惠和醫學 4(1), 58-73, 1995.
 16. 陳師文 等 : 太平惠民和劑局方, 旋風出版社, 101, 1985.
 17. 宋大燮 等 : 蓼芩白朮散의 效能에 關한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌 14 (1), 179-95, 1993.
 18. 이한철 : 蓼芩白朮散의 免疫作用에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文, 1994.
 19. 한승섭 : 蓼芩白朮散의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1994.
 20. 李錫于 外 : 抗癌白朮散의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究, 大韓東醫病理學會誌, 10(2), 153-70, 1996.
 21. 黃度淵 : 方藥合編, 南山堂, 147, 1988.
 22. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., Mc Mahon, J.D., Vistica, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. ; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(13), 1107-12, 1990.
 23. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, 17, 1972. 225 3~9, 1988.
 24. Liu, L. F. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) 371-89, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
 25. Mary K. Chelberg, Effie C. Tsilibary, Alan R. Hauser, James B. McCarthy ; Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. *Cancer Reserch*, 49, 4796-802, 1989.
 26. Martin J. Humphries., Kazue Matsumoto, Sandra L. White. and Kenneth Olden : Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors, *Cancer Reserach*, 46, 5215-22, 1986.
 27. 金井泉 外 : 臨床檢査法提要, 서울, 高文社, 242, 249, 1984.
 28. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, *Pharmac., Ther.*, 51, 1-11, 1991.
 29. Schnaper H.W., Grant D.S., Stetler-Stevenson W.S.: *Cell Physiology*, 156, 235-46, 1993.
 30. 최승훈 : 동의중양학, 행림출판사, 서울 142-65, 1995
 31. 楊維傑 : 癌症腫瘤醫論醫話精選, 藥群文化事業公司, 21, 75, 1989.
 32. 郁仁存等 : 惡性腫瘤患者中醫證型的 研究, 中醫雜誌 26-30, 1987.
 33. 金有景 : 抗癌食藥本草, 中國食品出版社, 110, 152, 251, 363, 472, 483, 1989.
 34. J. J. Champoux ; Mechanistic aspects of type-I topoisomerases. In Cozzarelli, N. R. & J. C. Wang. (eds) *DNA Topology and its biological effects*, pp. 217~42. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 35. 趙漢震 : 桃紅四物湯加減方の 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究, 大田大學校 博士學位 論文, 1998.
 36. 尹汝丹 : 天然物로부터 抗癌活性物質의 探索 및 分離, 忠南大學校 大學院 藥學碩士 學位 論文, 1994.
 37. Simionescu, N., and Simionescu, M. (eds), *Endothelial Cell Biology in Health and disease*, Plenum, New York, 1988.

38. Rak, J. N. St., Croix, B., and Kerbel, R. S.
: Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 6, 3~18, 1995.
39. Folkman, J. : Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *N Engl J Med*, 285, 1182~6, 1971