

## 加味金匱腎氣丸의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究

김용태 · 전영수\* · 김정효\*\* · 김성훈

### Study on Antitumor Activity and Antimetastatic effect of Kamigumguesingihwan(KGSH)

Yong-Tae Kim, Young-Soo Jeon, Jung-Hyo Kim, Sung-Hoon Kim

*Dept. of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,  
\*College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, \*\*Nursing College of Cho Sun University*

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Kamigumguesingihwan(KGSH) studies have been done.

The results were obtained as follows:

1. KGSH extracts exhibited a weak cytotoxicity against A549, SK-OV-3, B16-F10, and SK-MEL-2 cell lines. But exhibited potent cytotoxicity against P388 cell line in a dose-dependent manner.
2. The concentration inhibiting adhesion of A549 to complex extracellular matrix up to below 30% of control was recognized at  $10^{-3}$ g/ml of KGSH
3. KGSH extracts showed a weak inhibitory effect on DNA topo- isomerase I from calf thymus.
4. The T/C% was 137% in KGSH treated group in S-180 bearing ICR mice.
5. In pulmonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in KGSH treated group as compared with control group.
6. In hematological changes in B16-BL6 injected C57BL/6, numbers of WBC were decreased insignificantly in KGSH treated groups, and also those of platelet were increased insignificantly in KGSH treated groups as compared with control.

---

경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀

\*경희대학교 한의과대학 병리학교실

\*\*조선대학교 간호대학

7. In CAM assay, KGSH extracts inhibited angiogenesis at 15 $\mu$ g/egg concentration significantly as compared with control.

Taken together these results, it is strongly demonstrated that KGSH significantly suppressed tumor metastasis by blocking cell adhesion to extracellular matrix. Therefore, KGSH is expected to be clinically a potent antimetastatic drug for the prevention and treatment of cancer.

## I. 緒 論

腫瘍이란 正常的인 成長과는 달리 細胞自體가 어떠한 機轉에 의하여 癌細胞로 變化된 다음, 다른 組織으로 轉移되는 一種의 組織의 過剩의 成長을 말한다<sup>1)</sup>.

특히 複雜한 社會生活로 인한 스트레스 增加, 公害 等으로 인한 環境 變化 및 인스턴트 飲食 爲主의 食生活 等으로 인하여 癌發生率이 날로 增加 趨勢에 있고<sup>2,3)</sup>, 死因에서도 首位를 차지하고 있어, 最近까지도 醫學界의 주된 課題로 남아 있다.

韓醫學에서 癌은 宋代의 《衛濟寶書》<sup>4)</sup>에서 新生物인 癌과는 區別되지만 文獻上 最初로 癌字가 記載되었으며, 內經을 爲始한 各種 韓醫書에서 나타난 積聚, 癥瘕, 疝癖, 噎膈, 反胃, 癭瘤, 石癰 및 石疽 等이 오늘날 癌과 類似病症으로 認識<sup>5-10)</sup>되고 있다.

癌의 治療法으로 西洋醫學에서는 手術療法, 化學療法, 放射線療法 및 免疫療法 等<sup>11,12)</sup>이 있는데, 이들 대부분이 癌細胞뿐만 아니라 正常細胞에도 毒性을 나타내어, 骨髓 造血機能 障礙, 消化器 障礙 및 免疫機能 低下 等의 副作用을 招來하는 問題點이 擡頭<sup>13-15)</sup>되면서, 人體에 無害하면서 效果的으로 癌을 治療할 수 있는 새로운 藥劑 開發이 當面한 課題로 擡頭되고 있다.

韓醫學에서는 腫瘍에 對한 治療法으로 《醫宗金鑑》<sup>21)</sup>의 “積之成也 正氣不足而後邪氣踞之”, 《外證醫案》<sup>22)</sup>의 “正氣虛則成岩”의

理論과 臨床에서 癌患者 대부분이 虛證性 證候가 共通의으로 나타난 점에 根據하여 健脾益氣, 溫腎滋陰 等의 扶正法을 中心으로 病症의 樣相 및 癌化 程度에 따라 清熱解毒, 活血化癥 等의 多樣한 祛邪藥을 加味하여 活用<sup>23-28)</sup>하고 있다.

이와 더불어 最近에는 臨床的으로 西醫學의 癌治療法과 並行하여 癌治療의 效率을 높이고, 生存率을 增加시키며, 西醫學的인 癌治療로 인한 副作用 減少를 위한 많은 研究<sup>29-31)</sup>가 進行되고 있다.

本 試料의 基本方인 金匱腎氣丸은 腎氣丸, 八味丸 等의 異名으로도 불리우며, 《金匱要略》<sup>32)</sup>에서 “虛勞腰痛少腹拘急 小便不利者 八味腎氣丸主之”라고 처음 收載된 이후 腎陰, 腎陽 不足으로 因한 諸證에 多用되어 왔으며, 慢性 腎炎, 糖尿病, 自律腎經失調, 前立腺肥大症 및 不妊 等에 應用되고 있다<sup>34,35)</sup>.

金匱腎氣丸에 對한 研究로는 申<sup>77)</sup>이 “血清中 電解質 및 代謝基質의 變動에 對한 效果”를, 崔<sup>78)</sup>는 “Furosemide, Hydralazine, Atenolol 및 Verapamil의 併用投與 效果”를 實驗的으로 糾명한 바가 있고, 오<sup>79)</sup>는 “六味地黃湯과 金匱腎氣丸의 效能에 對한 文獻의 考察”을 報告한 바가 있으며, 最近에는 《諸病源候論》<sup>33)</sup>의 “凡脾腎不足 虛弱失調之人 多有積聚之病”에 根據하여 癌 等의 難治病에 腎陰虛, 腎陽虛 證狀이 發現되는 경우 基本方으로 使用<sup>35)</sup>되고 있으나, 金匱腎氣丸에 白花蛇舌草, 仙鶴草 및 魚腥草를 加味한 加味金匱腎氣丸의 抗癌效果에 對한 實

驗의 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 加味金匱腎氣丸을 試料로 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性作用, DNA topoisomerase I 活性抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率 等의 測定을 通해 抗癌效果를 評價하고, A549, 癌株의 附着 沮止作用, pulmonary colonization, 血液學的 變化 및 血管 形成 抑制作用 等을 測定하여 抗轉移 效果를 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 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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 《金匱要略》<sup>32)</sup>에 記載된 金匱腎氣丸을 基本으로 加味 構成하였으며, 한 錢 分量은 아래와 같다.

Prescription of Kamigumguesingihwan(KGSH)

韓 藥	生 藥 名	用 量 (g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	16
山 藥	Discoreae Radix	8
山茱萸	Corni Fructus	8
白茯苓	Poria	6
牡丹皮	Moutan Cortex	4
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	4
附子晷	Aconiti iateralis preparata Radix	1.15
桂 枝	Cinnamomi Ramulus	1.15
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusae Herba	6
魚腥草	Houttuyniae Herba	4
仙鶴草	Agrimoniae Herba	4
總 量		62.3

#### 3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), HBSS (Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, agarose, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), sulforhodamine-B(SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopolysaccharide (LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck社 製品, sodium bicarbonate는 Gibco社 製品, acetic acid는 Glacial社 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara社 製品, 受精卵은 풀무원社 製品, intralipose는 綠十字社 製品, Tissue culture coverslip은 Nunc社 製品을 각각 使用하였다.

## 2. 方法

### A. 抗癌性 探索

#### 1) 試料의 製造

上記한 加味金匱腎氣丸의 2貼 分量(124.6g)을 各各 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator(B chi 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를 凍結 乾燥하여 37g의 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 (0.22, 0.45 $\mu$ m, 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-BL6 melanoma (ATCC CRC 6322)를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640培地에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 포함하고 1% 抗生素(penicillin-G 10만 units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 添加하여 製造하였다.

#### 3) 細胞毒性 測定

In vitro 抗癌活性도와 tumor cell의 細胞毒性을 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B (SRB) assay 法<sup>39,40)</sup>과 細胞數를 계산하기 위하여 MTT<sup>39)</sup> 法을 使用하였다. 繼代中인 이들 細胞

들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가  $2 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하였다. 분주된 細胞들은 CO<sub>2</sub> incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, 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 20 $\mu$ 씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다. 試料는 加하기 前에 0.22  $\mu$ m 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 100 $\mu$ 씩 加하여 4℃에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 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 $\mu$ 의 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) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을 구하여 ED<sub>50</sub> 값을 얻었다<sup>41)</sup>

#### 4) DNA topoisomerase I assay 方法

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomeras I 저해 IC<sub>50</sub> 값을 결정하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法<sup>41)</sup>에

다랐다. 즉, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 효소(1 unit)만 추가하여 총 반응액을 20 μl가 되게 한 것을 對照群으로, 효소와 試料를 추가하여 총 반응액을 20 μl가 되게 한 것을 試驗群으로하여 이들을 37℃에서 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 μl를 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 전기영동을 한 後 agarose gel을 0.5 μg/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 I의 1 unit는 37℃에서 30分間 反應시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 효소의 量을 意味한다.

#### 5) 細胞附着 阻止 作用 測定<sup>43, 44)</sup>

미리 complex extracellular matrix (matrigel)로 coating한 96well plate에 A549세포를 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96 각 well에 100 μl 씩 가한(5 × 10<sup>4</sup> cells/well) 후 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度の 試料를 녹인 培地 100 μl를 加하고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃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<sup>38)</sup>에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

#### 6) 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 × 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 다

시 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 10<sup>7</sup> cells/ml의 濃度가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml 씩 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 溶解시켜 保存溶液(12mg/20g/day)을 만든 후 4℃에 保存하였으며 0.2ml씩 經口로 1週日 間 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式<sup>45)</sup>에 따라 計算하였다.

#### 7) Pulmonary colonization 抑制 作用 測定<sup>47)</sup>

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 × 10<sup>4</sup> 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 20.8mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4℃에서 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.

#### 8) 血管 形成 抑制作用 測定 (CAM assay)<sup>49, 50)</sup>

3日胚의 受精卵의 air sac이 있는 쪽으로 직경 2-3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 37°C에서 36시간 培養시켰다. 샘플을 적당하

**Table I.** Cytotoxic Effect of KGSH on various tumor Cells

Conc.(mg/ml)	A549	SK-MEL-2	SK-OV-3	B16-F10
0	100±3.31	100±2.6	100±2.6	100±3.5
0.25	103.21±6.3	106±1.5	96±5.6	106±5.1
0.5	89.6±2.8	102±3.6	93±2.4	75±3.8
1	73.5±2.4	75±1.8	68±3.3	69±8.6

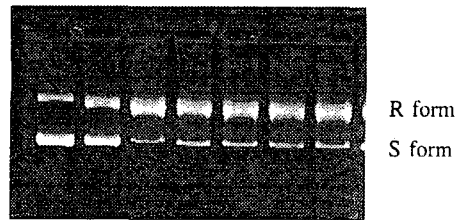
溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4등분된 thermanox coverslip 위에 10ul씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench 안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하였다. 유리 테잎을 칼로 뜯어내고, 注射器로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 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.

成長을 抑制하였다. SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 細胞生存率이 시료의 농도에 상관없이 전체적으로 微弱한 細胞毒性을 나타내었다 <Table I>.

## 2. DNA topoisomerase I 에 미치는 影響

50mM MgCl<sub>2</sub>, 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 20µl 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總反應液을 20µl 되게 한 것을 試驗群으로 하여 活性을 測定했다. 전기영동을

Lane 1 2 3 4 5 6 7



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

Lane 1 : DNA (0.5µg) 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 µg/ml of KGSH

## Ⅲ. 實驗成績

### 1. 癌株에 對한 細胞毒性

P388 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.2 0.5, 1mg/ml濃度에서 0.5mg/ml 以上の濃度에서 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다. A549 癌株에 對한 細胞毒性은 微弱한 細胞毒性을 나타내었다. A549 癌株에 對한 細胞毒性은 細胞生存率이 2.37%로 微弱한 細胞毒性을 나타내었다. B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性은 細胞生存率이 1mg/ml의 高濃度에서만 30% 以上 癌細胞

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 모든 實驗濃度에서 topo-I의 活性 抑制效果를 미약하였다<Fig. 1>.

### 3. A549 癌株의 附着 沮止 效果

A549 細胞에 對한 附着沮止 效果에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서  $108 \pm 2.49$ ,  $76 \pm 1.62$ ,  $35 \pm 2.83\%$ 로 高濃度인 1mg/ml의 高濃度에서 60% 이상 細胞附着沮止 效果를 나타내었다<Table 2>.

**Table 2.** Inhibitory Effect of KGSH on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	$100 \pm 4.9$
0.25	$108 \pm 2.49$
0.5	$35 \pm 2.83$
	$76 \pm 1.62$

註: 30% 이상 附着沮止 效果를 나타낸 濃度

### 4. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

KGSH를 S-180이 移植된 생쥐에 10일간 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바 腹水 癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 16일에 급격히 增加하여 22일에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 18.3日, KGSH 投與群은 25.1日로 나타나, T/C%는 137%로 나타났<Table 3>.

**Table 3.** Effect of KGSH on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%)#
Control	8	18.3	100
KGSH	8	25.1	137

$$\# : T/C(\%) = \frac{\text{MST of sample}}{\text{MST of control}} \times 100$$

### 5. 肺臟 Colony 形成 抑制에 미치는 影響

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 後 21日째에 실시한 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果 對照群은  $49.7 \pm 3.27$ (개)인데 반해 KGSH 投與群은  $31.8 \pm 5.72$ (개)( $P < 0.01$ )로써 36%의 有意性있는 肺癌轉移 抑制效果를 나타내었다<Table 4>.

**Table 4.** Inhibitory Effect of KGSH of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells.

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	8	$49.7 \pm 3.27$
KGSH	8	$31.8 \pm 5.72^{**}$

a) : Mean  $\pm$  standard error

\* : Statistically significant value compared with control data (\*\*:  $P < 0.01$ )

### 6. 血管形成 抑制效果

血管形成 抑制效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 10個 중 3個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 30%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다<Table 5>.

Fig. 2>

Table 5. Antiangiogenic Activity of KGSH in a CAM Assay

Sample	Dose (μg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
KGSH	15	3/10

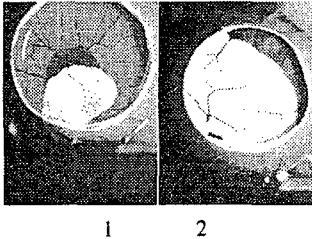


Fig. 2. Photographs of Distilled water or SYTG-treated embryonic CAM.  
(1) Distilled Water ; (2) SYTG (15μg/egg).

#### IV. 考 察

惡性腫瘍인 癌은 非正常的인 細胞分裂로 빠른 浸潤性 成長과 各 部位로 擴散되는 轉移 等의 特異性을 지님으로써<sup>3)</sup>, 全世界의 死亡 率 1위를 차지하고 있어 現在까지도 醫學界가 克服하여야 할 課題로 남아 있다<sup>1-3)</sup>.

癌의 發生原因에 對하여 西洋醫學에서는 內 的 因子로써의 遺傳, 人種과 地理學的 要因, 年 齡, 免疫學的 要因과 外 的 因子로써 化學的 發 癌因子와 紫外線 照射, 石棉, 放射線 等과 같은 物理的 發癌因子 및 바이러스성 發癌因子 等으 로 遺傳子가 損傷을 받아 突然變異되어 發生하 는 것으로 보고 있다<sup>49,50)</sup>.

이러한 治療法은 分子生物學 等의 學問 發展 과 더불어 더욱 發展되면서 많은 治療效果를 거두고 있지만, 이와 더불어 正常細胞에도 毒 性을 나타내어, 骨髓 造血機能 障礙, 消化器 障

碍 및 免疫機能 低下 等의 副作用을 招來하는 問題點이 擡頭<sup>13,15)</sup>되고 있어, 最近에는 副作用 이 輕微하고 抗腫瘍 效果가 우수한 새로운 治 療法 개발에 關心이 높아지고 있는 實情이다. 韓醫學의 癌의 治療法으로는 辨證施治에 입 각하여 扶正과 邪氣의 輕重緩急에 따라, 初期 에 正氣가 實하고 邪氣가 盛한 경우, 祛邪를 爲 主로 하고 兼해서 扶正을 佐하며, 中氣에는 正 氣가 虛하고 邪氣가 實하니 攻補兼施하며, 末 期에는 正氣가 不足하여 攻法을 쓰면 오히려 正氣를 傷하므로 마땅히 扶正을 爲主로 하여 病人의 抗病能力을 增強시키는 治療法이 活用 되고 있다<sup>23-31)</sup>.

이와 더불어 最近에는 癌治療에 있어 臨床的 으로 西醫學의 癌治療法과 並行하여 癌治療의 效率을 높이고, 生存率을 增加시키며, 西醫學 的인 癌治療로 인한 副作用 減少를 위한 많은 研究가 進行되고 있다. 이에 대한 報告로 王 等<sup>53)</sup>은 灸法이 化學療法의 副作用 治療에 效果가 있다고 報告하였으며, 李<sup>54)</sup>는 補中益氣湯이 cyclophosphamide의 毒性을 減少시킨다 하였으 며, 이 밖에 孫<sup>55)</sup>은 柴胡 茵陳의 肝癌細胞에 對 한 抗癌活性和 抗癌劑와의 相乘效果를, 崔 等<sup>56)</sup>은 四六湯의 放射線 副作用 減少效果를 各 實驗的으로 立證한 바가 있다.

그러나 이런 實驗 研究 대부분이 補氣健脾 處方 혹은 清熱解毒, 活血化瘀藥을 中心으로 抗腫瘍效果를 探索하고 있는 반면, 補陰, 補陽 劑에 對한 研究는 아직 未洽한 實情이다.

本 實驗의 試料인 加味金匱腎氣丸은 金匱腎 氣丸에 清熱利濕, 解毒消癰<sup>57)</sup>하는 白花蛇舌草, 收斂止血, 止痢, 解毒<sup>57)</sup>하는 仙鶴草, 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋<sup>57)</sup>하는 魚腥草를 加味한 處 方으로 韓醫學에서 多用되는 扶正祛邪· 攻補 兼法 治療法에 附合되는 處方이다.

이에 著者는 金匱腎氣丸에 抗癌效果를 나타



내는 仙鶴草, 魚腥草, 白花蛇舌草를 加味한 加味金匱腎氣丸의 抗癌活性을 實驗的으로 究明하고자 이를 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, A549 癌株에 對한 附着 沮止作用, 肺癌轉移 抑制效果 및 血管形成 沮害作用等を 測定하여 抗癌 效果와 抗轉移 效果를 評價하였다.

實驗에 앞서 加味金匱腎氣丸을 構成하는 單味 藥物의 本草學의 效能을 살펴보면, 熟地黃은 甘微溫하여, 滋陰補血, 益精眞髓의 效能이 있어 肝腎陰虛로 나타나는 諸 症狀을 다스리고<sup>57)</sup>, 特定한 癌 疾患이 아닌 陰虛 症狀을 同伴한 各種 癌症에 使用되고 있으며<sup>58-62)</sup>, 山藥은 甘溫而澁하여 健脾補肺, 固腎益精의 效能이 있고<sup>57)</sup>, 山茱萸는 酸微溫而澁하여, 補益肝腎, 精固脫의 效能이 있으며<sup>57)</sup>, 補骨脂, 杜仲 등과 함께 配合하여 胃癌 등 各種 腎虛 症狀을 同伴한 腫瘍에 使用된다<sup>58-62)</sup>. 澤瀉는 甘寒하여 利水滲濕, 泄熱의 效能이 있으며<sup>57)</sup>, 牡丹皮는 苦辛微溫하여, 清熱涼血, 活血散瘀하는 效能이 있어<sup>57)</sup>, 癌症 중 特히 腫瘍으로 인한 發熱에 使用한다<sup>58-62)</sup>. 白茯苓은 甘淡而平하여, 健脾涼心, 利水滲濕시키는 效能이 있고<sup>57)</sup>, 各種 消化器 癌症에 多用<sup>58-62)</sup>되며 桂枝는 發汗解肌, 溫經通脈, 助陽化氣하는 效能이 있으며<sup>57)</sup>, 附子炮는 回陽助火, 散寒除濕하여<sup>57)</sup>, 食道, 結腸, 直腸癌, 惡性 淋巴腫에 多用되고 있다<sup>58-62)</sup>.

가미된 魚腥草는 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋의 效能<sup>57)</sup>이 있어 扁桃腺癌 肺癌等에<sup>58-62)</sup>, 仙鶴草는 收斂止血, 截癰, 止痢, 解毒의 效能이 있어<sup>57)</sup> 肺癌 等에<sup>58-62)</sup>, 加味된 藥物中 用量이 가장 많은 白花蛇舌草는 清熱解毒, 利尿通淋, 活血化瘀, 消癰의 效能이 있어<sup>57)</sup> 肺熱咳嗽, 扁桃腺炎, 咽喉炎, 蟲垂炎, 痢疾, 黃疸, 子宮附屬器炎 등 各種 炎症에 使用되고 있으며<sup>57)</sup>, 最近

에는 消化器癌, 淋巴癌 및 咽喉癌 등에 4-70g의 用量으로 應用되고 있다<sup>58,59,62)</sup>.

이렇듯 溫補腎陽, 清熱解毒 效能을 지닌 加味金匱腎氣丸을 試料로 한 抗癌實驗에서는 浮游癌인 P388 癌株는 MTT 法<sup>36,37)</sup>을, 나머지 固形癌인 A549, SK-OV-3, B16-F10, SK-MEL-2 癌株는 SRB 方法<sup>37,38)</sup>을 使用하여 細胞毒性을 測定하였는데, P388 細胞는 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 50% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였으며, SK-OV-3, B16-F10 癌株에서는 1mg/ml 高濃度에서만 30% 以上の 癌細胞 成長 抑制效果를 나타내어<Table 2>, 쥐 白血病 癌株인 P388 癌株에 보다 有意성을 나타내었다.

細胞毒性을 評價하는 또다른 實驗으로 topoisomerase-I의 活性抑制에 對한 實驗을 實施하였다.

이는 最近에 topoisomerase poison이라고 불리우는 topoisomerase의 抑制劑가 細胞毒性<sup>63-65)</sup>을 일으킴으로써 抗生, 抗癌劑로서 使用될 수 있음이 報告<sup>63,65,66)</sup>된 이후 細胞毒性 評價에 자주 應用되고 있기 때문이다. 本 實驗에서는 DNA만을 處理한 實驗群은 大部分 supercoiled form으로 나타났고(Lane 1), DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다(Lane 3). 이에 比해서 KGSH를 處理한 群에서는 實驗에 使用된 모든 濃度에서 酵素의 抑制效果를 나타내지 않았다<Fig. 1>. In vivo에서 S-180을 이용한 抗癌 實驗에서는 KGSH를 10日間 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 10日에 급격히 增加하여 22日에 모두 死亡하여 對照群의 MST는 18.3日, KGSH 投與群은 25.1日로, T/C%(生存比)는 137%로 效果의인 生命延長 效果를 나타내었다<Table 3>.

다음으로 癌의 成長에 必須的인 轉移<sup>67-69)</sup>에

대한 실험으로, A549 癌株에 對한 複合基質에 對한 附着 沮止作用과, B16-BL6 癌株를 移植한 생쥐의 lung colony 形成 抑制效能, 血液學的 變化 및 最近 抗轉移 實驗으로 研究되어지고 있는 血管形成 抑制效能을 評價하였다.

A549 細胞를 이용한 複合基質에 대한 細胞 附着 沮止作用 實驗에서는 1mg/ml의 高濃度에서 60% 以上 附着을 沮止하여 有意性있는 結果를 나타내었다<Table 2>. B16-BL6 癌株를 이용한 肺癌轉移實驗에서는 KGSH 投與群이 36%의 有意性있는 肺癌轉移 抑制效果<Table 4>가 나타나, A549 附着沮止 實驗과 附合됨으로써, 本試料가 癌細胞의 轉移를 效果의으로 抑制함을 알 수 있다.

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<sup>71-74</sup>). 이러한 血管形成은 癌의 成長, 浸透 및 轉移에 重要한 段階로 알려지면서 antiangiogenic therapy가 癌治療를 위한 하나의 意味있는 手段<sup>74,75</sup>)으로써 등장한 以來로 많은 研究가 이루어지고 있다.

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 된다<sup>71,72,74,76,77</sup>).

이러한 血管形成의 抑制作用을 評價하기 위한 實驗方法은 數種이 있으나, 本 實驗에서는 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 있는 CAM assay를 實施하였다.

CAM assay 結果, Fig. 2에서 보는 바와 같이 受精卵 10個중 3個에서 血管形成 抑制效果를 나타내어 30%의 有意性있는 血管形成 抑制效果를 나타내었다<Table 5, Fig. 2>.

以上の 結果를 綜合하여 보면, 加味金匱腎氣丸은 固形癌細胞보다 浮遊癌細胞에 강한 細胞 毒性이 나타나 白血病 等에 效果의으로 作用할 것으로 보이며, 抗轉移效果에 關聯된 實驗에서 有意性있는 結果가 導出됨으로써, 加味金匱腎氣丸의 抗腫瘍效果는 주로 多樣한 轉移抑制作用에 起因한 것으로 推測된다.

## V. 結 論

加味金匱腎氣丸의 抗腫瘍效果를 糾明하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞 毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率, A549에 對한 附着 沮止作用,

肺臟 colony 形成 抑制作用, 血液學的 變化 및 血管形成 抑制作用 等を 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 數種 癌株에 對한 細胞毒性에서는 P388 癌株에 對하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서, SK-OV-3, B16-F10 癌株에서는 1mg/ml 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다.
2. A549 癌株에 對한 附着 阻止作用에서는 對照群에 比하여 高濃度인 1mg/ml 濃度에서 60% 以上 附着阻止 效果를 나타내었다.
3. DNA topoisomerase I assay에서는 濃度 依存的으로 酵素活性 抑制效果를 보였으나 有意性있는 效果는 나타나지 않았다.
4. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C% 는 137%로 나타났다.
5. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 比하여 36%의 抑制效果를 보여 有意性있는 效果를 나타내었다.
6. B16-BL6가 移植된 생쥐의 血液學的 變化에서는 對照群에 比하여 有意性있는 效果가 나타나지 않았다.
7. CAM assay에서는 30%의 血管形成 抑制 效果를 나타내었다.

以上の 結果를 보아 加味金匱腎氣丸의 抗腫瘍 效果는 多様な 轉移抑制 作用에 의한 것으로 보여, 向後 癌治療 및 轉移豫防에 活用可能 할 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. 大韓病理學會：病理學, 서울, 高文社, pp.225-271, pp.632-638, pp.703-710, pp.742-759, pp.816-827, pp.936-941, pp.1015-1021, pp.1061-1070, 1990.
2. 이문호외：最近 韓國의 疾病變遷, 大韓 醫學協會誌, 32(3):283-290, 1989.
3. 서울대학교 醫科大學：腫瘍學, 서울大學 校出版部, pp.1-3, p.137, pp.214-215, pp.225-234, 1989.
4. 洪元植：精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋 醫學研究院, p.38, p.249 p.317, 1985.
5. 厲暢：癌의 中醫治療, 東洋醫學, 18(1), p.56, 1992
6. 余桂清：歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
7. 白洪龍：辨證施治概要, 雲南, 人民出版社, p.502. 1984.
8. 葉銘洪：治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1-10, 1986.
9. 郁仁存：中醫腫瘤學, 北京, 科學出版社, p.20, p.258, 1991.
10. 郎偉君：抗癌中藥一千方, 北京, 中國醫藥 技術出版社, pp.5-17, 1994.
11. 李佩文：如何正確選用抗癌中城藥, 中醫雜 誌, 第9期, pp.46-48, 1989.
12. 李文鎬：內科學 卷下, 博愛出版社, pp.2246-2250, pp.2466-2475, 1976.
13. 鞠永棕 編：고오스 藥理學, 서울, 汎文社, pp.701-710, 1986.
14. 金東熙 外：抗癌劑와 放射線療法の 副作用에 對한 韓方藥物療法, 大田大學校 韓醫學 研究所論文集 3卷, pp.34-39, 1993.
15. 張中植：蔘茸湯이 S-180에 對한 抗腫瘤效 果와 cyclophosphamide에 의한 副作用減 少에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論 文, 1992.
16. 金秀眞：補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯 이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와

- cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1993.
17. Blomgren H, Berg R, Wasserman J, Glas U : Effect of radiotherapy on blood lymphocyte population in mammary carcinoma. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 1: 177, 1976.
  18. Stratton JA, Byfield PE, Byfield JE, Small RC, Benfield J, Pilch Y : A comparison of the acute effects of radiation therapy, including or excluding the thymus, on the lymphocyte subpopulations of cancer patients. *The Journal of Clin Invest* 56: 88, 1975.
  19. Job G, Pfreundschuh M, Bauer M, Winkel KZ, Hunstein W : The influence of radiation therapy on T-lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 10: 2077, 1984.
  20. Idestrom K, Petrini B, Blomgren H, Wasserman J, Wallgren A, Baral E : Changes of the peripheral lymphocyte population following radiation therapy to extended and limited fields. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 5: 1761, 1979.
  21. 吳謙 : 醫宗金鑑. 서울, 大星出版社, p.375, 1983.
  22. 徐景和 : 外證醫安, 北京, 人民衛生出版社, p.255, 1987.
  23. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
  24. 邢雪梅 : 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況. 한글판 中醫雜誌, No.3, pp. 85-90, 1994.
  25. 李仲守 : 扶正則積自除, 新中醫, 第10期, p.39, 1984.
  26. 趙健斌 : 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗. 陝西醫學, 第14期, pp. 451-453, 1993.
  27. 王冠庭 外 : 中西醫結合治療晚期胃癌53例, 上海中醫藥雜誌, 第8期, pp.25-27, 1982.
  28. 孫孝洪 : 中醫治療學原理, 成都, 四川科學技術出版社, pp.155-157, pp.196-197, pp.228-229, pp.386-395, pp.513-519, pp.538-541, pp.565-566, pp.593-597, pp.631-633, 1990.
  29. 錢伯文 : 運用補益藥治療腫瘤的經驗, 上海中醫藥雜誌, 第8期, p.6, 1984.
  30. 李佩文 : 如何正確選用抗癌中成藥, 中醫雜誌, 第9期, pp.46-48, 1989.
  31. 雷永仲 外 : 中醫藥治療肺癌的臨床觀察, 中醫雜誌, 第2期, pp.25-27, 1988.
  32. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, p.429, 1989.
  33. 巢元方 : 諸病源候論, 서울, 大星文化社, p.263, 1982.
  34. 李尚仁 外 : 方劑學, 서울, 永林社, p.247, 1992.
  35. 廉泰煥 : 東醫處方大全, 杏林書院, p.215, 1990.
  36. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol* 65, pp.55-63, 1983
  37. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. 30, p.2418, 1989.
  38. 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), pp.1107-1112, 1990.
39. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, *Cancer Chemother. Res.*, (part 3), 3, p.17, 1972.
  40. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, *Cancer Treat. Rep.*, 60, p.979, 1966.
  41. K. Drlica and R. J. Franco ; Inhibitors of DNA Topoisomerases, *Biochemistry.*, 27(7), pp.2253~2259, 1988.
  42. Hellmann, K. and Carter, S.K. : *Fundamentals of cancer chemotherapy*, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132 -140, 1987.
  43. 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 domanes of the collagen molecule. *Cancer Reserch*, 49, 4796-4802, 1989.
  44. Lin Yan et, al. : Inhibition of cell attachment by selite, *Cancer reserch* 52, 5803-5807, 1992.
  45. 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, pp.5215-5222, 1986.
  46. 金井泉 外 : 臨床検査法提要, 서울, 高文社, p.242, p.249, 1984.
  47. Robert. A. Wanda. A Igor. P. : Assays for angiogenesis. *Pharmac., Ther.*, Vol.51, pp.1-11, 1991.
  48. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, *Devl Biol.* 41:391-394, 1974.
  49. Ashall, F., Bramwell M.E., Harris H : A new marker for human cancer cells, *cancer research*, 1986.
  50. Gold V.E. ET : Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia, Evidence for humoral nonhumoral groups, *Engl, J. Med*, 1976.
  51. 孫甲鎬 外 : 柴胡 茵陳의 肝癌細胞에 對한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.414-432, 1995.
  52. 王少錦 : 灸法抗腫瘤及化療副作用的研究進展, *中醫雜誌*, 31(11), pp.52 -54, 1982.
  53. 李宇彬 外 : 補中益氣湯對 cyclophosphamide 抗癌活性和毒性的影響, *中藥雜誌* 3卷, p.50, 1989.
  54. 崔昇勳 : 放射線 照射後의 N:GP(S) mouse 脾臟細胞增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 第1回 東洋醫學 國際심포지움論文集, pp.110-239, 1995.
  55. 郁仁存外 : 腫瘤研究, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-22, pp.41-44, 1991.
  56. 買 堃: 癌瘤防治研究, 서울, 成輔社, pp.25-28, 1984.
  57. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 永林社. pp. 201-202, pp. 223-224, pp.302-306, pp.385-386, pp.414-415, pp.417-420, pp.423-425, pp.498-499, pp.531- 205, 1991.
  58. 김수철 : 抗癌本草. 서울, 圖書出版 바람과 물결, p.251. p.354. p.365. p.415, p.474, 1988.

59. 上海中醫學院：中草藥學，香港，商務印書館，pp.127-130, pp.561- 562,pp.564-566, 1983.
60. 金有景：抗癌食藥本草，中國食品出版社，pp.132-135, 1989.
61. 王 冰：抗癌中藥方選，人民軍醫出版社，pp.157-164, 1990.
62. 李 岩：腫瘤臨床備要，人民衛生出版社，pp.89-98, 1980.
63. Champoux, J. J. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.217- 242, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
64. P. D. Arpa, and L. F. Liu ; Topoisomerase-targeting anticancer drug, *Biochim. Biophysica Acta.*, 989, pp.163~177, 1989.
65. Y. H. Hsiang, and L. F. Liu ; Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, *Cancer Res.*, 48, pp.1722~1726, 1988.
66. D. K. Trask, and M. T. Muller ; Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexed by actinomycin D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, pp.1417~1421, 1988.
67. Yong Q. C. : Fatty acid modulation of tumor cell- platelet vessel wall interaction, *Cancer and Metastasis Review*, 11, pp.389-410, 1992.
68. Knighton, D. R., Phillips, G. D., and Fiegel, V. D. : Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. *J. Trauma*, 30 (Suppl. 12): S134~144, 1990
69. Simionescu, N., and Simionescu, M. (eds). *Endothelial Cell Biology in Health and disease*, Plenum, New York, 1988.
70. Simionescu, N., and Simionescu, M. (eds), *Endothelial Cell Dysfunction*, Plenum, New York, 1991.
71. Fidker, I. J. and Ellis, L. M. : The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, 79, 185~188, 1994.
72. 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.
73. Folkman, J. : Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *N Engl J Med*, 285, 1182~1186, 1971.
74. Folkman, J. in *th Congress of thrombosis and Haemostasis* (Verstraete, M., Vermynen, J., Lignen, R., and Arnout, J., eds), Luvén University Press, pp. 583~596, 1987.
75. Folkman, J. : Angiogenesis and breast cancer. *J. Clin. Oncol*, 12, 441~443, 1994
76. Munoz, J : Effect of bacteria and bacterial products on antibody response. *Adv. Immunol.*, p.4:397, 1964.
77. 申攻圭：飢餓白鼠血清中電解質 및 代謝基質의 變動에 對한 八味丸의 效果, 東醫生理學會誌, Vol.1, No.1, p.25, 1983.
78. 崔圭善 外：八味丸과 Furosemide, Hydralazine, Atenolol 및 Verapamil의 併用投與에 對한 實驗的研究, 慶熙韓醫大論文集, Vol.14, No.1, p.293, 1991.
79. 오로사：八味地黃丸과 六味地黃丸의 效能에 關한 文獻의 考察, 東醫病理學會誌, Vol.10, No.2, p.12, 1996.