

四味軟堅湯加味方이 抗癌 및 抗轉移 效果에 미치는 영향

裴文庸 · 康仁哲 · 金聖勳

Study on Antitumor Activity of Samiyeongeontanggamibang(SYTG)

Moon-Yong Bae, In-Cheol Kang, Sung-Hoon Kim

Dept. of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

To evaluate the antitumor and antimetastatic effects of Samiyeongeontanggamibang(SYTG), We have examined whether SYTG can inhibit the growth of several tumor cell lines, tumor cell adhesion, experimental tumor metastasis and increase survival rate of tumor-bearing mice by inhibition of DNA topoisomerase activity,

The results were obtained as follows:

1. SYTG extracts revealed an efficient cytotoxicity against A549, SK-OV-3, B16-F10, and SK-MEL-2 cell lines.
2. SYTG extracts inhibited DNA topo-isomerase I from calf thymus.
3. The T/C% in S-180 bearing ICR mice treated with SYTG was 115.8%
4. SYTG extracts significantly inhibited adhesion of A549 cell to complex extracellular matrix.
5. In pulmonary colonization assay, SYTG suppressed lung metastases in tumor cell-injected mice.
6. In CAM assay, SYTG extracts inhibited angiogenesis at 15 μ g/egg concentration as compared with control.

These results suggested that SYTG extracts might be a potent inhibitor of cancer.

I. 緒 論

科學의 發達에 따른 醫學의 進步와 人間 生活의 變化는 傳染性 疾患의 減少를 가져온 反面, 高血壓, 糖尿病 等の 成人病 및 癌 等の 難治性 疾患은 最近 50年間 急激히 增加하는 趨勢에 있으며, 특히 癌은 世界的으로 가장 重要한 死因中의 하나로 報告^{1,2)}되고 있다.

癌이란 個體를 構成하는 正常細胞가 各種 刺戟에 의하여 細胞分裂을 調節하는 機能의 缺陷이나 惡性腫瘍 遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失됨으로써 變形細胞로 發展하여 無節制한 增殖을 한 것을 말한다³⁾.

韓醫學에서의 癌은 體內에서 發現되는 質이 堅硬하며 岩石과 같은 腫塊 等を 指稱하는 것^{4,5)}으로, '積聚', '腸覃', '石瘕', '癥瘕', '癰疽', '瘦瘤', '反胃', '噎膈', '乳巖', '石疽', '石癰' 등이 癌과 類似한 病症으로 認識⁶⁻⁹⁾되고 있다.

西洋醫學에서의 癌 治療法으로는 生物學 및 生化學 發展과 더불어 既存의 手術療法, 化學療法, 放射線療法 等に 免疫療法, 호르몬 療法 等이 并用되어 施行되고 있으나^{3,10)}, 治療 效果에 못지 않은 副作用¹¹⁻¹⁵⁾과 限界性¹⁵⁻¹⁸⁾으로 因하여 이를 代替할 수 있는 效果의인 治療 方法에 對한 研究 역시 活發히 進行되고 있다.

韓醫學에서 癌의 治療는 軟堅散結, 淸熱解毒, 理氣化血, 通經活絡, 化痰利濕 等の 祛邪法과 健脾益氣, 益氣養血, 健脾和胃, 滋補肝腎 溫補腎陽 等の 扶正法으로 大別되나 實際 臨床에 선 病情 및 患者의 正氣 狀態에 따라 이들을 併用하는 扶正祛邪法과 上記한 祛邪法을 相互 併用하는 治療法이 多用되고 있다¹⁹⁻²⁸⁾.

이 중 軟堅散結法은 "堅者削之, 結者散之, 癥者攻之"의 理論²⁹⁾에 따라, 腫塊를 軟化시키거나 疏散시키는 方法으로, 間質의 量이 많아 돌

처럼 굳어지는 硬性(scirrhous) 腫瘍³¹⁾ 等に 活用 가능한 治法이다.

軟堅散結法을 이용한 實驗의 報告로 常等³⁰⁾은 "海藻의 腫瘍細胞에 對한 抑制效果"를, 廣等³¹⁾은 "夏枯草의 S-180, U14에 對한 抑制作用"을 報告하였고, 白僵蠶, 牡蠣, 水蛭 等の 藥物에 對하여서도 研究가 이루어지고 있으나, 軟堅散結의 效能을 지닌 複合方을 이용한 研究는 아직 接하지 못했다.

이에 著者는 各種 癌患者에게 應用되는 四味軟堅湯³⁵⁾에 白花蛇舌草, 魚腥草 및 仙鶴草를 加味한 四味軟堅湯加味方을 試料로 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 生存比 등의 測定을 통해 抗癌效果를 評價하였고, A549 癌株에 對한 附着阻止作用, 血管形成沮害作用 및 pulmonary colonization 等を 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. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 動 物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계와 C57BL/6계 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 2주일간 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定 實驗에는 ICR계 생쥐를 使用하였고, 肺癌 轉移 實驗에는 C57BL/6계 생쥐를 使用하였다.

2) 藥 物

本實驗에 使用한 藥材는 市內 乾材 藥局 두 곳에서 外部形態를 比較 調査하여 確認한 後 實驗에 使用하였으며, 處方의 內容은 雷³⁵⁾의 四味軟堅湯을 基本으로 加味 構成하였으며 한 貼 分量은 아래와 같다.

Prescription of Samiyeongeontanggamibang (SYTG)

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
海 藻	Sargassum	20
昆 布	Laminariae Thallus	20
牡 蠣	Fossilia Osis Mastodi	20
夏 枯 草	Prunellae Spica	20
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusae Herba	8
魚腥草	Houttuyniae Herba	6
仙鶴草	Agrimoniae Herba	6
總 量		100

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), Hank's balanced salt solution(HBSS), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, EDTA, agaroses, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin, EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lyso-phosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma社 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 製品, tissue culture coverslip은 Nunc社 製

品을 各各 使用하였다.

2. 方 法

A. 抗癌性 探索

1) 試料의 製造

上記한 四味軟堅湯加味方의 2貼 分量(200g)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을 凍結 乾燥하여 26g의 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(0.25µm, 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, 및 B16-F10 melanoma(ATCC CRC 6322), SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 黑色腫을 in vivo 抗癌 實驗에 는 S-180(ATCC TIB 66) 腹水癌株, B16-BL6(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989년에 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^{39,40)}과 細胞數를 계산하기 위하여 MTT³⁹⁾ 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 2×10^4 개가 되도록 분주하였다. 분주된 細胞들은 CO₂ 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 μl씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다. 試料는 加하기 前에 0.22 μm 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 μl씩 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 μl의 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 ED₅₀ 값을 얻었다⁴¹⁾.

4) DNA topoisomerase I assay 方法⁴²⁾

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomerase I 저해 IC₅₀값을 결정하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法⁴²⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1 unit)만 加하여 總反應液을 20 μl가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料를 加하여 總反應液을 20 μl되게 한 것을 試驗群으로 하여 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 酵素의 量을 意味한다.

5) 細胞附着 沮止 作用 測定^{43, 44)}

미리 complex extracellular matrix (matrigel)로 coating한 96well plate에 A549세포를 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96-well microplate에 well당 100 μl 씩 가한(5×10^4 cells/well)후 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度の 試料를 녹인 培地 100 μl를 加하고 5% CO₂, 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³⁸⁾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 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 10^7 cells/ml의 濃도가 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로 溶解시켜 保存溶液(12mg/20g/day)을 만든 後 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 生理食鹽水液을 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式⁴⁵⁾에 따라 計算하였다.

7) Pulmonary colonization 抑制 作用 測定⁴⁷⁾

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 2×10^4 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)^{49, 50)}

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℃에서 36시간 培養시켰다. 샘플을 適當한 溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4等分된 thermanox coverslip 위에 10ul씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4等分하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 37℃에서 24시간 배양하였다. 유리 테잎을 칼로 뜯어내고, 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.

Ⅲ. 實驗成績

1. 癌株에 對한 細胞毒性

癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 SYTG의 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率을 측정하였다. P388 경우 SYTG농도가 증가됨에 따라 각각 95 ± 5.91 , 91 ± 3.96 , $87 \pm 2.15\%$ 로 細胞毒性이 微弱하였다. A549 癌株에 對한 細胞毒性은 87 ± 2.84 , 72 ± 2.91 , $61 \pm 3.64\%$ 로, 1mg/ml 濃度에서만 對照群에 比해서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다. SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性은 各各 92 ± 2.26 , 68 ± 4.25 , $38 \pm 6.15\%$ 로 0.5

Table 1. Cytotoxic Effect of SYTG on Various Tumor Cells

Conc.(mg/ml)	A549	SK-MEL-2	SK-OV-3	B16-F10	P388
Control	100±3.95	100±3.58	100±3.69	100±3.56	100±3.56
0.25	87±2.84	96±2.75	92±2.26	114±1.18	95±5.91
0.5	72±2.91	79±1.45	68±4.25	66±3.82	91±3.96
1	61±3.64	67±3.627	38±6.15	47±4.73	87±2.15

mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다. B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性은 細胞生存率이 各各 114±1.18, 66±3.82, 47±4.73%로, 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다. SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 各各 96±2.75, 79±1.45, 67±3.67%로, 高濃度인 1mg/ml에서만 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다<Table 1>.

2. DNA topoisomerase I에 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 20μ가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20μ되게 한 것을 試驗群으로 하여 活性을 測定하였다. 전기영동을 실시하여 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 μg/ml 濃度에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 强하게 抑制 하였다<Fig. 1>.

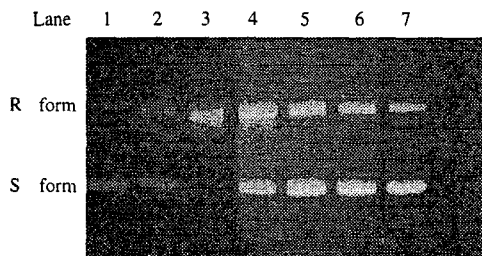


Fig. 1. Effect of SYTG on the DNA topoisomerase I from calf thymus

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 μg/ml of SYTG

3. A549 癌株의 附着 沮止效果

A549 細胞에 對한 附着 沮止 實驗을 한 結果 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 74±3.15, 43±4.75, 28±2.18%로 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 50% 以上 細胞附着을 沮止하였다<Table 2>.

Table 2. Inhibitory Effect of SYTG on Cell Adhesion of A549 cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0	100±6.26
0.25	74±3.15
0.5	43±4.75
1	28±2.18

■ : 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

SYTG를 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 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 16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, SYTG 投與群은 21.2日로 나타나, T/C%는 115.8%로 나타났다<Table 3>.

Table 3. Effect of SYTG on MST and T/C % in Sarcoma 180 bearing ICR Mice.

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%) [#]
Control	8	18.3	100
SYTG	8	21.2	115.8

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

5. 肺癌轉移에 미치는 效果

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 후 21日째에 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果 對照群은 49.7±3.27(개)이었는데 比해서 SYTG 投與群은 31.3±5.85(개)로써 36%의 肺癌轉移 抑制效果를 보였다<Table 4>.

Table 4. Inhibitory Effect of SYTG on Lung colonization in C57BL/6

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	8	49.7±3.27
SYTG	8	31.3±5.85

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

SYTG : 20.8mg SYTG-treated group after B16-BL6 i.v. injection

6. 血管形成 抑制效果

CAM assay를 통한 血管形成 抑制效果는 實驗에 使用된 受精卵 10개중 3개에서 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 SYTG on CAM

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

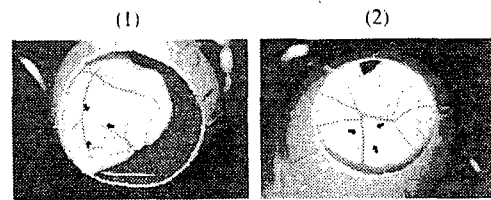


Fig. 2. Photographs of Distilled water or SYTG-treated embryonic CAM. (1) Distilled Water ; (2) SYTG(15μg/egg).

IV. 考 察

癌은 오늘날 人類를 위협하는 主要 難治性 疾患의 하나로, 生體내 正常細胞가 發癌物質 등의 環境의 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性刺戟 및 突然變異 등에 依하여 細胞分裂을 調節하는 機能의 缺陷이나 惡性腫瘍遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失됨으로써 發生하는 非正常的 細胞의 增殖을 말하다^{1,3,51}.

韓醫學에서의 癌은 體內에서 發現되는 表面이 高低不平하고, 質이 堅硬하며 岩石과 같은 腫塊等を 指稱하는 것⁵⁾으로 일찌기 內經에서

言及한 '積聚', '腸覃', '石瘕', '伏梁', '息賁', '石瘤', '厥疝', '瘤病' 과 이 후의 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 石疽, 石癰 등^{4,5,8,10})이 오늘날 癌과 全의으로 一致하지는 않지만 症狀 및 病理的 側面에서 癌과 가장 類似한 病證으로 認識되고 있다.

腫瘍의 發生 原因에 對하여 《內經》⁵²⁾에서는 虛邪, 八風, 憂怒, 血氣稽留, 飲食不節, 起居不節, 用力過度, 邪氣, 寒熱相搏 等으로 보았고, 巢⁵³⁾는 臟腑의 氣가 虛弱하거나 循環이 不利하여 發生한다 하였고, 陳⁵³⁾은 比較的 具體的으로 憂鬱傷肝, 思慮傷脾, 所願不得하여 經絡이 澁해서 發生한다는 病理를 설명하였다. 따라서 現재 抗癌劑 開發方法은 細胞分化, 增殖抑制, 細胞自殺機轉(Apoptosis), 癌細胞의 信號傳達, 分子生物學的 研究 및 腫瘍免疫 研究 等으로 보다 副作用이 적고 效果의인 藥物 開發을 위한 研究가 活發히 進行되고 있다^{17,18)}.

軟堅散結藥의 抗癌效果에 對한 實驗的 報告로 常等³⁰⁾은 "海藻의 腫瘍細胞에 對한 抑制效果"를, 廣等³¹⁾은 "夏枯草의 S-180, U14에 對한 抑制作用"을 報告하였고, 白僵蠶, 牡蠣, 水蛭 等の 藥物에 對하여서도 研究가 이루어지고 있다^{32,33,34)}.

그러나 軟堅散結의 效能을 지닌 處方에 대한 研究는 아직 未盡한 實情이며, 軟堅散結藥을 기타 攻邪藥과 함께 사용하면 腫瘍 治療效果를 增強시킬수 있다고 보여져 四味軟堅湯加味方을 試料로하여 抗癌과 抗轉移 效果에 대하여 살펴보았다.

四味軟堅湯은 1983年 浙江中醫雜誌에 惡性腫瘍을 治療한다고 紹介된 方劑로 原發性肝癌, 胃癌, 賁門癌, 直腸癌, 脾臟癌, 膀胱癌 등 511名의 患者에 投與하여 有效한 效果를 거두었다고 報告된 바 있다³⁵⁾.

四味軟堅湯加味方을 構成하는 藥物의 本草

學的 效能을 살펴보면 海藻와 昆布는 모두 性味가 鹹寒하여 軟堅散結, 消痰利水하고, 牡蠣는 性味가 鹹澁하고 微寒하여 軟堅散結하며 平肝潛陽하고, 夏枯草는 性味가 苦, 辛寒하여 清肝瀉火하고 軟堅散結한다. 여기에 加味된 白花蛇舌草는 清熱利濕, 解毒消癰하며, 魚腥草는 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋하며, 仙鶴草는 收斂止血, 止痢, 解毒한다⁵⁴⁾.

構成藥物의 抗癌效果에 對한 實驗研究로 海藻는 乳腺癌, 子宮肌肉癌, 骨血管腫과 Ehrlich 腹水癌에, 昆布는 甲狀腺腫, 食道癌, 惡性淋巴瘤에, 牡蠣는 乳腺癌, 食道癌, 胃癌, 惡性淋巴瘤, 骨細胞癌等에, 夏枯草는 多發性 骨血管腫, 甲狀腺腫瘍⁵⁵⁾에, 白花蛇舌草는 肺癌, 食道癌, 胃癌, 直腸癌 等에^{56,57)}, 仙鶴草는 惡性腫瘤에^{58,59)}, 魚腥草는 扁桃腺癌 肺癌 등에 有效하며 人體의 免疫能을 增加시킨다 報告되었다⁶⁰⁾. 따라서 이런 抗癌本草로 구성된 四味軟堅湯加味方은 抗癌效果가 期待된다.

먼저 抗癌實驗에서는 癌細胞 成長抑制를 測定하는 實驗方法인 MTT 및 SRB法^{37,38)}을 使用하여 數種의 癌株에 對한 細胞毒性을 測定하였는데, SK-OV-3, B16-F10 癌株에서는 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 30% 以上 細胞成長을 抑制하였고, A549, SK-MEL-2 癌株에서는 1mg/ml의 濃度에서만 30% 以上 細胞成長을 抑制하여(Table I), 전반적으로 NCI가 設定한 細胞毒性 基準에는 미치지 못하지만 有意性있는 細胞毒性 效果를 나타내었다.

DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 지대한 影響을 미친다^{61,62)}.

이와 같이 DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 여러 機能에 必須的이어서, 그들의 抑制製는 抗生, 抗癌劑 開發의 目標⁶³⁾가 되고 있다.

1990年代 以前까지 DNA topo-II 抑制製는 많이 알려져 있지만 DNA topo-I 抑制製는 camptothecin 외에는 별로 알려져 있는 것이 없어 이에 대한 研究가 활발하다⁶⁴⁾. 本 實驗에서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 DNA만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 1 unit topo-I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다. 이에 比해서 試料를 處理한 群에서는 濃度依存的으로 酵素의 活性를 抑制하였으며, 125-250 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 IC₅₀을 나타내어 細胞毒性은 全般的으로 有意性있는 것을 알 수 있다. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에서는, 對照群의 MST는 18.3日, SYTG 投與群은 21.2日로 나타나, T/C%가 115.2%로 나타났다<Table 3>.

轉移는 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, 癌의 病理 機轉上 重要하게 認識되고 있는 바^{1,3)}, 本 實驗에서는 A549 癌株에 對한 附着 阻止作用, B16- BL6를 이용한 肺臟 colony 抑制作用 및 CAM에 의한 血管形成 阻害作用을 測定하여 抗轉移 效果를 評價하였다. 먼저 A549 癌株에 對한 附着 阻止作用에서는 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 50% 以上 細胞成長을 抑制하여 有意性있는 效果를 나타내었으며<Table 2>, B16-BL6 黑色腫의 肺癌轉移 抑制效果에서는 36%의 肺癌轉移 抑制效果를 나타내어<Table 4>, 附着 阻止作用에 있어 서로 相反되는 結果가 나타났다.

마지막으로 癌細胞가 成長하기 위하여서는 血管形成을 通하여 血液供給을 받는 것이 必修의인데, 新生血管을 抑制하므로써 癌細胞의 成長을 抑制할 수 있는 效果를 觀察하기 위하여 本 實驗에서는 CAM assay를 實施하였다.

Angiogenesis는 新生血管(new blood vessel)이

生成되는 根本的인 過程으로써 이러한 新生血管의 形成은 胎盤의 形成, 初期의 embryonic development 동안에 embryonic membrane의 形成, 生殖, 傷處回復과 再生 등과 같은 生理學的 狀態에 있어서 必需的으로 매우 精妙하게 調節된다. 즉, 필요한 時機에 血管 형성이 誘導되고 抑制되면서 均衡을 이루는 이러한 調節作用은 生體내에서 生産되는 新生血管形成 誘導因子들과 抑制因子들에 의해서 이루어진다⁶⁵⁾. 그러나 血管形成의 誘導와 抑制가 제대로 調節되지 않으면 關節炎(arthritis), 糖尿病性 網膜症, 血管腫, 硬皮腫과 같은 疾病을 惹起하기도 하여^{66,67)} angiogenesis를 誘導 혹은 抑制하는 因子를 찾기 위한 많은 研究가 이루어지고 있다.

한편, angiogenesis는 癌의 成長(growth)과 invasion, metastasis에 重要的 段階로 알려져 있다. 즉, 癌은 成長을 위해 새로운 毛細血管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 연결된 새로운 血管을 이용해 循環期를 통하여 肝, 肺, 뼈조직 등으로 移動하게 된다^{68,69)}.

그러므로 癌細胞 주위로 新血管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 急速히 자라게 되며 營養分의 供給源인 새로운 微細血管이 그 周圍를 둘러싸고 結局 轉移가 일어나게 된다^{70,71)}. 따라서 angiogenesis의 과정을 抑制하면 癌을 治療할 수 있으리라는 것을 豫想할 수 있다.

위와 같은 angiogenesis에 대한 現在의 知識을 바탕으로하여 angiogenesis를 抑制하는 방식은 다음의 세가지로 分類된다. 첫째로 癌細胞로부터 angiogenic factor의 分泌를 抑制 혹은 이미 分泌된 angiogenic factor를 中和시키거나, 둘째로 vascular endothelial cell proliferation 혹은

migration을 억제하거나, 셋째로 vessel basement membrane의 합성을 억제하는 방법이 가능하다. 現在까지 알려진 血管形成 抑制製는 內因性因子(endogenous factor)외에 suramin 유도체, distamycin A 유도체, tamoxifen, genistein, AGM-1470, quinoline-3-carboxamide, thalidomide, minocycline, progesteron 誘導體인 medroxyprogesteron acetate (MPA)⁷¹⁾들이 있으며 이밖에 抗癌劑인 herbimycin A와 eponemycin도 抗癌效果와 함께 抗血管形成 效果를 가지고 있다고 알려져 있다⁷²⁾. 이와 같이 血管形成을 抑制하는 物質을 찾아내어 抗癌劑로써 開發하려는 가장 큰 理由는 癌細胞에 대하여 直接的으로 作用하여 癌細胞를 죽이기 보다는 根本的으로 癌細胞가 成長하기위해서 必需的인 血管形成(angiogenesis)을 抑制하여 副作用이 없는 理想的인 抗癌劑를 開發할 수 있다는 점이다.

實際로 angiostatin^{73,74)}이라는 物質은 血管生成을 抑制할 뿐만 아니라 動物實驗에서 癌을 거의 완벽하게 治癒한다는 報告가 있어 많은 關心을 불러일으키고 있다.

지금까지 血管形成 抑制效果에 널리 사용되고 있는 screening 方法인 CAM assay^{49,50)}는 胚의 發生 3-4일째에 生成되는 胚외막(extra embryonic membrane)으로써 毛細血管과 다른 血管들을 뚜렷이 區別할 수 있어 血管移動과 形態形成에 影響을 주는 因子를 研究하는데 適當한 모델로 사용되고 있다. 本 實驗에서의 CAM assay 結果는 實驗에 使用된 10個의 受精卵中 3個의 受精卵에서 血管形成 抑制效果가 나타나 30%의 血管形成 抑制效果를 보였다 <Table 5, Fig. 2>.

以上을 綜合하여 보면 四味軟堅湯加味方은 A549를 除外한 數種 癌細胞에 對하여 有意性 있는 細胞毒性을 나타내었으며, Topo-I의 活性을 強하게 抑制하여 有意性있게 癌細胞 成長

을 抑制하였다. 癌轉移에 關聯된 實驗으로 A549 癌株의 細胞附着 阻止作用에 대해서만 有意한 結果를 나타내고, 肺癌轉移 抑制作用 및 血管形成 抑制作用에서도 의미있는 效果를 나타내어, 本 試料의 抗癌活性은 轉移抑制作用과 直接的인 細胞毒性에 依한 것으로 思料된다.

V. 結 論

四味軟堅湯加味方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 阻止作用, 肺臟 colony 形成 抑制作用 및 血管形成 抑制作用 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 數種 癌株에 對한 細胞毒性에서는 SK-OV-3, B16-F10 癌株에 對하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서, A549, SK-MEL-2 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 비하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 50%以上 阻止하여 有意性있는 效果를 나타내었다.
3. DNA topoisomerase I assay에서는 濃度 依存的으로 酵素活性을 抑制하여 有意性있는 效果를 나타내었다.
4. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 115.8%로 微弱한 生命延長效果를 나타내었다.
5. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 비하여 36% 抑制하였다.
6. CAM assay에서는 30%의 血管形成 抑制作用을 나타내었다.

以上の結果를 보아 加味抵當湯의 抗腫瘍效果는 直接的인 細胞毒性和 유의성 있는 抗轉移作用에 의한 것으로 보이며, 向後 扶正藥과 配合時 癌治療에 더욱 有效할 것으로 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 서울대학교 醫科大學：腫瘍學, 서울, 서울대학교출판부, p.137, pp.1-3, 214-215, 225-234, 1989.
2. 이문호 외：最近 韓國의 疾病變遷, 大韓醫學協會誌, 32(3), : 283- 290, 1989.
3. 孫泰重 編：病理學概論, 서울, 高文社, p.227, 1979.
4. 白洪龍：辨證施治概要, 雲南, 人民出版社, P.502. 1984.
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. 葉銘洪：治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1-10, 1986.
8. 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.
9. 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.
10. 李文鎬：內科學 卷下, 博愛出版社, pp.2246-2250, 2466-2475, 1976.
11. 鞠永棕 編：고오스 藥理學, 서울, 汎文社, pp.701-710, 1986.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 儲水蟲：惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
20. 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.
21. 李仲守：扶正則積自除, 新中醫, 第10期, p.39, 1984.
22. 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.

23. 潘明繼 外：胃癌에 對한 中西醫結合治療規則研究, 한글판中醫雜誌, No.3, pp.52-55, 1994.
24. 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.
25. 孫孝洪：中醫治療學原理, 成都, 四川科學技術出版社, pp.155- 157, 196-197, 228-229, 386-395, 513-519, 538-541, 565-566, 593-597, 631-633, 1990.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 山東中醫學院：黃帝內經素問校釋, 人民衛生出版社, p.336, 1982.
30. 常敏毅：抗癌本草, 湖南科學技術出版社, p.228, 1987.
31. 廣西醫學院：醫學科學技術資料匯編, 廣西醫學院篇, p.49, 1960
32. 昆明醫學院部一院內科學：云南醫學(1)：29, 1980.
33. 王冠庭 外：扶正抗癌方為主結合化療對158例術後晚期胃癌的治療及實驗研究, 中西醫結合雜誌, vol.10, No.12, pp.712 716, 1990.
34. 姜延良：滋陰和腫瘤豫防, 學術論文集, 中國中醫研究院中藥研究所編, pp.193-194, 1987
35. 雷永仲：四味軟堅湯治療惡性腫瘤, 浙江中醫雜誌, p.207-210, 1983
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. Liu, L. F. : In DNA topology and its biological effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.371-389, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
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. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals

- of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132 -140, 1987.
47. 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.
 48. 金井泉 外 : 臨床検査法提要, 서울, 高文社, p.242, 249, 1984.
 49. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, *Pharmac., Ther.*, Vol.51, pp.1-11, 1991.
 50. 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.
 51. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, pp.225-271, 632-638, 703-710, 742-759, 816-827, 936-941, 1015- 1021, 1061-1070, 1990.
 52. 賈 瑩: 癌瘤防治研究, 서울, 成輔社, pp.25-28, 1984.
 53. 巢元方 : 諸病源候論, 서울 大星文化社, pp.234-235, 1982.
 54. 陣士鐸 : 石室秘 , 서울 大星文化社, pp.11-12, 1993.
 55. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 永林社, pp. 205-206, 315-316, 481-487, 521-522, 534-535, 551- 552, 621-623 1991.
 56. 김수철 : 抗癌本草, 서울, 圖書出版 바람과 물결, p.251, 354, 365, 415, 474, 1988.
 57. 上海中醫學院 : 中草藥學. 香港, 商務印書館, pp.127-130, 561- 562. 564-566, 1983.
 58. 金有景 : 抗癌食藥本草, 中國食品出版社. p.214. p.226. p.311 p.351. 1989.
 59. 王 冰: 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.25-28, 33-34, 1990.
 60. 李 岩 : 腫瘤臨床備要, 人民衛生出版社, pp.75-77 1980.
 61. 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.
 62. P.D. Arpa, and L.F. Liu ; Topoisomerase-targeting anticancer drug, *Biochim. Biophysica Acta.*, 989, pp.163~177, 1989.
 63. 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.
 64. 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.
 65. Yong Q.C. : Fatty acid modulation of tumor cell-platelet vessel wall interaction, *Cancer and Metatasis Review*, 11, pp.389-410, 1992.
 66. 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
 67. Simionescu, N., and Simionescu, M.(eds), *Endothelial Cell Biology in Health and disease*, Plenum, New York, 1988.
 68. Simionescu, N., and Simionescu, M.(eds), *Endothelial Cell Dysfunction*, Plenum, New York, 1991.
 69. Fidker. I.J. and Ellis, L.M. : The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 79. 185~188. 1994.

70. 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.
71. Folkman, J. : Tumor angiogenesis:
Therapeutic implications, N Engl J Med, 285,
1182-1186, 1971.
72. Folkman, J. in th Congress of thrombosis
and Haemostasis (Verstraete, M., Vermylen,
J., Lijnen, R., and Arnout, J., eds), Luvén
University Press, pp. 583-596, 1987.
73. Folkman, J. : Angiogenesis and breast cancer.
J. Clin. Oncol, 12, 441-443, 1994
74. Munoz, J : Effect of bacteria and bacterial
products on antibody response, Adv.
Immunol.4:397, 1964.