

감두약침액의 암세포 성장 저해 효과

조경희 · 한상훈 · 임종국 · 손윤희*[†] · 이임태* · 남경수*

동국대학교 한의학대학 경혈학교실, *의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터

Antitumor Activity of Gamdutang Aqua-Acupuncture Solution

Kyoung-Hee Cho, Sang-Hoon Han, Jong-Kook Lim, Yun-Hee Shon*[†],
Yim-Tae Lee* and Kyung-Soo Nam*

Department of Acupuncture and Moxibustion Pointology, College of Oriental Medicine

**Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Diseases Research Center,
Dongguk University, Kyongju, 780-714, Korea*

Abstract

Gamdutang aqua-acupuncture solution (GAS), Gamdutang water-extracted solution (GWS) and Dae-Gamdutang aqua-acupuncture solution (DGAS) were prepared and tested for antitumor activities. It was shown to possess considerable toxicity toward various tumor cell lines. Concentration of 5× and 10× of GAS resulted in more than 70% inhibition of growth in Ehrlich ascites tumor cells (EATC), Hepa1c1c7 and A549. GAS at concentrations of 5× and 10× revealed more than 60% inhibition in HeLa. GWS showed more than 50% inhibition of growth with EATC and HeLa at concentrations of 5× and 10×, respectively. Toxicity assay with GWS in Hepa1c1c7 and A549 revealed that more than 80% inhibition of growth at the concentration of 5× and 10×. In morphological study, the number of cells were decreased, and the shape of cells was round-form in EATC, Hepa1c1c7, A549, HeLa with GAS.

Key words – Gamdutang aqua-acupuncture solution, Antitumor activity, Morphological study

서 론

세포분열을 지배하는 조절기능의 결함이나 악성종양 유전자를 억제하는 능력이 상실되므로서 발생하는 비정상적인 세포의 증식을 병리학적으로 암이라 규정하고 있다. 이러한 악성종양을 치료하기 위하여 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하고 있으나[8,10,16,18] 수술요법, 방사선요법은 국소적인 치료법

이기 때문에 한계성이 있고, 전신요법인 면역요법도 현재로서는 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이다[15]. 또한, 화학요법도 독성문제를 아직 해결하지 못하고 있는 실정이다[13,14,20] 이러한 문제를 해결하기 위해서는 항종양 효능이 우수한 새로운 천연산물에서 안전성이 있는 약물개발이 요구되고 있다[4,12,17]. 감두탕은 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer)와 흑두(*Glycine max* (L) Merr)를 배합한 것으로 감초는 원산지가 내몽고이고 두과의 다년생 초본

[†] Corresponding author

식물이며[1,5], 흑두는 콩과 식물의 흑대두와 흑소두의 검은 종자로 둘 다 해독작용을 가지고 있는 약초로 알려져 있다. 특히 감초는 여러 가지 암(식도암, 복수암, 농피암) 등에 대한 항암효능이 있다고 보고되어 있다[6,7]. 그러나, 감두탕의 해암작용에 관한 실험결과를 보고된 바가 없어 본 실험에서는 항독효능이 있다고 알려진 한약재인 감두탕으로 *in vitro*에서 암세포에 대한 독성실험[9]을 실시하여 항암효능을 살펴보았다.

재료 및 방법

감두약침액 및 열수추출액의 제조

본 실험에서 감두약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 원감초와 흑소두 및 흑대두를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다. 약침액은 수제 알콜침법에 의하여 조제하였다[2,3]. 흑소두와 감초 60 g (1:1)을 조말하여 증류수 400 mL을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 진탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 mL을 감압농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman Germany)로 여과한다. 그리고 3차 증류수를 가하여 200 mL이 되게 하여 1×의 약침액으로 사용하였으며 10×, 5×, 3× 약침액은 1×의 약침액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였고, 대감두약침액은 흑소두 대신 흑대두를 사용하여 감두약침액과 동일한 방법으로 조제하였다. 그리고, 흑소두와 감초 60 g (1:1)을 조말하여 증류수 400 mL을 가한 뒤 rotary evaporator에서 3시간 진탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 200 mL을 감압농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하고 PBS를 가하여 200 mL이 되게 하여 1×의 열수추출액으로 사용하였으며,

10×, 5×, 3× 감두열수추출액은 1×의 열수추출액을 감압농축하여 사용하였고, 증류수나 PBS를 첨가하여 0.1×, 0.5× 농도로 조제하였다.

세포배양

세포 독성 실험은 mouse Ehrlich ascites tumor cell (EATC, ascites carcinoma), Hepalcl7 (mouse hepatoma), human A549 (lung carcinoma)와 HeLa (epithelioid carcinoma, cervix) 세포를 사용하여 실시하였다. 계대 보존 중인 EATC (ATCC CCL-77)를 1×10^6 cells씩 ICR 마우스의 복강내에 매주 이식하고 다시 세포를 복강에서 추출하여 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 NCTC 135 (Sigma Chemical Co.)를 배양액으로 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 생쥐의 Hepalcl7과 사람의 HeLa세포는 10% FBS가 첨가된 minimum essential medium eagle's (MEM)으로 A549는 10% FBS가 첨가된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배양액으로 각각 배양하였다. 세포 독성 실험에 사용한 세포들은 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였다.

MTT assay

실험에 사용한 적정세포수는 세포 부유액을 세포 밀도 1/2로 희석하면서 접종한 후 96-well plate를 37°C, 5% CO₂ 하에서 3일간 배양한 후 MTT 처리후의 흡광도를 측정하였다[11,19]. 세포 농도에 따른 지수 곡선에서 흡광도가 0.6-0.7인 부분의 세포농도가 적정세포의 수로 본 실험에 사용하였다. 적정수의 세포를 180 μ L의 배지에 부유시켜 96-well plate에 접종시키고 CO₂ 배양기에서 2시간 배양 후 시료, 감두약침액, 대감두약침액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×) 또는 열수추출액 (0.1×, 0.5×, 1×, 3×, 5×)을 각각 20 μ L씩 각 well에 가하였다. 세포를 약침액 또는 열수추출액이 첨가된 배양액에서 72시간 배양한 후, PBS에 녹인 20 μ L 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/ml PBS)을 well에 넣고 4시간 배양하여 MTT가 환원되게 하였다. 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO)

와 ethanol을 1:1 섞어 만든 용액 150 μ l씩 각각의 well에 넣어 20분간 formazan 결정을 용해하여 ELISA microplate reader (Behring EL 311) 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 평균 \pm 표준편차 (Standard deviation, SD)로 표현하였다. Student's t test를 시행하여, 결과치는 P 값이 0.05 또는 0.01 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

세포 형태 관찰

시료의 세포 형태를 관찰하기 위하여 각 세포 (EATC, Hepalcl7, A549, HeLa)에 MTT assay에서와 같은 방법으로 5 \times 농도의 시료를 처리한 후에 세포 형태를 inverted microscope (Nikon, Japan)상에 장치하고 각 well에서 세포를 관찰한 후 100배로 사진을 촬영하였다.

결과 및 고찰

In vitro에서 암세포에 미치는 영향

In vitro에서의 감두탕의 암세포 성장 저해효과를 알아보기 위해 감두약침액, 열수추출액 및 대감두약침액을 쥐의 암세포인 EATC와 Hepalcl7, 그리고, 사람의 암세포인 A549와 HeLa에 처리하여 암세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보았다. EATC에 대한 실험에서 감두약침액은 10 \times , 5 \times 농도에서 각각 100%의 세포 성장 억제율이 나타났으며, 열수추출액 10 \times , 5 \times 농도에서도 74%, 47%의 세포 성장 억제 효과가 나타났고, 대감두약침액은 10 \times , 5 \times 농도에서 각각 97%, 62%의 성장 억제율을 보였다 (Fig. 1).

EATC에서 사용한 농도와 같은 농도의 약침액 및 열수추출액을 Hepalcl7 세포에 처리했을때 약침액 10 \times , 5 \times 농도에서 90%, 84%의 세포 성장 억제효과가 나타났으며, 열수추출액 10 \times , 5 \times 농도에서는 92%, 74%의 억제율을 보였고, 대감두약침액은 10 \times , 5 \times 농도에서는 88%, 79%의 세포 성장 억제율을 가져왔다 (Fig. 2). 쥐의 암세포에 실시한 것과 같은 방법으로 사람의 A549, HeLa 세포주에 대한 감두약침액 및 열수추출액의 세포 독성 실험을 실시한 결과, A549 세포에 약침액 10 \times , 5 \times 를 처리한 후 72시간 배양에서 98%, 72.1%의 세포 성장 억제효과가 나

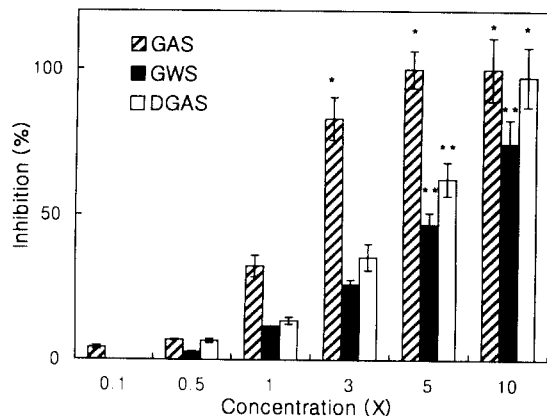


Fig. 1. In vitro toxicity assay of Gamdutang to Ehrlich ascites tumor cells.

The cells were incubated for 72 hrs with Gamdutang at the concentrations indicated. Data shown are mean values with bars indicating the standard deviation of the mean (n=3). GAS: Gamdutang Aqua-acupuncture Solution, GWS: Gamdutang Water Solution, DGAS: Dae-Gamdutang Aqua-acupuncture Solution. *P<0.01 as compared to control, **P<0.05 as compared to control.

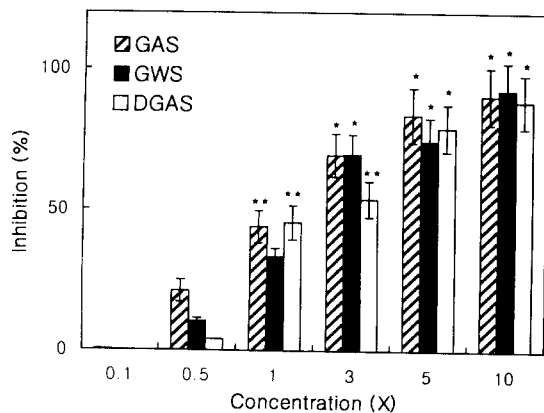


Fig. 2. In vitro toxicity assay of Gamdutang to Hepalcl7 cells.

The cells were incubated for 72 hrs with Gamdutang at the concentrations indicated. Data shown are mean values with bars indicating the standard deviation of the mean (n=3). GAS: Gamdutang Aqua-acupuncture Solution, GWS: Gamdutang Water Solution, DGAS: Dae-Gamdutang Aqua-acupuncture Solution. *P<0.01 as compared to control, **P<0.05 as compared to control.

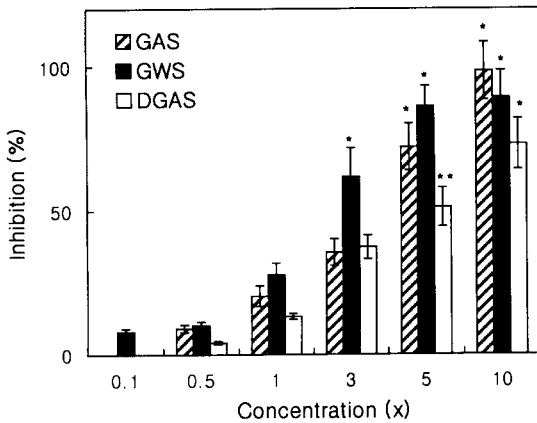


Fig. 3. *In vitro* toxicity assay of Gamdutang to A549 cells. The cells were incubated for 72 hrs with Gamdutang at the concentrations indicated. Data shown are mean values with bars indicating the standard deviation of the mean (n=3). GAS: Gamdutang Aqua-acupuncture Solution, GWS: Gamdutang Water Solution, DGAS: Dae-Gamdutang Aqua-acupuncture Solution. *P<0.01 as compared to control, **P<0.05 as compared to control.

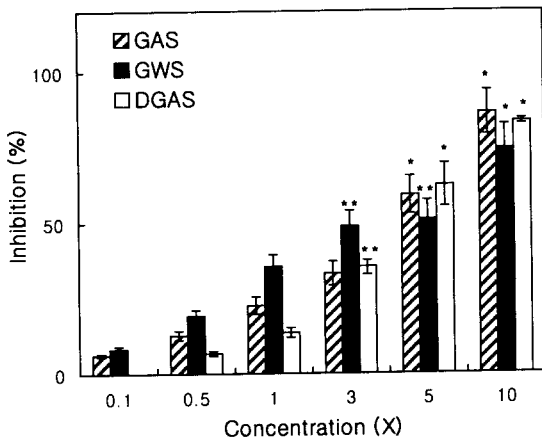


Fig. 4. *In vitro* toxicity assay of Gamdutang to HeLa cells. The cells were incubated for 72 hours with Gamdutang at the concentrations indicated. Data shown are mean values with bars indicating the standard deviation of the mean (n=3). *P<0.01 as compared to control, **P<0.05 as compared to control.

타났으며, 감두열수추출액 10×, 5× 농도에서는 89%,

86%의 억제율이 나타났으며, 대감두약침액의 경우는 10×, 5× 농도에서는 73%, 51%의 억제율을 보였다 (Fig. 3). HeLa 세포에 10×, 5× 감두약침액과 대감두약침액을 처리했을 때 86%, 59%과 73%, 62%의 억제효과가 나타났으며, 열수추출액은 10×, 5×농도에서 74%, 51%의 세포 성장 억제율을 나타내었다 (Fig. 4). 이와 같이 감두약침액, 열수추출액 및 대감두약침액은 농도가 높을수록 암세포 독성 효과가 증가하였으며 약침액과 열수추출액 10×의 경우 모든 세포에서 성장 저해효과에 큰 차이가 없었다. 이와 같이 감두탕이 *in vitro*에서 암세포에 대해 독성효과가 있는 것으로 나타나, 향후 EATC를 사용하여 mouse를 대상을 복수암을 유발시킨 후 *in vivo*에서의 감두약침액의 항암효과를 측정하는 것이 매우 의미가 있는 일이라 생각된다.

세포 형태 관찰

감두약침액을 쥐의 암세포인 EATC와 Hepal1c7, 그리고, 사람의 암세포인 A549와 HeLa에 투여한 후 세포를 관찰한 결과 비처리한 세포와 형태학적 차이가 뚜렷하게 나타났다. 본 실험에 사용한 모든 세포주들은 부착 세포들로서 세포 배양 플라스크의 바닥에 부착하여 성장하나, 5× 약침액을 처리한 후 세포주의 형태를 현미경상으로 관찰해 본 결과, 약침액을 비처리한 세포와는 다른 둥근 모양으로 변화되어 플라스크의 바닥에서 떨어져 세포들이 부유된 상태가 되어 있었다 (Fig. 5, 6, 7, 8).

요 약

한방에서 염증, 종양 억제등에 사용되는 감초와 흑소두, 감초와 흑대두를 정량으로 배합하여 조제한 약침액을 이용하여 *in vitro*에서의 암세포 성장 저해 효과를 살펴 보았다. 그 결과, 감두약침액, 열수추출액 및 대감두약침액은 mouse Ehrlich ascites tumor cells, Hepa1c1c7과 human A549, HeLa세포의 성장 억제효과를 나타냈으며, 감두약침액을 처리한 세포 (mouse EATC, Hepa1c1c7과 human A549, HeLa)의 현미경 관찰에서는 세포수의 감소와 형태의 변화를 관찰할 수 있었다.

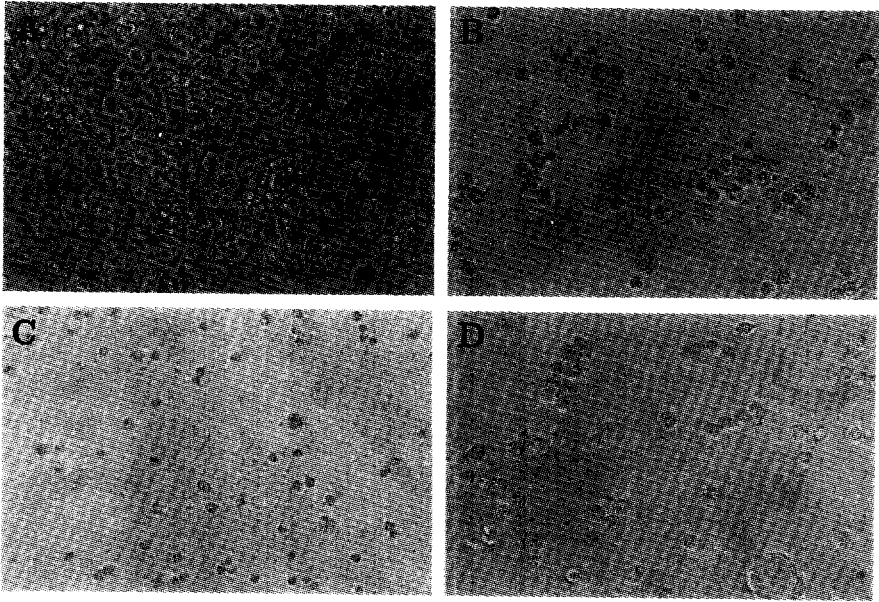


Fig. 5. Micrograph of Ehrlich ascites tumor cells (A, $\times 100$).

EATC (B, C, D $\times 100$) were cultured with samples (GAS; B, GWS; C, DGAS; D) at the concentration of $5 \times$ for 72 hrs. The number of cells were decreased, and most cells showed round form with GAS, GWS and DGAS.

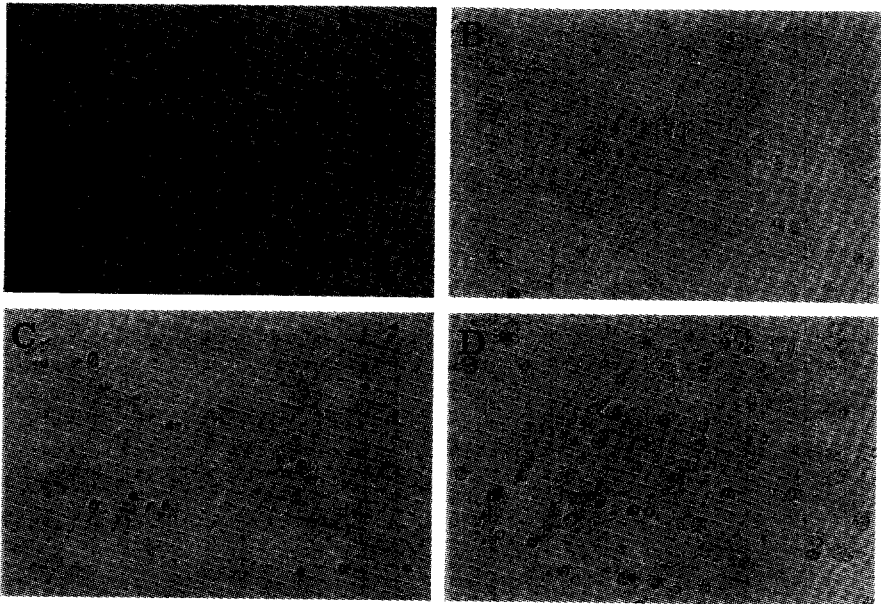


Fig. 6. Micrograph of Hepa1c1c7 cells (A, $\times 100$).

Hepa1c1c7 cells (B, C, D $\times 100$) were cultured with samples (GAS; B, GWS; C, DGAS; D) at the concentration of $5 \times$ for 72 hours. The number of cells were decreased, and most cells showed round form with GAS, GWS and DGAS.

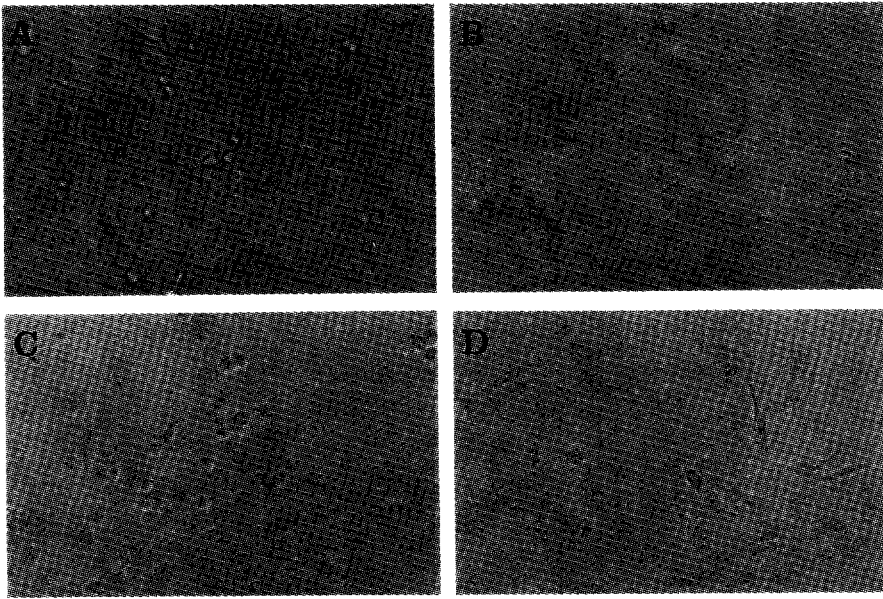


Fig. 7. Micrograph of human A549 cells (A, $\times 100$).

A549 cells(B, C, D $\times 100$) were cultured with samples (GAS; B, GWS; C, DGAS; D) at the concentration of $5\times$ for 72 hrs. The number of cells were decreased, and most cells showed round form with GAS, GWS and DGAS.

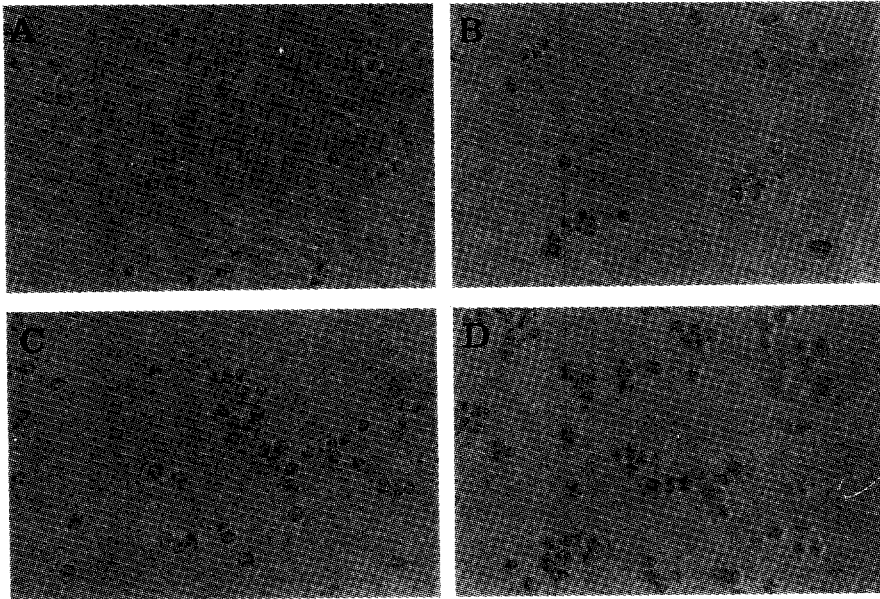


Fig. 8. Micrograph of human HeLa cells (A, $\times 100$).

HeLa cells (B, C, D $\times 100$) were cultured with samples (GAS; B, GWS; C, DGAS; D) at the concentration of $5\times$ for 72 hrs. The number of cells were decreased, and most cells showed round form with GAS, GWS and DGAS.

참 고 문 헌

1. 康秉秀. 1994. 臨床配合本草學. pp.94-97, 永林社. 서울.
2. 김중완, 최혜경, 손윤희, 임종국, 이항우, 남경수. 1999. 금은화 약침액의 암예방 효과. 생약학회지 **30**, 261-268.
3. 문진영, 임종국, 최혜경, 이임태, 이항우, 남경수. 1999. 시호 약침제재가 생쥐의 면역활성에 미치는 영향, 생약학회지 **30**, 115-122.
4. 손윤희, 전경희, 최수정, 정시린. 1998. 별불가사리 렉틴의 복수암에 대한 항암효과. 약학회지 **42**, 388-394.
5. 申信求. 1973. 申氏本草學. pp.16-20, 壽文社. 서울.
6. 安德均. 1998. 中藥大辭典. pp.6635-6638. 圖書出版社. 서울.
7. 許 凌. 1981. 東醫寶鑑. pp.90, 91, 92, 118, 218, 238, 232, 332, 373, 382, 385, 396, 424, 476, 477, 576, 589, 682, 720. 大星文化社. 서울.
8. Bluming, A. Z. 1975. Current status of clinical immunotherapy. *Cancer Chemother. Rep.* 59-91.
9. Borenfreund, E. and J. A. Puemer. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *J. Tissue Culture Meth.* **9**, 7-9.
10. Braun, D. P. and J. E. Harris. 1987. Cancer chemotherapy and its impact on the immune system. pp.77-100, In Hellmann, K. and S. K. Harris(ed.), *Fundamentals of cancer chemotherapy*, McGraw-Hill Book Co., New York.
11. Carmichael J., W. G. DeGrff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
12. Chang, I. M. 1989. Assay of mutagenicity and anti-mutagenicity of traditional herbal drugs by using SOS-chromolumutest and micronucleus test in mice. pp.229-248. In *New drug development from national production*. K. S. of Pharm. Seoul.
13. Fish, B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* **54**, 2609.
14. Goodman G. E., Y. P. Yen, T. C. Cox and J. Crowley. 1987. Effect of verapamilon *in vitro* cytotoxicin and vinblastine in human tumor cell, *Cancer Res.* **47**, 2295.
15. Mac Ewen, E. G. 1975 General concepts of immunotherapy of tumors. *J. Am. Annu. Hosp. Assoc.* **12**, 363-369.
16. Mathe, G. 1978. Active immunotherapy : Experimental and rational basis. pp.5-27. *Immunotherapy of human cancer*, Raven press, New York.
17. Nakamura, T. and T. Ueda. 1993. Pharmacodynamics and action mechanism of antitumor agents. *Gan To Kadaku Ryoho* **20**, 1731-1740.
18. Theilen, G. H. and D. Hills. 1983. Comparative aspects of cancer immunotherapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **181**, 1134-1139.
19. Vistica, D. T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman and M. Boyd. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515-2520.
20. Weiss, D. V. 1980. Tumor antigenicity and approaches to tumor immunotherapy. Springer-Verlag, Berlin.