

加味地黃湯, 加味四君子湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性

金東熙 · 金聖勳*

Abstract

Study on Antitumor Activity of Kamisagoonjatang, Kamijihwangtang and Kamigoonjajihwangtang

Kim Dong-hee · Kim Sung-hoon*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Taejon University

To evaluate the antitumor activity of Kamisagoonjatang(KST), Kami-
jihwangtang (KJT) and Kamigoonjajihwangtang(KKJT), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows:

1. In cytotoxicity against B16-F10, HT1080, SNU, and L1210, con-
centration inhibiting cell growth up to below 50% of control was recognized at 10^{-3} g/ml of KKJT.

2. In cytotoxicity against A549, SK-OV-3, XF498 and HCT15, concentration inhibiting cell
growth up to below 30% of control was over $400\mu\text{g}/\text{ml}$ of KKJT only and also over $200\mu\text{g}/\text{ml}$
against SK-MEL-2.

3. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, the IC_{50} was shown $200\text{-}400\mu\text{g}/\text{ml}$
of KST, over $400\mu\text{g}/\text{ml}$ of KJT and $100\text{-}200\mu\text{g}/\text{ml}$ of KKJT.

4. The T/C% was 122.8 in KJT, 127.4 in KST and 158.4 in KKJT-
treated group in S-180 bearing ICR mice.

5. In hematological changes in S-180 bearing ICR mice, numbers of WBC were decreased
significantly in KJT and KKJT treated groups as compared with control, whereas those of platelet
were increased with no significance in all groups as compared with control.

From above results it was concluded that KKJT could be usefully applied for the prevention
and treatment of cancer.

腫瘍이란 非正常的인 過剩發育으로 體內的 各
部位에 擴散 浸潤하여 正常 組織을 破壞하는 疾
患으로, 이 중 惡性腫瘍을 흔히 癌이라 일컫으
며¹⁻⁴⁾, 現在 韓國人 疾病 死亡 原因中 循環器 疾
患에 이어 2位를 點하고 있다⁵⁾.

I. 緒 論

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學教室

‘息貞’,《靈樞·刺節眞邪》⁶⁾의 ‘昔瘤’,《靈樞·九鍼論》⁶⁾의 ‘瘤病’,《素問·腹中論》《素問·奇病論》⁷⁾의 ‘伏梁’,《素問·五藏生成論》⁷⁾의 ‘厥疝’,《素問·骨空論》의 ‘瘕聚’와 이 후의 여러 韓醫書에서 나타나는 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 乳巖, 石疽, 石癰 등⁸⁻¹⁵⁾이 오늘날 癌과 全적으로 一致하지는 않지만 症狀 및 病理 側面에서 癌과 가장 類似한 病證으로 認識되고 있다.

癌에 대한 治療法으로 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등이 活用^{16,17)}되는데 手術療法는 轉移된 腫瘍의 治療가 不可避하다는 限界點을 가지고 있으며, 放射線療法는 局所的 浸潤性 腫瘍의 治療에는 有效하나 轉移 腫瘍의 境遇는 治療에 制限性이 있어, 照射量의 增加에 따른 正常組織의 損傷과 骨髓造血器障礙, 脫毛, 皮膚異狀 및 臟器損傷 등의 副作用을 招來하는 短點이 있고, 化學療法는 全身的 轉移의 경우 훌륭한 治療法이 되나 化學製劑의 腫瘍에 대한 選擇性, 正常細胞에 對한 毒性作用 등의 問題點이 심각하게 擡頭되어^{17,18)}, 最近에는 新規 抗癌物質 開發을 위한 研究가 활발히 進行되고 있다.

韓醫學에서 癌의 治療는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎 및 健脾益腎 등 人體 抗病能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥, 理氣消腫 등 直接 癌細胞를 殺傷하는 祛邪法 및 이 두가지 方法을 적절히 配合시킨 扶正祛邪法 등¹⁹⁻²¹⁾으로 大別되나, 이 중 扶正祛邪法과 病情에 따라 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼法, 末期에는 先補後攻法 등²²⁾이 現在 臨床에서 多用되고 있다.

이러한 臨床 報告와 더불어 最近에는 抗癌效果가 認定되는 韓藥劑나 韓方 處方 또는 藥針液을 中心으로 抗癌·抗轉移²³⁻²⁷⁾, 抗癌劑 副作用 抑制效果²⁸⁻³⁰⁾ 등을 살펴보는 많은 實驗 研究도 進行되고 있다.

그러나 韓方處方이나 韓藥劑가 抗癌劑에 比하여 副作用이 顯著하게 적지만, 既存의 抗癌劑보다는 細胞毒性이 떨어져 急速 成長하는 癌細胞를 效率적으로 殺害하여 遮斷하는데는 限界가

있어, 現在 韓醫學界에서는 보다 效果的인 抗癌活性을 나타내는 韓藥劑 또는 處方의 探索과 더불어, 癌의 治療效果를 極大化하고 化學療法과 放射線療法의 副作用을 減少시키기 위한 方法 등이 多角度로 講求되고 있다.

이에 著者는 代表的인 補氣 處方인 四君子湯과 補陰 處方인 六味地黃湯을 基本方으로 하여, 여기에 數種의 藥物을 加味한 후 이를 試料로 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, S-180에 對한 生命延長率 및 實驗動物에서의 血液變化 등을 通하여 抗癌 效果를 檢索하고, 浸潤(invasion) 抑制效果, 複合基質과 單味基質에 對한 附着阻止效果, adenosine diphosphate(ADP)에 의한 血小板凝集 抑制效果, pulmonary colonization 抑制效果 및 組織變化 등을 通하여 抗轉移 效果를 檢索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 雌性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A), C57BL/6 및 Balb/C 생쥐를 韓國化學研究所에서 공급받아 實驗當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2 주일간 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 市內 乾材 藥局 두 곳에서 外部形態를 比較 調查하여 確認한 後 實驗에 使用하였으며, 各 處方의 한침 分量은 아래와 같다.

Sample A 加味地黃湯
《Kamijihwangtang(KJT)》

韓藥	生藥名	用量 (g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	16
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8
山茱萸	Corni Fructus	8
澤瀉	Alismatis Rhizoma	4
牡丹皮	Moutan Cortex	4
白茯苓	Poria	4
枸杞子	Lycii Fructus	4
女貞子	Ligustri lucidi Fructus	4
菟絲子	Cuscutae Semen	4
補骨脂	Psoraleae Fructus	4
杜仲	Eucommiae Cortex	4
黃精	Polygonati Rhizoma	4
總量		64

Sample B 加味四君子湯
《Kamisagoonjatang(KST)》

韓藥	生藥名	用量 (g)
黃芪	Astragali Radix	6
人參	Ginseng Radix	6
白朮	Atractylodis macrocephalae Rhizoma	6
白茯苓	Poria	6
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
靈芝	Ganoderma	6
總量		42

Sample C 加味君子地黃湯
《Kamigoonjijihwang(KKJT)》

韓藥	生藥名	用量
丹參	Salviae miltiorrhizae Radix	4
鬱金	Curcumae Radix	4
赤芍藥	Paeonia Radix Rubra	4
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
桃仁	Persicae Semen	4
莪朮	Zedoariae Rhizoma	4
紅花	Carthami Flos	4
瓦松	Orostachys fimbriatus Berger	4
半枝蓮	Portulaca grandiflora Hook	4
仙鶴草	Agrimoniae Herba	4
蒲公英	Taraxaci Herba	4
黃連	Coptidis Rhizoma	4
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusae Herba	10
加味地黃湯	KJT	64
加味四君子湯	KST	42
總量		164

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin, EDTA,

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glicial 製品을 使用하였다.

機器는 CO₂ incubator (vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench (vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge (Beckman Co.,GS-6R), inverted microscope (Nikon Co, Japan), bright microscope (UFX-DX, Nikon), SEM(JEOL사, JEM 6400), TEM(Hitachi H-600), Liner accelerator(Varian Co, USA), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScan (Becton dickinson, USA), rotary vaccum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet (Gilson, USA), autostill WG25 (Japan), titer plate shaker (Labline Inst., USA), culture flask (Falcon 3024), multiwell plate (96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet (5ml, 10ml, 25ml, Falcon) 및 syringe filter (0.25µm, Falcon) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

上記한 KJT, KST, KKJT의 두침分量을 각각 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 vaccum evaporator(Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer (Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 KJT 29.8g, KST 18.3g, KKJT 96g의 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 (0.25

µm, Falcon)로濾過하여使用하였다.

2) 細胞培養

In vitro 細胞毒性測定에는 L1210(ATCC CCL 219) 白血病癌株와 SNU-1(gastric cancer) 胃癌株, SK-OV-3 (ATCC HTB 77) 卵巢癌株, SK-MEL-2 (ATCC HTB 77) 黑色腫, XF498 (brain cancer) 腦癌株, HCT 15(ATCC CCL225) 大腸癌株, A549 (ATCC CCL185) 肺癌株 및 B16-F10 melanoma(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫등을, *in vivo* 抗癌實驗에는 S-180 (ATCC TIB66) 腹水癌株, B16-F10 생쥐 黑色腫 등을使用하였는데 이들의培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640 배지에 56°C 水槽에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제 (penicillin-G 10만units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) L1210, SNU-1 癌株에 對한 細胞毒性測定³¹⁾

細胞毒性實驗에서 logarithmic phase에 도달한 細胞를 얻기 위하여實驗 24 時間前에 36~37°C로 加溫한 medium을 넣은 75ml screw-capped erlenmeyer flask에 細胞를 2~3×10⁵cells/ml 濃도가 되게 調整하여 1日間培養시킨 後, 約 0.8~1.0×10⁶cells/ml의 濃도가 되도록 L1210 細胞 懸濁液을 만들었다. 細胞 懸濁液(5×10⁴cells/ml)을 5ml씩 튜브에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에 dimethyl sulfoxide가 0.2% 以下가 되도록 溶解시키고 20분간 超音波로 處理한 後 試料를 10µg/ml, 100µg/ml, 1000µg/ml 등의 濃도로 加하여 實驗群으로 하였으며, 對照群 tube(2√n : n=시료수)에는 5ml의 細胞 懸濁液만을 넣고 37°C, CO₂ incubator에서 48시간 배양 후 hemacyto-meter를 使用하여 細胞數를 計算하였다.

4) A549, B16-F10, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT 15 癌株에 對한 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도를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B(SRB)assay 法³²⁾을 使用하였다. 계대중인 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 24시간 培養하여 바닥면에 附着시킨 後, medium에 濃度別(1000µg/ml, 800µg/ml, 400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 12.5µg/ml, 6.25µg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 20µl씩 넣어주고 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 가하기 전에 0.22µm filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48시간 培養이 끝난 後, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100µl씩 가하여 4°C 에서 1시간 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 後 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. 완전히 乾燥된 plate는 well당 250µl의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30분간 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 後, control의 O.D. (optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값이 되도록 일정량의 10mM tris로 염색액을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값을 구하여 ED₅₀값을 얻었다. 癌 細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위하여 細胞數의 測定은

藥物を 가할 때의 細胞數(Tz)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各濃度の 藥物과 함께 48時間 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다.

다음의 수식에 의해 抗癌活性 正道를 測定하였다. 즉, $Tz \geq T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/(C-Tz) \times 100$ 의 수식으로 計算하였고, $Tz < T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/Tz \times 100$ 의 수식으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 기능을 이용하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose(ED₅₀)값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 정도를 比較하였다. ED₅₀ 값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 주어지며, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法³³⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

이 때, T = 試驗群의 48時間 培養後 平均 細胞數 (cells/ml)

C = 對照群의 48時間 培養後 平均 細胞數 (cells/ml)

C₀ = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

각각 濃度の Y(%)값과 log₁₀ dose를 圖式化 하고 다음과 같은 식에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 各各의 濃度에 대하여 計算한 Y(%) 값이 모두 50%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이 때, N = number of points selected
[\leq number of dose level & > 2]
X_i = log dose i Y_i = growth ratio calculated dose i

여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 $Y = A + BX$ 를 얻었으며 이 회귀선의

기울기와 절편으로부터 ED₅₀값을 計算하였다.

$$50 = A + B (\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g}/\text{ml}$$

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 合成物인 경우 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定³⁴⁾하고 있다.

5) DNA topoisomerase I assay 方法

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 Calf thymus에서 由來된 것이며, pBR 322 DNA는 E.coli C 600의 것으로 Takara shuzo Co., LTD.社에서 購入 使用하였으며, topoisomerase의 IC₅₀값을 決定하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法³⁵⁾에 따랐다. 즉, 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 20 μl 가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20 μl 되게 한 것을 試驗群으로 하여 이들을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30分間 培養하였다. 反應은 2% SDS(sodium dodecylsulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 包含하는 溶液 5 μl 를 添加하여 反應을 終結시키고, 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전 기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide 용액에서 1시간동안 染色, 紫外線 下에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 活性을 測定했다. 이 때 topo I의 1 unit는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킬 때 super coiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 양을 意味한다.

6) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 腹腔內에 7일간 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 가해 4003 \times g로 2분간 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 부유시켜 다시 遠心分離하여 上清液을 除去한 후 混在된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 취하였다. 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 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 후 24시간부터 각 군을 8~9마리로 配定하였다. 試料는 물로 溶解시켜(KJT 62mg/ml, KST 38mg/ml, KKJT 200mg/ml) 保存溶液을 만든 후 4℃에 保存하며 注射 直前에 保存溶液 0.2ml씩 實驗動物의 口腔內에 投入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 記及된 式³⁶⁾에 따라 計算하였다.

7) 白血球數 및 血小板數에 미치는 影響 測定

ICR 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중외제약)으로 痲醉하고 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23G×1¼, Samwoo Co.)로 心臟을 穿刺, 血液을 採取하여, 血小板數, 白血球數를 Finio 法³⁷⁾에 準하여 測定하였다.

III. 實驗成績

A. In vitro

1. B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性

Table 2. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on B16-F10 Cells

Conc. (μ g/ml)	Percent of control		
	SA	SB	SC
Control	100±1.56 ^{a)}	100±1.56	100±1.56
10^{-5} g/ml	96.1±2.35	90.1±1.97	92.4±1.24
10^{-4} g/ml	90.7±2.12	88.2±1.63	89.8±1.35
10^{-3} g/ml	80.4±1.56	83.4±2.36	10.11±0.7

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

a) : Mean ± standard error.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml 濃度에서 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 濃度에 比例하여 細胞成長을 抑制하였으나, 가장 높은 濃度인 10^{-3} g/ml 濃度에서 各各 80.4, 83.4%의 細胞生存率이 나타나 細胞毒性이 微弱하였고, 加味君子地黃湯 投與群의 10^{-3} g/ml 濃度에서 細胞生存率이 10.11%로 나타나 가장 강한 細胞毒性을 나타냈다(Table 2).

2. HT1080 癌株에 對한 細胞毒性

HT1080 癌株에 對한 細胞毒性은 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml 濃度에서 加味地黃湯 投與群은 101.1±2.21, 98.5±2.34, 86.6±1.78%로, 加味四君子湯 投與群은 96.3±2.24, 90.8±1.67, 81.3±2.53%로, 加味君子地黃湯 投與群은 98.6±2.14, 95.2±2.13, 13.4±0.79%로, 加味君子地黃湯 投與群의 10^{-3} g/ml 濃度에서만 15% 以下 癌細胞生存率을 나타냄으로써 B16-F10 實驗 結果와 같은 類型으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on HT1080 Cells

Conc. (μ g/ml)	Percent of control		
	SA	SB	SC
Control	100±2.12	100±2.12	100±2.12
10^{-5} g/ml	101.1±2.21	96.3±2.24	98.6±2.14
10^{-4} g/ml	98.5±2.34	90.8±1.67	95.2±2.13
10^{-3} g/ml	86.6±1.78	81.3±2.53	13.4±0.79

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

3. SNU 癌株에 對한 細胞毒性

SNU 癌株에 對한 細胞毒性은 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml 濃度에서 加味地黃湯 投與群은 95.1±2.36, 80.8±2.45, 79.1±2.24%로, 加味四君子湯 投與群은 97.6±2.11, 94.6±2.35, 87.5±2.71%로, 加味君子地黃湯 投與群은 98.2±2.11, 80.8±2.07, 54.8±0.76로 나타나 加味君子地黃湯 投與群의 10^{-3} g/ml 濃度에서만 40% 以上 癌細胞成長을 抑制하였다(Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on SNU Cells

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control		
	SA	SB	SC
Control	100 \pm 3.13	100 \pm 3.13	100 \pm 3.13
10 ⁻³ g/ml	95.1 \pm 2.36	97.6 \pm 2.11	98.2 \pm 2.11
10 ⁻⁴ g/ml	80.8 \pm 2.45	94.6 \pm 2.35	80.8 \pm 2.07
10 ⁻⁵ g/ml	79.1 \pm 2.24	87.5 \pm 2.71	54.8 \pm 0.76

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

4. L1210 癌株에 對한 細胞毒性

L1210 癌株에 對한 細胞毒性은 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁴g/ml, 10⁻³g/ml 濃度에서 加味地黃湯 投與群은 92.8 \pm 2.54, 86.8 \pm 2.14, 80.7 \pm 2.16%으로, 加味四君子湯 投與群은 101.1 \pm 2.34, 98.4 \pm 2.14, 88.3 \pm 2.26%로, 加味君子地黃湯 投與群은 91.4 \pm 2.48, 79.4 \pm 2.22, 49.1 \pm 2.36%로 나타나 10⁻³g/ml 濃度에서 加味君子地黃湯 投與群만이 50% 以上 癌細胞成長을 抑制하였다(Table 5).

Table 5. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on L1210 Cells

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control		
	SA	SB	SC
Control	100 \pm 2.42	100 \pm 2.42	100 \pm 2.42
10 ⁻³ g/ml	92.8 \pm 2.54	101.1 \pm 2.34	91.4 \pm 2.48
10 ⁻⁴ g/ml	86.8 \pm 2.14	98.4 \pm 2.14	79.4 \pm 2.22
10 ⁻⁵ g/ml	80.7 \pm 2.16	88.3 \pm 2.26	49.1 \pm 2.36

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

5. A549 癌株에 對한 細胞毒性

A549 癌株에 對한 細胞毒性은 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 75% 이상 癌細胞生存率을 나타내어 細胞毒性이 微弱하였고, 加味君子地黃湯 投與群은 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다(Table 6).

6. SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性

SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性은 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 A549 癌株에 對한 細胞毒性 實驗 結果처럼 加味地黃湯,

加味四君子湯 投與群 모두 75% 이상 癌細胞生存率을 나타내어 細胞毒性이 微弱하였고, 加味君子地黃湯 投與群은 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다(Table 7).

Table 6. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on A549 Cells

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control		
	SA	SB	SC
6.25	103.45	98.18	83.06
12.5	98.24	95.13	86.22
25.0	93.53	94.46	83.06
50.0	89.45	90.35	78.46
100.0	90.78	91.48	80.16
200.0	86.67	84.24	77.98
400.0	83.67	83.56	60.35
800.0	80.74	80.89	57.42
1000.0	81.00	75.56	48.24

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

Table 7. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on SK-OV-3 Cells

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Percent of control		
	SA	SB	SC
6.25	99.90	101.56	84.00
12.5	96.43	101.23	83.21
25.0	97.89	98.71	81.43
50.0	9312	101.21	83.47
100.0	90.80	97.53	78.89
200.0	88.79	93.47	74.55
400.0	80.89	83.50	62.58
800.0	78.97	82.32	42.13
1000.0	76.74	83.64	40.24

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.

SA : KJT treated group. SB : KST treated group.

SC : KKJT treated group.

7. SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性

SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 75% 이상 癌細胞生存率을 나타내었고, 加味君子地黃湯 投與群은 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하여 實驗 癌株中 가장 效果的으

로 나타났다(Table 8).

Table 8. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on SK-MEL-2 Cells

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SA	SB	SC
	Percent of control		
6.25	101.78	98.98	79.71
12.5	99.04	101.67	74.92
25.0	97.86	96.67	73.88
50.0	98.76	94.25	75.54
100.0	93.13	93.45	72.90
200.0	93.09	90.78	61.57
400.0	87.76	87.56	52.08
800.0	80.54	82.70	32.15
1000.0	76.35	79.68	33.25

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.
SA : KJT treated group. SB : KST treated group.
SC : KKJT treated group.

8. XF498 癌株에 對한 細胞毒性

XF498 癌株에 對한 細胞毒性은 가장 高濃度인 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 80% 이상 癌細胞生存率을 나타냈고, 加味君子地黃湯 投與群은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하여 他 癌株와 비슷한 結果가 나타났다(Table 9).

Table 9. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on XF498 Cells

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SA	SB	SC
	Percent of control		
6.25	98.43	101.23	92.00
12.5	99.89	102.12	88.83
25.0	102.12	100.23	90.70
50.0	97.56	99.70	89.67
100.0	96.35	101.0	87.62
200.0	90.78	98.67	76.84
400.0	85.67	96.78	65.92
800.0	80.89	92.23	64.21
1000.0	76.89	86.50	50.68

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.
SA : KJT treated group. SB : KST treated group.
SC : KKJT treated group.

9. HCT15 癌株에 對한 細胞毒性

HCT15 癌株에 對한 細胞毒性은 가장 高濃度인 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 80% 이상 癌細胞生存率을 나타내어 細胞毒性이 微弱하였고, 加味君子地黃湯 投

與群은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다(Table 10).

Table 10. Cytotoxic Effect of KJT, KST and KKJT on HCT15 Cells

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SA	SB	SC
	Percent of control		
6.25	101.11	100.12	86.55
12.5	101.24	101.21	88.30
25.0	99.64	102.11	85.90
50.0	97.13	98.24	81.93
100.0	96.89	99.34	81.34
200.0	98.24	97.54	76.70
400.0	90.76	92.23	65.05
800.0	85.79	89.90	50.48
1000.0	81.12	88.89	47.24

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度.
SA : KJT treated group. SB : KST treated group.
SC : KKJT treated group.

10) 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 20 μl 가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總反應液을 20 μl 되게 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의 IC₅₀은 加味地黃湯 投與群이 200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加味四君子湯 投與群이 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 加味君子地黃湯 投與群은 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 加味君子地黃湯 投與群이 가장 效果의므로 topo-I의 活性을 抑制하였다(Table 11).

Table 11. Inhibitory Effect of KJT, KST and KKJT on Activity of DNA Topoisomerase

Group	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
SA	200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SB	>400 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SC	100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

만이 有意性있는 減少를 나타내었고, 血小板數는 對照群에 비하여 모두 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 13, 14).

Table 12. Effect of KJT, KST and KKJT on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	MST (day)	T/C (%) [#]
Con.	10	17.1	-
SA	10	21.0	122.8
SB	10	21.8	127.4
SC	10	27.1	158.4

SA : KJT treated group SB : KST treated group

SC : KKJT treated group

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

Table 13. Effect of KJT, KST and KKJT on WBC after i.p. Injection of Sarcoma 180 Cells

Group	WBC(x10 ³ /mm ³)
Nor.	8.7±0.14 ^{al}
Con.	21.3±1.78
SA	13.2±1.11 [*]
SB	16.8±1.21
SC	11.2±0.75 ^{**}

Table 14. Effect of KJT, KST and KKJT on Platelet after i.p. Injection of Sarcoma 180 Cells

Group	Platelet(x10 ³ /mm ³)
Nor.	745.5±24.8
Con.	389.4±32.8
SA	418.7±20.8
SB	407.4±22.2
SC	553.6±24.6

Fig. 1. Inhibitory effect of KJT, KST and KKJT on activity of DNA topoisomerase I

11. S-180이 移植된 생쥐의 體重變化 및 生存比에 미치는 效果

加味地黃湯, 加味四君子湯, 加味君子地黃湯을 S-180이 이식된 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 10일에 급격히 증가하여 20일에 모두 죽었다. 平均 生存日數에서 對照群의 MST(mean survival time)는 17.1일, 加味地黃湯 投與群은 21.0일, 加味四君子湯 投與群은 21.8일, 加味君子地黃湯 投與群은 27.1일로 나타나, T/C%는 각각 122.8, 127.4, 158.4%로 나타났다(Table 12).

12. 血液學的 變化

S-180을 이용한 抗癌實驗에서 加味地黃湯, 加味四君子湯, 加味君子地黃湯 投與群은 白血球數에 있어 異常으로 增加된 對照群에 비하여 抑制하였으나, 加味地黃湯, 加味君子地黃湯 投與群

IV. 考 察

癌이란 惡性腫瘍을 總稱하는 것으로 正常 組織에 대하여 破壞의인 것을 말하며, 正常的인 成長과는 달리 獨立的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이다^{1,2)}

癌의 發生은 生體內 正常細胞가 發癌物質 등의 環境的 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性 刺戟 및 突然變異 등에 依하여 일정한 過程을 거

처 癌細胞로 變形되면 癌細胞化와 癌成長 機轉을 거쳐 자라는데, 人體의 抗病能力이 低下된 狀態에서는 免疫防禦機能이 弱화되어 癌細胞화된 非正常細胞를 破壞 除去하지 못하게 되어 細胞調節機能을 잃고 增殖하게 되는 것이다¹⁴⁾.

1995년 保健福祉部 統計⁵⁾에 따르면 惡性腫瘍은 韓國人 疾病 死亡 原因 중 循環器 疾患에 이어 2위를 點하고 있다. 이렇듯 致命的 結果를 招來하는 難治病의 하나인 癌에 대하여 東西 醫藥에서는 끊임없는 努力을 通하여 癌治療에 대한 治療法과 治療劑 開發에 있어 相當한 發展이 있었으나, 아직 惡性 腫瘍의 完治率は 未洽하여 醫藥 先進國에서조차도 약 55% 정도로 報告되고 있으며, 韓國에서의 完治率は 이보다 낮을 것으로 思料되어, 惡性 腫瘍 治療에 대한 投資가 切實한 時點이다.

癌에 對한 治療法으로 西洋醫學에서는 外科의 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등을 活用하는데^{16,17)}, 手術療法은 轉移된 腫瘍의 治療가 不可避하다는 限界點을 가지고 있으며, 放射線療法은 局所的 浸潤性 腫瘍의 治療에는 有效하나 轉移 腫瘍의 境遇는 治療에 制限性이 있고, 照射量의 增加에 따른 正常 組織의 損傷과 合併症도 增加시킨다는 短點이 있으며, 化學療法은 全身의 轉移의 경우 훌륭한 治療法이 되나 化學製劑의 腫瘍에 대한 選擇性, 正常 細胞에 대한 毒性 作用의 問題點이 있어 여러가지 副作用과 合併症^{17,18)}이 나타나고 있다.

韓醫學에서 癌은 宋代의《衛濟寶書》¹⁵⁾에서 오늘날 病理組織의으로 나타나는 癌과는 區別되지만 文獻上 最初로 癌字가 記載된 이래 이에 對한 治療法으로 清熱解毒, 化痰軟堅, 利水消腫, 活血化瘀 處方에 의한 攻邪法과 健脾益氣, 滋養肝腎, 養胃生津 處方에 의한 扶正法 및 兩者를 結合한 扶正祛邪法으로 大別된다¹⁹⁻²¹⁾.

또한 全身의 情況과 病情에 따라 攻法爲主, 攻補兼治, 扶正爲主로 하는 治療法과, 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼治, 末期에는 先補後攻法 등의 治療法이 臨床에서 자주 活用되고 있다²²⁾.

이렇듯 韓醫學에서는 오랜 臨床 經驗을 바탕으로 抗癌 效果를 나타내는 韓方 處方이 臨床에서

使用되고 있지만, 이들 大部分 副作用이 적고 局所的으로 癌細胞를 죽이는 것보다는 非特異的이나 特異的으로 免疫機能을 增強시켜 癌細胞를 除去하는 藥物이 大部分이다.

그러나 이러한 處方이나 韓藥劑가 既存의 洋方 抗癌劑보다는 細胞毒性이 떨어져 急速 成長하는 癌細胞를 效率的으로 殺害하여 遮斷하는데는 역시 限界가 있어, 現在에도 抗癌性이 認定되는 處方을 中心으로 數種의 單味藥物을 加味하여 抗癌 및 抗轉移 效果를 增大시키는 處方 開發³⁾을 위하여 持續的인 研究가 이루어지고 있다.

이에 著者는 40餘種의 文獻考察을 通하여 現在 癌關聯 雜誌 및 書籍에서 癌治療에 있어 臨床 및 實驗에서 效果的인 處方 或 韓藥材를 統計處理하였던 바 共同的으로 使用된 基本 處方은 四君子湯과 六味地黃湯이, 韓藥劑에 있어서는 白花蛇舌草의 20餘種이 多用되었다. 따라서 이들을 相互 配合하면 效果的인 抗腫瘍作用을 나타낼 것으로 思料되어, 이들을 配合한 加味地黃湯, 加味四君子湯, 加味君子地黃湯을 試料로 使用하였다.

抗癌性 探索을 위하여 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性效果, DNA topoisomerase I assay, S-180에 대한 生命延長率, 血液變化 등을 살펴보았다.

本 論文의 試料로 使用된 基本方인 六味地黃湯은 錢乙의《小兒藥證直訣》卷下方³⁸⁾에서 最初로 言及된 處方으로, 六味丸 또는 地黃丸이라고도 불리운다. 滋補肝腎의 效能이 있어 肝腎陰虛, 腰膝痠軟, 頭暈眼花, 耳鳴耳聾 및 盜汗遺精을 治療한다. 近來에는 慢性腎炎, 高血壓, 肺結核, 神經衰弱, 糖尿病, 甲狀腺機能亢進, 腎結核 및 子宮出血 등에 使用되고 있으며³⁹⁾, 惡性腫瘤 및 抗癌劑 및 放射線으로 인한 肝腎陰虛證에도 使用되고 있다⁴⁰⁻⁴²⁾.

四君子湯은 《太平惠民和劑局方》卷三方⁴³⁾에 처음 記載된 處方으로 甘溫益氣의 效能이 있어서 營衛氣虛, 臟腑怯弱, 心腹脹滿, 不思飲食, 腸鳴泄瀉 및 嘔噦吐逆 등을 治療한다. 四君子湯의 癌症 活用 報告로 邱⁴⁴⁾와 梁⁴⁵⁾은 消化器癌에, 林⁴⁶⁾은 肝癌에 使用하였고, 類方인 六君子湯을 高⁴⁷⁾는 未分化形肺癌 등에 使用하였으며, 이 밖에도 四君子湯의

加味方을 一般의 癌治療의 基本方으로 사용한 많은 臨床例^{48,49)}가 있다.

構成 藥物의 本草學的 效能을 살펴보면, 基本方인 六味地黃湯의 君藥인 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 다스리고⁵⁰⁾, 癌 治療에 있어서는 四物湯이나 六味地黃湯의 主要 構成 藥物으로써 特定한 癌 疾患이 아닌 陰虛 症狀을 同伴한 各種 癌症에 使用되고 있으며⁵¹⁾, 山藥은 甘溫而澁하여 健脾補肺, 固腎益精의 效能이 있고⁵⁰⁾, 山茱萸는 酸微溫而澁하여, 補益肝腎, 澀精固脫의 效能이 있으며⁵⁰⁾, 補骨脂, 杜仲 等과 함께 配合하여 胃癌 등 各種 腎虛 症狀을 同伴한 腫瘍에 使用된다⁵¹⁾.

澤瀉는 甘寒하여 利水滲濕, 泄熱의 效能이 있으며⁵⁰⁾, 牡丹皮는 苦辛微溫하여, 清熱涼血, 活血散瘀하는 效能이 있어⁵⁰⁾, 癌症中 特히 腫瘍로 인한 發熱에 使用한다⁵¹⁾. 白茯苓은 地黃湯의 構成藥物인 과 同時에 加味四君子湯의 構成 藥物으로써 甘淡而平하여, 健脾涼心, 利水滲濕시키는 效能이 있고⁵⁰⁾, 各種 消化器 癌症에 多用⁵¹⁾된다.

補陰藥으로 六味地黃湯에 補強된 枸杞子는 甘寒하여 滋腎潤肺, 補肝明目의 效能이 있으며⁵⁰⁾, 女貞子는 甘苦涼하여 滋補肝腎, 明目烏髮의 效能이 있고⁵⁰⁾, 菟絲子는 辛甘溫하여, 補肝腎, 益精髓, 明目, 止瀉의 效能이 있으며⁵⁰⁾, 補骨脂는 辛苦溫하여 溫腎調養, 納氣, 止瀉의 效能이 있고⁵⁰⁾, 杜仲은 甘微辛溫하여 補肝腎, 強筋骨, 安胎의 效能이 있으며⁵⁰⁾, 黃精은 甘平하여, 補中益氣, 潤心肺, 強筋骨의 效能이 있어⁵⁰⁾, 이들 모두 癌患者에 陰虛證이 同伴된 경우나, 抗癌劑 및 放射線 副作用 減少 等에 應用되고 있다.

四君子湯의 構成藥物인 人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神의 效能으로⁵⁰⁾, 그 構成 成分인 saponine이 肝癌을 비롯한 多様な 癌株에 抗癌活性이 있음이 報告되었고^{52,53)}, 白朮은 補脾益胃, 燥濕和中 效能으로⁵⁰⁾, 甘草는 和中緩急, 潤肺解毒, 調和諸藥 效能으로⁵⁰⁾, 黃芪는 益衛固表, 利水消腫, 托毒生氣, 補中益氣 效能으로⁵⁰⁾, 人蔘과 더불어 各各 相互 配合時 補氣健脾 效果가 增大되어 消化器 腫瘍에 使用되어지며⁵¹⁾, 靈芝는 涼心安神, 補氣益血,

止咳平喘의 效能으로⁵⁰⁾, 抗癌效果가 이미 實驗 및 臨床에서 밝혀진 바가 있다⁵¹⁾.

加味된 活血活瘀藥中 丹蔘은 活血祛瘀, 涼血消癰, 除煩安神之 效能이 있어⁵⁰⁾, 腫塊를 同伴한 各種 瘀血性 癌症에 使用되고 있으며⁵¹⁾, 鬱金은 行氣化瘀, 清心解鬱, 利膽退黃의 效能이 있어⁵⁰⁾, 肝癌, 胰腫瘤 等에⁵¹⁾, 赤芍藥은 清熱涼血, 散瘀止痛의 效能이 있어⁵⁰⁾, 桃仁 紅花 等과 더불어 瘀血性 癌症에⁵¹⁾, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 效能이 있어⁵⁰⁾ 瘀血性 癌症을 비롯한 多様な 癌에 基本藥으로 使用된다⁵¹⁾. 莪朮은 行氣破血, 消積止痛의 效能이 있어⁵⁰⁾, 子宮頸癌, 肝癌, 胃癌, 白血病, 卵巢癌, 淋巴肉瘤, 黑色素瘤, 腸癌, 子宮肌瘤 等에⁵¹⁾, 紅花, 桃仁은 모두 活血通經, 散瘀止痛의 效能이 있어⁵⁰⁾, 肺, 卵巢, 乳腺, 甲狀腺, 宮頸癌, 癌腫塊 等에⁵¹⁾, 清熱解毒藥인 瓦松은 清熱解毒 消腫癰毒 效能이 있어⁵⁰⁾ 肝癌, 肺癌, 胃癌 等에⁵¹⁾, 半枝蓮는 清熱解毒, 利尿消腫 效能이 있어⁵⁰⁾, 肺癌, 直腸癌, 胃癌, 食道癌, 宮頸癌, 肝癌, 口腔癌, 乳腺癌, 纖毛膜上皮癌, 消化器癌 等の 各種腫瘍에⁵¹⁾, 仙鶴草는 收斂止血, 載瘡, 止痢, 解毒의 效能이 있어⁵⁰⁾ 肺癌 等에⁵¹⁾, 蒲公英은 清熱解毒, 消腫散結, 利尿通淋의 效能이 있어⁵⁰⁾, 肺癌, 胃癌, 食道癌, 乳腺癌 等에⁵¹⁾, 黃連은 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 效能이 있어⁵⁰⁾, 舌屑 및 消化器 癌 等에⁵¹⁾, 白花蛇舌草는 清熱利濕, 解毒消癰의 效能이 있어⁵⁰⁾, 肺癌, 食道癌, 胃癌, 直腸癌 等에⁵¹⁾ 使用되고 있다.

먼저 上記한 處方을 試料로 癌細胞 成長抑制를 測定하는 實驗方法인 SRB法³²⁾을 使用하여, 細胞 毒性을 測定하였는데, 쥐 固形癌株인 B16-F10, HT1080 癌株에 對한 細胞毒性에서는 加味地黃湯, 加味四君子湯 投與群 모두 濃도에 比例하여 細胞 成長을 抑制하였으나, 가장 높은 濃度인 10⁻³g/ml 濃度에서 대부분 80% 이상 癌細胞生存率이 나타나 細胞毒性이 微弱하였고, 加味君子地黃湯 投與群은 10⁻³g/ml 濃度에서 30% 以下の 癌細胞 生存率을 나타내어 高濃度에서 강한 細胞毒性을 나타냈고, suspending cell인 SNU, L1210 癌株에서도 역시 高濃度인 10⁻³g/ml 濃度에서 加味君子地黃湯

投與群만이 50% 以上 細胞 成長을 抑制함으로써 實驗群中 細胞毒性이 가장 强하였다(Table 2-5).

人間 固形 癌株인 A549, SK-OV-3, XF498, HCT15 癌株에 對한 細胞毒性은 上記한 細胞毒性 結果와 類似하게 加味君子地黃湯 投與群만이 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였으며(Table 6,7,9,10), SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性에서는 加味君子地黃湯 投與群이 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하여 實驗 癌株中 가장 效果的으로 나타났다 (Table 8).

이렇듯 加味地黃湯과 加味四君子湯은 高濃度에서 대부분 癌株에서 80% 이상 生存率이 나타난 반면, 加味君子地黃湯 投與群은 10⁻³g/ml 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制한 것으로 보아, 細胞毒性은 加味된 淸熱活瘀藥의 直接的인 癌細胞 殺傷作用으로 인한 것임을 알 수 있다.

다음으로 最近에 細胞毒性을 測定하는 方法中 하나로 研究되어지고 있는 DNA topoisomerase I assay³⁵⁾를 실시하여 SRB assay 結果와 비교하여 보았다. DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 지대한 影響을 미친다⁵⁴⁻⁵⁷⁾. 細胞內的 DNA는 negatively supercoiled되어 있는데, negative supercoiling은 duplexed DNA helix가 덜 감겨(under wound)있다는 것을 意味한다. 原核細胞에서 negative supercoil의 半은 HU 등의 nucleo-protein에 의해 固定되어 있고, 나머지 negative supercoil은 자유스러운, torsional tension을 가진 supercoil로 存在한다. DNA topoisomerase는 이런 DNA supercoiling state를 調節하므로써, 複製, 轉寫의 initiation의 效率性에 影響을 주며, 이러한 過程들이 進行되는 段階에서 發生하는 DNA의 topological problem을 解決해 줌으로써 細胞內 여러 DNA의 기증에 必須的이다⁵⁶⁾. 이러한 DNA topoisomerase는 그 촉매기작에 따라 두 형태로 분류되는데^{56,57)}, 그 중 topoisomerase I은 DNA duplex의 한 가닥을 phosphodiester bond에서 끊고, 切斷된 한끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한

바퀴 회전시킨 후, 끊어졌던 부분을 다시 연결한다.

Topoisomerase의 抑制劑들은 topoisomerase poison이라고 부르기도 하는데, 이들의 抗癌作用은 topoisomerase의 不活性化에 起因하는 것이라기 보다는 대부분 抗癌劑의 경우처럼 DNA에 損傷이 생기기 때문이라고 생각되고 있다⁵⁷⁾. Topoisomerase와 그 억제제가 DNA에 작용하여 생긴 cleavable complex는 열처리를 하거나, topoisomerase 抑制劑를 除去할 경우 다시 phosphodiester bond가 連結될 수 있는 可逆性 complex이다. 그러므로, DNA 損傷 그 自體에 의해 細胞가 죽는 것이 아니라, 이 可逆性 cleavable complex가 細胞內的 다른 相互作用을 함으로써 細胞毒性을 일으킨다고 推測^{56,57)}되고 있어 이들의 抑制劑는 抗生, 抗癌劑로서 使用될 수 있음이 最近에 報告되고 있다.

本 實驗에서는 fig. 1에서 보는 바와 같이 DNA 만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났다, DNA에 1 unit topo-I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다. relaxed form에서 super-coiled form으로 50% 轉換되는 濃度인 IC₅₀은 加味地黃湯 投與群에서 200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加味四君子湯 投與群에서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, 加味君子地黃湯 投與群에서 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 加味君子地黃湯 投與群이 가장 效果的으로 topo-I의 活性을 抑制하였다(Table 11).

이는 앞서 實施한 數種의 癌細胞에 대한 抗癌作用의 結果와 一致되는 바가 있어, 向後 韓藥에서의 topoisomerase poison의 探索은 淸熱解毒, 活血化瘀藥에서 먼저 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 本 實驗에서 具體的으로 어떤 藥物 혹은 어떤 藥物間的 相乘作用으로 인하여 topo-I의 抑制效果가 發揮되었는지는 向後 個別 藥物에 대한 探索이 必要할 것으로 보인다.

S-180이 移植된 생쥐를 이용한 抗癌 動物 實驗에서는 對照群은 癌株 移植 後 腹水癌으로 인해 10일만에 急激히 增加하여 MST가 17.1일인데 비하여, 加味地黃湯 投與群은 21.0일, 加味四君子湯 投與群은 21.8일, 加味君子地黃湯 投與群은 27.1일

로, T/C%가 각각 122.8, 127.4, 158.4%로 나타나 加味君子地黃湯 投與群이 가장 效果的으로 나타났다(Table 12).

다음으로 S-180이 移植된 생쥐에 대한 血液學的 檢査에서는 癌形成에 密接한 關聯이 있는 白血球 數値와 血小板數를 測定하였다. 白血球數는 末梢血液에서 보는 과립구계 및 單핵구계세포의 血液 單位 容積當의 總數로 藥物中毒, 急性出血, 急性溶血, 腫瘍增殖 等에서 增加하고, 바이러스 感染, 化學療法, 血液疾患, 脾臟機能亢進證, 自家免疫疾患에서 減少하여 各種 血液 疾患의 診斷, 腫瘍治療의 指標로 使用되는데⁶⁰⁾, 本 實驗에서는 모든 實驗群에서 白血球數에 있어 異常的으로 增加된 對照群에 비하여 抑制하였으나, 加味地黃湯, 加味君子地黃湯 投與群에서 有意性있는 減少를 나타내었다 (Table 13).

血小板數는 血液 疾患과 더불어 惡性腫瘍, 炎症性 疾患, 藥物 等の 影響으로 變化하며, 骨髓機能이 亢進되거나 抗癌劑 放射線 使用 後에 減少되는데⁶¹⁾, 最近에 Yong 等⁶²⁾은 癌細胞가 血小板의 凝集을 促進하는 反應(Tumor Cell Induced Platelet Aggregation; TCIPA)의 機轉에 대해 血小板이 脈管系의 癌細胞의 安定化를 돕고, 癌細胞의 增殖을 促進하며, 癌細胞의 內皮細胞收縮을 促進하여 癌細胞의 일출을 助長하고, 癌細胞와 細胞外基質과의 相互作用을 促進한다고 하였으며, 實際로 癌患者에서 血小板過少症이 자주 發生한다는 臨床 報告로 血小板 數値變化 역시 癌의 診斷 및 治療의 指標로 使用되고 있는데, 本 實驗에서는 모든 實驗群에서 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다 (Table 22).

以上の 結果로, T/C%에 있어 補氣藥(加味四君子湯)이나 補陰藥(加味地黃湯)의 投與群이 NCI³⁶⁾가 設定한 再實驗 可能 T/C%인 140%를 넘지 않고, 더불어 두 實驗群의 T/C%가 비슷한 結果를 나타내며, 두 實驗群에 清熱活瘀藥을 加味한 加味君子地黃湯 投與群이 140%를 上廻한 점은 他 論文^{40-42,58,59)}에서도 言及되었듯이 六味地黃湯과 四君子湯의 免疫增強 效果와 더불어 加味된 清熱活瘀

藥의 癌細胞 殺傷 效果가 複合되어 나타난 것으로 보인다.

이는 實際 臨床에 있어 癌治療에 單純한 扶正이나 祛邪藥의 單獨投與보다는 病症에 立脚한 混合投與가 더욱 效果的임을 알 수 있다. 豫備實驗으로 實施한 清熱活瘀藥만으로 構成된 實驗群의 T/C% 역시 130%를 넘지 못한 점, 역시 이를 立證해준다고 볼 수 있다. 단 本 論文은 文獻調査를 統計處理한 結果를 가지고 清熱活瘀藥을 加味한 까닭에 結果的으로 藥物의 數가 많아 이 역시 向後 藥物間의 相乘作用에 대한 檢討가 必要할 것으로 보이며, 실제 癌治療時는 加味君子地黃湯에 病症에 立脚하여 加味藥物의 加減이 이루어진다면 效果的인 抗癌作用을 發揮할 수 있을 것으로 보인다.

V. 結 論

加味四君子湯, 加味地黃湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性을 實驗的으로 研究하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. B16-F10, HT1080, SNU, L1210 癌株에 對한 細胞毒性은 加味君子地黃湯 投與群만이 10^3 g/ml 濃度에서 50% 以上 細胞 成長을 抑制하였다.

2. A549, SK-OV-3, XF498, HCT15 癌株에 對한 細胞毒性은 加味君子地黃湯 投與群만이 400 μ g/ml 以上の 濃度에서, SK-MEL-2 癌株에서는 200 μ g/ml 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다.

3. DNA topoisomerase I assay에서는 加味地黃湯 投與群은 200-400 μ g/ml, 加味四君子湯 投與群은 400 μ g/ml 以上, 加味君子地黃湯 投與群은 100-200 μ g/ml의 IC₅₀을 나타냈다.

4. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 加味地黃湯이 122.8, 加味四君子湯이 127.4, 加味君子地黃湯이 158.4%로 나타나 加味君子地黃湯 投與群이 가장 效果的으로 나타났다.

5. S-180이 移植된 생쥐의 血液學的 變化에서 白血球數는 對照群에 비하여 加味地黃湯, 加味君

子地黃湯 投與群에서 有意性있는 減少를 나타난 반면, 血小板數는 모든 實驗群에서 有意性있는 變化가 나타나지 않았다.

以上の 結果를 보아 加味君子地黃湯은 癌治療에 活用 可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울大學校出版部, p.137, pp.1-3, 214-215, 225-234, 1989.
2. 豫防醫學과 公衆保健 編輯委員會 : 豫防醫學과 公衆保健, 서울, 癸丑文化社, p.426, 1987.
3. 金春元 : 病理學, 서울, 新光出版社, p.84, 1989.
4. 新太陽社 編輯局 百科辭典部 : 原色最新醫療百科辭典, 서울, 新太陽社 (卷12), p.155, 171, pp.157-160, 163-164, (卷16) pp.86-87, 1991.
5. 統計廳 : 死亡原因統計年譜, 웃고문화사, p.21, 1995.
6. 河北醫學院 : 靈樞經校釋, 人民衛生出版社, 上卷 p.78,219, 下卷 p.37, 48,142,255,326,391, 1982.
7. 王洪圖 : 黃帝內經素問, 春秋出版社, p.71,237,271, 1988.
8. 金定濟 : 東醫臨床要覽, 서울, 書苑堂, pp.253-254, 1981.
9. 上海中醫學院 : 中醫外科學, 香港, 商務印書館, pp.302-307, 1982.
10. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1-10, 1986.
11. 方藥中 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.12-16,621-635, 1986.
12. 顧伯華 : 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.148-149, 1985.
13. 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.
14. 上海中醫學院 : 中國外科學講義, 香港, 醫藥衛生出版社, pp.95-101, 1973.
15. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
16. 孫泰重 編 : 病理學概論, 서울, 高文社, p.227, 1979.
17. 鞠永棕 編 : 고오스 藥理學, 서울, 汎文社, pp.701-710, 1986.
18. 金東熙 外 : 抗癌劑와 放射線療法의 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.
19. 儲水鑫 : 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. 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.
21. 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.
22. 陳紹東 : 治癌芻議, 上海中醫藥雜誌, 第4期, pp.12-13, 1989.
23. 高광석 外 : 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 研究, 東醫病理學會誌 9, pp.1-20, 1994.
24. 尹太汝 : 消積四君子湯, 瓦松, 鬼箭羽가 MNNG를 投與한 흰쥐의 抗癌作用에 對한 研究, 東國大學校論文集, pp.311-322, 1986.
25. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 實驗的研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1), pp.245-263, 1994.
26. 康坵林 : 數種 韓藥劑의 抗癌活性 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 3(2), pp.315-321, 1995.
27. 金賢洙 外 : 葦莖湯, 加味葦莖湯의 B16-F0에 對한 抗腫瘍效果와 組織變化, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.365-387, 1995.
28. 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.
29. 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.
30. 張代釗 外 : 中醫藥對腫瘤放化療的增敏減毒作用, 中國中西結合雜誌, 12(3), pp.135-138, 1992.
31. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H.,

- Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. : Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res.*, 48, pp.4827-4833, 1988.
32. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, 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.
33. National Cancer Institute U.S.A. ; *Cell culture technical procedures*, 1972.
34. Spjut, R. W. and Perdue, R. E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, *Cancer Treat. Rep.*, 60, p.979, 1966.
35. Higgins, N. P., Ferro, A. M., Olivera, B., M. : In DNA topology and its biological effects(Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.361-370, 1990.
36. Hellmann, K. and Carter, S.K. : *Fundamentals of cancer chemotherapy*, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
37. 金井泉 外 : 臨床検査法提要, 서울, 高文社, p.242, 249, 1984.
38. 錢乙 : 小兒藥證直訣(卷下方), 江蘇科學技術出版社, pp.47-48, 1981.
39. 黃度淵 : 方藥合編, 南山堂, p.166, 1988.
40. 姜廷良 外 : 六味地黃湯方法腫瘤的實驗研究, 中藥雜誌, pp.471-474, 1983.
41. 劉鈺儀 : 六味地黃丸或金匱腎氣丸補助治療小細胞肺癌的療效觀察, 中西醫結合雜誌 12, pp.720-722, 1990.
42. 趙良輔 外 : 六味地黃湯對誘變和自發腫瘤的抑制作用, 中西醫結合雜誌, vol. 10, No.7, pp.433~435, 1990.
43. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 上海, 上海校經山房成記, pp.26-63, 1987.
44. 邱桂信 外 : 健脾中藥防治消化道惡性腫瘤的作用原理研究, 上海中醫藥雜誌, 第6期, pp.45-47, 1987.
45. 梁興才 : 健脾補氣常用藥防治癌症研究綜述, 中醫藥信息 3, pp.17-19, 1988.
46. 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, p.7, 1984.
47. 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, pp.9-10, 1985.
48. 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.
49. 楊倉良 : 胃癌的中醫及中西醫結合治療進展, 新中醫, vol.21, No.2, pp.45~47, 1989.
50. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 서울, 永林社, pp.193-196, 201-202, 223-224, 302-306, 385-386, 414-415, 417-420, 423-425, 498-499, 531-538, 540-541, 556-557, 559-560, 568-569, 580-581, 594-597, 626-627, 1991.
51. 李 岩 : 腫瘤臨床備要, 人民衛生出版社, pp.356-366, 1980.
52. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-OKa S, Samukawa K and Azuma I : Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponin, ginsenoside-Rb₂, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg₃, of red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 18(9): 1197-1202, 1995.
53. 이재훈 : 高麗人蔘이 肝再生 및 肝癌 發生過程中 肝細胞膜 Transferrin receptor 變動에 미치는 影響, 高麗人蔘學會誌 20(1): 114-115, 1996.
54. Champoux, J. J. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.217-242, 1990.
55. 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.

56. 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.

57. P. D. Arpa and L. F. Liu ; Topoisomerase-targeting anticancer drug, *Biochim. Biophysica Acta.*, 989, pp.163~177, 1989.

58. 呂麗娜 外: 健脾理氣法治療原發性肝癌臨床和機理的初步研究, *中醫雜誌*, vol. 28, No.7, pp.28~30, 1987.

59. 胡 濱 外: 中醫健脾理氣法爲主合并阿霉素治療晚期原發性肝癌, *中西醫結合雜誌*, vol.10, No.12, pp.746~747, 1990.

60. 이귀녕 : 임상병리파일, 서울, 醫學文化社, pp.54-57, 82-89, 216-218, 740-744, 767-773, 1075-1095, 1993.

61. 李三悅 : 臨床病理檢查法, 서울, 延世大學校出版部, pp.202-207, 1994.

62. Yong Q. C. : Fatty acid modulation of tumor cell-platelet vessel wall interaction, *Cancer and Metatasis Review.* 11, pp.389-410, 1992.