

원 저

소복축어탕과 가미소복축어탕이 항암활성에 미치는 영향

신원웅¹⁾, 최주선, 김재호²⁾, 김성훈

대전대학교 대학원 한의학과¹⁾, 경희대학교 체육과학대학 체육학부²⁾, 경희대학교 동서의학대학원 중앙학과

Study on Antitumor Activity of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang*

Won-Woong Shin¹⁾, Joo-Sun Choi, Jae-Ho Kihl²⁾, Sung-Hoon Kim

Department of Oriental Medicine, Graduate School of Oriental Medicine¹⁾, Daejeon University,
Department of Physical Education, College of Physical Education and Sports Science, Kyunghee University²⁾,
Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

This study was attempted to investigate the anti-tumor and anti-metastatic effects of *Sobokchukeotang*(SBCT) and *Kamisobokchukeotang*(KSBCT). Cytotoxicity against various cancer cell lines, anti-adhesion, pulmonary colonization, anti-angiogenesis, and T/C% were evaluated. SBCT and KSBCT exhibited no cytotoxicity against HT-1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 and SK-Mel-2 cell lines. In inhibitory effect on DNA topoisomerase I, the IC₅₀s were shown 250-500 $\mu\text{g/ml}$ of SBCT and 62.5-125 $\mu\text{g/ml}$ of KSBCT respectively. In the *in vivo* experiments, SBCT(135.98%) and KSBCT(151.92%) apparently increased the life span of mice bearing sarcoma-180. KSBCT significantly inhibited the adhesion of HT-1080 to complex extracellular matrix in a dose-dependent manner in contrast to SBCT. In pulmonary colonization assay by B16-F10, a number of colonies in the lungs were decreased more significantly in KSBCT group than those in SBCT group. *In vitro* neovascularization and CAM assay, angiogenesis was more significantly inhibited in KSBCT-treated group than in SBCT-treated group. Above results suggests that KSBCT is more effectively applied to prevention and treatment of cancer than SBCT. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(2):22-30)

Key Words: *Sobokchukeotang*, *Kamisobokchukeotang*, DNA topoisomerase I, T/C%, Cytotoxicity, Pulmonary colonization, CAM, Neovascularization

서 론

소복축어탕은 활혈거어·온경지통하는 처방으로 서 왕¹⁾의 《의림개착》에 처음 수록된 이후, 어혈로 인한 월경통, 만성골반염, 자궁근종, 종양, 습관성 유산,

불임 등 소복의 제반 증상을 치료하는데 응용되어 왔다²⁾. 어혈이란 생리적 기능을 상실한 혈액이 응취하여 형성된 일종의 병리적 산물인 동시에 치병인자로 오늘날 혈액순환장애, 혈류속도감소 및 혈액성분 변화의 병리상태를 포괄한다³⁾. 이러한 어혈의 증상으로는 고정성 자통, 종괴, 출혈 및 피하어반, 흑변, 설질암자, 피부조조, 기부갑착 등으로 매우 다양하게 나타나는데, 어혈표현은 암환자의 주관적, 객관적인 신체적 증상에서 다방면에 걸쳐 관찰되며, 비교적 보편적

· 접수 : 2001년 3월 26일 · 채택 : 5월 20일
· 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 처천리 경희대학교 동서의학대학원 중앙연구팀
(Tel. 031-201-2179, Fax. 031-201-2179, E-mail : sungkim7@khu.ac.kr)

으로 인식할 수 있다⁴⁾.

《황제내경》⁵⁾에서는 “혈기계류 불득행 고속숙이성 적의”라 하여, 어혈이 오래되면 “적”이 내부에 형성된다고 보았고, 왕¹⁾은 《의림개착》에 “두복결괴, 필유형지혈야, 혈수한칙 응결성괴, 혈수열칙 전오성괴,……혈부, 혈지근본, 어척운명”이라 하여 어혈이 종양의 형성과 발전과정에 중요한 병리기전임을 주장하였다.

최근에는 옥 등⁶⁾에 의하여 활혈화어법이 혈액순환을 촉진하고, 혈관을 확장시켜 결체조직의 증식을 억제함으로써 종양의 성장 및 전이를 억제한다고 보고하였으며, 서양의학적으로도 혈전이 전이 유발인자로 작용한다는 사실이 밝혀졌으며⁷⁾, 임상에서도 암환자들에게 고점도혈증이 자주 관찰되어 활혈화어법은 암 치료에 광범위하게 활용가능한 치법으로 대두되고 있다⁸⁾.

활혈화어제를 이용한 암에 대한 실험 연구로는 단일 약물 등에 대하여 부⁹⁾ 등은 항암작용을, 고¹⁰⁾는 활혈거어 방제의 항암 및 면역조절작용을, 임상적으로도 구¹¹⁾ 등이 활혈화어법의 유효한 암치료 효과를 보고하는 등 어혈제의 암치료 가능성을 시사하고 있다.

이에 저자는 하복부의 대표적 어혈 처방인 소복축어탕과 이미 항암 효과가 보고된 선착초, 어성초, 백화사설초를 가미한 가미소복축어탕의 항암 활성을 실험적으로 입증하고자, 수종 암세포에 대한 세포독성, DNA topoisomerase I 활성 억제작용, sarcoma-

180에 대한 생존비를 통하여 항암성을 평가하고, HT-1080 암주에 대한 부착저지 작용, 폐암전이 억제 작용, 혈관형성 저해작용등을 통하여 항전이 작용을 평가하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 동물

동물은 4주령의 수컷 ICR(International Cancer Research, U.S.A) 및 C57BL/6 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험당일까지 고형사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 약물

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선 사용하였으며, 가미소복축어탕은 《의림개착》의 소복축어탕을 기본방으로 가미 구성하였으며, 한 첩 분량은 Table 1과 Table 2와 같다. 약재 2첩 분량을 각각 대용약탕기에 넣고 증류수 1,200ml와 함께 넣은 다음 2시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하

Table 1. Prescription of Sobokchukeotang

| Herbal Medicine | Botanical Name | Amount(g) |
|-----------------|---------------------------------|-----------|
| 小茴香 | <i>Foeniculi Fructus</i> | 4.0 |
| 乾薑 | <i>Zingiberis Rhizoma</i> | 0.8 |
| 玄胡 | <i>Corydalis Tuber</i> | 4.0 |
| 沒藥 | <i>Myrrha</i> | 4.0 |
| 當歸 | <i>Angelicae gigantis Radix</i> | 12.0 |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 4.0 |
| 肉桂 | <i>Cinnamomi Cortex</i> | 4.0 |
| 赤芍藥 | <i>Paeoniae Radix Rubra</i> | 8.0 |
| 蒲黃 | <i>Typhae Pollen</i> | 12.0 |
| 五靈脂 | <i>Trogopterorum Faeces</i> | 8.0 |
| 總量 | | 60.8 |

Table 2. Prescription of Kamisobokchukeotang

| Herbal Medicine | Botanical Name | Amount(g) |
|-----------------|------------------------------------|-----------|
| 小茴香 | <i>Foeniculi Fructus</i> | 4.0 |
| 乾薑 | <i>Zingiberis Rhizoma</i> | 0.8 |
| 玄胡 | <i>Corydalis Tuber</i> | 4.0 |
| 沒藥 | <i>Myrrha</i> | 4.0 |
| 當歸 | <i>Angelicae gigantis Radix</i> | 12.0 |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 4.0 |
| 肉桂 | <i>Cinnamomi Cortex</i> | 4.0 |
| 赤芍藥 | <i>Paeoniae Radix Rubra</i> | 8.0 |
| 蒲黃 | <i>Typhae pollen</i> | 12.0 |
| 五靈脂 | <i>Trogopterorum Faeces</i> | 8.0 |
| 白花蛇舌草 | <i>Oldenlandiae diffusae Herba</i> | 12.0 |
| 魚腥草 | <i>Houtuniae Herba</i> | 8.0 |
| 仙鶴草 | <i>Agrimoniae Herba</i> | 8.0 |
| 總量 | | 88.8 |

였고, 동결건조하여 SBCT 11.7g과 KSBCT 14.6g의 분말을 각각 얻어, 검액으로 제조하여 사용하였다. 동물 실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포독성 실험시에는 RPMI 1640 free medium에 용해시켜 syringe filter(0.22 μ m, Falcon)로 여과하여 사용하였다.

3. 세포배양

HT-1080(ATCC CCL 121) 암세포주와 A549(ATCC CCL 185)폐암주, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 난소암주, SK-MEL-2(ATCC HTB 68) 피부 흑색종 및 B16-F10(ATCC CRC 6322) 폐흑색종을 사용하였는데, 이들의 배양액은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56 $^{\circ}$ C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고, 1% 항생제(penicillin-G 10만 units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 첨가하여 제조하였다.

4. 암주에 대한 세포독성 측정

HT-1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 및 SK-MEL-2 암주에 대한 세포독성은 세포수가 2x10⁴개가 되도록 96-well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 농도별(0.25, 0.5, 1mg/ml)로 희석된 시료용액들을 20 μ l씩 넣어주고 다시 48시간 동안 배양하였다. 각 well의 medium을 제거하고, sulforhodamine-B 방법¹²⁾을 사용하여 약물의 암세포 성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose(ED₅₀)값을 계산하여 NCI의 방법¹³⁾에 따라서 세포독성을 평가하였다.

5. DNA topoisomerase I 활성 측정

실험에 사용된 DNA topoisomerase I (topo-I)는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E. coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomerase I 저해 IC₅₀값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였다. Topoisomerase I 활성의 측정은 Liu와 Miller의 방법¹⁴⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 μ g pBR 322 DNA와 효소(1 unit)만 가하여 총반응

액을 20 μ l가 되게 한 것을 대조군으로 하고, 효소와 시료를 가하여 총 반응액을 20 μ l되게 한 것을 시험군으로 하여 이들을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 이에 2% SDS(sodium dodesyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 용액 5 μ l를 첨가하여 반응을 종결시키고, TBE running buffer (50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전기영동을 한 후 ethidium bromide 용액에서 염색하여, 자외선 하에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 활성 밴드를 측정했다. 이 때 topo I의 1 unit는 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 촉매하는 효소의 양을 의미한다.

6. S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 sarcoma-180 세포를 1x10⁷ cells/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 8마리로 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켰고, SBCT는 11.7mg/20g/day의 농도로, KSBCT는 14.4mg/20g/day의 농도로 보존용액을 만든 후 4 $^{\circ}$ C에 보존하였으며, 0.2ml씩 경구로 1주일간 연속 투여하였고, 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 미국립 암연구소(NCI) protocol에 언급된 식¹⁵⁾에 따라 계산하였다.

7. HT1080 암주에 대한 부착저지 작용 측정

HT-1080 암세포를 2% FBS로 조절된 배지에 현탁시켜 96 well plate의 각 well에 100 μ l씩(5x10⁴ cells/well) 가한 후 0.25, 0.5, 1mg/ml 농도의 시료를 녹인 배지 100 μ l를 가하고, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다¹⁶⁾. 3시간 후 배양액을 제거시키고 2% FBS로 세척한 다음 24시간 배양시킨 후 SRB법¹²⁾에 의하여 바닥에 붙어 있는 세포수를 관찰하였다.

8. 폐암 전이억제 작용 측정

Pulmonary colonization 측정¹⁷⁾은 B16-F10 폐암세포를 2x10⁴ cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들어 18

~20g인 C57BL/C에 세포현탁액 0.2ml을 미정맥 주사하였다. 검액은 B16-F10 암세포를 이식한 후 24시간부터 1일 1회씩, SBCT는 11.7mg/20g/day의 농도로, KSBCT는 14.4mg/20g/day 농도로 생리식염수에 녹여 4℃에서 보관하면서 7일간 매일 zonde를 사용하여 경구투여하였다. 암이식 21일후에 cervical dislocation으로 치사시킨 다음 개복하여 폐에 전이된 암세포 colony를 계산하였다.

9. 혈관 형성 억제작용 측정

In vitro neovascularization 측정은 혈관신생 내피세포인 ECV 304 세포의 혈관을 형성시키기 위해서 Schnaper¹⁸⁾ 등의 방법에 준하여 basement membrane인 matrigel을 이용하여 신혈관 형성을 유도하였다. Ice bath상에서 96-well plate에 matrigel을 50µl씩 넣은 후 37℃에서 1시간동안 incubation하였다. ECV 304 세포수가 well당 2×10⁴ cells이 되도록 matrigel이 덮인 96 well plate에 넣고, 시료 1mg/ml 처리하고, 혈관형성 활성물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 8ng을 처리한 ECV 304 세포를 양성 대조군으로 하여 시간별로 matrigel 위에서 ECV 304 세포의 신혈관이 형성되는 모양을 전자현미경을 사용하여 혈관형성 유무를 관독하였다. *In vivo* CAM(Chorioallantoic membrane) assay는 1일째(0일배)은 수정란을 배양기에서 부화시켜 3일째(2일배)에 알부민을 3~5ml 정도 뽑아낸 후 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 다시 배양시켰다. 4일째(3일배)에는 수정란의 air sac이 있는 쪽으로 직경 2~3cm 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 배양시켰다. 5일째(4일배)에 CAM이 생성되며, 그 직경이 2~5mm 정도 된다. 시료를 물에 녹인 다음 4등분된 thermanox cover slip 위에 10µl씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 건조시킨 다음 수정란의 CAM 위에 thermanox를 올려놓고 유리 테잎으로 막는다. 7일째(5일배)에 유리 테잎을 제거하고 주사기로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 취하여 CAM의 바로 아래 부분에 주입한 후 혈관의 생성 유무를 관찰한다. 관

찰이 끝난 수정란은 카메라로 근접 촬영하였다¹⁹⁾.

10. 통계처리

실험결과는 Mean±SD값으로 나타내었으며, 각 실험군간의 비교는 T-test를 하였고 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 세포독성 효과

HT-1080, A549, SK-OV-3, B16-F10, SK-Mel-2 암주에 대한 세포독성은 SBCT 투여군과 KSBCT 투여군 모두에서 ED₅₀이 1 mg/ml 이상인 것으로 나타나 여러 종류의 암세포에 대해 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Table 3).

2. DNA topoisomerase I에 미치는 효과

Fig. 1에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었다. 이에 비해 SBCT 투여군은 농도의존적으로 topo-I의 활성을 억제하여, IC₅₀값은 250~500µg/ml으로 나타났으며, KSBCT 투여군 역시 농도의존적인 topo-I의 활성을 억제하였으며 IC₅₀ 값은 62.5~150µg/ml으로 SBCT 투여군보다 억제효과가 우수하

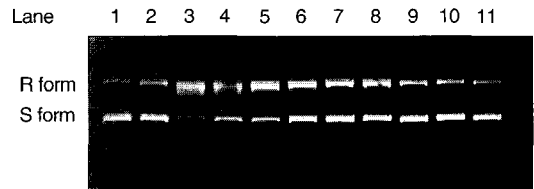


Fig. 1. Effect of Sobokchukeotang and Kamisobokchukeotang on the DNA topoisomerase I from calf thymus.

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 500µg/ml of Sobokchukeotang.
 Lane 8-11 : DNA + DNA topoisomerase I(1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500µg/ml of Kamisobokchukeotang.

Table 3. Cytotoxic Effect of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang* on Various Cancer Cell Lines

| Cancer cell lines | Group | Concentration(mg/ml) | | | |
|-------------------|-------|--------------------------|-------------|------------|------------|
| | | 0(Control) | 0.25 | 0.5 | 1.0 |
| HT-1080 | SBCT | 100.00±1.91 | 101.93±6.79 | 99.03±4.91 | 88.73±5.76 |
| | KSBCT | | 96.49±5.71 | 89.63±3.96 | 71.72±4.05 |
| A549 | SBCT | 100.00±3.75 ^a | 99.73±2.94 | 95.06±5.73 | 90.07±5.85 |
| | KSBCT | | 91.97±4.65 | 82.52±5.06 | 68.94±5.87 |
| SK-OV-3 | SBCT | 100.00±3.60 | 102.04±5.83 | 92.76±4.69 | 87.05±4.61 |
| | KSBCT | | 94.86±3.07 | 80.88±6.94 | 69.55±4.92 |
| B16-F10 | SBCT | 100.00±4.23 | 95.08±3.85 | 87.94±3.71 | 78.37±5.93 |
| | KSBCT | | 90.86±3.92 | 78.63±4.96 | 60.63±5.71 |
| SK-Mel-2 | SBCT | 100.00±4.68 | 101.73±5.09 | 94.92±4.65 | 88.74±4.09 |
| | KSBCT | | 91.65±2.97 | 86.93±5.08 | 86.93±5.08 |

SBCT : *Sobokchukeotang* treated group. KSBCT : *Kamisobokchukeotang* treated group.

Table 4. Effect of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang* on T/C% in ICR Mice Bearing Sarcoma-180.

| Group | No. of animals | M S T (day) | T/C (%) ^a |
|---------|----------------|-------------|----------------------|
| Control | 8 | 13.25 | 100 |
| SBCT | 8 | 18.00 | 135.98 |
| KSBCT | 8 | 22.38 | 151.92 |

T/C (%)# : $\frac{\text{MST of smaple}}{\text{MST of Control}} \times 100$

MST : Mean survival time.

SBCT : *Sobokchukeotang* (11.7mg/20g/day) treated group.

KSBCT : *Kamisobokchukeotang* (14.4mg/20g/day) treated group.

Table 6. Inhibitory Effect of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang* of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-F10 Cells

| Group | No. of animals | Number of colonies |
|---------|----------------|-------------------------|
| Control | 6 | 56.62±4.86 ^a |
| SBCT | 5 | 51.86±7.52 |
| KSBCT | 5 | 33.04±6.01 [*] |

a) : Mean ± standard error.

SBCT : *Sobokchukeotang* (11.7mg/20g/day) treated group.

KSBCT : *Kamisobokchukeotang* (14.4mg/20g/day) treated group.

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

였다.

3. S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 영향

S-180이 이식된 생쥐에 SBCT와 KSBCT를 10일간 경구 투여한 후 체중 증가를 측정하였던 바, 복수암으로 인한 체중 증가는 대조군에서는 암주 이식 후 11일에 급격히 증가하여 16일에 모두 죽었다. 평균 생존일수에서 대조군의 MST는 13.25일, SBCT 투여군은

Table 5. Inhibitory Effect of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang* on Cell Adhesion of HT-1080 Cells to Complex Extracellular Matrix

| Concentration (mg/ml) | Percent of control | |
|-----------------------|--------------------|------------|
| | SBCT | KSBCT |
| 0(Control) | 100.00±4.51 | |
| 0.25 | 94.07±5.89 | 84.81±3.69 |
| 0.5 | 80.94±3.92 | 69.84±6.94 |
| 1 | 68.46±4.95 | 48.83±6.05 |

SBCT : *Sobokchukeotang* treated group.

KSBCT : *Kamisobokchukeotang* treated group.

18.00일, KSBCT 투여군은 22.38일로 나타나, T/C%는 각각 135.98과 151.92%로 나타났다(Table 4).

4. 세포부착 저지효과

HT1080 세포에 대한 부착저지 실험에서 대조군에 비해 0.25, 0.5, 1mg/ml 농도에서 SBCT 투여군은 94.07±5.89, 80.94±3.92, 68.46±4.95%로 1mg/ml의 농도에서만 30% 이상 세포 부착저지 효과가 나타났으며, KSBCT 투여군은 84.81±3.69, 69.84±6.94, 48.83±6.05%로 나타나, 0.5mg/ml 이상의 농도에서 30% 이상 세포 부착저지 효과가 나타냄으로써, SBCT 투여군보다 강한 세포 부착저지 효과를 나타내었다(Table 5).

5. 폐암 전이 억제에 미치는 효과

B16-BL6 암주의 전이에 의한 폐장 colony수 관찰

에서는 대조군은 56.62 ± 4.86 개 이었는데 비해서 SBCT 투여군은 51.86 ± 7.52 개, KSBCT 투여군은 33.04 ± 6.01 개로써 41.64%의 유의성($P < 0.05$)있는 폐암전이 억제효과를 보였다(Table 6, Fig. 2).

6. 혈관형성 억제효과

ECV 304 내피세포의 신생혈관 형성 억제효과에서 대 조군에서는 ECV 304 내피세포가 plating 후 1~2 시간에 matrigel 위에 부착하고 3~5시간에 cell clustering이 형성되고, 7~10시간에 cell cord를 형성 하여 혈관을 형성할 준비를 하며, 12~18시간에는 내강을 갖는 모세혈관이 형성되었다. 이에 비해서

SBCT 1mg/ml을 가한 실험군에서는 lumen 형성에 대해서 억제효과를 나타내지 않았으나, KSBCT 1mg/ml을 가한 실험군에서는 lumen 형성의 억제효과를 나타내었다(Fig. 3). CAM assay를 통한 혈관형성 억제 효과는 실험에 사용된 수정란 10개중 SBCT 투여군은 20%의 혈관형성 억제효과를 나타내었으며, KSBCT 투여군은 40%의 혈관형성 억제효과를 나타내었다(Table 7, Fig. 4).

고찰 및 결론

최근 한의학계에서는 어혈을 치료하는 약물 및 처방을 시료로 하여 혈전증을 중심으로 한 순환기 장애에 대한 연구가 실험 및 임상에서 폭넓게 이루어지고 있으며, 이와 더불어 아직까지도 난치병의 범주에 속한 악성종양에 대한 활혈화어 약물의 활용 가능성 및 치료효과에 대한 연구 역시 심도있게 진행되고 있다^{8,11)}. 특히 후자의 경우는 종양이 지니는 종괴, 혈액학적 이상 및 전이 등의 특성에 기인한 것으로 보여진다.

Table 7. Antiangiogenic activity of *Sobokchukeotang* and *Kamisobokchukeotang* in Chorioallantoic Membrane Assay

| Sample | Dose(μ g/egg) | No. of CAM (avascular/total) |
|--------|--------------------|------------------------------|
| SBCT | 15 | 2/10 |
| KSBCT | 15 | 4/10 |

SBCT : *Sobokchukeotang* treated group.
 KSBCT : *Kamisobokchukeotang* treated group.
 CAM : Chorioallantoic membrane

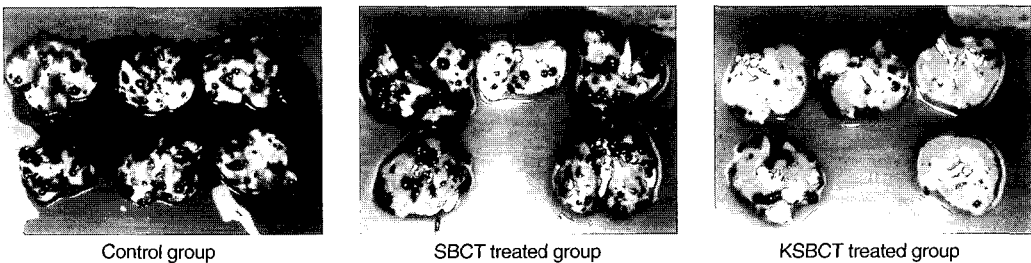


Fig. 2. Inhibitory effect of *Sobokchukeotang*(SBCT) and *Kamisobokchukeotang*(KSBCT) of lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-BL6 cells.

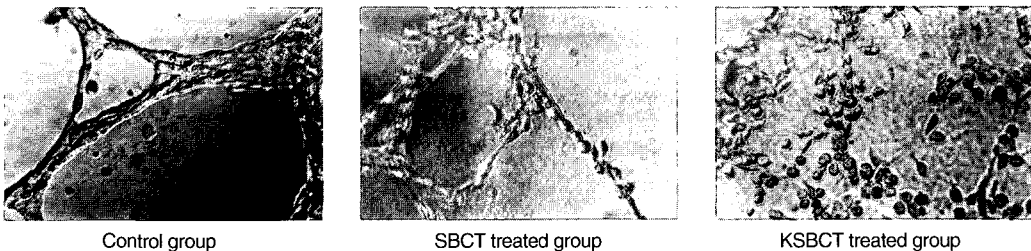


Fig. 3. Photography of in vitro neovascularization by ECV 304 in control, *Sobokchukeotang* (SBCT) and *Kamisobokchukeotang*(KSBCT) treated group.

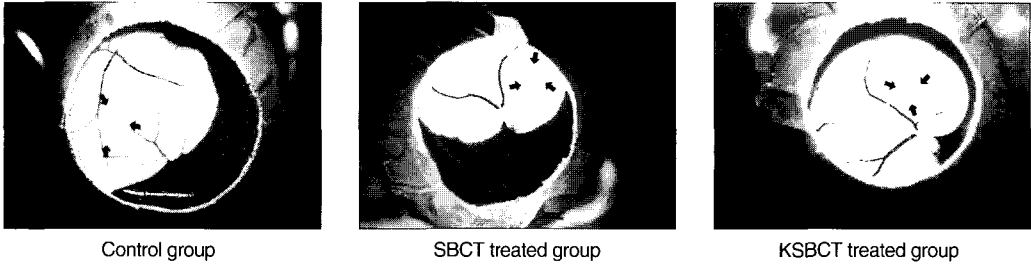


Fig. 4. Photography of control, Sobokchukeotang(SBCT) and Kamisobokchukeotang (KSBCT) on embryonic angiogenesis.

어혈의 치법인 활혈화어법의 항종양 효과에 대한 연구로 옥 등⁶⁾은 “활혈화어법은 혈맥을 통하게 하고 혈액순환을 촉진하며 혈관을 확장시켜 미순환을 개선시킴으로써 결체조직의 증식을 억제하여 종양의 성장 및 전이를 억제하여 종양을 축소시키는 작용을 한다”는 것을 실험적으로 입증하였다. 이와 같은 결과는 혈소판이 맥관계의 암세포의 안정화를 돕고, 암세포의 증식을 촉진하며, 암세포의 내피세포수축을 촉진하여 암세포의 일출을 조장한다는 보고²⁰⁾와 암환자를 대상으로 혈액학적 검사를 통하여 정상인과 대비해 본 결과, 전혈집도, 적혈구전영시간, fibrinogen 및 적혈구 침강율 등이 높으며, 암환자에서 혈소판과소증이 자주 발생한다는 임상 보고²¹⁾ 등과도 상호 관련성이 있다.

소복축어탕의 구성 약물의 본초학적 효능을 살펴보면, 천궁은 활혈행기, 거풍지통의 효능, 적작약은 청열량혈, 산어지통의 효능, 당귀는 보혈화혈, 조경지통, 윤조활장의 효능이 있어, 이들 세 가지 약물이 균약이 되어 양혈행혈하며, 현호색은 활혈산어, 이기지통의 효능, 몰약은 산혈거어, 소종정통의 효능, 오령지는 활혈산어 지통의 효능, 포황은 수삼지혈, 행혈거어의 효능이 있어, 신약으로써 화혈산어작용을 한다²³⁾. 건강은 온중축한, 회양통맥의 효능, 육계는 보원양, 난비위, 제적냉, 통혈맥의 효능이 있어, 좌약으로써 온한행기하며, 소회향은 온신산한, 화위리기의 효능이 있어 사약이 됨으로써 군신좌사약이 대부분 혈독 및 혈행장애 등의 혈액학적 이상을 치료하는 약물로 구성되어 있다²³⁾.

가미된 약물중 백화사설초는 청열이습, 해독소응의 효능이 있고, 어성초는 청열해독, 소종배농, 이뇨통림 효능이 있으며, 선학초는 수렴지혈, 지리, 해독작용이 있어, 모두 청열해독의 공통 효능으로 현재 암의 치료에 주로 자주 응용되고 있다²²⁾.

구성 약물의 암에 대한 임상에서의 활용을 살펴보면 당귀, 천궁, 적작약은 타 약물과 배합하여 혈허 증상과 어혈 병증이 동반되는 다양한 암에 기본약으로 사용되며, 어성초는 폐암에, 선학초는 식도암, 폐암 등에, 백화사설초는 간암, 골육암, 임파암, 폐암 및 직장암 등에 유효하다는 임상적 보고가 있었으며²³⁾, 최근에 김²⁴⁾은 백화사설초의 구성 물질인 ursolic acid의 항암활성을 실험적으로 입증한 바가 있다.

이에 본 실험에서는 이러한 본초학적 효능과 실험·임상적 보고를 바탕으로, 어혈의 기본방으로 응용되고, 아직까지 항종양작용에 대한 검색이 이루어지지 않은 소복축어탕과 여기에 실험 및 임상에서 이미 항암활성이 인정된 백화사설초, 어성초 및 선학초를 가미한 가미소복축어탕을 시료로 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 평가하였다.

세포독성에 있어서는 기존의 실험 결과²⁵⁾로 보아 활혈화어약과 청열해독 약물로 구성된 본 처방이 세포독성을 나타낼 것으로 기대되었으나 수종 암주의 세포독성 평가 결과에서는 SBCT 투여군과 KSBCT 투여군 모두 대조군에 비하여 감소하였으나, 1mg/ml 농도에서도 70% 이상 암세포 생존율이 나타나 세포독성이 미약하였다.

DNA topoisomerase는 DNA에서 일어나는 복제,

전사 및 재조합에 영향을 미치는 효소로 암의 전변 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있으며¹⁴⁾, 한의학에서도 최근 김²⁵⁾은 가미지황탕, 가미사군자탕, 가미군자지황탕, 조²⁶⁾는 도홍사물탕가미방, 김²⁷⁾은 계지복령환가미방의 topo-I 활성 억제효과를 보고한 바가 있으며, 이들 모두는 공통적으로 활혈화어약물이 기타 약물에 비하여 topo-I의 활성 억제에 효과적이라고 언급한 바가 있다. 본 실험에서는 DNA에 topo-I을 처리한 대조군에 비하여, SBCT 투여군과 KSBCT 투여군 모두 농도의존적으로 topo-I의 활성을 억제하였는데, IC₅₀ 값은 SBCT 투여군이 250-500 $\mu\text{g/ml}$, KSBCT 투여군은 62.5-150 $\mu\text{g/ml}$ 로서, KSBCT 투여군이 SBCT 투여군 비하여 효과적인 topo-I의 활성 억제효과를 나타내었다. 이와 같은 결과, 특히 KSBCT 투여군의 IC₅₀ 값은 김²⁵⁾, 조²⁶⁾, 송²⁷⁾ 등의 실험에서의 결과보다 우수하여 KSBCT가 topo-I의 활성 억제에 효과적임을 알 수 있다.

In vivo 실험인 S-180 동물 이식실험에서는 생쥐에 SBCT와 KSBCT를 10일간 경구 투여한 후 이들의 평균 생존일수를 측정한 결과, T/C%가 각각 135.98, 151.92%로 나타나 NCI가 설정한 재실험 가능 T/C%인 140%¹⁵⁾를 상회하고, 아울러 기존의 실험에서 나타난 결과²⁵⁾에 비하여 매우 효과적으로 나타났다.

전이는 악성종양이 가지는 가장 대표적인 특성으로서 종양의 발생 부위에서의 국소 침윤능력과 원격 부위로의 전이능력을 동시에 가지고 있어서 전신 각 장구나 조직에 전이소를 만들어 암환자 사망의 주된 사유가 된다²⁸⁾.

본 실험에서는 이러한 전이 억제에 대한 실험으로 *in vitro*에서 HT-1080 암주에 대한 부착 저지작용을, *in vivo*에서 B16-F10 암주를 이식한 생쥐의 lung colony 형성 억제작용을 측정하였으며, CAM assay를 통하여 혈관형성 억제작용은 평가하였다.

HT-1080 세포에 대한 부착저지 실험에서는 모두 농도의존적으로 세포부착저지 효과를 나타내었는데, KSBCT 투여군이 SBCT 투여군에 비하여 전반적으로 우수한 효과를 나타내었으며, 1 mg/ml 의 농도에서 50% 이상의 세포부착저지 효과를 나타내어, 본 시료

가 단일 물질이 아닌 복합방임을 감안하면 50% 이상의 부착저지 효과는 유의성있는 결과라고 할 수 있다. 아울러 세포독성 실험에서는 HT-1080 세포에 대하여 미약한 세포독성을 나타낸 반면, 부착저지 작용면에서는 유의성있는 결과가 나타난 점은 KSBCT가 전이 억제에 효과적임을 알 수 있는데, *in vivo* 실험인 pulmonary colonization assay에서 KSBCT 투여군에서만 유의성있는 감소가 나타난 점이 이를 입증해준다.

혈관형성(angiogenesis)은 암의 침투와 전이에 중요한 단계로²⁹⁾, 성장중인 종양은 신생혈관을 통한 많은 영양물질을 필요로 한다. 이러한 영양물질을 공급받기 위하여 새로운 혈관을 형성하는 물질을 분비하며, 일단 전이된 암세포도 크기가 2mm가 넘으면 스스로 새로운 혈관을 만들어 영양분을 공급받는다. 암은 이러한 신생혈관의 생성없이 2-3mm 이상 성장하지 못하는 것으로 알려져 최근 이러한 angiogenesis를 차단하는 여러 약제가 개발중에 있으며, 이중 angiostatin과 endostatin은 동물실험 후 임상실험을 진행하고 있다³⁰⁾.

본 실험에서는 모세혈관과 다른 혈관들을 뚜렷이 구별할 수 있어서 혈관이동과 형태형성에 영향을 주는 인자를 연구하는데 적당한 모델로 사용되고 있는 CAM assay를 사용하여 혈관형성 억제작용을 평가하였는데 SBCT 투여군은 20%, KSBCT 투여군은 40%의 혈관형성 억제효과가 나타났다.

이상의 실험 결과를 종합하여 보면, 가미소복축어탕은 소복축어탕에 비하여 효과적으로 DNA topoisomerase I 활성, 복합의 기질에 대한 HT-1080 암주의 부착과 B16-F10에 의한 폐장전이 및 ECV 304 내피세포와 CAM assay를 통한 신생혈관 형성 억제효과를 나타내어 항암 및 항전이 효과가 우수한 것으로 보여진다. 또한 가미소복축어탕의 140%를 상회하는 평균생존율은 직접적인 세포독성보다는 부착억제 및 혈관형성 억제 등을 통한 항전이 억제 작용에 기인한 것으로 사료되며, 암환자의 치료에 활용 가능할 것으로 보이나 그 작용기전에 관한 보충연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학재단 2000년 특정기초 연구비로 수행되었는 바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 왕청임. 의립개착. 서울:일증사. 1992:66-109.
2. 이상인. 방제학. 서울:영림사. 1992:250.
3. 유지자. 어혈개념의 중요성. 서울:동양의학. 1983; (26):60-65.
4. 김완희. 장부변증론치. 서울:성보사. 1985:59-375.
5. 홍원식. 황제내경. 서울:고문사. 1974:358-359.
6. 옥인준. 활혈화어어종류치료. 실용중서의결합잡지 1991;4(3):189-192.
7. Fidler IJ. Review on biologic heterogeneity of cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* 1987;9:17.
8. 중국중서의결합연구회 중국중의연구원. 약성종류중서의결합연구성취. 중서의결합잡지. 1988;8(2):57.
9. 부내무. 활혈화어약화항암물대세포표면적작용. 중화종류잡지 1980;2(1):24.
10. 고헌석. 격하축어탕과 격하축어탕합사군자탕의 항암 및 면역조절작용에 관한 연구. 동의병리학회지 1994;9:21-46.
11. 구가신. 재약성종류치료중여하합이응용활혈화어약물. 중의잡지 제5기. 1987:64-67.
12. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, Mc Mahon JD, Vistica J, Warren T, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-1112.
13. National Cancer Institute. Cell culture screen. *Cancer Chemother. Res.* 1972;3:17.
14. Liu LF. DNA Topology and its biological effects. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990:371-389.
15. Hellmann K, Carter SK. Fundamentals of cancer chemotherapy. New York: McGraw-Hill Book Company. 1987:132-140.
16. Mary KC, Effie CT, Alan RH, James BM. Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. *Cancer Res.* 1989;49:4796-4802.
17. Martin JH, Kazue M, Sandra LW, Kenneth O. Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. *Cancer Res.* 1986;46:5215-5222.
18. Schnaper HW, Grant DS, Stetler-Stevenson WS. Cell Physiology. 1993:156-246.
19. Robert A, Wanda A, Igor P. Assays for angiogenesis. *Pharmac. Ther.* 1991;51:1-11.
20. Flanga A, Donati MB. Pathogenesis of thrombosis in patients with malignancy. *Int. J. Hematol.* 2001;73(2):137-144.
21. Yong QC. Fatty acid modulation of tumor cell-platelet vessel wall interaction. *Cancer Metastasis Review* 1992;11:389-410.
22. 전국의과대학 본초학교수 공저. 본초학. 서울:영림사. 1991:155-325.
23. 금유경. 항암식약본초. 중국:중국식품출판사. 1989:110-480.
24. Kim SH, Ahn BZ, Ryu SY. Antitumor effect of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa*. *Phytotherapy Res.* 1998;12:553-556.
25. 김동희, 최봉균, 조문준, 김성훈. 가미지황탕, 가미사군자탕 및 가미군자지황탕의 방사선 부작용 감소효과. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1):115-129.
26. 조한진, 김성훈. 도홍사물탕가감방의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 대한동의병리학회지. 1999;13(1):76-91.
27. 김규, 김동희, 최태균, 김성훈. 가미청열해독탕의 항암활성에 관한 연구(I). 대전대학교 한의 학연구소 논문집. 2000;8(2):93-108.
28. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;85: 1182-1186.