

원 저

桔梗解毒湯이 항암 및 항전이 효과에 미치는 영향

왕중권, 정희재, 이형구, 정승기
경희대학교 한의과대학 내과학교실

The Effects of *Gilgyunghaedok-tang* on Antitumor and Antimetastatic Activity

Joung-Chun Wang, Hee-Jae Jung, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung.

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University.

Background and Objective : In order to investigate the effects of *Gilgyunghaedok-tang* (GHT) on antitumor activity and antimetastatic activity, studies were done experimentally.

Materials and Methods : Experimental studies were performed for the cytotoxic effect on BALB/c mouse lung fibroblast cells, the proliferating effect of splenic lymphocyte, the expression of CD3e/CD4, CD3e/CD8, and B220 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the cytotoxic effect on A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, MCF-7 cells, the inhibitory effect on the activity of DNA topoisomerase I, the T/C% in ICR mice bearing S-180, the inhibitory effect of Cell adhesive of A549 Cells and SK-OV-3 Cells to complex extracellular matrix, the inhibitory effect on lung colonies, the change of lung tissue, the antiangiogenic activity, and the effect on MMP-2 and MMP-9 gene expression in the HT1080 cell line.

Results and Conclusion : The results were obtained as follows:

1. In the cytotoxic effect on BALB/C mouse lung fibroblast Cell, GHT didn't show the significant cytotoxic effect on BALB/C mouse lung fibroblast cell compared to the control group.
2. In thymidine uptake assay, GHT showed the significant proliferating effect of splenic lymphocyte in proportion to the concentration.
3. In the expression of CD3e/CD4, CD3e/CD8, and B220 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of mice, GHT had no significant change to the normal group in CD4. However, GHT showed an increase to the normal group in CD8 and GHT in the only 1 μ g/ml category showed an increase to the normal group in B220.
4. In the cytotoxic effect of GHT on A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 and MCF-7 cells, there was no significant cytotoxic effect compared to the control group.
5. In the inhibitory effect on the activity of DNA topoisomerase I, GHT in the 10 μ g/ml category showed the inhibitory effect on the activity of DNA topoisomerase I in proportion to the concentration.
6. In the T/C% in ICR mice bearing S-180, GHT treated group showed 123.7% of T/C% compared to the control group.
7. In the inhibitory effect of cell adhesive of A549 Cells and SK-OV-3 Cells to complex extracellular matrix, GHT in the only 100 μ g/ml category showed the significant inhibitory effect compared to the control group.
8. In the inhibitory effect on lung colonies, GHT showed the significant inhibitory effect on lung colonies compared to the control group.
9. In the change of lung tissue, GHT showed a significant decrease of lung cancer growth, interalveolar fibrosis and hyaline material compared to the control group. In the development of lymphocyte around lung cancer cells and lung parenchymal, GHT showed the significant inducement efficacy compared to the control group.
10. In CAM assay, the antiangiogenic activity of GHT showed 30%.
11. In the effect on MMP-2 and MMP-9 gene expression in the HT1080 cell line, GHT had no significant inhibitory effect on MMP-2 and MMP-9 gene expression compared to the control group.

According to the above results, it could be suggested that GHT has an antitumor activity and antimetastatic activity. (J Korean Oriental Med 2002;23(2):211-224)

Key Words: *Gilgyunghaedok-tang*(*Jiegengjiedu-tang*), antitumor activity, antimetastatic activity

서론

암이 인간의 생명을 위협하는 치명적인 원인이 되면서도 근본적인 치유가 아직 이루어지지 않고 있는 주요 원인중의 하나는 전이에 있다¹⁾. 현재까지 알려진 암세포의 전이과정을 살펴보면 우선 악성화된 암세포들이 1차 종양에서부터 이탈하여 이동을 시작하고 세포외기질을 파괴하며 움직이는 침윤단계, 침윤을 일으킨 암세포가 혈관, 임파관과 같은 순환계로 들어가는 단계, 그리고 적합한 부위에서 다시 혈관을 뚫고 나가 혈관 신생을 유도하여 전이암을 유발시키는 단계 등 여러 과정을 거쳐야 한다²⁾.

종양에 대한 한의학적 실험연구로 金³⁾, 裴⁴⁾, 李⁵⁾ 등은 각각 加味金 腎氣丸, 四味軟堅湯加味方, 血府逐瘀湯의 항암 및 항전이 효과를, 李⁶⁾와 車⁷⁾는 각각 桔梗湯과 百合固金湯의 항암효과와 면역반응을 보고하였다.

실험에 사용된 桔梗解毒湯은 魚腥草 瓦松 8g 桔梗 金銀花 蒲公英 貝母 麥門冬 4g 前胡 柴胡 黃芩 甘草 2g 등으로 이루어진 처방으로 폐암치료를 위하여 경희대학교 한의과대학 폐계내과교실에서 창방한 것으로, 주로 治惡瘡, 清熱解毒, 補肺陰, 潤燥化痰, 祛痰排膿로 구성되어서, 폐암의 치료에 활용되고 있는 처방이다.

이에 저자는 桔梗解毒湯의 면역 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 확인하고자 정상 lung fibroblast cells에 대한 세포독성, BALB/C 생쥐의 脾臟세포에

서 유세포 분석, 수종의 암세포에 대한 세포독성효과, DNA topoisomerase I 활성억제효과, 수종 암종에 대한 부착저지, sarcoma 180에 대한 生存比, 폐암전이 억제 및 조직변화, 혈관형성억제, MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 동물

한국화학연구소에서 구입한 雌性 ICR(International cancer research, U.S.A) 및 C57BL/6, BALB/c 3주령을 구입하여, 1주일동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22℃, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 약제는 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입, 정선하여 사용하였다. 桔梗解毒湯의 구성과 1첩의 분량은 아래와 같다.(Table 1)

Table 1. Composition and Dosage of Gilgyunghaedok-tang(GHT)

Herbs	Scientific Name	Harvesting Time(month)	Dose (g)
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	7	8
瓦松	<i>Orostachys fimbriatus</i>	3	8
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4	4
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	7	4
蒲公英	<i>Taraxaci Herba</i>	4	4
麥門冬	<i>Liripois Tuber</i>	5	4
貝母	<i>Fritillariae cirrhosae Bulbus</i>	8	4
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	5	2
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	6	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	10	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5	2
Total amount(g)			44

3) 시약 및 기기

(1) 시약

실험에 사용된 시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS, U.S.A), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), Hank's balanced salt solution(HBSS), tris base, boric acid, sodium dodecyl sulfate(SDS), trypsin-EDTA, sulforhodamine-B(SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma(U.S.A)사 제품을 사용하였고, RNazol B(Tel-Test, Inc.) Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa(Japan)사 제품을, 逆轉寫酵素(Molecy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega (U.S.A)사 제조품을, 유세포분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-CD3e, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD4, FITC-anti-CD8는 Pharmingen (U.S.A)사 제품을, 3H-thymidine은 Amersham 사 제품을 사용하였다. 이 밖에 수정란은 풀무원사 제품, intralipose는 녹십자 제품, tissue culture coverslip은 Nunc사 제품을 각각 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

사용된 기기는 flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A), imager system (Kodak, U.S.A), microcentrifuge(한일과학, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), turbo thermalcyclerTM (Bioneer Co., Korea), CO₂ incubator(Napco, U.S.A), clean bench (KMC-14001, Vision Scientific Co., Korea), rotary vacuum evaporator(B chi 461), autoclave(Hirayama, Japan), camera(601S, Nikon) 및 blood cell counter(Minos, Sweden) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

桔梗解毒湯 2첩 분량을 대용약탕기에 넣고 증류수 1,200ml와 함께 넣은 다음 3시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator(B chi 461)에서

감압 농축하였고, 이 round flask를 -70℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 방치하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 동결 건조하여 桔梗解毒湯 17.2g의 분말을 얻어, 검액으로 제조하여 사용하였다. 동물 실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포독성 실험시에는 RPMI 1640 free medium에 용해시켜 syringe filter(0.22µm, Falcon)로 여과하여 사용하였다.

2) 세포배양

(1) 생쥐의 정상 lung fibroblast 세포배양

생쥐의 정상 lung fibroblast 세포(mLFC)는 BALB/C 생쥐의 폐조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에는 DMEM {containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)과 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산 완충생리식염수(PBS)로 약 2 회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 脾臟세포 배양

脾臟세포를 분리하고 RPMI 배지를 첨가하여 세포 현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 4℃에서 10분간 정취한 후 상층액을 취하고 3회 水洗하여 조직절편과 세포 덩어리를 제거하고, 이를 10ml의 cold RPMI 배지에 현탁시켰다. 이 현탁액을 ficoll (Pharmacia) 용액 3ml 위에 가볍게 올려놓고, 2,000 r.p.m 에서 20분간 원심분리하여, ficoll 용액층 위에 걸려 있는 세포를 회수하여 배지로 3회 水洗 후 세포 숫자를 계산하였다. 이 脾臟 세포를 96 well plate의 각 well에 5×10⁵ cells씩 첨가하고, 검액과 Con A를 농도별로 처리한 후 세포를 37℃에서 48시간 배양하였다.

(3) 암주배양

In vitro 세포독성 측정에는 A549 (ATCC CCL185) 폐암주, SK-OV-3 (ATCC HTB 77) 난소암주, SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 흑색종 및 MCF-7 (ATCC CCL HTB-22) 유방암주 등을, in vivo 항암 실험에는 S-180(ATCC TIB66) 복수암주, B16-F10 생쥐 흑색종 등을 사용하였는데, 이들의 배양액은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56℃ 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제 (penicillin-G 10만 units/streptomycin 100mg)와 NaHCO3 2g을 첨가하여 제조하였다.

3) 임파구의 증식반응 측정

검액과 mitogen 등을 처리한 세포의 증식정도를 측정하기 위하여 脾臟세포를 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 첨가하고, 검액과 Con A를 농도별로 처리한 후 세포를 37℃에서 48시간 배양 후 50uCi/ml의 [methyl -3H] Thymidine 을 첨가하고 다시 18시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell harvester)를 사용하여 유리섬유 여지(Glass microfiber filter, Whatman)위에 捕獲하고 건조한 후 방사선 측정기(Liquid scintillation counter)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

4) 유세포 형광분석기(FACS)를 이용한 면역 조절 작용 분석

(1) 脾臟 임파구 현탁액 조제

BALB/C mouse를 頸椎脫骨로 치사시킨 후 脾臟을 적출하고 脾臟 임파구 현탁액을 제조하였다.

(2) 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)

면역 형광염색은 전 과정을 0-4℃에서 실시하였고, 배양한 脾臟 세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한 후 5ml FACS tube (Becton Dickinson, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300 r.p.m, 5min)하였다. 각각의 1차 항체 culture sup.을

100μl씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 얼음에서 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 3회 세척 후, fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat IgF(ab)2 fragment 1:100 (Tago, U.S.A) 희석액 50μl을 가하여 40분간 반응시키고, 3회 세척 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACS can(Becton dickinson, U.S.A)으로 분석하였다.

(3) 면역세포 분석

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACScan (Becton dickinson, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며, consort 30 프로그램을 이용하여 분석하였다. Data의 분석은 forward scatter (FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 비율(gated, %)을 산출하였다.

5) 수종 암주에 대한 세포독성 측정

Solid tumor에 대한 세포독성은 1989년에 미국의 국립 암연구소에서 약물의 in vitro 항암활성도를 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine-B (SRB) assay 법을 사용하였다. NCI manual에 따르면 세포독성 평가는 식물 추출물인 경우 20μg/ml 이하, 합성물인 경우 4μg/ml 이하일 경우 항암 작용이 있다고 규정하고 있다.

6) DNA topoisomerase I assay 방법⁸⁾

실험에 사용된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomerase I 저해 IC50값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였다. Topo I 활성의 측정은 Liu와 Miller의 방법에 따랐다.

7) S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가해 400g로 2분간 원심분리하여 세포 침전물을 분리했다. 분리된 세포 침전물을 冷滅菌 생리식염수에

부유시켜 다시 원심분리하여 上澄액을 제거한 후 흔개된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma 180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 세어 10^6 cells/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 8마리로 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켜 보존용액 (24.90mg/20g/day)을 만든 후 4℃에 보존하였으며 0.2ml씩 경구로 10일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 生存比(T/C%)는 미국국립암연구소 protocol에 언급된 式⁹⁾에 따라 계산하였다.

8) 암주의 세포부착저지 작용 측정¹⁰⁾

A549, SK-OV-3 세포를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 세포 농도를 조절하면서 키웠다. 암세포는 2% FBS로 조절한 배지에 현탁시켜 96 well plate의 각 well에 100μl 씩 가한(5×10^4 cells/well) 후 100, 10, 1μg/ml 농도의 시료를 녹인 배지 100μl를 가하고 5% CO₂, 37℃ 에서 배양하였다. 4시간 후 배양액을 제거시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 세척한 다음 24시간 배양시킨 후 SRB(sulforhodamine-B assay)법에 의하여 바닥에 붙어 있는 세포수를 관찰하였다.

9) 폐암 전이 억제작용 측정

(1) Pulmonary colonization 측정¹¹⁾

In vitro에서 계대배양한 B16-F10(ATCC CRC 6322) 폐암세포를 실험에 사용하였다. 계대중인 이들 세포들을 실험에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시켜 HBSS 용액으로 세포수가 2×10^4 cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들었다. 18~20g인 C57BL/6에 세포현탁액 0.2ml을 尾정맥 주사하였다. 검액은 B16-F10 암세포를 이식한 후 24 시간부터 1일 1회씩 5.73 mg/20g/day의 시료를 생리식염수에 녹여 4℃에서 보관하면서 10일간 매일 zonde를 사용하여 경구투여하였다. 암 이식 21일 후에 경추탈골로 치사시킨 다음 개복하여 폐에 전이된 암세포 colony수를 측정하였다.

(2) B16-F10에 의한 폐장 조직 변화 측정

B16-F10을 미정맥 주사하고 시료를 10일간 경구 투여한 후 C57BL/6 생쥐를 21일째 희생시켜 폐장에 전이된 흑색종을 관찰한 후, 10% 중성 formalin에 고정한 후 절단하여, 흐르는 물에 8시간 씻어 아래 scheme 3과 같은 과정을 거쳐 format하였다. 이것을 다시 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 하였다.

10) 혈관 형성 저해작용(CAM assay) 측정¹²⁾

-1일째(0日胚) : 수정란을 배양기에서 孵化시켰다. 이 때 배양기의 온도는 37-38℃, 습도는 90% 이상 유지되도록 수시로 확인하였다. 여기에서 0日胚란 수정란이 산란되어 18에서 보관된 지 3-4일 이내의 것을 말한다.

-3일째(2日胚) : 수정란의 뾰족한 끝 부분에 칼로 흠을 낸 후 수평으로 눕어놓고 5ml 주사기로 구멍을 낸 다음 알부민을 3-5ml 정도 뽑아내었다. 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 배양시켰다.

-4일째(3日胚) : 수정란의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3cm 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 배양시켰다. 참고로, 원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 껍질 위에 원형으로 흠을 낸 뒤 핀셋으로 껍질을 뜯어내었다. 이 때 껍질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 수정란이란 window를 냈을 때 십자가형의 가는 혈관이 보이는 것을 의미한다.

-5일째(4.5日胚) : 이 시기가 되면 CAM이 생성되며, 그 직경이 2-5mm 정도 된다. 샘플을 적당한 용매(물, 에탄올)에 녹인 다음 4등분된 thermanox coverslip 위에 10ul씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 수정란의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox

를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로 消毒하여 사용하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 소독하여 사용하였다. 기타 실험器具들도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용하였다.

-7일째(6.5日胚): 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. 주사기로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 주입한다. 이 때 흰색 바탕에 뚜렷한 혈관을 관찰할 수 있었다. 주사기로 intralipose로 주입할때는 혈관이 다치지 않도록 注意하였다. 관찰이 끝난 수정란은 카메라로 근접 촬영하였다.

11) MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현변화 측정

(1) 세포 배양 및 약물 처리

유전자 발현에 사용된 HT1080 세포주는 37℃, 5% CO₂ incubator에서 자란 것을 Trysin-EDTA 용액으로 단일세포가 되도록 처리한 후, 2.0×10⁴개의 세포를 24 well plate에 분주하고, incubator (37℃, 5% CO₂)에서 24시간 배양하였다. 약제는 최종 농도가 각각 100 μg/ml, 10μg/ml이 되도록 24 well에 세포분주 2시간 후에 처리하였다. 배양 종료후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) RNA의 추출

배양 종료 후 24 well plate의 상층액을 제거한 후 RNAzolB (Tel-Test, Inc.)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 201의 증류수에 녹여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg에 해당하는 양을 75℃에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denatured total RNA 3 μg에 2.5 μl의 10 mM dNPTs mix, 1 μl의 random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl의 RNasin (20 U/μl), 1 μl의 100 mM DTT, 4.5 μl

의 5 RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 섞은 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 더하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 spin down하여 37℃ 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 10분동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 재빨리 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 사용되어졌다.

(4) cDNA의 PCR 증폭

PCR은 water bath 방식의 Turbo Thermalcycler™ (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 反應은 이미 합성된 3 μl의 first-strand cDNA가 주형으로 사용되어졌으며, 아래 표에서처럼 주형에 대한 primer는 β-actin, MMP-2, MMP-9, hTNF-α을 증폭하기 위하여 sense primer (10 pmole/μl)와 antisense primer (10 pmole/μl)를 혼합 후 1 μl씩 넣어주고, 여기에 3 μl의 2.5 mM dNTPs, 3 μl의 10 PCR buffer (100 mM Tris-Cl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl의 Taq. polymerase (5 U/μl)를 첨가한 뒤, 증류수로서 최종 부피가 30 μl가 되게하여 PCR을 수행하였다.

PCR 조건은, predenaturation; 95℃, 5분을 한 다음, annealing; 57℃, 1분, elongation; 72℃, 1분, denaturation; 95℃, 1분을 30 cycles 한 뒤, postelongation을 72℃에서 3분 동안 해주었다. 각각의 PCR products는 20 μl 씩 1.2%의 agarose gel상에 loading하여 전기영동을 통해 분석되어졌다.

Internal control로서 β-actin이 사용되어졌으며, 증폭되는 PCR product size는 β-actin(548bp), MMP-2(620bp), MMP-9(541bp) 그리고 hTNF-α(348bp)이다.

성적

1. 생쥐의 정상 lung fibroblast cells에 대한 세포 독성

Lung fibroblast cells에 대한 세포독성에서 대조군은 100 ± 1.24 , 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100, 500($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 99.6 ± 1.14 , 97.4 ± 2.24 , 95.1 ± 3.24 , $93.2 \pm 2.22(\%)$ 로 나타나 모두 93% 이상의 세포生存율을 나타내었다.

2. 임파구의 증식 반응에 미치는 효과

[3H] Thymidine uptake assay를 통하여 桔梗解毒湯 투여군의 면역세포에 대한 작용을 검색한 결과에서는, 陰性대조군(negative control)에서 $3,400 \pm 23.6(\text{cpm})$, Con A를 처리한 陽性대조군(positive control)에서 $9,000 \pm 35.0(\text{cpm})$ 으로 나타났고, 桔梗解毒湯 투여군은 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 $3,200 \pm 34.5$, $3,700 \pm 35.2(P<0.001)$, $4,500 \pm 50.6(P<0.001)$, $4,700 \pm 32.7(\text{cpm})(P<0.001)$ 으로 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 이상의 농도에서, 陰性대조군에 비해서만 유의성있는 임파구 증식효과를 나타내었다(Table II).

3. 유세포 형광분석기(FACS)를 이용한 BALB/C 생쥐의 脾臟세포에서 유세포 분석

1) CD4 세포 수의 변화

脾臟세포 중 CD4의 효과에서 활성유세포(% positive cell)는 정상군이 12.8이고, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 9.6, 9.2, 9.2으로 정상군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table III).

2) CD8 세포 수의 변화

脾臟세포 중 CD8의 효과에서 활성유세포(% positive cell)는 정상군이 13.5이고, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 15.9, 13.4, 15.1으로 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 정상군에 비하여 증가함이 나타내었다(Table III, Fig. 1).

3) B220 세포 수의 변화

脾臟세포 중 B220의 효과에서 활성유세포(% positive cell)는 정상군이 17.8이고, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 20.4, 17.6, 17.7으로 1 $\mu\text{g/ml}$ 에

Table 2. Effect of *Gilgyunghaedok-tang* on Proliferation of Splenic Lymphocyte by Thymidine Uptake

Group	Conc.($\mu\text{g/ml}$)	thymidine uptake(cpm)
Control(negative con.)		$3,400 \pm 23.6$
Con A(positive con.)		$9,000 \pm 35.0$
GHT	2.5	$3,200 \pm 34.5$
	5.0	$3,700 \pm 35.2^{***}$
	10	$4,500 \pm 50.6^{***}$
	20	$4,700 \pm 32.7^{***}$

Control : None treated group

Con A : Con A treated group

GHT : *Gilgyunghaedok-tang* treated group

* P-value : Statistically significant as compared with data of negative control group (***) $P<0.001$

Table3. Effect of *Gilgyunghaedok-tang* on the Expression of CD3e/CD4, CD3e/CD8, and B220 in Peripheral Blood Mononuclear Cells(PBMCs) of Mice

Drugs	Dosage($\mu\text{g/ml}$)	CD3e+/CD4+(%)	CD3e+/CD8+(%)	B220+(%)
Normal	0	12.8	13.5	17.8
	1	9.6	15.9	20.4
GHT	10	9.2	13.4	17.6
	100	9.2	15.1	17.7

GHT : *Gilgyunghaedok-tang*

1 : 1 $\mu\text{g/ml}$ of *Gilgyunghaedok-tang* treated group

10 : 10 $\mu\text{g/ml}$ of *Gilgyunghaedok-tang* treated group

100 : 100 $\mu\text{g/ml}$ of *Gilgyunghaedok-tang* treated group

서 정상군에 비하여 증가함을 보였다 (Table III).

4. 수종 암주에 대한 세포독성 측정

1) A549 암주에 대한 세포독성

A549 암주에 대한 세포독성 실험에서는 대조군이 100±3.41(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 102.22±5.17, 95.61±2.41, 73.37±3.44(%)로 나타나 대조군에 비하여 30% 이상 세포독성을 나타낸 실험군은 없었다.

2) SK-OV-3 암주에 대한 세포독성

SK-OV-3 암주에 대한 세포독성 실험에서는 대조군이 107.96±5.12(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투

여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 100.34±5.17, 99.26±6.04, 97.50±2.39(%)로 나타나, 대조군에 비하여 30% 이상 세포독성을 나타낸 실험군은 없었다.

3) SK-MEL-2 암주에 대한 세포독성

SK-MEL-2 암주에 대한 세포독성 실험에서는 대조군이 107.96±5.12(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 103.94±4.37, 101.45±4.51, 82.10±2.36(%)로 나타나 대조군에 비하여 30% 이상 세포독성을 나타낸 실험군은 없었다.

4) MCF-7 암주에 대한 세포독성

MCF-7 암주에 대한 세포독성 실험에서는 대조군이 103.64±2.45(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 100.87±2.74, 92.66±1.13, 89.64±4.58(%)로 나타나 대조군에 비하여 30% 이상 세포독성을 나타낸 실험군은 없었다.

5. DNA topoisomerase I 에 미치는 효과

50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 µg pBR 322 DNA와 효소(1unit)만 가하여 총 반응액을 20µl 가 되게 한 것을 대조군으로, 효소와 桔梗解毒湯를 가하여 총 반응액을 20µl되게 한 것을 실험군으로 하여 활성을 측정했다. 전기영동을 실시하여 사진 촬영한 결과 DNA만을 처리한 대조군은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었다. 이에 비해 桔梗解毒湯 투여군은 농도의존적으로 topo-I의 활성을 억제하였다(Fig. II).

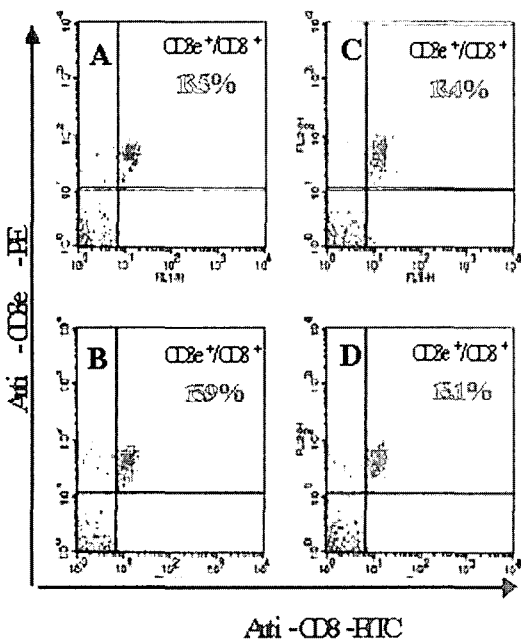


Fig. 1. Effects of *Gilgyunghaedok-tang*(GHT) on the expression of CD3e/CD8 in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) of mouse. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD3e-PE versus CD8-FITC. BALB/c mice were normal control(A), GHT 1 µg/ml(B), GHT 10 µg/ml(C), GHT 100 µg/ml(D)treatment group were stained with CD3e-PE/CD8-FITC.

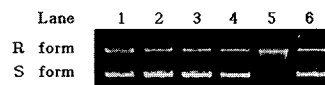


Fig. 2. Effect of *Gilgyunghaedok-tang* on the DNA topoisomerase I from calf thymus
Lane 1-4 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) 10, 50, 100, and 500 µg/ml of *Gilgyunghaedok-tang*
Lane 5 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit)
Lane 6 : DNA (0.5µg) only

6. S-180 암주에 대한 生存比

S-180 암세포에 대한 生存比를 측정한 결과, 平均 生存日이 대조군은 19.85(day), 桔梗解毒湯 투여군은 각각 24.57(day)로 나타나 123.7(%)의 T/C%를 나타내었다.

7. 數種 암주의 세포부착저지 효과

1) A549 암주에 대한 세포부착저지 효과

A549 암주에 대한 세포부착저지 효과를 측정한 결과, 대조군에서는 100.69±5.84(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 100.06±2.33, 102.09±3.56, 85.43±1.38(%)로 나타났다.

2) SK-OV-3 암주에 대한 세포부착저지 효과

SK-OV-3 암주에 대한 세포부착저지 효과를 측정

한 결과, 대조군에서는 100±0.22(%)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 1, 10, 100µg/ml 농도에서 각각 96.6±1.29, 92.7±0.16, 68.6±3.91(%)로 나타났다.

8. 폐암 전이 억제효과

1) 폐암주 형성 억제에 미치는 효과

폐암주 형성 억제에 미치는 효과를 측정한 결과, 대조군이 37.10±1.85(개)로 나타난 반면, 桔梗解毒湯 투여군은 23.16±3.26(개, P<0.01)로 나타나 유의성있는 폐암전이억제 효과를 나타냈다(Table IV).

2) 폐장 조직 변화

① 대조군

대조군에서는 전이된 암세포들이 모세혈관을 통과하여 폐포간 중격(interalveolar septum)기질에서 증식이 이루어지고, 성장하여 말단 세기관지(terminal bronchiole), 폐동맥(pulmonary artery) 및 폐정맥(pulmonary vein) 주변의 광범위한 폐실질 영역에서 종괴의 성장이 관찰되었다. 일부 종괴는 성장하여 폐동맥과 폐정맥들을 협착 시키기도 하며, 일부 혈관 내에서는 암세포 덩어리들도 관찰되었다. 폐포간 중격에서는 기질의 섬유화(fibrosis)현상과 폐포강내 초자성 물질의 저류도 관찰되고, 성장하는 암종괴 주변에는 소수의 림프구들도 관찰되었다.

② 桔梗解毒湯 투여군

桔梗解毒湯 투여군에서는 전이된 암세포들이 폐포간 중격에서의 증식이 감소하여 종괴의 성장은 대조군에 비해 감소하였다. 일부 성장된 종괴들은 말단 세기관지, 폐동맥, 혹은 폐정맥 주변의 일부에서 국소적으로 관찰되었다. 폐포간 기질의 섬유화와 초자성 물질

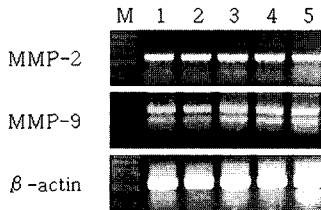


Fig. 3. Inhibition effect on MMP-2 and MMP-9 gene expression in the HT1080 cell line.

HT1080 is activated with RPMI1640 medium (lane1), 200 µg/ml GHT (lane2), 100µg/ml GHT (lane3), 50µg/ml GHT (lane4), 10µg/ml GHT (lane5) for 24hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 µl reaction volume containing with 3ug total RNA and oligo d(T). And 3 µl of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized β-actin cDNA product by RT-PCR was used in internal control. M ; 100bp DNA ladder marker.

Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

GHT : *Gilgyunghaedok-tang*

Table 4. Inhibitory Effect of *Gilgyunghaedok-tang* on Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-F10 Cells

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	10	37.10±1.85 ^{a)}
GHT	10	23.16±3.26 ^{**}

a) : Mean±Standard Error

Control : Saline treated group

GHT : 5.73mg/20g/day of *Gilgyunghaedok-tang* treated group

** : Statistically significant value compared with control data

(** : P<0.01)

의 저류도 소수 관찰되나 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 또한 성장하는 종괴주변과 폐 실질조직 주변에서는 많은 림프구의 출현이 특징적으로 관찰되었다.

9. 혈관 형성 저해효과(CAM assay)

혈관형성억제 효과에서는 수정란 10개중에서 桔梗解毒湯 투여군은 3개로 30%의 혈관형성 억제효과를 나타냈다.

10. MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현 효과

MMP-2의 발현 양상 분석 결과, 대조군(line 1)의 Ht 값은 187로 나타났으며, 桔梗解毒湯 투여군(line 2, 3, 4, 5)은 200, 100, 50, 10 μ g/ml의 농도에서 각각 190, 189, 189, 190으로 억제 효과는 나타나지 않았다. MMP-9의 발현 양상 분석 결과, 대조군(line 1)의 Ht 값은 162로 나타났으며, 桔梗解毒湯 투여군(line 2, 3, 4, 5)은 200, 100, 50, 10 μ g/ml의 농도에서 각각 162, 161, 173, 169로 억제 효과는 나타나지 않았다(Fig III).

고 찰

암의 전이는 주로 림프성, 혈행성, 파종성의 세가지 방식으로 이루어지는데, 림프관은 혈관과 연결되어 있기 때문에 암종과 육종은 주로 혈관을 통해서 전이된다고 할 수 있다. 파종성 전이는 암이 복강이나 흉막강 같은 체내의 자연적인 공간 부위를 관통하였을 때 일어나며 복강내 장기에서 주로 위장관이나 간장 특히 난소에서 번번히 관찰된다¹³⁾.

혈행성 전이 과정은 암세포의 세포외기질(extracellular matrix: ECM) 분해와 이동, 혈관내 이동, 암세포가 ECM을 분해하기 위해서는 암세포간의 부착이 느슨해져서 유동성이 증가한후, 암세포가 ECM에 부착되고, ECM을 분해하고 관통하여 이동해야 한다¹⁴⁾. 이처럼 ECM의 분해는 암 전이의 공통적인 기전이므로 암세포의 ECM 분해를 억제하는 것이 암의 전이를 억제하는 이상적인 방법이 될 수 있다.

또한 서로 분리된 종양세포가 기저막과 세포외기질을 통과하기 위해서 효소적 분해과정이 필요한데,

암세포는 자체적으로 단백분해효소를 분비하거나 섬유모세포나 대식세포와 같은 숙주의 세포에서 단백분해효소를 분비하도록 유도한다¹⁵⁾. 단백 분해효소 중 matrix metalloproteinase(MMP)는 16가지 정도의 다른 유형이 존재하는데 그 중 하나인 MMP-2는 상피세포와 혈관의 기저막의 주된 성분인 제4형 콜라겐을 선택적으로 분해하는 효소이다. MMP는 잠재형으로 분비되어 세포의 활성화 과정을 필요로 하며, 활성화된 MMP는 단백분해 억제제와 복합체를 형성함으로써 활성도가 조절된다¹⁶⁾.

T 림프구중 cytotoxic T 림프구는 암세포 파괴에 관여하는 것으로 자연살해세포에 비하여 한정된 목표만을 공격하여 다른 물질에는 살해능력이 매우 약하거나 없으나, MHC 항체로 인지된 목표물에 대해서는 자연살해세포보다 100배 이상의 살해능력이 있음이 알려져 있다¹⁷⁾. 1983년 이후 IL-2의 대량생산으로 면역치료가 가능하여진 현재로서는 자연살해세포 및 cytotoxic T 림프구의 조작에 따른 암세포의 역동적인 변화와 숙주면역기능의 변화를 규명하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다¹⁸⁾.

폐암을 한의학의 병증과 비교하여 보면, 그 발병과정 및 증상면에서 肺積·肺疽·肺痿·肺癰·痰癥 등의 병증과 유사하다¹⁹⁾. 특히 痰癥은 胸膈内の 종양(心肺의 종양)과 유사하고, 肺癰證 중 咳則胸中隱隱痛·咳唾膿血 등의 症狀²⁰⁾과 肺疽證 중에 重症인 四肢微腫·咳唾膿血·腥臭濁沫·胸中隱隱痛 등의 증상^{21,22)}도 폐암의 증상과 유사하다고 볼 수 있다. 폐암의 발생기전은 瘀熱內結·痰濕鬱肺·肺熱陰虛·氣滯氣阻 등 병리변화의 상호작용에 의해 시일이 지나면서 점점 암류가 형성된다²³⁾.

桔梗解毒湯은 魚腥草 瓦松 8g 桔梗 金銀花 蒲公英 貝母 麥門冬 4g 前胡 柴胡 黃芩 甘草 2g 으로 이루어진 처방으로 폐암치료를 위하여 경희대학교 한의과대학 폐계내과에서 창방하였다.

구성약물의 항암작용에 대한 연구로는 瓦松에 대하여 李²⁴⁾는 瓦松藥鍼으로, 黃²⁵⁾은 瓦松과 十全大補湯加 瓦松의 抽出物로 항암효과와 면역효과를 보고하였다.

金銀花에 대하여 한²⁶⁾과 김²⁶⁾은 金銀花 ethyl acetate

분획 물질에서 항암활성물질이 많이 함유된 것을 실험적으로 확인하였고, 麥門冬에 대하여 백²⁷⁾은 麥門冬 스테로이드 사포닌의 암세포성장억제활성을 보고하였다. 魚腥草에 관하여 林이 魚腥草藥鍼에 의한 항암효과를, 鄭^(28,29)은 魚腥草藥鍼으로 방사선피폭에 의한 면역기능 저하에 미치는 영향과 Melanoma B16에 의한 피부암에 대한 효능을, 吉은 魚腥草의 면역기능에 미치는 영향을 보고하였다.

이처럼 桔梗解毒湯의 처방구성은 消瘦癆와 惡瘡을 치료하는 瓦松과 清熱解毒작용을 가진 魚腥草, 金銀花, 蒲公英, 前胡, 柴胡, 黃芩과 補肺陰 潤燥化痰하는 貝母, 麥門冬, 그리고 祛痰排膿하는 桔梗과 補脾解毒하는 甘草로 이루어져, 폐암의 치료와 더불어 慢性 經過에서 나타나는 肺陰虛와 脾氣虛를 補해주는 작용을 가진 약물로 구성된 桔梗解毒湯은 실험적으로도 항암효과가 있을 것으로 사려된다.

따라서 桔梗解毒湯의 면역 및 항암 항전이 효과를 검색하고자 정상 fibroblast cells에 대한 세포독성효과 및 BALB/C 생쥐의 脾臟세포에서 유세포 분석, 수종의 암세포에 대한 세포독성효과, DNA topoisomerase I 활성억제효과, 수종 암종에 대한 부착저지효과, sarcoma 180에 대한 生存比, 폐암전이억제효과 및 조직변화, 혈관형성억제효과, MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현에 미치는 효과를 관찰하였다. 생쥐의 정상 lung fibroblast cells에 대한 세포독성 작용은 미약하였다. 임파구의 증식 반응에 미치는 효과를 살펴보면 5 μ g/ml의 이상의 농도에서, 陰性대조군에 비해서만 유의성있는 임파구 증식효과를 나타내었다.

桔梗解毒湯에서 세포독성효과는 약하였고, 면역기능을 담당하는 림프구를 증식하는 효과는 陽性 대조군에 비하여 효과가 떨어지지만 유의성 있는 림프구 증식 효과가 인정되어 桔梗解毒湯의 효능이 주로 면역반응시 인체의 면역기능을 증강시키는 작용에 있다는 것으로 생각할 수 있다.

BALB/C 생쥐의 脾臟세포에서 유세포 분석을 살펴보면 脾臟세포 중 CD4의 효과에서 활성유세포(% positive cell)는 桔梗解毒湯 투여군에서 정상군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으나, CD8의 효과

에서 활성유세포(% positive cell)는 桔梗解毒湯 투여군에서 10 μ g/ml과 100 μ g/ml 농도에서 증가하였다. 脾臟세포 중 B220의 효과에서 활성유세포(% positive cell)는 桔梗解毒湯 투여군에서 1 μ g/ml의 농도에서만 증가하였다.

B220의 발현은 apoptosis의 과정에서 중요한 역할은 하며, apoptosis 과정 동안에는 B220의 발현이 thymocytes 의 표면에서 증가한다고 하였다³⁰⁾.

이처럼 桔梗解毒湯이 세포매개반응과 관련된 T 림프구와 apoptosis 와 관련된 B220 의 활성유세포를 증가시키는 효과는 인체의 암세포를 파괴하는 면역반응을 활성화시키고, 비정상적인 세포의 生存을 차단하는 세포사멸을 촉진함으로써 종양세포의 출현을 억제할 수 있는 효능을 가진 것으로 생각된다.

數種 암주에 대한 세포독성 측정은 약물의 in vitro 항암활성도를 측정하기 위하여 개발된 SRB法을 사용하여 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, MCF-7 암주들의 세포독성을 측정하였는데 농도의존적으로 세포성장을 억제하였으나 30% 이상 세포성장을 억제하는 유의성은 없었지만 농도의존적으로 세포독성 효과를 보였다.

DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 supercoiling state를 조절하는 효소로서 DNA에서 일어나는 복제, 전사, 재조합에 지대한 영향을 미친다. 즉 DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 여러 기능에 필수적이고, DNA의 supercoiling state를 조절함으로써 복제, 전사 등의 initiation의 효율성에 영향을 주게되므로, 이물질에 대한 억제제는 항생, 항암제 개발의 목표가 되고 있다^{31,32)}.

桔梗解毒湯을 이용한 topoisomerase I assay에서 DNA만 처리한 실험군에서는 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topoisomerase I을 처리한 대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었는데 桔梗解毒湯으로 처리한 실험군은 10 μ g/ml 농도부터 농도依存的으로 topoisomerase I의 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 桔梗解毒湯이 topoisomerase I의 활성 억제효과를 통해 암세포의 복제 및 전사를 억제하는 기전으로 항암작용을 할 수 있을 것으로 생각된다.

S-180 암세포에 대한 생존비를 측정 한 결과, 평균 생존일이 대조군은 19.85 일 이었으나, 桔梗解毒湯 투여군은 24.57 일로 123.7(%)의 T/C%를 나타내어 생명연장효과를 볼 수 있었다.

이는 암세포가 이식된 동물에 대한 桔梗解毒湯의 생명연장효과는 桔梗解毒湯의 항암효능에 의한 결과라고 생각되며 여기에 대한 정확한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

암주의 세포부착저지 효과를 보기 위하여 A549 암주와 SK-OV-3 암주를 이용한 실험의 결과를 살펴보면 桔梗解毒湯 투여군은 대조군에 비하여 100 μ g/ml의 고농도에서만 유효한 효과를 보였다.

폐암 전이 억제효과에 대하여 桔梗解毒湯 투여군은 23.16 \pm 3.26개 (P<0.01)로 나타나 유의성있는 폐암전이억제 효과를 나타냈다.

폐장 조직의 변화를 살펴보면 桔梗解毒湯 투여군에서는 전이된 암세포들이 폐포간 중격에서의 증식이 감소하여 종괴의 성장은 대조군에 비해 감소하였고, 일부 성장된 종괴들은 말단 세기관지, 폐동맥, 혹은 폐정맥 주변의 일부에서 국소적으로 관찰되었다. 폐포간 기질의 섬유화와 초자성 물질의 저류도 소수 관찰되나 대조군에 비해 현저히 감소하였으며, 또한 성장하는 종괴주변과 폐 실질조직 주변에서는 많은 림프구의 출현이 특징적으로 관찰되었다.

CAM assay는 수정란의 鷄胚(chick embryo)의 융모뇨막(chorioallantoic membrane:CAM)을 이용한 융모뇨막분석법이다. CAM은 鷄胚의 발생 3-4일째 생성되는 胚外膜으로써 모세혈관과 다른 혈관들을 뚜렷이 구별할 수 있어서 혈관이동과 형태형성에 영향을 주는 인자를 연구하는데 적당한 모델로 사용될 수 있으나 시료의 삼투압, pH, 독성 등에 의해 CAM을 수축시키거나 염증을 일으키기도 한다. CAM assay를 이용한 혈관 형성 저해효과를 알아보면 수정란 10개중에서 桔梗解毒湯 투여군은 3개로 30%의 혈관형성 억제효과를 나타냈다.

桔梗解毒湯 투여군에서 30%의 혈관형성억제효과를 볼 수 있어, 桔梗解毒湯의 종양 성장 및 전이 억제효과는 이러한 혈관형성억제작용에 의한 결과로 볼 수 있다.

단백분해효소는 정상발육과정이나 창상의 치유, 뼈의 개형(remodeling), 그리고 배아의 착상과정과 같이 생명을 유지하기 위해서는 없어서는 안 될 물질이지만, 병리적 현상인 종양의 침윤이나 전이와 같은 과정에도 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다. MMP도 단백질분해효소중의 하나이며 수많은 종류가 알려져 있지만, 이 가운데 MMP-9와 MMP-2에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들은 변성된 교원질이나, gelatin, 그리고 기저막의 주성분인 제 4형 교원질에 주로 작용함으로써, 특히 종양세포의 침윤과 전이에 중요한 역할을 한다³⁴.

침습하고 있는 종양의 가장자리에는 단백질분해효소와 단백질분해 억제제의 균형이 깨져 단백질분해효소의 활성이 증가되어 있다. 대장암종, 피부암종, 폐암종을 비롯한 여러암종에서 MMP의 발현율이 높은 경우 종양의 전이와 림프절 전이율이 높고, 예후가 좋지 않다는 보고들이 있다^{34,35,36}.

桔梗解毒湯의 MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현에 미치는 효과를 살펴보면, MMP-2와 MMP-9의 발현양상 분석 결과 桔梗解毒湯 투여군에서 억제 효과를 볼 수 없었다. 桔梗解毒湯은 단백질분해효소인 MMP-2 및 MMP-9와 관련된 종양세포의 침윤과 전이 과정에 영향을 주지 못했다.

桔梗解毒湯의 실험에서 S-180 암세포에 대한 生存比에서 生命年長효과와 폐암의 전이억제가 인정되어 桔梗解毒湯이 종양 특히 폐암에 대한 치료제로서의 가능성을 볼 수 있었다.

이러한 결과를 토대로 桔梗解毒湯의 항암효과에 대한 기전을 살펴보면 암세포에 대한 세포독성실험과 종양세포의 침윤과 전이 과정에 중요한 암세포 부착저지와 단백질분해효소인 MMP-2 및 MMP-9 유전자의 발현억제에서 유의한 변화가 없었다.

桔梗解毒湯은 혈관 형성 저해효과와 유전자의 복제 및 전사와 관련된 topoisomerase I의 활성억제효과가 인정되었다. 또한 면역기능과 관련되어 림프구 증식효과와 종양세포파괴 및 억제와 apoptosis와 관련된 CD8 T 세포와 B220 세포의 증가효과가 인정되었다. 이상의 실험결과로 桔梗解毒湯의 항암효과는

주로 면역기능의 항진과 혈관형성 억제 및 암세포의 복제 및 전사를 억제하는 기전으로 항암작용을 할 수 있을 것으로 생각된다.

실험을 통하여 桔梗解毒湯의 항암 및 항전이효과가 나타나 암 치료에 대한 활용 가능성을 확인할 수 있었지만, 향후 그 기전과 관련된 심도있는 연구의 필요성이 있다고 생각된다.

결론

桔梗解毒湯의 면역, 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 입증하고자 정상 lung fibroblast cells과 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, MCF-7 등의 암세포에 대한 세포독성, 유세포 분석에 의한 면역조절작용, DNA topoisomerase I 활성억제, A549와 SK-OV-3 암주에 대한 부착저지, sarcoma 180에 대한 生存比, 폐암전이 억제 및 조직변화, 혈관형성억제 및 MMP-2 와 MMP-9 유전자 발현에 미치는 효과를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다

1. 桔梗解毒湯은 생쥐의 정상 lung fibroblast cells에 대해 세포독성을 나타내지 않았다.

2. 桔梗解毒湯은 농도의존적으로 유의성있는 임파구 증식효과를 나타냈다.

3. 桔梗解毒湯은脾臟세포 유세포 분석중 CD4에서는 유의한 변화가 없었으나, CD8 에서는 증가하는 경향을, B220에서는 1 μ g/ml 저농도에서만 증가를 보였다.

4. 桔梗解毒湯은 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, MCF-7 암주들에 대해 유의한 세포독성은 없었다.

5. 桔梗解毒湯은 10 μ g/ml 부터 농도의존적으로 topoisomerase-I의 활성을 억제함을 볼 수 있었다.

6. 桔梗解毒湯의 S-180 암세포에 대한 生存比는 대조군에 비해 123.7%로 나타났다.

7. 桔梗解毒湯은 A549 암주와 SK-OV-3 암주에 대한 세포부착저지 효과는 100 μ g/ml 농도에서만 유의한 효과를 보였다.

8. 桔梗解毒湯은 유의성 있는 폐암전이 억제효과를 보였다.

9. 桔梗解毒湯은 폐장 조직에서 종괴의 성장과 폐포간 기질의 섬유화와 초자성 물질도 현저히 감소시켰고, 종괴주변과 폐 실질조직 주변에서 많은 림프구의 출현을 유도함이 관찰되었다.

10. 桔梗解毒湯은 CAM assay에서 30%의 혈관형성 억제효과를 보였다.

11. 桔梗解毒湯은 MMP-2 및 MMP-9의 유전자 발현을 유의하게 억제하지 못하였다.

참고문헌

1. Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix:Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 1986;46:1-7.
2. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expresses on the surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994;370:61-65.
3. 김용태, 전영수, 김정효, 김성훈. 加味金匱腎氣丸의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구. 대한한방중앙학회지. 1999;5(1):19-32.
4. 裴文庸, 姜仁哲, 金聖勳. 四味軟堅湯加味方이 항암 및 항전이 효과에 미치는 影響. 대한한방중앙학회지. 1999;5(1):33-42.
5. 이진화, 심범상, 안규석, 최승훈. 血府逐瘀湯이 암전이 억제에 미치는 影響. 대한한방중앙학회지. 1999;5(1):61-75.
6. 李周姬, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 桔梗湯과 桔梗湯加味方이 S-180에 대한 항암효과 및 면역反應에 關한 실험의 연구. 경희한의대논문집(50주년). 1998;21(1): 225-250.
7. 차용석, 정희재, 정승기, 이형구. 百合固金湯 및 百合固金湯加味方の Sarcoma-180에 대한 항암효과와 면역반응에 관한 연구. 경희의학. 1999;15(4):420-435.
8. Champoux J.J. In DNA Topology and its Biological Effects. 1990:217-242.
9. Hellmann K, Carter SK. Fundamentals of cancer chemotherapy. New York:McGraw-Hill Book Company. 1987:132-140.

10. Lin Yan et, al. Inhibition of cell attachment by selenite. *Cancer Research*. 1992;52:5803-5807.
11. 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 Research*. 1986;46:5215- 5222.
12. Robert, A. Wanda, A Igor, P. Assays for angiogenesis. *Pharmac.Ther*. 1991;51:1-11.
13. 서울대학교 의과대학 편. 개정판 증양학. 서울:서울대학교 출판부. 1992:1-2, 19-22.
14. Liotta LA. Cancer metastasis and angiogenesis; An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991;64:327.
15. Cotran R.S, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia:WB saunders. 1999:303.
16. Chambers A.F, Matrisian L.M. Changing view of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1260-1270.
17. Reynolds J.V, Thom A.K, Zhang S.M, Ziegler M.M, Naji A, Daly J.M. Arginine, protein malnutrition and cancer. *J Surg Res*. 1988;45:513.
18. 최승훈. 자연살해세포 조작에 따른 전이암의 전이양상 변화와 숙주면역기능에 미치는 영향. *대한암학회지*. 1996;28(2):368-374.
19. 陳熠. 世界傳統醫學腫瘤學. 北京:科學出版社. 1999:157.
20. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:一中社. 1988:309-315.
21. 王肯堂. 六科準繩. 서울:翰成社. 1982:182-189.
22. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:大星文化社. 1983:548.
23. 黃文東. 實用中醫內科學. 서울:一中社. 1988:621-624.
24. 이정화. 瓦松藥鍼의 항암효과 및 면역효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지*. 1999;16(4):175-212.
25. 황규동, 류봉하, 박동원, 류기원. 십전대보탕 외송 및 십전대보탕가와송의 항암효과와 면역반응에 관한 연구. *대한한방중앙학회지*. 1996;2(1):1-23.
26. 김경진, 한두석. 금은화의 가용성 Ethyl acetate 소분획의 인체 구강유상피암세포에 대한 항암효과. *원광치의학*. 1998;8(2):31-40.
27. 백남인, 조성지, 방면호, 이인자, 박창기, 김무성, 김금숙. 맥문동 스테로이드 사포닌의 항암활성. *한국농화학지*. 1998;41(5):390-394.
28. 鄭昇杞. 魚腥草藥鍼이 放射線 被曝에 의한 면역기능 저하에 미치는 影響. *대한한의학회지*. 1997;18(2):97-107.
29. 鄭昇杞. 魚腥草藥鍼이 Melanoma B16 피부암의 증식 억제효과와 Mononuclear cell subsets에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2000;21(3):453-460.
30. Oka S, Mori N, Matuyama S, Takamori T, Kubo K. Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology*. 2000;100:417-423.
31. Arun B, Frenkel E.P. Topoisomerase I inhibition with topotecan: pharmacologic and clinical issues. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(3):491-505.
32. Champoux J.J. DNA topoisomerases:structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:369-413.
33. 민수기, 김준미, 주영채, 조영업, 염범우. 유방의 침윤성 관암종에서 MMP-2 및 TIMP-2의 발현과 종양 경계부위의 성장양식, 림프절 전이 및 에스트로겐 수용체 사이의 연관성. *대한병리학회지*. 2000;34:366-373.
34. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase(gelatinase) in T1 adenocarcinoma of lung. *Pathol Int*. 1997;47:461-469.
35. Liabakk N.B, Talbot I, Smith R.A, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9(MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996;56:190-196.
36. Pyke C, Ralfkiar E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for M W 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancer by in situ hybridization. *Cancer Res*. 1992;52:1336-1341.