

# 黃芪와 Chlorambucil 併用이 P388D1 白血病 細胞 및 擔癌생쥐에 미치는 影響

전정희, 류기원, 김진성, 윤상협, 류봉하  
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

## Combined application of Astragali Radix and chlorambucil on anticancerous effect and host safety in Lukemia Cell(P388D1 cell) and its bearing mice

Jeong-hoi Jeon, Ki-Won Ryu, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Bong-Ha Ryu  
3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objective :** Anticancerous and host safety effects of the combination of Astragali Radix and chlorambucil are studied when it is applied to leukemia cell(P388D1 cell) related disease.

**Methods :** After 5 groups of mice are treated by respective procedures (HG, CHL, HG+CHL, etc), the quantitative analyses (cell proliferation assay, mutagenesis test, survival rate, weight shift observation, tissue and blood analyses, etc) are conducted.

**Results :** While sole injection of Astragali Radix extends the survival period and deter the liver and marrow function deterioration, combined injection (HG+CHL) shows more strong anticancerous effect than sole injection of Astragali Radix or Chlorambucil, and also does not cause any mutation on the normal cells and virulence on marrow and liver caused by leukemia.

**Conclusions :** The combined application of Astragali Radix and chlorambucil has more effective anticancerous and host safety effects than independent use of them.

**Key Words:** Astragali Radix, Chlorambucil, Anticancerous effect, host safety effects

### 1. 緒 論

白血病은 未成熟 骨髓細胞 및 淋巴系細胞의 異常 增殖과 白血病細胞의 組織浸潤을 特徵으로 하는 造血組織의 惡性腫瘍이다<sup>1,2</sup>. 白血病은 시기에 따라 急性白血病과 慢性白血病으로 나누어지고, 增殖된 細胞의 種類에 의해 骨髓性과 淋巴性으로 細分된다<sup>3,4</sup>.

현재까지 白血病의 治療에 있어 化學療法에 많이 依存하고 있는 실정이다. 그렇지만 化學療法の 正常細胞에 대한 副作用과 癌細胞의 抗癌耐性增加는 合併症 誘發과 癌의 再發에 관계하고 있다<sup>5,6</sup>. 이것을 막기 위해서 正常細胞에는 損傷을 주지 않고 癌細胞만을 선택적으로 攻擊하는 藥物이 필요하며, 韓藥과 抗癌劑의 併用이 고려되고 있는데, 最近에는 抗癌效果 增大나 免疫增進, 抗癌劑의 副作用抑制 등에 관한 研究<sup>7</sup>가 활발히 進行되고 있다.

韓醫學의 文獻에서 白血病의 名稱은 없지만, 熱勞, 急勞, 虛勞, 血症, 癩病, 積聚, 痰核 등의 범주에 屬한다고 볼 수 있다<sup>2,4</sup>.

· 접수 : 2005. 2. 21. · 채택 : 2005. 4. 20.  
· 교신저자 : 류기원, 서울특별시 동대문구 회기동 1  
경희의료원 부속한방병원 3내과  
(비계내과학교실)  
(Tel. 02-958-9140, Fax. 02-958-9136  
E-mail : dawoom@unitel.co.kr)

黃芪는 豆科에 屬한 多年生草本 및 同屬近緣植物의 根이다. 性味는 溫甘하며 入肺脾經하며, 神農本草經에 “甘微溫 主癰疽 久敗瘡 排膿止痛 大風癩疾 五痔鼠瘻 補虛 小兒百病”하는 上品으로 最初 언급된 이래 補氣升陽, 固表止汗, 托毒排膿, 利水消腫의 效能을 지닌 대표적인 補氣藥의 하나로 認用되고 있다<sup>8-10</sup>. 특히 黃芪의 補氣效能은 免疫機能과 聯關하여 說明되는데<sup>7,11-13</sup>, 實驗的으로는 各種 癌治療에 使用되는 放射線療法와 化學療法의 細胞毒성을 減少내지 緩和시키는 效果가 있다<sup>14</sup>. 그러나 黃芪 및 抗癌劑의 병행투여에 관한 抗癌效能 및 安全性 研究는 미미한 실정이다.

이에 著者는 P388D1형 白血病細胞柱 와 白血病細胞를 注入한 생쥐를 대상으로 하여 黃芪와 白血病 治療劑로 利用되는 chlorambucil의 單獨投與 및 複合投與를 施行하여 첫째; 抗癌效能實驗으로 白血病細胞 增殖抑制, 白血病細胞 擔癌생쥐의 生存率과 生存期間 및 體重變化를, 둘째; 安全性 實驗으로 Ames test를 통한 突然變異, 造血機能, 肝機能, 肝組織 損傷에 미치는 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

動物은 生후 8週된 BDF1 수컷 생쥐 (중양실험동물(주), 한국)를 購入하여 利用하였고, 各 群별로 6마리씩 5群으로 총 30마리를 利用하였다. 無菌飼育室의 溫度와 濕度는 一定하게 ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $50 \pm 10\%$ ) 維持하였으며, 照明은 12時間 단위로 밝기와 어둠이 반복되도록 하였고 (08:00 ~ 20:00hr), 實驗動物用 飼料 (퓨리나 (주), Korea)와 蒸溜水는 충분히 공급하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 試料

實驗에 使用한 黃芪(學名; *Astragalus Membranaceus*, 生藥名; *Astragali Radix*; AR)는 順天堂藥廠股份有限

公司 (SUNTEN Pharmaceutical Co., LTD., Taiwan)에서 購入하여 使用하였다. 검액을 위한 표품은 黃芪 1g을 1ml의 蒸溜水에 녹인 후 10분간 15,000rpm에서 遠心分離하고 상층액을 다른 튜브에 분주하여 0.2 $\mu\text{m}$ 의 syringe filter (Millipore, U.S.A.)로 濾過하여 준비하였다. Chlorambucil (CHL)은 시그마(주) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)에서 購入하였으며, 黃芪와 chlorambucil은 各 實驗 目的에 맞게 恰 적정량을 稀釋하여 사용하였다.

#### 3) 白血病細胞柱 (P388D1 cell)의 培養

白血病 細胞柱인 P388D1 cell line은 韓國細胞柱銀行 (KCLB, Korea)에서 분양받아 實驗에 利用하였으며, 培養 flask에 10% horse serum (Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)과 5% fetal bovine serum (Sigma, U.S.A.) 및 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)이 含有된 RPMI 1640 培地 (Invitrogen Life Technologies, U.S.A.)를 使用하여, 濕度가 維持되는  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator (Nuair, U.S.A.)에서 培養하였으며, 계대배양 횟수는 10회를 넘기지 않도록 하였다.

## 2. 方法

#### 1) 細胞增殖 測定檢査 (Cell proliferation assay)

AR, CHL 및 複合投與가 癌細胞增殖에 미치는 影響을 測定하기 위해 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, U.S.A.)를 使用하여 제조사 protocol 대로 細胞增殖 測定檢査를 수행하되 實驗 3과 같은 방법으로 培養된 P388D1 細胞를  $2 \times 10^5$  cells/ml의 濃度로 100 $\mu\text{l}$ 씩 flat bottomed 96-well plate (Corning, U.S.A.)에 분주하여  $37^\circ\text{C}$ 가 유지된 5%  $\text{CO}_2$  incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 24시간 동안 培養하였다. 培養 plate에 AR와 CHL을 각각 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1mg/ml의 濃度로, AR+CHL의 경우 상가농도를 1:1로 혼합하여 100 $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ 가 유지된 5%  $\text{CO}_2$  incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 24시간 동안 培養한 후 제조사로부터 제공된 20 $\mu\text{l}$ 의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-

phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 용액을 넣고 37°C가 유지된 5% CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, U.S.A.)에서 1시간 동안 반응하였으며, microplate reader (Molecular Device, U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 UV 흡광도를測定하였다.

## 2) 突然變異 檢査 (Ames test)

AR, CHL 및 複合投與의 安全性 檢査를 위해 시행된 Ames test에 쓰인 菌株은 salmonella typhimurium TA98 (KCTC 2053)으로서 韓國生命工學研究所에서 분양받아 實驗에 利用하였다. 實驗에 利用한 培地는 glucose-minimal salts agar로서 0.7% dipotassium phosphate (덕산케미컬, 한국), 0.2% monopotassium phosphate (Shinyo Pure Chemical, Japan), 0.05% sodium citrate (덕산케미컬, 한국), 0.01% magnesium sulfate (덕산케미컬, 한국), 0.1% ammonium sulfate (Shimakyu Pure Chemical, Japan), 1.5% agar (DIFCO, U.S.A.)로 제조하였다. 여기에 0.05 mM histidine 및 0.05 mM biotin (이상 Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 添加하여 soft agar를 제조하고 salmonella typhimurium 및 mutagen을 添加한 후 黃芪 10, 50, 100mg/ml을 濃度별로 투여, 37°C에서 48時間 동안 incubation하였고, mutagen으로는 각각 10mg/ml 농도의 2-aminoanthracene (2AA), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), ethidium bromide (Et-Br, 이상 Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 利用하였다.

## 3) *in vivo* 實驗 群의 分類

黃芪와 CHL 複合投與群 (AR+CHL group, n=6)은 實驗 생쥐에 P388D1 cell을  $2 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ l/day 濃度로 10일간 腹腔注射하였으며, 群내 모든 생쥐에서 腹部腫塊가 肉眼으로 確認된 11일째부터 黃芪를 1mg/ml 濃度로 500 $\mu$ l씩 經口投與함과 동시에 CHL을 0.1mg/ml 濃度로 100 $\mu$ l씩 實驗 종료시까지 腹腔注射하였다. CHL 單獨投與群 (CHL group, n=6)은 AR+CHL 群과 같은 濃度로 P388D1 cell을 10일간 매일 腹腔注射하고 群내 모든 생쥐에서 腹部腫塊를 肉眼으로 확인한 11일째부터 蒸溜水 500 $\mu$ l를 經口投與함과 동시에 CHL을 0.1mg/ml 濃度로 100 $\mu$ l씩 實驗 종료시까지 腹腔注射하였다.

黃芪 單獨投與群 (AR group, n=6)은 역시 같은 濃度의 P388D1 cell을 10일간 매일 腹腔注射하고 群내 모든 생쥐에서 腹部腫塊가 육안으로 확인된 11일째부터 黃芪를 1mg/ml 濃度로 500 $\mu$ l씩 經口投與함과 동시에 phosphate-buffered saline (PBS) 100 $\mu$ l를 實驗 종료시까지 腹腔投與하였다. Control 群 (C group, n=6)은 같은 濃度의 P388D1 cell을 같은 기간 동안 腹腔注射하고 11일째부터 蒸溜水 500 $\mu$ l를 經口投與함과 동시에 PBS 100 $\mu$ l를 實驗 종료시까지 腹腔注射하였다.

Normal 群 (N group, n=6)은 아무것도 처치하지 않고 자유로이 實驗 종료시까지 물과 먹이를 공급하였다.

## 4) 體重 觀察

實驗 始作부터 實驗終了인 21일째까지의 體重을 관찰하였으며, 實驗期間 동안 매일 같은 時間에 各 群 생쥐의 體重을 秤重機 (Scaltec instruments GmbH, Germany)로 測定하였다.

## 5) 肝의 組織學的 檢査

實驗終了直後 생쥐를 희생하여 肝을 적출하여 무게를 測定하고 -70°C deep freezer (Nuair, U.S.A.)에서 急速冷凍시켜 보관한 후 cryotome HM 505E (Microm, Germany)를 利用하여 5 $\mu$ m 薄片을 제작, hematoxylin-eosin 염색방법을 利用하여 染色한 뒤 顯微鏡으로 組織檢査를 施行하였다.

Hematoxylin-eosin 染色은 各 群에서 추출하여 제작된 肝組織薄片을 xylene (덕산케미컬, 한국)으로 水洗한 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol (덕산케미컬, 한국)로 含水過程을 거쳐서 蒸溜水로 씻어내고 hematoxylin (Sigma-Aldrich, U.S.A.)에 4분간 染色한 후에 다시 수돗물로 10분간 水洗하고 eosin (Sigma-Aldrich, U.S.A.)에 2분 30초간 染色 후 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethanol에서 3분간, 다시 1:1로 혼합된 ethanol-xylene을 각각 1분씩 그리고 xylene 2회를 3분씩 한 후 canada balsam (Junsei, Japan)으로 mounting하여 光學顯微鏡 (BX-51, Olympus Optical Co., LTD., Japan)으로 觀察하였다. 관찰시 Nakamura 등<sup>18</sup>의 관찰방법을 적용하여

마리당 portal vein 10개 부위, 각 군별 3마리의 간 조직을 검색하였으며, 염색된 핵이 위축되고 일그러져있는 사멸 간세포 및 간실질 내부로 침습하여 portal vein 부위에 자리잡고 있는 광범위한 백혈병 전이세포 군집의 존재여부를 확인하고자 하였다. 상기 대상세포가 군내에 존재하지 않을 경우 absent (-), 3개 부위 이하인 경우 mild (+), 10개 부위 이하인 경우 moderate (++), 그 이상인 경우 severe로 구분하여 표기하였다.

6) 血液學的 檢査

實驗終了 후 血液을 採取한 뒤, 혈청 aspartate amino transferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) level은 酵素法에 의하여 測定하였으며, Bun, Creatinine lever, RBC level 및 WBC level은 財團 法人 서울의과학연구소 (서울, 한국)에 依頼하여 測定하였다.

7) 統計處理

데이터는 GraphPad PRISM® 4.0 (GraphPad Software Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계처리하였다. Ames test는 돌연변이원성 대조군의 군집수를 평균하여 이것에 대한 대상약물의 군집 수 비 (%)를 계산하여 평가하였다.

담암생쥐 생존율은 Kaplan-Meier survival analysis를 적용하였으며, 동시에 생존기간 증가율 (ILS, increase of life-span)을 구하여 one-way ANOVA를 실시, 유의수준이 0.05 이하인 경우 사후검정으로 LSD (least significant difference)를 시행하여 최종 생존율을 비교하였다.

체중변화는 repeated measures of ANOVA를 시행하였다. 이 외의 실험에는 one-way ANOVA를 실

시하여 유의수준이 0.05 이하인 경우에 post hoc test로서 Newman-keul's multiple comparison test를 시행하여 각 군간 비교를 수행하였다. 모든 통계는 양측검정을 하였고 유의수준은 P value<0.05로 하였다.

III. 成績

1. 抗癌效果

1) 白血病細胞 增殖抑制

白血病細胞 (P388D1 cell)에 黃芪 (AR)를 濃度別로 投與하고 細胞生存率을 確認한 結果를 나타내었다. 검액에 대한 細胞生存 (cell viability)은 stress 없이 培養한 白血病細胞 生存率을 100으로 하여 이것에 대한 比率(%)로 표시하였으며 生存率을 50%로 만드는 藥物濃度를 log scale(LOGIC50)로 전환시켜서 sigmoidal dose-response graph를 그렸다. AR 單獨投與는 0.0001~1mg/ml 농도구간에서 P388D1 細胞生存率을 50% 이하로 억제하는 농도를 찾을 수 없었으며, AR+CHL 群의 LOGIC<sub>50</sub>는 -1.912, CHL 群의 LOGIC<sub>50</sub>는 -1.886으로 산출되었고, AR 群을 제외한 모든 群에서 비선형회귀분석결과 R<sup>2</sup> 값이 모두 0.99를 넘어서 LOGIC<sub>50</sub>가 적정함이 인정되었다(Table 1).

2) 擔癌생쥐의 生存率 및 生存期間

백혈병세포 주입에 의한 육안적 종괴형성 확인 후 각 군의 약물처치가 생존율에 미치는 영향을 살펴보기 위해 실험개시 후 10일간 白血病細胞 (P388D1 cell)를 腹腔에 注入한 후 AR, CHL 및 복합투여처치를 진행하고 실험시작 21일째까지의 생쥐 生存

Table 1. LOGIC<sub>50</sub> and R<sup>2</sup> values for each group

| Group  | LOGIC <sub>50</sub> | R <sup>2</sup> |
|--------|---------------------|----------------|
| CHL    | -1.886              | 0.9983         |
| AR     | -2.972 <sup>a</sup> | 0.09411        |
| AR+CHL | -1.912              | 0.9967         |

a) No significant LOGIC<sub>50</sub> due to the low R<sup>2</sup> value; AR, Astragali Radix group; CHL, chlorambucil group; AR+CHL, Astragali Radix combined with chlorambucil group.

률을 측정하였다. 各 群의 생쥐들은 白血病細胞 注入 후 16일째 되는 날부터 死亡하기 始作하였으며, median survival time의 경우 C군이 20일, AR군이 19.5일, CHL 군이 20.5일, N군과 AR+CHL군의 경우 undefined 값이 산출되었으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나, 최종생존을 비교를 위해 實驗終了 時點인 21일까지의 C군의 생존시간 평균에 대한 ILS (increase of life-span)를 검토한 결과, 모든 군의 비교에서는 차이를 나타내지 않았으나 N군, C군 및 AR+CHL군의 비교시 C군은 N군에 비하여 유의한 감소를 보였고( $P<0.05$ ), 다시 AR+CHL군은 C군에 비하여 유의한 증가를 확인할 수 있었다( $P<0.05$ )(Table 2.).

### 3) 實驗終了時의 擔癌생쥐 體重

腫瘍成長에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 實驗終了時의 體重을 觀察하였다. 그 結果, N군 28.01 $\pm$ 2.94g, C군 30.50 $\pm$ 2.60g, AR군 30.55 $\pm$ 6.79g, CHL군 35.71 $\pm$ 12.42g, AR+CHL군 32.69 $\pm$ 2.68g 으로서

CHL군이 N군에 비해 統計적으로 有意性( $P<0.05$ ) 있는 體重增加를 보인 이외에 다른 有意한 差異는 發見할 수 없었다.

## 2. 安全性

### 1) 突然變異

正常細胞에 mutagen으로 作用하여 突然變異를 誘發하는 毒性을 갖는지를 確認하기 위해 Salmonella typhimurium TA98을 利用하여 Ames test를 施行하였다. 實驗 전 screening을 통해 實驗군인 AR 및 CHL을 돌연변이원성 대조군인 4NQO, 2AA 및 Et-Br과 동일 농도로 처리할 경우 實驗군의 菌집수가 극히 적거나 아예 나타나지 않아 비교하기 어렵다는 것을 확인, 돌연변이원성 대조군은 1mg/ml의 농도로, 實驗군은 50mg/ml 농도로 처리하였다. 그 결과, AR 및 CHL은 상기 돌연변이원성 대조군 평균에 비하여 각각 11.09%, 0.7%의 菌집을 형성하였다 (Table 3.).

Table 2. Increase of life-span analysis

| Group  | Life-span (days $\pm$ S.D.)   | ILS (%) |
|--------|-------------------------------|---------|
| N      | 21.00 $\pm$ 0.00              | —       |
| C      | 18.67 $\pm$ 2.73 <sup>#</sup> | —       |
| AR     | 18.17 $\pm$ 2.71              | -2.68   |
| CHL    | 19.17 $\pm$ 2.40              | 2.68    |
| AR+CHL | 20.83 $\pm$ 0.41 <sup>*</sup> | 11.61   |

#, significantly different from normal group ( $P<0.05$ );

\*, significantly different from control group ( $P<0.05$ ). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by LSD; Data is mean  $\pm$ S.D. N, normal group; C, control group; AR, Astragali Radix group; CHL, chlorambucil group; AR+CHL, Astragali Radix combined with chlorambucil group.

Table 3. Colonies in Ames test with Salmonella typhimurium.

|                     | Administration <sup>a</sup> | Colonies (n) | Colony ratio (%) |
|---------------------|-----------------------------|--------------|------------------|
| Mutagenesis control | 4NQO                        | 587          | —                |
|                     | 2AA                         | 305          | —                |
|                     | Et-Br                       | 379          | —                |
| Experimental group  | CHL                         | 3            | 0.70             |
|                     | AR                          | 47           | 11.09            |

a) 4NQO, 2AA and Et-Br were administered with 1mg/ml concentration each; CHL and AR were administered with 50mg/ml concentration each for Ames test due to few colonies to count if in the same concentration with mutagenesis controls.

2) 造血機能

造血機能에 미치는 影響을 確認하기 위해 혈중 赤血球 數 및 白血球 數를 비교하였다. 혈중 赤血球 數에서 N群은  $9.37 \pm 1.25 (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , C群은  $5.40 \pm 1.25 (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , AR群은  $7.79 \pm 1.27 (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , CHL群은  $3.77 \pm 0.79 (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , AR+CHL군은  $5.47 \pm 1.42 (\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로서 10주령 BDF1 mouse의 혈중 赤血球 數 正常參考值인  $10.15 \pm 0.287 (\times 10^6/\mu\text{l})$ <sup>19</sup>에 비해 모든 群에서 減少하는 경향을 確認하였으며, N群에 比해서 C群, CHL群 및 AR+CHL群이 특히 有意性(각각  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ) 있게 減少하였다. AR群은 N群에 比해서 統計적으로 有意한 差異를 보이지 않은 채 正常參考值에 비해 微弱한 減少를 나타내었고, 가장 赤血球 數치가 낮았던 CHL 群에 比하여는 有意性( $P < 0.05$ ) 있게 增加하였다.

한편, 혈중 백혈구 수에서는 N군은  $1.87 \pm 0.55 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , C군은  $2.53 \pm 0.81 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , AR군은  $0.90 \pm 0.60 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , CHL군은  $1.73 \pm 0.31 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ , AR+CHL군은  $1.97 \pm 1.32 (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l})$ 로서 10주령 BDF1 mouse의 혈중 白血球 數 正常參考值인  $2.2 \pm 0.96 (\times 10^3/\mu\text{l})$ <sup>19</sup>에 대해 모든 群에서 차이를 보이지 않았으며, 각 群간 비교에서도 모두 統計的인 有意성은 없었다.

3) 肝機能

肝機能에 대한 영향을 確認하기 위해 血中 AST level 및 ALT level을 比較한 結果, 血中 AST level에서 N群은  $40.80 \pm 5.15 \text{ IU/L}$ , C群은  $679.33 \pm 36.69 \text{ IU/L}$ , AR群은  $732.67 \pm 91.43 \text{ IU/L}$ , CHL群은  $1349.67 \pm$

$778.51 \text{ IU/L}$ , AR+CHL群은  $532.67 \pm 251.79 \text{ IU/L}$ 로 나타나 10주령 BDF1 mouse의 正常參考值인  $49 \pm 12.0 \text{ IU/L}$ <sup>19</sup>에 비해 모든 群이 增加하는 경향을 나타내었고, 그 중 CHL群이 N群에 비해 有意性( $P < 0.01$ ) 있게 增加한 반면, 그 외 모든 群들은 모두 統計적으로 有意한 差異를 나타내지 않았다. 또한 血中 ALT level에서 N群은  $27.00 \pm 7.55 \text{ IU/L}$ , C群은  $38.33 \pm 22.94 \text{ IU/L}$ , AR群은  $64.00 \pm 15.52 \text{ IU/L}$ , CHL群은  $469.33 \pm 643.79 \text{ IU/L}$ , AR+CHL群은  $60.33 \pm 21.39 \text{ IU/L}$ 로서 10주령 BDF1 mouse의 正常參考值인  $26 \pm 7.1 \text{ IU/L}$ 에 비해 모든 群이 增加하는 경향을 나타내었으며, CHL 群이 N 群에 비해 有意性( $P < 0.01$ ) 있게 增加한 반면, 그 외 모든 群간 統計的 비교에서는 有意한 差異를 나타내지 않았다.

4) 肝 組織 損傷

肝 實質上 白血病細胞의 전이와 혈관주위 염증에 미치는 影響을 確認하기 위해 肝의 組織學的 檢査한 結果, C群은 廣範圍한 癌細胞의 肝實質 내 전이와 고빈도의 혈관주위의 염증상태가 確認되었고, AR群의 경우 癌細胞의 肝實質 내 전이가 저빈도로 確認되었고 그리고 血管의 一部에서 염증상태를 確認할 수 있었다. CHL群에서는 癌細胞의 肝 혈관 내 부로의 전이는 확인되지 않았으며, 血管 中心의 염증상태가 中等도로 확인되었다. AR+CHL群 역시 癌細胞의 간전이 존재하지 않았고, 血 管 中 心 的 염 증 状 態 또 한 中 等 度 的 빈 도 로 確 認 되 었 다 (Fig. 1.) (Table 4.).

5) 腎機能

腎機能에 미치는 影響을 確認하기 위해 BUN과

Table 4. Histological findings on liver

|        | Periportal lymphoma metastasis | Periportal inflammation |
|--------|--------------------------------|-------------------------|
| N      | -                              | -                       |
| C      | ++                             | +++                     |
| AR     | +                              | ++                      |
| CHL    | -                              | ++                      |
| AR+CHL | -                              | ++                      |

-, absent; +, mild (focal); ++, moderate (several foci); +++, severe (multifocal)

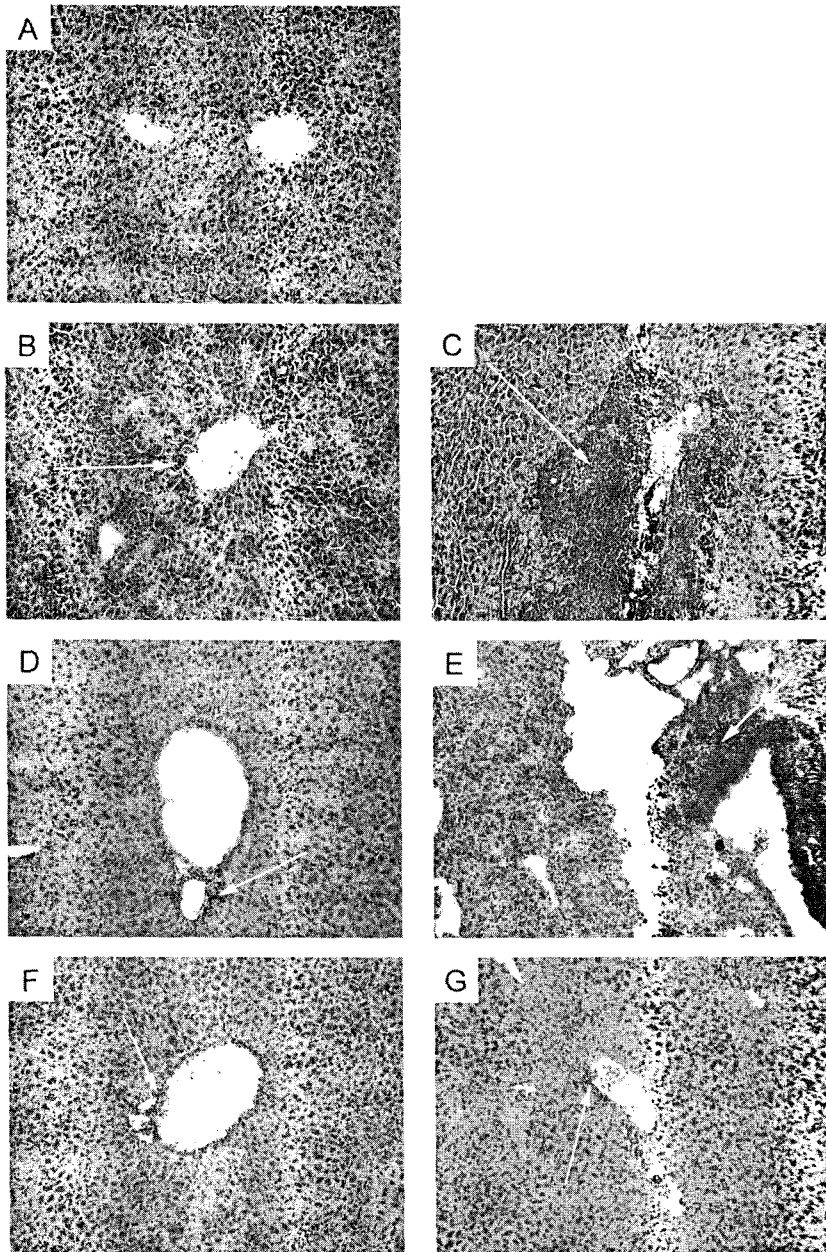


Fig. 1. Histological observation of liver dissected from survived mice.

White arrows indicate normal condition of periportal vein; A, normal liver; B, arrow indicates periportal inflammations in the liver of control group; C, arrow indicates P388D1 lymphoma in the liver of control group; D, periportal inflammations of AR group; E, P388D1 lymphoma of AR group; F, periportal inflammations of CHL group; G, periportal inflammations of AR+CHL group; AR, Astragali Radix group; CHL, chlorambucil group; AR+CHL, Astragali Radix combined with chlorambucil group.

creatinine level을 비교한 결과, BUN level에서 N  
群은  $23.20 \pm 1.00 \text{ mg/dL}$ , C群은  $32.30 \pm 0.78 \text{ mg/dL}$ , AR

群은  $47.77 \pm 8.40 \text{ mg/dL}$ , CHL群은  $32.70 \pm 1.20 \text{ mg/dL}$ ,  
AR+CHL群은  $32.93 \pm 4.21 \text{ mg/dL}$ 로서 N群을 제외한

모든 群이 10주령 BDF1 mouse의 正常參考值인  $25.8 \pm 1.89 \text{mg/dL}$ <sup>19</sup>에 비해 上乘하였다. AR群은 N群 및 C群과 比較하여 有意性 (각각  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) 있게 增加하였으며, CHL群 및 AR+CHL群은 C群과 比較하여 有意한 差異가 없었으나 AR群과 比較하여 有意하게 (각각  $P < 0.01$ ) 減少된 樣相을 確認하였다. 또한 creatinine level에서 N群은  $0.30 \pm 0.10 \text{mg/dL}$ , C群은  $0.50 \pm 0.10 \text{mg/dL}$ , AR群은  $0.47 \pm 0.06 \text{mg/dL}$ , CHL群은  $0.47 \pm 0.06 \text{mg/dL}$ , AR+CHL群은  $0.43 \pm 0.06 \text{mg/dL}$ 으로 모든 群에서 10주령 BDF1 mouse의 正常參考值인  $0.4 \pm 0.05 \text{mg/dL}$ <sup>19</sup>에 대해 미약한 증감이 있었으나 모든 群에서 통계적으로 有意한 變化를 觀察할 수 없었다.

#### IV. 考 察

白血病 (leukemia)은 白血球를 生産하는 組織인 骨髓 또는 淋巴系에서 發生한 癌細胞 즉 白血病細胞가 非正常的으로 增殖하여 모든 臟器에 浸潤하며 동시에 末梢血液 중에도 出現하는 病이다. 白血病은 기원에 따라 骨髓性과 淋巴性 두 가지로 分類된다<sup>6</sup>.

白血病的 症狀은 蒼白, 貧血, 疲勞, 無氣力, 呼吸困難, 心悸亢進, 感染에 의한 發熱, 各種出血, 體重減少, 淋巴節腫大, 肝腫大, 脾臟腫大, 骨痛, 關節痛 등으로 그 病情은 짧고 死亡率은 높다<sup>4</sup>.

白血病的 治療法으로는 化學療法을 위주로 放射線療法, 免疫療法 및 遺傳子療法 등을 使用하고 있으나, 化學療法은 化學藥劑의 毒性에 의한 正常細胞 損傷 誘發과 암세포의 抗癌耐性增加 등의 약점이 있다<sup>15</sup>. 이러한 이유로 韓方治療와 西洋治療의 結合治療에 대한 관심이 증대되면서 抗癌劑와 韓藥의 併用에 의한 抗癌效果 增大와 副作用 減少로 癌治療에 많은 進歩를 이루고 있다<sup>16-8</sup>.

韓醫學界의 最近 抗癌研究動向은 單一韓藥材와 複合製劑의 抗癌效果에 대한 實驗的 研究가 활발히 進行되고 있는데, 연구된 처방의 대부분은 扶正祛邪法에 속한 것이었다. 朴等<sup>19,20</sup>은 白血病 細胞柱에 대한 生藥抽出物의 細胞毒性作用을, 金等<sup>21,22</sup>은 伏

梁丸과 痞氣丸이 白血病에 미치는 抗癌效果를, 姜<sup>23</sup>은 息賁丸 및 痞氣丸이 白血病에 미치는 抗癌效果를, 李<sup>24</sup>는 八珍抗癌丹이 癌細胞에 對한 細胞毒性和 細胞枯死 誘導를 통한 白血病細胞 死滅效果에 대하여 報告하였다.

黃芪는 콩과에 屬하는 多年生 草本인 단너삼의 乾燥한 뿌리를 말하며 補益藥 중 補氣藥에 屬하는 藥物로서, 性味가 甘溫하고 脾, 肺經으로 들어가 補裨益氣하며, 陽氣를 升學시키고, 外로 肌表에 達하므로 補氣升陽하여 元氣가 下陷한 것을 升學하고, 補氣固表하는 效能이 있다<sup>9,10</sup>. 神農本草經에 “甘微溫 主癰疽 久敗瘡 排膿止痛 大風癩疾 五痔鼠瘻 補虛 小兒百病”하는 上品으로 最初 言及된 이래 補氣升陽, 固表止汗, 托毒排膿, 利水消腫의 效能을 지닌 代表的인 補氣藥으로 臨床에서 使用한다<sup>8</sup>.

黃芪의 補氣機能은 특히 免疫機能과 連結하여 說明하는데<sup>7,11,13</sup>, 黃芪의 免疫效能을 研究한 in vitro적인 것에서 抗體形成, cytotoxic T cell의 活性, 單核細胞에 의한 IL-1 生産增加 등의 報告가 있으며 in vivo에서도 淋巴節의 CD4 T cell의 比率과 抗體形成을 增加시켰다는 結果들이 報告되었다<sup>25,26</sup>. 抗癌實驗에서는 各種 癌治療에 使用되는 放射線療法과 化學療法의 副作用에서 초래된 세포손상을 완화시키는 效果를 보이고 있다<sup>14,27</sup>. 한편 韓藥과 洋藥의 並行投與에 관한 安全性 및 效能研究은 소수의 臨床的 檢討에 그치고 있으며<sup>28</sup>, 특히 韓藥과 抗癌療法劑의 複合投與에 대한 안전性과 效能研究은 미미한 상황이다.

Chlorambucil은 淋巴腫, 慢性淋巴球性白血病 등의 惡性腫瘍에 使用되고 있는 alkylating agent이다. 強力한 抗癌效果와 아울러 正常組織에도 損傷을 주어 여러 副作用을 나타낸다. 즉, 태아 환경에서의 奇形誘發, 환경 胎兒의 尿生殖系의 異常, 累積投與에 따른 心筋 微細構造의 變化 등의 報告<sup>29,30</sup>가 있다.

이에 본 研究에서는 黃芪를 扶正, chlorambucil를 祛邪의 藥物로 간주하여 이들을 併用使用했을 때 擔癌宿主를 위한 上乘效果가 있는지를 糾明하고자 했다. 上乘效果은 숙주에 대한 抗癌性和 安全性의



두 가지 방면에서 평가되었다. 이 목적을 달성하기 위해서 실험군을 黃芪의 單獨投與, chlorambucil의 單獨投與 및 黃芪와 chlorambucil 複合投與群으로 나누었다. 抗癌效能은 白血病細胞柱의 增殖率, 擔癌생쥐의 生存率과 生存期間 및 體重推移를 觀察하였으며, 安全性에 대해서는 造血機能, 肝機能, 肝組織 損傷 및 腎機能을 調査하였다.

먼저 抗癌效能에서, in vitro 實驗上 白血病細胞 (P388D1 cell)에 黃芪, chlorambucil 및 黃芪+CHL을 농도별로 投與하고 細胞生存率을 確認한 結果, 黃芪 單獨投與가 비록 in vitro 상 癌細胞의 增殖 抑制에 效果가 없다고 할지라도 chlorambucil에 複合된 併用投與는 chlorambucil 單獨投與보다 癌細胞 增殖를 效率의으로 抑制할 수 있음을 보였다. 實驗終了 21일째의 平均體重은 모든 實驗群에서 增加하였으나 統計의으로 有意하지 않았다. 이것은 黃芪, chlorambucil 및 複合投與가 癌의 成長을 억제하지 못했다는 것을 의미하지만, 적어도 黃芪가 腫瘍의 成長과는 無關하다는 것을 시사한다. 그리고 擔癌생쥐의 生存率이 올라가지 못한 것도 藥物의 抗腫瘍 效果缺如에서 비롯되었을 가능성이 있다. 그러나 비록 實驗群 모두가 腫瘍成長 抑制과 生存率 上昇을 보이지 못했지만, chlorambucil과 黃芪의 複合投與는 擔癌생쥐의 生存期間을 延長시켰다. 이것은 상당한 의미를 둘 수 있는 자료로서, 生存期間延長은 腫瘍抑制가 아닌 다른 요인에 의해 비롯되었을 가능성을 內包하는 것이어서 追後 糾明이 필요하다.

安全性 調査에서 藥物의 突然變異性(mutagenesis)이 먼저 調査되었는데 黃芪, chlorambucil 및 複合投與는 모두 突然變異를 만들지 않아서 腫瘍治療에 安全한 것으로 確認되었다. 突然變異性이 없다하더라도 擔癌宿主에 사용되었을 경우 심한 副作用이 생기면 이것은 安全性의 危險因子가 된다. 그래서 造血, 肝, 腎에 대한 毒性與否를 調査하였다. 造血機能에 있어서 예상대로 chlorambucil 單獨投與群이 가장 낮은 赤血球數를 보였는데 반면, 黃芪 및 黃芪와 chlorambucil을 併用한 群에서는 chlorambucil 單獨投與群 보다 현저하게 赤血球數가 높았다. 이것은

黃芪가 擔癌과 chlorambucil 치료로 의한 赤血球數 減少를 모두 방어하는 效果가 있음을 보여주었다. 그러나 白血球數에 대해서는 별다른 영향을 보이지 않았다. 그래서 造血機能에 대한 結果는 黃芪가 擔癌이나 抗癌劑 處置후의 貧血j를 개선시키고 부분적이지만 造血機能 保護效果가 있음을 시사한다. 肝機能 保護에 대하여 血中 AST 및 ALT level을 測定하여 比較하였다. AST 및 ALT는 aspartate 또는 alanine의 amino 기를  $\alpha$ -ketoglutarate로 轉移시키는 酵素로서 肝炎과 같은 肝細胞 損傷時에 혈중으로 방출, 임상적으로 많이 이용되고 있어 본 연구에서도 측정하였다. 肝毒性 역시 造血機能과 마찬가지로 chlorambucil 單獨投與群에서 가장 심했다. 그 수치는 다른 實驗群보다 2배내지 11배 이상의 편차를 보였다. 그러나 黃芪와 chlorambucil 複合投與는 擔癌으로 인한 肝機能 低下보다 더 심한 肝毒性을 유발하지 않았으며, 黃芪는 오히려 chlorambucil의 AST 및 ALT 상승을 抑制하는 效能을 보였다. 또한 肝 實質內 白血病細胞의 轉移와 血管主位 炎症所見은 黃芪, chlorambucil 및 複合投與가 對照群의 轉移 및 炎症狀態 보다 弱함을 입증시켰다. 이러한 肝 損傷 減少는 肝機能 改善과 연관될 것으로 믿어지며 追加的인 糾明이 있어야 할 것으로 思慮된다. 腎機能에 있어서도 안전성 문제가 없는 것으로 확인되었다.

以上에서 黃芪와 chlorambucil의 複合投與는 P388D1형 白血病細胞柱增殖 抑制와 擔癌생쥐 生存期間의 增加에 모두 效果가 있음을 확인하였으며, 突然變異性, 造血機能, 肝機能, 肝組織 損傷, 腎機能에도 安全性이 인정되었다. 貧血狀態의 好轉 效果가 확인되었으며, 특히 肝機能에서 血中 AST와 ALT의 上昇과 肝組織 損傷에 대한 複合投與의 抑制能은 주목할 필요가 있다.

## V. 結 論

慢性 淋巴球性 白血病에 적용되는 chlorambucil 과 黃芪의 單獨投與 및 併用投與의 抗癌效能 및 安

全性を 確認하기 위하여, P388D1형 白血病細胞柱의 增殖率, 擔癌생쥐의 生存率과 體重을, 安全性은 造血機能, 肝機能, 肝組織 損傷 및 腎機能을 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 黃芪 單獨投與는 P388D1형 白血病細胞柱의 增殖과 생쥐의 腹腔內 腫瘍成長을 抑制하지는 못하였지만, 擔癌생쥐의 生存期間을 延長시키고 chlorambucil에 의한 骨髓와 肝機能抑制를 막는 效果가 있었다.
2. 黃芪와 chlorambucil의 併用投與는 黃芪나 chlorambucil 單獨投與보다 癌細胞 增殖을 보다 效果的으로 抑制하였다.
3. 黃芪와 chlorambucil을 병용해도 正常細胞에 突然變異가 생기지 않았으며, 骨髓 및 肝에 대한 毒性은 擔癌에 의한 毒性보다 增加하지 않았다.

結論적으로 chlorambucil 單獨보다는 黃芪를 併用하는 것이 P388D1형 白血病 癌細胞의 抗癌性 增加와 chlorambucil의 副作用 緩和에 有益하였다.

### 參 考 文 獻

1. 전국한의학대학교간계내과교수공저. 간계내과학. 동양의학연구원; 2001, p.564-79.
2. 최승훈. 동의중양학. 행림출판; 1995, p.245-9.
3. 진귀연 외. 실용중서의 결합진단치료학. 북경:중서의약과기출판사; 1999, p.577-89.
4. 조종관. 한방임상중양학. 주민출판사; 2001, p.8-15.
5. 서울대학교의과대학편. 혈액학. 서울대학교 출판부; 1989, p.123-42.
6. 문구 외. 암 동서의 결합 치료. 익산: 원광대학교 출판국; 1999, p.256-7, 461-2, 742-93.
7. 전병훈. 황기도홍탕의 항종양 효과 및 면역조절 반응에 관한 연구. 대한병리학회지; 1996, 10(1) p.133-43.
8. 孫憑翼 外. 神農本草經. 太原市. 西科學技術出版社; 1991, p.26.

9. 전국한학과 본초학교수공저. 본초학. 영림사; 1991, p.534-5.
10. 신편중약대사전(하). 대북: 신문과출판공사; 1990, p.2102-6.
11. Song Q., Kobayashi T., Xiu L.M., Hong T. and Cyong J.C., Effects of Astragali root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation. J Ethnopharmacol; 2000,73(1-2) p.111-9.
12. Kajimura K., Takagi Y., Miyano K., Sawabe Y., Mimura M., Sakagami Y., Yokoyama H. and Yoneda K., Polysaccharide of Astragali radix enhances IgM antibody production in aged mice. Biol Pharm Bull; 1997, 20(11) p.1178-82.
13. Shan B.E., Yoshida Y., Sugiura T. and Yamashita U., Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. Int J Immunopharmacol; 1999, 21(3) p.149-59.
14. 전병훈. 황기가 항암화학요법제로 유발된 세포 독성에 미치는 영향. 대한동의병리학회지; 1998, 12(1)p.55-9.
15. Fish H. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. Cancer; 1984,54p.2609.
16. 김성진. 팔진탕합화적환의 항종양 효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원; 2000, 21(1)p.65-73
17. 오정진. 팔진탕가감방이 항종양 면역반응과 항암제로 유발한 부작용에 미치는 영향. 원광대학교 대학원; 1998, 19(2)p.219-32.
18. 김종한. 이진탕의 항종양효과 및 면역활성에 미치는 영향. 원광대학교 대학원; 1995,
19. 이윤영. 백혈병 세포주에 대한 biological response modifiers 및 생약추출물의 항암제 세포 독성 증강 효과. 충남대학교 대학원; 1991,
20. 박세광. 삼릉전원 전탕액이 인체 백혈병 세포주에 미치는 영향. 대전대학교 대학원; 1996,
21. 김강산, 강병기. 복방환이 백혈병과 간암환자에서

- 추출한 암세포에 미치는 항암효과. 한국전통의학지; 1991, 1(1) p.153-67.
22. 한상일, 강병기. 비기환이 백혈병과 임파종 환자에서 추출한 암세포에 미치는 항암효과. 대한한방내과학회지; 1992, 12(2) p.1-15.
  23. 강대근, 강병기. 식분환 및 비기환이 백혈병과 임파종 환자에서 추출한 암세포에 미치는 항암효과. 대한한방내과학회지; 1992, 12(2) p.96-112.
  24. 이견업. 팔진항암단의 인간 전골수성 백혈병 세포 사멸 효과. 원광대학교 대학원; 2002, 16(3) p.514-20.
  25. 박정숙. 황기 메탄올 추출물의 용량에 따른 면역생물학적 연구. 원광대학교 대학원; 1995,
  26. 진선두. 황기의 투여가 생체 및 시험관 내에서 면역세포의 기능에 미치는 영향. 원광대학교 대학원; 1995,
  27. 김광식, 송영준. 당귀 및 황기 약침이 간손상된 백서의 혈액에 미치는 영향. 다한침구학회지; 1996, 13(1)p.1-10.
  28. 이원철, 김민기, 김성완, 윤소영, 이문성, 최서영, 김장현, 엄완식, 김춘배, 이한구. 주요 난치성 질환에 대한 한양방 협진의 임상효과 검증 및 한양방 협진 의료기관의 운영모형 개발. 보건 의료기술연구개발사업 최종보고서. 보건복지부; 2002,
  29. Monie, I. M, Chlorambucil induced abnormalities of urogenital system of rat fetuses. Anat. Rec.; 1962, p.139 p.145-53.
  30. Conner, T. A. New platinum complex with antitumor patient. Biochem. Int.;1972, 5p.415-24.