

## 內消升麻湯의 抗癌效果 研究

심상희 · 박수연 · 김종한 · 최정화  
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

### Anti-tumor activities of Naesosungma-tang

*Sang-hee Shim · Su-yeon Park · Jong-han Kim · Jung-hwa Choi*

This study was carried out to evaluate antioxidative, cytotoxic and chemosensitizing effects for anti-tumor activities of Naesosungma-tang (NST).

The results were as follows ;

1. The oxidative effects were measured by DPPH radical scavenging activity. NST water extract was showed more effective than ethanol extract and also various solvent fractions from NST showed effective in the following order : butanol fraction > ethyl acetate fraction > hexane fraction > aqueous fraction.
2. NST water extract was showed cytotoxic effects on the human cancer cells Calu-6 cell and SNU-601 cell, but not on MCF-7 cell.
3. The viability of cells was measured in 4 kinds of solvent fractions from water extract of NST by MTT assay. The results were as followings :
  - 1) On the NIH3T3 cell, IC<sub>50</sub> value was 200~300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in three fractions except aqueous fraction.
  - 2) On the Caco-2 cell, effective only in the butanol fraction.
  - 3) On the Calu-6 cell, most effective in hexane fraction(IC<sub>50</sub>:80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and effective in ethyl acetate and butanol fraction(IC<sub>50</sub>:100~120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
  - 4) On the MCF-7 cell, IC<sub>50</sub> value was similar in three fractions except aqueous fraction.
  - 5) On the SNU-601 cell, IC<sub>50</sub> value was within 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in three fractions except aqueous fraction.
  - 6) On the HCT-116 cell, IC<sub>50</sub> value was 150~200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in three fractions except aqueous fraction.
  - 7) On the AML-2/WT cell, not effective in four kinds of solvent fractions.
4. In combined effects of NST and vincristine on AML-2/D100 cell, water and ethanol extracts of NST and hexane fraction of water extracts of NST more effectively inhibited proliferation of AML-2/D100 cell.

These results suggest that NST has antioxidative and cytotoxic effects against Caco-2, Calu-6, MCF-7, SNU-601, HCT116 and NIH3T3 cell especially Calu-6 and SNU-601 cell, and also chemosensitizing effects against AML-2/D100 cell in combined vincristine.

---

**Key words :** Anti-tumor, Naesosungma-tang.

## I. 緒論

최근의 암 발생률은 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 생활의 변화 등으로 과거에 비해 급격히 증가하고 있으나 아직도 암의 발생기전이 불명확하고 난치성 질병으로 지금까지 알려져 있는 사망원인 중 비교적 높은 비율을 차지하고 있다<sup>1)</sup>. 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소제제나 백신등의 생물학적 제제, 순수합성 의약품 및 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이 중 유전자, 효소, 백신등을 이용한 항암제는 실용단계에 있는 상태는 아니며, 화학요법에 의해 개발된 많은 항암제는 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고, 약제의 독성에 의해 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다<sup>2-4)</sup>. 또한 항암제는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만, 때로는 정상세포에 대해서 독성을 나타내기도 한다<sup>2-4)</sup>.

이러한 문제점을 해결하기 위해 새로운 항암제의 개발이 시도되고 있으며<sup>5-7)</sup>, 최근 한약재를 이용하여 암을 치료하려는 연구들이 활발히 이루어지고 있으나<sup>8-11)</sup>, 이제까지 内消升麻湯에 관한 연구는 없었다.

内消升麻湯은 《外科精義》<sup>12)</sup>에 최초로 수록되고, 《東醫寶鑑》<sup>13)</sup>에 기재된 것으로 大黃·升麻·當歸·黃芩·赤芍藥·枳實·甘草로 구성되며, 附骨疽를 치료한다고 하였다. 附骨疽는 癰疽중 無頭疽에 속하며 골격과 관절에 발생한 급성 화농성 질환으로 현대의 화농성 골수염과 유사하다<sup>14-15)</sup>.

癰疽는 인체 각 부위에 국부적으로 發熱·發赤·堅硬·腫痛·환부의 陷沒·突起 및 化膿등의 양상을 나타내는 질환으로 염증성 질환이나 종양성 중

과, 즉 암과 유관하다고 인식하였다<sup>16-18)</sup>.

따라서 癰疽질환에 사용되어 왔던 内消升麻湯의 항암효과를 알아보기 위해 항산화 효과, 세포독성 효과, 항암제 내성 암세포에 대한 항암제 병용투여 효과에 관한 실험적 연구를 하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용한 内消升麻湯은 《東醫寶鑑》<sup>13)</sup>에 수록된 내용에 준하였으며, 본 실험에 사용된 약재는 동신대학교 부속광주한방병원 약제과에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 한 첩의 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Naesosungma-tang(NST).

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	重量 (Weight, g)
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	6.0
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	6.0
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	6.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6.0
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	6.0
枳實	<i>Aurantii immaturus Fructus</i>	6.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
	Total Amount	40.0

#### 2) 암 세포주

본 실험에 사용된 세포주는 인간 암세포주로서 폐암 세포 Calu-6, 유방암 세포 MCF-7, 위암 세포 SNU-601, 대장암 세포 Caco-2와 HCT116, 백혈암 세포 AML-2/WT을 이용 하였고, 정상세포로는 NIH3T3를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다.

교신저자: 심상희, 광주광역시 남구 월산동 377-13번지  
동신대학교 부속한방병원 안이비인후피부과교실  
(E-mail: lenteur75@hanmail.net)  
· 접수 2006/02/23 · 수정 2006/03/13 · 채택 2006/03/21

2. 시약 및 기기

항산화 활성 등을 측정하기 위해 사용한 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), MTT 등의 시약은 Sigma 제품 (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였고, 항산화 활성 및 세포 독성 측정을 위해서 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 사용하였다.

3. 실험방법

1) 검액 조제

(1) 열수추출물 조제

NST의 2첩 분량에 해당하는 80 g에 1차 증류수 1500 ml 첨가하여 전기약탕기(DWP-99000T, 한국)로 120 분 전탕한 후 Whatman paper No. 1로 여과한 여과액을 건조기(비전과학, 한국)에서 건조하여 추출물을 얻었으며 최후의 건조물은 19.6 g 이었다.

(2) 에탄올 추출물 조제

NST를 마쇄한 후 처방 용량의 5배에 해당하는 에탄올로 상온에서 24 시간 3 회 추출하였다. 추출액은 감압 농축하여 1/10로 농축한 다음 동결건조로 분말화하여 실험재료로 사용하였다.

(3) 열수추출물의 분획 추출물 조제

얻어진 열수 추출물을 다시 증류수에 현탁시킨 다음 hexan, 에틸아세테이트 및 부탄올을 사용하여 각각의 분획과 물 분획을 얻었으며 구체적 절차는 Scheme 1과 같다.

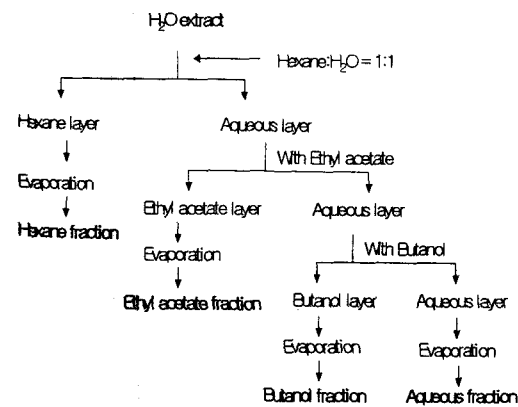
2) 항산화 활성 측정

항산화 활성은 free radical인 DPPH를 사용한 기존의 측정방법<sup>19-22)</sup>에 준하여 측정했다. DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 radical로서, radical 전자의 비편재화에 의해 안정화된 상태로 존재한다. 에탄올에 용해시킨 100 mM DPPH 용액을 180  $\mu$ l씩 96 well plate에 분주하고, 여기에 1 · 10 · 50 · 100  $\mu$ g/ml의 농도로 제조한 시료를 20  $\mu$ l씩 첨가하여 최종 반응용액이 200  $\mu$ l가 되도록 하였다. 일정시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Tek, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 조사하였고, 무처리구와 처리구의 값을 비교하여 free radical 소거활성을 결정하였다. Free radical 소거활성을 DPPH의 50 %를 환원시키는데 필요한 시료의 양( $\mu$ g)을 RC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

3) 암세포에 대한 세포 독성 효과 측정

(1) 암세포 배양

Calu-6, HCT116,, MCF-7, SNU-601의 배양은 RPMI1640 복합배지를, NIH3T3, Caco-2는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)을, AML-2/WT은  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Medium)을 이용하여 10 % Fetal Bovine Serum와 항생제 (Antibiotic antimycotic)을 첨가하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>의 습윤화 된 incubator에서 적응시켜 배양하였다. 기타의 세포 배양법 및 독성 평가 방법은 기존의 방법에 준 23-24)하여 사용하였다.



Scheme 1. Fraction process of the Naesosungma-tang.

(2) 세포 독성 측정

암세포에 대한 세포 독성 측정은 MTT 검정법으로 실험하였다. 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위해 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 인체암세포와 정상세포를  $2\sim4\times 10^4$  cells/ml의 농도가 되도록 조절하여 96 well microplate 에 세포부유액 90  $\mu$ l씩 분주하고, 24 시간 동안 배양한 후 무처리구인 대조군과 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 하였다. 각각의 시료는 DMSO에 녹여 농도별로 첨가하여 3 일 배양한 후 모든 well에 MTT용액 (5 mg/ml PBS) 10  $\mu$ l씩을 가해주고 다시 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>의 습윤 배양기에서 4 시간 30 분 더 배양함으로써 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO 150  $\mu$ l로 잘 녹여서 Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하여 IC<sub>50</sub> (50 % inhibitory concentration)값을 산출하였다.

4) 항암제 내성 억제 효과 측정

(1) 암세포 배양

인체 백혈병 세포주인 AML-2/WT는  $\alpha$ -MEM에 10 % FBS와 항생제(antibiotic-antimycotic)를 함유한 복합배지를 사용하여 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>와 습윤화된 배양기 내에서 적응시켜 배양하였다. AML-2/D100 세포주는 daunorubicin IC<sub>50</sub>농도를 함유한 배양액에서 AML 세포주를 배양하여, 한 농도에서 약물을 3일간 투여 후 내성 표현형의 발현을 돕기 위해 약물을 제거하여 며칠 또는 몇 주 배양한 후 융합되던 약물의 농도를 50 %씩 증가시키는 방법으로 선별하여 100 nM의 daunorubicin 이 존재하는 배지에서도 잘 자라는 내성아세포주를 얻어 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>와 습윤화 된 배양기에서 배양하였다. 기타의 세포 배양법 및 독성 평가 방법은 기존의 방법에 준<sup>25-27)</sup>하여 사용하였다.

(2) 세포 독성 측정

96 well microplate에 측정하고자 하는 약물을 10  $\mu$ l씩 넣고 3~4 일간 약물 없이 배양한 내성 세포주를  $2\times 10^5$  cells/ml가 되도록 한 세포 부유액 90  $\mu$ l를 각각 넣었다. 이때 약물대신 PBS를 넣어 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 96 well microplate를 잘 흔든 후 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 4 일간 배양한 후 각 well에 MTT 용액 10  $\mu$ l를 가해주고 다시 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>에서 5 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 0.04 N HCl-isopropanol 용액 100  $\mu$ l로 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 통계 처리

본 연구의 통계처리는 SPSS10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 평균값의 유의성을 5 % 이내의 한계로 조사하였다.

III. 實驗成績

1. NST의 DPPH free radical 소거법에 의한 항산화 활성 효과

NST의 열수 추출물과 에탄올 추출물 그리고 열수 추출물의 부탄올, 에틸 아세테이트, 헥산 및 수용성 추출물의 DPPH를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과 다음과 같다.

에탄올 추출물에서 보다 열수 추출물에서 RC<sub>50</sub> 값이 44.545  $\mu$ g/ml로 항산화 활성 효과가 높았고 (Fig. 1, Table 2), 열수 추출물의 용매분획을 얻어 이의 분획별 항산화 효과는 부탄올 추출물에서 57.390  $\mu$ g/ml로 가장 RC<sub>50</sub> 값이 높게 나타났으며, 부탄올 > 에틸 아세테이트 > 헥산 > 수용성 추출물의

순으로 항산화 효과가 나타났다 (Fig. 2, Table 3).

Table 2. DPPH free radical scavenging activity of ethanol (A) and water (B) extracts from NST.

Sample	Free radical scavenging activity <sup>1)</sup> (% Inhibition)	RC502) ( $\mu\text{g/ml}$ )	비고
ethanol Extract	77.939	53.146	Fig.1-A
water Extract	87.704	44.545	Fig.1-B

1) Free radical scavenging activity of each sample was determined relative to control group. Each value was expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3). 2) Amount required for 50 % reduction of DPPH after 30 min.

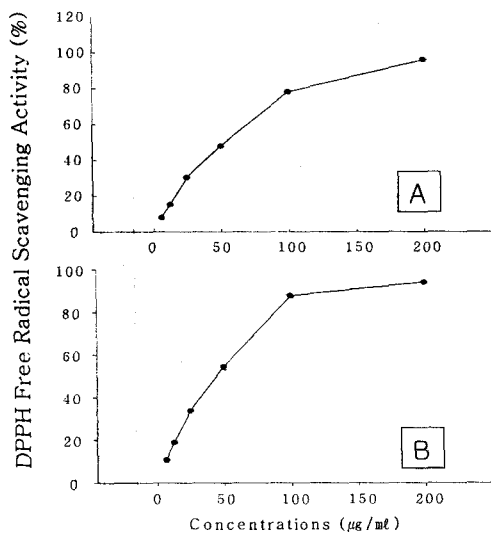


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of ethanol (A) and water (B) extracts from NST. Extracts were incubated with DPPH solution (100 mM) at 37 °C for 30 min. Activity was determined by measurement of absorbance at 517 nm. Each value was expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3).

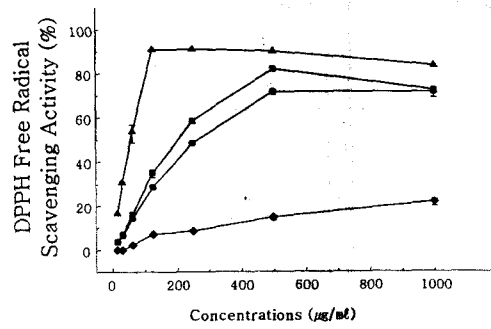


Fig. 2. Free radical scavenging activities of various solvent fraction from NST using DPPH method. ●, Hexane fraction; ■, ethyl acetate fraction; ▲, butanol fraction; ◆, aqueous fraction.

Table 3. Antioxidant effect of water extract and its each solvent fraction of NST.

Fractions	Free radical scavenging activity <sup>1)</sup> (% Inhibition)	RC502)( $\mu\text{g/ml}$ )	비고
Hexane	28.53	267.476	Fig.2
Ethyl acetate	35.01	205.112	Fig.2
Butanol	90.74	57.390	Fig.2
Aqueous	7.08	Not result	Fig.2

1) Free radical scavenging activity of each sample was determined relative to control group. Each value was expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3). 2) Amount required for 50 % reduction of DPPH after 30 min. 2. NST의 암세포주에 대한 세포 독성 효과

1) NST 열수 추출물의 암세포주에 대한 세포 독성 효과

NST를 열수로 추출한 시료를 세 종류의 인체 암세포 Calu-6, MCF-7, SNU-601에 처리한 결과, Calu-6와 SNU-601에 대하여 높은 세포독성효과를 나타내었으나 MCF-7에 대해서는 유의할 만한 활성을 보이지 않았다 (Fig. 3, Table 4).

Table 4. Effect of water and ethanol extracts from NST on the viability of human cancer cell lines.

Cell line	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/ml)
Calu-6 <sup>2)</sup>	273.65
MCF-7 <sup>3)</sup>	-
SNU-601 <sup>4)</sup>	320.96

Data were presented as means±SD (n=3).

1) Extract concentrations which inhibit 50 % growth of the cells. 2) human pulmonary carcinoma. 3) human breast adenocarcinoma pleural effusion. 4) human gastric carcinoma.

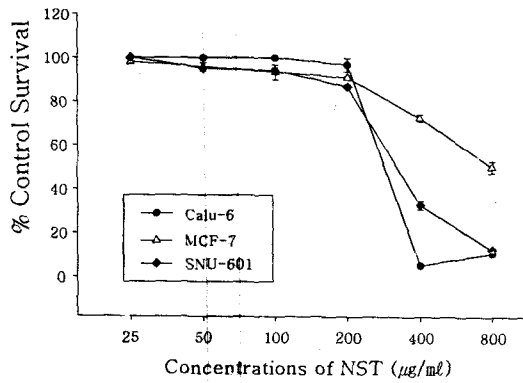


Fig. 3. Effect of water extracts from NST on the viability of human cancer cell lines.

2) NST의 열수 추출물의 용매분획의 암세포 독성 효과

(1) NIH3T3 세포에 대한 세포독성효과

NIH3T3 세포에 대한 세포독성효과는 유의할만한 활성을 보이지 않은 수용성 분획물을 제외하고는 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였다. 헥산과 에틸 아세테이트의 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 동일한 250 μg/ml을 보였고, 부탄올 분획물은 IC<sub>50</sub> 값이 가장 높은 200 μg/ml로 수용층을 제외한 세 종류 용매분획물의 IC<sub>50</sub> 값의 범위는 200~300 μg/ml임을 알 수 있었다 (Fig. 4).

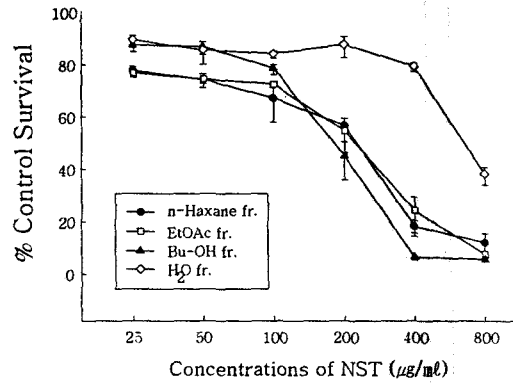


Fig. 4. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on NIH3T3 cells. The viability of cells was measured by MTT assay.

(2) Caco-2 세포에 대한 세포독성 효과

Caco-2 세포에 대한 세포독성 효과는 부탄올 분획물을 제외한 나머지 분획물들에서는 거의 유사한 양상으로 유의성 있는 세포독성 효과를 보이지 않았다. 부탄올 분획물의 경우 400 μg/ml 이하의 농도에서 50 % 이상의 암세포를 치사하였으며 800 μg/ml의 농도에서는 90 % 이상을 치사 시켰다. (Fig. 5).

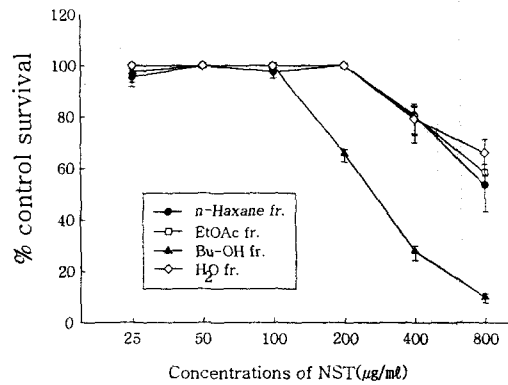


Fig. 5. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells Caco-2. The viability of cells was measured by MTT assay.

(3) Calu-6 세포에 대한 세포독성효과

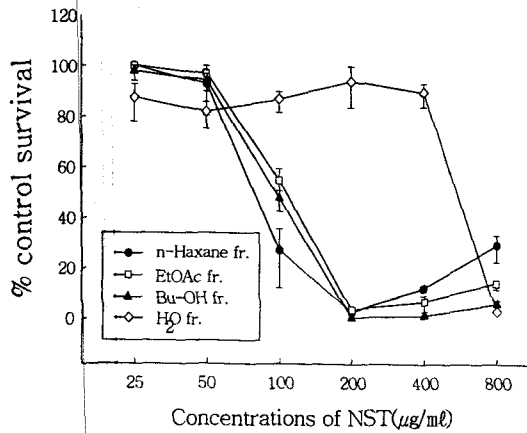


Fig. 6. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells Calu-6. The viability of cells was measured by MTT assay.

Calu-6 세포에 대한 세포독성효과는 수용성 분획물을 제외하고는 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였다. 그중에서 헥산 분획물이 IC<sub>50</sub> 값이 80 µg/ml로 가장 높은 독성도를 보였고 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 100~120 µg/ml로 거의 유사함을 보였다. 또한 200 µg/ml의 농도일때 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올의 세가지 분획물 모두 Calu-6 세포를 사멸시켰다 (Fig. 6).

(4) MCF-7 세포에 대한 세포독성 효과

MCF-7 세포에 대한 세포독성 효과는 유의할만한 활성을 보이지 않은 수용성 분획물을 제외하고는 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였다. 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 거의 유사하였고, 그 중 부탄올 분획물이 IC<sub>50</sub> 값이 340 µg/ml로 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 7).

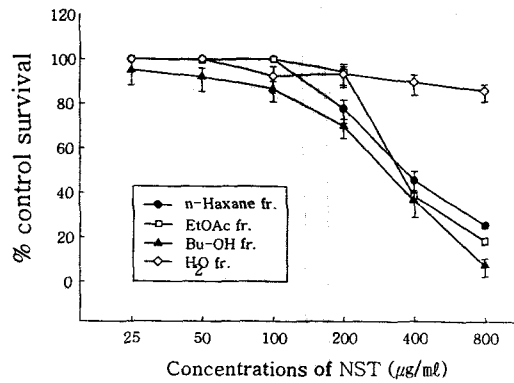


Fig. 7. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells MCF-7. The viability of cells was measured by MTT assay.

(5) SNU-601 세포에 대한 세포독성효과

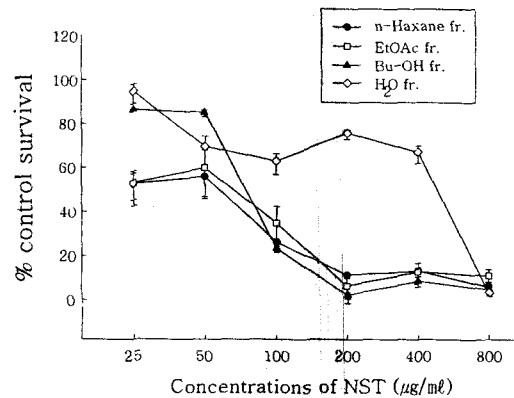


Fig. 8. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells SNU-601. The viability of cells was measured by MTT assay.

SNU-601 세포에 대한 세포독성 효과는 수용성 분획물을 제외한 헥산, 에틸 아세테이트과 부탄올 분획물은 IC<sub>50</sub> 값이 100 µg/ml 이내로 거의 유사한 독성효과를 보였으며, 200 µg/ml의 농도에서 세가지 분획물 모두 80% 이상의 치사율을 나타내었다. 또한 Caco-2, Calu-6 그리고 MCF-7 세포에 대

하여 세포독성 효과를 거의 보이지 않았던 수용성 분획물이 SNU-601 세포에 대해선 시료의 최대농도인 800  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50%의 암세포를 치사하여 미약하나마 세포독성 효과를 보였다 (Fig. 8).

(6) HCT-116 세포에 대한 세포독성효과

HCT-116 세포에 대한 세포독성 효과는 유의할 만한 활성을 보이지 않은 수용성 분획물을 제외하고는 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였다.

헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물은  $\text{IC}_{50}$  값이 150~250  $\mu\text{g/ml}$  농도범위로 유사한 독성효과를 보이고 있으며, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세가지 분획물 모두 80% 이상의 치사효과를 보이고 있다. 한편, Caco-2 세포에 대해선 전혀 활성을 보이지 않았던 헥산 분획물이 대장암 세포이지만 세포유래가 다른 HCT-116 세포에 대해선  $\text{IC}_{50}$  값이 250  $\mu\text{g/ml}$ 로 상당한 세포독성 효과를 나타내었다 (Fig. 9).

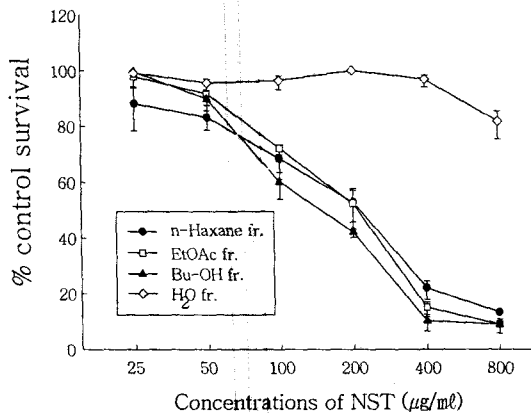


Fig. 9. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells HCT-116. The viability of cells was measured by MTT assay.

(7) AML-2/WT 세포에 대한 세포독성 효과

AML-2/WT 세포에 대한 세포독성 효과는 유의할 만한 활성을 보이지 않은 수용성 분획물을 제외

하고는 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물의 전체적인  $\text{IC}_{50}$  값의 범위가 400  $\mu\text{g/ml}$ 에 가깝게 나타나 유의할만한 세포독성 효과를 보이지 않았다 (Fig. 10).

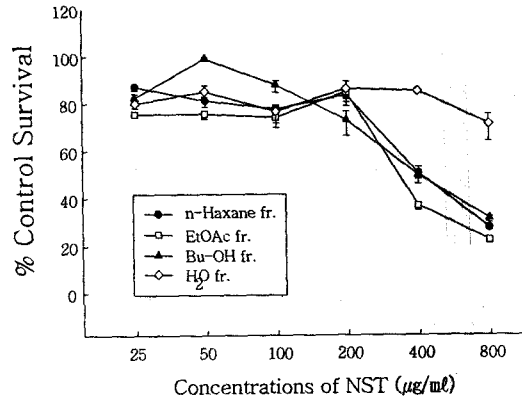


Fig. 10. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells AML-2. The viability of cells was measured by MTT assay.

Table 5. Effect of 4 kinds of solvent fractions from water extracts of NST on human cancer cells Caco-2, Calu-6, MCF-7, SNU-601, HCT-116, AML-2 and NIH3T3. The viability of cells was measured by MTT assay.

Cell Line	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	n-Hexane	Ethyl acetate	Butanol	H <sub>2</sub> O
Caco-2	-	-	400 ↓	-
Calu-6	80	100	100	-
MCF-7	380	330	340	-
SNU-601	25 ~ 50	25 ~ 70	70	-
HCT-116	250	200	150	-
AML-2	-	-	400 ↑	-
NIH3T3	250	250	200	-

Data were presented as means±SD (n=3).



3. NST의 항암제 내성 암세포주에 대한 항암제 병용투여 효과

1) NST의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 효과

Table 6. Chemosensitizing effects of ethanol and water extracts in the absence or presence of vincristine in Pgp-overexpressing AML-2/D100 cells.

Local name	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> of AML-2/WT <sup>2)</sup>	CR <sup>3)</sup>	IC <sub>50</sub> of AML-2/D100 <sup>4)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )		CI <sup>6)</sup>
			VCR <sup>5)</sup> -	VCR+	
water extracts	800 $\uparrow$	-	800 $\uparrow$	193.10	4.14 $\uparrow$
ethanol extracts	31.65	1.30	24.33	16.20	1.50

Data were presented as means $\pm$ SD (n=3).

- 1) Extract concentrations which inhibit 50% growth of the cells.
- 2) Wild type.
- 3) Cross resistance(CR) = IC<sub>50</sub> of AML-2/WT/IC<sub>50</sub> of AML-2/D100 without vincristine.
- 4) Daunorubicin 100nM.
- 5) Vincristine.
- 6) Chemosensitizing index = IC<sub>50</sub> of AML-2/D100 without vincristine/IC<sub>50</sub> of AML-2/D100 with vincristine.

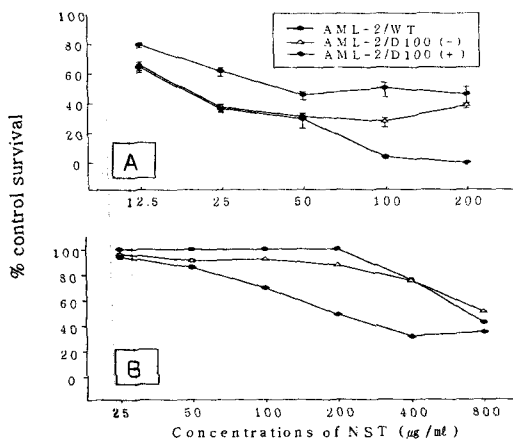


Fig. 11. The viability of cells was measured by MTT activities of ethanol (A) and water (B) extract of NST on human cancer cells AML-2/WT and AML-2/D100.

NST의 열수 추출물과 에탄올 추출물을 항암제에 내성을 가진 암세포주에 항암제 vincristine과 병용 투여시 IC<sub>50</sub> 값이 열수 추출물에서는 193.10  $\mu\text{g/ml}$ , 에탄올 추출물에서는 16.20  $\mu\text{g/ml}$ 로 암세포 성장을 더욱 효과적으로 억제함을 보여주었다 (Table 6, Fig. 11).

2) NST의 열수 추출물의 용매분획물의 효과

Table 7. chemosensitizing effects of extracts in the absence or presence of vincristine in Pgp-overexpressing AML-2/D100 cells.

Solvents	IC <sub>50</sub> of AML-2/WT	CR	IC <sub>50</sub> of AML-2/D100( $\mu\text{g/ml}$ )		CI
			VCR-	VCR+	
n-Hexane	203.96	0.29	698.84	224.76	3.11
Ethyl acetate	172.89	0.37	470.08	707.22	0.66
Butanol	198.04	0.29	675.12	702.11	0.96
H <sub>2</sub> O	800 $\uparrow$	-	800 $\uparrow$	800 $\uparrow$	-

Data were presented as means $\pm$ SD (n=3).

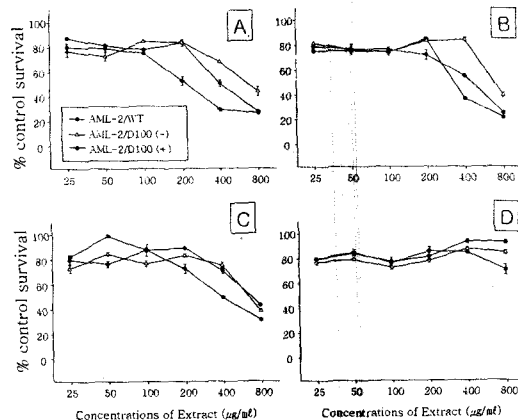


Fig. 12. The viability of cells was measured by MTT activities in n-hexane (A), ethyl acetate (B), butanol (C) and H<sub>2</sub>O (D) fractions from water extract of NST on human cancer cells AML-2/WT and AML-2/D100.

T의 열수 추출물을 다시 핵산, 에틸 아세테이트, 부탄올, 수용성의 네 종류의 분획으로 나누어 그 항암제 내성 억제효과를 관찰하였는데 항암제 vincristine과 병용 투여시 핵산 분획물에서 IC<sub>50</sub> 값이 224.76 µg/ml로 가장 효과적으로 작용하였다 (Table 7, Fig. 12 ).

#### IV. 考 察

內消升麻湯은 《外科精義》<sup>12)</sup>에 “治附骨疽，疎下後服此”라 하여 최초로 수록되고, 《東醫寶鑑》<sup>13)</sup> 기재된 것으로 大黃, 升麻, 當歸, 黃芩, 赤芍藥, 枳實, 甘草로 구성되며, 附骨疽를 치료한다고 하였다. 附骨疽는 癰疽證 無頭疽에 속하며 골격과 관절에 발생한 급성 화농성 질환으로 현대의 화농성 골수염과 유사하다<sup>14,15)</sup>. 內消升麻湯의 構成藥物을 살펴보면 瀉熱通腸·涼血解毒·逐瘀經通의 효능이 있는 大黃, 發表透疹·清熱解毒·升舉陽氣의 효능이 있는 升麻, 補血和血·調經止痛·潤燥滑腸의 효능이 있는 當歸, 瀉實火·除濕熱·止血·安胎의 효능이 있는 黃芩, 清熱涼血·散瘀止痛의 효능이 있는 赤芍藥, 破氣·散痞·瀉痰·消積의 효능이 있는 枳實, 和中緩急·潤肺·解毒·調和諸藥의 효능이 있는 甘草로 구성되어<sup>28)</sup> 清熱解毒·理氣和血의 효과가 있어 癰疽의 實證에 적용할 수 있다.

癰疽는 인체 각 부위에 국부적으로 發熱·發赤·堅硬·腫痛·환부의 陷沒·突起 및 化膿 등의 양상을 나타내는 질환<sup>16)</sup>으로 염증성 질환이나 종양성 종괴, 즉 암과 유관하다고 인식하였다<sup>17,18)</sup>.

癰疽질환에 사용되어 왔던 內消升麻湯에 대한 작용기전을 보다 깊이 이해하고 임상적 응용의 폭을 넓히는 데에 도움이 되는 기초 자료로 쓰일수 있도록 內消升麻湯의 항암효과를 알아보기 위해 항산화 효과, 세포독성 효과, 항암제 내성 암세포에 대한 항암제 병용투여 효과에 관한 실험적 연구를 하였다.

산소는 호흡에 의해 체내로 유입되어 각종 호기성 대사과정에 참여하는 필수적인 물질로 생명유지에 절대적으로 필요하지만 안정한 분자 상태인 기저삼중항산소가 대사 후 물이 되는 과정에서 유독성 산소 대사물인 free radical을 발생시킨다. free radical에는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>), peroxy radical(ROO<sup>·</sup>) 등이 있으며, 이들은 핵산, 단백질, 지질 등 모든 세포내 거대분자를 변성 또는 파괴시키며, 특히 세포막을 구성하고 있는 인지질을 과산화시켜 세포막을 손상시켜 세포독성을 유발한다<sup>29,30)</sup>. 이와같은 세포내 산화적 손상이 축적되어 free radical은 암을 비롯한 각종 질병과 노화<sup>31,33)</sup>의 원인이 되기도 한다.

본 실험에서 사용된 DPPH는 대표적인 free radical 중 하나로 內消升麻湯의 항산화 활성을 측정하는 지표로 DPPH 라디칼의 소거효과를 관찰하였는데, 에탄올 추출물 보다 열수 추출물에서 RC<sub>50</sub> 값이 44.545 mg/ml로 항산화 활성 효과가 높았고, 이에 열수 추출물의 용매분획을 얻어 이의 분획별 항산화 효과 관찰시 부탄올 추출물에서 RC<sub>50</sub> 값이 57.390 mg/ml로 가장 높게 나타났다. 이는 內消升麻湯의 열수 추출물의 부탄올 분획물내에 우수한 항산화효과를 나타내는 성분이 있음을 시사한다.

內消升麻湯의 암세포에 대한 세포독성을 알아보기 위해 內消升麻湯의 열수 추출물을 세 종류의 인체암세포인 Calu-6 세포·MCF-7 세포·SNU-601 세포에 처리한 결과, Calu-6 세포와 SNU-601 세포에 대하여 높은 세포독성 효과를 나타내어 內消升麻湯의 폐암과 위암에 대한 항암효과가 기대되었다.

內消升麻湯의 열수 추출물의 용매분획물의 암세포에 대한 세포독성 효과에서 정상세포인 NIH3T3 세포에서는 유의할 만한 활성을 보이지 않은 수용성 분획물을 제외하고는 세가지 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 200~300 mg/ml 농도범위를 보였다.

Caco-2 세포에서는 강한 세포독성 효과를 보였던 부탄올 분획물을 제외한 나머지 분획물들에서는

거의 유사한 양상으로 세포독성효과를 보이지 않았음을 알 수 있었다. 이 결과는 부탄을 분획물내에 Caco-2 세포를 저해하는 유효성분이 존재함을 암시한다.

Calu-6 세포에서는 대장암세포인 Caco-2 세포에 대하여 전혀 독성효과를 보이지 않았던 헥산 분획물이 IC<sub>50</sub> 값이 약 80 mg/ml로 Caco-2 세포에 대해서 가장 강한 활성을 보였던 부탄을 분획물의 활성보다 더 높은 IC<sub>50</sub> 값을 알 수 있었다. 에틸 아세테이트 분획물과 부탄을 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 100~120 mg/ml로 거의 유사하게 나타났고, 또한 200 mg/ml의 농도일때 세가지 분획물 모두 Calu-6 세포를 사멸시켰다. 이 결과는 수용층을 제외한 모든 용매층의 분획물이 폐암세포인 Calu-6 세포의 생육을 저해시키는 항암성 약제로 사용이 가능함을 시사하고 있다.

MCF-7 세포에서는 헥산 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, 부탄을 분획물 층의 IC<sub>50</sub> 값은 330~400 mg/ml로 거의 유사하며 부탄을 분획물이 IC<sub>50</sub> 값이 340 mg/ml로 가장 높은 활성을 보였으나 Caco-2 세포와 Calu-6 세포에 대한 세포독성도와 비교하면 미약한 수치이다.

SNU-601 세포에서는 수용성 분획물을 제외한 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물과 부탄을 분획물은 IC<sub>50</sub> 값이 100 mg/ml 이내로 세포 독성 효과가 있었으며, 특히 헥산 분획물과 에틸 아세테이트 분획물에서는 거의 동일하게 IC<sub>50</sub> 값이 최저농도 범위인 25~70 mg/ml에서 치사효과를 보였고, 200 mg/ml의 농도에서 세가지 분획물 모두 80 % 이상의 치사율을 나타내고 있다.

HCT-116 세포에서는 세포유래가 다른 대장암세포인 Caco-2 세포에 대해선 전혀 활성을 보이지 않았던 헥산 분획물이 HCT-116 세포에 대해선 IC<sub>50</sub> 값이 250 mg/ml로, 에틸 아세테이트 분획물에서는 200 mg/ml로 세포독성도를 보였다. 부탄을 분획물에서도 IC<sub>50</sub> 값이 150 mg/ml로 수용성 분획물

을 제외한 세가지 분획물에서는 IC<sub>50</sub> 값이 150~200 mg/ml범위로 유사한 독성효과를 보이고 있으며, 400 mg/ml의 농도에서 80 % 이상의 치사효과를 보이고 있다.

AML-2/WT 세포에서는 어떤 활성도 보이지 않은 수용성 분획물 이외에도 세가지 분획물의 전체적인 IC<sub>50</sub> 값의 범위가 400 mg/ml정도였다.

총괄하면 內消升麻湯의 열수 추출물에서는 정상 세포인 NIH3T3 세포에서 수용성 분획물을 제외한 세가지 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 200~300 mg/ml 농도 범위를 보였는데, Calu-6과 SNU-601 세포에서는 각각 80~120 mg/ml, 100mg/ml이내의 농도 범위로 NIH3T3 세포의 IC<sub>50</sub> 값보다 작아 정상세포에 대해 손상을 주지 않는 범위에서 폐암과 위암에 대한 세포독성 효과가 가장 높았다. 또한 內消升麻湯의 열수 추출물을 4 종류의 분획으로 나누었을 경우, 부탄을 분획물은 대부분의 암세포주인 Caco-2 세포, Calu-6 세포, SNU-601 세포, HCT116 세포에 대하여 상당한 세포독성력을 가지고 있는 것으로 나타나 부탄을 분획물에 암세포의 생육을 효과적으로 억제할 수 있는 유효성분이 있음을 시사하고 있다.

항암제는 암세포의 각종 대사경로에 개입하여 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 複製 轉寫나 翻譯 과정을 遮斷하거나 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 항암활성 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타내는데, 세포독성은 비특이적 방어기전으로서 암세포에 직접적으로 손상을 줄 뿐만 아니라 동물 생체 내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대하여 세포독성 효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포독성 효과를 항진시키는 것으로 보고되고 있다<sup>34,35)</sup>. 항암제는 그 작용기전과 화학구조에 의거하여 알킬화제(alkylating agents), 대사길항제(antimetabolites), 항암성항생제(anti-biotics), 식물성 알칼로이드(plant alkaloids), 호르몬제(hormonal agents), 기

타제제(miscellaneous agents) 등 6종으로 분류된다<sup>34-35)</sup>. 현재까지 암치료에 이용되고 있는 기존의 화학요법은 시행 초기에는 종양의 크기가 줄어드는 민감한 반응을 나타내나 점차 암세포가 항암제에 대하여 내성을 획득하게 되어 결국 항암제를 이용한 화학요법이 큰 실효를 나타내지 못하고 있다<sup>36-38)</sup>. 특히, 암세포의 다제내성(multidrug-resistance, MDR)은 구조와 작용기전이 서로 다른 여러 항암제에 대하여 교차내성을 나타냄으로써 화학요법에서 가장 큰 장애가 되고 있다<sup>36-38)</sup>. 지금까지 여러 가지 약물들이 다제내성 조절 활성이 있음이 연구<sup>25)</sup>되고 있으나, 이들 약물의 인체에 대한 부작용과 유해성 때문에 천연물로부터 다제내성 극복 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다<sup>26-27)</sup>. 본 실험에서는 항암제에 내성을 가진 암세포주에 內消升麻湯을 항암제와 병용 투여하였을 경우 그 내성을 어느 정도 극복할 수 있는지를 관찰하였다. 內消升麻湯의 열수 추출물과 에탄올 추출물을 항암제에 내성을 가진 암세포주에 항암제 vincristine과 병용 투여시 암세포 성장을 더욱 효과적으로 억제함을 보였고, 열수 추출물을 다시 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올, 수용성의 네 종류의 분획으로 나누어 그 항암제 내성 억제효과를 관찰하였는데 항암제 vincristine과 병용 투여시 헥산 분획물에서 가장 효과적으로 작용하였다.

이상의 결과들을 종합하여 볼때 內消升麻湯은 항산화 효과와 암세포주에 대해 항암효과 뿐만 아니라 항암제 내성 암세포주에 대해서도 항암제와의 병용투여를 통해 생육 저해 효과를 증대하는 효과가 있음을 확인하였으며, 그 기전과 임상상 활용에 대한 더 많은 연구 개발이 필요할 것으로 생각된다.

### V. 結 論

內消升麻湯의 항암효과를 알아보기 위해 항산화

효과, 세포독성 효과, 항암제 내성 암세포에 대한 항암제 병용투여 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 열수 추출물이 에탄올 추출물에서 보다 높은 항산화 활성을 나타내었고, 열수 추출물의 용매 분획에서는 부탄올 > 에틸 아세테이트 > 헥산 > 수용성 분획물의 순으로 항산화 효과가 나타났다.
- 2) 內消升麻湯의 열수 추출물의 암세포에 대한 세포 독성은 Calu-6 세포와 SNU-601 세포에서 높은 세포독성효과를 나타내었다.
- 3) 內消升麻湯의 열수 추출물의 용매분획물의 암세포에 대한 세포 독성을 측정된 결과는 다음과 같다.
  - (1) NIH3T3 세포에서는 수용성 분획물을 제외한 세가지 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 200~300 mg/ml 농도범위로 나타났다.
  - (2) Caco-2 세포에서는 부탄올 분획물에서만 세포독성 효과가 있었다.
  - (3) Calu-6 세포에서는 헥산 분획물이 가장 높은 독성효과(IC<sub>50</sub>:80 mg/ml)가 있었고, 에틸아세테이트와 부탄올 분획물도 세포독성효과(IC<sub>50</sub>:100~120 mg/ml)가 있었다.
  - (4) MCF-7 세포에서는 헥산·에틸 아세테이트·부탄올 분획물들이 유사한 세포독성효과가 있었다.
  - (5) SNU-601 세포에서는 수용성 분획물을 제외한 세가지 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 100 mg/ml이 내로 세포 독성 효과가 있었다.
  - (6) HCT-116 세포에서는 수용성 분획물을 제외한 세가지 분획물에서는 IC<sub>50</sub> 값이 150~200 mg/ml범위로 유사한 세포독성효과가 있었다.
  - (7) AML-2/WT 세포에서는 모든 용매분획물이 세포독성효과가 없었다.
- 4) 內消升麻湯을 항암제에 내성을 가진 암세포주에 內消升麻湯과 항암제 vincristine을 병용 투

여시 열수와 에탄올 추출물, 열수 추출물의 핵산 분획물에서 항암효과가 증가되었다.

參考文獻

1. 齊德之. 外科精義 外 三種合本. 서울. 醫聖堂. 1999: 104-105.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울. 법인문화사. 2002: 1442-1443.
3. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1985: 106-109.
4. 顧伯康. 中醫外科學. 北京. 人民衛生出版社. 1987: 126-128.
5. 지선영. 동의피부과학. 서울. 일중사. 1996: 44-49.
6. 楊醫竝. 中醫學問答(下). 北京. 人民衛生出版社. 1985: 356-357, 369-370.
7. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 北京. 北京科學技術出版社. 1983: 1-10.
8. 서울대학교의과대학 편. 종양학. 서울. 서울대학교출판부. 2001: 1-3.
9. 이창혜외 3인. 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성. 연세대학교의과대학 논문집. 1983: 16: 180.
10. Kim, S.H. Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay. J. Kor. Cancer Assoc. 1989: 21: 11.
11. Park, C.G., Lim, D.K., Kook, Y.H., Cha, C.R. and Paik, C.G. In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines. J. Kor. Cancer Assoc. 1990: 22: 61.
12. Ito, N and Shimura, K. Studies on antitutor activity of traditional Chinese medicines. Japan J. Cancer Chemother. 1985: 12: 2149.
13. Komiyama, K and Hirokawa, Y. Potentiation of chemotherapeutic activity by a Chinese herb medicine Juzen-Tai-Ho-Tho. Japan J. Cancer Chemother. 1988: 15: 1715.
14. Masaki Aburada. Protective effects of Juzen-Tai-Ho-Tho against adverse reactions associated with mitomycin C. Recent Advances in the pharmacology of Kampo medicine. 1988: 275.
15. 유미경외 3인. 타리산이 항암에 미치는 작용기전 연구. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2005: 18(1): 71-81.
16. 이선구. 완폐당이 실험적 폐전이암에 대한 항암 및 면역효과에 관한 연구. 東醫生理病理學會誌. 2003: 17(3): 711-718.
17. 이진화. 數種의 補氣補血 韓藥의 血管新生 抑制效果. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2002: 8(1): 79-92.
18. 김성언 외. 가미삼출삼자탕의 항암활성에 관한 연구. 東醫生理病理學會誌. 2002: 16(4): 667-673.
19. Nowak, K. Kujawa, R. Zadernowski, R. Antioxidative and antibacterial properties of phenolic compounds in rapeseed. Fat Sci. Technol 1992: 94: 149-152.
20. Brand-Wiliams, W., M.E. Cuvelier, C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Technology 1995: 28: 25-30.
21. Lee, J.O., M.C. Kim, M.H. Kim, J.S. Park, J.W. Kim, K.H. Song, D.W. Shin, J.M. Mok and H.K. Shin. Studies on the phenolic compounds and the antioxidant properties of various plants used as

- commercial teas (I) (in Korean). The Annual Report of KFDA 1996: 1: 21-32.
22. Matsuzaki, T. and Y. Hara. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1985: 59: 129-134.
23. Chung, H.K. Park, J.H. Lim, J.K. Lee, K.J. Chung, G.Y. and Jeoung, H.J. The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 2003: 11(1): 31-39.
24. Yim, H.B. Lee, G.S. and Chae, H.J. Cytotoxicity of Ethanol Extract of *Raphanuse Sativus* on a Human Lung Cancer Cell Line. *Kor. J. Soc. Food, sci.* 2004: 33(2): 287-290.
25. Hwang, E.J., Y.J. Cha, M.H. Park, J.W. Lee and S.Y. Lee. Cytotoxicity and chemosensitizing effect of camellia (*Camellia japonica*) tea extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 2004: 33(3): 487-493.
26. Kim, J.R., S.Y. Kim, J.H. Kim. Reversal effect of antihistamines on multidrug resistance in adriamycin and vincristine resistant L1210 variants. *J. Kor. Cancer Association* 1995: 27(1): 130-137.
27. Kim, S.E., B.Y. Hwang, Y.H. Kim, Y.C. Kim. Multidrug-resistance reversing activity of medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 1997: 28(4): 174-178.
28. 전국한의과대학 본초학 교실 편저. *本草學*. 서울. 영림사. 1999: 151, 178, 195, 243, 350, 540, 579.
29. Fridovich, I. The biology if oxygen radicals. *Science.* 1978; 201, 875.
30. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine:some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986: 246: 501-14.
31. Johannsen, P., Valender, G. and Mai, J. Glutathion peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1991: 54: 697.
32. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the cental nervous system. *J. Neurochem.* 1992: 59: 1609.
33. Marx, J.L. Oxygen free radicals linked to many disease. *Science.* 1987: 235: 529-31.
34. 김경환 엮음. 이우주의 약리학강의(제4판). 서울. 의학문화사. 1997: 633-690.
35. James, B., Lyoyd, H. Cecil textbook of medicine. W. B. Saunders Co. 1985: 1090-1100.
36. 차운정. 위암세포에서 metallothionein 발현과 항암제에 대한 내성과의 관계. 조선대 대학원 박사학위논문. 2003.
37. Kim, S.H. Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay. *J. Kor. Cancer Assoc.* 1989: 21: 11.
38. Park, C.G., Lim, D.K., Kook, Y.H., Cha, C.R. and Paik, C.G. In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.* 1990: 22: 61.