

## 益氣養榮湯의 항산화 및 유방암 세포주 생장 억제 효과에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 부인과학교실  
이진아, 박경미, 조성희

### ABSTRACT

#### Antioxidative and Anti-proliferative Effects on MCF-7 Human Breast Cancer Cells of *Ikiyangyoung-Tang*

Jin-A Lee, Kyung-Mi Park, Seong-Hee Cho  
Dept. of Oriental OB & GY, College of Oriental Medicine,  
DongShin University

**Purpose:** Breast cancer is the most common disease in Korean women. Despite remarkable improvements in treatment strategies against various cancer during the past 40 years, breast cancer still remains as one of the main causes of cancer mortality among women in the whole world.

This study was carried out to investigate antioxidative and anti-proliferative effects on MCF-7 human breast cancer cells of *Ikiyangyoung-Tang* extract.

**Methods:** We measured a content of polyphenol and flavonoid in the *Ikiyangyoung-Tang* extract, eliminative ability of DPPH radical, ABTS free radical and hydrogen peroxide, antioxidative effects of linoleic acid, cytotoxicity on MCF-7 human breast cancer cells. MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(DMEM/F12) supplemented with 10 % fetal bovine serum(FBS: Gibco) and antibiotics.

**Results:** The extract of *Ikiyangyoung-tang* contains polyphenol of  $168.3 \pm 12.8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  and flavonoid of  $84.3 \pm 3.4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Above results show profitable abilities of elimination of  $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) radical, ABTS free radical and hydrogen peroxide. Also, the extract of *Ikiyangyoung-Tang* strongly inhibits the proliferation of MCF-7 cells in a dose dependent manner. And, it has cytotoxicity on NIH3T3 cells.

**Conclusion:** It can be concluded that *Ikiyangyoung-Tang* extract has an antioxidative effect and antiproliferative effect on MCF-7 human breast cancer cells.

**Key Words:** human breast cancer, MCF-7, Ikiyangyoung-Tang antiproliferation, cytotoxicity, antioxidative effect

## I. 서론

유방암은 세계적으로 흔한 악성 종양의 하나로 산업의 발달, 생활습관, 식생활의 변화로 인하여 증가 속도가 가장 빠른 암 중의 하나로 2002년 한국중앙암등록본부의 발표에 따르면 우리나라의 유방암 발생빈도는 약 16.8 %로 여성암 중 발생빈도 1위를 차지하고 있다<sup>1)</sup>.

유방암의 증상으로는 유방종괴, 유방통, 병적 유두 분비물 등이 있으며 이에 대한 서양의학적인 치료로는 외과적 절제술인 수술요법, 항암화학요법, 방사선요법, 면역요법, 호르몬요법 등이 병용되고 있다<sup>2,3)</sup>. 과학이 발달함에 따라 이를 이용한 치료율은 점점 높아지고 있으나, 또한 이와 더불어 유방소실 등 각종의 많은 부작용이 발생하고 있다<sup>4,5)</sup>. 따라서 이와 같은 부작용의 발생과 증상완화, 재발과 전이 방지, 각종 치료를 하였음에도 불구하고 기대치가 낮은 말기암 환자의 삶의 질을 높이기 위한 방법으로 한의학적 치료에의 수요는 증가하고 있다. 이에 유방암의 새로운 치료법을 연구, 모색하는 일이 절실히 요구되고 있으며 한의학적 접근과 치료법을 모색하여 유방암에 대한 한약의 치료 효과와 치료 기전을 규명하는 일이 더욱 중요해지고 있다.

유방암에 해당하는 한의학적 질환명으로는 石癰<sup>6)</sup>, 乳巖<sup>7)</sup>, 奶巖<sup>8)</sup>, 番花奶<sup>9)</sup> 등이 있으며 隋代 巢<sup>6)</sup>에 “石癰之狀 … 無大熱 但結核如石 謂之石癰”이라 하여 처음 기재되었다. 乳房腫塊가 주증상으로 不痛, 不痒, 不赤하고 혹, 內熱 夜熱 五心煩熱 肢體倦瘦 月經不調 등의 증상<sup>7,10)</sup>이 나타나기도 하며, 원인으로는 肝氣鬱結

<sup>7,11)</sup>, 氣血虧損<sup>7)</sup>, 肝鬱脾虛失運<sup>12)</sup>, 氣滯痰凝<sup>13)</sup>, 思慮傷脾<sup>14)</sup>, 風寒之氣<sup>6)</sup> 등이 있고, 治法으로는 초기에는 疏氣行血<sup>8)</sup> 하고 후기에는 大補氣血<sup>15)</sup>한다.

본 실험에 사용된 益氣養榮湯은 武<sup>13)</sup>의 《濟陰綱目》에 수록되었으며, “治抑鬱及勞傷血氣, 頸項兩乳或四肢腫硬, 或軟而不赤不痛, 日晡微熱, 或潰而不斂, 并皆治之”라 하여 氣血兩虧할 때 大補氣血하여 乳巖을 치료하는 처방이다.

유방암에 대한 기존 한의학 연구로는 김 등<sup>16)</sup>의 유방종괴에 대한 문헌적 고찰, 김 등<sup>17)</sup>의 유방암의 다용약물에 관한 문헌적 고찰, 서<sup>18)</sup>의 淸肝解鬱湯이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암세포에 미치는 영향, 박<sup>19)</sup>의 SKBR3 유방암세포주에 대한 鬼箭羽 메탄올 추출물의 성장억제 및 항산화 효과, 용 등<sup>20)</sup>의 황금의 유방암세포주에 대한 항암작용, 권 등<sup>21)</sup>의 반지련이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구, 여 등<sup>22)</sup>의 봉독약침액에 의한 인체 유방암세포의 성장억제 및 세포에 관한 연구 등이 있었으나 益氣養榮湯에 관한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 부작용이 적고 안정적인 유방암 치료제 개발을 위한 연구의 일환으로 益氣養榮湯이 유방암에 효과가 있는지 알아보기 위하여 益氣養榮湯 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거활성, ABTS free radical 소거활성, hydrogen peroxide 소거활성, linoleic acid에 대한 항산화 효과 등을 관찰하였고, 인간 유방암 세포주 MCF-7의 성장 억제 효과, 益氣養榮湯의 분획별 DPPH 라디칼 소거 활성, MCF-7에 대한 n-hexane 분획물 세포독성 효과, MCF-7에 대한 ethyl acetate

분획물의 세포 독성 효과, MCF-7에 대한 butanol 분획물의 세포 독성 효과, MCF-7에 대한 수용성 분획물의 세포 독성 효과, MCF-7에 대한 각 분획물에서의 IC<sub>50</sub>값을 측정함으로써 인간 유방암 세포주 MCF-7에 대한 세포독성과 세포성장억제 효과 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

본 실험에서 사용한 益氣養榮湯은 武<sup>13)</sup>의 《濟陰綱目》에 수록된 내용에 준하였으며, 본 실험에 사용된 약제는 ○○대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Ikiyangyoung-Tang

韓藥名 (Herbal Name)	生 藥 名 (Scientific Name)	重 量 (Weight, g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	8.0
白朮(炒)	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	8.0
茯 苓	<i>Poria</i>	4.0
陳 皮	<i>Citri pericarpium</i>	4.0
貝 母	<i>Fritillariae Cirrhosae Bulbus</i>	4.0
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	4.0
當歸(酒拌)	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4.0
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4.0
黃芪(鹽水拌炒)	<i>Astragali Radix</i>	4.0
熟地黃(酒拌)	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4.0
白芍藥(炒)	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4.0
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
甘草(炒)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	4.0
Total Amount		64.0

#### 2) 암 세포주 및 시약

본 실험에 사용된 세포주는 인간 유방암 세포주인 MCF-7을 이용 하였고, 대조군으로 사용하기 위한 정상세포로는 NIH3T3를 사용하였다. MTT 등의 시약은 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였고, 세포 독성 측정을 위해서 microplate reader(Bio-Tek, USA)를 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 열수 추출물 조제 및 분획의 획득

2 첩 분량에 해당하는 128 g에 1차 증류수 1500 ml를 첨가하여 전기약탕기(DWP-99000T, 한국)로 120 분 전탕한 후 Whattman paper No. 1로 여과한 여과액을 건조기(비전과학, 한국)에서 건조하여 추출물 27.0 g을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁시킨 다음 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 H<sub>2</sub>O 등의 용매로 분획하여 농축한 후 동결 건조하여 냉장 보관하면서 시료로

사용하였다(Fig. 1).

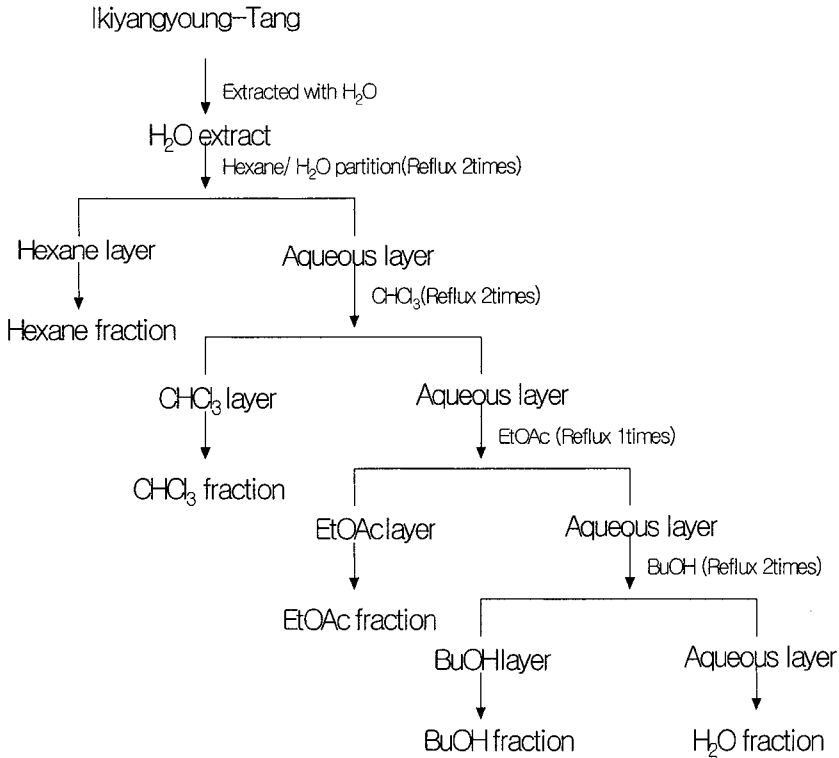


Fig. 1. Procedure of various solvent fraction from Ikiyangyoung-Tang.

2) 총 폴리페놀 함량

시료의 총 페놀함량은 페놀성 물질이 phosphomolibdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 법<sup>23)</sup>을 응용하여 측정하였다. 즉 시료 1 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 ml에 2배 희석한 Folin 시약 2 ml을 첨가하고 잘 혼합한 후 3 분간 실온에서 방치시켰다. 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액을 2 ml을 넣고 1 시간 실온에서 방치시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량을 구하였다. 이때 표준 검량곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였으며 그 농도가 5, 25, 50 µg/ml가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 측정하였다.

3) 총 플라보노이드 함량

시료 중의 총 플라보노이드 함량은 Nieva 등<sup>24)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. 추출물 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 ml을 혼합한 혼합물 0.5 ml에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 ml 그리고 80% 에탄올 4.3 ml을 가하여 실온에 40 분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin 검량선과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다. Quercetin을 이용한 표준 곡선은 quercetin의 최종 농도가 5, 25, 50 µg/ml가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

4) α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH)

#### radical 소거활성

DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800  $\mu$ l와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200  $\mu$ l를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인  $RC_{50}$  값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA와 ascorbic acid를 사용하였으며 시료농도의 1/10이 되도록 첨가하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하였다.

#### 5) ABTS radical 소거활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은  $ABTS^+$  cation decolorization assay방법<sup>25)</sup>에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical Co., USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 어두운 곳에서 24시간 동안 방치하여  $ABTS^+$ 를 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이  $0.70(\pm 0.02)$ 이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990  $\mu$ l에 sample 10  $\mu$ l를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

#### 6) Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide radical에 소거활성은 Müller<sup>26)</sup>의 방법에 따라 96 well micro plate에 PBS 100  $\mu$ l, 물에 녹인 시료 20  $\mu$ l를 넣고 1 mM  $H_2O_2$ 를 가하여 5분간 방치한 다음 1.25 mM ABTS 30  $\mu$ l와 PBS에 녹인 1 u/ml peroxidase 30

$\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7) Linoleic acid에 대한 항산화 효과

Linoleic acid의 과산화에 대한 저해 효과 검정은 Haraguchi 등<sup>27)</sup>의 방법에 준해 다음과 같이 실험하였다. linoleic acid의 기질용액은 95%의 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid 4 ml, 50 mM sodium phosphate buffer(pH7.0) 8 ml와 absolute alcohol 4 ml를 가하여 제조한 후 cap을 한 뒤 40°C에서 100 rpm으로 12일간 incubation하였다. 먼저 FTC가의 측정을 위해서 linoleic acid 반응기질 용액 0.1 ml를 취해 75% ethanol 9.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml, 20 mM ferrous chloride 0.1 ml와 혼합하여 3분간 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TBA가의 측정을 위해 기질용액 1 ml에 20% trichloroacetic acid 2 ml와 0.8% thiobarbituric acid 시약 2 ml를 가한 후 혼합하여 95°C 수욕 상에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시키고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

#### 8) 암세포에 대한 독성

##### (1) 암세포 배양

MCF-7의 배양은 RPMI1640 복합배지를, NIH3T3는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)을 이용하여 10% Fetal Bovine Serum과 항생제(Antibiotic antimycotic)를 첨가하여 37°C, 5%  $CO_2$ 의 습윤화 된 incubator에서 적응시켜 배양하였다. 기타의 세포 배양법 및 독성 평가 방법은 기존의 방법<sup>28-37)</sup>에 준하여 사용하였다.

(2) 세포 독성 측정

암세포에 대한 세포 독성능 측정은 MTT 검정법으로 실험하였다. 암세포에 대한 세포독성능을 측정하기 위해 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 인체암세포와 정상세포를  $2\sim 4 \times 10^4$  cell/ml의 농도가 되도록 조절하여 96 well microplate에 세포부유액 90  $\mu$ l 씩 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  $\mu$ l 씩을 가해주고 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 배양기에서 4 시간 30 분 더 배양함으로써 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 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.

3. 통계 처리

본 연구의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 평균값의 유의성을 5 % 이내의 한계로 조사하였다.

III. 실험 성적

1. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

추출물 중에 존재하는 폴리페놀은 약  $168.3 \pm 12.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났으며, 플라보노이드는 약  $84.3 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타

났다(Fig. 2).

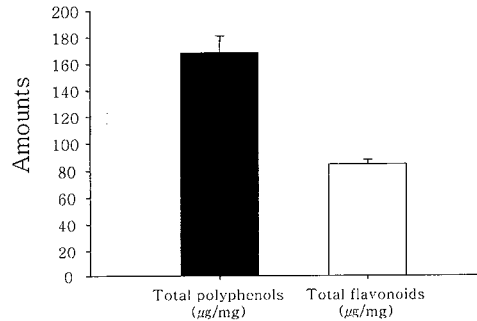


Fig. 2. Contents of total polyphenols and flavonoids in extracts from Ikiyangyoung-Tang.

Miligrams of total polyphenol content/g of extracts based on tannic acid as standard. Miligrams of total flavonoid content/g of extracts based on quercetin as standard. Each value is mean±SD (n≥3).

2. DPPH radical 소거활성

익기양영탕 추출물과 BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 익기양영탕 추출물이  $27.1 \pm 3.6\%$ 의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid는 각각  $85.2 \pm 3.6\%$  및  $95.7 \pm 2.9\%$ 의 강력한 항산화능을 보였다. 익기양영탕 추출물의 경우 농도를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 늘렸을 경우 DPPH 라디칼 소거능도 증가하는 양상을 보였다(Fig. 3).

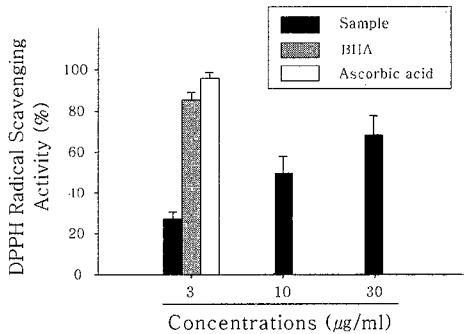


Fig. 3. DPPH free radical scavenging activity of butylated hydroxyanisole(BHA), ascorbic acid and various concentrations of Ikiyangyoung-Tang.

Extracts were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 min. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. Each value was expressed as mean±standard deviation (n≥3).

### 3. ABTS free radical 소거활성

이끼양영탕 추출물의 ABTS+· 소거활성을 BHA, ascorbic acid와 비교 측정 한 결과 3 µg/ml 농도에서 BHA는 39.1±2.8%, ascorbic acid는 54.8±1.6%의 소거능을 보인데 비해 이끼양영탕 추출물은 3, 10 및 30 µg/ml 농도에서 각각 4.7±2.6%, 18.6±3.2% 및 65.3±3.5%의 소거능을 보였다(Fig. 4).

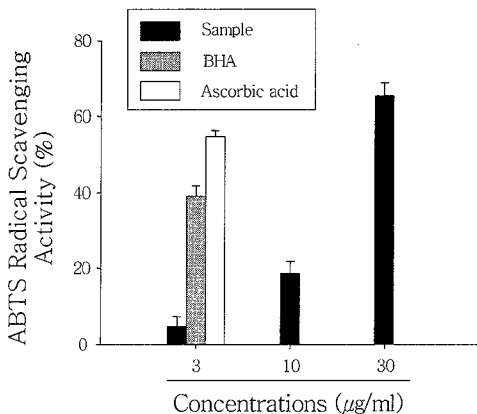


Fig. 4. ABTS free radical scavenging activity of butylated hydroxyanisole(BHA), ascorbic acid and various concentrations of

### Ikiyangyoung-Tang.

Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. Each value was expressed as mean±standard deviation (n≥3).

### 4. Hydrogen peroxide 소거활성

BHA 및 ascorbic acid는 3 µg/ml의 농도에서 12.7±4.3% 및 53.7±5.8%의 소거능을 보여 hydrogen peroxide에 대해서는 활성이 강하지 못하였는데, 이끼양영탕 추출물의 경우 3, 10 및 30 µg/ml 농도에서 각각 6.6±1.6%, 18.8±3.5% 및 49.2±4.4%의 비교적 강한 소거능을 보였다(Fig. 5).

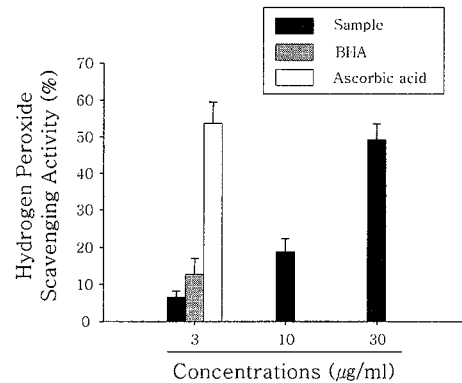


Fig. 5. Hydrogen peroxide scavenging activity of butylated hydroxyanisole(BHA), ascorbic acid and various concentrations of Ikiyangyoung-Tang.

Activities were determined by measurement of absorbance at 405 nm. Each value was expressed as mean±standard deviation (n≥3).

### 5. Linoleic acid에 대한 항산화 효과

대조군으로 사용한 BHA 및 ascorbic acid의 경우 3 µg/ml 농도에서 각각 0.32±0.08 및 0.31±0.05의 흡광도를 보였는데 비해, 이끼양영탕 추출물을 3, 10 및 30 µg/ml 농도로 처리하였을 경우 각각 0.4±0.1, 0.36±0.2 및 0.41±0.14의 흡광

도를 보였다(Fig. 6).

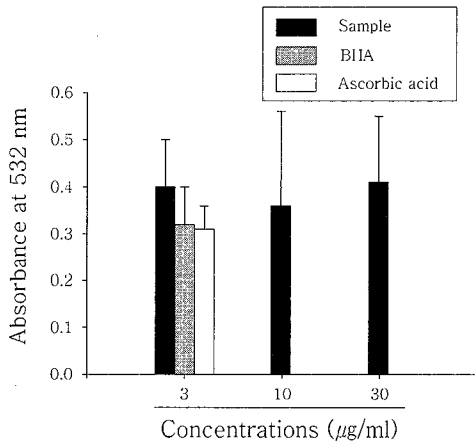


Fig. 6. TBA values in linoleic acid emulsion treated with BHA, ascorbic acid and various concentrations of Ikiyangyoung-Tang.

Activities were determined by measurement of absorbance at 532 nm. Each value was expressed as mean±standard deviation(n≥ 3).

### 6. MCF-7 성장 억제 효과

익기양영탕 추출물의 유방암 세포주 MCF-7에 대한 세포 독성을 확인한 결과 10 µg/ml 농도에서는 전혀 항암 활성을 나타내지 못하였으며, 300 µg/ml 이상의 농도에서 유의성있게 세포 성장을 억제함을 보였다(Fig. 7).

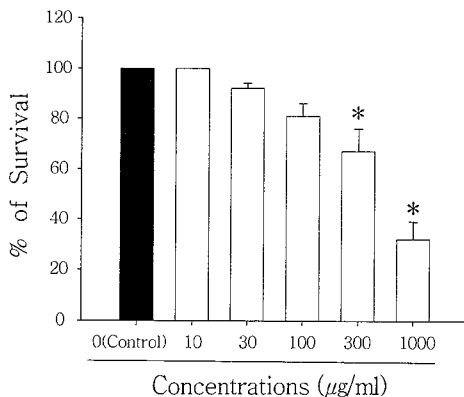


Fig. 7. The viability of cells was measured by MTT activities in water

extract of Ikiyangyoung-Tang on human cancer cell MCF-7.

\*, Statistically different(p<0.05) when compared with control group.

### 7. 익기양영탕의 분획별 DPPH 라디칼 소거 활성

익기양영탕 추출물로부터 다시 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획을 얻어 각기 30 µg/ml 농도에서의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획에서 각각 22±3%, 41±4%, 35±6% 및 2±0.6%의 소거 활성을 보였는데, 특히 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 비교적 강한 소거 작용을 나타냈다(Fig. 8).

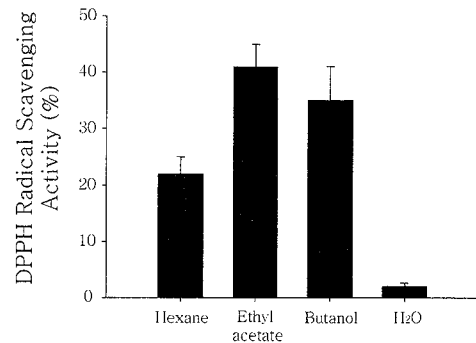


Fig. 8. DPPH free radical scavenging activity of various fractions of Ikiyangyoung-Tang at 30 µg/ml concentration.

Extracts were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 min. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. Each value was expressed as mean±standard deviation(n≥3).

### 8. MCF-7에 대한 n-Hexane 분획물 세포 독성 효과

유방암 세포주인 MCF-7에 대한 hexan 분획물의 세포 독성은 약 225.4 µg/ml의 농도에서 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었는데 비해 정상세포인 NIH3T3에 대한 세포 독성



은 약 184.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 나타나 비교적 강한 세포독성을 나타냈으나, 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다(Fig. 9).

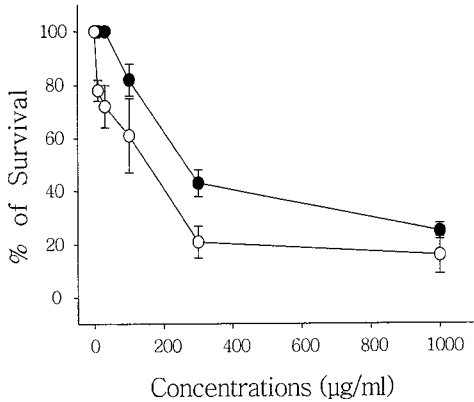


Fig. 9. The viability of cells was measured by MTT activities in n-Hexane fraction from water extract of Ikiyangyoung-Tang on human cancer cell MCF-7(closed circle) and human murine fibroblast NIH3T3(open circle).

9. MCF-7에 대한 ethyl acetate 분획물의 세포 독성 효과

Ethyl acetate 분획물은 유방암 세포인 MCF-7에서  $\text{IC}_{50}$ 값이 236.9  $\mu\text{g/ml}$ , NIH3T3에 대해서  $\text{IC}_{50}$  값이 145.2  $\mu\text{g/ml}$ 로 비교적 강한 세포 독성을 나타내었으나, 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다(Fig. 10).

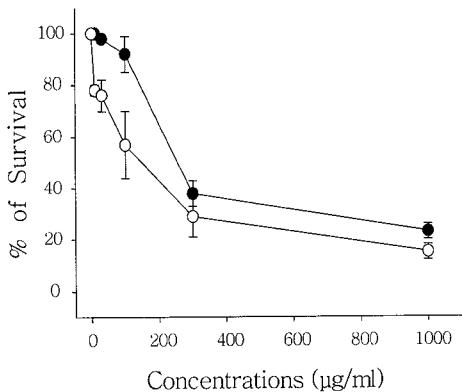


Fig. 10. The viability of cells was measured by MTT activities in ethyl acetate fraction from water extract of Ikiyangyoung-Tang on human cancer cell MCF-7(closed circle) and human murine fibroblast NIH3T3(open circle).

10. MCF-7에 대한 Butanol 분획물의 세포 독성 효과

부탄올 분획물에 대한 암세포의 독성 효과를 비교한 결과 유방암 세포인 MCF-7에서  $\text{IC}_{50}$ 값이 약 205.7  $\mu\text{g/ml}$ , 정상세포인 NIH3T3에 대해서  $\text{IC}_{50}$ 값이 276.5  $\mu\text{g/ml}$ 로 비교적 강한 세포 독성을 나타내었으나, 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 거의 없었다(Fig. 11).

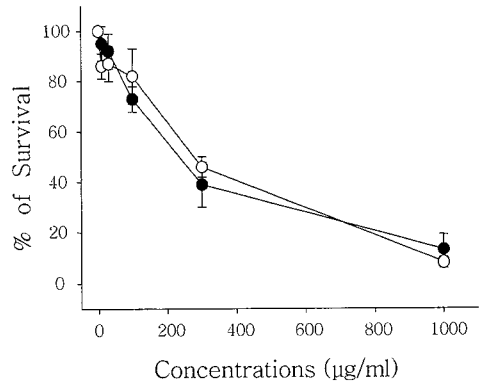


Fig. 11. The viability of cells was measured by MTT activities in butanol fraction from water extract of Ikiyangyoung-Tang on human cancer cell MCF-7(closed circle) and human murine fibroblast NIH3T3(open circle).

11. MCF-7에 대한 수용성 분획물의 세포 독성 효과

수용성 분획물은 유방암 세포주인 MCF-7 및 정상 세포인 NIH3T3에 대해서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 12).

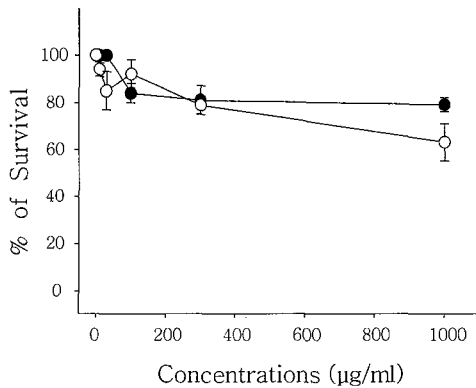


Fig. 12. The viability of cells was measured by MTT activities in H<sub>2</sub>O fraction from water extract of Ikiyangyoung-Tang on human cancer cell MCF-7(closed circle) and human murine fibroblast NIH3T3(open circle).

12. MCF-7에 대한 각 분획물에서의 IC<sub>50</sub>값

헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획의 IC<sub>50</sub>값은 Table 2와 같다. 즉, 익기양영탕의 항암 활성은 비선택적이었으며, 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서는 항암 활성이 비교적 강하게 나타났으나 수용성 분획에서는 항암 활성이 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. The Cytotoxicity effects of various fraction from Ikiyangyoung-Tang on MCF-7

Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/ml)	
	MCF-7 <sup>2)</sup>	NIH3T3 <sup>3)</sup>
Hexane	225.4	184.5
EtOAc	236.9	145.2
BuOH	205.7	276.5
H <sub>2</sub> O	≥ 1000	≥ 1000

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

<sup>1)</sup>Extract concentrations which inhibit 50% growth of the cells

<sup>2)</sup>human breast adenocarcinoma pleual effusion

<sup>3)</sup>murine fibroblast.

IV. 고 찰

유방암은 유방에 발생하는 악성 종양으로 대부분 유즙분비의 관, 미세관에 있는 선상피세포로부터 발생하는 전형적인 선암종이다<sup>38)</sup>. 한국 여성의 유방암 발생빈도는 2001년 16.1 %로 위암을 추월하여 1위를 차지한 이후 현재까지 여성 발생암 1위를 고수하고 있고, 미국의 경우도 19 %의 발생률로 미국 여성에서 가장 흔하게 발생하는 암으로 제시되고 있다. 우리나라의 경우 발병 연령이 40-50 대로 외국 여성의 60-70 대에 비해 더 낮은 추세를 보이고 있으며, 2002년 새로 발생한 암환자 중 증가율 1위를 차지하였다. 이것은 1995년에 비하면 약 166 % 가량 증가한 것으로 그 증가 속도가 가장 빨라지고 있으며, 따라서 그 위험성 또한 매우 높아지고 있는 추세이다<sup>1)</sup>.

유방암은 40대 이후, 남자보다는 여자에게 다발하며, 유전적으로 유방암을 가진 친인척이 있는 여성은 3배, 유방암 환자의 딸은 평균 3-11배 정도의 증가된 위험요소를 가지고 있다. 또한, 에스트로겐에의 장기간 노출 즉 고령출산, 미경산부, 조기 초경, 만기 폐경의 경우에 호발하며<sup>3)</sup>, 여성의 사회 활동에 따른 경구피임약제의 복용과 각종 정신적 스트레스, 식생활의 변화에 따른 지방식이 섭취와 비만도의 증가에 따라 유방암의 위험도도 증가되고 있다<sup>3,5)</sup>. 대표적 증상으로는 유방종괴, 섬유화, 유방통, 병적 유두분비물이 있으며<sup>2,3)</sup>, 치료는 변형근치유방절제술이나 유방보존술식의 외과적 절제 등의 수술요법과 이에 병행하여 방사선 요법이나 항암화학요법, 호르몬 요

법 등을 시행하고 있으나<sup>4,5)</sup>, 그간의 유방암 발생률 추이나 5년 생존율, 재발률 등을 고려할 때 이런 치료법들은 충분히 효과적이지 않은 것으로 보고되고 있다. 지난 수 십 년 동안 다양한 암 치료법의 발전이 있었음에도 불구하고 유방암은 여전히 세계 여성 사망의 주요한 원인이 되고 있기 때문에 새로운 치료법을 연구, 모색하는 일이 절실히 요구되고 있으며, 유방암 치료에 대한 한의학적 접근도 더욱 중요해지고 있다.

유방암에 해당하는 한의학적 질환으로는 石癭<sup>6)</sup>, 乳巖<sup>7)</sup>, 奶巖<sup>8)</sup>, 番花奶<sup>9)</sup> 등이 있는데 그 중 고대문헌의 乳巖에 대한 서술이 현대 오늘날의 유방암에 대한 인식과 가장 유사한 것을 살펴볼 수 있다. 陳<sup>7)</sup>은 『婦人良方大全』에서 “初起內結小核, 或如髓棋子, 不赤不痛, 積之歲月漸大, 巖巖崩破, 如熟石榴, 或內潰深洞, 血水滴瀝”라 하였으며 주요 증상으로는 乳房腫塊, 不痛, 不痒, 不赤하며 或 內熱, 夜熱, 五心煩熱, 肢體捲瘦, 月經不調 等<sup>7,10)</sup>이 나타난다고 하였다.

乳巖의 病因은 주로 肝鬱氣滯<sup>7,11)</sup>, 憂怒抑鬱<sup>14)</sup>, 憂鬱傷肝<sup>12)</sup>, 思慮傷脾<sup>14)</sup> 등의 七情所傷과 이것이 오래되어서 氣血이 損傷되고 衝任이 실조되어 臟腑機能이 失調<sup>7)</sup>된 것으로 볼 수 있다. 治療는 초기에 肝氣鬱結로 인한 때는 疏氣行血, 疏肝解鬱<sup>8)</sup>하는 治法을 이용하여 十六味流氣飲이나 淸肝解鬱湯 등을 사용하였고, 오래되어 氣血虧損할 때에는 大補氣血<sup>15)</sup>하는 治法을 이용하여 益氣養榮湯을 사용하였다. 이에 고대 문헌의 乳巖에 대한 처방으로 언급된 益氣養榮湯이 말기 유방암이나 또는 전이되어 전신이 쇠약할 때 효과가 있을 것으로 사료되어

본 실험을 실시하였다.

유방암에 대한 기존 한의학 연구 발표로는 김<sup>16)</sup>의 유방종괴에 대한 문헌적 고찰, 김<sup>17)</sup>의 유방암의 다용약물에 관한 문헌적 고찰, 서<sup>18)</sup>의 淸肝解鬱湯이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암세포에 미치는 영향, 박<sup>19)</sup>의 SKBR3 유방암세포주에 대한 貴筋羽 메탄올 추출물의 성장억제 및 항산화 효과, 용 등<sup>20)</sup>의 황금의 유방암세포주에 대한 항암작용, 권 등<sup>21)</sup>의 반지련이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구, 여 등<sup>22)</sup>의 봉독약침액에 의한 인체 유방암세포의 성장억제 및 세포에 관한 연구, 하<sup>39)</sup>의 전이된 유방암 환자에 대한 미슬토를 사용한 면역요법의 임상례, 송<sup>40)</sup>의 항암단을 투여한 유방암 환자 60례에 대한 임상보고, 현 등<sup>41)</sup>의 가미쌍화당의 유방암 발생 및 전이 억제에 대한 실험적 연구, 정<sup>42)</sup>의 活絡效靈丹 추출물의 인간 유방암세포 MCF-7에 대한 성장억제 효과, 정<sup>43)</sup>의 三稜 추출물의 인간 유방암 세포 성장억제 효과, 반 등<sup>44)</sup>의 歸朮破癥湯 추출물의 인간 유방암세포에 대한 성장억제 효과 등이 있었으나 乳巖의 氣血虧損에 大補氣血하는 治法으로 多用한 益氣養榮湯에 관한 연구는 아직 접하지 못하였다.

본 실험에 사용된 益氣養榮湯은 武<sup>13)</sup>의 『濟陰綱目』에 수록된 처방으로 人蔘 白朮炒 各二錢, 茯苓 陳皮 貝母 香附子 當歸酒拌 川芎 黃芪鹽水拌 炒 熟地黃 酒拌 芍藥炒 桔梗 甘草炒 各一錢, 生薑三片으로 구성되어 있으며, “治抑鬱及勞傷血氣, 頸項兩乳或四肢腫硬, 或軟而不赤不痛, 日晡微熱, 或潰而不斂, 并皆治之”라 하여 氣血兩虧할 때 大補氣血하여 乳巖을 치료하는 처방이다.

또 “胸痞 減人參熟地黃各三分. 口乾 加五味子麥門冬. 往來寒熱 加軟柴胡地骨皮. 膿清 加人參黃芪. 膿多 加川芎當歸. 膿不止 加人參黃芪當歸. 肌肉遲生 加白斂官桂.”라 하여 증상에 따라 加減하였음을 알 수 있다.

구성약물의 효능을 살펴보면 人參, 白朮, 茯苓, 甘草는 四君子湯으로 甘溫하여 補脾胃하는 것으로 氣虛를 치료하는 補氣의 기본 방으로 소화기능증진, 신진대사촉진, 면역기능의 강화, 신경과 내분비기능을 왕성하게 하고, 熟地黃, 當歸, 芍藥, 川芎은 四物湯으로 補血의 기본방으로 부인병 諸疾患에 사용할 수 있다. 따라서 유방암의 증상들 유방종괴, 月經不調 등을 완화시킬 수 있다. 人參은 大補元氣, 陽生陰長하여 生津止渴의 효능이 있고 오랜 병으로 인한 氣虛의 증에 모두 적용할 수 있다. 또한 元氣가 허탈한 위급한 증에 응용하여 補虛救急의 要藥이 되므로 암의 후기에 발생할 수 있는 虛脫證에 유효할 것으로 사료된다. 陳皮는 理氣, 健脾, 燥濕, 化痰의 要藥이다. 貝母는 清熱散結하고 化痰止咳하는 효능이 있으며, 香附子는 理氣解鬱하고 止痛調經하므로 乳房脹痛등을 해소시킬 수 있다. 黃芪는 益偉固表하며 陽氣를 升擧시키고 補氣升揚하여 元氣가 下陷한 것을 升擧케 하므로 正氣를 고무시켜 托毒生肌하고, 陽氣를 溫運케 하여 利水消腫하므로 癰疽不潰등에 사용할 수 있다. 桔梗은 宣肺利咽하고 祛痰排膿의 효과가 있어 瘡瘍膿成不潰에 사용하며, 甘草는 清熱解毒의 효능으로 癰疽瘡腫에 內服이나 外用으로 쓰일 수 있다<sup>45-46)</sup>.

따라서 益氣養榮湯은 八物湯으로 補氣血하여 유방암 후기나 전이암에서 올 수

있는 氣血兩虧 상태를 개선시켜 扶正去邪하며, 黃芪는 補氣 固表托毒하고 香附子 陳皮로 理氣解鬱하여 유방창통, 유방종괴등을 개선시킬 수 있으리라 사료된다. 따라서 益氣養榮湯은 초기보다는 氣血兩虧한 후기 유방암이나 암이 다른 장기까지 전이되어 전신쇠약상태에 빠진 경우에 활용할 수 있다.

이에 저자는 益氣養榮湯의 항산화 효과와 인간 유방암 세포주 MCF-7 에 대한 세포독성과 세포생장억제 효과를 관찰하였다.

폴리페놀계 물질은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 총치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드 역시 항균·항암·항바이러스·항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 없으며 모든 질병의 원인이 되는 생체 내 산화작용을 억제한다는 사실이 알려지면서 플라보노이드 계(系) 물질의 개발 및 활용에 관한 관심이 지속적으로 커지고 있다<sup>47)</sup>.

益氣養榮湯을 추출하여 이에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 폴리페놀은 약 168.3±12.8 µg/mg, 플라보노이드는 약 84.3±3.4 µg/mg으로 나타났다(Fig. 2). 이는 益氣養榮湯 추출물이 다량의 항암, 항산화물질을 보유하고 있음을 의미한다.

자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 자유라디

칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있는데, 본 연구에서는 DPPH를 이용하여 그 상쇄 능력을 확인하였으며 DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 자유라디칼로서 cystein, glutathione과 같은 합유황아미노산과 ascorbic acid, BHA등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다<sup>48)</sup>.

益氣養榮湯 추출물의 DPPH radical 소거활성능을 살펴보기 위해 益氣養榮湯 추출물과 BHA, ascorbic acid의 DPPH 소거활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과 3  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 益氣養榮湯 추출물이 27.1 $\pm$ 3.6%의 소거능을 보였고, BHA와 ascorbic acid는 각각 85.2 $\pm$ 3.6% 및 95.7 $\pm$ 2.9%의 강력한 항산화능을 보였다. 益氣養榮湯 추출물의 경우 농도를 10  $\mu\text{g/ml}$  및 30  $\mu\text{g/ml}$ 로 늘였을 경우 DPPH 라디칼 소거능도 증가하는 양상을 보였다(Fig. 3). 이는 益氣養榮湯 추출물이 농도 의존적으로 항산화능을 보임을 시사한다.

ABTS 라디칼 소거활성법은 in vivo에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 in vitro에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있으며, ABTS와 potassium persulfate를 어두운 곳에 방치하여 ABTS+ $\cdot$ 이 생성되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+ $\cdot$ 이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 ABTS+ $\cdot$ 의 소거활성능을 측정할 수 있다<sup>49-51)</sup>.

益氣養榮湯 추출물의 ABTS+ $\cdot$  소거활

성을 BHA, ascorbic acid와 비교 측정된 결과 3  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 BHA는 39.1 $\pm$ 2.8%, ascorbic acid는 54.8 $\pm$ 1.6%의 소거능을 보인데 비해, 益氣養榮湯 추출물은 3, 10 및 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 4.7 $\pm$ 2.6%, 18.6 $\pm$ 3.2% 및 65.3 $\pm$ 3.5%로 특히 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 강력한 소거능을 보였다(Fig. 4). 이는 益氣養榮湯 추출물이 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 강력한 항산화능을 보인다고 할 수 있다.

益氣養榮湯 추출물의 hydrogen peroxide 소거능 측정 결과 BHA 및 ascorbic acid는 3  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 12.7 $\pm$ 4.3% 및 53.7 $\pm$ 5.8%의 소거능을 보인데 비해 益氣養榮湯 추출물의 경우 3, 10 및 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 6.6 $\pm$ 1.6%, 18.8 $\pm$ 3.5% 및 49.2 $\pm$ 4.4%로 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 비교적 강한 hydrogen peroxide 소거능을 보였다(Fig. 5). 이는 益氣養榮湯 추출물이 30  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 비교적 강한 항산화능을 보임을 시사한다. 이러한 결과를 토대로 추측건대 만일 益氣養榮湯으로부터 특정 성분을 지속적으로 검색하여 단일 물질을 분리·정제할 수 있다면 BHA나 ascorbic acid보다 우수한 hydrogen peroxide 소거활성능을 가지는 항산화 물질을 개발할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

지질은 산화되어 식품의 품질이나 생체에 부정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있는데 식품 중에 존재하는 지질은 대기 중의 산소와의 반응에 의한 산화적 산패 혹은 식품이나 미생물에서 유래하는 lipase가 촉매하는 가수분해 반응에 의해 쉽게 변질될 수 있으며<sup>52)</sup> 생체막에 존재하는 지질도 라디칼에 의해 지방산으로부터 수소원자가 박탈됨으로

써 산화되기 시작하여 반응성이 높은 유리 라디칼이 형성된다. 지질의 산화에 의해 생성된 hydroperoxide가 촉매력이 강한 전이 금속들에 의해 분해되어 만들어지는 alkoxy radicals (RO·), peroxy radicals (ROO·), hydroxyl radical (OH·) 및 malondialdehyde나 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한자이기도 하다<sup>53)</sup>.

益氣養榮湯 추출물을 linoleic acid 기질에 첨가하여 산화 방지 효과를 측정하여 보았는데, 지질산화 초기에 발생하는 과산화물은 ferrous chloride( $Fe^{2+}$ )를 ferric chloride( $Fe^{3+}$ )로 산화시켜 적갈색을 띄게 되며, 지질산화가 계속 진행된다면 malonaldehyde와 같은 저분자의 활성 화합물이 생성되는데 이것은 TBA와 결합하여 적색의 화합물을 형성하게 된다. 본 실험에서는 이렇게 생성된 적색 화합물의 양을 측정함으로써 산화의 정도를 확인하였다. 그 결과 대조군으로 사용한 BHA 및 ascorbic acid의 경우 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $0.32 \pm 0.08$  및  $0.31 \pm 0.05$ 의 흡광도를 보였는데 비해, 익기양영탕 추출물을 3, 10 및 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하였을 경우 각각  $0.4 \pm 0.1$ ,  $0.36 \pm 0.2$  및  $0.41 \pm 0.14$ 의 흡광도를 보여 농도에 따른 경향성 있는 결과를 보여주지 못하였다 (Fig. 6). 이는 益氣養榮湯 추출물이 linoleic acid에 대해 항산화 효과가 미약하게나마 있음을 의미한다.

益氣養榮湯 추출물의 유방암 세포주 MCF-7에 대한 세포 독성을 확인한 결과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 전혀 항암 활성을 나타내지 못하였으며, 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이

상의 농도에서 유의성있게 세포 성장을 억제하였다(Fig. 7). 이는 益氣養榮湯이 유방암 세포주 MCF-7 세포에 대해 독성을 가지고 있음을 의미한다.

益氣養榮湯 추출물로부터 다시 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획을 얻어 각기 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획에서 각각  $22 \pm 3\%$ ,  $41 \pm 4\%$ ,  $35 \pm 6\%$  및  $2 \pm 0.6\%$ 의 소거 활성을 보였는데, 특히 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 비교적 강한 DPPH 라디칼 소거 작용을 나타냈다(Fig. 8).

유방암 세포주인 MCF-7에 대한 hexan의 세포 독성은 약 225.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서  $IC_{50}$  값을 나타내었는데 비해 정상세포인 NIH3T3의 독성 효과는 약 184.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 나타나 비교적 강한 세포독성을 나타내었으나 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다(Fig. 9). 이는 益氣養榮湯 추출물이 세포독성을 나타내고 있으나 세포 성장 억제 효과는 유의하지 않은 것으로 여겨지므로 항암활성이 미약함을 의미한다.

Ethyl acetate 분획물은 유방암 세포인 MCF-7에서도  $IC_{50}$ 값이 236.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, NIH3T3에 대해서도  $IC_{50}$ 값이 145.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 세포 독성을 나타내었으나, 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다(Fig. 10). 이는 益氣養榮湯 추출물이 세포독성을 나타내고 있으나 세포 성장 억제 효과는 유의하지 않은 것으로 여겨지므로 항암활성이 미약함을 의미한다.

부탄올 분획물에 대한 암세포의 독성 효과를 비교한 결과 유방암 세포인

MCF-7에서 IC<sub>50</sub>값이 약 205.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 정상세포인 NIH3T3에 대해서 IC<sub>50</sub>값이 276.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 비교적 강한 세포 독성을 나타내었으나, 두 세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 거의 없었다(Fig. 11).

수용성 분획물은 유방암 세포주인 MCF-7 및 정상세포인 NIH3T3에 대해서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 12).

益氣養榮湯의 항암 활성은 비선택적이었으며, 핵산, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서는 항암 활성이 비교적 강하게 나타났으나 수용성 분획에서는 항암 활성이 나타나지 않았다(Table 2). 이는 益氣養榮湯 추출물이 항암활성이 없음을 의미한다.

이상의 실험결과를 종합하면 益氣養榮湯 추출물은 항암, 항염물질인 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 유의성 있게 다량 함유하고 있어 항산화능이 존재하는 것으로 파악된다. 최근의 연구들에 의하면 인체 내에서 산화로 인하여 생성된 활성산소 및 여러 종류의 과산화물이 다양한 질병의 원인이 되며 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있으므로 益氣養榮湯이 항산화능이 뛰어나다는 것은 그로 인한 질병억제 및 치유 능력이 있는 것으로 파악된다. 또한, DPPH radical, ABTS free radical, hydrogen peroxide 소거활성능이 나타났고 MCF-7 세포 성장억제 효과는 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 유의성있게 보여지므로 항암활성이 있는 것을 나타낸다.

이상에서와 같이 大補氣血의 효능을 지닌 益氣養榮湯이 항산화효과와 MCF-7 성장 억제 효과를 나타내므로 유방암 치료에 대해 비교적 유의한 치료

효과를 보이는 것으로 사료되므로 앞으로 유방암에 대한 益氣養榮湯의 임상 적용 연구가 충분히 이루어져야 할 것으로 보이며, 여타의 유방암 세포주를 대상으로 한 지속적인 연구와 좀 더 깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

益氣養榮湯의 항산화 효과와 유방암 세포주 MCF-7 에 대한 세포독성과 세포성장억제 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 益氣養榮湯 추출물은 폴리페놀 약 168.3 $\pm$ 12.8  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 플라보노이드 약 84.3 $\pm$ 3.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 함유한 것으로 나타났다.
2. 益氣養榮湯 추출물은 용량의존적으로 DPPH radical 소거활성능이 증가하는 양상을 보였다.
3. 益氣養榮湯 추출물은 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 강력한 ABTS radical 소거활성능을 보였다.
4. 益氣養榮湯 추출물은 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 비교적 강한 hydrogen peroxide 소거능을 보였다.
5. 益氣養榮湯 추출물은 linoleic acid에 대해 항산화 효과가 미약하였다.
6. 益氣養榮湯 추출물은 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 고농도에서 유의성있게 세포 성장을 억제하였다.
7. 益氣養榮湯 추출물은 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 비교적 강한 DPPH 라디칼 소거 작용을 나타냈다.
8. 益氣養榮湯 추출물 핵산분획물은 세포 독성을 나타냈으나 유방암세포주

- 와 정상세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다.
9. 益氣養榮湯 추출물 ethyl acetate 분획물은 세포 독성을 나타냈으나, 유방암세포주와 정상세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 미약하였다.
  10. 부탄올 분획물은 세포 독성을 나타냈으나, 유방암세포주와 정상세포주 사이의 성장 억제 효과의 차이는 거의 없었다.
  11. 수용성 분획물은 유방암세포주와 정상세포주에 대해서 세포독성을 나타내지 않았다.
  12. 益氣養榮湯의 항암 활성은 비선택적이었으며, 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서는 항암 활성이 비교적 강하게 나타났으나 수용성 분획에서는 항암 활성이 나타나지 않았다.

□ 투 고 일 : 2007년 01월 25일

□ 심 사 일 : 2007년 02월 01일

□ 심사완료일 : 2007년 02월 06일

## 참고문헌

1. 보건복지부 한국암등록본부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서. 2003.
2. 대한산부인과학회. 부인과학 제3판, 서울:칼빈서적, 1997:1299-1301.
3. 한의부인과학교재편집위원회. 한의부인과학 상, 서울:정담, 2001:364-366.
4. 대한부인종양 콜포스코피학회. 부인종양학, 서울:칼빈서적, 1997:427-462.
5. 강진오. 유방암의 방사선치료. 경희의학회지 2005;21(1):37.
6. 巢元方. 巢氏諸病源候論, 서울:大星文化社, 1992:296.
7. 陳自明. 婦人良方大全, 서울:도서출판정담, 1993:卷24p.71.
8. 虞搏. 醫學正傳, 서울:圖書出版成輔社, 1986:310.
9. 朱橚. 普濟方(歷代中醫腫瘤案論選粹), 北京:北京出版社, 1988:1-3.
10. 張介賓. 景岳全書, 上海:上海科學技術出版社, 1984:679.
11. 李梴. 編註醫學入門, 서울:大星文化社, 1994:402-404.
12. 方廣. 丹溪心法附餘, 서울:大星文化社, 1993:585.
13. 武之望. 濟陰綱目, 北京:人民衛生出版社, 1996:838-841.
14. 陳實功. 外科正宗, 北京:人民衛生出版社, 1964:144-145.
15. 薛己. 薛氏醫案, 北京:中國中醫藥出版社, 1997:936-938.
16. 김정진, 이경섭, 송병기. 유방종괴에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지 1998;11(2):29-43.
17. 김진웅 등. 유방암의 다용 약물에 대한 문헌적 고찰. 대전대논문집, 2001;9(2):57-86.
18. 서정민 등. 청간해울탕이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암 세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 1997;10(2):69-83.
19. 박영수 등. SKBR3 유방암세포주에 대한 귀전우 메탄올 추출물의 성장 억제 및 항산화효과. 대한한방부인과학회지, 2005;18(1):45-54.
20. 용형순, 고성규. 황금의 유방암 세포주에 대한 항암작용. 대한한방내과학회지 2004;25(3):451-460.
21. 권은정 등. 반지련이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한방부인



- 과학회지 1999;12(2):148-182.
22. 여성원 등. 봉독약침액에 의한 인체 유방 암세포의 성장억제 및 세포에 관한연구, 대한한방침구학회지 2003;20(3):45-62.
23. AOAC. Official method of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC. 1985.
24. Nivea MM, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 2000;71:109-114.
25. Re R et al. Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 1999;26:1231-1237.
26. Müller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. Zentralbl Bakteriol. Mikrobi. Hyg. 1985;259:151-158.
27. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidative substances in leaves of Polygonum hydropiper. J. Agric. Food Chem. 1992;40:1349-1351.
28. Chung, H.K. et al. 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.
29. Yim, H.B. et al. Cytotoxicity of Ethanol Extract of *Raphanuse Sativus* on a Human Lung Cancer Cell Line. Kor. J. Soc. Food. sci. 2004;33(2):287-290.
30. Cha, Y.J. and Lee, S.Y. Cytotoxicity and Multidrug-Resistance Reversing Activity of Extracts from Gamma-Irradiated *Coix lachryma-jobi* L. Var. *ma-yuen* Stapf seed. Kor. J. Soc. Food. sci. 2005;34(5):613-618.
31. Kwag, J.S. and Baek, S.H. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Extracts from *Salvia miltiorrhiza*. Kor. J. Pha. 2003; (4):293-296.
32. Lee, M.K. et al. Enhanced Immune Activity and Cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. Extracts against Human Cell Line. Kor.J. Med. Crop. Sci. 2004;12(1):36-42.
33. Robert, K.Y. Cheng, Y.Z. and Cheng, C.C. Screening and evaluation of anticancer agents. Exptl. Clin. Pharmacol. 1998;10(2):67.
34. Jun, Y.Y. et al. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of Extracts of *Eleutherococcus senticosus* Maxim fruits. Kor. J. Food. Pha. 2003;10(3):394-400.
35. Kim, J.H. et al. Anticancer and Immune Activities of the Extracts from *Amorpha fruticosa* L. Kor. J. Med. Crop. Sci. 2005;13(1):41-47.
36. Jung, B.M. et al. Inhibitory Effects on Cell Survival and Quinone Reductase Induced Activity of *Aster yomena* Fractions on Human Cancer Cells. J. Kor. Soc. Food.

- Sci. 2005;34(1):8-12.
37. Shin, M.K. et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effect of the Extract of *Salvia plebeia*. 2001.
  38. 의학교육연수원 편. 가정의학, 서울: 서울대학교출판부, 1987:625.
  39. 하정일, 정선형. 전이된 유방암 환자에 대한 미슬토를 사용한 면역요법의 임상례. 대한한방부인과학회지 2001;14(3):209-217.
  40. 송기철 등. 항암단을 투여한 유방암 환자 60예에 대한 임상보고. 대한한방내과학회지 2001;22(4):669-674.
  41. 현동환 등. 가미쌍화탕의 유방암 발생 및 전이 억제에 대한 실험적 연구. 대한동의병리학회지 1997;11(2):108-112.
  42. 정지예, 양승정. 活絡效靈丹 추출물의 인간 유방암세포 MCF-7에 대한 성장억제 효과. 대한한방부인과학회지 2006;19(3):13-24.
  43. 정경아, 박경미, 조성희. 三稜 추출물의 인간 유방암 세포 성장억제 효과. 2006;19(1):166-177.
  44. 반혜란, 조성희, 박경미. 歸朮破癥湯 추출물의 인간 유방암 세포에 대한 성장억제 효과. 2006;19(1):155-165.
  45. 전국한의과대학본초학교수 공편저. 본초학, 서울:도서출판 영림사, 1999:531-532, 536-537, 302-303, 347-348, 463-464, 354-355, 578-579, 534-535, 580-581, 581-582, 410-411, 460-461, 540-541.
  46. 강순수. 바른방제학, 서울:대성문화사, 120-123.
  47. Yoshizawa S et al.. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* 1987;1:44-47.
  48. An BJ et al.. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *sanguisorbae officinalis* L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2004;47:244-250.
  49. Rice-Evans CA, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994;234:279-293.
  50. Miller NJ et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993;84:407-412.
  51. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996;20:933-956.
  52. Lee SE et al. Antioxidatives activities of Korean medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2003;11:127-134.
  53. Farag RS et al.. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic and oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989;66:792-799.