

抗癌劑 Mitomycin C와 數種 複合生藥의 併用投與 效果(I)

—補 益 劑—

安文生·金世吉·殷載淳*·林種弼*·廉楨烈*·徐恩實*·吳贊鎬**·蘇俊魯**
圓光大學校 韓醫科大學, *全州又石大學校 藥學科, **全州又石大學校 生物工學科

Studies on the Combined Effect of Several Combined Preparation of
Crude Drugs and Mitomycin C(I)

—Bo Ik Je—

Moon Saeng Ahn, Sae Gil Kim, Jae Soon Eun*, Jong Pil Lim*, Jung Yul Yum*,
Eun Shil Suh*, Chan Ho Oh** and June No So**
College of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iri 570-749, Dept. of Pharmacy* and
Dept. of Biotechnology**, Chon Ju Woo Suk University, Chonju 565-800, Korea

Abstract—The studies were conducted to investigate the combined effects of several combined preparation of crude drugs and mitomycin C(MMC). The combined effects on the proliferation of Molt-4 cells and activation of human lymphocytes were estimated by MTT colorimetric assays. The drugs itself enhanced the proliferation of Molt-4, but the inhibitory action of MMC was not affected by the combined treatment of the drugs and MMC. Among 9 kinds of the drugs, Sip Jeon Dae Bo Tang(SDT), Saeng Maek San(SMS) and Kwi Bi Tang(KBT) did not inhibit the action of MMC, but activated lymphocytes. When the mice were treated by MMC, the number of leukocytes was decreased significantly at the 1st day, but recovered at the 7th day. In the groups of MMC treated with SDT or KBT, the number of leukocytes was increased significantly than the group of MMC treated only at the 3rd day. The combined treatment of SDT, SMS and MMC retained the body weight of mice at the level of normal mice. The SDT, SMS and KBT did not change the number of plaque forming cells(PFC) and the proliferation of T cells. The combined treatment of SDT and MMC increased the number of PFC significantly than the MMC treated group. The combined treatment of SDT, SMS, KBT and MMC increased the T cell proliferation significantly than the MMC treated group. In conclusion, it is suggested that SDT, SMS and KBT can recover the side effects of MMC, such as weight loss, leukopenia and immunosuppression, without any intercalating the anti-proliferative action of MMC *in vivo*.

Keywords—MOLT-4 cell · human lymphocyte · mitomycin C · MTT assay · ³H-thymidine · body weight · leucocyte · PFC · lymphocyte blastogenesis

현대의학에서 난치성 질병중의 하나인 암의 치료를 위한 효율성 높은 여러 방법의 개발에 많은 연구가 있어 왔다. 그 결과 외과적치료법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등이 개발되어 암의 치료에 이용되고 있으며, 특히 수많은 종류의 화학요법제가 개발되어 다양한 종류의 암 치료에 사용되고 있으나, 암종에 따른 감수성, 치료후의 예후, 부작용 등이 각기 다양하여 이에 따른 문제점들을 안고 있다.^{1,2)}

현재 개발되어 이용되고 있는 항암제들은 생체에 대한 독성이 심하여 정상적인 세포의 대사를 크게 억제하기 때문에, 항암제의 사용에 있어 커다란 장애로 지적되고 있다.³⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위해 부작용이 적은 새로운 항암제의 개발, 항암성을 나타내는 천연물질에 대한 연구, 새로운 약제학적인 연구(drug delivery system) 등이 시도되고 있으나⁴⁾, 제암력에 있어 기존 항암제를 능가하여 부작용이 극소화된 암치료 방법은 아직 개발되지 않았다.

한편 수천년동안 사용되어 온 한방제제들을 암 치료시 기존 항암제와 병용투여하여 항암제의 부작용을 최소화하려는 방법들이 수행되고 있으며, 몇가지 한방제제들이 암을 이식한 실험동물의 생명을 연장시켰다는 보고가 있는데⁵⁻¹⁵⁾, 이의 이론적 근거는 암과 암환자간의 상호작용에 있어서 암에 대한 환자의 생체반응을 조절함으로써, 암의 증식을 억제할 수 있다는 생체반응조절물질(Biological Response Modifiers, BRM)¹⁶⁾과 관련될 수 있다.

그러나 암과 숙주인 암환자와의 관계는 매우 복잡하므로 숙주의 생체반응을 조절하는 생체의 작용기전 역시 매우 다양하다. 생체가 암에 저항하는 가장 중요한 수단은 면역체계이며, 현재 시행되고 있는 생체반응조절에 의한 암치료법 또한 면역체계의 조절에 가장 큰 비중을 두고 있다.

補益劑라함은 인체의 정기가 부족한 4가지 기본상태인 氣虛, 血虛, 陽虛 및 陰虛를 개선하기 위한 처방으로서 일반적으로 補氣劑, 補血劑, 氣血雙補劑, 補陰劑, 氣陰雙補劑 및 補養劑 등으로 분류할 수 있다.¹⁷⁾

따라서 본 실험에서는 항암제의 부작용을 경

감시킬수 있는 보익제를 찾기 위해 補氣劑로서 四君者湯과 補中益氣湯, 補血劑로서 四物湯, 氣血雙補劑로서 十全大補湯, 歸脾湯 및 養心湯, 補陰劑로서 六味地黃湯, 氣陰雙補劑로서 生脈散, 그리고 補陽劑로서 八味地黃湯을 선택하여, 사람의 백혈구 암세포인 MOLT-4 및 사람의 정상 임파구에 기존 항암제로서 DNA합성을 저해하는 mitomycin C¹⁸⁾와 병용투여함으로써, 병용투여시의 효과를 MTT 법으로 screening한 후, 그 효과가 인정되는 처방들에 대해서는 DNA 합성능을 측정하였고, 동물실험을 통하여 mitomycin C에 의해 야기되는 백혈구수 및 체중의 감소와 면역능의 저하에 대한 영향을 살펴본 결과, 약간의 저전을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

검액조제

각 방제의 구성은 동의보감¹⁹⁾에 의하여 하였으며, 약제들은 원광대학교 부속 한방병원에서 구입하여 각 5첩분을 증류수 2,000ml로 5시간 가열추출한 후, 여과하여 여액을 농축하여 엑스를 얻어 실험에 사용하였으며(엑스양: 양심탕 YST 5.9%, 보중익기탕 BYT 20%, 사물탕 SMT 28.1%, 팔미지황탕 PJT 8.9%, 육미지황탕 YJT 12.3%, 사군자탕 SKT 21.2%, 십전대보탕 SDT 8%, 생맥산 SMS 31.5%, 귀비탕 KBT 6.5%), 세포 실험시에는 PBS 용액에 용해시켜 autoclave에서 121°C, 20분간 멸균처리하였으며, 경구 투여시에는 0.9% 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 동물은 ICR계통의 웅성 마우스 6~8주령 되는것을 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Gibco), RPMI 1640(Gibco), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma), mitomycin C(MMC, Sigma), fetal bovine serum(FBS,

Gibco), ^3H -thymidine(^3H -TdR, Sp. act. 50Ci/m mol, ICN), Insta-gel(Packard), Ficoll-Hypaque(Sigma), Trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma) 등이며, 사용기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96, 48, 24-well, Costa), disposable pipette(Bellco), disposable pasteur pipette(9 inch, Sigma), hemocytometer(Neubauer), cell-harvester(Nunc), ELIZA-Reader(Dynatech), liquid scintillation counter(Packard), CO_2 incubator(Vision Scientific Co.), inverted microscope(Nicon Co.) 등이다.

세포 배양액 제조 및 기구 멸균

본 실험에 사용된 세포배지 및 시약은 탈이온 증류수(3차 증류수)에 용해시켜, filter(pore size, 0.2 μm)로 여과 멸균하였으며, 기구는 121°C, 15 psi. 하에서 고압멸균하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포주 및 세포배양조건

MOLT-4 세포는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 RPMI-1640(FBS-RPMI 1640)에서 배양하였으며, 계대배양조건은 1:10~1:20 비율, 3일 간격으로 하였다. 세포증식에 미치는 MMC 및 복합생약제의 영향을 관찰하기 위한 실험에는 계대배양 2일째의 세포를 사용하였다.

2) 임파구의 분리

Mishell의 방법²⁰⁾을 이용하여 Ficoll-Hypaque 용액을 3 ml씩 분주한 15 ml 시험관을 준비하고, 정상인의 정맥으로 부터 heparin 처리된 주사기로 혈액을 채취하여 혈액량의 1.5배 되는 DPBS-A와 혼합한 다음, 8~10 ml를 취하여 Ficoll-Hypaque 용액 위에 조심스럽게 올려 놓고, 실온에서 400 g로 30분간 원심분리한 후, pasteur pipette를 이용하여 Ficoll-Hypaque용액 바로 위층에 밀집된 단핵세포를 얻어 5배 부피의 DPBS-A 용액에 재부유시킨 뒤, 250 g로 10분간 원심분리하여 세포를 3회 세척하였다. 최종 세척 후, hemocytometer를 이용하여 세포의 생존율 및 총 세포수를 측정하고 실험에 필요한 적정세포수로 FBS-RPMI 1640에 재부유시켜 사용하였다.

3) MTT 법에 의한 세포성장률 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann²¹⁾이 개발하여 Kotnik 등²²⁾이 변형시킨 방법을 이용하였다. 즉 96-well plate의 각 well에, 각 농도별로 희석된 복합생약제 추출액 50 μl , MMC 50 μl 및 세포부유액 50 μl 를 넣고 37°C의 CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양종료 4 시간전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μl 를 각 well에 첨가하고, 배양종료시까지 은박지로 빛을 차단시켜 배양하였다. 배양 종료시 0.1 N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl 를 각 well에 다시 첨가하고 빛이 차단된 상태에서 37°C CO_2 incubator에서 18시간 처리한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader(Dynatech)를 이용하여 570 nm에서 측정하여, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장률을 %로 환산하였다.

4) DNA 합성능 측정

세포내로 유입된 ^3H -TdR 양으로 측정된 DNA 합성능은 MTT 법에 의한 세포성장률 측정시와 같은 조건에서 MOLT-4 세포를 배양하면서 배양종료 6시간전에 ^3H -TdR을 첨가하여 배양종료시까지 pulse시켜 조사하였다. 배양종료 후 cell harvester를 이용하여 glass filter에 각 well의 세포를 수거한 다음, glass filter disk를 counting vial에 옮기고 cocktail 용액인 Insta-gel을 첨가하여 liquid scintillation counter로 측정하였다.²³⁾

5) 백혈구수의 측정

백혈구수를 측정하기 위해 마우스 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였으며, MMC 투여군에는 mitomycin C 3 mg/kg을 복강에 1회 투여하였고, 실험군은 MMC 투여군에 각 검액을 2 g/kg씩 7일간 1일 1회씩 경구투여하면서, 약물투여 전, 투여 후 1일, 3일, 5일 및 7일에 각각 mouse의 꼬리를 절단하여 heparinized microtube로 채혈한 후, 10 배량의 türk 액을 가하여 염색한 다음, hemocytometer로 백혈구수를 계산하였다.

6) 체중 측정

마우스 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였으며, MMC 투여군에는 mitomycin C 3 mg/kg을 0 일째와 7 일째 복강에 투여하였으며, 실험군에는 MMC 투

여군에 각 검액 2g/kg을 1일 1회씩 14일간 경구 투여 하면서 체중을 측정하였다.

7) 항체생성세포(PFC)수의 측정

Cunningham의 방법²⁴⁾에 따라 마우스 5마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였고, MMC 투여군에는 mitomycin C 1mg/kg을 1일 1회씩 7일간 복강투여 하였으며, 실험군에는 MMC 투여군에 각 검액 2g/kg을 1일 1회씩 11일간 경구투여 하였다. 약 물투여 8일 제 1×10⁸개 SRBC 0.2ml를 꼬리 정맥에 주입하였고, 12일째 PFC 측정을 위해 mouse를 경구 탈구하여 도살한 후, 비장을 적출하여 cold PBS(-) 용액을 넣은 petri dish에 침지시켰다. 적출한 비장은 clean bench내에서 수술용 가위와 pincette를 사용하여 분절한 후, 압박하면서 비장세포를 PBS용액에 누출시켰다. 신선한 PBS용액으로 3회 세정(원심분리 250g, 5분간, 4°C)하여 비장세포 현탁액을 조제한 후, MEM으로 2.5×10⁶ cell/ml가 되도록 세포수를 조정하였다. 별도로 항원으로 사용한 SRBC를 PBS로 50%(v/v)용액으로 조제하여 eppendorf tube에 50μl를 넣은 후, complement(guinea pig 신선혈청) 50μl를 주입하고, 미리 조제한 비장세포 현탁액 0.4 ml 및 MEM 0.1 ml를 첨가하여 pipette로 혼합시켰다. 혼합된 액을 0.1 ml를 취하여 미리 제작한 Cunningham chamber의 3실에 균일하게 주입시켰다. 주입 후 chamber의 양쪽 끝을 가운 용해한 유동 paraffin으로 밀봉한 후, 37°C의 incubator에서 1시간 동안 배양하고 곧바로 4°C의 cold chamber에서 30분간 넣어 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 chamber내의 plaque수를 1×10⁶개의 비장세포당 항체생성 세포수로 환산하였다.

8) T 임파구증식능의 측정

위에서 조제한 비장세포 부유액을 microculture plate(96 well)에 각 well당 5×10⁵ 세포가 되도록 조정하여, concanavalin A(2.5 μg/ml)를 가하고, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 후, 배양종료 4시간 전에 MTT시약을 가한뒤, 3)과 동일한 방법으로 실험하여 control군의 O.D.를 100%으로 환산하여 각 실험치를 산정하였다.^{25,26)}

실험 결과

1. MOLT-4 세포의 세포수 및 배양시간과의 관계

세포수와 배양시간과의 관계를 알아보기 위하여 MOLT-4 세포 0.5×10³, 1.6×10³, 5×10³ 및 1.5×10⁴개를 각 well에 넣고 1, 3 및 5일을 각각 배양하였을 때, 5×10³ cells/well에서 3일 이상 배양시 대수 증식기에 도달하였기에, 본 실험에서는 세포수를 5×10³개로 하였으며, 배양일은 4일로 정하였다(Fig. 1).

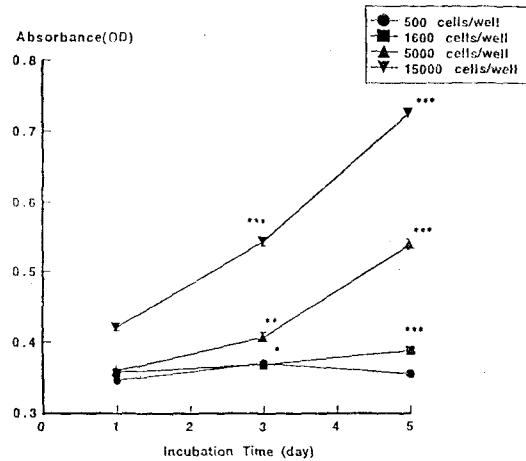


Fig. 1. The growth curve of MOLT-4 cells. The OD of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Dynatech MR 700) at 570nm.

2. MOLT-4 세포에 미치는 mitomycin C의 영향

MOLT-4 세포를 50% 억제할 수 있는 mitomycin C의 농도를 정하기 위해, 각 well당 세포 5×10³개를 넣고, mitomycin C 0, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016 및 0.032 μg/well을 각각 가하고 4일 배양하였을 때 0.004 μg/well의 농도에서 약 50%의 억제효과가 나타났기 때문에, 본 실험에 사용한 mitomycin C의 농도는 0.004 μg/well로 하여 이후의 실험에 사용하였다(Fig. 2).

3. 수증 보익제 및 mitomycin C 병용투여가 MOLT-4 세포(5×10³ cells/well) 및 normal human lymphocyte에 미치는 영향

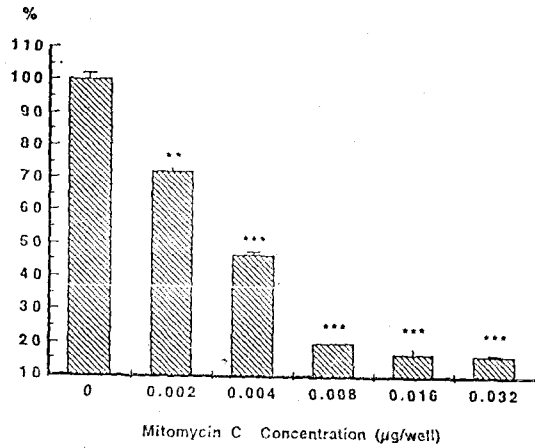


Fig. 2. Effect of mitomycin C on MOLT-4 cell (5×10^3 cells/well)

Each bar represents the mean \pm S.E. of 4 assays.

*; Significantly different from the MMC non-treated group.

; $p < 0.01$, *; $p < 0.001$

9종의 보익제와 MMC의 병용투여 효과를 관찰하기 위해 MMC 0.004 $\mu\text{g/well}$ 과 각 보익제 10^{-7} , 10^{-5} 및 10^{-3}g/ml 를 well에 각각 혼합하여 MOLT-4 세포 및 human lymphocyte에 미치는 영향을 살펴 본 결과 양심탕(YST)은 MOLT-4 세포에 대해 직접작용이 없었고, MMC와 병용시 MOLT-4 세포를 10^{-7} 및 10^{-5}g/ml 농도에서 증가시켰으며, normal lymphocyte에는 영향을 주지 않았다. 보충익기탕(BYT), 사물탕(SMT), 팔미지황탕(PJT) 및 육미지황탕(YJT)은 단독사용시 10^{-7} 및 10^{-5}g/ml 농도에서 MOLT-4 세포를 증가시켰으며, MMC와 병용시에도 MMC 단독투여시에 비해서는 약하지만 증가시켰고, normal lymphocyte를 감소시켰다. 사군자탕(SKT)은 단독사용시 10^{-3}g/ml 의 농도에서 MOLT-4 세포를 증가시켰으나, MMC와 병용시에는 MOLT-4 세포를 10^{-7} 및 10^{-5}g/ml 농도에서 감소시켰으며, normal lymphocyte도 감소시켰다. 십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS) 및 귀비탕(KBT)은 단독투여시 10^{-7} , 10^{-5}g/ml 농도에서 MOLT-4 세포를 증가시켰으며, MMC와 병용시에도 증가시켰으나, 단독사용시에 비하여는 증가되는 경향이 약하였고, normal lymphocyte는 농도증가에

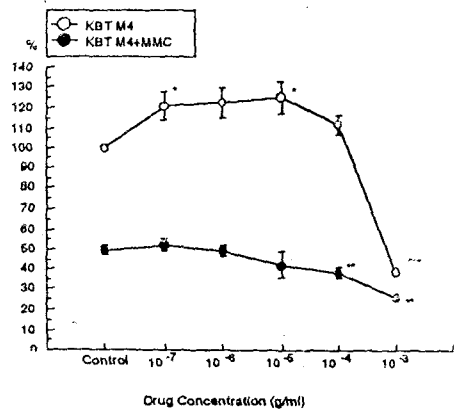
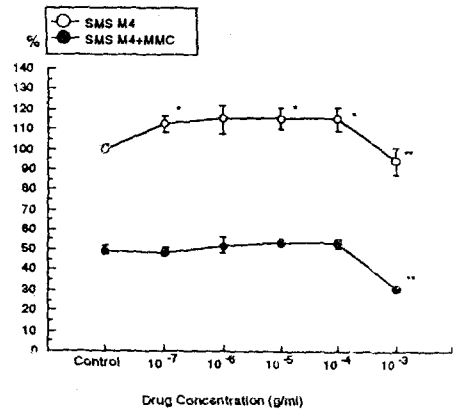
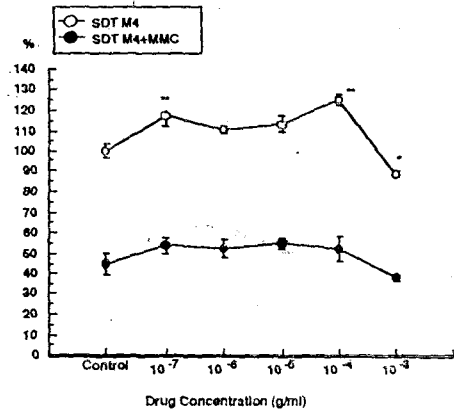


Fig. 3. Effect of SDT, SMS, KBT and mitomycin C on MOLT-4 cell (1×10^4 cells/well)

Each bar represents the mean \pm S.E. of 4 assays.

; Significantly different from the control group. (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$,

***; $p < 0.001$)

Table I. Effect of combined preparation of crude drugs and mitomycin C on MOLT-4 cell growth using the MTT-colorimetric assay

Sample	Control(%)	Concentration(g/ml)			
		10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}	
Y S T	M	100.0±4.5	119.9±18.6	121.3±13.8	50.2±2.8**
	MM	31.2±3.5	38.5±2.8*	46.2±2.6**	18.8±0.5**
B Y T	M	100.0±6.8	195.4±14.4**	210.8±23.4**	87.6±1.6*
	MM	32.4±2.7	59.4±6.3**	64.1±3.8**	16.6±0.9**
S M T	M	100.0±5.9	198.1±15.9**	200.1±26.2*	156.1±1.9**
	MM	32.4±2.7	55.5±2.1**	63.2±4.5**	87.2±1.6***
P J T	M	100.0±15.1	152.5±19.7**	179.0±20.2**	29.2±0.3**
	MM	27.5±2.6	50.5±4.3*	52.3±4.5*	10.5±0.6**
Y J T	M	100.0±15.5	186.4±18.8***	107.5±16.0***	37.5±1.0**
	MM	27.5±2.6	50.5±4.3**	52.3±4.5**	10.5±0.6**
S K T	M	100.0±8.6	94.6±6.9	117.0±4.3	134.9±3.2*
	MM	34.1±2.8	14.0±3.0	24.8±3.3	34.9±3.9
S D T	M	100.0±13.0	147.1±18.3**	186.5±20.9**	64.5±1.3*
	MM	40.8±4.8	48.7±3.3*	62.7±3.8**	23.8±0.9*
S M S	M	100.0±13.0	200.6±20.8**	200.9±26.7**	56.1±1.6*
	MM	40.8±4.8	60.8±6.5*	78.6±9.3*	16.2±1.4**
K B T	M	100.0±13.0	238.9±21.7**	279.9±27.2**	68.0±1.5*
	MM	40.8±4.8	74.3±6.5**	79.1±7.0**	15.9±1.0**

Mitomycin C(MMC, 0.004 μ g/well) treated and non-treated cells(5×10^3 cells/well) were incubated with various dilution of samples extract for 4 day at 37°C CO_2 -incubator, followed by the addition of 20 μ l of MTT(5 mg/ml) and further incubation at 37°C for 4hrs. At the termination of culture, and 100 μ l of 10%-SDS(in 0.01N HCl) to the each well of 96-well plate and then culture plate was incubated at 37°C for 18hrs. The OD of each well was measured with a microplate spectrophotometer(Dynatech MR 700) at 570 nm.

The data represents the mean \pm S.E. of 4 assays. M; MOLT-4 cell, MM; MOLT-4+MMC

Significantly different from the control group. (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$)

따라 증가시켰다(Table I, II).

십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS) 및 귀비탕(KBT)의 작용을 명확히 규명하여 보고자 MOLT-4 세포의 수를 2배 증가시켜 1×10^4 cells/well로 하고, 각 약물의 농도를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 각 well에 MMC와 혼합하였을 때, 단독사용시 MOLT-4 세포를 증가시키는 경향이였으며, MMC와 병용시에는 별다른 영향을 주지 못했으나, 귀비탕 10^{-4} g/ml 농도에서는 유의성있게 감소시켰다. 이러한 결과는

앞의 실험과 거의 유사한 결과이었다(Fig. 3).

4. DNA 합성능에 미치는 십전대보탕, 생맥산, 귀비탕 및 사군자탕과 mitomycin C의 병용투여 효과

위의 실험결과와 DNA 합성능의 관계를 알아보기 위해 MOLT-4 세포의 수를 1×10^4 cells/well로 하고, 각 약물의 농도를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 각각 가하고 3H -thymidine uptake되는 양을 측정할 결과, 십전대보탕(SDT)은 단독사용시 10^{-6} g/ml에서 증가시키고, 10^{-4}

Table II. Effect of combined preparation of crude drugs and mitomycin C on human lymphocyte growth using the MTT-colorimetric assay

Sample	Control(%)	Concentration(g/ml)			
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻³	
Y S T	L	100.0±7.0	97.1±1.7	86.7±1.4	105.7±2.5
	LM	92.6±2.8	86.0±4.0	93.0±7.0	101.2±3.2
B Y T	L	100.0±7.8	98.1±3.3	95.8±4.5*	80.2±1.6*
	LM	100.0±6.1	91.2±5.1	84.5±2.3*	73.1±1.4**
S M T	L	100.0±7.6	71.6±6.2**	100.7±4.9	110.3±3.3
	LM	100.5±6.1	87.6±5.9**	89.4±2.8	111.2±2.8
P J T	L	100.0±5.4	93.9±1.7	88.8±2.7	92.8±2.2*
	LM	94.2±1.3	93.6±3.9	87.1±1.8	101.4±2.0
Y J T	L	100.0±5.4	77.9±1.4*	86.6±4.2	76.6±5.2**
	LM	94.2±1.3	82.3±0.9**	83.2±2.0*	96.3±3.1
S K T	L	100.0±1.0	96.5±1.8	93.9±0.9**	83.6±0.5***
	LM	96.6±0.7	97.4±1.3	97.6±1.4	82.9±0.9***
S D T	L	100.0±3.0	104.0±3.9	103.7±5.7	125.5±1.3**
	LM	98.1±4.3	104.8±7.6	102.3±5.2	125.8±2.9**
S M S	L	100.0±3.0	115.2±4.8*	124.7±4.8**	120.2±0.6*
	LM	98.1±4.3	104.7±3.2*	115.7±8.2*	119.4±0.8**
K B T	L	100.0±3.0	106.4±3.4*	109.3±3.7*	119.6±1.3**
	LM	98.1±4.3	104.2±4.2	107.4±6.3	125.5±3.5**

The data represents the mean±S.E. of 4 assays.

Significantly different from the control group (; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001). L; human lymphocyte, LM; lymphocyte+MMC YST; Yang Sim Tang, BYT; Bojung Yikki Tang, SMT; Sa Mul Tang, PJT; Palmi Jihwang Tang, YJT; Yukmi Jihwang Tang, SKT; Sa Kunja Tang, SDT; Sipjeon Daeho Tang, SMS; Saeng Maek San, KBT; Kwi Bi Tang. The % viability was calculated by the following equation:

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{OD of treated group}}{\text{OD of control}} \times 100$$

g/ml에서는 감소시켰으며 MMC와 병용시에는 별다른 영향을 주지 못했으며, 생맥산(SMS)은 단독사용시와 MMC 병용시 별다른 영향을 주지 못했다. 한편 귀비탕(KBT)은 10⁻⁴g/ml에서 단독사용시와 MMC 병용시 모두 유의성 있게 감소시켰다. 전 실험에서 사군자탕의 농도가 10⁻⁷ 및 10⁻⁵g/ml 일때 MMC와 병용시 항암작용이 강력하였기 때문에 이의 작용과 DNA 합성능과의 관계를 알아 본 결과, 10⁻⁷ 및 10⁻⁶g/ml 농도에서 DNA 합성능을 유의성 있게 감소시켰다 (Table III).

5. Mitomycin C 투여 mouse의 백혈구수

에 미치는 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕의 영향

MMC 투여 전, MMC 투여 후 1, 3, 5 및 7일에 백혈구수를 측정 한 결과, MMC 투여 전의 백혈구수($\times 10^3$)는 14.16±1.2개 이었고, MMC 투여 1일 후에 5.8±0.29개로 감소하였다가 9.71±0.32, 11.47±0.56 및 13.42±0.65로 7일 후에는 거의 정상치로 회복되었다. MMC를 투여 하고 십전대보탕(SDT)을 투여하였을 때는, 1일 후에 7.09±0.61개, 3일 후에 12.95±0.73개, 5일 후에 13.5±1.0개 및 7일 후에 16.82±0.71개로 MMC 투여군에 비해 유의성 있게 백혈구

Table III. Effect of SDT, SKT, SMS, KBT and mitomycin C on ³H-thymidine incorporation into MOLT-4 cells(1×10⁴ cells/well)

Sample	Control(cpm)	Concentration(g/ml)					
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	
SDT	M	4,952±154	5,251±649	7,148±603*	5,586±503	3,295±191**	1,278±106***
	MM	2,888±498	2,874±712	3,150±276	2,126±365	1,615±326	972±154
SKT	M	—	5,520±337	3,998±146**	4,034±478	4,177±663	2,344±423*
	MM	—	2,055±414	1,734±383*	1,829±211**	2,108±319	1,293±499
SMS	M	6,675±685	7,876±446	7,802±655	7,245±445	5,306±568	1,002±194**
	MM	4,038±845	3,886±318	4,232±523	5,132±680	2,175±580	1,895±210*
KBT	M	—	6,433±156	7,000±267	7,715±405	2,610±233*	2,014±437**
	MM	—	5,347±420	5,526±667	3,724±632	642±104*	563±90**

; Significantly different from the control group (; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001). M; MOLT-4 cell, MM; MOLT-4+MMC

The data represents the mean±S.E. of 4 assays.

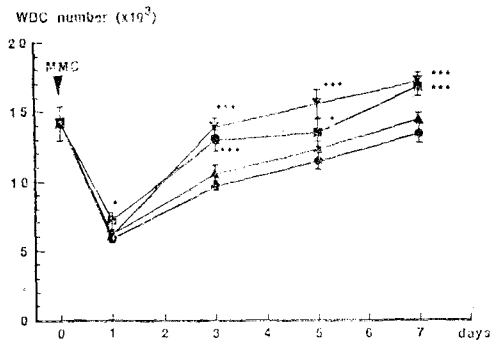


Fig. 4. Effect of SDT, SMS and KBT extract on leukopenia by MMC in mice

Mice were administered 2g/kg/day of SDT, SMS and KBT respectively, orally for 7 days, and were injected i.p. with 3mg/kg of MMC.

Each bar represents the mean±S.E. of 10 mice.

; Significantly different from the MMC-treated group(; p<0.05, ***; p<0.001)

- MMC
- MMC+SDT
- ▲- MMC+SMS
- ▼- MMC+KBT

수가 증가하였으며, 생택산(SMS) 투여군은 6.06±0.3, 10.48±0.72, 12.27±0.64 및 14.49±0.4개로 MMC 투여군에 비해 증가하는 경향이였으나 유의성은 없었고, 귀비탕(KBT) 투여군에서는 6.01±0.41, 13.94±0.62, 15.59±1.0 및 17.18±0.63개로, MMC 투여군에 비해 3일 후 부터

유의성 있게 증가하였다(Fig. 4).

6. Mitomycin C 투여 mouse의 체중에 미

치는 십전대보탕, 생택산 및 귀비탕의 영향

약물 투여하기 전의 체중을 100%로 하였을 때, 정상군은 14일후에 106.4%로 체중이 증가하였으나, MMC 투여군은 약물 투여 5일 후에 93.5%, 8일째 92.3%, 13일 후에는 91.8%로 체중이 감소하였으나, MMC와 십전대보탕(SDT) 투여군은 2일째 96.7%로 약간 감소하였으나, 14일째는 106.6%로 정상군의 체중까지

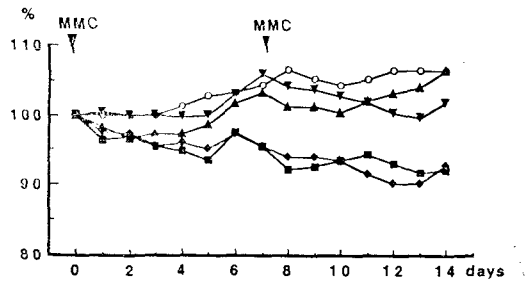


Fig. 5. Effect of SDT, SMS and KBT extract on weight loss caused by MMC in mice

Mice were administered 2g/kg/day of SDT, SMS and KBT respectively, orally for 14 days, and were injected i.p. with 3mg/kg of MMC at 0 and 7 day.

- Normal
- Control(MMC)
- ▲- MMC+SDT
- ▼- MMC+SMS
- ◆- MMC+KBT

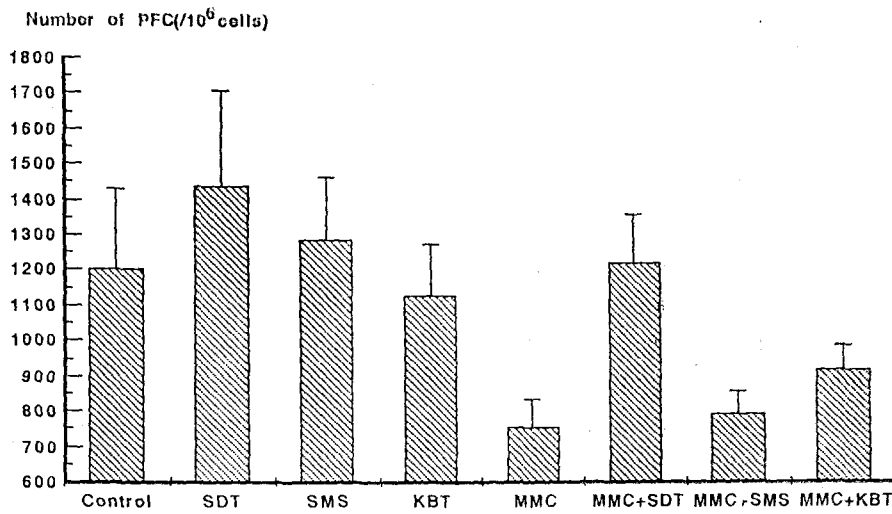


Fig. 6. Effect of SDT, SMS, KBT and MMC on PFC induction in mice
 Mice were given 2 g/kg/day SDT, SMS and KBT respectively, orally for 11 days and injected i.p. with 1mg/kg/day of MMC for 7 days. At 8th day, mice were injected i.v. with 1×10^8 cells/0.2 ml of SRBC. After 4 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FBS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay. Each bar represents the mean \pm S.E. of 5 mice.
 **; Significantly different from the MMC-treated group. ($p < 0.01$)

회복되었다. MMC와 생맥산(SMS) 투여군은 MMC 투여 7일까지는 정상군과 별 차이가 없었고, MMC 2회 투여 후부터는 정상군에 비해 체중이 약간 감소하였으나 MMC 투여군에 비하여는 체중이 증가하였으며, MMC와 귀비탕(KBT) 투여군은 MMC 투여군과 거의 유사하게 체중감

소가 일어났다(Fig. 5).

7. 항체생성세포(PFC)수에 미치는 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕과 mitomycin C 병용 투여 효과

대조군의 PFC 숫자는 10^6 세포당 1,203 \pm 228 개이었으며, 십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS)

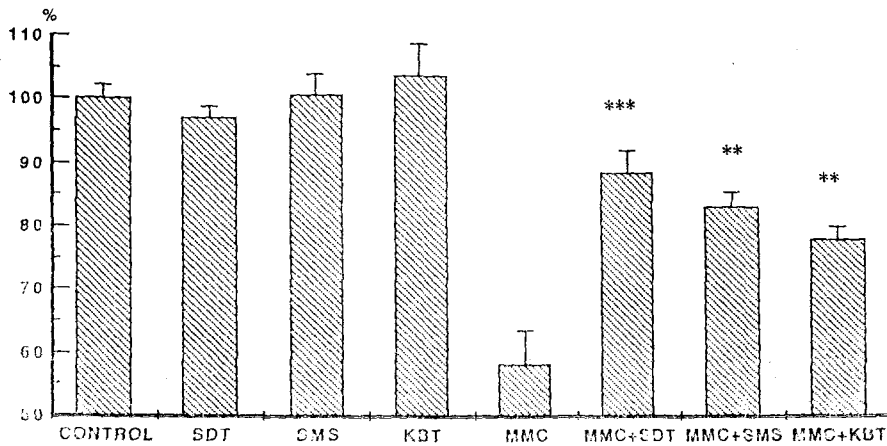


Fig. 7. Effect of SDT, SMS, KBT and MMC on concanavalin A (2.5 μ g/ml) treated lymphocyte blastogenesis of spleen cells in mice
 Mice were treated with SDT, SMS, KBT and MMC as described in Fig. 6. Each bar represents the mean \pm S.E. of 5 mice.
 *; Significantly different from the MMC-treated group. (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$)

및 귀비탕(KBT) 단독 투여군은 각각 $1,438 \pm 269$, $1,282 \pm 180$ 및 $1,125 \pm 150$ 개로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, MMC 투여군은 750 ± 84 개로 대조군에 비해 현저히 감소하였다. MMC와 각 약물을 병용투여 하였을 때는 $1,219 \pm 180$, 788 ± 67 및 913 ± 71 개로, 십전대보탕을 병용하였을 경우에 MMC단독 투여군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 6).

8. T 임파구증식능에 미치는 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕과 mitomycin C의 병용투여 효과

약물 투여한 마우스의 비장세포 배양제를 이용하여 T 임파구 mitogen인 concanavalin A($2.5 \mu\text{g/ml}$)를 첨가하여 배양한 뒤, MTT법으로 측정된 결과 대조군의 OD를 100%으로 환산하였을 때, 십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS) 및 귀비탕(KBT) 단독투여군은 각각 97.7 ± 1.8 , 100.7 ± 3.2 및 $103.7 \pm 5.0\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, MMC 투여군은 $58.2 \pm 5.3\%$ 로 현저히 감소하였으며, MMC와 각 약물을 병용투여하였을 때는 88.5 ± 3.4 , 83.0 ± 2.3 및 $78.0 \pm 1.9\%$ 로 MMC 투여군에 비해 모두 유의성 있게 증가되었다(Fig. 7).

고 찰

한의학에서 현대의학의 암과 관련된 질병은 “정화”, “적취”, “열격” 및 “유암” 등이 있다고 하였다.²⁷⁾ 이러한 질병들의 치료시에는 치법의 선택이 중요한데, 초기에는 공법 위주로, 중기에는 공보검시 위주로, 만기에는 보법 위주로 치료하여야 한다고 하였다.²⁸⁾ 현대의학에서 암의 치료법은 한의학적인 관점에서 볼 때는 주로 공법 위주라 할 수 있는데, 이 때 사용하는 약재들이 너무 강력하여 생체에 많은 부작용을 야기시킨다고 볼 수 있다. 따라서 현대의학에서 암을 치료하고자 할 때 항암제들의 부작용을 감소시키는데 공보검시의 치법을 이용하는 것이 주효할 것으로 예상할 수 있다. 현재 이용되고 있는 항암제들의 생체에 대한 부작용을 감소시키기 위한 여러 시도 중에 생체반응을 조절하여 부작용을 감소시키는 천연물질(BRM)에 대한 연구¹⁶⁾

가 진행되고 있으며, 특히 항암제 mitomycin C와 십전대보탕을 병용투여한 결과, 항암제의 부작용인 백혈구 감소, 체중감소 및 면역능 저하 등이 현저히 감소되었다는 보고들⁶⁻¹⁵⁾은 바로 이러한 치법이 임상적으로 유용할 것이라는 점을 시사하고 있다. 따라서 본 실험에서는 한방임상에서 일체의 허증을 치료하는 보익제 중 대다수의 처방이 면역촉진 및 조절작용을 나타낸다는 보고²⁹⁾에 따라, 항암제인 mitomycin C와 병용투여할 때 공보검시의 처방에 합당한 보익제를 찾고자 실험하였다.

동물세포의 증식을 시험관내에서 측정하는 데에는 실험목적에 따라 다양한 방법들이 적용되고 있는데³⁰⁾, 이들 중 대량의 시료를 빠른 시간 내에 측정할 수 있으며 재현성이 높고, 특히 약물들의 암세포 증식에 미치는 효과의 검색에 널리 이용되고 있는 MTT법을 이용하여 사람의 백혈구암 세포주인 MOLT-4 세포의 증식율을 측정된 결과 각 well당 5,000개 이상에서 3일 이상 배양시 대수증식기에 도달하였기에, 세포수를 각 well당 5,000개로 하여 4일간 배양하면서 각 보익제에 대한 영향을 관찰하였다.

한방제제와 MMC의 병용투여 효과를 측정하고자 할 때는 MMC의 농도에 따라 그 효과가 변화될 수 있기 때문에, 암세포에 대한 MMC의 감수성 및 50% 증식 억제 농도를 정하는 것이 중요하다. 따라서 본 실험에서는 MMC의 농도를 $0.004 \mu\text{g/well}$ 로 하였는데, 이 농도는 MOLT-4 세포를 50% 증식억제 할 수 있는 농도이다.

MOLT-4 세포에 보익제만을 단독 처리하였을 때는 전반적으로 암세포의 증식을 촉진시켰다. 그러나 항암제 MMC와 보익제를 병용투여시에는 보익제 단독투여에 비하여는 약하지만 약간 증가시키는 경향이었는데, 사군자탕은 다른 보익제와는 달리 MMC의 항암작용을 항진시키는 결과를 나타내었다. 사람의 정상 임파구에 보익제 단독 및 MMC병용 처리하였을 때, 양심탕은 별다른 변화를 주지 못했으며, 보중익기탕, 사물탕, 팔미지황탕, 육미지황탕 및 사군자탕은 약한 세포독성을 나타내었으나, 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕은 임파구를 활성화시켰다. 다만 MMC를 임파구에 처리시 영향을 주지 못한 결

과는, 임파구 배양시 임파구 증식유도물질인 Con A 등³¹⁾을 처리하지 않았기 때문에 사료된다. 사군자탕이 항암제의 항암효과를 항진시킨 작용은 주목할 만한 것이고, 그의 작용기전은 DNA 합성능의 억제에 기인된 것이라 생각되며, 이에 대하여는 추후 연구 검토할 만한 가치가 있다고 사료된다.

9종의 보익제중 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕은 항암제의 작용을 저해하지 않으면서 임파구를 활성화시키는 작용을 나타내었으므로, 이를 확인하기 위해 MOLT-4 세포의 수를 well당 10,000개로 증가시키고, 각 약물의 농도를 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 및 10^{-3} g/ml로 하여 영향을 살펴 본 결과 앞의 결과와 유사하였으며 DNA 합성능에 미치는 영향을 살펴 본 결과도 동일하였다. 십전대보탕 단독처리시 암세포 증식의 촉진 작용은 DNA 합성능 증가에 기인되었으나, 생맥산 및 귀비탕의 단독처리시 암세포 증식의 촉진 작용은 DNA 합성에 기인된 것이라기 보다는 RNA나 protein 합성에 기인된 것이 아닌가 사료되며, 특히 귀비탕은 10^{-4} g/ml 농도이상에서 MMC와 병용시 세포독성을 나타냈는데, 이는 DNA 합성을 억제한 결과라 추정된다.

이러한 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕에 대한 결과는 임상적으로 중요한 의미를 가질 수 있기 때문에, 항암제 투여시 부작용으로 나타날 수 있는 백혈구감소, 체중 감소 및 면역능저하에 대하여 이들 약물의 영향을 살펴 보기위해 동물실험을 실시하였다.

MMC를 마우스에 투여하면 1일 후에 백혈구수가 현저히 감소하여 7일 후에는 거의 정상으로 되었으나, MMC와 십전대보탕 및 귀비탕을 병용투여하였을 때, 십전대보탕 병용투여군은 1일 후 부터 귀비탕 병용투여군은 3일 후부터 유의성 있게 백혈구수가 증가하였으며, MMC와 생맥산 병용 투여군은 백혈구수에 영향을 미치지 못하였다.

MMC를 실험 개시일 및 7일에 투여하고 마우스의 체중을 측정된 결과 현저히 감소하였으나, MMC와 십전대보탕 및 생맥산 병용투여군은 거의 정상군의 체중과 비슷하였으며, MMC와 귀비탕 병용투여군은 MMC 투여군의 체중 변화

와 유사한 감소를 보였다.

면역실험에서는 T 임파구가 주도하는 세포성 면역반응 및 B 임파구가 생성하는 항체생성 능력을 검토하였는데, T 임파구의 유약화 반응에 미치는 효과에 있어서 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕 단독투여군은 별 영향이 없었으나, MMC와 병용투여 하였을 때는 MMC 단독 투여군의 비하여 모두 현저한 면역증강반응을 나타냈으며, 또한 항체생성세포(ABC)에 미치는 영향도 단독투여시에는 별 영향이 없었으나, MMC와 병용시에는 십전대보탕에서 유의성 있는 증강반응을 나타냈다. 이러한 결과는 이들 약물이 항암제에 의해 면역능이 현저히 저하되는 것을 방지할 수 있음을 의미하는 것이다.

그러나 항암제의 종류는 다양하기 때문에 추후 폭 넓은 연구가 진행되어야 할 것이며, 면역반응 번조능을 보다 다각적으로 검토하는 문제(NK cell activity, macrophage function 등)가 앞으로 연구되어진다면 의미 있는 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

결 론

본 연구는 보익제(양심탕, 보충억기탕, 사물탕, 팔미지황탕, 육미지황탕, 사군자탕, 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕)와 항암제로 사용되고 있는 mitomycin C(MMC)를 병용투여함으로써 항암제의 부작용을 경감시킬 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여, 백혈구암 세포인 MOLT-4 및 사람 정상임파구에 대한 영향을 MTT법으로 검색하였으며, 효과가 인정되는 3종의 처방(십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕)과 MMC를 병용투여 함으로써 MMC에 의하여 야기되는 부작용에 대한 영향을 동물실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 보익제와 MMC의 병용처리시 보익제는 MMC의 세포증식 억제작용을 저해하지 않는 경향이었으나, 보익제만을 단독처리 하였을 때는 세포의 증식을 전반적으로 증가시켰다.
2. 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕은 임파구를 활성화시키는 작용을 나타내었다.
3. 마우스에 MMC를 단독 투여하였을 때, 투

여 1일 후 백혈구수는 현저히 감소하였으며 7일 후에는 거의 정상으로 회복되었으나, MMC와 십전대보탕 및 귀비탕을 병용투여하였을 때는 십전대보탕은 투여 1일 후 부터 귀비탕은 투여 3일 후 부터 감소된 백혈구수가 유의하게 증가되었다.

4. 마우스에 MMC를 단독투여하였을 때 현저한 체중감소가 있었으나, MMC와 십전대보탕 및 생맥산을 병용투여 하였을 때는 체중을 정상군과 비슷하게 유지시켰다.

5. 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕을 단독투여하였을 때는 항체생산 세포수 및 T임파구 증식능에 영향을 미치지 못했으나, MMC와 십전대보탕 병용투여군은 MMC에 의해 감소된 항체생산 세포수를 유의하게 증가시켰으며, MMC와 십전대보탕, 생맥산 및 귀비탕 병용투여군들은 MMC에 의해 감소된 T임파구 증식능을 유의하게 증가시켰다.

〈1992년 6월 15일 접수 : 8월 3일 수리〉

문 헌

- Hersh, E.M. and Ereish, E.J.: *Methods in Cancer Research*, New York, Academic Press, p.335 (1986).
- Madewell, B.R.: *Tumor Immunol.* 69, 213 (1982).
- Ruddon, R.W.: *Chemical carcinogenesis*; In Principles of Drug Action—The basis of pharmacology(3rd ed.), Churchill, Livingstone, pp.735-773 (1990).
- Ito, N. and Shimura, K.: *Japan J. Cancer Chemother.* 15, 1715 (1988).
- Aburada, M.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.275 (1988).
- Ito, H. and Shimura, K.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.281 (1988).
- Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.291 (1988).
- Maruyama, H., Kawamura, H., Takemoto, N., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.297 (1988).
- Haranaka, R., Ckado, H., Hasegawa, R., Hyun, S.J., Liu, A.M., Nakagawa, S., Satomi, N., Sakurai, A. and Haranaka, K.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.304 (1988).
- Umezawa, J. and Komiyama, K.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.320 (1988).
- Hamada, M., Miyazawa, Y., Hikosaka, S., Shimizu, S., Tung, Y.C. and Yamaguchi, N.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.328 (1988).
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Takemoto, N., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.336 (1988).
- Takemoto, N., Maruyama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M., Hosoya, E., Yamada, H., Kiyohara, H. and Cyong, J.C.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.345 (1988).
- Iijima, O.T., Fujii, Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.353 (1988).
- Oldham, R.K.: *J. Natl. Cancer Inst.* 79, 789 (1983).
- 李尙仁: 天眞處方解說, 서울, 成輔社. pp.31-94 (1987).
- A. Goodman Gilman: *The pharmacological basis of therapeutics*, 8th ed., Pergamon Press, p.1247 (1991).
- 許浚: 東醫寶鑑(新增版), 서울, 南山堂, pp.90, 97, 98, 113, 147, 410, 434, 447 (1987).
- Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.: *Selected methods in cellular immunology*, W.H. Freeman and Company, pp.186-208 (1979).
- Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
- Kotnik, V. and Fleischmann, W.R. Jr.: *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
- Kotnik, V. and Fleischmann, W.R. Jr.: *J. Immunol. Methods* 129, 23 (1990).

23. Freshney, R.I.: *Culture of animal cells; A manual of basic technique*(2nd ed.), Alan R. Liss Inc., pp.227-256 (1987).
24. Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: *Immunology* 14, 599 (1968).
25. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: *J. Immunol.* 120, 1497 (1979).
26. Janossay, G., Greaves, M.F., Doenhoff, H.J. and Snajdr, J.: *Clin. Exp. Immunol.* 14, 581 (1973).
27. 白洪龍：辨症診治概要，云南，人民出版社，p.502 (1984).
28. 楊維傑：黃帝內經 素問譯解，臺北，樂群出版事業有限公司，p.226 (1977).
29. 劉正才 外：中醫免疫，四川省，重慶出版社，pp.54, 62 (1983).
30. Cook, J.A. and Mitchell, J.B.: *Anal. Biochem.* 179, 1 (1989).
31. Coligan, J.E. *et al.*: *Current protocols in immunology*, Wiley Interscience, 3:2.1 (1991).