

항암제 Mitomycin C의 부작용에 대한 수종 복합생약의 영향

殷 載 淳

全州又石大學校 藥學科

Effect of Several Combined Preparation of Crude Drugs on the Adverse Effects of Anticancer Agent-Mitomycin C

Jae Soon Eun

Dept. of Pharmacy, 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 HepG2, A549, KHOS-Np, A431 and HeLa cells were estimated by MTT colorimetric assays. Sa Kunja Tang(SKT), Boyang Hwanoh Tang(BHT) and Hyulbu Choogo Tang(HCT) inhibited the proliferation of A549 and HeLa cell. The inhibitory action of MMC was increased by the combined treatment of SKT and MMC, and Sa Mul Tang(SMT) and MMC, respectively. When the mice were treated by MMC, the number of leukocyte was decreased significantly at the 3rd day, but recovered at the 7th day. In the groups of MMC treated with SKT or HCT, the number of leukocyte was increased significantly than the group of MMC treated only at the 1st and 3rd day. The combined treatment of SKT, SMT, BHT, HCT and MMC retained the spleen weight of mice at the level of normal mice, but decreased the thymus weight of mice. The combined treatment of SKT, SMT, BHT, HCT and MMC increased the number of PFC significantly than the MMC treated group. The combined treatment of SKT, SMT, BHT, HCT and MMC increased the T cell proliferation significantly than the MMC treated group.

Keywords—HepG2 • A549 • KHOS-Np • A431 • HeLa cell • mitomycin C • MTT assay • thymus and spleen weight • leukocyte • PFC • lymphocyte blastogenesis

암은 아직도 그 발생기전이 불명확하여 난치성 질병중의 하나로 알려져 있으며, 많은 항암제들이 개발되어 있지만, 암의 종류에 따라 다양한 작용이 나타나며, 또한 그 부작용도 다양하기 때문에 암치료시 문제점으로 지적되고 있다.^{1,2)}

이러한 항암제의 부작용을 최소화하기 위해, 한방재제들과 항암제를 병용투여하는 방법들이

시도되고 있으며,³⁻⁵⁾ 본 실험실에서는 전보⁶⁾에서 백혈병 세포인 MOLT-4 세포에 대한 보익제와 항암제인 mitomycin C의 병용효과를 보고하였다. 그러나 암세포의 종류는 다양하기 때문에 본 실험에서는 human cancer cell line인 Hep G2(hepato carcinoma), A549(lung carcinoma), KHOS-Np(osteo sarcoma), A431(skin carcinoma) 및 HeLa(cervical carcinoma) 세포를 이

용하여 한방에서 기, 혈 및 어혈에 사용하는 대표적인 복합생약과 전보⁶⁾에서 작용이 인정되는 복합생약인 사군자탕(SKT), 사물탕(SMT), 십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS), 보양환오탕(BHT) 및 혈부축어탕(HCT)의 6종류의 복합생약을 선택하여 항암제 mitomycin C와 병용시의 효과를 MTT법으로 screening하였으며, 동물실험을 통하여 mitomycin C에 의해 야기되는 백혈구수의 감소, 비장과 흉선의 중량변화와 면역능의 저하에 대한 영향을 살펴본 결과 약간의 지견을 얻었으므로 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험재료

검역조제

사군자탕, 사물탕, 십전대보탕, 생맥산 및 혈부축어탕의 구성은 방약합편,⁷⁾ 보양환오탕의 구성은 방제학⁸⁾에 의하여 하였으며, 약제들은 건재상에서 구입하여 엄선하여 사용하였다. 각 10첩분을 증류수 2,000ml로 5시간 가열추출한 후, 여과하여 여액을 농축하여 엑스를 얻어 실험에 사용하였으며(엑스양 : 사군자탕 SKT 30g, 사물탕 SMT 70g, 십전대보탕 SDT 99g, 생맥산 SMS 62g, 보양환오탕 BHT 70g, 혈부축어탕 HCT 203g), 세포 실험시에는 PBS용액에 용해시켜 autoclave에서 121°C, 20분간 멸균처리하였으며, 경구투여시에는 0.9% 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 동물은 ICR계의 웅성 마우스 6~8주령 되는 것을 사용하였으며, 비장세포 실험시에는 C₃H계 웅성 마우스 6~8주령 되는 것을 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 mitomycin C(MMC, Sigma) RPMI 1640(Gibco), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A,

Sigma) 등이며, 사용기구는 culture plate(Nunc), multi-well plate(96-well, Costa), hemocytometer (Neubauer), ELIZA-Reader(Dynatech MR 700), CO₂ incubator(Vision Scientific Co.), inverted microscope(Nicon Co.) 등이다.

세포 배양액 제조 및 기구 멸균

본 실험에 사용된 세포배지 및 시약은 탈이온 증류수(3차증류수)에 용해시켜, filter(pore size, 0.2 μ m)로 여과멸균하였으며, 기구는 121°C, 15psi 하에서 고압멸균하여 사용하였다.

실험방법

1) 세포주 및 세포배양조건

HepG2, A549, KHOS-Np, A431 및 HeLa 세포는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ml)이 함유된 RPMI-1640(FBS-RPMI 1640)에서 배양하였으며, 계대배양조건은 1:10~1:20 비율, 3일 간격으로 하였다. 세포 증식에 미치는 MMC 및 복합생약제의 영향을 관찰하기 위한 실험에는 계대배양 2일째의 세포를 사용하였다.

2) MTT법에 의한 세포성장률 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann⁹⁾이 개발하여 Kotnik 등¹⁰⁾이 변형시킨 방법을 이용하였다. 즉 96-well plate의 각 well에, 1×10^4 cells/well로 조정된 세포부유액 50 μ l를 가하고 37°C CO₂ incubator에서 1일 배양한 후, 각 농도별로 희석된 복합생약추출액 50 μ l, MMC 50 μ l를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 2일간 더 배양하였다. 배양종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 배양종료시까지 은박지로 빛을 차단시켜 배양하였다. 배양 종료시 0.04N HCl-isopropanol 100 μ l를 각 well에 다시 첨가하고 교반한 다음 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader(Dynatech)를 이용하여 570nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장률을 %로 환산하였다.

3) 백혈구수의 측정

백혈구수를 측정하기 위해 마우스 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였으며, MMC투여군에는 mitomycin C 3mg/kg을 복강에 1회 투여하였고, 실험군은

MMC투여군에 각 검액을 2g/kg씩 7일간 1일 1회씩 경구투여하면서, 약물투여 전, 투여 후 1일, 3일, 5일 및 7일에 각각 mouse의 꼬리를 절단하여 heparinized microtube로 채혈한 후, 10배량의 turk 액을 가하여 염색한 다음, hemocytometer로 백혈구수를 계산하였다.

4) 비장 및 흉선의 중량 측정

마우스 10마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였고, MMC투여군에는 mitomycin C 3mg/kg을 0일째와 7일째 복강에 투여하였으며, 실험군에는 MMC투여군에 각 검액 2g/kg을 1일 1회씩 14일간 경구투여 한 후 개복하여 비장 및 흉선의 중량을 측정하였다.

5) 항체생성세포(PFC)수의 측정

Cunningham의 방법¹¹⁾에 따라 마우스 5마리를 1군으로 하여, 대조군에는 0.9% 생리식염수만을 경구투여 하였고, MMC투여군에는 mitomycin C 1mg/kg을 1일 1회씩 7일간 복강투여 하였으며, 실험군에는 MMC투여군에 각 검액 2g/kg을 1일 1회씩 11일간 경구투여 하였다. 약물투여 8일째 1×10^8 개 SRBC 0.2ml를 꼬리 정맥에 주입하였고, 12일째 PFC 측정을 위해 mouse를 경추 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 PBS 용액으로 3회 세정(원심분리 250×g, 5분간 4°C)하여 비장세포현탁액을 조제한 후, MEM으로 2.5×10^6 cell/ml가 되도록 세포수를 조정하였다. 별도로 항원으로 사용한 SRBC를 PBS로 50%(v/v)용액으로 조제하여 eppendorf tube에 50 μ l를 넣은 후, complement(guinea pig 신선 혈청) 50 μ l를 주입하고, 미리 조제한 비장세포 현탁액 0.4ml 및 MEM 0.1ml를 첨가하여 pipette로 혼합시켰다. 혼합된 액을 0.1ml를 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 곧 바로 4°C의 cold chamber에서 30분간 넣어 반응을 중

결시켰다. 반응이 종결된 chamber내의 plaque수를 1×10^6 개의 비장세포당 항체생성 세포수로 환산하였다.

6) T 임파구증식능의 측정

C₃H mouse를 경추탈구하여 비장을 적출하여 Mizel 등의 방법¹²⁾에 의해 비장세포 부유액을 조제한 후, 비장세포 부유액을 microculture plate (96 well)에 각 well당 5×10^5 세포가 되도록 조정하여, concanavalin A 1 μ g/ml, MMC 0.004 μ g/well 및 여러 농도의 각 검액 액스를 첨가한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 다시 첨가하고 빛이 차단된 상태에서 37°C CO₂ incubator에서 18시간 처리한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader (Dynatech)를 이용하여 570nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장률을 %로 환산하였다.

실험 결과

1. 각 암세포에 미치는 mitomycin C의 영향

각 암세포는 1×10^4 cells/well에서 3일간 배양시 대수증식기에 도달하였기에, 본 실험에서는 세포수를 1×10^4 개로 하였으며, 배양일은 3일로 정하였고, 이 조건하에서 각 암세포를 50% 억제할 수 있는 mitomycin C(MMC)의 농도를 측정된 결과, HepG2 세포는 0.063 μ g/ml, A549 세포는 0.625 μ g/ml, KHOS-Np 세포는 0.125 μ g/ml, A431 세포는 0.031 μ g/ml, HeLa 세포는

Table I. Antitumor activities of mitomycin C (MMC) against tumor cell lines (1×10^4 cells/well)

Cells	IC ₅₀ (μ g/ml)
HepG2	0.063
A549	0.625
KHOS-NP	0.125
A431	0.031
HeLa	0.313

0.313µg/ml에서 50%의 억제효과가 나타났다 (Table I).

2. 수종 복합생약과 mitomycin C 병용 투여가 각 암세포에 미치는 영향

6종의 복합생약과 MMC의 병용투여 효과를 관찰하기 위해, 앞 실험에서 정한 조건하에서, 각 복합생약의 농도를 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ 및 10⁻³g/ml로 하여 복합생약의 직접작용 및 MMC와의 병용투여 효과를 측정하였다.

HepG2 세포에 대해서는 사군자탕(SKT), 사물탕(SMT), 십전대보탕(SDT), 생맥산(SMS), 보양환오탕(BHT) 및 혈부축어탕(HCT) 모두 단독투여시 암세포에 대한 작용이 거의 없었으며, MMC와의 병용투여시에도 MMC의 작용에 별 영향을 미치지 못하였다(Table II).

A549 세포에 대해서는 SKT 10⁻⁴g/ml 농도에서, SMT 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, BHT 10⁻⁴g/ml 농도에서, HCT 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, 단독투여시 암세포의 증식을 억제하였으며, MMC와 병용시에는 MMC의 작용에 별 영향을 주지 못하였다(Table III).

KHOS-Np 세포에 대해서는 SDT 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, SMS 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, HCT 10⁻⁶ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 단독사용시 오히려 암세포를 증식시켰으며, MMC와 병용투여시 SDT 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, SMS 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, BHT 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 HCT 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 MMC의 항암작용을 감소시켰다(Table IV).

Table II. Effect of combined preparation of crude drugs and mitomycin C(MMC) on HepG2 cell growth

Samples	Control(%)	Concentration(g/ml)				
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
SKT	100.0±8.9	105.8±5.7	117.9±4.1	106.9±9.6	98.4±7.2	64.2±1.5*
SKT+MMC	46.7±2.0	48.6±2.3	51.0±3.5	51.6±5.3	53.7±0.4*	39.9±1.5*
SMT	100.0±8.9	102.8±1.6	105.9±2.8	99.6±4.1	91.4±5.2	38.5±2.2*
SMT+MMC	46.7±2.0	41.1±5.3	51.6±1.1	49.9±0.4	62.1±6.3	67.7±6.2*
SDT	100.0±4.7	100.8±4.1	104.0±4.6	103.9±3.4	96.5±3.0	68.6±3.3**
SDT+MMC	47.9±2.2	46.4±4.4	46.2±3.5	49.9±1.4	45.1±1.6	33.4±1.9**
SMS	100.0±4.7	102.3±6.5	94.3±3.4	92.2±8.2	99.0±3.8	104.2±6.3
SMS+MMC	47.9±2.2	44.5±2.0	39.3±4.1	43.5±2.6	42.9±2.2	41.8±1.4*
BHT	100.0±3.6	113.0±2.1	99.3±4.9	107.1±3.6	100.0±1.0	75.4±2.1**
BHT+MMC	53.5±3.5	53.3±3.1	55.9±2.1	53.4±2.8	51.5±2.2	41.0±3.4*
HCT	100.0±3.6	109.4±2.6	106.2±2.1	100.6±6.8	99.4±2.6	58.5±2.9***
HCT+MMC	53.5±3.5	57.5±3.4	51.7±2.6	47.4±1.7	48.6±1.2	32.6±3.6**

Mitomycin C (MMC, 0.063µg/ml) treated and non-treated cells(1×10⁴ cells/well) were incubated with various dilution of samples extract for 3 day at 37°C CO₂-incubator, followed by the addition of 20µl of MTT (5mg/ml) and further incubation at 37°C for 4hrs. At the termination of culture, add 100µl of 0.04N HCl-isopropanol to the each well of 96-well plate. The OD of each well was measured with a microplate spectrophotometer(Dynatech MR 700) at 570nm.

The data represent the means±SE of 4 assays.

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

SKT: Sa Kunja Tang, SMS: Sa Mul Tang, SDT: Sipjeon Daebo Tang, SMS: Saeng Maek San, BHT: Boyang Hwanoh Tang, HCT: Hyulbu Choogo Tang.

The % viability was calculated by the following equation:

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

Table III. Effect of combined preparation of crude drugs and MMC(0.625 μ g/ml) on A549 cell growth

Samples	Control(%)	Concentration(g/ml)				
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
SKT	100.0 \pm 3.9	93.3 \pm 3.9	87.7 \pm 2.0	91.0 \pm 5.3	71.9 \pm 3.1*	64.8 \pm 4.7**
SKT+MMC	45.1 \pm 4.1	44.0 \pm 4.1	44.3 \pm 4.5	44.1 \pm 4.1	38.4 \pm 3.2	37.4 \pm 3.1
SMT	100.0 \pm 3.9	79.3 \pm 6.9	72.6 \pm 4.5*	62.4 \pm 2.1*	64.1 \pm 1.8*	22.3 \pm 1.7**
SMT+MMC	45.1 \pm 4.1	44.3 \pm 2.9	37.2 \pm 3.9	35.3 \pm 4.5	39.6 \pm 2.9	21.7 \pm 3.8**
SDT	100.0 \pm 4.4	97.1 \pm 4.0	93.8 \pm 5.4	94.5 \pm 7.0	87.8 \pm 4.8	47.0 \pm 2.0**
SDT+MMC	45.0 \pm 3.1	45.8 \pm 2.5	48.0 \pm 2.7	44.3 \pm 2.5	48.8 \pm 2.5	32.6 \pm 2.1*
SMS	100.0 \pm 4.4	100.5 \pm 4.8	99.9 \pm 4.0	96.8 \pm 4.7	97.0 \pm 4.7	83.7 \pm 5.9
SMS+MMC	45.0 \pm 3.1	50.6 \pm 2.9	55.2 \pm 2.8	51.9 \pm 1.5	52.1 \pm 3.6	44.7 \pm 2.4
BHT	100.0 \pm 5.6	89.6 \pm 4.3	89.6 \pm 3.9	91.9 \pm 2.5	81.2 \pm 5.9*	44.2 \pm 0.9**
BHT+MMC	33.6 \pm 4.2	34.0 \pm 4.2	34.3 \pm 5.2	38.7 \pm 4.6	39.1 \pm 4.2	23.2 \pm 5.1
HCT	100.0 \pm 5.6	84.4 \pm 2.7*	81.8 \pm 3.7*	75.9 \pm 3.5*	83.8 \pm 3.2*	31.2 \pm 2.5**
HCT+MMC	33.6 \pm 4.2	32.4 \pm 4.8	37.0 \pm 4.3	30.0 \pm 5.3	29.2 \pm 4.7	16.4 \pm 3.5*

The data represent the means \pm SE of 4 assays.

: Significantly different from the control group. (: p<0.05, **: p<0.01)

Table IV. Effect of combined preparation of crude drugs and MMC (0.125 μ g/ml) on KHOS-Np cell growth

Samples	Control(%)	Concentration(g/ml)				
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
SKT	100.0 \pm 5.5	112.6 \pm 9.7	104.8 \pm 8.5	112.4 \pm 6.7	106.7 \pm 4.8	80.8 \pm 3.2*
SKT+MMC	50.9 \pm 2.8	45.0 \pm 3.0	46.1 \pm 4.2	47.5 \pm 4.0	48.5 \pm 3.4	36.0 \pm 2.4**
SMT	100.0 \pm 5.5	116.7 \pm 7.1	111.7 \pm 11	113.2 \pm 8.8	110.0 \pm 9.3	108.7 \pm 7.3
SMT+MMC	50.9 \pm 2.8	48.0 \pm 2.3	51.6 \pm 3.0	45.9 \pm 6.1	45.5 \pm 4.3	43.5 \pm 4.2
SDT	100.0 \pm 3.7	109.7 \pm 5.1	126.8 \pm 6.8*	132.1 \pm 5.7**	132.9 \pm 6.7**	125.9 \pm 5.2**
SDT+MMC	56.3 \pm 1.8	58.3 \pm 1.6	56.6 \pm 2.5	67.1 \pm 3.2*	67.5 \pm 2.5**	51.5 \pm 2.4
SMS	100.0 \pm 3.7	135.7 \pm 1.4**	125.2 \pm 6.3*	122.1 \pm 5.1*	118.7 \pm 7.3**	126.2 \pm 6.1*
SMS+MMC	56.3 \pm 1.8	75.6 \pm 4.5*	66.0 \pm 1.4*	60.1 \pm 1.7	63.3 \pm 1.6*	66.8 \pm 1.4*
BHT	100.0 \pm 6.5	101.9 \pm 1.9	111.3 \pm 1.9	114.2 \pm 2.9	106.5 \pm 3.8	110.5 \pm 4.8
BHT+MMC	48.6 \pm 2.4	45.1 \pm 1.0	57.0 \pm 0.7*	56.4 \pm 0.4*	57.8 \pm 1.0*	56.4 \pm 0.8*
HCT	100.0 \pm 6.5	111.2 \pm 4.0	122.8 \pm 3.0*	107.7 \pm 3.8	116.4 \pm 4.5*	115.7 \pm 4.4
HCT+MMC	48.6 \pm 2.4	50.3 \pm 1.3	62.9 \pm 1.4*	58.7 \pm 0.7*	59.1 \pm 0.7*	61.4 \pm 2.1**

The data represent the means \pm SE of 4 assays.

: Significantly different from the control group. (: p<0.05, **: p<0.01)

A431 세포에 대해서는 SMT는 MMC와 병용 시 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 MMC의 항암작용을 증강시켰다. 한편 BHT 및 HCT

는 MMC와 병용시 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 MMC의 항암작용을 감소시켰다(Table V).

HeLa 세포에 대해서는 SKT 10⁻⁴g/ml 농도에

Table V. Effect of combined preparation of crude drugs and MMC(0.031 μ g/ml) on A431 cell growth

Samples	Control(%)	Concentration(g/ml)				
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
SKT	100.0 \pm 9.1	103.2 \pm 5.2	123.3 \pm 7.7	85.7 \pm 11	89.1 \pm 2.3	41.1 \pm 0.6*
SKT+MMC	52.7 \pm 2.3	51.1 \pm 5.4	55.6 \pm 3.2	55.0 \pm 3.1	49.7 \pm 2.5	22.5 \pm 2.6***
SMT	100.0 \pm 9.1	80.3 \pm 4.4	92.1 \pm 1.3	96.2 \pm 3.9	89.5 \pm 2.2	18.8 \pm 1.1**
SMT+MMC	52.7 \pm 2.3	37.6 \pm 4.4*	36.8 \pm 3.4*	41.7 \pm 4.5*	42.7 \pm 1.1*	17.6 \pm 0.8***
SDT	100.0 \pm 4.3	97.8 \pm 1.8	103.9 \pm 2.3	98.9 \pm 6.3	100.3 \pm 1.6	22.4 \pm 1.1
SDT+MMC	56.7 \pm 2.5	46.7 \pm 4.5	44.9 \pm 5.2	48.2 \pm 3.9	52.9 \pm 3.6	18.1 \pm 1.5***
SMS	100.0 \pm 4.3	140.1 \pm 3.9	134.9 \pm 4.5	138.8 \pm 3.0	127.1 \pm 3.5	77.5 \pm 2.9**
SMS+MMC	56.7 \pm 2.5	73.1 \pm 6.2	67.2 \pm 4.8	74.1 \pm 7.1	64.5 \pm 6.6	38.8 \pm 2.9**
BHT	100.0 \pm 6.6	90.9 \pm 3.3	112.2 \pm 3.9	117.1 \pm 5.1	115.8 \pm 9.6	28.0 \pm 0.8**
BHT+MMC	44.0 \pm 5.3	53.0 \pm 5.1	56.5 \pm 6.1	62.3 \pm 3.7*	63.7 \pm 3.7*	20.4 \pm 1.3*
HCT	100.0 \pm 6.6	101.1 \pm 4.0	107.1 \pm 2.1	108.3 \pm 6.7	113.6 \pm 2.1	14.8 \pm 2.1**
HCT+MMC	44.0 \pm 5.3	54.4 \pm 3.2	56.0 \pm 3.8	63.1 \pm 3.9*	60.2 \pm 3.1*	12.4 \pm 1.2**

The data represent the means \pm SE of 4 assays.

: Significantly different from the control group. (: p<0.05, **: p<0.01)

Table VI. Effect of combined preparation of crude drugs and MMC(0.313 μ g/ml) on HeLa cell growth

Samples	Control(%)	Concentration(g/ml)				
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
SKT	100.0 \pm 2.4	96.3 \pm 3.9	102.4 \pm 4.5	101.0 \pm 2.3	84.3 \pm 0.4**	69.4 \pm 1.2***
SKT+MMC	47.7 \pm 2.2	49.3 \pm 2.6	52.9 \pm 2.2	47.2 \pm 2.4	41.8 \pm 1.8*	39.6 \pm 4.3
SMT	100.0 \pm 2.4	119.8 \pm 2.3**	114.2 \pm 5.7*	108.8 \pm 4.8	100.2 \pm 2.4	27.1 \pm 4.0***
SMT+MMC	47.7 \pm 2.2	46.9 \pm 2.5	51.3 \pm 1.8	46.2 \pm 1.8	47.8 \pm 3.1	18.6 \pm 4.5**
SDT	100.0 \pm 7.4	84.0 \pm 1.8	86.5 \pm 2.3	80.3 \pm 2.0*	77.1 \pm 5.5*	23.6 \pm 6.9***
SDT+MMC	48.7 \pm 3.5	51.0 \pm 6.6	48.8 \pm 9.4	49.0 \pm 8.2	47.1 \pm 3.9	31.3 \pm 8.6
SMS	100.0 \pm 7.4	98.9 \pm 6.8	102.5 \pm 6.4	106.3 \pm 17	89.1 \pm 6.9	70.2 \pm 12
SMS+MMC	48.7 \pm 3.5	67.6 \pm 1.7**	65.8 \pm 2.2**	72.4 \pm 5.0**	63.7 \pm 1.8**	55.2 \pm 1.4
BHT	100.0 \pm 2.0	93.8 \pm 5.9	102.6 \pm 1.7	96.8 \pm 2.5	88.4 \pm 4.6*	47.5 \pm 1.5***
BHT+MMC	46.3 \pm 3.4	45.9 \pm 2.8	48.2 \pm 5.2	44.6 \pm 2.8	43.4 \pm 2.7	31.4 \pm 3.9*
HCT	100.0 \pm 2.0	95.2 \pm 5.1	89.9 \pm 3.6*	82.0 \pm 3.3**	81.4 \pm 6.6*	29.9 \pm 4.1***
HCT+MMC	46.3 \pm 3.4	44.9 \pm 3.1	40.8 \pm 3.7	41.0 \pm 4.0	37.4 \pm 3.3	14.3 \pm 0.9**

The data represent the means \pm SE of 4 assays.

: Significantly different from the control group. (: p<0.05, **: p<0.01)

서, SDT 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서, BHT 10⁻⁴ g/ml 농도에서, HCT 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴g/ml 농도에서 단독투여시 암세포의 증식을 억제하였 으며, SMT는 단독투여시 10⁻⁷ 및 10⁻⁶g/ml 농도에서 오히려 암세포를 증식시켰으며 MMC 와 병용시에는 SKT 10⁻⁴g/ml 농도에서 MMC

의 항암작용을 증강시켰고, SMS는 전농도에서 MMC의 항암작용을 감소시켰다(Table VI).

3. Mitomycin C 투여 mouse의 백혈구수에 미치는 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕의 영향

MMC 투여 전, MMC 투여 후 1,3,5 및 7일에 혈중 백혈구수를 측정된 결과, MMC 투여 전의 백혈구수는 10950±380개이었고, MMC 투여 1일 후에 5280±490개로, 3일 후에 4150±190개로 감소되었다가, 5일 후부터는 증가되어 7일째 7760±1000개로 회복되는 경향이었고, MMC를 병용시에는 SKT 투여 1일 및 3일 후에 7800±900개 및 6060±410개로, BHT 투여 5일 후에 8600±640개, HCT 투여 1일과 3일 후에 각각 7080±410 및 6400±280개로 MMC 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1).

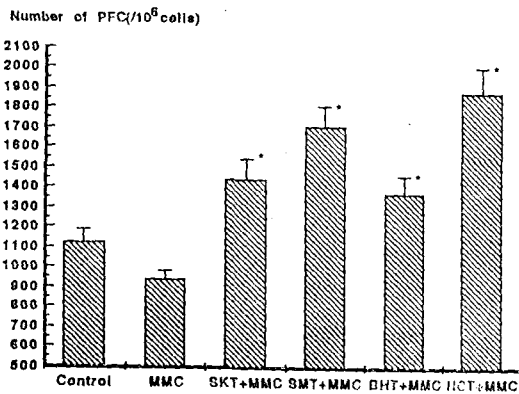


Fig. 1. Effect of SKT, SMT, BHT and HCT extract on leukopenia by MMC in mice. Mice were administered 2g/kg/day of samples, respectively, orally for 7 days and were injected i.p. with 3mg/kg of MMC. Each bar represents the mean±SE of 10 mice. *: Significantly different from the MMC-treated group. (*: p<0.05)

4. Mitomycin C 투여 mouse의 비장 및 흉선의 중량에 미치는 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕의 영향

대조군의 비장무게는 134.2±15.0mg, MMC 투여군은 144.2±11.0mg으로 대조군과 별 차이가 없었으며, MMC와 SKT, SMT, BHT 및 HCT를 각각 병용하였을 때도 대조군에 비해 별

차이가 없었다. 그러나 흉선의 무게는 대조군 60.4±10.0mg인데 비해 MMC 투여군은 30.2±2.5mg, SKT+MMC 투여군은 34.5±4.3mg, SMT+MMC 투여군은 37.4±4.4mg, BHT+

Table VII. Effect of combined preparation of crude drugs and mitomycin C(MMC) on organ weight in mice

Samples	Spleen weight(mg)	Thymus(mg)
Control	134.2±15.0	60.4±10.0
MMC	144.2±11.0	30.2±2.5*
SKT+MMC	140.6±27.0	34.5±4.3*
SMT+MMC	122.0±5.2	37.4±4.4*
BHT+MMC	141.0±13.0	28.4±5.3*
HCT+MMC	125.6±17.0	31.2±5.6*

Mice were administered 2g/kg/day of SKT, SMT, BHT and HCT respectively, orally for 14 days, and were injected i.p. with 3mg/kg of MMC at 1 and 7 days.

The data represent the means±SE of 5 mice.

: Significantly different from the control group. (: p<0.05)

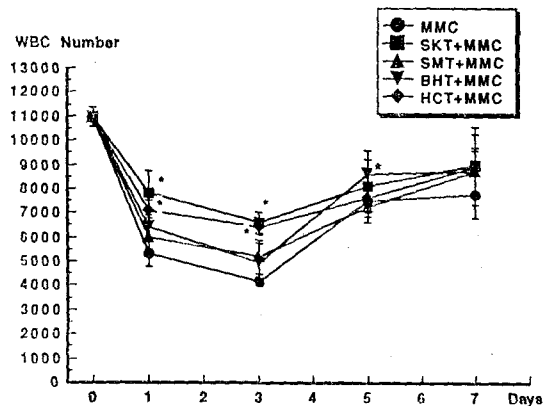


Fig. 2. Effect of SKT, SMT, BHT, HCT and MMC on PFC induction in mice

Mice were given 2g/kg/day samples 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 1×10⁸ cells/0.2ml 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±SE of 5 mice.

*: Significantly different from the MMC-treated group (p<0.01).

MMC 투여군은 28.4±5.3mg, HCT+MMC 투여군은 31.2±5.6mg으로 유의성 있게 감소되었는데, 이는 복합생약들이 MMC에 의해 왜곡된 흉선에 대해 별다른 영향을 주지 못함을 의미한다(Table VII).

5. 항체생성세포(PFC)수에 미치는 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕과 mitomycin C의 병용 효과

대조군의 PFC 숫자는 10⁶ 세포당 1125±67개이었으며, MMC 투여군은 937±46개로 대조군에 비해 현저히 감소하였으나, SKT와 MMC 병용시에는 1438±107개, SMT와 MMC 병용시에는

1708±106개, BHT와 MMC 병용시에는 1375±90개, HCT와 MMC 병용시에는 1875±125개로, MMC 단독 투여군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2).

6. T 임파구증식능에 미치는 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕과 mitomycin C의 병용 효과

마우스의 비장세포 배양계를 이용하여 T 임파구 mitogen인 concanavalin A(1.0μg/ml)를 첨가하여 배양한 뒤, MTT법으로 측정된 결과 대조군의 OD를 100%으로 환산하였을 때, SKT, SMT, BHT 및 HCT만을 각각 10⁻⁸ 및 10⁻⁶g/ml

Table VIII. Effect of combined preparation of crude drugs on T lymphocyte proliferation activity

Samples	Concentration(g/ml)		
	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴
Control(Con A treated)	100.0±3.2		
Non-treated	72.6±1.0		
SKT	120.5±0.3***	112.6±1.0**	65.1±0.6***
SMT	119.9±0.6***	117.7±1.0***	64.0±0.3***
BHT	110.0±4.5	110.0±2.0*	49.1±0.5***
HCT	127.0±3.5***	124.9±0.6***	69.4±0.4***

Spleen cells obtained from C₃H mice were cultured in 96-well plate in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum. Concanavalin A(1μg/ml) was added with various dilution of samples extract and MMC (0.004μg/well) at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C CO₂-incubator for 48hrs, followed by the addition of 20μl of MTT and further incubation at 37°C for 4hrs. At the termination of culture, add 100μl 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 each well was measured with a microplate spectrophotometer at 570nm.

The data represent the means±SE of 4 assays.

: Significantly different from the Con A treated control group. (: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001)

Table IX. Effect of combined preparation of crude drugs and mitomycin C(MMC) on T lymphocyte proliferation activity

Samples	Concentration(g/ml)		
	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴
Control(Con A treated)	100.0±3.2		
MMC	86.9±2.1		
SKT+MMC	100.6±1.9***	93.4±0.6**	54.7±0.7***
SMT+MMC	93.0±1.6*	91.6±1.2*	52.0±0.2***
BHT+MMC	88.4±0.7	94.8±1.9*	39.9±0.4***
HCT+MMC	101.2±1.3***	97.5±0.9***	55.9±0.5***

The data represent the means±SE of 4 assays.

: Significantly different from the MMC-treated group. (: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001)

투여하였을 때 SKT는 120.5 ± 0.3 , 112.6 ± 1.0 , SMT는 119.9 ± 0.6 , 117.7 ± 1.0 , BHT는 110.0 ± 4.5 , 110.0 ± 2.0 , HCT는 127.0 ± 3.5 , $124.9 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 T 임파구 증식능이 증가하였으며, MMC와 병용시에도 MMC 투여군 $86.9 \pm 2.1\%$ 에 비해 SKT와 MMC 병용시 100.6 ± 1.9 , 93.4 ± 0.6 , SMT와 MMC 병용시 93.0 ± 1.6 , 91.6 ± 1.2 , BHT와 MMC 병용시 $10^{-6}g/ml$ 농도에서 94.8 ± 1.9 , HCT와 MMC 병용시 101.2 ± 1.3 , $97.5 \pm 0.9\%$ 로 유의성 있게 증가되었다. 각 약물 $10^{-4}g/ml$ 를 투여하였을 때 단독처리시 SKT, SMT 및 BHT는 Con A를 첨가한 대조군에 비해서는 감소하였으나 Con A를 첨가하지 않은 군에 비하여는 별 차이가 없었고 HCT는 Con A를 첨가하지 않은 군에 비하여 현저히 감소하였는데, 이는 약물 자체에 의한 독성에서 기인된 것이라 추정된다(Table VIII). MMC와 각 약물 $10^{-4}g/ml$ 를 병용 투여하였을 때 MMC 단독처리시 보다 T 임파구 증식능이 현저히 감소하였는데 이의 자세한 작용기전은 추후 검토되어야 할 것이다(Table IX).

고 찰

각 암세포에 대한 복합생약들의 영향을 살펴 보기 위해 전보⁶⁾에서는 사용한 세포가 MOLT-4로 부착하지 않는 세포를 사용하였기에 암세포와 복합생약을 동시에 처리하여 3일간 배양하여 결과를 살펴 보았으나, 본 실험에 사용한 세포주들은 부착성을 가지고 있기 때문에 세포수를 각각 조정하여 96 well plate에 넣고 1일간 배양한 후, 복합생약을 가하고 2일간 배양함으로써 암세포의 부착력에 대한 영향을 최소화하여 복합생약들의 영향을 살펴 보았다. 복합생약들의 영향은 다양하였으며 hepatoma인 HepG2 세포에 대해서는 사용한 6종의 약물들이 영향을 주지 못하였고, lung carcinoma인 A549 세포에 대해서는 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕이 직접 암세포의 증식을 억제하는 작용이 있었다. Osteo sarcoma인 KHOS-Np 세포에 대해서는 십전대보탕, 생맥산 및 혈부축어탕의 단독 처리시 오히려 암세포의 증식을 촉진시켰

으며, MMC와 병용시에도 MMC의 암세포 증식 억제작용을 감소시켰다. 이러한 결과는 보익제를 단독 처리시 MOLT-4 세포를 증식시켰다는 전보⁶⁾의 보고와도 일치하는 것이다. Skin carcinoma인 A431 세포에 대해서는 사물탕과 MMC 병용시 MMC 단독처리시 보다 암세포증식 억제작용이 증가되었다. Cervical carcinoma인 HeLa 세포에 대해서는 사군자탕, 십전대보탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕이 직접 암세포 증식 억제작용이 있었으며, 사군자탕은 MMC와 병용시 암세포 증식 억제작용을 증가시켰다. MMC와 병용시 암세포 증식 억제작용이 증강된다는 결과는 MMC의 용량을 감소시킬 수 있음을 의미하며 이는 복합생약을 MMC와 병용함으로써 MMC의 부작용을 감소시킬 수 있다는 것을 의미하는 흥미로운 결과이다.

한편 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕 단독 사용시에 T 임파구의 증식능을 증가시켰으며, MMC와 병용시에도 MMC 단독투여군에 비해 항체생성 및 T 임파구 증식능을 증가시켰다는 것은 이 약물들이 항암제 MMC에 의해 감소되는 면역능의 감소를 개선시켜 줄 수 있음을 의미하는 것이라 할 수 있으며, 이러한 결과는 보익제에서 전반적으로 세포성 면역증강작용이 나타났다는 전보⁶⁾의 보고 및 유¹³⁾의 보고와도 유사한 결과이다.

암환자의 치료를 위하여 포유동물의 유전자 산물인 생체반응물질과 외부에서 얻어지는 생체 반응조절물질들이 면역계와 관련되어 있다는 보고¹⁴⁻²¹⁾는, 본 실험에 사용한 복합생약들도 이러한 물질과 관련성이 있을 것이라 추정되어지나 자세한 기전은 추후 연구 검토되어야 할 것이다.

사군자탕의 암세포 증식 억제작용은 백혈병 세포인 MOLT-4에서도 나타났으며, 그 작용기전은 DNA 합성의 저하에 기인된다는 전보⁶⁾의 보고와도 관계가 있으리라 사료되며 더 자세한 암세포 증식 억제작용 기전은 추후 연구되어야 할 것이다. 5종의 암세포에 대한 6종의 약물들을 각각 처리하였을 때, 약물에 따라 폐암, 자궁암 및 피부암에 효과를 나타냈지만 간암 및 골수암에는 전혀 효과를 나타내지 못하였다. 이러한 다양한 약물작용의 차이점에 대해서도 추

후 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 항암제의 종류를 작용기전별로 다양화하여, 복합생약과의 병용효과도 검토할 만한 가치가 있다고 사료되며 이의 연구를 현재 진행 중이다.

결 론

항암제 mitomycin C의 부작용을 감소시킬 목적으로 5종의 human cancer cell line에 대하여 6종의 복합생약을 mitomycin C와 병용투여하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 암세포에 대한 mitomycin C의 약 50% 억제농도는 HepG2 세포 0.063 μ g/ml, A549 세포 0.625 μ g/ml, KHOS-Np 세포 0.125 μ g/ml, A431 세포 0.031 μ g/ml 및 HeLa 세포 0.313 μ g/ml이었다.

2. 사군자탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕은 단독사용시 A549 세포 및 HeLa 세포의 증식을 억제하였다.

3. 사군자탕은 mitomycin C와 병용시 HeLa 세포에 대하여, 사물탕은 mitomycin C와 병용시 A431 세포에 대하여 mitomycin C 단독 사용시보다 암세포 증식 억제작용을 증강시켰다.

4. 사군자탕 및 혈부축어탕은 mitomycin C와 병용시 mitomycin C에 의해 감소되는 백혈구수를 3일째 유의성 있게 증가시켰다.

5. 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕은 mitomycin C와 병용시 비장의 중량에는 대조군에 비하여 별 영향을 주지 못하였으나, 흉선의 중량은 대조군에 비하여 감소시켰으며, mitomycin C 투여에 의한 중량감소를 회복시키지 못하였다.

6. 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕은 mitomycin C와 병용시 mitomycin C에 의해 감소되는 항체생산 세포수를 유의성 있게 증가시켰다.

7. 사군자탕, 사물탕, 보양환오탕 및 혈부축어탕은 mitomycin C와 병용시 mitomycin C에 의해 감소되는 T 임파구 증식능을 증가시켰으며, 단독 사용시에도 T 임파구 증식능을 증가시켰다.

감사의 말씀—이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

(1992년 9월 23일 접수 : 10월 2일 수리)

참 고 문 헌

1. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A. and Taylor, P.: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Maxwell Macmillan, 8th, p.1202 (1991).
2. Hersh, E.M. and Ereish, E.J.: In *Methods in Cancer Research*, New York, Academic Press, p.335 (1986).
3. Aburada, M.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.275 (1988).
4. Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E.: *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicine*, p.291 (1988).
5. 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).
6. Ahn, M.S., Kim, S.G., Eun, J.S., Lim, J.P., Yum, J.Y., Suh, E.S. Ch, C.H. and So, J.N.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 158 (1992).
7. 申載鏞 : 方藥合編解說, 成輔社, p.57, 62, 40, 27, 443 (1988).
8. 李尙仁 : 方劑學(廣州中醫學院編), 永林社, p.253 (1990).
9. Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983).
10. Kotnik, V. and Fleischmann, W.R. Jr.: *J. Immunol. Methods* 129, 23 (1990).
11. Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: *Immunology* 14, 599 (1968).
12. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: *J. Immunol.* 120, 1497 (1979).
13. 劉正才 外 : 中醫免疫, 四川省, 重慶出版社, p.54, 62 (1983).

14. Cheever, M.A., Greenberg, P.D. and Fefer, A.: *J. Biol. Resp. Modif.* 3, 113 (1984).
15. Goldstein, A.L. and Chirigos, M.A.: *Progr. Cancer Res. Ther.* 20, 1 (1982).
16. Mitchell, M. and Cetgen, H.F.: *Progr. Cancer Res. Ther.* 21, 1 (1982).
17. Killion, J.J.: *Cancer Immunol. Immunother.* 4, 115 (1978).
18. Mazurek, N., Bashikin, P. and Pecht, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6014 (1983).
19. Whitney, R.B. and Sutherland, R.M.: *Cell Immunol.* 5, 137 (1972).
20. Goldin, A., Schepartz, S., Venditti, J. and Devita, V.: *Methods Cancer Research* 16, 165 (1978).
21. Klein, T., Specter, S. Friedman, H. and Szentivanyi, A.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 166, 1 (1983).