

생약복합제제 길경탕 및 가미길경탕의 항암효과 (제 2 보)

김성훈 · 박경식¹ · 유시용^{2*}

대전대학교 한의학과, ¹상지대학교 한의학과, 한국화학연구소

Cytotoxic Activity of the Medicinal Formula Kilkyungtang and Two Modified Kilkyungtang against Cultured Tumor Cells *in Vitro*. II

Sung Hoon Kim, Kyung Sik Park¹ and Shi Yong Ryu^{2*}

Oriental Medical College, Taejeon University, Taejeon 300-716, Korea;

¹Oriental Medical College, Sangji University, Wonju 220-702, Korea; and

²Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract—The medicinal formula, Kilkyungtang (KKT) and two modified Kilkyungtang (KKT-1 and KKT-2), which were supplemented by the additional crude drug, *Houttuyniae herba* (KKT-1), and *Oldenlandiae diffusae herba* (KKT-2) to KKT, had been applied widely as decoctions for the treatment of malignant tumors. Cytotoxic activities against two tumor cell lines, A549 and B16-F₀ were investigated. However, none of them were found to exhibit significant cytotoxicity upon tested tumor cells below the concentration of 1000 µg/ml. However, cytotoxic activities of three reputed antitumor agents, *i.e.*, mitomycin C (MMC), cisplatin (CPT) and 5-fluorouracil (5-FU) was significantly potentiated by the combined treatment of them with KKT, KKT-1 and KKT-2 respectively, especially against A549 (human non small cell lung adenocarcinoma), *in vitro*.

Key words—Kilkyungtang; modified preparation; antitumor; B16-F₀; A549; *in vitro*.

著者들은 이미 前報를 통하여 韓方臨床에서 주로 肺癌의 치료목적으로 頻用되는 原方 桔梗湯(KKT) 과 여기에 魚腥草와 白花蛇舌草를 各各 加味하여 調劑한 加味桔梗湯 I 및 II (KKT-1, KKT-2)을 각각 B16-F₀ 및 S-180 癌細胞를 移植한 mouse에 經口 投與한 후 나타나는 實驗動物의 體重 및 腫瘍무게의 增減 그리고 生存延長效果등을 指標로하여 이들 製劑의 抗癌效果를 檢討하여 報告한 바 있다¹⁾.

즉, 醫學正典²⁾에 명시된 原方 桔梗湯(KKT)²⁻³⁾과 이 原方 桔梗湯에 魚腥草와 白花蛇舌草를 따로따로 加味하여 調劑한 加味桔梗湯 I 및 II (KKT-1, KKT-

2)는 모두 murine tumor cell Sarcoma-180으로 誘發된 mouse 癌種에 대하여 모두 유의성 있는 壽命延長效果를 보여주었으며 B16-F₀으로 誘發된 mouse 癌種에 대하여도 현저한 腫瘍무게 減少效果를 보여주었다. 이와 같이 癌細胞를 移植한 實驗動物을 대상으로 한 *in vivo* 實驗結果를 통하여 관찰되어진 이들 製劑들의 抗癌效果에 관한 mechanism을 알아보기 위한 試圖의 一環으로 cell culture를 통하여 培養한 A549 (human non small cell lung adenocarcinoma) cell과 B16-F₀ (murine melanoma) cell에 이들 製劑들을 *in vitro*에서 직접 投與한 후 나타나는 細胞成長阻止效果를 檢討하였으며 아울러 現在 臨床에서

*교신저자 : Fax 042-861-1291

가장 頻繁하게 使用되어지고 있는 市販抗癌劑 5-Fluorouracil (5-FU), mitomycin-C (MMC) 및 cisplatin (CPT)등을 본 製劑들과 함께 併用投與하였을때 나타나는 抗癌作用의 相乘效果를 檢討한 결과 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

試藥 및 器機 - RPMI 1640, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide), phenolred, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline (PBS), sodium dodecylsulfate (SDS), 5-fluorouracil(5-FU), trypan blue, sodium azide, isopropanol, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA 및 mitomycin C (MMC) 등은 Sigma社로부터, cisplatin (CPT)은 大熊製藥으로부터 각각 購入하였으며 기타 一般試藥은 모두 特級 및 一級試藥을 使用하였다.

ELISA-reader(Emax, USA), autoclave (Hirayama), CO2 incubator (Model VS -9108 MS, Vision scientific Co.), clean bench (KMC-14001, Vision scientific Co.), centrifuge(GS-6R, Beckman), inverted microscope (Nikon), light microscope (UFX-DX, Nikon), titer plate shaker(Labline), culture flask (Falcon 3024), multi-well microplate (96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet (Falcon) 및 syringe filter (0.25 μ m, Falcon)등을 使用하였다(Table I).

使用藥材의 構成 - 實驗에 使用된 原方 桔梗湯(KKT)의 構成生藥과 成人 1일 1회 사용량(1貼)은 前報¹⁾에 紹介한 바와 同一하며(Table I), 각각의 構成生藥은 모두 乾材藥材商을 통하여 市販品을 구입하여 使用하였다.

또, 加味桔梗湯 I (KKT-1) 및 加味桔梗湯 II(KKT-2)은 上記한 原方 桔梗湯에 각각 魚腥草(Houttuyniae Herba) 6g 및 白花蛇舌草(Oldenlandia diffusa Herba) 6g을 따로 첨가하여 각각 1첩 당 총중량 64.4g이 되도록 調劑하였다.

檢液의 調製 - 上記한 桔梗湯(KKT), 桔梗湯 I (KKT-1) 및 桔梗湯 II(KKT-2) 각 二貼分量 (116.8

Table I. Comoposition of Kilkyungtang and the amount for a dose/day.

생 약	Latine name	Amount
길경(桔梗)	Platycodi Radix	8.0 g
패모(貝母)	Fritillariae Cirrhosae Bulbus	8.0 g
당귀(當歸)	Angelicae Gigantis Radix	6.4 g
과루인(瓜蒌仁)	Trichosanthis Fructus	6.4 g
저각(枳殼)	Aurantii Fructus	4.0 g
의이인(薏苡仁)	Coicis Semen	6.4 g
상백피(桑白皮)	Mori Cortex	4.0 g
방기(防己)	Stephaniae Tetrandrae Radix	4.0 g
감초(甘草)	Glycyrrhizae Radix	2.4 g
황기(黃耆)	Astragali Radix	4.0 g
행인(杏仁)	Armeniacae Amarum Semen	2.4 g
백합(百合)	Lilii Bulbus	2.4 g
Total amount		58.4 g

g, 129.6 g 및 129.6 g)을 各各 蒸溜水 2,000 ml씩으로 2 時間 동안 還流加熱抽出하고 濾過한 濾液을 凍結乾燥하여 각각 45.8 g, 48.9 g 및 48.7 g의 粉末狀 extract를 얻었다. 이들을 각각 適當한 농도로 RPMI 1640 medium에 녹인 후 syringe filter (0.25 μ m, Falcon)로 濾過하여 얻은 濾液을 檢液으로 使用하였다.

癌細胞의 培養 - A549 cell (human non small cell lung adenocarcinoma) 및 B16-F₀ (murine melanoma, ATCC No. CRL 6322) cell은 RPMI 1640-HEPES medium, 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin (100 unites/ml, 100 μ g/ml) 및 L-glutamine 등을 混合한 培養液으로 37°C 恒溫恒습 5% CO₂ incubator 내에서 培養하였다. 3-4일 간격으로 繼代를 계속하였으며 cell이 75 cm² culture flask의 70-80%에 monolayer 狀態로 자라고 있을때 培養細胞 表面을 phosphate buffered saline으로 씻어준 後-10%FBS 5 ml을 넣어 37°C에서 3分間 放置한 後 RPMI 1640-10% FBS 5 ml을 넣고 反應을 中止시키고 2回 RPMI 1640 로 遠心洗滌한 後 實驗에 使用하였다.

細胞成長沮害效果測定 - MTT法⁴⁻⁵⁾에 따라 A549 및 B16-F₀ cell에 대한 *in vitro* cytotoxicity를 측정하였다. 즉 96 well plate의 各 well에 암세포 1×10⁴ cells/200 μ l를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 24時間 培養한 後, 검액 20 μ l씩을 넣

고 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 培養하였다. 培養終了 4時間 前에 5 µg/ml 濃度로 PBS에 稀釋된 MTT 溶液 20 µl를 各 well에 添加하고, 培養 終了時까지 銀薄紙로 빛을 遮斷시켜 培養하였다. 培養 終了時 well plate를 1000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 上層液을 除去하였다. 여기에 0.04 N HCl-isopropanol 100 µl를 添加하고 20分間 攪拌시킨 다음 titer plate shaker(Lab Line)로 5分間 계속 shaking한 후 ELISA-reader (E_{max})를 利用하여 570 nm에서 흡광도를 測定하고 對照群의 吸光度와 比較하여 細胞成長率을 %로 換算하였다. 모든 檢液에 대한 檢定은 triplicate로 실시하여 平均値를 算出하였으며 各 檢體를 濃度別로 처리하여 얻어진 平均 細胞成長率(%)을 根幹으로하여 Lotus data regression program에 따라서 細胞成長을 50% 抑制하는 各 檢體의 濃度(IC₅₀)를 算出하였다.

결과 및 고찰

漢方臨床에서 주로 肺癌의 治療 목적으로 頻用되는 桔梗湯(KKT)과 여기에 魚腥草와 白花蛇舌草를 따로따로 加味하여 조제한 加味桔梗湯(KKT-1, KKT-2)들의 抗癌效果 및 그 mechanism을 알아 보기 위한 試圖로서 우선 *in vitro*에서 사람의 肺癌 株 A549와 murine tumor cell B16-F₀에 미치는 이들 製劑의 직접적인 cytotoxicity, 즉 癌細胞成長 阻害 效果를 MTT방법에 따라 測定하여 보았다. 아울러 이들 製劑들을 既存의 抗癌劑인 mitomycin C (MMC), cisplatin (CPT), 5-Fluorouracil (5-FU) 등과 併用 投與하였을 때 일어나는 相乘效果를 살펴 보았다.

우선 human tumor cell A549에 對照藥物로 사용한 既存의 抗癌劑들을 各 濃度別로 投與하고 그 때 얻어진 細胞成長 阻止率을 根幹으로 하여 各 各 IC₅₀ (50% 細胞成長 阻止濃度) value을 算出하여 본 결과 MMC의 경우 0.65 µg/ml, CPT은 0.47 µg/ml, 5-FU은 7.8 µg/ml 등으로 나타나 모두 卓越한 細胞成長 阻害效果를 보여주었다. 또, murine tumor cell B16-F₀에 대하여서도 이들 對照藥物들은 各 各 MMC의 경우 0.39 µg/ml, cisplatin은 0.52 µg/ml, 5-fluorouracil은 2.89 µg/ml 등으로 그 IC₅₀ value가 측정되어졌다. 반면,

human tumor cell A549에 대하여 桔梗湯(KKT) 및 加味桔梗湯(KKT-1 및 KKT-2)을 各 各 1.0, 10.0, 100.0 및 1000 µg/ml 濃度로 投與하였을 때 나타나는 癌細胞成長 阻止率은 桔梗湯(KKT)의 경우 3%, 4%, 5% 및 14%, 加味桔梗湯 I (KKT-1)의 경우 6%, 8%, 12% 및 20%, 加味桔梗湯 II (KKT-2)의 경우 1%, 3%, 6%, 및 30% 등으로 나타나 이들 3가지 製劑들은 모두 적어도 100 µg/ml 以下の 濃度에서는 A549 cell에 대하여 直接적인 細胞成長 阻害效果가 없는 것으로 思料되며 高濃度(1000 µg/ml)에서도 아주 微微한 效果를 나타내었다. 또, 이들 製劑들을 murine tumor cell B16-F₀에 대하여 各 各 같은 濃度로 適用하여 본 결과 細胞成長 阻止率은 桔梗湯(KKT)의 경우 10%, 12%, 12% 및 19%, 加味桔梗湯 I (KKT-1)의 경우 20%, 20%, 28% 및 30%, 加味桔梗湯 II (KKT-2)의 경우 20%, 22%, 31%, 및 52% 등으로 나타나 桔梗湯(KKT)의 경우에 있어서 적어도 100 µg/ml 이하의 濃度에서는 B16-F₀ cell에 대하여 직접적인 細胞成長 阻害效果가 전혀 없는 것으로 나타났으며 기타 加味桔梗湯 KKT-1 및 KKT-2의 경우에 있어서도 高濃度(1000 µg/ml)의 경우에만 약간의 細胞成長 阻止效果가 認定되고 있으나 그 效果는 微微한 것으로 思料된다. 이와같은 實驗結果를 미루어보아 이미 前報에 報告한 바와 같이 이들 桔梗湯 製劑들이 *in vivo*實驗에서 B16-F₀를 移植한 實驗動物에 대하여 卓越한 抗癌效果를 나타내고 있음에도 불구하고 培養된 同一한 癌細胞들에 대하여도 *in vitro* 實驗에서 細胞成長 阻害效果를 거의 보여주지 못한다는 사실은 대부분의 既存 抗癌劑들의 경우와는 달리 *in vivo* 실험을 통하여 관찰된 이들 製劑들의 抗癌效果는 *in vitro* 實驗을 통하여 觀察되어질 수 있는 癌細胞에 대한 직접적인 細胞成長 阻止效果와는 無關한 전혀 다른 mechanism에 依存하고 있다는 사실을 示唆하고 있다. 이와 같은 假定 下에 이들 製劑들이 가질수 있는 또 다른 抗癌 mechanism의 可能性을 알아보기 위하여 試圖하여 본 여러가지 實驗方法의 一環으로서 既存의 抗癌劑와 더불어 이들 製劑들을 併用投與하였을 때 期待할 수 있는 上昇效果를 測定하여 보았다. 즉, 豫備實驗을 통하여 確立된 바와 같이 *in vitro* 實驗條件 下에서 human tumor cell A549에 대하여 MMC, CPT 및 5-FU를 各 各 癌細胞

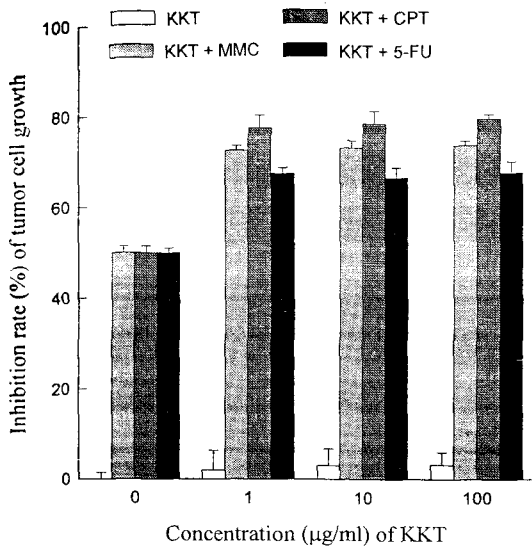


Fig. 1. Inhibition rate(%) of tumor cell growth by the combined treatment of antitumor agents with KKT. Cultured A549 cells were exposed to MMC(mitomycin, 0.65 µg/ml), CPT(cisplatin, 0.47 µg/ml) and 5-FU (5-fluorouracil, 7.8 µg/ml) together with given amount of KKT (1.0, 10.0 and 100.0 µg/ml) for 48 hours respectively and the cell growth inhibition rate (%) was estimated by MTT assay.

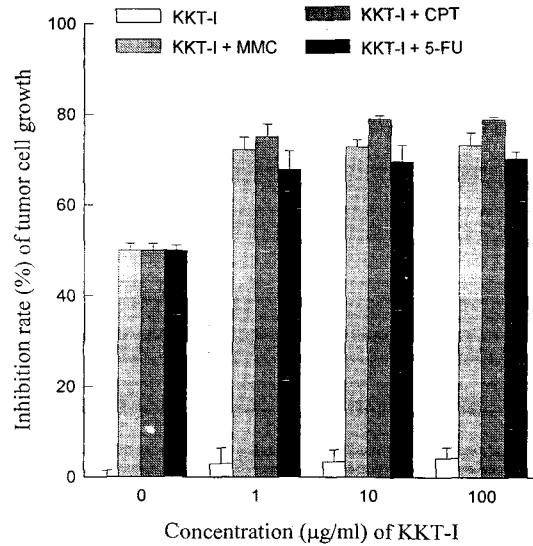


Fig. 2. Inhibition rate (%) of tumor cell growth by the combined treatment of antitumor agents with KKT-1. Cultured A549 cells were exposed to MMC(mitomycin, 0.65 µg/ml) CPT(cisplatin, 0.47 µg/ml) and 5-FU (5-fluorouracil, 7.8 µg/ml) together with given amount of KKT-1 (1.0, 10.0 and 100.0 µg/ml) for 48 hours respectively and the cell growth inhibition rate (%) was estimated by MTT assay.

胞成長을 50% 阻害하는 濃度(IC₅₀)로 投與하고 여기에 각각의 桔梗湯 製劑(KKT, KKT-1 및 KKT-2) 들을. 이들 製劑들만을 單獨으로 投與하였을 때 癌細胞 A549의 成長에 거의 影響을 주지 못하는 濃度 즉 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml 및 100.0 µg/ml 농도로, 각각 添加하여 주었을 때 나타나는 細胞成長 阻止效果의 變化를 觀察하여 보았다. 우선 抗癌劑 MMC에 대하여 桔梗湯 (KKT)을 첨가하였을 경우를 살펴보면 MMC만을 0.65 µg/ml 濃도로 投與한 경우 50±1.5%의 細胞成長 阻止率을 보여준 반면 同一한 濃度の MMC에 桔梗湯(KKT)을 각각 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml 및 100.0 µg/ml 농도로 첨가하였을 때 나타난 細胞成長 阻止率은 각각 75%, 75% 및 78% 등으로 나타나 MMC의 癌細胞成長 阻止效果가 桔梗湯(KKT)의 添加에 따라 상당히 增加하고 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 桔梗湯(KKT)을 첨가함에 따라 抗癌劑의 癌細胞成長 阻止效果가 增加하는 樣相은 MMC 이외의 CPT 및 5-FU 등의 抗癌劑를 使用한 實驗의 경우에서도 약간의 차이는 있으나 모

두 비슷한 傾向을 나타내었다(Fig. 1).

또, 桔梗湯(KKT) 대신 加味桔梗湯 KKT-1 및 KKT-2를 MMC, CPT 및 5-FU에 각각 濃度別로 添加하여 본 경우에도 모두 이러한 細胞成長 阻止率의 增加效果가 觀察되었으며 그다지 큰 차이는 없으나 모든 桔梗湯 製劑 KKT, KKT-1 및 KKT-2은 모두 CPT와 병용 투여되었을 때 癌細胞成長 阻止率의 上昇效果가 보다 크게 나타났다(Fig. 2 및 Fig. 3).

한편, 이와 같이 MMC, CPT 및 5-FU 등의 抗癌劑가 KKT, KKT-1 및 KKT-2와 併用投與되었을 때 나타나는 癌細胞成長 阻止率의 上昇效果는 A549 cell 대신 murine tumor cell B16-F₀ 을 사용한 경우에 있어서도 類似한 樣相을 나타내었으나 (data 省略) 添加한 桔梗湯 製劑 自體가 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml 및 100.0 µg/ml의 濃度領域에서 어느정도 B16-F₀ 細胞의 成長을 阻止(10-30%)하고 있어 이들의 첨가에 따른 上昇效果의 有無를 판단하기가 어려웠다.

이상의 實驗結果를 綜合하여 보면, 桔梗湯(KKT),

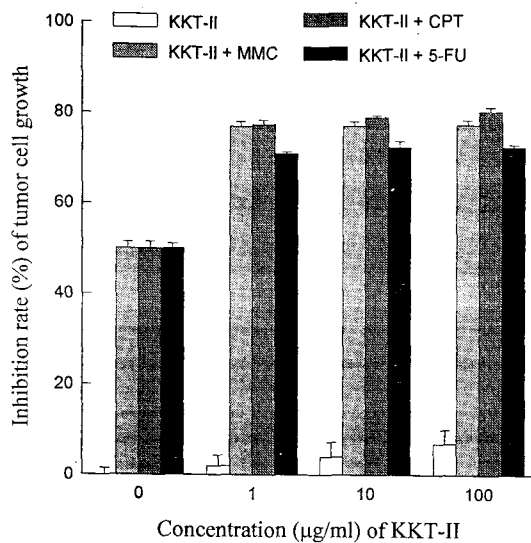


Fig. 3. Inhibition rate (%) of tumor cell growth by the combined treatment of antitumor agents with KKT-2. Cultured A549 cells were exposed to MMC(mitomycin, 0.65 µg/ml), CPT(cisplatin, 0.47 µg/ml) and 5-FU (5-fluorouracil, 7.8 µg/ml) together with given amount of KKT-2 (1.0, 10.0 and 100.0 µg/ml) for 48 hours respectively and the cell growth inhibition rate (%) was estimated by MTT assay.

加味桔梗湯 I (KKT-1) 및 加味桔梗湯 II (KKT-2)은 human tumor cell A549 및 murine tumor cell B16-F₀을 사용한 *in vitro* 세포성장 阻止實驗 결과 모두 100.0 µg/ml 이하의 濃度에서는 뚜렷한 세포성장阻止效果가 관찰되지 아니하였다. 그러나 이들 각 製劑들을 각각 既存의 市販抗癌劑 MMC,

CPT 및 5-FU 등과 併用 投與하였을 때 이들은 모두 既存 抗癌劑의 細胞성장 阻止效果를 큰 폭으로 增強시키는 上昇效果를 보여주었다. 現在 본 研究室에서는 이들 製劑의 添加에 따른 既存抗癌劑의 細胞성장 阻止率의 上昇效果 및 *in vivo* 實驗을 통하여 示唆된 바 있는 이들 桔梗湯 製劑(KKT, KKT-1 및 KKT-2)들의 抗癌效果를 보다 明確하게 說明할 수 있는 또 다른 藥理作用 즉 癌細胞 分化(cell differentiation)誘導效果 혹은 免疫增強 效果 등을 *in vitro* 實驗을 통하여 檢討 중에 있다.

인용문헌

1. 김성훈, 박경식, 유시용(1996) 生藥複合製劑 桔梗湯 및 加味桔梗湯의 抗癌效果 (第1報). 生藥學會誌 26: 37-41.
2. 吳博(1986) 醫學正傳, 307-308. 成輔社, 서울.
3. 許浚(1981) 東醫寶鑑, 392-394. 南山堂, 서울.
4. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 55-65.
5. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936.

(1996. 2. 15. 접수)