

항암활성 수종생약의 B16-F₀와 A549 암세포에 대한 항전이 효과(Ⅱ)

김성훈* · 유시용**

ABSTRACT

Antimetastatic effect of several crude drugs with antitumor activity
on B16-F₀ and A549 cells(Ⅱ)

Sung Hoon Kim*, Shi Yong Ryu**

* Oriental Medical College, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

** Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, 305-606 Korea

Ethyl ether fractions of Ferula Resina(EFR) and Lithospermi Radix(ELR) and hexane fraction of Salviae miltiorrhizae Radix(HSR) exerted an inhibitory effect on cell adhesion of A549 to extracellular matrix most effectively in vitro cell adhesion assay. Thus, with above fractions for the evaluation of antitumor activity, T/C% was monitored in ICR bearing S-180 and for antimetastatic effect, pulmonary colonization assay, weight of organs, changes of WBC and

* : 대전대학교 한의과대학

** : 한국화학연구소

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

* 본 논문은 1996년 3 월 10 일 대한한의학회에 제출된 논문임.

platelet were studied. In pulmonary colonization assay incidence rate to control was 73 %, 42 %, 14 % in ELR, HSR and EFR-treated groups respectively. Gain of lung weight was significantly inhibited in all groups, while spleen weight was significantly reduced only in SMR group, but no changes in kidney and liver as compared with control. Number of platelet was significantly increased in all groups to normal range as compared with thrombocytopenic control. WBC was significantly reduced only in LR group. These results suggest that ethyl ether fraction of *Ferula Resina* has more effective antimetastatic activity.

key words : Antimetastatic effect, *Ferula Resina*, *Lithospermi Radix*, *Salviae miltiorrhizae Radix*

I. 緒 論

암이 현대 사회의 불치병으로 대두된 이래 동서 의학에서 이의 퇴치를 위해 끊임없는 노력을 하여 항암제의 개발에 있어 상당한 진전이 있었다¹⁻⁵⁾. 그러나 항암 효과가 증대되면서 부작용이 적고 항전이 효과를 겸한 새로운 항암제의 개발에는 어려움이 적지 않다. 최근에는 생약으로부터 암세포를 직접 살해하는 방법외에도 암세포의 전이를 예방함으로써 결국 암을 예방 또는 치료하려는 연구가 진행되고 있다⁶⁻⁹⁾.

한의학에서는 옛부터 수종의 한약을 현대의 암과 유사한 병증에 사용해 왔는데 이 중에는 그 항암활성이 임상과 실험에서 다수 입증되었다¹⁰⁻²⁰⁾.

자초, 단삼 및 아위는 항암 활성을 가진 한약으로 알려져 있는데 자초는 성미가 苦寒하여 清熱涼血藥으로 분류되어 각종 창양 및 습진에 사용되고 있으며 topoisomerase I 에 저해작용을

나타내는 항암성 성분으로 acetylshikonin 및 shikonin 등이 밝혀져 있으며²¹⁾, 단삼은 성미가 苦微寒하여 活血祛瘀, 安神寧心, 消癰止痛 등의 효능이 있어 活血祛瘀藥으로 분류하는데 성분으로 tanshinonate 등을 함유하고 있으며²²⁾, 아위는 성미가 苦辛溫하며 消積殺蟲하며 癥瘕積聚를 치료하는 효능이 있으며 주로 수지를 40-64% 가량 함유하고 있으며 성분은 secbutyl propenyl disulfide가 45%를 차지하고 있으며 약리작용은 결핵균억제작용 및 거담효과가 알려져 있다²³⁾.

본 실험실에서는 41종의 생약을 이용하여 세포외기질에 대한 세포부착 저지작용과 ADP에 대한 혈소판응집 억제작용을 살펴보았던바 자초, 단삼 및 아위가 유효한 효과를 나타내었다.

따라서 상기약의 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 입증하려는 일환으로 아위와 단삼의 ethyl ether 분획 및 자초의 hexane 분획을 이용하여 in vitro에서 세포부착저지 작용을 측정하였으며, in vivo에서 ICR 생쥐에 S-180을 이식하고 T/C %

를 살펴보고, C57BL/6의 미정맥에 B16-Fo를 주입하고 pulmonary colonization assay, 장기무게 측정, WBC 및 platelet 수의 변화등을 측정하였던 바 유의성 있는 결과가 있어 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 시약 및 약물

실험에 사용된 시약은 RPMI 1640(sigma), fetal bovine serum(sigma), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, sigma), trypsin-EDTA(sigma), 3-[4, 5-dimethylthiazo 1-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT sigma), ethanol(Merck, Germany), penicillin-streptomycin(sigma), sodium bicarbonate(GIB CO), trypan blue(sigma), phenol red(sigma), sodium azide(sigma), isopropanol(sigma), HCl (Merck, Germany), acetic acid(Glicial), sodium hydroxide(sigma)등을 구입하였고, 기타 일반 시약은 모두 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 본 연구에 사용된 생약인 자초(Lithospermi Radix), 단삼(Salviae miltiorrhizae Radix) 및 아위(Ferula Resina) 등은 한의원에서 구입하여 정선하여 실험에 사용하였다.

2) 사용기기

본 연구에 사용한 기기는 CO₂ incubator

(Vision), clean bench(Vision), centrifuge(Beckman), inverted microscope(Nikon), light microscope(Nikon), ELISA-reader(Emax), rotary vacuum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama), micropipet(Gilson), vortex mixer(thermolyne) 및 aggregometer(Chrono-Log), freeze dryer(Eyela), culture flask(falcon 3024), multi-well plate(96-well, falcon), conical tube, disposable pipet(5ml, 10ml, 25ml, Falcon) 및 syringe filter(0.25um, Falcon)등을 사용하였다.

3) 실험동물

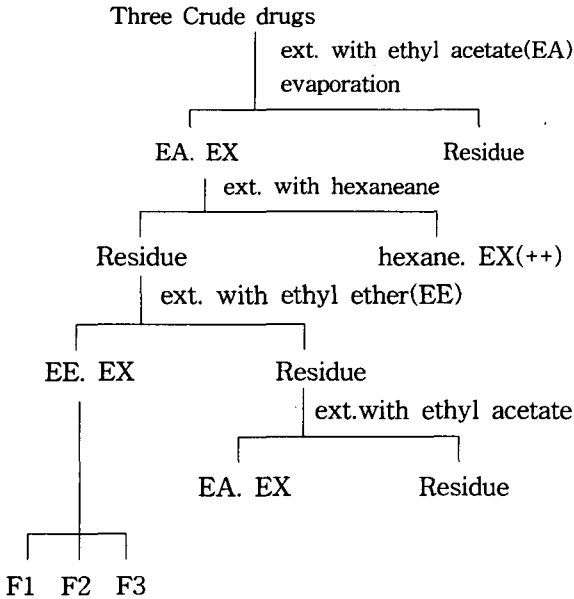
ICR계 생쥐와 C57BL/6생쥐를 화학연구소에서 분양받아 실험에 사용하였다. 체중은 18-22g의 생쥐를 사용하였으며 실험군당 10마리씩 배정하였다.

2. 方 法

1) 검액의 조제

상기의 생약을 분말로하여 99.5% MeOH 용액에 상온에서 3시간 담그고 여과하는 과정을 3회 반복하고 모액을 rotary vacuum evaporator로 농축한 후 다시 hexaneane, ethyl ether, ethyl acetate 층의 순서로 용매 분획을 추출하고 freeze dryer로 동결 건조하여 실험시에는 RPMI1640 free medium에 용해시켜 syringe filter(0.25um, falcon)를 사용 여과(filtrate)하여 사용하였다.

(Scheme 1)



2) 폐암주의 세포배양조건

폐암주는 mouse melanoma인 B16-F₀(ATCC No.CRL 6322)과 사람의 폐암주인 A549(human Lung Cancer, ATCC CRA7909)를 실험에 사용하였다. 배양액은 RPMI1640-HEPES medium (sigma), 10% fetal bovine serum(GIBCO), penicillin streptomycin(100units/ml, 100µg/ml) 및 L-glutamine(sigma)에서 계대 배양하였다. 암주가 75cm² culture flask에 monolayer 상태로 70-80%를 차지하고 있을때 실험을 실시하였다. 준비된 flask는 배양세포 표면을 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A, sigma) 용액으로 씻어준 후 trypsin-EDTA으로 single cell 이 되도록 떼어내고 실험에 사용하였다.

3) 세포부착저지작용 측정

A549, B16-F₀ 세포는 cell culture flask에 monolayer로 자라도록 세포 농도를 조절하면서 키운다. 단삼과 아위의 EE층, 자초의 hexan층을 DMSO에 녹이고 배지로 10배 희석한 후 최종 농도가 2×10⁻⁴g/ml 및 4×10⁻⁴g/ml 등으로 조정 한 후 실험에 사용하였다. 암세포 현탁액은 1×10⁵ cells/ml가 되게 조제하여 24 well plate 의 각 well에 1ml 씩 가하고 0.5% CO₂, 37°C 에서 배양하였다. 약 20시간이 경과된 후 well plate 를 흔들어 준 다음 현탁액은 자동 피펫으로 분리하여 다른 시험관에 넣고 여기에 0.25% trypan blue 용액을 가하여 세포를 염색한 후 세포수를 계산하였다. 한편 상정액을 제거한 각 well 에는 0.5% trypsin 용액 300µl 씩을 가하고 약 1시간 incubation 시켜 기질에 부착된 세포를 현탁시킨 후 0.25% trypan blue 용액으로 염색 하여 세포수를 계산하였다. 세포수와 기질에 부착된 세포수의 비율을 기준으로하여 시료 첨가 시 이 부착세포/비부착세포의 비율의 변화를 계산하여 부착 저지 비율을 산출하였다.

24 well plate

- cell suspension 1ml(10⁵ cells/ml)
- samples 20ul(in 10% Etoh soln)
- incubation for 20 hrs
- 상정액 -- trypan blue로 염색
- cell count
- trypsin 300ul
- incubation for 10 min
- trypan blue로 염색
- cell count

4) 항암 및 항전이 동물실험

(1) B16-F0 이식과 검액 투여

B16-F0(ATCC,CRL6322)을 C57BL/6 mouse의 피하에 계대 배양하였고 실험전에 형성된 종양 부분을 분리하여 종양 1g에 10ml의 Cold D-PBS(Ca²⁺, Mg²⁺-Free,SIGMA ,U.S.A)이 되게 조절한 후 100mesh (SIGMA,U.S.A)로 종양조직을 분쇄한 후 원심분리(1500rpm,5min.)한다. 이 pellet에 collagenase(1700 units/mg, type-XI Sigma, U.S.A.)를 tumor 0.1g/ml을 처리하여 30분간 water bath(37 °C)에서 incubation시킨 후 원심분리(1300 rpm, 5min.)한다. 상층액을 제거하고 0.85% NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 후 37 °C 배양기에서 5분간 방치하여 적혈구를 파괴시킨 후 원심 분리하여 B16-F0 cell을 분리한다. 최초 1g의 tumor당 10ml의 D-PBS로 조절한 후 18-20g인 C57BL/6 mouse의 미정맥에 주사하였다. 검액은 B16-F0세포를 이식 후 24시간 경과한 후 1일 1회씩 단삼과 아위의 EE층, 자초 hexane층을 각각 133.3mg/kg씩 10일간 1일 회경구 투여하고 18일 후 pulmonary colonization assay, 장기무게 및 hematology를 측정하였다.

(2) Sarcoma-180 종양세포주 이식 및 T/C% 측정

종양 세포주는 본 실험실에서 복강내에 일주일 간격으로 이식하여 보존하고 있는 sarcoma-180 종양 세포를 사용하였다. 즉 이식 8일째 복수가 충만한 마우스를 ether 마취하에 도살 방혈시킨 후 sarcoma-180 종양세포와 복수를 함

께 무균적으로 채취하여 0.83% NH₄Cl-Tris buffre를 가해 잘 섞은 다음 적혈구는 용혈시켰다. 그 후 1200rpm에서 7분간 원심분리하여 상층액을 버린 다음, pellet를 잘 분산시킨 후, RPMI1640 배지를 넣어 다시 2회 원심분리하여 잘 세척한 다음, 적당한 농도로 잘 분산시켰다. 이때 분산된 종양세포는 trypan blue exclusion 법에 의하여 viability를 확인하고 총세포수를 hemocytometer로 산출하여 2.5 x 10⁶ cell/생쥐를 복강내 이식하였다. 생명연장을 측정은 24시간 후 부터 10일간 sample을 연속투여하면서 당일 생존여부를 관찰하여 평균생존일수 및 연명율을 구하였다.

MST (median survival time) : 생존일수중양치
T/C% (생명 연장율)=(T/C) x 100 (%)

T : 처치군의 MTS

C : 대조군의 MTS

(3) 체중측정과 채혈

체중 측정은 B16-F0 이식한 C57BL/6 생쥐와 S-180을 이식한 ICR계 생쥐를 24시간 후부터 1일 1회씩 측정 하였고, 18일째 되는 날 C57BL/6 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중의제약)으로 마취하고 심장천자를 하여 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23Gx1¼, SAMWOO CORP.)로 혈액을 채혈하여 hematology에 사용하였다.

(4) 혈소판수 계산

혈소판수의 계산은 Fonio법²³⁾ 준하여 Minos-

ST로 측정하였다.

(5) 백혈구수 계산

백혈구수 계산은 Fonio법²³⁾ 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

III. 實驗成績

1. 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether층 및 아위 ethyl ether층의 A549와 B16-Fo 암주에 대한 세포부착 저지작용

A549에 대하여 자초의 water 층은 64.5/35.5, MeOH 층은 72.4/27.6, hexane층은 54.4/45.6로 단삼의 water층은 68.4/31.6, MeOH층은 63.3/36.7, ethyl ether층은 50.3/49.7로 나타났으며, 아위의 water층은 60.5/39.5, MeOH 층은 54.6/45.4, ethyl ether층은 39.7/60.3으로 나타났으며, 기타층은 80%이상 부착되었고, B16-Fo에 대하여서는 자초의 water층은 60.2/39.8, MeOH층은 65.4/34.6, hexane층은 50.8/49.2로, 단삼의 water층은 69.4/30.6, MeOH층은 63.3/36.7, ethyl ether층은 54.6/45.4로 나타났으며, 아위의 water층은 55.8/44.2, MeOH층은 53.6/46.4, ethyl ether층은 50.8/49.2로 나타났으며, 이 역시 기타층에서는 80%이상 부착되었다. 따라서 폐암 세포에 대하여 자초는 hexane층, 단삼 아위는 ethyl ether 층에서 다른 층에 비하여 효과적인

부착 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다(Table 1).

Table 1. Inhibitory Effect of Lithospermi Radix, Salviae miltiorrhizae Radix and Ferula Resina on Cell Adhesion of A549 and B16-Fo.

Crude drugs	Concentration	Solvent fraction	Attached/Dettached	
			A 549	B16-Fo
자 초	2×10^{-4} g/ml	Water	64.5/35.5	60.2/39.8
		MeOH	72.4/27.6	65.4/34.6
		Hexane	54.4/45.6	50.8/49.2
단 삼	2×10^{-4} g/ml	Water	68.4/31.6	69.4/30.6
		MeOH	63.3/36.7	63.3/36.7
		Ethyl Ether	50.3/49.7	54.6/45.4
아 위	2×10^{-4} g/ml	Water	60.5/39.5	55.8/44.2
		MeOH	54.6/45.4	53.6/46.4
		Ethyl Ether	39.7/60.3	50.8/49.2

2. 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether (EE)층 및 아위 ethyl ether(EE)층의 S-180암주에 대한 T/C%

S-180암주에 대한 T/C %에서 대조군의 MST는 15.7일이었으나 자초 hexane층 처치군의 MST는 20.9일, 단삼EE층 처치군의 MST는 22.6일, 아위EE층 처치군의 MST는 22.7일로 자초 hexane층, 단삼 EE층 및 아위 EE층의 T/C%는 각각 133일, 143일, 144일 등으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Survival Time of ICR bearing S-180 Treated with Lithospermi Radix(HLR), Ethyl Ether extract of Salviae miltiorrhizae Radix (ESR) and Ethyl Ether Extract of Ferula Resina (EFR)

Treatment	Survival time	M S T ^(b)	T/C (%) ^(c)
Control	14, 15, 15, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 17	157	-
Sample A	17, 17, 19, 19, 21, 21, 21, 24, 24, 26	209	133.12
Sample B	19, 19, 19, 21, 21, 24, 25, 26, 26, 26	226	143.95
Sample C	15, 19, 19, 20, 24, 26, 26, 26, 26, 26	227	144.59

a) : Mean ± Standard Error.

Normal : Untreated group

Control : Normal saline was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample A : Hexane extract of Lithospermi Radix was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample B : Ethyl Ether extract of Salviae miltiorrhizae Radix was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample C : Ethyl Ether extract of Ferula Resina was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

* Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001)

3. 자초hexane층, 단삼 ethyl ether층 및 아위 ethyl ether층이 폐장전이 colony수에 미치는 영향

대조군의 colony 수는 78개이었으나 자초 hexane층 처치군에서는 57개로 감소하였고(P<

0.05), 단삼 EE층 처치군에서는 33개로 감소하였으며(P<0.01), 아위 EE층 처치군에서는 11개로 모든 실험군에서 유의성 있게 감소하였다(P<0.01)(Table 3).

Table 3. Effects of hexaneane extract of Lithospermi Radix(HLR), Ethyl Ether extract of Salviae miltiorrhizae Radix(ESR) and Ethyl Ether extract of Ferula Resina (EFR) on the Colony Number of Lung of C57BL/6

Group	No. of animals	No. of colony
Control	8	78 ± 5.2
Sample A	8	57 ± 3.6*
Sample B	8	33 ± 4.5***
Sample C	8	11 ± 2.1***

a) : Mean ± Standard Error.

Normal : Untreated group

Control : Normal saline was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample A : Hexaneane extract of Lithospermi Radix was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample B : Ethyl Ether extract of Salviae miltiorrhizae Radix was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

Sample C : Ethyl Ether extract of Ferula Resina was treated orally for ten days after i.v injection with B16-Fo

* Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001)

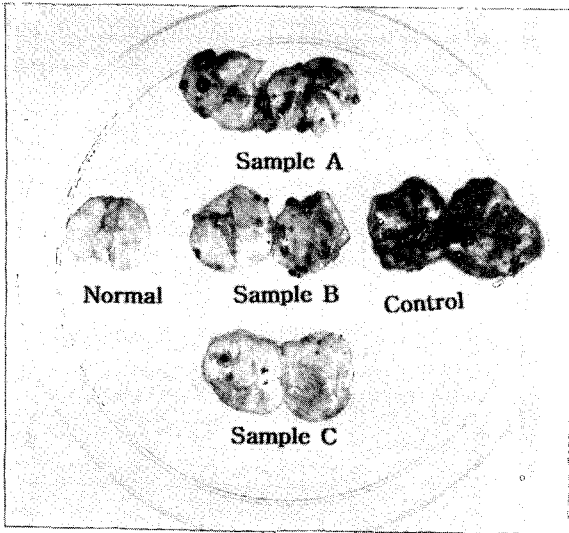


Fig 1. Lungs in sample groups. showing less colonies than lungs of control ; sample A(Lithospermi Radix treated Lungs), Sample B(Salviae miltiorrhizae Radix treated Lungs), Sample C(Ferula Resina Treated Lungs), Control(Saline Treated Lungs after i.v. injection with B16-Fo into tail vein of C57BL/6.

4. 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether 층 및 아귀 ethyl ether층이 장기 무게 변화에 미치는 영향

폐장의 무게 변화에서는 정상군이 $0.1922 \pm 0.022g$ 이었으며 대조군은 $0.5080 \pm 0.022g$ 으로 증가하였으나 자초 hexane층 처치군에서는 $0.3130 \pm 0.029g$ ($P < 0.01$), 단삼 EE층 처치군에서는 $0.2799 \pm 0.006g$ ($P < 0.001$), 아귀 EE층 처치군에서는 $0.2287 \pm 0.019g$ ($P < 0.001$)등으로 모두 유의성 있는 억제 효과가 있었다. 비장의 무게 변화에서도 정상군이 $0.121 \pm 0.022g$ 이었으며 대조군은 $0.189 \pm 0.011g$ 으로 증가하였으나 자초 hexane층 처치군에서는 $0.159 \pm 0.012g$, 단삼 EE

층 처치군에서는 $0.151 \pm 0.006g$, 아귀 EE층 처치군에서는 $0.152 \pm 0.0020g$ 등으로 모두 유의성 있는 억제 효과가 있었으나 신장과 간장의 무게 변화에서는 대조군과 실험군간에 유의성 있는 변화가 없었다(Table 4-6).

Table 4. Effects of HLR, ESR and EFR on Lung Weight of C57BL/6

Sample	No.of mice	Lung weight(g)
Normal	8	0.1922 ± 0.022
Control	8	0.5080 ± 0.031
Sample A	8	$0.3130 \pm 0.029^{**}$
Sample B	8	$0.2799 \pm 0.006^{***}$
Sample C	8	$0.2287 \pm 0.019^{***}$

Table 5. Effects of HLR, ESR and EFR on Spleen Weight of C57BL/6

Sample	No.of mice	Lung weight(g)
Normal	8	0.121 ± 0.022
Control	8	0.189 ± 0.011
Sample A	8	0.159 ± 0.012
Sample B	8	0.151 ± 0.006
Sample C	8	0.152 ± 0.020

Table 6. Effects of HLR, ESR and EFR on Liver, Kidney weight of C57BL/6

Sample	No. of mice	Lung wt (g)	Kidney wt (g)
Normal	8	1.101 ± 0.022	0.149 ± 0.012
Control	8	1.131 ± 0.011	0.155 ± 0.015
Sample A	8	1.125 ± 0.012	0.148 ± 0.011
Sample B	8	0.121 ± 0.006	0.151 ± 0.012
Sample C	8	0.121 ± 0.020	0.152 ± 0.014

5. 자초 hexane층, 단삼 EE층 및 아 위 EE층이 WBC 변화에 미치는 영향

WBC 변화에서 정상군이 $0.45 \pm 0.03 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 이고 대조군에서 0.57 ± 0.02 로 이상 증가하였으나 자초 hexane층 처치군에서는 0.49 ± 0.01 로 감소하였고, 단삼 EE층에서는 0.46 ± 0.02 로 유의성 있게 감소하였고, 아위 EE층 처치군에서는 0.49 ± 0.03 로 감소하였다(Table 7).

Table 7. Effects of HLR, ESR and EFR on WBC of C57BL/6

Group	No. of animals	WBC($\times 10^3 / \text{mm}^3$)
Normal	8	0.45 ± 0.03
Control	8	0.57 ± 0.02
Sample A	8	0.49 ± 0.01
Sample B	8	$0.46 \pm 0.02^{**}$
Sample C	8	0.49 ± 0.03

6. 자초 hexane층, 단삼 EE층 및 아 위 EE층이 platelet 변화에 미치는 영향

혈소판수의 변화에서 정상군은 $864.5 \pm 0.03 (\times 10^4 / \text{mm}^3)$ 이고 대조군은 720.2 ± 10.2 로 감소하였지만 자초 hexane층 처치군에서는 767.5 ± 23.1 로 감소하였지만 유의성이 없었고, 단삼 EE층 처치군에서는 784.9 ± 11.2 로($P < 0.01$), 아위 EE층 처치군에서는 804 ± 14.2 ($P < 0.01$)로 모두 유의성 있

게 증가하였다(Table 8).

Table 8. Effects of HLR, ESR and EFR on the Number of Platelet of C57BL/6

Group	No. of animals	Platelet($\times 10^4 / \text{mm}^3$)
Normal	8	864.5 ± 11.4
Control	8	720.2 ± 10.2
Sample A	8	767.5 ± 23.1
Sample B	8	$784.9 \pm 11.2^{**}$
Sample C	8	$804.6 \pm 14.2^{**}$

IV. 考 察

암은 인류가 극복해야할 난치병의 하나로 이 중 肺癌은 癌死亡率 중 胃癌과 肝癌에 이어 3위를 차지하며, 吸煙人口, 重金屬 汚染 및 大氣汚染 增加로 인하여 매년 死亡率이 상승하는 傾向을 나타내고 있어, 이의 治療와 豫防은 醫學界의 課題로 登場하고 있다²⁴⁻²⁵.

現代醫學的인 治療法으로 西洋醫學에서는 外科 處置, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法등이 使用된다. 이 중 cyclophosphamide, doxorubicin, methotrexate, cisplatinum, etoposide, vindesine, 5-fluorouracil 등을 利用한 化學療法이 多用되는데²⁶⁻²⁸ 이 化學療法은 癌種에 對한 感受性差異, 治療後의 副作用과 再發 및 合併症 등의 問題點이 提起되어 副作用을 減少시키면서 特異性 毒性을 增大시키는 抗癌劑나 治療法의 開發을 위하여 꾸

준히 努力하고 있는 實情이다^{10,13,15,29,30)}

이런 일환으로 최근에는 생약으로 부터 암세포를 직접 살해하는 방법외에도 암세포의 전이를 예방함으로써 결국 암을 예방 또는 치료하려는 연구가 진행되고 있다⁶⁻⁹⁾.

전이는 암세포가 이차적으로 다른 부위에 전이되어 암의 증상을 악화시킴으로써 결국 사망에 이르게 하였다는 점에서 암의 병리 기전상 중요하게 인식되고 있다. 전이의 병리 기전은 다음의 세단계로 설명되고 있다. 첫째, 암세포가 세포의 기질에 부착하였다. 이때에는 laminin이나 fibronectin 등의 특이 glycoprotein과 암세포 plasma membrane 부착 인자가 작용하였다. 둘째, 암세포와 관련된 단백분해효소에 의해 기질의 국소적인 퇴화가 일어난다. 이 효소는 기질의 부착단백과 구조적 교원질성 단백을 퇴화시키고 단백질 분해가 암세포 표면에서 일어나는데 이곳에서는 다량의 활동성 효소가 기질내에 있는 자연적 단백질 효소저해제를 능가하게 된다. 셋째, 단백질용해에 의해 변형된 기질내로 암세포가 이주하는데 이때에는 화학주성인자에 의하여 이루어진다.⁶⁻⁷⁾ 이에 전이 과정을 첫번째 단계에서 차단함으로써 전이를 막으려는 연구로 Vollmers 등³¹⁾은 7종의 항체가 in vitro에서 B16 melanoma cell의 부착저지효과가 있고 in vivo에서도 흑색종의 폐암전이를 막는다고 보고하였으며, Ikuo Saiki등³²⁾도 악성흑색종의 전이는 Arg-Gly-Asp의 순서로 된 polymeric peptides의 항전이 및 항부착저지효과가 같은 배열의 단

백질에 의해 증대됨을 보고하였으며, Lin Yan 등⁹⁾은 selenite가 Hela cell의 부착을 농도에 따라 저해하는 것으로 보고한 바가 있다.

이에 본 실험실에서 41종의 생약을 이용하여 세포외기질에 대한 세포부착저지작용과 ADP에 대한 혈소판응집 억제작용을 스크리닝 하였는데 자초, 단삼 및 아위가 유효한 효과를 나타내어, 이들의 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 입증하고자 자초 단삼 및 아위의 분획을 이용하여 in vitro에서 세포부착저지 작용을 측정하였고, 상기 약물의 유효분획을 경구 투여하여 S-180을 이식한 ICR 생쥐의 T/C%, 미정맥에 B16- Fo를 주입한 C57BL/6의 pulmonary colonization assay, 장기 무게측정, WBC 및 platelet 수의 변화 등을 측정하였다.

자초, 단삼 및 아위의 A549 암주에 대한 세포 부착 저지작용에서는 유효분획중의 부착세포/비부착세포 비율에서 자초 hexane층은 54.4/45.6, 단삼의 ethyl ether(EE)층은 50.3/49.7, 아위의 ethyl ether(EE)층은 39.7/60.3으로, B16-Fo 암주에 대한 세포부착 저지작용에서도 자초의 hexane층에서 50.8/49.2, 단삼의 ethyl ether층에서 54.6/45.4, 아위의 ethyl ether층에서 50.8/49.2로 나타나 아위의 ethyl ether층, 단삼의 ethyl ether층 및 자초의 hexane층 등의 순으로 효과적인 부착 억제 효과를 나타냈다.

S-180 암주를 이용한 항암 실험에서는 대조군의 MST는 15.7일인데 비해 자초 hexane층 처치군은 20.9일, 단삼 ethyl ether층 처치군은

22.6일, 아위 ethyl ether층 처치군은 22.7일로 나타났으며, T/C%는 각각 133일, 143일, 144일 등으로 나타나 아위 EE층이 가장 효과적이었다.

Pulmonary colonization assay는 폐암세포가 폐장에 전이되는 colony수를 계산하여 전이정도를 판정하는 방법인데 B16-Fo를 이용한 실험에서 대조군이 평균 78 ± 5.2 개로 나타난 반면 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether층, 및 아위 ethyl ether층이 각각 57 ± 3.6 ($p < 0.05$) 33 ± 4.5 ($p < 0.001$), 11 ± 2.1 ($p < 0.001$) 개씩 나타나 아위 ethyl ether층이 가장 유효한 전이 억제효과를 나타냈다.

암주의 장기 전이를 판정하기 위해 암주의 증식으로 인해 증가되는 장기 무게를 측정하였는데 폐장 무게 변화에서 자초 hexane층 단삼 및 아위EE층이 모두 유의성 있게 무게 증가를 억제하였고, 비장의 무게 변화에서도 대조군에 비해 억제하였지만, 단삼 EE층만이 유의성있는 억제를 나타냈고, 간장과 신장의 무게 변화는 거의 없어 폐암주의 장기 전이는 주로 폐장과 비장으로 전이됨을 알 수 있고 아위 EE층, 단삼 EE층 및 자초 hexane층의 순서로 전이 억제 효과가 있다고 볼 수 있다.

WBC는 암주가 들어가면 이상적인 증식을 하는데 대조군에 비하여 모든 실험군에서 감소하였으나 단삼 EE층에서만 유의성이 인정되었다.

최근들어 platelet과 metastasis와는 밀접한 상관성이 있는 것으로 알려졌는데 Yong 등³³⁾은 혈소판이 맥관계의 암세포의 안정화를 돕고, 암

세포의 증식을 촉진하며, 세포외기질과의 상호작용을 통해 암세포의 전이를 촉진하였다고 보고하였다. Tanaka 등³⁴⁾은 혈소판수를 적게하고 암주를 주입하면 암의 전이가 잘 되지 않는다고 하여 혈소판수와 전이와의 상관성을 언급하여 암주를 정맥주사하면 혈전 형성이 되면서 대조군에서는 혈소판수가 감소하였지만 자초, 단삼 및 아위 EE층에서는 대조군에 비해 증가하였으며 유의성은 단삼 및 아위 ethyl ether층에서만 인정되었다.

이상의 결과로 보아 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether층, 아위 ethyl ether층은 모두 항전이 효과가 있지만 아위 ethyl ether층이 가장 유효하여 유효 물질 분리 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 結 論

자초, 단삼 및 아위의 향암 및 항전이 효과를 실험적으로 입증하고자 자초 단삼 및 아위의 분획을 이용하여 in vitro에서 세포부착저지 작용을 측정하였고, in vivo에서 상기 약물에서 가장 효과적으로 판명된 분획을 경구 투여하여 S-180을 이식한 ICR 생쥐의 T/C %를, 미정맥에 B16-Fo를 주입한 C57BL/6의 pulmonary colonization assay, 장기무게측정, WBC 및 platelet 수의 변화 등을 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자초, 단삼 및 아위의 A549 와 B16-Fo 암주에 대한 세포부착 저지작용에서 자초는 hexane층에서, 단삼 아위는 ethyl ether층에서 다른 층에 비하여 효과적인 부착 억제 효과를 나타냈다.
 2. S-180암주에 대한 실험에서 대조군의 MST는 15.7일인 반면 자초 hexane층은 20.9일, 단삼 ethyl ether층은 22.6일, 아위 ethyl ether층은 22.7일로 나타났고, T/C%는 각각 133일, 143일, 144일 등으로 나타나 아위 ethyl ether층이 가장 효과적이었다.
 3. 폐장 전이 colony수에 미치는 영향에서는 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 아위 ethyl ether층이 가장 효과적이었다.
 4. 장기무게 변화중 폐장 무게 변화는 모두 실험군에서 유의성 있는 억제효과가 있었고, 비장 무게 변화는 대조군에 비해 모든 실험군에서 무게가 감소하였으나 단삼만의 유의성이 인정되었고, 신장과 간장의 무게 변화에서는 대조군과 실험군간에 유의성 있는 변화가 없었다.
 5. WBC 변화에서는 이상 증가한 대조군에 비하여 모든 실험군에서 감소 하였으나 단삼 ethyl ether층에서만 유의성이 인정되었다.
 6. 혈소판수의 변화에서는 감소되었던 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의성 있게 증가하였다.
- 이상의 결과로 보아 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether층, 아위 ethyl ether층은 모두 항전이 효과가 있지만 아위 ethyl ether층이 가장 유효하여 유효 물질 분리 연구가 필요하다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 鐘研勤 : 中醫藥和中西結合防治腫瘤研究的進展, 복건중의약 5, 47-50, 1982.
2. 中國中西結合研究會編 : 中西醫結合防治腫瘤及抗癌中草藥研究進展, 중서결합잡지 7(12), 757-760
3. 馬竹卿등 : 抗癌藥物新劑型, 중초약 13(4), 13-19, 1988.
4. 姜延良 : 我國抗癌中草藥研究現狀和展望, 중서결합잡지 6(11), 698-703, 1987.
5. 雲南省植物研究所植物化學研究室 : 昆明山解藥的抗癌成分簡報, 中草藥通訊, 1977, 7:10.
6. Hellmann et al. : Metastasis, Martinus Publishers, 147-152, 1980.
7. J. Wiley et al. : Metastasis, CIBA

- Foundation, 42-48, 1988.
8. H. Peter Vollmers et al. : Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo, Proc. Natl. Acad. vol 80, 3729-3733, 1983.
 9. Lin Yan et al. : Inhibition of cell attachment by selite, Cancer Research -52, 803-5807, 1992.
 10. 陣炳生 : 新魚腥草素對小鼠腹水癌細胞內 cAMP的影響, 癌症 1, 20-23, 1988.
 11. 傅乃武 등 : 丹參의抗腫瘍作用及作用機制的研究, 중초약12(10), 22-25, 1988.
 12. 高淑珍 外 : 天花粉治愈轉移性惡性葡萄胎二例報告, 中華婦產科雜誌, 1:28, 1978.
 13. 上海藥物研究所藥理研究室腫瘍組 : 喜樹鹼抗腫瘍作用的實驗研究, 中和醫學雜誌, 4:274, 1975.
 14. 王耐勤 外 : 中藥鴉膽子的抗腫瘍作用及其對癌細胞中 cAMP含量的影響, 中醫雜誌, 21(8): 71, 1980.
 15. 張譚木 外 : 雷公藤內脂抗腫瘍作用及對小鼠免疫功能의影響, 中國藥理學報, 2:128, 1981.
 16. 中藥研究所腫瘍組 : 猪苓提取物治療腫瘍的實驗研究, 中華腫瘤雜誌, 3(4) :106, 1983.
 17. 十河孝博:東洋醫學における癌治療考, 瘀血研究(6), 105, 1987.
 18. 李嚴 : 中西醫結合治療晚期胃癌研究, 浙江中醫雜誌(12), 54, 1981.
 19. 徐龍生 : 扶正培本法在腫瘤臨床的應用, 浙江中醫學院報12(3), 1989, 22-24.
 20. 王冠庭 등 : 扶正抗癌方爲主結合化療對158例術後晚期胃癌的治療及實驗研究, 中西結合雜誌, 1989, 22-24.
 21. 江蘇中醫學院編 : 中藥大辭典, p.1186, 2345, 1979.
 22. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 人民衛生, p.223, 1981.
 23. 金井泉 : 臨床檢査提要, 서울, 高文社, p.242, 298, 303, 1112, 1149, 1984.
 24. 박재갑 : 人間生命科學, 서울, 서울大學校出版部, p.392, 394, 642, 644, 1994.
 25. 재단법인 대한임상의학연구소 : 알기쉬운 건강진단해설, 서울, 의학문화사, p.241, 1994.
 26. 김재식 : 臨床病理學概論, 學文社, p.141, 1985.
 - 27.李文鎬 外 : 內科學, 서울, 學林社, 卷下, p.1614, 2446-2450, 2466-2475, 1986.
 28. 金禮會 : 肺癌, 臨床藥學, vol.6, No.1, pp.122 ~124.
 29. Ahn, B.Z. and Kim, S.I. : Antineoplastic natural products and the analogues VI: Panaxydol, the cytotoxic principle of the Panax ginseng root against L1210 cells. Arch. Pharm. Res. 8, 283, 1985.
 30. Sato, A. : Studies on anti-tumor activity of crude drugs I : The effects of aqueous extracts of some crude drugs in short term screening test.(1). Yakugaku Zasshi

pp.109, 409, 1898.

31. H.Peter Vollmers et al. : Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo, Proc.Natl.ACAD.vol80, PP.3729-3733, 1983
32. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. Int. J. Cancer, 54: 137-143, 1993.
33. Yong Q. Chen et al.:Fatty acid modulation of tumor cell-platelet vessel wall interaction, Cancer and Metastasis Review 11, 389-410, 1992.
34. Tanaka, K., Kohga, S., Ogawa, M,Ishihara, Tanaka, N, Effect of ticlopidine on blood borne metastasis, Mode of action of Ticlopidine in inhibition of platelet aggregation in the rat, Thrombos. Haemostas. 41, 436-449, 1979.