

加味沙蔘麥門冬湯이 抗癌活性과 放射線副作用 抑制效果에 미치는 影響

朴陽春 · 金炳卓*

ABSTRACT

Study on Antitumor Activity and Radioprotective effects of Kamisasammaekmundongtang

Park, Yang-chun · Kim Byeong-tak
Division of Respiratory, Department of Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Taejon University, Taejon, Korea

To evaluate the antitumor activity, antimetastatic and radioprotective effects of Kamisasammaekmundongtang(KSMT), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows: 1. In cytotoxicity against P388, A549 and B16-F10, KSMT was not showed satisfiable cytotoxicity as compared with control. 2. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, KSMT has strong inhibitory effect. 3. The inhibitory effect on adhesion of A549 to complex extracellular matrix was significantly increased at 0.5mg/ml, 1mg/ml of KSMT. 4. The T/C% was 122 in KSMT treated group in S-180 bearing ICR mice. 5. In antiangiogenic effect on CAM assay, inhibitory rate was 33% in KSMT treated group. 6. In pulmonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in KSMT treated group as compared with control group. 7. By FACS analysis of splenic leukocyte after exposure to radiation by linear accelerator, T-helper cell, B cell and macrophage in KSMT treated group were significantly increased while splenocytes were decreased in control group. 8. In histological changes of jejunum of Balb\C mice after exposure to radiation by linear accelerator, exclusion and fusion of villi were decreased as compared with control group. But in duodenum and ileum, exclusion and fusion of villi were not decreased as compared with control group. 9. WBC, PLT were increased in KSMT treated group as compared with control group after exposure to radiation by linear accelerator, but the increasing effect was not significant..

Above results suggest that KSMT may be useful in prevention of cancer metastasis and protection from damage by radiotherapy. But the further study of KSMT would be demanded.

Key words: antitumor activity, radioprotective effects, Kamisasammaekmundongtang(KSMT)

* 大田大學校 韓醫科大學 肺系內科學教室

I. 緒 論

腫瘍은 組織이 自律的으로 過剩의 成長을 하는 것으로, 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대해서 破壞的인 것을 말하는데, 이중 빠른 成長, 浸潤性 成長, 體內各 部位에의 擴散 및 轉移를 特徵으로 하는 惡性腫瘍을 癌이라고 일컫는다¹⁻⁴⁾. 癌은 最近 50年間 急激히 增加하여 現在 國內 死亡 原因中 循環器 疾患에 이어 2位를 차지하고 있으며 점점 增加 趨勢에 있다⁵⁻⁶⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 記載는 宋代의 《衛濟寶書》⁷⁾에서 最初로 記述되었으나 《黃帝內經》⁸⁻⁹⁾에서의 積聚, 鼓脹, 腸覃, 石瘕, 息賁, 骨痛, 瘤病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚와 以後 여러 醫書에 보이는 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 乳巖, 石疽, 石癰 등¹⁰⁻¹⁶⁾이 오늘날의 癌과 가장 類似性을 가진 病證이라 할 수 있다.

西洋醫學에서 癌의 治療法으로는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등^{1,3-4,17)}이 있다. 이 중 化學療法은 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題가 되고, 手術療法은 轉移된 腫瘍의 治療에는 姑息的으로 應用될 수밖에 없고, 放射線療法은 轉移 腫瘍의 경우에는 適用이 制限의이면서 紅斑, 表皮脫落 같은 皮膚反應, 惡心, 嘔吐, 嚥下困難, 泄瀉 같은 胃腸管 症狀, 白血球減少症, 血小板減少症, 貧血 같은 骨髓抑制로 인한 各種 血球減少症의 副作用을 招來한다¹⁸⁻²⁵⁾. 따라서 最近에는 韓藥 또는 藥針液을 對象으로 抗癌·抗轉移²⁶⁻²⁸⁾ 및 抗癌劑 副作用 抑制效果²⁹⁻³¹⁾ 등의 效果를 檢討하는 많은 實驗 研究가 進行되고 있다.

韓醫學에서 癌의 治療는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 人體 抗病 能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥, 理氣消腫 등 癌細胞를 直接 攻擊하는 祛邪法 및 이 두 가지 方法을 配合한 扶正祛邪法 등³²⁻³⁶⁾으로 區別할 수 있는데 이 중 扶正培本法의 一種인 養陰生津法은 手術中의 體液喪失, 放射線

治療에 의한 火灼傷陰, 化學療法에 의한 嘔吐와 泄瀉, 末期患者의 感染發熱 등으로 造成된 陰津損傷의 狀態를 恢復시키는 治法으로 應用된다^{32,37-39)}.

沙蔘麥門冬湯은 《溫病條辨·秋燥》⁴⁰⁾에서 “燥傷肺胃陰分 或熱或咳者 沙蔘麥冬湯主之”라하여 燥熱邪로 肺胃의 陰分이 損傷되어 나타나는 症狀을 治療하는 處方으로 腫瘍治療에 있어서는 主로 氣陰損傷型 肺癌에 應用되고 있으나^{32,41-42)} 이를 對象으로한 抗癌, 抗轉移 및 抗癌治療 副作用 抑制效果에 대한 實驗研究는 찾아보기 어렵다.

이에 著者는 沙蔘麥門冬湯에 이미 抗癌效果가 있는 것으로 認定된 白花蛇舌草, 仙鶴草, 魚腥草를 加來하여, 이를 試料로 抗癌·抗轉移 效果를 檢索하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性效果, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 대한 附着阻止 效果, sarcoma 180에 對한 生存比, 血管形成 抑制效果, pulmonary colonization 및 組織變化 등을 測定하였고, 放射線 副作用 減少效果를 살펴보고자 放射線 照射後 免疫細胞變化, 血液變化 및 十二指腸, 空腸, 回腸의 組織變化를 觀察하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

動物은 雄性 4週齡의 ICR(International Cancer Research, U.S.A), Balb/C 및 C57BL/6 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(조단백질 22.1% 以上, 조지방 8.0% 以下, 조섬유 5.0% 以下, 조회분 8.0% 以下, 칼슘 0.6% 以上, 인 0.4% 以上 抗生劑 無添加, 삼양배합사료 Co.)와 물을 充分히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 《溫病條辨》³⁰⁾의 用量에 따라 大田大學校附屬韓方病院에서 購入하여 實驗에 使用하였으며, 處方의 한첩 分量은 아래와 같다.

Prescription of Kamisasammaekmundongtang
《KSMT》

韓藥	生藥名	用量(g)
沙蔘	<i>Adenophorae Radix</i>	12
麥門冬	<i>Liriope Tuberosa</i>	12
玉竹	<i>Polygonati odorati Rhizoma</i>	8
桑葉	<i>Mori Folium</i>	6
白扁豆	<i>Dolichoris Semen</i>	6
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	6
生甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
白花蛇舌草	<i>Oldenlandiae diffusa Herba</i>	24
仙鶴草	<i>Argemone Herba</i>	12
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	12
總量		102

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), trichloroacetic acid(TCA), sodium dodecyl sulfate(SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT), sulforhodamine-B(SRB, Sigma Co., U.S.A.), tris base, penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, sodium bicarbonate, formaldehyde, lysophosphatidic acid, F(ab')₂FITC-goat anti rat Ig antibody, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, glacial acetic acid는 Duksan 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 製品, 受精卵은 풀무원社 製品, intralipose는 녹십자 製品, tissue culture coverslip은 Nunc社 製品을 각각 使用하였다.

機器는 CO₂ incubator(Vision Scientific Co., Model VS-9108 MS, U.S.A.), clean bench(Vision Scientific Co., KMC-14001, U.S.A.), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted

microscope(Nikon Co., Japan), bright microscope(Nikon, UFX-DX), linear accelerator(Varian Co., U.S.A.), ELISA-reader(Emax, U.S.A.), fluorescence-activated cell sorter Calibur(FACS Calibur, Becton Dickinson, U.S.A.), rotary vacuum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama, Japan), micro-pipet(Gilson, U.S.A.), autostill WG25(Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A.), culture flask(Falcon, 3024), multiwell plate(96-well, Falcon), conical tube, disposable pipet(5ml, 10ml, 25ml, Falcon), camera(Nikon, 601S, Japan) 및 syringe filter(0.22µm, 0.45µm, Falcon) 등을 使用하였다.

2. 方法

A. 抗癌 및 抗轉移性 探索

In vitro assay

1) 試料의 製造

加味沙蔘麥門冬湯의 10貼 分量(1020g)을 藥湯器에 蒸溜水 1200ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 3時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator(Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24時間 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12時間을 凍結 乾燥하여 74.5g의 物抽出乾燥粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter(0.22µm, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 P388 白血病癌株, A549(ATCC CCL185) 肺癌株와 B16-F10 melanoma(ATCC CRC 6322)를 使用하였고, pulmonary colonization assay에는 B16-BL6을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640培地에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 包

속하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10萬 units, streptomycin 100mg)와 NaHCO_3 2g을 添加하여 製造하였다.

3) P388 癌株에 對한 細胞毒性 測定⁴¹⁻⁴⁴⁾

細胞毒性 實驗에서 logarithmic phase에 到達한 P388 細胞를 얻기 위하여 實驗 24 時間前에 36~37°C로 加溫한 medium을 넣은 culture dish에 P388 細胞를 $2\sim3 \times 10^5$ cells/ml 濃도가 되게 調整하여 1.5時間 培養시킨 後, 約 $0.8\sim1.0 \times 10^5$ cells/ml의 濃도가 되도록 P388 細胞 懸濁液을 만들었다. 다시 細胞懸濁液을 培地로 稀釋한 細胞 懸濁液(2×10^4 cells/ml) 100 μ 를 96 well plate의 각 well에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에 0.25, 0.5, 1mg/ml 등의 濃도로 culture medium에 溶解시키고 試料를 加하여 實驗群으로 하였으며, 對照群 well(\sqrt{n} ; n=試料數)에는 100 μ 의 細胞 懸濁液만을 넣고 37°C, CO_2 incubator에서 48時間 培養 後 MTT法⁴¹⁻⁴⁴⁾에 의하여 細胞數를 計算하였다.

4) A549, B16F10 癌株에 對한 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989년에 美國의 國立 癌研究所에서 藥物의 *in vitro* 抗癌活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B(SRB) assay 法⁴⁵⁻⁴⁷⁾을 使用하였다. 總代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA溶液으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2×10^4 個가 되도록 分枝하였다.

分枝된 細胞들은 CO_2 incubator내에서 24時間 培養하여 바닥면에 附着시킨 後, culture medium에 濃度別(0.25, 0.5, 1mg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 20 μ 씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다.

試料는 加하기 전에 0.45 μ m filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48時間 培養이 끝난 後, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ m씩 加하여 4°C 에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 後 plate를 물로 5~6回 洗

滌하여 남아 있는 TCA 溶液을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 250 μ m의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30分間 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6回 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 後, 對照群의 O.D.(optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度)값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度)값을 구하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃도인 50% effective dose(ED₅₀)값을 얻었다. 癌 細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위하여 細胞數의 測定은 藥物을 加할 때의 細胞數(Tz)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 加하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃도의 藥物과 함께 48時間 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 程度를 測定하였다. 즉, $Tz \geq T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/(C-Tz) \times 100$ 의 數式으로 計算하였고, $Tz < T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/Tz \times 100$ 의 數式으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 機能을 利用하여 ED₅₀값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 程度를 比較하였다. ED₅₀값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度(μ g/ml)로 주어지며, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法⁴⁸⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各 濃도에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

이때,

T= 試驗群의 48時間培養後 平均細胞數(cells/ml)

C= 對照群의 48時間培養後 平均細胞數(cells/ml)

C₀= 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

각각 濃도의 Y(%)값과 Log₁₀ dose를 圖式化 하고 다음과 같은 式에 의하여 回歸線을 구했다. 이때 各各의 濃도에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두

50%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이때, N=number of points selected

[≤ number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose i

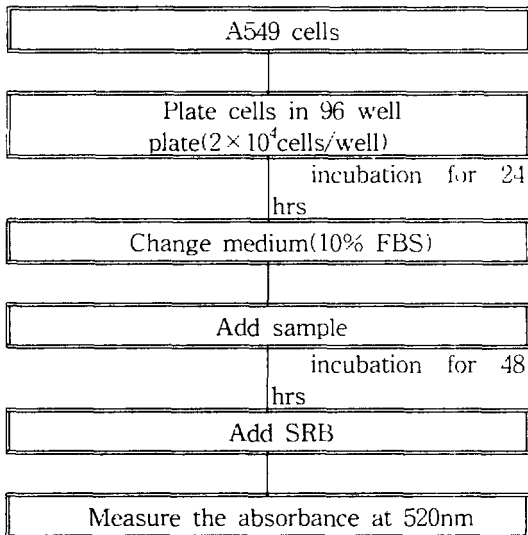
여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 回歸線 $Y = A + BX$ 를 얻었으며 이 回歸線의 기울기와 절편으로부터 ED_{50} 값을 計算하였다.

$$50 = A + B (\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g/ml}$$

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 $20 \mu\text{g/ml}$ 以下, 合成物인 경우 $4 \mu\text{g/ml}$ 以下일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定⁴⁹⁾하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of KSMT on A549 cells

5) DNA topoisomerase I assay⁴⁹⁾

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I 은 Calf thymus에서 由來된 것이며, pBR 322 DNA는 E.coli C 600의 것으로 Takara shuzo Co., LTD.에서 購入 使用하였다. Topoisomerase I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法⁵⁰⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM Spermidine, 0.01% Bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液을 20 μl 가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料을 加하여 總 反應液을 20 μl 가 되게 한 것을 實驗群으로 하여 이들을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30分間 培養하였다. 反應은 2% SDS(sodium dodecylsulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 包含하는 溶液 5 μl 를 添加하여 反應을 終結시키고, 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 調節된 1% agarose gel에 電氣 泳動을 한 後 agarose gel을 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 ethidium bromide溶液에서 1時間동안 染色, 紫外線 下에서 寫眞을 찍은 다음 scanner를 使用하여 活性을 測定했다. 이때 topoisomerase I 의 1unit는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30分間 反應시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA(0.5 μg)를 100% relaxation시키는 酵素의 量을 意味한다.

6) A549 癌株의 附着 阻止作用 測定⁵¹⁾

A549 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96 well plate의 각 well에 100 μl 씩 加한(5 x 10⁴ cells/well) 後 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度의 試料을 녹인 培地 100 μl 를 加하고 5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 培養하였다. 3時間 後 培養液을 除去시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24時間 培養시킨 後 SRB法에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

In vivo assay

7) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 생쥐의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400 x g로 2分間 遠心 分離하여 細胞 沈澱物을 分離했다. 分離된 細胞 沈澱物을 冷滅菌

生理食鹽수에 浮游시켜 다시 遠心分離하여 上澄液을 除去한 後 混在된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 취하였다. 同一한 方法으로 3回 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 10^7 cells/ml의 濃도가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 後 24時間부터 각 群을 8마리로 配定하였다. 試料는 물로 溶解시켜(19.6mg/20g/day) 保存溶液을 만든 後 4℃에 保存하며 注射 直前에 保存溶液 0.2ml씩 實驗動物의 口腔內에 投入하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式⁵²⁾에 따라 計算하였다.

$$T/C(\%) = \frac{\text{MST(mean surviva time) of sample group}}{\text{MST(mean surviva time) of control group}} \times 100$$

8) 血管形成 抑制作用(chorioallantoic membrane assay: CAM assay)⁵³⁾

- 1日째(0日胚): 受精卵을 incubator에서 孵化시켰다. 이 때 incubator의 溫度는 37-38℃, 濕度는 90% 以上 維持되도록 수시로 確認하였다. 여기에서 0日胚란 受精卵이 産卵되어 18℃에서 保管된지 3-4일 以內의 것을 말한다.

- 3日째(2日胚): 受精卵의 뾰족한 끝부분에 칼로 홈을 낸 後 水平으로 누어놓고 5ml 注射器로 구멍을 낸 다음 알부민을 3-5ml 정도 뽑아내었다. 受精卵이 乾燥되지 않고 또 感染되지 않도록 구멍을 유리테잎으로 封한 後 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 培養시켰다.

- 4日째(3日胚): 受精卵의 air sac이 있는 쪽(注射器 구멍의 반대쪽)으로 直徑 2-3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리테잎으로 막고 다시 培養시켰다. 參考로, 圓形 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 受精卵의 겹질위에 圓形으로 홈을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이때 겹질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 注意하였다. 受精卵이란 window를 냈을때 十字架形의 가는 血管이 보이는 것을 意味한다.

- 5日째(4.5日胚): 이 時期가 되면 CAM이 生成되며, 그 直徑이 2-5mm 정도된다. sample을 적당한 溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4等分된 thermanox coverslip 위에 10 μ l씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4等分하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 確認한 後 핀셋으로 sample이 處理된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리테잎으로 막았다. 이때 使用하는 가위, 칼, 핀셋등은 70% 에탄올로 消毒하여 使用하고, 핀셋은 sample을 하나하나 loading할 때마다 消毒하여 使用하였다. 기타 實驗器俱들도 受精卵이 感染되지 않도록 注意하면서 使用하였다.

- 7日째(6.5日胚): 유리테잎을 칼로 뜯어내었다. 注射器로 intralipose(fat emulsion)를 1ml 취하고, 氣泡를 除去한 뒤 CAM의 바로 아래부분에 注入하였다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 血管을 觀察할 수 있었다. 注射器로 intralipose로 注入할때는 血管이 다치지 않도록 注意하였다. 觀察이 끝난 受精卵은 카메라로 近接撮影하였다.

9) Pulmonary colonization에 미치는 影響 測定

*In vitro*에서 繼代培養한 B16-BL6 肺癌細胞를 實驗에 使用하였다. 즉, 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA溶液으로 附着面으로부터 分離시켜 HBSS 溶液으로 細胞數가 2×10^4 cells/ml이 되도록 細胞懸濁液을 만들었다. 18-20g인 C57BL/6생쥐에 細胞懸濁液 0.2ml을 각각 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를 移植한 後 24時間 經過한 後 1日 1回씩 9.6mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4℃에서 保管하면서 7日間 連續 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. Pulmonary colonization assay⁵⁴⁻⁵⁶⁾는 癌株 移植 後 21日째에 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡上(Nikon, Japan)에서 x200 倍率에서 計算하였다.

B. 放射線 副作用 減少效果

1) 放射線 照射

생쥐가 움직이지 않게 제작된 아크릴상자에 넣어 고정시키고, 放射線은 線形加速器(linear accelerator, Varian Co, U.S.A.) 6MV-X線을 사용하였으며, 照射野(field size)는 35cm × 35cm, source-surface-distance(SSD)는 100cm 거리로 하였다. 6MV-X線은 皮下 1.5cm 깊이에서 最大線量(build-up)이 形成됨으로 아크릴상자 前·後面에 1.5cm 두께의 人體組織 等價物質인 bolus를 附着하여 鼠 表面에 均一하게 照射되도록 하였다. 放射線 露出에 의한 細胞壞死가 심하지 않아 染色體異狀 및 SCE(sister chromatid exchange)를 가장 잘 觀察할 수 있는 것으로 報告된 線量 範圍는 50cGy-500cGy이다. 따라서 放射線 照射量은 이 중 癌治療 目的으로 가장 많이 使用하는 200cGy를 基準으로 하였는데 反復적으로 全身 照射됨을 考慮하여 選定하였다. 放射線은 對向 2門 照射로 각각 20cGy, 40cGy, 60cGy를 全身 照射하였으며, 이때 線量率(dose-rate)는 3cGy/min이다.

2) FACS에 의한 脾臟 免疫細胞 變化測定

(1) 脾臟 淋巴球 懸濁液 造製

Balb/C 8마리를 1群으로 하여 放射線 照射前 3日間 試料 9.8mg/20g을 生理食鹽水 0.2ml에 녹여 zonde를 利用하여 經口投與하고 照射 後 3日間 試料를 投與한 Balb/C를 cervical dislocation으로 致死시킨 後 脾臟을 摘出하고 Scheme 2-3에서와 같이 脾臟 淋巴球 懸濁液을 製造하였다. 細胞 處理 및 螢光染色用 緩衝液으로는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어 있지 않은 staining buffer를 使用하였다. 摘出した 脾臟을 100 mesh (Sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5分間 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 後 上層液을 取해 2回 洗滌하고 0.83 % NH_4Cl 溶液을 넣고 37℃에서 5分間 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2回 洗滌하고 RPMI 1640-10% FBS로 5×10^6 cells/ml가 되도록 稀釋하였다

(2) 免疫 螢光染色 (immunofluorescence staining)

免疫 螢光染色은 全 過程을 0-4 °C에서 實施하였고, 培養한 脾臟 細胞를 回收하여 PBS로 3回

洗滌한 後 5ml FACS tube (Becton Dickinson, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 後 遠心分離(1300rpm, 5min)하였다. 각각의 1次 抗體 Culture sup.을 100μl 씩 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 後 40分間 얼음에서 反應시켰다. 使用한 1次 抗體는 3回 洗滌 後, F(ab')₂FITC-goat anti rat Ig antibody(Sigma, U.S.A.) 1:100 稀釋液 50μl을 加하여 40分間 反應시키고, 3回 洗滌 後 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 後 FACS Calibur(Becton Dickinson, U.S.A.)로 分析하였다.

(3) 免疫細胞 分析

染色이 完了된 細胞들을 0.3ml의 staining buffer에 浮遊시켜 FACS Calibur (Becton Dickinson, U.S.A.)를 利用하여 分析하였다. 試料 當 5,000個의 細胞에 대하여 list mode로 資料를 聚合하였으며, consort 30 프로그램을 利用하여 分析하였다. Data의 分析은 forward scatter (FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 利用한 dot plot상에서 全體 脾臟細胞와 small lymphocyte 領域 및 lymphoblast 領域을 區分하여 그 中の T cell, T helper cell, B cell, macrophage의 比率(gated,%)을 算出하였다.

Table 1. Monoclonal antibody used for immunofluorescence staining

Immune cell types	Markers	Monoclonal antibody
T cells	Thy1,2	J1j.10
helper T cells	CD4	G.K.1.5.3
B cells	CD23	J11d.2
Macrophages	CD11b	M1/70
Second antibody	F(ab') ₂ FITC-goat anti rat Ig	

Balb/C mouse
 Sacrifice of mouse by cervical dislocation
 Excise the spleen out
 Spleen
 Transfer onto a prewetted 100 mesh stainless-steel screen
 Cut into pieces
 Squeeze through the screen
 Transfer to a 15 ml conical tube
 Keep it for 5 min on ice
 Take the upper layer
 Wash 3 times with buffer (PBS w/o Ca²⁺&Mg²⁺)
 Hemolysis with 0.83 % NH₄Cl
 Adjust the cell concentration to 5x10⁶ cells ml⁻¹ in 10% FBS-RPMI 1640
 Splenic Leukocyte suspension

Scheme 2. Preparation of splenic leukocyte suspension

Cell culture

Pool the cells into 5 ml tube
 Wash 3 times with the staining buffer
 Resuspend in 0.3ml of the staining buffer

Cell suspension (100μl)

Add 80μl of the primary Ab
 Incubate for 40 min
 Wash 3 times with the staining buffer

mAb-bound cells

Add 50μl of F(ab)₂ fragment of FITC-conjugated goat anti-rat Ig
 Incubate for 40min on ice
 Wash 3 times with the staining buffer
 Resuspend in 0.3ml of staining buffer

IF-stained cell

Scheme 3. Staining with fluorescein conjugated antibody

3) 白血球數, 血小板數 및 血小板凝集反應에 미치는 影響

Balb/C 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg. 중외제약)으로 痲醉하고 미리 heparin이 들어있는 1회용 注射器(23G×1¼, Samwoo Co.)로 心臟穿刺하여 血液을 採取하고 血小板數, 白血球數, 赤血球

數를 Finio法⁵⁷⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

4) 放射線 照射 後 duodenum, jejunum, ileum 組織變化

Balb/C 8마리를 1群으로 하여 放射線 照射 前 3日間 試料 19.6mg/20g을 生理食鹽水 0.2ml에 녹여 zonde를 이용하여 經口를 投與하고, 照射 後 3日間 試料를 經口投與한 後 Balb/C 생쥐를 14日째 犧牲시켜 腹腔을 開腹 後 十二指腸, 空腸, 回腸의 中間 部位를 選擇하여 摘出하였으며, 生理的 食鹽水(0.9%)로 水洗한 後 10% 中性 완충 포르말린(NBF)에 48時間 동안 固定하였고 12時間동안 水洗한 後 脫水過程을 거쳐 과라핀에 包埋하였다. 組織切片機(Reichert Jung)를 이용하여 包埋된 組織을 5μm두께로 자르고 젤라틴이 입혀진 슬라이드에 附着시켰으며, 이를 35 °C 슬라이드 乾燥器에서 12時間 乾燥시킨 後 一般의인 H-E 染色法으로 染色하였고, 製作된 슬라이드를 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

III. 成績

가. 抗癌 및 抗轉移性 效果

□ In vitro assay

1. P388 癌株에 對한 細胞毒性 效果

P388 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 97±7.9 104±8.6 109±8.6%의 細胞生存率이 나타나 細胞毒性이 거의 없었다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of KSMT on P388 Cells

Conc.(mg/ml)	Percent of control
Control	100±20.0 ^{a)}
0.25	109±08.6
0.50	104±08.6
1.00	97±07.9

a): Mean ± standard error.

2. A549 癌株에 對한 細胞毒性 效果

A549 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1mg/

mℓ, 0.5mg/mℓ, 0.25mg/mℓ 濃度에서 對照群에 비하여 각각 97±1.99, 101±4.2, 101±3.2%의 細胞生存率 이 나타나 細胞毒性 效果가 거의 없었다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of KSMT on A549 Cells

Conc.(mg/mℓ)	Percent of control
Control	100±6.80 ^{a)}
0.25	101±3.20
0.50	101±4.20
1.00	97±1.99

a): Mean ± standard error.

3. B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 效果

B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1mg/mℓ, 0.5mg/mℓ, 0.25mg/mℓ 濃度에서 對照群에 각각 92±6.37, 102±5.83, 102±4.93%의 細胞生存率 이 나타나 細胞毒性 效果가 거의 없었다(Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of KSMT on B16-F10 Cells

Conc.(mg/mℓ)	Percent of control
Control	101±5.68 ^{a)}
0.25	102±4.93
0.50	102±5.83
1.00	92±6.37

a): Mean ± standard error.

4. DNA topoisomerase I 에 미치는 影響

50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM Spermidine, 0.01% Bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液 을 20μℓ가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料 을 加하여 總 反應液을 20μℓ되게 한 것을 實驗群 으로 하여 活性을 測定했다. 電氣泳動을 實施하여 寫眞 撮影한 結果 Figure 1에서 보는 바와 같이 DNA만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topoisomerase I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다.

이에 비해 實驗群은 62.5, 125, 250, 500μg/mℓ 濃度에서 濃度依存的으로 topoisomerase I의 活性 抑制 效果를 나타내었다(Figure 1).

Lane 1 2 3 4 5 6 7

Figure 1. Effect of KSMT on the DNA topoisomerase I from calf thymus.

Lane 1: DNA (0.5μg) only.

Lane 2: DNA + DNA topoisomerase I (0.5 unit).

Lane 3: DNA + DNA topoisomerase I (1 unit).

Lane 4-7: DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500 μg/mℓ of KSMT.

5. 複合細胞外基質에 對한 A549의 細胞附着 阻 止效果

A549細胞에 對한 附着阻止 實驗을 한 結果 0.25, 0.5, 1mg/mℓ의 濃度에서 105±5.32, 78.5±4.63(P<0.05), 49.3±5.38(P<0.01)로 有意性 있는 細胞附着阻止 效果가 나타났다(Table 5).

Table 5. Inhibitory Effect of KSMT on Cell Adhesion of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.(mg/mℓ)	Percent of control
Control	100±6.25 ^{a)}
0.25	105±5.32
0.50	78.5±4.63*
1.00	49.3±5.38**

a): Mean ± standard error.

: Statistically significant value compared with control data (*: P<0.05, **: P<0.01).

□ In vivo assay

6. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

加味沙蔘麥門冬湯이 S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 影響을 測定하였던 바 平均 生存 日數(MST: mean survival time)에서 對照群은

18.8日, 加味沙蔘麥門冬湯 投與群은 23日로 나타나, 生存比는 122%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Effect of KSMT on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	MST(day)	T/C (%)
Control	7	18.8	100
KSMT	7	23.0	122

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(19.6mg/20g/day) treated group.

7. 血管形成 抑制效果

血管形成 抑制效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 15個中 5個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 33%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 7, Figure 2).

Table 7. Antiangiogenic Activity of KSMT by CAM Assay

Sample	Dose(μ g/egg)	No. of CAM (avascular/total)
KSMT	15	5/15

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(15 μ g/egg) treated group.

Figure 2. Photography on embryonic angiogenesis of CAM in control and KSMT groups 2 days after sample implantation. (1) control (2) KSMT (15 μ g/egg).

8. B16-BL6에 의한 pulmonary colonization 抑制效果

B16-BL6 黑色腫 癌株를 尾靜脈에 注射하여 21日째 實施한 肺臟의 colony數 測定에서 對照群에서는 42.4 \pm 4.86個, 加味沙蔘麥門冬湯 投與群은 31.7 \pm 5.72個로써 22.5%의 有意性 있는(P<0.05) 肺癌轉移 抑制效果를 보였다(Table 8).

Table 8. Inhibitory Effect of KSMT of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells

Group	No. of animals	No. of colonies
Control	8	42.4 \pm 4.86 ^{a)}
KSMT	8	31.7 \pm 5.72*

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg/20g/day) treated group.

a): Mean \pm standard error.

: Statistically significant value compared with control data(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

나. 放射線 副作用 抑制效果

1. 脾臟 免疫細胞에 미치는 效果

40cGy 放射線을 照射 後 10日間 試料를 投與(9.8mg/20g/day)하고 脾臟內의 免疫細胞 變化를 調査한 結果, 大部分의 免疫 細胞가 放射線으로 인하여 細胞數가 크게 減少하여 cell event %가 正常群에 비하여 크게 減少하였고, 脾臟內의 少數의 macrophage는 거의 나타나지 않아 聚合하는데 問題點이 있었다.

먼저 T cell 變化에서 positive cell 比率은 正常群, 對照群, KSMT 處理群이 各各 3.97 \pm 0.5, 1.05 \pm 0.2, 1.32 \pm 0.3으로 나타나 增加를 나타내었으나 有意性은 없었다(Table 9, Figure 3).

T helper cell 變化에서는 positive cell 比率이 各各 9.21 \pm 0.14, 5.34 \pm 0.13, 7.96 \pm 0.18로 나타나 對照群에 비하여 有意性(P<0.001) 있는 增加를 나타내었다(Table 10, Figure 4).

B cell 變化에서는 positive cell 比率이 각각 63.07 ± 0.54 , 43.38 ± 0.67 , 54.29 ± 0.15 로 나타나 對照群에 비하여 有意性 있는($P < 0.001$) 있는 增加를 나타내었다(Table 11, Figure 5).

Macrophage 變化에서는 positive cell 比率이 각각 44.41 ± 0.34 , 17.49 ± 0.19 , 24.36 ± 0.74 로 나타나 對照群에 비하여 有意性($P < 0.001$) 있는 增加를 보였다(Table 12, Figure 6).

Table 9. Effects of KSMT on T cells of Spleen of Balb/C Mice after Irradiation

Group	% Positive cells
	J1j.10
Normal	3.97 ± 0.5^{a1}
Control	1.05 ± 0.2
KSMT	1.32 ± 0.3

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

a): Mean \pm standard error.

Table 10. Effects of KSMT on T Helper cells of Spleen of Balb/C Mice after Irradiation

Group	% Positive cells
	G.K.1.5.3
Normal	9.21 ± 0.14^{a1}
Control	5.34 ± 0.13
KSMT	$7.96 \pm 0.18^{***}$

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

a): Mean \pm standard error.

: Statistically significant value compared with control data (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Table 11. Effects of KSMT on B cells of Spleen of Balb/C Mice after Irradiation

Group	% Positive cells
	J11d.2
Normal	63.07 ± 0.54^{a1}
Control	43.38 ± 0.67
KSMT	$54.29 \pm 0.15^{***}$

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

a): Mean \pm standard error.

: Statistically significant value compared with control data (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Table 12. Effects of KSMT on Macrophage of Spleen of Balb/C Mice after Irradiation

Group	% Positive cells
	M1/70
Normal	41.41 ± 0.34^{a1}
Control	17.49 ± 0.19
KSMT	$24.36 \pm 0.74^{***}$

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

a): Mean \pm standard error.

: Statistically significant value compared with control data (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Figure 3. Effects of KSMT on T cells of Balb/C mice after irradiation(A: Normal, B: Control, C: Sample).

Figure 4. Effects of KSMT on T helper cells of Balb/C mice after irradiation(A: Normal, B: Control, C: Sample).

Figure 5. Effects of KSMT on B cells of Balb/C mice after irradiation(A: Normal, B: Control, C: Sample).

Figure 6. Effects of KSMT on macrophage of Balb/C mice after irradiation(A: Normal, B: Control, C: Sample).

2. 血液學的 變化

放射線 照射 後 試料를 投與한 Balb/C의 白血球數의 變化에서는 正常群은 $4.5 \pm 0.12 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 인데 비하여 對照群은 $1.04 \pm 0.26 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 으로 현격히 減少하였으며, 實驗群은 $1.36 \pm 0.09 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 로써 약간의 增加를 보였으나 有意性은 없었다. 血小板數의 變化에서는 正常群은 $596.9 \pm 24.8 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 인데 비하여 對照群은 $420.9 \pm 46.31 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 으로 현격히 減少하였으며 實驗群의 경우 $468.7 \pm 20.19 (\times 10^3 / \text{mm}^3)$ 로 增加를 보였으나 有意性은 없었다(Table 13-14).

Table 13. Effects of KSMT on the Number of White Blood Cell of Balb/C Mice after Irradiation

Group	No. of animals	WBC ($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	P value
Normal.	8	4.50 ± 0.12^{a1}	
Control.	8	1.04 ± 0.26	
KSMT	8	1.36 ± 0.09	-

a): Mean \pm standard error.
Control: Saline-treated group.

KSMТ: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

Table 14. Effects of KSMТ on the Number of Platelet of Balb/c Mice after Irradiation

Group	No. of animals	Platelet (x10 ³ /mm ³)	P value
Normal.	8	596.9 ± 24.80 ^{a)}	
Control.	8	420.9 ± 46.31	
KSMТ	8	468.7 ± 20.19	-

a): Mean ± standard error.

Control: Saline-treated group.

KSMТ: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

3. Duodenum, jejunum, ileum의 組織學的 變化 放射線 照射 程度를 決定하기 위하여 照射 10日 後 實施한 jejunum 組織檢査에서 20cGy, 40cGy, 60cGy 照射 實驗群은 모두 正常群에 비하여 jejunum villi의 脫落이 나타났고, 특히 40cGy, 60cGy에서는 Figure 15에서 보는 바와 같이 jejunum villi의 fusion이 이루어지면서 異狀의인 肥厚 形態가 나타나고 villi 數가 크게 減少하였다.

이에 40cGy를 實驗 放射線量으로 定한 後 實驗을 實施하였는데 duodenum, jejunum 및 ileum 組織檢査에서 40cGy 照射 對照群은 모두 正常群에 비하여 duodenum, jejunum 및 ileum crypts의 값은 19.43 ± 3.06, 19.29 ± 2.38, 23.86 ± 2.77 로써 脫落이 나타났다. 實驗群에서는 對照群에 비하여 duodenum, jejunum 및 ileum crypts의 값이 19.00 ± 1.38, 25.33 ± 2.23, 23.96 ± 2.14로써 duodenum과 ileum에는 影響을 미치지 않았으며, jejunum의 경우 脫落이 相對的으로 적게 나타나고, fusion되어 나타나는 crypts 數가 적었다. 또한 對照群에서 上皮細胞의 核 윤곽이 뚜렷하지 못하고 核消失이 일어난 반면 實驗群은 이에 비해 뚜렷한 核 윤곽을

觀察할 수 있었다(Figure 7-10, Table 15-17).

Table 15. Effect of KSMТ on Duodenum Proliferating Crypts Counts in Mice after 40cGy Irradiation by Linear Accelerator

Injury	Surviving crypts	
	Duodenum	P value
Normal	40.00 ± 3.74 ^{a)}	
Control	19.43 ± 3.06	
KSMТ	19.00 ± 1.38	-

Control: Saline-treated group.

KSMТ: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

Table 16. Effect of KSMТ on Jejunum Proliferating Crypts Counts in Mice after 40cGy Irradiation by Linear Accelerator

Injury	Surviving crypts	
	Jejunum	P value
Normal	36.00 ± 3.15 ^{a)}	
Control	19.29 ± 2.38	
KSMТ	25.33 ± 2.23	> 0.05

Control: Saline-treated group.

KSMТ: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

Table 17. Effect of KSMТ on Ilium Proliferating Crypts Counts in Mice after 40cGy Irradiation by Linear Accelerator

Injury	Surviving crypts	
	Ileum	P value
Normal	32.00 ± 2.87 ^{a)}	
Control	23.86 ± 2.77	
KSMТ	23.96 ± 2.14	-

Control: Saline-treated group.

KSMT: Kamisasammaekmundongtang(9.8mg /20g/day) treated group.

20 cGy 40 cGy 60 cGy
treated group treated group treated group

Figure 7. Histological changes of duodenum of Balb\C mice after irradiation.

Control KSMT treated group
Figure 8. Histological changes of duodenum of Balb\C mice after 40cGy irradiation.

Control KSMT treated group
Figure 9. Histological changes of jejunum of Balb\C mice after 40cGy irradiation.

Control KSMT treated group
Figure 10. Histological changes of ileum of Balb\C mice after 40cGy irradiation.

IV. 考 察

腫瘍은 組織이 自律的으로 過剩的 成長을 하는 것으로, 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대해서 破壞的이다¹⁻³⁾. 癌細胞의 發生은 發癌物質 등의 環境的 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性刺戟 및 突然變異 등에 의하여 正常細胞가 일정한 過程을 거쳐 癌細胞로 變形됨으로써 이루어지는데 이러한 癌細胞는 人體의 抗病能力이 低下된 狀態에서 免疫防禦機能이 弱화되어 增殖하게 된다⁵⁸⁻⁵⁹⁾. 癌은 生物學 및 生化學的으로 單一 細胞의 遺傳的 變化에서 시작해서 惡性 細胞 클론을 形成하고, 正常 生化學的 및 物理的 影響에 의해 成長이 適切히 調節되지 않으며, 正常的이고 調和的인 細胞 分化의 缺乏이 있고, 不連續的인 成長과 身體의 다른 部位로 轉移能을 나타낸다는 特徵이 있다³⁻⁴⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 記載은 宋代의 《衛濟寶書》⁷⁾에서 最初로 記述되었으나 이미 《黃帝內經》⁸⁻⁹⁾에서 보이는 積聚, 鼓脹, 腸覃, 石瘕, 息賁, 昔瘤, 癰病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚와 以後 여러 醫書에 보이는 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 乳巖, 石疽, 石癰 등¹⁰⁻¹⁶⁾이 오늘날의 癌과 가장 類似한 病證이다.

韓醫學에서 癌의 治療는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣, 補肝益腎, 健脾益腎 등 人體 抗病 能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化痰, 化痰消癥, 理氣消腫 등 癌細胞를 直接 攻擊하는 祛

邪法 및 이 두가지 方法을 配合한 扶正祛邪法 등^{2~36)}으로 區別된다.

西洋醫學에서 癌의 治療法으로는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등^{1,3,4,17)}이다. 이중 化學療法은 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題가 되고, 手術療法은 轉移된 腫瘍의 治療에는 姑息的으로 應用될 수 밖에 없고, 放射線療法은 局部的 浸潤性 腫瘍의 治療에는 有效하지만 轉移腫瘍의 경우에는 適用이 制限의이고, 紅斑, 表皮脫落 같은 皮膚反應, 惡心, 嘔吐, 嚥下困難, 泄瀉 같은 胃腸管 症狀, 白血球減少症, 血小板減少症, 貧血 같은 骨髓抑制 등이 副作用으로 招來된다^{18~25)}.

이러한 副作用은 韓醫學의 正氣損傷에 該當하는 것으로 腫瘍에 의한 正氣虛弱 狀態에서 抗癌劑 및 放射線療法에 의한 祛邪의 治法을 行하여 나타난 것이다¹⁸⁾. 따라서 最近에는 韓醫學의 扶正培本의 治法에 根據하여 免疫機能을 強化시킴으로써 抗癌 效果를 上升시키고, 抗癌劑 및 放射線 治療의 副作用을 減少시키고, 癌이 生命에 威脅이 되는 가장 큰 原因인 癌細胞의 轉移能을 抑制하는 研究가 韓藥劑 또는 藥針液을 中心으로 多數 進行되고 있다^{26~31)}.

腫瘍治療에 있어 扶正培本法의 一種인 養陰生津法은 手術中の 體液喪失, 放射線治療에 의한 火灼傷陰, 化學療法에 의한 嘔吐와 泄瀉, 末期患者의 感染發熱 등으로 造成된 陰津損傷의 狀態를 恢復시키려는 目的으로 應用되고 있다^{32,37~39)}. 이에 著者는 《溫病條辨·秋燥》⁴⁰⁾에서 “燥傷肺胃陰分 或熱或咳者 沙蔘麥冬湯主之”라하여 燥熱邪로 肺胃의 陰分이 損傷되어 나타나는 症狀을 治療하는 處方으로서 腫瘍治療에서는 주로 氣陰損傷型 肺癌에 多用되고 있는^{32,41~42)} 沙蔘麥門冬湯에 이미 抗癌效果가 認定된 白花蛇舌草, 仙鶴草, 魚腥草를 加味한 加味沙蔘麥門冬湯의 抗癌效果와 放射線副作用 抑制效果를 實驗의으로 糾明하고자 하였다.

加味沙蔘麥門冬湯의 構成 藥物의 本草學的 效能을 살펴보면 沙蔘, 玉竹, 麥門冬, 天花粉은 養陰潤燥生津하여^{60~61)} 모두 肺癌을 비롯한 各種 癌에 使用되고 있으며^{62~65)}, 甘草, 白扁豆는 健脾和中, 調和諸藥하여^{60~61)} 各種 消化器癌에 使用되며^{64~66)},

桑葉은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하고^{60~61)}, 白花蛇舌草는 清熱利濕, 解毒消腫하여^{60~61)} 消化器癌, 淋巴腺癌을 비롯한 各種 癌에 使用되며^{62~68)}, 仙鶴草는 收斂止血, 戴瘡, 止痢, 解毒하여^{60~61)} 出血症, 惡性腫瘤 등에 使用되며^{63~64,66)}, 魚腥草는 清熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하여^{60~61)} 扁桃腺癌, 肺癌 등에 使用된다^{62,64~66,69)}.

먼저 抗癌性을 探索하기 위하여 *in vitro*에서 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性效果, DNA topoisomerase I assay와 A549 癌株의 複合基質에 대한 附着阻止效果 등을 살펴보고, *in vivo*에서 S-180이 移植된 ICR 생쥐의 生存比, CAM assay를 통한 血管形成 抑制效果, pulmonary colonization assay를 통한 抗轉移 效果를 測定하였으며, 放射線 副作用 抑制 作用을 糾明하기 위하여 放射線이 照射된 생쥐의 脾臟 免疫細胞 變化, 血液變化, 十二指腸, 空腸, 回腸의 組織變化를 살펴보고자 하였다.

抗癌效果를 觀察하기 위하여 實施한 SRB法^{45~47)}에 의한 細胞毒性 測定에서 P388, A549, B16-F10 등의 癌株에 對한 細胞毒性은 微弱하였다(Table 2-4, Figure 1-3). 이는 加味沙蔘麥門冬湯이 주로 養陰潤燥藥으로 構成되어 祛邪法에 活用되는 清熱解毒, 活血化瘀, 利濕祛痰, 軟堅散結, 以毒攻毒하는 藥物^{32~33)}이 相對的으로 적게 加味되어 有意性 있는 細胞毒性을 보이지 못한 것으로 생각된다.

DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 至大한 影響을 미친다. 즉, DNA topoisomerase는 DNA의 supercoiling state를 調節하므로써 複製, 轉寫 등의 initiation의 效率性에 影響을 주며, 이러한 過程들이 進行되는 段階에서 發生되는 DNA topological 問題를 解決해 준다. 이와같이 DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 여러 機能에 必須的으로, 그들의 抑制劑는 抗癌劑 開發의 目標^{70~71)}가 되고있다.

이러한 DNA topoisomerase는 그 觸媒機作에 따라 두 形態로 分類되는데, 그 中 topoisomerase I은 DNA duplex의 한 가닥을 phosphodiester

bond에서 끊고, 切斷된 한끝을 상대편 DNA 가닥을 軸으로 한바퀴 同轉시킨 後, 끊어졌던 부분을 다시 連結한다⁷²⁾. 1990年代 以前까지 DNA topoisomerase II 抑制劑는 많이 알려져 있지만 DNA topoisomerase I 抑制劑는 camptothecin 외에는 별로 알려져 있는 것이 없다⁷¹⁾.

이에 加味沙蔘麥門冬湯을 利用한 topoisomerase I assay에서 DNA만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 1 unit topoisomerase I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었으나, 이에 比해서 加味沙蔘麥門冬湯으로 處理한 實驗群에서는 濃度依存的으로 酵素의 活性을 抑制하였다(Figure 4). 이같은 結果는 加味沙蔘麥門冬湯이 topoisomerase I 活性 抑制效果를 通하여 癌細胞의 複製 및 轉寫를 抑制함으로써 抗癌效果를 나타낼 수 있을 것으로 보이나 個別藥物에 대한 檢討 역시 必要할 것으로 보인다.

또한 癌治療에 있어서 가장 큰 問題點으로 대두되고 있는 轉移를 效果적으로 抑制할 수 있는지를 評價하기 위한 *in vitro*에서의 A549癌株의 複合細胞外基質에 대한 附着阻止實驗에서 Table 5에서와 같이 加味沙蔘麥門冬湯으로 處理한 實驗群은 1 mg/ml의 高濃度에서 50.7%의 附着阻止率을 나타내어 加味君子地黃湯⁷³⁾, 桃紅四物湯加減方⁷⁴⁾이 같은 濃度에서 보인 33.7%, 39.7%보다 效果적으로 나타났다.

S-180이 移植된 생쥐를 利用한 生存比 測定에서 對照群은 癌株 移植 後 平均 生存日數가 18.8日인데 비하여, 加味沙蔘麥門冬湯 投與群은 23日로, 生存比(T/C%)가 122%로 나타나 微弱하게 生命을 延長하였다(Table 6). 이는 癌細胞가 移植된 動物에 대한 加味沙蔘麥門冬湯의 生命延長效果를 小動物을 利用하여 評價한 것으로 向後 大動物 및 人體에 대한 臨床研究가 必要할 것으로 思料된다.

血管形成(angio genesis)은 新生血管(new blood vessel)이 生成되는 根本的인 過程⁷⁵⁾으로써 이러한 新生血管의 形成은 胎盤의 形成, 初期의 embryonic development 동안에 embryonic membrane의 形成⁷⁶⁾, 生殖, 傷處回復과 再生⁷⁷⁾ 등

과 같은 生理學的 狀態에 있어서 必需的인 過程으로 매우 精巧하게 調節된다.

또한 血管形成은 癌의 成長(growth)과 invasion, metastasis에 重要한 段階로 알려져 있다. 즉, 癌은 成長을 위해 새로운 毛細血管을 자기 쪽으로 誘導함으로써 營養分을 供給받고 老廢物을 排出하는 通路로 利用하고, 癌細胞에 連結된 새로운 血管을 利用해 循環器를 通하여 肝, 肺, 骨組織 등으로 移動하게 된다⁷⁸⁾. 그러므로 癌細胞 周圍로 新血管이 形成되지 않으면 大部分의 癌細胞는 直徑 1mm 以上을 자라지 못하며, 다른 곳으로도 轉移되지 못한다. 그러나 일단 새로운 微細血管이 形成되면, 이 癌細胞는 急速히 자라게 되며 營養分의 供給源인 새로운 微細血管이 그 周圍를 둘러싸고 結局 轉移가 일어나게 된다⁷⁹⁾. 따라서 angiogenesis의 過程을 抑制하면 癌을 治療할 수 있으리라는 것을 豫想할 수 있으며 實際로 1971년에 Folkman⁸⁰⁾에 의해서 처음으로 antiangiogenic therapy가 癌治療를 위한 하나의 意味있는 手段으로써 登場한 以來로 많은 研究가 이루어 지고 있다.

지금까지 抗血管形成 研究에 널리 使用되고 있는 screening 方法으로는 *in vivo* 로써 受精卵의 鷄胚(Chick embryo)의 絨毛尿膜(chorioallantoic membrane: CAM)을 이용한 絨毛尿膜 分析法(CAM assay)⁸¹⁾과 토끼나 쥐의 角膜(Cornea)을 이용하는 Cornea assay⁸²⁾ 외에 Intradermal assay⁸³⁾, Disc angiogenesis assay⁸⁴⁾, HCP assay⁸⁵⁾ 등이 있다. 이중 CAM 은 鷄胚의 發生 3-4日째에 生成되는 胚外膜(extraembryonic membrane)으로써 毛細血管과 다른 血管들을 뚜렷이 區別할 수 있어서 血管移動과 形態形成에 影響을 주는 因子를 研究하는데 適當한 모델로 使用될 수 있으나 試料의 滲透壓, pH, 毒性 등에 의해 CAM을 收縮시키거나 炎症을 誘發할 수 있으므로 注意를 기울여야 한다. CAM assay를 통한 血管形成抑制 實驗에서 實驗에 使用된 15個의 受精卵 中 5個에서 血管形成이 抑制되어 33%의 血管形成 抑制效果를 보였다(Table 7).

抗轉移 作用에 대한 動物實驗으로서 B16-BL6 黑色腫을 利用한 pulmonary colonization assay⁵⁴⁻⁵⁶⁾를 통한 肺癌轉移 抑制實驗에서 對照群에 比하여 實驗群에서 22.5%의 肺癌轉移 抑制效果를 나타냈다(Table 8).

放射線治療의 副作用으로 造血 組織이 損傷되면, 骨髓 및 免疫機能이 低下되어 白血球減少症, 血小板減少症, 貧血, 기타 感染의 增加가 發生하게 되는데⁸⁶⁻⁸⁹⁾, 이러한 것들은 患者의 삶의 質을 低下시키고 심한 경우는 致命的인 結果를 가져오며, 아울러 癌治療의 持續的인 施行과 效果의인 用量的 治療를 制限하게 된다⁸⁶⁻⁸⁹⁾.

韓醫學에서는 放射線治療中에 나타나는 副作用은 주로 熱毒, 熱邪가 過盛하여 熱象偏重되고 熱毒傷陰, 熱邪傷氣耗血하므로 津液이 損傷되고, 脾胃의 機能이 失調되며, 肝腎이 虧損하여 發生한다고⁹⁰⁻⁹⁴⁾ 보고, 주로 清熱解毒, 生津潤燥, 養陰清肺, 補氣養血, 滋補肝腎法을 活用하고 있다⁹⁰⁻⁹⁴⁾. 이들 治法은 初期에는 清熱解毒, 生津潤燥, 補氣養血을 爲主로 熱毒傷陰을 防止하고, 中期에는 熱毒이 臟腑機能을 失調케하여 上部的 肺의 宣發, 中部的 脾의 運化, 下部的 膀胱氣化和 大腸傳導를 紊亂케하므로 清熱利濕, 健脾和胃를 爲主로 하고, 末期에는 熱邪가 이미 眞陰을 耗損하므로 滋補肝腎을 爲主로 하고 있다^{32,33)}.

放射線 副作用 減少效果에 대한 研究를 살펴보면 李⁹⁶⁾의 數種 韓藥劑의 放射線 保護作用에 대한 研究, 崔⁹⁷⁾의 補中益氣湯과 四六湯이 放射線 照射後의 脾臟細胞增殖에 미치는 效果에 대한 研究, 金⁷³⁾의 加味地黃湯, 加味四君子湯 및 加味君子地黃湯의 放射線 副作用 減少效果에 대한 研究가 있는데, 主로 人體의 免疫機能 低下를 防止하는데 초점을 두고 있다.

림프구는 末梢血液 白血球中 正常에서는 약 20%를 차지하며 機能上 대개 T 림프구, B 림프구 및 null 細胞로 分類하고 있는데⁹⁵⁾, 現在 腫瘍免疫은 주로 T 림프구 細胞에 의한 細胞性 免疫反應으로 알려져 있다. 最近에는 림프구계 細胞의 表面抗原을 特異的으로 認識하는 단클론항체를 利用하여 T 림프구를 다시 助力/誘發(helper/inducer,

CD4+) 細胞와 抑制/細胞 傷害(suppressor / cytotoxic, CD8+)細胞로 分類하고 있는데, CD4+ 細胞는 抗原을 B 림프구에 傳達하여 抗體 生成을 誘發시키는 機能이 있고, CD8+ 細胞는 癌細胞와 같은 非正常的인 細胞를 直接 除去할 수 있는 機能인 것으로 報告되고 있다⁹⁴⁾.

이에 FACS를 利用하여 加減沙蔘麥門冬湯이 脾臟內의 免疫細胞 變化에 미치는 影響을 觀察하였는데, Figure 9-12에서 보는 바와 같이 放射線 照射로 인하여 對照群에서는 T cell, T helper cell, B cell, macrophage가 正常群에 比하여 減少하였고, 加味沙蔘麥門冬湯 投與群에서는 對照群에 比하여 T helper cell, B cell, macrophage가 모두 有意性있게 活性增加를 보여 加減沙蔘麥門冬湯은 放射線 照射로 인한 림프구의 減少 및 機能低下를 向上시킴으로써 免疫機能 低下를 抑制하는 作用이 있음을 알 수 있었다.

血液 檢査에서는 Rotman 등⁹⁹⁾의 報告처럼 放射線 投與로 인한 造血機能 抑制作用으로 對照群에서는 白血球數와 血小板數가 크게 減少하였고 加減沙蔘麥門冬湯 投與群에서는 白血球數와 血小板數가 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性이 認定되지 않았다(Table 13-14).

放射線 照射의 適定 線량을 決定하기 위하여 照射 10日 後 實施한 jejunum 組織變化에서 20cGy, 40cGy 및 60cGy를 照射한 實驗群에서는 모두 正常群에 比하여 jejunum villi의 脫落이 나타났고, 특히 40cGy, 60cGy에서는 Figure 15에서 보는 바와 같이 jejunum villi의 fusion이 이루어지면서 異狀的인 肥厚 形態가 나타나고 villi 數가 크게 減少하였다.

이에 40cGy를 實驗 放射線量으로 定하여 實施한 放射線 照射 後 duodenum, jejunum 및 ileum 組織變化에서 加味沙蔘麥門冬湯을 投與한 實驗群은 duodenum과 ileum의 crypts 變化는 有意性이 없었으나 jejunum에서는 有意性 있게 crypts의 脫落이 抑制되었다(Figure 16-21, Table 15-17).

以上の 結果를 綜合하면 加味沙蔘麥門冬湯은 細胞毒性은 없었고, 抗癌, 抗轉移 作用이 있으며 放射線 副作用 抑制 效果가 있는 것으로 나타났지만

向後 補充 實驗 및 臨床研究가 必要하리라 思料된다

V. 結 論

加味沙參麥門冬湯의 抗腫瘍活性和 放射線 副作用 減少 效果를 實驗的으로 研究하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. P388, A549, B16-F10 癌株에 對한 細胞毒성은 없었다.

2. DNA topoisomerase I assay에서는 顯著한 抑制效果를 보였다.

3. A549 癌株의 複合細胞外氣質에 대한 附着阻 止 效果에서 濃度依存的으로 附着阻止作用을 보였다.

4. S-180을 利用한 抗癌 實驗에서 生存比는 122%로 有意性은 나타나지 않았다.

5. CAM assay에서는 33%의 血管形成 抑制作用을 보였다.

6. 肺癌轉移 抑制實驗에서 22.5%의 pulmonary corony 抑制 效果를 보였다.

7. 放射線 照射後 脾臟의 免疫細胞 變化는 放射線으로 인해 顯著히 減少된 對照群에 비하여 T helper cell, B cell과 macrophage가 有意性있게 增加되었으나 白血球, 血小板은 變化가 없었다.

8. 放射線 照射 後 小腸의 組織變化에서 對照群에 비하여 jejunum에서 crypt의 脫落과 fusion이 적게 나타났다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교의과대학: 腫瘍學, 서울, 서울大學校出版部, p.137, pp.1~3, 203~204, 213~215, 225~234, 1989.

2. 金春元: 病理學, 서울, 新光出版社, p.84, 1989.

3. Bennett JC, Plum F: Cecil Textbook of Medicine(20th edi.), W. B. Saunders co., Philadelphia, pp.1004~1008, 1036~1049, 1996.

4. Isselbacher KJ, et al.: Harrison's Principles of Internal Medicine, Vol.2, New York, McGraw-Hill Inc., pp.1814~1840, 1994.

5. 統計廳: 死亡原因統計年譜, 서울, 統計廳, pp.21~28, 1997.

6. 이문호: 최근 한국의 질병변천, 대한의학협회지, 32(3):283~290, 1989.

7. 余桂清: 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1~2, 1988.

8. 河北醫學院: 靈樞經校釋, 人民衛生出版社, 上卷 p.78, 219, 下卷 p.37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.

9. 王洪圖: 黃帝內經素問, 春秋出版社, p.71, 237, 271, 1988.

10. 金定濟: 東醫臨床要覽, 서울, 書苑堂, pp.253~254, 1981.

11. 上海中醫學院: 中醫外科學, 香港, 商務印書館, pp.302~307, 1982.

12. 葉銘洪: 治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1~10, 1986.

13. 方藥中: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.12~16, 621~635, 1986.

14. 顧伯華: 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.148~149, 1985.

15. 郎偉君: 抗癌中藥一千方, 北京, 中國醫藥技術出版社, pp.5~17, 1994.

16. 上海中醫學院: 中國外科學講義, 香港, 醫藥衛生出版社, pp.95~101, 1973.

17. Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP: American Cancer Society textbook of Clinical Oncology, The American Cancer Society Inc., Atlanta, pp.80~98, 589~591, 1991.

18. 金東熙 외: 抗癌劑 및 放射線 副作用에 對한 韓方療法, 東醫病理學會誌, 9:239~264, 1994.

19. Grunberg SM: Control of chemotherapy induced emesis. N Engl J Med 329:1790~1796, 1993.

20. Mitchell EP: Gastrointestinal toxicity of chemotherapeutic agents. Sem Oncol 19:566~579, 1992.

21. Morrow GR, et al.: Progress in reducing nausea and emesis. *Cancer* 76:343~357, 1995.
22. Blomgren H, et al.: Effect of radiotherapy on blood lymphocyte population in mammary carcinoma. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 1:177, 1976.
23. Stratton JA, et al.: A comparison of the acute effects of radiation therapy, including or excluding the thymus, on the lymphocyte subpopulations of cancer patients. *The Journal of Clin Invest* 56:88, 1975.
24. Job G, et al.: The influence of radiation therapy on T-lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 10:2077, 1984.
25. Idestrom K, et al.: Changes of the peripheral lymphocyte population following radiation therapy to extended and limited fields. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 5:1761, 1979.
26. 李鳳雨: 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 實驗的研究, *大韓韓醫學會誌*, 15(1):245~263, 1994.
27. 康坼林: 數種 韓藥劑의 抗癌活性 研究, *大田大學校 韓醫學研究所 論文集*, 3(2):315~321, 1995.
28. 金賢洙 외: 葦莖湯, 加味葦莖湯의 B16-F10에 對한 抗腫瘍效果와 組織變化, *大韓韓醫學會誌*, 16(2):365~387, 1995.
29. 李宇彬 외: 補中益氣湯對 cyclophosphamide 抗癌活性和毒性的影響, *中藥雜誌* 3:50, 1989.
30. 孫甲鎬 외: 柴胡 茵陳의 肝癌細胞에 對한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, *大韓韓醫學會誌*, 16(2):414~432, 1995.
31. 張代釗 외: 中醫藥對腫瘤放化療的增敏減毒作用, *中國中西結合雜誌*, 12(3):135~138, 1992.
32. 孟琳升 외: 中醫治癌大成, 北京科學技術出版社, 北京, pp.111~112, 122~143, 232~233, 245, 246, 470~472, p.484, 1995.
33. 李佩文: 中西醫臨床腫瘤學, 中國中醫藥出版社, 北京, pp.101~124, 134~154, 1996.
34. 郭瑞林: 扶正祛邪與腫瘤免疫, *實用中西醫結合雜誌*, 4(4):205~208, 1991.
35. 李佩文: 中醫診治腫瘤的現狀與展望, *北京中醫學院學報*, 15(3):146~151, 1992.
36. 儲水鑫: 惡性腫瘤中醫調理四法, *上海中醫藥雜誌*, 7:33~34, 1992.
37. 張毓玲: 養陰生津法在腫瘤病治療中的應用, *浙江中醫學院學報*, 14(1):20, 1990.
38. 陳炳旗: 扶正法在腫瘤治療中的臨床運用, *浙江中醫學院學報*, 17(4):20~21, 1993.
39. 陳 斌 외: 益氣養陰湯合併化療治療小細胞肺癌26例治效觀察, *實用中西醫結合雜誌*, 4(4):204, 1991.
40. 吳 瑭: 溫病條辨, 石家莊, 河北科學技術出版社, pp.63~64, 1993.
41. 洪素蘭 외: 實用中醫呼吸病學, 北京, 中國中醫藥出版社, p.397, 1995.
42. 裴基采 외: 肺癌의 變證과 治方에 대한 文獻的 考察, *大田大學校 韓醫學研究所 論文集*, 5(2):243~269, 1997.
43. Scudiero DA, et al.: Evaluation of a soluble tetrazolium /formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48:4827~4833, 1988.
44. National Cancer Institute: Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, *Cancer Chemother Res(part 3)*, 3:17, 1972.
45. Rubinstein LV, et al.: Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30:2418, 1989.
46. Skehan P, et al.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13):1107~1112, 1990.
47. Skehan P, et al.: Evaluation of colorimetric protein and biomass strains for assaying in vitro drug effects upon human

tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30:2436, 1989.

48. National Cancer Institute U.S.A.: Cell culture technical procedures, 1972.

49. Spjut RW, Perdue RE: Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity. Cancer Treat Rep 60:979, 1966.

50. Liu LF, et al.: Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. J Biol Chem 256(4):15365, 1983.

51. Chelberg MK, et al.: Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. Cancer Reserch 49:4796~4802, 1989.

52. Hellmann K, Carter SK: Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132~140, 1987.

53. Tanaka NG, et al.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization. Exp Pathol 30:143~150, 1986.

54. Humphries MJ, et al.: Oligosaccharide modifications by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:1752~1756, 1986.

55. Martin J, et al.: Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice: Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. Cancer Reserach 46:5215~5222, 1986.

56. Fidler IJ: General consideration for studies of experimental cancer metastasis. Methods Cancer Res, 47:3239~3245, 1987

57. 金井泉 외: 臨床檢査法提要, 서울, 高文社, p.242, 249, 1984.

58. Bridges BA: Short-term screening tests for carcinogens. Nature 261:195~200, 1976.

59. Heidelberger C: Chemical carcinogenesis. Ann Rev Biochem 44:79~121, 1975.

60. 李時珍: 本草綱目(上冊), 人民衛生出版社, 北京, pp.691~692, 710~711, 721~723, 1033~1034, 2067~2068, 1982.

61. 全國韓醫科大學 本草學教授 공편: 本草學, 永林社, 서울, pp.145~146, 65~166, 212~213, 223~224, 385~386, 539~541, 587~589, 593~594, 1991.

62. 李 岩: 腫瘤臨床備要, 人民衛生出版社, pp.356~359, p.365, 1980.

63. 王 冰: 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, p.1, 29, 32, 50, 73, 1990.

64. 常敏毅: 抗癌本草, 湖南科學技術出版社, pp. 96~98, 119~122, 126~128, 188~190, 192~194, 282~283, 1987.

65. 洪成範 역: 臨床抗癌中草藥, 成輔社, 서울, pp.100~103, 1990.

66. 金有景: 抗癌食藥本草, 中國食品出版社, pp.110~115, 483~488, 1989.

67. 金聖勳: 白花蛇舌草로부터 分離된 抗癌性物質에 관한 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 4(2):273~297, 1996.

68. 金聖勳: 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 5(2):523~533, 1997.

69. 鄭鉉雨 외: 金銀花 및 魚腥草가 人體 癌細胞株에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 10(1):126~132, 1996.

70. Arpa PD, Liu LF: Topoisomerase-targeting anticancer drug. Biochim Biophysica Acta 989:163~177, 1989.

71. Champoux JJ: Mechanistic aspects of type-I topoisomerases, In Cozzarelli NR & Wang JC(eds), DNA topology and its biological effects, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp.217~242.

72. Drlica K, Franco RJ: Inhibitors of DNA topoisomerases, Biochemistry 27(7): 2253~2259, 1988.

73. 金東熙: 加味地黃湯, 加味四君子湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性和 放射線 副作用 減少效果, 大田大學校 大學院, 1998.
74. 趙漢震: 桃紅四物湯加減方의 抗癌 및 抗轉移效果에 關한 研究, 大田大學校 大學院, 1988.
75. Folkman J: in *Biologic Therapy of Cancer*(DeVita V, Hellman S, and Rosenberg SA, eds), J. B. Lippincott Co., Philadelphia, pp.743~753. 76. Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (eds): *The Development of the vascular system*, S. Karger, Basel, 1991.
77. Knighton DR, et al.: Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. *J Trauma* 30(Suppl. 12): S134~144, 1990.
78. Folkman J: Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175:409~416, 1972.
79. Fidker IJ, Ellis LM: The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79:185~188, 1994.
80. Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182~1186, 1971.
81. Tanaka NG, et al.: Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization. *Exp Pathol* 30:143~150, 1986.
82. Gimbrone MA, et al.: Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J natn Cancer Inst* 52:413~427, 1974.
83. Sidky YA, Auerbach R: Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs.-host reaction. *J Exp Med* 141:1084~1100, 1975.
84. Fajardo LF, et al.: The disc angiogenesis system. *Lab Invest* 58:718~724, 1988.
85. Schreiber AB, et al.: Transforming growth factor alpha: a more potent angiogenic factor than epidermal growth factor. *Science* 232:1250~1253, 1986.
86. Lichtman M: The ultrastructure of the hemopoietic environment of the bone marrow. A review *Exp Hematol* 9:391~410, 1981.
87. Gray R, et al.: *Methods in immunotoxicology*. Vol.1, New York, U.S.A., Wiley-Liss, pp.197~210, 1995.
88. Makinodan T, James SJ: T cell potentiation by low dose ionizing radiation: possible mechanism. *Health Physics* 59:29~34, 1990.
89. Yarin AA: Action of ionizing radiation on lymphocytes(inhibition and activation effects). *Immunology* 5:5~11, 1988.
90. 鄭斐璇 외: 放射加中藥治療鼻咽癌生存五年以上200例療效分析, *新中醫*, 22(9):35~37, 1990
91. 李秋貴 외: 中醫藥配合放療證治規律的探討, *中醫雜誌*, 28(5):28~30, 1987.
92. 史恒軍 외: 吳一純防治腫瘤放化療後副反應的經驗, *遼寧中醫雜誌*, 20(11):11~12, 1993.
93. 邱琴珠: 治療癌症放療後血白細胞下降的體會, *浙江中醫雜誌*, 1:36, 1991.
94. 吳廣寧 외: 扶正增效合劑對食管癌放射增敏的臨床和實驗研究, *中華腫瘤雜誌*, 15(1):79, 1993.
95. Hsu HY, Hau DM, Lin CC: Effects of Kueipi-tang on cellular immunocompetence of γ -irradiated mice. *American J Chinese medicine*, 11(2):151~158, 1993.
96. 李綾基: 數種 韓藥劑가 생쥐의 骨髓 및 脾臟細胞의 造血促進과 放射線 防禦에 미치는 影響, *慶熙大學校論文集*, 19(2):157~173, 1996.
97. 崔昇勳: 放射線 照射後의 N:GP(S) mouse 脾臟細胞增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 第1回 東洋醫學 國際심포지움論文集, pp.110~239, 1995.
98. Schulof RS, et al.: T-cell abnormalities after mediastinal irradiation for lung cancer. *Cancer* 55:974, 1985.

99. Rotman M, et al: Monocytosis: A new observation during radiotherapy. Int J Radiant Oncol Biol Phys 2:117, 1977.