

紅蓼大補湯의 抗癌活性 및 抗轉移 效果에 關한 研究

김성훈* · 최봉균** · 김동희*

Abstract

Study on Antitumor Activity of Hongsamdaibotang(HDT-C)

Kim Sung-Hoon O.M.D., Choi Byong-gyun O.M.D, Kim Dong-Hee O.M.D., Ph. D.
Dept. of Oriental Medicine Pathology,
College of Oriental Medicine, Taejon University, Taejon, Korea.

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Hongsam -daibotang(HDT-C), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows:

1. In cytotoxicity against A549, SK-OV-3 and B16-BL6 concentration inhibiting cell growth up to below 30% of control was recognized at 10^{-3} g/ml of HDT-C.
2. The T/C% was 145.4% in HDT-C treated group in S-180 bearing ICR mice.
3. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, the IC_{50} was shown 100-200 μ g/ml of HDT-C.
4. The expressing TNF- α was increased in HDT-C treated group as compared with control.
5. The expressing MMP-9 was decreased in HDT-C treated group as compared with control.
6. HDT-C extracts exhibited efficient adhesive effect of A549, B16-BL6 cell to complex extracellular matrix.
7. In CAM assays, angiogenesis was significantly inhibited in HDT-C treated group than control group.
8. In pulmonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in HDT-C treated group as compared with control group.
9. In hematological changes in B16-BL6 injected C57BL/6, numbers of WBC and were decreased insignificantly and also those of platelet were increased insignificantly in HDT-C treated group as compared with control.
10. In the histological changes of lung in B16-BL6 injected mice, infiltration of cancer cells were inhibited effectively in HDT-C treated groups whereas many cancer cells were infiltrated into intravascular and peribronchiol of control group.

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學敎室

** 푸른한의원

These results suggested that HDT-C extracts might be usefully applied for prevention and treatment of cancer.

I. 緒 論

最近 分子生物學 發展은 多樣한 實驗을 可能하게 하였고, 점점 人間의 계능을 全面的으로 把握하기 에까지 이르게 되었다¹⁾. 그러나 이러한 急速한 科學 및 醫療 技術의 發展에도 不具하고, 아직도 癌은 難治病의 分類에 該當되며, 年間 일천만명이 넘는 人口가 癌으로 死亡하고 있다²⁾.

韓醫學界에서는 現在 生藥이나 韓方 處方으로부터 抗癌劑 開發과 抗癌劑副作用을 除去하려는 研究를 數年에 걸쳐 修行하고 있다³⁻⁷⁾. 아직 우리나라에서는 基礎와 臨床의 接木을 통한 癌의 韓醫學的 治療 成果 報告는 비록 시작 段階이지만, 多樣한 實驗 및 四象醫學, 波動醫學 등을 통한 獨創的인 研究로 優秀한 治療 效果가 報告되고 있다.

本 試料은 現在 臨床에서 應用하고 있는 抗癌 處方으로, 이는 病理學敎室에서 自體 實驗하여 平均生存率이 가장 높은 處方을 基本方으로 加味한 것으로, 十全大補湯을 基本方으로, 人參을 紅蔘으로 代用하고, 抗癌 效果가 微弱하고 消化障礙를 일으킬 수 있는 熟地黃, 川芎, 肉桂를 去하고, 最近 抗癌活性이 認定된 白花蛇舌草, 半枝蓮, 山慈姑, 瓦松등의 清熱解毒 藥物을 加味하였다.

實驗은 多樣한 側面에서 抗癌 및 抗轉移 效果를 糾明하고 實用化하기 위한 前 段階로 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性作用, DNA topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率 등의 測定을 통해 抗癌效果를 評價하고, A549, B16-BL6 癌株의 附着 沮止 作用, 血管形成 沮害作用, pulmonary colonization 등을 測定하여 抗轉移 效果를 評價하였다.

II. 實 驗

1. 材料
- 1) 動物

實驗 動物은 韓國化學研究所에서 購入한 雌性 ICR(International cancer research, U.S.A) 및 C57BL/6 3주령을 購入하여, 1週日 동안 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 動物 飼育室의 條件은 conventional system으로 22±2℃, 1日中 12時間은 200-300 Lux로 照明하고, 12時間은 모든 빛을 遮斷하였다. 飼料은 固形飼料 (조단 백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 充分히 供給하였다.

2) 藥 材

本 實驗에 使用한 紅蔘은 韓國人蔘煙草研究院에서 10枝 600g 正官藏을 購入하여 使用하였으며, 冬蟲夏草는 中國 井州市 藥材 市場에서 直接 購入하여 使用하였고, 紅蔘大補湯加減方(HDT)의 기타 構成 藥物은 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다.

Prescription of Hongsamdaibotang(HDT-C)

韓 藥 名	生 藥 名	分量(g)
黃 芪(大)	<i>Astragali Radix</i>	8
紅 蔘	<i>Red Ginseng Radix</i>	6
白 朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
白 茯苓	<i>Poria</i>	4
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
白 芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	4
枸 杞子	<i>Lycii Fructus</i>	4
靈 芝	<i>Ganoderma</i>	6
冬蟲夏草	<i>Cordyceps</i>	8
白花蛇舌草	<i>Oldenlandiae diffusae Herba</i>	10
半枝蓮	<i>Scutellariae barbatae Herba</i>	8
山慈姑	<i>Cremastrae appendiculatae Tuber</i>	4
瓦 松	<i>Orostachi Herba</i>	10
Total amount		86

3) 試藥 및 機器

(1) 試 藥

實驗에 使用된 試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS, U.S.A), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A)는 Sigma社 (U.S.A) 製品을 使用하였으며, RNAzolB (Tel-Test, Inc.) Taq polymerase와 Deoxy- nucleotide triphosphate

(dNTP)는 TaKaRa (Japan)社 製品을, 逆轉寫酵素 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega社 製品, 流細胞分析에 使用된 phycoerythrin (PE)-anti-CD3e, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD4, FITC-anti-CD8는 Pharmingen (U.S.A)社의 製品을, 3H-Thymidine은 Amersham에서 購入하였으며, 그리고 agarose (FMC, U.S.A) 등을 비롯한 기타 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

(2) 機器

使用된 機器는 cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), imager system (Kodak, U.S.A), microcentrifuge (韓一科學, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Turbo Thermalcycler™ (Bioneer Co., Korea), CO2 incubator (Napco, U.S.A), cleanbench (KMC-14001, vision scientific Co., Korea) rotary vacuum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan) 그리고 blood cell counter (Minos, Sweden) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

HDT-C의 2貼 分量(172g)에 蒸溜水 1,000ml을 添加하여 熱湯 抽出器에서 3時間 동안 抽出하여 抽出液을 얻고, 이를 吸入 濾過하여 濾液을 減壓 蒸溜裝置(Rotary evaporator, Büchi 461, switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, FDU-540, Eyla, U.S.A)를 이용하여 完全 乾燥하여 48.8g을 얻어 冷凍 保管 하였으며, 實驗에 適當 溫度로 溶液을 製造하여 使用하였다.

2) 癌柱 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 A549 (ATCC CCL185), SK-OV-3 (ATCC HTB 77) 卵巢癌柱, SK-MEL-2(ATCC HTB 77)黑色腫 및 B16-BL6 mel-anoma(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫 등을, *in vivo* 抗癌 實驗에는 S-180 (ATCC TIB66) 腹水癌柱, B16-BL6 생쥐 黑色腫 등을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된

RPMI 1640 배지에 56℃ 水槽에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories Inc., Mclean, VA)을 10% 포함하고 1% 항생제(penicillin-G 10만units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-BL6 癌柱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⁸⁾을 使用하였다. 계대 중인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2×10⁴개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24시간 培養하여 바닥면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(1000μg/ml, 500μg/ml, 250μg/ml)로 稀釋된 試料 溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 20μl씩 넣어주고 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 가하기 전에 0.22μm filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48시간 培養이 끝난 후, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100μm씩 가하여 4℃ 에서 1시간 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA 용액을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 250μm의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30분간 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 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 후, control의 O.D. (optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값이 되도록 일정량의 10mM tris로 염색액을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값을 구하여 ED₅₀값을 얻었다. 癌 細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위

하여 細胞數의 測定은 藥物을 가할 때의 細胞數 (Tz)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃度의 藥物과 함께 48時間 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다.

다음의 수식에 의해 抗癌活性 正道를 測定하였다. 즉, $Tz \geq T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/(C-Tz) \times 100$ 의 수식으로 計算하였고, $Tz < T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/Tz \times 100$ 의 수식으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 기능을 이용하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose(ED₅₀)값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 정도를 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($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 주어지며, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各 濃度에 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 濃度의 Y(%)값과 log₁₀ dose를 圖式化하고 다음과 같은 식에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 各 濃度에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 50%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

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

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

이 때, N = number of points selected

[\leq number of dose level & > 2]

X_i = log dose i Y_i = growth ratio calculated dose I

여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 $Y = A + BX$ 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED₅₀값을 계산하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 合成物인 경우 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下인 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定⁹⁾하고 있다.

4) DNA topoisomerase I assay 方法

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 Calf thymus에서 由來된 것이며, pBR 322 DNA는 E.coli C 600의 것으로 Takara shuzo Co., LTD.社에서 購入 使用하였으며, topoisomerase의 IC₅₀값을 決定하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法¹⁰⁾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 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20 μl 되게 한 것을 試驗群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 평형된 1% agarose gel에 전기 영동을 한 후 agarose gel을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide 용액에서 1시간 동안 染色, 紫外線 下에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 活性을 測定했다. 이 때 topo I의 1 unit는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킬 때 super coiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 양을 意味한다.

5) A549, B16-BL6 細胞의 附着 沮止作用 測定¹¹⁾

A549, B16-BL6 細胞는 cell culture flask에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키우고, 癌細胞 懸濁液은 1×10^5 cells/ml가 되게 造製하여 24 well plate의 각 well에 1ml씩 가하였으며, 凍結 乾燥된 시료는 3차 蒸溜수에 녹여 最

終 濃度가 10^{-3} g/ml, 5×10^{-4} g/ml 및 2.5×10^{-4} g/ml 등이 되게 하여 5% CO₂, 37°C에서 培養하였다. 약 20시간이 經過된 後 well plate를 흔들어준 다음懸濁液은 自動 피펫으로 分離하여 다른 試驗管에 넣고 여기에 0.25% trypan blue 溶液을 加하여 細胞를 染色한 後 細胞數를 計算하였다. 한편 상정액을 除去한 各 well 에는 0.5% trypsin 용액 300 μl씩을 加하고 약 10분간 incubation시켜 기질에 附着된 細胞를 懸濁시킨 後 0.25% trypan blue 溶液으로 染色, 細胞數를 計算하여 試料 添加時의 附着細胞/非附着細胞의 比率 變化를 計算하여 附着阻止比率를 算出하였다.

6) 血管 形成 阻害作用(CAM assay) 測定¹²⁾

- 1일째(0일배) : 수정란을 배양기에서 부화시켰다. 이 때 배양기의 온도는 37-38°C, 습도는 90% 이상 유지되도록 수시로 확인하였다. 여기에서 0일배란 수정란이 산란되어 18°C에서 보관된지 3-4일 이내의 것을 말한다.

- 3일째(2일배) : 수정란의 보족한 끝부분에 칼로 흠을 낸 후 수평으로 누어놓고 5ml 주사기로 구멍을 낸 다음 알부민을 3-5ml 정도 뽑아내었다. 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 배양시켰다.

- 4일째(3일배) : 수정란의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2-3cm 크기의 원형 window를 내고 수정란으로 확인된 것만 넓은 유리테잎으로 막고 다시 배양시켰다. 참고로, 원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 겹질위에 원형으로 흠을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이때 겹질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 수정란이란 window를 났을때 십자가형의 가는 혈관이 보이는 것을 의미한다.

- 5일째(4.5일배) : 이 시기가 되면 CAM이 생성되며, 그 직경이 2-5mm 정도된다. 샘플을 적당한 용매(물, 에탄올)에 녹인 다음 4등분된 thermanox coverslip 위에 10ul씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench안

의 UV 아래에서 overnight시켰다. 수정란의 유리테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋등은 70% 에탄올로 소독하여 사용하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 소독하여 사용하였다. 기타 실험기구들도 수정란이 감염되지 않도록 주의하면서 사용하였다.

- 7일째(6.5일배) : 유리테잎을 칼로 뜯어내었다. 주사기로 intralipose(fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래부분에 주입한다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 혈관을 관찰할 수 있었다. 주사기로 intralipose로 주입할때는 혈관이 다치지 않도록 주의하였다. 관찰이 끝난 수정란은 카메라로 근접촬영하였다.

7) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 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 1500 rpm으로 5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 生理食鹽水에 浮遊시켜 다시 遠心 分離하여 上澄液을 除去한 後 혼재된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 10^7 cells/ml의 濃度가 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 各 群을 8마리로 配定하였다.

試料는 生理食鹽水로 溶解시켜 HDT는 16.2mg/20g의 濃度를 0.2ml씩 經口로 10日間 連續 投與하였고, 對照群에는 同量의 生理食鹽水液을 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立癌研究所(NCI) protocol에 言及된 式¹³⁾에 따라 計算하였다.

8) Pulmonary colonization에 미치는 影響

B16-BL/6 melanoma cell(ATCC, CRL6322)을 C57BL/6 생쥐의 皮下에 계대 培養하였고, 實驗前에 形成된 腫瘍 部分을 分離하여 Ca²⁺와 Mg²⁺가 들어 있지 않은 D-PBS(Sigma)에 100mesh(Sigma)로 腫瘍 組織을 粉碎한 後 遠心 分離하였다. 그리고 0.85% NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 후 37

℃ 배양기에서 5분간 放置하여 赤血球를 破壞시킨 후 遠心分離하여 B16-F10 cell을 分離하였다. 이 pellet에 collagen(Sigma)을 處理하여 single cell로 만든 후 1×10^6 개를 C57BL/6 생쥐 尾靜脈에 注射하였다. 檢液은 24시간 經過한 後 10일간 매일 1회씩 經口 投與하였으며, pulmonary colonization assay^{14,15)}는 癌柱 移植 後 21일째에 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 현미경상(Nikon, Japan)에서 x200 배율에서 계산하였다.

9) 白血球數, 血小板數 測定

C57BL/6 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중 의제약)으로 마취하고 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23G \times 1¼, Samwoo Co.)로 心臟을 穿刺, 血液을 採取하여, Finio法¹⁶⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

10) B16-BL6에 의한 肺臟 組織 變化 測定

B16-BL6을 尾靜脈 注射하고 試料를 經口投與한 후 C57BL/6 생쥐를 21일째 犧牲시켜 肺臟에 轉移된 黑色腫을 觀察한 後, 10% 中性 formalin에 固定한 후 切斷하여, 흐르는 물에 8시간 씻어 아래 scheme 1과 같은 過程을 거쳐 포맷하였다. 이것을 다시 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색(scheme 2)을 하였다.

주사전자현미경 관찰은 肺 組織을 摘出 즉시 2.5% glutraldehyde(0.1M PBS, pH7.4)가 포함된 고정액 상에서 1.5mm³ 크기로 세절한 다음 3시간 동안 前固定한 다음 인산 완충액에 洗滌하여 1%OsO₄에 2시간 동안 後固定하였다. 固定이 완료된 조직은 알코올 농도 상승순으로 탈수하고 isoamyl acetate에 치환한 다음 임계점 건조기에서 CO₂로 乾燥시켰다. 乾燥된 組織은 이온증착기를 이용하여 500nm 두께로 금을 증착하여 주사전자현미경(Hitach S-2500)하에서 관찰 및 사진 촬영하였다.

III. 實驗成績 및 考察

1. BALB/C mouse lung fibroblast cell에 對한 細胞毒性

本 試料의 正常細胞에 對한 細胞毒性 發顯 與否를 評價하기 위하여 實施한 BALB/C mouse lung fibroblast cell에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 50, 100, 200(μ g/ml) 濃度에서 모두 95% 以上の 細胞生存率을 나타내어 細胞毒性은 나타나지 않았다(Table. 1).

이같은 結果는 藥物의 服用時 正常細胞에 對한 副作用없이 癌細胞에 選擇的으로 作用할 수 있음을 나타내주고 있으며, 向後 血液學的 分析 등의 理化學的 檢査를 通한 多樣한 毒性 檢査를 實施하여 毒性이 나타나지 않을 경우 長期服用이 可能할 것으로 思料된다.

Table 1. Cytotoxic Effect of HDT-C on BALB/C Mouse Lung Fibroblast Cell

Conc.(μ g/ml)	Percent of control
Control	100 \pm 1.11
1	101.2 \pm 1.34
10	99.4 \pm 1.45
100	97.2 \pm 2.67
500	95.7 \pm 3.45

2. 數種 癌柱에 對한 細胞毒性

HDT-C의 A549, SK-OV-3, B16-BL6 癌柱에 對한 細胞毒性은 濃度에 比例하여 癌細胞 成長을 抑制하였으며, 高濃度인 10⁻³g/ml 濃度에서는 對照群에 比하여 30% 以上の 細胞毒性을 나타냈으며 (Table 2,3,5), SK-MEL-2 癌柱에 대해서는 高濃度에서도 有意性있는 結果가 나타나지 않았다 (Table 4). 이 같은 結果는 既存의 抗癌 處方의 抗癌 活性¹⁷⁻²⁰⁾과 類似한 結果로 特異할만한 細胞毒性은 나타나지 않았다.

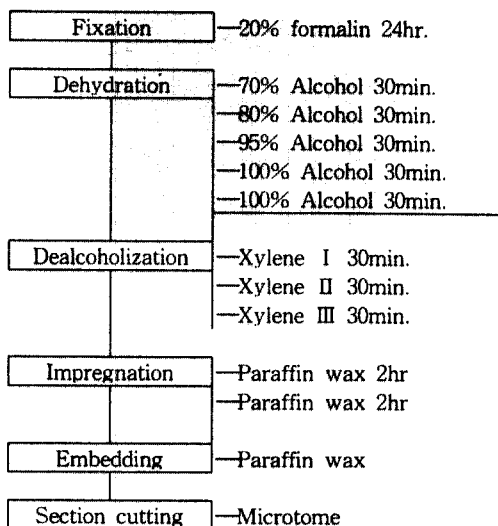
Table 2. Cytotoxic Effect of HDT-C on A549 Cells

Conc.(mg/ml)	Percent of control
Control	100 \pm 2.32
0.25	83.05 \pm 4.20
0.5	78.16 \pm 2.41
1	62.47 \pm 3.20

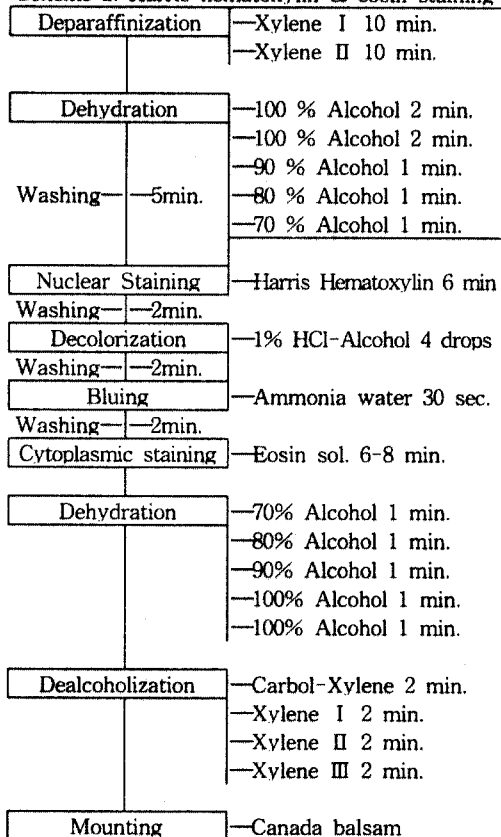
●●●● : 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

Table 3. Cytotoxic Effect of HDT-C on SK-OV-3 Cells

Scheme 1. Tissue processing



Scheme 2. Harris hematoxylin & eosin staining



Conc.(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 3.40
0.25	93.7 ± 2.49
0.5	82.9 ± 2.46
1	66.5 ± 1.94

Table 4. Cytotoxic Effect of HDT-C on SK-MEL-2 Cells

Conc.(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 2.59
0.25	98.60 ± 2.46
0.5	87.59 ± 1.89
1	75.21 ± 2.19

Table 5. Cytotoxic Effect of HDT-C on B16-BL6 Cells

Conc.(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 2.63
0.25	99.40 ± 2.19
0.5	88.64 ± 3.45
1	66.27 ± 1.89

6. DNA topoisomerase I 活性 抑制 效果

전기영동을 실시하여 寫眞 撮影한 結果, DNA 만을 처리한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다. 이에 비해 HDT-C 投與群은 IC₅₀이 200-300µg/ml로 나타났다(Table 6).

단일 植物 혹은 이들에게서 추출된 단일 compound 경우 낮은 濃度에서 IC₅₀이 나타나며, 效果的인 IC₅₀ 濃度가 設定되어 있으나, 韓方 處方은 有意性있는 濃度에 대한 基準 自體가 아직 設定되어 있지 않다. 그러나 이 같은 結果는 既存의 複合方 試驗 結果¹⁷⁻²⁰⁾와 比較하여 볼 때, 有意性있는 結果로 보여진다.

Table 6. Inhibitory Effect of HDT-C on Activity of DNA Topo-I

Group	IC ₅₀ (µg/ml)
HDT-C	200-300µg/ml

7. MMP-9 遺傳子 發顯에 미치는 影響

Matrix metalloproteinase(MMP)는 tumor 周圍의 extracellular matrix를 減少시킴으로써 癌轉移防止에 決定的인 役割을 한다고 報告²¹⁾되고 있어, 이들의 發顯量에 대한 檢索과 다른 cytokine과의 關係가 抗轉移 實驗과 關聯되어 多樣하게 進行되고 있다²²⁾. 本 實驗에서는 모든 濃度에서 NC(lane1)보다 減少하였으나 對照群에 비하여 큰 幅의 變化는 없었다(Fig. 1).

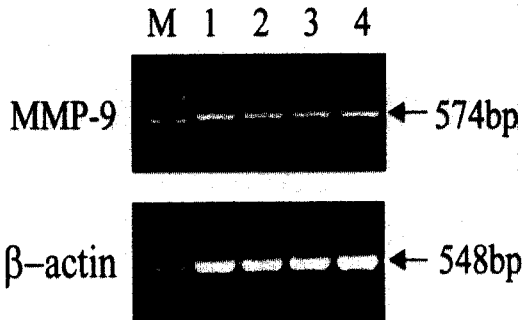


Fig. 1. Inhibition effects of HDT-C on MMP-9 gene expression in B16 -F10 melanoma cell.

B16-F10 cells were cultured with RPMI1640 medium (lane 1), 200mg/ml HDT-C(lane 2), 100 mg/ml HDT-C(lane 3), 10 mg/ml HDT-C (lane 4) for 48 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized b-actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

8. TNF- α 遺傳子 發顯에 미치는 影響

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 157 a.a, trimer로 大食細胞에서 주로 分泌되고, TNF- β (lymphotoxin)는 T 細胞에서 分泌되는데 이들의 기능은 거의 類似하다²³⁾. TNF- α 는 生體內에서 주로 macrophage에 의해 生産되는 抗腫瘍性 cytokine으로 全身의 각 組織과 細胞에서 多樣한 生理活性을 나타내며, 특히 腫瘍細胞를 壞死시키거나 腫瘍 細胞 成長을 抑制시킬 수 있다는 것이 밝혀짐에 따라 그 重要性이 認識되었다²⁴⁾. 本 實驗에서는 모든 濃度에서 濃度依存的으로 NC(lane1)보다 增加함으로써(Fig. 2), 向後 이와 關聯된

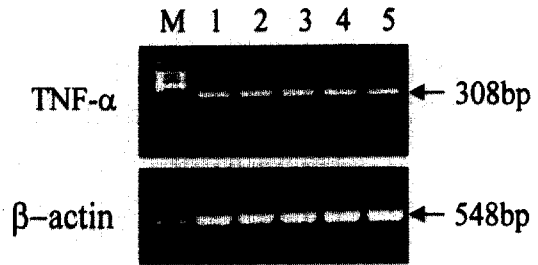


Fig. 2. Effects of HDT-C on TNF- α gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10 mg/ml PHA-M (line 2), 100 mg/ml HDT-C (lane 3), 10 mg/ml HDT-C (lane 4), 1 mg/ml HDT-C (lane 5) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR analysis.

cytokine 및 macrophage 活性에 대한 檢索이 持續的으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

9. 複合細胞外基質에 對한 A549, B16-BL6 細胞의 附着阻止效果

全體 細胞數를 100으로 하여 附着狀態의 細胞比/浮游狀態의 細胞比로 表示하였는데, 모든 實驗群에서 濃度依存的으로 細胞附着을 抑制하였으며, 1×10^{-3} g/ml의 濃度에서는 40% 以上の 附着阻止效果를 나타내었다(Table 7,8).

이같은 結果는 CAM assay, pulmonary colonization assay 結果와 附合되는 바가 있어, 本 試料가 直接的인 細胞毒性 등을 통한 抗癌作用보다는 轉移 抑制를 통한 抗癌作用이 있음을 示唆해 주고 있다.

Table 7. Inhibitory Effect of HDT-C on Cell Adhesion of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.(mg/ml)	Percent of control	
	A549	
Control	100 \pm 1.59	
0.25	98.5 \pm 2.46	
0.5	82.5 \pm 2.99	
1	59.8 \pm 1.91	

: 30% 이상 附着阻止效果를 나타낸 濃度

Table 8. Inhibitory Effect of HDT-C on Cell Adhesion of B16- BL6 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.(mg/ml)	Percent of control	
	B16-BL6	
Control	100±4.14	
0.25	98.6±1.86	
0.5	87.9±3.19	
1	52.4±1.62	

10. 血管形成 阻害效果(antiangiogenesis)

CAM은 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되고 있는데²⁵⁾, 本 實驗에서는 實驗에 使用된 受精卵 7個中 3個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 42% 抑制率을 나타내어 有意性있는 血管 形成抑制 作用을 나타내었다(Table 9).

Table 9. Antiangiogenic Activity of HDT-C in a CAM assay

Sample	Dose(μg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
HDT-C	15	3/7(42%)

11. S-180이 移植된 생쥐의 體重 變化와 生存比에 미치는 效果

S-180이 移植된 생쥐에 10일간 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바, 腹水癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌柱 移植 後 10일에 급격히 增加하여 14일에 모두 죽었고, 對照群의 MST는 13.71일, HDT-C 投與群은 19.94일로, T/C(%)는 145.4%로 나타나 NCI가 設定한 再實驗 可能 T/C%인 140%를 上廻하였다(Table 10).

Table 10. Effect of HDT-C on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%)
Control	10	13.71	100.0
HDT-C	10	19.94	145.4

$$T/C (\%)\# : \frac{\text{MST of sample}}{\text{MST of control}} \times 100$$

12. B16-BL6에 의한 pulmonary colonization 抑制效果와 血液學的 變化

B16-BL6 黑色腫 癌柱를 尾靜脈에 注射하여 14일째 實施한 肺臟의 colony數 測定에서는 對照群에서는 46.7±1.4개, 實驗群은 38.2±3.1로, 對照群에 비하여 有意性있는 減少를 나타내었다(Table 11).

血液學的 變化에서 血小板數, 白血球數의 變化는 對照群에 비하여 增減하였으나 큰 變化는 나타나지 않았다(Table 12,13).

Table 11. Effect of HDT-C on Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6.

Group	No. of animals	Lung colonies
Control	10	46.7±1.4
HDT-C	10	38.2±3.1*

* : Statistically significant as compared with data of control group(* : P<0.05)

Table 12. Effect of HDT-C on WBC after i.v. Injection of B16-BL6

Group	WBC(x10 ³ /mm ³)	
	C57BL/6	
Normal	5.7±0.04 ^{a)}	
Control	9.8±0.10	
HDT-C	8.8±0.12	

Table 13. Effect of HDT-C on Platelet after i.v. Injection of B16-BL6

Group	Platelet(x10 ³ /mm ³)	
	C57BL/6	
Normal	879.4±25.9	
Control	609.6±18.8	
HDT-C	655.1±26.6	

IV. 結 論

HDT-C의 抗腫瘍效果를 探索하기 위하여 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, 附着阻止作用, 血管形成 阻害作用 및 組織·血液學的 變化 등을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 數種 癌柱에 대한 細胞毒性에서는 A549, SK-OV-3, B16-BL6 癌柱에 對하여 高濃度인 10^{-3} g/ml 濃度에서 30% 以上 細胞成長을 抑制하였다.
2. DNA topoisomerase I assay에서는 100-200 μ g/ml의 IC₅₀을 나타내었다.
3. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서는 145.4%의 T/C%를 나타내었다.
4. TNF- α 遺傳子 發顯에 미치는 影響에서는 모든 實驗 濃度에서 對照群에 비하여 增加하였다.
5. MMP-9 遺傳子 發顯에 미치는 影響에서는 모든 實驗 濃度에서 對照群에 비하여 減少하였다.
6. 複合細胞外基質에서의 細胞附着 沮止效果는 高濃度인 10^{-3} g/ml 濃度에서 30% 以上 附着沮止效果를 나타냈다.
7. CAM assay에서는 42%의 血管形成抑制作用을 보였다.
8. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 비하여 colony 形成에 있어 有意性있는 減少를 나타내었다.
9. B16-F10이 移植된 생쥐의 血液學的 變化에서는 白血球數 및 血小板數에서 對照群과 큰 차이가 없었다.
10. H&E 염색에 의한 肺臟의 組織 變化에서는 對照群에서 주로 perivascular에 全般的인 癌細胞 浸潤이 있었고, peribronchiole에 심한 癌細胞 浸潤이 觀察되었지만, 實驗群에서는 對照群에 비해 浸潤이 抑制되었다.

參考文獻

1. Harvey Lodish, Arnold Berk : Molecular cell biology 4.0, W. H. Freeman and company, 1999.
2. 統計廳 : 死亡原因統計年譜, 웃고문화사, p.21, 1995.
3. 김성훈, 유시용, 송규용 : 白花蛇舌草 핵산 分劃과 多糖體가 抗癌 및 抗轉移에 活性에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 13(1), pp.65-75, 1999.
4. 조한진, 김성훈 : 桃紅四物湯加減方の 抗癌 및 抗轉移 效果에 관한 研究, 東醫病理學會誌, 13(1), pp.76-91, 1999.
5. 진천식, 강성도, 정현우 : 免疫細胞 및 腫瘍細胞에 미치는 丹蔘의 效果, 東醫病理學會誌, 12(2), pp.125-132, 1998.
6. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1), pp.245-263, 1994.
7. 黃奎東 外 : 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯 加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol.2, No.1, p.1, 1996.
8. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J.D., Vistica, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. ; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(13), pp.1107-1112, 1990.
9. National Cancer Institute U.S.A. ; *Cell culture technical procedures*, 1972.
10. L. F. Liu, T. C. Rowe, L. Yang, K. M. Tewey, and G. L. Chen : Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II, *J. Biol. Chem.*, 256(4), 15365, 1983
11. Mary K. Chelberg, Effie C. Tsilibary, Alan R. Hauser, James B. McCarthy ; Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. *Cancer Reserch*, 49, 4796-4802, 1989.
12. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, *Devl Biol.*, 41, pp.391-394, 1974.
13. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
14. Humphries. M. J., Matsumoto. K., White. S.L., and Olden. K. Oligosaccharide

modifications by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, pp.1752-1756, 1986.

15. Martin J. Humphries., Kazue Matsumoto, Sandra L. White. and Kenneth Olden : Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors, *Cancer Reserach*, 46, pp.5215- 5222, 1986.

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

17. 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 博士學位論文, 1998.

18. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 關한 實驗的研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1), pp.245-263, 1994.

19. 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), pp.315-321, 1995.

20. 金賢洙 外 : 葦莖湯, 加味葦莖湯의 B16-F0 에 對한 抗腫瘍效果와 組織變化, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.365-387, 1995.

21. Chizzolini C., Rezzonico R., De Luca C., Burger D., Dayer JM. : Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J Immunol.* 164(11):5952-60, 2000.

22. Kubota Y., Ninomiya T., Oka S., Takenoshita Y., Shirasuna K. : Interleukin-1alpha-dependent regulation of matrix metalloprotein ase-9(MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res.* 79(6):1423-30, 2000.

23. Darnay B. G., Aggarwal B. B. : Early events in TNF signaling: a story of as-sociations and dissociations. *J. Leukocyte Biol.* 61:5596, 1997.

24. Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett.* 410:9606, 1997.

25. Doug Z, Kumar R, Yang X, and Fidler IJ. Macrophage -derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, *Cell*, 88 : 801-810, 1997.