

扶正養陰湯의 抗癌活性에 關한 研究(I)

宋敏鎬* · 최봉균** · 金東熙*

Abstract

Study on Antitumor Activity of Bujeongyangeumtang(BJYET)

Song Min-Ho 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 Bujeongyangeumtang(BJYET), studies were done experimen- tally.

The results were obtained as follows:

1. BJYET extracts exhibited a significant cytotoxicity against A549, SK-MEL-2, SK-OV-3, and B16-BL6 cell lines.
2. The T/C% was 118.2% in BJYET treated group in S-180 bearing ICR mice.
3. BJYET extracts exhibited inefficient adhesive effect of A549, B16-BL6 cell to complex extracellular matrix.
4. BJYET extracts showed a significant inhibition of lung metastasis of B16-BL6 cells in C57BL/6.
5. In vitro neovascularization assays, angiogenesis was significantly inhibited in BJYET treated group than control group.

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

I. 緒 論

腫瘍은 '組織의 自律的인 過剩成長으로 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을뿐더러 正常組織에 대하여 破壞的인 것'으로 그 發生原因과 機轉이 明白하게 밝혀져 있지 않고 또 生物學的 性

狀이 複雜하여 일반적으로 臨床 및 病理形態學的 所見에 의하여 陽性과 惡性으로 兩分된다^{1,2)}.

우리가 通常 癌이라고도 말하는 惡性腫瘍은 빠른 成長, 浸潤性, 轉移性 등과 같은 特性이 있어 生命을 위협하는 疾患으로 우리나라는 물론 全世界의 死亡原因의 首位를 차지하고 있는 實情이다³⁾.

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學敎室
** 푸른한의원

韓醫學에서 癌이라는 용어는 宋代 《衛濟寶書》에서 最初로 記錄하고 있으나, 癌과 같은 疾患으로 認識한 記錄은 훨씬 以前으로 《內經》에 기록된 “腸覃”, “石瘕” 등의 用語이며⁴⁾, 腫瘍 및 積聚, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 石疽, 石癰 등으로 多樣하게 記述되어 왔으며⁴⁻⁶⁾ 最近에 이에 對한 檢證이 實驗과 臨床을 通하여 이루어지고 있다.

癌의 治療 方法을 보면 韓醫學에서는 正氣補養을 爲主로 하면서 淸熱解鬱法, 軟堅散結法 및 活血化瘀法 등을 널리 使用하고 있고^{5-6,9)}, 西醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 遺傳子療法 등을 使用하고 있다⁷⁻⁹⁾. 그러나 이들 療法는 癌種에 따른 感受性差異, 治療後의 副作用 등 많은 問題點을 안고 있어, 우수한 새로운 治療法의 開發의 環으로 우리나라에서도 韓醫學의 癌治療法 및 補助의 療法의 開發이 進行되고 있다.

最近의 韓藥製劑를 이용한 腫瘍治療에 관한 研究를 살펴보면 單一 抗癌 藥物 및 複合製劑를 이용하여 朴¹⁰⁾, 羅¹¹⁾, 李¹²⁾, 尹¹³⁾, 張¹⁴⁾, 金¹⁵⁾, 白¹⁶⁾ 등의 報告가 있고, 藥針을 이용한 實驗으로는 徐¹⁷⁾, 林¹⁸⁾ 등의 研究가 多數 있으며, 이러한 研究를 통하여 癌의 治療法에 관한 一般의 韓醫學的 治療法은 扶正이 爲主이고, 祛邪는 補助의 療法이라는 認識이 擴散되고 있다.

이에 本 研究에서는 腫瘍의 治療에 使用되는 扶正養陰湯의 抗癌活性을 實驗의 으로 立證하고자, 이를 試料로 HT1080을 비롯한 癌細胞에 對한 細胞毒性, sarcoma 180에 對한 生存比 등의 測定을 通해 抗癌效果를 評價하고, A549, B16-BL6 癌柱의 附着 阻止作用, 肺癌轉移抑制作用, 血管形成 阻害作用 등을 測定하여 抗轉移 效果를 評價하였던 바 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 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계 생쥐를 韓國化學研究所에서

供給받아 實驗當日까지 固形飼料(抗生劑 無添加, 三養飼料 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 S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定 實驗에 使用하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選한 것을 使用하였으며, 扶正養陰湯의 내용은 《癌症治療綠》¹⁹⁾에 記載된 것을 基本으로 構成하였으며 處方의 內容과 한 貼分量은 아래와 같다.

Prescription of Bujeongyangeumtang(BJYET)

韓 藥	生藥名	用量(g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	12
麥門冬	<i>Lirioepis Tuber</i>	12
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	15
漏 蘆	<i>Rhapontici Radix</i>	30
土茯苓	<i>Smilacis Glabrae Rhizoma</i>	30
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	30
升 麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	30
總 量		153

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), HBSS (Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, agarose, sodium dodesyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), sulforhodamine-B (SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopolysaccharide (LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glicial 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 製品을 각각 使用하였다.

機器는 CO₂ incubator (Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench (Vision

scientific Co., KMC-14001), centrifuge (Beckman Co., GS-6R), inverted microscope (Nikon Co., Japan), bright microscope (UFX -DX, Nikon), linear accelerator (Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScan (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(601S, Nikon) 및 syringe filter (0.22, 0.45 μ m, Falcon)등을 사용하였다.

2. 方法

A. 抗癌性 探索

1) 試料의 製造

上記한 扶正養陰湯의 5첩 分量(765g)을 各各 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2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 $^{\circ}$ C deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 17.2g의 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 (0.22 μ m, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 HT1080(ATCC CCL121), A549(ATCC CCL185) 肺癌株, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌株, 및 B16-BL6 melanoma (ATCC CRC 6322), B16-F10(ATCC CRC 6322) 黑色腫을 in vivo 抗癌 實驗에는 S-180(ATCC TIB 66) 腹水癌株, B16-BL6(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56 $^{\circ}$ C 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)

을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만 units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) HT-1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 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 sulforho-damine-B (SRB)assay 法²⁰⁾을 使用하였다. 繼代中인 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 2×10^4 개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(100, 10, 1 μ g/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 넣어 細胞가 들어있는 well에 各各 200 μ l씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다.

試料는 加하기 前에 0.22 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, 各 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ l씩 加하여 4 $^{\circ}$ C에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 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 250 μ l의 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 5~6회 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(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 ED₅₀값을 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할때의 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(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 程度를 測定하였다. 즉, $T_z \geq T$ 인 境遇에는 $(T-T_z)/(C-T_z) \times 100$ 의 數式으로 計算하였고, $T_z < T$ 인 境遇에는 $(T-T_z)/T_z \times 100$ 의 數式으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 機能을 利用하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose(ED_{50})값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 程度를 比較하였다. ED_{50} 값은 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²¹⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = \left[\frac{(T - C_0)}{(C - C_0)} \right] \times 100$$

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)

C_0 = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

各 濃度의 Y(%)값과 Log10 dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 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.

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

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

이때, N=number of points selected

[\leq number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose I

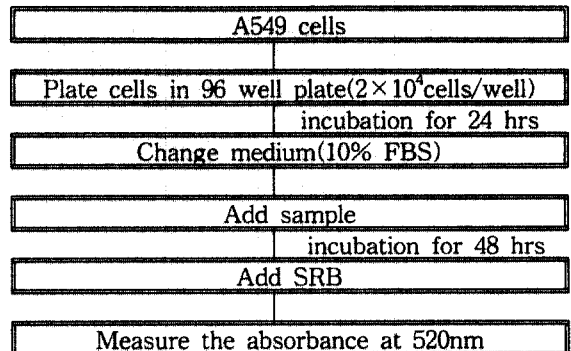
여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 $Y = A + BX$ 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED_{50} 값을 계산하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하, 合成物인 경우 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定^{21,22)}하고 있다.



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

4) A549, B16-BL6 癌株의 附着 沮止 作用 測定^{23,24)}

A549, B16-BL6 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 $100\mu\text{l}$ 씩 가한(5×10^4 cells/well). 후 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度의 試料를 녹인 培地 $100\mu\text{l}$ 를 加하고 5% CO_2 , 37°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 후 SRB法²⁰⁾에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

5) 肺癌 轉移 抑制에 미치는 效果²⁵⁾

(1) 肺臟內 colony 形成 抑制에 미치는 效果

In vitro에서 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/6에 細胞懸濁液 0.2ml 을 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를 移植

한 後 24時間부터 1日 1回씩 10mg/20g/day의 試料을 生理食鹽水에 녹여 4°C에서 保管하면서 7日間 每日 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. 癌移植 21日 後에 cervical dislocation으로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony를 계산하였다.

6) 血管形成 抑制作用 測定

(1) In vivo CAM(Chorioallantoic membrane) assay^{26,27)}

- 1日째(0日胚) : 受精卵을 培養基에서 孵化시켰다. 이 때 培養基의 溫度는 37~38°C, 濕度는 90% 以上 維持되도록 隨時로 確認하였다. 여기에서 0日胚란 受精卵이 産卵되어 18°C에서 保管된 지 3~4日 以內的 것을 말한다.

- 3日째(2日胚) : 受精卵의 뾰족한 끝 部分에 칼로 홈을 낸 후 水平으로 뒤어놓고 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 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 培養시켰다.

- 4日째(3日胚) : 受精卵의 air sac이 있는 쪽 (주사기 구멍의 반대쪽)으로 직경 2~3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 培養시켰다. 참고로, 圓形 window를 내는 方法은 날카로운 칼로 受精卵의 겹질 위에 圓形으로 홈을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이때 겹질가루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 受精卵이란 window를 났을 때 십자가형의 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 정도 된다. 샘플을 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 bench의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 確認한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이 때 使用하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로

消毒하여 使用하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 消毒하여 使用하였다. 기타 實驗 機具들도 受精卵이 感染되지 않도록 注意하면서 使用하였다.

- 7日째(6.5日배) : 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. 注射器로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 취하고, 기포를 除去한 뒤 CAM의 바로 아래 部分에 注入한다. 이 때 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.

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 400×g로 2分間 遠心分離하여 細胞沈澱物을 分離하였다. 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 混在된 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 hemacytometer 로 세어 10⁷cells/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은 生理食鹽水로 溶解시켜 保存溶液(10mg/20g/day)을 만든 후 4°C에 保存하였으며, 0.2ml씩 經口로 1週日간 連續 投與하였으며 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 protocol에 言及된 式²⁸⁾에 따라 計算하였다.

III. 實驗 成績

A. In vitro

1. HT1080 癌柱에 對한 細胞毒性

HT1080 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比해 各各 91.49±1.54, 82.47±4.15, 49.54±1.08%로 0.1mg/ml에서 50% 以上 細胞毒성을 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Cytotoxic Effect of BJYET on HT1080 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 4.41 ^{a)}
0.001	91.49 ± 1.54
0.01	82.47 ± 4.15
0.1	49.51 ± 1.08

: 30% 이상 細胞毒성을 나타낸 濃度

a) : Mean ± standard error

0(control) : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group

0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group

0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

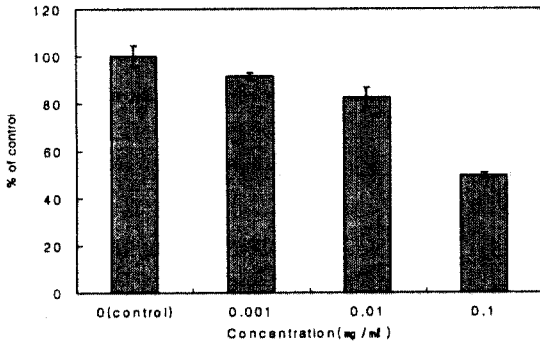


Fig. 1. Cytotoxic effect of BJYET on HT1080 cells.

0(control) : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group

0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group

0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

2. A549 癌柱에 對한 細胞毒性

A549 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比 較 各 各 86.73 ± 2.17, 79.71 ± 3.84, 50.42 ± 4.91%로 0.1mg/ml에서 50%以上 細胞毒성을 나타내었다 (Table 2, Fig. 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of BJYET on A549 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 5.17 ^{a)}
0.001	86.73 ± 2.17
0.01	79.71 ± 3.84
0.1	50.42 ± 4.91

: 30% 이상 細胞毒성을 나타낸 濃度

a) : Mean ± standard error

Control : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml of BJYET treated group

0.01 : 0.01mg/ml of BJYET treated group

0.1 : 0.1mg/ml of BJYET treated group

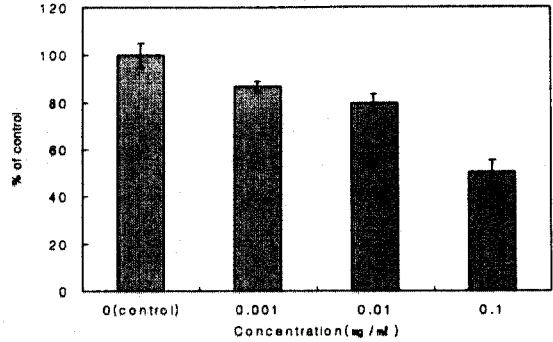


Fig. 2. Cytotoxic effect of BJYET on A549 cells.

0(control) : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group

0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group

0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

3. SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞毒性

SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比 較 各 各 89.18 ± 5.17, 69.81 ± 6.55, 42.31 ± 1.18%로 0.1mg/ml에서 50% 以上의 細胞毒성을 나타내었다 (Table 3, Fig. 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of BJYET on SK-OV-3 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 ± 6.18 ^{a)}
0.001	89.18 ± 5.17
0.01	69.81 ± 6.55
0.1	42.31 ± 1.18

: 30% 이상 細胞毒성을 나타낸 濃度

a) : Mean ± standard error

Control : Non-treated group

0.001 : 0.001mg/ml of BJYET treated group

0.01 : 0.01mg/ml of BJYET treated group

0.1 : 0.1mg/ml of BJYET treated group

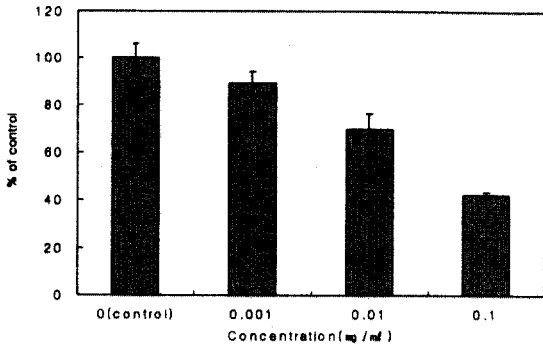


Fig. 3. Cytotoxic effect of BJYET on SK-OV-3 cells.

0(control) : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group
 0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group
 0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

4. B16-F10 癌柱에 對한 細胞毒性

B16-F10 癌柱에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群에 比해 各各 89.1±4.74, 85.47±5.40, 42.95±5.30%로 0.1mg/ml에서 50% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Table 4, Fig. 4).

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

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±8.08 ^{a)}
0.001	89.1±4.74
0.01	85.47±5.40
0.1	42.95±5.30

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

a) : Mean± standard error
 Control : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml of BJYET treated group
 0.01 : 0.01mg/ml of BJYET treated group
 0.1 : 0.1mg/ml of BJYET treated group

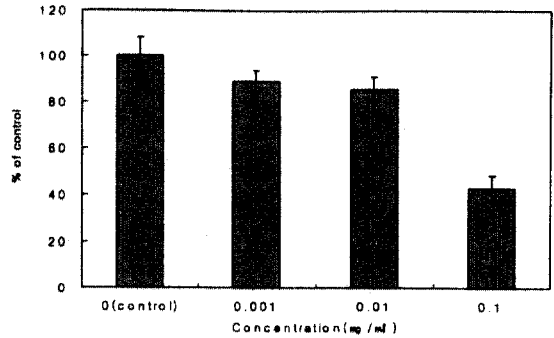


Fig. 4. Cytotoxic effect of BJYET on B16-F10 cells.

0(control) : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group
 0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group
 0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

5. A549 癌柱의 附着阻止 效果

A549 細胞에 對한 附着阻止 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml의 濃度에서 對照群에 比해 134.64±1.76, 113.24±4.60, 93.64±3.80%로 細胞 附着阻止 效果가 거의 나타나지 않았다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Inhibitory Effect of BJYET on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±5.47 ^{a)}
0.001	134.64±1.76
0.01	113.24±4.60
0.1	93.64±3.80

a) : Mean± standard error
 Control : Non-treated group
 0.001 : 0.001mg/ml of BJYET treated group
 0.01 : 0.01mg/ml of BJYET treated group
 0.1 : 0.1mg/ml of BJYET treated group

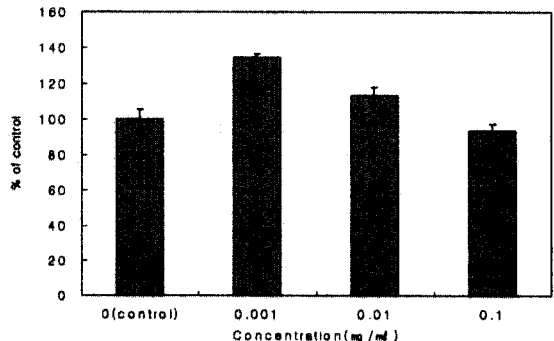


Fig. 5. Inhibitory effect of BJYET on cell adhesive of A549 cells to complex extracellular matrix.

- 0(control) : Non-treated group
- 0.001 : 0.001mg/ml BJYET treated group
- 0.01 : 0.01mg/ml BJYET treated group
- 0.1 : 0.1mg/ml BJYET treated group

6. B16-BL6 癌柱의 附着阻止 效果

B16-BL6 細胞에 對한 附着阻止 實驗에서는 0.001, 0.01, 0.1mg/ml의 濃度에서 對照群에 比해 114.19±0.59, 108.54±1.13, 91.56±1.08%로 細胞 附着阻止 效果가 거의 나타나지 않았다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Inhibitory Effect of BJYET on Cell Adhesive of B16-BL6 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±3.31 ^{a)}
0.001	114.19±0.59
0.01	108.54±1.13
0.1	91.56±1.08

a) : Mean ± standard error

- Control : Non-treated group
- 0.001 : 0.001mg/ml of BJYET treated group
- 0.01 : 0.01mg/ml of BJYET treated group
- 0.1 : 0.1mg/ml of BJYET treated group

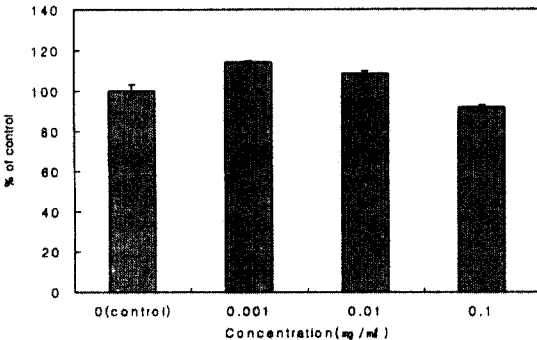


Fig. 6. Inhibitory effect of BJYET on cell adhesive of B16-BL6 cells to complex extracellular matrix.

- 0(control) : Non-treated group
- 0.25 : 0.25mg/ml BJYET treated group
- 0.5 : 0.5mg/ml BJYET treated group
- 1 : 1mg/ml BJYET treated group

B. In vivo

1. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

S-180이 移植된 생쥐에 10日間 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 癌株 移植 後 11日에 급격히 增加하여 18日에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 17.12日, BJYET 投與群은 20.25日로 나타나, T/C%는 118.2%로 나타났다(Table 7).

Table 7. Effect of BJYET on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	MST (day)	T/C (%) ^{a)}
Control	8	17.12	100
BJYET	8	20.25	118.2

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

2. 肺癌 轉移 抑制에 미치는 效果

1) 肺臟內 colony 形成 抑制에 미치는 效果

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 後 10日間 BJYET를 投與하면서 21日째에 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果 對照群은 48.62±2.48(개)이었는데 比해서 BJYET 投與群은 36.04±8.81(개)로써 26%의 有意性있는 (P<0.05) 肺癌轉移 抑制效果를 보였다(Table 8, Fig. 7).

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

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	10	48.62±2.48 ^{a)}
BJYET	10	36.04±8.81*

a) : Mean ± standard error

BJYET : 10mg/20g/day BJYET treated group group

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

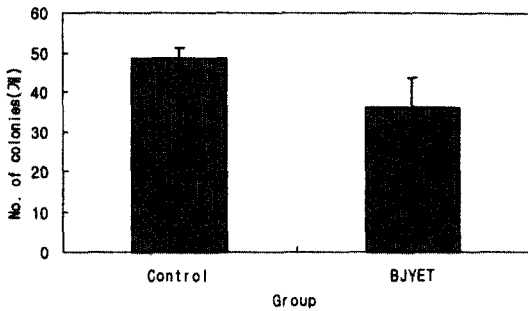


Fig. 7. Inhibitory effect of BJYET of lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-BL6 cells.

3. 血管形成 抑制效果

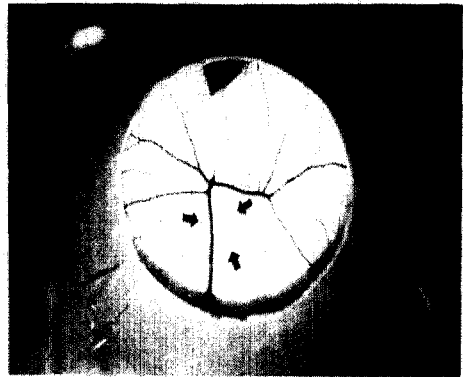
血管形成 抑制效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 10個 중 5個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 50%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 9, Fig. 8)

Table 9. Antiangiogenic Activity of BJYET in a CAM Assay

Sample	Dose(μg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
BJYET	10	5/10



Control group



BJYET treated group

Fig. 9. Photography of control and BJYET(10μg/egg) on embryonic angiogenesis in CAM 2 day after sample implantation.

IV. 考 察

惡性腫瘍인 癌은 正常 組織에 대해 破壞의 일면 아니라, 正常的인 成長과는 달리 獨立的으로 자라 周圍 組織을 浸潤하고 다른 組織으로 轉移되는 一種의 組織의 過剩成長으로 오늘날 人類가 克服해야 할 難治病중의 하나이다^{1,2,29,30}.

癌細胞는 正常細胞와는 달리 非正常的으로 突然 變異된 形態를 지니며 形態가 매우 不規則하다. 癌細胞의 核은 크고 多樣하며 核小體가 뚜렷한데 이는 癌細胞가 合成能力이 뛰어난 未成熟된 胎兒細胞로 끊임없이 細胞分裂을 일으키면서 成長한다는 것을 의미한다²⁹.

癌의 發生原因과 機轉이 明白하게 밝혀져 있지 않으나 細胞分裂을 調節하는 機能의 缺陷이나 惡性腫瘤遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失됨으로써 發生한다 여겨지는데, 電離放射線, 담배, 飲酒 및 바이러스, 長期間 多量의 藥物服用, 食餌의인 문제, 寄生蟲 疾患 등과 함께 飲食, 水質, 大氣 등의 環境汚染과 복잡한 産業社會에서의 각종 精神 心理的 스트레스 등으로 發生한다 認識하고 있다^{1,7,30}.

癌에 대한 治療法으로 手術療法, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法 및 遺傳子療法 등이 活用되고

있는데^{5,8)}, 手術療法은 轉移된 腫瘍의 治療가 不可能하다는 限界가 있으며, 放射線療法은 局所의 浸潤性 腫瘍의 治療에는 有效하나 轉移 腫瘍의 경우는 治療에 制限性이 있고 正常組織의 損傷과 骨髓造血機能 障礙, 脫毛, 皮膚異常, 臟器損傷등의 副作用이 있으며, 化學療法은 全身的 轉移의 경우 좋은 治療法이나 正常細胞에 대한 毒性作用등 대부분의 治療方法이 短點과 副作用이 있어^{9,14,31)} 최근 각 분야에서 抗癌治療時 나타나는 副作用減少를 통한 抗癌效果增進 目的의 研究가 進行되고 있다.

韓醫學에서 腫瘍과 비슷한 病證으로는 일찌기 積聚, 癭疽, 癭瘤, 反胃, 嗜膈, 失榮, 石疽, 石癭등이 언급되었고, “癌”字는 宋代 東軒居士의 《衛濟寶書》에서 最初로 나타났으며 《仁齋直指附遺方論》에서 現代의 惡性腫瘍과 가장 비슷하게 說明되었다⁴⁾.

韓醫學에서 癌의 治療는 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽, 健脾益腎등의 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化痰, 化痰消痞, 理氣消腫등의 祛邪法 및 이 두가지 方法을 配合한 扶正祛邪法癌에 對한 治療法으로 大別하여 多樣하게 應用하고 있으며, 특히 癌이 全身的, 多臟器의 疾患으로 轉換된다는 特徵으로^{4,31-35)}, 一部分의 臟器 治療보다는 患者의 自體 正氣를 增進시킴으로써 內部 臟器間의 相互 關係를 復原하는데 重點을 두고 있다.

특히 “正氣存內, 邪不可干”, “邪之所湊, 其氣必虛”, “精氣虛則成癌”이라 하여 모두 正氣를 重要視하여 癌의 發生은 韓醫學의 대체적 病因論과 같이 正邪의 抗爭이며, 邪氣에 대한 正氣의 抵抗能力의 低下, 免疫能力의 低下로 發生된다고 볼 수 있다^{33,34)}.

그러므로 扶正培本法은 人體 陰陽氣血과 臟腑經絡生理機能을 調節하여 患者의 抗病力 및 免疫기능을 向上시키며, 祛邪法을 併用하더라도 “祛邪不傷正”, “扶正而達邪”하게 한다. 또한 臨床의 으로도 扶正培本 治方의 活用으로 六味地黃湯을 惡性腫瘤 및 抗癌劑 및 放射線으로 인한 肝腎陰虛證에³⁵⁻³⁷⁾, 四君子湯을 邱와 梁등이 消化器癌에^{38,39)}, 林은 肝癌에⁴⁰⁾ 使用하였고, 六君子湯을 高는 未分化形肺癌에 使用하였음⁴¹⁾이 報告된 바 있다.

또한 最近 放射線 및 化學療法에 黃芪, 人蔘, 白朮, 茯苓, 陳皮, 麥門冬, 當歸, 生地黃, 山藥, 女貞

子, 白芍藥, 太子參, 菟絲子, 枸杞子 등의 補氣健脾 滋補肝腎의 藥材들의 使用頻도가 높다고 하는 등^{42,43)} 四君子湯이나, 四物湯, 六味地黃湯등과 그 構成藥物등 補氣, 補血, 補陰하는 正氣를 補하는 藥物이 免疫을 增強하고 抗癌 및 副作用減少에 效果가 있는 것으로 알려져 있다.

本 實驗의 試料인 扶正養陰湯은 補陰劑인 生地黃, 熟地黃, 天門冬, 麥門冬과 補氣劑인 黃芪와 漏蘆, 土茯苓, 魚腥草, 升麻로 構成되어 臨床에서 正氣를 補益하여 免疫을 增強시키고 抗癌效果가 있을 것으로 思料된다.

扶正養陰湯 構成藥物의 效能 및 抗癌活性을 살펴보면, 熟地黃은 甘微溫하여, 滋陰補血, 益精眞髓의 效能이 있어 肝腎陰虛로 나타나는 諸 症狀을 다스리고, 癌 治療에 있어서는 四物湯이나 六味地黃湯의 主要 構成 藥物으로써 特定한 癌 疾患이 아닌 陰虛 症狀을 同伴한 各種 癌症에 使用되고 있으며, 生地黃은 甘寒하여 心肝腎經에 入하여 清熱涼血, 養陰生津하며, 細胞免疫 增強, 淋巴母細胞轉化 및 E-rossette 形成을 促進하여 化學療法, 放射線治療에 의한 白血球, 血小板 減少症에 應用된다. 麥門冬은 甘微苦微寒하여 肺胃心經에 入하여 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하고, 天門冬은 甘苦寒하여 肺腎經에 入하여 滋陰潤燥, 清肺降火하여 모두 抗體의 存在時間을 延長시켜 體液性免疫을 增強시킨다⁴⁶⁻⁴⁷⁾.

또한 黃芪는 辛甘溫하여 益衛固表, 利水消腫, 托毒生氣, 補中益氣 效能이 있고, 免疫反應 增強作用, 網狀內皮系 貪食機能 增強作用 등이 報告되어, 肺癌, 鼻咽癌, 晩期의 消化道 腫瘤에 活用되어지며, 漏蘆는 苦寒하여 胃經에 入하여 清熱解毒, 消癰腫, 下乳汁하며, 土茯苓은 肝胃經에 入하여 除濕解毒, 通利關節하여 突然變異 抑制作用이 있어 특히 膀胱癌, 皮膚癌, 絨毛膜上皮癌에 사용되며, 魚腥草는 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋 效能이 있어 仙鶴草와 더불어 肺癌 등에 活用되며, 升麻는 辛微甘微寒하여 肺脾胃大腸經에 入하여 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣하며 下陷된 脾氣를 끌어올린다⁴⁶⁻⁴⁷⁾.

이에 本 實驗에서는 이러한 本草學의 效能과 臨床의 報告를 바탕으로, 扶正養陰湯을 試料로 抗癌 및 抗轉移 效果를 實驗적으로 評價하고자 하였다.

먼저 抗癌性 探索하기 위하여 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, S-180에 對한 生命延長率 等を 測定하였고 轉移 抑制에 對한 實驗으로 in vitro에서 HT1080, A549 癌株에 對한 附着 阻止作用과, in vivo에서 B16-BL6 癌株을 移植한 생쥐의 lung colony 形成 抑制作用을 測定하였으며, CAM assay를 通하여 血管形成 抑制作用을 評價하였다.

細胞毒性的 測定에는 細胞內의 蛋白質 含量을 測定함으로써 抗癌物質의 活性을 測定하는 方法인 sulforhodamin-B(SRB)assay 사용하여 測定하였는데, 實驗한 모든 癌柱인 HT1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 癌柱에서 BJYET 0.1mg/ml 濃度에서 各各 50% 以上 癌細胞 成長 抑制效果를 나타내었다(Table 1-4, Fig. 1-4).

또한 In vivo에서 sarcoma-180을 皮下에 移植해 腹水癌을 誘發한 생쥐를 이용하여 生存比를 測定하였는데, 本 實驗에서는 對照群의 MST는 17.12日, BJYET의 MST는 20.25日로 118.2%의 生存比(T/C%)를 나타내었다(Table 7).

轉移는 惡性腫瘍이 가지는 가장 代表的인 特性으로서 腫瘍의 發生 部位에서의 局所 浸潤能力과 遠隔部位로의 轉移能力을 同時에 가지고 있으므로 全身 各 臟器나 組織에 轉移所를 만들어 終局에는 癌患者 死亡의 主된 事由가 된다^{21,44,45}.

먼저 in vitro에서 A549, B16-BL6 癌株을 이용한 附着 阻止實驗에서는 가장 高濃度인 BJYET 0.1mg/ml에서도 A549, B16-BL6 癌柱 모두 93, 91%의 附着을 나타내어 複合基質에서의 附着阻止效果는 微弱하였다(Table 5, 6, Fig.5, 6). 反面에 B16-BL6 癌柱를 이용한 肺癌轉移實驗에서는 BJYET 投與群이 26% 減少하여 有意性있는 ($P < 0.05$) 肺癌轉移 抑制效果(Table 8, Fig 7)가 나타났다.

血管形成(angiogenesis)은 癌의 成長과 浸透, 轉移에 중요한 段階로, 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 이용하고, 癌

細胞에 연결된 새로운 血管을 이용해 循環期를 통하여 肝, 肺, 뼈조직 등으로 移動하게 된다. 그러므로 癌細胞 주위로 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혈관이 形成되면, 이 癌細胞는 急速히 자라게 되며 營養分의 供給源인 새로운 微細혈관이 그 주위를 둘러싸고 結局 轉移가 일어나게 된다. 따라서 angiogenesis의 過程을 抑制하면 癌을 治療할 수 있으리라는 것을 豫想할 수 있으며 실제로 1971년에 Folkman⁴⁸⁻⁵⁰에 의해서 처음으로 antiangiogenic therapy가 癌治療를 위한 하나의 意味 있는 手段으로써 등장한 以來로 많은 研究가 이루어지고 있다.

이와 같이 血管形成을 抑制하는 物質을 찾아내어 抗癌劑로써 開發하려는 가장 큰 理由는 癌細胞에 대하여 直接的으로 作用하여 癌細胞를 죽이기 보다는 根本적으로 癌細胞가 成長하기 위해서 必需的인 血管形成(angiogenesis)을 抑制하여 副作用이 없는 理想的인 抗癌劑를 開發할 수 있다는 점에서 癌治療를 위한 하나의 意味 있는 手段⁵¹으로써 浮刻되고 있다.

이러한 血管形成의 抑制作用을 評價하기 위하여 本 實驗에서는 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 있는 CAM assay를 實施하였다.

CAM assay 結果, figure 8에서 보는 바와 같이 受精卵 10個중 5個에서 血管形成 抑制效果를 나타내어 50%의 有效한 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 9).

以上の 結果를 綜合하여 보면, 扶正養陰湯이 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, 肺臟 轉移 抑制作用 및 血管形成抑制의 實驗에서 有意적으로 나타나, 本 試料의 抗癌活性이 認定된다. 이러한 抗癌活性은 直接的인 細胞毒性和 더불어 多樣한 轉移抑制作用에 의한 것으로 여겨지나, 生存率에 있어 낮은 수치를 나타냄으로써, 向後 多樣한 藥物의 配

함을 통한 持續的인 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

扶正養陰湯의 抗腫瘍 效果를 糾明하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, 複合基質에 對한 附着阻 止效果, 肺癌柱 形成抑制作用, CAM assay를 通한 血管形成抑制 效果, S-180에 對한 生命延長率 等 을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 數種 癌株에 對한 細胞毒性實驗에서는 HT1080, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 모든 癌株 에 0.1mg/ml 以上の 濃度에서 50% 以上 細胞毒 性을 나타내었다.

2. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 118.2%의 生命延長效果를 나타내었다.

3. A549, B16-BL6 癌株에 對한 附着 阻止作用 에서는 對照群에 비하여 微弱한 附着阻 止 效果를 나타내었다.

4. B16-BL6에 의한 肺臟轉移 抑制效果에서는 對照群에 비해 26%의 pulmonary colonization 形 成 抑制를 나타내었다.

5. CAM assay에서는 對照群에 비해 50% 抑制 效果를 나타내었다.

以上の 結果를 보아 扶正養陰湯은 向後 臨床에 서 多樣한 藥物의 加減을 통하여 癌의 轉移豫防 및 治療에 活用可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 金春元: 병리학, 서울, 신광출판사, 1989, p.84.
2. 서울대학교 의과대학: 腫瘍學, 서울, 서울대학 교 출판부, 1989, p.2-3.
3. 박재갑: 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판 부, 1994., pp.622-663.
4. 楊維傑 主編: 癌症腫瘍醫論醫華精選, 藥羣文 化事業公司, 1989, pp.1-4.
5. 李佩文: 如何正確選用抗癌中成藥, 中醫雜誌, 第9期, 1989, pp.46-48.

6. 厲暢: 癌의 中醫治療, 東洋醫學, 18(1), 199, p.56.

7. 李文鎬 外: 내과학, 서울, 박애출판사, 1976., pp.2446-2450.

8. 孫泰重 篇: 병리학개론, 서울, 고문사, 1979, p.227.

9. 金東熙 外: 抗癌劑와 放射線療法의 副作用에 對한 韓力藥物療法, 大田大學校 韓醫學研究所 論 文集 3卷, 1993, pp.34-39.

10. 朴春赫: 黃花敗醬과 白花敗醬이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14 : 1991, 1-26.

11. 羅瑛杰: 白朮과 枸杞子가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士 學位論文, 1987.

12. 李權益: 丹蔘의 抗癌效果와 活性物質 分離 에 對한 研究, 東醫病理學會誌, 10(2), 199, p76.

13. 尹相協: 六君子湯, 小柴胡湯, 魚腥草의 擔癌 생쥐의 生存期間延長效果와 免疫 反應에 關한 實 驗의 研究, 慶熙醫學, 7(3) : 1991., 342-357.

14. 張中植: 參茸湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效 果와 cyclophosphamide에 의한 부작용감소에 미 치는 영향, 대전대학교 석사학위논문, 1992.

15. 金秀眞: 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 cyclophosphamide에 의한 부작용감소에 미치는 영향, 대전대학교 석사 학위논문, 1993.

16. 白承學: 消積白朮散이 白朮의 抗癌障礙에 미치는 영향, 대전대학교 석사학위논문, 1991.

17. 徐珠源: 枸杞葉藥針이 s-180에 對한 抗腫 瘍 效果와 免疫反應에 미치는 影響, 針灸學會誌, 13(2), 199, p280.

18. 林사비나: 魚腥草水鍼의 抗腫瘍效果에 關한 研究, 12(1), 198, p467.

19. 牛孺子 外: 癌症治驗錄, 北京, 中醫古籍出版 社, 1994, pp.1-15.

20. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : 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, 1989, p.2418.
21. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, 1972, p.17.
22. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, Cancer Treat. Rep., 60, 1966, p.979.
23. 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.
24. Lin Yan et, al. : Inhibition of cell attachment by sellite, Cancer reserch 52, 5803-5807, 1992.
25. 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, 1986., pp.5215-5222.
26. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, Pharmac., Ther., Vol.51, 1991, pp.1-11.
27. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, Devl Biol.41 : 1974, 391-394.
28. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987, pp.132-140.
29. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, 1990, pp.225-271, 632-638, 703-710, 742-759, 816-827, 936-941, 1015-1021, 1061-1070.
30. 송계용 외 : 核心病理學, 서울, 高麗醫學, 1998, pp.151-160.
31. 鞠永棕 篇 : 고오스 약리학, 서울, 범문사, 1986, pp.701-710.
31. 李岩: 腫瘤學, 北京, 人民衛生出版社, 1985, pp.2-5.
32. 錢伯文: 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, 1983, pp.10-15.
33. 張寶娣 : 扶正抗癌活血爲主治療術後晚期胃炎 158例, 遼寧中醫雜誌, 第7期, 1993, p.25.
34. 于爾幸 : 健脾理氣法治療原發性肝癌臨床和機理的初步研究, 中醫雜誌, 第7期, 1987, pp.28-30.
35. 姜延良 外 : 六味地黃湯方法腫瘤的實驗研究, 中藥雜誌, 1983, pp.471-474.
36. 劉紋儀 : 六味地黃丸或金匱腎氣丸補助治療小細胞肺癌的療效觀察, 中西醫結合雜誌 12, 1990, pp.720-722.
37. 趙良輔 外 : 六味地黃湯對誘變和自發腫瘤的抑制作用, 中西醫結合雜誌, vol. 10, no.7, 1990, pp.433~435.
38. 梁興才 : 健脾補氣常用藥防治癌症研究綜述, 中醫藥信息 3, 1988, pp.17-19.
39. 林宗光 : 扶正培本法治療晚期原發性肝癌31例, 上海中醫藥雜誌 5, 1984, p.7.
40. 高令仙 : 未分化型小細胞肺癌治驗病例紹介, 上海中醫藥雜誌 1, 1985, pp.9-10.
41. 呂麗娜 外: 健脾理氣法治療原發性肝癌臨床和機理的初步研究, 中醫雜誌, vol. 28, No.7, 1987, pp.28~30.
42. 김민영 : 癌研究의 最新指見, 암연구소센터, 1993, pp.307-321.
43. 張民慶 外: 抗腫瘤中藥的臨床活用, 北京, 人民衛生出版社, 1997, p.82, 393, 72, 286, 354, 406.
44. 方藥中 外: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, 1986, pp.630-631.
45. 程劍華 外: 抗癌食物藥及其驗方, 江西科學技術出版社, 1997, p.294, 82, 508.

46. 葉銘洪: 治癌中藥及處方, 華聯出版社, 1995, p.138, 159, 210.
47. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編著: 本草學, 서울, 永林社, 1991, p.151, 190, 212 227, 580, 589.
48. Folkman, J. : Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, N Engl J Med, 1971, 285, 1182~1186.
49. Folkman, J. in XIth Congress of thrombosis and Haemostasis (Verstraete, M., Vermeylen, J., Lignen, R., and Arnout, J., eds), Luven University Press, 1987, pp.583~596.
50. Folkman, J. : Angiogenesis and breast cancer. J. Clin. Oncol, 12, 199, 441~443.
51. 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, pp.110-239, 제1회 동양의학 국제심포지움논문집, 1995.