

# 活血大補湯의 抗癌活性 및 抗轉移 效果에 關한 研究

裴文庸 · 金東熙\*

## Abstract

### Study on Antitumor Activity of Hwalheuldaibotang(HDBT)

Bae Moon-yong O.M.D, Kim Dong-hee O.M.D., Ph. D.

Dept. of Oriental Medicine Pathology

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of HDBT, studies were done experimentally.

The results were obtained as follows:

1. HDBT extracts didn't show cytotoxicity against BALB/C mouse lung fibroblast cell.
2. In cytotoxicity against A549, SK-OV-3, B16-BL6 and HT1080 concentration inhibiting cell growth up to below 30% of control was recognized at  $10^{-3}$ g/ml of HDBT.
3. The concentration inhibiting adhesion of A549 and B16-BL6 to complex extracellular matrix up to below 30% of control was recognized at  $10^{-3}$ g/ml of HDBT.
4. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, the  $IC_{50}$  was shown 200-300 $\mu$ g/ml of HDBT.
5. The T/C% was 137.9% in HDBT-treated group in S-180 bearing ICR mice.
6. In CAM assay, HDBT extracts inhibited angiogenesis significantly at 15 $\mu$ g/egg concentration as compared with control.
7. In pulmonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased but insignificantly in HDBT-treated group as compared with control group.
8. In hematological changes in B16-BL6 injected C57BL/6, numbers of WBC were decreased significantly in HDBT-treated group but numbers PLT were increased insignificantly as compared with control.

From above results it was concluded that HDBT could be usefully applied for the prevention and treatment of cancer.

## I. 緒 論

惡性 腫瘍을 總稱하는 癌은 組織의 過剩의 發育으로 個體를 死亡에 까지 이르게 하는 致命的인 疾患中の 하나<sup>1)</sup>로, 이에 對한 豫防과 治療는 醫學界의 重要한 課題가 되고 있다.

最近 들어 分子生物學의 發達로 癌 發生 機轉에

\* 大田大學校 韓醫科大學 韓方病理學教室

對한 研究가 深度있게 進行되고 있으나, 아직까지 全世界의으로 年間 淸만명에 가까운 人口가 癌으로 死亡하고 있는 實情이다<sup>2)</sup>.

韓醫學界에서는 1970년대 이후 抗癌劑 開發과 抗癌劑 副作用을 除去하려는 研究를 繼續 修行하여 왔으나, 현재까지 急速 成長하는 癌細胞를 效率的으로 殺害하여 遮斷하는데는 限界가 있다.

現在 大部分의 癌 發見이 初期 段階가 아닌 中期·末期에서 이루어지고, 西洋 醫學의 偏見으로 인하여 實際 臨床에서 癌患者가 韓藥을 服用하는 時機 역시 中期·末期인 까닭에 더욱 더 治療率이 떨어진다.

그러나 最近 들어 新規 抗癌物質 開發을 위하여 天然物을 이용한 研究가 활발히 進行되고 있다는 점<sup>3-5)</sup>에서 韓藥材 및 韓方 處方의 抗腫瘍 效果에 대한 研究는 많은 可能性을 內包하고 있다.

本 試料(活血大補湯-HDBT)는 現在 臨床에서 應用하고 있는 抗癌 處方으로, 數種의 補益 處方중 平均生存率이 가장 높은 處方인 十全大補湯을 基本方으로, 人蔘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, 牡丹皮, 鬱金, 赤芍藥, 丹蔘 등의 活血化癆 藥物을 加味한 攻補兼法에 附合된 處方이다.

最近 抗癌 處方에 대한 研究 動向을 살펴보면 扶正益氣方에 活血化癆 藥物을 加味한 處方의 抗癌 活性에 대한 研究가 가장 많이 進行되어 왔는데<sup>6-9)</sup>, 이는 이 두가지 方法이 多方面에 걸쳐 癌에 對한 治療, 調節作用이 있음을 의미하는 것이다.

이에 著者는 閱<sup>10)</sup>이 本 試料의 基本方에 淸熱解毒 藥物을 加味하여 抗腫瘍效果를 檢索한 바가 있어, 本 實驗에서는 同一한 實驗 方式에 의해 活血化癆藥物을 加味한 活血大補湯의 抗癌 活性을 檢索하고자 하였다. 이러한 연구를 기초로 향 후 韓藥 및 韓方 處方의 抗癌 機轉에 대한 比較 研究가 이루어 질 수 있을 것으로 보인다.

## 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는 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 安國市 藥材 市場에서 直接 購入하여 使用하였고, 活血大補湯(HDBT)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 Hwalheuldaibotang(HDBT)

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
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
鬱金	<i>Curcumae Radix</i>	6
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	6
丹蔘	<i>Salviae multiorrhizae Radix</i>	6
Total amount		88

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), HBSS (Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, EDTA, agaroses, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin, EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formal dehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 社 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 社 製品, acetic acid는 Glicial 社 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 社 製品, 受精卵은 풀무원사 製品, intralipose는 綠十字 製品, Tissue culture coverslip은 Nunc 社 製品을 各各 使用하였다.

機器는 CO<sub>2</sub> 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), ELISA-reader (Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micropipet (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 (0.22um, Falcon) 등을 使用하였다.

2. 方法

□ In vitro

1) 試料의 製造

HDBT의 10貼 分量(88g)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, Buchi 461, switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結 乾燥器

(Freeze dryer, FDU-540, Eycla, U.S.A)를 이용하여 完全 乾燥하여 21g을 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 melanoma(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫, P388 (白血病 癌柱), HT1080(大腸癌柱), MCF-7(乳房癌柱)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 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 添加하여 製造하였다.

3) 생쥐의 正常 lung fibroblast 細胞培養

생쥐의 正常 lung fibroblast 세포(mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐(lung)조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 DMEM (containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A.)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37 °C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2 회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

4) 數種 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 sulfor hodamine-B (SRB) assay 法<sup>11)</sup>을 使用하였다. 계대중인 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-BL6, P388, HT1080, MCF-7(乳房癌) 癌柱들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가  $2 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO<sub>2</sub> incubator내에서 24시간 培養하여 바닥면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(1000 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml)로 稀釋된 試料 溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 20 $\mu$ l씩 넣어주고 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 가하기 전에 0.22 $\mu$ m 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 100 $\mu$ l씩 가하여 4 $^{\circ}$ C 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 250 $\mu$ m의 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 ED<sub>50</sub>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 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  $\times$  100의 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 (ED<sub>50</sub>)값을 計算하여 各 藥物의 細胞毒性 정도를 比較하였다. ED<sub>50</sub>값은 對照群의 50% 水準으로 癌 細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度( $\mu$ g/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)  
 C<sub>0</sub> = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

각각 濃度의 Y(%)값과 log<sub>10</sub> dose를 圖式化하고 다음과 같은 식에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 各各의 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<sub>i</sub> = log dose i Y<sub>i</sub> = growth ratio calculated dose I  
 여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 Y = A + BX 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED<sub>50</sub>값을 계산하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20 $\mu$ g/ml 以下, 合成物인 경우 4 $\mu$ g/ml 以下일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定<sup>12)</sup>하고 있다.

5) A549, B16-BL6 細胞의 附着 阻止作用 測定<sup>13)</sup>

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  $1 \times 10^5$  cells/ml가 되게 造製하여 24 well plate의 각 well에 1ml씩 가하였으며, 凍結 乾燥된 시료는 3차 蒸溜水에 녹여 最終 濃度가  $10^{-3}$ g/ml,  $5 \times 10^{-4}$ g/ml 및  $2.5 \times 10^{-4}$ g/ml 등이 되게 하여 5% CO<sub>2</sub>, 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) DNA topoisomerase I 活性 抑制 測定

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 IC<sub>50</sub>값을 決定하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法<sup>14)</sup>에 따랐다. 즉, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 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 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總反應液을 20μl되게 한 것을 試驗群으로 하여 이들을 37°C에서 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 5μl를 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 0.5μg/ml의 ethidium bromide 용액에서 1시간 동안 染色, 紫外線 下에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용

하여 活性를 測定했다. 이 때 topo I의 1 unit는 37°C에서 30분간 반응시킬 때 super coiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 양을 意味한다.

□ In vivo

1) 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 HDBT는 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<sup>15)</sup>에 따라 計算하였다.

2) 血管 形成 沮害作用(CAM assay) 測定<sup>16)</sup>

- 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 胚족한 끝부분에 칼로 흠을 낸 후 수평으로 누어놓고 5ml 주사기로 구멍을 낸 다음 알부민을 3-5ml 정도 뽑아내었다. 수정란이 건조되지 않고 또 감염되지 않도록 구멍을 유리테일로 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 유리테일로 막고 다시 배양시켰다. 참고로,

원형 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 수정란의 겹질위에 원형으로 홈을 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 10 $\mu$ l씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 수정란의 유리테일을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리테일로 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) : 유리테일을 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.

### 3) B16-BL6에 의한 pulmonary colonization에 미치는 影響

B16-BL/6 melanoma cell(ATCC, CRL6322)을 C57BL/6 생쥐의 皮下에 계대 배양하였고, 實驗前에 形成된 腫瘍 部分을 分離하여 Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>가 들어 있지 않은 D-PBS(Sigma)에 100mesh (Sigma)로 腫瘍 組織을 粉碎한 후 遠心分離하였다. 그리고 0.85% NH<sub>4</sub>Cl을 넣어 잘 섞은 후 37 °C 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<sup>6</sup>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 assay는 癌 柱 移植 後 21일째에 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 현미경상(Nikon, Japan)에서 ×200 배율에서 계산하였다.

### 4) 血液學的 變化

C57BL/6 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중외제약)으로 마취하고 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23G×1¼, Samwoo Co.)로 心臟을 穿刺, 血液을 採取하여, Finio法<sup>17)</sup>에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

## III. 成 績

### □ In vitro

#### 1. 생쥐의 正常 lung fibroblast cell에 對한 細胞毒性

Lung fibroblast cell에 對한 細胞毒性에서 HDBT는 1, 10, 100, 500( $\mu$ g/ml) 濃度에서 각각 103.3±3.56, 98.4±3.23, 98.3±4.24, 91.1±2.45(%)로 나타나 모두 90% 이상의 細胞生存率을 나타내어 細胞毒性은 나타나지 않았다(Fig. 1).

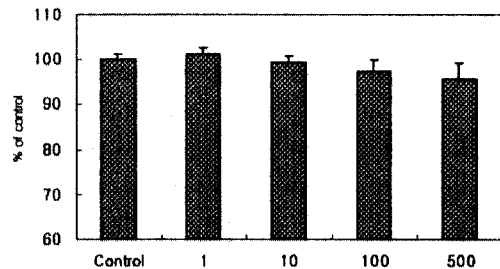


Fig. 1. Cytotoxic effect of HDBT on BALB/C mouse lung fibroblast cell.

Control : No treated group

1 : HDBT(1 $\mu$ g/ml) treated group

10 : HDBT(10 $\mu$ g/ml) treated group

100 : HDBT(100 $\mu$ g/ml) treated group

500 : HDBT(500 $\mu$ g/ml) 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 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이 100 ± 2.32인데 比해 各各 87.15 ± 3.24, 75.32 ± 3.14, 69.12 ± 4.24%로 1mg/ml에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 2).

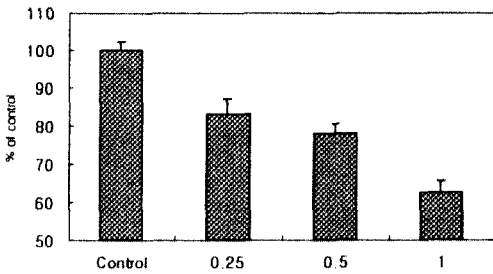


Fig. 2. Cytotoxic effect of HDBT on A549 cells.

Control : No treated group  
 0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group  
 0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group  
 1 : HDBT(1mg/ml) treated group

3. SK-OV-3 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 各各 94.1 ± 3.16, 80.1 ± 2.76, 70.6 ± 2.25%로 1mg/ml에서 30% 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 3).

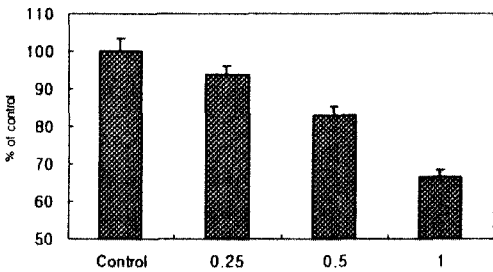


Fig. 3. Cytotoxic effect of HDBT on SK-OV-3 cells.

Control : No treated group  
 0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group  
 0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group  
 1 : HDBT(1mg/ml) treated group

4. SK-MEL-2 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이 100 ± 2.59인데 比해 各各 96.24 ± 1.65, 85.35 ± 2.37, 79.31 ± 2.64%로 他 癌柱에 比하여 弱한 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 4).

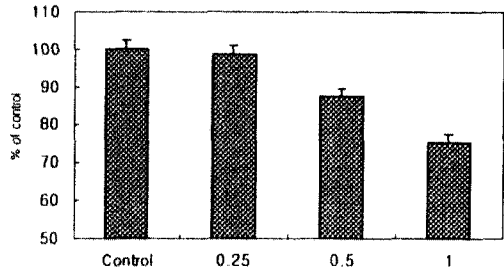


Fig. 4. Cytotoxic effect of HDBT on SK-MEL-2 cells.

Control : No treated group  
 0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group  
 0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group  
 1 : HDBT(1mg/ml) treated group

5. B16-BL6 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이 100 ± 2.63인데 比해 各各 96.34 ± 2.35, 83.13 ± 3.27, 69.86 ± 2.46%로 1mg/ml에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 5).

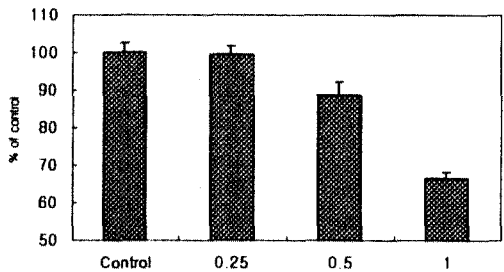


Fig. 5. Cytotoxic effect of HDBT on B16-BL6 cells.

Control : No treated group  
 0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group  
 0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group  
 1 : HDBT(1mg/ml) treated group

6. P388 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이  $100 \pm 2.32$ 인데 比해 各各  $93.14 \pm 2.53$ ,  $84.16 \pm 2.22$ ,  $75.21 \pm 3.17\%$ 로 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 6).

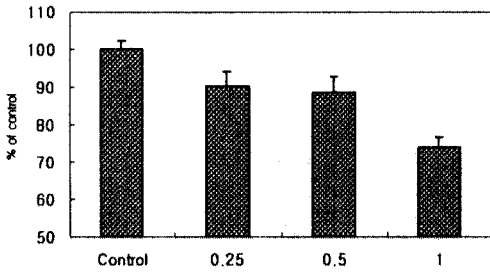


Fig. 6. Cytotoxic effect of HDBT on P388 cells.

Control : No treated group

0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group

0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group

1 : HDBT(1mg/ml) treated group

7. HT1080 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이  $100 \pm 2.32$ 인데 比해 各各  $94.12 \pm 2.67$ ,  $83.40 \pm 2.54$ ,  $63.36 \pm 2.25\%$ 로 1mg/ml에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 7).

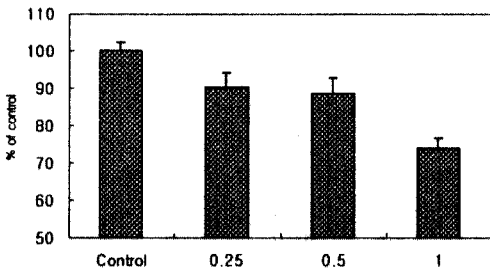


Fig. 7. Cytotoxic effect of HDBT on HT1080 cells.

Control : No treated group

0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group

0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group

1 : HDBT(1mg/ml) treated group

8. MCF-7 癌柱에 對한 細胞毒性

0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞生存率이 對照群이  $100 \pm 2.32$ 인데 比해 各各  $92.14 \pm 3.23$ ,  $85.36 \pm 2.45$ ,  $70.33 \pm 2.54\%$ 로 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 8).

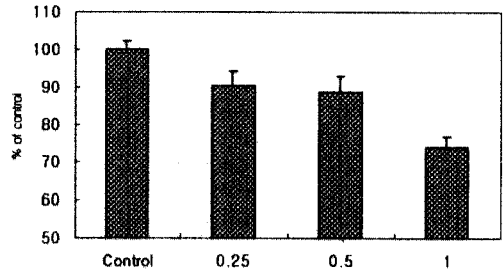


Fig. 8. Cytotoxic effect of HDBT on MCF-7 cells.

Control : No treated group

0.25 : HDBT(0.25mg/ml) treated group

0.5 : HDBT(0.5mg/ml) treated group

1 : HDBT(1mg/ml) treated group

9. A549, B16-BL6 細胞의 附着阻止效果

A549 細胞에 對한 附着阻止 實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 對照群이  $100 \pm 2.22$ 인데 比해 各各  $96.2 \pm 3.16$ ,  $79.1 \pm 3.45$ ,  $63.5 \pm 2.22\%$ 로 濃度에 比例하게 細胞 附着阻止 效果를 나타냈으며, 1mg/ml의 濃度에서는 30% 以上 附着 阻止效果를 나타내었다(Fig. 9).

B16-BL6 細胞에 對한 附着 阻止實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 對照群이  $100 \pm 3.64$ 인데 比해 各各  $92.2 \pm 2.65$ ,  $81.24 \pm 1.86$ ,  $60.5 \pm 2.45\%$ 로 濃度에 比例하게 細胞 附着阻止 效果를 나타냈으며, 1mg/ml의 濃度에서는 40%의 부착저지효과를 나타내었다(Fig. 10).



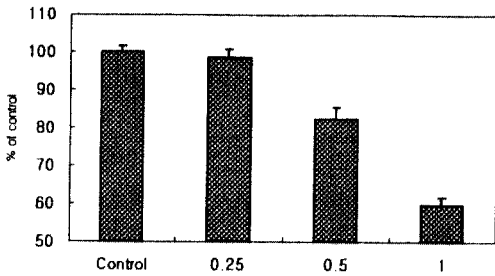


Fig. 9. Inhibitory effect of HDBT on cell adhesion of A549 cells to complex extracellular matrix.

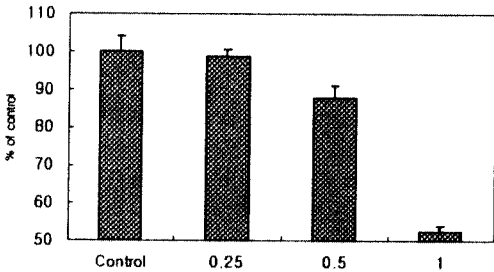


Fig. 10. Inhibitory effect of HDBT on cell adhesion of B16-BL6 cells to complex extracellular matrix.

10. 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 HDBT 投與群은 IC<sub>50</sub>이 200-300µg/ml으로 나타났 다(Table 1).

Table 1. Inhibitory Effect of HDBT on Activity of DNA Topo-I

Group	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HDBT	200-300µg/ml

□ 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 持續的으로 觀察하였던 바, 腹水癌으로 인하여 對照群에서는 癌柱 移植 後 10日에 급격히 體重이 增加하여 14日에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 13.71日, HDBT 投與群은 18.80日로 나타나, T/C%는 137.1%로 나타났다(Table 2).

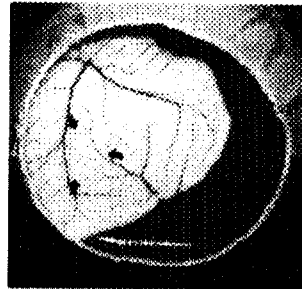
Table 2. Effect of HDBT on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%)
Control	8	13.71	100.0
HDBT	8	18.80	145.4

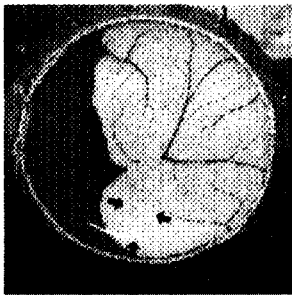
$$T/C (\%)\# : \frac{MST \text{ of sample}}{MST \text{ of control}} \times 100$$

2. 血管形成 阻害效果(CAM assay)

血管形成 阻害效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 7個중 2個에서 血管形成 抑制效果가 나타나 28%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Fig. 11)



Control



HDBT

Fig. 11. Antiangiogenic activity of HDBT in a CAM assay.

Control : No treated group  
 HDBT : HDBT treated group

3. B16-BL6에 의한 pulmonary colonization에 미치는 效果

B16-BL6 黑色腫 癌柱를 尾靜脈에 注射하여 14 일째 實施한 肺臟의 colony 數 測定에서는 對照群 에서는 36.3±3.13개, HDBT 投與群은 28.5±3.4로, 對照群에 比하여 減少하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 3).

Table 3. Effect of HDBT on Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6

Group	No. of animals	Lung colonies
Control	10	36.3±3.13
HDBT	10	28.5±3.4

4. 血液學的 變化

血液學的 變化에서 白血球數는 對照群에 比하여 有意性있는 減少를 나타내었고, 血小板數는 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 4, 5).

Table 4. Effect of HDBT on WBC after i.v. Injection of B16-BL6

Group	WBC(×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
	C57BL/6
Normal	5.7±0.04 <sup>AB</sup>
Control	10.2±0.10
HDBT	8.4±0.20 <sup>***</sup>

Table 15. Effect of HDBT on Platelet after i.v. Injection of B16-BL6

Group	Platelet(×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
	C57BL/6
Normal	879.4±25.9
Control	654.2±23.2
HDBT	689.5±34.5

IV. 考 察

癌에 關한 最初의 記錄은 B.C 2500년경 Ramayana 힌두 서사시에서 찾아 볼 수 있고, 희랍의 醫聖 Hippocrates가 新 생물을 위치에 따라 表面的인 것 과 深層의인 것으로 구분한 이래 지금까지 人類의 最大의 難治病으로 認識되고 있다<sup>18)</sup>.

韓醫學에서 腫瘍은 《靈樞·五變》 《靈樞·上膈》<sup>19)</sup>의 '積聚', 《靈樞·水脹》<sup>19)</sup>의 '鼓脹' '腸覃', '石瘕', 《靈樞·邪氣臟腑病形》 《靈樞·經筋》 《靈樞·本藏》<sup>19)</sup>의 '息賁', 《靈樞·刺節眞邪》<sup>19)</sup>의 '昔瘤', 《靈樞·九鍼論》<sup>19)</sup>의 '瘤病', 《素問·腹中論》 《素問·奇病論》<sup>20)</sup>의 '伏梁', 《素問·五藏生成論》<sup>20)</sup>의 '厥疝', 《素問·骨空論》<sup>20)</sup>의 '瘕聚'와 이 후의 여러 韓醫書에서 나타나는 癥瘕, 癥疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 失榮, 乳巖, 石疽, 石癰 等<sup>21-24)</sup>이 症狀 및 病理 側面에서 癌과 가장 類似한 病證으로 認識되고 있다.

癌의 治療法으로 手術, 抗癌劑, 放射線 療法이 最近 30~40年 동안 이용되고 있으나<sup>25)</sup>, 여러 가지 副作用을 惹起<sup>26)</sup>한다는 사실과 이제는 非通常의인 療法들 즉 免疫療法, 食餌療法, 天然藥物과 같은 쪽의 治療方法에 귀 기울려야 한다는 理論이 점점

說得力을 얻어가고 있다.

韓醫學에서는 癌의 治療法으로 扶正과 祛邪의 두 法則으로 개괄할 수 있는데<sup>21-24</sup>, 그 중에서 宿主의 抗癌能力을 強化시키는 扶正培本法과 祛邪하되 人體의 正氣를 損傷시키지 않는 扶正祛邪法이 가장 效果的인 方法인 것으로 報告되고 있다<sup>21-25</sup>.

祛邪法中 活血祛瘀法은 癌 등의 難治病에 瘀血病症이 好發한다는 점에서 많은 研究가 이루어지고 있다<sup>27-28</sup>.

活血化瘀劑의 抗腫瘍 效果에 對한 研究로 郁 등<sup>29</sup>은 “活血化瘀法은 血脈을 通하게 하고 血液循環을 促進하며 血管을 擴張시켜 微循環을 改善시킴으로써 結締組織의 增殖을 抑制하여 腫瘍의 成長 및 轉移를 抑制함과 아울러 腫瘍을 縮小시키는 作用을 한다” 는 것을 實驗的으로 立證하였다. 이와 같은 結果는 血小板이 脈管系의 癌細胞의 安定化를 돕고, 癌細胞의 增殖을 促進하며, 癌細胞의 內皮細胞收縮을 促進하여 癌細胞의 溢出을 助長한다는 報告와 癌患者를 對象으로 血液學的 檢査를 通하여 正常人과 對比해 본 結果, 全血粘度, 赤血球電泳時間, fibrinogen 및 赤血球 沈降率 등이 높으며, 癌患者에서 血小板過少症이 자주 發生한다는 臨床 報告 등과도 相互 關聯性이 있다.

이에 著者는 補氣와 補血을 함께 兼하여 氣血虛損의 諸症狀을 治療하는 十全大補湯<sup>30</sup>을 基本方으로 하고, 消化 障礙를 誘發할 수 있는 熟地黃, 川芎, 肉桂를 除去하고, 臨床에서 癌 患者의 大部分이 氣虛證과 더불어, 陰虛로 인한 虛熱이 發生하는 경우가 다반사고, 化學療法과 放射線療法을 받은 患者 역시 實熱과 더불어 虛熱이 發生하는 경우가 많은 것을 고려하여 補陰과 補氣 作用을 兼한 紅蔘이 人蔘보다 效果的인 것으로 思料되어, 人蔘을 紅蔘으로 代替하였으며, 여기에 抗癌效果가 이미 立證<sup>31-34</sup>된 牡丹皮, 鬱金, 赤芍藥, 丹蔘 등을 添加하였다.

먼저 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 정상 lung fibroblast cell에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 100, 500( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 濃度에서 모두 90% 以上の 細胞生存率을 나타내어 細胞毒性은 나타나지 않았다(Fig. 1).

이 같은 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.

A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-BL6, P388 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 1mg/ml 濃度에서는 對照群에 비하여 각각 A549, SK-OV-3, B16-BL6, MCF-7 癌柱에서만 對照群에 비하여 30%의 細胞毒性을 나타내었다(Fig. 2, 3, 5). 이 같은 結果는 既存의 抗癌 處方의 抗癌 活性和 類似한 結果로 特異할만한 細胞毒性은 나타나지 않았다.

A549, B16-BL6 細胞의 附着阻止 實驗에서는 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, 1mg/ml의 濃度에서는 각각 30%, 40% 以上の 附着阻止 效果를 나타내었다(Fig. 9, 10).

DNA topoisomerase I 活性 抑制 실험에서는 전기 영동을 실시하여 寫眞 撮影한 結果, DNA만을 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 HDBT 投與群은 IC<sub>50</sub>이 200-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다(Table 1). 이 역시 既存의 實驗 結果와 類似하였다.

S-180이 移植된 생쥐의 生存比 실험에서는 S-180이 移植된 생쥐에 10일간 HDBT를 經口 投與한 後 관찰하였던 바, 腹水癌으로 인하여 對照群에서는 癌柱 移植 後 10일에 급격히 體重이 增加하여 14일에 모두 죽었고, 平均 生存日數에서 對照群의 MST는 13.71日, HDBT 投與群은 18.80日로 나타나, T/C%는 137.1%로 나타났다(Table 2).

CAM assay는 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 있는데, 本 實驗에서는 實驗에 使用된 受精卵 7個中 2個에서 血管

形成 抑制效果가 나타나 28%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Fig. 11)

B16-BL6에 의한 pulmonary colonization 抑制實驗에서는 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하였는데, 對照群에서는 對照群에 비하여 減少하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 3).

血液學的 變化에서 白血球數는 對照群에 비하여 有意性있는 減少를 나타내었고, 血小板數는 對照群에 비하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 4, 5).

以上的 結果를 綜合하여 보면, 活血大補湯은 同一한 方法으로 實施한것이 發表한 淸熱大補湯의 抗腫瘍 結果와 比較하여 볼 때 全般的으로 약한 抗腫瘍 效果를 보였다. 또한 加味된 活血化癆 藥物로 인해 抗轉移 效果를 發揮할 것으로 豫想되었으나 이 역시 淸熱大補湯에 비하여 優秀하지 못함으로써, 향 후 淸熱藥物과의 加味를 통한 相乘 效果에 대한 比較 研究가 必要할 것으로 보인다. 아울러 癌의 機轉이 多樣하다는 점에서 多角의인 研究 方法의 接近이 必要할 것으로 思料된다.

#### IV. 結 論

活血大補湯의 抗腫瘍效果를 探索하기 위하여 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, 附着沮止作用, 血管形成 沮害作用 및 組織·血液學的 變化 등을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 正常 lung fibroblast cell에 대한 細胞毒性에서는 1, 10, 100, 500 $\mu$ g/ml의 각 濃度에서 모두 90% 以上の 細胞 生存率을 나타내어 細胞毒性은 나타나지 않았다.

2. 數種 癌柱에 대한 細胞毒性에서는 A549, SK-OV-3, B16-BL6, HT1080 癌柱에서만 高濃度인 1mg/ml 濃度에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었다.

3. A549, B16-BL6 癌柱에 대한 細胞附着 沮止 效果는 高濃度인 1mg/ml 濃度에서 각각 30, 40% 以上の 附着沮止 效果를 나타냈다.

4. DNA topoisomerase I assay에서는 200-300 $\mu$ g/ml의 IC<sub>50</sub>을 나타내었다.

5. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에서는 137.1%의 T/C%를 나타내었다.

6. CAM assay에서는 28%의 血管形成 抑制作用을 보였다.

7. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 비하여 colony 形成에 있어 감소하였으나 有意性은 나타나지 않았다.

8. 血液學的 變化에서 白血球數는 對照群에 비하여 有意性있는 減少를 나타내었고, 血小板數는 對照群에 비하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다.

以上的 結果를 보아 活血大補湯은 向後 臨床에서 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. 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 分割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. 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.
5. 허 부 : 大戟 分割藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果 및 免疫反應에 미치는 影響, 대전대학교 대학원, 석사학위논문, 1998.
6. 조한진, 김성훈 : 桃紅四物湯加減方의 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.
7. 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.

8. 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.
9. 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과 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.
10. 閔漢奎 外 : 清熱大補湯의 免疫調節作用을 통한 抗腫瘍效果, 東醫病理學會誌, 14(2), pp.199-214, 2000.
11. 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.
12. Spjut. R. W. and Perdue. R. E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of anti-tumor activity, *Cancer Treat. Rep.*, 60, p.979, 1966.
13. 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.
14. 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
15. National Cancer Institute U.S.A. ; *Cell culture technical procedures*, 1972.
16. 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.
17. 金井泉 外 : 臨床檢査法提要, 서울, 高文社, p.242, 249, 1984.
18. 新太陽社 編輯局 百科辭典部 : 原色最新醫療 百科辭典, 서울, 新太陽社 (卷12), p.155, 171, pp.157-160, 163-164, (卷16) pp.86-87, 1991.
19. 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.
20. 王洪圖 : 黃帝內經素問, 春秋出版社, p.71, 237, 271, 1988.
21. 李仲守 : 扶正則積自除, 新中醫, 第10期, p.39, 1984.
22. 趙健斌 : 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗, 陝西醫學, 第14期, pp.451-453, 1993.
23. 瀋明繼 外 : 胃癌에 對한 中西醫結合治療 規則研究, 한글판中醫雜誌, No.3, pp.52-55, 1994.
24. 김상현 : 腫瘍의 治法에 關한 實驗的 研究, 경산대학교대학원, 박사학위논문, 1997.
25. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울대학교 출판부, p. 1-5, 1992.
26. 孫泰重 編 : 病理學概論, 서울, 高文社, p.227, 1979.
27. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
28. 邢雪梅 : 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況, 한글판 中醫雜誌, No.3, pp. 85-90, 1994.
29. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 科學出版社, pp.20-22, 1991.
30. 張寧根 外 : 少陰人十全大補湯과 局方十全大補湯이 陽虛病症에 미치는 影響, 四象醫學會誌, Vol.7, No.1, p.281, 1995.
31. 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.
32. 田炳旭 : 癌에 對한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 關한 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 제1권 제1호, p.29, 34, 43, 44, 47, 1995.
33. 金有景 : 抗癌食藥本草, 中國食品出版社, 1989.
34. 王冰 : 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.1-2, 6, 20, 22, 24, 28, 78, 1990.