

鴨蛋子の 抗癌活性 및 抗轉移 效果에 關한 研究

李東勳 · 金聖勳* · 金東熙

Abstract

Study on Antitumor Activity and Antimetastatic Effects of Bruceae Fructus(BF)

Lee Dong-hoon · Kim Sung-hoon* · Kim Dong-hee

Dept. of Oriental Medicine Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

* Dept. of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Bruceae Fructus(BF), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows :

1. In cytotoxicity against A549, SK-MEL-2, MCF-7 and XF498 cell concentration inhibiting cell growth up to below 50% of control was recognized at 25 μ g/ml of BF. Also BF inhibited cell growth up to below 50% of control against HCT15 cell at 12.5 μ g/ml, so it showed stronger cytotoxicity against HCT15 cell than another cancer cell.
2. In Inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase- I, the IC₅₀ was shown 10-50 μ g/ml of BF.
3. The T/C% was 143.4 in BF treated group in S-180 bearing ICR mice.
4. The concentration inhibiting adhesion of A549 and SK-OV-3 to complex extracellular matrix up to below 30% of control was recognized at 1 μ g/ml of BF.
5. In pumonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in BF treated group as compared with control group.

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

I. 緒 論

1970年代 以後 癌의 정복을 위해 韓醫學系에서는

既存의 多様な 實驗 法에서 韓藥과 韓方 處方을 試料로 抗癌 活性和 抗轉移 作用 등에 대한 多様な 研究¹⁻⁸⁾를 進行하여 왔다.

또한 이와 더불어 既存의 抗癌劑와의 相乘作用 및 副作用 抑制 등의 研究⁹⁻¹²⁾를 終 了 遂行하여 왔으며, 大學附屬病院과 特性화된 韓方病院 등에

大田大學校 韓醫科大學 病理學敎室
* 慶熙大學校 東西醫學大學院

서 獨創的인 治療 方法을 통하여 많은 治療 效果도 報告된 바가 있다.

鴨蛋子는 性이 苦寒하며, 清熱, 解毒, 殺蟲, 截癰, 消腫하는 效能이 있어 熱毒血痢, 冷痢, 休息痢, 瘡疾, 痔瘡, 癰腫, 陰痒, 白帶 등을 治療한다^{13,14)}.

鴨蛋子를 비롯한 清熱解毒藥物이 單獨 또는 複合方에서 竝用되었을때, 보다 有意性인 抗癌 作用을 發揮한다는 既存의 많은 報告¹⁵⁻¹⁷⁾들이 있는데, 이들의 主要 機轉은 주로 癌細胞의 DNA, RNA 등의 合成 抑制를 통한 細胞分裂 抑制 作用, 直接的인 殺害作用 및 免疫機能 增強을 통한 抗癌 作用 등으로 要約된다.

따라서 本 實驗은 有意性인 新規 抗癌劑를 探索하기 위하여 現在 臨床에서 주로 腸癌, 宮頸癌, 肝癌, 胃癌, 食管癌, 賁門癌, 皮膚癌 등에 應用되는 清熱解毒藥物인 鴨蛋子의 抗腫瘍效果를 檢索하고자 하였다.

먼저 1차적으로 基本 研究 方法으로 6種 癌柱에 對한 細胞毒性, A549, SK-OV-3 癌柱의 附着 阻止作用, DNA topoisomerase-I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率 및 肺癌柱 形成 抑制作用(pulmonary colonization assay) 등을 實施하였다. 上記한 方法에서 有意性인 結果가 도출되면 2단계로 物質分劃을 통한 多樣한 研究을 實施하고자 한다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A), C57BL/6 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗 當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.) 와 물을 충분히 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 材

本 實驗에 使用한 鴨蛋子(Bruceae Fructus : BF)

는 中國 上海中醫藥 學院 藥材部에서 購入하여 使用하였다

□ Prescription of Bruceae Fructus(BF)

韓藥名	生 藥 名	分量(g)
鴨蛋子	<i>Bruceae Fructus</i>	200

3) 試藥 및 機器

(1) 試 藥

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Hank's balanced salt solution(HBSS), glycerol, bromophenol blue, tris base, boric acid, EDTA, agaroses, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, anti-biotic(penicilin 10⁴ U/ml, streptomycine 10 mg/ml, amphotericin B 25 μg/ml), sodium hydroxide, formaldehyde, 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을 購入하였으며, 기타 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

(2) 機 器

機器는 CO₂ incubator(Forma scientific model: 3546 S/N. U.S.A), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001. Korea), centrifuge(Beckman Co., GS-6R. U.S.A), inverted microscope (Nikon Co., Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon, Japan), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), titer plate shaker(Labline Inst, U.S.A), camera (601S, Nikon, Japan), vaccum pump(Büchi Vac V-500, Switzerland), freeze dryer(Eyela, FDU-540, Japan), Mupid-21, U.S.A), pipet aid(Falcon, U.S.A), shaking incubator(Intron, korea), vortex mix

(KMC-1300V), pH meter(Corning, U.S.A), deep freezer(Sanyo, MDF-U50V, Japan) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

上記한 鴨蛋子(BF) 200g 分量을 各各 大雄藥湯器에 넣고 蒸溜水 1,500ml와 함께 넣은 다음 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 -70℃ 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 15.2g의 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시에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter(0.22 μ m, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 癌柱 培養

細胞 毒性 測定에서는 女性癌柱인 SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌柱, MCF-7(ATCC CCL HTB-22) 乳房癌柱 등을 使用하였고, 一般 癌柱로는 A549(ATCC CCL185) 肺癌柱, SK-MEL-2(ATCC HTB-68) 皮膚癌柱, XF498 腦癌柱, HCT-15(ATCC CCL225) 大腸癌柱 등을 使用하였다.

이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640培地에 56℃ 수조에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10단units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) 數種 癌柱에 對한 細胞 毒性 測定

女性癌柱 SK-OV-3, MCF-7, 一般 癌柱 A549 SK-MEL-2, XF498 및 HCT-15 癌柱에 對한 細胞 毒性 測定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) assay¹⁸⁾을 使用하였다. 계대중인 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 2×10⁴개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24시간 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT-15 細胞는 25, 12.5, 6.25 μ g/ml로, MCF-7는 100, 10, 1, 0.1 μ g/ml로 稀釋된 試料 溶液들을 각각의 細胞가 들어있는 well에 각각 200 μ l씩 넣어주어 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 가하기 전에 0.22 μ 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 μ l씩 가하여 4℃에서 1시간 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 고정시켰다. 細胞의 고정이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA溶液을 완전히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 완전히 乾燥된 plate는 well당 200 μ l의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 가하여 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, 對照群의 O.D.(optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 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(T_z)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48시간동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃度의 藥物과 함께 48시간 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 정도를 測定하였다. 즉, T_z ≥ T 인 경우에는 (T-T_z)/(C-T_z)×100의 數式으로 計算하였고, T_z < T 인 경우에는 (T-T_z)/T_z×100의 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

(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(μg/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. 實驗群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 = 實驗群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)

各 濃度의 Y(%)값과 Log₁₀ dose를 圖式化하고 다음과 같은 식에 의하여 回歸線을 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
 [≤ number of dose level & > 2]
 X_i = log dose i
 Y_i = growth ratio calculated dose i

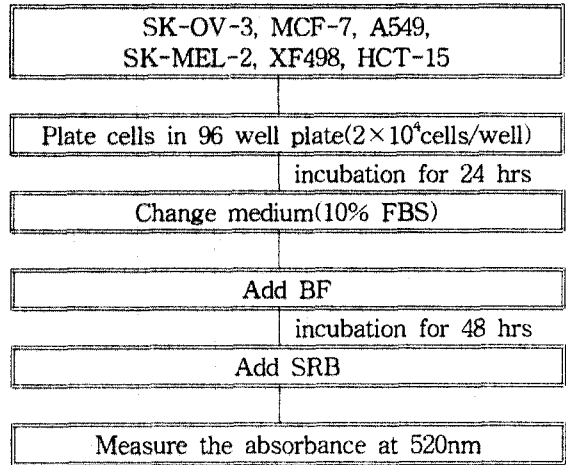
여기서 구한 기울기와 切片을 利用하여 回歸線 Y = A + BX 를 얻었으며 이 回歸線의 기울기와 切片으로부터 ED₅₀값을 計算하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20μg/ml 以下, 合成物인 경우 4μg/ml 以下일 경우 抗癌 作用이 있다고 규정¹⁹⁾하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of BF on SK-OV-3, MCF-7, A549, SK-MEL-2, XF498 and HCT-15 cells

4) DNA topoisomerase- I assay

實驗에 使用된 DNA topoisomerase- I는 Calf thymus에서 由來된 것이며, pBR 322 DNA는 E.coli의 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²⁰⁾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 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℃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 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 使用하여 活性을 測定했다. 이 때 topo- I의 1 unit는 37℃에서 30분간 반응시킬 때 super coiled pBR 322 DNA를 100% relaxation

을 觸媒하는 酵素의 양을 意味한다.

5) 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 가해 1,500 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 浮遊液을 만들고 이 浮遊液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 BF는 18.7mg/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²¹⁾에 따라 計算하였다.

6) A549, SK-OV-3 細胞의 附着 沮止作用 測定

A549, SK-OV-3 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 10% FBS로 調節한 배지에 懸濁시켜 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 가한 (5×10^4 cells/well) 후 100, 10, $1\mu\text{g/ml}$ 濃度의 試料를 녹인 배지 $100\mu\text{l}$ 를 가하고 5% CO_2 , 37°C 에서 培養하였다. 4시간 후 培養液을 除去시키고 96well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24시간 培養시킨 후 SRB法에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察한다.

7) B16-F10에 의한 pulmonary colonization 測定²²⁾

In vitro에서 계대배양한 B16-F10(ATCC CRC 6322) 肺癌細胞를 實驗에 사용하였다. 계대중인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여, trypsin-EDTA溶液으로 부착면으로부터 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 0.2ml을 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-F10

癌細胞를 移植한 後 24시간 부터 1일 1회씩 10mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4°C 에서 보관하면서, 10일간 매일 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. 癌移植 14일 후에 頸椎脫骨로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony數를 測定하였다.

III. 成績 및 考察

1. 數種 癌柱에 對한 細胞毒性

먼저 肺癌柱인 A549 癌柱에 對한 細胞毒性은 모두 濃度 依存的으로 나타났으며, $25.0\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서는 50% 가까운 강한 細胞毒性이 나타났다 (Table 1). 이같은 結果는 B16-F10에 의한 pulmonary colonization 測定에서 나타난 有意性 있는 結果와 附合되는 數值로, 本 試料가 肺癌에 效果의임을 알 수 있다. 또한 既存의 結果²³⁻²⁵⁾와 比較하여 볼 때 이는 매우 높은 細胞毒性으로, 本 試料가 本草學的으로 未有毒하여, 自體 毒性에 의한 것인지를 검토할 필요가 있으나 生存率과 肺癌柱 形成 抑制에 대한 動物 實驗에서 나타난 結果와 더불어 檢討하여 보면 매우 有意性 있는 結果로 주목할 만하다.

SK-MEL-2, MCF-7과 XF498 癌柱에 대한 細胞毒性도 A549 癌柱와 類似하게 $25.0\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서는 50% 가까운 강한 細胞毒性이 나타내었다 (Table 3, 4, 6).

또한 HCT15 癌柱에 대하여서는 $12.5\mu\text{g/ml}$ 濃度부터 細胞毒性이 나타나 實驗 癌柱中 가장 效果의으로 나타났고 (Table 5), SK-OV-3 癌柱에 대하여서는 모든 濃度에서 有意性 있는 結果가 나타나지 않았다 (Table 2).

비록 SK-OV-3 癌柱에서는 細胞毒性이 나타나지 않았지만, 全般的으로 $25.0\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 모든 實驗 癌柱에 대해 有意性 있는 結果가 도출되어 本 試料의 細胞毒性이 인정되었다. 아울러 既存의 抗癌 處方 및 單一 藥材에 대한 抗癌活性 評價 結果와 比較하여 볼 때, 複合 物質로서는 效果의인 細胞毒性이 있음을 알 수 있다.

Table 1. Cytotoxic Effect of BF on A549 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	94.50
12.5	75.71
25.0	50.35

☐ : 30% 以上 細胞毒性을 나타낸 濃度

Table 2. Cytotoxic Effect of BF on SK-OV-3 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	91.89
12.5	100.80
25.0	93.73

Table 3. Cytotoxic Effect of BF on SK-MEL-2 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	86.87
12.5	81.33
25.0	45.78

Table 4. Cytotoxic Effect of BF on XF498 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	97.22
12.5	80.79
25.0	48.62

Table 5. Cytotoxic Effect of BF on HCT15 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	108.18
12.5	57.14
25.0	15.90

Table 6. Cytotoxic Effect of BF on MCF-7 Cells

Conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100
6.25	80.12
12.5	72.64
25	24.29

2. DNA topoisomerase-I 活性 抑制 效果

Topoisomerase는 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 對한 影響을 미치는 酵素²⁶⁾이다. 이들의 抑制製는 抗生, 抗癌劑 開發의 目標²⁷⁾가 됨으로써 最近 抗癌活性 物質을 檢索하는데 있어, 評價 實驗으로 應用되고 있다.

本 實驗에서는 전기영동을 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 relexd form으로 轉換되었다.

이에 비해 BF 投與群은 10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度에서 50% 이상 relexd form으로의 轉換을 막았다 (Table 7). 이 같은 結果 역시 既存의 結果²³⁻²⁵⁾에 비해 有意的인 結果로, 向後 物質 分割을 통한 보다 具體的인 研究가 이루어질 수 있을 것으로 思料된다.

Table 7. Inhibitory Effect of BF on Activity of DNA Topo-I

Group	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
BF	10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3. S-180이 移植된 생쥐의 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 15일에 모두 죽었고, 對照群의 MST는 14.50일, BF 投與群은 20.80일로, T/C(%)는 143.4%로 나타났다(Table 8). 이는 140%가 넘는 生存率로 再實驗이 可能한 動物 實驗 結果로, 毒性의 問題에 있어 問題가 되지 않는 것으로 評

價된다. 보다 구체적인 毒性 評價가 항 후 이루어져야 하겠지만, 本 實驗 結果만을 기준으로 볼 때, 비록 本 試料가 微毒하지만 一定量以下인 경우 藥物 自體에 의한 毒性 發顯이 나타나지 않음을 알 수 있다.

Table 8. Effect of BF on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	MST (day)	T/C (%)
Control	10	14.50	100
BF	10	20.80	143.4

MST of sample

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

4. A549, SK-OV-3 細胞의 附着阻止 效果

轉移는 惡性 腫瘍의 特徵으로, 癌患者의 대부분이 轉移에 의해 死亡하게 되는데, 一般의 轉移 과정은 크게 癌細胞가 周邊組織으로 浸潤하는 過程과 이에 隨伴된 癌細胞의 移動過程, 이러한 移動過程의 通路로 使用되는 新生血管이 核心構成 要素가 된다²⁸⁻³⁰⁾.

本 實驗에서의 抗轉移 實驗으로 먼저 癌의 轉移에 있어 첫번째로 나타나는 細胞外基質의 附着 및 通過 過程에 대한 本 試料의 影響을 評價하기 위하여 複合基質에서의 附着阻止 效果에 대한 實驗을 實施하였다.

附着 特徵을 지닌 A549, SK-OV-3 細胞를 利用하여 抗轉移能을 評價하였는데, 모두 1 μ g/ml 이상의 濃度에서 對照群에 비하여 30% 이상의 附着阻止 效果를 나타냄으로써(Table 9, 10), 複合 物質로서는 매우 낮은 濃度에서 附着阻止 效果를 나타내었다. 이는 本 試料가 癌柱의 細胞外基質의 附着 및 通過 過程에서 效果의으로 附着을 阻止하는 것으로 評價되어, 이와 관련된 메카니즘에 대하여서는 항 후 單一 物質의 抽出을 통한 持續的인 檢索이 必要할 것으로 보인다.

Table 9. Inhibitory Effect of BF on Cell Adhesion of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.(μ g/ml)	Percent of control	
	A549	
Control	100 \pm 0.02	
1	65.47 \pm 3.14	
10	48.15 \pm 2.18	
100	25.4 \pm 2.89	

☐ : 30% 이상 附着阻止 效果를 나타낸 濃度

Table 10. Inhibitory Effect of BF on Cell Adhesion of SK-OV-3 Cells to Complex Extracellular Matrix

Conc.(μ g/ml)	Percent of control	
	SK-OV-3	
Control	100 \pm 0.02	
1	88.8 \pm 0.03	
10	16.2 \pm 0.04	
100	11.3 \pm 0.02	

5. B16-F10에 의한 pulmonary colonization 抑制 效果

Pulmonary colonization assay에서는 對照群은 55.42 \pm 3.26개의 colony 數가 觀察된 반면, BF 投與群은 29.66 \pm 5.84개로 나타나 有意性있는 肺癌轉移의 抑制效果를 나타내었다(Table 11, Fig. 1).

Table 11. Inhibitory Effect of BF on Lung in C57BL/6 Injected i.v. with B16-F10 Cell

Group	No. of animals	NO. of colonies
Control	10	55.42 \pm 3.26
BF	10	29.66 \pm 5.84**

Control : Saline treated group

BF : BF(10mg/20g/day) treated group

* : Statistically significant value compared with control data

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



Control



BF

Fig 1. Inhibitory effect of BF of lung colonies in C57BL/6 injected i.v. with B16-F10 cell.

Control : Saline treated group

BF : BF(10mg/20g/day) treated group

IV. 結 論

鴨蛋子의 抗腫瘍效果를 探索하기 위하여 6種 癌柱에 對한 細胞毒性, A549, SK-OV-3 癌柱의 附着 阻止作用, DNA topoisomerase-I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率 및 肺癌柱 形成 抑制作用(pulmonary colonization assay) 등을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. A549, SK-MEL-2, MCF-7, XF498 癌柱에 대한 細胞毒性은 25.0 μ g/ml의 濃度에서는 50% 가 가까운 강한 細胞毒性이 나타났고, 특히 HCT15 癌柱에 대하여서는 가장 강한 細胞毒性을 나타내었다.

2. DNA topoisomerase-I assay에서는 10-50 μ g/ml의 IC₅₀을 나타내었다
3. S-180을 利用한 抗癌 動物實驗에서는 143.4%의 T/C%를 나타내었다.
4. A549, SK-OV-3 癌柱에 대한 細胞附着 阻止效果는 1 μ g/ml 이상의 濃度에서 對照群에 비하여 30% 이상의 附着 阻止效果를 나타냈다.
5. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 비하여 colony 形成에 있어 有意性있는 減少를 나타내었다.

以上の 結果를 綜合하여 보면, 鴨蛋子 抽出液은 各種 癌細胞에 對한 細胞毒性에서 강한 細胞毒性和 더불어 細胞外基質의 附着 및 通過 過程에서 效果的인 作用으로 抗癌活性이 認定된다. 따라서 향 후 多樣한 物質 分割을 통하여 有效性있는 物質 探索과 더불어, 이를 試料로 分子生物學的 水準에서 깊이 있는 研究가 이루어질 수 있을 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 나영철 : 六味地黃湯加味方의 抗癌活性에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
2. 박상채 : 扶正解毒湯의 抗癌活性과 免疫調節作用에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
3. 이원주 : 羌活勝濕湯加減方이 抗癌活性과 免疫調節作用에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2000.
4. 김성동 : 加味犀黃丸의 抗轉移와 免疫增進에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
5. 이승호 : 白仙抗癌湯의 抗轉移 및 免疫增進에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
6. 임의수 : 상황머슴의 抗轉移와 免疫增進에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
7. 정국찬 : 丹蔘의 抗癌성에 관한 研究, 高麗大學校 大學院, 2000.
8. 李善熙 : 抗癌 및 免疫效果에 覆盆子藥鉞이 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2000.
9. 곽계호 : 少陰人補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯 加味方의 抗癌效果 및 cyclophosphamide에 의한

- 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 博士學位論文, 1996.
10. 이능기 : 數種 韓藥材가 생쥐의 骨髓 및 脾臟 細胞의 造血促進과 放射線 防禦에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, 19(2), 157-173, 1996.
11. 金泰運 : 消積白朮散이 Bleomycin의 副作用減少와 抗癌效果에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol. 5 No. 1, pp.77-101, 1999.
12. 이용현 : 抗癌丹을 投與한 大腸癌 患者 87例에 대한 臨床報告, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol. 6 No. 1, pp.165-180, 2000.
13. 中華本草編委會 : 中華本草(5), 上海科學技術出版社, pp.7-12(5), 1999.
14. 全國韓醫科大學 本草學教授 : 本草學, 서울, 永林社, pp.221-222, 1991.
15. 최우진 : 冬蟲夏草의 抗轉移와 免疫增進에 관한 研究, 大田大學校 大學院, 2000.
16. 金性勳 : 紅蔘大補湯加減方의 抗癌活性 및 抗轉移 效果에 관한 研究, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
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. Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, Giaccone G, Peters G.J. : The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening., *Crit Rev Oncol Hematol.* Nov;36: 141-57. Review, 2000.
19. National Cancer Institute U.S.A. ; Cell culture technical procedures, 1972.
20. 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.
21. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
22. 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.
23. 裴文庸 : 活血大補湯의 抗癌活性, 抗轉移 및 免疫調節 作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
24. 金鎮雄 : 清金湯의 抗腫瘍 및 免疫調節作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
25. 李泰亨 : 加味紅蔘大補湯의 抗癌活性, 抗轉移 및 免疫調節 作用에 關한 研究, 大田大學校 大學院 韓醫學科 博士學位論文, 2002.
26. Collins I, Weber A, Levens D. : Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol Cell Biol.* 21(24):8437-51, 2001.
27. Topcu Z. : DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J Clin Pharm Ther.* 26(6): 405-16, 2001.
28. 大韓病理學會 大邱·慶北支部學會 : 간추린 病理學, 정문각, p.138, 139, 2000.
29. Zogakis TG, Libutti SK. : General aspects of anti-angiogenesis and cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 1(2):253-75, 2001.
30. Zhang XM, Xu Q. : Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes. *Melanoma Res.* 11(6):559-567, 2001.