

익기양음해독탕의 항암 및 항전이효과에 관한 연구

윤성우 · 김진성 · 윤상협 · 류봉하 · 류기원

경희대학교 한의과대학 비계내과교실*

Effect of Ikiyangeumhaedoc-tang on the tumor and metastasis

Seoung-Woo Yoon, Jin-Sung Kim, Sang-Hyub Yoon, Bong-Ha Ryu, Ki-Won Ryu

Dept. of the 3rd Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objective : *Ikiyangeumhaedoc-tang*(IYHT) has an effect of nourishing Yin(陰) and Jin(津), and has been used to cancer patient effectively. In order to prove the anticancer's and antimetastatic effect of IYHT experimentally, studies were done.

Methods : We evaluated the cytotoxic activity on HT-1080 cells as well as inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase α , cell adhesion, cell invasion and proliferation of HUVEC cells induced by bFGF and measured the expression of mRNA(uPA, MMP2, TIMP2), p-ERK protein, recovery effect of gap junctional intercellular communication by H_2O_2 and survival time of ICR mice bearing sacoma-180.

Results : IYHT showed the inhibitory effect on DNA topoisomerase α in the concentration of $100\mu g/ml$, $500\mu g/ml$ and the dosage-dependent inhibitory effect on the adhesion of HT-1080. The concentration of $1mg/ml$ of IYHT inhibited 15% of adhesion compared with control. IYHT decreased the expression of uPA, but not in MMP2, TIMP2 by RT-PCR and inhibited the expression of p-ERK effectively in the concentration of more than $500\mu g/ml$. IYHT recovered the inhibited gap junctional intercellular communication by H_2O_2 to the level of 60% of normal control in the concentration of $400\mu g/ml$ but, did not extended the mean survival time of sarcoma 180-bearing mouse.

Conclusions : It was concluded that IYHT could be applied usefully for prevention and treatment of human cancer. And also experimental study for the evaluation of molecular biological study and

antimetastatic research would be recommended in the near future.

Key word : tumor, metastasis, Ikiyangeumhaedoc-tang

I. 緒 論

암은 단일 세포의 유전적 변화에서 기인하며 자율적 성장, 비정상적인 세포분화 및 전이의 특성을 가진 난치병 중의 하나로 많은 연구와 막대한 투자에도 불구하고 세계적으로 발생률이 매년 증가 추세에 있다. 우리나라의 경우도 癌으로 인한 사망률은 해마다 높아져 2000년에는 59,020명이 사망하여 사망원인 중 1위로 보고되었다¹⁾.

암 치료를 위한 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 및 유전자요법 등의 부작용 때문에 최근에는 합성물질이 아닌 한약제로부터 항암물질을 추출하여 부작용을 감소시키면서도 암세포에 대해서는 특이적 독성효과와 전이억제효과를 나타내는 약제의 개발에 중점을 두고 연구가 활발히 진행되고 있다^{2,3)}.

암의 한의학적 치료법으로는 益氣補脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 扶正固本法과 行氣理氣, 軟堅散結, 活血化癥, 通絡解毒, 疎理濕熱 등의 祛邪法 및 扶正固本法과 祛邪法을 병용하는 扶正祛邪法으로 구분된다⁴⁾.

종양이 이미 전이 또는 확산된 중·말기 암 환자의 경우 종양으로 말미암아 소모증상과 영양섭취불량이 생기며 방사선 혹 화학요법의 부작용으로 인한 津液虧損으로 체액내 평형실조가 생기면 종양은 점점 악화되고 전이는 더욱 광범위하게 되는데 여기에는 滋陰生津法을 기본으로 사용한다. 滋陰生津法을 기본으로 하여 항암효과를 보고한 처방으로는 四物湯, 六味地黃湯, 加味金匱腎氣丸 등이 있었으나 滋陰生津을 기본으로 하면서 益氣清熱解毒시키는 약제

가 가미된 처방의 항암실험은 보고된 바가 없었다⁵⁾.

따라서, 이러한 효능을 가진 益氣養陰解毒湯의 항암실험은 새로운 항암치료법의 연구로서 가치 있는 것이며 또한, 임상에서 급성 비임파성 백혈병에 65.4%의 효과를 낸 것에 대한 실험적 뒷받침으로서도 가치 있는 것이라 하겠다⁶⁾.

이에 저자는 益氣養陰解毒湯의 항암효과를 실험적으로 입증하고자 HT-1080 암세포에 대한 세포독성실험, DNA topoisomerase I 활성억제실험, 세포부착저지실험, 침윤억제실험, HUVEC proliferation assay, RT-PCR 방법에 의한 uPA, MMP-2, TIMP-2의 발현양 측정, western blots assay, gap junction assay, 그리고 sarcoma-180 담암생쥐에 대한 생존비 측정을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동 물

동물은 雄性 4週齡의 ICR계 생쥐를 대한실험동물(주)에서 공급 받아 실험당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료Co.)와 물을 충분히 공급하면서, 2주일간 실험실환경(실온 22±2℃, 습도 40-60%, 12시간 간격의 명암 조절)에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Herbal name	Scientific name	Weight(g)	
黃芪	Astragali Radix	Astragalus membranaceus BUNGE	15.0
白花蛇舌草	Oldenlandiae Diffusae Herba	Oldenlandia diffusa ROXB.	15.0
半枝蓮	Protulacae Herba	Portulaca grandiflora HOOK	15.0
太子參	Caryophyllaceae	Pseudostellaria heterophylla	10.0
生地黃	Rehmanniae Radix	Rehmannia glutinosa LIBOSCH.	10.0
麥門冬	Lirioepis Tuber	Liriope platyphylla	10.0
旱蓮草	Ecliptae Herba	Eclipta prostrata L.	9.0
黃精	Polygonai Rhizoma	Polygonatum stenophyllum MAX.	7.5
天門冬	Asparagi Radix	Asparagus cochinchinensis MERR.	7.5
女貞子	Lugustri Lucidi Fructus	Ligustrum lucidum AIT.	7.5
小薊	Cephalonoplosi Herba	Cephalonoplos segetum BGE. KITAM.	7.5
白朮	Atractylodis Rhizoma	Atratyloides macrocephala KOIZ.	6.0
茯苓	Hoelen	Poria cocos WOLF	5.0
甘草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhia uralensis FISCH.	2.5
Total amount			127.5

2) 약 재

이 실험에 사용한 益氣養陰解毒湯은 『中西醫結合防治腫瘤』⁶⁾에 수록된 용량에 준하였다. 각 약재는 시내 건재 약국에서 외부형태를 비교 검사하여 확인한 후 실험에 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

益氣養陰解毒湯 5첩 분량을 증류수 1,500ml 에 가하여 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary vaccum evaporator(Buchi 461)로 감압 농축하고 freeze dryer로 동결건조하여 분말 95.7g의 검액(수득율;15.01%)을 얻었다. 세포실험에서는 검액을 3차 증류수에 용해시킨 후 membrane filter(d;0.45 μm)로 여과 멸균하여 사용하였으며, 생명연장 동물실험에서는 생리식염수에 용해하여 실험하였다.

2) 시약 및 기기

시약은 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, agarose, sodium dodecyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma제품, matrigel은 Collaborative Research제품, hexan, ethyl acetate, butanol, ether는 Merck제품, sodium bicarbonate는 Gibco제품, acetic acid는 Glicial 제품을 사용하였다. 기기는 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(Buchi 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 μ m, Falcon) 등을 사용하였다.

3) 세포배양

실험에 사용한 암세포는 HT-1080 (human fibrosarcoma cell line; ATCC CCL-121)와 복수암주인 sarcoma-180으로 암주 배양에서 배양액은 3차 증류수에 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 powder(GIBCO) 한봉지(1 l 용, 10.4g), fetal bovine serum(FBS, Flow Laboratories inc., Mclean, VA) 100ml, NaHCO₃ 2g 및 penicilin 10만 단위, streptomycin 100mg을 넣어 용해시킨 후 0.1N 염산으로 pH를 7.2로 조절하여 전체를 1 l 가 되게 한 다음 세균 여과하여 사용하였다. 정상세포로는 WB-F344와 HUVEC을 사용했는데 간상피세포주인 WB-F344 (rat liver epithelial cell line)는 D-media(5% FBS)를 사용하여 배양액은 3차 증류수에 fisher's powder(GIBCO) 한봉지(1 l 용, 10.5g), horse serum(GIBCO) 100ml, NaHCO₃ 1.125g 및 penicillin 10만 단위, streptomycin 100mg으로 구성하였고, 냉장고 (4-6℃)에서 보관하여 사용하였으며, HUVEC(제대세포, human umbilical vein endothelial cell)은 0.1% gelatin coating한 T-75 flask에 M199 배지, ECGS(endothelial cell growth supplement), 5 unit/ml heparin, 1% antibiotics 등을 첨가하여 배

양하였다.

4) In vitro 세포독성실험⁷⁾

MTT 방법을 이용하여 검액의 세포 독성을 측정하였다. 종양세포로는 HT-1080 세포를 사용하였으며 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640으로 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양하여 사용하였다. In vitro 세포고사 효과를 조사하기 위하여 1×10⁴ cells과 검액을 농도별(0, 125, 250, 500, 1000 μ l/ml)로 섞어 well당 100 μ 씩 96 well plate에 분주하였다. 이를 24시간 배양한 후 배양액을 모두 버리고 MTT(5mg/ml) 10 μ 씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO(dimethyl sulfoxide) 100 μ 를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) In vitro DNA topoisomerase I assay⁸⁾

실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것이며, supercoiled pBR322 DNA는 E.coli C600의 것을 사용하였다. 또한 DNA topoisomerase I의 IC₅₀값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였으며 Topo-I의 활성은 Liu와 Miller⁹의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 35mM Tris-HCl(pH 8.0), 72mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM dithiothreitol(DTT), 5mM spermidine, 0.01% bovine serum albumin (BSA)을 함유하는 용액에 0.5 μ g pBR322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 20 μ 가 되게 한 것을 대조군으로 하고, 0.5 μ g pBR 322 DNA와 효소, 검액을 가하여 총 반응액을 20 μ 되게 한 것을 시험군으로 하여 이들을 37℃에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 반응종결액 5 μ

를 첨가하여 반응을 종결시키고 이를 TBE running buffer (50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide 용액에서 1시간동안 염색, 자외선 하에서 사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 활성을 측정하였다. 이때 Topo-I 1 unit는 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킬 때 supercoiled pBR322 DNA의 100% relaxation을 촉매하는 효소의 양을 의미한다.

6) In vitro 세포부착 저지실험¹⁰⁾

HT-1080 암주에 대하여 세포부착저지능을 실험하기 위하여 96 well immuno-plate에 0.1% gelatin을 100 μ 씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 coating하였다. 이를 PBS로 2회 세척한 후 검액(0, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml)과 5×10^4 암주를 섞어 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 30분마다 광학현미경하에서 세포부착 정도를 확인한 후 최적 세포 부착 시간대에서 각각의 plate를 PBS로 2회 세척하고 serum free 배지를 100 μ 씩 첨가한 후 MTT 방법으로 흡광도를 측정하였다.

7) In vitro Invasion assay¹¹⁾

HT-1080 암세포의 침윤 억제 효과를 측정하기 위하여 Boyden chamber를 이용하였다. 암세포의 크기에 따라서 8 μ m pore size를 가진 membrane을 20배 희석한 matrigel로 coating하여 12시간 이상 실온에서 건조하였다. 암세포의 chemotatic 물질로 0.1% BSA가 들어간 배지를 low chamber에 분주한 후 membrane과 upper chamber를 조합하고 실험하고자 하는 검액과 배양한 암세포 1×10^6 /ml를 30 μ 씩 섞어 50 μ 씩 분주하였다. 이를 배양기에서 6시간 이상 배양한 후 membrane만을 분리한 후 fixing, staining

solution하여 현미경하에서 migration한 세포만을 육안으로 측정하였다.

8) In vitro HUVEC proliferation assay¹²⁾

혈관내피세포인 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)의 세포증식 조절효과를 측정하기 위하여 0.1% gelatin을 100 μ 씩 96 well plate에 분주하고 2시간 이상 coating하였다. 이를 PBS로 2회 세척하고 HUVEC 배양배지인 M199 배지에 8×10^3 /well이 되도록 seeding하고 24시간 동안 배양한 후 이를 다시 PBS로 2회 세척하고 M199 배지에 5ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor)가 들어있는 배지에 검액을 농도별(0, 250, 500, 1000 μ g/ml)로 100 μ 씩 넣어주었다. 이를 72시간 동안 배양하고 PBS로 2회 세척한 후 새로운 M199 배지를 100 μ 씩 넣어 갈아준 후 MTT 방법으로 세포의 성장률을 측정하였다.

9) In vitro RNA 추출과 RT-PCR¹³⁾

HT-1080 암세포주를 1×10^6 개로 seeding하여 24시간 37 $^{\circ}$ C에 incubation시켜, 검액을 농도별(0, 125, 500, 1000 μ g/ml)로 처리하여 24시간 37 $^{\circ}$ C에서 다시 incubation시켰다. 24시간 후에 cell을 수거하여 Trizol reagent(Life Technologies 15596)를 이용하여 RNA를 추출하였으며 spectrophotometer를 이용하여 2 μ g RNA를 정량한 후 cDNA를 합성하였다. 이때 RT(reverse transcriptase)는 RNA virus로부터 분리한 MmlV (Moloney murine leukemia virus)를 사용했으며, RT 조건은 pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C 5분, denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 58-65 $^{\circ}$ C 30초, polymerization 72 $^{\circ}$ C 30초, extend polymerization 72 $^{\circ}$ C 5분으로 30 cycle을 수행하고 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 합성된 cDNA에 상보적 결합을 하여

PCR(polymerase chain reaction)에는 uPA, MMP-2, TIMP-2 GAPDH primer를 사용하였고, Taq polymerase를 통해 94° C 2분, 72° C 30초, 58° C 30초, 30cycle, 72° C 30초, 4° C forever의 과정으로 mRNA를 증폭시켰다. 0.15% agarose gel을 0.5% TAE buffer로 만들어 전기영동시켰으며, ethidium bromide(EtBr) staining을 통해 농도별 차이를 확인하였다.

10) In vitro Western blots assay¹⁴⁾

HT-1080 cell에 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 20ng/ml와 검액을 농도별(0, 250, 500, 1000µg/ml)로 처리한 후 세포를 수거하여 lysis시켜 protein을 얻어 동량으로 정량하였다. 4-12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane 으로 300mA로 3시간동안 이동시킨 후 5% skim milk로 blocking하였다. p-ERK에 대한 항체를 TBS-T에 1:1000으로 희석하여 overnight 반응시켰다. 2차 항체는 anti-rabbit IgG conjugated HRP(horseradish peroxidase) (TBS-T : Tris buffer saline -Tween 20으로 1:5000)로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켜 ECL(Enhanced Chemiluminescence) kit를 사용하여 발색하여 필름에 노출시켜 사진을 얻었다.

11) In vitro Gap junction assay (Scrape-loading dye transfer assay)¹⁵⁾

WB-F344(rat liver epithelial cell line)을 D-media(5% FBS)에서 배양하여 35mm dish(105 cells/ml)에 seeding하여 24시간 37° C에 incubation시켰다. 검액을 400µg 농도로 처리하여 24시간 37° C에 incubation시키고 24시간후 각각 TPA(12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate)

와 H₂O₂를 검액 400µg/ml로 같이 처리하였다. 처리 후 1시간 뒤 PBS로 wash한 뒤 dish에 0.05% Lucifer yellow 2ml을 처리하고 암소상태에서 surgical blades(10호)를 이용하여 6개 정도의 scrape line을 만들어 3분동안 실온에서 반응시킨 후 다시 PBS로 wash한 후 formalin을 이용하여 cell을 고정시켰다. 형광현미경을 이용하여 Lucifer yellow의 transfer 양상을 보았다.

12) In vivo Sarcoma-180 담압 생쥐의 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가해 400×g로 2분간 원심 분리하여 세포 침전물을 분리했다. 분리된 세포 침전물을 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 上澄液을 제거한 후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma-180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 세어 3×10⁶cells/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1 ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 8마리로 배정하였다. 검액은 생리식염수로 용해시켜(50mg/20g/day) 보존용액을 만든 후 4° C에 보존하며 주사 직전에 보존용액 0.2ml씩 실험동물의 구강내에 1주일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 미국립암연구소 protocol에 언급된 식16에 따라 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{生存比(T/C\%)} = \frac{\text{MST* of Sample}}{\text{MST of Control}} \times 100$$

(* MST : Mean Survival Time)

13) 통계처리

Gap junction assay에서 실험결과와 통계처리는 Student T-test를 사용하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. In vitro HT-1080 암주에 대한 세포 독성 효과

검액의 HT-1080 암주에 대한 세포독성 효과를 조사한 결과 대조군에 비하여 $500 \mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 15% 정도의 세포독성을 보였지만 IC_{50} 의 값은 나오지 않아 유의성있는 세포독성을 인정할 수 없었다(Fig. 1).

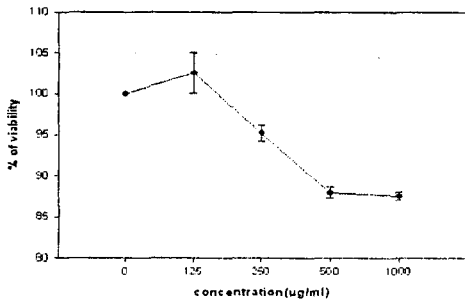
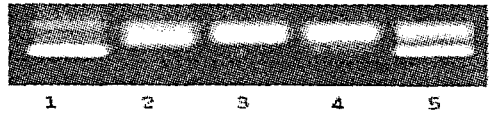


Fig. 1. Cytotoxic effect of IYHT on HT-1080.

2. In vitro DNA topoisomerase I 억제 효과

35mM Tris-HCl, 72mM KCl, 5mM MgCl_2 , 5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% BSA를 함유하는 용액에 $0.5 \mu\text{g}$ pBR 322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 $20 \mu\text{l}$ 가 되게 한 것을 대조군으로 하고, $0.5 \mu\text{g}$ pBR 322 DNA와 효소, 검액을 가하여 총 반응액을 $20 \mu\text{l}$ 되게 한 것을 시험군으로 하여 활성을 측정했

다. 전기영동을 실시하여 사진 촬영한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 시험군은 supercoiled form으로 나타났고(L1), DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 relaxed form으로 전환되었다(L2). 이에 비해 검액을 처리한 군은 IC_{50} 이 $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 $500 \mu\text{g/ml}$ 사이의 농도에서 나타나 효과적인 topo-I의 활성억제작용을 나타내었다(L4-5).



Lane 1 : Supercoiled DNA only
 Lane 2 : Supercoiled DNA and Topo-I 0.5 unit
 Lane 3 : Supercoiled DNA and Topo-I and $10 \mu\text{g/ml}$ of IYHT
 Lane 4 : Supercoiled DNA and Topo-I and $100 \mu\text{g/ml}$ of IYHT
 Lane 5 : Supercoiled DNA and Topo-I and $500 \mu\text{g/ml}$ of IYHT

Fig. 2. Inhibitory effect of IYHT on DNA topoisomerase I activity.

3. In vitro HT-1080 암주에 대한 세포 부착 저지효과

96 well plate에 125, 250, 500, $1000 \mu\text{g/ml}$ 의 농도별 검액과 HT-1080을 동시에 처리하여 1시간 후 전체 세포수를 100으로 하여 부착상태의

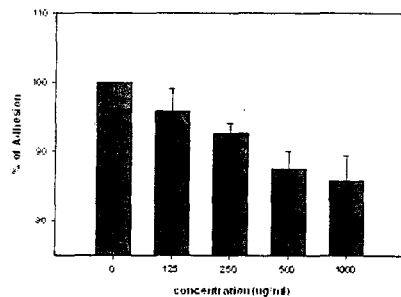


Fig. 3. Inhibitory effect of IYHT on the adhesive activity of HT-1080 cells to 0.1% gelatin.

세포/부유상태세포를 비(%)로 표시하였다.

HT-1080 세포에 대한 부착저지실험에서 대조군에 비하여 농도의존적으로 세포부착이 감소되었으며, 1mg/ml의 농도에서는 대조군에 비해서 15%의 세포부착저지 억제효과를 나타내었다(Fig. 3).

4. In vitro HT-1080 암주에 대한 세포 침윤 억제효과

암세포가 원격 부위로 전이되기 위해서 거쳐야 하는 basement membrane을 인공적으로 재구성한 matrigel을 이용해 in vitro invasion assay 실험을 하였다.

그 결과 검액을 처리한 군은 대조군에 비하여 유의성있는 침윤억제 효과가 나타나지 않았다(Fig. 4).

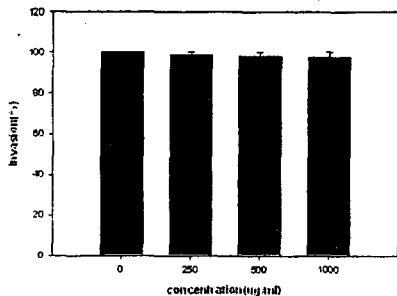


Fig. 4. Inhibitory effect of IYHT on cell invasion of HT-1080.

5. In vitro HUVEC 내피세포의 신혈관 증식억제효과

검액의 angiogenesis에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HUVEC proliferation assay를 수행하였다. HUVEC 내피세포에 bFGF를 처리한 경우 정상 혈관이 아닌 angiogenic한 혈관이 발현한다고 알려져 있다. 따라서 정상 혈관에는 억제

효과가 없으며 종양에 의해 유발되는 angiogenic한 혈관에만 억제 작용을 하는 약물의 개발을 위하여 bFGF를 처리하여 실험을 하였다. 그 결과 검액은 혈관형성 유발인자인 bFGF를 처리한 HUVEC의 혈관내피세포의 증식을 억제하지 못하였다(Fig. 5).

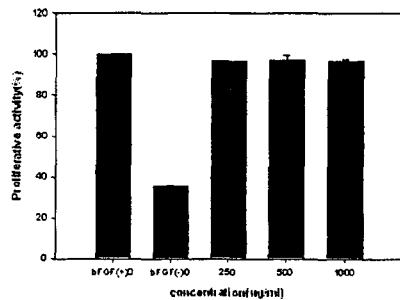
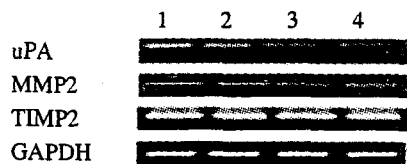


Fig. 5. Inhibition effect of IYHT on proliferation of HUVEC induced by bFGF.

6. In vitro uPA, MMP, TIMP의 발현에 미치는 효과

검액을 처리한 세포로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후 uPA, MMP2, TIMP2의 발현양을 PCR로 분석하고 정량하였다. uPA와 MMP2, TIMP2의 mRNA 발현 양상을 RT-PCR로 확인결과 uPA는 농도의존적으로 발현양이



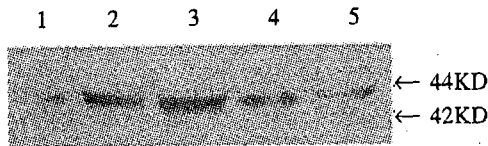
Lane 1 : Control
 Lane 2 : IYHT 125 µg/ml
 Lane 3 : IYHT 500 µg/ml
 Lane 4 : IYHT 1000 µg/ml

Fig. 6. mRNA expression of uPA, MMP2 and TIMP2.

감소되었으나 MMP2와 TIMP2의 발현양상에는 유의한 변화를 관찰 할 수 없었다(Fig. 6).

7. In vitro p-ERK의 발현에 미치는 효과

HT-1080 cell에 VEGF 20ng/ml를 검액을 농도 별(0, 250, 500, 1000 μ g/ml)로 처리한 후 western blots assay로 p-ERK의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 그림과 같이 검액 500 μ g/ml부터 p-ERK의 발현을 저해하기 시작하여 1000 μ g/ml에서는 뚜렷한 억제 효과를 보였다(Fig. 7).



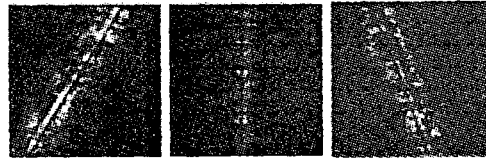
Lane 1 : non-treated
 Lane 2 : VEGF 20ng/ml only
 Lane 3 : VEGF 20ng/ml + IYHT 250 μ g/ml
 Lane 4 : VEGF 20ng/ml + IYHT 500 μ g/ml
 Lane 5 : VEGF 20ng/ml + IYHT 1000 μ g/ml

Fig. 7. Effect of IYHT on p-ERK protein expression in VEGF 20ng/ml treated HT-1080 by western blotting.

8. In vitro Gap junction을 통한 세포 간 정보전달 저해에 대한 회복효과

Fig. 8은 검액 400 μ g/ml을 처리한 것이 H₂O₂의 전처치에 의하여 억제된 Gap junction을 회복시킨 것을 보여준다. H₂O₂ 단독 처리한 것과 검액 400 μ g/ml와 H₂O₂를 동시에 처리한 것을 비교해 보면 단독 처리된 H₂O₂로 인해 억제된 GJIC(Gap Junctional Intercellular Communication)가 검액으로 인하여 60%의 회복하는 효

과를 나타냈다(Fig. 9).



(A) : Normal(non-treated)
 (B) : H₂O₂ 250uM
 (C) : H₂O₂ 250uM +IYHT 400 μ g/ml

Fig. 8. Scrape loading dye transfer image in the WB-F344 rat liver epithelial cells treated with IYHT 400 μ g/ml for 1 hour against H₂O₂.

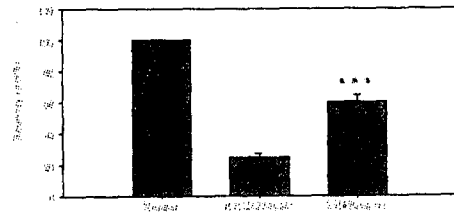


Fig. 9. Recovery by IYHT 400 μ g/ml from inhibition of GJIC by H₂O₂ as determined using a fluorescent microscope after scrape-loading dye transfer assay.

*** : Statistically significant value compared with control data.
 (p<0.001)

9. In vivo Sarcoma-180 담암 생쥐의 생존비에 미치는 효과

검액 50mg을 S-180이 이식된 생쥐에 1주간 경구투여한 후 평균 생존일수(MST : mean survival time)를 계산하였더니 대조군의 MST는 17.25일, 검액 투여군은 21.5일로 나타나 T/C %는 각각 100%와 124.6%로 나타났다(Fig. 10, Table I).

Table I . Effect of IYHT on T/C% in Mice Bearing Sarcoma-180

Group	No.of animal	MST(day)	T/C(%)*
Control	8	17.25	100
IYHT	8	21.5	124.6

$$* : T/C(\%) = \frac{\text{MST of Sample}}{\text{MST of Control}} \times 100$$

IV. 考 察

종양의 발생기전을 한의학에서는 外邪, 七情 및 飲食失調, 過勞, 房勞過度 등의 治病因素가 痰凝, 濕聚, 氣滯, 血瘀, 溫毒 등의 病理因素와 相互搏結하여 발생하는 것으로 보며¹⁷⁾, 서양의 학에서는 방사선, 자외선, 석면, 담배 등 물리적 자극, DNA 및 RNA virus, 화학 발암물질, 호르몬 등의 환경적 요인과 유전적 요인이 상호 결합하여 발생한다고 보고 있다¹⁸⁾. 이러한 암은 정상세포와 비교할 때 악성세포 clone을 형성 (clonality)하고, 성장에 있어 정상적인 대사 조절이 되지 않는 자발성(autonomy)을 지니고 있으며, 세포분화의 결핍(anaplasia)이 있고, 전이 능력(metastasis)을 지니고 있는 특징을 갖고 있다¹⁸⁾.

종양의 한의학적 치료방법은 益氣補脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 扶正固本法과 行氣理氣, 軟堅散結, 活血化瘀, 通絡解毒, 疎理濕熱 등의 祛邪法 및 扶正固本法과 祛邪法을 병용하는 扶正祛邪法으로 구분된다⁴⁾. 崔³⁾는 암재발과 전이의 억제에 대한 연구에서 임상적으로는 補氣養血, 滋補肝腎藥이 인체의 내적 환경을 조절하여 방사선 및 항암제로 인한 부작용에 치료효과가 있었고, 실험적으로는 扶正培本藥이 세포면역기능을 활성화시키고 인체의 조혈계통의 기능을 촉진한다고 보고하였으

며, 崔¹⁹⁾는 철관신생억제제로서 活血化瘀藥이, 철관신생과정에 동원되는 염증세포억제에는 清熱解毒藥이 항암치법으로 유효한 가능성이 있다고 제시하였으며, 金⁵⁾은 중·말기 종양환자에서 나타나는 소모증상과 영양불량상태, 방사선 혹은 화학요법의 부작용으로 인한 津液虧損 상태에는 滋陰生津法이 효과적이라고 제시하였다. 따라서, 滋陰生津法을 기본으로 하여 益氣, 清熱解毒의 藥劑가 가미된 益氣養陰解毒湯의 항암실험은 胃陰不足을 비롯한 이와 관련된 병증에 대해 새로운 치료법의 연구로서 가치 있는 것이라 하겠다.

益氣養陰解毒湯⁶⁾은 顧振東 등이 1993년에 급성 비임파성 백혈병에 활용하여 65.4%의 임상효과를 거두었다고 보고한 것으로 益氣滋陰, 清熱解毒의 약제로 구성되어 있다.

이 중 君藥으로 쓰인 黃芪는 암세포에 대한 독성작용은 없지만 면역기능을 활성화시켜 항암작용을 나타내는 것으로 자궁경부암, 백혈병, 원발성폐암, 방사선치료 후유증 등에 활용되었으며, 半枝蓮은 실험적으로 백혈병세포를 억제하였고 직장암, 난소암, 임파선암, 백혈병, 유방암, 자궁경부암, 식도암, 폐암 등에 활용되었으며, 白花蛇舌草는 항암, 항균, 항염증 작용이 있어 각종 종양에 활용되는데 위암, 간암, 후두암, 방광암, 백혈병, 난소암 등에 활용되었다²⁰⁾.

이에 저자는 益氣養陰解毒湯의 항암효과를 관찰하기 위하여 HT-1080 암세포에 대한 세포독성실험, DNA topoisomerase I assay, 부착저지 실험, 침윤억제실험, HUVEC proliferation assay, RT-PCR 방법에 의한 uPA, MMP-2, TIMP-2의 발현양 측정, western blots assay, gap junction assay, sarcoma-180 담암생쥐에 대한 생존비 측정 등을 시행하였다.

MTT 검색법은 생존 암세포의 효소작용에

의해 MTT 시약이 환원되어 생기는 formazan의 양을 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 항암제에 의해 암세포가 사멸 혹은 증식이 억제되는 정도를 결정하는 방법이다. 이 방법은 formazan 용액의 불안정성으로 인한 단점은 있으나, 실험조작의 자동화가 가능하고 실험결과 재현성과 객관성도 우수하여 대량검색이나 초기검색 단계에 적합하다²¹⁾.

DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 supercoiling state를 조절하는 효소로서 DNA에서 일어나는 복제, 전사, 재조합에 큰 영향을 미친다²²⁾. 세포내의 DNA는 negatively supercoiled되어 있는데, negative supercoiling은 duplexed DNA helix가 덜 감겨(under wound)있다는 것을 의미한다. DNA topoisomerase는 이런 DNA supercoiling state를 조절함으로써, 복제 전사의 initiation의 효율성에 영향을 준다. DNA topoisomerase는 그 촉매기전에 따라 두 형태로 분류되는데, 그 중 topoisomerase I은 DNA duplex의 한 가닥을 phosphodiester bond에서 끊고, 절단된 한 끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한바퀴 회전시킨 후, 끊어졌던 부분을 다시 연결한다. 따라서, 세포내 유전자의 분열에 필요한 효소 중 하나인 topoisomerase I을 억제하는 것은 곧 종양세포의 증식을 억제함을 의미한다²³⁾.

전이는 암세포가 이차적으로 다른 부위에 전이되어 암의 증상을 악화시켜 결국 사망에 이르게 한다는 점에서, 암의 병리기전상 중요하게 인식되고 있다. 數種 生藥 및 한방처방의 세포부착저지에 관한 연구로 李²⁴⁾는 A549, SK-OV-3의 암주에 대해 瓦松, 金銀花, 蒲公英, 當歸 등의 약물이 세포부착저지효과가 있다고 보고한 바가 있으며, 趙⁵⁸⁾는 A549 암주에 대해 桃紅四物湯加減方이 30% 이상, 金²⁵⁾은 A549 암주에 대해 加味金匱腎氣丸이 60% 이상의 세

포부착저지 효과가 있었다고 보고하였다.

혈행을 통한 암의 전이에는 복잡한 기전이 수반되는 여러 과정을 거친다. 첫째, 암세포로의 형질전환 및 성장, 둘째, 기저막 침투 및 신생혈관 형성, 셋째, 혈관벽 침투 및 관통, 넷째, 혈관내에서 혈류압과 면역세포로부터의 생존, 다섯째, 혈소판과 결합 및 기저막에 부착, 여섯째, 혈관벽 침투, 일곱째, 원격 부위에서의 성장의 순서에 따라 이루어지며 이러한 과정에서 한 단계라도 결여되면 전이는 이루어 질 수 없다²⁶⁾. 따라서 angiogenesis의 과정을 억제하면 암을 치료할 수 있으며, 실제로 1971년 Folkman에 의해 처음 anti-angiotherapy가 암치료를 위한 수단으로 등장한 이래, 1998년에는 NCI에서 공식적으로 angiostatin과 endostatin을 동시에 투여하여 쥐에 유발된 종양의 성장을 억제함으로써 종양의 angiogenesis 억제가 새로운 종양 치료방법으로 세계적인 관심을 끌게 되었다²⁷⁾.

종양세포가 원발 부위를 이탈하여 다른 장기로 전이가 되기 위해서는 세포질을 분해하고 지나가야 하는 과정이 필수적이다. 이때 세포는 세포질을 분해하는 세포질 분해효소를 분비하게 되는데, 이 단백질 분해효소를 억제함으로써 종양세포의 전이를 억제할 수 있다. 이러한 단백질 양을 측정하기 위해서는 단백질의 전구체인 RNA의 양을 측정함으로써 예측할 수 있다²⁸⁾.

Western blots assay는 세포에서 발현되고 있는 총단백질을 추출한 후 면역반응을 이용하여 관찰하고자 하는 단백질만을 정성, 정량 분석할 수 있는 방법이다. 암세포의 전이에는 많은 유전자가 관여하며, 이들은 단백질 발현을 통해 전이의 여러 과정을 조절하고 있다. VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)는 신생혈관을 촉진시키는 인자이며 p-ERK는 세포 신호전달체계에서 cell proliferation에 관여한

다. 암세포가 영양을 공급받기 위해 VEGF를 분비하여 암세포를 촉진시킬 때 검액을 처리하여 cell proliferation에 관계하는 p-ERK를 줄여 준다면 암의 증식을 억제시킬 수 있다²⁹⁾.

최근 세포분자학이 발달하면서 gap junction과 종양의 발생기전에 대한 연구가 활발하게 보고되고 있다. Gap junction이란 옆에 인접한 세포와 서로 물질을 주고받는 세포막 표면에 존재하는 통로중의 하나로, 대사산물과 신호물질의 교환이 일어나고 세포의 성장 및 분화, 발생 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있어 gap junction을 통한 세포간 교통(GJIC)은 세포의 정상적인 생활차원에서 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 특히 GJIC의 억제는 세포를 생체의 정상적인 조절상태에서 이탈되게 하며 이러한 이탈 상태를 종양의 성질이라 할 때, 종양화 과정과 GJIC의 변화 사이에는 밀접한 관계가 있다.

이상 실험을 통해 益氣養陰解毒湯은 효과적인 세포독성효과, 침윤억제효과, 신혈관형성 억제효과, 생존기간연장효과는 없으나, DNA topoisomerase I 억제효과, 세포부착저지효과, 전이효소억제효과, p-ERK발현억제효과, 세포간교통회복효과가 있으며, 향후 본 실험을 바탕으로 益氣養陰解毒湯의 임상적 효과에 대한 체계적인 연구 및 활용이 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

益氣養陰解毒湯의 항암 및 항전이 효과를 검토하기 위하여 HT-1080 암세포주를 이용한 세포독성효과, DNA topoisomerase I 억제효과, 세포부착저지효과, 침윤억제효과, HUVEC 내피세포의 신혈관억제효과, RT-PCR 방법에 의한 단백분해효소 억제효과, western blotting을 이

용한 p-ERK 발현억제효과, 세포간교통회복효과 및 S-180 암세포를 이용한 담암생쥐의 생명연장효과를 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 益氣養陰解毒湯은 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 15% 정도의 세포독성을 보였으나 IC₅₀ 값이 나오지 않아 유의성을 인정할 수 없었다.
 2. 益氣養陰解毒湯은 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 DNA topoisomerase I의 활성을 유효하게 억제하였다.
 3. 益氣養陰解毒湯은 HT-1080 암주에 대한 세포부착저지작용에서 농도의존적인 저지효과를 보였으며 1mg/ml의 고농도에서 대조군의 15%정도의 세포부착저지억제효과를 나타내었다.
 4. 益氣養陰解毒湯은 HT-1080 암주에 대한 침윤억제 작용과 혈관형성 유발인자인 bFGF를 처리한 HUVEC 혈관내피세포 증식억제 작용에서 유의한 억제효과를 보이지 않았다.
 5. 益氣養陰解毒湯은 RT-PCR 방법으로 전이관련 유전인자에 대한 억제효과에서 uPA는 농도의존적으로 발현양이 감소되었으나 MMP2와 TIMP2의 발현 양상에는 유의한 변화를 보이지 않았다.
 6. 益氣養陰解毒湯은 VEGF를 처리한 후 시행된 western blot assay에서 500 $\mu\text{g/ml}$ 부터 p-ERK의 발현을 유효하게 억제하였다.
 7. 益氣養陰解毒湯은 gap junction assay를 통해 H₂O₂로 인해 억제된 세포간교통을 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 정상군의 60% 정도까지 회복하는 효과를 보였다.
 8. Sarcoma-180 담암 생쥐의 생존비 측정에서 益氣養陰解毒湯을 투여한 실험군은 대조군에 비해 생존비(T/C%)가 124.6%로 나타났다.
- 이상의 결과로 보아 益氣養陰解毒湯은 DNA

topoisomerase [저해작용과 항전이 억제작용을 통해 항암효과를 발현하는 것으로 보이며 항후 보다 깊이 있는 분자생물학적 기전과 다양한 전이실험의 연구를 바탕으로 益氣養陰解毒湯의 임상적용을 위한 체계적인 연구가 필요하다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 통계청. 2000년 사망원인별 사망자수 및 사망률 (Available from URL <http://www.nso.go.kr>).
2. 金聖勳. 韓醫學界의 癌研究動向과 研究戰略에 對한 研究. 大韓韓醫學會誌 1998;19(1):470-499.
3. 崔昇勳. 韓醫學的 癌治療에 대한 理解. 大韓放射線腫瘍學會誌 2002;20(부록):31-32.
4. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林書院;1995, p.37-38, 85-87, 142-165.
5. 金鍾吳, 趙鍾寬. 腫瘍의 轉移 및 再發 抑制에 관한 考察. 大韓韓方內科學會誌 1997;18(2):53, 60, 62.
6. 孫燕, 余桂清. 中西醫結合防治腫瘤. 北京醫科大學中國協和大學聯合出版社. 北京;1995, p.15.
7. Skehan P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening. J Natl Cancer Inst 1990;82(13):1107-1112.
8. Hsiang YH, Liu LF. Identification of Mammalian DNA Topoisomerase I as an Intracellular Target of the Anticancer Drug Camptothecin. Cancer Res. 1988;48:1722-1726.
9. Liu LF, Miller KG. Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. Proc Natl Acad Sci. 1981;78(6):3487-3491.
10. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis Mediated by Soluble Forms E-selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1. Nature 1995;376: 517-519.
11. Ata N, Oku T, Hattori M, Fujii H, Nakajima M, Saiki I. Inhibition by Galloylglucose(GG6-10) of Tumor Invasion through Extracellular Matrix and Gelatinase-mediated Degradation of Type IV Collagens by Metastatic Tumor Cells. Oncology Research 1996;8:503-511.
12. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. J Immunol Method 1983;65:55-63.
13. Ottino P, Taheri F, Bazan HE. Platelet-activating Factor Induces the Gene Expression of TIMP-1,-2 and PAI-1. Exp Eye Res 2002 ;74(3):393-402.
14. Li L, Eisen AZ, Sturman E, Seltzer JL. Protein Tyrosine Phosphorylation in Signalling Pathways Leading to the Activation of Gelatinase A. Biochimica et Biophysica Acta 1998; 1405:110-120.
15. El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrapeloading and Dye Transfer : A Rapid and Simple Technique to Study Gap Junctional Intercellular Communication. Exp Cell Res 1987;168:422-430.
16. Hellman K, Carter SK. Fundamentals of Cancer Chemotherapy. McGraw-Hill Book Company, New York;1987, p.132-140.
17. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠. 癌腫의 病

- 因病理에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方內科學會誌 1995;1(1):100.
18. 해리슨 번역 편찬위원회. Harrison's 내과학 (Ⅱ). 서울:정담출판사;1997, 1977-1993.
 19. 최우진 외. 血管新生抑制를 통한 腫瘍治療의 韓醫學的 考察. 大韓韓方內科學會誌 2001; 22(4):639-645.
 20. 張秀成 編著. 現代實用抗癌中藥. 北京:北京科學技術出版社;1999, 14, 23, 173.
 21. 李庚鎬, 金昌漢. 항암물질 탐색을 위한 In Vitro 검색법의 비교 연구. 大韓癌學會誌 1995;27(5):712.
 22. Liu LF. In DNA Topology and its Biological Effects(Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press;1990, p.371-389.
 23. 金聖勳, 全基石. 麥吳白朮散加味方的 抗癌 및 抗轉移 活性에 관한 研究. 大韓韓醫學會誌 1999;20(2):128-140.
 24. 이유희. 數種의 抗癌生藥으로부터 活性成分 分離와 그 誘導體의 抗癌效果. 忠南大學校 大學院 博士學位論文. 1994.
 25. 김용태, 전영수, 김정효, 김성훈. 加味金?腎氣丸의 抗癌 및 抗轉移 效果에 대한 研究. 大韓韓方腫瘍學會誌 1999;5(1):19-33.
 26. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. Lancet 1992;339:1453.
 27. 이준우, 崔昇勳, 安圭錫. Angiogenesis의 韓醫學的 治療戰略. 제3의학 998;3(1):21-31.
 28. 신병철, 이형구, 김병우, 柳基遠, 柳逢夏, 尹相協. 消癆去痰益氣湯의 抗癌效果에 대한 研究. 慶熙大大學院 博士學位論文. 2002.
 29. Burnette, W. H. Western Blotting, Anal. Biochem. 1981;112:195-203.