

完肺湯의 실험적 폐전이암에 대한 항암 및 면역효과에 관한 연구

이선구* · 이동주 · 윤근찬 · 하지용

상지대학교 한의과대학 병리학교실

The Anticancer Effects and Immune Response on the Metastatic Lung Cancer by Wanpae-tang

Seon Goo Lee*, Dong Joo Lee, Keun Chan Yoon, Jee Yong Ha

Department of Pathology Oriental Medicine Sangji University

Wanpae-tang is suggested to have antitumor activity on lung cancer. This study was performed to investigate antitumor, immune response, and apoptotic effects by Wanpae-tang in the cancer cell lines and C57BL/6 mice. Experimental studies were progressed through the anticancer activities such as, survival time, cell cytotoxicity, natural killer cell activity, productivity of interleukins and apoptotic effects. The results were summarized as follows: 1. Median survival time of Wanpae-tang treated group was prolonged to 4.1%, as compared with control group, but was not significant. 2. On the MTT assay, half-maximal inhibitory concentration(IC50) of Wanpae-tang was 15.00 mg/ml in HeLa cell, and 4.158 mg/ml in HRT-18 cell. 3. Natural killer cell activity in Wanpae-tang treated group was decreased in case of 100:1 and 10:1 effect cell/target cell ratio. 4. Production of interleukin-2, 4, 12 in Wanpae-tang treated group were significantly increased. 5. On the studies of Wanpae-tang induced apoptosis, a DNA fragmentation patterns were not appeared.

Key words : Wanpae-tang(完肺湯), IC50, anti-tumor, immunomodulatory, IL-2, IL-4, IL-12, natural killer cell activity, apoptosis, DNA fragmentation

서 론

암은 발생원인과 기전이 명확하지 않고 그 생물학적 성상이 복잡하여 정확한 정의를 내리기 어렵지만 조직의 자율적인 과잉 성장이며, 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않으며 국부에 침윤 성장하거나 다른 부위로 확산과 전이를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴하고, 숙주에 일련의 대사장애와 영양장애 등을 일으켜 항병력을 악화시키고, 사망에까지 이르게 하는 질병으로 요약할 수 있다¹⁾. 발병원인은 생체내 정상세포가 환경적 요인과 바이러스 감염, 유전적 요인, 만성자극 및 돌연변이 등에 의하여 어떤 과정을 거쳐 내적원인으로 유발되는 것으로 추측하고 있다²⁾. 한의학에서의 암은 체내에서 발현되는 質이 堅硬하며, 巖石과 같은 腫塊를 지칭하는 것³⁾으로, 瘤·岩·癥瘕·積聚·崩漏·噎膈·腸覃·失榮·舌菌·茧脣·石瘕·癭瘤·癰疽·癰瘡·反胃

·乳巖·石疽·石癰 등의 範圍에 속하며⁴⁾⁵⁾, 癌證의 病因은 原發性 原因으로 風·寒·暑·濕·燥·火의 外感原因과 情志鬱結·飲食傷·過勞의 內傷 原因이 있고, 續發性 原因으로 痰飲·瘀血로 分類될 수 있으며⁶⁾, 年老하고 脾胃가 衰退한 사람에게 많고, 病機上 機體의 臟腑陰陽氣血의 失調로 발생하고, 外來의 致病因素은 반드시 機體의 內部에서 생성된 痰·濕·氣·瘀 등의 病理因素과 搏結함으로 癌證이 발생한다⁷⁾. 폐암은 한의학적으로 正氣가 損傷되어 肺氣가 虛해지면, 邪毒이 肺에 침범하여 宣發과 肅降機能이 失調되고 氣機가 不暢하여 津液이 散布되지 못하므로 絡脈이 阻塞되어 氣滯血瘀하고 痰濕이 內聚하여 腫塊가 형성되는 것으로 인식한다⁸⁾. 完肺湯은 『辨症錄』의 肺癰門⁹⁾에 膿이 형성된 이후에 補肺氣하여 邪를 없애는 扶正祛邪의 처방으로 完肺飲으로 최초 기술되었고, 『辨證論治 方藥合編』의 辨證增補方¹⁰⁾에 完肺湯이라는 이름으로 나온다. 이에 본 연구자들은 완폐탕이 항암 및 면역조절에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여 약재의 직접적인 항암능을 살펴보고, 동물실험에서 대조군과 완폐탕 투여군(실험군)으로 나누어 NK 세포 활성화도,

* 교신저자 : 이선구, 강원도 원주시 우산동 660번지, 상지대학교 한의과대학
· E-mail : returnto@mail.sangji.ac.kr · Tel : 033-730-0664
· 접수 : 2003/03/19 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/28

IL-2, IL-4, IL-12의 생산능을 비교하였고, apoptosis에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 실험동물

생후 4주령, 체중 20 g내외의 음성 C57BL/6를 대한 실험동물센터로부터 구입하여 시판사료(삼양사료(주), 한국)와 수돗물을 자유롭게 급식시키면서, 온도 21±2℃, 습도 55±3%의 항온항습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 시중에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 처방내용과 1첩 분량은 다음과 같다.

Table 3. Prescription of Wanpae-tang

한약명	생약명	용량(g)
玄 麥	Scrophulariae Radix	37.5
金銀花	Lonicerae Flos	37.5
蒲公英	Taraxaci Herba	9.37
天花粉	Trichosanthes Radix	5.62
甘 草	Glycyrrhizae Radix	5.62
桔 梗	Platycodi Radix	5.62
人 參	Ginseng Radix	3.75
黃 芩	Scutellariae Radix	3.75
總	量	0

2. 방법

1) 검액의 제조

10첩 분량의 완폐탕 1087.3 g을 5,000 cc의 둥근 플라스크에 3,000 cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 전탕한 후, 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator (Yamata, Japan)에서 감압농축하였다. 농축액을 동결건조기(일신 Engineering, 한국)로 동결 건조하여 177.62 g (득수율 16.3%)의 분말을 수거 한 후, 필요한 농도로 조정하여 실험에 사용하였다. 동물실험의 경우 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포독성 실험에서는 0.22 μm의 syringe filter(Whatman, USA)로 여과한 후 사용하였다. 사용된 검액은 사용 전에 매번 확인 하여 부유물이나 침전물이 있는 경우 다시 제조하여 사용하였다.

2) 세포

본 실험에 사용한 세포는 B16-F10 (KCLB 80008) mouse melanoma cell 과 HeLa (KCLB 10002) human adenocarcinoma cell, HRT-18 (KCLB 10244) human colorectal cancer cell, YAC-1 (KCLB40160) mouse lymphoma cell을 사용하였고, 모두 한국세포주은행으로부터 분양받아 5% CO₂와 95% air의 배양기(존샘, 한국)에서 37℃를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경(HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을 하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

3) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7 g/L sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co, Japan), Penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1 ml, Streptomycin (100 mg/ml, Sigma, USA) 1 ml, fungizone (Gibco, USA) 4 ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Corning, USA)로 걸러 사용하였다. FBS(Gibco, USA)는 56℃의 항온수조에서 30분간 inactivation시킨 후 사용하였다. 혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

4) 군분리

생존율 측정, NK-Cell activity, IL-2, IL-4, IL-12를 측정할 실험에서 대조군(Control group)은 B16-F10 세포를 1.5×10⁵ cells/ml로 조정하여 0.2 ml씩 미정맥에 주입하고 0.2 ml/day의 농도로 생리식염수를 경구 투여하였다. 실험군(Treat group)은 상기의 방법으로 B16-F10 세포를 주입 후, 완폐탕을 성인 1일 복용량으로 환산하여 조제한 완폐탕 검액을 0.2 ml/day씩 경구 투여하였다.

5) 비장세포의 분리

완폐탕의 면역능과 항암능을 살펴보기 위하여 NK-cell activity, IL-2, IL-4, IL-12를 측정하였다. 이때 사용한 세포는 비장세포에서 분리한 임파구로서, 간략히 설명하면 다음과 같다. 비장세포는 각각의 실험 마지막날 치사시킨 마우스에서 무균상태로 적출하여 4℃의 HBSS로 2회 세척 한 뒤 이를 직경 60 mm의 세포배양용 접시에 옮기고, HBSS를 가한 후 두 장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 잘게 부순 뒤 반복 여과시켜 작은 조직편을 제거하고 부유세포를 모았다. 이 세포 부유액을 원심 분리한 후 1 ml의 증류수로 5-6초간 처리 하여 Hypotonic shock으로 적혈구를 용해시킨 뒤 10× HBSS (Gibco, USA)로 희석하고 원심분리하여 임파구를 분리하였다. 분리된 임파구는 완폐탕에 재부유 시킨 후, 각각의 실험 항목에 맞추어 세포수를 조정된 뒤 본 실험에 사용하였다. 비장에서 얻은 임파구를 5×10⁶ cells/ml로 조정 한 뒤, 여기에 100 μg/ml로 조정된 Conavalin-A 100 μl를 가하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 상층액을 수거하여 IL-2, IL-4, IL-12의 생산능을 측정하였다.

3. 측정항목 및 측정방법

1) 생존율 측정

대조군과 실험군의 C57BL/6 마우스에 1.5×10⁵ cells/ml로 맞춘 B16-F10 세포를 0.2 ml씩 29g의 주사기를 이용하여 미정맥으로 주입하였다. 주입 다음날부터 오전 10시에서 12시 사이에 대조군은 생리식염수를, 실험군은 완폐탕을 경구투여 하였으며, 이 시간을 기준으로 생존여부를 결정하였다. 생존율은 Geran¹¹⁾ 등이 기술한 바와 같이 아래의 Median Survival time을 이용하여 생존증가율을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X+Y}{2} \quad \text{생존증가율} = \frac{T-C}{C} \times 100$$

X : 생존 동물이 전체 동물수의 1/4이 되는 최초의 시간(일), Y : 생존 동물이 전체동물의 1/4이 되는 최초의 시간(일), T : 실험군의 median survival time(일), C : 대조군의 median survival time(일)

2) 세포독성능 측정

완폐탕의 시험관내 세포독성능 측정은 MTT assay를 사용하였다. 지수 증식기의 HeLa, HRT-18세포를 96 well microtiter plate(Falcon, USA)에 1×10^4 cells/well로 분주한 다음, 적정농도로 조정된 완폐탕을 분주하였다. 완폐탕의 최고농도는 HeLa 세포의 경우 8 mg/ml로 하였고, HRT-18의 경우는 16 mg/ml로 하여 각 well에 dilution하였다. 이 상태로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3-4일간 배양하면서 위상차 현미경으로 대조 well을 관찰하여 대조 well의 세포가 충분히 자란 후에 본 실험에 들어갔다.

배양이 끝난 뒤 배양액을 버리고, MTT(Sigma, USA)용액 20 μ l를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 버리고, 100 μ l의 HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT용액과 반응하여 생긴 푸른색의 formazan crystal을 녹였다. 그 후 30분 안에 540 nm의 파장을 이용하여 ELISA(Emax, USA)로 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 6개의 well을 사용하여 평균치를 구하였고, 동시에 2회 측정하여 다음의 공식에 의거 생존율을 측정하였다.

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3) NK-cell activity 측정

Natural killer cell (NK-cell)의 세포독성능 측정은 Promega社의 Cytotox96TM Non-radioactive Cytotoxicity assay kit (Promega, USA)를 사용하였다. 실험방법은 제조사의 지침을 따랐으며, 간략히 기술하면 다음과 같다.

(1) 대조 well의 준비

Yac-1을 표적세포로 하고 이에 반응하는 작동세포는 상기의 방법으로 분리한 비장세포 중의 임파구를 사용하였다. LDB는 세포가 파괴될 때 분비되므로, 정상적인 표적세포와 작동세포에서 분비가 가능하다. 본 실험에서는 이들 정상적으로 분비되는 양을 배제하기 위하여 다음과 같은 대조Well을 설정하였다. 대조 well 1은 표적세포의 LDH 자연방출량을 측정하는 것이고, 대조 well 2는 표적세포의 LDH의 최대방출량을 측정하는 것이다. 대조 well 3은 작동세포의 LDH 자연방출량을 측정하는 것이고, 대조 well 4는 각 well의 부피를 보정하는 것이고, 대조 well 5는 배지에 포함된 phenol red에 의한 LDH의 활동능을 보정하는 것이다. 대조well 1과 2는 표적세포 100 μ l와 배지100 μ l로 구성되었고, 대조well 3은 작동세포 100 μ l와 배지 100 μ l로 구성하였다. 대조well 4와 5는 배지 200 μ l로 사용하였다.

(2) 실험방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 5×10^4 cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well microtitration plate에 well당 100 μ l씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각 5×10^6 cells/ml, 2.5×10^6 cells/ml, 5×10^5 cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 μ l를 분주하여 최종부피가 200 μ l/well이 되도록 한 후 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에

100 μ l당 10 μ l의 lysis buffer (10 \times)를 첨가하고 배양 종료 시 250 \times g로 4분간 원심 분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 μ l 옮긴 후, assay buffer 12 ml를 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든 후 각 well에 50 μ l씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 μ l의 정지용액을 각 well에 넣은 후 주사기로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 구한 뒤 NK 세포 활성도의 표지로 삼았다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{(A-B)-C}{D-C} \times 100$$

A: Experimental - culture medium background, B: Effect cell spontaneous LDH release - culture medium background, C: Target cell spontaneous LDH release - culture medium background, D: Target cell maximum LDH release - volume correction control

4) IL-2, IL-4, IL-12의 생산능 측정

상기의 방법으로 B16-F10 세포로 암이 형성된 대조군과 실험군의 생쥐에서 적출한 비장으로부터 임파구를 분리하여 IL-2, IL-4, IL-12의 생산능을 측정하였다. IL-2의 생산능은 cytoscreen Mouse Interleukin-2 ELISA kit (Biosources, USA)을 이용하였고, IL-4의 생산능은 Endogen Mouse Interleukin-4 ELISA kit (Endogen, USA)를 이용하였고, IL-12의 생산능은 Endogen Mouse Interleukin-12 ELISA kit (Endogen, USA)를 이용하였다. ELISA kit는 고형상 면역효소 측정법을 이용하는 것으로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 Standard sample의 표준곡선으로부터 시료의 IL-2, IL-4, IL-12량을 계산한다. 실험방법은 제조사의 지침을 따랐다.

5) Apoptosis 측정

종양세포에 완폐탕을 처리하여 세포 성장 억제 효과와 그에 따른 독성능을 알아보고, DNA분절능을 측정하였다.

(1) DNA분리

1×10^6 cells/ml의 HRT-18세포에 농도별로 완폐탕을 처리하여 24시간 동안 반응시킨 다음 DNA를 분리 하였다. 먼저 500 \times g, 10분, 4°C에서 원심 분리하여 세포를 모은 후 500 μ l의 lysis buffer (1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM EDTA)를 첨가하여 얼음 위에 1시간 방치하였다. 이를 1,000 \times g, 10분, 4°C에서 원심분리하여 파쇄한 세포의 상층액을 모은 후, 1% SDS 100 μ l, TE/RNase (RNase 10 mg/ml, Sigma in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl) 10 μ l, Proteinase K (1 mg/ml, Sigma)를 50 μ l 첨가해 37°C에서 4시간 이상 반응시킨 다음, phenol/chloroform/ isoamylalcho (25:24:1, sigma, USA)을 동량 처리하여 10,000 \times g, 5분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 분리한 상층액에 100% cold ethanol을 처리하여 -70°C에서 DNA를 침전시키고 이것을 10,000 \times g, 10분간 원심분리 한 후 상층액을 모두 제거하고 실온에서 말린 다음 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 10 μ l로 녹여 전기영동을 하였다.

(2) 전기영동

1.8% agarose gel (TAE buffer 30 ml, 0.54 g Seakem gold agarose)을 끓인 뒤 ethidium bromide(10 mg/ml, Sigma, USA) 2 μ l를 첨가하여 mold에서 굳힌 다음, agarose EP chamber (Bio-

Rad)에 TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA pH 8.0)를 채워놓고, TE buffer로 녹인 DNA samples에 type II 6 X loading buffer (0.25% bromo-phenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll(Type 400, Pharmacia, USA) in water) 3 μ l를 섞어서 18 μ l를 loading하고, 100bp ladder(Bio-Rad, USA)를 marker로 전기영동을 하였다. 전기영동은 50 V constant로 하여 2시간 동안 수행하였다. 전기영동이 끝난 agarose gel은 자외선 관원판(Vilber-Lourmat)위에 두고 polaroid film이 들어 있는 Photo- Documentation Camera (Fisher Scientific, USA)를 이용하여 254 nm에서 촬영하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STASTICA와 PRISM을 이용하였으며, 통계방법은 student's T-test를 하였고, 시험관내 세포 독성에서 구한 IC50은 회귀분석을 통하였으며, 생존율의 경우 Survival package를 이용하였고, 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

성 적

1. 마우스 생존율

B16-F10 세포를 마우스에 주입한 이후 매일 일정시간에 생존여부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 대조군은 주입 21일째부터 사망하여 25일째 모두 사망하였고 실험군은 21일째부터 사망하여 27일에 모두 사망하였다. 대조군의 median survival time은 23일이었고, 실험군은 24일로 나타나어 실험군이 대조군에 비하여 4.1%의 생존증가를 보였으나, 통계적인 의의는 없었다(Fig. 1).

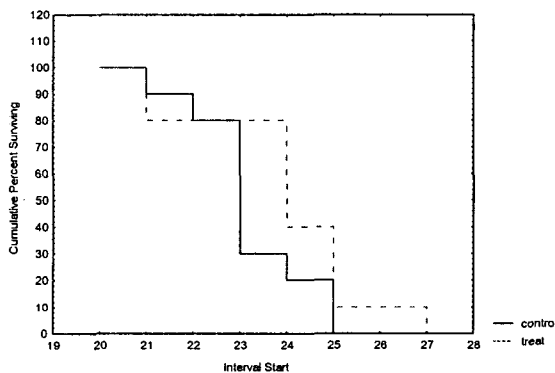


Fig. 1. Survival numbers of the B16-F10 cell bearing mice treated with Wanpae-tang

2. 세포독성능

HeLa 세포와 HRT-18세포를 이용한 완폐탕의 세포독성능을 측정하여 IC50을 구한 결과는 다음과 같다.

1) HeLa 세포에 대한 세포독성 효과

HeLa세포를 이용한 세포독성능 실험에서 완폐탕의 농도가 증가함에 따라 세포독성을 나타냄을 확인 하였다. 세포생존곡선

에 따라 구하여진 IC50은 15.00 mg/ml을 나타내었다.

2) HRT-18세포에 대한 세포독성 효과

HRT-18세포를 이용한 세포독성능 실험에서 완폐탕의 농도가 증가함에 따라 세포독성을 나타냄을 확인 하였다. 세포생존곡선에 따라 구하여진 IC50은 4.158 mg/ml을 나타내었다

3. NK 세포 활성화도

NK 세포의 활성화도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정 결과 대조군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일때 34.61±5.25, 50:1일때 27.48±9.19, 10:1일때 34.81±5.85를 나타내었다. 실험군의 경우 100:1일때 25.46±12.24, 50:1일때 20.40±18.63, 10:1일때 17.04±14.14를 나타내어 대조군에 비하여 전반적으로 낮은 수치를 보였다.

4. IL-2 생산능

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 21일 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정한 결과를 보면 대조군은 0.29±0.22 pg/ml, 실험군은 0.86±0.33 pg/ml을 나타내어 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가(P<0.05)를 보여주고 있다 (Fig. 2).

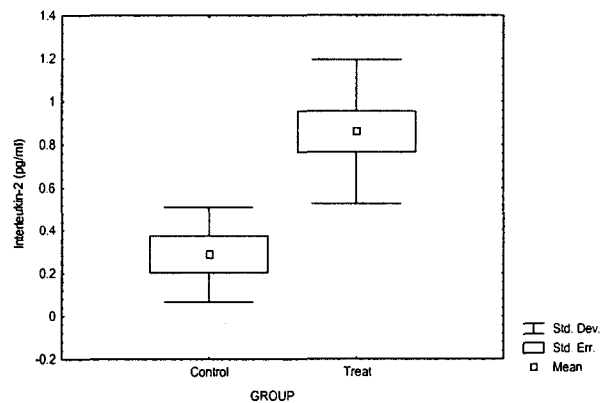


Fig. 2. Interleukin-2 productivity for the B16-F10 cell bearing mice treated with Wanpae-tang. Mouse splenic cell was cultured medium with 100 μ l/ml of concanavalin-A. After 24hrs, culture's supernant was harvested and determined by mouse IL-2 ELISA kit. Control group : Treated with 0.85% saline after inoculated with B16-F10 cell. Treat group : Treated with Wanpae-tang after inoculated with B16-F10 cell.

5. IL-4 생산능

Interleukin-4의 생산능은 검액 투여 후 21일 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정한 결과를 보면 대조군은 81.77±17.56 pg/ml, 실험군은 111.40±35.30 pg/ml을 나타내어 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가(P<0.05)를 보여주고 있다(Fig. 3).

6. IL-12 생산능

Interleukin-12의 생산능은 검액 투여 후 21일 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정한 결과를 보면 대조군은 74.75 ± 10.60 pg/ml, 실험군은 92.53 ± 24.80 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보여주고 있다(Fig. 4).

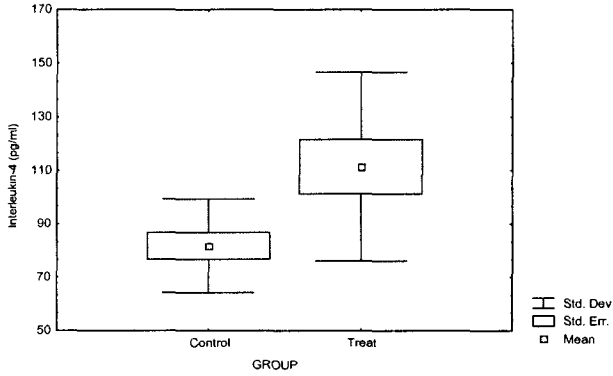


Fig. 3. Interleukin-4 productivity for the B16-F10 cell bearing mice treated with Wanpae-tang. Mouse splenic cell was cultured medium with $100 \mu\text{l/ml}$ of concanavalin-A. After 24hrs, culture's supernant was harvested and determined by mouse IL-4 ELISA kit. Control group : Treated with 0.85 % saline after inoculated with B16-F10 cell. Treat group : Treated with Wanpae-tang after inoculated with B16-F10 cell.

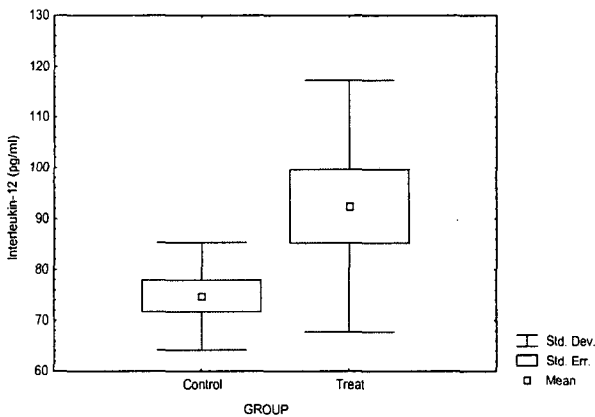


Fig. 4. Interleukin-12 productivity for the B16-F10 cell bearing mice treated with Wanpae-tang. Mouse splenic cell was cultured medium with $100 \mu\text{l/ml}$ of concanavalin-A. After 24hrs, culture's supernant was harvested and determined by IL-12 ELISA kit. Control group : Treated with 0.85 % saline after inoculated with B16-F10 cell. Treat group : Treated with Wanpae-tang after inoculated with B16-F10 cell.

7. Apoptosis

본 실험은 항암제로서 완폐탕의 효능을 알아보기 위해 종양 세포에 완폐탕을 투여하여 세포성장억제 효과와 그에 따른 독성능을 알아보고, DNA분절능을 측정하였다. 분절능의 측정결과 Apoptosis에 관여하는 분절이 보일 경우 전자현미경 관찰과 apoptosis와 관련된 여러 신호전달 체계중에서 MAP Kinase와의 연관성을 알아보려고 하였다.

실험결과 완폐탕의 HRT-18세포에 대한 세포독성능은 IC_{50} 은 4.158 mg/ml 로 나타남을 알 수 있었다. 그러나 완폐탕을 24시

간 동안 처리한 후 1.8% agarose 전기영동으로 확인한 결과 Apoptosis 시 보여지는 DNA분절은 보이지 않았다(Fig. 5).

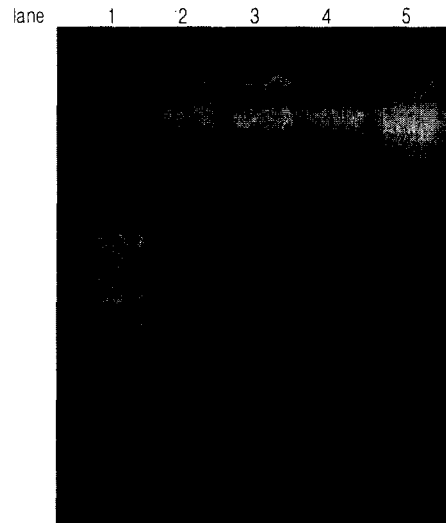


Fig. 5. DNA fragmentation extracted from HeLa cell line treated with Wanpae-tang for 24hr. lane 1. 100bp ladder marker. lane 2. Control. lane 3-5. Wanpae-tang $60 \mu\text{g/ml}$, $600 \mu\text{g/ml}$, 6 mg/ml

고 찰

한의학에서 폐암은 肺脹, 肺咳, 肺積, 息賁, 肺癰 등의 병증이 폐암의 범주에 속한다고 볼 수 있는데, 『靈樞·脹論』에 '肺脹者, 虛滿而喘咳'라 하였고, 『素問·玉機真藏論』에 '大骨枯槁, 大肉陷下, 胸中氣滿, 喘息不便, 內痛引肩項, 身熱, 脫肉破脰'이라 하였고, 『素問·咳論』에는 '肺咳之狀, 咳而喘息有音, 甚則唾血'이라 하여 그 기원이 되고 있다⁹⁾. 肺癰의 治法에 대하여 爽等¹²⁾의 考察에 의하면, 滋陰生津, 益氣養陰, 益氣健脾, 滋陰溫陽 등의 扶正培本을 爲主로 하고, 化痰軟堅, 清熱解毒, 活血化痰 등의 治法을 兼하는데, 肺癰의 初期에는 解毒祛邪, 中期에는 功補兼施, 末期에는 補虛扶正的 治法을 主로 使用하였다. 폐암의 발생률과 사망률은 지속적인 증가추세를 나타내고 있는데 산업발달 및 흡연인구의 증가와 더불어 폐암의 조기발견이 어렵다는 점과 발생원인 및 기전이 잘 밝혀지지 않았다는 점 때문에 최근 10년간 폐암에 대한 내과적, 외과적 치료의 발전에도 불구하고 폐암의 치유률은 크게 개선되지 않고 있다¹³⁾. 수술 및 방사선 치료의 발전과 약물요법의 시도에도 불구하고 폐암의 5년 생존율은 전체적으로 15%에 불과하다¹⁴⁾ 암의 전이는 임파선, 혈행성, 파종성의 세가지 방식으로 이루어지나 대부분 혈관을 통해 이루어진다고 볼 수 있다¹⁵⁾. 폐는 심장으로부터 직접 혈액을 공급받고, 血管床이 풍요롭고, 호흡운동의 영향으로 혈류속도가 변동되고, 모세혈관이 정체를 일으키는 장기라는 특징을 가지고 있어 전이소 형성의 빈도가 높으며¹⁶⁾, 악성종양으로 사망한 환자의 부검예에서 폐전이의 빈도는 약 20-40%로 보고¹⁷⁾ 되고 있다. 또한 폐가 원발병소가 되어 다른 장기로 전이되는 보고¹⁸⁾도 있다.

완폐탕은 玄參, 金銀花, 蒲公英, 天花粉, 甘草, 桔梗, 人蔘, 黃耆로 構成되어 있다. 玄參은 『神農本草經』 中品에 元蔘으로

수목되었으며, 『名醫別錄』에 처음으로 玄蓼이라는 명칭으로 불리워졌으며, 味는 苦鹹, 性은 微寒하며, 肺經 肝經 腎經에 귀경하고, 滋陰潤燥·降火除煩·解毒·解熱利尿消腫·散腹中寒熱積聚하는 效能으로 吐血·衄血·咽喉腫痛·癰腫·癰瘡·積聚 등에 사용할 수 있다^{19),20)}. 金銀花는 味는 甘하고 性은 寒하며, 肺經·胃經·心經·脾經에 歸經하고, 清熱解毒·風熱疏散·抗菌·收斂·利尿·消腫敗毒의 效能으로 사용된다^{19),20)}. 蒲公英은 味는 苦甘하고 性은 寒하며, 肝經·腎經·胃經에 歸經하고, 清熱利尿·解毒消腫의 效能으로 사용한다^{19),20)}. 清熱解毒 消腫散結 清肝明目 利尿의 효능으로 사용한다²¹⁾. 天花粉은 박과 (Cucurbitaceae)에 속하는 하늘타리 및 동속 근연식물의 과근으로, 味는 甘·微苦·微酸하고 性은 寒하며, 肺經·胃經·心經·腎經·膀胱에 歸經한다. 生津潤燥止渴·化痰消腫·降火·排膿·清熱生津·清肺化痰·消腫排膿의 效能으로 사용된다^{19),20),22)}. 甘草는 味는 甘하고 性은 平하며, 주로 脾經·胃經·肺經에 歸經하며, 補脾益氣·清熱解毒·和中緩急·潤肺·調和諸藥의 效能으로 咽喉腫痛·消化性潰瘍·癰疽瘡瘍·藥毒解毒에 사용된다¹⁹⁾. 桔梗은 味는 苦·辛하며, 性은 平하고, 肺經·腎經·心經·胃經·膽經에 歸經하며, 宣肺利氣疏散·祛痰排膿의 效能으로 外感咳嗽·咽喉腫痛·肺癰吐膿·胸滿脇痛·痢疾腹痛 등에 사용된다^{19),20)}. 人參은 性은 甘·微苦하며 性은 溫하고, 脾經·肺經에 歸經하며, 大補元氣·生津止渴·固脫安神之 효능으로 사용된다^{19),20),23)}. 黃芩은 『神農本草經』에 諸熱黃疸 逐水 下血閉 惡瘡疽 節 火瘍에 사용된다고 수록되었고, 味는 苦하고 性은 寒하며, 心經·肺經·膽經·大腸經에 歸經하고, 清熱解毒·瀉火燥濕·止血安胎·利尿解熱·抗菌·鎮靜 등의 효능으로 사용한다¹⁹⁾. 완폐탕은 『辨症錄』의 肺癰門⁹⁾에 完肺飲을 제시하였고, 『辨證論治 方藥合編』의 辨證增補方¹⁰⁾에 같은 목적으로 처방내용이 동일하고 분량의 차이만 있는 完肺湯이라는 처방으로 제시하였다. 『辨症錄』에는 ‘胸膈作痛, 咳嗽不止吐痰 更覺疼甚, 手按痛處, 不可忍, 先聞腥臭之氣, 隨吐膿血’ 한 경우를 肺癰이 이미 潰破된 상 황으로 인식하고, 이때에 完肺湯을 쓸 수 있다고 하였다. 또한 『辨症錄』에서는 이러한 상황이 肺虛로 인하여 肺火가 疏散되지 못한 것으로, 肺虛를 補하고 肺火를 瀉하는 방법을 사용하여야 하는데, 肺를 직접 치료할 수 없기 때문에, 胃氣를 補하고 胃火를 瀉함으로써 肺氣를 補하고 肺火를 瀉한다고 하였으니, 이는 胃를 치료함으로써 肺를 치료하는 것으로 土生金의 원리를 사용한 것으로 볼 수 있다. 즉, 이 처방은 胃氣를 補하고 胃火를 瀉하는 간접적인 방법을 통하여 肺癰이 이미 潰破된 것을 치료하는 약물이라 할 수 있다. 한편 『辨證論治 方藥合編』의 辨證增補方에서는 『辨症錄』의 이러한 사고를 바탕으로 金銀花, 玄蓼을 增量하여 肺陰을 보하고 消炎하는 효과를 보장하였다.

실험결과를 보면, 생존율의 경우 B16-F10 세포를 마우스에 주입하여 생존여부를 관찰한 결과, 대조군의 median survival time은 23일이었고, 실험군은 24일로 나타나어, 실험군이 대조군에 비하여 4.1%의 생존증가를 보였으나 유의성은 없었다.

본 실험에서, Hela 세포와 HRT-18세포를 이용한 세포독성 실험에서 완폐탕의 농도가 증가함에 따라 세포독성을 나타내

었고, IC50은 15.00 mg/ml과 4.158 mg/ml을 나타내었다. NK-cell은 종양세포²⁴⁾, virus감염세포²⁵⁾ 및 몇몇 정상세포²⁶⁾를 자연적으로 살해할 수 있는 세포로서, 특히 종양면역에 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되고 있다. NK활성은 발암에 대한 면역 감시에 중추적인 역할을 하는 것으로 추측되는데, 이는 NK세포는 암세포를 살해하는데 T세포와는 달리 종양항원에 감작된 임파구의 클론성 증식이 선행될 필요가 없고 major histocompatibility complex(MHC) 비제한적 방법으로 전암(preneoplastic)세포나 암세포와 같이 형질전환된 세포를 파괴할 수 있기 때문이다²⁷⁾. Seaman 등²⁸⁾에 의해서 NK세포에 대한 모노클론 항체로 NK세포를 제거시킨 동물은 암세포 성장을 방어할 수 없음이 동물실험결과 밝혀졌다. 본 실험의 경우, NK 세포의 활성도를 작동세포와 표적세포의 관계에서 산출된 세포독성능으로 측정 한 결과 대조군에 비하여 전반적으로 낮은 수치를 보였다. IL-2는 T임파구의 증식에 필요한 인자로서 Morgan 등²⁹⁾에 의해 처음 보고되었고, Henny 등³⁰⁾은 IL-2에 의해서도 NK세포의 활성이 증진됨을 밝혔다. 본 실험의 경우, Interleukin-2의 생산능을 측정 한 결과, 대조군은 0.29±0.22 pg/ml, 실험군은 0.86±0.33 pg/ml을 나타내어 실험군이 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보여주고 있다(P<0.05). IL-4의 주된 생물학적 기능은 B세포의 활성화, 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려졌으나 최근의 많은 실험에 의해서 NK세포, 대식세포 및 기타 여러세포군에 다양하게 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다³¹⁾. 본 실험의 경우, Interleukin-4의 생산능을 측정 한 결과를 보면 대조군은 81.77±17.56 pg/ml, 실험군은 111.40±35.30 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보여주고 있다(P<0.05). IL-12는 활성화된 B세포나 macrophage에서 분비되는 cytokine으로써 여러 가지 종양모델에 탁월한 항암효과를 보이는 것으로 보고되어 왔다³²⁾. 최근에는 IL-12를 IL-2와 병용하여 사용함으로써 암의 발생은 물론 이미 생성되어 있는 종양의 제거에도 뛰어난 효과를 보이고 있음이 보고 되고 있다³³⁾. IL-12의 항암작용 기전을 보면 IL-12는 직접적으로 T 세포나 natural killer 세포의 증식을 증가시키며 이 세포들의 암세포에 대한 cytotoxic activity를 높인다³⁴⁾. 본 실험의 경우, Interleukin-12의 생산능을 측정 한 결과를 보면 대조군은 74.75±10.60 pg/ml, 실험군은 92.53±24.80 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 발견 할 수 있었다(P<0.05).

괴사의 경우는 죽는 세포의 부피가 커지고, 결국에는 세포가 터져 밖으로 분출된 세포질에 의해 염증반응을 일으키는 반면, Apoptosis는 세포내 기관들이 보존된 상태로 염증을 동반하지 않으면서 세포 부피의 축소, 세포막의 돌출, membrane-bound apoptotic body의 형성, 핵염색질의 농축, DNA의 단편화 등이 일어나고, 죽은 세포는 이웃세포의 대식작용에 의해 사라진다³⁵⁾. DNA의 분절은 internucleosomal DNA cleavage가 일어나서 180-200bp 정도의 multiple ladder 형태의 DNA가 관찰되고, 이러한 DNA 분절은 주로 세포내에서 Ca²⁺나 cAMP의 농도 증가에 의해 핵 내에 존재하는 endogeneous endonuclease의 활성화를 통해 나타나는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. 또한 DNA의 합성에 증

요한 역할을 하는 topo- isomerase I의 작용이 억제되면서³⁷⁾, histone H1같은 핵내 단백질이 poly(ADP-ribosyl)ation되어 분해되면서 DNA 분절이 유도된다고 보고하였다³⁸⁾. 이미 많은 항암제들이 특정 세포종에 따라 Apoptosis를 유도하여 DNA분절을 일으킨 것으로 보고 되어졌고³⁹⁾, 이를 이용하여 종양세포들에 특이적으로 Apoptosis를 유도하는 항암제가 작용하는 기전에 관한 연구가 이루어지고 있다⁴⁰⁾. 본 실험의 경우, HRT-18세포에 대하여 완폐탕을 24시간 동안 처리한 후 1.8% agarose 전기영동으로 확인한 결과 Apoptosis 시 보여지는 DNA분절은 보이지 않았다. 이것으로 보아 완폐탕이 Apoptosis에는 직접 관여 하지 않는 것으로 생각된다.

결 론

실험적 폐암 유발 생쥐를 이용하여 완폐탕의 항암능 및 면역능을 알아보고자, B16-F10 세포에 의해 종양이 유발된 생쥐형 태모형에 완폐탕을 투여하여 생존율 측정, NK cell-activity, IL-2 생산량, IL-4 생산량, IL-12 생산량을 측정하였고, MTT assay, DNA 분절 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

B16-F10세포를 주입 후 살펴본 median survival time은 실험군이 24일, 대조군은 23일로서 4.1%의 증가를 보였으나, 유의성은 없었고, 완폐탕의 세포독성을 살펴본 결과, HeLa 세포를 이용한 경우 IC50은 15.00 mg/ml를 보였고, HRT-18세포의 경우 4.158 mg/ml를 보였으며, NK 세포의 활성도를 측정한 결과 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로 낮은 수치를 보였으나 유의성은 없었다. IL-2를 측정한 결과 대조군은 0.29±0.22 pg/ml, 실험군은 0.86±0.33 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보여주고 있고, IL-4를 측정한 결과 대조군은 81.77±17.56 pg/ml, 실험군은 111.40±35.30 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보여주고 있다. IL-12를 측정한 결과 대조군은 74.75±10.60 pg/ml, 실험군은 92.53±24.80 pg/ml을 나타내어, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보여주고 있었으며, 완폐탕을 24시간 동안 처리한 후 1.8% agarose 전기영동으로 확인한 결과 Apoptosis 시 나타나는 DNA분절은 보이지 않았다.

이상으로 보아 완폐탕이 면역능에 관여하여 항암효과를 나타내는 것으로 추측되나, 직접적인 세포독성을 보이지 않아 어떤 기전에 작용하는지는 구체적으로 알 수 없다. 완폐탕의 효능에 대한 계속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. 이기룡 : 立安散이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
2. Cox R. : The multi-step nature of carcinogenesis and the implication for risk analysis, Int. J. Radiat. Biol. 743(4), pp. 373-376, 1998.
3. 白洪龍 : 辨證施治概要, 人民出版社, p. 502, 1984.

4. 金桂清 : 歷代中醫腫瘤論選粹, 北京出版社, pp. 1-11, 1988.
5. 郎偉君 : 抗癌中藥一千方, 中國醫藥技術出版社, pp.5-17, 1994.
6. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 형림서원, pp. 207-218, 1995.
7. 上海中醫學院 : 實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, pp. 621-635, 1986.
8. 王翠玉 : 實用腫瘤臨床, 中國醫藥科技出版社, pp. 94-102, 1995.
9. 陳士鐸 : 辨症錄, 醫聖堂, p. 766, 1989.
10. 李尙仁, 金東傑 校閱 : 辨證論治方藥合編, 南山堂, p.571, 1991.
11. R. I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. Macdinald, A.M. Schumacher, and B.J. Abbot : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against animal tumors and other Biological system(Third Edition), Cancer chemotherapy Reports, pp. 48-59, 1972.
12. 裴基采, 金聖勳 : 肺癆의 辨證과 治方에 對한 文獻의 考察, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 5(2), pp. 243-264, 1997.
13. Park, I.W. : Detection of mutations and human papillomavirus in human primary lung carcinoma by immunohistochemistry and ISH using biotinylated probes on paraffin embedded specimens. M.S. Thesis, ChungAng University, 1993.
14. 강재송 외 7인 : 폐암에서 각종 진단수기에 따른 진단율에 관한 연구, 결핵 및 호흡기 질환 40(6), pp. 700-708, 1993.
15. 서울대학교 의과대학 편 : 종양학(개정판), 서울대학교 출판부, pp. 1-2, 19-22, 1992
16. Abrams H.L., Spiro R, Goldstein N. : Metastasis in carcinoma, analysis of 1000 autopsied cases, Cancer 3 : p. 74, 1950
17. 권성준, 조석주 : 위암의 폐전이, 대한외과학회지 Vol. 56, No. 1, pp. 91-98, 1999
18. 김유찬, 조광현, 이유신, 함의근 : 내부 장기암의 피부전이, 대한피부과학회지 Vol. 25, No. 2, pp. 213-221, 1987
19. 梁基相 : 處方構成을 위한 漢藥의 配合과 應用, 전통의학연구소, pp. 212, 222, 240-241, 254-255, 280, 284, 385-386, 398, 1993.
20. 申偉求 : 申氏本草學, 壽文社, pp. 1-2, 456-461, 617-618, 675-676, 677-678, 731-732, 1973.
21. 辛民教 : 臨床本草學, 永林社, pp. 445-446, 1997.
22. 辛民教 : 臨床本草學, 永林社, pp. 369-372, 1987.
23. 李尙仁 : 한방에서 본 人蔘, 한국인삼사, p. 516, 1980.
24. Herberman R.B., Nunn M.E., Holden H.T. and Lavrin D.H. : Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors III, Characterization of effector cells, Int. J. Cancer 16, p. 230, 1975.
25. Minato N., Bloom B.R., Jones C., Holland J. and Reid L.M. : Mechanism of rejection of virus persistently infected tumor cells by athymic nude mice, J. Exp. Med. 149, p. 117, 1979.
26. Riccarch C., Santoni A, Barlozzari T. and Herberman RB : Invitro reactivity of mouse natural killer(NK) cells against

- normal bone marrow cells, *Cell Immunol.* 160, p. 136, 1981.
27. Herberman, R.B. and Holden, H.T. : Natural cell-mediated immunity, *Adv. Cancer Res.* 27, pp. 305-377, 1978.
 28. Seaman W.E., Sleinger M., Eriksson E. and Koo G.C. : Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1. 1 : Reduction in defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity., *J. Immunol.* 138, pp. 4539-4544, 1987.
 29. Morgan D.A., Ruscetti F.W. and Gallo R.C. : Selective in vitro growth of T lymphocyte from normal human bone marrow, *Science* 193, p. 1007, 1976.
 30. Henny C.S., Kuribayashi K., Mern D.E. and Gillis : Interleukin-2 augments natural killer cell activity, *Nature* 291, p. 335, 1981.
 31. Banchereau J. : Interleukin-4. The cytokine Handbook, ed, Thomson A, Academic Press, p. 119, 1991.
 32. Hastala C.L., Edington H.D., McKinney T.G., Tahara H., Nalesnil M.A., Brunda M.J., Gately M.K., Wolf S.F., Schreiber R.D., Storkus W.J., Lotze M.T. : Recombinant interleukin 12 administration induced tumor regression in association with interferon-gamma production, *J. Immunol.* 153, pp. 1697-1706, 1994.
 33. Wigginton J.M., Kuhns D.B., Back T.C., Brunda M.J., Wiltrot R.H., Cox G.W. : Interleukin 12 primes macrophages for nitric oxide production in vivo and restores depressed nitric oxide production by macrophage from tumor-bearing mice: implications for the antitumor activities of interleukin 12 and/or interleukin 2, *Cancer Res.* 56, pp. 1131-1136, 1996.
 34. Kobayashi M., Fitz L., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G. : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor(NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, pp. 827-846, 1989.
 35. Jacobson M.P., Weil M. and Raff M.C. : Programmed cell death in animal development, *Cell* 88, pp. 347-354, 1997.
 36. Ribeiro J.M., Carson D.A. : Ca²⁺/Mg²⁺ Dependent endonuclease from human spleen, purification, properties, and role on apoptosis, *Biochem.* 32, pp. 9129-936, 1993.
 37. Fukasawa K., Komatani H., Hara Y., Suda H., Okura A., Nishimura S., Yoshinari T. : Sequence-selective DNA cleavage by a topoisomerase I poison, NB-506, *Int. J. Cancer* 75, pp. 145-150, 1998.
 38. Yoon Y.S., Kim J.W., Kang K.W., Kim Y.S., Choi K.H., Joe C.O. : Poly(ADP-ribosyl)ation of Histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis., *J. Biol. Chem.* 271, pp. 9129-9134, 1996.
 39. Walker P.R., Smith C., Youdale T., Leblanc J., Whitfield J. F. and Sikorska M. : Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes, *Cancer Res.* 51, pp. 1078-1085, 1991.
 40. Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Jarvis W. D., Grant S., Birrer M. J., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. N. : Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, *Nature* 380, No.6569, pp. 75-79, 1996.