

加味補中益氣湯의 항암활성 및 항전이효과에 관한 연구

이병주 · 김동희 · 이효정¹ · 김성훈^{1*}

대전대학교 한의과대학, 1:경희대학교 동서의학대학원 동서중앙학과

Study on Antitumor Activity of Kamibojungikgi-tang

Byung Ju Lee, Dong Hee Kim, Hyo Jeong Lee, Sung Hoon Kim*

Department of Oriental Medical College, Taejon University, 1:Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

To explore the possible cancer agent from oriental prescriptions, we have examined its antitumor and antimetastatic activities of Kamibojungikgi-tang(KBIT). KBIT extracts exhibited cytotoxicity against P388, A549 and B16-F10 cell lines in a dose-dependent manner and showed antiadhesive effect of A549 cell to complex extracellular matrix at 1mg/ml in vitro. In DNA topoisomerase I assay, KBIT extracts showed strong inhibitory effect in a dose-dependent manner. In pulmonary colonization assay with B16BL6, a number of colonies in the lungs were decreased effectively in KBIT treated group as compared with control group. Moreover, in CAM assay, KBIT extracts significantly inhibited angiogenesis at 15µg/egg as compared with control. The T/C% was 141% in KBIT treated group in S-180 bearing ICR mice. From the above results it was concluded that KBIT had antitumor and antimetastatic activities. So it is expected to be clinically helpful on the prevention and treatment of cancer, although it is still necessary to study its mechanism on molecular biology and immunology.

Key words : Kamibojungikgi-tang(加味補中益氣湯), cytotoxicity, pulmonary colonization, antiadhesion, DNA topoisomerase I, S-180, CAM assay

서론

惡性腫瘍으로 일컫는 癌은 非正常的인 細胞分裂, 浸潤性 成長 및 轉移 등의 特異性으로 無節制한 增殖을 함으로써, 終局에 是 個體를 죽음에 이르게 하는 難治性 疾患이다¹⁾. 世界保健機構(WHO)의 報告에 의하면 매년 癌으로 인한 死亡率은 增加 一路에 있으며, 우리나라 統計廳 資料에서도 新生物 全體를 포함하면 50-60대 死亡者의 死亡 原因 1위가 癌이며, 이 年齡에서 10명당 3명꼴로 各種 癌으로 死亡하였다고 報告되고 있다²⁾. 現代 醫學에서 癌治療는 抗癌劑를 投與하는 化學療法과 癌 部位에 放射線을 照射하여 癌細胞를 殺傷하는 放射線 療法 및 宿主의 免疫機能을 向上시켜 癌을 抑制하는 免疫 療法 등 多様な 治療技術이 應用되고 있다³⁾. 그러나 化學療法과 放射線 療法는 造血 및 免疫 機能에 異常을 招來하고, 外科의 手術은 精神的, 肉體의 스트레스를 加重시키며, 免疫 療法는 初期 段階이어서⁴⁾, 아직까지 癌細胞

에 特異적으로 作用하면서 副作用이 적은 抗癌劑 및 治療 技術은 없는 實情이다. 이러한 現實의 背景으로 正常 細胞에는 毒性이 發顯되지 않으면서, 癌細胞에 選擇的이고, 特異적으로 作用하는 抗癌劑를 開發하기 위하여, 最近에는 多様な 天然物에 대한 檢索이 활발히 進行되고 있다.

韓醫學界에서도 分子生物學的 發展과 더불어 1970년도 이후 癌治療劑 開發을 위해 多様な 韓藥劑와 處方을 試料로 細胞 毒性, 免疫反應, apoptosis 및 angiogenesis 등에 대한 研究⁵⁾가 이루어지고 있고, 이와 더불어 抗癌劑 및 放射線 副作用 抑制作用과 相乘 作用에 대한 研究도 持續적으로 이루어지고 있다⁶⁾. 臨床에서는 癌의 主 病機가 正氣先虛, 留滯客邪, 氣滯血瘀, 邪毒積聚, 成塊의 機轉으로 形成되는 것으로 認識하여, 補法을 中心으로 攻·削·散·除法 등이 併用되는 이른바 攻補兼法이 癌治療法으로 多用되고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

本 試料의 基本方인 補中益氣湯은 脾胃論에 "...治脾胃氣虛而致的身熱有汗, 渴喜熱飲, 頭痛惡寒, 少氣懶言, 飲食無味, 四肢乏力, ..."이라고 最初로 收載된 이래¹¹⁾, 臨床에서 脾胃虛損으로 나타나는 諸 症狀에 應用되고 있다. 이에 대한 實驗的 研究로는

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1, 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2179
· 접수 : 2003/03/25 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/28

李¹²⁾가 抽出에 관한 研究를, 李¹³⁾가 效能에 관한 研究를, 金¹⁴⁾이 항스트레스 效能을 각각 報告한 바가 있으며, 抗癌 研究로는 李¹⁵⁾가 cyclophosphamide 抗癌活性과 毒性에 미치는 影響을, 金¹⁶⁾이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響을, 李¹⁷⁾가 補中益氣湯의 加味方인 防毒湯의 抗腫瘍 效果와 免疫反應에 미치는 影響을 報告하여, 補中益氣湯이 一定한 抗癌 效果가 있을을 提示하였다. 이에 著者는 이러한 實驗的 報告를 根據로 補中益氣湯에 抗癌活性이 認定¹⁸⁾된 白花蛇舌草, 仙鶴草, 魚腥草, 丹蔘, 鬱金을 加味하여, 이를 試料로 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率 등의 測定을 通해 抗癌 活性을 評價하고, A549 癌柱의 附着 阻止作用, 血管形成 阻害作用, pulmonary colonization 抑制作用 및 血液學的 變化 등을 測定하여 抗轉移 效果를 評價하였던 바, 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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)과 C57BL/6 3주령의 생쥐를 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(조단백질 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) 약물

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選한 것을 使用하였으며, 加味補中益氣湯의 內容은 <方藥合編>¹⁹⁾에 記載된 加味補中益氣湯을 基本으로 構成하였고, 處方의 內容과 用量은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of Kamibojungki-tang

한약명	생약명	총량(g)
황기	Astragali Radix	5.62
인삼	Ginseng Radix	3.75
백출	Atradyloides Rhizoma	3.75
감초	Glycyrrhizae Radix	3.75
당귀신	Angelicae Gigantis Radix	1.87
진피	Citri Pericarpium	1.87
승마	Cimicifuga Rhizoma	1.12
시호	Bupleuri Radix	1.12
백화사설초	Oldenlandiae diffusae	6
어성초	Houttuniae Herba	4
선학초	Agrimoniae Herba	4
총량		36.85

3) 試藥 및 機器

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, agarose, sodium dodesyl sulfate(SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetra-zoliumbromide (MTT), sulforhodamine-B (SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopolysaccharide(LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma社 製品, ethanol, HCl은 Merck社 製品, sodium bicarbonate는 Gibco社 製品, acetic acid는 Glicial社 製品을 각각 使用하였다.

機器는 CO₂ incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS, Korea), 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 vacuum evaporator(Büchi 461, France), autoclave (Hirayama, Japan), micro pipet(Gilson, U.S.A), autostill WG25(Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A) 및 camera(601S, Nikon, Japan) 등을 使用하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

上記한 加味補中益氣湯의 2접 分量을 각각 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator (Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer (Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 25.3g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter (0.25µm, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 세포 배양

In vitro 細胞毒性 測定에는 P388(ATCC CCL 219) 白血病癌柱와 A549(ATCC CCL185) 肺癌柱, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌柱, SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 黑色腫 및 B16-F10 melanoma(ATCC CRC 6322)를 使用하였는데, 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56℃ 水槽에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고 1% 항생제(penicillin-G 10만units/streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) P388 癌柱에 對한 細胞毒性 測定

細胞毒性 實驗에서 logarithmic phase에 도달한 P388 細胞를 얻기 위하여 實驗 24時間前에 36~37℃로 加溫한 medium을 넣은 culture dish에 P388 細胞를 2~3×10⁵cells/ml 濃도가 되게 調整하여 1日間 培養시킨 後, 約 0.8~1.0×10⁶cells/ml의 濃도가 되도록 P388 細胞 懸濁液을 만들었다. 細胞 懸濁液(4×10⁴ cells/ml)을 100µl씩 96 well plate에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에

배지에 용해시키고 20분간 sonication한 후 試料을 0.25, 0.5, 1mg/ml 등의 濃度로 만든 시료용액 100 μ l을 加하여 實驗群으로 하였으며, 對照群 well($2\sqrt{n}$: n = 시료수)에는 細胞 懸濁液만을 넣고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 48시간 배양 후 MTT 法²⁰⁾에 의하여 細胞數를 計算하였다.

4) A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 및 B16-F10 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 sulforhodamine-B(SRB) assay 法²¹⁾을 使用하였다. 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate에 well당 細胞數가 2×10^4 개가 되도록 분주하였다. 분주된 細胞들은 CO₂ incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(100, 10, 1 μ g/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 넣어 細胞가 들어있는 well에 各各 200 μ l씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다. 試料은 加하기 前에 0.22 μ m filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48時間 培養이 끝난 後, 各 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μ l씩 加하여 4 $^{\circ}$ C에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 固定시켰다. 細胞의 固定이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA 용액을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 250 μ l의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30分間 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다. 染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 후, 對照群의 O.D.(optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을 구하여 ED50 값을 얻었다.

5) A549 癌柱의 附着 阻止 實驗²²⁾

A549 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96 well plate의 各 well에 100 μ l 씩 가한(5×10^4 cells/well). 후 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 濃度의 試料을 녹인 培地 100 μ l를 加하고 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 에서 培養하였다. 3時間 後 培養液을 除去시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24時間 培養시킨 후 SRB法에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

6) DNA topoisomerase I assay

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., LTD에서 購入 使用하였으며, topoisomerase의 IC50 값을 決定하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法²³⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM Spermidine, 0.01% Bovine serum albumin, 0.5 μ g pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液

을 20 μ g가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料을 加하여 總 反應液을 20 μ l되게 한 것을 試驗群으로 하여 이들을 37 $^{\circ}$ 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 5 μ l를 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 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 染色, 紫外線 下에서 사진을 찍은 다음 scanner를 使用하여 活性를 測定했다. 이때 topo I의 1unit는 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 反應시킬 때 super coiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 양을 의미한다.

7) 肺癌轉移 實驗(Pulmonary colonization assay²⁴⁾

In vitro 상에서 계대 배양한 B16-BL6 肺癌 細胞를 實驗에 使用하였다. 즉, 계대중인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 溶液으로 附着面으로부터 分離시켜 HBSS 溶液으로 細胞數가 2×10^4 cells/ml이 되도록 細胞 懸濁液을 만들었다. 18-20g인 C57BL/6에 細胞 懸濁液 0.2ml을 各各 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를 移植하고, 24時間 經過한 후 1일 1회씩 37.6mg/20g/day의 試料을 生理食鹽水에 녹여 4 $^{\circ}$ C에서 保管하면서 7일간 연속 zonde를 使用하여 經口投與하였다. 癌移植 21일 後에 頸椎脫骨로 致死시킨 다음 開腹하여 肺로 轉移된 癌柱(colony)와 血液 檢査를 施行하였다.

8) CAM assay

CAM assay는 기존의 알려진 방법에 따라 실시하였다²⁵⁾.

10) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 腹腔內에 7일간 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가해 400 \times g로 2분간 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 부유시켜 다시 遠心分離하여 상침액을 除去한 후 혼재된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 취하였다. 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 후 24시간부터 각 군을 8마리로 配定하였다. 試料은 生理食鹽水로 溶解시켜(37.6mg/20g/day) 保存溶液을 만든 후 4 $^{\circ}$ C에 保存하며 注射 直前에 保存溶液 0.2ml씩 實驗動物의 口腔內에 1주일간 연속 投入하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式²⁶⁾에 따라 計算하였다.

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

가미보중익기탕의 여러 가지 암세포에 대한 세포독성을 측정한 결과 B16-F10, A549 와 P388에 대해서 고농도인 1mg/ml에서 30%정도의 세포독성을 나타냈으며, SK-MEL-2 와 SK-OV-3 암세포에 대해서는 미약한 세포독성을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Cytotoxicity of KBIT on various cancer cell lines

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% of control				
	B16-F10	P388	SK-MEL-2	A549	SK-OV-3
Control	100 \pm 2.29 ^{a)}	100 \pm 1.83	100 \pm 3.8	100 \pm 1.83	100 \pm 1.83
0.25	90.4 \pm 1.12	99.0 \pm 1.89	99.6 \pm 3.68	90.6 \pm 2.53	98.7 \pm 4.21
0.5	77.5 \pm 2.23	81.2 \pm 3.87	90.7 \pm 4.35	70.3 \pm 2.69	81.5 \pm 3.58
1	69.4 \pm 2.63	69.6 \pm 3.67	83.2 \pm 1.25	61.2 \pm 3.16	76.8 \pm 2.63

a) : mean \pm S. E.

2. A549 癌株의 附着阻止 效果

A549세포에 대한 부착저지 실험을 한 결과 0.25, 0.5, 1mg/ml의 농도에서 90.4 \pm 3.18, 76.4 \pm 2.24, 56.8 \pm 1.83(P<0.01)로 고농도인 1mg/ml에서 유의성 있는 세포부착저지 효과가 나타났다(Table 3).

Table 3. Inhibitory effect of KBIT on cell adhesive of A549 cells to complex extracellular matrix

Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Percent of control
Control	100 \pm 6.45a)
0.25	90.4 \pm 3.18
0.5	76.4 \pm 2.24
1	56.8 \pm 1.83**

a) : Mean \pm standard error, * : Statstcally significant value compared with control data; P(0.05, ** : P(0.01)

3. DNA topoisomerase I 活性 抑制效果

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 20 μl 가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20 μl 되게 한 것을 試驗群으로 하여 活性를 測定했다. 전기영동을 실시하여 사진 촬영한 결과 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 實驗群은 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性를 强하게 抑制하였다.

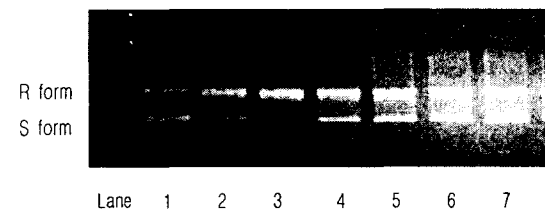


Fig. 1. Effect of KBIT on the DNA topoisomerase I from calf thymus. Lane 1 : DNA (0.5 μg) only, Lane 2 : DNA + DNA topoisomerase I (0.5 unit), Lane 3 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit), Lane 4-7: DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of KBIT

Table 4. Inhibitory effect of KBIT of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells.

Group	No. of animals	Number of colonies
Control	8	50.2 \pm 3.24
Sample	8	41.1 \pm 2.25

4. 肺癌轉移 抑制 效果

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 후 21일째에

實施한 肺臟의 colony 數 觀察에서는 對照群이 50.2 \pm 3.24(개)이었는데 비해서 KBIT 投與群은 41.1 \pm 2.25(개)로써 肺癌柱 形成을 抑制하였으나 有意성은 나타나지 않았다(Table 4).

5. 血管形成 抑制效果(CAM assay)

血管形成 抑制效果는 CAM assay를 實施하여 測定하였는데, 實驗에 使用된 受精卵 10개중 4개에서 血管形成 抑制效果가 나타나 40%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 5, Fig. 2)

Table 5. Antiangiogenic Activity of KBIT in a CAM Assay

Sample	Dose($\mu\text{g}/\text{egg}$)	No. of CAM (avascular/total)
BIT	15	3/10

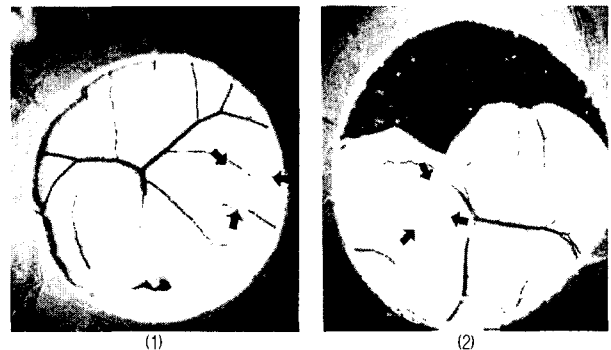


Fig. 2. Photography of control and KBIT on embryonic angiogenesis in CAM 2 day after sample implantation. (1) control (2) KBIT(15 $\mu\text{g}/\text{egg}$) treated group.

6. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

S-180이 移植된 생쥐에 10日間 KBIT를 經口 投與한 後 體重增加를 測定하였던 바, 腹水腫으로 인한 體重增加는 對照群에서는 癌柱 移植 後 10일에 急激히 增加하여 16일에 모두 죽었다. 平均 生存日數에서 對照群의 MST는 14.4일, KBIT 投與群은 20.4일로 나타나, T/C%는 141.6%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Effect of KBIT on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	MST(day)	T/C(%)
Control	8	14.4	100
KBIT	8	20.4	141.6

고 찰

正常 組織에 대하여 破壞的인 癌은 發癌物質 等の 環境의 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性刺激 및 突然變異 등으로 인하여 發生하며, 人體의 抗病能力이 低下된 狀態에서는 免疫防禦機能이 弱화되어, 癌細胞를 破壞 除去하지 못해 細胞 調節機能을 喪失함으로써 더욱 惡化되게 된다¹⁾. 그러나 아직까지 癌細胞에 特異적으로 作用하면서 副作用이 적은 抗癌劑 및 治療 技術은 없는 實情으로, 正常 細胞에는 毒性이 發顯되지 않으면서 강력한 效果를 갖는 抗癌劑 開發을 위해 最近에는 天然物에서

癌의 增殖을 抑制할 수 있는 生體調節活性物質(BRM, Biologic Response Modifier)을 찾기 위한 努力이 活發하게 進行되고 있다. 韓醫學界에서도 現代의이고 科學的인 實驗 方法으로 數種의 韓藥劑 및 韓方 處方을 試料로 抗癌 活性 및 抗轉移에 대한 研究⁹⁾가 이루어지고 있고 있다. 本 試料의 基本方인 補中益氣湯은 脾胃論에 "...治脾胃氣虛而致的身熱有汗, 渴喜熱飲, 頭痛惡寒, 少氣懶言, 飲食無味, 四肢乏力, ..."이라고 最初로 收載된 이래¹¹⁾, 臨床에서 脾胃虛損으로 나타나는 諸 症狀에 應用되고 있다. 構成藥物의 本草學的 效能을 살펴보면, 黃芪는 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌하는 效能이 있고, 人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神하는 效能이 있으며, 白朮은 補脾, 益胃, 燥濕, 和中하는 效能이 있고, 甘草는 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하는 效能이 있으며, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하는 效能이 있고, 陳皮는 理氣, 調中, 燥濕, 化痰하는 效能이 있으며, 升麻는 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣하는 效能이 있고, 柴胡는 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣하는 效能이 있다²⁷⁾. 加味된 活血化痰 藥物인 丹蔘은 活血祛瘀, 涼血消癰, 除煩安神하는 效能이 있고, 鬱金은 行氣化痰, 清心解鬱, 利膽退黃하는 效能이 있어²⁷⁾ 臨床에서 瘀血로 인한 諸症狀과 더불어 各種 癌治療에 應用되고 있다¹⁸⁾. 清熱解毒 藥物인 白花蛇舌草는 清熱利濕, 解毒消癰하는 效能이, 魚腥草는 清熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하는 效能이, 仙鶴草는 收斂止血, 截癰, 止痢, 解毒하는 效能이 있어²⁷⁾ 胃癌, 乳房癌, 食道癌 및 直腸癌 등 數種의 癌治療에 活用되고 있다¹⁸⁾. 補中益氣湯의 實驗的 研究로는 李¹²⁾가 抽出에 관한 研究를, 李¹³⁾가 效能에 관한 研究를, 金¹⁴⁾이 항스트레스 效能을 각각 報告한 바가 있으며, 抗癌 研究로는 李¹⁵⁾가 cyclophosphamide 抗癌活性和 毒性에 미치는 影響을, 金¹⁶⁾이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果和 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響을, 李¹⁷⁾가 補中益氣湯의 加味方인 防毒湯의 抗腫瘍 效果和 免疫反應에 미치는 影響을 報告하여, 補中益氣湯이 一定한 抗癌效果가 있을을 提示하였다. 이에 著者는 이러한 實驗的 報告를 根據로 補中益氣湯에 抗癌活性이 認定¹⁸⁾된 白花蛇舌草, 仙鶴草, 魚腥草, 丹蔘, 鬱金을 加味하여, 이를 試料로 抗癌 活性 및 抗轉移 效果를 評價하였다. 먼저 癌細胞의 成長, 生化學的 特徵, 分子 生物學的 研究 및 生體 研究를 可能하게 해주는 實驗으로, 많은 研究者들이 癌細胞 培養을 通하여 癌을 研究하고 있는데, 이 중 直接的인 癌細胞의 增殖을 抑制하는 細胞毒性은 스크린 過程에서 多用되고 있다. 細胞毒性 測定은 細胞의 viability를 測定하는 方法으로 Mosmann에 의해 처음 施行되고, Cole, Alley에 의해 널리 보급된 MTT²⁰⁾ 및 SRB 法²¹⁾을 使用하여 數種의 癌株에 對한 細胞毒性을 測定하였는데, P388, B16-F10 및 A549 癌株에 대하여서는 高濃度인 1mg/ml 濃度에서 30% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였고, SK-OV-3와 SK-MEL-2 癌株에서는 30% 以下로 細胞毒性이 微弱하였다(Table 2).

最近 抗癌劑 開發 方法中 topoisomerase의 活性를 抑制하는, 소위 topoisomerase poison이라고 불리우는 活性 抑制劑에 대한 研究가 이루어지고 있다²⁸⁾. 이러한 抑制劑들의 抗癌 機轉은 topoisomerase의 不活性化에 起因하는 것이라기보다는 대부분 抗癌劑의 경우처럼 DNA에 損傷이 생기기 때문이라고 생각되고

있어²⁹⁾, 細胞毒性에 대한 評價 方法이 되고 있는데, 本 實驗에서는 對照群에 비하여 濃度依存的으로 topo-I의 活性를 強하게 抑制하였다(Fig 1). 轉移는 주로 淋巴性, 血行性, 播種性의 方式로 이루어지는데, 淋巴管은 결국 血管과 連結되어 癌腫과 肉腫은 주로 血管을 通해서 轉移된다고 할 수 있으며, 播種性 轉移는 癌이 腹腔이나 胸膜腔 같은 空間을 通過하였을 때 일어난다. 血行性 轉移는 癌細胞의 細胞外基質(extracellular matrix-ECM)을 分解, 移動, 遠隔 部位着床으로 이루어진다. 本 實驗에서는 A549 癌株에 대한 附着 阻止效果를 複合基質에서 評價하였는데, 濃度 依存的인 附着 抑制作用과 더불어, 高濃度인 1mg/ml 濃度에서는 44%의 有意性있는 附着 阻止效果를 나타내었다(Table 3). In vivo 實驗에서는 먼저 肺癌柱(colony) 形成 抑制效果를 B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 후 肺臟의 colony 數를 計算하는 colonization assay를 통하여 檢索하였는데, 對照群에 비하여 22%의 肺癌柱 形成 抑制 效果를 나타내었다(Table 4). 마지막으로 in vivo에서는 가장 基本的인 抗癌 스크린 方法인 sarcoma-180을 이용하여 生存比를 測定하였는데, 平均 生存日數에서 對照群의 MST는 14.4일, KBIT 投與群은 20.4일로 나타나, T/C%는 141.6%로 나타났다(Table 5).

以上的 結果로 보아 加味補中益氣湯의 抗癌 및 抗轉移 效果가 認定되며, 이러한 抗腫瘍 效果는 直接的인 細胞毒性和 더불어 多樣한 轉移抑制 作用에 의한 것으로 思料된다.

결론

加味補中益氣湯의 抗腫瘍效果를 實驗的으로 研究하여 다음과 같은 結論을 얻었다. 數種 癌株에 對한 細胞毒性은 P388, A549, B16-F10 癌株에 대하여 1mg/ml 濃度에서 30% 以上 細胞毒性을 나타내었고, A549 癌株에 對한 附着 阻止效果에서는 44%의 有意性있는 附着 阻止效果를 나타내었으며, DNA topoisomerase I assay에서는 酵素의 活性를 濃度依存的으로 抑制하였다. B16-BL6에 의한 肺臟內 癌柱(colony) 形成 抑制效果에서는 對照群에 비해 22%의 抑制效果를 나타내었고, CAM assay에 의한 血管形成 抑制效果에서는 對照群에 비해 40% 抑制效果를 나타내었으며, S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 141.6%로 나타났습니다.

이상의 結果를 보아 加味補中益氣湯 癌治療 및 轉移 豫防에 活用 可能할 것으로 思料된다.

감사의 글

본 과제는 한방치료기술 과제(01-PJ9-PG1-01CO05-0004)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 서울대학교의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울大學校出版部, p.137, pp.1-3, 214- 215, 225-234, 1989.

2. 김정순 : 우리나라 사망원인의 변천과 현황, 대한의학협회지 36(3) : pp. 271-284, 1993.
3. 孫泰重 篇 : 병리학개론, 서울, 고문사, p.227, 1979.
4. 김원동 : 99 내과학의 최신지견, 한국의학, p.213, 214, 1999.
5. 나기환 : 활락효령단이 angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
6. 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.
7. 厲暢 : 癌의 中醫治療, 東洋醫學, 18(1), p.56, 1997.
8. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京出版社, p.1, 2, 1988.
9. 田炳旭, 柳逢夏 外 : 癌에 對한 韓醫學의 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.
10. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 花聯出版社, pp.1-10, 1986.
11. 許占民 : 中醫大辭典, p.274, 1980.
12. 이동완 : 補中益氣湯의 抽出에 關한 研究, 경희대학교 석사학위논문, 1985.
13. 이상일 : 補中益氣湯의 效能에 關한 實驗的 研究, 경희대학교 박사학위논문, 1983.
14. 金泰燁 : 補中益氣湯의 항스트레스 效能에 對한 實驗的 研究, 경희대학교 석사학위논문, 1990.
15. 李宇彬 外 : 補中益氣湯對 cyclophosphamide 抗癌活性和毒性的影響, 中藥雜誌 3卷, p.50, 1989.
16. 金秀眞 : 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1993.
17. 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.
18. 李岩 著 : 腫瘤臨證備要, 人民衛生出版社, pp.356-366, 1996.
19. 申載鏞 : 方藥合編解說, 成輔社, p.516, 1989.
20. Cole S., P. : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer chemotherapy and Pharmacology, 17(3), pp.259-263, 1986.
21. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay(MTT) versus a protein assay(SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, p.2418, 1989.
22. 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.
23. 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
24. Humphries. M. J., Matsumoto. K., White. S. L., and Olden. K. : Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhbits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, pp.1752-1756, 1986.
25. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, Pharmac., Ther., Vol.51, pp.1-11, 1991.
26. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
27. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著 : 本草學, 永林社, pp.149, 151, 212, 223, 347, 385, 414, 419, 531, 534, 536, 540, 578, 1991.
28. Liu, L. F. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.371-389, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
29. Higgins, N. P., Ferro, A. M. and Olivera, B. M. : In DNA Topolgy and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.361-370, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.