

舌魚消腫湯이 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 영향

손기정 · 박양춘*

대전대학교 한의과대학 내과학교실

Study on Antitumor Activity and Immunomodulatory effects of Seoleosojong-tang

Ki Jeong Son, Yang Chun Park*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Taejon University

In order to evaluate the antitumor activity and immunomodulatory effects of Seoleosojong-tang(SST), studies were done. We measured the cytotoxic activity for various kinds of cancer cells, inhibitory effect on activity of DNA topoisomerase I, cell adhesion to complex extracellular matrix, survival time in ICR bearing S-180, pulmonary colonization and histological changes of lung in C57BL/6 injected i.v. with B16-F10, CAM assay, expression of CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, cytokine gene in spleen cell. The results were obtained as follows : 1. In cytotoxicity against A549, HT1080, B16-F10, NCL-H661 was showed cytotoxicity as compared with control. 2. The inhibitory effect on adhesion of A549, B16-F10 to complex extracellular matrix was over 40% at 100 μ g/ml of SST. 3. In DNA topoisomerase I assay, SST has inhibitory effect. 4. The T/C% was 120.8 in SST treated group in S-180 bearing ICR mice. 5. In pulmonary colonization assay, a number of colonies were decreased significantly and histological changes were showed that infiltration area of cancer cells were inhibited effectively in SST treated group. 6. In CAM Assay, SST has antiangiogenic effect. 7. On the expression of positive cell to CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ in spleen cells, CD4⁺ cells were increased significantly in SST treated group. 8. Effect of SST on IL-1 β gene expression in splenic cell was significantly increased as function of whole concentration. 9. The gene expression of IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α were increased in SST treated group. From above results SST could be usefully applied for antitumor activity and immunomodulatory effects, but further research of SST should be required.

Key words : Seoleosojong-tang(舌魚消腫湯), antitumor activity, immunomodulatory effects, cytotoxicity

서론

腫瘍은 非正常的인 細胞分裂를 통해 形成된 細胞塊로, 이 중 빠른 成長, 浸潤性 成長, 體內 各 部位에의 擴散 및 轉移를 特徵으로 하는 惡性 腫瘍을 癌이라고 일컫는다¹⁾. 癌은 現在 國內 死亡 原因中 1位의 疾患이며 最近 10年間 人口 10만명당 死亡率이 가장 높고 증가한 疾患이다. 특히 肺癌은 各種 癌 가운데 가장 높은 死亡率을 보이고 있다²⁾.

西洋醫學에서 癌의 治療法으로는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등³⁾이 있으며 韓醫學에서는 韓藥 또는 藥

針療法으로 抗癌·抗轉移^{4~6)} 및 抗癌劑 副作用 抑制效果^{7~9)} 등을 檢討하는 많은 實驗 研究가 進行되고 있다. 韓醫學에서 癌의 治療는 扶正培本法과 祛邪法 및 이 두 가지 方法을 配合한 扶正祛邪法 등으로 區別할 수 있는데 이 중 扶正培本法의 一種인 養陰生津法은 手術療法, 放射線療法, 化學療法의 副作用 또는 末期患者의 感染發熱 등으로 造成된 陰津損傷의 狀態를 恢復시키는 治法으로 肺陰虛型 肺癌의 治療에도 適用되고 있다^{10~11)}.

舌魚消腫湯은 大田大學校附屬韓方病院 肺系內科學教室에서 肺陰虛型 肺癌에 사용하고 있는 處方으로 清熱利濕, 解毒消腫하는 白花蛇舌草와 清熱解毒, 消腫排膿, 利尿通淋하는 魚腥草를 君藥으로하여 養陰潤燥生津하는 菁蒿, 鱉甲, 地骨皮, 麥門冬, 百合과 祛陰除濕 利水消腫하는 秦艽, 利水滲濕, 健脾寧心하는 茯苓, 潤肺下氣止咳하는 百部根으로 構成되어 있다^{12~13)}.

* 교신저자 : 박양춘, 청주시 상당구 용담동, 대전대부속 청주한방병원
· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr · Tel : 043-229-3705
· 접수 : 2003/11/13 · 수정 : 2003/12/05 · 채택 : 2004/01/12

이에 著者は 舌魚消腫湯의 抗癌 · 抗轉移 效果를 檢索하고자 數種의 癌細胞에 對한 細胞毒性效果, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 對한 附着阻止 效果, sarcoma 180에 對한 生存比, 血管形成 抑制效果, pulmonary colonization 및 組織變化 등을 測定하였고, 免疫調節 效果를 살펴보고자 脾臟細胞에서 流細胞 分析, cytokine 遺傳子 發顯 分析 등을 測定하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

動物은 雄性 4週齡의 18~20g ICR(International Cancer Research, U.S.A), BALB/C 및 C57BL/6 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2 주일간 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 약재

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 使用하였으며, 舌魚消腫湯(以下 SST)의 處方 內容과 1貼의 分量은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of Seoleosojong-tang

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
白花蛇舌草	<i>Oldenlandiae Diffusae Herba</i>	20.0
魚 腥 草	<i>Houttuyniae Herba</i>	20.0
青 蒿	<i>Artemisiae Annuae Herba</i>	8.0
龍 甲	<i>Trionycis Carapax</i>	6.0
地 骨 皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	6.0
秦 艽	<i>Gentianae Macrophyllae Radix</i>	6.0
茯 苓	<i>Poria</i>	6.0
麥 門 冬	<i>Liriois Tuber</i>	6.0
百 部 根	<i>Stemonae Radix</i>	6.0
百 合	<i>Lilii Bulbus</i>	6.0
總 量		90.0

3) 試藥 및 器機

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), HBSS(Hank's balanced salt solution), glycerol, bromophenol blue, Tris base, boric acid, agarose, sodium dodecylsulfate(SDS), trypsin-EDTA, sulforhodamine-B(SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxid, formaldehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol(이상 Sigma), ethanol, HCl(Merck), sodium bicarbonate(Gibco), glacial acetic acid(덕산), DNA topoisomerase I, pBR322 DNA(Takara), 수정란(풀무원), intralipose(녹십자), Tissue culture coverslip(Nunc) 등을 使用하였다.

器機는 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), flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A), rotary vaccum evaporator(Büchi 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 μg, Falcon) 등을 使用하였다.

2. 방법

1) 試料의 調製

上記한 舌魚消腫湯(SST) 2貼 分量을 각각 대응약탕기에 넣고 蒸溜水 1,200ml와 함께 넣은 다음 3시간 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vaccum 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 SST 44.3g의 粉末을 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(0.22 μm, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 肺癌株 A549(ATCC CCL185), HT1080(ATCC CCL), B16-F10(ATCC CRC 6322), NCL-H661(KCTC HCC 18402)를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640培地에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10만 units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO₃ 2g을 添加하여 製造하였다.

3) A549, HT1080, B16-F10, NCL-H661 癌株에 對한 細胞毒性 測定

A549, HT1080, B16-F10, NCL-H661癌株에 對한 細胞毒性 測定은 1989년에 미국의 국립암연구소에서 藥物의 in vitro 抗癌活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B (SRB) 法¹⁴⁾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 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 後, medium에 濃度別(1, 10, 100 μg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 200 μl 씩 넣어주고 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 加하기 전에 0.22 μm 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, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 μl 씩 加하여 4℃에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 後 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 μl의 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, control의 O.D.(optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(흡광도) 값이 되도록 일정량의 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 加 할때의 細胞數(Tz)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 加하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 각 濃度의 藥物과 함께 48時間 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, $Tz \geq T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/(C-Tz) \times 100$ 의 數式으로 計算하였고, $Tz < T$ 인 경우에는 $(T-Tz)/Tz \times 100$ 의 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 각 藥物의 細胞毒性 程度를 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($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 주어지며, 미국립암연구소인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 방법¹⁵⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 각 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)
C₀ = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

각각 濃度의 Y(%)값과 Log10 dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 각각의 濃度에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 50%보다 작으면 再 實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이때, N=number of points selected [\leq number of dose level & 2]
X_i = log dose i, Y_i = growth ratio calculated dose i

여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선 $Y = A + BX$ 를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED50값을 計算하였다.

$$50 = A + B (\log_{10} \text{ED}_{50})$$

$$\log_{10} \text{ED}_{50} = (50 - A) / B$$

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 合成物인 경우 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下일 경우 抗癌 作用이 있다고 規定¹⁸⁾하고 있다.

4) DNA topoisomerase I assay¹⁷⁾

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서,

pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 由來된 것으로 topoisomerase I 阻害 IC50값을 決定하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topoisomerase I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法¹⁸⁾에 따랐다. 즉, 50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum albumin, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液을 20 μl 가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料을 加하여 總 反應液을 20 μl 가 되게 한 것을 試驗群으로 하여 이들을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30分間 培養하였다. 反應은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 包含하는 溶液 5 μl 를 添加하여 反應을 終結시키고, 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 平衡된 1% agarose gel에 電氣영동을 한 후 agarose gel을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide溶液에서 1시간 동안 染色, 紫外線 下에서 사진을 찍은 다음 scanner를 使用하여 活性 밴드를 測定했다. 이때 topoisomerase I의 1unit는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30分間 反應시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 量을 의미한다.

5) A549, B16-F10 癌株의 附着阻止 作用 測定^{19,20)}

A549, B16-F10 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 각 well에 100 μl 씩 加한 (5×10^4 cells/well) 후 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度의 試料을 녹인 培地 100 μl 를 加하고 5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 培養하였다. 4時間 후 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¹⁴⁾에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

6) S-180 癌細胞에 대한 生存比 測定

ICR 생쥐의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 取하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400 $\times\text{g}$ 로 2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 浮游시켜 다시 遠心分離하여 上澄液을 除去한 후 混在된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 후 hemacytometer로 세어 10⁷ 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 24時間부터 각 群을 8마리로 配定하였다. 試料 14.8mg/20g을 生理食鹽水 0.2ml에 녹여 經口로 10日間 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 生存比(T/C%)는 미국립암연구소 protocol에 言及된 式²¹⁾에 따라 計算하였다.

$$T/C(\%) = \frac{\text{MST}(\text{mean survival time}) \text{ of sample group}}{\text{MST}(\text{mean survival time}) \text{ of control group}} \times 100$$

7) 肺癌 轉移抑制 作用

① Pulmonary colonization 測定²²⁾

In vitro에서 계대배양한 B16-F10(ATCC CRC 6322) 肺癌細胞를 實驗에 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. 검액은 B16-F10 癌細胞를 移植한 후 24시간부터 1일 1회씩 14.8mg/20g/day의 시료를 生理食鹽水 0.2ml에 녹여 10일간 매일 zonde를 사용하여 經口 投與하였다. 癌移植 15일 후에 cervical dislocation으로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony數를 測定하였다.

② B16-F10에 의한 肺臟 組織 變化 測定

B16-F10을 尾靜脈 注射하고 1일 1회 14.8mg/20g/day의 시료를 10일간 經口 投與한 후 C57BL/6 생쥐를 21일째 희생시켜 肺臟에 轉移된 黑色腫을 관찰한 후, 10% 중성 formalin에 고정된 후 切斷하여, 흐르는 물에 8시간 씻어 아래 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 포매하였다. 이것을 다시 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 하였다. 주사전자 현미경 관찰은 肺 組織을 摘出 즉시 2.5% glutaraldehyde(0.1M PBS, pH7.4)가 포함된 고정액 상에서 1.5mm³ 크기로 細切한 다음 3시간 동안 고정된 다음 인산 완충액에 洗滌하여 1% OsO₄에 2시간 동안 고정하였다. 고정이 완료된 組織은 알코올 농도 상승순으로 脫水하고 isoamyl acetate에 置換한 다음 임계점 건조기에서 CO₂로 건조시켰다. 건조된 조직은 이온 증착기를 이용하여 500nm 두께로 금을 증착하여 주사전자현미경(Hitach S-2500, Japan)하에서 관찰 및 사진 촬영하였다. 투과전자현미경적 관찰은 절개된 肺 組織을 1mm 크기로 細切한 다음 2.5% glutaraldehyde(in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 : PBS)에 4℃에서 30분간 고정된 다음 진공펌프를 이용하여 肺組織內 잔류 공기를 제거하였다. 다시 새로운 고정액을 이용하여 동일 조건에서 2시간 동안 전고정하고 PBS로 충분히 洗滌한 다음 1% OsO₄에 2시간 후 고정하였다. 고정이 완료된 組織은 PBS로 洗滌 후 脫水 과정으로 50% 알코올에서 농도 상승순으로 脫水하고 propylene oxide에 置換하여 epoxy 혼합물에 浸透 및 포매하여 37℃에서 12시간, 45℃에서 12시간 그리고 60℃에서 48시간 동안 각각 熱重合과정을 거쳐 블럭을 制作하였다. 각 制作된 블럭은 유리칼을 이용하여 초박절편기 (ultramicrotome)에서 0.5 μ m두께로 切片을 만들어 1% toluidine blue 溶液에 染色하여 光學顯微鏡上에서 觀察 부위를 선정한 다음 diamond knife를 이용하여 다시 60~70nm 두께로 초박 切片을 만들어 gride에 부착하였다. 染色으로는 6% uranyl acetate 溶液에 20분간 染色 후 蒸溜水로 洗滌하고, 乾燥한 다음 다시 lead citrate 溶液에 6분간 電子染色하여 蒸溜水로 洗滌하고 乾燥하여 加速電壓 75Kv에서 透過電子顯微鏡(Hitach-H600, 일본)으로 관찰하였다.

8) 血管 形成 抑制作用 測定(Chorioallantoic membrane assay: CAM)^{23,24)}

-1일째(0日胚) : 受精卵를 incubator에서 孵化시켰다. 이 때 incubator의 溫度는 37~38℃, 濕度는 90% 이상 維持되도록 수시로 확인하였다. 여기에서 0일 排卵 受精卵이 産卵되어 18℃에서 보관된 지 3~4일 이내의 것을 말한다.

-3일째(2日胚) : 受精卵의 靑쪽한 끝 부분에 칼로 홈을 낸 후 水平으로 窪어놓고 5ml 주사기로 구멍을 낸 다음 알부민을 3~5

ml 정도 뽑아내었다. 受精卵이 乾燥되지 않고 또 感染되지 않도록 구멍을 유리 테잎으로 봉한 후 구멍이 아래로 향하도록 놓고 다시 培養시켰다.

-4일째(3日胚) : 受精卵의 air sac이 있는 쪽(주사기 구멍의 반대 쪽)으로 直徑 2~3cm 크기의 圓形 window를 내고 受精卵으로 확인된 것만 넓은 유리 테잎으로 막고 다시 培養시켰다. 참고로 圓形 window를 내는 방법은 날카로운 칼로 受精卵의 겹질 위에 圓形으로 홈을 낸 뒤 핀셋으로 겹질을 뜯어내었다. 이때 겹질이 루가 안쪽으로 떨어지지 않도록 주의하였다. 受精卵이란 window를 냈을 때 십자가형의 가는 혈관이 보이는 것을 의미한다.

-5일째(4.5日胚) : 이 시기가 되면 CAM이 생성되며, 그 直徑이 2~5mm 정도 된다. 샘플을 적당한 溶媒(물, 에탄올)에 녹인 다음 4등분된 thermanox coverslip 위에 10 μ l씩 떨어뜨리고 clean bench안에서 말렸다. 여기에 thermanox coverslip은 가위로 잘라 4등분하여 clean bench안의 UV 아래에서 overnight시켰다. 受精卵의 유리 테잎을 칼로 뜯어내고 CAM을 찾아 확인한 후 핀셋으로 샘플이 처리된 thermanox를 뒤집어 조심스럽게 올려놓고 다시 유리 테잎으로 막았다. 이때 사용하는 가위, 칼, 핀셋 등은 70% 에탄올로 消毒하여 使用하고, 핀셋은 샘플을 하나하나 loading할 때마다 消毒하여 使用하였다. 기타 實驗器具들도 受精卵이 感染되지 않도록 主意하면서 使用하였다.

-7일째(6.5日胚) : 유리 테잎을 칼로 뜯어내었다. 주사기로 intralipose (fat emulsion)를 1ml 取하고, 氣泡를 제거한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 注入한다. 이때 흰색 바탕에 뚜렷한 血管을 觀察할 수 있었다. 주사기로 intralipose로 注入할때는 血管이 다치지 않도록 주의하였다. 觀察이 끝난 受精卵은 카메라로 近接 撮影하였다.

9) 脾臟 免疫細胞에 미치는 效果 測定

BALB/C 생쥐를 cervical dislocation으로 致死시킨 後 脾臟을 摘出하여 脾臟細胞를 각각 分利하여 PBS로 3회 水洗 後 Mesh Screen(Sigma, USA) 위에 올려놓고 가위와 유리봉을 使用하여 脾臟細胞를 分離하고 RPMI 培養液를 添加하여 細胞 懸濁液을 만들었다. 이 懸濁液을 4℃에서 10분간 定置한 후 上層液을 取하고 3회 水洗하여 組織 切片과 細胞 덩어리를 除去하고, RBC lysis 溶液(sigma,USA) 2ml을 넣고 37℃ water bath에서 5분간 放置한 후 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2000rpm에서 10分間 遠心 分離하여 脾臟細胞를 回收하여 培地로 3회 水洗 後 細胞 숫자를 1×10^6 cells로 計數하였다

脾臟細胞는 각각 4℃에서 免疫 螢光染色(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD19, FITC-anti-NK cells/2B4를 넣고 30분간 얼음에서 反應시켰다. 反應 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 水洗한 후 flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A.)로 分析하였다. 脾臟細胞 分析은 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD4⁺, CD8⁺과 B220⁺(positive cell)의 比率(gated, %)을 算出하였다.

10) 脾臟細胞內 cytokine 發顯 測定

정상 BALB/C 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟 細胞를 分利한

후 RPMI-1640培養液에서 1시간 동안 培養한 후 SST(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 처리하고 3시간 동안 incubator(37 $^{\circ}$ C, CO₂, Napco, USA)에 培養하였다. 培養終了後 上層液을 除去한 後 RNAzolB를 利用하여 細胞膜을 터트린 後 RNA를 抽出하는 方法을 擇하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

성 적

1. A549 癌株에 對한 細胞毒性

A549 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 90.38 \pm 3.44, 86.08 \pm 8.08, 64.51 \pm 1.09%의 細胞生存率이 나타나 濃度依存的으로 細胞毒性的 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞毒性效果가 나타났다 (Table 1).

Table 1. Cytotoxic Effect of Seoleosojong-tang on A549 Cells

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	102.02 \pm 5.11 ^{a)}
1	90.38 \pm 3.44
10	86.08 \pm 8.08
100	64.51 \pm 1.09

a) : Mean \pm standard error. : 30% 이상 細胞毒성을 나타낸 濃度.
Control : Non-treated group. 1 : 1 μ g/ml of SST treated group.
10 : 10 μ g/ml of SST treated group. 100 : 100 μ g/ml of SST treated group.

2. HT1080 癌株에 對한 細胞毒性

HT1080 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 94.45 \pm 3.16, 87.01 \pm 5.48, 63.33 \pm 1.09%의 細胞生存率이 나타나 濃度依存的으로 細胞毒性的 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞毒性效果가 나타났다 (Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of Seoleosojong-tang(SST) HT1080 Cells

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	100.0 \pm 3.40 ^{a)}
1	94.45 \pm 3.16
10	87.01 \pm 5.48
100	63.33 \pm 1.09

Control, 1, 10, 100은 Table 1 과 상동

3. B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性

B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 98.19 \pm 0.94, 83.19 \pm 1.38, 51.23 \pm 2.29%의 細胞生存率이 나타나 濃度依存的으로 細胞毒性的 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞毒性效果가 나타났다 (Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of Seoleosojong-tang(SST) on B16-F10 Cells

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	100.0 \pm 1.07 ^{a)}
1	98.19 \pm 0.94
10	83.19 \pm 1.38
100	51.23 \pm 2.29

Control, 1, 10, 100은 Table 1 과 상동

4. NCL-H661 癌株에 對한 細胞毒性

NCL-H661 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 96.82 \pm 3.73, 88.45 \pm 3.16, 44.27 \pm 0.10%의 細胞生存率이 나타나 濃度依存的으로 細胞毒性的 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞毒性效果가 나타났다 (Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of Seoleosojong-tang on NCL-H661 Cells

Concentration(μ g/ml)	Percent of control	
	SST	
Control	100.0 \pm 1.12 ^{a)}	
1	96.82 \pm 3.73	
10	88.45 \pm 3.16	
100	44.27 \pm 0.10	

Control, 1, 10, 100은 Table 1 과 상동

5. DNA topoisomerase I에 미치는 影響

50mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 5mM Spermidine, 0.01% Bovine serum album, 0.5 μ g pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液을 20 μ l가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料을 加하여 總 反應液을 20 μ l되게 한 것을 實驗群으로 하여 活性를 測定했다. 電氣泳動을 實施하여 寫眞 撮影한 結果 Fig. 5에서 보는 바와 같이 DNA만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topoisomerase I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다. 이에 比해 實驗群은 10, 50, 100, 500 μ g/ml 濃度에서 濃度依存的으로 topo-1의 活性를 抑制하였고 IC₅₀은 50~100 μ g/ml에서 나타났다(Fig. 5).

6. A549 癌株의 附着 阻止效果

A549 癌株에 對한 細胞 附着 阻止 效果에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 91.52 \pm 3.48, 68.4 \pm 1.26, 46.57 \pm 2.18%로 나타나 濃度依存的으로 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞附着 阻止의 效果가 나타났다(Table 5).

Table 5. Inhibitory Effect of Seoleosojong-tang on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(μ g/ml)	Percent of control
Control	100.0 \pm 3.40 ^{a)}
1	91.52 \pm 3.48
10	68.4 \pm 1.26
100	46.57 \pm 2.18

1, 10, 100은 Table 1 과 상동

7. B16-F10 癌株의 附着 阻止效果

B16-F10 癌株의 細胞附着 阻止 實驗에서는 1, 10, 100 μ g/ml 濃度에서 對照群에 比하여 각각 94.62 \pm 1.54, 79.83 \pm 3.17, 53.83 \pm 2.06%로 나타나 濃度依存的으로 效果를 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 細胞附着 阻止의 效果가 나타났다.

8. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 影響을 測定하였던 平均 生存日數(MST: mean survival time)에서 對照群은 16.85日, 實驗群은 20.28일로 나타나, 生存比는 120.7%로 나타났다.

9. 肺癌 轉移 抑制에 미치는 效果

1) Pulmonary colonization 測定

B16-F10 黑色腫을 C57BL/6 생쥐의 尾靜脈에 注射한 후 10 일간 藥物을 投與하면서 14일째 肺組織을 꺼내 colony 수를 觀察하고 각각을 포르말린에 넣어 固定시킨후 組織狀態를 觀察하였다. 對照群은 35.3개의 colony 수를 觀察한대 比하여 藥物投與群은 20.8로 肺癌轉移의 抑制效果를 보였다.

2) B16-F10에 의한 肺臟 組織 變化 測定

① 對照群

對照群의 肺組織 觀察所見으로 轉移된 癌細胞들이 肺胞間 中膈의 基質에서 小數의 細胞로 散在되어 나타나기도 하고 일부는 增殖을 통해 集團化(colony)를 形成하여 肺胞間 中膈, 肺動脈, 肺靜脈 및 末端 細氣管支 周邊의 廣範圍한 部位에서 癌細胞腫塊가 觀察되었다. 일부 血管과 末端 細氣管支 周邊의 癌細胞들은 成長하여 血管이나 細氣管支 內腔을 壓迫하기도 하였다. 또한 肺 外膜(serosa)에서도 局所的으로 1~5층으로 轉移 癌細胞가 成長하여 外觀上 멜라닌 색소에 의해 검게 觀察되었다(Fig. 1).

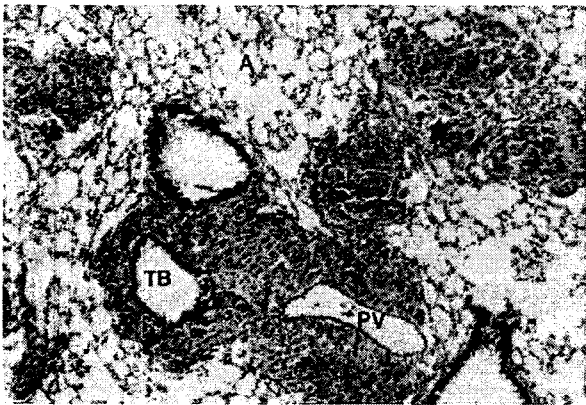


Fig. 1. Light micrographic appearance of the lung, the control group. H&E, X100, A : alveolar. TB : terminal bronchiole. PV : pulmonary vein.

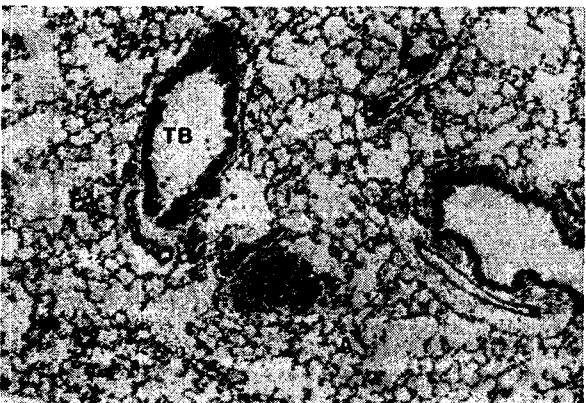


Fig. 2. Light micrographic appearance of the lung, low dose(14.8mg /20g/day) treatment group. H&E, X100, A, TB, PV는 Fig. 10과 상동

② 低濃度 投與群

低濃度(14.8mg/20g/day) 投與群에서는 癌細胞들의 成長이 顯著히 減少하였다. 일부 癌細胞들은 肺胞가 中膈의 一部 基質에서

集團化를 보였고 數的으로도 對照群에 비해 減少하였다. 또한 對照群과 달리 血管이나 末端 細氣管支 周邊에서는 癌細胞의 成長도 減少하였다. 癌腫塊의 周邊에서는 림프구의 浸潤이 增加하였다(Fig. 2).

③ 高濃度 投與群

高濃度(29.6mg/20g/day) 投與群에서도 低濃度群과 類似한 所見으로 癌細胞의 增殖과 集團化 정도는 對照群에 비해 減少하였고, 低濃度群과의 差異는 觀察되지 않았다. 對照群에서는 小數의 림프구가 癌細胞 周邊에서 觀察되나 藥物 投與群에서는 集團化를 形成하는 癌細胞들 사이와 周邊 血管에서 림프구의 浸潤이 增加하였다(Fig. 3).

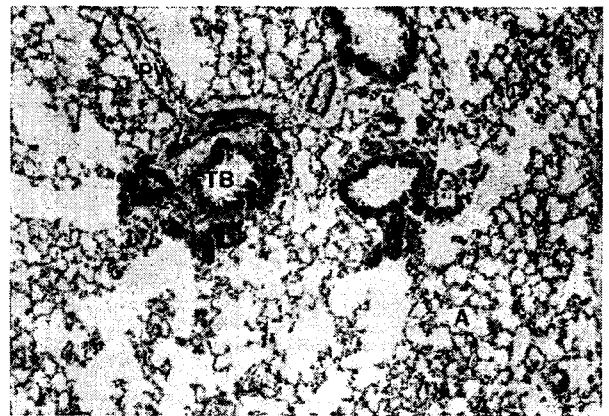


Fig. 3. Light micrographic appearance of the lung, high dose(29.6mg /20g/day) treatment group. H&E, X100, A, TB, PV는 Fig. 1과 상동

10. 血管形成 抑制效果

7日 동안 incubator에서 부화된 受精卵의 intralipose를 注射器로 1ml 취하여 氣泡를 除去한 뒤 CAM의 바로 아래 부분에 注入하여 血管을 觀察하였다. 對照群은 10개중 1개의 血管形成 抑制效果가 觀察되었음에 比하여 藥物投與群은 10개중 6개의 血管形成 抑制效果를 보였다(Table 6, Fig. 4).

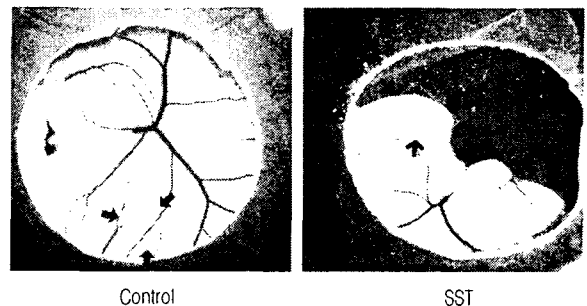


Fig. 4. Antiangiogenic activity of Seoleosojong-tang(SST) in a CAM assay. Control : Saline treated group. SST : Seoleosojong-tang treated group.

11. 脾臟 免疫細胞에 미치는 效果

1) CD4⁺ 細胞 數의 變化

脾臟細胞중 CD3e⁺CD4⁺의 效果에서 活性流細胞(% positive cell to)는 對照群이 17.1±2.30이고 SST 投與群은 23.1±1.2로 對照群에 比하여 有意性있는(p<0.05) 增加를 보였다(Table 7).

2) CD8⁺ 細胞 數의 變化

脾臟細胞중 CD3e⁺CD8⁺의 效果에서는 活性流細胞(% positive cell to)는 對照群이 7.2±0.4이고 SST 投與群은 8.4±0.7로 對照群에 比하여 增加를 보였다(Table 7).

3) B220⁺ 細胞 數의 變化

脾臟細胞중 B220⁺의 效果에서 活性流細胞(% positive cell to)는 對照群이 20.1±1.0이고 SST 投與群은 19.7±1.9로 對照群에 比하여 小幅의 減少를 보였다(Table 7).

Table 7. Effect of Seoleosojong-tang(SST) on the Splenic Leucocytes of BALB/C Mice

Group	% Positive Cell to		
	CD4	CD8	B220
Control	17.1±2.3a)	7.2±0.4	20.1±1.0
SST	23.1±1.2*	8.4±0.7	19.7±1.9

12. 脾臟細胞內에 cytokine 發顯에 미치는 效果

1) IL-1β 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IL-1β 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 118 이었고, conA 處理한 對照群에서는 131, LPS를 處理한 對照群에서는 146이었으며, 다양한 濃度の 實驗群(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果 136, 126, 122로 모든 實驗 濃度에서 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 8).

Table 8. The Effect of Seoleosojong-tang on the IL-1β Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IL-1β(Ht)	118	131	146	136	126	122

2) IL-4 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IL-4 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 111이었고, conA 處理한 對照群에서는 159, LPS를 處理한 對照群에서는 145이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果 150, 129, 120으로 모든 實驗 濃度에서 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 9).

Table 9. The Effect of Seoleosojong-tang on the IL-4 Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IL-4(Ht)	111	159	145	150	129	120

3) IL-6 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IL-6 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 10³이었고, conA 處理한 對照群에서는 177, LPS를 處理한 對照群에서는 163이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果는, 153, 107, 91로 10 μg/ml 이상의 濃度에서 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 10).

Table 10. The Effect of Seoleosojong-tang on the IL-6 Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IL-6(Ht)	103	177	163	153	107	91

4) IL-10 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IL-10 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 144 이었고, conA 處理한 對照群에서는 183, LPS를 處理한 對照群에서는 193이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果는 159, 147, 155로 모든 實驗 濃度에서 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 11).

Table 11. The Effect of Seoleosojong-tang on the IL-10 Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IL-10 (Ht)	144	183	193	159	147	155

5) IL-12 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IL-12 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 115 이었고, conA 處理한 對照群에서는 157, LPS를 處理한 對照群에서는 156이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果 112, 104, 92로 正常群에 比하여 큰 變化가 나타나지 않았다(Table 12).

Table 12. The Effect of Seoleosojong-tang on the IL-12 Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IL-12(Ht)	115	157	156	112	104	92

6) IFN-γ 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 IFN-γ 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 190 이었고, conA 處理한 對照群에서는 197, LPS를 處理한 對照群에서는 197이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果는 193, 189, 190로 100 μg/ml 濃度에서만 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 13).

Table 13. The Effect of Seoleosojong-tang on the IFN-γ Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
IFN-γ(Ht)	190	197	197	193	189	190

7) TNF-α 遺傳子 發顯에 미치는 效果

脾臟細胞에서 TNF-α 遺傳子 發顯은 正常群에서 Ht값이 138 이었고, conA 處理한 對照群에서는 168, LPS를 處理한 對照群에서는 161이었으며, 다양한 濃度の SST(100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml)을 處理한 結果는 175, 165, 112로 10 μg/ml 이상의 濃度에서 正常群에 比하여 遺傳子 發顯이 增加하였다(Table 14).

Table 14. The Effect of Seoleosojong-tang on the TNF-α Gene Expression in Particular Concentration

Expression	Normal	Con A	LPS	100μg/ml	10μg/ml	1μg/ml
TNF-α(Ht)	138	168	161	175	165	112

고 찰

腫瘍은 一般的으로 陽性과 惡性 腫瘍으로 區分하는데 陽性 腫瘍은 比較的 서서히 成長하며 轉移하지 않기 때문에 手術에

의해 治癒시킬 수 있다. 反面에 惡性 腫瘍은 빠른 成長을 主된 特徵으로 하며 周邊 組織에 대한 浸潤性 成長과 體內 各 部位로 의 擴散 혹은 轉移할 수 있는 能力을 갖고 있기 때문에 生命에 危險을 招來한다²⁵⁾ 肺癌은 吸煙 人구의 增加 및 産業化에 따라 우리 나라에서도 점차 發病率이 增加하고 있는 癌이며 또한 가장 致死率이 높은 癌으로 治療率이 10%정도이고 과거 10년간 治療方法의 改善이 거의 增進되지 않은 狀態에 있다³⁾.

西洋醫學에서 癌의 治療法으로는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 등³⁾이 있다. 이러한 治療法들은 그 有用性에도 불구하고 副作用을 가져올 수 있는데 化學療法는 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題가 되고, 手術療法는 轉移된 腫瘍의 治療에는 姑息의으로 應用될 수밖에 없고, 放射線療法는 轉移 腫瘍의 경우에는 適用이 制限의이면서 皮膚反應, 胃腸管 症狀, 骨髓抑制 등을 招來한다²⁶⁻³⁰⁾. 따라서 最近에는 韓藥 또는 藥針療法를 對象으로 抗癌·抗轉移 및 抗癌劑 副作用 抑制效果⁷⁻⁹⁾ 등의 效果를 檢討하는 많은 實驗 研究가 進行되고 있다.

韓醫學에서 癌의 治療는 扶正培本法, 祛邪法 및 扶正祛邪法 등으로 區別할 수 있는데 養陰生津法은 扶正祛邪法의 一種으로 手術療法, 放射線療法, 化學療法의 副作用 또는 末期患者의 感染發熱 등으로 造成된 陰津損傷의 狀態를 恢復시키는 治法으로 肺陰虛型 肺癌의 治療에 適用되고 있다¹¹⁾. 肺癌은 韓醫學에서 肺積, 肺疝, 肺痿, 肺癰, 痰癖 등의 病證과 類似하며³¹⁾, 肺臟虛弱한데 痰濁邪熱이 蘊肺하여 氣滯血瘀하게 되어 肺臟에 積塊를 形成하여 發生한다³²⁻³³⁾. 이에 著者는 大田大學校 韓醫科大學 肺系內科學教室에서 肺陰虛型 肺癌에 사용하고 있는 舌魚消腫湯의 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響을 實驗的으로 糾明하고자 하였다.

舌魚消腫湯을 構成하고 있는 藥物의 抗癌作用에 대한 研究로는 白花蛇舌草에 대하여 김 등³⁴⁻³⁵⁾은 白花蛇舌草의 핵산分劃과 多糖體가 抗癌 및 抗轉移 活性에 미치는 影響과 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用에 대하여 報告하였다. 魚腥草에 대하여 배 등³⁶⁾은 魚腥草藥鍼이 B16 黑色腫 癌모델에 대한 抗腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響을 報告하였고, 茯苓에 대하여 Ukiya 등³⁷⁾과 Kaminaga 등³⁸⁾은 茯苓이 유도된 腫瘍助長의 抑制와 抗癌效果에 미치는 影響을 報告하였고, Tseng 등³⁹⁾은 茯苓이 TNF-alpha, IL-1β, IL-6, GM-CSF의 分泌에 미치는 影響을 報告하였으며, 麥門冬에 대하여 백⁴⁰⁾은 麥門冬 스테로이드 사포닌의 癌細胞生長抑制活性을 報告하였다.

抗腫瘍效果를 크게 癌細胞에 대한 細胞毒性效果와 抗轉移效果로 나누어 實驗 하였는데, 먼저 舌魚消腫湯의 細胞毒性에 대하여 살펴보면 인간의 肺癌株인 A549 癌株, HT1080 癌株, B16-F10 癌株, NCL-H661 癌株에 대한 세포독성은 모두 100μg/ml의 濃度에서 30%이상 細胞毒性 效果를 나타내었다(Table 1~4).

이는 A549 癌株에 대한 細胞毒性 效果에서 왕 등⁴²⁾의 桔梗解毒湯, 박 등⁹⁾의 加味沙蔘麥門冬湯을 대상으로 한 研究에서 100 μg/ml의 濃度에서 細胞毒性을 보이지 않았고, 조⁴²⁾의 桃紅四物湯加減方, 김⁴³⁾의 加味君子地黃湯을 대상으로 한 研究에서 각각 400μg/ml 이상의 濃度에서 30% 이상의 細胞毒性을 보인 것과 비

교하여 상대적으로 높은 細胞毒性 效果를 보였다고 할 수 있다.

DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 至大한 影響을 미친다. 즉, DNA topoisomerase는 DNA의 supercoiling state를 調節하므로써 複製, 轉寫 등의 initiation의 效率性에 影響을 주며, 이러한 過程들이 進行되는 段階에서 發生되는 DNA topological 問題를 解決해 준다. 이와 같이 DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 여러 機能에 必須的으로, 그들의 抑制劑는 抗生, 抗癌劑 開發의 目標가 되고있다⁴⁴⁾.

이에 舌魚消腫湯을 利用한 topoisomerase I assay에서 DNA 만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 1 unit topoisomerase I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었으나, 이에 比해서 舌魚消腫湯으로 處理한 實驗群에서는 濃度依存的으로 酵素의 活性을 抑制하였다. 이같은 結果는 舌魚消腫湯이 topoisomerase I 活性 抑制效果를 통하여 癌細胞의 複製 및 轉寫를 抑制함으로써 抗癌效果를 나타낼 수 있을 것으로 보이나 個別藥物에 대한 檢討 역시 必要할 것으로 보인다. 또한 癌治療에 있어서 가장 큰 問題點으로 대두되고 있는 轉移를 效果的으로 抑制할 수 있는지를 評價하기 위하여 A549 癌株와 B16-F10 癌株의 複合細胞外基質에 대한 附着阻止 實驗에서 모두 100μg/ml의 濃度에서 40%이상 細胞附着阻止 效果를 나타내었다(Table 5).

A549 癌株를 대상으로한 조⁴²⁾, 김⁴³⁾의 研究에서 桃紅四物湯加減方, 加味君子地黃湯은 모두 100μg/ml의 濃度에서 30% 이상의 附着阻止 效果를 보였고, 박 등⁹⁾, 송 등⁵⁾의 研究에서 加味沙蔘麥門冬湯, 桂枝茯苓丸加味方이 모두 100μg/ml의 濃度에서 50% 이상의 附着阻止 效果를 보여 비슷한 細胞附着阻止 效果를 보였다.

S-180이 移植된 생쥐를 利用한 生存比 測定에서 對照群은 癌株 移植 後 平均 生存日數가 16.85일인데 비하여, 舌魚消腫湯 投與群은 20.28일로, 生存比(T/C%)가 120.7%로 나타나 微弱하게 生命을 延長하였다(Table 8, Fig 8).

기존의 研究에서 S-180이 이식된 생쥐의 생존비는 차⁴⁵⁾의 研究에서 百合固金湯, 百合固金湯加味方은 각각 123.8%, 119%이었고, 왕 등⁴²⁾의 研究에서 桔梗解毒湯은 123.7%이었고, 조⁴²⁾의 研究에서 桃紅四物湯加減方은 134.9%이었고, 김⁴³⁾의 研究에서 加味地黃湯, 加味四君子湯, 加味君子地黃湯은 각각 122.8%, 127.4%, 158.4%이었고, 박 등⁹⁾의 研究에서 加味沙蔘麥門冬湯은 122%이었고, 김 등⁴⁶⁾의 研究에서 木酢稀釋液(1%)은 113% 등으로 나타나 舌魚消腫湯의 生存比 延長效果는 높지 않았다.

B16-F10 黑色腫을 이용한 pulmonary colonization의 測定을 통한 實驗에서Theophylline, isothiocyanates, swainsonine 등이 轉移抑制 效果가 있다고 알려져 있다⁴⁷⁾. 본 實驗에서는 對照群은 癌株 移植 後 colony 수가 35.3±5.45개인데 비하여, 舌魚消腫湯 投與群은 20.8±3.81개(p<0.05)로 나타나 有意性 있는 肺癌轉移抑制 效果를 나타내었다.

B16-F10에 의한 肺臟 組織 變化 測定에서 對照群에서는 轉移된 癌細胞들이 肺胞間 中脈의 基質에서 小數의 細胞로 散在되어 나타나기도 하고 일부는 增殖을 통해 集團化(colony)를 形成

하여 肺泡間 中膈, 肺動脈, 肺靜脈 및 末端 細氣管支 周邊에 廣範圍하게 癌細胞腫塊가 觀察(Fig 1)되었으나, 低濃度(14.8mg/20g/day) 投與群에서는 癌細胞들의 成長이 顯著히 減少하였고 일부 癌細胞들은 肺泡가 中膈의 一部 基質에서 集團化를 보이며 數的으로도 對照群에 비해 顯著히 減少하였다(Fig 2). 高濃度(29.6mg/20g/day) 投與群에서는 癌細胞의 增殖과 集團化 정도는 對照群에 비해 顯著히 減少하였으나 低濃度群과의 有意한 差異는 觀察되지 않았다(Fig 3).

抗血管形成 研究에 널리 使用되고 있는 screening 方法으로 受精卵의 鷄胚(Chick embryo)의 絨毛尿膜(chorioallantoic membrane: CAM)을 이용한 絨毛尿膜 分析法(CAM assay)은 鷄胚의 發生 3~4日째에 生成되는 胚外膜(extraembryonic membrane)이 毛細血管과 다른 血管들을 뚜렷히 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 모델이다⁴⁶⁾. CAM assay를 통한 血管形成抑制 實驗에서 10개의 受精卵 中 6개에서 혈관형성을 억제하여 60%의 血管形成抑制 效果를 나타내었다(Fig 4).

細胞媒介免疫反應의 主要인 T 림프구는 T 세포수용체(T cell receptor, TCR)에 따라 TCR1과 TCR2로 나뉘며 TCR2를 가진 말초 T 細胞는 CD4와 CD8 분자 유무에 따라 구별하는데 즉 CD4⁺인 T 細胞는 보조 T 細胞이고 CD8⁺ T 細胞는 억제 T 細胞 또는 細胞毒性 T 細胞이다⁴⁹⁾. CD4⁺ 細胞는 抗原을 B 림프구에 傳達하여 抗體 生成을 誘發시키는 機能이 있으며, CD8⁺ 細胞는 癌細胞와 같은 非正常的인 細胞를 直接 除去할 수 있는 機能이 있는 것으로 알려져 腫瘍免疫에서 CD8⁺ 細胞에 초점이 맞추어져 있었으나 최근 MHC 第二抗原分子에 의해 제한되는 CD4⁺ 細胞에 인지되는 腫瘍抗原들이 밝혀져 CD4⁺ 細胞도 동등하게 중요하다는 증거들이 제시되고 있다⁵⁰⁾. B220⁺ 細胞는 apoptosis에서 중요한 역할을 하며, T 細胞가 活性化될 때 發顯이 야기되고, apoptosis의 과정에서 最高로 增加한다고 하였다⁵¹⁾.

本 實驗에서 流細胞 分析을 살펴보면 먼저 B220⁺는 少幅의 減少를 보였고, CD8⁺는 增加를 보였으나 CD4⁺만 對照群의 17.1±2.3(%)에 比하여 舌魚消腫湯 投與群은 23.1±1.2(%) (P<0.05)로 有意한 效果를 나타내었다(Table 7).

사이토카인은 免疫反應에 參與하는 細胞들이 分泌하는 分子량이 작은 蛋白으로 細胞間 刺戟의 傳達를 통하여 免疫 細胞의 成長과 分化에서 多様な 機能을 나타낸다. 바이러스나 변형된 癌細胞에 參與하는 免疫反應은 주로 CD8⁺ 細胞毒性림프구, NK 細胞, LAK 細胞에 의해 매개되며 이러한 細胞毒성을 活性化시키는 사이토카인에는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IFN 등이 있다⁵²⁾. 따라서 이러한 사이토카인들의 腫瘍免疫에서의 役割에 대한 研究과 더불어 臨床에 利用하려는 시도들이 이루어지고 있다⁵³⁾.

IL-1은 NK 細胞의 細胞破壞 活性을 增加시키고, 大食細胞의 細胞破壞 活性을 增加시킨다. 또한 Th 細胞를 活性化시켜 抗體媒介와 細胞媒介 免疫反應을 全般的으로 活性化시킨다. IL-4는 B 림프구와 大食細胞에서 IgE 受容體의 發顯을 誘導하여 免疫反應에 關與하여 처음에는 B 細胞成長因子라고 불렀으나 최근 다양

한 腫瘍에 대하여 抗腫瘍活性을 제공하는 것으로 알려졌으며 培養 乳房癌細胞에서 apoptosis를 유도한다고 하였다⁵⁴⁾. IL-6는 B 細胞分化에 關與하므로 B 細胞分化因子라고 불렀는데 癌患者의 營養狀態, 前立腺癌 등의 成長과 關聯이 있다고 하였다⁵⁵⁾. IL-10은 Th1의 IL-2와 IFN- γ 分泌를 抑制하고 肺癌의 成長과 關聯이 있다고 하였다⁵⁶⁾. IL-12는 Th1 細胞의 分化를 촉진하고 NK 細胞와 IFN- γ 의 分泌를 촉진하는데 動物實驗에서 腫瘍의 血管形成과 轉移를 抑制하는 作用이 보고되었다⁵⁷⁾. IFN- γ 는 大食細胞를 活性化시켜 食食細菌을 파괴하는 酵素 合成을 亢進시킬 뿐 아니라 LPS 또는 TNF 자극을 함께 가하여 大食細胞의 癌細胞를 죽이는 機能을 亢進시킨다. TNF- α 는 濃도에 따라 다양한 生物學的作用을 나타내며 IL-1의 生物學的 機能과 類似하다. 유리산소기를 生成하여 직접적인 腫瘍細胞毒성을 일으키는 것으로 보이는데 실제 臨床에서는 毒性으로 인하여 使用하기 어렵다

實驗 結果 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α 의 遺傳子 發顯은 實驗群에서 正常群에 比하여 濃度依存的으로 增加하였고, IL-12의 遺傳子 發顯은 實驗群에서 正常群에 比하여 減少하였다(Table 8~14). 이는 舌魚消腫湯이 細胞毒성을 活性化시키는 사이토카인의 發顯에 作用하여 抗癌 效果를 발휘한다고 類推할 수 있는 根據가 될 수 있다고 생각된다.

以上の 結果를 綜合하면 舌魚消腫湯은 抗癌, 抗轉移 作用이 있고 生存期間을 延長하는 效果가 있는 것으로 나타났으며, 細胞間에 相互情報를 傳達하거나 仲介하여 細胞增殖 및 細胞分化에 關與함으로써 免疫調節에 關與한다는 점에서 向後 이의 關聯된 cytokine과 作用 幾轉에 대한 補充 實驗 및 臨床研究가 必要하리라 思料된다.

결 론

舌魚消腫湯의 抗癌·抗轉移 效果를 檢索하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性效果, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 대한 附着阻止 效果, sarcoma 180에 對한 生存比, 血管形成 抑制效果, pulmonary colonization 및 組織變化 등을 測定하였고, 免疫調節 效果를 살펴보고자 脾臟細胞에서 流細胞 分析, cytokine 遺傳子 發顯 分析 등을 測定한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

A549, HT1080, B16-F10, NCL-H661 癌株에 對한 細胞毒性效果에서 濃度依存的으로 細胞毒性作用을 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 30%이상의 細胞毒性效果를 나타냈고, DNA topoisomerase I assay에서 抑制效果를 보였으며, A549, B16-F10 癌株의 複合細胞外氣質에 대한 附着阻止 效果에서 濃度依存的으로 附着阻止作用을 보였으며, 100 μ g/ml 濃度에서 40% 이상의 細胞附着阻止效果를 나타냈다. S-180을 利用한 抗癌 實驗에서 生存比는 120.7%로 나타났고, 肺癌 轉移 抑制에 미치는 效果에서 pulmonary colonization은 20.8로, 肺臟 組織 變化는 癌細胞가 顯著히 減少되어 轉移抑制 效果를 나타냈으며, 血管形成 抑制에 미치는 效果에서 10개중 6개에서 血管形成 抑制을 나타냈고, 脾臟 免疫細胞의 CD4⁺, CD8⁺, B220⁺ 細胞에 미치는 效果

는 CD4⁺에서만 有意性있는 增加를 나타냈다. 脾臟細胞에서 IL-1 β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 遺傳子 發顯을 濃度依存的으로 增加시켰고, 脾臟細胞에서 IFN-γ 遺傳子 發顯을 100 μg/ml, TNF-α 遺傳子 發顯을 10, 100 μg/ml 濃度에서 增加시켰다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 편: 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.1~2. 1993.
2. 통계청: 사망원인통계연보, 대전, 통계청, p.11. 2001.
3. 서울대학교의과대학: 腫瘍學, 서울, 서울大學校出版部, p.137, pp.1~3, 203~204, 213~215, 225~234, 1989.
4. 송호철, 길재호, 김성훈: 加味蔘苓白朮散 용매분획의 抗轉移 및 抗癌活性에 대한 연구, 동의생리병리학회지, 15(6):927~935, 2001.
5. 송옥, 김동희, 윤택준, 김성훈: 계지복령환가미방의 항암활성과 면역조절작용에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 15(1):36~41, 2001.
6. 이정화: 瓦松藥鍼의 항암효과 및 면역효과에 대한 실험적 연구, 大韓鍼灸學會誌 16(4):175~212, 1999
7. 김성훈: 한의학계의 압연구동향과 연구전략에 대한 연구, 大韓韓醫學會誌, 19(1):470~498, 1998.
8. 한미숙, 소준노, 송정모, 이재순: 항암제 Mitomycin C의 부작용에 대한 가미십전대보탕의 영향, 동의생리병리학회지, 15(4):599~604, 2001.
9. 박양춘, 김병탁: 加味沙蔘麥門冬湯이 抗癌活性과 放射線副作用 抑制效果에 미치는 影響, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(1):403~424, 1999.
10. 孟琳升, 趙滿華, 孟仲岐, 孟映雪, 郭文峰, 馬燕飛: 中醫治癌大成, 北京科學技術出版社, 北京, pp.111~112, 122~143, 232~233, 245, 246, 470~472, p.484, 1995.
11. 張毓玲: 養陰生津法在腫瘤病治療中的應用, 浙江中醫學院學報, 14(1):20, 1990.
12. 李尙仁: 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.111, 131, 133, 149, 151, 179, 371, 376, 382, 480, 1978
13. 全國韓醫科大學 本草學教授 公刊: 本草學, 서울, 永林社, pp.145~146, 65~166, 212~213, 223~224, 385~386, 539~541, 587~589, 593~594, 1991.
14. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon JD, Vistica J, Warren T, Kenney S, Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82(13):1107~1112, 1990.
15. National Cancer Institute: Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother Res(part 3), 3:17, 1972.
16. Spjut RW, Perdue RE: Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity. Cancer Treat Rep., 60(8):979~985, 1976.
17. Onishi Y, Azuma Y, Kizaki H: An assay method for DNA topoisomerase activity based on separation of relaxed DNA from supercoiled DNA using high-performance liquid chromatography. Anal Biochem., 210(1):63~68, 1993.
18. Liu LF, Miller KG. : Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei., Proc Natl Acad Sci USA., 78(6):3487~3491. 1981.
19. Chelberg MK, Tsilibary EC, Hauser AR, McCarthy JB: Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domanes of the collagen molecule. Cancer Reserch., 49:4796~4802, 1989.
20. Yan L, Frenkel GD: Inhibition of cell attachment by selenite. Cancer Res., 15:52(20):5803~5807, 1992.
21. Hellmann K, Carter SK: Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132~140, 1987.
22. Humphries MJ, Matsumoto K, White SL, Olden K: Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice: blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. Cancer Res., 46(10):5215~5222, 1986.
23. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I: Assays for angiogenesis. Pharmacol Ther., 51(1):1~11, 1991.
24. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Forkman J: A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. Devl Biol., 41:391~394, 1974.
25. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM: Cancer Invasion and Metastes. Boston. Nijhoff, pp.427~465. 1982.
26. 권오희, 류기원, 류봉하, 윤상협, 백태현: 止嘔養胃湯과 加味止嘔養胃湯의 항암제에 의해 손상된 위장관의 회복효과에 관한 연구, 大韓韓醫學會誌 22(2):84~93, 2001.
27. Markman M: Chemotherapy-associated neurotoxicity: an important side effect-impacting on quality, rather than quantity, of life. J Cancer Res Clin Oncol. 122(9):511~512, 1996.
28. Morrow GR, Roscoe JA, Hickok JT, Stern RM, Pierce HI, King DB, Banerjee TK, Weiden P: Initial control of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patient quality of life. Oncology 12(3 Suppl 4):32~37. 1998.
29. Schumacher K: Effect of selenium on the side effect profile of adjuvant chemotherapy/radiotherapy in patients with breast carcinoma. Design for a clinical study. Med Klin. 15:94(Suppl 3):45~48, 1999.
30. Reckzeh B, Merte H, Pfluger KH, Pfab R, Wolf M, Havemann K: Severe lymphocytopenia and interstitial pneumonia in patients treated with paclitaxel and simultaneous radiotherapy for non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 14(4):1071~1076, 1996.
31. 陳熠: 世界傳統醫學腫瘍學, 北京, 科學出版社, p.157, 1999.

32. 洪素蘭, 陳永輝, 裴曉華 주권: 實用中醫呼吸病學, 北京, 中國中醫藥出版社, p.390, 1995.
33. 金實 주권: 肺臟病學, 太原, 山西科學技術出版社, p.281, 1997.
34. 김성훈, 송규용, 류사용: 白花蛇舌草 핵산분획과 다당체가 항암 및 항전이 활성에 미치는 영향, 大韓東醫病理學會誌, 13(1):65~75, 1999.
35. 김성훈: 白花蛇舌草로부터 분리한 ursolic acid의 자연살해효과와 항전이작용, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 5(2):523~533, 1997.
36. 배원영, 고형균, 김창환: 魚腥草 약침이 B16흑색종 암모델에 대한 항종양효과 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지, 18(1):186~201, 2001.
37. Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Hirano M, Oshikubo M, Nobukuni Y, Kimura Y, Tai T, Kondo S, Nishino H: Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos*. *J Nat Prod.*, 65(4):462~465, 2002.
38. Kaminaga T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M: Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology*, 53(5):382~385, 1996.
39. Tseng J, Chang JG: Suppression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6 and granulocyte-monocyte colony stimulating factor secretion from human monocytes by an extract of *Poria cocos*. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*, 25(1):1~11, 1992.
40. 백남인, 조성지, 방면호, 이인자, 박창기, 김무성, 김금숙: 맥문동 스테로이드 사포닌의 항암활성, 한국농화학지, 41(5):390~394, 1998.
41. 왕중권, 정희재, 이형구, 정승기: 桔梗解毒湯이 항암 및 항전이 효과에 미치는 영향, 대한한의학회지23(2):211~224, 2002.
42. 조한진, 김성훈: 挑紅四物湯加減方の 항암 및 항전이 효과에 관한 연구, 동의병리학회지, 13(1):76~91, 1999.
43. 김동희, 김성훈: 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, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(1):131~146, 1999.
44. Arpa PD, Liu LF: Topoisomerase-targeting anticancer drug. *Biochim Biophysica Acta.*, 989:163~177, 1989.
45. 차용석, 정희재, 정승기, 이형구: 百合固金湯 및 百合固金湯加減方の Sarcoma-180에 대한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 연구, 경희의학, 15(4):420~435, 1999.
46. 김동희, 최주선, 김성훈: 목초액과 항암성 본초가 가미된 복합목초액의 항암 및 항전이 활성에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 15(1):136~142, 2001
47. Lentini A, Vidal-Vanaclocha F, Facchiano F, Caraglia M, Abbruzzese A, Beninati S: Theophylline administration markedly reduces hepatic and pulmonary implantation of B16-F10 melanoma cells in mice. *Melanoma Res.*, 10(5):435~443, 2000.
48. Steiner R: Angiostatic activity of anticancer agents in the chick embryo chorioallantoic membrane (CHE-CAM) assay. *EXS* 61:449~454, 1992.
49. Janis Kuby : *Immunology*(second edition), W.H. Freeman and Company, p.3, 10, pp.47~52, 85~92, 1994.
50. Pardoll DM, Topalian SL: The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.*, 10(5):588~594, 1998.
51. Blesing JJ, Morrow MR, Uzel G, Fleisher TA: Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol.*, 10;213(1):72~81, 2001.
52. 대한 천식 및 알레르기학회: 천식과 알레르기질환, 서울, 군자출판사, p.56, 2002.
53. Mocellin S, Wang E, Marincola FM: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother.*, 24(5):392~407, 2001.
54. Nagai S, Toi M: Interleukin-4 and breast cancer. *Breast Cancer* 7(3):181~186, 2000.
55. Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET: Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(1):33~40, 2001.
56. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, Dubinett SM: T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol.*, 1;163(9):5020~5028, 1999.
57. Gately MK, Brunda MJ: The potential of interleukin-12 for use in cancer therapy. *Gan To Kagaku Ryoho.*, 23(8):961~971, 1996.