

托裏散이 抗癌에 미치는 作用機轉 研究

유미경 · 최정화 · 김종한 · 박수연
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Mechanism Study of Takli-San on the Anti-Cancer Action in Mice

Mi-Kyoung Yu · Jung-Hwa Choi · Jong-Han Kim · Su-Yeon Park

Objective : This Study was to investigate effects of Takli-San on the anti-cancer and proliferation of immunocytes, nitric oxide(NO) production of peritoneal macrophages.

Methods : We used Takli-San extract(TLS) with freeze-dried, 8wks-old male mice and cancer cell lines(L1210, Sarcoma-180) for this Study. The cytotoxicity and proliferation of cells were tested using a colorimetric tetrazolium assay(MTT assay).

Results :

1. TLS was significantly showed cytotoxicity on the L1210 cell lines.
2. TLS was significantly increased proliferation of thymocytes and splenocytes *in vitro*.
3. TLS was significantly increased proliferation of thymocytes by all-dosage, but proliferation of splenocytes by low-dosage in normal mice.
4. TLS was significantly increased NO production from peritoneal macrophages in normal mice.
5. TLS was significantly decreased proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.
6. TLS was significantly increased proliferation of thymocytes by all-dosage, but proliferation of splenocytes by low-dosage in L1210 cells transplanted mice.
7. TLS was significantly increased NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Conclusions : The present author thought that TLS had action of anti-cancer by becoming immunocytes activity(NO production, proliferation of thymocytes).

Key words : Takli-San, anti-cancer.

서론

교신저자: 유미경. 동신대학교부속광주한방병원
안이비인후피부과학교실
(Tel. 062-350-7280, E-mail : mkyu0@hanmail.net)

托裏散은 《醫學入門》¹⁾에 “治癰疽 氣血虛不能起發, 腐潰收斂, 或惡寒發熱, 肌肉不生方”이라하여 최초로記載된 處方으로, “人蔘, 黃芪, 白芍藥, 白朮,

陳皮, 當歸, 熟地黃, 白茯苓, 甘草”로 구성되어 補托하는 효능이 있다.

補托法은 癰疽의 治療法 중 하나로, 元氣를 補해 줌으로써 오랫동안 癰疽가 치료되지 않고 氣血이 점차 衰退해졌을 때 사용하는 방법을 말하며, 肌寒肉冷·膿汁清稀·毒不出·瘡口不合·成聚積不赤·結核無膿·外證不明한 경우에 사용된다^{2,3)}.

癰疽란 癰과 疽를 합한 말로, 그 원인에 대해 《內經》⁴⁾에서는 膏粱厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通 등에 의해, 劉⁵⁾는 火熱·風濕之所乘에 의해, 李⁶⁾는 濕熱에 의해, 朱⁷⁾는 六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯에 의해 발생된다 하였다. 癰疽는 宋代《衛濟寶書》以後 病理的인 側面에서 炎症性疾患이나 腫瘍性 腫塊, 즉 癌과 有關하게 認識되었고⁸⁻¹⁰⁾, 또한 上石疽, 骨疽, 緩疽 등과 같이 癰양을 지칭하는 개념으로도 사용된다¹⁰⁾.

癰양은 사망원인 중 높은 비율을 차지하는 질환으로, 이를 정복하려는 노력이 국내외적으로 진행되고 있다¹¹⁾. 한의학적으로도 補氣·補血을 爲主로 하면서 破積·活血·清熱·解鬱·行氣 등의 治법들을 겸용^{10,12-15)}하여 면역기능을 활성화하면서 항암효과를 나타내는 연구들이 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서 魯¹⁶⁾ 등은 消積保中丸으로, 趙¹⁷⁾ 등은 桃紅四物湯으로 항암효과에 대해 보고하였다.

저자는 托裏散의 항암작용 및 면역증강 작용을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

실험에 사용한 托裏散(Takli-San, TLS)은 《東醫寶鑑》¹⁸⁾에 준하였으며, 동신대학교 부속광주한방병원

에서 구입한 후 본초학교실에서 정선을 받아 사용하였다. 실험에 사용한 처방의 내용과 분량은 다음과 같다¹⁹⁾(Table 1)

Table 1. Prescription of Takli-San(TLS)

韓藥名	生藥名	用量(g)
人蔘	Ginseng Radix	7.500
黃芪	Astragali Radix	7.500
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	5.625
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	5.625
陳皮	Pericarpium Citri	5.625
當歸	Angelicae Gigantis Radix	5.625
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	5.625
白茯苓	Poria Cocos	5.625
甘草	Glycyrrhizae Radix	3.750
Totality		52.50

2) 세포주

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 급성백혈병 세포주인 L1210 세포주와 복강암세포주인 sarcoma-180(S-180) 세포주를 사용하였다.

3) 동물

본 실험에 사용한 마우스는 (주) 다물 사이언스에서 구입한 balb/c계 8 주령된 수컷을 온도 20±3 °C, 습도 55±5 %, light/dark 12 hr의 사육조건에서 1 주일 이상 적응시키면서 고품질 pellet 사료(삼양주식회사, Korea)와 물을 자유로이 섭취하게 하였다.

4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약들은 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma R4130), Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco LOT. NO. 1006842), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma M2128), Sodium Dodecyl Sulfate(SDS, Sigma L5750), Brewer Thioglycollate Medium(TG, Difco 0236-17-7), Interferon-γ(IFN-γ, Sigma I6507) 등으로 특급시약을 사용하였으며, 기기로는 microplate reader(ELX800UV, U.S.A.) 등을 사용하였다.

증식율을 백분율로 환산하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제

TLS의 2 침분량(105.0 g)을 1,500 ml 증류수로 상온에서 100 °C 2 시간동안 전탕한 다음, 이 추출액을 1,500 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 그 후 rotary vacuum evaporator(EY ELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조시켜 20.9 g(수득율 19.9 %)을 얻어 검액으로 사용하였다.

2) 세포 배양조건

암세포주(L1210 세포주, S-180 세포주)와 면역 세포(흉선 세포, 비장 세포)의 배지로는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10 % FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하였다. 암세포주의 계대 배양은 1 : 10 ~ 1 : 20 비율로 3 일 간격으로 하였고, 세포 증식에 미치는 약제의 영향을 관찰하기 위한 실험은 계대 배양 2 일째의 세포를 사용하였다.

3) MTT법에 의한 암세포 독성 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann²⁰⁾이 개발하고 Kotnik²¹⁾ 등이 변형시킨 방법으로, 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 100 µl(2×10⁵ cells/ml)를 접종하여 37 °C의 CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후 농도별(1, 10, 100 µg/ml)로 희석된 TLS 100 µl를 넣고 37 °C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양하였다. 배양종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)-A에 희석된 MIT용액 20 µl를 각 well에 첨가하고 배양 종료 시까지 은박지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 0.01 NHCl에 용해시킨 10 % SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포

4) 마우스의 흉선세포 및 비장세포의 분리

마우스의 흉선 및 비장 세포 분리는 Wysocki²²⁾ 및 Mizel²³⁾ 등의 방법을 이용하였다. Balb/c 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 stainless mesh로 여과하여 2 회 세척한 다음 10 ml 주사기로 세포 부유액을 취하여 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3 회 반복 세척한 후 흉선 및 비장 세포를 분리하였다.

5) MTT법에 의한 흉선 및 비장 세포의 증식율 측정

4) 와 같이 분리된 흉선 및 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10⁶ cells/ml 농도로 접종하여 흉선 세포에는 Concanavalin A(Con-A, Sigma C5275) 5 µg/ml와, 비장 세포에는 Lipopolysaccharide(LPS, Sigma L2637) 5 µg/ml와 함께 다양하게 희석된 TLS의 농도(1, 10, 100 µg/ml)를 100 µl씩 첨가한 후 37 °C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 3) 과 동일한 방법으로 흉선 및 비장 세포의 증식율을 측정하였다.

6) 정상 마우스의 면역 세포 증식율에 미치는 효과 측정

① 실험군

Balb/c 마우스 7 마리를 1 군으로 하여 Control과 Sample 등으로 분류하였다. Control은 증류수 0.2 ml 씩을, Sample A는 TLS 500 mg/kg 0.2 ml 씩을, Sample B는 TLS 700 mg/kg 0.2 ml 씩을, 각각 7 일동안 1 일 1 회 씩 경구 투여하였다.

② 정상 마우스의 흉선 및 비장세포 증식율 측정

6)① 과 같이 실시한 후 4) 와 같이 흉선 및 비장 세포를 분리하였다. 이 후 분리된 흉선 및 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well

plate에 1.0×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 흉선세포에는 Con A $5 \mu\text{g/ml}$, 비장세포는 LPS $5 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 후, 37°C 의 CO_2 배양기에서 48 시간 배양한 다음 5) 와 동일한 방법으로 흉선 및 비장세포의 증식율을 측정하였다.

③ 복강 macrophages 분리 및 nitric oxide(NO) 생성능 측정

6)-① 과 같이 실시하면서 경추 탈골시키기 3 일 전에 3 % TG 2.0 ml를 복강 주사하였다. 이 후 도살된 마우스의 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분 원심 분리하고 RPMI 1640 배지로 2 회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 4 시간 동안 배양시켰다. 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한 macrophages 만을 cell scraper로 분리하여 24 well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/ml로 분주한 후 LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 와 IFN- γ 25 units/ml를 첨가하여 37°C CO_2 배양기에서 24 시간 배양한 후 생성된 NO의 양을 Griess법²⁵⁾으로 측정하였다. 세포 부유액 100 μl 와 Griess reagent(1 % sulfanilamide + 0.2 % N-naphthyl- ethylene-diamine 2 Hcl + 2.5 % H_3PO_4) 100 μl 를 혼합하여 96 well plate에 넣고 microplate-reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO_2 의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

7) L1210 세포를 이식한 병태모델의 암세포 및 면역세포 증식율 관찰

① 실험군

Balb/c 마우스 8 마리를 1 군으로 한 후 L1210 세포주를 2) 와 같이 제대 배양하여 2×10^6 cells/mouse로 조제한 다음 마우스의 복강에 1.0 ml를 주사함으로써 암종을 유발시켰다. 실험군은 Control과 Sample 등으로 분류하였다. Control은 증류수 0.2 ml를, Sample A는 TLS 500 mg/kg 0.2 ml를, Sample B는 TLS 700 mg/kg 0.2 ml를, 각각 7 일 동안 1 일 1 회

씩 경구 투여하였다.

② 암세포 증식율 측정

7)-① 과 같이 실시한 후 마우스를 경추 탈골시키 도살하였다. 도살 후 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 잘 혼합시킨 다음 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분간 원심 분리하고 RPMI 1640 배지로 2 회 세척한 후 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 배양시켰다. 4 시간 후에 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분간 원심 분리하였다. 침전된 세포 분획을 모아 1×10^6 cells/ml로 조제하여 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 100 μl 를 분주하고 배지 100 μl 를 채워 37°C 의 CO_2 배양기에서 48 시간 배양하였다. 이식된 암세포의 증식율은 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

③ 면역세포 증식율 측정

7)-① 과 같이 실시한 후 4) 와 같이 흉선 및 비장 세포를 분리한 다음, 5) 와 동일한 방법으로 흉선 및 비장 세포의 증식율을 측정하였다.

④ 복강 macrophages 분리 및 NO 생성능 측정

7)-① 과 같이 실시하면서 경추 탈골시키기 3 일 전에 3 % TG 2.0 ml를 복강 주사하였고, 이 후 6)-③ 과 같이 복강 macrophages를 분리한 다음, 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양을 NaNO_2 의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

3. 統計處理

통계처리는 Student's paired and/or unpaired t-test에 의하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다²⁴⁾.

실험성적

1. TLS가 암세포주에 미치는 세포독성 효과

암세포주에 미치는 TLS의 세포독성 효과를 알아보기 위하여 TLS를 각각 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 1).

TLS를 투여하지 않은 Control의 L1210 세포주 증식율을 100.00 \pm 0.02 %라 하였을 때, TLS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 92.81 \pm 0.04 %로 Control보다 감소되었고, TLS를 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 투여하였을 때는 각각 78.30 \pm 0.03 %와 77.03 \pm 0.03 %로 Control보다 유의성(P<0.001) 있게 세포 독성을 나타내었다.

TLS를 투여하지 않은 Control의 S-180 세포주 증식율을 100.00 \pm 0.02 %라 하였을 때, TLS 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 99.39 \pm 0.01 %와 99.03 \pm 0.01 %로 Control과 유사하였고, TLS 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 투여하였을 때는 94.63 \pm 0.01 %로 Control보다 유의성(P<0.05) 있게 세포 독성을 나타내었다.

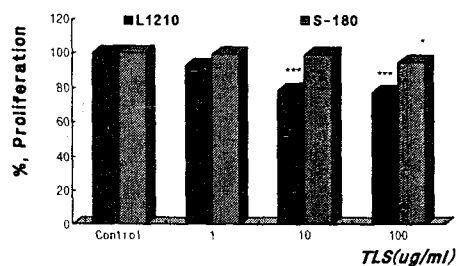


Fig. 1. Cytotoxicity of TLS on the L1210 cell lines and S-180 cell lines.

L1210 ; lymphocytic leukemia cell lines, S-180 ; sarcoma cell lines, TLS ; Takli-San extract, Control ; TLS non-treated group, 1, 10, 100 ; TLS 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$ treated group.

* : P-value vs Control group(* : P<0.05, *** P<0.001).

2. TLS가 면역세포 증식율에 미치는 효과

면역 세포 증식율에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS를 각각 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 2).

TLS를 투여하지 않은 Control의 흉선 세포 증식율을 100.00 \pm 0.01 %라 하였을 때, TLS 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때의 증식율은 각각 108.30 \pm 0.01 %, 115.80 \pm 0.01 %, 125.07 \pm 0.04 %로 Control보다 유의성(P<0.001) 있게 증가되었다.

TLS를 투여하지 않은 Control의 비장 세포 증식율을 100.00 \pm 0.02 %라 하였을 때, TLS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 113.84 \pm 0.02 %로 Control보다 유의성(P<0.01) 있게 증가되었고, TLS 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 111.95 \pm 0.03 %로 Control보다 유의성(P<0.05) 있게 증가되었으며, TLS 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 103.51 \pm 0.03 %로 나타났다.

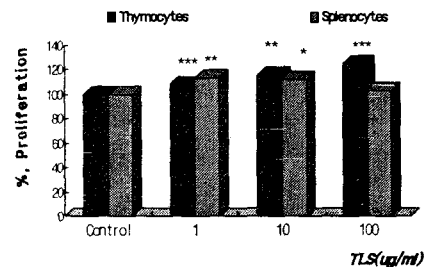


Fig. 2. Effects of TLS on the proliferation of thymocytes and splenocytes *in vitro*.

Other legends are the same as Fig. 1.

* : P-value vs Control group(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001).

3. TLS가 정상 마우스의 면역세포 증식에 미치는 효과

정상 마우스의 흉선 세포 및 비장 세포의 증식율에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS 500 mg/kg, 700 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았

다(Fig. 3).

Control의 흉선 세포 증식율을 100.00±0.01 %라 하였을 때 Sample A의 흉선 세포 증식율은 114.29±0.04 %로 Control에 비하여 유의성(P<0.05) 있게 증가되었고, Sample B의 흉선 세포 증식율도 127.85±0.02 %로 Control에 비해 유의성(P<0.001) 있게 증가되었다.

Control의 비장 세포 증식율을 100.00±0.01 %라 하였을 때 Sample A의 비장 세포 증식율은 107.88±0.01 %로 Control에 비해 유의성(P<0.01) 있게 증가되었고, Sample B의 비장 세포 증식율은 104.84±0.02 %로 나타났다.

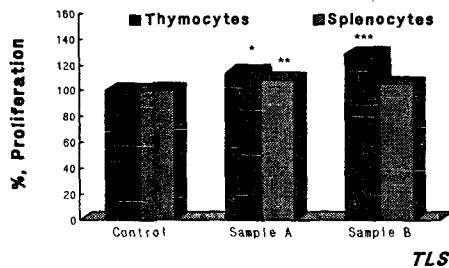


Fig. 3. Effects of TLS on the proliferation of thymocytes and splenocytes in normal mice.

TLS ; Takii-San extract, Control ; DDW 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day), Sample A ; TLS 500 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day), Sample B ; TLS 700 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day).

* : P-value vs Control group(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001).

4. TLS가 정상 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과

정상 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS 500 mg/kg, 700 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 4).

Control의 NO 양 3.06±0.16 μM를 100.00±0.05 %라 하였을 때 Sample A의 NO 양은 125.78±0.04 %로

Control에 비해 유의성(P<0.01) 있게 증가되었고, Sample B의 NO 양도 189.37±0.03 %로 Control에 비해 유의성(P<0.001) 있게 증가되었다.

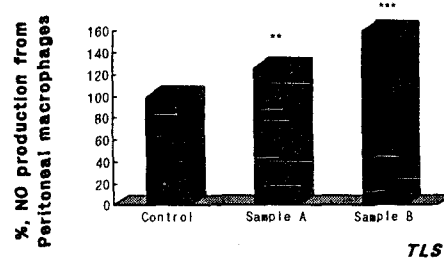


Fig. 4. Effects of TLS on the NO production from peritoneal macrophages in normal mice.

Other legends are the same as Fig. 3.

* : P-value vs Control group(** : P<0.01, *** : P<0.001).

5. TLS가 L1210 세포 이식 마우스의 복강내 암세포 증식에 미치는 억제 효과

암세포주(L1210 세포주)를 이식한 후 암세포의 증식 억제에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS 500 mg/kg, 700 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 5).

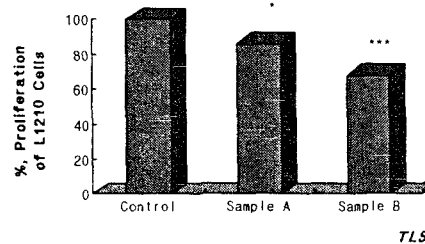


Fig. 5. Effects of TLS on the proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.

L1210 cells(2×10⁶ cells/mouse) transplanted to mice of all experimental group.

TLS ; Takii-San extract, Control ; DDW 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day), Sample A ; TLS 500 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day), Sample B ; TLS 700 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days(1 time/day).

* : P-value vs Control group(* : P<0.05, *** : P<0.001).

Control의 암세포 증식율을 100.00±0.02 %라 하였을 때 Sample A의 증식율은 86.00±0.05 %로 Control보다 유의성(P<0.05) 있게 억제되었고, Sample B의 증식율도 67.94±0.01 %로 Control에 비해 유의성(P<0.001) 있게 억제되었다.

6. TLS가 L1210 세포 이식 마우스의 면역 세포 증식에 미치는 효과

암세포주(L1210 세포주)를 이식한 후 흉선 세포 및 비장 세포의 증식율에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS 500 mg/kg, 700mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 6).

Control의 흉선 세포 증식율을 100.00±0.01 %라 하였을 때 Sample A와 Sample B의 흉선 세포 증식율은 각각 109.30±0.01 %와 117.09±0.01 %로 Control에 비하여 유의성(P<0.001) 있게 증가되었다.

Control의 비장 세포 증식율을 100.00±0.02 %라 하였을 때 Sample A의 비장 세포 증식율은 113.16±0.01 %로 Control에 비하여 유의성(P<0.001) 있게 증가되었고, Sample B의 비장 세포 증식율은 104.02±0.02 %로 나타났다.

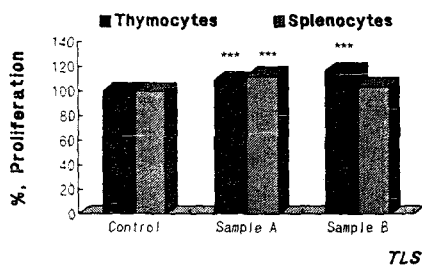


Fig. 6. Effects of TLS on the proliferation of thymocytes and splenocytes in L1210 cells transplanted mice.

Other legends are the same as Fig. 5.

* : P-value vs Control group(*** : P<0.001).

7. TLS가 L1210 세포 이식 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과

암세포주(L1210 세포주)를 이식한 후 복강 대식 세포에서 생산되는 NO의 양에 미치는 TLS의 효과를 알아보기 위하여 TLS 500 mg/kg, 700 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 7).

Control의 NO 양 7.64±0.11 μM를 100.00±0.01 %라 하였을 때 Sample A와 Sample B의 NO 양은 각각 140.07±0.01 %와 151.11±0.02 %로 Control에 비해 유의성(P<0.001) 있게 증가되었다.

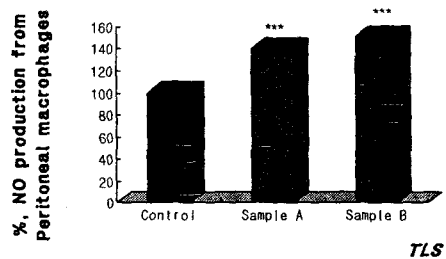


Fig. 7. Effects of TLS on the NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Other legends are the same as Fig. 5.

* : P-value vs Control group(*** : P<0.001).

고 찰

托裏散은 《醫學入門》¹⁾과 《東醫寶鑑》¹⁸⁾에 “癰疽에潰爛이 있는 후 오랜 동안 아물지 않을 때 사용하는 것으로 이를 補托이라 한다”고 수록되어 있다.

托裏散 構成藥物의 效能을 살펴보면, 人蔘은 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴 등의 효능이 있고, 黃芪는 補氣升揚, 益衛固表, 托毒生肌, 利水退腫하여 癰疽久敗瘡에 사용하고, 白芍藥은 養血斂陰, 柔肝止痛하며, 白朮은 補脾益氣, 燥濕利水, 固表止汗하고, 陳皮는 理氣調中, 燥濕化痰한다. 當歸는 補血活血, 調經止痛, 活血祛瘀하고, 熟地黃은 補血滋陰, 補精益髓 하며, 白茯苓은 理水滲濕, 健脾補中하고, 甘草는 補脾益氣, 潤肺止咳, 緩和藥性하여 解毒作用으로 癰疽瘡毒을 치료한다^{19,26)}. 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草는 四君子湯

으로 補氣하고, 熟地黃, 當歸, 白芍藥은 補血하는데, 黃芪가 配伍되면 升揚透發하고 托瘡生肌한다. 따라서 氣血이 虛弱하여 瘡瘍이 不潰하고 成潰한 후에도 傷處가 收斂하지 못할 때 사용하는 基本方이다²⁷⁾.

癰疽란 癰과 疽를 합한 말로, 그 원인에 대해 《內經》⁴⁾에서는 膏粱厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通 등에 의해, 劉⁹⁾는 火熱·風濕之所乘에 의해, 李⁹⁾는 濕熱에 의해, 朱⁷⁾는 六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯에 의해 발생된다 하였다. 그러나 이러한 癰疽는 宋代《衛濟寶書》 이후 병리적인 측면에서 염증성 질환이나 腫瘍性 腫塊, 즉 癌과 유관하다 인식되었다^{8,10)}. 또한 현대 문헌에서는 癰疽를 上石疽, 骨疽, 緩疽 등과 같이 腫瘍을 지칭하는 개념으로도 사용하였다¹⁰⁾.

補托法은 癰疽 치료법 중 하나로, 元氣를 복돋아 줌으로써 오랫동안 癰疽가 제거되지 않으면서 氣血이 점차 衰退해졌을 때 사용하는 방법을 말하고, 肌寒肉冷·膿汁清稀·毒不出·瘡口不斂·成聚積不赤·結核無膿·外證不明한 경우에 사용된다^{2,3)}.

질병발생에 대해 한의학에서는 《素問·調經論》⁴⁾에 “百病之生, 皆有虛實”, 《素問·評熱病論》⁴⁾에 “邪之所湊, 其氣必虛”, 《素問·通評虛實論》⁴⁾에 “邪氣盛則實, 正氣奪則虛”, 《靈樞·口門篇》⁴⁾에 “邪之所在, 皆爲不足”이라 하여 장부조직기관의 기능활동을 정상적으로 유지하게 하는 ‘正氣’²⁸⁾가 강하면 강할수록 인체를 발병하게 하는 ‘邪氣’²⁸⁾를 능히 물리칠 수 있는 항병력을 갖게 되어 질병이 발생하지 않는다 하였다. 이는 질병의 발병 및 발전에 한의학에서는 ‘正氣’를 중요시하였다는 것을 알 수 있고, 이러한 한의학의 인식론은 서의학의 면역개념과 밀접한 관련성이 있다^{29,30)}. 이에 면역기능, 즉 ‘正氣’를 증강시키면서 종양, 즉 ‘邪氣’를 제거하는 방법이 동서의 학론적 입장에서 볼 때 가장 효과적인 항암치료법이라 생각되고, 치료약물중에서는 ‘正邪’를 고려하여 치료하는 한의학적 약물요법이 인체기능을 조화롭게 하는데 있어서 유효할 것으로 생각되었다. 따

라서 사망원인 중 높은 비율을 차지하고 있는 암을¹¹⁾ 정복하려는 노력으로, 한의학에서는 補氣·補血을 爲主로 하면서 破積·活血·清熱·解鬱·行氣 등의 치법들을 겸용^{10,12-15)}하고 있다.

서의학에서는 암에 대한 치료법으로 수술요법·방사선요법·화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하고 있고, 그 중 화학요법은 화학 약제의 독성 및 부작용 문제를 해결하지 못하고 있고, 면역요법 또한 아직까지 치료방법이 정립되어 있지 않은 실정이다³¹⁻³⁴⁾.

면역은 인체내에 침입한 異物質이나 새로이 발생된 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상으로 식세포나 보체가 관여하는 선천적 면역과 T세포와 B세포가 관여하는 후천적 면역로 나누어진다. 또한 면역반응에 따라 체액성 면역(humoral immunity)과 세포매개성 면역(cell-mediated immunity)으로 분류되는데, 체액성 면역은 B세포가 주로 담당하는 것으로 혈액 및 기타의 체액속에서 방출된 항체로 생체에 감염을 일으킨 세균이나 세균독소, virus 등과 직접 결합하여 용균 또는 독소, virus의 중화, 식균현상을 나타냄으로써 생체를 감염으로부터 방어하는 기능을 담당하고, 세포 매개성 면역는 T세포가 주로 담당하는 것으로 알러지반응, 접촉피부염, 동종이식 거부 등을 나타내는 면역의 종류이며, 화학전달물질(lymphokine)들을 분비함으로써 종양세포나 virus 감염세포에 대해 직접 손상을 준다³⁵⁻³⁷⁾.

최근에 한약재를 이용하여 이런 면역기능을 활성화시키면서 항암효과를 나타내는 연구들이 진행되고 있는데, 魯¹⁵⁾ 등은 消積保中丸이 종양세포의 성장, 발생을, 종양 크기의 억제 및 생명연장효과 그리고 NK세포의 활성화도 증가를, 鄭³⁸⁾은 內托羌活湯이 MCA와 3LL세포 및 S-180세포로 유도된 피하암종 세포에 대해 특이적 세포독성 및 면역조절작용이 있음을, 趙¹⁷⁾ 등은 桃紅四物湯이 L1210세포의 증식억제효과와 NO의 양이 증가하여 서로 연관성이 있음을, 高³⁹⁾는 膽癌動物의 생명기간 延長, T cell과

B cell의 증식, 血清抗體價(凝集素價, 溶血素價), NK cell의 활성도를 관찰한 결과 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯이 항암효과가 있을 것으로 추정하는 동시에 그 중에서도 活血化瘀之劑와 補氣之劑를 合方하면 더욱 더 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 托裏散의 실험적 연구를 아직까지 접하지 못하여 托裏散의 항암작용 및 면역증강 작용을 관찰하고자 하였다.

托裏散이 암세포주에 미치는 세포독성 효과를 관찰한 결과, L1210 암세포주에 托裏散을 고농도로 투여할수록 대조군에 비하여 23 % 이상 유의성 있는 세포독성을 나타내었고 S-180 세포주의 세포독성에도 유의성을 나타내었다. 이는 托裏散이 암세포주에 미치는 세포독성이 선택성이 있음을 보여주는 결과라 생각된다.

면역 세포(흉선 세포 및 비장 세포)에 미치는 세포 증식율을 관찰한 결과 흉선 세포의 증식율은 고농도가 투여되었을 때 약 25 % 이상 세포 증식율을 유의성 있게 증가시켰지만 비장 세포의 증식율에 있어서는 저농도 투여시 약 13 % 정도 유의성 있는 세포 증식을 나타내 托裏散은 비장 세포 즉, B 세포보다는 흉선 세포, 즉 세포 매개성 면역을 담당하는 T 세포에 작용하는 것으로 생각된다.

정상 마우스의 면역 세포 증식에 미치는 托裏散의 효과를 관찰한 결과 *in vitro*상과 같이 본방은 비장 세포보다는 흉선 세포 즉, T 세포의 증식을 고농도 투여시 28 % 정도 유의성 있게 증가시켜 托裏散이 세포 매개성 면역에 관여하고 있음을 확인시켜 주었다. 그리하여 저자는 후천성 면역증 세포 매개성 면역에 관여하는 것으로 생각되는 托裏散이 선천성 면역과는 어떠한 관계가 있는지 알아보려고 하였다.

Nitric Oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthase(NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 NOS는 constitutive NOS(cNOS)와 활성화된 macrophages 등에서 발견되는 inducible NOS(iNOS)가 있다⁴⁰⁾. iNOS는 macrophages 및 호중구 등과 같이 탐식작용 등에 관

여하는 신체의 여러종류의 세포에서 분비되는 것인데, 그 중 macrophages가 생산하는 NO는 interleukin 1 β ·IFN- γ ·Tumor Necrosis Factor(TNF)- α 등과 같은 cytokine 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 유도되어 형성된다⁴¹⁾. 복강 macrophages에 의해 생산되는 NO가 항암작용이 있다고 최초로 보고⁴²⁾된 이래 많은 연구자들은 활성화된 macrophages가 정상세포보다는 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophages-mediated tumor cytotoxicity로 중요한 의미가 있다고 하였다⁴³⁻⁴⁴⁾.

托裏散이 정상 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과를 관찰한 결과 투여농도가 높을수록 NO 양도 대조군보다 약 90 % 정도 유의성 있게 증가되었다. 따라서 托裏散은 선천성 면역에도 관여하는 것으로 생각된다.

托裏散이 *in vitro*상에서 세포 매개성 면역에 관여하여 암세포주에 세포 독성을 나타내고, *in vivo*상에서 후천성 면역 뿐만 아니라 선천성 면역에도 관여하여 NO의 양을 증가시켰다면, 암세포를 이식한 *in vivo*상에서도 면역 기능 증강과 함께 항암 작용을 나타낼 것으로 생각되었다.

托裏散이 L1210 세포를 이식한 마우스의 복강내 암세포 증식에 미치는 억제 효과를 관찰한 결과 본방을 고농도로 투여할수록 약 34 % 정도 암세포의 증식을 억제하였고, 흉선 세포의 증식율은 17 % 이상 증가되었다. 그러나 비장 세포의 증식율은 저농도 투여시에만 유의성 있는 증가현상을 나타내었지만, 복강 macrophages에서 생성되는 NO 양은 고농도 투여시 대조군보다 약 51 % 이상 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과, 托裏散은 비록 암세포주에 세포 독성을 나타내기는 하지만 암세포의 증식 억제 효과를 *in vitro*상과 *in vivo*상에서 비교해보면, 후천성 면역인 세포 매개성 면역을 담당하는 T 세포의 증식을 촉진시키는 동시에, 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있는 iNOS의 생성을 증가시킴으로써 항암 작용을 보인 것으로 생각된다.

托裏散은 補氣血하고 升揚透發하므로 종양 뿐 아니라 큰 수술이나 오랜 질환으로 면역력이 많이 저하된 경우, 褥瘡이나 기타 傷處가 발생하였는데 오래도록 치유되지 않는 경우 등 虛證에 쓰일 수 있는 基本方으로 생각되며, 이에 보다 다양한 임상 응용 및 연구가 필요하리라 생각된다.

결론

托裏散의 항암작용에 미치는 작용기전을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 托裏散은 L1210 세포주에 대하여 유의성 있는 세포독성을 나타냈다.
2. 托裏散은 흉선 세포 및 비장 세포의 증식율을 유의성 있게 증가시켰다.
3. 托裏散은 정상 마우스 및 암세포가 이식된 병태 모델의 흉선 세포 증식율을 유의성 있게 촉진시켰고, 비장 세포의 증식율은 저농도에서 유의성 있게 촉진되었다.
4. 托裏散은 정상 마우스 및 암세포가 이식된 병태 모델의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양을 유의성 있게 촉진시켰다.
5. 托裏散은 암세포가 이식된 병태 모델의 암세포 증식율을 유의성 있게 억제하였다.

참고 문헌

1. 李 挺 : 醫學入門, 서울, 大成文化社, 1996:605.
2. 蔡炳允 : 漢方外科, 서울, 高文社, 1987:52-53.
3. 齊德之 撰 : 外科精義, 서울, 醫聖堂, 1999:60.
4. 楊維傑 : 黃帝內經素問靈樞譯解, 서울, 成輔社, 1980:(素問) 235, 266, 455, (靈樞) p. 262.
5. 李聰甫外 1人 : 金元四大醫家 學術思想研究, 서울, 成輔社, 1985:3637.

6. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大成文化社, 1994: 532-533.
7. 朱丹溪 : 丹溪心法附與, 臺灣, 五州出版社, 1963: (卷十六) 10, (卷十八) 1.
8. 陳無擇 : 三因論, 서울, 翰成社, 1977:525-526.
9. 揚醫竝 : 中醫學問答(下), 北京, 人民衛生出版社, 1985:356-357, 369-370.
10. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, 1983:110.
11. 대한의학협회 분과학회협의회 편저 : 암의 진단과 치료, 서울, 麗文閣, 1992:4.
12. 李 岩 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, 1983:11-26.
13. 張代釗 : 中西醫結合治療癌證, 山西, 山西人民出版社, 1984:11-19.
14. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, 1980:1-10.
15. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, 1995:37-42.
16. 전병훈, 문석재, 문구, 노훈정 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌 1996;2(1):43-56.
17. 趙鈴林의 1인 : 桃紅四物湯이 L1210세포가 이식된 마우스의 면역계에 미치는 효과, 東醫病理學會誌 1999;13(1):132-140.
18. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, 1987:538.
19. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著 : 本草學, 서울, 永林社, 1999:531-537, 540-541, 578-583.
20. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 1983;65(1-2):55-63.
21. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods, 1990;129(1):23-30.
22. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Planning" for lymphocytes ; A method for cell selection. Proc.

- Natl. Acad. Sci., USA, 1978;75(6):2844-2848.
23. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. : Regulation of lymphocyte-activating factor(LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF. *J. Immunol. Methods*, 1979;122(6):2173-2179.
 24. Rockett, K.A., Auburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. : Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immun.*, 1991;59(9):3280-3283.
 25. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*(6th ed). Iowa state Uni(ames). 1967.
 26. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, 1997:169, 175, 221, 223, 283, 321, 332, 380, 381, 387, 453, 454, 463, 473, 506, 636.
 27. 윤용감, 동의방제와 처방해설, 서울, 의성당, 1998:603.
 28. 鄭遇悅 : 韓方病理學, 裡里, 서울공판사, 1985: 5-34.
 29. 康命吉 : 濟衆新編, 서울, 杏林書院, 1982:182.
 30. 傅 芳 : 中醫免疫思想及成就, 新中醫 1984;25 (11):55-57.
 31. 이창혜 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성, 연세대학교 대학원(碩士), 1983.
 32. Kim, S.H. : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J. Kor. Cancer Assoc.* 1989;21(1):11-17.
 33. Park, C.G., Lim, D.K., Kook, Y.H., Cha, C.R. and Paik, C.G. : In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J. Kor. Cancer Assoc.* 1990;22(1):61-65.
 34. Willson, J.K.V., Bittner, G.N., Oberley, T.D., Meisner, L.F., & Weese, J.L. : Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *J. Cancer Res.* 1987;47(10):2704-2713.
 35. 김상호 외 4인 : 일반병리학, 서울, 고문사, 1995: 51-54, 348-349.
 36. 하대유 외 25인 : 免疫學, 서울, 高文社, 1994: 1-32.
 37. 대한병리학회 : 병리학 제3판, 서울, 고문사, 1998:159-161.
 38. 鄭鉉雨 : 內托羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校 大學院(博士), 1996.
 39. 高光錫 : 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 實驗的 研究, 東醫病理學會誌 1994;9(1):21-45.
 40. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 1992;(12):3051-3064.
 41. Higuchi, M.M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. : Cytolytic mechanisms of activated macrophages ; Tumor necrosis factor and L-arginine-depenent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, *J. Immunol. Methods*, 1990;144(4):425-1431.
 42. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 1987;235:473.
 43. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uni, K. and Sasada, M. : Mechanism of leukemic cell lysis by activated human macrophages ; leukemic cells can be lysed without direct contact. *Int. J. Hematol*, 1994;60(1):51-57.
 44. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleand, H.E.Jr., Gilleland, L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. : Neutrophil-mediated nitrosamine formation ; role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology*, 1992;103(4): 1260-1266.