加味蔘朮三子湯의 抗癌活性에 관한 연구

김성언[1] · 이효정 · 이효정 · 김동희[1] · 송규용 · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원, 1:대전대학교 한의과대학

Study on Study on Antitumor Activity of Kamisamchulsamja-tang

Seong Eon Kim[1], Hyo Jeong Lee, Hyo Jung Lee, Dong Hee Kim[1], Gyu Yong Song, Sung Hoon Kim*

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

The purpose of this study was to investigate the effect of Kamisamchulsamja-tang (KSST) water extract on the antitumor activity. The results were summarized as follows: KSST extract exhibited a weak cytotoxicity against HT1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 and SK-MEL-2 cells. KSST extract showed a inhibitoty effect on DNA topoisomerase I from calf thymus in a dose-dependent manner. Also, KSST extract showed antiadhesive effect on HT1080 cells but didn't showed on A549 cells to complex extracellular matrix. In pumonary colonization assay, a number of colonies in the lungs were decreased significantly in KSST treated group as compared with control group. In vitro neovascularization assays, angiogenesis was significantly inhibited in KSST treated group than control group. In CAM assay, KSST extract inhibited angiogenesis significantly at 15㎍/egg concentration as compared with control. From the above results it was concluded that KSST showed antitumor effect through the antimetastatic effect. So it is expected to be clinically helpful on the prevention of metastasis of cancer.

Key words : Kamisamchulsamja-tang(加味蔘朮三子湯), cytotoxicity, anti-adhesion, CAM assay, T/C %, DNA topoisomerase I

서 론

오늘날 국민 건강을 저해하는 주요 질환이 과거와는 달리, 산업사회로의 전환에 따른 생활양식 및 환경의 변화로 인하여 中風, 痴呆, 糖尿病 및 癌 등의 각종 난치병이 주종을 이루고 있어[1], 사회적으로 심각한 문제로 대두되고 있다. 특히 악성종양이라 일컫는 癌은 발생 원인과 기전이 명백히 알려져 있지 않고, 생물학적 성상의 복잡성[2]과 더불어 치료에 다용되는 화학약품의 독성작용으로 인한 과민반응과 부작용으로 인해 치료의 한계성을 나타내고 있다[3]. 이러한 현실적인 한계성과 문제점으로 인하여 최근에는 암의 효과적인 치료법 개발을 위하여 신규물질 개발에 막대한 연구비가 투자되고 있으며, 한의학이 대체의학으로써 인식되어 이에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 한의학에서 암의 치료는 扶正培本法, 祛邪法 및 扶正祛邪法 등[4]으로 대별되며, 암증의 진행 정도와 환자의 상태에 따라 초기는 攻法을 위주로, 中期나 末期는 補法을 위주로 한 치료를 실시하고 있으며, 이미 이에 대한 유의성있는 결과들이 보고된 바가 있다[5]. 또한 최근에는 이러한 임상적 보고와 더불어 韓藥, 韓方處方 또는 藥針液을 시료로 세포독성 및 항전이작용[6]을 통한 항종양 효과와 면역증강효과를 통한 항암제 및 방사선 부작용 억제효과[7] 등을 살펴보는 많은 실험연구가 진행되었으나, 현재까지의 연구결과는 기존의 치료법를 대체할 수 있을 정도로 효과가 뛰어난 것은 아니기 때문에 향후에도 이에 대한 많은 연구가 요구되고 있다. 特히 암의 특징이 점차 전신적, 다장기적 질환으로 전환된다는 점에서[2,3], 서양의학과 달리 인체의 균형과 조화를 중시하는 한의학적 암치료 방법에 대한 연구가 앞으로 더욱 활발히 이루어질 것으로 보인다. 蔘朮三子湯은 《癌症效方 240首》[8]에 기재된 처방으로, 人蔘, 枸杞子, 女貞子, 菟絲子, 白朮 및 破故紙로 구성되어, 임상에서 화학료법을 받은 말기위암 환자에게 병용투여하여 유의성있는 결과가 보고된 바가 있다. 시료인 加味蔘朮三子湯은 이러한 蔘朮三子湯에 항암효과가 인정[9]된 白花蛇舌草, 魚腥草 및 仙鶴草를 가미하여 扶正祛邪法에 부합되게 작방한 처방으로, 가미한 약물과의 상승작용으로 보다 유의성있는 항종양 효과가 나타날 것으로 기대된다.

이에 저자는 加味蔘朮三子湯을 시료로 수종 암세포에 대한 세포독성, DNA topoisomerase I 활성 억제효과, 복합기질에 대한 부착저지효과, S-180에 대한 생명연장률, 실험동물에서의 혈

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1, 경희대학교 동서의학대학원
E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179
· 접수: 2002/04/09 · 수정: 2002/06/12 · 채택 : 2002/07/22

액변화, pulmonary colonization 억제효과, chorioallantoic membrane(CAM), neovascularization assay를 통한 혈관형성억제 효과 등을 측정하여 항암 및 항전이 효과를 검색하였던 바 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약재

동물은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A) 및 C57BL/6 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(抗生劑 無添加, 三養飼料 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 가미삼출삼자탕 처방의 내용은 《癌症效方 240首》[8] 기재된 蔘朮三子湯을 기본방으로 가미구성하였으며, 한 첩의 분량은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of Kamisamchulsamja-tang

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
人 蔘	Ginseng Radix	15g
女 貞 子	Ligustri lucidi Fructus	15g
枸 杞 子	Lycii Fructus	15g
菟 絲 子	Cuscutae Semen	15g
白 朮	Atractylodis macrocephalae Rhizoma	10g
破 古 紙	Psoraleae Fructus	10g
仙 鶴 草	Agrimoniae Herba	6g
魚 腥 草	Houttuyniae Herba	6g
白花蛇舌草	Oldenlandie diffusae Herba	10g
總 量		102g

2. 검액의 조제

加味蔘朮三子湯의 2첩 분량(204g)을 각 대응약탕기에 넣고 증류수 1,200㎖와 함께 넣은 다음 2시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461)에서 減壓濃縮하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 방치하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 동결 건조하여 29.45g의 분말을 얻어, 검액으로 제조하여 사용하였다. 동물 실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포독성 실험시에는 RPMI 1640 free medium에 용해시켜 syringe filter(0.22㎛, Falcon)로 여과하여 사용하였다.

3. 시약 및 기구

시약은 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 dodecyl sulfate(SDS), trypsin-EDTA, sulforhodamine-B(SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopoly saccharide(LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 等은 Sigma社 製品, ethanol, HCl은 Merck社 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, glicial acetic acid는 德山社 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 製品, 受精卵은 풀무원社 製品, intralipose는 綠十字社 製品, Tissue culture coverslip은 Nunc社 製品을 各各 使用하였다. 機器는 CO_2 incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted microscope (Nikon Co, Japan), bright microscope (UFX-DX, Nikon), linear accelerator(Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScan(Becton dickinson, U.S.A), rotary 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(5㎖, 10㎖, 25㎖, Falcon), camera(601S, Nikon) 및 syringe filter(0.22㎍, Falcon) 等을 使用하였다.

4. 세포배양

In vitro 세포독성 측정에는 HT1080 암세포주와 (ATCC CCL 121) A549 (ATCC CCL185) 폐암주, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 난소암주, SK-MEL-2 (ATCC HTB 68) 흑색종 및 B16-F10(ATCC CRC 6322)를 사용하였는데, 이들의 배양액은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지를 56℃ 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 포함하고 1% 항생제(penicillin-G 10만 units/ streptomycin 100mg)와 $NaHCO_3$ 2g을 첨가하여 제조하였다.

5. A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, HT-1080 암주에 대한 세포독성 측정

Solid tumor에 대한 세포독성은 1989년에 미국의 국립암연구소에서 약물의 in vitro 항암활성도를 측정하기 위하여 개발된 sulforhodamine-B (SRB) assay 법[10]을 사용하였다.

6. DNA topoisomerase I assay

실험에 사용된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomeras I 저해 IC_{50}값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였다. Topo I 활성의 측정은 Liu와 Miller의 방법[11]에 따랐다. 즉, 50mM $MgCl_2$, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5㎍ pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 가하여 총 반응액을 20㎕가 되게 한 것을 대조군으로, 효소와 시료를 가하여 총 반응액을 20㎕되게 한 것을 시험군으로 하여 이들을 37℃에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 용액 5㎕를 첨가하여 반응을 종결시키고, 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5㎍/㎖의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 염색, 자외선 下에서

사진을 찍은 다음 scanner를 사용하여 활성 밴드를 측정하였다. 이 때 topo I의 1unit는 37℃에서 30分間 반응시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 촉매하는 효소의 양을 의미한다.

7. A549, HT1080 癌株의 부착저지 작용 측정

A549, HT1080 세포를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 세포 농도를 조절하면서 키웠다. 암세포는 2% FBS로 조절한 배지에 현탁시켜 96 well plate의 각 well에 100㎕씩 가한(5×10^4cells/well) 후 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도의 시료를 녹인 배지 100㎕를 가하고 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. 3시간 후 배양액을 제거시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 세척한 다음 24시간 배양시킨 후 SRB법에 의하여 바닥에 붙어 있는 세포수를 관찰하였다.

8. 폐암 전이억제 작용 측정[12)]

In vitro에서 繼代培養한 B16-BL6 폐암세포를 실험에 사용하였다. 즉, 繼代中인 이들 세포들을 실험에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시켜 HBSS 용액으로 세포수가 2×10^4 cells/㎖이 되도록 세포현탁액을 만들었다. 18~20g인 C57BL/6에 細胞懸濁液 0.2㎖을 尾靜脈 주사하였다. 검액은 B16-BL6 암세포를 이식한 후 24시간부터 1日 1回씩 24.90㎎/20g/day의 시료를 생리식염수에 녹여 4℃에서 보관하면서 7일간 매일 zonde를 사용하여 경구 투여하였다. 암이식 21日 후에 cervical dislocation으로 치사시킨 다음 개복하여 폐에 전이된 암세포 colony를 계산하였다.

9. 혈관 형성 억제작용 測定

1) CAM(Chorioallantoic membrane) assay

CAM assay는 기존의 알려진 방법에 의하여 실시하였다[13)].

2) In vitro neovascularization assay[14)]

인간의 태반에서 臍帶靜脈 內皮 細胞(HUVEC)에서 기원한 血管新生 內皮細胞인 ECV 304 細胞의 血管을 형성시키기 위해서 Schnaper 등의 방법에 준하여 basement membrane인 matrigel을 이용하여 新血管 형성을 유도하였다. Ice bath 위에서 96-well plate에 matrigel을 50㎕씩 넣어주었다. matrigel이 gel과 같은 상태로 되도록 37℃에서 30분에서 한시간 사이의 시간동안 incubation하였다. 그 동안 ECV 304 세포 수를 세어서 well당 2×10^4 cells이 되도록 하였다. 수를 센 ECV 304 세포를 matrigel이 덮인 96 well plate에 넣고, ECV 304 세포에 대한 세포독성 검사를 한 KSST 0.25㎍/㎖를 곧바로 처리하고, 혈관형성 활성물질인 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) 8㎎을 처리한 ECV 304 세포를 양성 대조군으로 하여 시간별로 matrigel 위에서 ECV 304 세포의 신혈관이 형성되는 모양을 전자현미경을 사용하여 혈관형성 유무를 판독하였다.

10. S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 腹腔內에 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 加해 400×g로 2분간 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포 침전물을 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상징액을 제거한 후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma 180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 세어 10^7cells/㎖의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1㎖씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군을 8마리로 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켜 보존용액(24.90㎎/20g/day)을 만든 후 4℃에 보존하였으며, 0.2㎖씩 경구로 1주일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 언급된 식[15)]에 따라 계산하였다.

실험결과

1. 암세포에 대한 세포독성효과

1) HT1080 암주에 대한 세포독성

HT1080 암주에 대한 세포독성 실험에서는 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 세포생존율이 대조군에 비해 각각 100.89±5.08, 99.83±3.06, 86.42±2.08%로 세포독성이 나타나지 않았다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of KSST on HT1080 Cells

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±2.43[a)]
0.25	100.89±5.08
0.5	99.83±3.06
1	86.42±2.08

a) : Mean±standard error, Control : Non-treated group, 0.25 : 0.25㎎/㎖ KSST treated group, 0.5 : 0.5㎎/㎖ KSST treated group, 1 : 1㎎/㎖ KSST treated group

2) A549 암주에 대한 세포독성

A549 암주에 대한 세포독성은 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 각각 99.95±3.81, 97.48±3.51, 87.03±4.75%로 세포생존율이 나타나 세포독성이 나타내지 않았다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of KSST on A549 Cells

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±3.75[a)]
0.25	99.95±3.81
0.5	97.48±3.51
1	87.03±4..75

3) SK-OV-3 암주에 대한 세포독성

SK-OV-3 암주에 대한 세포독성은 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 대조군에 비해 각각 102.06±4.76, 98.85±2.08, 96.59±3.75%로 세포독성이 나타내지 않았다(Table 4).

Table 4. Cytotoxic Effect of KSST on SK-OV-3 Cells

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±2.42[a)]
0.25	102.06±4.76
0.5	98.85±2.08
1	96.59±3.75

4) B16-F10 암주에 대한 세포독성

B16-F10 암주에 대한 세포독성은 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 각각 99.63±5.96, 97.15±4.03, 99.21±2.07%로 세포독성이 나타나지 않았다(Table 5).

Table 5. Cytotoxic Effect of KSST on B16-F10 Cells

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±5.32[a]
0.25	99.63±5.95
0.5	97.15±4.03
1	99.21±2.07

5) SK-MEL-2 암주에 대한 세포독성

SK-MEL-2 암주에 대한 세포독성은 0.25, 0.5, 1㎎/㎖ 농도에서 각각 98.71±2.90, 96.39±4.26, 81.93±3.07%로 세포독성이 나타나지 않았다(Table 6).

Table 6. Cytotoxic Effect of KSST on SK-MEL-2 Cells

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±4.96[a]
0.25	98.71±2.90
0.5	96.39±4.26
1	81.93±3.07

2. DNA topoisomerase I 에 미치는 영향

50mM $MgCl_2$, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5㎍ pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 가하여 총 반응액을 20㎕가 되게 한 것을 대조군으로, 효소와 시료를 가하여 총 반응액을 20㎕되게 한 것을 시험군으로 하여 활성을 측정했다. 전기 영동을 실시하여 사진 촬영한 결과, figure 6에서 보는 바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 모두 relaxed form으로 전환되었다. 이에 비해 실험군은 농도의존적으로 topo-I의 활성을 강하게 억제하였다(Fig. 1).

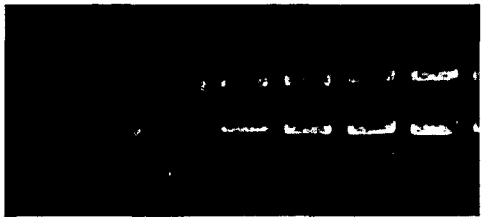


Fig. 1. Effect of KSST on the DNA topoisomerase I from calf thymus. Lane 1 : DNA(0.5㎍) only, Lane 2 : DNA + DNA topoisomerase I(0.5 unit), Lane 3 : DNA + DNA topoisomerase I(1 unit), Lane 4-7 : DNA + DNA topoisomerase I(1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500㎍/㎖ of KSST

3. HT1080 암주에 대한 부착 저지효과

HT1080 세포에 대한 부착저지 실험에서는 0.25, 0.5, 1㎎/㎖의 농도에서 대조군에 비해 101.65±8.31, 100.26±6.86, 70.00±2.07%로 1㎎/㎖의 농도에서만 30% 이상 세포 부착저지 효과를 나타내었다(Table 7).

Table 7. Inhibitory Effect of KSST on Cell Adhesion of HT1080 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±4.51[a]
0.25	101.65±8.31
0.5	100.26±6.86
1	70.00±2.07

4. A549 암주에 대한 부착 저지효과

A549 세포에 대한 부착저지 실험에서는 0.25, 0.5, 1㎎/㎖의 농도에서 대조군에 비해 102.12±8.56, 91.44±14.16, 79.50±13.91%로 미약한 세포부착저지 효과가 나타났다(Table 8).

Table 8. Inhibitory Effect of KSST on Cell Adhesion of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(㎎/㎖)	Percent of control
Control	100±4.96[a]
0.25	102.12±8.56
0.5	91.44±14.16
1	79.50±13.91

5. S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과

S-180이 이식된 생쥐에 KSST를 10일간 경구 투여한 후 체중 증가를 측정하였던 바, 복수암으로 인한 체중 증가는 대조군에서는 암주 이식 후 11일에 급격히 증가하여 16일에 모두 죽었다. 평균 생존일수에서 대조군의 MST는 13.25日, KSST 투여군은 22.38日로 나타나, T/C%는 168.90%로 나타났다(Table 9).

Table 9. Effect of KSST on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180.

Group	No. of animals	MST(day)	T/C(%)
Control	8	13.25	100
KSST	8	22.38	168.90

MST : 평균수명

6. 폐암전이에 미치는 효과

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 주사한 후 21日째에 폐장의 colony 수를 관찰한 결과, 대조군은 56.62±4.86(個)에 비해서 KSST 투여군은 26.97±6.59(個)로써 52.37%의 폐암전이 억제효과를 보였다(Table 10).

Table 10. Inhibitory Effect of KSST of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells.

Group	No. of animals	No. of colonies
Control	8	56.62±4.86
KSST	8	26.97±6.59

7. 혈관형성 억제효과

1) CAM assay에 의한 혈관형성 억제효과

CAM assay를 통한 혈관형성 억제효과는 실험에 사용된 수정난 10개중 3개에서 혈관형성 억제효과가 나타나 30%의 혈관형성 억제효과를 나타내었다(Table 11, Fig. 2)

Table 11. Antiangiogenic Activity of KSST in a CAM Assay

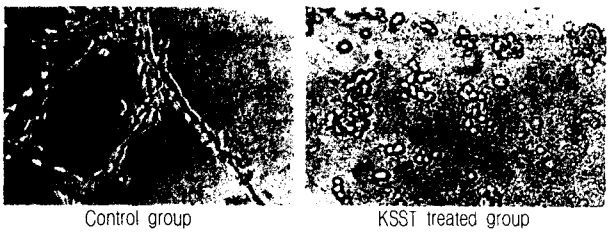
Sample	Dose(㎍/egg)	No. of CAM (avascular/total)
KSST	15	3/10

CONTORL KSST

Fig. 2. Photography of control and KSST on embryonic angiogenesis in CAM 2 day after sample implantation. Left panel: Control, Right panel: KSST(15㎍/egg).

2) ECV 304 세포에 의한 lumen 형성 억제효과

ECV 304 내피세포의 신생혈관 형성에서 대조군에서는 matrigel위에서 ECV 304 내피세포가 plating 후 1-2 시간에 matrigel위에 부착하고 3-5 시간에 cell clustering이 형성되고, 7-10 시간에 cell cord를 형성하여 혈관을 형성할 준비를 하며 12-18 시간에는 내강을 갖는 모세혈관이 형성되었으나, KSST를 가한 실험군에서는 Fig. 3에서와 같이 lumen 형성이 억제되는 것을 볼 수 있었다.



Control group KSST treated group

Fig. 3. Photography of in vitro neovascularization by ECV304 in control and KSST group.

고 찰

암의 치료법으로 서양의학에서는 手術療法, 化學療法, 放射線療法 등이 다용되고 있으나[15], 이들 대부분이 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어, 각종 부작용을 초래하는 문제점이 대두되고 있다. 한의학에서는 종양은 오늘날 암의 형태와 유사한 "瘤"가 은주시대에 갑골문에서 최초로 기록된 이래, '積聚', '鼓脹', '腸覃', '石瘕', '癥瘕', '癰疽', '瘿瘤', '反胃', '噎膈', '乳巖', '石疽' 및 '石癰' 等이 癌과 類似 病症으로 인식[16-20]되고 있다. 암에 대한 치료법으로 임상에선 攻法 위주의 치법, 補法 위주의 치법 및 이들의 병용법인 攻補兼施 위주의 치법으로 대별하여 다양하게 응용하고 있으며, 특히 암의 특징이 점차 전신적, 다장기적 질환으로 전환된다는 점에서[2], 일부분의 장기 치료보다는 환자의 자체 정기를 증진시킴으로써 내부 장기간의 상호관계를 복원하는데 중점을 두고 있다. 이러한 임상연구와 더불어 최근에는 한약 및 처방을 이용한 항암제의 개발과 더불어 동서의학의 결합을 통한 치료효과의 증대 및 화학요법과 방사선료법의 부작용을 감소시키는 처방에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 시료의 기본방인 蔘朮三子湯은 《癌症效方 240首》[8]에 기재된 扶正益氣方으로 임상에서 화학료법이 실시된 말기위암 환자에게 병용투여하여 유의성있는 결과가 이미 보고된 바가 있으며, 시료인 加味蔘朮三子湯은 임상적으로 유의성이 이미 밝혀진 蔘朮三子湯에 淸熱解毒 작용이 있는 三種의 藥物을 가미하여 扶正祛邪法에 부합되게 작방한 처방이다. 加味蔘朮三子湯의 構成藥物의 효능을 살펴보면, 人蔘은 脾肺心에 入하여 大補元氣, 固脫生津, 安神하고, 枸杞子는 肝腎에 入하여 滋腎, 潤肺, 補肝, 明目하며, 女貞子는 肝腎에 入하여 滋補肝腎, 明目하고, 菟絲子는 肝腎脾에 入하여 補肝腎, 益精髓, 明目, 止瀉하며, 白朮은 脾胃에 入하여 補脾, 益胃, 燥濕, 和中하고, 補骨脂는 腎脾에 入하여 溫腎助陽, 納氣, 止瀉하는 等의 效能이 있다. 加味된 魚腥草는 肺에 入하여 淸熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하고, 白花蛇舌草는 胃大腸小腸에 入하여 淸熱利濕, 解毒消腫하며, 仙鶴草는 肺肝脾에 入하여 收斂止血, 截瘧, 止痢, 解毒하는 효능이 있는데, 특히 이 세가지 약물은 이미 항암 활성이 인정되어 각종 암에 응용되고 있다[21,22]. 본 실험에서는 이러한 본초학적 효능과 임상적 보고를 바탕으로, 정거사법에 부합되게 작방한 加味蔘朮三子湯을 시료로 항암 및 항전이 효과를 실험적으로 평가하고자 하였다. 먼저 抗癌活性 효과 측정에서는 수종 암세포에 대한 세포독성, DNA topoisomerase I 활성억제 작용 및 S-180에 대한 생명연장률 등을 측정하였다. SRB법을 사용한 수종 암주의 세포독성 평가에서는 실험암주인 HT1080, A549, SK-OV-3, B16-F10 및 SK-MEL-2 癌株에 대하여 세포독성이 미약하여(Table 2-6), 전반적으로 NCI manual에 따른 세포독성 평가 기준치에는 미치지 못하였다. DNA topoisomerase는 DNA의 supercoiling state를 조절함으로써 複製, 轉寫의 initiation의 效率性에 影響을 주며, 이러한 과정들이 진행되는 단계에서 DNA topological 문제를 해결해 준다[23]. 이와 같이 DNA topoisomerase는 細胞內 DNA의 여러 기능에 필수적으로 그들의 억제제들은 抗癌, 抗生劑 개발의 목표가 되고 있어[23-26], 본 실험에서는 KSST를 농도별로 처리하여 DNA topoisomerase 활성 억제능을 평가하였다. DNA에 topo-I을 처리한 대조군에 비하여(L3), KSST 투여군은 농도의존적으로 topo-I의 활성을 억제하였고, 100-150㎍/㎖의 IC_{50}이 나타났는데 (Fig. 1), 한방처방이 복합물질인 점을 감안하면 유의성있는 결과로 볼 수 있다. In vivo 실험인 S-180 동물 실험에서는 생쥐에 KSST를 10일간 경구 투여한 후 이들의 평균 생존일수를 측정한 결과, 대조군의 MST는 13.25日, KSST 투여군은 22.38日로 나타났다(Table 9). 전이란 암의 침윤 과정에서 암 세포가 혈관이나 림프관을 타고 다른 장기나 조직에 뿌리를 내려 그곳에서 새롭게 증식을 시작하는 것으로, 양성종양은 전이하지 않기 때문에 악성종양인 암에서 나타나는 특징이라 할 수 있다. 결국 암환자를 죽음으로 이르게 하는 것은 일차적인 종양이 아니고, 전이에 의하여 이루어진다는 점에서 암의 병리 기전상 중요하게 인식되고 있다[27,28]. 본 실험에서는 이에 대한 실험으로는 in vitro에서 복합기질에서 A549, HT1080 암주에 대한 부착 저지작용을, in

vivo에서 B16-BL6 암주를 이식한 생쥐의 lung colony 형성 억제 작용과 혈액학적 변화를 측정하였으며, 최근 항전이작용을 탐색하기 위하여 사용되어지고 있는 neovascularization assay와 CAM assay를 통하여 혈관형성 억제작용을 측정하였다. A549, HT1080 세포에 대한 부착저지 실험에서는 HT1080 암주에서만 1㎎/㎖의 농도에서 30% 以上 세포 부착 저지효과를 나타내었고(Table 7), A549 세포에서는 미약한 세포부착저지 효과가 나타났다(Table 8). 반면 in vivo 실험인 colony 형성 억제에 미치는 효과에서는 대조군에 비해서 KSST 투여군은 52.37%의 폐암전이 억제효과를 보임으로써(Table 10) 유의성있는 결과가 나타났다. 혈관형성은 신생혈관(new blood vessel)이 생성되는 근본과정으로써 기존의 세정맥 바깥쪽에 존재하는 기저막(basementmembrane)이 蛋白質 分解酵素인 collagen, plasminogen과 같은 활성인자들에 의해서 부분적인 분해가 일어난 후 내피세포(endothelial cell)가 새로운 혈관형성의 유도물질(angiogenic factor)를 향해 이동하는 것으로 시작한다[29,30]. 이동한 내피세포들은 서로 연결되어 solid sprout가 생기고 이어서 각각의 내피세포들에 彎曲(curvature)이 일어나서 lumem이 생성된다. 이 후 내피세포들의 증식이 일어나서 sprout의 길이가 증가되어 두 끝이 둥글게 결합함으로써 loop를 형성하게 되고 이 곳으로 혈액이 흐르게 된다. 암 역시 영양분 공급 및 노폐물 배출을 위하여서는 이러한 혈관형성을 필요로 하며, 아울러 이를 이용하여 다른 장기 내지 조직으로 전이가 가능하게 된다. 따라서 혈관형성은 암의 成長(growth)과 浸透(invasion), 轉移(metas tasis)에 중요한 단계로, 최근 암의 치료 방법중 하나로 이러한 혈관 형성을 억제하는 antiangiogenic therapy에 대한 연구[31]가 심도있게 진행되고 있다. 먼저 in vitro에서 ECV 304 內皮細胞를 이용한 血管形成 억제작용 측정은 대조군에서 matrigel에 ECV 304 內皮細胞가 plating 후 12-18 시간에는 내강을 갖는 毛細血管이 형성된 반면, KSST 투여군에서는 Fig. 3에서와 같이 대조군에 비하여 lumen 형성이 억제됨으로써, 암전이에 필수적인 혈관형성 억제작용을 나타내었다. In vivo 방법으로써, cornea assay, intradermal assay, disc assay, angiogenesis assay, HCP assay 등[32-35]과 더불어 항혈관형성 실험에 널리 사용되고 있는 CAM assay에서는 실험에 사용된 受精卵 10個중 3個에서 혈관형성 억제효과가 나타나 30%의 혈관형성 억제효과를 나타내었다(Table 11). 이렇듯 본 시료가 세포독성이 미약하고, ECV 304 내피세포를 이용한 실험 및 CAM assay에서 혈관형성억제 효능을 나타난 점은, 혈관형성 억제물질 검색시 가장 효과적인 혈관형성억제물질을 '세포독성이 없으면서 혈관형성을 억제하는 물질'로 보는 점을 감안하면, 상기의 결과는 의미있는 결과라 볼 수 있다.

이상의 내용을 종합하여 보면, 加味蔘朮三子湯은 세포독성은 약하지만, 복합기질에서의 附着沮止作用, lung colony 形成抑制作用, ECV 304 內皮細胞 및 CAM assay 등에서 효과적인 결과가 나타나고, MST에서 160%를 上廻한 점은, 본 시료의 항종양 기전중 항전이작용이 주요 기전중에 하나임을 알 수 있다. 아울러 약물의 구성과 임상보고면에서 볼 때, 향후 본 시료의 면역조절작용에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

加味蔘朮三子湯의 항암활성을 실험적으로 구명하고자, 수종 암세포에 대한 세포독성, topoisomerase I 활성 억제작용, sarcoma 180에 대한 생존비, A549와 HT1080 암주에 대한 부착저지작용, 폐암전이 억제작용 및 혈관형성 저해작용 등을 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. DNA topoisomerase I assay에서는 농도의존적으로 효과적인 topo-I의 활성 억제작용을 나타내었다. S-180이 이식된 생쥐를 이용한 항암실험에서는 168.9%의 생존비를 나타내었다. 복합외기질에 대한 부착저지 효과에서는 HT1080 암주에서만 1㎎/㎖의 농도에서 30% 이상 세포부착 저지효과를 나타내었다. B16-BL6에 의한 폐장전이 억제효과에서는 대조군에 비해 52.37%의 pumonary colonization 형성 억제효과를 나타내었다. 혈관형성 억제효과에서는 CAM assay에서 30%의 억제효과를 나타내었고, neovascularization assay에서는 대조군에 비해 유의성있게 lumen 형성을 차단하였다. 이상의 결과를 보아 가미삼출삼자탕은 임상에서 암의 전이예방 및 치료에 활용가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 과제인 한방치료기술 중점공동연구과제(01-PJ9-PG1-01C005-004)와 Brain Korea 21 project의 지원에 의해 수행되었는바 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 통계청 : Annual report on the cause of death stastistics (Based on vital registration), Seoul, yoohansa, 1997.
2. 송계용 외 : 核心病理學, 서울, 高麗醫學, pp.151-160, 1998.
3. 전국의과대학교수 : 오늘의 진단 및 치료, 서울, 한우리, pp.85-95, 1999.
4. 陳炳旗 : 扶正法在腫瘤治療中的臨床運用, 浙江中醫學院學報, Vol.17, No.4, pp.20-21, 1993.
5. 趙健斌 : 吳一純教授治療晩期惡性腫瘤的經驗, 陝西醫學, 第14期, pp.451-453, 1993.
6. 崔政和 : 當歸飮子加蟅酥가 皮膚癌細胞의 細胞毒性에 미치는 影響, 大韓外官學會誌, Vol.9, No.1, pp.1-15, 1996.
7. 金東熙 : 加味四君子湯, 加味地黃湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性과 放射線 副作用 抑制 效果, 大田大學校大學院, 1998.
8. 柯新橋 外 : 癌症效方 240首, 北京醫科大學出版社, p.213, 1993.
9. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 永林社, p.223, p.385, p.212, p.531, p.536, p.559, p.568, p.596, p.600, 1991.
10. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., Mc Mahon, J.D., Vistica, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. ; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82(13), pp.1107-1112, 1990.

11. Liu, L. F. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.371-389, 1990.
12. Martin J. Humphries., Kazue Matsumoto, Sandra L. White. and Kenneth Olden : Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice : Blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors, Cancer Reserach, 46, pp.5215-5222, 1986.
13. Robert, A. Wanda, A Igor, P. : Assays for angiogenesis, Pharmac., Ther., 51, pp.1-11, 1991.
14. 김응국 外 : 新血管形成 기작 硏究를 위한 生體外 모델 시스템 확립 : ECV 304 內皮細胞株를 利用한 新血管形成 모델 및 염기성 섬유아세포 成長因子의 生産, 1997.
15. Hellmann, K., Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
16. 方藥中 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.12-16, 621-635, 1986.
17. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 杏林出版, 서울, pp.142-165, 1995.
18. 中國中西醫結合硏究會 中國中醫硏究院 編 : 惡性腫瘤中西醫結合硏究成就, 中西醫結合雜誌, 8(2), p.57, 1988.
19. 한종현 外 : 紅花가 人體의 癌細胞株에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 17(2), pp.303-310, 1996.
20. 厲 暢 : 癌의 中醫治療, 서울, 東洋醫學, 18(1):56-63, 1992.
21. 王 冰 : 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.1-2, p.73, 1990.
22. 李 岩 : 腫瘤臨床備要, 人民衛生出版社, pp.356-366, 1980.
23. Champoux, J. J. : In DNA Topology and its Biological Effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.217-242, 1990.
24. Y. H. Hsiang, and L. F. Liu ; Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, Cancer Res., 48, pp.1722~1726, 1988.
25. D. K. Trask, and M. T. Muller ; Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexed by actinomycin D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, pp.1417~1421, 1988.
26. 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.
27. 大韓病理學會編著 : 病理學. 서울, 高文社, pp. 213-266, 1995.
28. 李春海 外 : 腫瘤生物學硏究進展, 北京, 軍事醫學科學出版社, pp.26-38, 1997,
29. Knighton, D. R., Phillips, G. D., and Fiegel, V. D. : Wound healing angiogenesis : indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. J. Trauma, 30 (Suppl. 12) : S134~144, 1990.
30. Fidker, I. J., Ellis, L. M. : The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell, 79, 185~188, 1994.
31. Folkman, J. : Tumor angiogenesis : Therapeutic implications, N Engl J Med., 285, pp.1182~1186, 1971.
32. Okawa, T., Hiragun, A., Yosida, Y., Ashino-Fuse, H., Tominaga, T., and Iwagushi, T. : Angiogenic aqctivity of rat mammary carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz [α]anthracene and its inhibition by medroxyprogesteron acetate: possible involvement of antiangiogenic action of medroxyprogesteron acetate in its tumor growth inhibition. Cancer Lett. 43, 85~92, 1988.
33. Oikawa, T., Hasegawa, M., Shimamura, M., Ashino-Fuse, H., Murota, S.I., and Morita, I. : Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Comm. 181, 1070~1176, 1991.
34. Tanaka, N. G., Sakamoto, N., Tohgo, A., Nishiyama, Y., and Ogawa, H. : Inhibitory effects of antiangiogenic agents on neovascularization. Exp. Pathol. 30, 143~150, 1986.
35. Gimbrone, M. A. JR., Cotran, R. A., Leapman, S. B., and Folkman, J. : Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. J. natn. Cancer Inst. 52, 413~427, 1974.