

修治巴豆 및 巴豆加黃連의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究

圓光大學校 韓醫科大學 脾系內科學教室

趙誠珪 · 文九 · 文錫載

I. 緒 論

巴豆는 漢代의 神農本草經¹⁾에서 最初로 “主傷寒溫虐熱 破癥瘕結聚堅積 留飲痰癖 大腹水脹 蕩鍊五臟六腑 開通閉塞 利水穀道 祛惡肉 除塊毒蟲注邪物 殺蟲魚” 등에 使用된 以來, 古今의 本草書籍^{2~24)}에서는 瀉下祛積 逐水退腫 祛痰飴瘡한다고 하여, 肺癰, 一切積滯, 水腫, 瘡瘍 등의 治療에 쓰였고, 最近에는 食道癌, 胃癌, 直腸癌, 膀胱癌, 急性白血病, 肺癌 및 乳腺癌 등의 治療에 應用되고 있다²⁵⁾.

黃連은 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 効能에 있어, 痢疾, 糖尿病, 胎毒, 疳疾, 心腹痛, 口內炎, 胃酸過多 등을 治療하며, 抗菌, 抗癌, 抗放射線效果 및 巴豆毒의 緩和作用 등이 있다^{2~24, 26~27)}.

韓醫學的으로 癌은 積聚, 腫瘍, 腫瘤, 癥瘕, 疝瘕, 腸覃, 痞塊, 石瘕, 血瘕, 噎膈, 反胃 등과 關聯된 疾患으로 認識되고 있으며^{28~30)}, 治療法으로는 初期의 積塊不大, 正氣未虛한 경우에는 行氣活血 軟堅消積法을, 中期의 積塊漸大, 正氣漸傷하여 邪盛正虛한 경우에는 攻補兼施法을, 末期의 積塊堅硬, 正氣損傷이 甚한 경우에는 扶正培本法을 使用하고 있다³¹⁾.

單一藥物의 抗癌效果에 대한 實驗的 研究로는 金³²⁾ 등에 의한 人蔘, 鹿茸의 抗體生產

抑制 緩和效果 및 任³³⁾에 의한 魚腥草, 鹿血, 猪苓, 穿山甲 등이 正常 免疫細胞에는 거의 毒作用을 일으키지 않으면서 강력한 抗癌效果가 있다는 報告 등이 있다. 複合製劑 藥物의 抗癌效果에 대한 研究로는 姜 등^{34~35)}에 의한 息黃丸, 肥氣丸 및 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 抗癌效果가 있다는 報告 및 金 등^{36~37)}에 의한 伏梁丸, 痞氣丸 및 消積正元散이 各種 癌細胞柱의 成長 阻礙 效果가 있다는 報告 등이 있다.

巴豆에 대한 實驗研究로는 韓³⁸⁾의 巴豆油가 생쥐의 腸管粘液 細胞에 미치는 效果 및 李 등^{39~40)}의 巴豆가 包含되어 있는 處方인 增損五積丸의 抗癌效果에 대한 報告 등이 있으나, 巴豆 單味에 의한 抗癌效果 및 巴豆의 毒性 緩和方法에 관한 實驗 研究는 아직 報告된 바 없다.

이에 著者는 抗癌作用이 있을 것으로 豫測되는 巴豆의 抗腫瘍效果를 알아보기 위하여 文獻的 根據下⁴¹⁾에 몇가지 修治法으로 分類하고, 巴豆의 毒性을 緩和시켜 주는 것으로 알려진 黃連^{26~27)}을 加하여 抽出한 여러 濃度의 抽出液으로 細胞毒性 檢定試驗, 抗腫瘍效果, 平均生存率 및 腫瘍細胞의 成長抑制에 미치는 影響 등을 觀察하여 有意성을 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 藥材 및 腫瘍細胞

1) 藥材

實驗에 使用한 藥材는 市中에서 購入하고 精選한 後에 使用하였으며, 修治法은 辛⁴¹⁾에 準하였다.

巴豆의 修治法

本草名	修治狀態	中量(g)	數值方法
巴豆 (Semen Tiglii)	①生巴 豆霜 (ST I)	37.5 g	膜心과 白膜을 버리고 종이에 包하고 打壓하여 淨油를 버리고 使用
	②炒巴 豆霜 (ST II)	37.5 g	膜心과 白膜을 버리고 炒熟한 後에 종이에 包하고 打壓하여 淨油를 버리고 使用
	③醋炒 巴豆 (ST III)	37.5 g	膜心과 白膜을 버리고 醋를 輔料로 하여 藥物과 同炒하여 使用(藥物 37.5 g 當 輔料 7.5ml)
	④炒黑 巴豆 (ST IV)	37.5 g	膜心과 白膜을 버리고 비교적 強한 火力로 加熱하여 藥物의 外面이 焦黃, 焦黑黃이 되도록 炒하여 使用
	⑤水煮 巴豆 (ST V)	37.5 g	膜心과 白膜을 제거한 藥物을 清水에 넣고 물이 잠길 程度로 하여 藥物의 內面에 白心이 없어질 程度로 5次 煮하여 使用
	⑥生巴豆 霜加黃 連(日) (ST I+RC)	生巴豆霜 37.5 g 黃連 37.5 g	生巴豆霜과 黃連을 同量으로 混合하여 使用

ST(Semen Tiglii) : 巴豆

RC(Rhizoma Coptidis) : 黃連

2) 腫瘍細胞

實驗에 使用한 腫瘍細胞柱는 韓國細胞柱銀行(Korea Cell Line Bank) 및 日本理研細胞銀行(Riken Cell Bank)에서 분양받아 使用하였다.

Human cell lines used in this experiment

Name	Source	Reference
A 549	Lung carcinoma, human	OCL 185
Caki-1	Clear cell carcinoma	HTB 46
LL2(LLC1)	Lewis lung carcinoma	CRL 1642
Sarcoma 180	Sarcoma, mouse	TIB 66
NIH/3T3	Fibroblast	CRL 1658

3) 實驗動物

體重 28±2 g의 C57BL/6 마우스나 ICR系 마우스를 使用하였다. 實驗動物은 一般배합사료(삼양사료 : 조단백질 22.1% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상)로 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 動物 飼育室의 環境은 溫度 22±1°C, 相對濕度 65±5%로 유지하였으며, 明暗은 12時間(08:00~20:00)間隔으로 調節하였다. 實驗期間 동안 물과 基本配合食餌는 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液調製

各各의 修治法으로 修治한 巴豆 各 37.5 g과 生巴豆霜(37.5 g)加黃連(37.5 g)을 증류수 1,000ml와 함께 환저플라스크에 넣고 冷却基를 부착하여 2時間동안 電熱基로 加熱하여 煎湯한 後, 3,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 上清液을 取한 다음, 濾過紙로 濾過한 濾液을 減壓回轉蒸發基를 이용하여 減壓濃縮한

滅菌乾燥基에서 완전히 증류하여 乾燥액기스 各各 7.9 g(수득율 21.0%)을 製造하였다. 이 乾燥액기스를 증류수로 再調整하여 使用하였으며, 試料를 細胞에 接種하기 前에 1.2, 0.8, 0.45, 0.2 μ m pore size의 micro filter(Milipore)를 利用하여 濾過滅菌하였다.

2) 細胞培養 및 器具滅菌

實驗에 使用된 腫瘍細胞柱들은 Roswell Park memorial Institute 1640(RPMI 1640)과 Dulbecco's modification of Eagles's medium (GIBCO) 등의 培養液으로 1週일에 1 또는 2 회씩 繼代培養하면서 使用하였다. Medium은 5%의 FBS(heat-inactivated fetal bovine serum)나 10 또는 20%의 FBS(fetal bovine serum)를 補充하여 使用하였으며, antibiotic-antimycotic(GIBCO) 處理를 하였다. 2 또는 3일에 1회씩 培地를 交換하였으며, 若 1週일에 1회씩 0.25% trypsin EDTA(GIBCO) 溶液으로 處理하여 細胞를 脫着시키고 繼代培養하였다. 餘分の 細胞는 nitrogen tank에 凍結保存한 다음 必要에 따라 解凍하여 使用하였다.

本 實驗에 使用된 細胞培養液 및 試藥은 DDW(deionized distilled water)를 使用하여 製造하였으며, micro-filter(pore size 0.2 μ m)를 이용하여 濾過滅菌하여 使用하였고, 器具는 121 $^{\circ}$ C, 15psi下에서 高壓濕熱滅菌하거나 160 $^{\circ}$ C dry oven에서 2時間以上 乾熱滅菌하여 使用하였다.

3) 細胞毒性 檢定試驗

(1) MTT assay⁴²⁾

MTT定量은 Mosmann 等の 方法에 따라 하였다. 繼代培養한 NIH/3T3 纖維母細胞를 0.25% trypsin-EDTA溶液으로 處理한 後 遠

心分離하여 培養液으로 細胞浮遊液을 製造하였다. 標準血球計算法을 利用하여 1×10^4 cells/well이 되도록 96 well-plate에 옮기고, 實驗群은 檢液을 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 μ g/ml 等の 濃度別로 添加하고, 10% FBS(fetal bovine serum)가 包含된 培養液의 最終 容積을 200 μ l 가 되게하여 24時間 培養하였으며, 對照群은 檢液 대신 MEM(minimum essential medium)을 投與하였다. 培養後, 上清液을 버리고 使用 當日 製造한 1mg/ml의 MTT溶液을 50 μ l 씩 各 well에 넣고 빛에 의한 MTT液의 還元을 防止하기 위하여 은박지로 包裝한 後, 4時間 동안 37 $^{\circ}$ C, 5%, CO₂로 維持된 定溫基에서 培養하였다. 培養後, 上清液을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO, Merck)를 50 μ l 씩 各 well에 넣고 plate를 잘 흔들어 15時間 室溫에서 放置한 다음 흡광광도계를 利用하여 503nm에서 흡광도를 測定하였다. 實驗結果는 對照群에 대한 百分率로 計算하였다.

(2) Lactate dehydrogenase(LDH)活性度 測定⁴³⁾

繼代培養한 NIH/3T3 纖維母細胞를 0.25% trypsin-EDTA溶液으로 處理한 後 遠心分離하여 培養液으로 細胞浮遊液을 製造하였다. 標準血球計算法을 利用하여 1×10^4 cell/well 이 되도록 96 well-plate에 옮기고, 實驗群은 檢液을 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 μ g/ml 等の 濃度別로 添加하고, 10% FBS (fetal bovine serum)가 包含된 培養液의 最終 容積을 200 μ l 가 되게하여 25時間 培養하였으며, 對照群은 檢液 대신 MEM(minimum essential medium)을 投與하였다. 各 well의 上清液을 採取하여 1,000rpm으로 10時間 遠心分離한 後 검체량 50 μ l 와 효소기질액 LD-L(Gilford) 1.0ml를 섞어 30 $^{\circ}$ C, 340nm에서

gilford Impact 400E를 利用하여 自動測定하였다.

4) 腫瘍細胞의 colony 形成抑制實驗⁴⁾

檢液이 腫瘍細胞에 미치는 cytotoxicity를 알아보기 위하여 Hamburger 等の 方法을 變形한 semisolid double layer agarose法을 利用하여 실시하였다. 卽 0.5% agarose, 10% FBS (fetal bovine serum)를 含有한 RPMI 1640培地 1ml씩을 35×10mm plastic petri dish에 分주하여 凝固될 때까지 溫室에서 放置하여 기저아가층(basal soft agarose layer)을 準備하였다. 試驗管內에서 繼代培養시킨 腫瘍細胞 A 549를 5×10⁵ cells/ml로 調整한 試驗管에 實驗群은 檢液을 1.6mg/ml, 0.8mg/ml, 0.4mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml의 濃度別로 넣어 37°C 6% CO₂ 培養基에서 培養하였으며, 對照群은 檢液대신 MEM(minimum essential medium)을 投與하였다. 培養 2時間 後 培養液을 遠心分離하여 上清液을 버린 後, pellet를 잘 분산시켜 0.3% agarose, 10% FBS(fetal bovine serum)를 含有한 RPMI 1640培地 1ml에 腫瘍細胞柱들을 1×10⁵ cells/ml로 調整하여 넣은 後 이미 凝固된 0.5% basal soft agarose layer위에 重層하였다. 그 後 37°C 6% CO₂ 培養基에 집락의 出現與否를 觀察하면서 若 10日間 培養하였다. 50個 以上の 腫瘍細胞가 모여있는 것을 細胞塊로 判定하여 colony數를 도립현미경×200倍率下에서 計算하였다. 檢液 各 濃度에서의 結果의 判定은 무처리 對照群의 colony數를 100%로 하여 藥劑에 反應시킨 腫瘍細胞柱의 colony數를 算出하였다. 各 群의 colony數는 群當 4個의 petri dish의 colony數의 平均値를 利用하여 評價하였으며, 實驗結果는 對照群에 대한 百分率로 計算하였다.

5) SRB(sulforhodamine B) assay^{45~46)}

Caki-1 等の 腫瘍細胞柱들을 25cm 250ml culture flask(Nunclon)를 利用하여 37°C 5% CO₂ 培養基에서 subconfluent monolayers로 維持하면서 RPMI 1640과 Dulbecco's modification of Eagles's medium(GIBCO) 等の 培養液으로 1週일에 1 또는 2回씩 繼代培養하면서 使用하였다. medium은 5 또는 10%의 FBS (fetal bovine serum)를 補充하여 使用하였다. contamination을 防止하기 위하여 antibiotic-antimycotic(GIBCO)處理를 하였다. 繼代數는 分讓받은 後, 5내지 20次例의 範圍에서 制限하여 細胞를 使用하였다.

培養한 細胞는 지수함수 培養基에 0.25% trypsin EDTA(GIBCO)溶液으로 trypsinization하여 細胞를 脫着시키고, trypan blue를 利用하여 hemocytometer chamber로 細胞數를 計算하고 medium에 잘 분산하여 5×10⁵ cells/ml로 調整하고 96-well flat bottomed microtitre plate(Nunclon)에 well當 200 μl씩 細胞현탁액을 分주하고 37°C 5% CO₂培養基에서 培養하였다. 24時間 경과 後, 各 well의 medium을 除去하고 實驗群은 檢液을 medium에 1.5mg/ml, 0.8mg/ml, 0.4mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml의 濃度別로 조정하여 37°C 5% CO₂ 培養基에서 48時間 培養하였으며, 對照群은 檢液대신 MEM(minimum essential medium)을 投與하였다. 培養 後 TCA(cold trichloroacetic acid)를 最終濃度 10%가 되도록 50% TCA(cold trichloroacetic acid)를 50 μl씩 各 well에 分주하여 蛋白質을 沈澱시켜 細胞를 고정한 後, 4°C에서 1時間동안 放置하였다. 常水로 5回 洗滌한 後 乾燥시키고, 乾燥된 各 well에 1% acetic acid에 溶解시킨 0.4% SRB(sulforhodamine B)溶液을 50 μl씩 加하여 常溫에서 20分 동안 染色을 한 後, 1%

acetic acid 4회 洗滌에 부착하지 않은 SRB (sulforhodamine B)를 除去하였다. plate를 잘 乾燥하여 150 μ l 와 10m mol/l 의 unbuffered Tris base(tris hydroxy-methyl amino methane)를 加하여 bound protein stain을 녹여냈다. 各 well의 OD(optical density)는 510nm 의 wave length에서 測定하였으며, 實驗結果는 對照群에 대한 百分率로 計算하였다.

6) In vivo 抗腫瘍效果⁴⁷⁾

(1) 生存日數의 測定⁴⁸⁾

ICR系 마우스를 對照群과 實驗群(6群)으로 各各 8마리씩 나누고, 各 實驗群은 檢液건조 엑기스 200mg/kg을 1日 1回씩 20日間 經口投與하였으며, 對照群은 同量의 生理食鹽水를 投與하였다.

實驗에 使用한 癌細胞는 sarcoma 180細胞를 每週 mouse에 繼代培養한 것을 利用하였다. 實驗 開始 1週日 前에 癌細胞가 移植된 mouse를 경추탈구법으로 致死시키고, 腹部를 切開한 後, 腹腔에서 癌細胞를 채취한 다음 赤血球 等を 除去하고 hemocytometer로 sarcoma 180細胞를 0.1ml(1.5×10^6 /mouse)로 調整하여 腹腔內에 移植한 後, 24時間 後부터 20日間 檢液을 投與하고 50日 동안 每日 生存與否를 觀察하여 實驗群의 平均生存日數(MST : median survival time)와 對照群의 平均生存日數 比인 延命率(ILS : increased life span)을 NCI의 標準方法으로 求하였다.

$$ILS = 100 \times (E - C) / C (\%)$$

E : MST value of experimental group

C : MST value of control group

(2) 腫瘍成長 抑制의 測定

① Sarcoma 180에 대한 實驗

對照群과 實驗群(6群)에 固型腫瘍 sarcoma 180 cell 2×10^6 /mouse를 ICR系 마우스 各各

8마리의 右側서혜부에 皮下注射한 後 24時間 後부터 實驗群은 檢液 200mg/kg을 20日間 經口投與하였으며, 對照群은 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 實驗開始 21日에 경추탈구법으로 致死시키고 固型癌을 摘出하여 重量을 測定하였다.

② Lewis lung carcinoma에 대한 實驗

對照群과 實驗群(6群)에 固型腫瘍 Lewis lung carcinoma cell 2×10^6 /mouse를 C57BL/6 마우스 各各 8마리의 右側서혜부에 皮下注射한 後 24時間 後부터 實驗群은 檢液 200mg/kg을 20日間 經口投與하였으며, 對照群은 同量의 生理食鹽水를 投與하였다. 實驗開始 21일3에 경추탈구법으로 致死시키고 固型癌을 摘出하여 重量을 測定하였다.

7) 統計處理

實驗結果의 統計處理는 Mac Stat View TM +512를 利用하여 student t-test에 準하였고, 實驗值의 表現은 Mean \pm SE으로 하였다.

III. 實驗成績

1. 細胞毒性 檢定試驗

1) MTT assay

NIH/3T3 纖維母細胞의 活性度를 나타내는 指標인 MTT定量을 위하여, 培養한 纖維母細胞에 檢液을 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10 , 1 μ g/ml씩 投與하여 24時間 處理한 後 對照群과 比較하여 細胞의 毒性 程度를 檢定하였다.

ST I 實驗群에서 1×10^2 , 1×10 , 1 μ g/ml 씩을 投與한 群에서는 毒性效果가 크지 않았고, 1×10^4 μ g/ml을 投與한 群에서는 52.4 \pm 6.2%의 細胞活性度를 나타내어 濃度의 增加

에 따라 毒性效果가 漸增하는 結果를 나타냈으며, ST II 實驗群에서는 각각의 濃度에서 ST I 實驗群에 比하여 細胞毒性作用이 減少되었다. ST III 實驗群에서는 細胞毒性이 強한 것으로 나타났으며, ST IV, V의 實驗群에서

는 類似한 結果를 보였다. ST I + RC 實驗群에서는 ST I 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보여 黃連의 加味로 인한 毒性의 增減效果가 나타나지 않았다(Table 1, Fig 1).

Table 1. The cytotoxic effect of prebrewed Semen Tigllii measured by MTT values and LDH activities in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblast with the aqueous extract of prebrewed Semen Tigllii

Group	Dose concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% of control	
		MTT	LDH
CONT	MEN	100	100
ST I	1×10^4	52.4 ± 6.2^b	138.5 ± 7.3^b
	1×10^3	68.3 ± 4.7^b	128.3 ± 6.2^b
	1×10^2	73.6 ± 6.2^b	116.4 ± 5.2^a
	1×10	87.2 ± 5.8^a	106.3 ± 3.2
	1	92.4 ± 4.7	102.8 ± 6.3
ST II	1×10^4	68.8 ± 4.9^b	126.2 ± 6.3^b
	1×10^3	74.9 ± 6.2^b	121.2 ± 7.2^b
	1×10^2	82.8 ± 6.7^a	113.2 ± 5.4^a
	1×10	90.6 ± 7.2	105.3 ± 6.3
	1	94.3 ± 3.7	102.7 ± 5.2
ST III	1×10^4	46.7 ± 6.2^b	143.7 ± 8.8^b
	1×10^3	54.3 ± 3.6^b	137.6 ± 6.9^b
	1×10^2	67.7 ± 5.4^b	129.4 ± 7.2^b
	1×10	78.3 ± 7.2^a	112.4 ± 6.2^a
	1	90.4 ± 6.3	106.4 ± 5.9
ST IV	1×10^4	49.8 ± 6.2^b	144.5 ± 6.3^b
	1×10^3	54.7 ± 6.9^b	132.8 ± 7.2^b
	1×10^2	71.3 ± 5.7^b	127.4 ± 6.5^b
	1×10	83.4 ± 6.3^a	110.1 ± 7.2^a
	1	90.6 ± 7.7	104.2 ± 8.3
ST V	1×10^4	47.2 ± 6.3^b	139.7 ± 6.2^b
	1×10^3	52.8 ± 7.2^b	133.4 ± 7.3^b
	1×10^2	69.3 ± 5.8^b	123.6 ± 5.9^b
	1×10	84.7 ± 6.3^a	112.4 ± 7.1^a
	1	91.2 ± 6.3	105.7 ± 6.2
ST I + RC	1×10^4	52.7 ± 7.2^b	136.3 ± 5.2^b
	1×10^3	65.6 ± 6.3^b	125.8 ± 7.4^b
	1×10^2	74.2 ± 6.3^b	120.2 ± 6.2^b
	1×10	89.4 ± 5.2^a	114.3 ± 5.7^a
	1	93.7 ± 6.2	105.6 ± 4.3

CONT : Control group treated with MEM(minimum essential medium) as a vehicle.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tiglii in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts (ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I + RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

The data are shown as mean \pm SEM of 8 samples. The statistic analysis between vehicle control group and treated group was performed by student'a T-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and treated groups : ^a)P<0.01, ^b)P<0.001

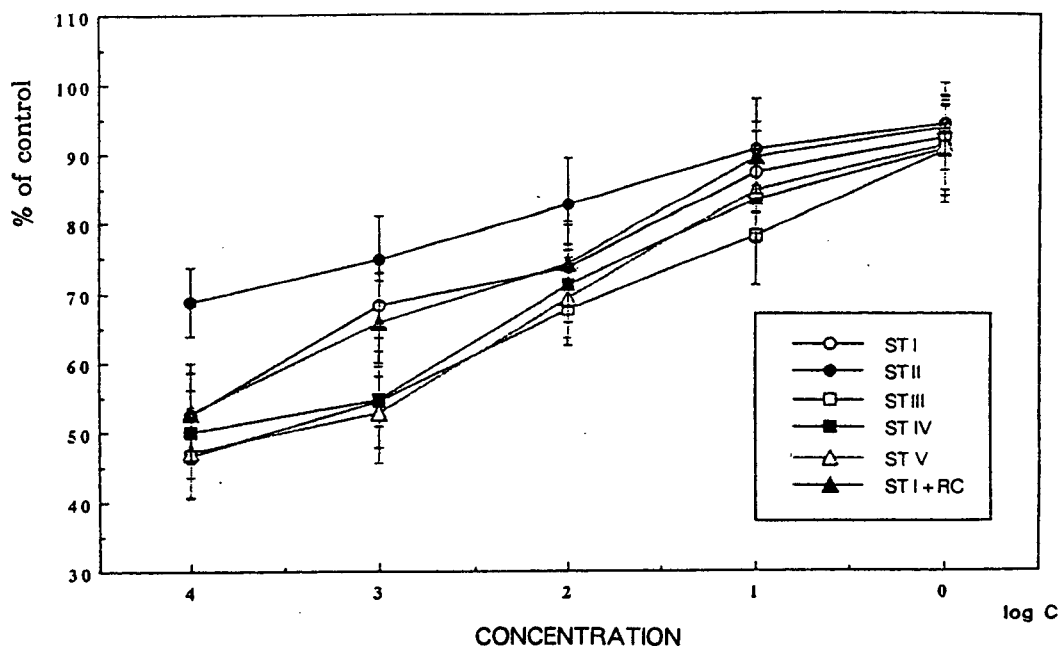


Fig 1. The cytotoxicity of prebrewed Semen Tiglii by MTT values in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblast with the aqueous extract of prebrewed of Semen Tiglii.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tiglii in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts (ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I + RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

2) Lactate dehydrogenase(LDH)活性度 測定 檢液을 投與한 培養液內의 纖維母細胞로부터 培養液으로 流出된 lactic dehydrogenase의 量을 測定하였다.

ST I 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度 等에서 各各 138.5 ± 7.3 , 128.3 ± 6.2 , $116.4 \pm 5.2\%$ 로 나타나 對照群에 比하여 增加되었다. ST II 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度 等에서 126.2 ± 6.3 , $113.2 \pm 5.4\%$ 의 增加를 보였고, ST III 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

의 濃度 等에서 143.7 ± 8.8 , 137 ± 6.9 , 129.4 ± 7.2 , $112.4 \pm 6.2\%$ 의 增加를 나타내어 ST I, II의 實驗群에 比하여 強한 毒性을 보였으며, ST IV, V의 實驗群에서도 類似한 結果를 보였다. ST I + RC 實驗群에서도 이와 類似한 樣相을 보여 MTT 定量法에 의한 細胞毒性과 一致하는 結果를 보였다(Table 1, Fig 2).

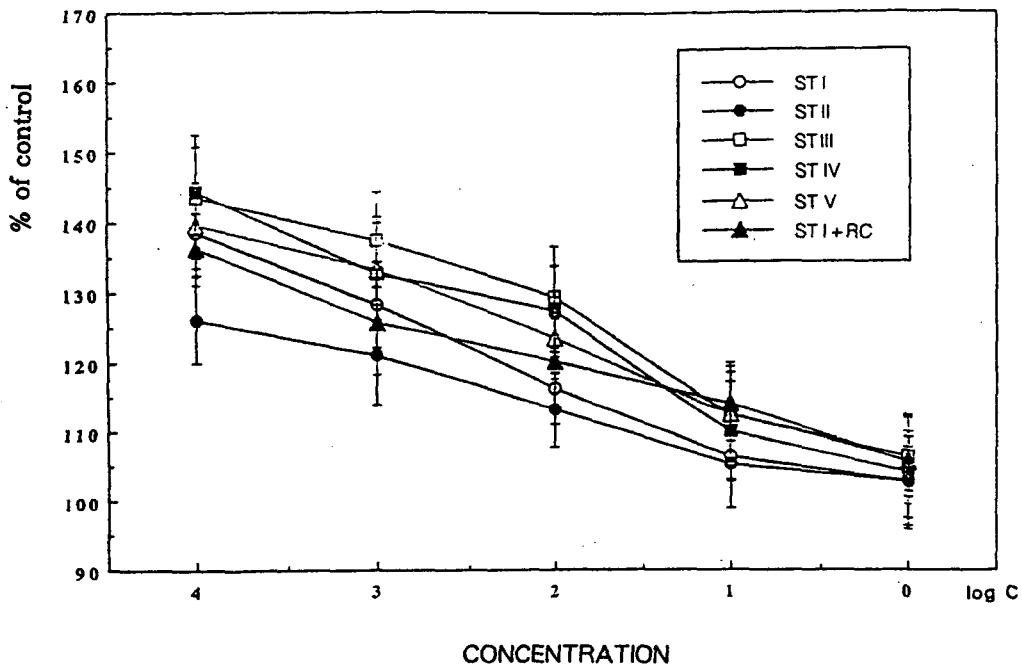


Fig 2. The cytotoxicity of prebrewed Semen Tigllii measured by LDH values in the supernatant of cultured NIH/3T3 mouse fibroblast with the aqueous extract of prebrewed of Semen Tigllii.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tigllii in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts (ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I + RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

2. 腫瘍細胞의 成長抑制에 미치는 影響

檢液이 腫瘍細胞의 成長에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 A 549 腫瘍細胞를 利用하여 colony 形成抑制 實驗을 實施하였다.

1) 腫瘍細胞의 colony 形成抑制 實驗

ST I 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度 等에서 各各 42.6 ± 2.4 , 59.7 ± 4.2 , $78.3 \pm 4.3\%$ 로 A 549 腫瘍細胞의 colony形成을 抑制하였다. ST II 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度 等에서 51.6 ± 3.2 , $79.6 \pm 6.3\%$ 로 A 549 腫瘍細胞의 colony形成의 減少를 보였고, ST III 實驗群에서는 ST

I 實驗群과 類似한 結果를 보였으며, ST IV, V의 實驗群에서도 類似한 結果를 보였다. ST I + RC 實驗群에서는 檢液의 各 濃度에서 52.6 ± 4.7 , 60.4 ± 5.2 , 76.8 ± 3.2 , 87.4 ± 5.7 , $97.5 \pm 3.9\%$ 의 colony形成 抑制를 보여 ST II 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보였다 (Table 2, Fig 3).

Table 1. The antitumor effect of prebrewed Semen Tigii measured by colony-forming efficiency (%) and absorbance in SRB assay of the cultured tumor cell, A 549 and Caki-1 cells

Group	Dose concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% of control	
		Colony forming efficiency	SRB assay(optical density)
CONT	MEN	100	100
ST I	1×10^4	42.6 ± 2.4^b	62.8 ± 3.7^b
	1×10^3	59.7 ± 4.2^b	72.9 ± 4.1^b
	1×10^2	78.3 ± 4.3^b	86.7 ± 6.2^b
	1×10	87.6 ± 6.3^a	91.3 ± 4.8^a
	1	94.7 ± 4.8	96.3 ± 3.2
ST II	1×10^4	51.6 ± 3.2^b	67.9 ± 4.1^b
	1×10^3	62.8 ± 4.7^b	76.5 ± 5.3^b
	1×10^2	79.6 ± 6.3^b	89.7 ± 5.2^b
	1×10	88.5 ± 7.2	94.6 ± 5.7
	1	96.5 ± 4.2	97.2 ± 6.1
ST III	1×10^4	42.7 ± 3.2^b	52.4 ± 7.3^b
	1×10^3	56.3 ± 4.1^b	69.8 ± 6.2^b
	1×10^2	75.6 ± 3.2^b	84.3 ± 4.7^b
	1×10	88.2 ± 4.8^a	91.3 ± 4.7^a
	1	95.3 ± 6.2	98.3 ± 3.6
ST IV	1×10^4	49.8 ± 6.2^b	56.3 ± 2.7^b
	1×10^3	54.7 ± 6.9^b	72.4 ± 4.3^b
	1×10^2	71.3 ± 5.7^b	82.8 ± 6.5^b
	1×10	83.4 ± 6.3^a	92.3 ± 4.7^a
	1	90.6 ± 7.7	98.3 ± 3.6
ST V	1×10^4	43.8 ± 6.2^b	56.3 ± 2.7^b
	1×10^3	52.4 ± 3.2^b	72.4 ± 3.6^b
	1×10^2	74.8 ± 4.2^b	83.2 ± 6.3^b
	1×10	83.6 ± 3.5^a	90.5 ± 4.7^a
	1	92.7 ± 2.8	95.3 ± 5.7
ST I + RC	1×10^4	52.6 ± 4.7^b	59.6 ± 3.2^b
	1×10^3	60.4 ± 5.2^b	68.4 ± 4.8^b
	1×10^2	76.8 ± 3.2^b	87.2 ± 3.5^b
	1×10	87.4 ± 5.7^a	93.6 ± 4.2^a
	1	97.5 ± 3.9	97.6 ± 3.5

Colony forming efficiency was measured in the cultured A 549 cells, and the optical density of sulforhodamine B(SRB) was measured in Caki-1 cells as the method of measuring the viability and cytotoxicity.

CONT : Control group treated with MEM(minimum essential medium)as a vehicle.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tiglii-treated group in the cultured tumor cells, A 549 and Caki- 1 cells

(ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I +RC : 生巴豆霜加黄连)

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

The data are shown as mean \pm SEM of 8 samples. The statistic analysis between vehicle control group and treated group was performed by student's T-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and treated groups : ^aP<0.01, ^bP<0.001.

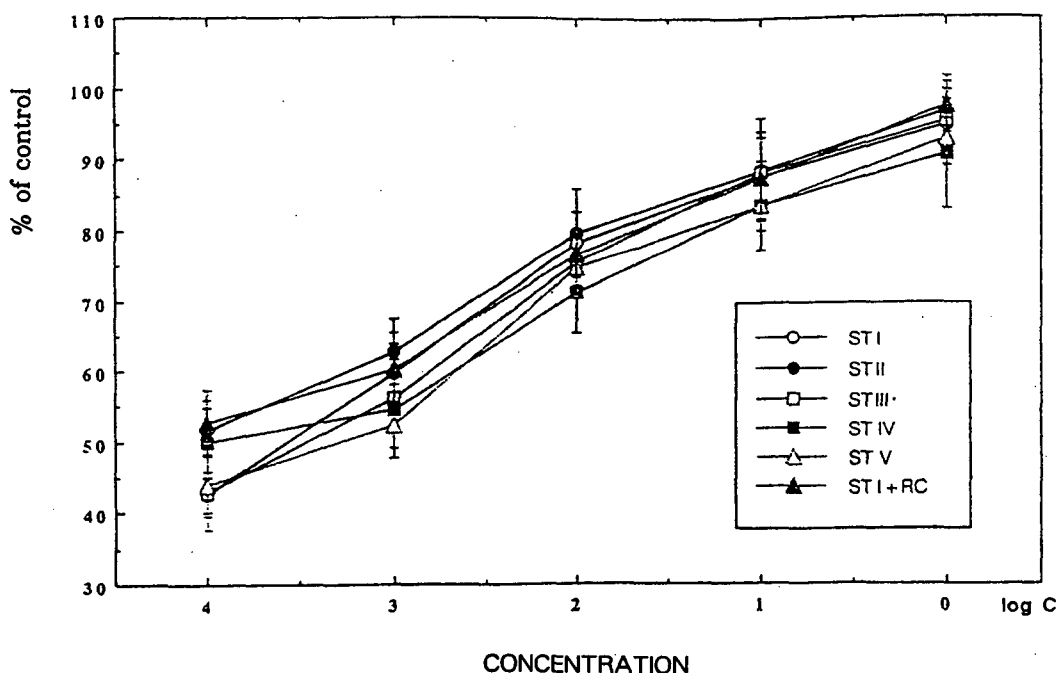


Fig 3. The antitumor effect of prebrewed Semen Tiglii measured by colony-forming efficiency of A 549 tumor cell.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tiglii in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts (ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I +RC : 生巴豆霜加黄连).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

2) SRB assay

檢液이 腫瘍細胞의 成長에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 Caki-1 腫瘍細胞를 利用하여 SRB assay를 實施하였다.

ST I 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度 等에서 各各 62.8 ± 3.7 , 72.9 ± 4.1 , $86.7 \pm 6.2\%$ 로 Caki-1腫瘍細胞에 對한 SRB(sulforhodamine B)의 optical density를 減少시켰다. ST II 實驗群에서는 1×10^4 , 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度 等에서 67.9 ± 4.1 , $89.7 \pm 5.$

2%로 optical density를 減少시켰고, ST III 實驗群에서는 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서 $52.4 \pm 7.3\%$ 의 減少를 보였으나 全般的으로 ST I 實驗群과 類似한 結果를 보였으며, ST IV, V 의 實驗群에서도 類似한 結果를 보였다. ST I +RC 實驗群에서는 檢液의 各 濃度에서 59.6 ± 3.2 , 68.4 ± 4.8 , 87.2 ± 3.5 , 93.6 ± 4.2 , $97.6 \pm 3.5\%$ 로 optical density를 減少시켜 ST III 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보였다 (Table 2, Fig 4).

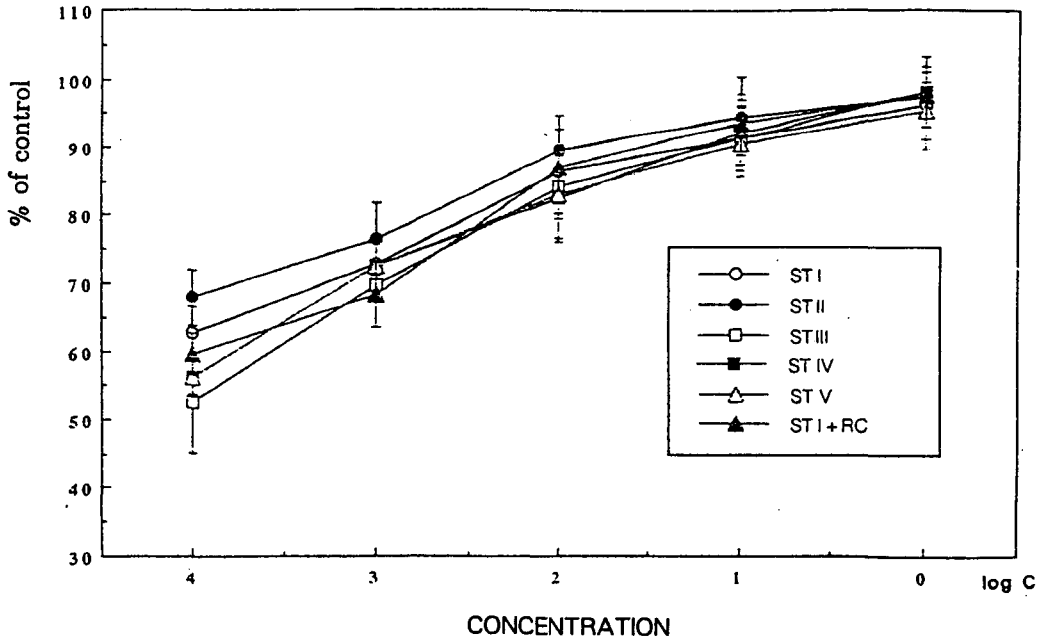


Fig 4. The antitumor effect of prebrewed Semen Tigllii measured by optical density in the SRB assay using Caki-1 tumor cells.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tigllii in the cultured NIH/3T3 mouse fibroblasts (ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I +RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

3. Sarcoma 180과 Lewis lung carcinoma에 대한 抗腫瘍效果

1) ICR 마우스의 平均生存率에 미치는 效果
Sarcoma 180 cell을 腹腔에 移植한 ICR 마우스에 檢液 200mg/kg을 投與하여 平均生存率에 미치는 效果를 觀察하였다.

對照群의 平均生存期間은 27.2 ± 2.9 日이었으며, ST I 實驗群의 平均生存期間은 32.2 ± 3.6 日로 對照群에 比하여 延長되었고, ILS는 18.4%였다. ST II 實驗群은 平均生存期間 34.9 ± 2.1 日 및 28.9%의 ILS를 나타내어 平均生存期間의 延長이 뚜렷하게 나타났다. ST III, IV, V 實驗群에서는 29.8 ± 4.2 , 30.2 ± 5.2 , 31.4 ± 3.8 日의 平均生存期間이었는데, 이것은 對照群보다는 增加하였지만 有意性은 없었다. ST I + RC 實驗群에서는 35.1 ± 3.9 日의 平均生存期間 및 29%의 ILS를 보여 全實驗群에서 가장 顯著한 平均生存期間의 延長效果가 나타났다(Table 3).

Table 3. Antitumor effect of the aqueous extract of Semen Tiglii and Rhizoma coptidis on ascites tumor induced by the intraperitoneal inoculation of sarcoma 180 cells in ICR mice

Group	Mean Survival Days (Mean \pm SE)	ILS (%)
CONT	27.2 ± 2.9	—
ST I	32.2 ± 3.6	18.4
ST II	34.9 ± 2.1	28.9
ST III	29.8 ± 4.2	13.2
ST IV	30.2 ± 5.2	11.0
ST V	31.4 ± 3.8	15.4
ST I + RC	35.1 ± 3.9	29.0

CONT : Control group treated with normal saline as a vehicle.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tiglii-treated group

(ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I + RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Coptidis.

ILS : Increased life span.

The data are shown as mean \pm SEM of 8 samples. The statistic analysis between vehicle control group and treated group was performed by student's T-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and treated group : * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

2) ICR 마우스의 固型腫瘍 成長抑制 效果

Sarcoma 180 cell을 ICR系 마우스 서혜부에 皮下移植하고 檢液 200mg/kg을 投與하여 固型腫瘍의 成長抑制에 미치는 影響을 觀察하였다.

實驗 21日에 경추탈구법으로 致死시킨 마우스에서 摘出した 對照群의 腫瘍重量은 1.37 ± 0.46 g 이었으며, 腫瘍細胞를 移植한 全實驗動物에서 腫瘍이 發生하였다. ST I 實驗群에서는 1.08 ± 0.56 g 으로 減少하는 傾向을 나타냈으며 腫瘍成長의 抑制率은 21.2% 이었고, ST II 實驗群에서는 0.99 ± 0.42 g 의 腫瘍重量 및 抑制率 27.7%로 나타났다. ST III, IV, V 實驗群에서는 各各 18.2, 22.6, 11.7%의 腫瘍成長 抑制效果를 보였으며, ST I + RC 實驗群은 0.96 ± 0.37 g 의 腫瘍重量 및 29.9%의 腫瘍成長 抑制率을 나타냈다(Table 4).

Table 4. Antitumor effect of the aqueous extract of Semen Tiglii on the growth of solid tumor induced by the subcutaneous inoculation of sarcoma 180 in the groin of ICR

Group	Tumor Weight(g) (Mean±SE)	Inhibition Rate (%)	Tumor incidence of recipient mice
CONT	1.37±0.46	—	8/8
ST I	1.08±0.56	21.2	7/8
ST II	0.99±0.42	27.7	7/8
ST III	1.12±0.32	18.2	7/8
ST IV	1.06±0.41	22.6	8/8
ST V	1.21±0.39	11.7	8/8
ST I +RC	0.96±0.37	29.9	7/8

CONT : Control group treated with normal saline as a vehicle.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tigllii-treated group

(ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I +RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Cop-tidis.

The data are shown as mean±SEM of 8 samples. The statistic analysis between vehicle control group and treated group was performed by student's T-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and treated groups : ^aP<0.01, ^bP<0.001.

3) C57BL/6 마우스의 固型腫瘍 成長抑制 效果

Lewis lung carcinoma 細胞를 C57BL/6 마우스 서혜부에 皮下移植하고 檢液 200mg/kg 을 投與하여 固型腫瘍의 成長抑制에 미치는 影響을 觀察하였다.

實驗 21일에 경추탈구법으로 致死시킨 마우스에서 摘出した 對照群의 腫瘍重量은 2.02±0.52 g 이었으며, 腫瘍細胞를 移植한 全 實驗動物에서 腫瘍이 發生하였다. ST I 實驗群에서는 1.77±0.38 g 으로 減少하는 傾向을 나타냈으며 腫瘍成長의 抑制率은 12.4% 였다. ST II 實驗群에서는 1.56±0.36 g 의 腫瘍重量

및 抑制率 22.8%로 나타났고, ST III, IV, V 實驗群에서는 各各 16.8, 15.3, 9.9%의 腫瘍 成長 抑制效果를 보였으며, ST I +RC 實驗群은 1.53±0.48 g 의 腫瘍重量 및 24.3%의 腫瘍 成長 抑制率을 나타냈다(Table 5).

Table 5. Antitumor effect of the aqueous extract of Semen Tigllii on the solid tumor Lewis lung carcinoma in the groin of C57BL/6 mice

Group	Tumor Weight(g) (Mean±SE)	Inhibition Rate (%)	Tumor incidence of recipient mice
CONT	2.02±0.52	—	8/8
ST I	1.77±0.38	12.4	7/8
ST II	1.56±0.36	22.8	6/8
ST III	1.66±0.42	16.8	7/8
ST IV	1.71±0.39	15.3	7/8
ST V	1.82±0.50	9.9	8/8
ST I +RC	1.53±0.48	24.3	6/8

CONT : Control group treated with normal saline as a vehicle.

ST : The aqueous extract of prebrewed Semen Tigllii-treated group

(ST I : 生巴豆霜, ST II : 炒巴豆霜, ST III : 醋炒巴豆, ST IV : 炒黑巴豆, ST V : 水煮巴豆, ST I +RC : 生巴豆霜加黃連).

RC : The aqueous extract of Rhizoma Cop-tidis.

The data are shown as mean±SEM of 8 samples. The statistic analysis between vehicle control group and treated group was performed by student's T-test. Asterisks denote significance levels of differences between control group and treated groups : ^aP<0.01, ^bP<0.001.

IV. 考 察

오늘날 우리나라에서의 疾患으로 인한 死亡原因 中에는 惡性新生物, 卽 癌이 단연 1 位를 차지하고 있다. 이러한 癌의 發生은 飲食, 水質, 大氣 等の 環境汚染과 複雜한 産業社會에서의 各種 精神心理的 스트레스 및 人口의 增加, 産業化의 加速化, 生活 環境의 多變化 等の 原因으로 誘發된다. 이러한 發病原因의 多樣性으로 인하여 癌의 征服을 위한 수많은 勞力에도 불구하고 現在에 이르기까지 그 原因과 治療法이 解決되지 않고 있는 實定이다.

病理學的으로 癌은 惡性新生物(malignant neoplasia)로서 自律性을 가진 組織의 過剩發育 現象으로 간단히 定義할 수 있다. 卽 細胞分裂을 지배하는 調節機能의 缺陷이나 惡性腫瘍遺傳子를 抑制하는 能力의 喪失 등으로부터 發生하는 非正常的 細胞의 增殖을 良性과 惡性으로 分類하여 惡性新生物을 癌이라한 것이다⁴⁹⁻⁵⁰. 惡性腫瘍은 大部分이 潛伏期가 길고, 初期에는 症狀이 없으나, 病이 進行된 後에 症狀이 나타나는 경우가 많기 때문에 早期診斷이 무엇보다도 重要하다⁵¹⁻⁵².

治療面에 있어서 韓醫學에서는 補陽正氣하는 藥劑를 爲主로 破積 活血 解鬱 行氣 補血하는 藥劑를 兼하여 活用하고 있으며, 初期의 積塊不大, 正氣未虛한 경우에는 行氣活血 軟堅消積法을, 中期의 積塊漸大, 正氣漸傷하여 邪盛正虛한 경우에는 攻補兼施法을, 末期의 積塊堅硬, 正氣損傷이 甚한 경우에는 扶正培本法을 使用하여 왔고³¹), 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法 등을 使用하고 있는데, 手術療法과 放射線療法은 局所的인 治療法이기때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 現在로는 治療方法이 定立되어 있지 않은 狀態이다⁵³⁻⁵⁴). 그러므로 現在의 狀況에서는 化學療法の 重要

性이 강조되고 있는데, 化學藥材의 毒性問題 및 各種 副作用때문에 完全한 治療效果를 期待하기는 어려운 實定이다. 이에 抗癌劑 使用으로 나타나는 各種 副作用을 防止하고 感受性이 높은 藥物의 開發 및 效果的인 治療法의 開發이 要求되고 있다⁵⁵⁻⁶⁴).

近來에는 正常細胞에 대한 毒作用이 적은 韓藥劑의 抗癌效果에 대한 研究가 活發히 進行되고 있는데³²⁻³⁷), 金等⁶⁵)은 積聚의 病因을 飲食內傷, 寒濕凝聚, 氣滯血瘀로 보고 이에 따른 症狀과 治療法을 提示하였고, 裴⁶⁶)는 癌의 韓洋方併用治療에 대한 報告에서 癌類가 갑자기 發生한 것이 아니고 처음에는 感氣에서부터 炎症으로, 그리고 慢性的(潰瘍, 痛症, 肥大, 浸潤, 腫溜, 癌의 順)으로 發生되는 것으로 思料되기 때문에 一般人的 方劑에 抗癌, 抗腫瘤藥을 虛實과 體質에 따라 2~3가지 藥을 加하면 本來의 疾病이 治癒된은 물론 癌의 豫防도 可能하다고 하였다.

巴豆는 古今의 本草書籍²⁻²⁴)에 의하면 大戟科(버들웃과)에 屬한 常綠灌木인 巴豆의 成熟한 種子로서 主成分은 巴豆油(tiglinic acid, crotonic acid, palmitic acid, stearic acid) 등의 glyceride 30~35%, 蛋白質(arginine, Ricine, Lipase, crotonoside)18%, 毒性蛋白(crotin, ricin 類似 物質인 crotonalbumin) 및 峻下作用이 있는 巴豆樹脂(croton Halz C₂₆H₃₄O₉) 등을 含有하고 있고, 味辛 性大熱大毒하여 攻痰積, 瀉寒滯, 破癥瘕, 消毒, 治水腫, 排惡瘡, 破膿血, 通閉塞, 利水穀道 等の 效能이 있으며, 現代에는 抗病原生物作用 및 抗腫瘤作用 등이 있다고 알려졌다.

黃連은 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 效能이 있어 痢疾, 糖尿病, 胎毒, 疳疾, 心腹痛, 口內炎, 胃酸過多 등을 治療하며, 抗菌, 抗癌, 抗放射線效果가 있고 특히 巴豆毒의 緩和作

用이 있는 것으로 알려져 있어^{2-24, 26-27)} 本實驗에서 巴豆加黃連의 效果를 比較 檢討해 보고자 하였다.

常⁶⁷⁾에 依하면 巴豆의 抽出物이 흰쥐肉腫-180實體型, 腹水型, 子宮頸癌, 肝癌腹水型, Erich腹水癌에 대한 抑制作用이 30%以上 있고, JTC-26抑制率이 50~70%以上 된다고 하였고, 最近에는 巴豆製齊가 食道癌, 胃癌, 直腸癌, 膀胱癌, 急性白血病, 肺癌, 乳腺癌 等の 惡性腫瘤에 治療 效果가 있음이 發表되었다²⁵⁾.

우리나라에서는 韓³⁹⁾이 巴豆油가 생쥐의 腸管粘液 細胞에 미치는 影響에 대해 報告한 바 있고, 李 等³⁹⁻⁴⁰⁾이 巴豆가 包含되어 있는 處方인 增損五積丸의 抗癌效果에 대하여 報告한 바 있지만, 巴豆 單方의 抗癌效果 및 毒性 緩和方法에 대한 實驗研究는 아직 報告된 바 없다.

이에 著者는 抗癌效果가 있을 것으로 豫想되는 巴豆의 抗腫瘍效果 및 毒性 緩和方法을 알아보기 위하여 5가지 方法으로 修治한 巴豆와 巴豆의 毒性을 緩和시켜 주는 것으로 알려진 黃連을 加하여 抽出한 여러 濃度の 抽出液을 A 549, Caki-1, LL2, Sarcoma 180, NIH/3T3 等の 腫瘍細胞柱에 附置시켜 現代 病理學的으로 多用하는 細胞毒性 檢定試驗 (MTT assay, LDH 活性化 測定), 抗腫瘍效果 (colony形成 抑制實驗, SRB assay), 平均生存率 및 腫瘍細胞(sarcoma 180, lewis lung carcinoma)의 成長抑制에 미치는 影響 등을 觀察하였다.

첫째, NIH/ 3T3 纖維母細胞를 이용하여 MTT assay에 의한 細胞毒性作用을 實驗한 結果, ST I 實驗群에서는 1×10^2 , 1×10 , 1μ g/ml씩 投與時에서 細胞毒性作用이 크지 않았으나, 濃度の 增加에 따라 漸增하였고, ST

II 實驗群에서는 全 實驗群에서 細胞毒性作用이 가장 弱하게 나타났다. ST III 實驗群에서는 細胞毒性作用이 가장 強한 것으로 나타났고, ST IV, V의 實驗群에서도 類似한 結果를 보였다. ST I + RC 實驗群에서는 黃連의 加味로 細胞毒性作用이 減少될 것으로 豫想했으나, ST I 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보여 黃連의 加味로 인한 毒性의 增減效果는 나타나지 않았다(Table 1, Fig 1).

둘째, 纖維母細胞를 이용하여 LDH(lactic dehydrogenase)活性化 測定에 의한 細胞毒性作用을 實驗한 結果, ST I 實驗群에서는 各各의 濃度에서 對照群에 比하여 細胞毒性作用이 增加되었으며, ST II 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 弱한 細胞毒性作用을 보였다. ST III 實驗群에서는 가장 強한 細胞毒性作用을 보였으며, ST IV, V 實驗群에서도 類似한 結果를 보였다. ST I + RC 實驗群에서는 ST I 實驗群의 結果 類似한 樣相을 보여 MTT assay에 의한 細胞毒性和 一致하는 結果를 보였다(Table 1, Fig 2).

셋째, A 549 腫瘍細胞로 colony形成抑制實驗을 實施하여 腫瘍細胞의 成長抑制效果를 觀察한 結果, ST I 實驗群에서는 各各의 濃度에서 colony 形成을 抑制하였고, ST II 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 낮은 colony 形成 抑制效果를 보였다. ST III, IV, V 實驗群에서는 ST I 實驗群과 類似한 結果를 보였으며, ST I + RC 實驗群에서는 ST II 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보였다(Table 2, Fig 3). 이러한 結果는 ST II 實驗群과 ST I + RC 實驗群이 다른 實驗群에 比해 腫瘍細胞의 成長抑制效果가 가장 弱하다는 것을 시사하였다.

넷째, Caki-1 腫瘍細胞로 SRB assay를 實施하여 腫瘍細胞의 成長抑制效果를 觀察한

結果, ST I 實驗群에서는 各各의 濃度에서 optical density를 減少시켰고 ST II 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 弱한 optical density 減少 傾向을 보였다. ST III, IV, V 實驗群에서는 全般的으로 ST I 實驗群과 類似한 結果를 보였고, ST I + RC 實驗群에서도 ST I 實驗群의 結果와 類似한 樣相을 보였다 (Table 2, Fig 4). 이러한 結果는 ST II 實驗群이 다른 實驗群에 비해 腫瘍細胞의 成長抑制 效果가 가장 弱하다는 것을 시사하였다.

다섯째, Sarcoma 180 cell을 腹腔에 移植한 ICR 마우스의 平均生存率에 미치는 影響을 觀察한 結果, ST I 實驗群에서는 對照群에 비해 平均生存期間이 延長되었고, ST II 實驗群에서는 平均生存期間이 뚜렷하게 延長되었다. ST III, IV, V 實驗群에서는 平均生存期間이 對照群보다 增加하였고, ST I + RC 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 顯著한 平均生存期間의 延長效果가 나타났다 (Table 3).

여섯째, Sarcoma 180 cell을 ICR 마우스 서혜부에 皮下移植하여 誘發한 固型腫瘍의 成長抑制에 미치는 影響을 觀察한 結果, ST I 實驗群에서는 對照群에 비해 腫瘍重量이 減少하는 傾向을 나타냈고, ST II 實驗群에서는 腫瘍重量이 뚜렷하게 減少되었다. ST III, IV, V 實驗群에서도 各各 腫瘍重量이 減少하여 腫瘍成長 抑制效果를 보였고, ST I + RC 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 顯著한 腫瘍重量 減少 및 成長抑制 效果를 나타냈다 (Table 4).

일곱째, Lewis lung carcinoma細胞를 C57BL/6 마우스 서혜부에 皮下移植하여 誘發한 固型腫瘍의 成長抑制에 미치는 影響을 觀察한 結果, ST I 實驗群에서는 對照群에 비해 腫瘍重量이 減少하는 傾向을 나타냈고, ST II 實驗群에서는 腫瘍重量이 뚜렷하게 減

少되었다. ST III, IV, V 實驗群에서도 各各 腫瘍重量이 減少하여 腫瘍成長 抑制效果를 보였고, ST I + RC 實驗群에서는 全 實驗群에서 가장 顯著한 腫瘍重量 減少 및 成長抑制 效果를 나타냈다 (Table 5).

以上の 實驗成績을 綜合하여 보면, 巴豆毒性的 緩和 方法으로는 炒巴豆霜이 가장 좋은 效果를 나타냈으며, 文獻上 巴豆毒의 緩和作用이 있다고 알려져 있는 黃連을 巴豆에 加했을 때 毒性이 緩和될 것으로 期待했으나 效果가 없었다.

In vitro에서의 抗腫瘍效果는 炒巴豆霜과 生巴豆霜加黃連이 다른 實驗群에 비해 弱하지만, in vivo에서의 平均生存率과 腫瘍成長 抑制效果는 다른 實驗群에 비해 優秀하게 나타나 in vitro에서의 效果와 in vivo에서의 效果가 相反되게 나타났다. 이러한 結果는 向後 巴豆의 毒性緩和 方法 및 巴豆의 臨床活用時 더 많은 研究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結 論

5種의 修治巴豆 및 生巴豆霜加黃連의 抽出液으로 細胞毒性 檢定試驗, 抗腫瘍效果, 平均生存率 및 腫瘍細胞의 成長抑制에 미치는 影響 등을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay에 의한 纖維母細胞의 細胞毒性效果는 炒巴豆霜에서 가장 弱하게 나타났으며, 醋炒巴豆에서 가장 強하게 나타났다. 生巴豆霜加黃連에서는 生巴豆霜과 類似한 樣相을 보여 黃連의 加味로 인한 細胞毒性的 增減效果는 나타나지 않았다.

2. LDH 活性度 測定에 의한 纖維母細胞의 細胞毒性效果는 炒巴豆霜에서 가장 弱하게

나타났으며, 醋炒巴豆에서 가장 強하게 나타났다. 生巴豆霜加黃連에서는 生巴豆霜과 類似한 樣相을 보여 黃連의 加味로 인한 細胞毒性的 增減效果는 나타나지 않았다.

3. colony形成抑制實驗에 의한 A 549腫瘍細胞의 成長抑制效果는 炒巴豆霜과 生巴豆霜加黃連에서 다른 實驗群에 비해 가장 弱하게 나타났다.

4. SRB assay에 의한 Caki-1 腫瘍細胞의 成長抑制效果는 炒巴豆霜이 다른 實驗群에 비해 가장 弱하게 나타났다.

5. 平均生存率에 미치는 影響은 生巴豆霜加黃連과 炒巴豆霜에서 가장 높은 生存率을 보였고, 그 外의 群에서도 增加하는 傾向을 보였다.

6. Sarcoma 180과 Lewis lung carcinoma에 대한 固型腫瘍 成長抑制實驗에서는, 生巴豆霜加黃連과 炒巴豆霜에서 가장 높은 成長抑制率을 보였고, 그 外의 群에서도 抑制 傾向을 보였다.

參考文獻

1. 王恒芬 輯著：神農本草經校證，吉林科學技術出版社，pp.536~538, 1988.
2. 李時珍：本草綱目，人民衛生出版社，pp. 2052~2058, 1982.
3. 李尙仁：本草學，修書院，pp.308~310, 1981.
4. 辛民教：原色本草維新，慶苑文化社，pp. 193~194, 1979.
5. 高學敏：中藥學，中國醫藥科技出版社，pp. 122~123, 1990.
6. 國際漢醫學學生會：東洋醫學叢書，一中社，pp.113~114, 1990.
7. 中華人民共和國衛生部藥典委員會：中華人民共和國藥典 1985年版 1部，人民衛生出版社，pp.60~61, 1985.
8. 科學百科辭典綜合出版社：東醫學辭典，麗江出版社，p.900, 1989.
9. 大韓藥師漢藥研究會：漢藥學，韓國메디칼인덱스社，p.258, 1991.
10. 金定濟：診療療鑑，東洋醫學研究院，p. 154, 1974.
11. 謝觀原：東洋醫學大辭典，高文社，pp.128~129, 1975.
12. 李載熙：圖設 漢方 藥理，藥能의 臨床應用，學林社，pp.556~557, 1985.
13. 文寬深：藥草의 成分과 利用，科學百科辭典出版社，pp.199~200, 1984.
14. 江蘇新醫學院：中藥大辭典，成輔社，pp. 502~505, 1982.
15. 金晨壽：標準本草學，進明出版社，pp.405~406, 1975.
16. 陸昌洙：韓國本草學，癸丑文化社，pp.354~356, 1981.
17. 陸昌洙：現代本草學，高文社，pp.289~290, 1972.
18. 李泰浩：鮮漢藥物學，杏林書院，pp.91~93, 1979.
19. 時逸人：中國藥物學，台聯國風出版社，pp. 144~145, 1980.
20. 載克敏：常用中藥的藥理和應用，江華科學技術出版社，pp.44~45, 1981.
21. 葉桔泉：本草鉤沈，中國醫藥科技出版社，pp.84~86, 1988.
22. 張隱庵 外：本草三家合註，醫道韓國社，pp.11~12, 1976.
23. 上海中醫學院：中藥學，商務印書館香水分館，pp.92~95, 195~199, 221~223, 226~230, 236~238, 293~295, 298~

- 301, 302~303, 512~515, 1983.
24. 金在佶：漢方藥物療法，書苑堂，p.88, 1979.
 25. 焦中華 外：巴豆制劑治療惡性腫瘤 30例，山東中醫學院學報 14, 5：36~39, 1990.
 26. 新文風出版公司：新編中藥大辭典，新文風出版公司，pp.30~34, 270~272, 346~348, 871~874, 1096~1097, 1288~1290, 1594~1594, 1604~1605, 1686~1687, 2094~2096, 2109~2110, 2524~2525, 1981.
 27. 宋益煥：方藥合編 解說과 臨床應用，三進社，p.638, 1989.
 28. 錢伯文：腫瘤的辨證施治，上海科學技術出版社，pp.1~10, 1980.
 29. 郁仁存：中醫腫瘤學，北京科學出版社，pp. 1~11, 1983.
 30. 賈 旁：癌瘤中醫防治研究，陝西科學技術出版社，pp.1~3, 1983.
 31. 李岩編：腫瘤臨證備要，人民衛生出版社，pp.11~26, 1983.
 32. 金光湖 外：數種 韓藥材가 制癌劑 및 Gluco-corticoid의 抗體生產抑制作用에 미치는 影響，趙永植 博士 華甲紀念論文集，pp.1041~1050, 1981.
 33. 任宰訓：數種의 韓藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響，慶熙韓醫大論文集 vol 9：242~266, 1986.
 34. 姜大根：息賁丸 및 肥氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果，圓光大學校大學院，1991.
 35. 韓相日：痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌 效果，圓光大學校大學院，1991.
 36. 金剛山：伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果，圓光大學校大學院，1989.
 37. 金剛山：肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果，圓光大學校大學院，1992.
 38. 韓景澤：巴豆油 投與가 생쥐의 腸管粘液 細胞에 미치는 影響，慶熙大學校 大學院，1975.
 39. 李竝求：增損五積丸(脾積方)이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果，圓光大學校大學院，1993.
 40. 任正勇：增損五積丸(肺積方)이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果，圓光大學校大學院，1993.
 41. 申佶求：申氏本草學，壽文社，pp.416~419, 1973.
 42. Fass L., Fefer A.：The application of an in vitro cytotoxicity test to studies the effects of drugs on the cellular immune response in mice, Primary response, J. immunol. 109：749, 1972.
 43. Mosman T.：Rapid for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. immunol. Meth. 65：55~63, 1983.
 44. Lee N. K.：The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drug a comparison of coloney formation assay and isotope uptake assay, JKMA, 31：435, 1988.
 45. Ysukagoshi S.：Fundmental approaches to cancer immunotherapyusing a protein bound polysaccharide Ps. K. with special reference to its clinical application in Mizuno D., Chihara G., Fukuoka F., Yamamura Y., eds "Host deference against cancer and its potentiation" Uni-

- versity of Tokyo Press. Tokyo 365, 1975.
46. Rubinstein L. V., Shoemaker R. H., Paull K. D., Simon R. M. : Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 1113~1118, 1990.
 47. Golub S. H., Morton D. L. : Corelationship of in vitro and in vivo assays of immunocompetance in cancer patients, *Cancer Res.* 34 : 1722, 1984.
 48. Siegel I., Liu. T. I. Yaghoubzadeh E., Keskey T. S., Gleicher N. : Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells, *J. Natl. Cancer inst.* 78 : 271, 1987.
 49. 金承濟 : 腫瘍學의 發展을 中心으로 한 個個腫瘍의 文獻的 考察, 現代醫學 別冊, 1967.
 50. 大韓病理學會編 : 病理學, 高文社, p.225, 1990.
 51. 裴元植 : 癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告, 大韓韓醫學會誌 7, 2 : 53~57, 1986.
 52. 李 岩 : 腫瘤學, 人民衛生出版社, pp.1~9, 1982.
 53. 劉正村尤煥文 : 中醫免疫, 重慶出版社, p. 57, 1983.
 54. 張代釗 : 中西醫結合治療癌證, 山西人民出版社, pp.11~19, 1984.
 55. Fish B. : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer* 54 : 2609, 1984.
 56. Kim S. H. : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J. Kor., Cancer Assoc.* 21 : 11, 1989.
 57. 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.* 22 : 61, 1990.
 58. Willson J. K. V., Bittner G. N., Oberley T. D., Meisner L. F. & Weese J. L. : Cell culture human colon adenomas and carcinomas, *Cancer Res.* 47 : 2704, 1987.
 59. Teicher B. A., Holden s. A., Kelly M. J., Shea T. C., Cucchi C. A., Rosowsky A., Henner W. D. & Frei E. : Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cisdiamine dichloroplatinum(II), *Cancer Res.* 46 : 388, 1987.
 60. Lee N. K. : The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drug a comparison of coloney formation assay and isotope uptake assay, *JKMA* 31 : 435, 1988.
 61. Hongo T., Fujii Y. & Igarashi Y. : An in vitro chemosensitivity test for screening anticancer drug in childhood leukemia *Cancer* 65 : 1263, 1990.
 62. 李昌惠, 梨鳳淇, 李元亨, 金朱德 : 試驗管 및 生體內 癌細胞(S-180YS)의 adriamycin에 對한 內性細胞의 染色體 分布特性, 延世醫大 論文集 16 : 180, 1983.
 63. 孔慶德, 李相彥, 韓秉勳, 徐昇衍, 許萬夏, 朴秉彩 : 進行性 胃癌에 對한 5-FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 併用化學療法의 治療效果, 大韓癌學會誌 22 : 144, 1990.
 64. Goodman G. E., Yen Y. P., Cox T. C. & Crowley J. : Effect of verapamilon in vitro cytotoxicity of adriamycin and

- vinblastine in human tumor cell, *Cancer Res.* 47 : 2295, 1987.
65. 金英鎮, 金東圭 : 積聚에 관한 文獻的 考察, *東西醫學*, pp.3~9, 51~63, 1984.
66. 裴元植 : 癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告, *大韓韓醫學會誌* 6 : 297, 1986.
67. 常毅敏 : 抗癌本草, 圖書出版 바람과 물결, pp.117~119, 1992.

ABSTRACT

Experimental Studies on the Change of Cytotoxic and Antitumor Effects according to the Prebrewed Method of Semen Tigllii and Rhizoma Coptidis

Jo, Soung Gak

Dept. of oriental Medicine, Graduate School of
Won kwang University.

Directed by Moon, Goo Moon, Suk Jae O.M.D., Ph

This experiment was designed to study the change of cytotoxic and antitumor effects according to the prebrewed method of Semen Tigllii and Rhizoma Coptidis.

The cytotoxic and antitumor effects were evaluated on human cell lines(A 549, Caki-1, LL2, Sarcoma 180, NIH/3T3)after exposure to prebrewed Semen Tigllii and Rhizoma Coptidis water extract 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6mg/ml using in MTT assay, LDH, colony forming efficiency and SRB assay which were regarded as a valuable method for cytotoxic and antitumor effects of unknown compound on tumor cell lines.

The results obtained in this studies were as follows.

1. The cytotoxicity from the result of MTT assay was low slightly in the ST II (炒巴豆霜), high in the ST III (醋炒巴豆). The cytotoxicity of ST I +RC(生巴豆霜加黄連) was similar to that of ST I (生巴豆霜).
2. The cytotoxicity from the result of LDH was low slightly in the ST II (炒巴豆霜), high in the ST III (醋炒巴豆). The cytotoxicity of ST I +RC(生巴豆霜加黄連) was similar to that of ST I (生巴豆霜).
3. The antitumor affect on A 549 tumor cell from the result of colony forming efficiency was low slightly in the ST II (炒巴豆霜) and ST I +RC(生巴豆霜加黄連).
4. The antitumor effect on Caki-1 tumor cell from the result of SRB assay was low slightly in the ST II (炒巴豆霜).
5. Median survival time and Increased life span increased slightly in the ST I RC(生巴豆霜加黄連) and ST II (炒巴豆霜).
6. The inhibitory effect on the growth of Sarcoma 180 and Lewis lung carcinoma tumor cell increased slightly in the ST I +RC(生巴豆霜加黄連) and ST II (炒巴豆霜).