

## 加味清熱解毒湯의 抗癌活性에 關한 研究(I)

金圭, 金東熙, 崔奉均, 金聖勳\*

### Abstract

#### Study on Antitumor Effect of Kamicheungyeolhaedogtang(KCHT)(I)

Gyu Kim, O.M.D., Dong-Hee Kim, O.M.D., Ph. D., Bong-Gyoon Choi, O.M.D., Ph. D.,  
Sung-Hoon Kim, O.M.D., Ph. D.

Dept. of Oriental Medicine Pathology,  
College of Oriental Medicine, Taejon University, Taejon, Korea.

To evaluate the antitumor activity and antimetastatic effects of Kamicheungyeolhaedogtang(KCHT), studies were done experimentally.

The results were obtained as follows:

1. KCHT extracts exhibited a significant cytotoxicity against A549, SK-MEL-2, SK-OV-3, and B16-BL6 cell lines.
2. KCHT extracts showed significant inhibitory effect on DNA topoisomerase I
3. The T/C% was 145.8% in KCHT treated group in S-180 bearing ICR mice.
4. KCHT extracts exhibited efficient affect adhesive effect of A549, B16-BL6 cell to complex extracellular matrix.
5. In vitro neovascularization assays, angiogenesis was insignificantly inhibited in KCHT treated group as compared with control group.

These results suggested that KCHT extracts might be usefully applied for prevention and treatment of cancer.

### I. 緒 論

다양한 生活環境 및 食生活의 變化로 癌의 發生率이 해마다 增加하고 있으나, 이에 대한 적절한 治療法은 알려져 있지 않다<sup>1,2)</sup>. 現在 癌患者 治療

에 使用되는 抗癌劑는 alkyl화劑, 代謝拮抗物質 및 抗生物質 등이 이용되고 있는데, 이들은 대부분 生體內의 癌細胞뿐만 아니라 正常細胞 및 다른 感染症에 對한 免疫을 弱하게 하는 副作用을 일으켜<sup>3-6)</sup>, 最近에는 免疫機能 調節과 더불어 癌細胞에만 選擇적으로 作用하는 天然抗癌劑를 生藥劑로부터 開發하려는 많은 研究가 進行되고 있다<sup>7,8)</sup>. 일례로

\* 大田大學校 韓醫科大學 病理學敎室

美國의 癌研究所(NCI)에서는 전세계적으로 植物資源을 수집하여 抗癌性 物質에 대한 방대한 探索을 實施하고 있으며<sup>9)</sup>, 國內에서도 수많은 植物生藥劑를 檢索하고 抗癌成分의 분리 및 동정에 대한 研究가 이루어지고 있다<sup>10-12)</sup>.

韓醫學에서 癌은 宋代 《衛濟寶書》에 最初로 言及된 以來, 《仁齋直指遺方論》에서 現代의 惡性腫瘍과 가장 비슷하게 說明되었으나, 그 以前부터 《內經》爲始한 여러 醫書에서 積聚, 鼓脹, 腸覃, 石瘕, 息賁, 癰病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚, 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 乳巖, 石疝 및 石癰 등이 類似한 病證으로 認識되고 있다<sup>13)</sup>.

이에 對한 治療法으로 清熱解毒, 化痰軟堅, 利水消腫, 活血化癥 處方에 의한 攻邪法과 健脾益氣, 滋養肝腎, 養胃生津 處方에 의한 扶正法 및 兩者를 結合한 扶正祛邪法이 實施되고 있으며, 이미 이에 對한 有意性있는 結果들이 報告된 바가 있다<sup>14-18)</sup>.

實驗의 研究로는 單味韓藥 및 韓方處方 및 水鍼製劑를 대상으로 抗癌效果에 對한 研究가 활발히 이루어지고 있는데, 이 중 他藥에 비하여 清熱解毒類의 藥物의 抗腫瘍效果가 優秀하다 報告된 바가 있다<sup>19,20)</sup>. 清熱解毒藥物은 大部分 抗腫瘍 活性物質을 含有하고 있으며, 단순히 癌細胞의 分裂을 抑制할뿐만 아니라, 直接 癌細胞를 殺傷시키기도 하며, 白花蛇舌草, 半枝蓮 등 몇몇 藥物들은 生體의 免疫防禦機能을 增強시켜 抗癌 活性을 發揮하는 것이 立證되었다<sup>21-23)</sup>.

이에 著者는 臨床에서 이미 肝癌 患者에 應用되고 있는 加味清熱解毒湯<sup>15)</sup>의 抗腫瘍 效果를 實驗的으로 評價하고, 이를 중심으로 새로운 抗癌處方을 開發할 目的으로, 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 對한 附着沮止效果, in vitro neovascularization assay를 통한 血管形成抑制效果 및 S-180에 對한 生命延長率 等を 測定하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 動 物

動物은 雄性 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계 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, 三養飼料 Co.)와 물을 充分히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서, 2 週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定 實驗에 使用하였다.

#### 2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選한 것을 使用하였으며, 處方의 內容과 한 貼 分量은 아래와 같다.

□ Prescription of Kamicheungyeol- haedogtang (KCHT)

韓 藥	生 藥 名	用量(g)
柴 胡	<i>Bupleuric Radix</i>	10
玄胡索	<i>Corydalis Tuber</i>	10
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	12
川芎藭	<i>Dioscoreae tokoro Rhizoma</i>	12
鬱 金	<i>Curcumae Rhizoma</i>	12
枳 殼	<i>Ponciri Fructus</i>	6
土茯苓	<i>Smilacis Glabrae Rhizoma</i>	15
丹 蔘	<i>Salviae multiorrhizae Radix</i>	15
半枝蓮	<i>Portulaca grandiflora Hook</i>	20
總 量		112

#### 3) 試藥 및 機器

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 dodecyl sulfate (SDS), trypsin-EDTA, 3-[4,5 -dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), sulforhodamine-B (SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, lipopolysaccharide (LPS), trypan blue, phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glacial 製品, DNA topoisomerase

I, pBR322 DNA는 Takara 製品을 각각 使用하였다.

機器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), FACScan (Becton dickinson, U.S.A), rotary vacuum 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, 0.45 $\mu$ m, Falcon)등을 使用하였다.

## 2. 方法

### A. 抗癌性 探索

#### 1) 試料의 製造

上記한 加味清熱解毒湯의 2첩 分量(224g)을 各 各 3,000ml round flask에 蒸溜水 2,000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator(Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84 $^{\circ}$ C deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 30g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 使用하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞 毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter (0.22, 0.45 $\mu$ m, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

#### 2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 A549(ATCC CCL185) 肺癌株, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌株 및 B16-BL6 melanoma (ATCC CRC 6322), SK-MEL-2(ATCC HTB 77) 黑色腫을, in vivo 抗癌 實驗에는 S-180(ATCC TIB 66) 腹水

癌株를 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56 $^{\circ}$ C 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑 (penicillin-G 10만units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 添加하여 製造하였다.

#### 3) A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-BL6 癌株에 對한 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989年에 美國의 國立癌研究所에서 藥物의 in vitro 抗癌活性度를 測定하기 위하여 開發된 sulforhodamine-B (SRB) assay 法<sup>24,25)</sup>을 使用하였다. 繼代나인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 well당 細胞數가 2 $\times$ 10<sup>4</sup>개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO2 incubator내에서 24時間 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(0.25, 0.5, 1mg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 各 各 20 $\mu$ l씩 넣어주고 다시 48時間 동안 培養하였다.

試料는 加하기 前에 0.22 $\mu$ m filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48時間 培養이 끝난 後, 各 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100 $\mu$ l씩 加하여 4 $^{\circ}$ C에서 1時間 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 後 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA 용액을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 250 $\mu$ l의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30分間 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 後, control의 O.D. (optical density) 값이 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을 구하여 ED50값을 얻

었다. 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 가하여 48時間동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 各 濃度の 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 程度를 測定하였다. 즉,  $Tz \geq T$  인 境遇에는  $(T-Tz)/(C-Tz) \times 100$  의 數式으로 計算하였고,  $Tz < T$  인 境遇에는  $(T-Tz)/Tz \times 100$ 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 各 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, 美國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法<sup>26)</sup>에 따라서 決定하였다. 試驗群의 各 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = \left[ \frac{T - C_0}{C - C_0} \right] \times 100$$

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)  
 C<sub>0</sub> = 培養 始作時 平均 細胞數 (cells/ml)

各 各 濃度の Y(%)값과 Log<sub>10</sub> dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 의하여 회귀선을 구했다. 이때 各 各의 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  
 [ < number of dose level & > 2]  
 X<sub>i</sub> = log dose i  
 Y<sub>i</sub> = growth ratio calculated dose i

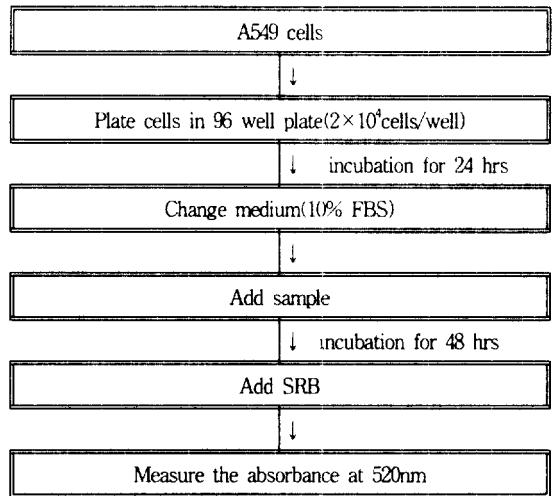
여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 회귀선  $Y = A + BX$  를 얻었으며 이 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED50값을 계산하였다.

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

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

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

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하, 合成物인 경우 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하일 境遇 抗癌 作用이 있다고 規定<sup>26,27)</sup>하고 있다.



Scheme 1. The experimental scheme for cytotoxicity of SBSK on A549 cells

4) DNA topoisomerase I assay 方法<sup>28)</sup>

實驗에 使用된 DNA topoisomerase I는 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomeras I 저해 IC50값을 결정하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性의 測定은 Liu와 Miller의 方法<sup>29)</sup>에 따랐다. 즉, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum album, 0.5 $\mu\text{g}$  pBR 322 DNA와 酵素(1 unit)만 加하여 總 反應液을 20 $\mu\text{l}$ 가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20 $\mu\text{l}$ 되게 한 것을 試驗

群으로 하여 이들을 37°C에서 30分間 培養하였다. 反應은 2% SDS (sodium dodesyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 溶液 5 $\mu$ l를 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 전기영동을 한 後 agarose gel을 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide 溶液에서 1時間동안 染色, 紫外線 下에서 寫眞을 찍은 다음 scanner를 사용하여 活性 밴드를 測定했다. 이때 topo I의 1 unit는 37°C에서 30分間 反應시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 觸媒하는 酵素의 量을 意味한다.

5) A549, B16-BL6 癌株의 附着 沮止 作用 測定<sup>30,31)</sup>

A549, B16-BL6 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞 濃度を 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 $\mu$ l 씩 가한(5 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/well). 후 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度の 試料를 녹인 培地 100 $\mu$ l를 加하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 培養하였다. 3時間 後 培養液을 除去시키고 96 well plate의 바닥을 2% FBS로 洗滌한 다음 24時間 培養시킨 후 SRB法<sup>24,25)</sup>에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 觀察하였다.

6) In vitro neovascularization assay<sup>32)</sup>

人間的 胎盤에서 臍帶靜脈 內皮 細胞에서 (HUVEC)에서 起源한 血管新生 內皮細胞인 ECV 304 細胞의 血管을 形成시키기 위해서 Schnaper 등의 方法에 準하여 basement membrane인 matrigel을 이용하여 新血管 形成을 誘導한다. Ice bath上에서 96-well plate에 matrigel을 50 $\mu$ l씩 넣어준다. matrigel이 gel과 같은 상태로 되도록 37°C에서 30분에서 한시간 사이의 時間동안 incubation한다. 그동안 ECV 304 細胞 數를 세어서 well당 2 $\times$ 10<sup>4</sup>cells이 되도록 한다. 數를 센 ECV 304 細胞를 matrigel이 덮인 96well plate에 넣고, ECV 304 細胞에 對한 細胞毒性 檢査를 한 KCHT 0.25 $\mu$ g/ml를 곧바로 處理하고, 血管形成 活性物質인 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)

8ng을 處理한 ECV 304 細胞를 陽性 對照群으로 하여 時間別로 matrigel위에서 ECV 304 細胞의 新血管이 形成되는 模樣을 電子顯微鏡을 使用하여 血管形成 有無를 判讀하였다.

7) S-180 癌細胞에 對한 生存比 測定

ICR 마우스의 腹腔內에 7日間 培養된 sarcoma 180 細胞를 腹水와 함께 취하여 滅菌된 冷生理食鹽水를 加해 400 $\times$ g로 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 浮遊시켜 다시 遠心 分離하여 上澄液을 除去한 後 혼재된 赤血球를 溶血시키고 sarcoma 180 細胞만을 取하였다. 同一한 方法으로 3회 洗滌한 後 hemacytometer로 세어 107cells/ml의 濃도가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 後 24時間부터 各 群을 8마리로 配定하였다. 試料는 生理食鹽水로 溶解시켜 保存溶液(12mg/20g/day)을 만든 후 4°C에 保存하였으며 0.2ml씩 經口로 1週日 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 美國立 癌 研究所 protocol에 言及된 式<sup>33)</sup>에 따라 計算하였다.

### III. 實驗 成績

#### A. In vitro

##### 1. A549 癌株에 對한 細胞毒性

A549 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 96.40 $\pm$ 1.86, 80.04 $\pm$ 1.56, 41.01 $\pm$ 2.53%로 1mg/ml 濃度에서 50% 以上 細胞成長을 抑制하였다(Table I, Fig. 1).

Table I. Cytotoxic Effect of KCHT on A549 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0(Control)	100 $\pm$ 2.32
0.25	96.4 $\pm$ 1.86
0.5	80.04 $\pm$ 1.56
1	41.01 $\pm$ 2.53

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度  
 Control : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

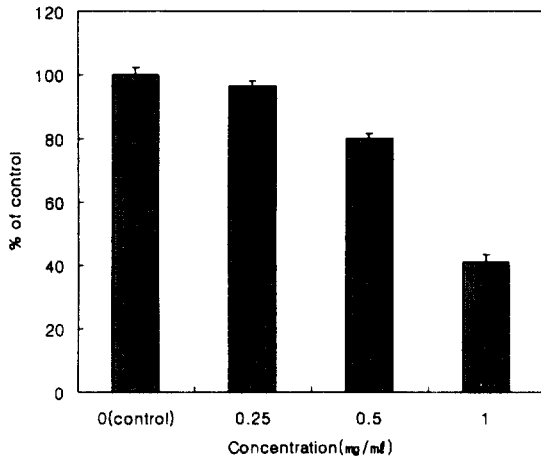


Fig. 1. Cytotoxic effect of KCHT on A549 cells.  
 0(control) : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

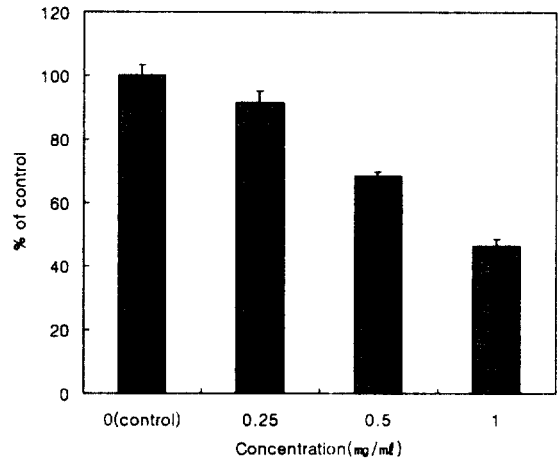


Fig. 2. Cytotoxic effect of KCHT on SK-OV-3 cells.  
 0(control) : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

2. SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性

SK-OV-3 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1 mg/ml 濃度에서 成長率이 各各 91.5±3.48, 68.4±1.26, 46.5±2.18%로 濃度依存的으로 抑制하였으며, 특히 1mg/ml 濃度에서 50% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table II, Fig. 2).

Table II. Cytotoxic Effect of KCHT on SK-OV-3 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±3.40
0.25	91.5±3.48
0.5	68.4±1.26
1	46.5±2.18

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

Control : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

3. SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性

SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 87.2±2.76, 75.4±1.84, 46.2±2.35%로 1mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 50% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table III, Fig. 3).

Table III. Cytotoxic Effect of KCHT on SK-MEL-2 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0(Control)	100±2.59
0.25	87.2±2.76
0.5	75.4±1.84
1	46.2±2.35

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

Control : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

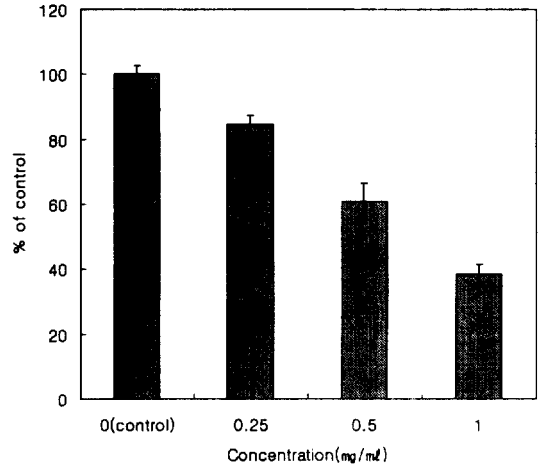
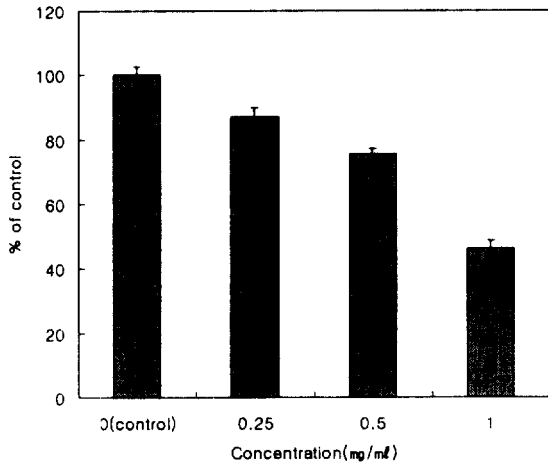


Fig. 3. Cytotoxic effect of KCHT on SK-MEL cells.  
 0(control) : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

Fig. 4. Cytotoxic effect of KCHT on B16-BL6 cells.  
 0(control) : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

4. B16-BL6 癌株에 對한 細胞毒性

B16-BL6 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1 mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 84.6±2.84, 60.8±5.67, 38.5±2.89%로 對照群에 比하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 40% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다 (Table IV, Fig. 4).

Table IV. Cytotoxic Effect of KCHT on B16-BL6 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0(Control)	100±2.63
0.25	84.6±2.84
0.5	60.8±5.67
1	38.5±2.89

: 30% 이상 細胞毒性을 나타낸 濃度

Control : Non-treated group  
 0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group  
 0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group  
 1 : 1mg/ml KCHT treated group

5. DNA topoisomerase I 에 미치는 效果

50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 5mM Spermidine, 0.01% Bovine serum album, 0.5 μg pBR 322 DNA와 酵素(1unit)만 加하여 總 反應液을 20μl가 되게 한 것을 比較群으로, 酵素와 試料를 加하여 總 反應液을 20μl되게 한 것을 試驗群으로 하여 活性을 測定했다. 전기영동을 實施하여 寫眞 撮影한 結果 figure 5에서 보는 바와 같이 DNA만을 處理한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다.

이에 比해 實驗群은 250, 500μg/ml 濃度에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 强하게 抑制하였다 (Fig. 5).

Fig. 5. Effect of KCHT on the DNA topoisomerase I from calf thymus

- Lane 1 : DNA (0.5 $\mu$ g) only
- Lane 2 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit)
- Lane 3,4 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit)+ 250 and 500 $\mu$ g/ml of KCHT

6. A549 癌柱의 附着阻止 效果

A549 細胞에 대한 附着阻止 實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 97.2 $\pm$ 2.83, 75.2 $\pm$ 3.85, 49.1 $\pm$ 1.12로 1mg/ml의 濃度에서 50%이상 細胞附着을 阻止하였다(Table V, Fig. 6).

Table V. Inhibitory Effect of KCHT on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0(Control)	100 $\pm$ 1.59
0.25	97.2 $\pm$ 2.83
0.5	75.2 $\pm$ 3.85
1	49.1 $\pm$ 1.12

: 30% 以上 細胞附着阻止效果를 나타낸 濃度

0(control) : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group

0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group

1 : 1mg/ml KCHT treated group

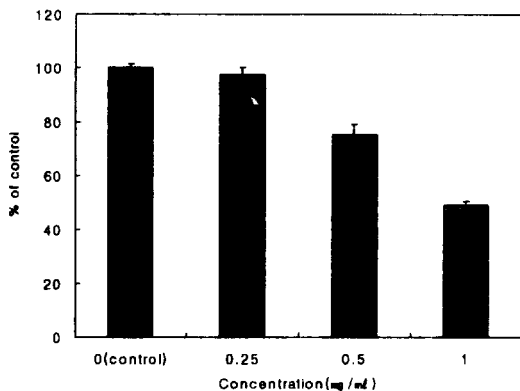


Fig. 6. Inhibitory effect of KCHT on cell adhesive of A549 cells to complex extracellular matrix.

0(control) : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group

0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group

1 : 1mg/ml KCHT treated group

7. B16-BL6 癌柱의 附着阻止 效果

B16-BL6 細胞에 대한 附着阻止 實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml의 濃度에서 90.1 $\pm$ 1.82, 55.9 $\pm$ 1.96, 38.5 $\pm$ 2.68%로 0.5mg/ml의 以上の 濃度에서 40% 이상 細胞附着을 阻止하였다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Inhibitory Effect of KCHT on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
0(Control)	100 $\pm$ 4.14
0.25	90.1 $\pm$ 1.82
0.5	55.9 $\pm$ 1.96
1	38.5 $\pm$ 2.68

: 30% 以上 細胞附着阻止效果를 나타낸 濃度

0(control) : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group

0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group

1 : 1mg/ml KCHT treated group

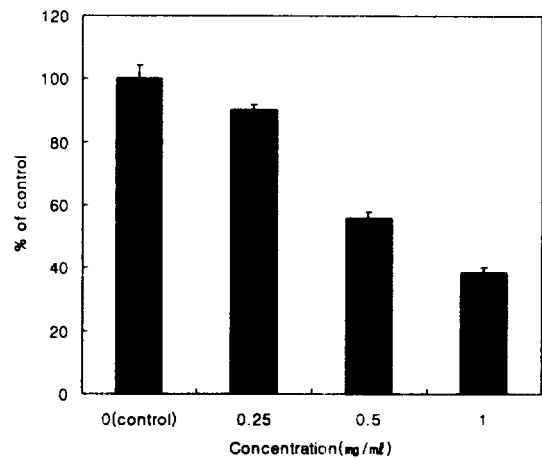


Fig. 7. Inhibitory effect of KCHT on cell adhesive of A549 cells to complex extracellular matrix.

0(control) : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml KCHT treated group

0.5 : 0.5mg/ml KCHT treated group

1 : 1mg/ml KCHT treated group

8. ECV 304 細胞에 의한 lumen 形成 抑制效果

ECV 304 內皮細胞의 新生血管 形成에서 對照群에서는 matrigel위에서 ECV 304 內皮細胞가



plating 後 1-2時間에 matrigel 위에 附着하고 3-5 時間에 cell clustering이 形成되고, 7-10時間에 cell cord를 形成하여 血管을 形成할 준비를 하며 12-18時間에는 內腔을 갖는 毛細血管이 形成되었으나, KCHT 250 $\mu$ g/ml을 가한 實驗群에서는 Fig. 8에서와 같이 lumen 形成에는 영향을 미치지 않았다

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

Group	No. of animals	M S T (day)	T/C (%) <sup>*</sup>
Control	7	13.71	100
KCHT <sup>*</sup>	7	20.0	145.8

T/C (%)<sup>\*</sup> :  $\frac{\text{MST of sample}}{\text{MST of control}} \times 100 (\%)$

#### IV. 考 察

癌은 循環期系 疾患과 더불어 多發하는 成人病의 하나로, 다른 疾患에 비해 死亡率이 높아 現代醫學이 當面한 가장 큰 課題중의 하나이다<sup>1,2)</sup>. 1971년 12월 미국 닉슨 대통령이 “암과의 전쟁”을 선포하고 수 천만 달러를 투자한 이래로 지난 25년간의 전쟁에도 불구하고 癌의 發生率과 死亡率은 지속적으로 增加하고 있다<sup>34)</sup>. 더욱이 靑壯, 간, 위, 식도암의 5년 比較 生存率은 10% 以上 減少하였으며, 현재 1년에 50萬名 이상의 사람들이 癌으로 죽고 있다<sup>35)</sup>.

癌이란 生體組織의 一部가 自律的으로 非正常的인 면서도 끊임없이 過剩成長하는 惡性新生物로, 周圍 組織으로 浸透하여 隣接組織 및 臟器의 機能을 障礙할 뿐 아니라 過多한 增殖에 竝行한 血管增殖의 缺如로 壞死나 潰瘍을 일으킨다. 癌細胞는 破壞력이 강하고 脫落傾向이 높아 일정한 크기로 增大하면 淋巴管이나 血管을 통하여 身體 여러 곳으로 옮겨가 轉移病巢를 만들고 癌細胞가 多發性으로 分散하여 增殖하게 된다<sup>36-38)</sup>.

계속적인 癌細胞의 增殖은 細胞內 蛋白質이나 核酸의 合成을 旺盛하게하며, toxohormone, malignolipin 等 非正常的인 毒性物質을 分泌하고, 癌의 抗原을 비롯한 發癌因子 등이 몸 안에 쌓이게 하여 貧血과 癌性 惡液質(cancerous cachexia)을 招來하여 결국 生命을 잃게 한다<sup>38,39)</sup>.

癌의 發生은 確實히 규명되어 있지 않으나 人體의 抗病能力이 低下된 상태에서 慢性刺戟, 物理的刺戟, 化學物質, 老化, 免疫變調, 호르몬, 遺傳的

Fig. 8 Photography of in vitro neovascularization by ECV 304 in control and KCHT treated group.

#### B. In vivo

1. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 效果

加味抵當湯을 S-180이 移植된 생쥐에 10日간 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였던 바 腹水 癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植後 12日에 급격히 增加하여 17日에 모두 죽었다.

平均 生存日數에서 對照群의 MST는 13.71日, KCHT 投與群은 20.0日로 나타나, T/C%는 145.8%로 나타났다(Table VII).

素因 및 發癌性 바이러스 등으로 因하여 發生한다고 보고있다<sup>38,39</sup>.

癌의 治療에 있어서 西醫學的으로는 現在 手術, 放射線治療, 免疫療法 및 化學療法 등 많은 治療法이 있지만, 選擇性的 缺如로 인해 癌細胞 뿐만 아니라 正常細胞에도 影響을 주어 多樣한 副作用을 招來하는 短點이 있으며, 藥物에 대한 耐性이 增加되고 있는 實情이기 때문에 새로운 方式의 抗癌劑 開發이 요구되고 있다<sup>3-5,40,41</sup>. 따라서 免疫機能을 높여주고 癌細胞에만 選擇적으로 作用하는 天然抗癌劑를 生藥劑로부터 開發하려는 많은 研究가 이루어지고 있으며 韓醫學등 代替醫學의 癌治療法에 대하여 關心이 增大되고 있는 實情이다.

韓醫學에서 癌이라는 用語는 宋代에 《衛濟寶書》와 《仁齋直指附遺方論》에서 腹部癌과 乳房癌에 대한 病證을 시사하는 內容이 최초로 언급되었으나, 韓醫書에는 積聚, 鼓脹, 腸覃, 石瘕, 息賁, 瘤病, 伏梁, 厥疝, 瘕聚, 癥瘕, 癰疽, 癭瘤, 反胃, 噎膈, 乳巖, 石疽, 및 石癰 등이 현대의 癌과 類似的한 많은 病症들이 기재되어 있다<sup>13-14</sup>.

韓醫學에서 癌의 治療는 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽, 健脾益腎등의 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消癆, 理氣消腫등의 祛邪法 및 이 두가지 방법을 配合한 扶正祛邪法으로 區分되며<sup>13-19</sup>, 扶正祛邪法을 中心으로 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼法, 末期에는 先補後攻法으로 臨床에서 活用되고 있다<sup>20</sup>.

또한 最近에는 韓醫學界에서도 單味韓藥 및 韓方處方, 水鍼製劑를 대상으로 抗癌效果에 對한 實驗的 研究가 활발히 이루어지고 있는데, 이 중 清熱解毒類의 藥物의 抗腫瘍 治療效果가 優秀하다 보고되고 있다.

美國 NCI(National Cancer Institute)에서는 抗癌劑를 開發하기 위한 스크리닝에서 L1210 癌柱를 사용하였는데<sup>41,42</sup>, 이 때 IC50이 植物抽出物에서 20 $\mu$ g/ml 以下, 合成物이나 單利 compound에서는 2.4-4.0 $\mu$ g/ml 以下일 때 抗癌劑로 개발될 可能性이 있다고 規定<sup>43</sup>하고 있다.

韓藥材에 대한 細胞毒性 探索에서 閔<sup>44</sup>은 L1210 癌柱에 대하여 白花蛇舌草, 羌活, 馬兜鈴, 香薷, 瞿

麥子, 連翹, 梔子, 旋覆花, 苦楝皮, 薄荷, 虎杖根, 三稜, 玄蔘 등이 10 $\mu$ g/ml 以下の 濃度에서 有效한 細胞毒性을 보여, 清熱解毒 藥物이 他 藥材에 비하여 細胞毒性에 있어 效果의 差를 示唆하였다. 이와 더불어 最近의 研究 結果에서도 清熱解毒藥物이 大部分 抗腫瘍 活性物質을 含有하고 있으며, 단순히 癌細胞의 分裂을 抑制할뿐만 아니라, 直接 癌細胞를 殺傷시키기도 하며, 몇몇 藥物들은 生體의 免疫防禦機能을 增強시켜 抗癌 活性 作用을 만들어내는 것이 立證되기도 하였다.

또한 臨床에서도 清熱解毒藥은 癌을 發展시키고, 病情을 악화시키는 要素 중의 하나인 炎症과 感染을 豫防 治療하여, 患者의 病情과 辨證에 근거해서 多用되고 있다<sup>19,20</sup>.

본 實驗의 試料인 加味清熱解毒湯은 《癌症治驗錄》<sup>15</sup>에 記載된 處方으로 柴胡, 玄胡索, 白芍藥, 川芎藥, 鬱金, 枳殼, 土茯苓, 丹蔘, 半枝蓮으로 構成되어 臨床에서 肝癌患者에게 投與하여 有意性인 結果가 報告된 바가 있다.

加味清熱解毒湯 構成藥物의 效能을 살펴보면, 柴胡는 味苦 微寒하여 肝經에 入하여 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣, 舒肝和胃, 清泄相火하고, 玄胡索은 肝脾經에 入하여 活血散瘀, 理氣止痛하며, 白芍藥은 苦酸味로 肝脾經에 入하여 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하고, 川芎藥은 肝胃膀胱經에 入하여 利濕濁, 祛風濕하며, 鬱金은 行氣化瘀, 清心解鬱, 利膽退黃하고, 枳殼은 肺脾大腸經에 入하여 破氣行痰消積하며, 土茯苓은 肝胃經에 入하여 除濕解毒, 通利關節하고, 丹蔘은 活血祛瘀, 涼血消癭, 除煩安神하며, 半枝蓮은 清熱解毒, 利尿消腫한다<sup>45</sup>.

構成藥物의 抗癌效果를 보면 鬱金은 肝癌, 胰腫瘤 등에, 丹蔘은 腫塊를 同伴한 各種 瘀血性 癌症에 使用되고 있으며, 半枝蓮은 肺癌, 直腸癌, 胃癌, 食道癌, 宮頸癌, 肝癌, 口腔癌, 乳腺癌, 纖毛膜上皮癌, 消化器癌 등의 各種腫瘍에 應用되며<sup>46-48</sup>, 柴胡는 抗癌活性을 나타내는 saikosaponin a, d, f 등이 定量分析되었다<sup>49</sup>.

이에 본 實驗에서는 이러한 本草學의 效能과 臨床的 報告를 바탕으로, 加味清熱解毒湯을 試料로 抗癌 및 抗轉移 效果를 實驗的으로 評價하고자 하

었다. 먼저 抗癌性 평가는 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, S-180에 對한 生命延長率 등을 測定하였다.

細胞毒性 測定으로 과거에는 MTT assay가 널리 이용되었으나 product인 formazan의 不溶性과 細胞외에도 이온 및 pH 등의 다른 요인에 의하여 영향을 받을 수 있다는 短點이 있어, 최근에는 MTT assay 대신 細胞內的 蛋白質 含量을 測定함으로써 抗癌物質의 活性을 測定하는 方法인 sulforhodamin-B(SRB)assay가 開發되었다. 蛋白質의 量은 全體 細胞內的 物質을 推定하는데 널리 이용되고 있으며 특히 SRB assay는 細胞數와 비례하고 水溶性의 性質 및 환경에 의한 영향을 덜 받는다는 장점으로 MTT assay 보다 광범위하게 이용되고 있다<sup>24,25)</sup>.

SRB assay를 이용한 本 實驗에서는 모든 實驗 癌柱에서 KCHT 1mg/ml 이상의 濃度에서 50% 이상 癌細胞 成長 抑制效果를 나타내었다(Table I-IV, Fig. 1-4).

다음으로 最近에 細胞毒性을 測定하는 方法中 하나로 研究되어지고 있는 DNA topoisomerase I assay를 실시하여 SRB assay 結果와 비교하여 보았다. DNA topoisomerase는 세포내 DNA의 supercoiling state를 調節하는 酵素로서 DNA에서 일어나는 複製, 轉寫, 再組合에 지대한 影響을 미치고, 이러한 過程들이 進行되는 段階에서 發生하는 DNA의 topological problem을 解決해 줌으로써 細胞內 여러 DNA의 기중에 必須적이다<sup>50-53)</sup>. 本 실험에서는 figure 5에서 나타난 바와 같이 DNA만을 처리한 實驗群은 대부분 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었으나, KCHT 投與群에서는 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 抑制하여 SRB assay 結果와 일치함을 나타내었다.

In vivo 실험으로는 S-180이 移植된 생쥐를 이용하여 生存比를 測定하였는데, 對照群의 MST는 13.71日, KCHT의 MST는 20.0日로 145.8의 生存比(T/C%)를 나타내어 NCI가 設定한 再實驗 可能

T/C%인 140%를 上廻하는 結果가 나타났다 (Table XII).

다음으로 癌細胞가 二次적으로 다른 部位에 轉變되어 癌의 症狀을 惡化시킴으로써 死亡에까지 이르게 한다는 점에서 重要하게 認識되고 있는 轉移에 對한 實驗으로, in vitro에서는 複合基質에서 A549, B16-BL6 癌株에 對한 附着 阻止作用을 評價하였다. KCHT 1, 0.5mg/ml 濃度에서 A549, B16-BL6 癌柱 50%以上 附着을 阻止하여, 이 역시 細胞毒性에서 나타난 結果와 類似하였다(Table V, VI, Fig. 6,7).

마지막으로 抗轉移 實驗으로 癌의 成長, 浸透 및 轉移에 重要한 段階로 알려진 血管形成에 대한 抑制作用을 測定하였다. 血管形成(angiogenesis)은 新生血管(new blood vessel)이 生成되는 根本인 過程으로 생리적으로 태반의 형성, embryonic membrane의 형성, 生殖, 傷處回復과 再生 등의 狀態에 있어서 必需의이나, 統制되지 않는 血管新生은 關節炎, 糖尿病性 網膜症, 血管腫, 硬皮腫과 같은 疾病을 惹起하기도 한다<sup>53-58)</sup>.

惡性腫瘍은 자신의 成長을 위해 지속적으로 새로운 모세혈관의 成長을 자극해야 하며, 腫瘍에 다다른 新血管은 腫瘍細胞가 血液 속에 들어가서 먼 곳으로 轉移하는 通路가 되므로 腫瘍의 成長과 轉移 또한 血管新生에 依存한다<sup>59)</sup>. 따라서 血管形成의 過程을 抑制하면 癌을 治療할 수 있으리라는 것을 豫想할 수 있어 癌治療를 위한 하나의 意味 있는 手段으로써 등장한 以來로 많은 研究가 이루어지고 있다. 本 실험에서는 angiogenesis 억제효과를 관찰하는 方法으로 ECV 304 cell을 이용한 matrigel coated plate에서 생기는 lumen formation 억제효과를 살펴보았는데, figure 8에서와 같이 對照群에서와 같이 lumen이 形成되어, 血管形成 抑制作用을 나타내지 않았다.

以上の 結果를 綜合하여 보면, 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 對한 附着阻止效果 및 S-180에 對한 生存率 등에서 有意性있는 結果가 나타나, 本 試料의 抗癌活性이 認定되며, 더욱 效果的인 抗癌 處方에 대한 探索을 위해, 向後 本 試料를

基本方으로 多樣한 藥物의 組合을 通한 研究가 持續되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

加味淸熱解毒湯의 抗腫瘍 效果를 糾明하고자 數種 癌細胞에 對한 細胞毒性, DNA topoisomerase I 活性 抑制效果, 複合基質에 對한 附着沮止效果, in vitro neovascularization assay를 通한 血管形成抑制 效果, S-180에 對한 生命延長率 等を 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 數種 癌株에 對한 細胞毒性에서는 A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-BL6 모든 癌株에서는 1mg/ml 以上の 濃度에서 50% 以上 細胞毒성을 나타내었다.

2. DNA topoisomerase I assay에서는 濃度 依存的으로 酵素活性을 抑制하였다.

3. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 145.8%의 生命延長效果를 나타내었다.

4. A549, B16-BL6 癌株에 對한 附着 沮止作用에서는 對照群에 비하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 50% 以上 附着을 沮止하였다.

5. neovascularization assay에서는 對照群에 비해 lumen 形成을 遮斷하지 못하였다.

以上の 結果를 보아 加味淸熱解毒湯은 向後 臨床에서 癌의 轉移豫防 및 治療에 活用可能할 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. Doll, R. and R. Peto : The causes of cancer quantitative estimates of avoidablw risks of cancer in the united states today. J. Natl. Cancer Inst. 66. 1192-1305, 1981

2. 통계청 : Annual report on the cause of death stastistics (Based on vital registration), Seoul, yoo hansa, 1997

3. 전국의과대학교수 : 오늘의 진단 및 치료, 서울, 한우리, pp.85-95, 1999.

4. 金秀眞 : 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1993.

5. 金東熙 外 : 抗癌劑와 放射線療法의 副作用에 對한 韓方藥物療法, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集 3卷, pp.34-39, 1993.

6. 趙克勝 外 : 黃芪多糖質이 人體周圍穴 單核細胞의 腫瘍壞死因子 産生을 增強시키는데 對한 研究, 한글판 中西醫結合雜誌, No.5, pp.1 -4, 1993.

7. Park, Y. S. and J. W. Kim : Screening and isolation of antitumor agents from medicinal plants (I), Kor. J. pharmacogn. 23, 264-267, 1992.

8. Jurry, M. C : Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. J. Nat. Prod. 53, 23-41, 1990.

9. Ally, M. C. and D. A. Scudiero : Screening for natural plants, Cancer Res. 48, 5891-5897, 1988.

10. 崔政和 : 當歸飲子加蟾酥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.

11. 孫甲鎬 外 : 柴胡, 茵陳의 肝癌細胞에 對한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.414-432, 1995.

12. 趙漢震 : 桃紅四物湯加減方의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究, 大田大學校大學院, 1998.

13. 楊維傑 主編: 癌症腫瘤醫論醫華精選, 藥羣文化事業公司, pp.1-4, 1989.

14. 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, 17(4), pp.20-21, 1993.

15. 牛孺子 外 : 癌症治驗錄, 北京, 中醫古籍出版社, p.147, pp.1-15, 1994.

16. 梁興才 : 健脾補氣常用藥防治癌症研究綜述, 中醫藥信息 3, pp.17-19, 1988.

17. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
18. 孟琳升 外: 中醫治癌大成, 北京, 北京科學出版社, pp.111-112, 122-143, 232-233, 1995.
19. 郁仁在 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學出版社, pp.1-10, 1983.
20. 郎偉君 : 抗癌中藥一千方, 北京, 中國醫藥技術出版社, pp.5-17, 1994.
21. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
22. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1-10, 1986.
23. 趙健斌 : 吳一純教授治療晚期惡性腫瘤的經驗, 陝西醫學, 第14期, pp.451-453, 1993.
24. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, p.2418, 1989.
25. 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.
26. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, p.17, 1972.
27. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, Cancer Treat. Rep., 60, p.979, 1966.
28. K. Drlica and R. J. Franco ; Inhibitors of DNA Topoisomerases, Biochemistry., 27(7), pp.2253~2259, 1988.
29. Liu, L. F. : In DNA topology and its biological effects (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.371-389, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
30. Mary K. Chelberg, Effie C. Tsilibary, Alan R. Hauser, James B. McCarthy ; Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration : Involvement of multiple, distant domains of the collagen molecule. Cancer Reserch, 49, 4796-4802, 1989.
31. Lin Yan et, al. : Inhibition of cell attachment by selite, Cancer reserch 52, 5803-5807, 1992.
32. 김응국의 6인 : 新血管形成 기작 研究를 위한 生體外 모델 시스템 확립 : ECV304 內皮細胞株를 利用한 新血管形成 모델 및 膜기성 섬유아세포 成長因子的 生産, 1997년 기초의학 학술대회.
33. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132-140, 1987.
34. American Cancer Society : Cancer facts & figures ; 3005-3008 1996.
35. Moss, R , W : The Cancer Syndrom, New York, Paragon House 1989.
36. 송계용 의 : 核心病理學, 서울, 高麗醫學, pp.151-160, 1998.
37. 서울대학교의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교출판부, p.137, pp.1-3, 214-215, 225-234, 1989.
38. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, pp.225-271, 632-638, 703-710, 742-759, 816-827, 936-941, 1015- 1021, 1061-1070, 1990.
39. 李文鎬 : 內科學 卷下, 博愛出版社, pp.2246-2250, 2466- 2475, 1976.
40. Idestrom K., Petrini B., Blomgren H., Wasserman J., Wallgren A., Baral E. : Changes of the peripheral lymphocyte population following radiation therapy to extended and limited fields. Int J Radiant Oncol Biol Phys 5: 1761, 1979.

41. Suffness, M. and Douros, J. : Current status of the NCI plant and animal product program, *J. Nat. Prod.*, 45(1), 1-14 (1982).
42. Kinoshita, G., Nakamura, F. and Maruyama, T. : Immunological studies on polysacchride from crude drugs, *Shoyakugaku Zasshi*, 40, 325-332 (1986).
43. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, *Cancer Treat. Rep.*, 60, p.979, 1966.
44. 김성훈, 박경식, 유시용 : 생약복합제제 길경탕 및 가미길경탕의 항암효과(제1보), *生藥學會誌*, 27권1호, pp.37-41, 1996.
45. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 永林社, pp. 223-224, 302-306, 431-433, 201-202, 385-386, 414-415, 417-420, 1991.
46. 王 冰 : 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.1-2, p.73, 1990.
47. 李 岩 : 腫瘤臨床備要, 人民衛生出版社, pp.356-366, 1980.
48. 김수철 : 抗癌本草, 서울, 圖書出版 바람과 물결, p.221, 254, 315, 425, 474, 1988.
49. 한기광 : 柴胡의 有效物質 分離 및 抗癌活性에 關한 研究, 대전대학교 한의과대학 박사학위논문, 1999.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Higgins, N. P., Ferro, A. M. and Olivera, B. M. : In *DNA Topology and its Biological Effects* (Cozzarelli, N. R. and Wang, J. C. eds.) pp.361-370, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
54. Folkman, J. : Tumor angiogenesis : Therapeutic implications, *N Engl J Med.*, 285, pp.1182~1186, 1971.
55. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, *Devl Biol.*, 41, pp.391-394, 1974.
56. 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.
57. Fidker, I. J., Ellis, L. M. : The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, 79, 185~188, 1994.
58. Okawa, T., Hiragun, A., Yosida, Y., Ashino-Fuse, H., Tominaga, T., and Iwagushi, T. : Angiogenic activity of rat mammary carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz [ $\alpha$ ]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.