

# 加味抵當湯의 抗癌 및 抗轉移 효과에 관한 연구

이동훈<sup>1</sup> · 김동희<sup>1</sup> · 강인철 · 박영미<sup>2</sup> · 송규용 · 김성훈\*

경희대학교 동서의학대학원, 1:대전대학교 한의과대학, 2:인천대학교 생물학과

## Study on Antitumor and Antimetastatic Effect of Kamigedang-tang

Dong Hoon Lee<sup>1</sup>, Dong Hee Kim<sup>1</sup>, In Cheol Kang, Young Mi Park<sup>2</sup>, Gyu Yong Song, Sung Hoon Kim\*

Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,

1:Oriental Medical College, Daejeon University, 2:Department of Biology, Incheon University

The purpose of this study was to investigate the effect of Kamigedang-tang(KGDT) water extract on the antitumor and antimetastatic activity. The results were summarized as follows: KGDT extracts exhibited a significant cytotoxicity against P388, SK-MEL-2, SK-OV-3, and B16-F10 cell lines and showed significant inhibitory effect on DNA topoisomerase I from calf thymus. The T/C% was 122.9% in KGDT treated group in S-180 bearing ICR mice. Also, KGDT extracts exhibited efficient affect adhesive effect of A549 cell to complex extracellular matrix. In CAM assay, KGDT extracts inhibited angiogenesis at 15µg/egg concentration insignificantly as compared with control. These results suggested that KGDT extracts might be usefully applied for prevention and treatment of cancer.

Key words : Kamigedang-tang(加味抵當湯), cytotoxicity, anti-adhesion, CAM assay, T/C %, DNA topoisomerase I

### 서론

抵當湯은 漢代 張仲景의 《傷寒論》<sup>1)</sup>에 “太陽病六七日 表證仍在 脈微而沈 反不結胸 其人發狂者 以熱在下焦 少腹 當鞭滿 小便自利者 下血乃愈 所以然者 以太陽隨經 瘀熱在裏故也 抵當湯主之”라 收載된 以後 瘀血에 의한 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 精神分裂症, 癲癇, 半身不隨, 血腫, 血塊 등을 치료하는데 광범위하게 사용되어 왔다<sup>2)</sup>. 瘀血은 韓醫學의 독특한 病理概念<sup>3)</sup>으로, ‘瘀’字는 本來 淤水積滯의 뜻인 ‘淤’字에서 기원하여, 물이 積滯된 것처럼 體內 一定部位에 血液이 瘀滯되어 나타나는 病症 및 瘀滯된 血液 自體를 意味한다<sup>4)</sup>. 惡性腫瘍은 組織의 非正常的인 過剩成長으로 스스로 만들어내는 여러가지 毒性物質, 불안정한 新陳代謝로 인한 老廢物 및 發癌因子 등이 體內에서 癌性 惡液質(cancerous cachexia)을 형성하는데, 이는 한의학에서의 瘀血의 病理의 形態學的 特徵과 유사하다 볼 수 있다<sup>5)</sup>. 癌性 惡液質은 면역력을 저하시키고 세균과 바이러스가 번식할 온상이 되어 2차 감염으로 사망에까지 이르게 하는데, 癌으로 인한 사망중 전체의 약 50%를 차지하고 있다. 한의학에서의 癌의 치료는 다른 질환의 치료와 마찬가지로 辨證施治에 입각한 扶正法과 祛邪法 및 이 두가

지 방법을 배합한 扶正祛邪法으로 구분할 수 있다<sup>6)</sup>. 이 중, 祛邪法의 일종으로 瘀血에 대한 치료법인 活血祛瘀法은 活血化瘀, 疏通經絡, 破瘀散結, 祛瘀生新 등의 치료로 消腫散結하여 腫塊를 치료할 뿐만 아니라 瘀血로 인한 出血, 疼痛 등의 치료 및 癌性 惡液質의 除去 등 암치료에 효과적인 치료법으로 여겨져 현재 각종 암관련 실험 및 임상에서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>7)</sup>. 최근 이에 실험적 연구로 活血祛瘀하는 단일 약물에 대하여 顏<sup>8)</sup>, 韓<sup>9)</sup>, 李<sup>10)</sup>, 傅<sup>11)</sup> 등은 항암 작용을 보고하였고, 沈<sup>12)</sup>는 活血祛瘀 방제의 抗癌活性和 抗癌劑와의 병용 투여 효과를 보고하였으며, 이 밖에 암치료에 있어 應은 活血化瘀法의 有效한 治療效果를 보고한 바가 있었지만, 抵當湯에 清熱解毒藥物을 加味한 加味抵當湯의 抗癌 효과에 대한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다. 이에 본 연구는 抵當湯에 抗癌活性和을 나타내는 白花蛇舌草, 魚腥草, 및 仙鶴草을 加한 加味抵當湯을 試料로 A549를 비롯한 암세포에 대한 세포독성작용, DNA topoisomerase I 활성 억제작용, sarcoma 180에 대한 생존비 등의 측정을 통해 항암효과를 평가하고, A549 癌株의 부착 저지작용, 혈관형성 억제작용, 肺臟 colony 형성 억제작용 등을 측정하여 항전이효과를 평가하였던 바 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1, 경희대학교 동서의학대학원  
E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179  
· 접수: 2002/03/12 · 수정: 2002/04/24 · 채택: 2002/05/17

### 재료 및 방법

1. 동물 및 약재

동물은 자웅 4주령의 ICR(International Cancer Research, U.S.A)계와 C57BL/6계 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료와 물을 充分히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서, 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. S-180 암세포에 대한 생존비 측정 실험에는 ICR계 생쥐를 사용하였고, 폐암전이 실험에는 C57BL/6계 생쥐를 사용하였다. 본 실험에 사용한 약재는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 구입하여 精選한 것을 使用하였으며, 處方의 內容은 《傷寒論譯詮》<sup>13)</sup>의 抵當湯을 基本으로 加味 構成하였으며 한 貼 分量은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of Kamigedang-tang

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
水 蛭	Hirudo	4
虻 蟲	Tabanus	5
桃 仁	Pericae Semen	7.5
大 黃	Rhei Radix et Rhizoma	11.25
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusa Herba	8
魚腥草	Houttuyniae Herba	6
仙鶴草	Agrimoniae Herba	6
總 量		47.75

2. 검역의 조제

加味抵當湯의 2첩 분량(95.5g)을 각각 3리터 round flask에 증류수 2리터와 함께 넣은 다음 2시간 동안 가열하여 여과한 여액을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461)에서 감압농축하였고, 이 round flask를 -84℃ deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 방치하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 동결건조하여 30g의 분말을 얻었다. 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, 0.45µm, Falcon)로 濾過하여 사용하였다.

3. 시약 및 기구

실험에 사용한 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, 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 Glicial 製品, DNA topoisomerase I, pBR322 DNA는 Takara 製品, 受精卵은 풀무원社 製品, intralipose는 綠十字 製品, Tissue culture coverslip은 Nunc社 製品을 각각 使用하였다. 기구는 CO<sub>2</sub> 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 (5ml, 10ml, 25ml, Falcon), camera(601S, Nikon) 및 syringe filter (0.22, 0.45µm, Falcon)등을 사용하였다.

4. 세포배양

In vitro 細胞毒性 測定에는 P388(ATCC CCL 219) 白血病癌株와 A549(ATCC CCL185) 肺癌株, SK-OV-3(ATCC HTB 77) 卵巢癌株, 및 B16-F10 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, B16-BL6(ATCC CRC 6322) 생쥐 黑色腫을 使用하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 培地에 56℃ 水槽에서 30分間 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum (FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10 단units/streptomycin 100 mg)와 NaHCO<sub>3</sub> 2g을 添加하여 製造하였다.

5. P388 癌株에 대한 細胞毒性 측정

細胞毒性 實驗에서 logarithmic phase에 도달한 P388 細胞를 얻기 위하여 實驗 24時間 前에 36~37℃로 加溫한 medium을 넣은 culture dish에 P388 細胞를 2~3×10<sup>5</sup>cells/ml 濃도가 되게 調整하여 1日間 培養시킨 後, 約 0.8~1.0×10<sup>6</sup>cells/ml의 濃도가 되도록 P388 細胞 懸濁液을 만들었다. 細胞 懸濁液(4×10<sup>4</sup>cells/ml)을 100µl씩 96well plate에 넣고 試料는 實驗하기 바로 전에 培地에 溶解시키고 20分間 sonication한 後 試料를 0.25, 0.5, 1mg/ml등의 濃도로 만든 試料용액 100µl를 가하여 실험군으로 하였으며, 대조군에는 懸濁液만을 넣고 37℃, CO<sub>2</sub> incubator에서 48時間 培養 후 MTT<sup>14)</sup> 法에 의하여 細胞數를 計算하였다.

6. A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性 측정

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989년에 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>15)</sup>을 使用하였다.

7. DNA topoisomerase I assay 방법

실험에 사용된 DNA topoisomerase I 은 calf thymus에서, pBR 322 DNA는 E.coli C 600에서 유래된 것으로 topoisomerase I 저해 IC<sub>50</sub>값을 결정하기 위해 relaxation assay를 實施하였다. Topo I 活性的 測定은 Liu와 Miller의 方法<sup>16)</sup>에 따랐다. 즉, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 5mM spermidine, 0.01% bovine serum albumin, 0.5µg pBR 322 DNA와 酵素(1 unit)만 加하여 總 反應液을 20µl가 되게 한 것을 對照群으로, 酵素와 試料

를 추가하여 총 반응액을 20 $\mu$ l 되게 한 것을 실험군으로 하여 이를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 용액 5 $\mu$ l를 추가하여 반응을 종결시키고, 이를 TBE running buffer (50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)로 평형된 1% agarose gel에 전기영동을 한 후 agarose gel에 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide 용액에서 1시간동안染色, 紫外線 下에서 寫眞을 찍은 다음 scanner를 사용하여 活性 밴드를測定했다. 이때 topo I 의 1 unit는 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킬 때 supercoiled pBR 322 DNA를 100% relaxation을 촉매하는 酵素의 量을 의미한다.

8. A549 癌株의 附着 阻止 作用 측정

A549 細胞를 cell culture dish에 monolayer로 자라도록 細胞濃度를 調節하면서 키웠다. 癌細胞는 2% FBS로 調節한 培地에 懸濁시켜 96 well plate의 각 well에 100 $\mu$ l 씩 가한(5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well). 후 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度의 試料를 녹인 培地 100 $\mu$ l를 加하고 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 에서 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에 의하여 바닥에 붙어 있는 細胞數를 관찰하였다.

9. S-180 癌細胞에 對한 生存比 측정

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 흔재된 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 濃度가 되도록 細胞 浮游液을 만들고 이 浮游液을 0.1ml씩 腹腔內에 移植하였다. 移植 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 $^{\circ}$ C에 保存하였으며 0.2ml씩 經口로 1週日간 連續 投與하였으며 對照群에는 同量의 生理食鹽水液을 投與하였다. 生存比(T/C%)는 美國立 癌研究所 protocol에 言及된 式<sup>17)</sup>에 따라 計算하였다.

10. 肺癌 轉移抑制 작용

In vitro에서 繼代培養한 B16-BL6 肺癌細胞를 實驗에 使用하였다. 즉, 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 trypsin-EDTA 溶液으로 附着面으로부터 分離시켜 HBSS 溶液으로 細胞數가 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml이 되도록 細胞懸濁液을 만들었다. 18-20g인 C57BL/6에 細胞懸濁液 0.2ml을 尾靜脈 注射하였다. 檢液은 B16-BL6 癌細胞를 移植한 後 24時間 부터 1日 1回씩 24mg/20g/day의 試料를 生理食鹽水에 녹여 4 $^{\circ}$ C에서 保管하면서 7日間 每日 zonde를 使用하여 經口 投與하였다. 癌移植 21日 後에 cervical dislocation으로 致死시킨 다음 開腹하여 肺에 轉移된 癌細胞 colony를 계산하였다.

11. Chicken chorioallantoic membrane(CAM assay)

CAM assay는 기존의 알려진 방법에 의하여 실시하였다<sup>18)</sup>.

실험결과

1. 암세포에 대한 세포독성효과

1) P388 癌株에 對한 細胞毒性

P388 癌株에 對한 細胞毒性 實驗에서는 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 80.33 $\pm$ 3.22, 67.78 $\pm$ 3.21, 20.08 $\pm$ 1.99%로 對照群에 比하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 30% 以上 癌細胞 成長을 억제하였다(Table 2).

Table 2. Cytotoxic Effect of KGDT on P388 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 $\pm$ 2.42 <sup>a)</sup>
0.25	80.33 $\pm$ 3.22
0.5	67.78 $\pm$ 3.21
1	20.08 $\pm$ 1.99

a) : Mean $\pm$ standard error, Control : Non-treated group, 0.25 : 0.25mg/ml KGDT treated group, 0.5 : 0.5mg/ml KGDT treated group, 1 : 1mg/ml KGDT treated group

2) 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 105.32 $\pm$ 4.32, 90.34 $\pm$ 2.76, 79.35 $\pm$ 3.57%로 對照群에 比하여 75% 以上 癌細胞生存率을 나타내어 細胞毒性이 微弱하였다(Table 3).

Table 3. Cytotoxic Effect of KGDT on A549 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 $\pm$ 3.25 <sup>a)</sup>
0.25	105.32 $\pm$ 4.32
0.5	90.34 $\pm$ 2.76
1	79.35 $\pm$ 3.57

3) 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, 1mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 97.36 $\pm$ 1.15, 80.94 $\pm$ 2.45, 43.75 $\pm$ 3.33%로 對照群에 比하여 1mg/ml의 高濃度에서 50% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table 4).

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

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100 $\pm$ 3.60 <sup>a)</sup>
0.25	97.36 $\pm$ 1.15
0.5	80.94 $\pm$ 2.45
1	43.75 $\pm$ 3.33

4) B16-F10 癌株에 對한 細胞毒性

B16-F10 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 118.63 $\pm$ 4.40, 81.29 $\pm$ 4.45, 61.53 $\pm$ 2.75%로 對照群에 比하여 1mg/ml의 高濃度에서 30% 以上 癌細胞成長을 抑制하였다(Table 5).

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

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±4.45 <sup>a)</sup>
0.25	118.63±4.40
0.5	81.29±4.45
1	61.53±2.75

5) 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, 1 mg/ml 濃度에서 細胞成長率이 各各 81.84±2.25, 60.94±6.75, 51.24±1.45%로 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 對照群에 比하여 40% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table 6).

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

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±2.45 <sup>a)</sup>
0.25	81.84±2.25
0.5	60.94±6.75
1	51.24±1.45

2. DNA topoisomerase I에 미치는 영향

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하였다. 전기영동을 실시하여 寫眞 撮影한 結果 figure 1에서 보는 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되었다. 이에 比해 實驗群은 62.5, 125, 250, 500µg/ml 濃度에서 濃度依存的으로 topo-I의 活性을 强하게 抑制하였다(Fig. 1).

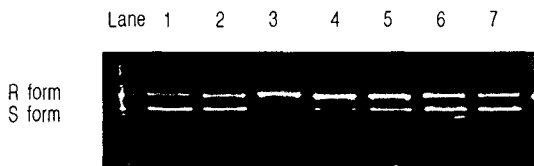


Fig. 1. Effect of KGDT on the DNA topoisomerase I from calf thymus. Lane 1 : DNA (0.5µg) only, Lane 2 : DNA + DNA topoisomerase I (0.5 unit), Lane 3 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit), Lane 4-7 : DNA + DNA topoisomerase I (1 unit) + 62.5, 125, 250 and 500 µg/ml of KGDT

3. A549 癌株의 附着 阻止效果

A549세포에 對한 附着阻止 實驗을 한 結果 0.25, 0.5, 1mg/ml 의 濃度에서 各各 98.74±4.10, 52.84±2.35, 12.86±1.55%로, 0.5 mg/ml 以上の 濃度에서 40% 以上の 細胞附着 阻止效果를 나타 냈다(Table 7).

Table 7. Inhibitory Effect of KGDT on Cell Adhesive of A549 Cells to Complex Extracellular Matrix

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100±6.45 <sup>a)</sup>
0.25	98.74±4.10
0.5	52.84±2.35
1	12.86±1.55

4. S-180이 移植된 생쥐의 生存比에 미치는 효과

加味抵當湯을 S-180이 移植된 생쥐에 10일간 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 16일에 급격히 增加하여 22일에 모두 죽었다. 平均 生存日數에서 對照群의 MST는 18.3日, KGDT 投與 群은 22.54日로 나타나, T/C%는 122.9%로 나타났다(Table 8).

Table 8. Effect of KGDT on MST and T/C % in ICR Mice Bearing Sarcoma 180

Group	No. of animals	MST(day)	T/C(%)
Control	8	18.3	100
KGDT	8	22.5	122.9

MST : 평균수명

5. 肺癌轉移에 미치는 효과

B16-BL6 黑色腫을 C57BL/6의 尾靜脈에 注射한 후 21日째에 실시한 肺臟의 colony 數를 觀察한 結果 對照群은 49.7±3.27(개) 이었는데 비해서 KGDT 投與群은 43.4±5.82(개)로써 13%의 微弱한 肺癌轉移 억제效果를 보였다(Table 9).

Table 9. Inhibitory Effect of KGDT of Lung Colonies in C57BL/6 Injected i.v. with B16-BL6 Cells.

Group	No. of animals	No. of colonies
Control	8	49.7±3.27
KGDT	8	43.4±5.82

7. 血管形成 억제효과

CAM assay를 통한 血管形成 抑制效果는 實驗에 使用된 受精卵 10개중 2개에서 血管形成 抑制效果가 나타나 20%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 10, Fig. 2)

Table 10. Antiangiogenic Activity of KGDT in a CAM Assay

Sample	Dose(µg/egg)	No. of CAM (avascular/total)
KGDT	15	2/10

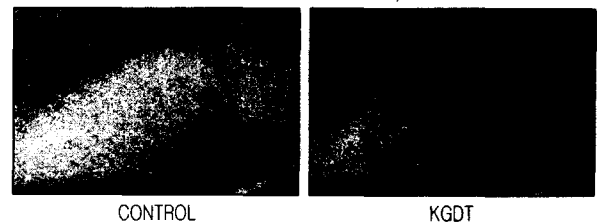


Fig. 2 Photography of control and KGDT on embryonic angiogenesis in CAM 2 day after sample implantation. Left Panel: control, Right Panel: KGDT(15µg/egg).

## 고찰

癌이란 生體組織의 일부가 自律的으로 非正常的인면서도 끊임없이 過剩成長한 惡性新生物을 말하는 것으로, 正常細胞와 比較할때 모양이 不規則하고 核의 크기도 아주 多樣하며 細胞는 아주 빠르게 分裂하는 特徵이 있다. DNA, RNA 등 核酸代謝의 異常으로 體細胞 分裂에 異常이 일어나면 그 異常이 일어난 大部分의 細胞는 免疫器具로 말미암아 없어지지만, 免疫器具의 監視를 피하여 制御되지 않고 增殖된 組織은 無制限 커진다든지 또는 血流나 淋巴流를 따라 體內的 여러 군데에 가서 轉移되어 組織 破壞까지 일으키면서 增殖한다. 腫瘍細胞는 스스로 toxohormone, malignolipin 등 非正常的인 毒物物質을 分泌하고 癌의 抗原을 비롯한 發癌因子 등이 몸 안에 쌓이게 하여, 主要臟器의 機能이 障礙되는 결과, 全身의 代謝系에 顯著한 變化가 일어나서 體液과 血液의 狀態는 非正常的으로 나쁘게 되어 癌性 惡液質(cancerous cachexia)을 招來하게 된다<sup>19)</sup>. 이러한 惡液質의 形成과 病理變化는 韓醫學에서의 瘀血의 形態, 病理學的 概念과 類似하다 볼 수 있다. 瘀血은 韓醫學의 독특한 病理概念으로, 機能을 喪失한 血液이 脈內, 脈外를 막론한 體內的 一定部分에 瘀滯되어 形成된 病理產物이며, 또한 氣血의 循行에 影響을 미쳐 臟腑機能을 失調시킴으로써 多樣한 疾病을 惹起하는 重要한 發病因子로 認識되고 있다. 본래 淤水積滯의 淤지에서 轉化되어 온 것으로, 瘀血이 病의 범주에 속하기 때문에 疔附를 고친 것이며, 淤濁한 물이 停滯되어 잘 흐르지 못하는 것을 象徵하고 있다. 《內經》에서는 瘀血이란 名稱은 나타나지 않고, “留血”, “著血” 등의 病症이 記載되었으며, 《金匱要略·傷寒論》에서는 “瘀血”, “乾血”, “蓄血” 등이 記載되어 最初로 瘀血이란 名稱이 言及되었으며, 이에 對한 脈症과 理·法·方·藥이 論述되었다. 瘀血은 固定性 腫塊를 形成하며, 그 副產物로 臟腑機能의 失調를 惹起하여 氣機를 阻害하여 疼痛, 出血 등의 多樣한 病症을 誘發하는데, 이러한 症狀는 新生物인 癌의 症狀에서도 쉽게 찾아볼 수 있다<sup>20-24)</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, 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 있다. 또한 藥物에 대한 耐性이 增加되고 있는 實情이기 때문에 위와 같은 短點을 克服할 수 있는 새로운 方式의 抗癌劑 開發이 要求되고 있다. 이러한 現實的인 問題로 인하여 東·西醫學에서는 最近에는 細胞毒性이 다소 弱하기는 하지만, 既存 抗癌劑와 併用하여 抗癌性を 增加시키고 副作用을 줄일 수 있는 物質을 찾기 위한 努力들이 進行되고 있으며, 특히 韓藥 등 天然物에 對하여 關心을 가지고 있다. 抵當湯은 《傷寒論》<sup>3)</sup>에 “太陽病六七日 表證仍在 脈微而沈 反不結胸 其人發狂者 以熱在下焦 少腹 當鞭滿 小便自利者 下血乃愈 所以然者 以太陽隨經 瘀熱在裏故也 抵當湯主之”, “太陽病 身黃 脈沈結 少腹鞭 小便不利者 爲無血也 小便自利 其人如狂者 血證諦也 抵當湯主之”라고 最初로 收載된 以來 活血化瘀作用으로, 現在에는 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 精神分裂症, 癲癇, 半身不遂, 血腫 및 血塊 등 瘀血이 病因이 되어 나타나는 諸症狀에 廣範圍하게

使用되고 왔다<sup>2)</sup>. 抵當湯의 實驗的 研究로는 林<sup>25)</sup>이 “抵當湯이 血栓에 미치는 影響”을, 文<sup>26)</sup>이 “桂枝茯苓丸, 抵當湯 및 桂枝茯苓丸合抵當湯이 Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響” 등 주로 瘀血病態 모델을 이용하여 活血化瘀作用을 糾명한 研究가 이루어진 바가 있다. 아울러 抵當湯의 構成藥物 혹은 抵當湯과 같은 活血化瘀 處方들의 抗腫瘍效果에 대한 研究는 있으나, 아직 抵當湯에 抗癌活性이 있는 藥物을 加한 加味抵當湯의 抗腫瘍效果에 對한 報告는 接하지 못했다. 이에 著者는 活血化瘀作用이 있는 抵當湯에 抗癌效果를 나타내는 仙鶴草, 魚腥草, 白花蛇舌草를 加味한 加味抵當湯의 抗腫瘍效果를 實驗的으로 究明하고자, 이를 試料로 A549를 비롯한 癌細胞에 對한 細胞毒性作用, DNA topoisomerase I 活性 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生存比, A549 癌株의 附着 阻止作用, 血管形成 抑制作用, 肺臟 colony 抑制作用 등을 測定하여 抗癌活性 및 抗轉移效果를 評價하였다. 먼저 癌細胞 成長 抑制 程度를 測定하는 MTT 法과 SRB 法을 使用하여 細胞毒性을 測定하였는데, P388, SK-MEL-2 癌株는 0.5mg/ml 以上の 濃度에, SK-OV-3, B16-F10 癌株에서는 1mg/ml 濃度에서 各各 30% 以上の 癌細胞 成長 抑制效果를 나타내었고, A549 癌株에서는 모든 實驗濃度에서 有意性있는 結果가 나타나지 않았다(Table 2-6). 細胞毒性을 評價하는 또다른 實驗으로, DNA supercoiling state를 調節하므로써, 複製, 轉寫의 initiation의 效率性에 影響을 주는 DNA topoisomerase의 活性 抑制에 대한 實驗을 實施하였는데, 이는 最近에 topoisomerase poison이라고 불리는 topoisomerase의 抑制劑이 細胞毒性을 일으킴으로써 抗癌劑로서 使用될 수 있음이 報告<sup>27,28)</sup>된 이후 細胞毒性 評價에 자주 應用되고 있기 때문이다. 본 實驗에서는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 DNA만을 處理한 實驗群은 大部分 supercoiled form으로 나타났고(L1), DNA에 topo-I을 處理한 對照群은 모두 relaxed form으로 轉換되었다(L3). 이에 比해서 KGDT를 處理한 群에서는 濃度依存的으로 酵素의 活性를 抑制하였으며, relaxed form에서 supercoiled form으로 50% 轉換되는 濃度인 IC<sub>50</sub>은 >125~250μg/ml로 나타나 topo-I의 活性抑制效果가 強하였다(Fig. 1). S-180이 移植된 생쥐를 이용한 抗癌實驗에서는 KGDT를 10日間 經口 投與한 後 體重 增加를 測定하였는데, 腹水癌으로 인한 體重 增加는 對照群에서는 癌株 移植 後 10日에 급격히 增加하여 22日에 모두 死亡하함으로써 18.3日의 MST는 나타난 反面, KGDT 投與群은 22.5日로, T/C%(生存比)는 122.9%로 나타났다(Table 8). 다음으로 癌細胞가 二次的으로 다른 部位에 轉變되어 癌의 症狀를 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 癌株에 對한 附着 阻止作用을, in vivo에서는 B16-BL6 癌株를 移植한 생쥐의 lung colony 形成 抑制作用 및 血液學的 變化와 CAM assay를 통한 血管形成 抑制作用을 評價하였다. A549 細胞를 이용한 複合基質에 대한 細胞附着 阻止作用 實驗에서는 0.5mg/ml의 以上の KGDT 濃度에서 40% 以上 附着을 阻止하여 有意性있는 結果를 나타내었다(Table 7). B16-BL6 癌株를 이용한 肺臟轉移實驗에서는 KGDT 投與群이 13%의 肺臟轉移 抑制效果(Table 9)가 나타났

다. 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 抑制作用을 測定하는 實驗中 CAM은 鷄胚의 發生 3-4日째에 生成되는 胚外膜(ext raembryonic membrane)으로써 毛細血管과 다른 血管들을 뚜렷이 區別할 수 있어서 血管移動과 形態形成에 影響을 주는 因子를 研究하는데 適當한 모델로 使用되고 있는데, 本 實驗에서는 受精卵 10개중 2개에서 血管形成 抑制效果를 나타내어 20%의 血管形成 抑制效果를 나타내었다(Table 10, Fig. 2). 以上の 結果를 綜合하여 보면, 加味抵當湯이 特히 topoisomerase I 酵素의 活性抑制에 보다 效果의으로 나타나, 주로 DNA 損傷에 의한 細胞毒性으로 抗腫瘍 效果를 發揮함을 알 수 있고, 또한 A549 癌株의 細胞附着 抑制 效果에 있어서 有意性 있는 結果를 나타낸 점으로 보아, 加味抵當湯이 癌細胞가 轉移를 위하여 特異 glycoprotein과 附着時 附着 抑制作用을 發揮할 것으로 推測된다. 아울러 最近 金<sup>29)</sup>의 實驗報告에 비추어 볼 때, 加味抵當湯에 扶正藥 혹은 扶正處方과 併用할 경우, 細胞毒性和 더불어 免疫機能 調節效果로 보다 나은 抗腫瘍 效果를 나타낼 것으로 期待된다.

## 결 론

加味抵當湯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 抑制作用, sarcoma 180에 對한 生命延長率, A549에 對한 附着 阻止作用, 肺臟 colony 形成 抑制作用, 血液學的 變化 및 血管形成 抑制作用 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다. 數種 癌株에 對한 細胞毒性에서는 P388, SK-MEL-2 癌株에 對하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서, SK-OV-3, B16-F10 癌株에는 1mg/ml 以上の 濃度에서 30% 以上 細胞毒성을 나타내었다. A549 癌株에 對한 附着 阻止作用에서는 對照群에 비하여 0.5mg/ml 以上の 濃度에서 40%以上 阻止하여 有意性있는 效果를 나타내었다. DNA topoisomerase I assay에서는 濃度 依存的으로 酵素活性 抑制하여 有意性있는 效果를 나타내었다. S-180을 이용한 抗癌 動物實驗에서 T/C%는 122.9%로 有意性있는 生命延長效果를 나타내었다. Pulmonary colonization assay에서는 對照群에 비하여 13%의 억제하여 有意性있는 效果가 나타나지 않았다. B16-BL6가 移植된 생쥐의 血液學的 變化에서는 有意性있는 效果가 나타나지 않았다. CAM assay에서는 20%의 血管形成 抑制作用을 나타내었다. 以上の 結果를 보아 加味抵當湯의 抗腫瘍 效果는 直接的인 細胞毒性에 의한 것으로 보여지며, 向後 癌治療에 活用可能할 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. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, p.184-186, 1989.
2. 李尙仁外 : 方劑學, 서울, 永林社, p. 247, 1992.
3. 金聖勳 : 東醫病理學, 翰林園, pp.347-352, 1992.
4. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳 : 東醫病理學, 高文社, pp.78-90, 1990.
5. 楊寶仁 : 癌症的中藥治療, 河北科學技術出版社, pp.1-33, 1992.
6. 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.
7. 康坼林 : 數種 韓藥劑의 抗癌活性 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集3(2), pp.315-321, 1995.
8. 顏德馨 : 活血化癥療法臨床實踐, 中醫古籍出版社, p.5, 1980.
9. 한종현 외 : 紅花가 人體의 癌細胞柱에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 17(2), pp.303-310, 1996.
10. 李權益 外 : 丹蔘의 抗癌效果와 活性物質 分離에 對한 研究, 東醫病理學會誌, 10(2), pp.76-91, 1996.
11. 傅乃武 等 : 活血化癥藥和 抗癌藥物對細胞表面的作用, 中華腫瘤雜誌 2 (1) , 24, 1980.
12. 沈龍燮 : 子宮細胞에 대한 穿山甲散 煎湯液과 抗癌劑의 併用 投與 效果, 大田大學校 大學院 博士學位論文, 1993.
13. 蔡仁植 : 傷寒論譯註, 高文社, p.493, 1975.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Hellmann, K. and Carter, S.K. : Fundamentals of cancer chemotherapy, McGraw-Hill Book Company, New York, pp.132 -140, 1987.
18. Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Forkman, J. : A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos, Devl Biol.41:391-394, 1974.
19. 姜順熙 : 清泡逐癥湯 및 蜂毒이 癥血病態模型에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校大學院, 1995.
20. 山東中醫學院 : 黃帝內經靈樞校釋, 人民衛生出版社, p.150, 236, 266, 377, 466, 1982.
21. 李挺 : 醫學入門(外科), 서울, 大星文化社, pp.40-42, 1990.
22. 吳謙 등. 醫宗金鑑, 서울, 大星文化社, p.158, 1983.
23. 唐宗海 : 血證論(評釋 裴正學), 北京, 人民衛生出版社, pp.175-176, 1979.
24. 張機 : 金匱要略, 北京, 醫學研究院, pp.328-339, 1983.
25. 林光模 : 抵當湯이 血栓에 미치는 影響, 東醫病理學會誌8(1),

p.45-48, 1993.

26. 文宗模 : 桂枝茯苓丸, 抵當湯 및 桂枝茯苓丸合抵當湯이 endotoxin 으  
로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響, 大田大學校 大學院  
碩士學位論文.
27. 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.
28. 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.
29. 金東熙 : 加味四君子湯, 加味地黃湯 및 加味君子地黃湯의 抗  
腫瘍活性和 放射線 副作用 抑制 效果, 大田大學校 大學院 韓  
醫學 博士學位論文, 1998.