大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌 : 第15卷 第2號
The Journal of Oriental Medical Surgery,
Ophthalmology & Otolaryngology
Vol. 15, No 2, December 2002.

神授衛生湯의 抗腫瘍 效果

배진석[8] · 최정화 · 김종한

ABSTRACT

Effects of Shinsuwuisaeng-Tang on the Anti-Tumor

Bae jin-suk · Choi jung-hwa · Kim jong-han

Shinsuwuisaeng-Tang was a drug that treated carbuncle and cellulitis. So, the purpose of this Study was to investigate effect of Shinsuwuisaen g-Tang on the anti-cancer and nitric oxide(NO) production of peritoneal macrophages.

We used Shinsuwuisaeng-Tang extract(SWT) with freeze-dried, 8wks-old male mice, and cancer cell lines(L1210, sarcoma-180) for this Study. The proliferation of cells was tested using a colorimetric tetrazoliun assay(MTT assay).

The results of this Study were obtained as follow ; SWT was showed cytotoxicity on the L1210 and sacoma-180(S-180) cell lines, SWT inhibited significantly proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice, SWT accelerated NO production of peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice. And SWT inhibited significantly tumor weight, increased significantly body weight and mean survival days in S-180 cells transplanted mice.

This results suggest that SWT has anti-cancer by producing NO of peritoneal macrophages.

8) 동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

Ⅰ. 緖 論

神授衛生湯은 明代 陳의 「外科正宗」에 "治癰疽·發背·腦疽·對口·丹瘤·瘿瘤·惡毒疔瘡·濕痰流注及外科一切瘡症.…"[1] 이라고 처음 수록되어 있다.

癰疽의 原因에 대해 「黃帝內經」[3]에서는 '膏粱厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通等' 에 의해, 劉[4]는 '火熱·風濕之所乘'에 의해, 李[5]는 '濕熱' 에 의해, 朱[6]는 '六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯' 에 의해 發生된다고 하였다. 癰疽의 症狀[2]은 人體 각 部位에 局部的으로는 發熱·發赤·堅硬·腫痛·患部의 陷沒·突起 및 化膿 등의 樣相으로 나타난다.

癌은 지금까지 알려져 있는 死亡原因 중 비교적 높은 비율을 차지하고 있는 疾患[10]으로 이를 정복하려는 노력 또한 國內外的으로 다양하게 진행되고 있는데, 특히 韓醫學에서는 補氣·補血 및 破積·活血·淸熱·解鬱·行氣 등의 治法들을 兼用[11-15]하고 있고, 西醫學에서는 수술요법·방사선요법·화학요법 및 면역요법과 유전자요법 등을 사용하나 면역요법은 아직까지도 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이고, 화학요법도 화학 약재의 독성 및 부작용 문제를 해결하지 못하고 있는 실정이다[16]. 최근 한약재를 이용한 抗癌硏究가 활발히 진행되고 있지만[17-26], 癰疽 및 各種 瘡腫에 사용되는 神授衛生湯 연구는 접할 수가 없었다.

이에 저자는 神授衛生湯의 抗癌效果를 알아보기 위해 *in vitro*상으로 L1210 세포주와 sarcoma-180 세포주에 대한 세포독성효과를 관찰하고, *in vivo*상으로 L1210 세포주를 이식한 병태모델의 항암효과를 살펴보는 동시에 sarcoma-180 세포주를 이식한 병태모델의 고형암 무게·체중·생존기간 연장효과 등을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 약재

실험에 사용한 神授衛生湯(SWT)은 外科正宗[1]에 準하였으며, 동신대학교 부속광주한방병원에서 구입한 후 본초학교실에서 정선을 받아 사용하였다. 실험에 사용한 처방의 내용과 분량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Prescription of Shinsuwuisaeng-Tang(SWT)

구성약물	생 약 명	분량(g)
大黃酒拌炒	RADIX ET RHIZOMA RHEI	7.500
羌活	RHIZOMA SEU RADIX NOTOPTERYGII	3.000
防風	RADIX SAPOSHNIKOVIAE	2.250
白芷	RADIX ANGELICAE DAHURICAE	2.250
穿山甲土炒	SQUAMA MANITIS	2.250
沈香	LIGNUM AQUILARIAE RESINATUM	2.250
紅花	FLOS CARTHAMI	2.250
連翹	FRUCTUS FORSYTHIAE	2.250
石決明煅	CONCHA HALIOTIDIS	2.250
乳香	OLIBANUM	1.875
金銀花	FLOS LONICERAE	3.750
皂角刺	SPINA GLEDITSIAE	3.750
當歸	RADIX ANGELICAE SINENS	3.750
甘草炙	RADIX GLYCYRRHIZAE	3.750
天花粉	TRICHOSANTHIS RADIX	3.750
總 計		46.875

2) 세포주

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 급성백

혈병세포주인 L1210 세포주와 복강암세포주인 sarcoma-180(S-180) 세포주를 사용하였다.

3) 동물

본 실험에 사용한 mouse는 (주)대한실험동물에서 구입한 balb/c계 22±1(g) 수컷과 ICR계 20±1(g) 수컷을 온도 20±3(℃), 습도 55±5(%), light/dark 12(hr)의 사육조건에서 1주일 이상 적응시키면서 고형 pellet 사료(삼양주식회사, Korea)와 물을 자유로이 섭취케 하였다.

4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약들은 Roswell Park Memorial Institude 1640(RPMI 1640, Sigma R4130), Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco LOT. NO. 1006842), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma M2128), Sodium Dodecyl Sulfate(SDS, Sigma L5750), Vincristine(Sigma, V8879), Brewer Thioglycollate Medium(TG, Difco 0236-17-7), Lipopolysaccharide(LPS, Sigma L2637), Interferonγ(IFN-γ, Sigma I6507) 등으로 특급시약을 사용하였으며, 기기로는 Microplate Reader(ELX800UV, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제

SWT의 2첩분량(93.75g)에 1,500㎖ 증류수를 넣고 상온에서 100℃ 2시간동안 전탕한 다음 추출액을 1,500rpm으로 30분간 원심분리기(VS 6000CFN, vision, Korea)로 원심분리하였다. 그 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 100.0㎖로 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조시킨 결과 18.1(g)을 얻었다.

2) 세포 배양조건

L1210 세포주와 S-180 세포주는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100units/㎖, 100㎍/㎖)을 첨가하여 사용하였다. 암세포주의 계대 배양은 1 : 10~1 : 20 비율로 3일 간격으로 하였고, 세포 증식에 미치는 SWT의 영향을 관찰하기 위한 실험은 계대배양 2일째의 세포를 사용하였다.

3) MTT법에 의한 암세포 독성 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann[27]이 개발하고 Kotnik[28] 등이 변형시킨 방법으로, 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 100㎕ (2×10^5cells/㎖)를 접종하여 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 농도별(1, 10, 100㎍/㎖)로 희석된 SWT 100㎕를 넣고 37℃의 CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5㎎/㎖ 농도로 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)-A에 희석된 MTT용액 20㎕를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 은박지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 0.01N HCl에 용해시킨 10% SDS 100㎕를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570㎚에서 측정하여 Control group의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

4) 암세포주 대한 vincristine의 IC_{50} 측정

암세포주의 증식을 50% 억제할 수 있는 vincristine의 농도(IC_{50})를 구하기 위해 각 well에 L1210 세포주를 2×10^5cells/㎖로 접종하고 24시간 동안 배양한 후 vincristine을 다양한 농도로 암세포주에 처리하여 3)과 동일한 방법으로 IC_{50}을 계산하였다. 그 결과 vincristine의 IC_{50}은 5×10^{-6}g/㎖

이었다.

5) 세포증식에 미치는 SWT와 항암제 병용처리 효과 측정

각각의 세포에 미치는 SWT와 항암제의 병용처리 효과를 알아보기 위하여 각 well에 암세포를 2×10^5cells/㎖ 농도로 접종하고 24시간동안 배양한 후 다양한 농도의 SWT와 vincristine의 IC_{50} 농도(5×10^{-6}g/㎖)를 병용처리하여 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

6) Sample group 분류

(1) L1210 증식율 및 복강 macrophages의 nitric oxide 생성능 Sample group

Balb/c 마우스 7마리를 1군으로 하여 Control group과 Sample group으로 분류하였다. Control group은 1일 1회씩 7일동안 증류수를 0.2㎖씩을 투여하였고, Sample A group은 SWT 500㎎/kg을, Sample B group은 SWT 700㎎/kg을 각각 7일동안 1일 1회 0.2㎖씩 경구투여하였다.

(2) 복강암 및 생존율 Sample group

ICR계 마우스 8마리를 1군으로 하여 Control group과 Sample group으로 분류하였다. Control group은 격일간격으로 증류수 0.2㎖을 15일이상 경구투여하였고, Sample A group은 SWT 500㎎/kg을, Sample B group은 SWT 700㎎/kg을 격일간격으로 15일이상 경구투여하였다.

7) L1210 세포주가 이식된 마우스의 암세포 증식율 억제 측정

L1210 세포주를 2)와 같이 계대배양하여 2×10^6cells/mouse로 조제한 다음 마우스의 복강에 1.0㎖를 주사함으로써 암세포를 이식하였다. 이 후 6)-(1)과 같이 Sample group을 분류한 후 7일동안 SWT를 경구투여한 후 경추탈골시켜 도살하였다. 도살 후 복강에 cold PBS 10.0㎖를 주입하여 잘 혼합시킨 다음 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4℃에서 1,500rpm으로 5분간 원심분리하고 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후 직경 120㎜ petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 배양시킨 다음 4시간후 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 4℃에서 1,500rpm으로 5분간 원심분리를 하였다. 침전된 세포분획을 모아 1×10^6cells/㎖로 조제하여 96 well plate의 각 well에 세포부유액 100㎕를 분주하고 배지 100㎕를 채워 37℃의 CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 이식된 암세포의 증식율은 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

8) L1210 세포주가 이식된 마우스의 복강 macrophages 분리 및 nitric oxide 생성능 측정

7)과 같이 암세포를 이식한 후 6)-(1)과 같이 실시하면서 경추탈골시키기 3일전에 3% TG 2.0㎖를 복강주사하였다. 이 후 도살된 마우스의 복강에 cold PBS 10㎖를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4℃에서 1,500rpm으로 5분간 원심분리하고 RPMI 1640배지로 2회 세척한 후 직경 120㎜ petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양시킨 후 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한 macrophages만을 cell scraper로 분리하여 24 well plate에 각 well당 1×10^6cells/㎖로 분주한 후 LPS 1㎍/㎖와 IFN-γ 25units/㎖를 첨가하여 37℃ CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 생성된 nitric oxide(NO)의 양을 Griess법[29]으로 측정하였다.

세포부유액 100㎕와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthyl-ethylene-diamine 2Hcl + 2.5% H_3PO_4) 100㎕를 혼합하여 96 well plate에 넣고 microplate-reader로 570㎚에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한

$NaNO_2$의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

9) 복강암 유발 마우스의 체중변화 측정

S-180 세포주를 2)와 같이 계대배양하여 2×10^6cells/mouse로 조제한 다음 마우스의 복강에 0.2㎖를 주사함으로써 암종을 유발시켰다. 이 후 6)-(2)와 같이 실시한 후 15일 후에 체중을 측정하였다. 그 후 복강암의 무게를 제외한 무게를 체중으로 환산하였다.

10) 복강암 유발 마우스의 고형암 억제효과 측정

9)와 같은 방법으로 실시한 15일 후 경추탈골시켜 도살한 마우스의 복강에 있는 고형암을 적출하여 전자저울을 이용하여 측정하였다.

11) 복강암 유발 마우스의 생존율 연장효과 측정

6)-(2)와 같은 방법으로 유발시킨 다음 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존기간 연장측정의 척도인 Median survival time 계산에서 제외시켰다. Median survival time은 R.I. Geran[30] 등이 기술한 방법에 의하여 실시하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

X ; 생존수가 전체동물수의 1/2이 되는 최초의 시간(일)

Y ; 생존수가 전체동물수의 1/2에서 1일 뺀 최초의 시간(일)

단, 전체동물의 수가 홀수인 경우는 Median survival time은 X/2가 된다.

3. 統計處理

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

Ⅲ. 實驗結果

1. SWT의 암세포주에 대한 세포독성 효과

L1210 세포주와 S-180 세포주에 미치는 SWT의 세포독성 효과를 알아보기 위하여 SWT를 각각 1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 100㎍/㎖를 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 1).

SWT를 투여하지 않은 Control group의 L1210 세포주 증식율을 100.00±2.26(%)라 하였을 때, SWT 1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 100㎍/㎖을 투여하였을 때는 각각 85.20±1.16(%), 80.52±1.26(%), 78.97±2.97(%)로 Control group보다 유의성($P<0.001$)있게 감소되었다.

SWT를 투여하지 않은 Control group의 S-180 세포주 증식율을 100.00±1.23(%)라 하였을 때, SWT 1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 100㎍/㎖을 투여하였을 때는 각각 82.32±2.91(%), 82.03±1.64(%), 78.96±1.38(%)로 Control group보다 유의성($P<0.001$)있게 감소되었다.

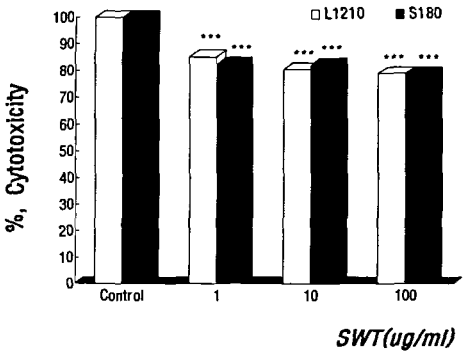

Fig. 1. Cytotoxicity of SWT on the L1210 cell lines and S-180 cell lines.
L1210 ; lymphocytic leukemia cell lines, **S-180** ; sarcoma cell lines, SWT ; Shinsuwuisaeng-Tang extract, **Control** ; SWT non-treated group, **1** ; SWT 1.0㎍/㎖ treated group, **10** ; SWT 10.0㎍/㎖ treated group, **100** ; SWT 100.0㎍/㎖ treated group.
* : P-value vs Control group(*** : P<0.001).

2. SWT와 항암제 병용투여시 암세포주 증식억제에 미치는 효과

암세포 증식율에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 SWT 1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 100㎍/㎖와 항암제 vincristine의 IC_{50}인 5×10^{-6}g/㎖를 병용 투여하였을 때 암세포의 증식억제 효과는 다음과 같았다 (Fig. 2).

SWT와 항암제를 투여하지 않은 Normal group의 L1210 세포주 증식율을 100.00±1.80(%)라 하였을 때, 항암제만을 투여한 Control group은 48.43±0.65(%)이었고, SWT 1㎍/㎖와 항암제를 병용투여하였을 때는 44.90±0.31(%)로 Control group에 비해 유의성(P<0.001)있게, SWT 10㎍/㎖와 항암제를 병용투여하였을 때는 46.80±0.35(%)로 Control group에 비해 유의성(P<0.05)있게 감소되었으나 SWT 100㎍/㎖와 항암제를 병용투여하였을 때는 52.50±0.74(%)로 Control group에 비해 유의성(P<0.01)있게 증가되었다.

SWT와 항암제를 투여하지 않은 Normal group의 S-180 세포주 증식율을 100.00±2.24(%)라 하였을 때, 항암제만을 투여한 Control group은 85.96±0.51(%)이었고, SWT 1㎍/㎖, 10㎍/㎖, 100㎍/㎖와 항암제를 병용투여하였을 때는 각각 79.45±1.56(%), 82.96±0.89(%), 82.04±1.27(%)로 Control group에 비해 유의성(P<0.05)있는 감소되었다.

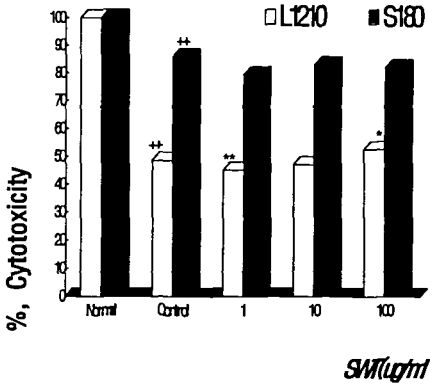

Fig. 2. The combined effects of SWT and vincristine on the cytotoxicity of L1210 cell lines and S-180 cell lines.
SWT ; Shinsuwuisaeng-Tang extract, **Normal** ; SWT and vincristine non-treated group, **Control** ; vincristine 5×10^{-6}g/㎖ treated group, **1** ; SWT 1㎍/㎖ and vincristine 5×10^{-6}g/㎖ treated group, **10** ; SWT 10㎍/㎖ and vincristine 5×10^{-6}g/㎖ treated group, **100** ; SWT 100㎍/㎖ and vincristine 5×10^{-6}g/㎖ treated group.
\+ : P-value vs Normal group(+++ : P<0.001).
* : P-value vs Control group(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001).

3. SWT가 암세포주 이식 마우스의 암세포 증식억제에 미치는 효과

암세포(L1210 세포주)가 이식된 마우스의 복강 암세포 증식율에 미치는 SWT의 효과를 알아보기 위하여 SWT 500㎎/㎏, 700㎎/㎏을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 3).

Control group의 암세포 증식율을 100.00±2.25(%)라 하였을 때, Sample A group의 증식율은 88.50±1.71(%)로 Control group에 비하여 유의성($P<0.01$)있게 감소되었고, Sample B group의 증식율도 48.97±1.12(%)로 Control group에 비하여 유의성($P<0.001$)있게 감소되었다.

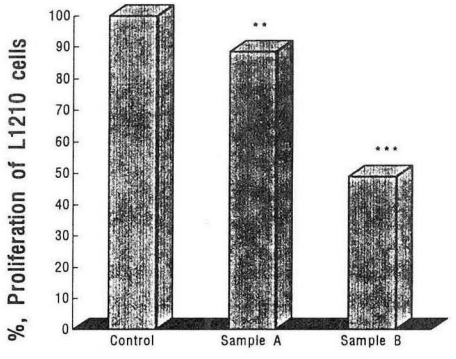

Fig. 3. Effects of SWT on the proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.
L1210 cells(2×10^6cells/mouse) transplanted to mice of all experimental group.
SWT ; Shinsuwuisaeng-Tang extract, **Control** ; DDW 0.2㎖ administered group for 7 days to mice, **Sample A** ; SWT 500㎎/㎏ 0.2㎖ administered group for 7 days to mice, **Sample B** ; SWT 700㎎/㎏ 0.2㎖ administered group for 7 days to mice.
* : P-value vs Control group(** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$).

4. SWT가 암세포주 이식 마우스의 체중 및 고형암에 미치는 효과

암세포(S-180 세포주)가 이식된 마우스의 체중 및 고형암에 미치는 SWT의 효과를 관찰하기 위하여 SWT 500㎎/㎏, 700㎎/㎏을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 4).

Control group의 체중 43.57±2.01(g)을 100.00±4.61(%)로 하였을 때, Sample A group의 체중은 109.81±3.56(%)로 증가되었고, Sample B group의 체중도 116.32±3.41(%)로 Control group보다 유의성($P<0.05$)있게 증가되었다.

Control group의 고형암 무게 1.40±0.33(g)을 100.00±23.2(%)로 하였을 때, Sample A group의 고형암 무게는 61.61±10.01(%)로 억제되었고, Sample B group의 고형암 무게도 54.46±6.60(%)로 Control group보다 유의성($P<0.05$)있게 억제되었다.

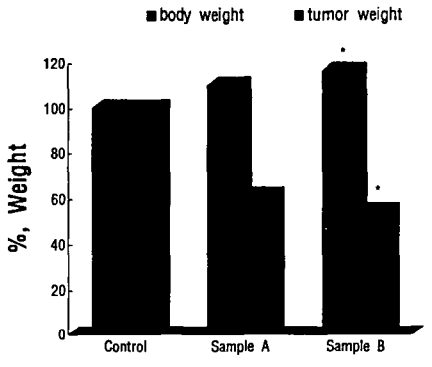

Fig. 4. Effects of SWT on the body weight and tumor weight in S-180 cells transplanted mice.
S-180 cells(2×10^6cells/mouse) transplanted to mice of all experimental group.
SWT ; Shinsuwuisaeng-Tang extract, **Control** ; DDW 0.2mℓ administered group for 15 days 1time/2days to mice, **Sample A** ; SWT 500mg/kg 0.2mℓ administered group for 15 days 1time/2days to mice, **Sample B** ; SWT 700mg/kg 0.2mℓ administered group for 15 days 1time/2days to mice.
* : P-value vs Control group(* : $P<0.05$).

5. SWT가 암세포주 이식 마우스의 생존율 연장에 미치는 효과

암세포(S-180 세포주)가 유발된 마우스의 생존율에 미치는 SWT의 효과를 알아보기 위하여 SWT 500mg/kg, 700mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 5).

사망한 Control group의 숫자는 복강암 이식 후 16일째에 1마리, 17일째에 3마리, 18일째에 3마리, 19일째에 1마리가 사망하여 평균생존율이 17.50±0.33(day)인데 반하여 Sample A group는 16일째에 2마리, 17일째에 2마리, 18일째에 1마리, 20일째에 1마리, 25일째에 1마리, 28일째에 1마리가 사망하여 평균생존율이 19.63±1.59(day)로 연장되었다. Sample B group는 16, 18, 19, 21, 24, 27, 28, 30일째에 각각 1마리씩 사망하여 평균생존율이 22.88±1.82(day)로 Control group에 비하여 유의성($P<0.05$)있게 연장되었다.

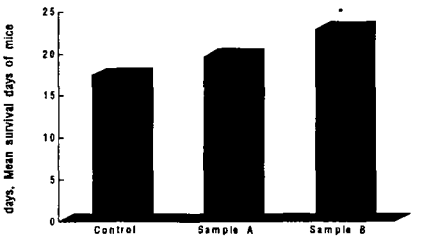

Fig. 5. Effects of SWT on the mean survival days of mice in S-180 cells transplanted mice.
Control ; DDW 0.2mℓ administered group to mice, **Sample A** ; SWT 500 mg/kg 0.2mℓ administered group to mice, **Sample B** ; SWT 700mg/kg 0.2mℓ administered group to mice.
Other legends are the same as Fig. 4.
* : P-value vs control group(* : $P<0.05$).

6. SWT가 암세포주 이식 마우스의 복강 macrophages에서 생성되는 NO의 양에 미치는 효과

SWT가 L1210 세포주가 이식된 마우스의 복강 macrophages에서 생성되는 NO의 양에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 SWT 500mg/kg, 700mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 6).

Normal group의 NO양은 2.95±0.12(μM)이었고, Control group의 NO양은 4.06±0.14(μM)이었다. 그러나 Sample A group의 NO양은 7.19±0.18(μM), Sample B group의 NO양은 6.14±0.15(μM)로 Control group보다 유의성($P<0.001$)있게 증가되었다.

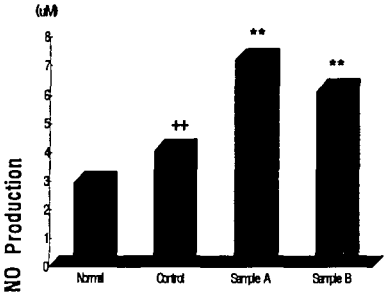

Fig. 6. Effects of SWT on the NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Normal ; DDW 0.2mℓ administered group for 7 days to normal mice.

Other legends are the same as Fig. 3.

+ : P-value vs Normal group(+++ : P<0.001).

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

Ⅳ. 考 察

癰疽란 人體 각 部位에 發熱·發赤·堅硬·腫痛·患部의 陷沒·突起 및 化膿 등의 樣相을 나타내는 症狀이다. 그 原因에 대해 『黃帝內經』[3]에서는 '膏粱厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通等' 에 의해, 劉[4]는 '火熱·風濕之所乘'에 의해, 李[5]는 '濕熱'에 의해, 朱[6]는 '六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯'에 의해 發生된다고 하였고 宋代以後 病理的인 측면에서 癰疽를 炎症性 疾患이나 腫瘍性 腫塊, 즉 癌과 유관하다고 認識하였다[6-8].

癰疽의 治法은 初期에는 祛邪爲主의 內消法으로 淸熱解毒·和營行瘀·行氣·解表·溫通·通裏·利濕 등의 治法을 使用하고, 中期에는 扶正祛邪의 內托法으로 補益氣血·排膿托毒의 治法을 使用하며, 後期에는 扶正爲主의 生肌·補氣養血 등의 治法을 사용한다[8,31].

神授衛生湯은 一切瘡症이 已成潰한 以後에 사용되는 方劑로, 羌活, 防風, 白芷, 穿山甲, 沈香, 紅花, 連翹, 石決明, 金銀花, 皂角刺, 歸尾, 甘草節, 天花粉, 乳香, 大黃으로 구성되어 있으며, 明代 陳[1]은 『外科正宗·癰疽門·腫瘍治法』에서 "治癰疽·發背·腦疽·對口·丹瘤·瘰癧·惡毒疔瘡·濕痰流注及外科一切瘡症, 但未成者卽消; 已成者卽潰. 能宣熱散風, 行瘀活血, 解毒消腫, 疏通臟腑. 且藥性平和, 功效甚速, 誠外科首用方也."라 하여 本方의 主治와 治療機轉에 대하여 자세하게 論하고 있다. 특히 陳은 本方이 祛邪하는 藥物을 爲主로 구성되어 있으나 藥性이 緩和하여 癰疽나 腫瘍의 初·中期에 사용할 수 있다고 하였다.

神授衛生湯에 사용된 藥物들의 효능을 살펴보면 大黃은 攻積導滯, 行瘀通經 등의 效能이 있고, 羌活은 發散風寒, 祛風濕止痛의 效能이 있다. 防風은 祛風解表, 濕勝解痙, 止瀉止血의 效能이 있고, 白芷는 祛風除濕, 消腫排膿, 通竅止痛의 效能이 있다. 穿山甲은 活血通經, 消腫排膿 등의 效能이 있고, 沈香은 降氣調中, 溫腎助陽 등의 效能이 있다. 紅花는 活血通經, 祛瘀止痛의 效能이 있고, 連翹는 淸熱解毒, 消腫散結 등의 效能이 있다. 石決明은 淸熱明目, 平肝潛陽의 效能이 있고, 乳香은 活血止痛, 消腫, 生肌의 效能이 있다. 金銀花는 淸熱解毒, 散風熱 등의 效能이 있고, 皂角刺는 消腫排膿, 托毒 등의 效能이 있다. 當歸는 補血活血, 調經止痛의 效能이 있고, 甘草는 淸熱解毒, 調和諸藥 등의 效能이 있으며 天花粉은 降火潤燥, 排膿消腫 效能이 있다[33].

최근 한약재를 이용한 항암연구들을 살펴보면 魯 등[17]은 消積保中丸이 종양세포의 성장, 발생율, 종양 크기의 억제 및 생명연장효과 그리고 NK세포의 활성도 증가 등에 유효함을, 鄭[18]은 內托羌活湯이 MCA와 3LL세포 및 S-180세포로 유도된 피하암종 세포에 대해 특이적 세포독성 및 면역조절 작용이 있음을, 趙 등[21]은 桃紅四物湯이 L1210세

포의 증식억제효과와 NO의 양을 증가시켰음을, 高[34]는 膽癌 동물의 생명기간 연장, T cell과 B cell의 증식, 혈청항체가(응집소가, 용혈소가), NK cell의 활성도를 관찰한 결과 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯이 항암효과가 있을 것으로 추정하는 동시에 그 중에서도 活血化瘀之劑와 補氣之劑를 합방하면 더욱 더 효과가 있음을, 金 등[35]은 자초 hexane층, 단삼 ethyl ether층, 아위 ethyl ether층이 모두 B16-Fo와 A549癌細胞에 대한 항전이 효과를 나타내었고, 그 중에서도 아위의 ethyl ether층이 가장 유효한 효과를 나타났음을, 柳[20]는 사물탕이 미친 마우스의 항암작용은 T_H세포를 증식시켰기 때문임을, 金 등[36]은 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 항종양효과와 cyclophosphamide에 의한 부작용에 미치는 영향을, 朴 등[37]은 葦莖湯과 加味葦莖湯이 A549에 대한 세포독성 및 S-180에 대한 항암효과에서 葦莖湯, 葦莖湯加魚腥草, 葦莖湯加白花蛇舌草가 항종양효과가 있음은 물론 魚腥草나 白花蛇舌草를 가미하였을 때 보다 더 효과적이었음을 보고하였다.

그러나 저자는 癰疽가 癌과 관련되어 있고, 神授衛生湯이 癰疽를 치료하는 方劑임도 불구하고 아직까지 抗癌作用에 미치는 神授衛生湯의 硏究를 접할 수 없어 本方이 癌腫의 治療效果를 실험적으로 구명하고자 암세포주에 대한 細胞毒性, 抗癌劑와의 併用投與時 암세포주에 미치는 細胞毒性을 *in vitro*상에서 관찰하고, 암세포를 마우스에 이식한 후 本方이 미치는 抗癌效果를 살펴보는 동시에 그에 대한 作用機轉을 알아보고자 하였다.

그 결과 L1210 세포주와 S-180 세포주에 항암제 vincristine(IC_{50} = 5×10^{-6}g/㎖)과 함께 SWT를 병용 투여하였을 때 항암제만을 투여한 Control group에 비해 세포독성을 나타내었지만 SWT 단독으로 투여하였을 때는 투여농도에 의존해 유의성($P<0.001$)있는 세포독성을 나타내었다. 이는 SWT가 항암작용이 있음을 간접적으로 보여주는 결과라 생각된다.

L1210 세포주를 이식한 마우스에 미치는 항암효과를 관찰한 결과에서도 SWT는 500㎎/㎏을 투여하였을 때 Control group에 비해 유의성($P<0.01$)있는 항암효과를 나타내었고, 700㎎/㎏을 투여하였을 때도 50%이상의 유의성($P<0.001$)있는 증식율 억제효과를 나타내었다. 또한 S-180 세포주가 이식된 마우스의 체중, 고형암의 무게 및 평균생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과 체중과 생존연장율은 투여농도에 의존해 증가되었고, 고형암의 무게는 투여농도에 의존해 감소되었다. 특히 고농도를 투여한 Sample group은 체중, 고형암의 무게 및 평균생존율 모두에서 유의성($P<0.05$)을 보였다. 이는 SWT가 세포독성 뿐만아니라 생체내에서 항암작용이 있음을 보여주는 결과로 임상에서도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

NO는 L-arginine에 NO-synthase(NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 NOS는 constitutive NOS (*c*NOS)와 inducible NOS(*i*NOS)가 있으며 *c*NOS는 혈관내피세포 및 뇌에서, *i*NOS는 활성화된 macrophages 및 여러 세포에서 발견된다[38]. 이 중 *i*NOS는 macrophages 및 호중구 등과 같이 탐식작용 등에 관여하는 신체의 여러 종류의 세포에서 분비되고, 그 중 macrophages가 생산하는 NO는 interlukin 1β · IFN-ϒ · tumor necrosis factor(TNF)-α 등과 같은 cytokine 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 유도되어 형성된다[39]. 복강 macrophages에 의해 생산되는 NO가 항암작용이 있다고 최초로 보고[40]된 이래 많은 연구자들[41-42]은 활성화된 macrophages가 정상세포보다는 암세포를 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophages-mediated tumor cytotoxicity로 중요한 의미가 있다고 하였다.

그리하여 SWT가 미친 항암작용이 NOS의 생성에 의한 기전인지를 확인하고자 L1210 세포주를 이식한 마우스에서 복강 macrophages를 분리한

후 NO의 생성능을 살펴보았다.

그 결과 Control group의 NO 양은 Normal group의 NO 양보다 유의성(P<0.001)있게 감소된 반면 SWT를 투여한 모든 Sample group에서는 Control group보다 유의성(P<0.001)있게 NO의 양이 증가되어 SWT로 나타난 항암작용은 SWT가 NO의 생성을 촉진시킴으로써 나타난 결과라 생각된다.

이상의 결과들을 볼 때 神授衛生湯은 細胞毒性 및 生體內 抗癌效果가 있고, 특히 투여량에 비례하여 좋은 효과를 나타내었기에 임상에서도 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 神授衛生湯의 生體內 作用機轉이나 다른 癌과 관련된 병태모델에는 神授衛生湯을 투여하지 않았기 때문에 이에 대한 연구는 더욱 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

이상과 같이 神授衛生湯의 항암 효과를 실험적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 神授衛生湯은 암세포에 투여농도에 의존해 유의성있는 세포독성을 나타내었다.

2. 神授衛生湯은 L1210 세포주를 이식한 마우스의 L1210 세포주 증식율을 유의성있게 감소시켰다.

3. 神授衛生湯은 S-180 세포주를 이식한 마우스의 체중을 유의성있게 증가시켰다.

4. 神授衛生湯은 S-180 세포주를 이식한 마우스의 평균생존율을 유의성있게 증가시켰다.

5. 神授衛生湯은 S-180 세포주를 이식한 마우스의 고형암의 무게를 유의성있게 감소시켰다.

6. 神授衛生湯은 L1210 세포주를 이식한 마우스의 복강 macrophages에서 생성되는 NO 양을 유의성있게 증가시켰다.

參考文獻

1. 陳實功 : 外科正宗, 北京, 人民衛生出版社, p. 28, 1964.

2. 宋孝元 : 還魂散이 實驗的으로 誘發한 腫瘍 및 免疫學的 反應에 미치는 影響, 益山, 圓光大學校 大學院(博士), 1996.

3. 楊維傑 : 黃帝內經素問靈樞譯解, 서울, 成輔社, (素問) pp. 235, 266, 455, (靈樞) p. 262, 1980.

4. 李聰甫外 1人 : 金元四大醫家 學術思想硏究, 서울, 成輔社, pp. 36~37, 1985.

5. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大成文化社, pp. 532~533, 1994.

6. 方 廣 : 丹溪心法附與, 臺灣, 五州出版社, (卷十六) p. 10, (卷十八) p. 1, 1963.

7. 陳無擇 : 三因論, 서울, 翰成社, pp. 525~526, 1977.

8. 楊醫竝 : 中醫學問答(下), 北京, 人民衛生出版社, pp. 356~357, 369~370, 1985.

9. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp. 1~10, 1983.

10.서울대학교의과대학 편 : 종양학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 1~3, 1992.

11. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp. 1~10, 1983.

12. 李 岩 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp. 11~26, 1983.

13. 張代釗 : 中西醫結合治療癌證, 山西, 山西人

民出版社, pp. 11～19, 1984.

14. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 1～10, 1980.

15. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, pp. 37～42, 1995.

16. 이창혜외 3인 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성細胞의 염색체 분포특성, 연세의대 논문집, 16 : 180, 1983.

17. 魯勳政외 3인 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 硏究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1) : 43～56, 1996.

18. 鄭鉉雨 : 內托羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 實驗的 硏究, 圓光大學校 大學院(博士), 1996.

19. 梁起鎬 : 托裏消毒飮의 抗腫瘍 效果 및 免疫調節反應에 관한 硏究, 圓光大學校 大學院(碩士), 1997.

20. 柳東和 : 四物湯이 L1210세포 및 항암제를 투여한 마우스의 면역세포에 미치는 영향, 우석대학교 대학원(碩士), 1998.

21. 趙鈴林외 1인 : 桃紅四物湯이 L1210세포가 이식된 마우스의 면역계에 미치는 효과, 東醫病理學會誌, 13(1) : 132～140, 1999.

22. 崔雄외 1인 : 托裏消毒散이 抗腫瘍 및 免疫作用에 미치는 效果, 大韓外官科學會誌, 12(1) : 79～98, 1999.

23. 金弘振외 1인 ; 抗癌 및 免疫에 대한 托裏消毒散의 效果, 大韓外官科學會誌, 13(1) : 100～115, 2000.

24. 崔政和 ; 神功內托散이 免疫細胞 및 腫瘍에 미치는 實驗的 效果, 大韓外官科學會誌, 13(1) : 129～140, 2000.

25. 梁起豪외 2인 : 內托千金散 및 그 加味方이 마우스의 免疫細胞 및 癌細胞에 미치는 效果, 大韓外官科學會誌, 13(1) : 44～59, 2000.

26. 朴秀燕외 1인 : 內消散의 抗癌效果에 관한 實驗的 硏究, 大韓外官科學會誌, 14(1) : 154～166, 2001

27. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 65(1-2) : 55～63, 1983.

28. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods, 129(1) : 23～30, 1990.

29. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. : Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immun., 59(9) : 3280～3283, 1991.

30. Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdinald, M.M., Schumacher, A.M. and Abbott, B.J. : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against Animal Tumors and ather Biological system(Third Edition), Cancer chemotherapy Reports, 48 : 59, 1972.

31. 王肯堂 : 六科證治準繩, 서울, 大星文化社, pp. 23～24, 65～66, 1992.

32. 金完熙·崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp. 140～142, 168～170, 281～284, 1985.

33. 辛民敎 : 臨床本草學, 서울, 南山堂, pp. 277～279, 283～284, 321, 336～338, 432～433, 453～455, 472～474, 556～558, 1986.

34. 高光錫 : 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 實驗的 硏究, 東醫病理學會誌, 9(1) : 21～45, 1994

35. 金聖勳외 1인 : 抗癌活性 數種生藥의 B16-Fo와 A549癌細胞에 대한 抗轉移 效果(II), 大韓韓醫學會誌, 17(1) : 132～145, 1996.

36. 金秀鎭외 2인 : 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響,

東醫病理學會誌, 8(1) : 119~136, 1993.

37. 박경식외 3인 : 葦莖湯, 加味葦莖湯의 A549에대한 細胞毒性 S-180에 대한 抗癌效果, 東醫病理學會誌, 9(2) : 217~246, 1995.

38. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J., 6(12) : 3051~3064, 1992.

39. Higuchi, M.M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. : Cytolytic mechanisms of activated macrophages ; Tumor necrosis factor and L-arginine-depenent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, J. Immunol. Methods, 144(4) : 1425~1431, 1990.

40. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235 : 473, 1987.

41. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uni, K. and Sasada, M. : Mechanism of leukemic cell lysis by activated human macrophages ; leukemic cells can be lysed without direct contact. Int. J. Hematol, 60(1) :51~57, 1994.

42. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleand, H.E.Jr., Gilleland, L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. : Neutrophil-mediated nitrosamine formation ; role of nitric oxide in rats. Gastroenterology, 103(4) : 1260~1266, 1992.