

桑紅白朮散이 생쥐 대장암세포의 간전이억제와 면역활성화에 미치는 효과

오세순 · 강 희¹ · 심범상 · 김성훈² · 최승훈 · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학교실 · 경희대학교 한의학연구소, 1: BK21 경희대학교 한의과학사업단, 2: 암예방소재개발연구센터

Effect of Sanghongbaekchul-san on Anti-metastatic and Immunopotentiating Activities

Se Soon Oh, Hee Kang¹, Bum Sang Shim, Sung Hoon Kim², Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University · Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center, 2: Cancer Preventive Material Development Research Center

We evaluated the effect of SHBCS on adhesion and invasion of colon L5-26 adenocarcinoma cell line in vitro in vitro and experimental liver metastasis in vivo. SHBCS showed little inhibitory effect on colon 26-L5 cell proliferation. At the concentration of up to 500 mg/ml of SHBCS 80% of cells were viable. SHBCS showed no inhibitory effect on adhesion and invasion of colon 26-L5 cells, which were placed on matrigel. In a dose dependent manner, oral administration of SHBCS showed a significantly inhibitory effect on liver metastasis from colon 26-L5 injected mice. When mice were depleted of NK cells or macrophages before tumor inoculation, SHBCS significantly decreased liver metastasis from the tumor injected mice. Compared with the control mice, SHBCS increased the populations of macrophages and NK cells by 30%, 18% (10 mg/mouse, 50 mg/mouse) and 5%, 1% (10 mg/mouse, 50 mg/mouse) respectively. Compared with the control mice, SHBCS increased the populations of CD4 cells by 5%, 18% (10 mg/mouse, 50 mg/mouse) respectively. Splenocytes from mice administered with SHBCS were stimulated with LPS plus ConA, proliferation of splenocytes from mice administered with SHBCS was 140%, 146% (10 mg/mouse, 50 mg/mouse) compared with the control mice. In conclusion, the present study suggests that SHBCS may have an inhibitory effect on liver metastasis through immunopotentiating activity which is associated with macrophages and NK cells.



Key words : Sanghongbaekchul-san, Anti-metastatic, Immunopotentiating activity

서 론

대장암은 2003년 통계청 자료에 의하면 암 사망률의 4위로 인구 10만명당 11.4명이 대장암으로 사망하며, 최근 식생활 및 생활습관의 변화로 그 발생 빈도가 점차 증가하는 추세이다. 대장암의 자연생존기는 10~20개월 정도이며 길면 3년 이상 생존한다. 약 50%의 환자가 치료 후 5년 이내에 다시 재발하거나 전이된다. 전이는 대장암의 경우 주로 간으로 혈행성 전이하며, 직장암의 경우 간이나 폐로 전이된다¹⁾.

전이암의 치료는 원발암의 세포조직학적 특성을 고려한 것

* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2008/03/08 · 채택 : 2008/04/02

과 전이병소의 특이적 상황을 동시에 고려해야 하는 어려움이 따른다. 간의 전이성 대장암의 경우 원발암인 대장암이 본이고 간의 병소가 標에 해당한다 할 수 있으므로 標本同治가 필요한 실정인데, 특히 전이억제 혹은 전이의 예방을 목적으로 하는 경우 標本同治하되 本治에 좀 더 중점을 두고 특별히 전이억제를 위한 약물의 가감이 필요할 것으로 생각된다.

蔘苓白朮散은 《太平惠民和劑局方》에 수재된 처방으로脾胃의 기가 허하고 濕을 수반하여 음식을 소화하지 못하고 구토하고 설사하며, 형체가 허약하고, 사지에 힘이 없으며, 가슴과 배가 갑갑하고 맥상이 緩弱한 증상을 치료한다. 大腸의 병은 通下, 升提, 治濕의 3법을 적용하는데 升提나 治濕은 健脾益氣가 기본적인 방법이 되므로 補氣健脾. 滲濕和胃의 효능을 가진 蔘苓白朮散을 응용할 수 있으며, 실험적으로도 면역조절효과와 항암효과

가 보고된 바^{2,3)} 있으므로 대장암의 간전이 억제 목적으로 적용할 수 있는 처방 중의 하나로 생각된다.

본 연구자는 기존의 參耆白朮散을 구성하는 일부 약물에 최근 면역활성이 있다고 밝혀진 상황버섯⁴⁾과, 면역활성 및 항암효과가 있다고 밝혀진 紅參⁵⁾, 冬蟲夏草⁶⁾ 등을 가미하여 桑紅白朮散이라 명명하였다. 구성약재의 주된 효능을 살펴보면 대체로 면역활성을 통해 간의 전이성 대장암에 대한 항암효과를 나타낼 것으로 기대되므로 본 연구자는 桑紅白朮散의 면역활성 및 암세포의 전이억제 효과를 평가하게 되었다. 먼저 MTT법을 이용하여 桑紅白朮散의 대장암세포에 대한 세포독성을 측정하였고, 이 암세포에 대한 세포부착저지 측정과 침윤억제 측정을 시행하였다. 또한 대장암세포에 의한 간전이 억제를 알아보기 위해, 桑紅白朮散을 마우스에 경구투여하고 대장암세포를 이식한 후에 전이암의 무게를 비교하였으며, 아울러 면역세포의 증가를 확인하였는바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

桑紅白朮散의 구성성분은 Table 1과 같으며 이들 구성약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. Composition of Sanghongbaekchul-san(SHBCS)

Chinese name	Latin name	Amount (g)
冬蟲夏草	<i>Cordyceps Militaris</i>	10
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	6
陳皮	<i>Citrus Pericarpium</i>	5
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	6
當歸	<i>Angelicae Radix</i>	6
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	5
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	6
益智仁	<i>Alpiniae Oxyphyllae Fructus</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	10
白茯苓	<i>Poria</i>	6
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	6
桑黃	<i>Phellinus Linteus</i>	23.7*
紅參	<i>Ginseng Radix</i>	0.3**
Total		100

* 23.7 g에 대한 EtOH층 0.14 g을 가함. ** 홍삼사포닌 160 mg/g (0.13 g)을 가함.

2) 동물

실험동물로는 4-6주령의 female BALB/c mice(ORIENT)를 사용하였으며, 사료와 음료수는 무제한으로 제공하여 사육하였다.

2. 방법

1) 桑紅白朮散의 추출

桑紅白朮散의 구성약물 g을 추출 용기에 넣고 (알콜 or 물).....로 얻어지는 용액을 농축, 동결건조하여 g의 분말을 얻었다(in vitro 실험을 위해 DMSO에 녹여 사용했는지).

(1) 세포 배양

사용된 암세포는 murine colon 26-L5 adenocarcinoma이며

10% FBS가 첨가된 RPMI 1640과 MEM(? 사용된 배지가 RPMI 인지 아니면 MEM인지)으로 5% CO₂, 37°C의 조건에서 배양하며 사용하였다.

2) 세포독성 측정

Mosmann이 개발한 MTT법을 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 1×10⁴의 세포와 약제를 섞어 well당 100 μl씩 96-well culture plate에 분주하며 이를 24 시간 배양한 후 배양액을 모두 버리고 MTT (5 mg/ml) 10 μl씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 100 μl를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA reader 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Adhesion assay

0.1% gelatin을 96-well plate에 100 μl씩 분주하여 coating하고 이를 4 °C에서 12시간 이상 방치한 후 PBS로 3회 세척하여 사용하였다. BSA(10 mg/ml)를 100 μl씩 각 well에 분주하여 37°C 배양기에서 1시간 동안 blocking한 후 PBS로 3회 세척하였다. 桑紅白朮散 추출물과 colon26-L5 세포를 5×10⁴ cells/well로 섞어서 각 well에 분주한 후 37°C 배양기에서 1시간 반 동안 배양하였다. 배양 후 약제와 배지를 모두 제거하고 PBS로 세척한 후 serum free 배지를 100 μl씩 첨가한 후 MTT 방법으로 흡광도를 측정하였다.

4) Invasion assay

Cell invasion assay를 위해 Boyden chamber를 사용하였다. 위 chamber의 8 μm pore인 polycarbonate membrane을 50 μg의 matrigel로 24시간 동안 coating하였고 아래 chamber에는 0.1% BSA가 들어 있는 conditioned medium을 넣었다. 위 chamber에는 0.1%의 BSA와 桑紅白朮散 추출물을 첨가한 배지에 1×10⁶/ml 세포를 well마다 100 μl씩 가한 후 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 polycarbonate membrane을 H/E 염색한 뒤 현미경으로 invasion된 cell을 count하였다.

5) Colon26-L5 암주를 이용한 간전이

먼저 실험군은 한약을 1주일간 경구투여하고 control 군은 PBS를 투여하였다. 일주일 후 in vitro에서 배양한 colon 26-L5 세포를 5×10⁴cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들어 18~20 g인 BALB/c mice에 1×10⁴cells/0.2 ml씩 간문맥을 통해 주사하였다. 암세포 이식 18일 후에 cervical dislocation으로 치사한 다음 회복하여 간에 전이된 전이암을 측정하였다.

6) 마우스의 NK cell depletion과 macrophage depletion

Natural killer (NK) cell의 depletion을 위해서는 rabbit anti-asialo GM1 serum (200 μg/mouse; Wako pure chemicals co. Ltd. Japan)을 암세포 주사 1일 전에 복강투여하며, macrophage depletion을 위해서는 2-chloroadenosine (50 μg/mouse; Sigma, MO, USA)을 암세포 주사 1일 전에 정맥주사하였다.

7) 비장적출 및 비장부유세포의 준비

BALB/c mice에 실험군은 桑紅白朮散 추출물을 1주일간 경구투여하고 control 군은 PBS를 투여하였다. 일주일 후 mice를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하여 electronic chemical balance(MC1, sartorius)로 비장무게를 측정하였다. 적

출된 비장조직은 PBS로 세척한 후 RPMI 배지가 들어있는 Petri dish (35×100 mm)에서 작은 해부가위로 절단한 다음 cell strainer (40 μm, Becton Dickinson, USA)로 여과하여 조직편 및 분리되지 않은 세포덩어리를 제거한 후 800 rpm에서 3분간 3회 원심분리하여 세척하고 complete RPMI 배지에 부유시켰다.

8) 복강세포의 분리 및 Macrophage의 준비

BALB/c mice에 실험군은 桑紅白朮散 추출물을 1주일간 경구투여하고 control 군은 PBS를 투여하였다. 마지막 약물투여로부터 1일 후 2 ml의 3% thioglycolate broth를 복강투여하고 4일 후 복강세포를 peritoneal lavage를 통하여 회수하였다. Saiki 등⁷⁾의 방법에 의해 복강세포 중의 macrophage의 함량을 확인한 후 실험에 사용하였다.

9) 면역형광염색 (immunofluorescence staining)

비장세포 현탁액을 1×10⁶/ml 씩 counting 한 후 5 ml tube에 100 μl 씩 분주하였다. 이후 CD3, CD4, Mac-1 FITC-conjugated antibody를 50 μl 씩 가한 후 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 double staining으로 CD19, CD8, NK1.1 PE-conjugated antibody를 50 μl 씩 가한 후 실온에서 15분 반응시켰으며 이상의 면역형광염색 과정은 빙욕(ice bath) 상에서 시행하였다. 염색이 완료된 세포들을 0.5 ml의 완충액에 부유시켜 FACS vantage (Becton Dickinson Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며 Cell Quest 프로그램을 이용, 분석하였다. data의 분석은 forward scatter (FSC)와 side scatter (SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 B cell, Total T cell, CD4+ T cell, CD8+ T cell, Mac-1+ cell, NK1.1 cell의 비율을 산출하였다. 세포와 small lymphocyte의 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 B cell, T cell, CD4+, CD8+, Mac-1+, NK1.1 cell의 비율(gated %)을 산출하였다.

10) 비장세포의 proliferation assay

마우스로부터 분리한 비장세포를 2×10⁶/ml로 complete RPMI 배지에 부유시킨 후 100 μl 씩 96-well U-bottom culture plate에 가하고 1 μg/ml 의 Con A(concanavalin A, Sigma), LPS(lipopolysaccharide, Sigma)와 함께 72시간 배양한 후 XTT법에 의해 proliferation을 측정하였다. ELISA-reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 세포성장률을 %로 환산하였다.

성 적

1. Colon26-L5 암세포에 대한 세포독성

세포독성은 마우스 carcinoma 세포주인 colon26-L5를 이용하여 실시하였는데, 桑紅白朮散(SHBCS)의 최고농도인 500 μg/ml에서도 80% 이상의 생존율을 나타내어 세포독성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. Colon26-L5 암세포에 대한 세포부착저지 작용

桑紅白朮散(SHBCS)은 colon26-L5 세포의 0.1% gelatin에 대한 부착저지 실험에서 최고농도인 500 μg/ml까지 대조군에 비해 유의적인 효과를 나타내지 않아 in vitro 상에서 세포부착 저지 효과는 없는 것으로 나타났다(Fig. 2).

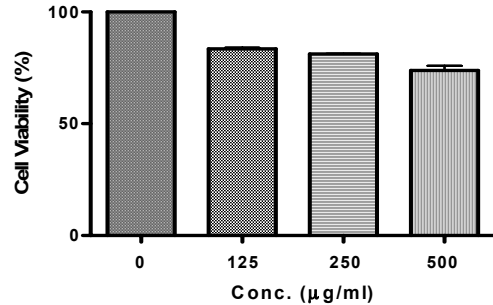


Fig. 1. Effect of SHBCS on colon 26-L5 cytotoxicity.

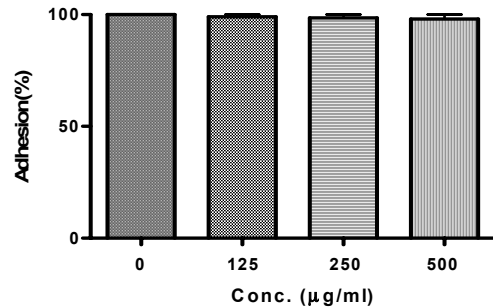


Fig. 2. Effect of SHBCS on colon 26-L5 cell adhesion in vitro. Colon 26-L5 cells were treated with SHBCS on the gelatin coated plate. Unbound cells were removed by aspiration and attached cells were measured using the MTT method.

3. Colon 26-L5 암세포에 대한 침윤억제 작용

桑紅白朮散(SHBCS)은 colon 26-L5 세포의 matrigel에 대한 침윤억제실험에서 최고농도인 500 μg/ml까지 대조군에 비해 유의적인 효과를 나타내지 않아 in vitro 상에서 침윤억제효과는 없는 것으로 나타났다(Fig. 3).

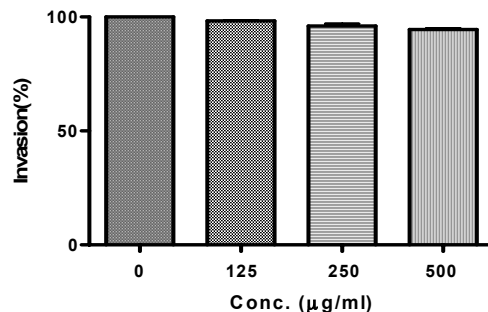


Fig. 3. Effect of SHBCS on colon 26-L5 cell invasion in vitro. Colon 26-L5 cells were treated with SHBCS on the matrigel coated plate.

4. Colon26-L5 암주에 의한 간전이 억제 작용

桑紅白朮散(SHBCS)은 colon26-L5 암세포를 사용한 실험적 간전이 모델에서 농도의존적으로 간전이 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4). 또한, 실험기간 중 생쥐의 체중의 변화를 관찰한 결과, colon26-L5 암세포를 이식하지 않은 정상군에서는 꾸준히 체중 증가를 나타내는 반면에 대조군과 실험군에서는 체중이 증가하다가 colon26-L5 암세포를 이식한 이후에는 체중이 감소되었다가 시일이 지남에 따라 체중이 다시 회복함을 보였다(Fig. 5).

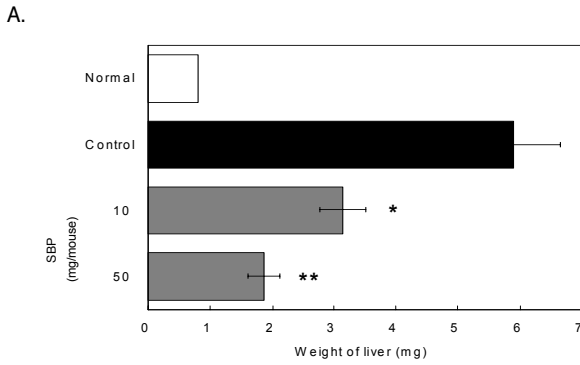


Fig. 4. Effect of oral administration of SHBCS on experimental liver metastasis produced by intraportal injection of colon 26-L5 carcinoma cells. A: Balb/c mice were inoculated intraportally with colon 26-L5 cells. SPB at the indicated doses was administered orally for 7 consecutive days before tumor inoculation. 18 days after tumor inoculation, mice were sacrificed and the liver weight was measured. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$ as compared to untreated control by Student's two-tailed t-test. B: Macroscopic observation of liver metastasis in mice.

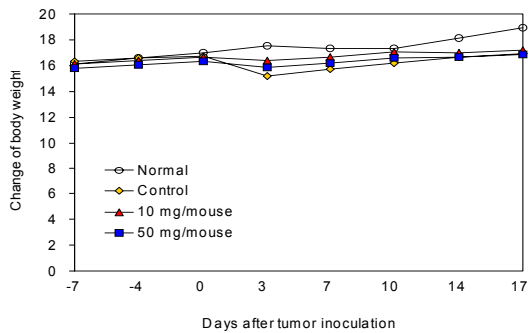


Fig. 5. Effect of SHBCS on body weight of mice injected with colon 26-L5 cells.

5. Natural killer cell이 선택적으로 제거된 생쥐에 대한 간전이 억제 효과

桑紅白朮散(SHBCS)은 NK cell이 없는 상황에서 간전이를 유의적으로 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 6).

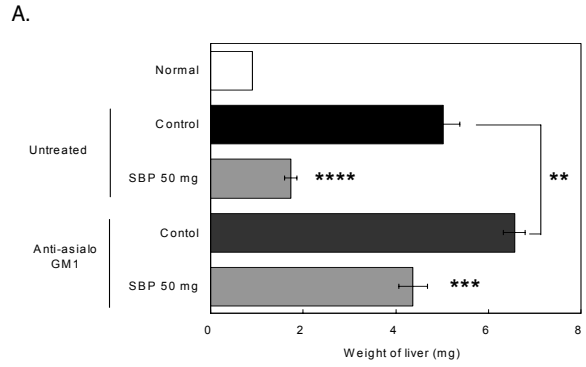


Fig. 6. A: Inhibitory effect of SHBCS on experimental liver metastasis in NK cell depleted mice. Mice were pretreated with anti-asialo GM1 serum 24 h before tumor inoculation. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ as compared to untreated control by Student's two-tailed t-test. B: Macroscopic Observation of livers of NK cell depleted-mice injected with colon 26-L5 cells.

6. Macrophage가 선택적으로 제거된 생쥐에 대한 간전이 억제 효과

桑紅白朮散(SHBCS)은 macrophage가 없는 상황에서 간전이를 유의성 있게 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 7).

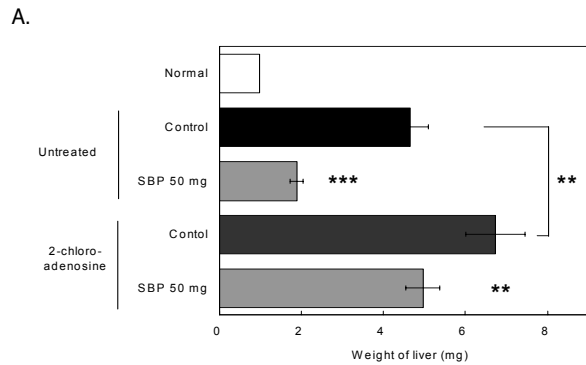


Fig. 7. A: Inhibitory effect of SHBCS on experimental liver metastasis in macrophage depleted mice. Mice were pretreated with 2-chloro-adenosine 24 h before tumor inoculation. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ as compared to untreated control by Student's two-tailed t-test. B: Macroscopic observation of livers of macrophage depleted-mice injected with colon26-L5 cells.

7. 桑紅白朮散 경구투여가 마우스의 NK cell 및 macrophage에

미치는 영향

桑紅白朮散(SHBCS)을 투여한 군은 대조군과 비교하여 macrophage는 10 mg, 50 mg에서 각각 30%, 18%의 높은 증가율을 보이며, NK cell은 같은 농도에서 5%, 1%의 증가율을 나타내었다(Fig. 8).

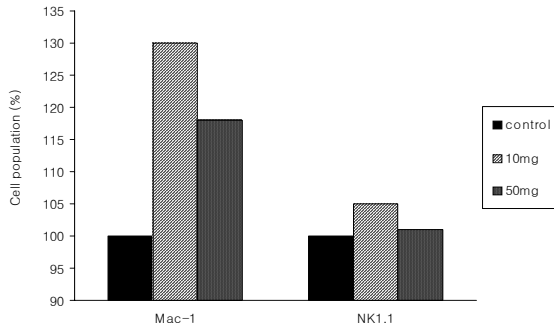


Fig. 8. Effect of oral administration of SHBCS on macrophage and NK cell population in Balb/c mice.

8. 桑紅白朮散 경구투여가 마우스의 T cell 및 B cell에 미치는 영향
대조군과 비교하여 桑紅白朮散(SHBCS)를 투여한 군에서는 10 mg, 50 mg에서 total T cell이 14% 정도 증가하였으며 total B cell이 15%, 18% 정도 증가하였다(Fig. 9).

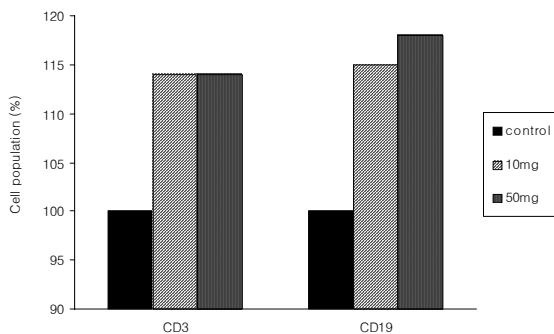


Fig. 9. Effect of oral administration of SHBCS on T cell and B cell population in Balb/c mice.

9. 桑紅白朮散 경구투여가 마우스의 CD4 T cell 및 CD8 T cell에 미치는 영향

대조군과 비교하여 桑紅白朮散(SHBCS)를 투여한 군에서는 10 mg, 50 mg에서 helper T cell이 5%, 18% 정도 증가하였으며 cytotoxic T cell이 15%, 18% 정도 증가하였다(Fig. 10).

10. 桑紅白朮散이 비장세포의 증식에 미치는 영향

桑紅白朮散(SHBCS)을 투여한 군에서 10mg, 50mg에서 각 20%를 36%, 44%로 증가시켜 농도가 증가함에 따라 유의적으로 면역세포의 증식이 증가하였으며 LPS와 Con A를 처리하였을 경우의 mitogenic response는 100%를 140%, 146%로 대조군과 실험군 간에 더욱 큰 차이를 보이며 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 11).

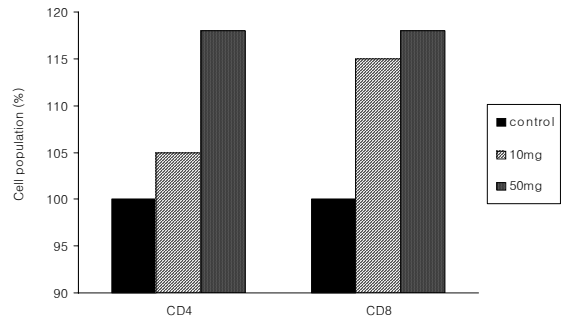


Fig. 10. Effect of oral administration of SHBCS on CD4 T cell and CD8 T cell population in Balb/c mice.

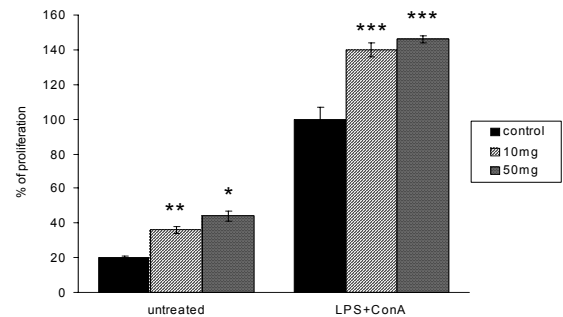


Fig. 11. Effect of oral administration of SHBCS on the proliferation of mouse splenocytes in response to mitogenic stimuli. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 as compared to control by Student's two-tailed t-test.

고찰

대장암은 일반적으로 '선진국형' 암으로 인식되어 왔으나 우리나라에서도 생활수준이 서구화되어 감에 따라 1980년대 이후 그 발병률이 꾸준히 증가하고 있으며 89년도 이후 지금까지 전체 암에서 차지하는 비율이 4위를 차지하고 있는 실정이다⁷⁾. 대장암의 발병은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용할 것으로 추측되고 있는데 식이 습관의 차이에 따라 발병률이 다르며 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는 보고도 있다^{8,9)}.

대장암의 간전이는 대부분 혈행성 경로를 통해서 이루어지는데 특히 간문맥을 통한 전이를 하게 된다. 대장암 수술 당시 15~20%의 환자에서 간전이가 발견되며 수술 당시 간전이가 없었던 환자의 29%에서 2년 이내에 간전이가 발생하여 간전이의 빈도는 50%에 달하는 것으로 알려져 있다. 또한 대장암 수술 후 사망하는 환자의 반 수 이상이 간전이에 의한 2차적 간 부전에 의한 것으로 보고되고 있어 수술 전후 간전이의 발견은 임상적으로 매우 중요한 사안이다¹⁰⁾.

간의 전이성 대장암 치법을 標本緩急의 원칙에 따라 살펴보면 원발암인 대장암이 本이 되고 전이암이 標가 되며 '急則治其標, 緩則治其本'이 되 中滿 등의 응급상황이 나타나지 않았다면 標本同治하여할 경우로 생각된다. 이 경우 本治의 대상은 세포생물학적으로 대장의 암조직이 되며 標治의 대상은 病位의으로 간에서의 암 증식이 될 것이다. 따라서 간의 전이성 대장암 치법은

대장암과 간암의 치법을 살펴서 준용할 필요가 있다.

대장암의 변증분류 및 치법으로는 濕熱蘊毒型, 脾虛濕滯型, 脾腎兩虛型, 寒濕凝滯型, 肝腎陰虛型, 氣血虛損型으로 나눌 수 있으며, 濕熱蘊毒型에는 清熱解毒, 祛濕攻積하고, 脾虛濕熱型에는 健脾化濕, 清熱解毒하며, 脾腎兩虛, 寒濕凝滯型에는 溫補脾腎, 祛濕化濁하고, 肝腎陰虛型에는 滋補肝腎, 養陰清熱하며, 氣血虛損型에는 補氣養血, 扶脾益腎하는 것으로 요약된다¹¹⁾. 즉 內因 및 外因의 작용으로 濕熱蘊毒되어 腫이 된 것이 대장암의 標이고, 脾腎虧虛로 正氣不足한 것이 대장암 원인의 根本으로 요약된다.

한편 간암 병인병기는 寒濕, 濕熱邪氣가 침범하고 飲食不節로 脾胃가 손상되어 발생하거나, 情志抑鬱로 肝氣가 鬱結되어 氣滯血瘀로 積을 이루거나, 脾陽濕困한데 濕이 鬱久化火하며 黃疸을 유발시킨다고 인식된다. 변증분형은 肝鬱脾虛, 氣滯血瘀, 熱毒蘊積, 肝膽濕熱, 肝腎陰虛, 氣陰兩虛 등으로 구분된다^{12,13)}.

參苓白朮散은 《太平惠民和劑局方》에서 “能補氣健脾. 滲濕和胃 治脾胃氣虛而挾濕之證 飲食不消 或 吐瀉 形體虛弱 四肢無力”으로 언급된 후 임상적으로는 脾虛로 運化가 장애되어 발생하는 증상에 활용되고 있으며, 실험적으로도 면역조절효과와 항암효과가¹⁴⁾ 보고된 처방이므로 간의 전이성 대장암에 標本同治의 목적으로 적용가능한 처방 중의 하나라고 할 수 있다.

이에 본 연구자는 기존의 參苓白朮散을 구성하는 일부 약물에 최근 면역활성이 있다고 밝혀진 상황버섯³⁾과, 면역활성 및 항암 효과가 있다고 밝혀진 紅參, 冬蟲夏草^{4,5)}등을 가미하여 桑紅白朮散이라 명명하고 간전이 억제와 면역조절효과를 평가하여 보았다.

桑紅白朮散의 구성약물 중 桔梗은 肝保護 효과가 있고¹⁴⁾, 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하며, 當歸는 간암에 효과가 있으며¹⁵⁾ 何首烏는 면역활성 효과가 있고¹⁶⁾, 山茱萸는 면역조절작용과¹⁷⁾ CCL4로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있고¹⁸⁾, 黃芪¹⁹⁻²¹⁾, 白朮²¹⁻²³⁾, 白茯苓²⁴⁾ 등의 健脾 혹은 益氣之劑는 면역활성을 통한 항암작용이 다수 보고되어 있다. 인삼을 대신하여 투여된 홍삼은 면역활성 및 항암효과가 있으며²⁵⁾ 특히 혈관신생 및 암세포의 전이 억제 활성이 있는 것으로 보고되어 있다^{26,27)}. 冬蟲夏草는 항암 및 면역조절작용이 있는 것으로 보고되어 있으며²⁸⁾, 상황버섯은 항암 및 항전이 효과, 면역조절효과가 다수 보고된 바 있다²⁹⁻³¹⁾.

이들 약재의 주된 효능을 살펴보면 桑紅白朮散이 대체로 면역활성을 통해 간의 전이성 대장암에 대한 항암효과를 나타낼 것으로 기대되며 이러한 효과가 어떠한 기전을 통해서 나타날 것인지를 분석하기 위하여 면역활성 및 암세포의 전이억제 효과를 평가하게 되었다.

먼저 桑紅白朮散 추출물이 murine colon 26-L5 adenocarcinoma에 대한 세포독성이 있는지 in vitro 생존률을 측정한 결과 추출물의 최고 농도인 500 µg/ml에 대해서도 약을 처리하지 않은 대조군에 비해 80% 이상의 생존률을 보여 줌으로써 별다른 독성을 갖지 않은 것으로 사료되었다.

암세포의 부착은 암세포의 이동과 혈관신생 및 전이에 매우 중요한 단계이다³²⁾. 桑紅白朮散 추출물이 gelatin에 대한 colon 26-L5 세포의 부착저지를 in vitro adhesion assay를 통해 측정한 결과 대조군에 비해 별다른 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한

Boyden chamber를 이용한 cell migration assay에서도 桑紅白朮散 추출물은 유의성 있는 차이를 나타내지 않아 전체적으로 in vitro test에서는 대장암세포의 전이억제능력이 발휘되지 않았다.

그러나 마우스에게 桑紅白朮散을 1주일간 경구투여한 후 colon 26-L5 세포를 간문맥을 통해 이식한 실험적 간전이 모델에서는 桑紅白朮散이 농도의존적으로 간적이 억제효과를 나타내었다. 마우스에게 암세포를 이식후 18일째 희생한 후 간의 무게를 측정할 결과 한약을 경구투여한 마우스의 간은 대조군에 비해 유의성 있게 줄어들었다. 또한 실험 기간 체중변화를 관찰한 결과 암세포 이식후 체중이 감소되다가 한약을 투여한 실험군의 마우스가 대조군에 비해 체중이 빨리 회복되어 이식으로 일어난 부작용을 최소화하였음을 알 수 있었다. 이 결과는 桑紅白朮散이 colon 26-L5 세포의 간전이 예방에 효과적임을 시사해 준다.

인체의 면역기능을 담당하는 T cell, B cell 및 NK cell, monocyte 등은 암세포를 파괴하여 암세포 전이를 억제하는데 중요한 역할을 한다^{33,34)}. 桑紅白朮散이 면역세포를 자극하여 간 전이를 억제하는지 알아보기 위해 암세포 이식전 GM1 serum이나 2-chloroadenosine을 처리하여 NK cell이나 대식세포를 선택적으로 제거한 후 처리하지 않은 마우스와 간의 무게를 비교하였다. NK cell이 제거된 마우스는 그렇지 않은 마우스보다 간의 무게가 증가하여 NK cell이 간전이에 억제에 매우 중요함을 알 수 있었다. 그러나 桑紅白朮散은 NK cell이 처리된 마우스끼리 비교했을 때 대조군에 비해 간의 크기를 매우 유의성있게 감소시켜서 macrophage에 의한 면역반응을 강화함을 간접적으로 알 수 있었다. 대식세포를 선택적으로 제거한 했을 때도 그렇지 않은 마우스보다 간의 크기가 컸기 때문에 대식세포도 간전이 억제에 매우 중요함을 알 수 있었는데 桑紅白朮散은 대식세포를 제거한 마우스끼리 비교했을 때도 간전이를 유의성있게 감소시켰다. 따라서 桑紅白朮散이 NK cell에 의한 암세포살해능력도 활성화함을 추측할 수 있었다.

桑紅白朮散이 면역계를 자극하여 암전이 억제를 유도함을 확인한다는 것은 대부분의 일반 항암제가 암세포뿐만 아니라 면역세포까지 저하시킴을 고려할 때 매우 중요한 차이점이 된다. 따라서 桑紅白朮散이 어떻게 면역기능을 조절하는지 알기 위해서 마우스에게 1주일간 경구투여한 후 비장세포를 분리하여 macrophage와 NK cell의 숫자에 미치는 영향을 분석하였다. Macrophage의 경우 대조군이 비해 桑紅白朮散이 10 mg, 50 mg에 대해 30%, 18%의 증가율을 보여 주었고 NK cell의 경우는 5%, 1%의 증가율을 보여주었다. 이로 보건대 桑紅白朮散이 특히 macrophage 의존적인 자연면역계를 강화하는데 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 자연면역 이외에 특이면역을 구성하는 T cell과 B cell의 비율에 어떠한 영향을 미치는지 측정한 결과 10 mg, 50 mg의 桑紅白朮散 투여에 대해 T cell은 모두 14%씩 증가하였고 B cell에 대해서는 15%, 18%씩 증가시켜 세포성 면역과 체액성 면역을 담당하는 특이면역계도 활성화함을 알 수 있었다.

T cell은 더 세분화하면 macrophage나 다른 lymphocyte를 활성화하는 CD4 T helper cell과 직접 감염된 세포를 공격하는 CD8 cytotoxic cell로 나누어진다. 桑紅白朮散이 이들 두 T cell에

미치는 영향을 살펴본 결과 10 mg, 50 mg에 대해 T helper cell은 5%, 18% 증가하였고 T cytotoxic cell은 15%, 18% 증가하여 세포성 면역을 담당하는 이들 두 유형의 T cell을 모두 활성화함을 알 수 있었다. 면역 반응을 담당하는 세포들은 외부의 자극에 대해 증식하는 것이 이들의 매우 중요한 기능이라고 할 수 있는데 약물을 투여한 마우스의 비장세포를 분리하여 3일간 배양하거나 또는 LPS와 Con A와 같은 mitogen을 처리한 후 같은 기간만큼 배양한 결과 약물을 투여한 마우스의 비장세포는 대조군의 비장세포보다 생존률이 유의성있게 증가하였고 mitogen에 대해서도 매우 유의성있게 증식하였다.

이상의 실험결과를 볼 때, 桑紅白朮散은 생쥐에서 대장암세포의 간전이를 억제하며, 이러한 효과는 암세포의 전이억제 기전이 아니라 면역활성화를 통한 것임을 시사한다.

결 론

본 연구자는 대장암과 간의 전이암에 대해 표본동치할 수 있는 삼령백출산에 면역활성 및 암전이 억제효과가 있는 약물을 가감하여 桑紅白朮散을 구성한 후 간전이 억제와 면역조절효과를 평가하였다. 먼저 桑紅白朮散의 대장암세포에 대한 세포독성을 측정하였고, 이 암세포에 대한 세포부착저지 측정과 침윤억제 측정을 시행하였다. 또한 생쥐에서 대장암세포에 의한 간전이 억제를 알아보기 위해, 桑紅白朮散 추출물을 마우스에 경구투여하고 대장암세포를 이식한 후에 전이암의 무게를 비교하였으며, 아울러 면역활성이 간전이 억제에 미치는 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

桑紅白朮散 추출물의 colon26-L5에 대한 세포독성을 알아본 결과 桑紅白朮散 추출물은 500 µg/ml 농도에서 80% 이상의 생존율을 나타내어 세포독성은 없는 것으로 나타났다. 桑紅白朮散 추출물의 colon26-L5 암세포에 대한 세포부착저지 효과를 알아본 결과 桑紅白朮散 추출물은 500 µg/ml 농도까지 대조군에 비해 유의한 효과를 나타내지 않아 in vitro 상에서 세포부착저지효과는 없는 것으로 나타났다. 桑紅白朮散 추출물의 colon 26-L5 암세포에 대한 침윤억제 효과를 알아본 결과 桑紅白朮散 추출물은 500 µg/ml 농도까지 대조군에 비해 유의적인 효과를 나타내지 않아 in vitro 상에서 침윤억제효과는 없는 것으로 나타났다. 桑紅白朮散 추출물의 colon26-L5 암주에 의한 간전이 억제 효과를 알아보기 위하여 桑紅白朮散 추출물을 암세포 이식 전 1주일간 BALB/c 생쥐에게 10 mg/mouse, 50 mg/mouse로 경구투여한 후 암세포 이식 18일 후 희생시켜 간전이에 미치는 효과를 관찰한 결과 농도의존적으로 간전이 억제 효과를 나타내었다. Natural killer cell을 선택적으로 제거한 후 간전이 억제효과를 알아본 결과 NK cell 제거군에서는 간전이가 유의성있게 증가하였으나 桑紅白朮散 추출물 투여군에서는 간전이가 유의성있게 억제되었다. Macrophage를 선택적으로 제거한 후 간전이 억제효과를 알아본 결과 桑紅白朮散 추출물 투여군에서는 간전이가 유의성있게 억제되었다. 桑紅白朮散 추출물 경구투여가 마우스의 NK cell 및 macrophage에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Mac-1과,

NK1.1의 population을 FACS 분석한 결과, 桑紅白朮散 추출물 투여군은 대조군과 비교하여 Mac-1은 10 mg, 50 mg에서 각각 30%, 18%의 높은 증가율을 보이며, NK1.1은 같은 농도에서 5%, 1%의 증가율을 나타내었다. 桑紅白朮散 추출물 경구투여가 마우스의 T cell 및 B cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD3, CD19를 FACS 분석하였다. 桑紅白朮散 추출물 투여군은 대조군과 비교하여 CD3는 10 mg, 50 mg에서 14%, CD19는 15%, 18% 증가하였다. 桑紅白朮散 추출물 경구투여가 마우스의 CD4 T cell 및 CD8 T cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD4, CD8의 FACS 분석 결과, 桑紅白朮散 추출물 투여군은 대조군과 비교하여 CD4는 10 mg, 50 mg에서 5%, 18%, CD8은 15%, 18% 증가하였다. 桑紅白朮散 추출물이 비장세포의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 桑紅白朮散 추출물 투여군은 10 mg, 50 mg에서 면역세포의 증식이 대조군 대비 180, 220% 증가하였으며, LPS와 Con A를 처리한 경우 대조군 대비 140%, 146% 증가하였다.

이상의 실험결과를 볼 때, 桑紅白朮散은 생쥐에서 대장암세포의 간전이를 억제하며, 이러한 효과는 면역활성화에 의한 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 경희대학교 한의과대학 암예방소재개발연구센터 (Cancer Preventive Material Development Research Center)에 의하여 지원(또는 연구)되었음.

참고문헌

1. 조종관. 한방임상중양학. pp 651-666.
2. 이한철. 蓼芩白朮散의 면역작용에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1994.
3. 한승섭. 蓼芩白朮散의 항암 및 면역조절작용에 관한 연구. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1994.
4. 나경수 외. 목질진흙 (상황) 버섯의 면역활성. 韓國 菌學會誌 26(1), 1998.
5. 장성강 외. 한국 홍삼의 면역활성 및 항암효과에 관한 실험적 연구. 高麗人蔘學會誌 18(3), 1994.
6. 정한술 외. 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과. 동의병리학회지 16(2), 2002.
7. 통계청. 주로 찾는 통계, 보건, 사인별 사망률. http://kosis.nso.go.kr/cgi-bin/sws_777.cgi?A_REPORT_ID=MA&A_CONTENTS=1502&A_LANG=1.
8. 이정호, 나양원, 서병조, 장석효, 백인욱, 이혁상. 대장암의 시대적 변화. 대한소화기학회지 33: 51-57, 1999.
9. 김미숙, 전점이, 손경희. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. 성인간호학회지 14(3):390-400, 2002.
10. 한준구, 김세형, 간영상. 대장암의 간 전이. 대한간학회지 8(2), 2002.
11. 김병주, 문 구. 大腸癌의 東西醫 結合 診治 近況. 대한한방중

- 양학회지 5(1):1-17, 1999.
12. 趙鐘寬. 韓方臨床腫瘍學, 大田 民衆出版社, pp 673-688, 2001.
 13. 郁仁存. 中醫腫瘍學(上冊), 北京, 科學出版社, pp 1-10, 1997.
 14. 조수열, 윤수홍, 하현, 송휘수; 길경 추출물의 간 보호효과, 한국위생과학회, 1(1), 1995.
 15. 張紹宗. 福建醫藥衛生. 5: 50, 1978.
 16. 김일영, 이상재, 김광호. 하수오가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향, 대한예방의학회지 4(2), 2000.
 17. 이원범, 정한솔, 권 진, 오찬호, 이광규. 산수유의 면역조절작용.
 18. 金令美. 山茱萸의 遊離自由基에 의한 肝損傷 保護效果 및 機轉에 대한 研究. 동국대학교 대학원 한의학과 박사학위 논문, 2003.
 19. 黔南三十二醫院上海醫療院, 貴州藥訊, 2: 34, 1976.
 20. 中國醫學技術員基礎醫學研究所等. 中華醫學雜誌 1: 23, 1979.
 21. 陰健, 郭力弓. 中藥現代研究與臨床應用 I. 北京, 學苑出版社, 1994.
 22. 劉國聲等. 1978年度 上海地域性藥學學術會議, 藥學論文摘要 (中國藥學會北京分會編), 269頁, 1978.
 23. 張鴻翔等. 腫瘤防治通訊, 2: 40, 1976.
 24. 宋芳吉等. 新醫藥學雜誌 6: 61, 1979.
 25. 장성강, 김주현, 정운신, 안동춘, 강명재, 이동근, 김상호. 한국 홍삼의 면역활성 및 항암효과에 관한 실험적 연구. 고려인삼학회, 18(3), 1994.
 26. Morisaki, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Zenibayashi, M., Shiina, R., Koyama, N., Kanzaki, T., Saito, Y. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng *Radix rubra* in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 115(7):1188-1193, 1995.
 27. Mochizuki, M., Yoo, Y.C., Matsuzawa, K., Sato, K., Saiki, I., Tono-oka, S., Samukawa, K., Azuma, I. Inhibitor effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rh2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rh3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull*. 18(9):1197-1222, 1995.
 28. 정한솔, 권 진, 이태규, 이광규, 오찬호. 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과, 동의병리학회지 16(2), 2002.
 29. Han Sang-Bae, Lee Chang-Woo, Jean Yong-Jin. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41: 157-164, 1999.
 30. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, N.D., Yoo, I.D. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus Linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18(5):295-303, 1996.
 31. Lee, J.H., Cho, S.M., Song, K.S., Hong, N.D., Yoo, I.D. Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull (Tyoyo)* 44(5):1093-1095, 1996.
 32. Huttenlocher, A. Sandborg, R.R., Horwitz, A.F. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 697-706, 1995.
 33. Fidler, I.J. Macrophages and metastasis-a biological approach to cancer therapy: presidential address. *Cancer Res* 45: 4714-4726, 1985.
 34. Hanna, N. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Re* 1: 45-64, 1982.