

十六味流氣飲의 免疫活性에 의한 乳房癌 세포 成長抑制效果

대구한의대학교 한의과대학 부인과교실

정연철, 박영선, 김동철

ABSTRACT

Shipyekmiyeugi-eum Extracts Suppressed Tumor Growth through Immunomodulatory Effects on MCF-7

Yeon-Chul Jung, Young-Sun Park, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetrics & Gynecology, College of Oriental Medicine,
Daeguhaany University

Objectives: The object of this study was to observe antitumor, anticachexia and immunomodulatory effects of *Shipyekmiyeugi-eum*(SYM) on human breast cancer cell, MCF-7, xenograft Balb/c nu-nu nude mice.

Methods: Three different dosages of SYM-125, 250 and 500 mg/kg were orally administered once a day for 28 days from 11 days after tumor cell inoculation, and the changes on the body weights, tumor volume and weights, weights of spleen and popliteal lymph node and epididymal fat, serum IL-6 and IFN- γ levels, NK cell and peritoneal macrophage activities, splenic TNF- α , IL-1 β and IL-10 contents were observed. In addition, histopathological observations of apoptotic cell, spleen, popliteal lymph node and cervical brown adipose were also detected. The results were compared with a potent cytotoxic estrogen receptor antagonist, Tamoxifen 20 mg/kg treated mice.

Results: Tumor volumes and weights were decreased without cytotoxic effects on the both MCF-7 and MCF-10A cells as results of all three different dosages of SYM treatment. And weights of body, spleen, popliteal lymph node, epididymal fat, serum IFN- γ , NK cell, peritoneal macrophage activities, splenic TNF- α , IL-1 β and IL-10 contents were increased with decrease of serum IL-6. At histopathological observations, apoptotic tumor cells, spleen, popliteal lymph node and cervical brown adipose tissue were increased. That means tumor-related immunosuppress and cachexia were markedly inhibited by SYM treatment as compared with tumor-bearing mice. On the other hand, Tamoxifen showed marked cytotoxic effects against MCF-7 and MCF-10A, decreases of tumor volume and weights, and increases of apoptotic tumor cells and related decreases of tumor cell volumes, but tamoxifen markedly deteriorated the tumor-related immune-suppress and cachexia.

Conclusions: The results obtained in this study suggest that SYM showed favorable anticancer effects and anticachexic effects on the MCF-7 cell xenograft through immunomodulatory effects. SYM did not induce any cytotoxic effects against both normal and cancer cells.

Key Words: Shipyekmiyeugi-eum, Breast cancer, Tamoxifen, Anticachexia, Cytotoxic, Immunomodulatory effect

I. 서 론

유방암은 서구 여러 나라에서 여성의 가장 흔한 암의 하나로, 2008년 통계에 따르면 우리나라의 유방암은 갑상선암에 이어 두 번째로 많으며 전체 여성암의 14.7%를 차지한다¹⁾. 보건복지부 통계에 의하면, 우리나라 유방암 환자의 발생은 계속 증가되는 추세이고 서구화가 진행됨에 따라 생활양식의 변화, 출산율과 수유 감소, 유방 정기검사 강화 등에 의해 더욱 증가될 것으로 판단된다¹⁾.

종양은 생체 자기 세포가 계속해서 분화, 증식하는 이상 세포 집단이고, 종양 관련 악액질은 악성 종양 환자의 삶의 질을 저하시키는 가장 중요한 원인으로 다양한 만성 합병증을 초래한다²⁾.

현재 사용되는 종양 치료제들은 종양 세포만이 아닌 정상 세포에도 동시에 독성을 나타내는 문제점이 있어 cytokine 생성을 통한 면역 활성화로 종양에 대한 생체 방어를 강화시키는 항암제 개발이 다양하게 진행되고 있는 실정이다^{3,4)}.

유방암은 한의학에서 '乳癌', '石癰', '乳巖' 등과 관련성이 깊고, 十六味流氣飲은 《瘍瘡全書⁵⁾》에 처음 수록된 처방으로 주로 乳巖을 치료하는 방제이다.

따라서 본 연구에서는 한의학에서 다양한 종양 치료에 많이 사용된 十六味流氣飲(SYM)의 유방암에 대한 항암 효과, 면역 활성화 효과 및 종양 관련 악액질에

미치는 효과 등을 관찰하였고, 이를 유방암 치료제인 Tamoxifen과 비교하여 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 모든 실험 동물은 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" 및 대구한의대학교 실험동물 윤리위원회의 기준에 준하여 취급하였다.

1. 시 료

본 실험에 사용된 약제는 제천한방약초(제천, Korea)에서 매입한 후 현미경으로 관능 검사를 통하여 선정한 것을 사용하였고, SYM 1첩 분량의 조성은 다음과 같다(Table 1). SYM 2첩 분량(77.25 g)을 취하여 정제수 1000 ml로 80°C에서 3시간 동안 3번 가열한 후 추출하였고, 다시 동결 건조시킨 뒤 총 18.20 g(수득율 23.56%)을 실험에 사용하였다. 추출물은 -20°C 냉장 보관 상태에서 실험에 사용하였고, 구입한 Tamoxifen(Sigma, MO, USA)은 4°C 냉장 보관 상태에서 실험에 사용하였다. SYM은 사용한 용매인 증류수에 50 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, Tamoxifen은 2 mg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of *Shipyekmiyeugi-eum* Used in This Study

Korean Name	Herbs	Scientific Name	Amounts (g)
蘇 葉	<i>Perillae Folium</i>	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> Kudo	5.625
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer	3.75
黃 耆	<i>Astragali Radix</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	3.75
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	<i>Angelica gigas</i> Nakai	3.75
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	<i>Cnidium officinale</i> Makino	1.875
肉 桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	<i>Cinnamomum loureirii</i> Nees	1.875
厚 朴	<i>Machili Cortex</i>	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	1.875
白 芷	<i>Angelicae Radix</i>	<i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hooker F.	1.875
防 風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	1.875
烏 藥	<i>Linderae Radix</i>	<i>Lindera strichnifolia</i> Villars	1.875
檳 榔	<i>Arecae Semen</i>	<i>Areca catechu</i> Linne	1.875
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	1.875
枳 殼	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	<i>Citrus aurantium</i> Linne	1.875
木 香	<i>Aucklandiae Radix</i>	<i>Aucklandialappa</i> Decne.	1.875
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	1.875
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq)A.DC	1.125
Total	16 Types		38.625

2. 세포 독성 평가

MCF-7(KCLB, Seoul, Korea) 및 MCF-10A(ATCC, Rockville, VA, USA) 세포를 10% FBS(Invitrogen, NY, USA), 100 U/ml penicillin(Sigma, MO, USA) 및 100 μ g/ml streptomycin(Sigma, MO, USA)이 포함된 RPMI 1640 배지(Sigma, MO, USA)에, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 유지하였고, 실험 과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였다.

MCF-7과 MCF-10A를 각각 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분류한 후 Tamoxifen과 SYM을 각각 농도별로 처리하여 세포 독성을 산출하였다. 즉 SYM은 10 mg/ml의 농도로 멸균 증류수에 용해시킨 후 계단식으로 배수 희석하여 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 및 0 mg/ml의 총 6가지 농도를 준비하였고, Tamoxifen

은 10 μ g/ml의 농도로 멸균 증류수에 용해시킨 후 계단식으로 배수 희석하여 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 및 0 mg/ml의 총 6가지 농도를 준비한 뒤 각각 세포에 처리한 후에 incubator에서 배양하였다.

세포 생존율은 SYM을 처리 후 48시간 배양한 뒤 생존 세포에 0.1 mg/ml 농도의 MTT(Sigma, MO, USA) 용액 50 μ l를 첨가하였고, 4시간 배양한 후 배지를 제거한 뒤 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Automatic ELISA microplate reader(Huntsville, AL, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정 한 후 무처리 control(LPS 무처리군)에 대한 ratio로 측정하였으며, 5회 반복 실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 MCF-7과 MCF-10A 각각의 생존율을 50% 억제하는 농도인 IC₅₀를 산출하였다.

3. In Vivo 항암 효과 평가

1) 실험 동물 및 사육 관리

70마리의 수컷 Balb/c nu-nu nude 마우스(4-week old upon receipt, SLC, Japan)를 14일간의 순화 과정을 거쳐 실험에 사용하였는데 순화 과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20~25℃)와 습도(30~35%)가 조절된 무균 사육실에서 마우스용 filtered cap polycarbonate 사육 상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였으며, 멸균 사료(Samyang, Korea)와 멸균 증류수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험 동물은 투여 시작일 및 최종 부검일(투여 28일 후)에 각각 18시간 정도 절식을 실시하였고, picric acid로 개체를 식별 하였다.

2) 종양 세포 이식

동물 이식 전 MCF-7은 Balb/c nu-nu mouse의 복강 내에 7~10일 간격으로 계대 배양 하여 보존한 후 복수와 함께 취하고, PBS와 함께 1,200 rpm에 10분간 원심 분리하여 종양 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10^7 cell/ml가 되도록 MCF-7의 부유액을 만들어 1 ml씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 마우스의 등쪽 제모 부위에 MCF-7의 부유액 0.2 ml(1×10^7 cell/mouse)씩을 피하 이식하여, 고형 종괴를 형성하였는데, MCF-7 이식 11일(종양 부피: 105 mm³ 전후) 후부터 125, 250 및 500 mg/kg의 SYM 또는 20 mg/kg의 Tamoxifen을 28일간 경구 투여하였다.

3) 실험군 분리 및 약물의 투여

실험 동물은 군당 8마리씩 6그룹으로

구분하였는데, 이 중 8마리는 정상 대조군으로 사용 하였으며, 62마리는 등쪽에 제모한 피하에 MCF-7을 이식한 10일 후, 종양 부피가 92.70~126.70 mm³ 되는 실험 동물만 선정하여 군당 8마리씩으로 하여 총 40마리의 종양 이식 마우스를 실험에 사용하였다. 즉 종양 세포 이식 대신 PBS를 주입한 정상 대조군, 종양 세포 이식 후 매체인 멸균 증류수 투여 대조군, 종양 세포 이식 후 SYM 20 mg/kg 투여군, 종양 세포 이식 후 SYM 125, 250 및 500 mg/kg 투여군 등의 총 6군으로 구분하여 실험하였다. SYM은 각각 적정량을 증류수에 용해시킨 후 동물 체중 10 ml/kg의 용량으로 종양 세포 이식 11일 후부터 매일 1회씩 28일간 금속제 Zonde가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여하였다. 또한 Tamoxifen은 증류수에 용해시켜 Detre S 등의 방법⁶⁾에 따라 MCF-7 이식 마우스에 확실한 항암 효과를 나타내는 것으로 알려진 20 mg/kg의 농도로 10 ml/kg의 용량으로 매일 1회씩 28일간 경구 투여하였다.

4) 체중의 측정

모든 실험 동물의 체중을 투여 시작 1일전(종양세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 1, 7, 14, 21, 27 및 최종 희생일에 각각 측정하였다. 사료 섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험 동물은 약 18시간 절식시켰으며, 실험 시작일부터 최종 희생일까지의 체중 변화량인 증체량을 각각 측정하였다.

5) 종양 부피의 측정

종양이식 후 정상 대조군을 제외한 모든 실험 동물에서 종양의 부피를 투여 시작 1일전(종양 세포 이식 10일 후), 투

여 시작일, 투여 2, 4, 7, 14, 21 및 최종 희생일에 Nishimura G 등의 방법⁷⁾에 따라 각각 아래의 공식을 이용하여 측정하였고, 실험 시작일부터 최종 희생일까지의 종양 부피의 변화량을 각각 측정하였다.

$$\text{Tumor Volume(mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{length} \times \text{width}^2$$

6) 종양 무게의 측정

정상 대조군을 제외한 모든 실험 동물에서 최종 희생일에 종양을 적출하여 주변 결합 조직을 제거한 후 절대 무게를 전자 저울(Precisa Instrument, Switzerland)을 이용하여 g 단위로 각각 측정하였다. 또한 최종 희생일의 체중에 대한 적출한 종양의 상대 무게를 각각 산출하였다.

7) 면역 장기 및 지방 무게의 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험 동물에서 최종 희생일에 비장, 슬와 임파절 및 부고환 주위 지방 조직 등을 적출하여 주변 결합 조직을 제거한 후 절대 무게를 전자 저울을 이용하여 g 단위로 각각 측정하였다. 또한 최종 희생일의 체중에 대한 적출한 각 조직의 상대 무게를 각각 산출하였다.

8) 혈중 IL-6과 IFN- γ 함량의 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험 동물에서 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture (Zoletile 50; Virbac Lab., France)를 복강으로 주사하여 마취한 다음 개복하여 복대 정맥을 노출하고, 1 ml의 혈액을 채취하였으며, 상온 13,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈중 IL-6 함량은 Iizuka N 등의 방법⁸⁾에 따라 ELISA Kit(R&D Systems Inc. MN, USA)를 이용하여 측정한 반면에 혈중 IFN- γ 함량은 분리된 혈청에

서 Mouse IFN- γ ELISA kit(BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA)를 이용하여 측정 manual에 따라 각각 pg/ml 단위로 측정하였다.

9) NK cell과 복강 대식 세포의 activity의 측정

NK 세포 활성은 Zarling JM 등의 방법⁹⁾에 따라 일반적인 Cr release assay로 평가하였다. 즉 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture 마취하에 비장 세포 및 복강 대식 세포를 수거하였다. 비장 세포는 비장 실질 조직(10~20 mg)을 4°C에서 RPMI-1640(Gibco BRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 후 RPMI-1640이 들어 있는 peridish에서 비장 소편을 준비한 뒤 균질화하여 비장 세포를 부유한 반면에 복강 대식 세포는 복강 내에 RPMI-1640 배지를 주입한 후 세척한 뒤 부유시켰다. 준비된 비장 세포와 복강 대식 세포의 부유액을 스테인레스 철망(Mesh No. 100, Sigma, MO, USA)에 여과하여 조직편과 유리되지 않은 세포 덩어리를 제거하고, RPMI-1640 배지로 다시 1회, HBSS(Gibco BRL, NY, USA)로 2회 세척하였다. 이후 멸균된 증류수로 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 후 10배 희석한 HBSS로 2회 세척하였고, RPMI-1640 배지로 한번 더 세척한 뒤 10% FBS가 첨가된 혼합 배지에 세포를 재부유하여 사용하였다.

수거한 일정량($1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml)을 complete medium(Sigma, MO, USA)에 overnight 배양하였는데, 비장 세포는 recombinant IL-2(1000 IU/ml: Proleukin Chiron, CA, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen, NY, USA)에 overnight 배양하였고, The

HTLA-230 neuroblastoma target cells은 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 $\mu\text{Ci}/1 \times 10^6$ cells, ICN Biomedicals, Asse, Belgium)으로 2시간 반응시켜 표지한 후 표적 세포(splenocytes 또는 peritoneal macrophages)와 함께 37°C에 6시간 동안 배양하였다. Effector: Target cell 비율은 비장 세포와 복강 대식 세포 모두 100:1로 조절하였고, 이후 상층액을 수거한 뒤 ^{51}Cr 에서 유리된 방사능을 gamma counter(Cobra 5002; Canberra Packard, CT, USA)를 이용하여 측정하였으며, Target 세포 손상(lysis)은 아래의 공식을 이용하여 % specific ^{51}Cr release로 산출하였다.

% Specific ^{51}Cr Release(NK cell activities) = $[(\text{Exp}-\text{S})/(\text{M}-\text{S})] 100\%$

Exp is the observed released ^{51}Cr value, S is the spontaneously released ^{51}Cr value, and M is the maximum released ^{51}Cr value.

10) 비장내 cytokine 함량의 측정

최종 희생일에 비장 조직의 일부(대략 10~15 mg/head)를 약 0.5 ml의 혈액을 복대 정맥에서 채취한 후 Clark의 방법¹⁰⁾에 따라 1 ml의 lysis 완충액(2 mM의 PMSF와 1 mg/ml의 aprotinin, leupeptin 및 pepstatin A가 포함된 인산 완충액, PBS)을 이용하여 균질화하였다. 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량을 각각 Mouse TNF- α ELISA kit(BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA), Mouse IL-1 β ELISA kit(Genzyme, MA, USA) 및 Mouse IL-10 ELISA kit(Genzyme, MA, USA)를 이용하여, Hotchkiss RS 등의 방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 분석은 lysis buffer에 희석한 100 ml의 standard 혹은 10, 50, 및 100 ml의 조직 homogenate에서 실시하였고, 각 sample을 두 번 반

복적으로 측정하였으며, 각 sample의 일정 부분은 단백질 함량 측정에 이용하였다. 모든 수치는 단백질 mg당 pg(pg/mg of protein)으로 측정하였고, 각 cytokine에 대한 표준 곡선은 흡광도를 이용하여 작성하였으며, 변이율은 10% 이하로 산출되었다.

11) 조직 병리학적 관찰

최종 희생일에 장기 무게 측정 후 종양, 좌측 슬와 임파절, 비장 및 경부 갈색 지방의 일부 조직을 10% 중성 포르말린에 18시간 이상 고정시킨 후 탈수한 뒤 일반적인 방법으로 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm 의 절편을 제작하여 Hematoxylin 및 Eosin 염색한 후 광학 현미경하에서 각각 조직 병리학적 관찰을 실시하였다. 세로로 절단한 mm의 종양 조직에서 종양 세포가 차지하는 비율과 종양 세포 중 apoptosis를 나타내는 세포의 비율을 각각 %/mm² 및 %/tumor cells 단위로 자동 조직 영상 분석장치(DMI CCD image analyzer; DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 측정하였다. 또한 세로로 절단한 비장 조직 표본에서 정중부의 비장 전체 두께, 백색 수질의 수 및 백색 수질의 직경을 각각 측정하였고, 세로로 절단한 슬와 임파절 조직에서 전체 두께 및 여포의 직경을 각각 측정하였으며, 갈색 지방 두께와 지방 세포의 평균 직경 역시 측정하였다.

4. 통계 처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 다중 비교 검증을 이용하여 통계 처리를 실시하였으며, 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산은 one way ANOVA test를 실시한

후 LSD test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정 한 반면 비등분산은 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에만 MW test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc. USA)를 이용하여 평가하였고, *p*-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였으며, 투여 물질의 항암 효과를 명확히 하기 위하여 투여군과 종양 이식 대조군과의 percent change와 tumor inhibition rate을 Liu L 등의 방법¹²⁾에 따라 아래의 공식을 이용하여 각각 측정하였다.

Tumor Inhibition Rate

$$= [(Average\ tumor\ weights\ of\ test\ groups\ average\ tumor\ weights\ of\ TB\ control) / average\ tumor\ weights\ of\ TB\ control] \times 100]$$

III. 결 과

1. 세포 독성(Cytotoxicity)

1) SYM이 MCF-10A와 MCF-7의 세

포 생존율에 미치는 영향

SYM 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서 MCF-10A와 MCF-7의 세포 생존율의 변화는 각각 -1.80, -2.60, -4.60, -7.60 및 -7.40%, -8.80, -5.80, -6.60, -2.20 및 -7.60%이었다. 대조군과 비교하여 의미있는 MCF-10A 세포 생존율의 감소는 모든 용량의 SYM 처리군에서 유의성이 인정되지 않아 IC₅₀가 10 mg/ml 이상으로 산출되었다(Fig. 1).

2) Tamoxifen이 MCF-10A와 MCF-7 세포 생존율에 미치는 영향

Tamoxifen 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 µg/ml 농도 처리군에서는 MCF-10A와 MCF-7의 세포 생존율의 변화는 대조군에 비해 각각 -1.80, -5.40, -39.80, -62.20 및 -77.80%, -35.00, -54.20, -71.80, -81.80 및 -91.60%이었다. 대조군과 비교하여 유의성이 있는 MCF-10A 세포 생존율의 감소는 Tamoxifen 2.5 µg/ml 처리군에서부터 유의성이 인정되어 IC₅₀가 4.06 µg/ml로 산출되었고(*p*<0.01), MCF-7 세포 생존율의 감소가 Tamoxifen 0.625 µg/ml 처리군에서부터 유의성이 인정되어 IC₅₀가 1.09 µg/ml로 산출되었다(*p*<0.01)(Fig. 1).

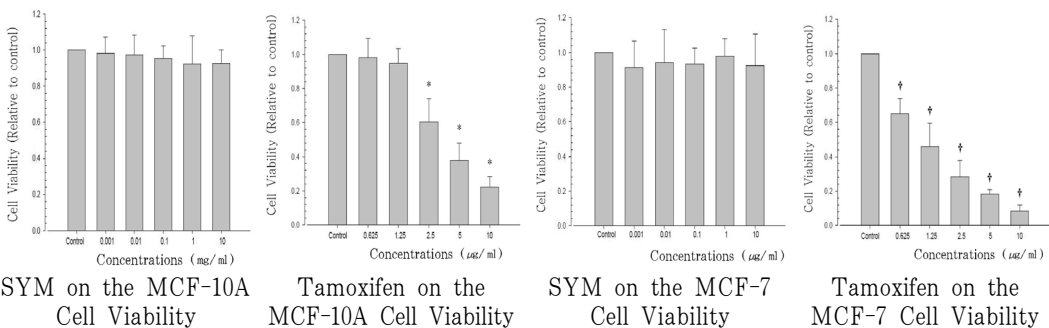


Fig. 1. Effects of SYM and Tamoxifen on the MCF-10A Cell Viability and MCF-7 Cell Viability.

* : *p*<0.01 as compared with control by LSD test
 † : *p*<0.01 as compared with control by MW test

2. In Vivo 항암 효과

1) 체중의 변화

종양 이식 대조군은 정상 대조군에 비해 실험 전 기간 동안 투여 1일 후부터 체중이 유의하게 감소하였고(p<0.01), 28일간의 증체량 역시 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.01). Tamoxifen 투여군은 투여 7일 후부터 정상 대조군에 비해 체중이 유의하게 감소하였고(p<0.01), 투여 27일 후부터 정상 및 종양이식 대조군에 비해 체중이 감소되어 투여 기간 동안의 증체량이 정상 및 종양 이식 대조군에 비해 각각 유의하게 감소되었다(p<0.01 또는 p<0.05). 한편 모든 SYM 투여군에서는 각각 투여 14, 21 및 28일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 체중이 유의하게 증가하였고(p<0.01

또는 p<0.05), 28일간의 증체량도 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.01)(Table 2).

2) 종양 부피의 변화

Tamoxifen 투여군에서는 투여 7일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 종양 부피가 유의하게 감소하였고(p<0.01), 투여 기간 동안 종양 부피의 변화량도 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(p<0.01). 한편 모든 농도의 SYM 투여군에서도 투여 14, 21 및 28일 후부터 각각 종양 이식 대조군에 비해 종양 부피가 유의하게 감소하였고(p<0.01 또는 p<0.05), 투여 기간 동안의 종양 부피의 변화량도 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.01 또는 p<0.05)(Table 2).

Table 2. Changes on the Body Weight Gains and Tumor Volume Changes after Tamoxifen or *Shipyekmiyeugi-eum*(SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice

	Intact	Tumor-Bearing	Tamoxifen 20 mg/kg	SYM 125 mg/kg	SYM 250 mg/kg	SYM 500 mg/kg
Body Weight (g)	Start 18.29±1.61	17.78±1.25	17.66±0.96	17.46±0.87	17.66±0.92	17.49±0.85
Sacrifice Gains	22.70±2.39	17.03±1.19*	15.55±1.08*	18.53±1.36*	19.61±1.49*†	19.85±1.57**
	4.41±1.13	-0.75±0.65*	-2.11±1.37**	1.06±1.08**	1.95±1.11**	2.36±1.20**
Tumor Volumes (mm ³)	Start	130.83±13.99	126.65±12.46	127.14±9.38	127.50±13.72	126.64±9.24
Sacrifice Changes		2082.93±106.25	542.58±351.73§	1802.34±278.88	1608.24±149.27§	904.06±201.67§
		1952.10±105.79	415.93±358.41§	1675.20±280.67	1480.74±144.82§	777.43±200.00§

* : p<0.01 as compared with intact control by LSD test
 † : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by LSD test
 ‡ : p<0.05 as compared with tumor-bearing control by LSD test
 § : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by MW test
 || : p<0.05 as compared with tumor-bearing control by MW test

3) 종양 무게의 변화

Tamoxifen과 모든 농도의 SYM 투여군에서 각각 종양 이식 대조군에 비해 종양의 절대 및 상대 무게가 유의하게 감소하였다(p<0.01). 즉 Tamoxifen과 모

든 농도의 SYM 투여군에서 절대 종양 무게에 대한 tumor inhibition rate는 각각 -63.79, -23.08, -31.36 및 -42.77%이고, 상대 종양 무게에 대한 tumor inhibition rate는 각각 -60.46, -28.52, -40.39 및 -50.73%

로 나타났다(Table 3).

4) 면역 장기 및 지방 무게의 변화

종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 비장의 절대 및 상대 무게가 유의하게 감소하였고(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서도 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 반면(p<0.01 또는 p<0.05), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 유의하게 증가하였다(p<0.01). 슬와 임파절 절대 및 상대 무게는 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 각각

종양 이식 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의하게 증가한 반면(p<0.01 또는 p<0.05), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 감소하였으나 유의한 변화는 나타나지 않았다. 부고환 주위 지방 절대 및 상대 무게는 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의하게 증가한 반면(p<0.01 또는 p<0.05), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Table 3).

Table 3. Changes of Absolute and Relative Weights on the Tumor, Spleen, Popliteal Lymph Node and Epididymal Fat after Tamoxifen or *Shipyekmiyeugi-eum*(SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice

	Organ	Intact	Tumor-Bearing	Tamoxifen 20 mg/kg	SYM 125 mg/kg	SYM 250 mg/kg	SYM 500 mg/kg
Absolute Weights (g)	Tumor		1.648±0.289	0.597±0.218*	1.268±0.252*	1.127±0.148*	0.943±0.115*
	Spleen	0.077±0.009	0.036±0.005*	0.026±0.005**	0.047±0.004**	0.053±0.008**	0.057±0.009**
	Popliteal Lymph Node	0.008±0.002	0.002±0.001*	0.001±0.000*§	0.004±0.001*	0.005±0.001*	0.006±0.002*
	Epididymal Fat	0.062±0.013	0.012±0.004*	0.004±0.001*	0.020±0.005*	0.025±0.009*	0.041±0.008*
	Tumor		9.688±1.658	3.830±1.307*	6.925±1.724*	5.774±0.869*	4.773±0.677*
Relative Weights (% Of Body Weights)	Spleen	0.345±0.075	0.209±0.022*	0.168±0.037*§	0.254±0.024*	0.268±0.040*	0.289±0.041
	Popliteal Lymph Node	0.037±0.006	0.013±0.004*	0.008±0.003*	0.020±0.006* ^b	0.025±0.006**	0.031±0.009* ^a
	Epididymal Fat	0.276±0.074	0.071±0.020*	0.025±0.010*	0.108±0.033*§	0.128±0.052*§	0.210±0.051
	Tumor						

* : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by LSD test
 † : p<0.01 as compared with intact control by LSD test
 ‡ : p<0.01 as compared with intact control by MW test
 § : p<0.05 as compared with tumor-bearing control by MW test
 || : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by MW test
 ¶ : p<0.05 as compared with intact control by MW test
 a : p<0.05 as compared with intact control by LSD test
 b : p<0.05: as compared with tumor-bearing control by LSD test

5) 혈중 IL-6와 IFN-γ 함량의 변화
 혈중 IL-6 함량은 종양 이식 대조군이

정상 대조군에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에

서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 유의하게 감소된 반면 ($p < 0.01$), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$). 혈중 IFN- γ 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게

감소하였고 ($p < 0.01$), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 유의하게 증가된 반면 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

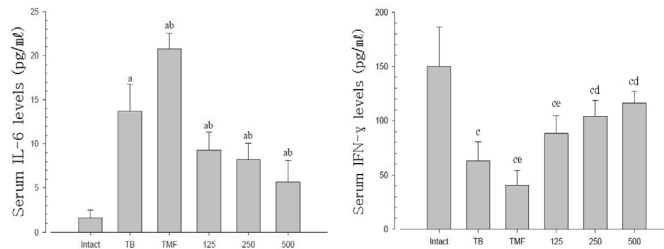


Fig. 2. Changes of the Serum IL-6 and IFN- γ Levels after Tamoxifen or *Shipyeukmiyeugi-eum* (SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice.

- a : $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test
- b : $p < 0.01$ as compared with tumor-bearing control by LSD test
- c : $p < 0.01$ as compared with intact control by MW test
- d : $p < 0.01$ as compared with tumor-bearing control by MW test
- e : $p < 0.05$ as compared with tumor-bearing control by MW test
- TB : Tumor-bearing control
- TMF : Tamoxifen 20 mg/kg treated mice
- 125 : SYM 125 mg/kg treated mice
- 250 : SYM 250 mg/kg treated mice
- 500 : SYM 500 mg/kg treated mice

6) 비장 NK cell과 복강 대식 세포 활성 변화

비장 세포의 NK cell 활성은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 ($p < 0.01$), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 유의하게 증가된 반면 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서

유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 복강 대식 세포의 세포 활성은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 ($p < 0.01$), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 유의하게 증가한 반면 ($p < 0.01$), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 3).

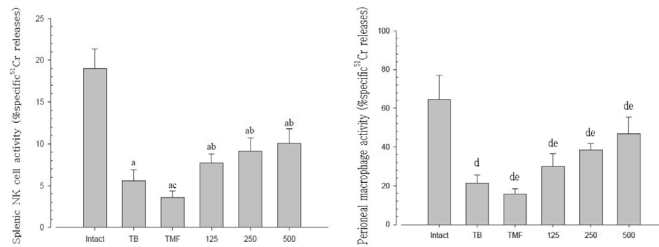


Fig. 3. Changes of the Splenic NK Cell and Peritoneal Macrophage Activities after Tamoxifen or *Shipyekmiyeugi-eum*(SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice.

- a : p<0.01 as compared with intact control by LSD test
- b : p<0.01 and as compared with tumor-bearing control by LSD test
- c : p<0.05 as compared with tumor-bearing control by LSD test
- d : p<0.01 as compared with intact control by MW test
- e : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by MW test

7) 비장내 cytokine 함량의 변화

비장내 TNF-α 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 유의하게 증가한 반면(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 유의하게 감소하였다(p<0.05). 비장내 IL-1β 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조

군에 비해 각각 유의하게 증가한 반면(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p<0.01). 비장내 IL-10 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 용량 의존적으로 증가한 반면(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 유의하게 감소하였다(p<0.01)(Table 4).

Table 4. Changes on the Splenic Cytokine Contents and Histomorphometry of Spleen, Popliteal Lymph Nodes and Cervical Brown Fats after Tamoxifen or *Shipyekmiyeugi-eum* (SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice

		Intact	Tumor-Bearing	Tamoxifen 20 mg/kg	SYM 125 mg/kg	SYM 250 mg/kg	SYM 500 mg/kg
Splenic Cytokine Contents (pg/mg)	TNF-α	120.33 ±15.25	61.56 ±9.26*	46.21 ±11.71*§	80.34 ±11.82**	92.16 ±13.35**	99.31 ±14.13**
	IL-1β	33.07 ±6.21	13.06 ±1.93	8.16 ±1.38 [¶]	16.28 ±3.05 [¶]	17.97 ±2.11 [¶]	19.71 ±2.03 [¶]
	IL-10	99.69 ±11.75	55.55 ±9.19*	39.01 ±11.24**	70.03 ±7.15**	76.30 ±10.42**	87.09 ±7.80**
Splenic Histomorphometrical Changes	Total Thickness (mm/Central Region)	4.06 ±0.41	2.49 ±0.26*	2.03 ±0.32*§	2.89 ±0.25*	3.43 ±0.65**	3.93 ±0.48*
	White Pulp Numbers (N/mm ²)	22.63 ±3.25	7.13 ±1.64	4.63 ±0.74 [¶]	11.00 ±1.77 [¶]	14.00 ±1.85 [¶]	18.38 ±4.00 [¶]

	Diameters of White Pulp (mm/White Pulp)	1.59 ±0.36	0.66 ±0.08	0.45 ±0.08 [¶]	0.89 ±0.15 [¶]	1.05 ±0.19 [¶]	1.28 ±0.13 ^{**¶}
Popliteal Lymph Node	Total Thickness (mm/Central Region)	2.84 ±0.32	2.01 ±0.19	1.74 ±0.17 ^{**}	2.25 ±0.12 [¶]	2.32 ±0.14 [¶]	2.50 ±0.30 [¶]
Histomorphometrical Changes	Diameters of White Pulp (mm/Follicle)	0.97 ±0.18	0.47 ±0.07	0.36 ±0.06 ^{**}	0.70 ±0.03 [¶]	0.69 ±0.11 [¶]	0.80 ±0.14 [¶]
Cervical Brown Fat	Total Thickness (mm/Central Region)	1.93 ±0.14	0.47 ±0.07	0.30 ±0.06 [¶]	0.87 ±0.18 [¶]	1.48 ±0.36 [¶]	1.67 ±0.24 ^{**¶}
Histomorphometrical Changes	Diameters of Adipocytes (µm/Adipocyte)	40.78 ±5.77	28.24 ±4.32 [*]	20.78 ±2.24 ^{**†}	33.13 ±2.85 ^{*§}	34.42 ±3.62 ^{*†}	40.97 ±5.21 [†]

* : p<0.01 as compared with intact control by LSD test
 † : p<0.05 as compared with intact control by LSD test
 ‡ : p<0.01 as compared with tumor-bearing control by LSD test
 § : p<0.05 as compared with tumor-bearing control by LSD test
 || : p<0.01 as compared with intact control by MW test

8) 조직 병리학적 변화

(1) 종양의 조직 병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 MCF-7 세포로 치밀하게 구성되어 있었으며, 일부 세포에서 apoptosis에 의한 세포질의 호산성 증가 및 핵 농축이 인정되었다. 한편 Tamoxifen 및 모든 SYM 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고, 결과적으로 MCF-7 세포가 차지하는 비율 역시 감소 하였다 (Fig. 4). Tamoxifen, SYM 투여군에서 각각 종양 이식 대조군에 비해 종양 조직 mm² 당 MCF-7 세포가 차지하는 비율의 감소 및 apoptotic 세포의 수적 증가에서 유의성이 인정되었다(p<0.01).

(2) 비장의 조직 병리학적 변화

종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 비장 백색 수질 부분의 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되었으며, 비장 두께, 백색 수질 직경 및 수가 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비

해 비장 두께, 백색 수질 직경 및 수가 조직 병리학적으로 증가한 반면, Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장 두께, 백색 수질 직경 및 수가 유의하게 감소하였다(p<0.01 또는 p<0.05) (Fig. 4).

(3) 슬와 임파절의 조직 병리학적 변화

종양 이식 대조군은 정상 대조군에 비해 슬와 임파절 피질 부분의 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되었으며, 슬와 임파절 전체 두께 및 여포 직경이 유의하게 감소하였고(p<0.01), 모든 농도의 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 슬와 임파절 전체 두께 및 여포 직경이 조직 병리학적으로 유의하게 증가한 반면(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 슬와 임파절 전체 두께 및 여포 직경이 유의하게 감소하였다(p<0.05) (Fig. 4).

(4) 경부 갈색 지방의 조직 병리학적 변화

종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 갈색 지방 세포의 크기가 특징적으로

감소되어 경부 갈색 지방조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경이 유의하게 감소하였으나($p<0.01$), 모든 농도의 SYM 투여군에서 종양 이식 대조군에 비해 경부 갈색 지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경이 각각 조직 병리학적으로 유의

하게 증가하였고($p<0.01$ 또는 $p<0.05$), Tamoxifen 투여군에서도 종양 이식 대조군에 비해 경부 갈색 지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경이 유의하게 증가되었다($p<0.01$)(Fig. 4).

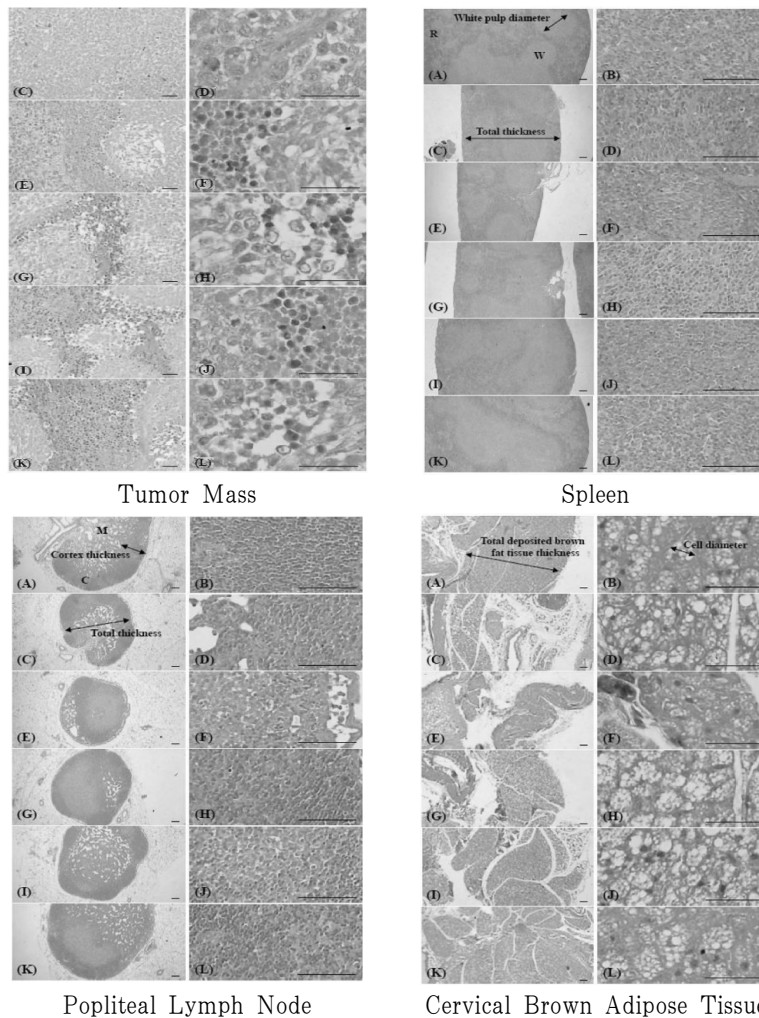


Fig. 4. Changes on the Tumor Mass, Spleen, Popliteal Lymph Node and Cervical Brown Adipose Tissue Histopathological Profiles after Tamoxifen or *Shipyekmiyeugi-eum* (SYM) Treatment in MCF-7 Cell Inoculated Nude Mice.

A,B : Intact control C,D : Tumor-bearing control E,F : Tamoxifen 20 mg/kg treated mice
G,H : SYM 125 mg/kg treated mice I,J : SYM 250 mg/kg treated mice K,L : SYM 500 mg/kg treated mice

IV. 고찰

유방암은 유방 실질 조직 및 유관에 발생하는 악성 종양으로, 우리나라 여성 암 중 두 번째로 빈발하는 악성 종양이다. 이는 40대 여성에서 가장 많이 발생하며, 5년 생존율은 0기 100%, 1기 98.4%, 2기 91.6%, 3기 69.7%, 4기 30.2%로 나타난다¹³⁾. 우리나라의 유방암 연간 발생율은 6.5%로 지속적으로 증가하고 있으며 생활 양식의 변화, 출산율 및 수유 감소, 유방 정기 검사 강화 등에 의해 더욱 증가될 것으로 예상된다¹³⁾.

종양이란 생체 자기 세포가 계속해서 분화와 증식을 하는 특성을 가진 이상 세포 집단으로 면역 담당 세포의 기능이 억제됨으로써 개체 방어 기전이 약화되고, 정상 세포의 세포 증식 조절 기능이 상실되어 암 세포가 폭발적으로 증식하여 발생한다¹⁴⁾. 종양 관련 악액질은 암 환자들에게 지방질이나 근육의 소모를 일으켜 체중을 감소시키고, 방사선 치료와 화학 치료에 대한 반응성을 떨어뜨릴 뿐 아니라 환자의 생존 기간을 줄이며, 암의 치료를 제한하고 합병증 발생을 증가시키는 결과를 가져와 암 환자 사망의 주원인으로 작용한다¹⁴⁾.

악성 종양의 치료에 사용하는 항암제의 작용 기전은 암 세포의 DNA와 RNA 및 단백질 합성을 억제하거나 세포 주기를 저해하는 것으로 이러한 항암제는 암 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 손상을 줌으로써 중대한 여러 부작용을 일으킨다. 따라서 정상 세포에 대한 세포 독성은 낮고 악성 종양 세포에서만 선택적으로

세포 독성을 나타내는 항암제 개발이 필요한 실정이다.

한의학에서 ‘乳巖’, ‘乳癰’, ‘吹乳’, ‘乳勞’, ‘乳中結核’, ‘乳癖’ 등의 질환은 모두 유방 종괴를 의미하는데 그 중 “婦人憂怒抑鬱, 時日積累, 脾氣消沮, 肝氣橫逆, 遂成隱核, 如鰲碁子. 不通不痒, 十數年後, 方爲瘡陷, 名曰妳巖¹⁵⁾.”이라 하여 ‘乳巖’이 현재 유방암에 가장 부합된다¹⁶⁾. 본 연구에 사용된 十六味流氣飲은宋代《瘍瘡全書⁵⁾》에 처음 수록되어 주로 乳巖을 치료하는 방제로 알려져 있으며 蘇葉, 人蔘, 黃耆, 當歸, 川芎, 肉桂, 厚朴, 白芷, 防風, 烏藥, 檳榔, 白芍藥, 枳殼, 木香, 甘草, 桔梗의 16가지 약물로 구성되어 있다.

十六味流氣飲의 구성 약재 중, 蘇葉^{17,18)}, 人蔘^{19,20)}, 黃耆²¹⁾, 當歸²²⁾, 白芷²³⁾, 烏藥²⁴⁾의 면역 조절 효과와 川芎^{25,26)}, 厚朴²⁷⁾, 防風²⁸⁾, 檳榔²⁹⁾의 항산화 효과는 이미 잘 알려져 있다. 현재까지 十六味流氣飲 추출물에 대한 실험적 연구로 갑상샘 기능 항진³⁰⁾에 대한 효과가 보고되어 있으며, 李 등³¹⁾은 진경, 항염, 항경련, 장 연동 운동 및 자궁 수축 조절, 혈압 강하 효과 등 다양한 약리 효과를 보고하였으며, 沈³²⁾은 항암 및 항암제 부작용에 미치는 영향을 보고하였으나 十六味流氣飲 자체의 면역 활성화 효과는 알려져 있지 않다. 임상적으로 十六味流氣飲은 右乳腫結核, 淋巴腺炎, 耳下腺炎, 扁桃腺炎 등의 右側氣滯로 인한 炎症疾患³³⁾, 甲狀腺腫^{34,35)}, 腎腫瘍 및 腸腫瘍³⁶⁾, 盲腸炎, 子宮內筋腫, 頸部淋巴腺腫, 乳腫 등³⁴⁾에 가감하여 여러 가지 종양 치료에 다양하게 활용되고 있다.

본 연구에서는 한의학에서 전통적으로 여러 가지 종양 치료에 사용되어온 부인과의 처방인 十六味流氣飲의 세포 독성 효과를 MCF-7와 MCF-10A 세포를 이용하여 MTT 방법으로 평가하였다. 다음으로 항암 활성을 확인하기 위해 MCF-7 세포주 이식 11일 후부터 SYM 추출물을 매일 125, 250 및 500 mg/kg의 농도로 각각 28일간 경구 투여한 다음 체중, 종양 부피, 종양 무게, 면역 장기 무게, 혈중 IL-6 및 IFN- γ 함량, NK cell과 복강 대식 세포의 활성, 비장 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10 함량의 변화를 관찰하였다. 또한 종양 및 임파 장기의 조직 병리학적 변화와 종양 관련 악액질에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 종괴, 비장 조직, 슬와 임파절 및 경부 갈색 지방 조직의 변화를 각각 관찰하였다. 실험 결과는 정상 대조군, 종양 이식 대조군, Tamoxifen 20 mg/kg 투여군과 각각 비교하였다.

먼저 모든 용량의 SYM 추출물 처리군에서 MCF-10A와 MCF-7 세포의 생존율 변화는 인정되지 않았으나, Tamoxifen 투여군에서는 MCF-10A에서 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서부터 유의성이 인정되어 IC₅₀가 4.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 산출되었고(p<0.01), MCF-7에서는 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서부터 유의성이 인정되어 IC₅₀가 1.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 산출되었다(p<0.01). 이는 Tamoxifen의 현저한 세포 독성을 보여주는 결과로 5.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 MCF-7 및 MCF-10A 세포에 80% 이상의 세포 독성을 나타낸다는 Yaacob 등³⁷⁾의 보고와 유사하였다. 이상의 결과에서 Tamoxifen의 항암 효과는 세포의 독성 작용에 의하여 나타나는 것으로 정상 세포에도 세포 독성이

나타날 수 있는데 반하여, SYM 추출물은 정상 및 종양 세포에 별다른 세포 독성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

다음으로 SYM의 항암 및 면역 활성 효과를 관찰하였다. 체중의 변화를 살펴보면, 종양 이식 대조군은 정상 대조군에 비해 체중 및 증체량의 유의성 있는 감소가 나타났고(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서도 투여 기간 동안 종양 이식 대조군과 정상 대조군에 비해 체중 및 증체량의 유의성 있는 감소가 나타났다(p<0.01). 반면 모든 용량의 SYM 추출물 투여군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 감소가 나타났으나(p<0.01 또는 p<0.05), 종양 이식 대조군에 비해 체중과 증체량의 유의성 있는 증가가 나타났다(p<0.01 또는 p<0.05).

종양 부피와 중량의 변화를 살펴보면, Tamoxifen 투여군과 모든 용량의 SYM 추출물 투여군에서 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(p<0.01 또는 p<0.05). 그러나 종양의 절대 및 상대 중량치의 비교에서는 Tamoxifen이 각각 -63.79%, -60.46%로 나타나 SYM 세 가지 용량에서 보다 더 높은 종양 억제율을 나타내었다.

비장과 슬와 임파절, 부고환 주위 지방 중량의 절대 및 상대 중량치를 살펴보면, 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고(p<0.01), Tamoxifen 투여군에서도 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(p<0.01 또는 p<0.05). 반면 모든 용량의 SYM 추출물의 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 비장과 슬와 임파절, 부고환 주위 지방 중량의 상대 및 절대

중량치가 유의성 있게 증가되는 것으로 나타났다($p < 0.01$).

이러한 결과에서 Tamoxifen은 유방암 세포에 대한 항암 효과는 있으나 악액질 관련 현상은 악화시키는 반면 SYM은 종양의 부피와 중량은 감소시키나 악액질 관련된 현상인 체중과 면역 장기의 중량 및 지방의 감소는 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 이는 기존 연구³⁸⁾에서 十六味流氣飲加減 처방이 MCF-7 세포에 대해 증식 억제 효과가 없었다는 보고와 상이하였으며, 沈³²⁾의 연구에서 十六味流氣飲이 항암제와 같은 강한 세포 독성은 없으나 항암 효과를 보고한 내용과 유사한 결과로 사료된다.

SYM의 면역 활성화 효과에서 혈중 IL-6 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고, Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있게 증가한($p < 0.01$) 반면 모든 SYM 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 투여 용량의 존적으로 감소되었다($p < 0.01$). 현재까지의 다양한 연구에 따르면 종양 세포에서 생산 분비되는 IL-6가 종양 악액질에서 매우 중요한 역할을 하며 가장 일반적인 원인으로 지목되어 왔다³⁹⁾. 이러한 IL-6의 억제는 종양 환자에서 문제시되는 악액질 또는 영양 불균형 등을 완화시킬 수 있을 것으로 기대되고 있는데 본 연구의 SYM은 IL-6 함량을 용량 의존적으로 억제하는 효과를 관찰할 수 있었다.

한편 혈중 IFN- γ 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고($p < 0.01$), Tamoxifen 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의

성 있게 감소하는($p < 0.05$) 반면 SYM 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$). 또한 비장 NK cell과 복강 대식 세포 활성은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), Tamoxifen 투여군에서도 종양 이식 대조군에 비해서 유의하게 감소한($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 반면 모든 용량의 SYM 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 각각 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$).

IFN- γ 는 B 및 T 세포의 기능에 영향을 미치고, NK cell과 대식 세포의 기능을 강화시킨다⁴⁰⁾. NK cell은 기본적으로 세포 내 감염에 대한 초기 방어 작용을 하며, 동물 실험에서 NK cell을 제거할 경우 암의 발생 빈도가 늘어나고 전이가 증가하는 것을 볼 때 면역 활성화와 관련하여 NK cell의 중요성을 알 수 있다⁴¹⁾. 대식 세포는 인체 면역 체계에서 중요한 역할을 하는 대표적인 세포로 암 세포를 포식하며, 염증 반응시 cytokine을 생산하여 생체 방어에 중요한 역할을 한다⁴²⁾. 최근 자신의 면역 세포를 자극시켜 cytokine 생성을 유도함으로써 종양에 대한 생체 방어를 강화시키는 면역 활성을 통한 항암제 개발이 주목 받고 있는데^{3,4)}, 본 결과에서 INF- γ 증가와 NK cell과 대식 세포 활성의 유의한 증가는 SYM이 면역 기능의 활성화에 관여하는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

비장 내 TNF- α , IL-1 β , IL-10 함량은 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였고($p < 0.01$), Tamoxifen 투여군에서도 종양 이식 대조군에 비해

서 유의하게 감소하는($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 반면, SYM 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 면역을 담당하는 세포 중 TNF- α 는 비장 세포에서 생산되는 대표적인 cytokine으로 T-임파구의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며²¹⁾, 세포성 면역을 활성화시키고, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2의 기능을 증가시킨다⁴⁰⁾. IL-1은 대식 세포 등 다양한 세포에서 분비되는 cytokine으로 세포의 분비 형태인 IL-1 β 와 막 부착형인 IL-1 α 의 두 종류가 존재하며, 면역 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. IL-10은 전형적인 면역 억제 cytokine으로 주로 활성화된 대식 세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 본 실험 결과에서 SYM의 투여군에서 비장내 TNF- α , IL-1 β , IL-10의 함량이 유의하게 증가하는 것으로 관찰되어 SYM의 항암 효과는 주로 면역 활성화와 관련 있을 것으로 판단된다.

SYM의 조직 병리학적인 변화를 관찰한 결과, 종양 이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 MCF-7 세포로 치밀하게 구성된 반면, Tamoxifen과 SYM 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고 MCF-7 세포가 차지하는 비율은 감소하였다. 또한 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 비장 백색 수질 부분 위축과 비장 두께의 감소, 백색 수질 직경 및 수 감소, 슬와 임파절의 두께 및 여포 직경 감소가 유의하게 나타났으나 모든 SYM 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 그 수가 조직 병리학적으로

유의하게 증가하였다. 한편 Tamoxifen 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장 백색 수질 부분 위축과 비장 두께, 백색 수질 직경 및 수, 슬와 임파절의 두께 및 여포 직경이 유의하게 감소하였다. 지방 세포에서는 종양 이식 대조군이 정상 대조군에 비해 갈색 지방 세포의 크기, 경부 갈색 지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경이 유의하게 감소하였으나 Tamoxifen과 SYM 투여군에서 각각 조직 병리학적으로 유의하게 증가하였다.

이상의 연구 결과에서 SYM은 세포 독성 없이 종양의 부피와 무게를 감소시키며 체중과 증체량, 비장, 슬와 임파절, 부고환 주위 지방 조직의 무게는 증가시키는 것으로 나타났다. 악액질 현상과 관련된 혈중 IL-6를 감소시키고 면역 활성화와 관련된 혈중 IFN- γ 함량, NK cell과 대식 세포의 활성화, 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10 함량은 증가시키는 효과를 확인할 수 있었으며 조직 병리학적인 변화에서도 apoptotic 세포 수 및 면역 장기 조직의 두께와 직경의 유의한 증가를 관찰하였다. 이러한 결과에서 SYM의 항암 효과는 주로 면역 활성화와 관련 있을 것으로 생각되며, 종양 관련 악액질 현상이 억제되는 것으로 관찰되어 SYM은 종양 환자의 삶의 질을 높이기 위해 적용 가능할 것으로 판단된다. 반면 Tamoxifen의 항암 효과는 주로 세포 독성에 의한 것으로 생각되며 Tamoxifen 투여군에서는 악액질 현상이 관찰되어 정상 세포에 대한 세포 독성 및 면역력 저하로 인하여 장기간의 투여는 현저한 면역 억제를 유발할 것으로 판단된다. 이는 Tamoxifen의 장기간 투여시 면역

억제를 유발하여 오히려 종양의 크기를 증가시키는 것으로 알려져 있어 사용이 제한되고 있는 것^{37,44)}과 일치하는 결과이다. 비록 SYM 추출물 500 mg/kg은 Tamoxifen 20 mg/kg보다 비교적 낮은 항암효과를 나타내었으나 장기간 종양 치료시 면역 작용 및 항암 효과를 위하여 SYM 추출물이 유효하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 종양 환자의 삶의 질 개선 및 장기간 종양 치료시 면역 작용 및 항암 효과를 위하여 SYM 추출물이 유효할 것으로 기대된다. 향후 十六味流氣飲의 효능에 대한 임상 연구를 병행하고 구성 개별 약재의 수많은 생리 활성 물질⁵⁾에 대해 각각에 대한 효능 검색과 더불어 다양한 방면으로 기전적인 연구를 더 수행해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

MCF-7 세포와 MCF-10A 세포를 이용하여 SYM 125, 250, 500 mg/kg 추출물의 세포 독성, 항암 작용, 면역 활성 효과, 악액질 저하 작용 및 조직 병리학적 변화를 Tamoxifen과 비교하여 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 생존율의 변화에서 SYM 투여군은 세포 독성을 나타내지 않은 반면 Tamoxifen 투여군은 세포 독성을 나타내었다.
2. 체중의 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM 투여군은 체중과 증체량이 유의하게 증가한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 감소하였다.
3. 종양의 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM과 Tamoxifen 투여군에서 모두 종양의 부피와 중량이 유의하게 감소하였으나 Tamoxifen 투여군이 SYM 투여군 보다 더 높은 종양 억제율을 나타내었다.
4. 비장과 슬와 임파절 및 부고환 주위 지방의 중량 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM 투여군은 유의하게 증가한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 감소하였다.
5. 혈중 IL-6 함량 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM 투여군은 용량 의존적으로 유의하게 감소한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 증가하였다.
6. 혈중 IFN- γ 함량 및 비장 NK cell과 복강 대식 세포 활성 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM 투여군은 유의하게 증가한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 감소하였다.
7. 비장내 TNF- α , IL-1 β , IL-10 함량 변화에서 종양 이식 대조군에 비해 SYM 투여군은 유의하게 증가한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 감소하였다.
8. 조직 병리학적 변화는 Tamoxifen과 SYM 투여군 모두 종괴 조직에서 apoptotic 세포 수가 증가되고 종괴 조직의 비율이 감소하였으나 SYM 투여군은 비장 두께와 백색 수질의 직경과 수 및 슬와 임파절의 두께와 여포 직경이 유의하게 증가한 반면 Tamoxifen 투여군은 유의하게 감소하였다.

이상에서 SYM의 항암 및 면역 활성화 효과와 약액질에 대한 보호 기전을 확인 하였으므로 향후 추가된 연구를 통하여 항암제로써 활용 가치가 있을 것으로 생각된다.

□ 투 고 일 : 2012년 07월 25일

□ 심 사 일 : 2012년 08월 08일

□ 게재확정일 : 2012년 08월 16일

참고문헌

1. 보건복지가족부. 국가암등록사업 연례 보고서. 2009. available from: URL: <http://www.mw.go.kr/front/index.jsp>.
2. Oka M et al. Relationship between serum levels of Il-6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(12):2776-80.
3. Ha ES et al. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res.* 2004;27(2):217-24.
4. Yu GM, Hwang IG. In vitro effect of Yuza(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol.* 2004;36:339-44.
5. 陳夢雷 等. 古今圖書集成 醫部全錄. 9 冊. 北京:人民衛生出版社. 1983:54, 135.
6. Detre S et al. Comparison of the selective estrogen receptor modulator arzoxifene(LY353381) with tamoxifen on tumor growth and biomarker expression in an MCF-7 human breast cancer xenograft model. *Cancer Res.* 2003;63(19):6516-22.
7. Nishimura G et al. An antioxidant, probucol, induces anti-angiogenesis and apoptosis in athymic nude mouse xenografted human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(11):1224-30.
8. Iizuka N et al. Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett.* 2000;158(1):35-41.
9. Zarling JM et al. Augmentation of natural killer cell activity by polyinosinic acid-polycytidylic acid and its nontoxic mismatched analogues. *J Immunol.* 1980;124(4):1852-7.
10. Clark BD et al. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radio immunoassays. *J Appl Physiol.* 1991;71(6):2412-8.
11. Hotchkiss RS et al. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock.* 1995;3(5):337-42.
12. Liu L et al. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 1999;5(6):492-505.
13. 국가 암정보센터. available from: URL:

- <http://www.cancer.go.kr/>
14. 翁家武, 陳培丰. 癌症惡病質的中醫藥治療研究進展. 浙江:中西醫結合雜誌. 2009;19(2):271-80.
 15. 許浚. 東醫寶鑑 外形偏. 서울:대성문회사. 1992:407, 414.
 16. 김정진 등. 유방종괴에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1998; 11(2):29-43.
 17. Makino T et al. Suppressive effects of *Perilla frutescens* on IgA nephropathy in HIGA mice. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(3):484-90.
 18. Oh HA et al. Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. Exp Biol Med(Maywood). 2011;236(1): 99-106.
 19. Jang HI, Shin HM. Wild Panax ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) protects against methotrexate-induced cell regression by enhancing the immune response in RAW 264.7 macrophages. Am J Chin Med. 2010;38(5):949-60.
 20. Ni W et al. Antitumor activities and immune modulatory effects of ginseng neutral polysaccharides in combination with 5-fluorouracil. J Med Food. 2010;13(2):270-7.
 21. Clement-Kruzel S et al. Immune modulation of macrophage pro-inflammatory response by goldenseal and Astragalus extracts. J Med Food. 2008;11(3): 493-8.
 22. Han SB et al. Characteristic immune stimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. Immunopharmacology. 1998;40(1):39-48.
 23. 임강현 등. 백지의 사람비만세포 사이토카인 및 케모카인 발현 양상. 대한본초학회지. 2007;22:81-7.
 24. Luo Y et al. Total alkaloids from Radix Linderae prevent the production of inflammatory mediators in lipopoly saccharide-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing NF-kappa B and MAPKs activation. Cytokine. 2009; 46(1):104-10.
 25. Jeong JB et al. Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. Cancer Epidemiol. 2009;33(1):41-6.
 26. Jeong JB et al. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. Food Chem Toxicol. 2009;47(3): 525-9.
 27. Kim NY, Ryu JH. Butanolides from *Machilus thunbergii* and their inhibitory activity on nitricoxide synthesis in activated macrophages. Phytother Res. 2003;17(4):372-5.
 28. Tai J, Cheung S. Anti-proliferative and antioxidant activities of *Saposhnikovia divaricata*. Oncol Rep. 2007;18(1): 227-34.
 29. Pithayanukul P et al. Hepa toprotective potential of extracts from seeds of *Areca catechu* and nutgalls of *Quercus infectoria*. Molecules. 2009;14(12):

- 4987-5000.
30. 정연희, 채병윤. 십육미유기음(十六味流氣飲) 및 그 가미방이 갑상선 기능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1988;9:98-108.
 31. 李枝映 등. 十六味流氣飲煎湯液이 實驗動物에 미치는 影響. 원광한의학. 1993;3:149-65.
 32. 沈相姬. 十六味流氣飲의 항암 및 항암제 부작용에 미치는 영향. 2003. 동신대학교 대학원.
 33. 洪淳昇. 洪家定診秘傳. 서울:醫藥社. 1974:67-9, 75.
 34. 朴南錯. 韓方治療大全. 서울:南山堂. 1979:125, 349.
 35. 朴炳昆. 漢方臨床 40年. 서울:大成文化社. 1984:334-8.
 36. 李基淳. 漢方內科學. 서울:壽文社. 1982: 300, 372.
 37. Yaacob NS et al. Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. BMC Complement Altern Med. 2010;5(10):42.
 38. 김정숙 등. 유용에 활용되는 가감유기음에 대한 실험적연구. 대한한방부인과학회지. 1995;8(1):115-30.
 39. Kurebayashi J et al. Medroxyprogesterone acetate inhibits interleukin 6 secretion from KPL-4 human breast cancer cells both in vitro and in vivo: a possible mechanism of the anticachectic effect. Br J Cancer. 1999;79(3-4):631-6.
 40. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Saunders: Philadelphia, 1995:155-69.
 41. 서울대학교의과대학 편. 종양학. 서울:서울대학교출판부. 1998:229.
 42. Ripoll V.M. et al. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. Gene. 2008;413(1-2): 32-41.
 43. Unanue ER. The Mononuclear-Phagocytic System. In: Immunology an introduction (Tizard IR editor). 4th edition. Saunders: Philadelphia. 1995:61-74.
 44. Joffroy CM et al. Antiestrogens induce transforming growth factor beta-mediated immune suppression in breast cancer. Cancer Res. 2010; 70(4):1314-22.