

扶正抗癌湯이 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響

Influence of Bujeonhangamtang Extract against Chemically Induced Tumor and Xenografted Mice Tumor and Its Immunological Response

林美良 · 田炳薰 · 元秦喜 · 文 九 · 文錫哉

圓光大學校 韓醫科大學 脾系內科學教室

ABSTRACT

Bujeonhangamtang(扶正抗癌湯) has been used for cure of tumor as a traditional medicine without any experimental evidence to support the rational basis for its clinical use. This study was carried out to evaluate the possible therapeutic or antitumoral effects of Bujeonhangamtang extract against tumor, and to carry out some mechanisms responsible for its effect.

Some kinds of tumor were induced by the typical application of 3-methylcholanthrene (MCA) or by the implantation(s.c) of malignant tumor cells such as leukemia cells(3LL cells) or sarcoma cells(S180 cells). Treatment of the Bujeonhangamtang water-extract (dailly 1mg/mouse, i. p.) was continued for 7 days prior to tumor induction and after that the treatment was lasted for 20 days. Against squamous cell carcinoma induced by MCA, Bujeonhangamtang decreased not only the frequency of tumor production but also the number and the weight of tumors per tumor bearing mice (TBM). Bujeonhangamtang also significantly suppressed the development of 3LL cell and S180 cell-implanted tumors in occurrence-frequency and their size, and some developed tumors were regressed by the continuous treatment of Bujeonhangamtang extract into TBM. In vitro, treatment of Bujeonhangamtang extract had no effect on the growth of some kinds of cell line such as FsaII, A431 strain but significantly inhibited the proliferation of 3LL, S180 cells and augmented the DNA synthesis of mitogen-activated lymphocytes. Bujeonhangamtang also stimulated the migrative ability of leukocyte, the MIF and IL-2 production of T lymphocytes, but not IL 6 production of B cells. Bujeonhangamtang-administration to mice enhanced NK cells activities.

These results demonstrated that Bujeonhangamtang extract exhibited a significant prophylactic benefits against tumors and its antitumor activity was manifested depending on the type of tumor cells. And these results also suggested that effect of Bujeonhangamtang might be chiefly due to nonspecific

enhancement of NK cell activities and cell-mediated immune responses.

I. 緒 論

韓醫學에서 癌이라는 用語는 宋代《衛濟寶書》에서 最初로 記錄하고 있으나¹⁻³⁾ 이에 대한 皮相的 認識은 훨씬 以前으로 《內經》에 “腸覃”, “石瘕” 등의 用語에서 엿볼 수 있으며⁶⁾, 腫瘍 및 積聚·癥瘕·疝癖·癭瘤·石癰·石疽 등을 癌의 範疇에 包含시킬 수 있다⁴⁻⁵⁾.

癌은 細胞分裂을 調節하는 機能의 缺陷이나 惡性腫瘍遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失됨으로써 發生하는 非正常的 細胞의 增殖을 말하는데, 電離放射線, 담배, 飲酒 및 바이러스, 長期間 多量의 藥物服用, 食餌의인 問題, 寄生蟲疾患 等과 함께 飲食·水質·大氣 等的 環境汚染과 복잡한 産業社會에서의 各種 精神心理的 스트레스 等으로 發生한다^{8,9,10)}고 인식하고 있다.

癌의 治療방법을 보면, 韓醫學에서는 正氣補養을 爲主로 하면서 淸熱解鬱法, 軟堅散結法 및 活血化瘀法 等を 널리 使用하고 있고^{1,3,11,12)}, 西醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法와 遺傳子療法 等を 使用하고 있다¹³⁻²²⁾. 그러나 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法와 遺傳子療法 等이 癌腫에 따른 感受性의 差異, 治療 後 經過에 副作用이 따르는 等 많은 問題點을 안고 있어 副作用이 輕微하고 抗腫瘍 效果가 우수한 새로운 天然產物의 開發에 關心을 갖고 있는 實情이다²³⁻²⁸⁾.

최근 中國에서 西醫學의 癌治療法과 並行하여 韓藥材를 活用함으로써 癌治療의 效率을 높이고 生存率을 增加시키며, 西醫學의인 癌治療로 인한 副作用을 줄이고 있는 實情²⁹⁻³³⁾을 勘案할 때, 우리나라에서도 韓醫學의인 癌治療法 및 補助的인 療法의 開發이 요구된다.

韓藥材의 抗癌效果에 대한 研究로는 韓藥單一藥物의 抗癌效果에 대한 實驗的 報告³⁴⁻³⁹⁾와 複合製劑에 대한 研究⁴⁰⁻⁴²⁾가 있고, 癌의 治療法에 관해서는 扶正이 爲主이고, 祛邪는 補助的인 治療法⁵⁾이라고 하였다.

이에, 著者는 腫瘍의 治療에 使用되는 扶正抗癌湯이 細胞의 增殖과 機能에 影響을 주는 生物反應變造製 (biological response modifier, BRM)로서 作用할 수 있을 것으로 생각되어 扶正抗癌湯의 BRM으로서의 作用 여부와 抗腫瘍 效果 여부를 實驗的으로 糾明하고자 한다. 本實驗에서는 마우스를 對象으로 強力한 發癌性 化學物質인 3-MCA로 腫瘍을 誘導하고, 또한 leukemia cell line인 3LL cell과 sarcoma cell line인 S180 cell을 皮下에 移植하여 腫瘍의 發生을 誘導하면서 癌 發生 및 그 經過에 미치는 扶正抗癌湯 抽出液의 影響을 評價하고, 同時에 그 免疫調節作用을 究明하기 위하여 癌腫細胞의 試驗管内 增殖에 미치는 影響과 試驗管内 및 生體免疫反應에 미치는 影響을 測定 評價하였던 바 有意性이 있었기에 그 結果를 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 材

實驗에 使用한 藥材는 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 후 精選하여 使用하였다. 扶正抗癌湯은 健脾, 益氣, 祛痰, 補腎, 抗癌하는 治療效果를 갖는 藥物로 構成되어 있으며 扶正

祛邪하는 處方으로 1貼分量은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Prescription of *Bujeonghangamtang*

韓藥名	生藥名	用量(g)
黃芪	Rhizoma Coptidis	15
人蔘	Radix Ginseng	8
白朮	Rizoma Atractylodis Macrocephalae	6
陳皮	Pericarpium citri Nobilis	4
半夏(薑製)	Tuber Pinelliae	4
女貞子	Fructus Ligustri	8
白何首烏	Radix Polygoni Multiflori	8
薏苡仁	Semen Coicis	8
破故紙	Semen Psoraleae	6
龍葵	Herba Solani Nigri	12
榆根白皮	Cortex Ulmi Pumilae	6
甘草	Radix Glycyrrhizae	4
鬼箭羽	Lignum Suberalatum Euonymi	15
Total amount		104

2) 動物

實驗目的에 따라 生後 7-8週된 ICR마우스와 C57BL/6 마우스를 암수 區別없이 使用하였고 實驗群 및 對照群은 항상 同性(sex-matched)으로 하였다. 이들에 물과 飼料를 자유로이 供給하면서 1週이상 實驗室 環境(溫度는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 濕度는 40-60%, 12시간 間隔의 明暗調節)에 適應시킨 후 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

扶正抗癌湯 粉末 416g을 5,000ml 환저파라스 크에 蒸溜水 3000ml와 함께 넣고 冷却器를 附

着시켜 重湯으로 2時間동안 加熱하여 濾過한 후 rotary vaccum evaporator에서 200ml로 減壓 濃縮하고 濃縮된 試料를 凍結乾燥器(freeze dryer)를 利用하여 乾燥한 후 52.5g의 試料를 얻어 必要한 濃度로 溶解하여 使用하였다.

2) 細胞의 準備

單核細胞의 準備는 마우스의 扁桃腺 또는 脾臟에서 각각 얻어 이를 Hank's balanced salt solution(HBSS, irvin Scientific)에서 조심스럽게 teasing하여 細胞 浮遊液을 만든 다음 통상의 Ficoll-Diatrizoate(Pharmacia) 농도구배법에 의하여 單核細胞만을 分離하고 이를 HBSS로 세척한 후 2mM의 glutamin과 $80\mu\text{g/ml}$ 의 gentamicin 그리고 우태아혈청(FCS, Gibco)이 함유되어 있는 RPMI 1640(이하 RPMI라 약함)에 $2 \times 10^6\text{cells/ml}$ 의 濃度로 浮遊하여 만들었다.

림프구 分離는 사람 扁桃腺으로부터 얻은 單核細胞를 plastic culture dish($10 \times 20\text{mm}$, costar)에 넣어 37°C 에서 1시간씩 2회 放置하여 單核球의 附着을 誘導, 除去한 후 2-aminoethylisothiouronium bromide(AET, Sigma)로 처리된 綿羊赤血球(AET-SRBC)를 利用한 rosette形成法을 使用하였다. 이 때 SRBC와 rosette를 形成한 細胞를 T細胞로, 그리고 non-rosette細胞를 B細胞로 看做하였다. 이와 같이 준비한 T 및 B細胞는 각각 RPMI에 $1 \times 10^6\text{cells/ml}$ 로 浮遊하여 使用하였다.

한편, 本 實驗에 使用한 細胞柱는 本 教室에서 계대중인 S180, 3LL, A431, Yac1 등의 細胞들 로 이들 細胞를 RPMI에 浮遊하여 使用하였다.

3) 腫瘍의 誘導

扶正抗癌湯 抽出液(1mg/ml)을 腹腔內로 7일간 投與한 마우스 群(實驗群)과 扶正抗癌湯 抽出液 대신 同量의 生理食鹽水를 同一期間 投與한

마우스 群(對照群)으로 나누어 發癌物質誘導-腫瘍發生 實驗과 癌腫細胞 移植-腫瘍發生 實驗에 使用하였다. 發癌物質誘導-腫瘍發生 實驗은 Lee 等⁴⁴⁾의 方法대로 acetone에 溶解시켜 製造成한 0.4% 3-methylcholanthrene (MCA, Eastman Kodak)溶液 0.2ml를 각 마우스의 면도된 背部皮膚에 週 3回씩 2個月間 日週期 變動(diurnal variation)을 除去하기 위하여 午前 11-12時 사이에 局所塗布하여 癌發生을 誘導하였다.

癌腫細胞 移植에 의한 腫瘍發生 實驗은 Moorikawa 等⁴⁵⁾의 方法대로 대수증식기의 leukemia cell line인 3LL, sarcoma cell line인 S180 細胞(각각 1×10^6 cells/mouse)를 면도된 背部皮下에 利殖시켜 腫瘍發生을 誘導하였다.

扶正抗癌湯 抽出液의 癌發生 豫防效果 判定은 腫瘍誘導에 의하여 형성된 응어리(mass)를 肉眼的으로 觀察한 후 各群別 腫瘍發生率, 마우스 當 發生된 腫瘍의 크기 등을 經시적 方法으로 測定하였다.

4) 細胞柱의 增殖能 測定

MTT assay法⁴⁶⁾으로 測定하였다. 즉 대수증식기의 A431, S180, 3LL 및 Fsa II 細胞를 RPMI에 각각 1×10^5 cells/ml이 되도록 浮遊하여 그 浮遊液의 0.1 ml를 round-bottomed microculture plate의 각 well에 넣은 후 여기에 여러 濃度의 扶正抗癌湯 抽出液을 添加하여 well 當 總量이 0.2 ml씩 되도록 調整하여 37°C, 5% CO₂ 培養器에 넣어 20時間 培養하였다. 그 후 10 μ l의 MTT (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, 5mg/ml in saline)를 각 well에 가하고 plate를 aluminium foil로 밀폐하여 4시간 부치하여 formazan crystal 形成을 誘導하였다. 이어 plate를 275 × g 에서 5분간 遠心分離하여 上層을 조심스럽게 除去하고 formazan crystal을 溶解하기 위하여 150 μ l의

dimethylsulphoxide(DMSO, Sigma)를 가하여 5-15분 동안 흔들어서 完全溶解시켰다. 이어 microplate spectrophometer (TOYO)를 이용하여 540nm波長에서 吸光度를 測定하였다.

5) NK細胞의 活性化 測定

Lee 等⁴⁴⁾이 應用한 single cell level assay方法에 準하여 實施하였다. 1% agarose(electrophoresis grade, Grand Island Biological Co)를 蒸溜 高壓滅菌한 후 45°C 항온조에 保管하고 여기에 2배 濃度의 RPMI를 同量 加하여 0.5% agarose液을 만들었다. 그 후 이를 2ml의 pyrex試驗管에 分注하여 40°C 항온조에서 液狀을 維持하면서 實驗에 使用하였다. 作動細胞로는 여러 濃度의 扶正抗癌湯 抽出液으로 1時間 동안 前處理한 마우스의 脾臟細胞를, 標的細胞로는 마우스의 lymphoma cell line인 Yac1 細胞를 使用하였는데 이들 細胞의 濃度를 5×10^6 cells/ml가 되도록 하고 混合한 後 즉시 0.2 ml씩을 미리 0.2% agarose로 coating한 조직배양용 plastic plate(Falcon)에 分注하여 均等하게 퍼지도록 한 후 室溫에서 약 2분간 방치하여 응고시켰다. 여기에 agarose의 乾燥를 防止하기 위하여 RPMI 1640 1 ml를 증충시켜 37°C, 5% CO₂ 培養器에서 3시간동안 恒溫 培養하였다. 아울러 作動細胞 또는 標的細胞만을 單純 分注한 뒤 대조 평판에 함께 培養하였다. 3시간 배양 후 agarose 平판에 증충시켰던 배지를 除去하고 0.1% trypan blue sol 2 ml을 부어 室溫에서 5분간 染色한 다음 染色液을 除去하고 다시 5 ml의 RPMI 1640을 각 平板에 加하여 5분간 脫色시켰다. 그 후 平板내의 RPMI를 除去하고 2% formalin이 含有된 食鹽水 1 ml를 加하여 細胞를 固定시킨 후 400倍率로 檢鏡하여 conjugated cell에 대한 염색된 표적細胞의 백분율을 計算하였는데, 다음 公式에 의하여 NK 細胞의 百分率을 구하였다.

% of NK cells = % of conjugated lymphocytes
 × % of conjugated target
 cells lysed/100

6) 足蹠腫脹反應 檢査와 凝集素 역가 測定

本 實驗에서는 綿羊赤血球(SRBC)를 抗原으로 使用하였다. SRBC는 綿羊의 頸靜脈으로부터 採血하여 同量의 Alsever's(pH 6.1) solution을 加하여 4℃에 보존하면서 2週日이내의 것을 使用하였다. 免疫 誘導는 SRBC부유액(1×10^8 cells/ml) 0.1ml를 小鼠의 尾靜脈內에 注射하여 實施하였으며, 足蹠腫脹反應 檢査는 면역 4일에 20% SRBC부유액 0.03ml를 左側足蹠皮內에 沾하고 24시간 및 48시간에 足蹠腫脹度를 microcaliper로 測定하여 腫脹度를 評價하였다. SRBC에 對한 응집소 역가 測定은 SRBC로 沾한 7일에 小鼠 眼窩部에서 採血하여 血清을 분리한 다음 微細滴定(microtitration)法⁴⁸⁾으로 실시하였다. 이 때 扶正抗癌湯 抽出液이 足蹠腫脹反應 및 抗體生産能에 미치는 影響을 評價하기 爲해서 各群의 小鼠에 扶正抗癌湯 抽出液(1mg/mouse)을 SRBC로 小鼠를 沾하기 前, 後 4일간 腹腔內에 投與하였다.

7) Lymphokine 生産

준비된 單核細胞(2×10^6 cells/ml)로부터 IL-2를 生産하기 爲해서는 Con A-sepharose(10 μ g/ml, Sigma)로, IL-6生産을 爲해서는 SAC(0.0075% v/v)으로 자극하여 37℃, 5% CO₂ 培養器에서 40시간동안 培養하였다. 이것을 500 \times g로 遠心分離하여 上清液을 取하였다. 扶正抗癌湯 抽出液은 培養初期에 添加하였으며, 上清液內의 역가 檢定은 後述한 바와 같은 方法으로 各 lymphokine에 對應하는 細胞를 標的細胞로 하여 實施하였다.

IL-2 역가 檢定 : IL-2依存性 細胞는 本 教室에서 繼代保存중인 小鼠로부터 얻은 T細胞柱인 CTLL2를 使用하였다. 역가 檢定은 繼代중인 이들 細胞를 RPMI로 3회 遠心分離하고 洗滌한 다음 RPMI에 5×10^4 cells/ml의 濃度로 浮遊하여 그 0.1ml를 flat bottomed culture plate의 各 well에 넣었다. 이어 各 well에 系列 稀釋한 上記 Con-A 자극 細胞 培養液을 0.1ml씩 加하여 總量이 well 當 0.2ml되게 하여 37℃, 5% CO₂ 培養器에서 24시간동안 培養하였다. [³H]TdR의 pulse測定은 培養終了 4時間 前에 實施하였으며, pulse의 量, harvest 및 counting 方法은 單核細胞 增殖能 測定에서와 같은 方法으로 實施하였다.

IL-6 역가 檢定 : IL-6 依存性 細胞는 日本 Riken cell bank에서 분양받은 MH60BSF2 細胞를 使用하였다. SAC 刺戟細胞 培養液內의 IL-6 역가 檢定은 IL-2 역가 檢定에서와 동일한 수준으로 實施하였다.

8) 統計處理

統計處理는 unpaired test에 準하였고, 實驗值의 表現은 平均 標準誤差로 하였으며, p-value가 最大値 0.05以下인 境遇를 有意한 것으로 判定하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 扶正抗癌湯 抽出液이 MCA로 誘導한 腫瘍發生에 미치는 影響

實驗群의 小鼠와 對照群의 小鼠의 등쪽 피부에 MCA를 局所塗布하여 squamous cell carcinoma의 發生을 誘導한 후 腫瘍發生率을 測定하였다. 腫瘍小鼠(TBM)當 腫瘍의 數 및

腫瘍의 무게를 測定한 結果는 Table 2 와 같았다. 즉, 對照群의 腫瘍發生率(46%), TBM當 腫瘍의 數(1.7개), 腫瘍의 무게(9.8mg)에 비하여 實驗群에서의 腫瘍發生率(34%), TBM當 腫瘍의 數(1.3개), 腫瘍의 무게(7.2mg)가 각각 對照群에 비하여 MCA로 유도된 癌發生 뿐만 아니라 발생된 癌腫의 增殖에 있어서 低下되어졌음을 보여주었다.

Table 2. Effect of Bujeonhangamtang(BHT) extract on the tumorigenesis 9 weeks after the first MCA-application to Balb/c mice

Group	Saline	BHT-extract
No. of mice	50	60
Incidence of tumor(%)	23(46)	7(34)
No. of tumor per TBM	1.7	1.3
Wt. per tumor(mg)	9.8±0.9	7.2±0.6
Wt. per largest tumor(mg)	15.9±1.1	12.3±0.8

Smear of 2ml 3-methylcholanthrene(MCA) in 0.04% acetone on the shaved back skin, three times a week for 9 weeks with or without concomitant i.p. injection of 1mg of Bujeonhangamtang extract.

2. 扶正抗癌湯 抽出液이 癌腫細胞 移植에 의한 腫瘍發生에 미치는 影響

實驗群과 對照群 마우스에 3LL, S180 細胞를 面刀된 背部 皮下에 移植시킨 후 나타나는 腫瘍의 크기를 測定하였다. 그 결과 3LL 細胞를 移植하였던 경우에는 Table 3에서 보는 바와 같이 對照群에 비하여 實驗群에서 腫瘍發生率 뿐만 아니라 腫瘍의 크기가 減少되었다. 그 減少의 程度는 實驗群 A에서보다 實驗群 B에서 더욱 減少되었다. 특히 實驗群의 일부 腫瘍마우스에서는 觀察期間 동안 腫瘍이 消失되기도

Table 3. Effect of Bujeonhangamtang(BHT) extract on the implanted s.c. with 3LL tumor induction in mice

Days after implantation	Group	% of induction	Tumor size
5	CONT	79.9	51.3±3.1
	BHT-A	62.3	44.5±2.6
	BHT-B	51.9	36.1±2.5*
10	CONT	83.2	94.2±4.2
	BHT-A	71.7	85.2±4.3
	BHT-B	50.5	76.4±35*
15	CONT	88.9	197.6±8.2
	BHT-A	76.3	169.3±7.4
	BHT-B	46.3	127.8±8.

Leukemia 3LL cells (1×10^6 cells/mouse) were s.c. implanted into mice and then the frequency of tumor induction and tumor size were recorded at the various time interval after implantation. Group:

CONT : non-Bujeonhangamtang control mice
BHT-A : 7 days Bujeonhangamtang pretreated mice

BHT-B : 7 days Bujeonhangamtang pretreated and for more 14 days of the treatment of Bujeonhangamtang to mice.

The tumor size was measured as follows : major axis(mm²) × minor axis(mm²) / 2.

The value represent the mean ± SE. * : p value 0.05 vs control group

하였다. 한편, S180 細胞 移植에 의한 腫瘍發生率은 Table 4에서 보는 바와 같이 實驗群에서 腫瘍發生率 및 腫瘍의 크기가 對照群의 腫瘍發生率과 腫瘍의 크기에 비하여 低下되었다.

Table 4. Effect of Bujeonhangamtang(BHT) extract on the S180 implanted tumor production in mice

Days after implantation	BHT-treatment	% of induction	Tumor size
5	-	80	66.1±4.4
	+	60	55.1±3.5
10	-	100	142.1±5.3
	+	80	116.1±5.3
15	-	100	174.4±6.1
	+	80	143.5±6.5

Mice received Bujeonhangamtang extract(daily 1mg/mouse for 7 days) or saline(as a control) were s.c. implanted S180 cells(5×10^6 cells/mouse) and then at the various time interval, the frequency of tumor induction was observed and the size of tumors was measured as follows :

Tumor size = major axis(mm²) × minor axis (mm²)/2.

The value represent the mean ± SE. * : p value 0.05 vs control group

3. 扶正抗癌湯 抽出液이 試驗管内 細胞柱의 增殖에 미치는 影響

계대중인 대수증식기의 각 細胞柱를 扶正抗癌湯 抽出液(10 μ g/ml)의 存在下에서 20時間동안 培養한 結果는 Table 5 와 같았다. 즉 A431 細胞의 增殖은 扶正抗癌湯 抽出液 존재하에서 86.3%로 큰 影響을 받지 않았으며, FsaII 細胞는 扶正抗癌湯 抽出液을 첨가함에도 불구하고 그 增殖이 97.3%로 거의 增殖에 影響을 끼치지 못하였다. 그러나 3LL 및 S180 細胞는 扶正抗癌湯 抽出液을 培養器에 添加함으로써 그 增殖이 각각 79.8% 및 73.1%로 억제되었다.

Table 5. Effect of Bujeonhangamtang(BHT) extract on the proliferation of various cell strains in vitro.

Cell strains	% of control
A431	86.3
Fsa II	97.3
3LL	79.8
S180	73.1

Each cell strains(2×10^5 cells/ml) was cultured in the presence of Bujeonhangamtang extract(10 μ g/ml) for 20 hrs. The proliferation responses of each cultured cells were measured by MTT assay, and normalized as % of control.

4. 扶正抗癌湯 抽出液이 NK細胞 活性에 미치는 影響

마우스의 脾臟細胞(1×10^6 cells/ml)를 扶正抗癌湯 抽出液(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml)으로 1 시간 동안 處理한 다음 洗滌하여 同量의 標的 細胞(Yac1)와 混合한 후 作動脾臟細胞의 標的 細胞에 대한 NK細胞 活性度를 測定한 結果는 Table 6 과 같았다. 즉, 扶正抗癌湯 抽出液을 處理함으로써 對照群에 비하여 作動細胞의 標的 細胞와의 結合能 뿐만 아니라 結合된 標的 細胞의 殺害能이 充進되어 NK細胞의 活性度는 增加되었다. 특히 100 μ g/ml의 扶正抗癌湯 抽出液 濃度를 投與한 實驗群에서 對照群의 NK細胞 活性度보다는 약 43%정도 增加되었다.

5. 扶正抗癌湯 抽出液이 足蹠腫脹反應과 抗體生産能에 미치는 影響

扶正抗癌湯 抽出液이 生體內 免疫反應에 미치는 影響을 評價하기 위하여 마우스를 綿羊赤血球(SRBC)로 免疫하고 扶正抗癌湯 抽出液을 免疫前 및 後 각각 4일 동안 投與한 후 足蹠腫

Table 6. Effect of Bujeonghangamtang(BHT) extract on NK cell activity of mouse splenocytes against target cell(Yac1)

BHT-extract ($\mu\text{g/ml}$)	% of conjugated lymphocytes	% of conjugated target cell lyzed	% of NK cells
None	2.3 ± 0.2	55.1 ± 3.3	1.26
1	2.8 ± 0.3	58.2 ± 3.4	1.62
10	3.1 ± 0.2	59.9 ± 3.8	1.86
100	2.9 ± 0.3	62.3 ± 3.5	1.81

The results are the average percent and standard error of the value from ten to six experiments below for 1:1 effector-target ratio. Effector cells treated for 1 hr at 37°C with above concentration of Bujeonghangamtang extract just before the addition of target cells.

Percent of NK cells was calculated from % of conjugated lymphocytes \times % of conjugated target cell lyzed/100.

Table 7. Effect of Bujeonghangamtang(BHT) extract on footpad swelling reaction and antibody response of mice to sheep red blood cells

Group	Increase of thickness(1/1000mm)			HA titer(Log 2)
	Arthus reaction	DTH at		
		24hr	48hr	
Saline	34.8 ± 1.4	36.9 ± 1.7	17.7 ± 0.8	6.2
BHT-extract	$43.1 \pm 1.7^*$	$43.6 \pm 1.4^*$	$28.2 \pm 0.7^*$	6.8

Mice were sensitized i.v. with 107SRBC on day 0 and challenged(s.c.) 4 days later. Bujeonghangamtang extract(1mg/mouse) was administered i.p. for 4 days before and after sensitization.

* Titer at 7 days after 107SRBC(i.p.) sensitization

The value represent the mean \pm SE. * : p value 0.05 vs control group

脹度로 發現되는 Arthus 反應과 DTH 反應을 測定하고 血清내의 赤血球凝集抗體를 測定하였다. 그 結果는 Table 7 과 같았다. 즉, Arthus 反應, DTH 反應 및 抗體生産反應 모두 對照群에 비하여 實驗群에서 有意한 增加現象이 있었다.

IL-2 및 IL-6 生産을 誘導하면서 扶正抗癌湯 抽出液을 添加한 結果 扶正抗癌湯 抽出液이 이들 細胞의 lymphokine生産에 미치는 影響은 Table 8과 같았다. 즉, 扶正抗癌湯 抽出液은 Con A로 刺戟한 細胞의 IL-2 및 MIF生産能을 促進시켰으나, SAC로 刺戟한 細胞의 IL-6 生産能에는 影響을 크게 미치지 않았다.

6. 扶正抗癌湯 抽出液이 lymphokine 生産에 미치는 影響

마우스 脾臟細胞 및 사람편도 單核細胞를 Con A-sepharose 또는 SAC로 刺戟 培養하여

Table 8. Effect of Bujeonghangamtang(BHT) extract on mitogen-induced lymphokine production of human tonsillar mononuclear cells and mouse splenocytes

Cell source	BHT-extract($\mu\text{g/ml}$)	% of control	
		IL-2	IL-6
Human	1	135	106
	10	122	112
Mouse	1	139	100
	10	121	107

Results are normalized as % of control.

IV. 考 察

癌은 體內에서 發現되는 表面高低不平하고, 質이 堅硬하며 岩石과 같은 腫塊 등을 指稱하는 것으로, 韓醫學의으로는 積聚·癥瘕·疝癖·噎膈·反胃·癭瘤·石癰·石疽 등을 包含시킬 수 있다^{4,5}. 癌은 瘀血, 憂思忿怒의 情志 失常으로 인한 氣鬱血瘀, 飲食不節로 인한 宿滯食積, 酒色亂用으로 인한 陰不足 陽有餘 등에 의하여 氣血이 運行되지 않음으로써 經絡과 血脈이 阻滯되어 氣聚血凝하여 形成된다^{3,49,50}. 癌의 주된 症狀은 얼굴에 血色이 없고 無氣力하며, 全身倦怠感, 食慾不振, 消化不良, 惡心嘔吐, 心窩部飽滿感, 不眠, 脈細無力, 上腹部에 腫塊物 觸知 등 全身의, 局所的 症狀을 보이며^{1,2} 治療方向은 正氣補養 및 補血을 爲主로 하면서 破積, 活血, 解鬱, 行氣 등의 治法을 兼用하며, 현재 中國에서는 各種의 腫瘍 治療法으로 清熱解鬱法, 軟堅散結法, 活血化瘀法 및 扶正培本法 등을 利用하고 있다^{1,3,11,12}.

한편, 西醫學에서는 惡性腫瘍(malignant neoplasia)에 대하여 病理學的으로 癌이라 規定

하고 있으며, 빠른 浸潤性 成長과 體內 各部位로의 擴散 및 轉移와 같은 特異성을 지니고 있어 生命에 危險을 招來할 뿐만 아니라 現在 人類에게 있어서 가장 큰 危險性 있는 全身性 疾患으로 認識하고 있다. 바꿔 말하면 細胞分裂을 支配하는 調節機能의 缺陷이나 惡性腫瘍 遺傳子를 抑制하는 能力이 喪失됨으로써 發生하는 非正常的인 細胞의 增殖을 말한다^{1,8,9,10,51}.

이러한 惡性腫瘍을 治療하기 위하여 西洋醫學에는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法와 遺傳子療法 등을 使用하고 있으나, 手術療法와 放射線療법은 局所的인 治療法이기 때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 현재로서는 治療方法이 定立되어 있지 않은 狀態이며, 化學療법은 化學 藥材의 毒性 問題를 아직 解決하지 못하고 있는 實情이다^{13,22}. 즉, 外科的 處置法, 放射線 治療法, 化學療法, 免疫療法 등이 癌腫에 따른 感受性의 差異와 治療後의 經過 및 副作用이 각기 다르고, 또 治療에 많은 問題點을 안고 있기 때문에 副作用이 輕微하고 抗腫瘍 效果가 우수한 새로운 天然產物의 開發에 關心이 집중되고 있다. 왜냐하면 細胞의 分裂과 機能은 多樣한 種類의 外部刺戟에 의하여 調節되거나 變造되는데, 이 天然產物들은 그 外部刺戟 중의 하나로 알려진 생물반응변조제(biological response modifier, BRM)로써 取扱되어지는⁸⁸⁻⁹⁴ 同時에 일부 天然產物들은 그 構造와 生物學의 特性이 明確해지고 있기 때문이다⁸³⁻⁸⁷. 또한 이러한 天然產物들은 細胞分裂 및 機能의 變化에 關聯되어 抗腫瘍 效果를 나타내고 있고, 이들의 抗腫瘍 效果가 腫瘍細胞의 分裂을 직접적으로 抑制하거나 또는 癌을 가진 動物(tumor-bearing animal)의 免疫能을 增加시키는 것으로 밝혀지고 있다²³⁻²⁸. 現在까지 開發된 天然產物들은 癌 治療에 應用되어 抗腫瘍 效果를 보이

고 있으며, 특히 새로운 天然物質(BRM 또는 抗腫瘍 物質)의 抽出 및 開發과 관련된 材料로서 民間療法에서 使用되어진 傳統藥物을 選擇하여 肯定的이고도 成功的인 結果를 얻어내고 있는 趨勢이다. 현재 中國 等에서는 西醫學의 人 癌治療法과 并行하여 韓藥材를 활용하므로써 癌治療의 效率을 높이고 生存率을 增加시키며, 西醫學의 人 癌治療로 인한 副作用을 줄이고 있지만²⁹⁻³³⁾, 國內에서는 抗腫瘍 效果 또는 BRM 效果가 있을 것으로 알려진 많은 傳統藥物들이 있음에도 불구하고 이들에 대한 體系的인 檢討가 없었을 뿐만 아니라 실제로 그러한 藥物들이 어떤 種類의 生物學的인 特性을 가지고 있는지에 대한 研究가 거의 이루어지지 않은 實情이다. 즉, 天然產物에 대한 BRM의 作用을 究明하기 위하여 現在 中國 等에서는 單一藥物을 利用하여 활발히 研究를 하고 있고, 또 複合劑에 대한 研究도 이루어지고는 있지만 複合劑에 대한 實驗的 研究는 아직 未洽한 狀態이다. 따라서 複合製材인 扶正抗癌湯의 抗腫瘍 效果와 그에 따른 BRM의 作用 등을 살펴봄으로써 免疫調節機能에 있는지에 대하여 研究하고자 한다.

抗癌劑의 抗癌效果 程度를 檢査하는 方法으로는 藥劑에 의하여 惹起되는 細胞毒性을 測定하는 5가지 方法이 있는데⁷⁵⁻⁷⁹⁾, 그 중 細胞의 形態 變化觀察로써 細胞를 藥劑에 露出시킨 후 發生되는 形態學的 變化를 현미경을 통하여 藥劑의 效果程度를 決定하는 方法과 dye exclusion assay 方法 및 Cr release assay 方法이 있으나 現在는 使用되고 있지 않고, 細胞 代謝의 妨害程度를 測定하는 方法, 細胞內 放射線 同位元素의 流入妨害 程度를 測定하는 方法, stem cell assay 方法 등이 있다. 그 중 stem cell assay 方法은 clonogenic assay 方法이라고도 稱하는 것으로 이는 細胞를 藥劑에 露出시킨 후 soft agar에

single cell suspension으로 培養하여 그 細胞의 分裂 增殖 能力을 測定하는 方法이다. 이 方法은 1971年 Park⁸⁰⁾ 등이 마우스 骨髓腫 細胞에 대한 stem cell assay 方法을 施行해 본 結果 in vivo 에서의 結果와 一致하여 그 이후로는 腫瘍細胞에 대한 抗癌劑의 藥劑 感受性檢査에 많이 使用되고 있으므로 본 實驗에서도 癌腫細胞의 成長抑制 實驗인 MTT assay와 同時에 免疫學的 方法인 NK cell의 活性度, 單核細胞의 增殖能 및 lymphokine의 生成度를 觀察하였다.

本 實驗에 使用한 扶正抗癌湯은 健脾, 益氣, 祛痰, 補腎, 抗癌하는 治療效果를 가지며 그 構成藥物의 主治, 效能과 抗癌 免疫 增強作用에 대해 살펴보면 다음과 같다.

黃芪는 益胃固表, 利水消腫, 托毒生肌하고 補中益氣하는데, 다른 藥物과 配合하여 多種癌症의 扶正治療에 使用한다. 癌手術後發熱, 膀胱癌, 食道癌, 胃癌, 原發性肝癌, 肺癌, 縱膈腫瘤에 效果가 있으며 機體免疫機能을 增加시킬 수 있고, 抗體生成을 促進하며, 肝臟을 保護하고, 血細胞를 增加시킨다^{71,73)}.

人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神하며 食道癌, 肺癌, 胃癌中晚期, 子宮頸部癌, 乳房癌에 效果가 있으며 體液免疫을 增加시킨다⁷³⁾.

白朮은 補氣健脾, 燥濕利水, 止汗安胎하고 消化管癌, 多發性骨髓癌, 惡性淋巴腫, 肝癌, 胃癌, 食道癌, 肺癌, 女人乳房癌初期, 腎臟癌을 治療하며, 大食細胞系統機能을 增加시킨다^{71,73,96)}.

陳皮는 理氣調中, 燥濕化痰하는 作用을 하며 각종 腫瘤에 대해 一定한 程度의 緩解作用이 있다. 胃癌, 原發性肝癌, 鼻咽癌, 晚期骨肉腫를 治療하고 免疫機能을 增強시킨다^{73,96)}.

半夏는 燥濕化痰, 降逆止嘔, 消痞散結하며, 子宮頸部癌과 食道癌, 胃癌, 舌癌, 惡性淋巴腫, 賁門癌을 治療한다^{71,73,74)}.

女貞子は 强心利尿, 滋補肝腎, 烏髮明目, 强腰膝의 作用을 한다. 女貞子の 水浸劑는 移植性腫瘤의 生長을 抑制하는 作用이 있고 膀胱癌, 肺癌, 甲状腺癌의 骨轉移, 胃癌, 鼻咽喉癌, 惡性淋巴腫에 應用한다. 體液免疫增強 作用도 있다^{73,96)}.

白何首烏는 補肝益腎, 養血去風한다. 肺癌, 骨癌, 腦腫瘍, 甲状腺癌, 白血病을 治療하며 免疫增強 作用이 있다^{73,96)}.

薏苡仁은 健脾補肺, 清熱利濕하며 肺癌, 腸癌, 胃癌, 子宮頸部癌, 絨毛膜上皮癌, 鼻咽喉癌, 乳房癌 等を 治療하는 데 比較的 좋은 治療效果가 있다⁷³⁾.

破故紙는 補腎壯陽, 固定縮尿, 溫脾止瀉한다. 抗腫瘤作用이 있으며 骨癌, 白血球減少症에 治療效果가 뚜렷하고 白血病, 甲状腺腫瘍, 骨癌을 治療한다. 大食細胞系統機能을 增加시킨다^{73,96)}.

龍葵는 清熱解毒, 活血消腫하는 效能이 있으며 子宮頸部癌, 胃癌, 肺癌, 肝癌, 膀胱癌 등 多種癌症에 대해 特殊한 治療效果가 있다⁷³⁾.

榆根白皮는 利水, 通淋, 消腫하고 乳房癌을 治療한다⁹⁷⁾.

甘草는 緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하고, 中氣不足에 使用하며 絨毛上皮癌, 食道癌, 脊髓腔腫瘍, 食道癌, 胃癌, 舌癌, 肺癌, 乳腺癌을 治療하는 데 利用한다. 또한 鎮痛作用이 있어 癌性疼痛을 除去하는 데 補助作用을 할 수 있고 免疫增強作用이 있다^{73,74,96)}.

鬼箭羽는 行血通經, 散瘀止痛破血, 殺蟲하는 作用이 있고 惡性葡萄胎, 胃癌, 肝癌 等に 一定한 治療效果가 있다⁷³⁾.

最近 抗腫瘍 效果에 대한 韓醫學의 研究報告로는 金^{34,39)} 등이 人蔘과 鹿茸 그리고 白朮 甘草 魚腥草 等の 單一藥物을 使用하여 抗體生産 抑制의 緩和와 抗癌 效果가 있을 뿐만 아니라

正常 免疫細胞에 대해서도 毒作用을 나타내지 않는다고 報告하였고, 金^{40,41)} 은 伏梁丸과 肥氣丸 등이 各種 癌細胞柱에 대하여 抗癌效果가 있었음을 밝혔으며, 韓⁴²⁾은 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫 患者에서 抽出한 癌細胞에 致死效果가 顯著하였다고 報告하였고, 厲⁵⁾는 癌의 中醫治療에 대한 報告에서 扶正이 主이고, 祛邪는 補助的인 治療法이라고 하였다.

이에, 著者는 腫瘍治療에 使用하고 있는 扶正抗癌湯의 水溶性 抽出液을 얻은 후 抗腫瘍 및 免疫調節 作用을 평가하여 腫瘍 治療劑로서의 科學的 證據를 提示하고, 臨床活用度를 높이고자 本 實驗을 실시하였다.

本 實驗에서 扶正抗癌湯 抽出液을 마우스에 投與한 實驗群에서는 MCA로 誘導한 腫瘍과 3LL 細胞 및 S180 細胞의 이식에 의한 腫瘍의 發生率, 그리고 移植에 의하여 發生된 腫瘍의 크기 등이 減少되었다(Table 2, 3, 4). 이와같은 實驗 結果를 살펴 보면 扶正抗癌湯 抽出液의 存在下에서 3LL 細胞 및 S180 細胞의 시험관 내 增殖이 抑制되었고, A431 細胞의 增殖에 있어서는 큰 影響을 미치지 않는 實驗結果(Table 5) 등으로 미루어 볼 때 적어도 扶正抗癌湯 抽出液의 抗腫瘍作用은 癌腫特異性을 보이고, 또한 感受性있는 癌腫細胞에는 直接的으로 影響을 미쳐 그 增殖이 抑制되었을 可能性이 있다고 思料된다.

細胞性 免疫反應에서 重要的 役割을 하는 作動細胞 중 NK細胞는 여러 腫瘍에 대해서 自然 殺害能을 보이는데, 그 중 T細胞의 非依存性 免疫감시기전에서는 바이러스 및 細菌에 感染된 細胞를 破壞하는 活性을 가지고, IL-2 및 interferon 등에 의해서 活性이 增加된다^{46,48)}. NK細胞가 標的細胞를 破壞하는 機轉에 관해서는 아직 확실히 알려져 있지는 않으나, 첫째로 標的細胞를 認識하는 時期, 둘째로 融解機

轉을活性化시키는時期, 세째로 NK cell의 lymphotoxin이遊離되는時期, 네째로 標的細胞의死滅期로나눌수있다⁸¹⁾. 本實驗에서扶正抗癌湯抽出液으로前處理하였을때NK細胞에있어서標的細胞와의結合能은물론結合된標的細胞의融解能이促進된結果(Table 6)를볼때,扶正抗癌湯抽出液이NK細胞의標的細胞破壞4段階全體를充進시킨結果로認定된다.

扶正抗癌湯抽出液이生體內에서特異抗原에대한細胞性및體液性免疫反應에미치는直接的인影響을評價하고자마우스를對象으로T細胞의依存性抗原인綿羊赤血球로免疫하고足蹠腫脹反應으로發見되는DTH反應과Arthus反應그리고血清內抗體의體液性免疫反應을測定하였다.그結果(Table 7),Arthus反應,DTH反應그리고抗體生成反應모두扶正抗癌湯抽出液을投與한實驗群에서充進되었다.이와같은結果로볼때生體免疫反應은大食細胞,T및B細胞,그외數種의細胞,그리고여러因子에의하여左右되는複雜한現象이기때문에本實驗成績만으로는扶正抗癌湯抽出液의免疫反應充進機轉을설명할수는없지만,T림프구로부터IL-2生產을充進시킨結果(Table 8) 등으로미루어볼때扶正抗癌湯抽出液의免疫反應充進作用이주로抗原감작기에서發顯되었으리라생각되며이에대한研究가要望된다.또한扶正抗癌湯抽出液의抗腫瘍作用機轉에대하여서는扶正抗癌湯抽出液이NK細胞의活성에미치는影響(Table 6),生體內Arthus反應,DTH反應및赤血球凝集抗體의免疫反應(Table 7),그리고lymphokine生成能(Table 8) 등을充進시킨實驗結果를미루어볼때扶正抗癌湯抽出液이腫瘍마우스에非特異的인免疫活성을促進시켰음은물론腫瘍에대한作用이發顯되었을가능성도생각할

수있다.따라서앞으로多様な癌腫細胞에대한扶正抗癌湯抽出液의抗腫瘍作用과腫瘍動物에서의扶正抗癌湯抽出液投與에의한生體生理現象의變化,生理活性物質의本態등을밝히기위한보다具體적이고廣範圍한研究를하여새로운抗腫瘍治療劑로서韓醫藥의可能性을探索하여야할것으로생각된다.

Morgan等⁹⁵⁾에의해서最初로發見된IL-2는T림프구增殖因子로서주로抗原特異的및非特異的인刺戟을받은CD4細胞및large granular lymphocyte(대과립성림프구)에서生産되는lymphokine의一種이며,그機能은T림프구의成長이외에도B細胞의分裂因子誘導,細胞毒性림프구와NK細胞및大食細胞 등의增殖과活性等에도關與하고,또生産機轉에서는IL-2受用體의發顯活性和autocrine system에의하여增幅된다.本實驗에서림프구를Con A로刺戟培養시켜扶正抗癌湯抽出液을加하면IL-2의生成能이促進되었는데,이와같은結果는扶正抗癌湯抽出液이T細胞의特定亞集團에作用하여細胞柱를IL-2에感受성이높은細胞柱로變化시켜서IL-2의autocrine system이增幅되거나또는扶正抗癌湯抽出液에의하여T細胞의表面이수식되어IL-2및타lymphokine에대한感受성이促進되었으리라생각할수있다.또한IL-2의生成은calcium mobilization과protein kinase C의活性이同時에이루어질때最大의活性을보인다고보고⁹⁵⁾한것을미루어볼때扶正抗癌湯抽出液이IL-2의生成에關與하는細胞의signal transduction을變造시킴으로써活性化되었다고生覺할수있으나本實驗結果만으로는이를立證할수없어이에대한研究가要望된다.

이상의實驗結果,그作用機轉은不分明하나扶正抗癌湯抽出液이腫瘍細胞에直·間接的으로作用하여抗腫瘍作用을보이고,이와같

은 抗腫瘍作用은 癌腫에 따라 다르게 發顯되었음을 알 수 있었다. 또한 扶正抗癌湯 抽出液은 生體免疫反應 뿐만 아니라 시험관내에서 免疫關與細胞의 活性에도 作用하는 重要的 免疫調節劑임을 알 수 있어 그 有效成分 究明은 물론 具體的인 作用機轉이 밝혀진다면 앞으로 腫瘍治療에 寄與하는 바가 크리라고 생각된다.

V. 結 論

扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果 및 그 機轉을 研究 立證하고자 MCA로 腫瘍을 誘導하고 leukemia cell line인 3LL 細胞와 sarcoma cell line인 S180 細胞를 마우스의 背部皮下에 移植함으로써 發生되는 腫瘍의 發生率과 發生한 腫瘍의 크기 등을 評價하고, 同時에 生體內 免疫過敏性 反應인 Arthus 反應 및 DTH 反應, 그리고 抗體生產能, 試驗管内 NK細胞의 活性度, 림프구의 lymphokine 生産能 등을 觀察하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 扶正抗癌湯 抽出液은 MCA로 誘導한 腫瘍의 發生率과 發生된 腫瘍의 크기를 減少시켰다.
2. 扶正抗癌湯 抽出液은 3LL 細胞 및 S180 細胞 移植에 의한 腫瘍發生을 減少시켰다.
3. 扶正抗癌湯 抽出液은 試驗管内 A431 細胞의 增殖에 影響을 미치지 못하였고, Fsa II 細胞의 增殖能에 대해서도 큰 影響을 미치지 못하였으나, 3LL 細胞 및 S180 細胞의 增殖能은 低下시켰다.
4. 扶正抗癌湯 抽出液은 NK細胞의 活性度を 增加시켰다.
5. 扶正抗癌湯 抽出液은 綿羊赤血球에 대한 마우스의 Arthus反應 및 DTH反應, 그리고 赤血

球 凝集素의 免疫反應 등을 모두 亢進시켰다.

7. 扶正抗癌湯 抽出液은 림프구의 IL-2 生成能을 촉진시켰으나 IL-6 生成能에 대해서는 影響을 미치지 못하였다

이상의 結果로 扶正抗癌湯은 MCA와 3LL 細胞 및 S180 細胞로 誘導된 皮下癌腫 細胞에 대하여 抗癌性を 보였는데, 이는 腫瘍細胞에 대한 特異的 細胞毒性和 免疫調節作用에 의한 것으로 볼 수 있고, 또한 扶正抗癌湯이 癌腫細胞에 대한 依存性 抗腫瘍 作用을 보였기 때문에 扶正抗癌湯 抽出液의 抗腫瘍 作用은 腫瘍細胞에 直接 作用하여 發顯되고, 동시에 生體免疫界 細胞의 活性 促進作用에 의해서도 間接적으로 發顯된다고 思料된다.

參 考 文 獻

1. 錢伯文：腫瘤의辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-10, 1980.
2. 郁仁存：中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp.1-10, 1983.
3. 李 岩：腫瘤病, 北京, 人民衛生出版社, pp.2-8, 1982.
4. 白洪龍：辨證診治概要, 雲南, 人民出版社, p.502, 1984.
5. 厲 暢：癌의 中醫治療, 서울, 東洋醫學 18(1): 56-63, 1992.
6. 洪元植：精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院出版部, p. 38, 249,294, 317, 1985.
7. 蔡炳允：韓方外科, 서울, 高文社, p.38, 331, 1987.
8. 金承濟：腫瘍學의 發展을 中心으로 한 個個腫瘍의 文獻的 考察, 現代醫學別冊, 7(5), 1967.

9. 大韓病理學會編 : 病理學, 서울, 高文社, p. 225, 1990.
10. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.2, 9, 26-43, 1990.
11. 李 岩 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp. 11-26, 1983.
12. 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.
13. Fish B : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer*, 54:2609, 1984.
14. Kim, SH : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J. Kor. Cancer Assoc*, 21 : 11, 1989.
15. Park CG, Lim DK, Kook YH, Cha CR, and Paik CG : In vitro chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J. Kor. Cancer Assoc*, 22 : 61, 1990.
16. Willson JK, V, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, & Weese JL : Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *Cancer Res*, 47 : 2704, 1987.
17. Teicher BA, Holden SA, Kelly MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, Henner WD, & Frei E : Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis diammine dichloroplatinum(II), *Cancer Res*, 46 : 388, 1987.
18. Lee, NK : The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drug A comparison of coloney formation assay and isotope uptake assay, *JKMA*, 31 : 435, 1988.
19. Hongo T, Fujii Y, & Igarashi Y : An In vitro chemosensitivity test for screening anticancer drug in childhood leukemia *Cancer*, 65 : 1263, 1990.
20. 이창혜 · 이봉기 · 이원형 · 김주덕 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성, 연세의대 논문집, 16 : 180, 1983.
21. 공경덕·이상욱·한병훈·서승연·허만하·박병채 : 진행성 위암에 대한 5-FU, Adria mycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과, *대한암학회 지*, 22 : 144, 1990.
22. Goodman GE, Yen YP, Cox TC, & Crowley J : Effect of verapamil in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cell, *Cancer Res*, 47 : 2295, 1987.
23. Harsh EM, Ereiraish EJ : Host defence mechanisms and their modification by cancer chemotherapy. In *Methods in Caucer Research*, New Yock, Academic Press, p. 335, 1986.
24. Stajerward JM, Vanky F : Lymphocytopenia and change in stribution of human B and T lymphocyte in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet* 1 : 1352, 1982.
25. Mavlight GM, Hersh EM, McBride CM : Lymphocyte blastogenesis induced by autochtonous human solid tumor cells ; Relationship to stage of disease and serum factor. *Cancer* 34 : 1712, 1982.
26. Golub SH, Morton DL : Corelationship of in vitro and in vivo assays of immunocompetance in cancer patients. *Cancer Res*. 34 : 1722, 1984.
27. Kokker DL : Chemical-induced immunomodulation. *Am. Vet. Med. Assoc*. 181 : 1102, 1982.
28. Kotani S, Watanabe Y, Shimono T : Immunoadjuvant activity of cell wall, their water-soluble fractions and peptidoglycan

- subunits, prepared from various gram-positive bacteria and of synthetic N-acetylmuramyl peptides. *Immunitätsforschung and Experimentelle The rapie* 149 : 302 ,1975.
29. 宋慕玲 外：中藥複方抗瘤粉治療腦膠質瘤效的初步觀察, 中西醫結合雜誌, 4(1):10, 1984.
 30. 李先榮 外：梅花点舌丹抗腫瘤作用實驗研究, 中成藥研究, (6):28, 1982.
 31. 孫關林 外：蟾酥製劑對免疫功能作用的初步研究, 中西醫結合雜誌, 4(5) : 259, 1984.
 32. 潘明繼 外：理胃化結湯結合手術與化療治療320例胃癌患者療效分析, 中西醫結合雜誌, 5 : 268, 1986.
 33. 蔡偉民 外：活血祛瘀中藥并用放射療法治療鼻咽癌前瞻性對照試驗的觀察 報告, 中醫雜誌, 9:36, 1983.
 34. 金光湖 外：數種 韓藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産 抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲紀念論文集, pp. 1041-1050, 1981.
 35. 任宰訓：數種의 韓藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, 9:24-266, 1986.
 36. Tang, Defang ; Hao, Yonung ; Liu, Zuoya ; Miao, Shulin, Wei, Hua, Wu, Jian : Constituents of the essential oil from rhizome of *Atactylodes macrocephala* produced in pingjiang(China) and their antitumor effects, *Yaoyue Tongbao*, 19(9): 555-558, 1984.
 37. Sasaki S Antitumor agents from medical plants, *Jpn. Kokai Tokyo koho Jp*, p. 58, 118, 820, 1983.
 38. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell, *Yakuyo Ninjin Sono Kenkyu to Shinpo*, pp. 198-209, 1981.
 39. 沈載然：白鼠를 利用한 枳實 魚腥草 穿山甲 및 猪苓의 抗癌效果에 關한 研究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1988.
 40. 金剛山：伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌 效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1989.
 41. 金剛山：肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1992.
 42. 韓相日：氣丸이 白血病과 淋巴腫 患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1991.
 43. 이진홍：黃 桃紅湯이 endotoxin으로 유발된 백서의 혈전증에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1992.
 44. Lee JH, Ha TY : Effect of *Panax ginseng* on the tumorigenesis induced by 3-methylcholanthrene in mice. *J. Kor. Med Assoc.* 27 : 544, 1984.
 45. Moorikawa K, Takeda R, Yamazaki M : Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a line B(1-3)-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. *Cancer Res.* 45 : 1496, 1985.
 46. Herberman RB, Ortaldo JR : Natural killer cell, their role in defence against disease. *Science* 214 : 24, 1981.
 47. Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppelle GJ, Beelen RHT, Langenhuijsen MAC : Cell-mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. *J. Immunol. Methods* 141 : 15, 1991.
 48. Suzuki R, Handh K, Itoh K : Natural killer cells as a responder to interleukin 2

- proliferative response and establishment of cloned cell. *J. Immunol.* 130 : 2051, 1983.
49. 賈 堃：癌瘤中醫防治研究，陝西，陝西科學技術出版社，pp. 1-3, 1983.
 50. 裴元植：癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告, 서울, 大韓韓醫學會誌 7(2): 53-57, 1986.
 51. 洪元植：現代 中共의 癌治療, 서울, 英文社, pp. 81-85, 361-377, 1980.
 52. 顧鳴盛：外科大全，臺北，新文豐出版公司，p. 79, 1977.
 53. 吳謙外：醫宗金鑑(下), 서울, 大星文化社, pp. 304-305, 1983.
 54. 王肯堂：六科準繩(外科準繩), 上海, 上海鴻寶齋書局, p. 70, 1982.
 55. 東醫學研究所：韓方外科學, 서울, 여강출판사, p. 581, 1994.
 56. 金定濟：診療要鑑(下), 서울, 東洋醫學研究院出版社, p. 445, 446, 1974.
 57. 許 浚：東醫寶鑑(四卷), 서울, 大星文化社, p. 365, 1981.
 58. 陳實功：外科正宗, 北京, 人民衛生出版社, p. 153, 154, 1983.
 59. 吳克潛：古今醫方集成, 서울, 成輔社, p. 263, 1980.
 60. 丁光迪：東垣學說論文集, 北京, 人民衛生出版社, p. 44, 1982.
 61. 李 梴：醫學入門(外集卷三), 서울, 大星文化社, p. 257, 1984.
 62. 李時珍：本草綱目, 臺北, 文光圖書有限公司, p. 400, 403, 459, 484, 1110, 1130, 1170, 1982.
 63. 孫星衍編：神農本草經, 臺北, 聞名學社出版, 卷一 pp. 2-3, 9, 卷二 p. 4, 9, 11, 1985.
 64. 吳儀洛：本草從新, 臺北, 東海出版社, pp. 6-8, 13-14, 29, 42, 109, 118, 150, 1983.
 65. 申佶求：申氏本草學, 서울, 壽文社, pp. 9, 16, 80, 268, 280-281, 305, 390, 562, 653, 663, 725, 1982.
 66. 李尙仁 外：漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp. 50, 52-53, 68-70, 134, 142, 232, 245, 253, 285-287, 353, 357-360, 361, 399, 1982.
 67. 辛民教：臨床本草學, 서울, 南山堂, pp. 169-171, 175-177, 221-223, 261-262, 312-313, 322, 380-381, 414-416, 467-468, 504-505, 513-514, 522-523, 1986.
 68. 王浴生：中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp. 264-275, 424-435, 442-445, 460-469, 503-507, 515-520, 567-574, 983-989, 991-995, 1983.
 69. 王清任：醫林改錯, 서울, 一中社, pp.45-48, 53, 92, 112, 1992.
 70. 楊醫亞：中醫學問答(上), 北京, 人民衛生出版社, pp. 56, 118, 481, 497, 536, 550, 541, 446-447, 530-532, 648-650, 1985.
 71. 府 軍：克癌制勝最新腫瘤求醫指南, 北京, 中國醫藥科學出版社, p. 222, 224, 1992.
 72. 李家康 外：中醫腫瘤防治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, p. 599, 1994.
 73. 劉春安 外：抗癌中草藥大事典, 湖北, 湖北科學技術出版社, pp. 908, 905, 19, 342-343, 581-582, 395, 117, 540, 1122, 1123, 566, 567, 296, 263, 764, 1994.
 74. 常敏毅：抗癌本草, 湖南, 湖南科學技術出版社, p. 97, 98, 106, 1987.
 75. Wriugh JC, Plummer-Cobb J, Gumport S, Golomb FM, Sfadi D : Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to hemotherapeutic agents on human cancer. *N Engl J Med* 257 : 1207, 1957.
 76. Fass L, Fefer A : The application of an in vitro cytotoxicity test to studies the effects of

- drugs on the cellular immune response in mice : 1. Primary response. *J Immunol* 109 : 749, 1972.
77. Brunner KT, Maue J, Cerotoni JC, Chapuis B : Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr labeled allogenic target cells in vitro inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunol* 14 : 181, 1968.
 78. Laszlo J, Stengle J, Wight K, Vurk D : Effects of chemotherapeutic agents on metabolism of human acute leukemia cells in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 97 : 127, 1958.
 79. Bickis IJ, Henderson MD, Quastel JH : Biochemical studies of human tumors II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents. *Cancer* 19 : 103, 1966.
 80. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA : Mouse myeloma tumor stem cells. A primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 28 : 844, 1971.
 81. Targan S, Brivan L, Dorey E : Activation of human NK cells by moderate exercise : Increased frequency of NK cell with enhanced capability of effector-target lytic interactions. *Clin. Exp. Immunol.* 45 : 452, 1981.
 82. Nowell PL : Phytohemagglutinin and indicator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res.* 20 : 462, 1960.
 83. Ysukagoshi S : Fundamental approaches to cancer immunotherapy using a protein bound polysaccharide PS, K with special reference to its clinical application. In Mizuno D, Chihara G, Fukuoka F, Yamamoto T, Yamamura Y, eds "Host Defence against Cancer and Its Potentiation" University of Tokyo Press, Tokyo, p. 365, 1975.
 84. Lee JH, Chung YS, Ha TY : Immunological studies on natural killer cells. *J. Kor. Immunol.* 6 : 15, 1984.
 85. Kikumoto S, Miyazima T, Kimura K : Study on the polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *J. Agr. Chem.* 162 : 256, 1971.
 86. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K : Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8(LZ-8) from *Ganoderma lucidum*. *Gann* 65 : 557, 1989.
 87. Pettit GR, Singh SB, Hamel E : Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combrestatin A-4. *Experientia* 45 : 209, 1988.
 88. Dresser DR, Phillips JM : The orientation of the adjuvant activity of *Salmonella typhosa* lipopolysaccharide and lentinan. *Immunology* 27 : 895, 1974.
 89. Miller TE, Mackaness SB, Lagange PH : Immunopotentiality with BCG. 2. Modulation of the response to sheep red blood cells. *Natl Cancer Institute* 51:1969, 1973.
 90. Neale ML, Matthews S: Antimicrobial effects of a macrophage derived cytotoxin from the serum of BCG-primed rabbits (tumor necrosis serum). *Med. Microbiol.* 17:211, 1984.
 91. MacEwan EG : Immunotherapy. *Current Veterinary Therapy.* vol. 8, ed by RW Kirk, Saunders Philadelphia, p. 45, 1983.

92. Mackness GB, Lagrange PH, Ishibashi T :
The modifying effect of BCG on the immunological induction of T cells. *J. Exp. Med.* 139:1540, 1974.
93. Glasgow LA, Fishbach J, Bryant SM :
Immunomodulation of host resistant to experimental viral infections in mice: Effect of *Corynebacterium* and BCG. *Infect. Dis.* 135:763, 1977.
94. Halpen B, Fray A, Crepin Y :
Corynebacterium parvum, a potent immunostimulant in experimental infections and in malignancies. In *Immunology*, Ciba Foundation Symposium No.18, ed. by GEW Wolstenholme and J. Knight, Elsevier, Amsterdam, p. 217, 1973.
95. Morgan DA, Rusecetz FW, Galla RCY :
Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* 193:1007, 1976.
96. 張宗岐 外：臨床腫瘤綜合治療大典，北京，奧林匹克出版社，p. 30,31, 1995.
97. 江蘇新醫學院：中藥大辭典（下），上海，上海科學技術出版社，p. 2438, 1978.