

啓膈散의 抗癌 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究

Experimental studies on antitumor effects and immune responses of Kyegyoksan

李芝香* · 柳逢夏 · 朴東源 · 柳基遠**

*世明大學校 韓醫科大學, **慶熙大學校 韓醫科大學 脾系內科學教室

ABSTRACT

In order to investigate the effects of Kyegyoksan on antitumor effects after Sarcoma 180 cells transplantation into the peritoneal cavity or left groin in mice, and immune depression in mice induced by methotrexate, the extracts of its herbal medicines were orally administered for 14 or 21 days.

Experimental studies were performed for measurement of IC_{50} in MTT assay, mean survival days, tumor and body weights for antitumor effects, delayed type hypersensitivity, hemagglutinine titer, hemolysin titer, rosette forming cells, interleukin-2 productivity, lymphocyte transformation, natural killer cell activity and phagocytic activity for immune responses in the immune depressed ICR mice, and SGOT, SGPT, BUN and creatinine for liver and kidney protective function in SD-rats.

The results were obtained as follows ;

1. From the results of MTT assay, the Kyegyoksan extracts for SUN-1 and SUN-C4 were inhibited cell viability.
2. Mean survival time in Kyegyoksan-treated group was slightly increased with no effectiveness, as compared with the control group.
3. Tumor weight in Kyegyoksan-treated group was depressed with the statistical significance, as compared with the control group($P<0.01$).
4. Body weight in Kyegyoksan-treated group was increased with the statistical significance, as compared with the control group($P<0.05$).
5. Delayed type hypersensitivity in Kyegyoksan-treated group was slightly increased with no effectiveness, as compared with the control group.
6. Hemagglutinin titer in Kyegyoksan-treated group was increased with the statistical

significance($P < 0.05$), but hemolysin titer was slightly increased with no effectiveness, as compared with the control group.

7. Rosette forming cells in Kyegyoksan-treated group was increased with the statistical significance, as compared with the control group($P < 0.001$).

8. Interleukin-2 productivity in Kyegyoksan-treated group was increased with the statistical significance, as compared with the control group($P < 0.001$).

9. Lymphocyte transformation in Kyegyoksan-treated group was increased with the statistical significance, as compared with the control group($P < 0.01$).

10. Natural killer cell activity in Kyegyoksan-treated group at E/T ratio 100 : 1 was increased with the statistical significance($P < 0.01$), but at E/T ratio 50 : 1 and 10 : 1 was slightly increased with no effectiveness, as compared with the control group.

11. Phagocytic activity in Kyegyoksan-treated group was slightly increased with no effectiveness, as compared with the control group.

12. The levels of serum glutamic oxalacetic transaminase, serum glutamic pyruvic transaminase, blood urea nitrogen and serum creatinine in Kyegyoksan-treated group were not effective change, as compared with the control group.

According to the above results, it could be suggested that Kyegyoksan have prominent antitumor effects, enhance both cellular and humoral immunity, and have no injury to liver and kidney functions.

I. 緒 論

1994년 死亡原因 統計年譜⁷⁾에 따라 疾病發生樣相을 보면 1위가 惡性新生物(癌), 다음이 腦血管 疾患, 그리고 肝疾患 等の 順序이며, 특히 胃癌의 發生頻度는 全體 惡性腫瘍中 第1位를 占有하고 있다^{44, 132)}.

最近 惡性腫瘍에 對한 治療는 化學療法, 放射線療法, 手術療法 및 免疫療法 等を 單獨 또는 複合療法로 施行하고 있으나 豫測하지 못한 副作用이나 毒性作用 等이 나타나서 새로운 抗癌劑의 開發이 要求되고 있다^{10, 15, 117, 121)}. 化學療法의 根源物質로는 天然物質이 主從을 이루고 있으며^{41, 44, 62)} 一部の 天然產物은 중요한 免疫調節劑로 알려져 그 毒性은 물론 作用過程

에 對하여 자세히 研究되고 있고^{32, 41, 46, 53, 56, 60, 76, 93, 121, 193)} 韓藥의 抗癌效果에 對한 研究도 활발히 進行되고 있다.

韓藥에 對한 腫瘍免疫學的 研究動向을 보면 各種 物抽出 엑기스劑의 癌細胞 殺傷作用^{23, 27, 35, 47, 51, 52, 55, 80, 84, 88, 100, 106, 125)}과 發癌能 抑制作用¹²¹⁾을 비롯한 腫瘍細胞에 對한 直接的인 抑制效果, methotrexate^{29, 31, 34, 37, 43, 95, 120)}나 cyclophosphamide^{90, 101, 103)}, 또는 紫外線 照射⁵⁷⁾로 低下된 免疫機能에 對한 免疫增強效果, 抗癌劑와의 併用投與로 治療效果 提高^{88, 121)} 및 抗癌劑의 副作用 減少^{45, 103, 107)} 等에 관한 報告가 있다. 그 밖에 人蔘水鍼^{48, 82)}, 當歸水鍼¹³⁵⁾, 溫鍼^{70, 112)}, 艾灸⁸⁹⁾ 等이 低下된 免疫機能을 增強시킨다는 報告가 있다.

一般的으로 腫瘍患者의 免疫能은 低下되어 있으므로^{22, 65, 99, 114, 130, 131, 163, 168} 抗癌能力和 癌細胞 사이의 關係를 보다 깊이 認識하고 各種 治療法을 有機的으로 使用하여야 治療效果를 極大化할 수 있을 것으로 思慮된다.

啓膈散은 噎膈을 治療하는 處方으로 程¹⁵²⁾의 醫學心悟에 처음 收錄되어 많은 醫家들^{9, 11, 17, 138, 139, 141, 142, 146, 147, 159}에 依해 臨床에 活用되어 왔으나 抗腫瘍 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究은 아직 報告된 바 없었다.

이에 著者는 啓膈散의 抗癌 및 免疫反應에 關한 效果를 究明하기 爲하여 抗癌作用으로는 癌細胞의 生存能, 擔癌생쥐의 生存日數, 癌塊의 크기, 생쥐體重의 變化 등을 觀察하였고, 免疫反應에 對한 作用으로는 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價 및 溶血素價, rosette 形成細胞數, Interleukin-2 生産能, 淋巴球增殖反應, 自然殺害細胞의 活性度, carbon clearance에 依한 食能을 測定하였으며 아울러 藥材의 安全性與否를 觀察하고자 血清中 AST(GOT)와 ALT(GPT)의 測定 및 BUN과 creatinine을 測定하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

大韓實驗動物센터에서 分讓받은 ICR계 흰쥐 (18~22g)를 1週日간 一定量의 固型飼料(삼양유지, 서울)로 飼育하면서 實驗室 環境에 適應시킨 후 雌雄을 區別하여 實驗群과 對照群에 골고루 分配하여 使用하였다.

肝腎毒性實驗은 大韓實驗動物센터에서 分讓받은 흰쥐를 使用하였으며 5週齡의 수컷을 使用하였다.

赤血球溶血素價의 測定에 필요한 血清을 얻기 위해서 2.5kg의 家兔를 使用하였으며 이 實驗動物은 一定量의 카푸밀(제일사료 Co.) 固型飼料과 물을 充分히 供給하면서 飼育하였다.

2) 藥 材

藥材는 市中 乾材藥局에서 購入 精選한 後 使用하였으며 處方은 程¹⁵²⁾의 醫學心悟에 準하였으므로 그 內容과 1貼 分量은 다음과 같다.(但, 一錢을 4g으로 換算함)

藥 名	生 藥 名	學 名	用量(g)
沙 蔘	Adenophorae Radix	Adenophora triphylla var. japonica Hara.	12g
丹 蔘	Salviae miltiorrhizae Radix	Salvia miltiorrhiza Bge.	12g
茯 苓	Poria	Poria cocos Wolf.	4g
川貝母	Fritillariae cirrhosae Bulbus	Fritillaria cirrhosa D. Don.	6g
鬱 金	Curcuma Radix	Curcuma aromatica Salisb.	2g
砂仁殼	Amomi Fructus	Amomum villosum Lour.	1.6g
荷葉蒂	Nelumbo Calyx	Nelumbo nucifera Gaertn.	4g
杵頭糠	Oryzae sativae Cortex	Oryza sativa L.	2g
Total amount			43.6g

2. 方法

1) 檢液의 調製

啓膈散의 5貼分量 218g을 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 蒸溜水를 加하여 冷却器를 附着하여 3時間 加熱煎湯한 뒤 濾過한 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 後 完全 乾燥시켜 啓膈散 엑기스 70.5g(收得率 32.3%)을 얻어 檢液으로 使用하였다.

2) 抗腫瘍에 對한 實驗

(1) 檢液의 投與

생쥐 10마리를 1群으로 하여 對照群 및 實驗群으로 나누어 實驗群에는 엑기스 1g/kg의 檢液을 蒸溜水로 稀釋하여 14日間 連續으로 1日 1回 經口投與하였고 對照群은 同量의 食鹽水를 經口投與하였다.

(2) 癌細胞의 生存能 測定^{41, 44, 46, 62, 86, 93, 108, 129, 132, 180, 183, 192)}

가. 方法

實驗에 使用한 細胞柱들은 成長速度가 빠르고 比較的 抗癌劑 感受性이 銳敏한 SUN-1(胃癌細胞柱), 成長速度는 빠르나 一部分의 抗癌劑에 耐性을 갖는 SUN-C4(大腸癌細胞柱)와 大部分의 既存 抗癌劑에 耐性을 나타내는 SUN-396(肝癌細胞柱)를 利用하였다. 指數增殖期의 B16細胞를 1×10^4 cells/ml로 調整한 다음, 96 well 微細細胞培養板(Falcon, U.S.A.)에 180 μ l의 細胞浮遊液과 20 μ l의 檢液을 넣었다. 藥物의 濃度는 最初의 濃度를 25mg/ml로 調整한 後 2倍씩 稀釋시켜서 使用하였으며 96 well 微細細胞培養板에 分株直前에 0.22 μ m의 syringe filter로 濾過하여 使用하였다. 以後 3-4日間 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂의 培養器에서 培養하면서 細胞의 增殖程度를 位相差顯微鏡으로 隨時로 觀察하였다. 藥物이 處理되지 않은 對照 well의 細胞들이 充分

히 成長한 後, 培養液을 除去하고 各 well에 20 μ l의 MTT solution(5mg/ml in phosphate buffered saline : PBS)(Sigma, U.S.A.)을 넣고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器에서 3時間 培養하였다.

그 後 100 μ l의 0.04M HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT 溶液과 反應하여 생긴 푸른색의 formazan 結晶을 녹인 後 30分안에 540nm의 ELISA 判讀者(Emax precision microplate reader, Molecular devices, U.S.A.)에서 吸光度(Optical Density)를 測定하였다. 이때 參考波長으로 630nm를 利用하였다. 아래의 公式과 같이 實驗群의 吸光度를 對照群의 吸光도와 比較하여 生存率을 求하였다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{實驗群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}}{\text{對照群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}} \times 100$$

나. 各 細胞柱에서 50% 殺傷效果 測定 (IC₅₀)^{108, 129, 132)}

實驗群에서 各 well로 부터 한 컬럼의 平均 OD₅₄₀(波長 540nm에서의 Optical Density) 값을 求하여 위의 公式에 의하여 對照群(100% 生存率)의 平均 OD₅₄₀ 값에 對한 百分率 값을 算出하였다. 이 百分率은 對照群과 比較한 實驗群의 細胞生存率에 該當하는 값이다. 50% 抑制濃度(Inhibitory Concentration : IC₅₀)는 細胞生存率을 50%로 減少시키는 藥物의 濃度로 定義하였으며 이 IC₅₀ 값이 230 μ g/ml 以上으로 나타난 抽出物에 대해서는 抗癌活性이 없거나 微弱한 것으로 看做하였다¹²⁹⁾.

(3) 擔癌생쥐의 生存日數 測定^{59, 76)}

Sarcoma 180 細胞는 慶熙大 免疫研究室에서 分讓받아 생쥐의 腹腔內에 移植하여 15日 間隔으로 繼代培養하였다. 생쥐의 腹水로 부터 增殖이 旺盛한 時期에 Sarcoma 180 細胞를 收去하여 PBS로 2回 洗滌後 생쥐 腹腔에 한 마리당

0.1ml(2×10^6 /mouse)씩 注入하고 24時間 後부터 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하면서 壽命을 觀察하고 生存增加率(increase of life span : ILS %)을 求하였다.

$$ILS = \frac{\text{實驗群의 平均 生存日數} - \text{對照群의 平均 生存日數}}{\text{對照群의 平均 生存日數}} \times 100$$

(4) 擔癌생쥐의 腫瘍成長 抑制 測定^{32, 59, 193)}

생쥐를 對照群 및 實驗群으로 各各 10마리씩 나누고, 4×10^6 cells/ml로 調整된 Sarcoma 180 細胞溶液을 한 마리당 0.2ml씩 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24時間 後부터 14日間 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하고 Sarcoma 180 細胞投與 後 15日째에 頸推脫臼로 쥐를 致死시킨 후, 腫瘍을 摘出하여 그 重量을 測定하고 腫瘍成長抑制率(tumor growth inhibition rate : TIR %)을 計算하였다.

$$TIR = \frac{\text{對照群의 平均 腫瘍무게} - \text{實驗群의 平均 腫瘍무게}}{\text{對照群의 平均 腫瘍무게}} \times 100$$

(5) 擔癌생쥐의 體重測定⁵⁹⁾

생쥐를 對照群 및 實驗群으로 各各 10마리씩 나누어 體重을 測定한 後, 4×10^6 cells/ml로 調整된 Sarcoma 180 細胞溶液을 한 마리당 0.2ml씩 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24時間 後부터 14日間 檢液을 1日 1回 連續으로 經口投與하고 Sarcoma 180 細胞投與後 15日째에 頸推脫臼로 쥐를 致死시킨 후, 腫瘍을 摘出하여 腫瘍을 除外한 생쥐의 體重을 測定하였다.

3) 免疫에 對한 實驗

(1) 檢液의 投與

생쥐 10마리를 1群으로 하여 對照群 및 實驗群으로 나누어 實驗群에는 액기스 1g/kg의 檢

液을 蒸溜水로 稀釋하여 21日間 連續으로 1日 1回 經口投與하였고 對照群은 同量의 食鹽水를 經口投與하였다.

(2) 抗原^{93, 122, 124, 181, 188)}

抗原은 緬羊赤血球(Alsever sheep red blood cell, Korea Media Corp.)를 使用하였으며 4℃에 保存하면서 保存한지 1週日 以內의 것을 使用하였다.

(3) 免疫^{36, 93, 124, 181, 188)}

檢液 및 生理食鹽水를 21日間 經口投與한 後, 다음날 實驗群과 對照群의 꼬리靜脈에 5×10^8 cells/ml의 濃度로 調整된 緬羊赤血球 浮遊液(SRBC) 0.2ml를 注射하여 免疫시켰다.

(4) 免疫機能 低下 誘發²⁰⁾

免疫機能 低下誘發은 檢液을 21日間 經口投與한 後 對照群과 實驗群에 methotrexate(유한메 토트릭세이트징, 유한양행) 1mg/1kg을 1日 1回 4日間 經口投與하여 免疫機能을 低下시켰다.

(5) 遲延型過敏反應의 測定^{60, 76, 93, 122, 124, 188)}

遲延型過敏反應(delayed type hypersensitivity : DTH)의 測定은 Mitsuoka等¹⁸⁸⁾의 方法에 따라 免疫시킨 4日後에 2×10^9 cells/ml로 調整된 緬羊赤血球 浮遊液 0.05ml를 右側後肢足蹠皮內에 注射하고 24時間이 經過한 다음 足蹠腫脹反應 檢査를 行하였다.

足蹠腫脹程度는 생쥐를 ether로 가볍게 痲醉시키고 digimatic caliper(Mitutoyo corporation, Japan)를 使用하여 左右側後肢足蹠의 두께를 0.01mm까지 測定하여 左右足蹠 두께의 差異를 計算하였다.

(6) 採血 및 血清의 分離

足蹠腫脹反應 測定이 끝난 생쥐를 ether로 가볍게 痲醉하여 解剖板위에 固定하고 1回用 注射器(syring, 보인)로 心臟에서 1ml의 血液을 採取한 後 5ml用 plastic tube(Falcon, No.2058, Oxford, CA, U.S.A.)에 옮겨 1時間 동안 室溫에

서 放置하고 작은 유리봉으로 凝固된 血液을 數回 휘저은 後 遠心分離器로 2,000 rpm에서 30分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 다른 tube 에 取하였다. 取한 血清은 56℃에서 30분간 非動化 시킨 후 赤血球凝集素價와 溶血素價의 測定에 使用하였다.

溶血素價의 測定에 補體(complement)로 使用될 家兔의 血清도 上記와 같은 方法으로 分離하되 非動化시키지 않은 상태로 使用하였다.

(7) 赤血球 凝集素價의 測定^{93, 122, 124, 181)}

緬羊赤血球에 對한 凝集素價(hemagglutinin titer)를 測定하기 爲하여 위의 方法으로 非動化 시킨 血清을 microtitration plate(Limbro chemical Co., Conn., U.S.A.)의 各 well에 PBS로 2배 系列 稀釋한 血清 25 μ l와 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液을 50 μ l을 加하여 잘 混合한 다음 37℃ 5% CO₂ 培養器에서 18時間 放置한 後 赤血球凝集反應을 觀察判讀하였으며 赤血球凝集을 明白히 일으키는 血清의 最高稀釋倍數를 凝集素價로 測定하였다.

(8) 赤血球 溶血素價의 測定¹⁸¹⁾

緬羊赤血球에 對한 溶血素價(hemolysin titer)를 測定하기 爲하여 위의 方法으로 非動化 시킨 血清을 microtitration plate(Limbro chemical Co., Conn., U.S.A.)의 各 well에 PBS로 2배 系列稀釋한 血清 25 μ l와 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液을 50 μ l을 加한 다음 各 well에 補體로서 5배 稀釋한 家兔의 血清을 25 μ l씩 加하여 잘 混合하여 37℃ 5% CO₂ 培養器內에서 1時間 동안 放置한 後 緬羊赤血球가 完全히 溶血을 일으키는 最高稀釋倍數를 溶血素價로 算定하였다.

(9) 脾臟細胞 浮遊液의 準備

생쥐를 頸推脫骨로 致死시킨 후 腹部를 alcohol로 완전히 塗布한 후 無菌的으로 脾臟을

摘出하여 脾臟주위의 組織들을 조심스럽게 除去한 後 차가운 RPMI-1640培地로 洗滌한 後 cell dissociation sieve-tissue grinder kit(Sigma, U.S.A.)로서 잘게 으갠 後 組織破片을 除去하고 RPMI-1640으로 2회 洗滌하였다. 그 後 滅菌된 蒸溜水로 hypotonic shock¹¹⁰⁾을 일으켜 赤血球를 破壞한 後 HBSS(Hank's balanced salt solution : Gibco, NO. 310-4020)로 2回 洗滌하고, RPMI-1640培地로 1回 洗滌한 後, 10% FBS(fetal bovine serum)가 添加된 RPMI-1640培地에 脾臟淋巴球을 再浮遊하였다.

(10) Rosette 形成細胞數의 測定¹⁷⁶⁾

Rosette 形成細胞(rosette forming cells : RFC)의 測定은 Bach等¹⁷⁶⁾의 方法에 準하여 測定하였다. 遠心洗滌한 脾臟細胞 浮遊液을 1 $\times 10^7$ cells/ml의 濃度로 調整하고 緬羊赤血球를 3 $\times 10^8$ cells/ml의 濃度로 調整한 後, plastic tube(Falcon No. 2058, Oxford, CA, U.S.A.)에 各 0.5ml씩 넣고 混合하여 遠心分離器로 980rpm에서 5分間 遠心分離시킨 後 4℃ 冷水槽에서 30分間 放置하고 HBSS 1ml를 加하여 細胞를 再浮遊 시킨 다음 細胞浮遊液을 血球計算板(American Optica, Buffalo, NY, U.S.A.)위에 떨어뜨리고 450倍率로 檢鏡 觀察하였다. 脾臟細胞 1個當 緬羊赤血球가 4個 以上 附着된 경우를 Rosette 形成細胞로 定하여 10⁶ 脾臟細胞當 10³ Rosette 形成細胞數를 測定하였다

(11) Interleukin-2 (IL-2) 生産能 測定¹⁸⁴⁾ 가) IL-2의 生産

IL-2는 Gullberg等¹⁸⁴⁾의 方法에 따라 生産하였다. 즉 脾臟細胞 浮遊液을 FBS가 10% 添加된 混合培地에 5 $\times 10^6$ cells/ml의 濃度로 調整하고 여기에 concanavalin-A(Con-A ; Sigma, U.S.A.)를 100 μ g/ml의 濃度로 添加한 後 37℃ 5% CO₂ 培養器에서 24時間 동안 培養하고 上

層液을 收去하여 Interleukin-2(IL-2)의 生産能을 測定하였다.

나) IL-2의 生産能 測定

IL-2의 生産能은 Intertest-2X kit(Genzyme, U.S.A.)를 利用하여 測定하였다. Intertest-2X kit는 mouse IL-2 測定用 ELISA kit로서 고형상 免疫酵素 測定法을 利用한 것인데 450nm의 波長에서 吸光度를 測定하여 標準曲線으로 부터 檢體內의 IL-2量을 算定할 수 있는 方法이다. 96 well plate(Costar 3799)에 試料를 100 μ l씩 分株하고 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 40分間 培養하고 培養이 끝난 後 well의 反應溶液을 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌한 後 plate를 濾過紙로 말리고 各 well에 biotinylated polyclonal antimouse IL-2를 100 μ l씩 分株하고 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 40分間 培養하였다. 다시 well의 反應溶液을 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌한 後 plate를 濾過紙로 말리고 各 well에 streptavidin-peroxidase를 100 μ l씩 分株한 後 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 25分間 培養하였다. 다시 well의 反應溶液을 除去하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌한 後 plate를 濾過紙로 말리고 各 well에 基質을 100 μ l씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 常溫에서 10分間 培養하였다. 다시 各 well에 정지溶液을 100 μ l씩 分株한 後 ELISA判讀者(Emax precision microplate reader, Molecular devices, U.S.A.)로 波長 450nm에서 吸光度를 測定하였다.

(12) 淋巴球 增殖反應^{56, 60, 65, 73, 93, 114, 122)}

淋巴球 增殖反應은 양⁷³⁾의 方法을 多少 修正하여 測定하였다. 위의 方法으로 浮遊된 脾臟 淋巴球를 1 \times 10⁶ cells/ml의 濃度로 調整한 後 T細胞 有絲分裂 誘導物質인 concanavalin A(Sigma, U.S.A.)를 10 μ g/ml의 濃度로 添加하고 96 well 培養접시에 各 well當 100 μ l씩 分株한 後, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器에서 72時間 培養한 다

음 [³H]-thymidine(New England Nuclear, Boston MA, U.S.A.)을 各 well당 1 μ Ci씩 添加한 後 18時間 동안 追加 培養하였다. 그 後 自動細胞收 集機(SKAT- RON, Skatron instrument, Norway)로 glass fiber filter상에 收去한 後 이를 室溫에서 乾燥시킨 後 counting vial에 넣어 5ml의 cocktail 溶液(5g ppo, 250mg popop를 toluene 1 l 에 녹임)으로 溶解시킨 後 β -counter(Beckman, LS 3801, U.S.A.)에서 DNA合成時 陷入된 [³H]-thymidine量을 counter per minute(cpm)으로 測定하였고 實驗은 3倍數로 實施하였다.

(13) 自然殺害細胞의 活性度 測定^{179, 182, 187)}

가) 作動細胞의 準備

脾臟細胞를 作動細胞로 使用하였다.

나) 標的細胞의 準備

自然殺害細胞의 殺害能 測定時의 標的細胞는 韓國細胞柱銀行에서 分讓받은 생쥐 由來 YAC-1 淋巴腫細胞(TIB-160)를 使用하였다. 分讓받은 後 實驗室에서 FBS가 10% 添加된 混合培地로 繼代培養하면서 測定에 臨하였다.

다) 細胞毒性的 測定

① 基本方法

細胞毒性實驗은 Promega社의 Cytotox96TM non-radioactive cytotoxicity assay kit를 利用하여 實施하였다. 이 kit는 ⁵¹Cr assay를 代替하는 것으로 알려져있다^{182, 187)}. 즉, 細胞의 溶解時에 放出되는 lactate dehydrogenase(以下 LDH라 稱함)가 酵素反應의 結果로 붉은색의 結晶을 生成하 는데, 이를 ELISA 判讀者를 利用하여 可視光線領域의 波長(490nm)으로 吸光度를 測定함으로써 溶解된 細胞의 數를 測定하는 것이다. 이것을 利用하여 cell-mediated cytotoxicity를 測定할 수 있다¹⁷⁹⁾.

② 對照 well의 준비

이 方法은 5種類의 對照 well을 두었다. 이는 誤差를 補正하기 위한 것이다. 對照 well 1은 標

의細胞의 LDH 自然放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ l 와 培地 100 μ l 로 構成하였고, 對照 well 2는 標的細胞의 LDH 最大放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ l 와 培地 100 μ l 로 構成하였고, 培養이 끝나기 45分前에 20 μ l 의 lysis solution(溶解溶液)을 添加하였다. 對照 well 3은 作動細胞의 LDH 自然放出量을 나타낸 것으로 最適數의 作動細胞 100 μ l 와 培地 100 μ l 로 構成하였고, 對照 well 4는 溶解溶液을 添加하여 發生하는 파괴의 變化에 依한 誤差를 補正하기 爲해 培地 200 μ l 와 溶解溶液 20 μ l 로 構成하였다. 對照 well 5는 培地の background로서 培地內 血清이나 phenol red에 기인한 LDH의 活動能을 補正하기 爲한 것으로 培地 200 μ l 로 構成하였다.

③ 測定方法

自然殺害細胞 活性度의 細胞毒性能 測定은 YAC-1細胞를 標的細胞로 利用하여, FBS가 添加된 混合培地에 5 $\times 10^4$ cells/ml의 濃度로 製造하고, 96 well 微細細胞培養板(U-bottom plate)에 well당 100 μ l씩 分株한 후, 作動細胞와 標的細胞의 比가 100 : 1, 50 : 1, 10 : 1이 되도록, FBS가 10% 添加된 混合培地에 各各 5 $\times 10^6$ cells/ml, 2.5 $\times 10^6$ cells/ml, 5 $\times 10^5$ cells/ml의 濃度로 調整된 脾臟細胞를 well 에 100 μ l 를 分株하여 最終부피가 200 μ l/well이 되도록 하였다. 對照 well은 ②에 依據하여 準備하였다. 準備가 된 후 微細細胞培養板을 1,100rpm에서 4分間 遠心시킨 後, 4時間 동안 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器에서 培養하였다. 또한 培養完了 45分 前에 對照 well 2에 100 μ l 당 10 μ l 의 溶解溶液을 添加하였다. 終了時 37 $^{\circ}$ C 1,100rpm에서 4分間 遠心分離하였고, 새로운 96 well plate(Flat-bottom plate)에 上層液을 50 μ l 옮긴 후, 測定 buffer 12 ml를 基質混合器에 넣어 再組合基質을 만든 후 各 well에 50 μ l씩 넣고 常溫에서 30分間 培養하

였다. 이때 알루미늄 foil로 빛을 遮斷하였다. 培養後 50 μ l 의 停止溶液을 各 well에 넣은 후 注射器로 거품을 除去하였고, 그 後 1時間 以內에 490nm에서 吸光度를 測定하였다. 測定된 實驗값, 標的細胞 LDH 自然放出값 및 作動細胞 LDH 自然放出값에서 培地の back ground 값을 뺀고, 標的細胞 LDH 最大放出量에서 파괴補正값을 뺀다. 그 後 다음의 公式에 依하여 細胞毒性能을 測定하였다.

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(A - B) - C}{D - C} \times 100$$

A : 실험값 - culture medium background

B : effect cell spontaneous LDH release - culture medium background

C : target cell spontaneous LDH release - culture medium background

D : target cell maximum LDH release - volume correction control

(14) Carbon clearance에 依한 貪食能의 測定¹⁷⁸⁾

網狀內皮細胞系의 貪食能 測定은 Biozzi等¹⁷⁸⁾의 方法에 依하여 생쥐의 꼬리靜脈에 carbon 16mg을 注射한 後 1分, 5分後에 眼窩靜脈에서 heparinized capillary tube로 25 μ l씩 血液을 採取하고 0.1% Na₂CO₃ 2ml에 溶血시켜 分光光度計(spec-trophotometer, U-2,000, Hitachi, Japan)를 使用하여 波長 675nm에서 末梢血管內 炭粉濃度를 測定한 後 貪食指數로서 그 結果를 算出하였으며 貪食指數 K는 다음과 같다.

$$\text{Phagocytic index } K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

C₁ = 時間 T₁ 에서의 sample 血液中の carbon 濃度

C_2 = 時間 T_2 에서의 sample 血液中的 carbon 濃度

T_1 = 처음 採血時間

T_2 = 마지막 採血時間

4) 肝 및 腎毒性에 對한 實驗

(1) 檢液의 投與 및 血清의 分離

흰쥐 10마리를 1群으로 하여 對照群 및 實驗群으로 나누어 實驗群에는 액기스 1g/kg의 檢液을 蒸溜水로 稀釋하여 21日間 連續으로 1日 1回 經口投與하였고 對照群은 同量의 食鹽水를 經口投與하였다. 22日째에 ether 痲醉下에 腹大靜脈에서 5ml 程度의 血液을 採取한 뒤, 2,000rpm으로 30分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 血清分離管으로 거둬들인 후 24時間 以內에 SGOT, SGPT, BUN 및 creatinine을 測定하였다.

(2) 血清中 AST(GOT) 및 ALT(GPT) 測定^{18, 19)}

SGOT 및 SGPT 測定은 Reitman-Frankel法¹⁹⁾에 準하여 GOT & GPT 測定用 試藥(아산제약 주식회사, 한국)을 使用하여 測定하였다. 基質液 1.0ml를 40℃의 恒溫槽에 10分間 넣고, 血清 0.2ml를 加하여 混合해서 GPT는 精確히 60分間, GOT는 30分間 反應시킨 후, 呈色試藥 1.0ml을 넣고 室溫에 20分間 放置하고 0.4N NaOH 10ml을 加하여 蓋를 하고, 轉倒混合한 後 30分後에 물을 對照로 하여 波長 505nm에서 吸光度를 測定하였다. 盲檢(Blank)으로서 다른 試驗管에 基質液 1.0ml과 呈色試藥 1.0ml을 取하여 混合한 후 血清 0.2ml을 加하여 20分間 室溫에 放置하고 0.4N NaOH 10ml를 加하여 混合한 후 吸光度를 測定하여 實驗群의 吸光度에서 빼고 檢量線에서 活性을 單位로 하여 求하였다.

(3) BUN(blood urea nitrogen) 測定^{16, 17)}
BUN 測定은 Urease Indophenol法^{16, 17)}을 多

少 修正하여 實施하였는데 試驗管에는 urease buffer 0.2ml와 血清 0.02ml를 넣고 對照管에는 urease buffer 0.2ml와 標準液 0.02ml를 넣고 盲檢(blank)에는 urease buffer 0.2ml와 蒸溜水 0.02ml를 넣은 후 37℃ 恒溫槽에서 15分間 두었다가 試藥을 넣고 다시 37℃에서 15分 放置한 後, 各管에 8ml의 蒸溜水를 넣고 잘 흔들어서 波長 630nm에서 盲檢(blank)을 基準으로 값을 읽었다.

(4) Serum creatinine 測定^{16, 17)}

血清中 creatinine치는 Folin-Wu法^{16, 17)}에 依하여 測定하였는데 creatinine이 alkaline picrate와 作用하여 creatinine picrate를 形成하는 Jaffe 反應을 利用하였다. 試驗管에는 제단백여액을 遠心分離한 上層液 3ml를 넣고 對照管은 S1, S2, S3 로 나누어 基準原液을 各各 1, 2, 3ml씩 넣고, S1, S2는 蒸溜水를 各各 2, 1ml씩 넣어 各管에 넣은 溶液의 總이 3ml가 되도록 하고 盲檢에는 蒸溜水만 3ml 넣은 後 picric acid와 sodium hydroxide를 各各 1ml씩 넣고 잘 흔들여 室溫에서 20分間 放置하고 盲檢(blank)을 基準으로 520nm에서 값을 읽었다.

III. 成 績

1. 癌細胞 生存能에 對한 效果

啓膈散 抽出液이 SUN-1(胃癌細胞柱), SUN-C4(大腸癌細胞柱) 및 SUN-396(肝癌細胞柱)의 成長에 미치는 影響을 MTT assay를 通하여 觀察한 結果 IC_{50} 의 값이 各各 0.823 μ g/ml, 7.932 μ g/ml, 796.5 μ g/ml로 나타나 啓膈散 抽出液이 SUN-1(胃癌細胞柱)과 SUN-C4(大腸癌細胞柱)의 成長을 抑制하는데 效果가 있음이 認定되었다(Table 1).

Table 1. IC₅₀ of Kyegyoksan on SUN-1, SUN-C4 and SUN-396 in MTT assay

Group	IC ₅₀ ^{a)} (μg/ml)		
	SUN-1	SUN-C4	SUN-396
Sample	0.823	7.932	796.5

Nonlinear regression(sigmoidal dose-response) was used as statistical method.

Sample : Group of Kyegyoksan administered

a) : IC₅₀ ; 50% Inhibitory Concentration

2. 擔癌생쥐의 生存期間 延長에 對한 效果

Sarcoma 180 細胞를 腹腔內에 移植한 擔癌生쥐의 生存期間은 生理食鹽水를 投與한 對照群의 平均生存日數가 24.75±0.87日 이었고, 啓膈散投與群의 平均生存日數는 25.33±0.55日 이었으며 生存增加率(ILS %)이 2.34%로 나타나 對照群에 比해 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 2).

3. 擔癌생쥐의 腫瘍成長抑制에 對한 效果

Sarcoma 180 細胞溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24時間 後부터 各 檢液을 14日間 連續으로 投與하고, Sarcoma 180 細胞 投與後 15일째 致死시켜 腫瘍을 摘出하여 그 重量을 測定한 바, 生理食鹽水를 投與한 對照群이 平均 2.58±0.23g의 腫瘍成長을 보였으며, 啓膈散投與群에서는 平均 1.69±0.11g의 腫瘍成長으로 34.5%의 腫瘍成長抑制率(TIR %)을 보여 對照群에 比하여 P<0.01의 有意성이 認定되었다(Table 3).

4. 擔癌생쥐의 體重變化에 對한 效果

Sarcoma 180 細胞溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 後 24時間 後부터 各 檢液을 14日間

Table 2. Mean survival days of mice treated with Kyegyoksan, after Sarcoma 180 cells transplantation into the peritoneal cavity

Groups	No. of animals	Dose (g/kg)	Mean survival days(days)	ILS ^{b)} (%)
Control	10	-	24.75±0.87 ^{a)}	-
Sample	10	1	25.33±0.55	2.34

a) : Mean ± Standard Error

b) : ILS(%) = (T-C)/C × 100

T : mean survival days of the Sample group

C : mean survival days of the Control group

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

Table 3. Tumor weight of mice treated with Kyegyoksan, after Sarcoma 180 cells transplantation into the left groin

Groups	No. of animals	Dose (g/kg)	Tumor weight(g)	TIR ^{b)} (%)
Control	10	-	2.58±0.23 ^{a)}	-
Sample	10	1	1.69±0.11**	34.5

a) : Mean ± Standard Error

b) : TIR(%) = (C-T)/C × 100

T : mean tumor weight of the Kyegyoksan group

C : mean tumor weight of the Control group

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(**P<0.01)

連續으로 投與하고 Sarcoma 180 細胞 投與後 15일째 致死시켜 腫瘍을 摘出した 후 腫瘍을 除外한 생쥐의 體重을 測定한 바, 生理食鹽水를 投與한 對照群의 1日, 15日째 體重은 各各 19.46±0.14g, 19.15±0.26g이었고, 啓膈散投與

Table 4. Body weight of mice treated with Kyegyoksan, after Sarcoma 180 cells transplantation into the left groin

Groups	No. of animals	Dose (g/kg)	Body weight(g)	
			1 day	15days
Control	10	-	19.46±0.14 ^{a)}	19.15±0.26
Sample	10	1	19.34±0.17	19.95±0.13*

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(*P<0.05)

群은 各各 19.34±0.17g, 19.95±0.13g으로 對照群에 比하여 P<0.05의 有意性 있는 體重增加가 認定되었다(Table 4).

5. 遲延型過敏反應에 對한 效果

檢液 및 生理食鹽水를 21日間 經口投與한 후 實驗群과 對照群간의 遲延型過敏反應을 比較하기 위하여 緬羊赤血球로 免疫시킨 4日後 緬羊赤血球를 右側後肢 足蹠皮內에 注射한 다음 24時間이 經過한 後 左右肢足蹠의 腫脹程度를 測定하였던 바, 對照群이 0.16±0.04mm, 啓膈散投與群이 0.17±0.04mm로 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 나타났으나 有意性是 認定되지 않았다(Table 5).

6. 赤血球凝集素價에 對한 效果

實驗群과 對照群의 緬羊赤血球에 對한 凝集素價를 測定하여 Log₂값으로 計算하였던 바, 對照群이 6.60±1.19, 啓膈散投與群이 9.50±0.59로 나타나 對照群에 比하여 P<0.05의 有意性이 認定되었다(Table 6).

Table 5. Effects of kyegyoksan on the delayed type hypersensitivity response in the methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Footpad Swelling(mm)
Control	10	-	0.16±0.04 ^{a)}
Sample	10	1	0.17±0.04

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

Table 6. Effects of Kyegyoksan on the hemagglutinin titer in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Hemagglutinin (Log ₂ titer)
Control	10	-	6.60±1.19 ^{a)}
Sample	10	1	9.50±0.59*

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(*P<0.05)

7. 赤血球溶血素價에 對한 效果

實驗群과 對照群간의 緬羊赤血球에 대한 溶血素價를 測定하여 Log₂값으로 計算하였던 바, 對照群이 6.10±0.60, 啓膈散投與群이 6.33±0.68로 對照群에 比해서 增加하는 傾向을 보였으나 有意性是 認定되지 않았다(Table 7).

8. Rosette 形成細胞數에 對한 效果

實驗群과 對照群간의 抗原인 緬羊赤血球에 對한 免疫反應細胞數를 比較하기 위하여 脾臟

Table 7. Effects of Kyegyoksan on the hemolysin titer in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Hemolysin (Log ₂ titer)
Control	10	-	6.10±0.60 ^{a)}
Sample	10	1	6.33±0.68

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered

Table 8. Effects of Kyegyoksan on the appearance of rosette forming cells in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	10 ³ RFC ^{b)/} 10 ⁶ Spleen cell
Control	10	-	20.44±1.43 ^{a)}
Sample	10	1	29.20±1.66***

a) : Mean ± Standard Error
 b) : RFC ; rosette forming cells
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.
 * : Statistically significant as compared with control group(***P<0.001)

세포에 緬羊赤血球가 4個이상 附着된 경우를 Rosette 形成細胞로 定하여 10⁶ 脾臟細胞當 10³ Rosette 形成細胞數를 算定한 結果, 對照群이 20.44±1.43, 啓膈散投與群이 29.20±1.66으로 對照群에 比하여 P<0.001의 有意성이 認定되었다(Table 8).

9. Interleukin-2 生産能에 對한 效果

Interleukin-2 生産能을 比較하기 위해 이를 測定하였던 바, 對照群이 166.64±3.86 pg/ml이

Table 9. Effects of Kyegyoksan on the Interleukin-2 productivity in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Interleukin-2 (pg/ml)
Control	10	-	166.64±3.86 ^{a)}
Sample	10	1	217.66±9.72***

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.
 * : Statistically significant as compared with control group(***P<0.001)

있으며 啓膈散投與群이 217.66±9.72 pg/ml로 나타나 對照群에 比하여 P<0.001의 有意성이 認定되었다(Table 9).

10. 淋巴球 增殖能에 對한 效果

생쥐 脾臟細胞를 Con-A로 刺戟 培養한 후 그 增殖을 比較하기 위하여 [³H]-thymidine의 吸收程度를 測定 하였던 바, 對照群이 168.10±24.26 cpm, 啓膈散投與群이 347.90±39.53 cpm으로 나타나 對照群에 比하여 P<0.01의 有意성이 認定되었다(Table 10).

11. 自然殺害細胞活性에 對한 效果

實驗群과 對照群간의 自然殺害細胞에 對한 活性度를 比較해 보고자 % cytotoxicity를 測定 하였던 바, 作動細胞 對 標的細胞의 比가 100 : 1의 경우 % cytotoxicity는 對照群이 22.07±3.77 %, 啓膈散投與群이 50.30±4.98 %로 나타나 對照群에 比하여 P<0.01의 有意성이 認定되었다.

作動細胞 對 標的細胞의 比가 50 : 1의 경우

Table 10. Effects of Kyegyoksan on the Lymphocyte transformation in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Proliferation (cpm)
Control	10	-	168.10±24.26 ^{a)}
Sample	10	1	347.90±39.53**

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(**P<0.01)

% cytotoxicity는 對照群이 42.49±6.67 %, 啓膈散投與群이 63.44±31.62 %로 나타나 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

作動細胞 對 標的細胞의 比가 10 : 1의 경우 % cytotoxicity는 對照群이 40.61±8.08 %, 啓膈散投與群이 50.06±16.45 %로 나타나 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 11).

12. Carbon clearance에 對한 效果

實驗群과 對照群간의 巨食細胞活性度를 比

Table 12. Effects of Kyegyoksan on the phagocytic index K in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Phagocytic index K
Control	10	-	0.00676±0.00034 ^{a)}
Sample	10	1	0.00899±0.00212

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

較해 보기 위하여 생쥐의 꼬리靜脈에 carbon을 注射하여 carbon clearance를 測定하였던 바, 對照群의 phagocytic index K값이 0.00676±0.00034, 啓膈散投與群이 0.00899±0.00212로 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 나타냈으나 有意性은 認定되지 않았다(Table 12).

13. 血清中の AST(GOT)에 미치는 影響

檢液을 長期間 投與했을때 肝毒性 誘發 可能性을 살펴보기 위하여 血清 GOT를 測定한 結果, 對照群에서는 85.40±2.31 U/L, 啓膈散投與群에서는 83.56±1.90 U/L로 別變化가 없었다 (Table 13).

Table 11. Effects of Kyegyoksan on the natural killer activity in methotrexate pretreated mice

Groups	No. of animals	Dose (g/kg)	% Cytotoxicity at E/T ratio		
			100 : 1	50 : 1	10 : 1
Control	10	-	22.07±3.77 ^{a)}	42.49±6.67	40.61±8.08
Sample	10	1	50.30±4.98**	63.44±31.62	50.06±16.45

a) : Mean ± Standard Error

Control : Group of normal saline administered

Sample : Group of Kyegyoksan administered

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(**P<0.01)

Table 13. Effect of Kyegyoksan on the GOT in rats

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	GOT (U/L)
Control	10	-	85.40±2.31 ^{a)}
Sample	10	1	83.56±1.90

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.

Table 14. Effect of Kyegyoksan on the GPT in rats

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	GPT (U/L)
Control	10	-	51.60±1.96 ^{a)}
Sample	10	1	49.70±1.84

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.

14. 血清中の ALT(GPT)에 미치는 影響

檢液을 長期間 投與했을때 肝毒性 誘發 可能性을 살펴보기 위하여 血清 GPT를 測定한 結果, 對照群에서는 51.60±1.96 U/L, 啓膈散投與群에서는 49.70±1.84 U/L로 별 變化가 없었다 (Table 14).

15. BUN(Blood Urea Nitrogen) 含量에 미치는 影響

檢液을 長期間 投與했을때 腎毒性 誘發 可能性을 살펴보기 위하여 血清中 BUN 含量을 測定하였던 바, 對照群에서는 16.27±0.90 mg/dl, 啓膈散投與群에서는 17.38±0.86 mg/dl로 별 變化가 없었다(Table 15).

Table 15. Effect of Kyegyoksan on the BUN in rats

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	BUN (mg/dl)
Control	10	-	16.27±0.90 ^{a)}
Sample	10	1	17.38±0.86

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.

Table 16. Effect of Kyegyoksan on the creatinine in rats

Groups	No. of animals	Dose(g/kg)	Creatinine (mg/dl)
Control	10	-	0.51±0.01 ^{a)}
Sample	10	1	0.51±0.01

a) : Mean ± Standard Error
 Control : Group of normal saline administered
 Sample : Group of Kyegyoksan administered
 Student's t-test was used as statistical method.

16. Serum creatinine 含量에 미치는 影響

檢液을 長期間 投與했을때 腎毒性 誘發 可能性을 살펴보기 위하여 血清中 creatinine 含量을 測定하였던 바, 對照群에서는 0.51±0.01 mg/dl, 啓膈散投與群에서는 0.51±0.01 mg/dl로 별 變化가 없었다(Table 16).

IV. 考 察

惡性腫瘍(癌)은 世界的으로 成人 死亡의 가장 重要한 原因으로 우리나라에서도 發生頻度가 漸次 增加趨勢⁶²⁾에 있어, 死亡原因 統計年譜⁷⁾에 依하면 人口 10萬名 當 癌에 依한 死亡 率은 1985년의 85.9명에서 1993년에 112.2명으로 增加하였으며 이러한 趨勢는 더욱 深化될

것으로 展望된다.

癌은 通常 自覺症狀이 微弱하게 進行되므로 早期發見이 어렵고 症狀이 나타나 病院을 찾을 때는 大部分 治療效果를 期待하기 어렵기 때문에 豫防이 무엇보다도 重要하다 하겠다.

疾病을 豫防하는 것은 韓醫學이 窮極의으로 追求하는 主眼點으로⁶⁾ 일찌기 素問 四氣調神大論²¹⁾에 “不治己病 治未病, 不治己亂 治未亂”이라 하여 豫防을 強調하였는데 그 方法은 正氣를 扶固하여 邪氣를 防禦하는 것이다.

正氣는 抗病能力 및 그 機能活動을 包括하고, 邪氣는 廣範圍한 致病因素를 總稱하는 것으로, 六淫의 邪氣와 身體內의 陰陽失調로 發生된 病理變化 및 瘀血, 痰飲 등의 病邪를 말한다^{6, 13, 162)}.

疾病은 正氣와 邪氣 사이의 平衡이 決定하는데 大部分 正氣不足과 各 臟腑機能의 失調가 內在的인 根據이며, 邪氣는 다만 疾病發生의 重要한 條件이다^{6, 8, 13, 22, 162)}. 이를 素問 刺法論²¹⁾에서 “正氣存內 邪不可干”, 評熱病論²¹⁾에서 “邪氣所溱 其氣必虛”라 說明하였다.

腫瘍發生도 主로 正氣가 不足하고 邪氣가 停滯함으로써 氣滯血瘀하고 痰凝毒聚하며 서로 膠結하고 蘊鬱하여 마침내 腫塊가 되는 것이며, 正氣의 虛損 특히 氣血陰陽의 虛損이 主要한 原因이라 하였다^{22, 163)}.

腫瘍患者의 免疫能은 一般的으로 低下되어 있어^{22, 65, 99, 114, 130, 131, 163, 168)}, 臨床的으로 正氣가 虛한 狀態로 나타나므로^{22, 163, 168)} 免疫學的인 檢査는 腫瘍에 對한 效果를 보는 指標이며 또한 人體 正氣의 狀態를 觀察하는 하나의 指標로 삼을 수 있다고 하였고²²⁾, 史¹⁶²⁾는 先天稟賦의 強弱과 非特異性免疫 程度를 聯關시키고 後天調養과 特異性 免疫增強關係를 說明하여 正氣와 免疫의 關係를 論하였다.

免疫이란 外部에서 들어오는 異物質에 대해

宿主를 保護하려는 現象으로 抗原刺戟에 의해 抗體가 만들어지는 免疫反應을 抗體媒介免疫 (antibody-mediated immunity) 또는 體液性免疫 (humoral immunity)이라 하고, 抗原刺戟을 받은 T淋巴球나 T淋巴球가 만들어 낸 여러 蛋白質들에 의한 免疫反應을 細胞媒介免疫 (cell-mediated immunity) 또는 細胞性免疫 (cellular immunity)이라 한다. 免疫反應의 特殊性은 나와 남의 區別, 特異性 그리고 記憶力인데, “나와 남을 區別하는 能力”이란 자신이 가지고 있는 物質에 대해서는 免疫反應을 일으키지 않고 異物質에 대하여만 免疫反應을 일으키는 能力이고, “特異性”이란 例를 들어 豫防接種을 받은 病原菌에 대해서만 豫防能力을 가지는 特殊性을 意味하고, “記憶力”이란 한번 經驗한 異物質을 오랜동안 또는 平生을 두고 잊지 못하는 現象이다. 行動分子로 抗體를 만들어 抗原과 結合되면 補體의 여러 成分들이 活性化되고 그 結果로 抗體가 結合된 細胞 또는 細菌이 破壞되거나 食細胞의 食作用이 充進된다^{5, 36)}.

細胞媒介免疫反應의 中樞의 役割을 하는 細胞는 T淋巴球로서 補助(helper) T淋巴球, 抑制(suppressor) T淋巴球, 細胞毒性(cytotoxic) T淋巴球 그리고 遲延型過敏免疫反應(DTH) T淋巴球로 構成되어 있는데 補助 T淋巴球은 여러 種類의 cytokine을 生産하여 B淋巴球가 效率的으로 抗體를 生産하고 細胞毒性 T淋巴球가 잘 생기도록 도와준다. 抑制 T淋巴球는 必要以上으로 抗體 또는 細胞毒性 T淋巴球가 生産되는 것을 牽制하며 적절한 免疫反應이 일어나도록 調節하는 機能을 갖고 補助 T淋巴球와 抑制 T淋巴球는 個體의 免疫反應을 調節하여 免疫學的 平衡을 維持하고 있어 이 平衡이 깨지면 疾病에 걸리게 된다. 細胞毒性 T淋巴球는 標的이 되는 細胞와 直接 接觸하여 標的細胞(target cell)를 破壞하는데 바이러스 感染細胞나 癌細胞等

向이 있으며^{170, 172)} 扶正藥物에 抗癌成分이 있는 藥物을 配合하는 “扶正抗癌液”으로 보다 良好的 效果를 거두고 있다^{22, 164, 165, 166, 168)}.

最近에 西洋醫學에서는 여러가지 生物學的 反應物質(BRM)을 利用한 免疫療法과 癌細胞를 破壞할 수 있는 能力을 가진 物質을 生産하는 遺傳情報를 移入시킨 후 癌患者에게 注入함으로써 抗癌治療效果를 바라는 遺傳子療法에 期待를 하고 있다^{40, 117, 123, 128, 130)}.

本實驗에서는 程¹⁵⁹⁾의 醫學心悟에 噎膈을 治療하는 方劑로 收錄된 以後 여러 醫家들^{9, 11, 17, 138, 139, 141, 142, 146, 147, 159)}에 依하여 臨床에 活用되어 온 啓膈散을 選擇하여 動物實驗을 施行하였다. 啓膈散의 構成藥物은 沙蔘, 丹蔘, 茯苓, 川貝母, 鬱金, 砂仁殼, 荷葉蒂, 杵頭糠인데 醫家에 따라서는 構成과 用量을 다르게 하였다^{17, 138, 147)}.

啓膈散의 抗癌 및 免疫反應에 對한 研究은 아직 試圖되어진 적이 없으나 陳¹⁷¹⁾은 橫膈膜 痙攣에 應用하여 만족할만한 效果를 얻었다고 報告하였다.

膈은 飲食을 삼킬 때 障礙를 받아 食入則吐하는 病症으로 噎은 呑咽之時 梗噎不順이고 膈은 胸膈阻塞 飲食不下하는 것이다^{9, 139, 141, 142, 146, 147, 161)}. 重要原因은 憂思惱怒^{9, 137, 139, 141, 142, 146, 147, 150, 151, 153, 154, 160)}, 酒色過度^{9, 139, 141, 142, 146, 147, 151, 153)}, 飲食所傷^{9, 139, 142, 146, 147)}, 寒溫失宜^{9, 139, 147)}, 勞役所傷^{9, 139, 151)} 등으로 臟氣가 不和함으로써 氣血이 瘀結되고 陰液稿枯되며 胸膈을 填塞하여 飲食을 삼킬 수 없는 것이라 하였고^{9, 139)}, 西洋醫學의 食道癌, 噴門癌, 噴門 痙攣, 食道炎, 食道神經症, 憩室症, 胃癌이 이 範疇에 屬한다고 하였다^{3, 9, 11, 12, 17, 58, 139, 141, 142, 146, 147, 155)}. 治療時에는 虛實을 먼저 살펴서 痰氣交阻 津虧熱結 瘀血內結 氣虛陽微 等^{9, 139, 141, 142, 146, 147)}으로 辨證施治하였다.

啓膈散의 個別 藥物에 對한 效能을 살펴보면 2, 19, 22, 136, 140, 143, 144, 145, 148, 156, 157, 158), 方中の 沙蔘은 養陰清肺, 祛痰止咳, 益胃生津하는 效能이 있어 扶正培本藥에 屬하며 陳¹⁹⁾은 去痰作用, 強心作用, 抗真菌作用이 있다 하였고, 李¹⁴⁹⁾는 肺癌 腸癌 胃癌 扁平癌 等に 應用할 수 있다 하였다.

丹蔘은 活血祛瘀 涼血消癰, 清心養血, 除煩安神하는 效能이 있어 臨床에서 血管을 擴張하여 血壓을 降下시키고 鎮靜, 安靜 및 鎮痛作用과 血糖降下作用이 報告되고 있으며 動物實驗에서 抗癌作用이 觀察되어 李¹⁴⁹⁾는 各種 腫瘍治療에 應用할 수 있다 하였다.

茯苓은 利水滲濕 健脾和中寧神 益胃安神하는 效能이 있는데 補邪의 어느 쪽에도 치우치지 않아 臨床에서 廣範圍하게 使用되고 있으며 王¹⁴⁵⁾은 消化管腫瘍에, 李¹⁴⁹⁾는 肺癌, 尿中毒에 使用할 수 있다 하였고, 靖¹⁶⁷⁾은 抗癌藥의 效果를 높이고 S-180 肉瘤抑制作用이 있다고 하였다.

川貝母는 清熱潤肺 化痰止咳 散結하는 效能이 있어 氣管平滑筋을 擴張시키고 分泌를 減少시키며 瞳孔擴大 및 血壓降下作用이 있으며 葉¹⁴³⁾은 鼻咽癌에, 王¹⁵¹⁾은 鼻咽癌, 乳癌, 肺癌 等に 應用할 수 있다 하였다.

鬱金은 行氣化瘀 涼血止痛 清心解鬱 活血開竅 利膽退黃하는 效能이 있으며 王¹⁴⁵⁾은 癌細胞 抑制作用이 있어 肝癌 및 胰腫瘤에 쓸 수 있다 하였다.

砂仁殼은 化濕行氣 溫脾止瀉 脛脾寬中 安胎하는 效能이 있는데 砂仁보다 溫性과 力量이 다소 弱하다고 하였다. 荷葉蒂는 和胃安胎 止血止帶 收斂止血 清暑 濕하는 效能이 있다고 하였다.

杵頭糠은 米皮糠 米糠이라고도 하는 벼의 種皮로 噎膈과 脚氣를 治療하는데 一種의 抗癌物質을 含有하여 생쥐의 腹水癌과 S-180 抑制

효과가 있다고 하였고 靖¹⁶⁷⁾은 杵頭糠이 抗癌作用이 있어 抗癌劑와 併用投與時 治療效果를 높이고 副作用을 輕減시켰다고 하였다.

이와같은 藥物로 構成된 啓膈散은 養陰生津하는 扶正과 活血祛瘀, 滌痰散結하는 祛邪가 結合되어 痰氣交阻型的 噎膈을 治療하는 處方으로 運用되고 있다.

以上の 考察에 根據하여 本實驗에서는 啓膈散의 抗癌 및 免疫反應의 效能을 究明하고자 實驗動物을 利用하여 抗癌作用으로는 試驗管內 細胞生存能, 擔癌생쥐의 生存期間, 腫瘍의 成長, 體重의 變化를 觀察하였으며, 免疫反應으로는 細胞內 DNA 및 RNA 生合成을 抑制함으로써 免疫抑制效果를 나타내는 葉酸拮抗劑의 一種인 methotrexate^{15, 20)}를 생쥐에 經口投與하여 免疫機能이 低下된 狀態에서 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價 및 溶血素價, rosette 形成細胞數, IL-2 生産能, 淋巴球增殖反應, 自然殺害細胞活性, carbon clearance에 依한 食能의 效果에 對하여 實驗하였고 아울러 長期間投與時 나타날 수 있는 肝腎障害의 與否를 豫測하고자 血清中 GOT, GPT, BUN 및 creatinine을 測定하였다.

最近 抗癌候補物質 探索의 傾向은 過去의 마우스 腫瘍을 利用한 檢索法에서 脫皮하여 人體에서 由來된 腫瘍細胞柱를 利用하여 各 腫瘍細胞柱別로 가장 感受性 있는 抗癌物質을 찾는 것이며⁴⁴⁾, 먼저 in vitro에서 檢索하고, 다음 in vivo 檢索, kinetics 및 toxicology 등으로 檢索해 가는데 그 동안 MTT 및 XTT assay가 널리 使用되어 왔고, in vivo 檢索은 nude mouse에 human tumor를 移植시켜 藥效를 評價하는 方法이 중요시 되고 있다^{32, 46, 62, 92)}.

MTT 檢索法은 生存 癌細胞의 酵素作用에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)가 還元되어

formazan crystal로 沈澱되는 程度를 吸光度로 測定하여 이로부터 抗癌劑에 의해 癌細胞가 死滅 또는 增殖이 抑制되는 程度를 決定하는 實驗法으로, 96 well plate를 利用하면 實驗操作의 自動化가 가능하고 實驗結果의 再現性과 客觀性도 優秀하여 大量檢索이나 1次 檢索에 適合하다^{62, 86, 132)}. 本實驗에서는 啓膈散이 SUN-1(胃癌細胞柱), SUN-C4(大腸癌細胞柱) 및 SUN-396(肝癌細胞柱)에 對한 增殖抑制作用을 觀察하고자 MTT assay를 利用하였는데, 實驗結果 韓國人 胃癌細胞柱, 大腸癌細胞柱 및 肝癌細胞柱에 對한 IC₅₀ 값이 230 μ g/ml 以上으로 나타나면 抗癌效果가 微弱하거나 없다고 認定할 경우¹²⁹⁾ SUN-1은 0.823 μ g/ml, SUN-C4는 7.932 μ g/ml로 나타나 抗癌效果를 認定할 수 있었고 SUN-396은 796.5 μ g/ml으로 나타나 抗癌效果를 認定할 수 없었다.

抗癌效果를 살펴보기 위하여 Sarcoma-180 細胞를 腹腔內에 移植한 후 擔癌생쥐의 生存期間을 觀察한 바, 生存期間이 다소 增加하였으나 有意성은 認定할 수 없었고, 腫瘍成長抑制率을 觀察한 바, 對照群에 비하여 有意性 있는 抑制率을 보였으며 생쥐의 體重도 對照群에 비하여 有意性 있는 增加를 보였다.

遲延型 皮膚過敏反應은 오래전부터 細胞性 免疫反應을 測定하는데 使用하여 왔는데 細胞性 免疫을 評價하는 代表의 方法이다. 그 機轉은 抗原을 減작된 T細胞들에게 傳達하여 T細胞를 活性化시키면 活性化된 行動細胞들이 여러가지 cytokine을 分泌하게 되고 이로 因하여 周圍로 巨食細胞와 非特異炎症細胞들이 모여 들어 活性化되고 效率의으로 抗原을 죽이게 되는 T細胞 依存現象이다^{5, 174)}. 다만, 各 研究者마다 使用한 抗原의 種類와 量 및 方法에는 差異가 있다^{46, 60, 73, 93, 122, 124)}.

本實驗에서는 啓膈散投與群이 對照群에 비

하여 증가하는 경향이 나타났으나有意性は認定되지 않아 T細胞의 活性이 다소 亢進된 것으로 思慮된다.

體液性 免疫反應에 미치는 影響을 評價하기 위하여 赤血球表面抗原과 그에 對한 抗體와의 結合에 의해 생기는 凝集反應을 보는 赤血球凝集素價와 赤血球表面抗原과 抗體의 結合體에 異種의 補體가 加해짐으로써 생기는 溶血反應을 보는 赤血球溶血素價를 測定^{1, 5, 36, 122, 195)} 하였던 바, 凝集素價는 啓膈散投與群이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었고, 溶血素價는 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性이 認定되지 않았다. 따라서 啓膈散이 體液性免疫機能을 다소 增強시킨 것으로 볼 수 있다.

人體의 T細胞와 SRBC가 結合하는 現象을 보는 rosette 形成 實驗은 T細胞의 分離 및 分布를 測定하는 方法으로 利用하고 있다¹⁾. 本實驗에서는 細胞性免疫反應을 間接적으로 評價하기 위하여 脾臟細胞의 rosette 形成 檢査를 하였던 바, 對照群에 比하여 有意性 있게 增加하여 啓膈散이 細胞性免疫能을 亢進시킨 것으로 생각된다.

Morgan等¹⁸⁹⁾에 의해서 最初로 發見된 interleukin-2는 T淋巴球 增殖因子로서 그 機能은 T淋巴球의 成長, B細胞의 分化因子 誘導와 細胞毒性 T淋巴球, NK細胞, LAK細胞 및 巨食細胞 等の 增殖 및 活性에 關與하여, 個體內에서 免疫反應의 中心的인 役割을 하는 것으로 알려져 있다^{5, 40, 65, 93, 115, 194)}. 淋巴球의 IL-2 生成機轉은 活性과 增幅의 2段階로 첫째는 T細胞 受容體 活性化에 依한 것인데, 이 때 T細胞에서는 여러 免疫調節 lymphokine이 合成되며 同時에 T細胞 增殖을 直接的으로 調節할 수 있는 蛋白質 등이 合成되고, 둘째는 T細胞의 活性과 分化로 나타나는 IL-2, IL-2 受容體의 發顯,

이들 두 物質의 相互作用에 의한 自家增殖 및 分泌方法이다¹¹⁵⁾. 따라서 生成되는 lymphokine의 量을 測定하면 T細胞의 活性化 程度를 알 수 있다^{36, 174)}.

本實驗에서 淋巴球을 Con-A로 刺戟 培養時 啓膈散의 IL-2 生産能이 促進되었는데 이와같은 結果는 啓膈散의 特定 亞集團에 作用하여 IL-2에 感受性이 높은 細胞週기로 變化시켜서 IL-2의 autocrine system이 增幅되거나 또는 T細胞의 表面이 修飾되어 IL-2 및 다른 lymphokine에 대한 感受性이 促進되었으리라 생각된다.

Nowell¹⁹⁰⁾에 依하여 mitogen에 의한 淋巴球 增殖能이 最初로 報告된 이래 淋巴球 增殖能 測定은 淋巴球機能을 間接적으로 把握할 수 있는 免疫指標로 應用되고 있으며, 抗原-特異的인 反應 및 非特異的인 刺戟에 의해서 IL-2 依存性 T 淋巴球의 增殖이 發顯된다고 하여 이것의 增加는 淋巴球 活性의 亢進이나 數的 增加를 反映하고 있다^{10, 93, 174)}. 本實驗에서는 淋巴球의 增殖이 增加된 것으로 나타나고 T淋巴球로부터 IL-2 生産能이 增加된 것으로 보아 淋巴球의 數와 活性이 亢進되고 補助 T細胞의 活性을 增加시켜 免疫系 細胞의 增殖과 分化가 直接的으로 亢進되었으리라 思慮된다.

Herberman等¹⁸⁵⁾이 實驗을 통해 밝힌 NK 細胞는 免疫特異性이 없이 廣範圍한 腫瘍細胞들을 攻撃하는 機能을 가진 正常的으로 存在하는 末梢血液淋巴球인데 細胞表面에 B淋巴球나 T淋巴球의 特徵的인 標識因子를 가지지 않으며 過去 減作을 받지 않은 癌細胞나 바이러스에 感染된 細胞도 認知하여 破壞할 수 있다^{10, 32, 93, 115, 174, 177)}. 純種마우스에서 NK 細胞數가 減少함에 癌發生率이 높아지고 癌患者에서 NK 細胞機能이 顯著히 低下되어 있는 점으로 보아 腫瘍에 對한 免疫監視에 NK 細胞가 重要な 役

割을 하는 것을 알 수 있다^{99, 115, 128, 131, 174}). NK 활성은 NK 세포의 숫자가 아닌 標的細胞와의 結合能力, 結合된 標的細胞의 傷害能力, 한개의 作動細胞가 몇개의 標的細胞를 傷害시킬 수 있는가에 따라 左右되는 것으로 思料된다⁹⁹).

本實驗에서 NK 細胞活性를 測定하였던 바, 作動細胞 對 標的細胞의 比가 100 : 1에서는 對照群에 比하여 有意性있는 增加를 보였으나 50 : 1과 10 : 1에서는 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 없었다.

巨食細胞는 骨髓로부터 生産되는 細胞로서 組織이나 肝, 脾臟, 淋巴腺, 血液 等に 널리 分布되어 있어 外部 物質을 破壞하는 食作用과 腫瘍細胞를 除去하는 機能을 갖고 있다^{5, 36, 79, 174}).

非特異的인 免疫反應의 하나로 貪食作用과 抗原提供細胞로서의 役割 뿐 아니라 腫瘍에 대하여 細胞毒性을 일으키는 巨食細胞의 活性度를 比較해 보기 위하여 생쥐의 꼬리靜脈에 carbon을 注射하여 carbon clearance를 測定하였던 바, 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았다.

SGOT, SGPT의 測定은 肝臟障病을 살펴보는 重要한 指標가 되는데 本實驗에서 使用한 Reitman-Frankel¹⁹¹)法에 의한 正常値는 SGOT가 10-38 unit, SGPT는 8-35 unit 以內이며 肝障病, 心筋梗塞, 急慢性肝炎, 閉塞性黃疸, 肝硬變, 肝癌 等の 疾患에서 增加하게 된다^{4, 14, 16, 18, 175}). 本實驗에서 SGOT와 SGPT는 對照群에 比해 減少하는 傾向이 있어 長期間 投與時 肝損傷을 誘發하지 않으리라 推測된다.

血清中の BUN 含量과 creatinine 含量의 測定은 腎臟機能을 살펴보는 하나의 指標가 되는데 正常人의 BUN 含量과 creatinine 含量은 각각 10-15mg/dl 0.8-2.0mg/dl로 BUN 含量은 絲球體腎炎, 萎縮腎, 尿路閉塞, 腎의 破壞性 諸疾患 等에서 增加를 나타내며 creatinine 含量은 腎障

害, 尿路閉塞, 妊娠中毒, 脫水, 腸閉塞, 筋炎 等에서 增加를 나타낸다^{4, 14, 16, 175}). 本實驗에서 對照群에 比하여 BUN과 creatinine이 變變化가 없는 것으로 보아 長期間 投與해도 腎損傷을 誘發하지 않으리라 推測된다.

以上の 實驗結果와 文獻考察을 통하여 啓膈散이 SUN-1(胃癌細胞柱), SUN -C4(大腸癌細胞柱)에 抑制效果를 보이며 癌腫생쥐의 腫瘍成長 抑制, 體重增加 等を 보여 啓膈散의 直接的인 抗癌效果가 認定되었다.

免疫反應을 觀察하기 위하여 methotrexate로 誘發된 免疫低下 狀態에서 遲延型過敏反應, 赤血球溶血素價, carbon clearance에 의한 貪食能은 對照群에 比하여 增加하는 傾向을 보이고, 赤血球凝集素價, rosette 形成細胞數, Interleukin-2 生産能, 淋巴球增殖反應, 自然殺害細胞의 活性度(100 : 1)에서 有意性 있는 增加를 보여 免疫能이 向上되었음을 알 수 있었다.

이와같은 抗腫瘍作用은 腫瘍細胞에 直接作用하여 發顯됨과 同時에 生體免疫系細胞의 活性促進作用에 의하여 間接적으로 發顯됨을 알 수 있었다.

血清中 SGOT, SGPT, BUN과 creatinine을 測定하여본 바, 對照群에 比하여 類似的한 數値를 나타내어 肝 및 腎臟機能에 障病을 주지 않는 것으로 認定되어 本處方은 長期間 投與하여도 毒性作用이 없을 것으로 思慮된다.

韓藥 抽出物을 利用한 實驗은 活性를 갖고 있는 微量成分의 濃度를 稀釋시킬 수도 있고²⁴⁾ 實驗動物과 人間의 藥動力學的特性, 毒性學的性質의 差異, 實驗에 使用한 動物의 種이나 癌의 種類 및 移植方法, 藥物의 投與時期와 經路 等に 의해서 크게 影響을 받기도 하므로 얻어진 實驗結果로 臨床效果를 豫測하기 어렵지만^{46, 92, 108}), 本實驗을 통해 啓膈散이 免疫療法劑 및 抗癌劑로서의 可能性을 나타내었으며,

多様な實驗과 臨床을 통해 더 많은 研究가 이루어지기를 期待한다.

V. 結 論

啓膈散의 抗癌 및 免疫反應에 關한 效果를 究明하기 위하여 抗癌作用으로는 癌細胞의 生存能, 擔癌생쥐의 生存日數, 癌塊의 크기, 생쥐 體重의 變化 等を 觀察하였고, 免疫反應을 觀察하기 爲하여 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價 및 溶血素價, rosette 形成細胞數, Interleukin-2 生産能, 淋巴球增殖反應, 自然殺害細胞의 活性度, carbon clearance에 의한 食食能을 測定하였고, 肝腎毒性에 對한 作用을 알기 위해 SGOT, SGPT, BUN과 creatinine을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 啓膈散 抽出液이 SUN-1(胃癌細胞柱), SUN-C4(大腸癌細胞柱) 및 SUN-396(肝癌細胞柱)의 成長에 미치는 影響을 MTT assay를 통하여 觀察한 結果, SUN-1, SUN-C4의 成長을 抑制하였다.

2. 擔癌생쥐에 對한 生存期間 延長效果는 啓膈散投與群이 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

3. 擔癌생쥐에 對한 腫瘍成長抑制作用效果는 啓膈散投與群($P < 0.01$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었다.

4. 擔癌생쥐의 體重變化에 對한 效果는 啓膈散投與群($P < 0.05$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었다.

5. 免疫機能이 低下된 생쥐의 遲延型過敏反應에 對한 效果는 啓膈散投與群이 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

6. 免疫機能이 低下된 생쥐의 赤血球凝集素價는 啓膈散投與群($P < 0.05$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었고 赤血球溶血素價는 啓膈散投與群이 對照群에 比하여 增加하는 傾向이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

7. 免疫機能이 低下된 생쥐의 rosette 形成細胞數에 對한 效果는 啓膈散投與群($P < 0.001$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었다.

8. 免疫機能이 低下된 생쥐의 IL-2 生産能은 啓膈散投與群($P < 0.001$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었다.

9. 免疫機能이 低下된 생쥐의 淋巴球增殖反應에서는 啓膈散投與群($P < 0.01$)이 對照群에 比하여 有意性이 認定되었다.

10. 免疫機能이 低下된 생쥐의 自然殺害細胞活性度는 啓膈散投與群에서 E/T ratio가 100 : 1인 경우 對照群에 比하여 有意性이 認定되었고 ($P < 0.01$), 50 : 1과 10 : 1에서는 對照群에 比하여 增加하는 경향이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

11. 免疫機能이 低下된 생쥐의 carbon clearance에 對한 效果는 啓膈散投與群에서 對照群에 比하여 增加하는 경향이 있었으나 有意性은 認定되지 않았다.

12. SGOT, SGPT, BUN 및 creatinine은 對照群과 類似하여 別 變化가 없었다.

以上の 實驗結果로 보아 啓膈散은 直接的인 抗癌效果와 免疫增強效果가 있음이 認定되었고 肝腎毒性을 誘發하지 않음을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 各 醫科大學 微生物學 教室 : 醫學 微生物學, 서울, 고문사, pp.187, 200, 203-204,

- 1985.
2. 강병수 외 : 本草學, 서울, 영림사, pp.294-296, 302-304, 414-415, 419-420, 463-464, 587-588, 1994.
 3. 구본홍 : 소화기 질환의 한방임상, 서울, 행림출판사, pp.28-32, 1977.
 4. 김기홍 : 검사성적의 임상적 활용, 고문사, 서울, pp.203, 152-153, 1980.
 5. 김세종 : 면역학, 서울, 고려의학, pp.1-20, 114-116, 134-136, 142-143, 153, 253, 272-273, 290-299, 1994.
 6. 김완희 외 : 한의학의 형성과 체계, 대구, 중문출판사, pp.192-200, 1991.
 7. 김종대 : 보건복지백서, 과천, 보건복지부, pp.70-77, 1995.
 8. 김현제 외 : 한의학사전, 서울, 성보사, p.204, 1983.
 9. 류기원 외 : 비계내과학, 서울, 그린문화사, pp.89-95, 1991.
 10. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.1-2, 133, 138, 182-191, 207-241, 1990.
 11. 신천호 譯 : 病症診治, 서울, 성보사, pp.573-575, 1990.
 12. 신천호 譯 : 千家妙方, 서울, 성보사, p.145, 1992.
 13. 안덕균 譯 : 면역과 한방, 서울, 도서출판 열린책들, pp.1-13, 1994.
 14. 이귀녕 외 : 임상병리파일, 서울, 의학문화사, pp.73-74, 77-78, 228-231, 1990.
 15. 이문호 외 : 내과학(下), 서울, 학림사, pp.2466-2482, 1986.
 16. 이삼열 외 : 임상병리 검사법, 서울, 연세대학교 출판부, pp.191-196, 223-225, 1984.
 17. 조세형 : 새 임상처방집, 서울, 고려서점, p.153, 1971.
 18. 조운한 : 임상화학 검사의 실기, 서울, 고문사, pp.122-125, 1973.
 19. 陳存仁 : 漢方醫藥大事典, 서울, 松嶽출판사, pp.Ⅱ 64-67, 154-157, 240-243, 286-289, 388-391, Ⅲ 60-63, 1990.
 20. 한대섭 외 : 藥理學, 서울, 녹지사, pp.359-360, 362-363, 1985.
 21. 홍원식 : 黃帝內經 素問, 서울, 동양의학연구원, pp.14, 124, 285, 1981.
 22. 홍원식 譯 : 현대중공의 암치료, 서울, 영문사, pp.286-287, 342-345, 378-388, 1984.
 23. 강대근 외 : 息賁丸 및 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, 大韓韓方內科學會誌, 12(2) 96-112, 1992.
 24. 강삼식 외 : 표준엑스와 표준분획 제조법, 전통약물로 부터 신약개발연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, pp.9-15, 1993.
 25. 강석봉 외 : 白何首烏와 黃精이 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 9 : 367-376, 1986.
 26. 강운호 : 數種의 韓藥物이 白鼠의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 8(1) 53- 74, 1987.
 27. 강탁림 외 : 數種 韓藥材의 抗癌活性研究, 대전대학교 한의과대학논문집, 3(2) 315-321, 1995.
 28. 강혜영 외 : 秘方奪名散의 投與가 마우스의 先天的 및 特異 免疫反應에 미치는 影響, 方劑學會誌, 2(1) 131-149, 1991.
 29. 고경석 외 : 人蔘水鍼이 Methotrexate를 誘發한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 11 : 37-54, 1988.
 30. 고병희 외 : 鹿茸 熟地黃 人蔘 五加皮가 免疫反應 및 NK細胞活性度에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 7(2) 157-173, 1986.

31. 고병희 외 : 四種 鹿茸의 免疫學的 效能에 關한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 12(1) 187-199, 1991.
32. 광주희 외 : 영지를 투여한 마우스복강암 세포에 대한 NK세포의 활성화능, 대한면역학회지, 16 ; 115-126, 1994.
33. 권문현 외 : 甘草와 雷公藤合劑 煎湯液이 마우스의 免疫抑制에 미치는 影響, 원광한의학, 4(1) 337-359, 1994.
34. 권현 외 : 清離滋坎湯 및 清離滋坎湯加味方이 肺損傷과 免疫機能에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 15 : 5-28, 1992.
35. 김강산 외 : 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, 원광한의학, 1(1) 153-167, 1991.
36. 김길현 : 면역반응의 측정-면역조절물질 탐색기술, 제3회 산학연 심포지움 논문집, 한국생화학회, pp393-406, 1990.
37. 김달래 외 : 太陰人 清心蓮子湯과 清肺瀉肝湯의 免疫反應과 항알레르기 效果에 關한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 14 : 131-160, 1991.
38. 김덕호 외 : 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 6(2) 55-63, 1985.
39. 김동렬 외 : 四物髓甲清皮湯과 四物髓甲清皮湯加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 15(2) 174-196, 1994.
40. 김동집 : BRM이란 무엇인가, 대한의학협회지, 36(8) 922-928, 1993.
41. 김상용 외 : 각종 암세포주에 대한 SB-31의 항암효과, 대한암학회지, 26(6) 959-963, 1994.
42. 김상훈 외 : 紫莞이 抗癌작용 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 13 : 317-329, 1990.
43. 김성수 외 : 人蔘 및 熟地黃이 Methotrexate로 誘發된 생쥐의 免疫反應 低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 9 : 355-366, 1986.
44. 김수기 외 : SK-302 물질의 인형 위암 세포주에 대한 시험관내 항암제 감수성 검사, 대한암학회지, 27(5) 703-709, 1995.
45. 김수진 외 : 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 東醫病 理學會誌, 8 : 119-136, 1993.
46. 김숙희 외 : 밀버섯의 Collyban에 관한 면역학적 연구, 대한암학회지, 25(2) 288-298, 1993.
47. 김질수 외 : 增損五積丸 腎積方이 腫瘍細胞에 미치는 影響, 원광한의학, 4(1) 167-190, 1994.
48. 김태운 외 : 人蔘水鍼 前處置가 發癌豫防에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 9(2) 33-44, 1988.
49. 나영걸 외 : 白朮과 枸杞子가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10 : 579-587, 1987.
50. 노석선 외 : 當歸飲子 水抽出物이 抗 Allergy 反應과 마우스의 免疫細胞機能에 미치는 影響, 원광한의학, 2(1) 121-140, 1992.
51. 노훈정 외 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學 會誌, 2(1) 43-56, 1996.
52. 노훈정 외 : 巴豆加大黃이 抗腫瘍作用과 自然殺害細胞의 活性에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1) 75-90, 1996.

53. 류태형 외 : 생쥐에 이식된 암세포에 있어서의 Linoleic Acid의 암억제 효과, 대한암학회지, 24(4) 493-503, 1992.
54. 명성준 외 : 雷公藤 煎湯液이 마우스의 免疫抑制에 미치는 影響, 원광한의 학, 4(1) 309-355, 1994.
55. 문병하 외 : 氣丸이 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1) 167-189, 1995.
56. 문은이 외 : 당귀 추출물이 면역계에 미치는 影響(Ⅱ), 대한면역학회지, 13(1) 71-77, 1991.
57. 민용태 외 : 補中益氣湯의 投與가 紫外線 照射로 低下된 마우스의 免疫機能 恢復에 미치는 影響, 方劑學會誌, 2(1) 107-129, 1991.
58. 박동원 외 : 膈 反胃에 대한 文獻的 考察(Ⅰ), 大韓韓醫學會誌, 5(1) 25-27, 1984.
59. 박무인 외 : 마우스에 이식된 Sarcoma 180에 대한 Mycoplasma hominis의 항암효과, 대한암학회지, 26(3) 484-494, 1994.
60. 박은규 : 도꼬마리 면역 조절작용, 3회 산학연 심포지움논문집, 한국생화학회, pp.443-465, 1990.
61. 박은정 외 : 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫反應의 機能에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 11(2) 149-169, 1990.
62. 박재갑 : 항암제의 검색방법, 전통약물로부터 신약개발 연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, pp.174-181, 1993.
63. 박진웅 외 : 濃度差에 따른 黃 藥 鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫 反應에 미치는 影響, 大韓韓鍼學會誌, 11(1) 67-81, 1994.
64. 박춘혁 외 : 黃花敗醬과 白花敗醬이 抗癌 作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14 : 1-26, 1991.
65. 박형주 외 : 종양마우스 비장세포의 IL-2생산과 마이토젠으로 유도한 세포 증식 반응, 대한면역학회지, 16 : 331-338, 1994.
66. 배원영 외 : 黃 水 鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓鍼學會誌, 11(1) 49-66, 1994.
67. 백태현 외 : 半夏白朮天麻湯과 半夏白朮天麻湯加味方의 抗癌效果과 免疫反應에 관한 實驗的研究, 慶熙韓醫大論文集, 17(1) 121-143, 1994.
68. 손삼식 외 : 蘿 와 天漿殼 액기스가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 本草分科學會誌, 4(1) 63-72, 1989.
69. 송석호 외 : 에 應用되는 歸朮破 湯과 加味 歸朮破 湯의 效能에 관한 研究, 慶熙醫學, 10(1) 26-40, 1994.
70. 송윤희 외 : 溫鍼, 레이저鍼 및 毫鍼이 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 15 : 69-89, 1992.
71. 송윤희 외 : 溫鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應 低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 12 : 301-313, 1989.
72. 심재연 외 : 白鼠를 이용한 枳實 魚腥草 穿山甲 및 猪의 抗癌效果에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 11 : 99-112, 1988.
73. 양규환 : 면역항진효과 검정방법, 전통약물로부터 신약개발 연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, pp.114-121, 1993.
74. 양상은 외 : 易黃湯이 利尿 抗腫瘍 消炎 및 抗菌에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14 : 271-292, 1991.
75. 양서현 외 : 靈芝 山慈 仙鶴草 卷柏 瓦松이 白鼠의 自然殺害細胞에 미치는 影響, 大

- 韓韓醫學會誌, 10(2) 103-114, 1989.
76. 양용태 외 : Sarcoma 180 복강암면역에 대한 홍삼의 효과, 대한면역학회지, 5(1) 15-27, 1983.
 77. 오민철 외 : 黃 및 當歸의 免疫增強效果에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 9 : 343-354, 1986.
 78. 오용성 외 : 水蓼 白蓼 및 紅蓼이 細胞性 免疫反應 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10 : 219-230, 1987.
 79. 오종석 외 : 암세포에 대한 대식세포의 독성효과에 미치는 생물학적 반응 조절 물질의 영향, 대한면역학회지, 17 : 251-257, 1995.
 80. 오천식 외 : 靈芝 山慈 仙鶴草 卷柏 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10 : 99-115, 1987.
 81. 유태성 외 : 레이저鍼이 糖尿病 白鼠의 血清 및 細胞性免疫에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 10(1) 75-83, 1989.
 82. 윤동학 외 : 人參의 3種 藥鍼製法이 放射線 被曝에 의한 免疫機能 低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 18(1) 31-43, 1995.
 83. 윤상협 외 : 六君子湯 小柴胡湯 魚腥草의 擔癌生存期間 延長效果와 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 慶熙醫學, 7(3) 342-357, 1991.
 84. 윤성묵 외 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍 學會誌, 2(1) 25-42, 1996.
 85. 은광석 외 : 화살나무 抽出物이 腫瘍發生과 免疫系에 미치는 影響, 원광한 의학, 2(1) 197-211, 1992.
 86. 이경호 외 : 항암물질 탐색을 위한 In Vitro 검색법의 비교연구, 대한암학회지, 27(5) 711-720, 1995.
 87. 이남구 외 : 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK細胞의 細胞毒성에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 10(2) 115-121, 1989.
 88. 이봉우 외 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1) 263-280, 1994.
 89. 이상범 외 : 艾灸가 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 15 : 449-466, 1992.
 90. 이성래 외 : 鹿血生化湯이 마우스의 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14 : 85-130, 1991.
 91. 이장천 외 : 蕃杏草 煎湯液 投與가 생쥐의 腫瘍致死細胞 및 抗炎症細胞의 活性度에 미치는 影響, 원광한의학, 1(1) 73-90, 1991.
 92. 이정옥 : 신규항암제의 약효평가, 3회 산학연 심포지움논문집, 한국생화학 회, pp.19-33, 1990.
 93. 이정호 외 : 화살나무의 항종양작용과 그 기전, 대한면역학회지, 15 : 243-253, 1993.
 94. 이학철 외 : 東風菜가 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 13 : 189-201, 1990.
 95. 이형구 : 人參芎歸湯의 肺損傷과 免疫機能에 미치는 影響에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 13(2) 187-201, 1992.
 96. 임사비나 외 : 3-methylcholantrene 皮膚癌에 대한 刺戟部位別 抗癌 및 免疫增強效果, 慶熙韓醫大論文集, 16 : 149-179, 1993.
 97. 임사비나 외 : 魚腥草水鍼의 抗腫瘍效果에 관한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 12 : 467-483, 1989.
 98. 임사비나 외 : 靈芝水鍼이 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 13(1) 71-81, 1992.
 99. 임수덕 외 : 인터페론 Alpha, Gamma 존재

- 하에 NK세포가 암세포 파괴에 미치는 영향에 대한 연구, 대한암학회지, 15(1), 1-13, 1983.
100. 임재훈 외 : 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 : 241-266, 1986.
101. 장문석 외 : 消毒丸의 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 17(1) 45-67, 1994.
102. 장일진 외 : 鬼箭羽水鍼이 實驗的 血栓症과 알레르기 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1) 405-433, 1994.
103. 장종식 외 : 蔘茸湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果과 Cyclophosphamide에 의한 副作用減少에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 13(1) 313-323, 1992.
104. 정경진 외 : 卷柏煎湯液이 先天的 免疫反應에 미치는 影響, 원광한의학, 4(1) 19-41, 1994.
105. 정동욱 외 : 加味通竅湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 10(1) 99-106, 1989.
106. 조성각 외 : 修治巴豆 및 巴豆加黃蓮의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1) 191-210, 1995.
107. 조성기 외 : 消積白朮散의 抗癌 免疫增強效果 및 Cisplatin의 腎臟毒性抑制에 미치는 影響에 관한 研究, 大韓韓醫學會誌, 14(2) 281-309, 1993.
108. 조용백 : Ultrafiltrable Plasma 를 이용한 抗癌劑의 Ex Vivo Pharmacodynamic Study, 3회 산학연 심포지움 논문집, 한국생화학회, pp.107-118, 1995.
109. 조종관 외 : 淸肝湯이 肝臟保護와 微小循環 및 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10(1) 59-98, 1987.
110. 조철호 : 마우스 악성흑색종의 실험적 폐전이에 대한 Monophosphoryl Lipid polyuridylic Acid 및 cisplatin의 항암효과, 연세의대학위논문집, pp.347-359, 1993. 2학기
111. 주송죽 외 : 八味地黃湯 煎湯液의 投與가 마우스의 自然致死細胞의 活性度 및 免疫反應에 미치는 影響, 원광한의학, 2(1) 429-450, 1992.
112. 주태청 외 : 溫鍼이 寒冷에 露出된 생쥐의 免疫機能 低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 15 : 297-312, 1992.
113. 차용석 외 : 熊膽牛黃 및 向日葵油藥鍼刺戟이 생쥐皮膚癌의 免疫機能에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 10(1) 9-19, 1993.
114. 최규철 외 : Lymphokine-Activated Killer 세포 및 Interleukin-2를 이용한 암의 면역요법, 대한의학협회지, 30(8) 869-884, 1987.
115. 최동락 외 : 전기자극과 심리갈등 스트레스를 받은 동물의 interleukin-2 생성능 및 lymphokine activated killer 세포능 변화에 대한 연구, 대한면역학회지, 13(2) 151-162, 1991.
116. 최서형 외 : 生肝湯과 그 分割이 肝臟保護 血小版凝集能 및 一般 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10 : 25-57, 1987.
117. 최용목 : Biotherapy 의 전망, 대한의학협회지, 36(8) 955-959, 1993.
118. 최인화 외 : 仙方活命飲의 抗癌 및 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 15 : 341-359, 1992.
119. 최정화 외 : 韓國產 靈芝 煎湯液이 마우스의 免疫細胞 機能에 미치는 影響, 원광한의학, 1(1) 129-151, 1991.
120. 최평락 외 : 鹿茸이 Methotrexate로 誘發된 免疫低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文

- 集, 10 : 589-604, 1987.
121. 하대유 외 : 고려인삼이 3-Methylcholanthrene 의 발암능에 미치는 영향, 대한의학 협회지, 27(6) 541-552, 1984.
 122. 하대유 외 : 알콜이 IL-2 및 IL-6생산과 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향, 대한면역학회지, 13(1) 17-31, 1991.
 123. 하대유 외 : 억제 T세포 조절에 의한 抗腫瘍면역의 증강Ⅱ. 억제 T세포 조절에 의한 종양의 소퇴, 대한면역학회지, 17 : 101-118, 1995.
 124. 하대유 외 : 면역반응, 진균감염 및 종양증식에 있어서 Vinblastine 감수성 억제 T 임파구의 역할, 대한면역학회지, 18 : 43-53, 1996.
 125. 한상일 외 : 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, 大韓韓方內科學會誌, 12(2) 1-15, 1992.
 126. 한성규 외 : 補中益氣湯 手拈散 및 補中益氣湯合手拈散의 抗癌과 免疫調節 作用에 관한 實驗的研究, 慶熙韓醫大論文集, 18 : 15-29, 1995.
 127. 한주석 외 : 太陰人 葛根解肌湯이 免疫反應 및 NK細胞 活性도에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 11(2) 106-114, 1990.
 128. 허대석 : NK 세포와 LAK 세포의 임상응용, 대한의학협회지, 36(8), 936-941, 1993.
 129. 현진원 외 : 전통 약용식물 및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구, 생약학 회지, 25(2) 171-177, 1994.
 130. 홍원선 : 비특이 면역증강제, 대한의학협회지, 36(8) 949-954, 1993.
 131. 홍원선 외 : 랫트의 다장기 발암모델에 있어 자연살해활성의 변화, 대한면역학회지, 13(1) 43-50, 1991.
 132. 홍인규 외 : SNU 간암세포주들의 다중약제내성 1 유전자 발현과 抗癌劑에 대한 감수성 검사, 대한암학회지, 26(2) 219-230, 1994.
 133. 황규동 외 : 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果과 免疫反應 에 관한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1) 1-23, 1996.
 134. 황영명 외 : 生地黃 乾地黃 熟地黃이 細胞性 免疫反應 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10 :207-218, 1987.
 135. 황현서 외 : 濃度別 當歸藥鍼이 放射線 被曝에 의한 免疫機能低下에 미치는 影響, 대한침구학회지, 11(1) 113-129, 1994.
 136. 甘肅省新醫學研究所 : 中藥學, 北京, 人民衛生出版社, pp.192-193, 198-200, 366-367, 372-374, 385-386, 473-474, 518-520, 1982.
 137. 廷賢 : 萬病回春, 北京, 人民衛生出版社, pp.149-154, 1987.
 138. 方文賢 外 : 中醫內科症狀辨治手冊, 北京, 中國標準出版社, pp.276-277, 1989.
 139. 方藥中 外 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.233-238, 1986.
 140. 上海中醫學院 : 中草藥學, 香港, 商務印書館, pp.111-112, 222-223, 226-228, 376-377, 408-410, 475-477, 571-573, 1983.
 141. 上海中醫學院 ; 中醫內科學, 香港, 商務印書館 , pp.58-63, 1986.
 142. 上海中醫學院 : 內科學(上冊), 上海, 上海科學技術出版社, pp.83-87, 1983.
 143. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北, 華聯出版社, pp.169-173, 1986.
 144. 新文豐出版公司 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, pp.266-269, 302-306, 805-806, 1290-1291, 1593-1596, 1823, 2922-2924, 1985.
 145. 王冰等 : 抗癌中藥方選, 北京, 人民軍醫出版社, pp.22-25, 60, 1994.

146. 劉鵬舉：中醫臨證指南，長春，杏林科學技術出版社，pp.159-161，1991。
147. 李乾構 外：中醫胃腸病學，北京，中國醫藥科技出版社，pp.130-135，1993。
148. 李樹猷：現代中藥學，臺北，正中書局，上 pp.264-270, 468-471, 486-492, 683-686, 下 pp.149-159, 353-361, 526-531, 1970。
149. 李岩：腫瘤臨證備要，北京，人民衛生出版社，p.356，1989。
150. 李中梓：醫宗必讀，上海，上海科學技術出版社，pp.220-224，1987。
151. 張介賓：景岳全書，서울，대성문화사，pp.450-458，1988。
152. 程國彭：醫學心悟，香港，友聯出版社，pp.177-178，1961。
153. 周命新：醫門寶鑑，서울，의성당，pp.131-133。
154. 朱橧 外：普濟方(第五冊 諸疾)，北京，人民衛生出版社，pp.2912-2913，1983。
155. 周洪範 主編：中國秘方全書，好兄弟出版社，臺北，p.183，1985。
156. 中國藥物大全編委會：中國藥物大全(中藥卷)，北京，人民衛生出版社，pp.22-23, 138-139, 142, 217-220, 245-247, 358-359，1991。
157. 中醫大辭典編輯委員會：中醫大辭全(中藥分冊)，北京，人民衛生出版社，pp.155, 258, 286，1982。
158. 曾美玉 外：中國常用中藥材，北京，科學出版社，pp.59, 131, 190, 364, 705, 1076，1995。
159. 秦伯未 編：實用中醫學，新文豐出版公司，臺北，pp.60-61，1977。
160. 蔡陸仙 編：中國醫學匯海，新文豐出版公司，臺北，10卷 1271-1275。
161. 洪文旭 外：實用中醫消化病學，天津，天津科學翻譯出版公司，pp.106-107，1994。
162. 史知洪：淺談祖國醫學中正氣與現代免疫學的聯系，新中醫，9期：1-2，1988。
163. 徐龍生 外：扶正培本法在腫瘤臨床的應用，浙江中醫學院，12(3) 22-24，1988。
164. 王耐勤 外：扶正抗癌口服液抗腫瘤作用的研究，中成藥，15(10) 24-25，1993。
165. 王耐勤 外：扶正抗癌口服液抗腫瘤作用的研究，中成藥，15(4) 26-28，1993。
166. 魏育林 外：扶正解毒煎劑和CTX對小鼠腹腔巨三細胞產生腫瘤壞死因子的影響，中西醫結合雜誌，10(6) 353-355，1990。
167. 靖士俠 外：抗癌中藥及天然藥物有效成分研究進展，實用中西醫結合雜誌，4(4) 211-214，1991。
168. 陳凱 外：扶正抗癌液對移植瘤小鼠免疫功能的影响，中國中西醫結合雜誌，13(3) 171-172，1993。
169. 陳小飛：抗癌中藥復方的研究思路與方法探索，實用中西醫結合雜誌，6(3) 157-158，1993。
170. 陳玉春 外：健脾理氣合劑免疫調節作用的探討，中成藥，16(1) 39-40，1994。
171. 陳正芳：啓膈散治療手術後膈肌痙攣 30例，實用中西醫結合雜誌，5(7) 436，1992。
172. 陳坦 外：癌症術後首重扶正，江蘇中醫，10期：37-38，1993。
173. 金井泉：臨床檢查法提要，東京，金原出版，pp.VII36-VII45，1961。
174. Sell, S. : Cell-Mediated Immunity in Vitro in Immunology Immunopathology and Immunity(third edition), Maryland, Harper & Row Publishers, pp.144-166, 1980.
175. Wallach, J. : Interpretation of Diagnostic Tests, Boston, Little, Brown and Company, pp.42-43, 64, 1986.
176. Bach, J.F. and Dardenne, M. : Antigen recognition by T-lymphocytes thymus and

- marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in mouse, *Cell Immunol.*, 3:1, 1972.
177. Barlozzari, T. et al : In vivo role of natural killer cells : Involvement of Large Granular Lymphocytes in the clearance of Tumor cells in Anti-asialo GM1-Treated Rats, *J. Immunol.*, 131(2) 1024-1027, 1983.
178. Biozzi, G. et al : A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice Immunized Intravenously with sheep erythrocytes, *Immunol.*, 14 : 7-20, 1968.
179. Brander, C. et al : Carrier-mediated uptake and presentation of a major histocompatibility complex class I - restricted peptide, *Eur. J. Immunol.*, 23 : 3217-3223, 1993.
180. Carmichael, J. et al : Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing, *Cancer Research*, 47 : 936-942, 1987.
181. Clamen, H.N. et al.: Thymus marrow cell combination, synergism in antibody production, *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 122:1167, 1966.
182. Decker, T. et al : A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor(TNF) activity, *J. Immunol. Methods*, 15 : 61-69, 1988.
183. Denizot, F. and Lang, R. : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, 89 : 271-277, 1986.
184. Gullberg, M. and Larsson, E.L. : Studies on induction and effector function of concanavalin A-induced suppressor cells that limit TCGF production, *J. Immunol.*, 128(2) 746-750, 1982.
185. Herberman, R.B. et al : Effect of Antibody to θ Antigen on Cell-Mediated Immunity Induced in Syngeneic Mice by Murine Sarcoma Virus, *J. Natl. Cancer Inst.*, 51(5) 1509-1511, 1973.
186. K rre, K. et al : Low natural in vivo resistance to syngeneic leukaemia in natural killer-deficient mice, *Nature*, 284 : 624-626, 1980
187. Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. : An Enzyme - Release Assay for Natural Cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 64 : 313-320, 1983.
188. Mitsuoka, a. et al. : Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction, *Immunol.*, 34:363, 1978.
189. Morgan, D.A. et al : Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow, *Science*, 193 : 1007-1008, 1976.
190. Nowell, P.L. : Phytohemagglutinin indicator of mitosis in cultures of human leucocytes, *Cancer Res.*, 20 : 462, 1960.
191. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *AM. J. Clin. Path.*, 28 : 56-63, 1957. 192. Slater, T.F. et al : Studies on succinate - neotetrazolium reductase systems.

- III . Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77 : 383, 1963.
193. Suga, T. et al : Antitumor Activity of Lentinan in Murine Syngeneic and Autochthonous Hosts and Its Suppressive Effect on 3-Methylcholanthrene induced Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 44 : 5132-5137, 1984.
194. Talmadge, J.E. et al : Systematic Preclinical Study on the Therapeutic Properties of Recombinant Human Interleukin-2 for the treatment of Metastatic Disease, *Cancer Res.*, 47 : 5725- 5732, 1987.
195. Zaalberg, O.B. : A simple Method for detecting Single Antibody forming cells, *Nature*, 202 : 1231, 1964.