

원저

益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究

박상용, 이병렬

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Study on the Anti-cancer, Anti-metastasis and Immune Response Improvement of Aqua-acupuncture with Amomum Amarum Lourerio Infusion Solution.

Park, Sang-Yong · Lee, Byung-Ryul

Department of Oriental Medicine Graduate School, Tae Jon University

Objective : This study was purposed to investigate the anti-cancer and anti-metastasis and immune response of Aqua-acupuncture with Amomum amarum Lourerio infusion solution.

Methods : The Amomum amarum Lourerio infusion solution put into Chung-wan(CV12) of BALB/c or C57BL/6 mice were rised to cancer by B15-F10 and HT1080, S-180 cancer cell line.

Results : The following result have been obtained

1. The effect on expression of MMP-9 gene about the HT1080 cancer cell line was increased in 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluent groups, compared with control group.
2. The effect on expression of MMP-9 gene about the B15-F10 cancer cell line was increased in all the sample groups, compared with control group.
3. S-180 cancer cell line transplants in BALB/c mice were inhibited significantly in weight increase in all the sample groups, compared with control group.
4. The effect on spleen cell proliferation was decreased in all the sample groups, compared with control group.
5. The IFN- γ in all the sample groups and the TNF- α in 25 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluent groups was increased.
6. In flow cytometry, the number of CD4+, CD19+ cell in all the sample group was increased and the number of CD8+ cell in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluent group, compared with control group.

* 이 논문은 원광대학교 주산송산학술연구재단의 지원에 의해 연구됨.

· 접수 : 4월 27일 · 수정 : 5월 4일 · 채택 : 5월 19일

· 교신저자 : 박상용, 대전시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학 침구경혈학교실(Tel. 042-280-2641)

E-mail : yong1247@chollian.net

Conclusion : According to the result, Aqua-acupuncture with Amomum amarum Lourerio infusion solution has significant anti-cancer, anti-metastasis and Immune response improvement.

key words : Aqua-acupuncture, Anti-cancer, Anti-metastasis, Immune response

I. 서론

腫瘍은 韓醫學에서 伏梁, 癥, 疝, 腸澼, 瘤, 積聚等^{1,2)}으로 提示한 以後 厥疝²⁻⁵⁾, 石瘕²⁻⁷⁾, 息賁³⁻⁵⁾, 伏梁²⁻⁸⁾, 積聚^{1,2,4,6,7,9-12)}, 腸覃^{2,4,5,7,9,11)} 등을 腫瘍의 範疇로 言及하였으며, 西醫學의으로는 neo-plasia, 卽 새로운 成長이란 뜻¹³⁾으로 組織의 自律的인 過剩的 成長으로 個體의 正常組織에 對해서 破壞的인 것이며^{9,13-15)}, 크게 良性(benign)과 惡性(malignant)으로 나뉘어지고, 癌이라 불리는 惡性腫瘍은 빠른 成長, 浸潤性, 擴散 및 轉移 등의 特徵을 가지고 있어 生命에 危險을 招來하는 疾患¹³⁾이다.

原因은 七情鬱結^{6,10)}, 氣滯血瘀^{5-7,10-12)}, 飲食內傷^{6,11)}, 痰滯交阻^{6,7)}, 寒濕失調⁶⁾, 精虛痰凝^{7,13,14)} 등이라 하여 治療法으로는 扶正法, 祛邪法 및 扶正祛邪法^{3,4,16,17,19,20)}의 3가지로 分類하여 活用하고 있으며, 西醫學의인 治療法은 크게 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등^{13,21)}으로 大別되고 있다.

免疫은 韓醫學에서는 《素問》〈刺法論〉¹⁾에 “正氣存內 邪不可干”, 《靈樞》〈百病始生篇〉²⁾에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人” 및 《素問》〈評熱病論〉¹⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하여 疾病의 發生 및 進行을 正邪抗爭의 過程이라 認識^{16,22)}하고 免疫機能 등을 包含하는 概念을 正氣로 보았고^{16,22)}, 西醫學에서 免疫이란 宿主를 病原菌(抗原)으로부터 保護하는 機能으로 外部로부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에 不必要한 產物 등에 對해 非自己

的인 抗原으로 認知하고 이에 特異하게 反應하여 抗體를 만들고 抗原을 排除하여 그 個體의 恒常性을 維持하는 反應이다^{22,23)}.

抗腫瘍 및 免疫에 關聯된 研究로 多樣한 分野에서 많은 研究가 報告되고 있으며^{3,4,6,19,22,23)}, 藥鍼을 통한 抗腫瘍과 免疫에 對한 研究로 李¹⁶⁾는 肉蓯蓉 등을 使用한 實驗的 研究가 報告되고 있으나 腫瘍의 治法 中 扶正法에 該當하는 效能을 가지고 있는 益智仁에 對한 研究는 接할 수 없었다.

이에 著者는 補氣助陽藥²⁴⁻²⁸⁾으로 區分되어 지는 益智仁으로 藥鍼液을 製造한 後 和胃氣, 理中焦, 調升降, 寬中하는 效能이 있는 中脘(CV12)^{24,29-31)}에 藥鍼하여 抗癌, 抗轉移 및 免疫增進에 미치는 影響을 研究하고자 B16~F10과 HT1080 및 S-180 癌細胞株로 癌細胞毒性 및 MMP-9 遺傳子 發顯에 對한 影響을 살펴보았고, in vivo에서는 體重變化와 生存數, 平均 生存日數와 延命率, 白血球數, 赤血球數, 血小板數, GOT, GPT, creatinine, glucose, LDH, pulmonary colony를 觀察하였으며, 肝과 肺의 組織檢査, 脾臟細胞增殖, cytokine 遺傳子 發顯, 脾臟細胞의 流細胞 分析(CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺) 등을 觀察하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

動物은 雌性인 4~5週齡의 BALB/c, C57BL/6

생쥐를 대한실험센터에서 공급받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 維持하여 2週日 間 實驗 室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 약재

實驗에 使用된 益智仁(Amomum amarum Lourerio)은 大田大學校 附屬 韓方病院 藥劑科에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

3) 시약

RPMI 1640 medium, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), Penicillin streptomycin, L-glutamine, Trypsin-EDTA, Trichloroacetic acid, Sulforhodamide B, Acetic acid, Trisma base 등은 Sigma사(USA)로부터, Taq polymerase, Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)등은 TaKaRa사(Japan)로부터, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT), RNase inhibitor 등은 Promega사(USA), Fluorescein isothiocyanate(FITC)-anti-mouse-CD4, FITC-anti-mouse-CD8, FITC-anti-mouse-CD19 등은 Pharmingen사(USA)로부터 ^3H -Thymidine는 Amersham사(USA)로부터, Agarose는 FMC사로부터 USA, RNAzol^B는 Tel-Test사(USA)로부터 구입하여 使用하였고 其他 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

4) 機器

β -counter, Table centrifuge 등은 Beckman (U.S.A)사로부터, Cytometer는 Becton Dickinson(U.S.A)사로부터, Image system는 Kodak(U.S.A.)사로부터, Microcentrifuge는 Hanil scientific Co(Korea)사로부터, UV-Vis spectrophotometer는 Shimadzu(Japan)사로부터, Turbo themalcyclerTM는 Bioneer Co.(Korea)사로부터, CO₂ incubator는 Rapco(U.S.A.)사로부터, Clean bench(KMC-14001)는 Vision sc-

ientific Co.(Korea)사로부터, Rotary vacuum evaporator는 Büchi(Sweden)사로부터, Autoclave는 Hirayama(Japan)사로부터, Blood cell counter는 Minos(France)사로부터, Plate shaker는 Lab-Line(U.S.A.)사로부터, ELISA reader는 Molecular devices(U.S.A.)사로부터, Water bath는 Vision scientific Co.(Korea)사로부터, Chemical analyzer는 Ciba-Croning Co.(U.S.A.)사로부터 구입하여 使用하였다.

2. 방법

1) 藥鍼液의 製造

益智仁 55g을 粗末하여 圓形 flask에 넣고 蒸溜水 400ml를 加하여 3時間 동안 shaking water bath에서 流出하고 濾過한 다음, 이 沈澱物을 3回 濾別(3M paper)한 後 rotary evaporator로 減壓 濃縮 하였다.

細胞毒性實驗 時에는 益智仁藥鍼液 原液을 凍結 乾燥器를 利用하여 完全乾燥粉末을 얻어 冷凍 保管한 것을 牛胎兒血清이 缺乏된 RPMI 1640 培地에 濃度別로 稀釋하여 實驗에 使用하였다. 動物實驗 時에는 syringe filter (0.22 μm , Falcon)로 濾過 後 滅菌하여 10%, 20% 益智仁藥鍼液으로 製造하여 使用하였다.

2) 癌細胞株 培養

癌細胞株로 생쥐의 melanoma인 B16-F10[American Type Collection Cell(ATCC) Cell Repository Lines(CRL)-6322], 사람의 fibrosarcoma인 HT1080[ATCC Certified Cell Lines(CCL)-121], 肉腫인 S-180[Sarcoma-180, ATCC Tumor Immunology Bank(TIB) -66] 등을 實驗에 使用하였다. B16-F10과 HT1080의 培養液은 RPMI 1,640 培地(Hepes 包含), 10% FBS, penicillin(100U/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 L-glutamine에서 1週日 以上 繼代培養하였다. 그

리고 75cm² culture flask에 B16-F10과 HT1080 이 monolayer 狀態로 70~80%를 차지하고 있을 때 實驗을 實施하였다. S-180은 BALB/c 생쥐의 腹腔內에 移植하고 1週日 後 實驗에 使用하였다. 移植 8日째 腹水가 充滿한 생쥐에서 S-180 腫瘍細胞를 分離하여 1,200r.p.m.에서 5分間 遠心分離한다. 上層液을 버린 다음, 沈殿된 腫瘍細胞를 잘 分散시킨 後, D-PBS에 넣어 다시 2回 遠心分離하여 水洗한 다음 實驗에 使用하였다.

3) 抗癌

(1) 細胞毒性 測定

細胞毒性은 sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay法³²⁾을 變形하여 測定하였다. B16-F10과 HT1080은 培養器(incubator : 37℃, 5% CO₂)에서 자란 것을 trypsin-EDTA 溶液으로 細胞 分離하여 1.5×10⁴個를 96-well plate에 180 μl 分株하고 培養器에서 24時間 培養한 後 冷凍保管된 益智仁 乾燥粉末을 濃度別로 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml로 稀釋하여 各 稀釋液에 따른 群으로 區分하여 各 群에 따라 20μl 處理하여 全體 用量이 200μl가 되도록 한 다음 48時間 동안 培養하였다. 培養 終了 後에 培養液을 버리고 D-PBS로 2回 水洗하였다. 各 well에 50% trichloroacetic acid(TCA) 50μl를 加하여 1時間 동안 4℃에 放置하고, 蒸溜水로 5回 水洗한 다음 well plate를 공기 중에서 乾燥하였다. 1% acetic acid가 包含된 0.4%의 SRB 溶液(100μl/well)을 加하고 室溫에서 30分間 染色하고 1% acetic acid 溶液으로 약 4~5回 水洗한 다음 공기 중에서 乾燥한 後 10mM tris base(100μl/well)로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 5分間 混合하여 ELISA leader 에서 540nm에서 吸光度를 測定하였다.

ED₅₀ 값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度(μg/ml)로 주어지며, 美國國立癌研究所[National Cancer Institute (NCI,

U.S.A.)] manual의 方法에 의해 決定하였다. 實驗群의 各 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같이 計算하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

T=實驗群의 48時間 培養後 平均 細胞數(cells/ml)
 C=對照群의 48時間 培養後 平均 細胞數(cells/ml)
 C₀=培養 始作時 平均 細胞數(cells/ml)

各 濃度の Y(%)값과 log₁₀ dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 의하여 回歸線을 구했다. 이때 各 濃度에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 55%보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

N = number of points selected
 [≤number of dose level > 2]
 X_i = log dose i
 Y_i = growth ratio of dose i

여기서 求한 기울기와 切片을 利用하여 回歸線 Y = A + BX를 얻었으며 이 回歸線의 기울기와 切片으로부터 ED₅₀ 값을 計算하였다.

$$50 = A + B(\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g/ml}$$

NCI³³⁾에 따르면 細胞 毒性 評價는 植物 抽出物 內 境遇는 20μg/ml 以下, 合成物內 境遇는 4μg/ml 以下일 境遇 細胞毒性이 있다고 規定하고 있다.

(2) MMP-9(Matrix Metalloproteinase-9) 遺傳子 發顯

① 細胞培養 및 藥物 處理

B16-F10과 HT1080 癌細胞株를 trypsin-EDTA 溶液으로 single cell이 되도록 떼어내고, 2.0×10^5 個의 細胞를 24-well plate에 分株하여 培養器에서 48時間 培養하였다. 冷凍保管된 益智仁 粉末을 培養液에 溶解시켜 各各 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 稀釋하여 細胞 分株 2時間 後 24-well에 處理한 다음 48時間동안 培養하였다. 培養 終了 後에 培養液을 버리고 D-PBS로 2回 水洗하였다.

② Total RNA의 抽出

培養 終了 後 24-well plate의 上層液을 除去한 後 RNAzol^B(Tel- Test, U.S.A.)를 利用하여 total RNA를 抽出하였다.

③ cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 μg 에 該當하는 量을 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 μg 에 2.5 μl 의 10mM dNTPs, 1 μl 의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl 의 RNasin(20U/ μl), 1 μl 의 100mM DTT 및 4 μl 의 5 \times RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1 μl 의 M-MLV RT(200U/ μl)를 添加한 後 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20 μl 가 되도록 하였다.

④ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 water bath 方式의 turbo thermal cyclerTM(Bioneer Co., Korea)를 利用하여 遂行하였다. 反應은 이미 合成된 1 μl 의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였으며, 主型에 대한 β

-actin과 MMP-9의 primer는 Table I 과 같으며, sense primer(10pmole/ μl)와 antisense primer(10pmole/ μl)를 各各 1 μl 씩 넣어주고, 여기에 1 μl 의 2.5mM dNTPs, 2.5 μl 의 10 \times PCR buffer(100mM Tris-Cl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.2 μl 의 taq polymerase(5U/ μl)를 添加한 後 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 25 μl 가 되게 하여 PCR을 遂行하였다. (Table I, Table II)

Table I. Nucleotide sequences of PCR primers

gene	primers	sequence	product
β -actin	sense	5'-cttcgagcaggagatggc-3'	362
	antisense	5'-ccaccgatccacacagag-3'	
MMP-9	sense	5'-ttcactctcagggacgc-3'	349
	antisense	5'-ggaagacgcacagctctc-3'	

Table II. Condition of PCR

step	temp($^{\circ}\text{C}$)	time(sec)	cycle
pre-denaturation	95	60	
denaturation	94	40	36
annealing	56	60	
elongation	72	90	
post-elongation	72	180	

3) In vivo

① S-180 癌細胞株 移植

BALB/c 생쥐에 S-180(ATCC TIB-66) 癌細胞株 1×10^6 (cells/마리)을 對照群과 實驗群에 實驗始作 當日에 腹腔 內 移植하였다.

② 實驗群의 分類

對照群(control) : S-180 癌細胞株가 移植된 BALB/c 생쥐 10마리를 1群으로 하여 益智仁藥液을 處置하지 않은 群.

實驗群(sample) : S-180 癌細胞株가 移植된 BALB/c 생쥐 10마리를 1群으로 하여 10%, 20% 益智仁藥鍼液으로 中脘에 藥鍼한 後 各各 分類하였다.

Sample A : 10% 益智仁藥鍼群

Sample B : 20% 益智仁藥鍼群

③ 取穴

人體의 中脘에 相應하는 實驗動物의 體表面의 털을 除去한 後 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 使用하여 取穴하였다.

④ 藥鍼

藥鍼注入器로 1ml의 注射器를 使用하여 實驗始作 2日부터 15日까지 各各의 實驗群에 따라 中脘에 0.2ml씩, 1日 1回, 總 14日間 藥鍼하였다.

⑤ 平均生存日數(MST) 및 延命率(ILS) 測定

實驗始作 19日 後 生存與否를 觀察하여 平均生存日數 및 延命率을 求³⁴⁾하였다.

MST(median survival time) : 生存日數中央值

ILS(increase of life span) : 延命率= $\frac{(T-C)}{C} \times 100(\%)$

T : 處置群의 MST

C : 對照群의 MST

⑥ 體重 測定

BALB/c 생쥐에 S-180 癌細胞株(1×10^6 cells/마리)를 腹腔 內에 移植하고 24時間 後부터 1日 1回씩 總 14日동안 電子저울(CAS,Korea)을 使用하여 體重을 測定하였다.

4) 抗轉移

(1) B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10(ATCC, CRL-6322)을 C57BL/6 생쥐의 皮下에 繼代培養하였고 實驗前에 形成된 腫瘍組織 部位를 分離하여 腫瘍組織 1g에 10ml의 cold D-PBS(Ca^{2+} & Mg^{2+} -free, Sigma)가 되게 調節한 後 100mesh (Sigma)로 腫瘍組織을 粉碎한 後 遠心分離(1,500r.p.m., 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase(1,700U/mg, Type-XI Sigma)를 B16-F10 0.1g/ml에 處理하여 30分間 water bath(37℃)에서 培養시킨 後 遠心分離(1,300 r.p.m., 5min.)하였다. 上騰液을 除去한 다음 0.85% NH_4Cl 을 넣어 잘 섞은 것을 37℃ 培養器에서 5分間 放置하여 赤血球를 破壞시킨 後 遠心分離하여 B16-F10을 分離하였다. B16-F10 癌細胞株(2×10^5 cells/마리)를 各各 尾靜脈에 移植하였다.

(2) 實驗群의 分類

◇ 正常群(normal) : C57BL/6 생쥐 10마리를 1群으로 하여 處置하지 않은 群.

◇ 對照群(control) : C57BL/6 생쥐 10마리를 1群으로 하여 B16-F10 癌細胞株가 移植된 群.

◇ 實驗群(sample) : C57BL/6 생쥐 10마리를 1群으로 하여 B16-F10 癌細胞株를 移植하고 益智仁藥鍼液을 中脘에 藥鍼한 群.

Sample A : 10% 益智仁藥鍼群

Sample B : 20% 益智仁藥鍼群

(3) 藥鍼

實驗始作 2日부터 15日까지 0.2ml씩 1日 1回 總 14日間 中脘에 藥鍼하였다.

(4) 採血 및 血清 分離

採血은 實驗 始作 15日째까지 生存해 있는 생쥐 5마리를 選擇하여 ethyl ether(中外製藥)로 癡醉시

킨 後 心臟穿刺法으로 2ml의 血液을 1回用 注射器 (23G, Samwoo co.)로 取한 다음 1ml는 CBC bottle에 넣어 白血球(White Blood Cell, WBC), 赤血球(Red Blood Cell, RBC), 血小板(Platelet, PLT)數를 測定하였고, 나머지 1ml는 60分間 室溫에 放置한 다음 遠心分離器(GS-6R, Beckman)에 넣고 3,000r.p.m.으로 20分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 serum separator(綠十字)에 取하여 GOT, GPT, creatinine, glucose, LDH(lactate dehydrogenase) 含量 測定에 使用하였다.

① 白血球數, 赤血球數, 血小板數 測定

白血球數, 赤血球數, 血小板數는 Fonio法³⁵⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

② GOT, GPT 含量 測定

GOT와 GPT 含量은 Kinetic UV法³⁶⁾에 準하여 自動生化學分析機 (Express-550, Ciba-Corning Co.)를 使用하여 測定하였다.

③ Creatinine 含量 測定

血清中 creatinine은 picric acid와 反應하여 creatinine-picrate 複合物을 形成해서 510nm에서 吸光度를 測定하는 Jaffe 反應³⁷⁾을 原理로 해서 自動生化學分析機 (Express 550)를 使用하여 測定하였다.

④ Glucose 含量 測定

血清中 glucose는 hexokinase法³⁷⁾에 準하여 自動生化學分析機 (Express-550)를 使用하여 測定하였다.

⑤ LDH 含量 測定

LDH의 含量은 Wacker法³⁸⁾에 準하여 自動生化學分析機 (Express-550)를 使用하여 測定하였다.

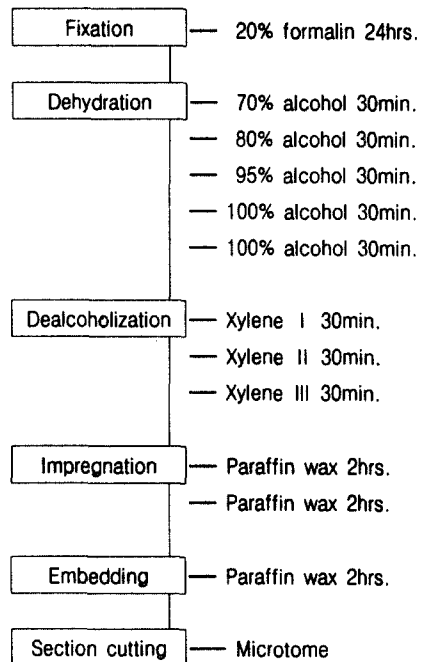
(5) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 移植 後 益智仁藥鍼液을 注入한 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15日에 colony assay를 實施하였다. Pulmonary colonization assay는 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡(Nikon, Japan)으로 觀察하였다.

(6) 病理組織檢査

B16-F10 癌細胞株를 移植하고 15日 後에 各群에서 肝과 肺를 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8時間동안 水洗한 다음 아래의 過程(scheme 1.)을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 切片을 만들어 He-matoxylin & Eosin 染色을 하였다.

Scheme 1. Tissue processing



5) 免疫增進

(1) 脾臟細胞 增殖

① 脾臟細胞 分離

BALB/c 생쥐에서 脾臟을 摘出하여 D-PBS로 3회 水洗 後 Mesh screen(Sigma, U.S.A.)위에 올려놓고 가위와 유리봉을 使用하여 脾臟細胞를 分離하고 RPMI 1,640 培地를 添加하여 細胞 懸濁液을 만들었다. 이 懸濁液을 4℃에서 10分間 定置한 後 上層液을 取하고 3회 水洗하여 組織 切片과 細胞 덩어리를 除去하고, 赤血球溶血液(Sigma, U.S.A.) 2ml를 넣고 37℃ water bath에서 5分間 放置한 後 10ml의 D-PBS를 添加하고 2,000r.p.m.으로 10分間 遠心分離하여 脾臟細胞를 回收하여 培地로 3회 水洗 後 細胞數를 計數하여 實驗에 使用하였다.

② 細胞增殖

脾臟細胞 增殖에 대한 效果를 알아보기 위하여 96-well plate의 各 well에 180 μ l씩 5 \times 10⁵cells를 分株하고 培養器에서 24時間동안 培養한 後 益智仁藥鍼液을 100, 50, 25, 12.5 μ g/ml로 稀釋시켜 各 群에 20 μ l씩 處理하여 全體 用量이 200 μ l가 되도록 하였다. Positive control(PC)群은 mitogen의 一種인 ConA와 IL-2 (Phytohemagglutin-M, Sigma)을 使用하여 10 μ l 處理하고 細胞를 37℃에서 48時間동안 培養한 後 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] Thymidine (Amersham, U.S.A.)을 添加한 다음 다시 8時間동안 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線同位元素의 量을 測定하기 爲하여 細胞만을 細胞收集機(Cell Harvester, U.S.A.)를 使用하여 琉璃纖維濾紙(Glass Microfiber Filter, Whatman)위에 捕獲을 하고 乾燥시킨 다음 放射線測程器(Liquid Scintillation Counter, LKB)로 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

(2) Cytokine 遺傳子 發顯

① 細胞培養 및 藥物 處理

BALB/c 생쥐에서 脾臟細胞를 分離하여 脾臟細胞를 24-well plate에 分株하고, 冷凍保管된 益智仁粉末을 培養液에 溶解시킨 後 100, 50, 25, 12.5 μ g/ml로 稀釋한 各各을 24-well plate에 處理한 後 3時間동안 培養하였다.

② Total RNA의 抽出

培養 終了 後 24-well plate를 2,000r.p.m.에서 10分間 遠心分離하여 上層液을 除去한 後, MMP-9 遺傳子 分析方法과 同一하게 施行하였다.

③ cDNA의 合成

MMP-9 遺傳子 分析方法과 同一하게 施行하였다.

④ cDNA의 PCR 增幅

MMP-9 遺傳子 分析方法과 同一하게 施行하였고, 사용된 primer는 TableIII과 같다(TableIII).

TableIII. Nucleotide sequences of PCR primers

gene	primers	sequence	product (bp)
IL-12 (p35)	sense	5'-gggtgcttagccagtc-3'	314
	antisense	5'-ggcctgggaactctgtctg-3'	
IFN- γ	sense	5'-gcagctcttctcatggc-3	714
	antisense	5'-cccgcaatcacagctctg-3	
TNF- α	sense	5'-ggcttcagaactccagg-3	399
	antisense	5'-ggtgaggagcacgtagtc-3	

(3) 流細胞 螢光分析

① 細胞培養 및 藥物 處理

BALB/c 생쥐에서 脾臟細胞를 分離하여 脾臟細胞를 24-well plate에 分株하고, 實驗群은 冷凍保管된 益智仁粉末을 100, 50 μ g/ml씩 培養液에 溶解시켜 各各 sample B, C로 區分하여 24-well plate에 處理한 後 72時間동안 培養하였다. Control群

(A)은 아무 處置도 하지 않았다.

② 免疫螢光染色(immunofluorescence staining)

免疫 螢光染色은 全 過程을 0-4℃에서 實施하였으며, 分離한 脾臟 細胞를 回收하여 5ml FACS tube(Becton Dickinson, U.S.A.)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 混合한 後에 遠心分離(1,300r.p.m., 5min.)하였다. 各各의 FACS tube에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19의 稀釋液을 各各 100ml씩 넣고 混合한 後 60分間 얼음 속에서 反應시킨다. 反應 後 約 3回以上 3ml의 staining buffer를 넣고 混合하여 水洗한 後 流細胞螢光分析器(Flow Cytometer, Becton Dickinson, U.S.A.)³⁹⁾로 分析하였다.

③ 流細胞 分析

染色이 完了된 細胞들을 0.3ml의 staining buffer에 浮游시켜 流細胞螢光分析器를 利用하여 分析하였다. 試料當 10,000個의 細胞에 대하여 list mode로 資料를 聚合하였으며, cellquest 프로그램을 利用하여 分析하였다. Data의 分析은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 利用한 dot plot上에서 全體 脾臟細胞와 small lymphocyte 領域 및 lymphoblast 領域을 區分하여 그 中の CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺細胞의 比率(gated, %)을 算出하였다.

6) 統計處理

統計는 student's t-test⁴⁰⁾에 依해 處理 하였다.

III. 본 문

腫瘍은 韓醫學에서 《素門》¹⁾<腹中論>에 “病有少腹盛 上下左右皆有根……病名曰伏梁”, <大奇論>에 “三陽急爲癢 三陰急爲疝……脾脈外鼓況爲腸澼

……肝脈小緩爲腸澼……腎脈小搏沈爲腸澼下血”, <長刺節論>에 “病在少腹有積……病在少腹 腹痛不得大小便 病名曰疝”이라 하여 伏梁, 癢, 疝, 腸澼, 癰, 積聚 등으로 提示한 以後 厥疝²⁻⁵⁾, 石瘕²⁻⁷⁾, 息賁³⁻⁵⁾, 伏梁²⁻⁸⁾, 積聚^{1,2,4,6,7,9-12)}, 腸覃^{2,4,5,7,9,11)}, 瘕^{3-5,10-12)}, 腫瘍^{3-5,9,10)}, 腫瘤^{3-5,9,10)}, 癥瘕³⁻¹¹⁾, 反胃^{3-10,12)}, 瘰癧^{10,12)} 등을 現代醫學의인 腫瘍의 範疇로 言及하였으며, 西醫學의으로 neoplasia 卽 새로운 成長이라는 뜻¹³⁾으로 組織의 自律의인 過剩의 成長이며 個體에 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 對해서 破壞의인 것이며^{9,13-15)}, 細胞學的으로 非正常的인 細胞의 過多增殖으로 因하여 實質臟器, 有腔腸器 및 骨格, 皮膚組織 등에 非正常的인 組織을 形成하는 疾患이다^{9,15)}. 臨床 및 病理形態的인 所見에 의해서는 良性腫瘍과 惡性腫瘍으로 區分하는데 良性和 惡性的 鑑別基準은 腫瘍發育速度의 持續性, 腫瘍發育形式의 膨脹性 및 浸潤性의 區別, 轉移의 有無, 再發의 有無, 腫瘍이 全身에 미치는 影響의 有無, 病理 組織學的인 異型度 등에 依해 區分되어지며 病理學的으로 腫瘍의 成長速度가 迅速하고 浸潤性 成長으로 一般的으로 腫瘍이라하면 大개 惡性腫瘍인 癌을 뜻한다^{3,4,6,10,15)}.

腫瘍의 原因은 《靈樞》²⁾<九鍼論>에 “四時八風之客於經絡之中 爲瘤病者也”, <百病始生篇>에 “積之始生 得寒乃生 厥內成積也”이라 하여 外因을, 巢는 “積聚者 乃陰陽不和 臟腑虛弱 受于風邪 搏于腑臟之氣少爲也”라 하여 內因과 外感風邪를, 陳은 “藹唇因飲食煎炒 過食炙燻 痰隨火行 留注于脣 初結似豆”라 하여 飲食勞倦 등 不內外因을, 王은 “憂鬱傷肝 思慮傷脾 積想在心 所願不得志者 致經絡痞澁 聚結成核”이라 하여 七情鬱結을 病因으로 보아 六淫에 의한 外因과, 七情內傷의 內因과, 飲食失調, 過勞 및 房勞過度의 不內外因을 腫瘍의 原因으로 나누었으며 病情의 變化는 大개 처음에는 實證이 많고 久病에는 虛證이 많다고 보았다⁶⁾. 西醫學에서는 物理的 要因

13), 化學的 發癌物質^{13,21)}, 生物學的 要因^{13,21)}, 호르몬^{13,21)}, 遺傳的 要因^{5,6,13,21)}, 人種과 地理學的 要因, 免疫學的 因子, 放射線, 腫瘍性 바이러스 等¹³⁾으로 先天性 或 後天性 免疫缺乏證 患者에게 發生頻度가 높다고 하였다⁶⁾.

腫瘍의 治療法은 健脾益氣, 養血滋陰 等の 扶正培本法과 淸熱解毒, 活血化瘀, 攻堅破積 等の 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 大別되는데¹²⁾, 精氣와 腫瘍의 狀態에 따라 積塊不大나 精氣未虛할 때에는 行氣活血, 軟堅消積法을, 積塊漸大나 精氣漸虛하여 邪盛精虛한 境遇에는 攻補兼施法을, 積塊堅硬이나 精氣損傷이 甚한 境遇에는 扶正培本法이 爲主로 使用¹⁷⁾되고 있고, 西醫學에서의 治療法은 手術療法, 化學療法, 放射線療法, 免疫療法,^{9,11,13,15,21,23)} 內分泌療法^{12,21)} 等으로 大別되어 지지만 腫瘍 治療에 對한 手術과 化學療法, 放射線療法 等에는 各各의 限界나 副作用들이 있으므로 腫瘍의 治療에 對한 副作用을 最小化하기 爲하여 더욱 많은 研究의 必要를 要하고 있다.

免疫은 韓醫學에서 《素問》¹⁾ <上古天眞論>에 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”, <刺法論>에 “正氣存內, 邪不可干”, <評熱病論>에 “邪氣所湊, 其氣必虛”라 하였으며, 《靈樞》²⁾ <口問篇>에 “邪之所在 皆爲不足”이라 하여 人體에 發生하는 疾病의 原因을 正氣가 虛弱함으로 보았다. 正氣는 人體 內에서 一切의 疾病에 抵抗하는 物質로 臟腑經絡, 營衛氣血의 正常的인 生理機能을 意味하며, 邪氣는 一切의 疾病을 일으키는 原因 要素를 總稱하여 外界의 六淫의 邪 및 人體 內의 陰陽의 失調에서 發生된 病理的 產物인 瘀血, 痰飲 等の 病邪를 意味한다.¹⁾ 그러므로 鍼灸學에서는 “虛則補 實則瀉”하는 補瀉法의 形態로 免疫機能을 調整하여 疾病을 治療하며 鍼灸의 取穴과 刺戟方法, 治療機具의 選擇에 補虛瀉實의 治療原則이 適用된다²²⁾. 免疫이란 外部로부터 侵入하는 微生物이나 同種의 組織, 體內에 不必要한 產物

等과 특이하게 反應하여 抗體를 만들고 抗原을 排除하여 그 個體의 恒常性을 維持하는 現象이며^{22,23)} 生體의 防禦機轉은 크게 두 가지로 나뉘는데 하나는 先天性 防禦機轉이고 또 하나는 後天性 防禦機轉인데, 後天性 防禦機轉이 免疫의 實體가 된다²³⁾. 免疫機構는 白血球系 細胞인 lymphocytes, plasma cells, phagocytes, granulocytes 等과 림프機關인 lymph node, spleen, thymus, bone marrow들로 構成되며 이 中 lymphocytes는 T細胞, B細胞, K細胞, NK細胞로 構成되어 lymph와 血液內를 再循環하면서 免疫機構 構成細胞로 免疫機能에 重要한 役割을 한다. 또한, lymphocytes를 비롯한 免疫細胞는 lymphokine 또는 cytokine을 分泌하여 各細胞에 信號를 내면서 細胞間에 相互情報를 傳達하거나 中繼하여 細胞增殖 및 細胞分化에 關與함으로써 免疫調節에 關與한다. 最近 들어서는 單細胞郡抗體技法과 遺傳子再組合技法의 發展으로 인터페론, 인터루킨, 腫瘍壞死因子, NK細胞 等과 같은 生理調節物質로 治療成績이 好轉되었으¹³⁾, 이와 더불어 最近 韓國과 中國에서는 東·西醫學의 治療를 並行하는 새로운 治療 方法이 試圖되고 있다.

藥鍼療法은 最近에 臨床에서 活發하게 活用되며 研究가 行하여 지고 있는 治療 方法³⁰⁾으로 穴位注射療法이라고도 하며, 이는 經絡學說의 原理에 根據하고 韓藥의 特性을 利用한 新療法으로 患者의 疾病을 根據로 穴位의 治療作用과 藥物의 藥理作用을 살핀 다음 相應하는 腧穴과 藥物을 選擇하고 藥液을 腧穴 內에 注入하여 腧穴과 藥物이 疾病에 對해 綜合的인 作用을 充分히 發揮하게 하여 疾病을 治療하는 方法인데, 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 依하여 有關한 穴位 或은 壓痛點에 注入하여 鍼刺戟과 藥物의 併合된 上昇 效果를 통하여^{29,30)} 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 疾病 治療의 目的을 이루는 治療法³⁰⁾으로 鎮痛, 免疫增強, 解毒, 腫瘍誘發抑制 等^{29,30)}에 活用되

며, 藥物의 吸收가 빠르고, 作用이 迅速하며 經口投與가 不可能한 境遇에 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있는 治療 方法이다^{29,30)}.

益智仁은 主로 脾, 胃, 心, 腎 四經에 應用되어 왔던 藥材로²⁶⁾, 益智子, 英華庫, 등의 異名²⁴⁾이 있으며, 益智仁의 主要 成分은 Terpen 및 S-quinterpen²⁴⁾, Zingiberene, Zingiberol 과 Cineole 等²⁶⁾이 含有되어 있고, 性溫無毒하고 味는 苦澁辛香하며²⁴⁻²⁶⁾, 補心氣命門三焦之不足 能澁精固氣 又能開發鬱結 使氣宣通 하는 效能²⁴⁾이 있고 藥理 作用으로 芳香性 健胃劑, 補脾溫腎, 多眠, 抗利尿, 唾液分泌抑制作用²⁸⁾이 있어 客寒犯胃, 泄精崩帶 等證³²⁻³⁷⁾을 治하여 遺精, 遺尿, 虛弱, 乳糜尿 等^{24,28)}을 治療하는데 應用되고 있다.

中脘(CV12)은 足陽明胃經의 募穴이며, 八會穴中 하나인 腑會로 和胃²⁹⁾, 貫中²⁹⁾, 消食^{29,30)}, 化濕滯²⁹⁾의 效能이 있어 胃痛, 嘔吐, 下痢, 消化不良 等²⁹⁾과 腸癰 및 心積²⁹⁾, 黃疸²⁹⁾, 水腫^{8,29)} 等を 治療하여 腫瘍의 治療에 應用됨을 나타내고 있다.

抗腫瘍 및 免疫에 關聯된 研究로 金⁴⁾은 癌의 治法, 治方과 治療 藥物을, 李⁶⁾는 鍼刺戟을, 蔡²²⁾는 免疫의 概念 및 治療를, 張³⁾은 蔘茸湯을 金⁵⁾은 紫菀 等 多樣한 研究가 報告되었으며, 藥鍼療法을 利用한 抗腫瘍이나 免疫에 對한 實驗的 研究로 盧¹⁸⁾는 鹿茸, 人蔘, 甘草를, 李¹⁶⁾는 肉蓯蓉藥鍼이 抗腫瘍과 免疫에 各各 有效하다고 하였으며, 이들 研究의 結果는 腫瘍治療 및 免疫增強에 有效한 方法으로 提示되고 있으나 補心氣命門三焦之不足, 能澁精固氣, 溫中進食의 效能이 있는 益智仁을 利用한 抗腫瘍 및 抗轉移, 免疫에 對한 實驗은 接할 수 없었다.

이에 著者는 補心氣命門之不足, 能澁精固氣, 溫中進食의 效能으로 補氣助陽藥²⁴⁻²⁸⁾으로 區分되어 지는 益智仁으로 藥鍼液을 製造한 後 實驗動物에 藥鍼 하여 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 影響을 實驗的

으로 究明하고자 和胃氣, 理中焦, 調昇降, 寬中하는 效能이 있는 中脘(CV12)^{24,29-31)}을 選擇하여 抗癌 實驗으로 B16-F10과 HT1080 癌細胞株에 對한 細胞毒性 및 MMP-9 遺傳子 發顯에 對한 影響을 살펴보고, in vivo에서는 S-180 癌細胞株로 腫瘍을 誘發시킨 생쥐에서 體重變化와 生存數, 平均 生存日數와 延命率에 미치는 影響을 觀察하였으며, 抗轉移 實驗에서 B16-F10 癌細胞株에 대한 白血球數, 赤血球數, 血小板數, GOT, GPT, creatinine, glucose 및 LDH를 測定하여 血液 및 血清에 미치는 影響을 살펴보고, B16-F10 癌細胞株 移植 생쥐의 pulmonary colony를 觀察하였으며, 肝과 肺의 組織檢査를 하였다. 免疫增進效果에 對하여서는 B16-F10 癌細胞株 移植 생쥐의 脾臟細胞增殖과 cytokine 遺傳子 發顯에 對한 影響을 觀察하였고, B16-F10 癌細胞株 移植 생쥐의 脾臟細胞의 流細胞를 分析하여 CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺에 對한 影響 等を 觀察하였다.

B16-F10 癌細胞株에 對한 細胞毒性($\mu\text{l/ml}$)을 살펴보기 위하여 100, 50, 25, 12.5, 6.25로 稀釋한 益智仁藥鍼液을 各各의 癌細胞株에 注入한 結果 B16-F10 癌細胞株에서는 全 實驗群에서 細胞毒性이 없는 것으로 나타났으며, HT1080 癌細胞株($\mu\text{l/ml}$)에 對한 細胞毒성을 살펴보기 위하여 100, 50, 25, 12.5, 6.25로 稀釋한 益智仁藥鍼液을 各各의 癌細胞株에 注入한 結果 HT1080 癌細胞株에서는 全 實驗群에서 細胞毒性이 없는 것으로 나타나 B16-F10 癌細胞株에 對한 李 等^{13,16,20)}의 覆盆子, 肉蓯蓉, 瓦松에 對한 報告에서와 類似한 結果를 나타냈다.

HT1080과 B16-F10 癌細胞株에 對한 MMP-9 遺傳子 發顯에서 益智仁藥鍼의 效果를 살펴보면 HT1080 癌細胞株의 Ht값은 對照群은 154이었고, 實驗群인 lane 1은 94, lane 2는 143으로 減少하였고, 實驗群 lane 3은 156, lane 4는 173으로 增

加하였으며, B16~F10 癌細胞株의 Ht값은 對照群은 113이었고, 實驗群인 lane 1, lane 2, lane 3, lane 4는 各各 78, 87, 96, 106으로 全 實驗群에서 減少하였는데 이것은 李 等¹⁶⁾의 覆盆子, 肉蓯蓉, 瓦松의 實驗에서는 全 實驗群에서 減少하였으나 本 實驗에서는 100, 50%로 稀釋한 實驗群에서만 減少하여 李 等¹⁶⁾의 肉蓯蓉 等 보다 益智仁이 效果가 적은 結果를 나타냈다.

S-180 癌細胞株 1.0×10^6 (cells/마리)을 腹腔內 移植한 생쥐 10마리를 1群으로 하여 益智仁藥鍼液을 注入하지 않은 群을 對照群으로 하고, 實驗群은 10%, 20% 益智仁藥鍼液으로 各各 中脘에 藥鍼한 것을 A, B로 分類하여 體重變化와 生存數, 平均生存日數, 延命率에 미치는 影響을 觀察하기 爲하여 S-180 癌細胞株 移植 後 藥鍼注入 1日 및 19日에 體重(g)의 變化를 測定한 結果 對照群은 27.2에서 31.5로 增加하였고, 實驗群 A는 26.5에서 28.6으로, 實驗群 B는 26.6에서 29.5로 나타나 全 實驗群에서 體重 增加 抑制의 傾向이 나타났으며, 實驗始作 19日째까지 生存한 생쥐의 數는 對照群이 10마리 중 3마리였고, 實驗群 A, B는 各各 6, 7마리로 나타나 生存數가 增加하였으며, MST(days)는 對照群이 19.25, 實驗群 A, B는 各各 24.5, 25로 나타나 生存日數가 增加되었으며, ILS(%)는 實驗群 A, B는 各各 27.3, 29.9로 延命率이 높게 나타났다.

抗轉移 實驗에서는 B16-F10 癌細胞株를 靜脈內 注射한 C57BL/6 생쥐에서 14日間 經過를 지켜본 後의 血液과 血清의 血球數에 대한 影響, 血清中 GOT, GPT, creatinine, glucose, LDH 와 pulmonary colonization assay 및 肝과 肺의 組織檢査 等을 살펴보았다. 本 實驗에서 白血球數($\times 10^3$ /mm³)에 미치는 影響은 正常群은 3.60 ± 0.56 , 對照群은 4.48 ± 0.65 , 實驗群 A는 4.77 ± 0.59 , B는 4.17 ± 1.16 으로 나타나 實驗群의 白血球數가 實驗群 A에서는 增加하였으나, 實驗群 B에서는 減少하였다.

赤血球數는 貧血이나 赤血球增多症의 有無와 그 程度를 把握하는 것이 그 目的으로 本 實驗에서 赤血球數($\times 10^6$ /mm³)는 正常群이 8.76 ± 0.38 , 對照群은 8.92 ± 0.11 , 實驗群 A는 9.04 ± 0.26 , 實驗群 B는 8.64 ± 0.37 로 나타나 實驗群 A에서 赤血球數가 增加하였다. 血小板數는 本 實驗에서 血小板數($\times 10^4$ /mm³)는 正常群에서 383.67 ± 74.48 , 對照群은 475.00 ± 67.00 , 實驗群 A는 448.00 ± 19.86 , 實驗群 B는 464.00 ± 22.00 으로 나타나 對照群에 對하여 全 實驗群에서 減少하였다. 이것은 李 等¹⁶⁾의 白血球數에 對한 肉蓯蓉의 報告와 類似한 結果를 나타내었다.

本 實驗에서 血清中 GOT(U/L)는 正常群에서 58.0 ± 2.7 , 對照群은 105.5 ± 25.5 , 實驗群 A는 98.0 ± 27.0 , 實驗群 B는 106.5 ± 15.5 로 10%로 稀釋한 實驗群 A에서 減少하는 傾向을 보였다. GPT (glutamic pyruvate transferase)는 本 實驗에서 GPT(U/L)는 正常群에서 21.3 ± 0.3 , 對照群에서 19.3 ± 0.3 , 實驗群 A는 22.5 ± 2.5 , 實驗群 B는 25.5 ± 6.5 로 正常群 및 對照群에 對하여 全 實驗群에서 增加하였다. Creatinine은 本 實驗에서 creatinine(mg/dl)은 正常群에서 0.37 ± 0.03 , 對照群은 0.33 ± 0.03 , 實驗群 A는 0.35 ± 0.05 , 實驗群 B는 0.35 ± 0.05 로 對照群보다 全 實驗群에서 增加하였다. 血中 glucose는 本 實驗에서 glucose(mg/dl)는 正常群에서 220.0 ± 3.79 , 對照群은 182.0 ± 7.55 , 實驗群 A는 242.5 ± 3.50 , 實驗群 B는 259.5 ± 6.50 로 나타나 對照群에 比해 全 實驗群에서 增加하여 李 等¹⁶⁾의 報告와 類似하였다. 血清 LDH本 實驗에서 LDH(U/L)는 正常群 702.3 ± 91.9 , 對照群 522.0 ± 54.59 , 實驗群 A는 516.5 ± 105.5 , 實驗群 B는 527.0 ± 8.0 으로 나타났다.

Pulmonary colonization assay에서는 B16 ~ F10 癌細胞株 移植 後 益智仁藥鍼液을 注入한 C57 BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15日에 colony

assay를 實施하여 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡으로 觀察한 結果 對照群에서는 顯著한 腫瘍細胞의 轉移가 觀察되었고 實驗群 A에서는 對照群에 比하여 腫瘍의 轉移가 抑制되었고 實驗群 B에서는 正常群에서와 같이 顯著한 腫瘍 轉移가 抑制되는 것이 顯微鏡으로 觀察되었다.

組織檢査에서 B16~F10 癌細胞株를 注入한 C57BL/6 생쥐의 轉移된 肝組織 轉移에 對하여 14日間 益智仁藥鍼을 中脘에 處置 後 組織檢査 結果 正常群 0에 對하여, 對照群에서는 +++, 實驗群 A에서는 ++, 實驗群 B는 +로 나타나 轉移가 抑制되는 效果가 있었으며(Table 8, Fig. 10), 肺組織에 對한 檢査 結果에서도 正常群 0에 對하여 對照群은 +++, 實驗群 A에서는 +++, 實驗群 B에서는 ++로 轉移가 抑制되는 것으로 나타났으며 李等¹³⁻¹⁶⁾의 報告와 類似한 結果를 나타냈다.

脾臟은 免疫機能이 增強하게 되면 機能이 強化되어 免疫反應이 일어나는 白髓部(white pulp)의 細胞數가 增加하는데²⁴⁾, 本 實驗에서는 免疫增進에 關聯된 益智仁藥鍼液의 脾臟細胞 增殖에 對한 影響으로 ³H-thymidine 測定值(cpm)를 살펴본 결과 正常群은 6,259.70±920.92로 나타났으며, 對照群은 61,069.24±5,689.40, 實驗群 100, 50, 25, 12.5는 各各 49,440.79±4,524.42, 41,447.12±4,418.96, 53,204.17±3,187.84, 30,483.51±3,252.12로 나타나 全 實驗群에서 減少되었다.

IFN- γ (Ht)는 對照群은 52, 實驗群 lane 1, lane 2, lane 3, lane 4에서 各各 105, 119, 125, 101로 增加하여 全 實驗群에서 T細胞 및 大食細胞의 機能을 活性化하는 것으로 思料되며, TNF- α (Ht)는 對照群은 35, 實驗群에서는 lane 1, lane 2에서는 各各 25, 29로 減少하여 高濃度의 益智仁藥鍼液이 TNF- α 의 生成에 拮抗的 作用을 하는 것으로 思料되며 lane 3, lane 4에서 各各 62, 51로 增加하여 低濃度의 益智仁藥鍼液이 TNF- α 의

生成에 效果가 있는 것으로 思慮되며 이는 李等¹⁶⁾의 報告와 類似한 結果를 나타냈다.

脾臟細胞의 流細胞分析을 통해 益智仁藥鍼液의 CD4⁺ 細胞數에 對한 影響을 살펴보면 positive cell의 比率(%)이 對照群은 28.47이고 實驗群 B는 36.90, 實驗群 C는 32.78로 李等¹⁶⁾의 報告와 類似하게 全 實驗群에서 增加하였고, CD8⁺ 細胞數에 對한 影響에서 positive cell의 比率(%)이 對照群은 8.98이고 實驗群 B는 9.34, 實驗群 C는 8.81로 모두 減少한 李¹⁶⁾의 報告와 달리 實驗群 B에서만 增加하였으며, CD19⁺ 細胞數에 對한 影響에서 positive cell의 比率(%)이 對照群은 23.85이고 實驗群 B는 28.51, 實驗群 C는 33.72로 李¹³⁾의 報告와 같이 모두 增加하여) 益智仁藥鍼液이 全體의 으로 B-淋巴球 및 T-淋巴球의 機能을 增強시키는 作用을 하는 것으로 思慮된다.

以上을 綜合하여 보면 益智仁藥鍼의 抗癌에 對하여 細胞毒性, MMP-9 遺傳子 發顯, in vivo에서 體重變化와 生存數, 平均 生存日數와 延命率에서 效果가 있었고, 抗轉移에 對하여 白血球數, 赤血球數, 血小板數, GOT, creatinine, glucose 및 LDH, 肝과 肺의 組織檢査에서 效果가 있었으며, 免疫에 對하여 脾臟細胞增殖과 cytokine 遺傳子 發顯, 脾臟細胞의 流細胞 分析(CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺) 에 效果가 있는 것으로 나타나 向後 臨床의 으로 惡性腫瘍의 治療 및 豫防에 對한 持續的인 研究 및 活用이 期待된다.

IV. 結 論

B16-F10과 HT1080 및 S-180 癌細胞株로 腫瘍을 誘發시킨 생쥐의 中脘(CV12)에 益智仁藥鍼液을 注入하여 抗癌 및 抗腫瘍, 免疫機能에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MMP-9遺傳子 發顯은 HT1080 癌細胞株에 對하여 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 稀釋한 實驗群에서 增加를 보였다.

2. MMP-9遺傳子 發顯은 B16-F10 癌細胞株에 對하여 全 實驗群에서 增加를 보였다.

3. S-180 癌細胞株가 移植된 생쥐에서 全 實驗群에서 體重增加 抑制의 結果를 보였고, 生存數와 平均生存日數, 延命率이 全 實驗群에서 增加하였다.

4. 脾臟細胞 增殖은 全 實驗群에서 減少되었다.

5. IFN- γ 는 全 實驗群에서, TNF- α 는 25 및 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 稀釋한 實驗群에서 增加하였다.

6. 脾臟細胞의 流細胞 分析에서 CD4⁺, CD19⁺ 細胞數는 全 實驗群에서, CD8⁺은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 稀釋한 實驗群에서 增加하였다.

V. 참고문헌

1. 王琦 外. 黃帝內經素問今釋. 서울:成輔社. 1983:1,14,60,146,164, 172,192,227,247,412.
2. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985:11, 38, 104, 124, 159, 211, 249, 287, 317, 331.
3. 張中植. 蓼茸湯이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide로 誘發된 白鼠의 副作用 減少에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1991.
4. 金漢燮 外. 癌의 治法·治方 및 治療 藥物에 關한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1989;10(1):162-164.
5. 金尙勳 外. 紫堇이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1990;13 :318

- ,324.
6. 李鍾賢 外. 鍼刺戟이 3-Methylcholanthrene으로 誘發된 實驗動物의 腫瘍發生抑制에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1989;10(1):25, 33,21-22.
7. 北京中醫學院. 韓醫學臨床病理. 서울:成輔社. 1983:563-566.
8. 楊溪州. 鍼灸大成. 서울:大成文化社. 1984:14, 80, 226, 228, 352, 376, 407, 431, pp.45-46, 92-93, 239-240, 270-271, 404-405.
9. 裴成植. 癌과 豫防. 大韓韓醫學會誌. 1994;6: 302-304.
10. 賈坤. 癌瘤防治研究. 서울:新光文化社. 1984: 25-30.
11. 裴元植. 癌의 韓洋方併用治療에 對한 報告. 大韓韓醫學會誌. 1990;6:297-301.
12. 方藥中 外. 實用中醫內科學. 서울:一中社. 1988:621-623.
13. 서울대학교의과대학 편. 중앙학. 서울:서울대학교출판부. 1996:43-93.
14. 豫防醫學과 公衆保健 編輯委員會. 豫防醫學과 公衆保健. 서울:癸丑文化社. 1987:426.
15. 洪元植. 現代 中共의 癌治療. 서울:英文社. 1984:361,81-84,329-330,372-375,378-379,381-382.
16. 李殷鏞 外. 肉蓯蓉藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000; 17(1):251-286.
17. 張代釗. 中西醫結合治療癌症. 山西:山西人民出版社. 1984:11-19.
18. 盧宗植. 鹿茸, 人蔘, 甘草水鍼의 糖尿病에 對한 效果 및 免疫機能에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院 博士學位論文. 1988.
19. 金楊中 外. 奔豚丸合冬蟲夏草 抽出液이 癌細

- 胞柱 및 L1210細胞가 移植된 마우스의 免疫系에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999;16(3):405-421.
20. 權奇祿 外. 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(2):151-172.
21. 李文鎬 外. 內科學(下). 서울:學林社. 1986:2458-2460,2462-2468, 2477-2479.
22. 蔡禹錫. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 對한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(2):55.
23. 李淵台. 最新免疫學. 서울:集文堂. 1985:76, 81,88,1-35,52-53.
24. 李尙仁. 本草學. 서울:學林社. 1975:80-81.
25. 王認庵. 本草備要. 台北:宏業書局. 1980:42.
26. 新文風出版公司. 新編 中藥大辭典. 臺北:新文風出版公司. 1984:1556-1558.
27. 陳存仁. 圖說 漢方醫藥大事典. 東京:講談社. 1982:194-197.
28. 李尙仁 外. 韓藥臨床應用. 서울:成輔社. 1982:383-384.
29. 崔容泰 外. 鍼灸學(上). 서울:集文堂. 1988:1457,382-383,730-732,1464-1465.
30. 崔旼燮 外. 水鍼療法에 關한 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(1):315-316, 324-326.
31. 金泰潤. 人蔘水鍼 前處置가 發癌豫防에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1988;9(2):33-44.
32. Papazissi, K., Geromichalos, D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H. Optimization of the sulforhodamine B(SRB) Colorimetric assay, J. Immunological method. 1997;208:151-158.
33. National Cancer institute. Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600. Cancer Chemother. Res. 1972;3(3):17.
34. Kasagara, T., Hookes, J.J., Dougherty, S.F. and Oppenheim, J.J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN- γ) production by human T cells and T cell subsets. J. Immunol. 1993;130:3299.
35. Bernard, J.H. Hematology basic methodology. clinical diagnosis agement by laboratory methods, 17th edition. 1984:586-588.
36. Kiesow, L.A. The enzymic determination of 2,3-dihosphoglycerate in a crude cell (UV method). Anal biochem. 1973;51(1):91-96.
37. Jaffe, M. Uber deu Niederschlag, Welchen Pikrinsaure in Normaleu Harn er Zeegt und uber ecne neue Peaktion des Kreatinines, Hoppe Seylers Z. Physial. Chem. 1896:10.
38. Young, D.S., Pestaner, L.E., and Giberberman, V. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem. 197 5:21:323.
39. Ormerod, M.G. Flow cytometry. New York:Oxford University Press. 1990:1-44.