대한침구학회지 제18권 제3호(2001년 6월)
The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society

원 저

兎絲子藥針의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 硏究

이재복 · 이병렬

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Study on the Anti-cancer, Anti-metastasis and Effects of Immune-response of Aqua-acupuncture with Cuscutae Semen Infusion Solution.

Lee, Jae-Bok · Lee, Byung-Ryul

Department of Oriental Medicine, Graduate School, Dae Jon University

Objective : The objective of tihs study is to study the effects of anti-cancer, anti-metastasis and effects of immune-response of aqua-acupuncture with Cuscutae Semen infusion solution.

Methods : We observed, in-vitro, the cytotoxicity and the effect on the expression of MMP-9 gene , and in-vivo, change of body weight, surviving number, MST, ILS, changes in amount of WBC, RBC, PLT, GOT, GPT, creatinine, glucose and LDH, number of pulmonary colony.

Results : 1. The effect on expression of MMP-9 gene was decreased in all the sample groups in B16-F10 cell line, and was decreased in Lane 1, 2, 3 in HT1080 cell, compared with control group.

2. BALB/c mice which was transplanted S-180 cancer cell line were inhibited significantly in weight increase, in all the sample groups, compared with control group.

3. The sample groups injected in vein with B16-F10 cancer cell line in C57BL/6 mice did'nt show significant change in the number of WBC, RBC, PLT.

4. In immune experiment, all the sample groups showed having more relevancy to the effect on splenic cell proliferation than normal groups.

5. IFN-γ and TNF-α in cytokine-gene were increased in all the sample groups than control group.

6. In flow cytometry of splenic cell, the numbers of CD4+ cell, CD8+ cell and CD19+ cell in sample groups were increased than in control group.

Conclusion : Above the results showed that aqua-acupuncture of Cuscutae Semen infusion solution has effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement.

key words : anti-cancer, anti-metastasis, aqua-acupuncture, cuscutaesemen infusionsolution

· 접수 : 4월 30일 · 수정 : 5월 4일 · 채택 : 5월 19일

· 교신저자 : 이재복, 대전대학교 한의과대학 침구학교실(Tel : 032-543-4200)
E-mail : hanchodang@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

癌이란 體內 正常組織이 異常 肥大, 發育, 增殖하고 다른 部位에 轉移되어 또 다른 組織을 形成하는 疾患으로[1,2], 빠른 成長, 浸潤, 擴散 및 轉移 등의 特徵을 가지고 있어 生命에 危險을 招來하며[3], 新生物 또는 惡性腫瘍으로 指稱된다[4]. 韓醫學에서는 積聚, 癥瘕, 癭瘤, 石瘕, 反胃, 癰疽, 腸覃, 噎膈, 癌, 巖, 岩, 痞塊, 痃癖 등[5,6]의 範圍에 包含하여 認識하고 있고, 原因으로는 六淫外邪의 外因과 七情內傷의 內因 및 飮食失調와 過勞, 房勞過度의 不內外因 등으로 區分하고[7], 그 治療法은 扶正法과 祛邪法 및 扶正祛邪法 등으로 大別하여 活用하고 있다[8,9].免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하여 外界로부터 侵犯하거나 體內에서 發生한 不必要한 産物들을 排除하는 人體의 防禦機轉으로[10] 韓醫學의 陰陽平衡槪念 또는 正邪論의 槪念으로 認識된다[11,12].抗腫瘍 및 免疫效果에 대하여 韓藥의 投與와 鍼灸 등의 方面에서 많은 硏究들이 報告되고 있는데 [13,14], 그 중 藥鍼을 通한 抗腫瘍과 免疫에 대한 最近의 實驗硏究로는 枸杞子 및 地骨皮[15], 猪苓[11], 瓦松[16], 覆盆子[17], 肉蓯蓉[18] 등 多樣한 報告[19,20]가 이루어졌다. 本 硏究에 使用된 藥鍼療法은 經絡學說과 藥物療法에 根據하여 疾病과 相應하는 腧穴과 藥物을 選擇하고 藥鍼液을 腧穴內에 注入하여 腧穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 充分히 發揮하여 疾病을 治療하는 方法이다[21].이에 著者는 益腎固精, 益精髓, 益氣力 등의 效能이 있는 菟絲子[22,23]로 藥鍼液을 만들어 和胃氣, 理中焦, 調昇降, 寬中하는 中脘(CV12)[24,25]에 藥鍼하여 抗癌, 抗轉移作業 免疫增强效果를 觀察하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

1) 동물

動物은 4~5週齡의 BALB/c, C57BL/6 雌性 생쥐를 대한실험센터에서 供給받아 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±2℃를 維持하여 2週日 間 實驗室環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 약재

實驗에 使用된 菟絲子(Cuscutae Semen)는 大田大學校 附屬 韓方病院 藥劑課에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

2. 방법

1) 藥鍼液의 製造

菟絲子(Cuscutae Semen) 55g을 粗末하여 圓形 flask에 넣고 蒸溜水 400㎖를 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 후 rotary evaporator로 減壓濃縮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.

3) 抗癌 實驗

(1) 細胞毒性 測定

細胞毒性은 sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay法을 變形하여 測定하였다.

(2) Matrix metalloproteinase-9(MMP-9) 遺傳子 發顯에 대한 影響

① 細胞培養

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.

② Total RNA의 抽出

培養 終了 후 24-well plate의 上層液을 除去한 후 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㎍에 該當하는 量을 75℃에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3㎍에 2.5㎕의 10mM dNTPs, 1㎕의 random sequence hexanucleotides (25pM/25㎕), RNA inhibitor로서 1㎕의 RNasin(20U/㎕), 1㎕의 100mM DTT 및 4㎕의 5×RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl2)를 混合한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 添加한 뒤 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20㎕가 되도록 하였다.

④ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 water bath 方式의 turbo themal-cycler^{TM}(Bioneer Co., Korea)를 利用하여 遂行하였다.

(3) In vivo 動物實驗

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 兎絲子藥鍼液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% 兎絲子藥鍼液으로 中脘(CV12)에 藥鍼한 후 各各 分類 하였다.

Sample A : 10% 兎絲子藥鍼群

Sample B : 20% 兎絲子藥鍼群

③ 取穴

人體의 中脘(CV12)에 相應하는 實驗動物의 體表面의 털을 除去한 후 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로는 1㎖의 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(CV12)에 1日 1回, 0.2㎖씩 總 14日間 藥鍼하였다.

⑤ 平均生存日數(MST) 및 延命率(ILS) 測定[26]

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

MST(Median Survival Time) : 生存日數中央値

ILS(Increase of Life Span)

: 延命率={(T-C)/C} × 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(1×10^6cells/마리)를 腹腔 內에 移植하고 24時間 후부터 1日 1回씩 總 14日동안 體重을 測定하였다.

4) 抗轉移 實驗

(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 10㎖의

cold D-PBS(Ca2+&Mg2+-free,Sigma)가 되게 調節한 후 100mesh(Sigma)로 腫瘍 組織을 粉碎한 후 遠心分離(1,500r.p.m., 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase(1,700U/㎎, Type-XI Sigma)를 tumor 0.1g/㎖ 處理하여 30分間 water bath(37℃)에서 培養시킨 후 遠心分離(1,300r.p.m., 5min.)하였다. 上腦液을 除去한 다음, 0.85% NH4Cl을 넣어 섞은 것을 37℃ 培養器에서 5分間 放置하여 赤血球를 破壞시킨 후 遠心分離하여 B16-F10을 分離하였다. B16-F10 癌細胞株(2×10^5cells/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 菟絲子藥鍼液을 中脘(CV12)에 藥鍼한 群.

Sample A : 10% 菟絲子藥鍼群

Sample B : 20% 菟絲子藥鍼群

(3) 藥鍼

實驗 始作 2日부터 15日 까지 0.2㎖씩 1日 1回, 總 14日間 中脘(CV12)에 藥鍼 하였다.

(4) 採血 및 血淸 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 痲醉시킨 후 心臟穿刺法으로 2㎖의 血液을 1回用 注射器(23G, Samwoo Co.)로 取한 다음 1㎖는 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 1㎖는 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 血淸을 serum separator(綠十字)에 取하여 total protein, creatinine, glucose, lactate dehydrogenase(LDH) 含量 測定에 使用하였다.

① 白血球數 測定

白血球數는 Fonio法[27]에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

② 赤血球數 測定

赤血球數는 Fonio法[27]에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

③ 血小板數 測定

血小板數는 Fonio法[27]에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

④ GOT, GPT 含量 測定

GOT와 GPT 含量은 Kinetic UV法[28]에 準하여 自動生化學分析機(Ciba-Corning Co., U.S.A.)를 使用하여 測定하였다.

⑤ Creatinine 含量 測定

血淸 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[29]을 原理로 해서 自動生化學分析機(Ciba-Corning Co., U.S.A.)를 使用하여 測定하였다.

⑥ Glucose 含量 測定

血淸 中 glucose는 hexokinase法[30]에 準하여 自動生化學分析機(Ciba -Corning Co., U.S.A.)를 使用하여 測定하였다.

⑦ LDH 含量 測定

LDH의 含量은 Wacker法[31]에 準하여 自動生化學分析機(Ciba-Corning Co., U.S.A.)를 使用하여 測定 하였다.

(5) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 移植 후 菟絲子藥鍼液을 注

入한 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 후 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 후에 各 群에서 lung과 liver를 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 후 細切하여 흐르는 물에 8時間동안 水洗한 다음, 아래의 過程(scheme 2)을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 切片을 만들어 hematoxylin & eosin 染色(scheme 3)을 하였다.

5) 免疫 實驗

(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 3回 水洗 후 Mesh Screen(Sigma, U.S.A.)위에 올려놓고 가위와 유리봉을 使用하여 脾臟細胞를 分離하고 RPMI 1640 培地를 添加하여 細胞 懸濁液을 만들었다.

② 細胞增殖

脾臟細胞 增殖에 대한 效果를 알아보기 위하여 96-well plate의 各 well에 180㎕씩 5×10^5cells를 分株하고 培養器에서 24時間동안 培養한 후 兎絲子藥鍼液을 100, 50, 25, 12.5㎍/㎖로 稀釋시켜 各各 Sample E, F, G, H로 區分하여 各 群에 따라 20㎕씩 處理하여 全體 用量이 200㎕가 되도록 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 兎絲子粉末을 培養液에 溶解시킨 후 100, 50, 25, 12.5 ㎍/㎖로 稀釋한 各各을 24-well plate에 處理한 후 3時間동안 培養하였다.

② Total RNA의 抽出

培養 終了 후 24-well plate를 2,000r.p.m.에서 10分間 遠心分離하여 上層液을 除去한 후, 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 Table 3과 같다.

(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 兎絲子粉末을 100, 50, 25 ㎍/㎖씩 培養液에 溶解시켜 各各 Sample I(Ⅱ), J(Ⅲ)로 區分하여 24-well plate에 處理한 후 72時間동안 培養하였다. Control群(Ⅰ)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 5㎖ FACS tube(Becton Dikinson, U.S.A.)에 0.3㎖의 staining buffer를 넣고 混合한 후에 遠心分離(1300r.p.m., 5min.)하였다. 各各의 FACS tube에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-CD19 의 稀釋液을 各各 100㎖씩 넣고 混合한 후 60分間 얼음 속에서 反應시킨다.

③ 流細胞 分析

染色이 完了된 細胞들을 0.3㎖의 staining buffer에 浮游시켜 流細胞螢光分析器를 利用하여 分析하

였다.

6) 統計處理

統計는 Student's T-test[32]에 依해 處理 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

菟絲子(Cuscutae Semen)는 旋花科(메꽃과, Convolvvlaceae)에 속한 1年生 寄生 蔓性草本인 실새삼의 種子로서 7~9月에 菟絲子(Cuscutae chinensis Lam.)나 大菟絲子(Cuscutae japonica Choisy.)의 成熟한 種子를 줄기와 함께 베어 햇볕에 말린 것으로[22], 이는 神農本草經 上品에 收錄된 藥物로서 氣는 平 無毒하고 味는 辛甘하여 주로 肝, 脾, 腎에 歸經한다[22,23]. 成分은 배당체와 당류, 비타민 A가 含有되어 있고[22], 效能은 益腎固精, 養肝明目, 調脾止瀉, 安胎生津, 補三陰, 潤心肺, 續絶傷, 堅筋骨, 和榮衛, 益精髓, 縮小便, 止遺泄하니 陰虛와 陽虛에 모두 應用할 수 있으나 주로 補陽에 치우치며 대개 腎陽不足에 사용하고, 養肝明目의 作用이 있어 肝腎虛損, 精血不足으로 인한 視力減退, 目暗昏花, 視物不淸, 兩目乾澁 등에 사용한다[22,23].中脘(CV12)은 "太倉, 胃脘, 上紀, 中管, 胃募, 中胃, 胃中"이라고도 하며[24], 任脈에 屬하고, 足陽明胃經의 募穴이며, 八會穴 중 腑會이고[24,25], 手太陽·少陽·足陽明의 發生하는 곳이며, 小腸經·三焦經·胃經·任脈의 總會地點임과 同時에 肺經의 發源處이고 肝經의 終結點으로 腸癰, 寒癖, 蓐麻疹, 心積 등에도 活用될 뿐만 아니라 調理中焦, 健脾化濕, 和胃降逆, 和胃利濕, 寬中의 作用을 하여 胃痛, 腹部膨滿, 腹鳴, 嘔吐, 下痢, 赤痢, 消化不良, 黃疸, 胃腸虛弱을 治療하고[24,25], 腫瘍治療穴로 應用되기도 하였다.藥鍼療法은 一定한 方法으로 製造된 藥鍼液을 疾病과 有關한 穴位에 注入하여 刺針刺戟과 藥理作用을 통하여 各種 疾病을 治療하는 方法으로[21,24] 穴位注射療法[21]이라고도 하며, 이것은 東西醫結合의 一種인 新療法으로 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 의거하여 有關한 穴位 혹은 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併合된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎭痛, 腫瘍誘發抑制 등의 治療效果가 있는 것으로, 藥物의 吸收가 빠르고, 經口投與가 不可能한 境遇에도 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있다[21,24]. 腫瘍은 組織의 自律的인 過剩的 成長을 特徵으로 하는데 이는 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐만 아니라 正常組織을 破壞하는 것으로, 크게 良性腫瘍과 惡性腫瘍인 癌으로 나눌 수 있고, 잘 發達되어 있는 生體의 防禦機構에도 不拘하고 癌은 發生한다[3]. 癌은 clonality(클론形成能), autonomy(自律性), anaplasia(逆形成), metastasis(轉移)의 네 가지 特徵에 依해 正常細胞와 區分되며4), 人體內 正常組織에 異常 肥大, 發育, 增殖하고 다른 部位에 轉移되어 또 다른 組織을 形成하는 疾患이다[1,2]. 韓醫學에서는 殷墟의 甲骨文에 '瘤'라는 病名이 나타나고[8], 周禮에는 瘍醫라는 表現이 登場하면서 腫瘍에 대한 認識이 始作된다. 《黃帝內經》에서 "伏梁, 瘕, 疝, 腸澼, 瘤, 積聚" 등으로 提示된 以後로 積聚, 癥瘕, 纍瘤, 石瘕, 反胃, 癰疽, 腸覃, 噎膈, 癰, 巖, 岩, 痞塊, 疫癖 등의 範圍에 包含[5]시켜 認識되고 있다.腫瘍의 原因은 生體內 正常細胞가 發癌物質 등의 環境的 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 慢性刺戟 및 突然變異 등에 의하여 어떠한 過程을 거쳐 內的 原因으로 誘發되고 人間의 發癌의 原因 中 80~90%가 環境的 要因에 의한 것으로 알려지고 있는데, 최근의 發癌遺傳子를 中心으로 한 發癌原因에 대한 考察에서 朴은 發癌의 要因으로 電離放射線, 담배, 飮酒, 食餌要因 및 바이러스가 있으며, 바이러스 發癌은 DNA 바이러스와 RNA 바이러스가 있고, 遺傳子 次元에서 發癌은 遺傳子의

轉位, 레트로 바이러스와의 結合, 染色體 轉位에 의해 일어나며, 遺傳子 次元의 異常이 있을 境遇 이를 抑制해주는 發癌抑制遺傳子가 있으며 이의 機能失調가 發癌의 한 原因이 된다고 하였다.

韓醫學에서는 癌의 原因을 六淫에 의한 外因과, 七情內傷의 內人과, 飮食失調, 過勞 및 房勞過多의 不內外因으로 區分되는데[11], 《靈樞·五變篇》에서는 邪氣留止而成積聚 內傷腸胃之間 若在飮食之寒溫不次 邪氣稍之卽蓄積"이라 하여 飮食內傷과 外感을, 巢[6]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 正氣虛와 外感風邪를, 陳[19]은 "乳岩由于憂思鬱結 所願不遂 肝脾氣逆 以致經絡阻塞 結積成核"이라 하여 七情變化를 原因으로 보았다. 治法[7,8]으로는 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 등의 扶正法과 淸熱解鬱, 祛濕解毒, 行氣理氣, 活血化瘀, 軟堅散結 등의 祛邪法 및 扶正祛邪의 方法이 提示되고 있다.

西洋 醫學的 治療法으로는 手術療法, 化學療法, 放射線療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등이 있다.

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機構로서 外部로부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에 생긴 不必要한 産物 등과 特異하게 反應하여 抗體를 만들며, 이것을 排除하여 그 個體의 恒常性을 維持하는 現象이며, 免疫反應이란 非自己를 抗原으로 認識하고 特異하게 抗體를 生産하여 이에 對處하고 處理하는 連鎖的인 反應을 말한다.

韓醫學에서 免疫의 槪念은 西洋醫學에서의 "自己"와 "非自己"를 "精氣"와 "邪氣"의 槪念으로 比較할 수 있다. "精氣"는 體內의 모든 抗病物質을 말하며 臟腑, 經絡, 榮衛氣血의 모든 正常的인 生理機能을 包括한다. "邪氣"는 모든 病因의 總稱이며 六淫之邪 또한 體內의 陰陽失調에 의한 病理改變 즉 瘀血, 痰飮 등의 病邪도 邪氣에 속한다. 疾病의 發生과 進展을 人體의 正氣와 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 過程으로 본 正邪論에서 그 聯關性을 찾아볼 수 있으며 疾病發生과 進行에 대한 病理理論을 보면 正氣와 邪氣의 力量對比에 의하여 疾病이 發生, 轉歸, 治療된다는 正邪論의 認識과 가장 가깝다.

藥鍼을 通한 抗腫瘍과 免疫에 대한 實驗硏究로 金은 金銀花藥鍼이 抗腫瘍에 有效함을 報告하였고, 高는 人蔘, 金은 鹿茸, 李는 當歸, 黃芪 등이 各各 免疫機能 增進에 效果가 있다고 하였으며, 崔[15]는 枸杞子 및 地骨皮, 徐[11]는 猪苓, 李[16]는 瓦松 藥鍼이 抗腫瘍과 免疫에 各各 有效함을 報告하였으나, 益腎固精, 養肝明目, 調脾止瀉, 安胎生津, 續絶傷, 堅筋骨, 益精髓, 益氣力의 效能이 있는 兎絲子[22,23]를 이용한 報告는 아직 接한 바가 없었다.

이에 著者는 兎絲子로 藥鍼液을 調製한 후 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 中脘(CV12)[24,25]에 藥鍼하여, 抗癌實驗으로 in vitro에서 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 살펴보았고, 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 血淸에 미치는 影響을 살펴보았고, 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 대한 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 대한 影響 等을 觀察하였다.B16-F10 癌細胞株에 대한 細胞毒性을 살펴보기 위하여 100㎕/㎖부터 50, 25, 12.5, 6.25㎕/㎖로 稀釋한 兎絲子藥鍼液을 各各의 癌細胞株에 注入한 結果 細胞毒性은 없었다

HT1080 癌細胞株에 대한 細胞毒性을 살펴보기 위하여 100㎍/㎖부터 50, 25, 12.5, 6.25㎍/㎖로 稀釋한 菟絲子藥鍼液을 各各의 癌細胞株에 注入한 結果 細胞毒性은 없었다.

HT1080과 B16-F10 癌細胞株에 대한 MMP-9 遺傳子 發顯에서 B16-F10 癌細胞株의 Ht값은 對照群에서 113, 實驗群 lane 1, 2, 3, 4에서 各各 56, 61, 86, 83으로 全 實驗群에서 減少하였고, HT1080 癌細胞株의 Ht값은 對照群에서 154, 實驗群 lane 1, 2, 3, 4에서 各各 98, 103, 105, 167로 나타나 lane 1, 2, 3에서 減少한 結果를 보였다.

S-180 癌株를 移植하고 菟絲子藥鍼 注入 후 1日과 14日에 測定한 體重은 對照群에서는 27.2g에서 31.5g으로 增加한 반면, sample A에서는 26.4g에서 28.5g로 sample B에서는 27.3g에서 29.5g으로 나타나 對照群에 비하여 實驗群에서 體重增加의 抑制된 경향을 알 수 있었으며 實驗始作 19日까지 生存한 생쥐의 數는 對照群과 sample A, sample B에서 각각 3, 6, 6마리로 나타났고, 또한 平均生存日數와 延命率에서 MST(days)는 對照群이 19.25, 實驗群 A, B는 各各 25.25日, 20.00日로 나타났으며, 對照群에 대한 ILS(%)는 實驗群 A, B에서 各各 31.2(%), 3.9(%)로 나타나 延命率이 높아진 것으로 나타났다

抗轉移 實驗에서 血液과 血淸에 미치는 影響을 살펴보면, 白血球數는 血液疾患의 診斷 또는 抗腫瘍療法의 指標로서의 意義를 가지며, 赤血球數로는 貧血이나 赤血球增多症의 有無와 그 程度를 把握하고, 血小板數는 癌의 骨髓轉移나 藥物에 의한 骨髓抑制 등으로 生産이 低下되고, 免疫性 疾患인 膠原病, 淋巴球增殖性疾患 등으로 破壞亢進이 있을 때나 脾臟機能亢進症 등일 때 減少하며, 腫瘍性으로 本態性血小板增多症, 慢性骨髓性白血病, 眞性赤血球增多症, 反應性인 惡性腫瘍, 脾臟摘出 및 出血 등으로 增加하는데, 本 實驗에서는 赤血球數, 白血球數, 血小板數 모두 有意한 變化를 나타내지는 않았다.

血淸分析을 위한 GOT(U/ℓ), GPT(U/ℓ), creatinine(㎎/dℓ), glucose(㎎/dℓ), LDH(U/ℓ) 등의 測定結果는 다음과 같다.

GOT와 GPT는 人體의 모든 組織에 存在하지만, 그 중 心筋, 肝, 筋肉, 血球 등의 障碍에서 血淸 酵素活性이 增加하게 되고 다른 組織의 障碍에서는 거의 增加를 보이지 않는 酵素인데 本 實驗에서는 GOT는 全 實驗群에서 有意한 變化를 보이지 않았고, GPT는 Sample A와 Sample B에서 有意한 增加를 보였다.

creatinine은 筋肉의 收縮 energy로서 creatine phosphate에서 生成된 creatine이 脫水되어 생긴 代謝終末産物로 血中 creatinine 濃度는 腎臟의 排泄機能에 關聯이 있기 때문에 腎血流量 減少, 腎絲球體 濾過値가 減少할 境遇, 鬱血性心不全 및 末端巨大症에서 增加를 보이고, 기타 肝障碍, 筋dystrophy 및 尿崩症에서는 減少하는데, 本 實驗에서는 有意한 變化를 보이지 않았다.

血中 glucose는 血液에서 糖의 供給과 消費로 調節되는데 臨床的으로 高血糖을 나타내는 境遇는 糖尿病, 甲狀腺機能亢進, 胃切除, 膵臟疾患, 頭部外傷, 腦出血, 姙娠 및 肥滿 등이며, 低血糖은 高 insulin 血症, 腦下垂體前葉機能低下症 및 糖尿病治療劑의 過剩投與時에 나타난다. 本 實驗에서는 對照群에 비해 全 實驗群에서 有意性 있게 增加하였다.

血淸 LDH는 可溶性分劃이므로 이 酵素 活性이 增加하는 것은 生體內 어느 臟器에 細胞破壞가 있어 血中에 流出하는 것인지를 推定하는데 利用되며, 또한 腫瘍細胞에서는 多量의 LDH가 生成되기도 하므로 惡性腫瘍의 存在與否를 推定하는 데도 利用된다. 惡性腫瘍 由來에서는 白血病, 惡性淋巴腫, seminoma, 胃癌 및 大腸癌 등에서 增加하며, 免疫抑制劑 投與 등에서 減少하는데, 本 實驗에서는 有意性을 보이지 않았다.

組織檢査에서 B16-F10 癌細胞株를 注入한 생쥐의 轉移된 肝組織 檢査 結果 對照群에서 +++로 나타난 것에 비해 sample A, sample B에서 各各 +로 轉移가 抑制된 結果를 보였고(Table 10), 肺組織에서도 對照群에서 ++++로 나타난 것에 비해 sample A, sample B에서 各各 ++와 +로 轉移가 抑制된 結果를 보여, 兎絲子藥鍼이 肝組織과 肺組織에서 抗轉移 效果가 있음이 立證되었다.

脾臟은 生體에서 림프組織이 가장 많이 모여 있는 器官이며, capsule(膜囊), trabeculae(脾柱), white pulp(白髓), red pulp(赤髓)로 構成되어 있고 食細胞가 豊富하며 循環하는 血液이 이 細胞들과 密接하게 聯關되기 때문에, 脾臟은 血液으로 浸透해 온 微生物을 防禦하는 重要한 器官이 된다. 또한 생쥐와 其他 動物에서 造血機能의 主要 部位이며, 免疫細胞를 爲主로 한 血球와 血小板의 貯藏機關으로 알려져 있다. 사람에 있어서는 成人의 境遇 造血機能이 大部分 骨髓에서 일어나지만, 胎兒期때나 骨髓의 非正常的 擴張에 의한 疾患의 境遇 脾臟에서도 造血作用이 일어난다. 이런 理由로 實驗動物의 脾臟은 免疫과 造血機能의 實驗材料로서 適切하여 많은 實驗에 使用되고 있다. 脾臟은 免疫機能이 增强하게 되면 機能이 强化되어 免疫反應이 일어나는 白髓部의 細胞數가 增加하여 T 細胞와 B 細胞를 增加시킨 結果로 重量이 增加된다.

免疫增進에 關聯된 實驗으로 兎絲子藥鍼液의 脾臟細胞 增殖에 대한 影響을 觀察한 3H-thymidine 測定値를 보면 實驗群 E, F, G, H 모두에서 對照群에 비해 增加를 보였다.

免疫反應은 여러 가지 細胞와 이 細胞들이 分泌하는 可溶性 分子들에 의해서 仲介되며 白血球가 中心이 되지만 組織에 있는 다른 細胞들도 細胞와 大食細胞들이 遊離하는 分子量이 작은 蛋白인 cytokine에 反應함으로써 免疫反應에 參與한다. cytokine은 血球들이 分泌하고 自然免疫과 特異免疫 大部分에 重要한 機能을 나타내며 그 作用細胞들도 白血球이므로 이들의 이름을 interleukin (IL)이라 命名하게 되었고 그 중 IL-10은 cytokine合成沮害因子로 알려졌으며 IFN의 生成이나 抗原 表出을 抑制하고 IL-1, IL-6, TNF-α를 만드는 大食細胞의 生成을 抑制하며 IFN-γ는 活性化된 T細胞와 自然殺害細胞에 의해 生成되며, IFN-γ가 生成되면 抗原提供細胞의 機能이 增加되고 潛在的으로 T細胞가 活性化되고 大食細胞도 活性化 된다. TNF-α는 活性化된 大食細胞가 主 生成源으로 效率的인 炎症反應을 誘發시켜 宿主를 保護하지만 多量의 TNF-α 投與나 生産은 宿主에 致命的인 害를 誘發한다.

兎絲子藥鍼이 脾臟細胞에서 cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 살펴본 缺課, IFN-γ, TNF-α가 各各 對照群에서 52, 35로 나타났고, lane 1에서 152, 38로 lane 2에서 139, 41로 lane 3에서 145, 53으로 lane 4에서 128, 64로 나타나 全實驗群에서 增加된 結果를 보였다.

脾臟細胞의 流細胞 分析을 通해 CD4+ 細胞數에 대한 影響을 살펴보면 positive cell의 比率(%)이 對照群은 28.47%로 나타났고 100, 50 μg/mℓ 兎絲子藥鍼群에서 各各 29.46%와 33.81%로 增加하였고, CD8+ 細胞數는 對照群은 8.98%로 나타났고 100, 50 μg/mℓ 兎絲子藥鍼群에서 각각 11.07%와 9.38%로 增加하였으며, CD19+ 細胞數는 對照群은 23.85%로 나타났고 100, 50 μg/mℓ 兎絲子藥鍼群에서 各各 26.70%와 24.00%로 增加하였다.

結果的으로 兎絲子藥鍼液은 細胞毒性은 없으나 MMP-9 遺傳子 發顯을 抑制하는 것으로 나타났고, 兎絲子藥鍼은 생쥐의 延命率과 平均 生存日數를 增加시켰다. 血液과 血淸 檢査에서는 有意性을 보이지 않았으나 肝과 肺의 組織 檢査에서 抗轉移 效果가 있음이 나타났고, 脾臟 細胞를 增殖시키고 cytokine 遺傳子와 脾臟의 免疫 細胞 發顯을 增加시켜 免疫

機能을 增進시키는 것으로 나타났다.

以上을 綜合하여 보면 益腎固精, 益氣力, 益精髓의 效能을 가진 菟絲子와 和胃氣, 理中焦, 寬中, 調昇降하는 中脘穴을 이용한 菟絲子藥鍼은 抗癌, 抗轉移 및 免疫增進에 效果를 나타내며, 向後 癌의 治療 및 豫防에 應用될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

菟絲子藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 影響을 實驗的으로 究明하고자 人體에 相應하는 中脘(CV 12)에 菟絲子藥鍼液을 一定한 方法으로 注入하여 癌細胞毒性, MMP-9 遺傳子 發顯에 미치는 影響, 體重變化, 生存數, 生存期間, 延命率과 白血球數, 赤血球數, 血小板數, GOT, GPT, creatinine, glucose 및 LDH의 變化, pulmonary colony, 轉移된 肺와 肝의 組織檢査, 脾臟細胞增殖, cytokine 遺傳子 發顯에 대한 影響, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ 에 대한 影響을 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. MMP-9 遺傳子 發顯은 B16-F10 癌細胞株에서는 全 實驗群에서 減少하였고, HT1080 癌細胞株에서는 lane 1, 2, 3에서 減少하였다.

2. S-180 癌細胞株가 移植된 생쥐의 體重은 對照群에 비하여 實驗群에서 體重增加가 抑制된 경향을 보였고, 平均生存日數와 延命率은 全 實驗群에서 增加하였다.

3. B16-F10 癌細胞株를 靜脈內 注射한 생쥐의 赤血球數, 白血球數, 血小板數는 有意한 變化가 없었다.

4. 免疫實驗에서 脾臟細胞數는 全 實驗群에서 有意性있는 增加를 보였다.

5. Cytokine 遺傳子 중 IFN-γ 및 TNF-α의 發顯은 全 實驗群에서 增加하였다.

6. 脾臟細胞의 流細胞 分析에서 $CD4^+$와 $CD8^+$, $CD19^+$ 細胞數가 全 實驗群에서 增加하였다.

以上을 綜合하여 보면 菟絲子藥鍼은 抗癌과 抗轉移 및 免疫機能 增進에 有效한 것으로 나타나 向後에의 活用이 期待된다.

VI. 참고문헌

1. 경희대학교 의과대학. 종양학. 서울:예원기획. 1999:15.
2. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995:226.
3. 서울대학교의과대학 편. 종양학. 서울:서울대학교출판부. 1996:43-93.
4. 해리슨 내과학 편찬위원회 편. HARRISON'S 내과학. 서울:정담. 1997:1963.
5. 楊維傑 編. 黃帝內經素問靈樞譯解. 서울:成輔社. 1980:41, 45, 97, 168, 243, 407, 347, 469, 473, 577, 295~296.
6. 巢元方. 諸病源候論. 北京:人民衛生出版社. 1979:576, 644, 691-692.
7. 田炳旭. 癌腫의 病因病理에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995;1:83-101.
8. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林書院. 1995:13-42.
9. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海:上海科學技術出版社. 1980:1-10.
10. 정태호. 면역학 강의. 대구:경북대학교출판부. 1993:309-317.
11. 徐範錫. 猪苓藥鍼이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1995.
12. 史知洪. 淺談祖國醫學中正氣與現代免疫學的關係. 新中醫. 第9期. 1989:1-2.
13. 郭桂豪. 腫瘍의 化學療法과 放射線療法의 不作用에 대한 韓方藥物療法. 東醫病理學會誌.

1995;9(2):45-88.
14. 金楨汜. 大腸癌의 東西醫學的 比較硏究. 東醫病理學會誌. 1995;9(2):89-128.
15. 崔鍾鎬. 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍 및 免疫에 미치는 影響. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1996.
16. 李貞和. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 硏究. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1999.
17. 李善熙. 抗癌 및 免疫效果에 覆盆子藥鍼이 미치는 影響. 大田大學校大學院 博士學位論文. 2000.
18. 李殷鏞. 肉蓯蓉藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 미치는 實驗的 硏究. 大田大學校大學院 博士學位論文. 2000.
19. 朴祥鎔. 薏苡仁水鍼이 腫瘍에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 碩士學位論文. 1994.
20. 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.
21. 大韓藥鍼學會 編纂. 藥鍼製劑와 臨床應用. 서울:大韓藥鍼學會. 1997:1-5.
22. 李尙仁. 本草學. 서울:學林社. 1975:117, 118.
23. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:1235-1238.
24. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學敎室. 鍼灸學(上, 下). 서울:集文堂, 1991:214-234, 699-701, 730-732, 1457-1467.
25. 安榮基. 經穴學叢書. 서울:成輔社. 1986:196-197, 694-695.
26. 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., 130:3299, 1993.
27. 金井泉외. 臨床檢査法提要. 서울:高文社. 1984:242, 298, 303, 1112, 1149.
28. Kiesow, L. A. The enzymic determination of 2,3-dihosphoglycerate in a crude cell(UV method). Anal Biochem. 1973;51(1):91-96.
29. Spierto, F.W., MacNeil, M.L., Burtis, C.A. The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffe procedure. Clin. Biochem. 1979;12(1):18-21.
30. Bernard, J.H. Hematology basic methology, clinical diagnosis agement by laboratory methods. 17th edition. 1984:586-588.
31. Young, D.S., Pestaner, L.E. and Gibberman, V. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem. 1975; 21:323. 1975.
32. Daniel, W.W. A foundation for analysis in the health sciences. NewYork:Wiley, third edition. 1983:136-146.