

# K-藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 抗癌效果에 關한 實驗的 研究

김광호\* · 권기록\*

\* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

## The Study on Acute · Subacute Toxicity and Anti-cancer Effect of K-herbal-acupuncture.

Kwang-Ho, Kim\* · Ki-Rok, Kwon\*

\*Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

**Objectives :** The purpose of this study was to investigate Acute · Subacute Toxicity and Anti-cancer Effect of K-Herbal-acupuncture in mice and rats.

**Methods :** Balb/c mice were injected intraperitoneally with K-herbal-acupuncture for LD<sub>50</sub> and acute toxicity test. Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with K-herbal-acupuncture for subacute toxicity test. K-Herbal-acupuncture was injected on abdomen of mice with S-180 cancer cell line.

### Result :

1. LD<sub>50</sub> of K-Herbal-acupuncture was limited  $4 \times 10^{-3} \text{ml/kg} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ml/kg}$  by the test.
2. In acute toxicity test, all of mice were down to the moving reflex, but the weight of mice was increased in treatment group, compared with the normal group. ( $p < 0.05$ )
3. In acute toxicity test of serum biochemical values of mice, glucose was increased in treatment II group, total cholesterol was increased both treatments. ( $P < 0.05$ )
4. In subacute toxicity test, the clinical signs of toxication was down to the moving reflex, but it is not severe like acute toxicity test, and observed weight loss at the treatments.
5. In subacute toxicity test, liver weight was decreased compared with the normal group. ( $P < 0.05$ )
6. In subacute toxicity test of complete blood count test (CBC) of rat, HCT was decreased in treatments, compared with the normal group. ( $P < 0.05$ )
7. In subacute toxicity test of serum biochemical values of rat, uric acid and triglyceride were decreased, and glucose

was increased in treatment groups compared with the control group. (P<0.05)

8. Median survival time was increased about 45% in treatment groups compared with the control group.(P<0.05)

9. Natural killer cell activity was increased in B16F10 lung cancer model, but it was not in sarcoma-180 abdomen cancer.

10. In interleukin-2 productivity test, treatment groups didn't show significant change in lung cancer and abdomen cancer, compared with the normal group.(P<0.005)

11. In making an examination of metastatic cancer with the naked eye, melanoma metastasized in the Lung of C57BL/6 mice.

The treated group showed more Melanoma than the control in the numbers and volume.

**Conclusion :** According to the results, K-herbal-acupuncture need further study to know the function and effect in cancer.

**Key word :** K-herbal-acupuncture, LD<sub>50</sub>, acute toxicity, subacute toxicity, natural killer cell activity, interleukin-2 productivity, cancer.

## I. 緒 論

우리나라에서 1997년 통계청이 발표한 질병사인분류에 의하면 연간 5만명 이상이 암으로 인해 사망하여 전체 사망원인의 2위를 차지하고 있다.<sup>1)</sup> 또한 앞으로 이의 사망률은 여러 가지 원인에 의해 더욱 심화될 것으로 전망된다. 현재 암에 대한 치료법은 일차적으로 생활 습관이나 환경의 개선 등을 통한 발생의 예방과 이차적으로 조기 진단을 통한 예방을 들 수 있다.<sup>2)</sup> 그러나 진행된 암의 치료방법으로는 외과적 수술요법, 방사선 요법, 약물요법, 항화학요법, 면역요법, 호르몬 요법 및 골수나 조혈모세포의 이식 등의 유전자 치료 방법들이 제시되고 있으나 그 효과는 만족할 만하지 못하다.<sup>3,4)</sup>

韓醫學에서의 암은 內經 이후부터 石癥, 腸癰, 骨疽, 肉疽, 積聚, 瘤 등으로 생각하여 왔으며<sup>5)</sup>, 腫瘍의 발생은 外感六淫이나 內傷七情, 그리고 음식, 과로 그리고 인체의 正氣虛와 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 보고 있다.<sup>6)</sup>

藥鍼療法은 질병의 치료에 유관한 穴位나 壓通點 등에 氣味論을 따른 정제된 한약제재를 주입하여 刺針과 藥物의 효과를 동시에 구현한 新鍼療法으로,<sup>7)</sup> 최근에 들어서 藥鍼液을 이용한 抗癌效果와 免疫에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>8,9,10,11)</sup> 이에 저자는 임상

적으로 암환자를 치료하고 있으며, 항암효과가 우수하다고 주장하는 K-약침을<sup>12)</sup> 구한 후 안전성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12.3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호에 준하여<sup>13)</sup> 급성 및 아급성 독성실험을 통해 독성을 평가하였고, 항암작용과 면역능력이 있는지 여부를 알아보고자 Sarcoma-180 복강암과 B16F10 폐암을 ICR계 mouse에 유발한 후, 생존율, NK cell 활성화도 및 Interleukin-2 양을 측정하여 면역작용에 미치는 영향을 실험한 결과 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 동물 및 재료

#### 1. 동물

급성 독성실험과 항암능 측정을 위하여 체중 25±5g 내외의 ICR, Balb/c계 웅성 mouse를 사용하였고, 아급성 독성실험을 위하여 체중 220±30g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였다. 모든 동물은 대한실험동물센터에서 구입하여 2주간 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하

였다. 급성, 아급성 독성 및 항암능 실험에서 모든 실험군은 한군에 각 10마리씩으로 시행하였다.

## 2. 약침

실험에 사용한 약침은 현재 강남오당 한의원에서 자체 개발하여 암환자의 치료에 사용하고 있는 약침(이하 K-약침, K-herbal-acupuncture)을<sup>13)</sup> 사용하였고, 독성을 완화하기 위한 base oil은 실험적으로 독성이 거의 없다고 보고된 호도유를<sup>14)</sup> 약침조제지침에 준하여<sup>13)</sup> 조제한 후 적정 비율로 배합하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1. 약침의 시술

급성 독성실험의 경우는 K-약침을 호도약침액과 4:100, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:2000으로 각각 희석한 후, 주사기에 0.1ml, 0.2ml로 준비하여 Balb/c mouse의 복강에 1회 주입하였다.

아급성 독성 실험의 경우는 Sprague-Dawley rat에 1:1000으로 희석한 약침액을 동일한 방법으로 매주 2회씩 4주 동안 0.1ml, 0.2ml씩 복강 주입하였고, 대조군의 경우 동량의 생리식염수를 사용하였다.

항암능 측정 실험의 경우는 암세포 주입 2일 후부터 매주 2회씩 1:2500으로 호도약침과 희석한 후, 0.1ml씩 주입하였고, 대조군의 경우 동량의 생리식염수를 주입하였다.

### 2. 암세포의 배양

#### (1) 배지구성

##### ① 기본배지의 준비

RPMI 1640(Gibco, U.S.A)에 sodium bicarbonate(Shinyo-pure Chemicals Co., LTD., Japan) 2g과 fungizone(Gibco, U.S.A) 4ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A) 1ml을 증류수에 녹인 후 pH를 7.3으로 조정된 뒤, 1000ml로 맞추고, 0.22 $\mu$ m disposable sterile bottle top filter(Coming, U.S.A)로 여과하여 기본배지로 사용하였다.

##### ② 혼합배지의 준비

FBS(fetal bovine serum, Gibco, U.S.A)를 56°C에서 30분간 inactivation시킨 후 RPMI 1640 기본배지에 10%의 농도가 되도록 조정하여 사용하였으며(이하 혼합배지라 칭함), 세포배양 전반에 사용되었다.

#### (2) 암세포의 배양

실험에 사용된 암세포는 B16F10(KCLB No, 80008)과 Sarcoma-180(KCLB No, 40066)세포로, 모두 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태로 분양 받아 한국세포주 은행의 세포 부유법에 의하여 녹인 후, 혼합배지에 부유시켜 5% CO<sub>2</sub> 배양기(존샘, 한국)안에서 배양시키면서 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

#### (3) 암 유발

ICR을 이용한 경우는 지수증식기의 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 암을 유발시켜, 생존율, IL-2 양을 측정하였다.

C57BL/6를 이용한 경우는 지수증식기의 B16F10 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 생쥐의 미정맥에 0.2ml씩 주입하여 암을 유발시켜, NL-세포 활성, IL-2 양을 측정하였다.

## 3. 측정항목

### 1. 급성독성

#### (1) LD<sub>50</sub> 측정

약침을 희석된 농도별로 Balb/c mouse에 0.1ml, 0.2ml씩 주입한 후, 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다.

#### (2) 임상관찰 및 체중측정

희석비율에 따른 약침을 0.1ml, 0.2ml씩 Balb/c mouse의 복강에 주입한 실험군과, 생리식염수 0.2ml를 주입한 대조군으로 나누어 실험하였고, 약침주입 후부터 실험 종료일까지 1일 1회 mouse의 호흡, 행동, 자세,

반응성, 피모 및 안구 등의 상태를 관찰하였다. 체중은 실험 첫째 날과 종료일에 저울을 이용하여 측정하였다.

(3) 채혈 및 생화학 혈청검사

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 심장해서 1ml의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A)에 넣었고, 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분간 혈청을 원심분리하여 실험에 사용하였다.

측정항목은 Biochemical Analyser(TBA-20R, Toshiba, Japan)으로 Total Protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase 등이다.

2. 아급성 독성

(1) 임상관찰 및 체중측정

약침을 0.1ml, 0.2ml씩 Sprague-Dawley rat에 주입한 실험군과 생리식염수 0.2ml를 주입한 대조군으로 나누어 실험하였고, 실험개시일부터 종료시까지 1일 1회 1시간씩 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 시행하였다. 체중은 1주일 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다.

(2) 장기의 무게 측정

아급성 독성실험 종료일에 체중을 측정하고, 채혈을 한 뒤 간장, 심장, 비장, 폐장, 신장을 적출하여 저울(EB-200HU, SHIMADZU, Japan)을 이용하여 무게를 측정하였다.

(3) 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle(녹십자의료공업, 한국)에 넣고, 나머지는 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000 rpm으로 5분간 혈청을 원심분리하여 실험에 사용하였다.

(4) Complete blood count

EDTA bottle에 보존한 혈액을 이용하여 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)을 이용하여 WBC, RBC,

HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT를 측정하였다.

(5) 생화학 혈청검사

Vacutainer tube에 보존한 혈청을 이용하여 Biochemical Analyser(TBA-20R, Toshiba, Japan)로 Total Protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase, A/G ratio, BUN/Cr ratio 등을 측정하였다.

3. 항암

(1) 생존율 측정

지수증식기의 sarcoma-180 세포를 ICR의 복강에 주입한 후, 30일동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다.

Geran<sup>15)</sup> 등이 기술한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

$$\text{생존증가율} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

X : 생존수가 전체동물의 1/2이 되는 최초의 시간(일)

Y : 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(일)

T : 실험군의 median survival time(일)

C : 대조군의 median survival time(일)

(2) 비장세포의 준비

생쥐를 경추탈골로 처사시킨 후 복부를 알콜로 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 뒤, 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4°C 기본배지로 2회 세척한 다음 cell dissociation sieve-tissue grinder kit(Sigma, U.S.A)로써 잘게 으갠 후 조직파편을 제거하고 기본배지로 3회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로써 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤 10×HBSS(Gibco, U.S.A)로 2회 세척하고 기본배지로 한번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

(3) NK cell의 활성화 측정

① 표적세포의 준비

NK 세포의 살해능측정시의 표적세포는 한국세포주 은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1임파종 세포 (KCLB 40160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 실험실에서 FBS가 10% 첨가된 혼합배지로 계대배양하여 사용하였다.

② 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

③ 세포 독성실험

세포독성실험은 Promega사의 51Cr assay를 대체하는 것으로 알려져 있는 cytotox96TM non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은 색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, U.S.A)를 이용하여 가시광선영역의 파장(490nm)에서 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

오차를 보정하기 위하여 5종류의 대조 well을 두었다. 표적세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 1은 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 표적세포의 LDH 최대방출량을 나타내는 대조 well 2는 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 작동세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 3은 최적수의 작동세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 부피를 보정하기 위한 대조 well 4는 용해용액을 첨가하여 발생하는 부피의 변화에 의한 오차를 보정하기 위한 것으로 배지 200 $\mu$ l와 용해용액(10 $\times$ )20 $\mu$ l로 구성하였으며, 배지의 background로서 배지 내의 혈청이나 phenol red에 기인한 LDH의 활동능을 보정하기 위한 대조 well 5는 배지 200 $\mu$ l로 구성하였다.

C57BL/6를 사용한 경우는 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 1 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/ml의 농도로 재부유하고, 96well microtitration plate에 well당 100 $\mu$ l씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합

배지에 각각 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml, 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml, 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ l를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ l/well이 되도록 한후 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다.

배양 종료 45분 전에 대조 well 2에 100 $\mu$ l당 10 $\mu$ l의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$ l 옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합 기질을 만든 후 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 $\mu$ l의 정지용액을 각 well에 넣은 후 주사기로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 실험값, 표적세포 LDH 자연방출값, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 제하였고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 제하였다.

즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였다

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

A: Experimental - 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.

(4) Interleukin-2 생산량 측정

Sarcoma-180 세포를 ICR계 생쥐에 주입하고 14일째에 생쥐를 치사하여 비장을 적출하였다. 비장세포를 FBS가 5% 첨가된 혼합배지에 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 (C57BL/6계 생쥐의 경우, 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml이 되도록 조정) 재부유한 후, 여기에 concanavalin-A (Sigma, U.S.A)를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 Interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다.

생쥐 IL-2의 생산량 측정은 Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit(R&D system, U.S.A)를 이용하였다.

Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit는 고형상 면역 효소 측정법을 이용한 mouse Interleukin- 2 측정용 kit로서 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2 량을 산정할 수 있는 방법이다.

96well plate의 각 well에 50 $\mu$ l의 Assay Diluent solution을 분주하고 준비된 standard, control, 실험군의 비장세포 상층액 50 $\mu$ l 첨가한 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well을 미리 준비된 Wash buffer로 5회 세척한 후 물기를 깨끗이 제거하고 100 $\mu$ l의 Conjugate solution을 각 well에 분주하였다. 그 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 Wash buffer로 5회 세척하여 물기를 제거하고, 100 $\mu$ l의 Substrate Solution을 각 well에 분주하여 빛이 차단된 장소에서 실온에서 30분간 배양하였다. 그 후 100 $\mu$ l의 Stop Solution을 각 well에 분주한 후 ELISA 판독기(Emax, Molecular device, U.S.A)로 450nm 파장에서 흡광도를 읽었다. 이 때 흡광도의 교정을 위하여 540nm에서 한 번 더 읽었다.

#### 4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS(Release 10.0.7)를 이용하였으며, student's T-test를 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 급성 독성

##### 1. LD<sub>50</sub> 측정

Balb/c mouse를 이용한 LD<sub>50</sub>의 측정에서 대조군에서는 사망한 개체가 발견되지 않아 LD<sub>50</sub>은 산출 할 수 없었다. K-약침을 호도약침액과 4:100, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:2000으로 희석한 후, 주사기에 0.1ml, 0.2ml로 준비하여 시술한 결과 4:100, 1:100, 1:200 시술군에서는 모든 개체가 24시간 이내에 사망하였고, 1:1000 0.1ml 시술군에서는 10마리 중 2마리가 생존하였으며,

1:2000에서는 사망하는 개체가 발견되지 않았다.

따라서 K-약침의 LD<sub>50</sub>은 4×10<sup>-3</sup>ml/kg~2×10<sup>-3</sup>ml/kg으로 추정할 수 있었고, 이는 기존의 약침에 비해 매우 독성이 강함을 알 수 있었다.

##### 2. 임상관찰

Balb/c mouse를 이용한 급성독성실험에서 약침을 주입하고 7일간 임상관찰을 한 결과, 약침 시술 후 대부분의 mouse들은 즉시 현저한 운동성의 저하가 나타나고 외부에 대한 반사작용도 떨어지며 움직이지 않고 있다가 1-12시간 내에 사망하는 경우가 많았다. 24시간 이후 사망하는 개체에서는 시술 부위 주위에 털이 빠지거나 피부색의 변화가 관찰되었다.(Table 1.)

Table 1. Clinical findings of ICR mice treated with K-herbal-acupuncture 0.1cc in acute toxicity test.  
(Dose of K-herbal-acupuncture: 2×10<sup>-3</sup> ml/kg)

Clinical observation	Hours after treatment							
	1	12	24	48	72	96	120	168
Tachypnea	0*	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	10	10	10	10	10	10	10	10
Opisthotonus	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	10	10	10	10	10	10	10	10
Ocular signs	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	10	10	10	10	10	10	10	10
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	0	0	0	0	0	0	0	0
others	0	0	0	0	0	0	0	0

\* Number of mouse

##### 3. 체중 변화

K-약침을 0.1ml, 0.2ml를 주입한 각 군의 체중 변화는 Table 2와 같다.

실험 시작 1일째에는 정상군이나 대조군, 그리고 실험군 모두 체중의 차이가 유의성을 나타내지 않았으나 7일째에는 실험군 모두에서 유의한 체중의 증가를 나타내었다.(Table 2.)

Table 2. Body weight of mice treated with K-herbal-acupuncture in acute toxicity test. (unit : g)

GROUP	Day 1	Day 7
Normal	25.66±1.18	25.91±0.78
Control	26.93±1.68	27.01±1.94
Treat-1	26.79±1.52	31.33±1.29 <sup>ab</sup>
Treat II	26.35±1.60	31.18±2.35 <sup>ab</sup>

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a: Control and treat group were compared with a normal group by students`two-tailed test. (P<0.05)

b: Treat groups were compared with a normal group by students`two-tailed test.(P<0.05)

#### 4. 생화학 혈청검사

급성 독성실험의 생화학 혈청검사 결과를 시행한 결과 정상군에 비하여 실험군 I에서는 GOT의 유의한 감소와, BUN과 Uric acid의 유의한 증가를 나타내었고, 실험군 II에서는 Total protein, Albumin, Total Cholesterol의 유의한 증가와 BUN의 유의한 감소를 나타내었다. 대조군에 비해서는 실험군 모두 BUN과 GPT의 유의한 감소와, Total Cholesterol의 유의한 증가를 나타내었다.(Table 3.)

Table 3. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with K-herbal-acupuncture in acute toxicity test.

GROUP	Normal	Control	Treat I	Treat II
Total Protein (g/dl)	4.89±0.19	5.01±0.29	5.01±0.33	5.15±0.24 <sup>a</sup>
Albumin (g/dl)	2.89±0.07	3.00±0.18	3.01±0.18	3.05±0.17 <sup>a</sup>
BUN (mg/dl)	24.46±4.46	33.74±1.90 <sup>a</sup>	29.13±2.32 <sup>ab</sup>	27.16±3.30 <sup>ab</sup>
Creatinine (mg/dl)	0.49±0.04	0.54±0.02 <sup>a</sup>	0.51±0.08	0.52±0.02
Uric Acid (mg/dl)	2.80±0.72	3.34±0.80	4.20±1.23 <sup>a</sup>	3.66±1.12
Glucose (mg/dl)	216.88±23.87	248.75±37.08	276.17±69.58	260.56±17.39 <sup>a</sup>
Triglyceride (mg/dl)	157.88±44.27	125.13±33.22	151.67±32.59	161.89±43.54
T-Cholesterol (mg/dl)	107.75±22.33	99.75±8.00	130.00±14.75 <sup>b</sup>	132.22±21.16 <sup>ab</sup>
GOT(U/L)	103.88±43.51	78.63±25.38	54.33±13.72 <sup>a</sup>	67.89±19.74
GPT(U/L)	25.63±5.88	28.88±6.64	20.50±2.74 <sup>b</sup>	21.22±2.77 <sup>b</sup>
Al-phospha (U/L)	225.50±46.46	225.63±12.61	193.83±46.08	234.89±78.80



Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students`two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

## 2. 아급성 독성

### 1. 임상관찰

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성 실험에서, 약침을 주입하고 관찰한 결과 운동성의 저하나 외부에 대한 반사작용은 떨어지지만 급성독성실험과 같이 심한 반응은 나타내지 않았다.(Table 4.)

Table 4. Clinical findings of rats treated with K-herbal-acupuncture 0.1cc in subacute toxicity test.(Dose of K-herbal-acupuncture:  $4 \times 10^{-4}$  ml/kg)

Clinical observation	Days after treatment							
	1	4	7	11	14	18	21	28
Tachypnea	0*	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	10	10	10	10	10	10	10	10
Opisthotonus	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	10	10	10	10	10	10	10	10
Ocular signs	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	10	10	10	10	10	10	10	10
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	0	0	0	0	0	0	0	0
others	0	0	0	0	0	0	0	0

※ Number of rat

## 2. 체중변화

아급성 독성실험에서 각 군의 체중변화는 대조군에 비하여 실험 개시 7일에서는 실험군 I 이, 14일에서 실험군 모두 유의한 체중 증가를 나타내었고, 실험 개시 28일에서는 실험군 모두 유의한 체중감소를 나타내었다.(Table 5.)

Table 5. Body weight of rats treated with K-herbal-acupuncture in subacute toxicity test.(unit :g)

GROUP	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Normal	220.44±9.36	256.92±10.32	280.95±34.68	320.62±15.02
Control	213.61±6.74	253.32±7.02	277.63±30.00	310.15±9.56
Treat I	221.80±6.83 <sup>b</sup>	261.89±8.73 <sup>b</sup>	288.20±12.55	291.25±15.02 <sup>ab</sup>
Treat II	214.29±7.29	260.80±7.10 <sup>b</sup>	287.58±6.12	291.50±3.38 <sup>ab</sup>

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test.(P<0.05)

### 3. 장기의 무게 측정

실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과 실험군 모두에서 정상군에 비하여 간의 무게가 유의한 감소를 나타내었다.(Table 6.)

Table 6. Absolute body weight and relative organ weights in rats treated intraperitoneally with K-herbal acupuncture in subacute toxicity test. (unit : %)

GROUP	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
Normal	3.99±0.18	0.37±0.02	0.23±0.02	0.44±0.07	0.70±0.02
Control	3.92±0.33	0.36±0.02	0.39±0.52	0.42±0.02	0.69±0.04
Treat I	3.61±0.19 <sup>a</sup>	0.35±0.03	0.20±0.13	0.43±0.02	0.72±0.04
Treat II	3.68±0.24 <sup>a</sup>	0.35±0.02	0.24±0.01	0.54±0.16	0.68±0.05

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

4. Complete blood count

아급성 독성실험에서 CBC를 측정된 결과 대조군에 비하여 실험군 I 은 RBC와 HCT의 유의한 감소와 MCHC의 유의한 증가를 나타내었고, 실험군 II는 HCT의 유의한 감소와 MCHC의 유의한 증가를 나타내었다.(Table 7.)

Table 7. Complete blood count values of treated intraperitoneally with K-herbal-acupuncture in subacute toxicity test.

GROUP CBC	Normal	Control	Treat - I	Treat - II
WBC( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8.85 $\pm$ 1.34	7.34 $\pm$ 1.76	7.07 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	7.65 $\pm$ 0.69
RB( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.37 $\pm$ 0.21	7.65 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	7.34 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	7.45 $\pm$ 0.30
HGB(g/dl)	14.88 $\pm$ 0.19	15.08 $\pm$ 0.39	14.90 $\pm$ 0.46	14.83 $\pm$ 0.40
HCT(%)	46.53 $\pm$ 1.17	47.75 $\pm$ 1.30	45.65 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	45.65 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup>
MCV(fL)	63.15 $\pm$ 1.24	62.39 $\pm$ 1.55	62.32 $\pm$ 1.19	59.65 $\pm$ 4.21
MCH(pg)	20.17 $\pm$ 0.44	19.71 $\pm$ 0.55	20.33 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	19.92 $\pm$ 0.31
MCHC(g/dl)	31.98 $\pm$ 0.59	31.58 $\pm$ 0.40	32.65 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	32.50 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>
PLT( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1012.00 $\pm$ 68.64	974.60 $\pm$ 292.05	972.50 $\pm$ 65.43	952.17 $\pm$ 112.18

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

RBC : Red blood cell

WBC : White blood cell

MCV : Mean corpuscular volume

MCH : Mean corpuscular hemoglobin

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration

5. 생화학 혈청검사

아급성 독성 실험에서 생화학 혈청검사를 측정된 결과 정상군과 대조군에 비하여 실험군 모두에서 Uric acid와 Triglyceride의 유의한 감소와, Glucose의 유의한 증가를 나타내었다. 또한 실험군 I 에서는 정상군과 대조군에 비하여 Total protein의 유의한 감소를, 대조군에 비해서는 GOT의 유의한 감소를 나타내었다. 실험군 II 에서는 정상군과 대조군에 비하여 GOT, GPT, 그리고 Alk-phosphatase의 유의한 감소를 나타내었고 Creatinine은 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.(Table 8.)

Table 8. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with K-herbal-acupuncture in subacute toxicity test.

GROUP	Normal	Control	Treat I	Treat II
Total Protein(g/dl)	6.14±0.19	6.24±0.18	5.85±0.18 <sup>ab</sup>	6.02±0.16
Albumin(g/dl)	3.67±0.23	3.89±0.14 <sup>a</sup>	3.80±0.08	3.79±0.12
BUN(mg/dl)	23.43±1.56	23.19±1.61	23.37±1.67	22.57±2.44
Creatinine(mg/dl)	0.62±0.01	0.62±0.03	0.67±0.15	0.64±0.01 <sup>a</sup>
Uric Acid(mg/dl)	2.47±0.23	2.47±0.37	1.77±0.20 <sup>a</sup>	1.53±0.20 <sup>ab</sup>
Glucose(mg/dl)	190.00±17.19	197.40±28.52	232.50±9.75 <sup>ab</sup>	234.33±26.54 <sup>ab</sup>
Triglyceride(mg/dl)	119.67±21.07	85.73±33.83 <sup>a</sup>	51.00±7.77 <sup>ab</sup>	54.00±21.08 <sup>ab</sup>
Total Cholesterol(mg/dl)	88.33±6.25	84.53±8.83	88.33±9.75	94.17±16.25
GOT(U/L)	139.67±18.81	135.80±18.92	115.00±21.91 <sup>b</sup>	88.17±17.13 <sup>ab</sup>
GPT(U/L)	55.33±0.52	54.60±3.83	55.67±7.74	48.33±5.43 <sup>ab</sup>
Alkaline phosphatase(U/L)	530.83±45.04	541.60±72.39	502.67±89.42	414.50±86.63 <sup>ab</sup>

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat I : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

Treat II : treated with K-herbal-acupuncture. (0.2 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

### 3. 항암 효과

#### 1. 생존율

sarcoma-180으로 복강암을 유발하여 30일 동안 생존율을 측정한 결과, 약침 0.1ml 처치의 경우 대조군은 median survival time이 19일, 실험군은 27.5일로 대조군에 비하여 44.74%의 생존 증가율을 나타내었다.(Table 9, Fig. 1) 약침을 0.2ml 처치의 경우는 암세포 주입 후 25일경에 10마리 중 6마리가 갑자기 폐사되어 생존증가율을 산출할 수 없었다.

Table 9. Survival time of the sarcoma-180 cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture

GROUP	Median survivaltime	ILS(%)a	
Control	19	0	
Treat	27.5	44.74	vs control

Control : treated with normal saline

Treat : treated with K-herbal-acupuncture (0.1 ml)

$$a : ILS : \text{Increase of Life Span} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

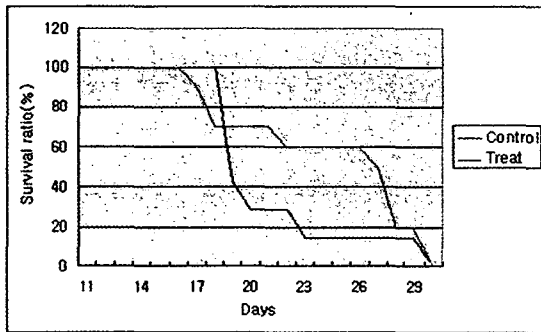


Fig. 1 Survival time of the sarcoma-180 cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture

2. NK 세포 활성화도

(1) B16F10 폐암

미정맥으로 B16F10 폐암을 전이시킨 C57BL/6계 mouse를 실험 14일째 도살하여 NK 세포의 활성도를 측정하였다. 검증 결과 정상군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때  $-154.57 \pm 48.68$ , 50:1일 때  $-112.25 \pm 36.68$ , 10:1일 때  $-239.72 \pm 66.63$ 을 나타내었으며, 대조군의 경우 100:1일 때  $26.81 \pm 3.72$ , 50:1일 때  $-7.88 \pm 2.82$ , 10:1일 때  $1.86 \pm 3.79$ 를 나타내었다. 실험군의 경우 100:1일 때  $151.93 \pm 9.50$ , 50:1일 때  $71.23 \pm 6.11$ , 10:1일 때  $123.99 \pm 2.77$ 을 나타내었다.(Table 10., Fig. 2)

따라서 실험군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1, 50:1 그리고 10:1 모두에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.( $p < 0.05$ )

Table 10. Natural killer cell activity of the B16F10 cell bearing C57BL/6 mice treated with K-herbal-acupuncture according to E/T Ratio.

GROUP	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	$-154.57 \pm 48.68$
	50:1	$-122.25 \pm 36.68$
	10:1	$-239.72 \pm 66.63$
Control	100:1	$26.81 \pm 3.72^a$
	50:1	$-7.88 \pm 2.82^a$
	10:1	$1.86 \pm 3.79^a$
Treat	100:1	$151.93 \pm 9.50^{ab}$
	50:1	$71.23 \pm 6.11^{ab}$
	10:1	$123.99 \pm 2.77^{ab}$

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat : treated with K-herbal-acupuncture (0.1 ml)

E/T ratio : Effector cell/Target cell

a : Control and treat group were compared with a normal group by students' two-tailed test. ( $P < 0.05$ )

b : Treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed test. ( $P < 0.05$ )

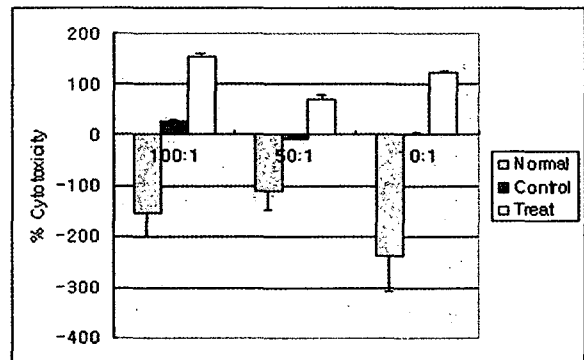


Fig. 2 Natural killer cell activity of the B16F10 cell bearing C57BL/6 mice treated with K-herbal-acupuncture according to E/T Ratio.

2) Sarcoma-180 복강암

Sarcoma-180으로 복강암을 유발시킨 ICR계 mouse를 실험 14일째 도살하여 NK 세포의 활성도를 측정하였

다. 검증결과 정상군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때  $-38.65 \pm 99.36$ , 50:1일 때  $-137.95 \pm 400.45$ , 10:1일 때  $-19.02 \pm 39.84$ 를 나타내었으며, 대조군의 경우 100:1일 때  $-26.09 \pm 134.82$ , 50:1일 때  $-4.66 \pm 23.66$ , 10:1일 때  $-14.62 \pm 21.73$ 을 나타내었다. 실험군의 경우 100:1일 때  $17.40 \pm 56.26$ , 50:1일 때  $41.94 \pm 63.73$ , 10:1일 때  $-19.92 \pm 18.03$ 을 나타내었다.(Table 11., Fig. 3) 그 결과 실험군은 정상군과 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Table 11. Natural killer cell activity of the Sarcoma-180 Cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture according to E/T Ratio.

GROUP	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	$-38.65 \pm 99.36$
	50:1	$-137.95 \pm 400.45$
	10:1	$-19.02 \pm 39.84$
Control	100:1	$26.09 \pm 134.82$
	50:1	$-4.66 \pm 23.66$
	10:1	$-14.62 \pm 21.73$
Treat	100:1	$17.40 \pm 56.26$
	50:1	$41.94 \pm 63.73$
	10:1	$-19.92 \pm 18.03$

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat : treated with K-herbal-acupuncture (0.1 ml)

E/T ratio : Effector cell/Target cell

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test. (P<0.05)

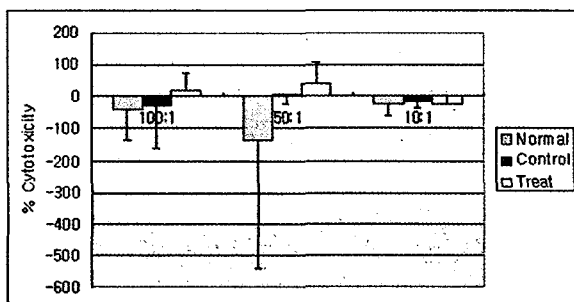


Fig. 3 Natural killer cell activity of the Sarcoma-180 cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture according to E/T Ratio.

### 3. Interleukin-2 양

#### 1) B16F10 폐암

미정맥으로 폐암을 전이시킨 C57BL/6계 mouse를 실험 14일째 도살하여 IL-2의 생산량을 측정된 결과 정상군은  $619.40 \pm 62.95$ pg/ml, 대조군은  $590.62 \pm 67.85$ pg/ml, 실험군은  $491.23 \pm 30.89$ pg/ml를 나타내어 대조군에 비해 실험군은 16.83%의 유의한 감소를 나타내었다. (Table 12., Fig. 4)

Table 12. Interleukin-2 Productivity of the B16F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with K-herbal-acupuncture.

GROUP	Interleukin-2	Va Control(%)
Normal	$619.40 \pm 62.95$	
Control	$590.62 \pm 62.85^a$	0
Treat	$491.23 \pm 30.89^{ab}$	-16.83

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students` two-tailed test.(P<0.05)

b : Treat groups were compared with a normal group by students` two-tailed test.(P<0.05)

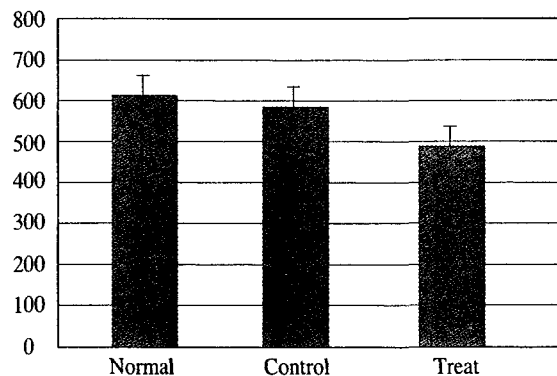


Fig. 4 Interleukin-2 productivity of the B16F10 cell bearing C57BL/6 mice treated with K-herbal-acupuncture.

2) Sarcoma-180 복강암

복강암을 유발시킨 ICR mouse를 실험 14일 째 도살하여 IL-2 생산량을 측정한 결과, 정상군은 1315.58±244.32pg/ml, 대조군은 567.63±193.86pg/ml, 실험군은 484.43±90.16pg/ml로 측정되어 대조군에 비하여 실험군이 14.66%의 유의한 감소를 나타내었다.(Table 13, Fig. 5)

Table 13. Interleukin-2 productivity of the Sarcoma-180 cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture.

GROUP	Interleukin-2	Va Control(%)
Normal	1315.58±244.32	
Control	567.63±193.86 <sup>a</sup>	0
Treat	484.43±90.16 <sup>ab</sup>	-14.66

Normal : Non-treated group.

Control : treated with normal saline.

Treat : treated with K-herbal-acupuncture. (0.1 ml)

a : Control and treat group were compared with a normal group by students' two-tailed test. (P<0.05)

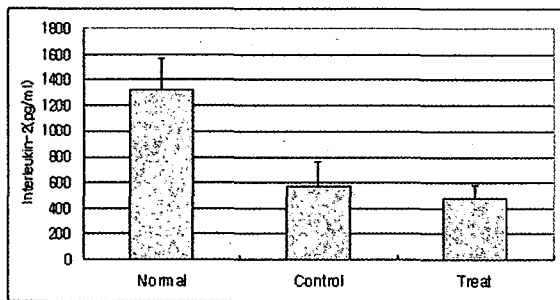


Fig. 5. Interleukin-2 productivity of the Sarcoma-180 cell bearing ICR mice treated with K-herbal-acupuncture.

4. B16F10 폐암에서 전이암의 군집 관찰

B16F10 세포를 C57BL/6 mouse의 미정맥으로 주입하여 폐전이암을 일으켜 실험 7일째와 14일째 도살한 후 폐를 육안적으로 관찰한 결과, 실험 7일째의 경우는 모든 군에서 육안적 관찰로 전이암을 볼 수 없었으나

14일째의 경우는 모든 군에서 전이암을 관찰할 수 있었다. 실험군에서는 전이암의 크기와 그 수가 대조군에 비하여 큼을 볼 수 있었다. (Fig. 6)

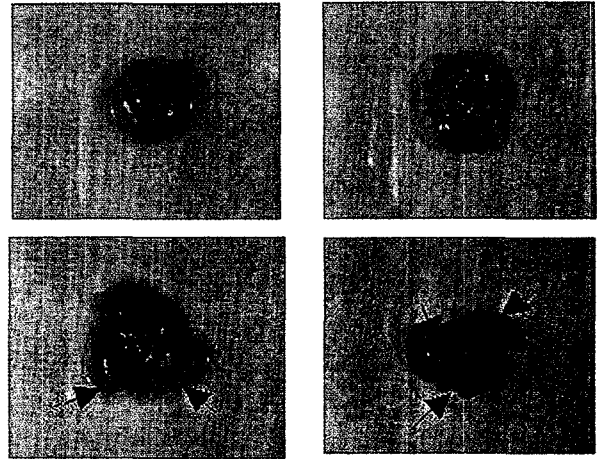


Fig. 6 Representative photographs showing melanoma metastasized in the lung of C57BL/6 mice. The photographs of lung treated at 7th days showed non Melanoma metastasized(A: Control, B: Treat). But the photographs of lung treated at 14th days showed Melanoma metastasized (arrowheads) and the group treated with the K-herbal-acupuncture showed more Melanoma than the control in the numbers and volume.(C: Control, D: Treat)

IV. 考 察

서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐만 아니라 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의되어 있다.<sup>1)</sup> 종양에 대한 치료법은 예방적인 면에서 일차적으로 생활 습관의 개선, 화학 예방이 될 수 있으며 이차 예방은 조기 진단을 들 수 있다.<sup>2)</sup> 진행된 암의 치료방법으로는 외과적 수술요법, 방사선요법, 약물요법, 항화학요법, 면역요법, 호르몬 요법 및 골수나 조혈모세포의 이식 등의 유전자 치료방법들이 있으나<sup>3)</sup> 만족할만한 치료효과는 얻지 못하고 있는 실정이다.<sup>4)</sup>

종양은 內經<sup>5)</sup>에서 石瘕, 腸癰, 骨疽, 肉疽, 積聚, 瘤 등으로 표기하고 있으며 韓醫學의 腫瘍 治療法은 扶正法, 祛邪法, 扶正祛邪法의 3種類로 크게 大別된다.<sup>6,17)</sup>

약침요법은 경락학설의 원리에 의거하여 한약재를 선택하여 유관한 혈위, 압통점 및 양성 반응점에 주입하여 자침과 약물작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 신침요법이다.<sup>7)</sup>

최근 여러 가지 약침에 대한 항암작용과 면역효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 金<sup>18)</sup>의 人蔘水鍼, 權<sup>19)</sup>의 蜂藥鍼, 李<sup>20)</sup>의 四君子湯 및 四物湯 藥鍼, 金<sup>21)</sup>의 金銀花 藥鍼, 金<sup>22)</sup>의 全蝎 藥鍼, 朴<sup>23)</sup>의 益智仁 藥鍼, 李<sup>24)</sup>의 兎絲子 藥鍼, 배<sup>25)</sup>의 魚腥草 藥鍼, 安<sup>9)</sup>의 紅花 藥鍼 등 많은 약침제제에 대한 抗癌效果和 免疫作用에 대한 연구보고가 보고되고 있으나, 이러한 연구 결과는 실험실 환경에서 진행된 것으로 실제 암 환자의 치료에 적용하여 효과를 인정받기까지는 앞으로 많은 연구가 선행되어야 할 것으로 사려된다.

최근 한의학계에서도 암 환자의 치료에 적극적으로 도전하고 있는 한의사들이 있고 또한 우수한 치료효과를 얻는 경우가 종종 보고되고 있다. 그 중 특정 약침요법(K-약침)이 암 치료에 효과가 있다는 주장이 있어<sup>12)</sup> 이에 대한 검증차원에서 본 연구는 시도되었다. 따라서 먼저 독성에 대한 유무와 강도를 평가하기 위해 '의약품 독성시험 기준'<sup>13)</sup>에 의거하여 K-약침(K-herbal-acupuncture)의 급성·아급성 독성실험을 시행하였고, 항암효과를 알아보기 위하여 Sarcoma-180 복강암 및 B16F10 폐암을 이용한 동물실험을 시행하였다.

그 중 독성실험은 의약품 등의 시험물질 안전성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다.<sup>26)</sup> 독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로<sup>13)</sup>, 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아급성 독성실험(1개월 반복투여 독성시험), 그리고 만성독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나누는데, 본 실험에서는 급성 독성실험과 아급성 독성실험을 시행하였다.

급성 독성실험에서는 LD<sub>50</sub>(반수치사량 측정)을 측정하기 위해 실험군에 약침을 다양한 농도로 조제하여 Balb/c mouse에 0.1ml, 0.2ml씩 주입 후 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다. K-약침은 임상적으로도 매우 독성이 강해 base oil과 희석하여 사용되므로, 부작용이나 독성이 거의 없다고 보고된 호도약침을<sup>14)</sup> base oil로 하여 4:100, 1:100, 1:200, 1:1000,

1:2000으로 희석한 후, 주사기에 0.1ml, 0.2ml로 준비하여 시술한 결과 4:100, 1:100, 1:200 시술군에서는 모든 개체가 24시간 이내에 사망하였고, 1:1000 0.1ml 시술군에서는 10마리 중 2마리가 생존하였으며, 1:2000에서는 사망하는 개체가 발견되지 않았다.

따라서 K-약침의 LD<sub>50</sub>은 4×10<sup>-3</sup>ml/kg~2×10<sup>-3</sup>ml/kg으로 추정할 수 있었으며, 이는 기존의 약침과 비교되지 않을 만큼 매우 독성이 강함을 알 수 있었다.

급성 독성의 임상 관찰을 위해서 K-약침을 2×10<sup>-3</sup> ml/kg으로 Balb/c mouse에 주입한 후, 실험 첫날부터 7일간 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 시행한 결과, 약침 시술 후 대부분의 실험군은 즉시 현저한 운동성의 저하가 나타나고 외부에 대한 반사작용도 떨어지며 움직이지 않고 있다가 1-12시간 내에 사망하는 경우가 많았다.(Table 1.) 24시간 이후에 사망하는 개체에서는 시술부위 주위의 털이 빠지거나 피부색의 변화가 관찰되었다. 또한 체중변화를 실험 전과 실험 후에 측정한 결과 실험군 모두가 유의하게 증가하였다.(Table 2.) 혈청학적 변화를 관찰하기 위하여 생화학 혈청검사를 시행한 결과, 대조군에 비하여 실험군 모두 BUN과 GPT의 유의한 감소를, Total cholesterol의 유의한 증가를 나타내었다.(Table 3.)

Sprague-Dawley rat을 이용한 아급성 독성실험은 매주 2회씩 4주 동안 약침을 4×10<sup>-4</sup> ml/kg씩 주입하여 실험 첫날부터 4주간 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 시행한 결과 실험군 모두 급성독성과 같이 반응이 뚜렷하지는 않았지만 역시 운동성의 저하와 반사작용의 둔화가 관찰되었다.(Table 4.) 또한 체중의 변화를 측정한 결과 실험개시 7일째에는 실험군 I에서, 14일째에는 실험군 모두에서 체중의 증가를 나타내었으나 28일째에는 실험군 모두 유의한 체중감소를 나타내었다.(Table 5.)

아급성 독성실험에서 장기의 무게를 측정한 결과 실험군 모두 간의 무게는 유의한 감소를 나타내었다.

아급성 독성실험에서 CBC를 측정한 결과 대조군에 비하여 실험군 I은 RBC와 HCT의 유의한 감소와 MCHC의 유의한 증가를 나타내었고, 실험군 II는 HCT의 유의한 감소와 MCHC의 유의한 증가를 나타내었다.(Table 7.)

아급성 독성 실험에서 생화학 혈청검사를 측정한 결과 정상군과 대조군에 비하여 실험군 모두에서 Uric



acid와 Triglyceride의 유의한 감소와, Glucose의 유의한 증가를 나타내었다. 또한 실험군 I에서는 정상군과 대조군에 비하여 Total protein의 유의한 감소를, 대조군에 비해서는 GOT의 유의한 감소를 나타내었다. 실험군 II에서는 정상군과 대조군에 비하여 GOT, GPT, 그리고 Alk-phosphatase의 유의한 감소를 나타내었고 Creatinine은 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.(Table 8.)

상기 내용을 종합해 볼 때 실험군에서 HCT, Uric acid와 Triglyceride의 유의한 감소 등이 나타나고 간 실질의 무게가 감소한 것으로 보아 K-약침의 주입이 간 실질의 손상을 유발할 수 있음을 추정할 수 있었다.

K-약침이 항암능과 면역기능계에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 복강 내에 주입하여 복강암을 유발한 후, 생존율과 NK세포의 독성능, 그리고 IL-2의 생산능을 측정하였고, 암의 육안적 관찰과 특정암에 유효성을 간과하지 않기 위해 B16F10 폐암세포를 mouse의 미정맥에 주입하여 폐암을 유발한 후, 생존율과 NK세포의 독성능, 그리고 IL-2의 생산능을 측정하였고, 또한 개 복하여 관찰을 시행하였다.

이중 NK cell은 주요 조직적 복합체(Major Histocompatibility Complex : MHC)의 제한현상도 없고, 항원 특이성도 없이 일부 암세포와 바이러스 감염 세포에 대하여 세포독성을 나타내는 일반적으로 자연 세포독성세포(NK cell : natural killer cell)라고 하고, 이는 일종의 자연면역 기능을 보이는 세포이다.<sup>20)</sup>

IL-2는 1976년 Morgan<sup>28)</sup>등이 mitogen으로 자극시킨 사람 말초혈 림프구(PBL) 배양 상청에 T 림프구의 장기 배양을 가능케 하는 활성의 존재를 발견하고 T 림프구 증식인자(T cell growth factor : TCGF)로 칭하였다. 현재는 IL-2로 명명된 것으로 B 세포, Natural killer cell(NK 세포)에도 작용하는 것이 밝혀졌고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 종양의 치료에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을 하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다.<sup>2)</sup> IL-2는 각종 cytokine을 생산하는 helper T 세포 증식을 촉진하는 것으로 면역응답능을 제어한다고 한다. 따라서 사람 말초혈중 IL-2 활성 측정이나 림프구의 IL-2생산능을 검토하는 것은 helper T 세포기능을 검토할 뿐만 아니라 각 개체에 있어서 면역응답능의 전모를 추측하여 질환을 상세하

게 해석하기 위하여 유력한 수단이 되는 것이다.<sup>29)</sup>

Sarcoma-180 세포를 ICR의 복강에 주입 한 후, 30일 동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰한 결과, 대조군은 median survival time이 19일, 실험군은 27.5일로 대조군에 비하여 44.74%의 생존 증가율을 나타내었다.(Table 9., Fig. 1) 실험과정에서 특이하게 관찰된 것은 대조군에 비하여 실험군의 활동성이 상대적으로 활발하였다는 것이다. 이는 아마도 암세포에 의해 발생하는 통증이 어느 정도 약침자극에 의해 조절되어서 실험군의 움직임이 활발한 것이 아닌가 추정하고 있다.

미정맥으로 B16F10 폐암을 전이시킨 후 NK 세포의 활성도를 측정한 결과 실험군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1, 50:1 그리고 10:1 모두에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.(Table 10., Fig. 2)

Sarcoma-180으로 복강암을 유발시킨 후 NK 세포의 활성도를 측정한 결과 실험군은 정상군과 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 11., Fig. 3)

이러한 결과는 K-약침이 다양한 암에 따라 효과나 작용기전이 다를 수 있음을 의미하는 것으로 추정할 수 있었다.

미정맥으로 폐암을 전이시킨 후 IL-2의 생산량을 측정한 결과 대조군에 비해 실험군은 16.83%의 유의한 감소를 나타내었고(Table 12., Fig. 4) 복강암에서도 대조군에 비하여 실험군이 14.66%의 유의한 감소를 나타내는 유사한 결과를 나타내었다.(Table 13., Fig. 5)

이는 K-약침이 주입되면 어느 정도 면역억제작용이 발생함을 알 수 있고, 또한 장기의 육안적 관찰에서 실험군의 비장 조직이 정상군에 비해 약간 변색된 것과 어떤 연관성이 있지 않을까 추정할 수 있었다. 전이암의 육안적 관찰에서는 폐 전이암에서 실험군이 대조군에 비해 전이암의 수나 용적이 더 커짐을 확인할 수 있었다.(Fig. 6)

이상의 실험 결과를 종합해 보면, K-약침은 매우 독성이 강하여 과용하면 치명적인 부작용을 유발할 수 있고, 장기적으로 시술시에는 간 실질에 어느 정도 손상을 줄 수 있다고 여겨진다. 그리고 약간의 면역억제 작용이 있으나 암세포에 특이적으로 작용하는 부분이 있고 이는 암의 종류에 따라 작용의 정도가 다를 수 있다고 추정된다.

또한 어느 정도 암으로 인해 발생하는 통증을 억제하고 활동성을 증가시키며 생존기간을 증가시키는 효과가 있지만 암세포의 파괴나 성장억제는 이루어지지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 실제 임상에서 암세포를 배출시키기 위해 뜸 요법을 병행하고 있으나 실험상의 어려움으로 적용하지 못하여 아쉬운 부분이 있다. 따라서 보다 발전적인 결과를 위해서는 향후 지속적인 연구가 진행되어야 하리라고 생각한다.

## V. 結 論

K-약침의 독성을 규명하기 위하여 급성・아급성 독성실험을 시행하고, 항암효과를 관찰하기 위해 Sarcoma-180 복강암 및 B16F10 폐암을 유발하여 생존율, NK cell 활성화도 및 IL-2양을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>은 4×10<sup>-3</sup>ml/kg~2×10<sup>-3</sup> ml/kg으로 추정할 수 있었으며, 이는 기존의 약침에 비해 매우 독성이 강함을 알 수 있었다.

2. 급성 독성실험에서 실험군의 현저한 운동성과 반사작용의 저하가 관찰되었으며 체중은 유의한 증가를 나타내었다.

3. 급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, 대조군에 비하여 실험군 모두 BUN과 GPT의 유의한 감소를, Total cholesterol의 유의한 증가를 나타내었다.

4. 아급성 독성실험에서 임상관찰과 체중측정을 시행한 결과, 실험군 모두 약간의 운동성과 반사작용의 저하가 관찰되었으며, 체중은 초기에는 증가하였으나 실험개시 28일째에는 유의한 감소를 나타내었다.

5. 아급성 독성실험에서 장기의 무게를 측정된 결과 실험군 모두 간의 무게가 유의하게 감소하였다.

6. 아급성 독성실험에서 CBC를 측정된 결과 실험군 모두 HCT의 유의한 감소와 MCHC의 유의한 증가를 나타내었다.

7. 아급성 독성실험의 생화학 혈청검사에서는 정상군과 대조군에 비하여 실험군 모두에서 Uric acid와 Triglyceride의 유의한 감소와, Glucose의 유의한 증가를 나타내었다. 또한 실험군 I에서는 Total protein과 GOT의 유의한 감소를, 실험군 II에서는 GOT, GPT, 그리고 Alk-phosphatase의 유의한 감소를 나타내었다.

8. Sarcoma-180 복강암에서 생존율을 측정된 결과, 실험군이 대조군에 비하여 44.74%의 생존 증가율을 나타내었고 움직임도 상대적으로 활발하였다.

9. NK cell 활성화도를 측정된 결과 B16F10 폐암에서는 유의한 증가를, Sarcoma-180 복강암에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

10. Interleukin-2의 생산능 측정 결과 폐암과 복강암 모두 유의한 감소를 나타내었다.

11. 전이암의 육안적 관찰에서는 폐전이암에서 실험군이 대조군에 비해 전이암의 수나 용적이 더 커짐을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 K-약침은 독성이 매우 강하고 특히 간독성을 일으킬 수 있으나 특이적으로 암세포에 작용하여 통증을 억제하고 생존률을 증가시키는 효과가 있다고 추정된다.

## 參考文獻

1. 김진복. 암면역학과 면역요법. 대한면역학회지, Vol 8, No.1 . pp73-83. 1986.
2. 서울대학교 의과대학, 종양학, 서울대학교 출판부, 서울, pp1-3, 137-143, 225-234. 1992.
3. 전국의과대학교수 역, Current Medical Diagnosis and Treatment, 도서출판 한우리, 서울, pp69-107, 1999.
4. 이영숙, 21세기 의학혁명 암은 정복된다. 제이프로, p50, 2000.
5. 楊維傑 編, 황제내경 소문영추해석, 정보사, 서울, p41, 45, 97, 168, 243, 295-296, 407, 447, 469, 473, 577.

- 1980.
6. 崔昇勳, 東醫腫瘍學, 杏林書院, 서울, pp13-42, 1995.
  7. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, pp.13-14, 112-118, 138-203, 1999.
  8. 이선구 외, 호도약침의 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 5, No.1, pp43-52, 2002. 6.
  9. 안창석 외, 홍화자약침의 급성·아급성 독성 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 5, No.1, pp7-26, 2002. 6.
  10. 유창길 외, 파두약침의 급성·아급성 독성 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 5, No.1, pp27-42, 2002. 6.
  11. 김옥 외, 행인약침의 급성·아급성 독성 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 5, No.1, pp61-80, 2002. 6.
  12. 박치완, 말기암을 다스린 면역약침이야기, 밀알출판사, 2001. 10.
  13. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제 98-116호. 1998.12
  14. 강계성 외, 호도약침의 급성·아급성 독성에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 4, No.3, pp85-92, 2001. 12.
  15. R. I. Geran, N. H. Greenberg, M. M. Macdinald, A. M. Schumacher, and B. J. Abbot : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against Animal Tumors and other Biological system(3rd Edition), Cancer chemotherapy Reports, pp.48-59, 1972.
  16. 田炳旭 外, 암종의 병인병리에 관한 문헌적 고찰. 대한한방중앙 학회지. Vol. 9, No. 2, pp33-44, 1988.
  17. 賈堃(申天浩 編譯) : 癌瘤防治研究, 成輔社, 서울, pp.25~27, 1984.
  18. 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, Vol. 9, No. 2, pp33-44, 1988.
  19. 權奇祿 外, 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 亢癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol. 14, No. 2, pp151-172, 1997.
  20. 李秉烈, 四君子湯 및 四物湯 藥鍼이 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol. 18, No. 1, pp357-374, 1997.
  21. 金중완, 金銀花 藥鍼液이 亢癌 및 癌豫防 效果에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol. 16, No. 2, pp261-284, 1999.
  22. 金소형, 전갈 약침액의 항돌연변이 및 항암효과. 大韓韓醫學會誌, Vol. 17, No. 3, pp151-167, 2000.
  23. 朴祥鎔, 益智仁 藥鍼이 亢癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, Vol. 18, No. 3, pp79-93, 2001.
  24. 이재복, 兔絲子藥鍼이 亢癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌. Vol. 18. No. 3. pp94-104. 2001.
  25. 배원형 외, 魚腥草藥鍼이 B16 흑색종 癌모델에 對한 亢腫瘍效果 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol. 18, No. 1, pp186-201, 2001.
  26. 金양강, 독성학, 동화기술, 서울, pp15-18, 1994.
  27. 金세중, 면역학, 고려의학, 서울, pp.134-136, 1994.
  28. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC : Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. Science 1976 ; 193:1007-1008.
  29. 이귀녕 외, 임상병리파일(제3판), 의학문화사, 서울, pp722-724, 2000.