

원저

A549 폐암세포와 Sarcoma-180 복강암에 대한 紅蔘 蒸溜藥鍼의 영향에 關한 實驗的 研究

원승환 · 권기록 · 이선구

An Experimental Study on Effects of Distilled Red-ginseng Herbal Acupuncture on A549 human epithelial lung cancer cell *in vitro* and implanted Sarcoma-180

Seung Hwan · Won* · Ki-Rok, Kwon* · Sun-Gu, Lee**

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

** Department of Pathology, Oriental Medical College, Sangji University

Abstract

Objectives : In order to investigate effects and immune improvement of distilled red-ginseng herbal Acupuncture, expression of Cox-1, Cox-2, and mRNA of Bcl-2 and Bax were analyzed in A549 cell *in vivo*. Survival time and expression of cytokine mRNA were measured for the mice with Sarcoma-180 induced abdominal cancer.

Methods : Balb/c mouse was treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) and Chung- wan(CV₁₂) to investigate anti-cancer effects and immune response.

Results :

1. For expression of mRNA of Cox-1 using RT-PCR, the control group and the experiment groups didn't show significant differences. For Cox-2, both experiment groups and the normal group showed significant decrease.
2. For expression of mRNA of Bcl-2 using RT-PCR, experiment groups showed slight decrease compared to the control group. For Bax, no significant changes were shown between the control group and experiment groups.
3. For survival time, all of experiment groups showed 11.1% increase compared to the control group.
4. For IL-2 and IL-4 productivity using Flow cytometry, all of experiment groups didn't show any significance.
5. For IL-2 productivity using ELISA, all of experiment groups didn't show any significance.
6. For expression of cytokine mRNA using RT-PCR, significant increase of IL-2 and IL-4 were witnessed in the experiment group II compared to the control group. Significant increase of IL-10 was shown in all of experiment groups compared to the control group.

Conclusion : According to the results, we can expect that distilled red-ginseng Herbal Acupuncture may be further effects in anti-cancer and immune improvement if increasing concentration.

Key words : Distilled red-ginseng, Herbal Acupuncture, A549 human epithelial lung cancer cell, Sarcoma-180 cancer cell, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , Cytokine mRNA.

1. 緒 論

인삼은 오가피나무과(Araliaceae)의 인삼속(Panax)에

속하는 다년생 음지성 속근초로서 한국과 중국을 비롯한 동아시아로부터 시베리아 동부 및 북미에 걸쳐 분포하고 있다¹⁾.

효능은 大補元氣, 固脫生津, 安精神, 除邪氣하여 勞傷虛損, 食少倦怠 등에 광범위하게 사용되는 滋補強壯 흥분제이다²⁾.

홍삼은 6년동안 재배한 수삼을 蒸蔘, 건조 등의 과정을 거쳐 수분량이 12.5-13.5%가 되도록 가공한 인삼제품을 말한다³⁾.

藥鍼療法은 鍼灸, 經絡이론과 本草이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 제조하여 經穴이나 壓痛點에 주입하여 刺鍼과 약물작용을 통하여 疾病을 치료하는 新鍼療法이다⁴⁾.

홍삼과 관련된 논문의 연구 유형은 金 등⁵⁾의 항산화 연구, 金 등⁶⁾의 당뇨병에 관한 연구, 紅蔘의 면역활성 및 항암효과에 관한 연구로는 張⁷⁾, 金⁸⁾, 梁⁹⁾, 황 등¹⁰⁾의 보고가 있었다.

최근 분자유전학적으로 종양의 발생 및 성장은 세포의 고유한 증식과 세포 사멸의 조절기전이 소실됨의 결과라는 개념이 정립되면서 이에 관계하는 원형 발암 유전자(proto-oncogene) 및 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)의 존재와 역할이 계속 밝혀지고 있다. 특히, p53 유전자, bcl-2 유전자 및 bax 유전자는 apoptosis에 관여하는 중요한 인자로서 이들의 변이 또는 그 단백질의 과발현에 대한 연구가 최근 종양학에서 활발하게 연구되고 있다¹¹⁾.

본 연구는 증류추출식 홍삼약침의 항암효과와 면역능을 알아보기 위하여 시험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 홍삼약침을 처리한 후 RT-PCR을 이용한 Cox-1, Cox-2, Bcl-2, Bax의 mRNA 발현을 관찰하였고, Sarcoma-180으로 mouse에 복강암을 유발한 후 홍삼약침을 처리하여 생존율, IL-2, IL-4 및 RT-PCR을 이용한 Cytokine mRNA 발현을 관찰한 결과 유의한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 동물 및 재료

1) 동물

생존율과 항암능 측정을 위하여 4주령된 체중 20g±3g 내외의 Balb/c계 웅성 mouse를 사용하였고, 사용된 동물은 대한바이오링크에서 구입하여 2주 동안 고형사

료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 생존율은 대조군, 실험군 I, II 모두 각 10마리를 한 군으로 하였고, 그 밖의 항암 및 면역능 실험은 대조군, 실험군 I, II 모두 6마리를 한 군으로 하였다.

2) 재료

• 홍삼증류약침의 조제⁴⁾

실험에 사용한 홍삼은 한국담배인삼공사 제품을 구입하여 사용하였다. 먼저 홍삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후 증류수와 배합하여 2시간 가량 전탕한 후 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 홍삼 100g으로 1000ml의 약침액을 얻었다. 얻어진 약침액을 0.45µm, 0.2µm 여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다<Fig. 1>.

• 약침기

30gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 방법

1) A549 human epithelial lung cancer cell *in vitro*

① Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

가. 배지의 구성

• 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(100,000units/ml) 1ml, streptomycine (100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정된 후 pH를 7.2로 맞추고 0.22µm disposable sterile bottle top filter(Corning, U.S.A.)로 여과하여 기본배지로 사용하였다.

• 혼합배지의 준비

FBS(fetal bovine serum, Gibco, U.S.A.)를 56°C에서 30분간 inactivation시킨 후 RPMI 1640 기본배지에 10%의

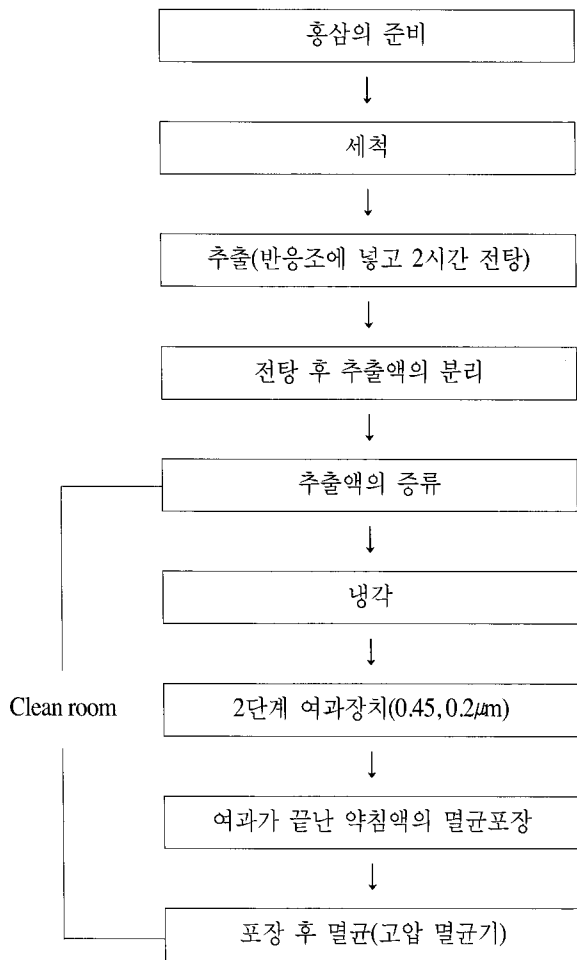


Fig. 1 Manufacturing process of distilled red-ginseng Herbal Acupuncture.

농도가 되도록 조정하여 사용하였으며(이하 혼합배지라 칭함), 이는 암세포의 배양전반에 사용되었다.

나. 암세포의 배양

• A549 human epithelial lung cancer cells

암 세포주는 한국세포주은행(KCLB 10185, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태로 분양받아 이를 녹인 후 혼합배지에 부유시켜 5% CO₂ 배양기(Jouan IGO-150A, France)안에서 배양시킨 후 실험에 사용하였다.

2) Sarcoma-180 복강암

① 약침의 시술

• 생존율 실험

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10⁶cells/ml로 조정하여 mouse의 복강에 주입한 후 복강암을 유발하였다. 실험군은 대조군과 실험군 I, II(홍삼약침군)로 분류하여 매일(1회/1일) 中脘에 0.1ml의 생리식염수를 주입한 대조군, 0.1ml의 홍삼 증류 약침액을 胃脘에 주입한 실험군 I, 그리고 0.1ml의 홍삼 증류 약침액을 中脘에 주입한 실험군 II의 생존여부를 관찰하였다.

• Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역능 측정

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5×10⁶cells/ml로 조정된 후 생쥐의 복강에 0.2ml를 주입하여 암을 유발한 후 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

② 암세포의 배양

가. 배지의 구성

• 기본배지의 준비

A549 human epithelial lung cancer cells 실험과 동일하게 준비하였다.

• 혼합배지의 준비

A549 human epithelial lung cancer cells 실험과 동일하게 준비하였다.

나. 암세포의 배양

Balb/c계 생쥐에 복강암을 유발시키기 위한 암 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태의 sarcoma-180 세포주를 분양받아 이를 녹인 후 혼합배지에 부유시켜 5% CO₂ 배양기(Jouan IGO-150A, France)안에서 배양시킨 후 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

다. 암세포 유발

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로

2회 원심세척한 후 2.5×10^6 cells/ml로 조정하여 대조군과 홍삼약침군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 복강암을 유발시켜 30일 동안 생존율을 측정하였다.

IL-2, IL-4 및 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현유무 측정의 경우는 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5×10^6 cells/ml로 조정한 후 생쥐의 복강에 0.2ml를 주입한 후 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

3. 측정항목

1) A549 human epithelial lung cancer cell에 대한 영향

① Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

• Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같이 A549 세포로부터 total RNA를 추출하였다.

A549 세포 1×10^7 를 1ml의 lysis buffer를 넣고 세게 흔들어 준 다음 얼음에 5분간 방치하였다가 0.4배의 chloroform를 첨가하고 다시 얼음에 5분간 방치한 후 14,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 여기에 동량의 phenol:chloroform(5:1) (Sigma, USA)를 넣고 다시 원심분리하여 새 튜브에 상층액을 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣고 -20°C 에서 1시간 방치한 후 다시 원심분리하였다. Pellet에 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에 용해시켜 UV spectrophotometer(Hitachi, Japan)로 260과 280nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 정량하였다.

• Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction

A549 세포로부터 분리한 total RNA $2\mu\text{g}$ 에 oligo-(dT) 15mer(Promega, USA) 10pmol를 첨가한 후 여기에 PCR 완충용액, AMY reverse transcriptase 20U, RNasin 10U 그리고 2mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNA-free water로 최종부피를 $20\mu\text{l}$ 로 조정한 후 57°C 에서 10분, 42°C 에서 60분간 반응시킨 후 cDNA를 만들었으며 95°C 에서 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 차후 PCR 실험에 사용하기 위하여 -20°C 에 보관하였다.

준비된 cDNA를 주형으로 <Table 1>에 예시되어있는

Table 1. Specific primers for Cox-1, Cox-2 and Bcl-2, Bax

Name (Product size)		primer
Cox-1 (303 bp)	forward	5' -TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3'
	reverse	5' -GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'
Cox-2 (305 bp)	forward	5' -TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'
	reverse	5' -AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'
Bax (205 bp)	forward	5' -GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC-3'
	reverse	5' -TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA-3'
Bcl-2 (318 bp)	forward	5' -CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3'
	reverse	5' -AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'

primer를 사용하였으며 cDNA $2\mu\text{l}$, dNTP $200\mu\text{M}$, primer 300nM , MgCl_2 2mM , reaction buffer(10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U를 섞어 최종부피가 $40\mu\text{l}$ 가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. PCR반응은 thermocycler에서 $94^\circ\text{C}/2\text{min}$ (1회), $94^\circ\text{C}/1\text{min}$ (1회), annealing(1회, Cox-1, 65°C ; Cox-2, 55°C ; Bcl-2, 65°C ; Bax, 59°C) 그리고 $72^\circ\text{C}/1\text{min}$ (1회)를 40회 반복하였고, 마지막 신장반응을 72°C 에 1회 수행하였다. PCR products를 확인하기 위하여 ethidium bromide(0.5mg/ml)가 포함된 agarose(2%)를 TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer (pH 8.3)에 녹여 사용하였으며, 시료 $5\mu\text{l}$ 와 $3\mu\text{l}$ loading

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

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

- X: 생존수가 전체동물의 1/2이 되는 최초의 시간(day)
- Y: 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(day)
- T: 실험군의 median survival time(day)
- C: 대조군의 median survival time(day)

buffer(6x ; Sambrook 등, 1989)를 gel에 주입하여 100V로 30분간 전기영동하였다. 전기영동 끝난 gel을 UV transilluminator(Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)을 사용하여 자외선 조명 하에서 촬영하였다. 이때 사용한 Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax 유전자의 specific primer는 다음과 같다<Table 1>.

2) Sarcoma-180에 대한 항암 및 면역능

① 생존율

생리식염수를 中腕혈에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한 군(이하 control 군)과 홍삼 증류 약침액을 胃俞에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한 군(이하 실험군 I)과 中腕에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한 군(이하 실험군 II)에 대하여 30일 동안 생존여부를 비교 관찰하였다.

• 측정 방법

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 실험군의 복강에 5×10^6 cells/0.2ml를 주입하여 30일 동안 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존율 계산에서 제외하였다. Geran 등¹²⁾이 기술한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

• 비장 세포의 준비

생쥐를 경추탈골로 치사시킨 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 shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤 $10 \times \text{HBSS}$ (Gibco, U.S.A.)로 2회 세척하고 기본배지로 한 번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재 부유하였다.

② Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4 생산량

마우스의 비장세포를 추출한 후 Interleukin-2(이하 IL-

2라 칭함), Interleukin-4(이하 IL-4라 칭함)를 Flow cytometry(Beckton Dickinson, USA)를 통하여 측정하였다. 추출한 splenocyte를 1×10^6 cells/ml로 조정된 후 brefeldin A(eBioscience, USA)를 1 μ /ml의 농도로 넣고 5% CO₂와 95% air의 배양기에서 3시간 배양하였다.

배양 후 세포를 500 \times g, 10°C로 5분간 2회 원심 분리하여 얻은 세포에 1ml의 staining buffer(0.15M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3)와 250 μ l의 BD Cytotfix/Cytoperm (BD bioscience, USA)를 넣고 4°C에서 20분 동안 배양하며 세포를 고정하였다.

고정이 끝난 후 2ml의 BD Perm/Wash solution(BD bioscience, USA)로 세척 하고 500 \times g로 5분간 원심 분리하였다. 이후에 100 μ l의 BD Perm/Wash solution에 고정된 세포에 2 μ l의 PE-con jugated anti-IL-2 antibody, PE-conjugated anti-IL-4 anti body를 각각 넣고 4°C에서 30분간 배양하였다.

그 후 BD Perm/Wash solution을 넣고 500 \times g로 5분간 원심 분리한 후 다시 500 μ l PBS/2% paraformaldehyde solution에 넣은 후 Flow cytometry(Beckton Dickinson, USA)로 측정하였다.

③ ELISA를 이용한 Interleukin-2 생산량

IL-2 측정은 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 plate reagent 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well 에 50 μ l 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l씩 첨가 후 37°C Incubator(Jouan IGO-150A, France)에서 1시간 동안 반응하였다. 반응 후 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응하였다. 반응을 멈추기 위해 0.18M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550nm에 측정하였다.

Sarcoma-180 세포를 Balb/c계 생쥐에 주입하고 14일째에 생쥐를 치사하여 비장을 적출하였다. 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 5×10^6 cells/ml의 농도로 재부유한 후, 여기에 concanavalin- A(Sigma, U.S.A.)를 100 μ g/ml의 농도로 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 IL-2의 생산량

을 측정하였다.

Mouse의 IL-2 생산량 측정은 Quantikine M ELISA Kit(R&D system, U.S.A.)를 이용하였다. 이 ELISA Kit는 sandwich enzyme immunoassay technique를 이용하는 것으로, micro plate에 pre-coated된 정제된 polyclonal antibody에 시료를 처리하여 결합시킨 후 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 Standard sample의 표준곡선으로부터 시료의 IL-2양을 계산하는 방법으로 모든 과정은 제조회사의 지침을 따랐다. 96 well microtiter plate의 각 well에 50µl의 Assay Diluent를 넣고, 다시 Standard, Control, 시료를 각 well에 50µl씩 분주하고 1분 정도 tapping하고 plate cover로 덮은 후 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100µl의 Conjugate를 넣고, plate cover로 덮은 뒤 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100µl의 Substrate Solution을 넣고 실온에서 30분 동안 빛을 차단하며 반응하였다. 반응 종료 후에 100µl의 Stop solution을 넣고 반응을 중지하였다. 그 후 ELISA reader(Emax, USA)로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ RT-PCR을 mRNA 발현

• Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 마우스의 비장으로부터 total RNA를 추출하였다.

비장 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응하였다. chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4°C에서 5분 동안 반응한 후, 14,328×g에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 분리한 후, Phenol : Chloroform (5:1)(Sigma, USA)을 동부피로 처리하여 원심분리 하였고 다시 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 동부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20°C에서 1시간 반응한 후 다시 원심분리 하였다. Pellet을 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에서 용해시켜 얻어진 total RNA를 UV spectrophotometer (Hitachi, Japan) (260/280nm)로 정량하였다.

• Reverse transcription-polymerase chain reaction

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2µg를 가지고 β

actin과 IFN-γ에 대해서는 oligo-(dT)15 primer(Promega, USA) 1µl를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-10에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1µM를 사용하여 70°C에서 10분 동안 pre-incubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl(pH 9.0 at 25°C), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), RNasin ribonuclease inhibitor(Promega, USA) 1U/µl, AMV reverse transcriptase(Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2µl씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다.

Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2µl를 dNTP mixture 200µM, gene specific primer 300nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl(pH 9.0 at 25°C), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR thermal cycler(Hybaid, UK)에서 denaturation은 94°C 5min으로, annealing은 IL-2은 60°C, IL-4은 48°C, IL-10은 72°C, IFN-γ은 56°C, β-actin은 60°C로 35cycles를 하였고,

Table 2. Specific primers for cytokines and β-actin

Name (Product size)		primer
β-actin (349 bp)	forward	5' -TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
	reverse	5' -TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
IL-2 (168 bp)	forward	5' -TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G-3'
	reverse	5' -GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G-3'
IL-4 (220 bp)	forward	5' -TTC TCG AAT GTA CCA GGA GC-3'
	reverse	5' -AAC GCT ACA CAC TGC \ ATC TT-3'
IL-10 (421 bp)	forward	5' -AGA CTT TCT TTL AAA CAA AGG ACC AGC TGG A-3'
	reverse	5' -CCT GGA GTC CAG CAG ACT CAA TAC ACA CTG C-3'
IFN-γ (247 bp)	forward	5' -AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3'
	reverse	5' -GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'

extension은 72°C 10min하였다. PCR product를 확인하기 위하여 agarose(2%) TAE(Tris- Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하였으며 시료 5 μ l를 loading buffer를 gel에 주입하여 100 volt에서 30분간 전기영동하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 DNA는 UV transiluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였다. 이때 사용한 cytokine과 β -actin의 specific primer는 다음과 같다 <Table 2>.

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. A549 human epithelial lung cancer cell에 대한 영향

1) Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

홍삼약침의 면역학적 기능 이외에 직접적으로 A549 human epithelial lung cancer cell에서 Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax에 대하여 어떠한 영향이 있는가를 알아보기 위해 RT-PCR에 의한 mRNA의 발현양상을 살펴보았다.

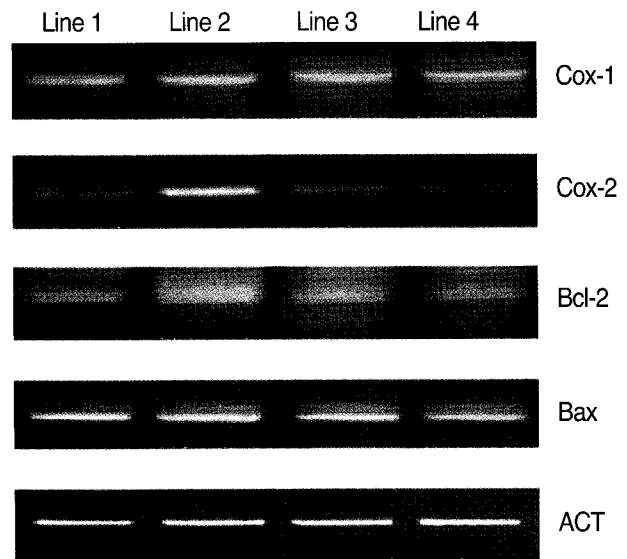
그 결과, Prostaglandin 합성과정에서 정상적 생리기능에 관여하는 Cox-1의 경우 대조군과 실험군이 큰 차이를 나타내지 않았고, 염증 반응에 관여하는 Cox-2의 경우 실험군 모두에서 normal 상태와 같이 감소되었다.

Apoptosis의 조절에 관여하는 인자인 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현을 관찰한 결과, Bcl-2는 대조군에 비해 실험군에서 약간의 감소를 나타내었고, Bax는 대조군과 실험군이 큰 차이를 나타내지 않았다<Fig. 2>.

2. Sarcoma-180 대한 항암효과 및 면역능

1) 생존율

Median survival time은 대조군은 27일, 실험군 I(홍삼



Line 1 : Normal
Line 2 : LPS
Line 3 : LPS + red-ginseng 200 μ l/ml
Line 4 : LPS + red-ginseng 400 μ l/ml

Fig. 2. Expression of Cox-1, Cox-2, and Bcl-2, Bax in A549 human epithelial lung cancer cells, with and without lipopolysaccharide and distilled red-ginseng Herbal Acupuncture, respectively.

胃脘 약침군)과 실험군 II(홍삼 中腕 약침군)는 모두 30일을 나타내어 실험군이 대조군에 비하여 11.1%의 생존증가율을 나타내었다<Fig. 3>.

2) Flow cytometry를 이용한 IL-2 및 IL-4 생산량

• IL-2 생산량

실험군 모두 대조군에 비하여 IL-2의 생산량이 증가한 것으로 관찰되었다<Fig. 4>.

• IL-4 생산량

실험군 모두 대조군에 비하여 IL-4의 생산량이 증가한 것으로 관찰되었다<Fig. 5>.

3. ELISA를 이용한 IL-2 생산량

검액 투여 후 14일 후에 정상군, 대조군 및 실험군의 mouse로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자

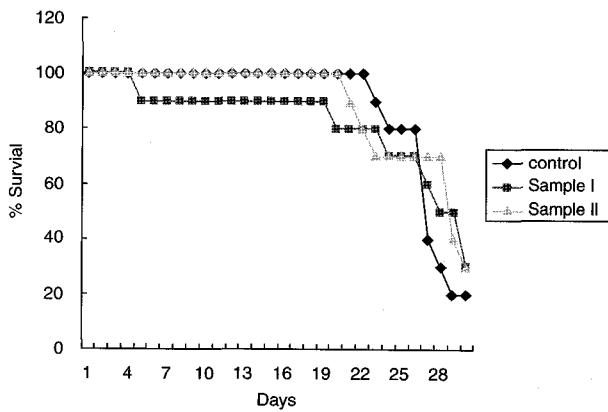


Fig. 3. Median survival time of mouse treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture in vivo.

- Control : treated with normal saline (0.1cc)
- Sample I : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- Sample II : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

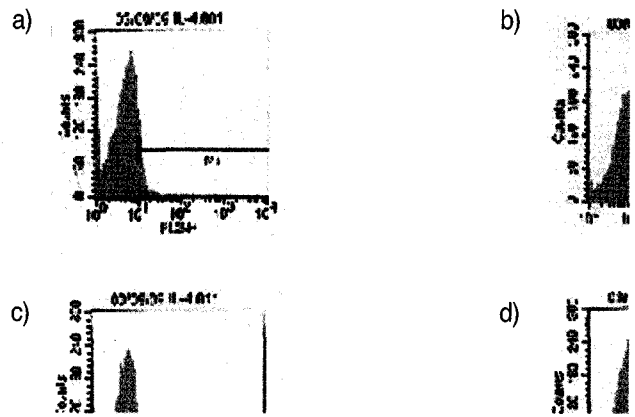


Fig. 5. Interleukin-2 Productivity using Flowcytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture.

- a) Normal : non-treated group
- b) Control : treated with normal saline (0.1cc)
- c) Sample I : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

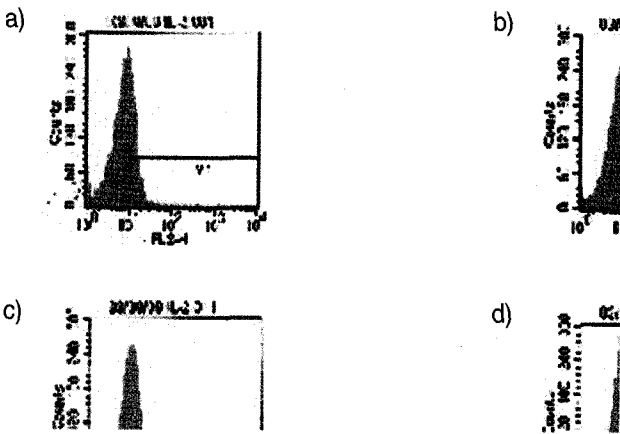


Fig. 4. Interleukin-2 Productivity using Flow cytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture.

- a) Normal : non-treated group
- b) Control : treated with normal saline (0.1cc)
- c) Sample I : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

극한 후 24시간 배양하여 IL-2의 생산능을 측정된 결과 정상군은 $919.38 \pm 19.53 \text{ pg/ml}$, 대조군은 $921.43 \pm 15.03 \text{ pg/ml}$, 실험군 I은 $807.20 \pm 39.67 \text{ pg/ml}$, 실험군 II는 $790.76 \pm 39.02 \text{ pg/ml}$ 를 나타내어 실험군 I, II는 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다<Table 3, Fig. 6>.

4. RT-PCR을 이용한 Cytokine의 mRNA 발견

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 주입한 후 홍삼약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, 생리식염수만을 주입한 대조군, 홍삼약침 0.1cc를 위수에 주입한 실험군 I, 홍삼약침 0.1cc를 중완에 주입한 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다.

Internal control로 사용한 β -actin과 각각의 cytokine을 비교하였을 때, IL-2, IL-4의 경우, 실험군 II는 정상군 및 대조군에 비해 mRNA 발현이 향상됨을 보였으나 실험군 I에서는 차이를 보이지 않았다. IFN- γ 는 실험군 I, II

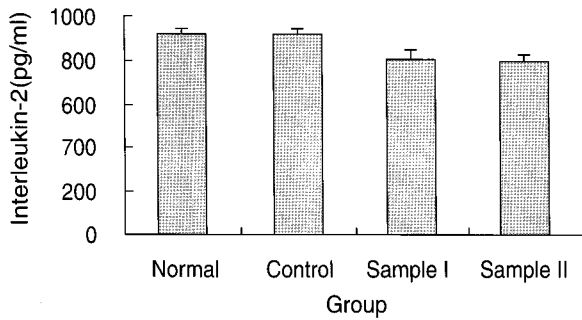


Fig.6. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture.

- Normal : non-treated group
- Control : treated with normal saline (0.1cc)
- Sample I : treated with distilling red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- Sample II : treated with distilling red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

Table 3. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture.

Group	Interleukin-2 (pg/ml)
Normal	919.38 ± 19.53
Control	921.43 ± 15.03
Sample I	807.20 ± 39.67
Sample II	790.76 ± 39.02

- Normal : non-treated group
- Control : treated with normal saline (0.1cc)
- Sample I : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- Sample II : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

모두 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다. 반면 IL-10에서는 대조군에 비해 실험군 I, II에서 발현이 향상되었음을 알 수 있었다<Fig. 7>.

IV. 考 察

人蔘은 五加皮科에 속한 蔘의 根으로 性은 微寒, 微

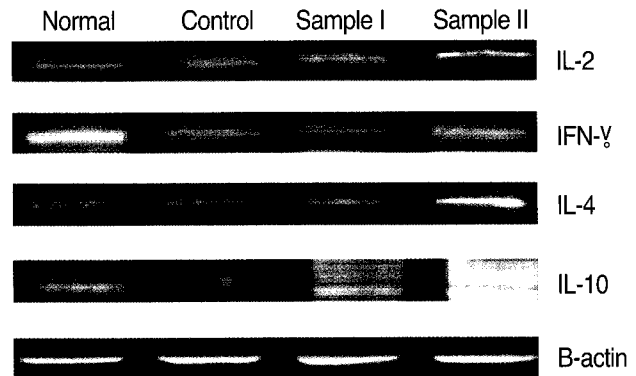


Fig. 7. Expression of cytokine mRNA extracted from spleen using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. After a mouse was innoculated with Sarcoma-180, it was treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture in the variable contents.

- Normal : non-treated group
- Control : treated with normal saline (0.1cc)
- Sample I : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
- Sample II : treated with distilled red-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

溫, 溫하고, 味는 甘, 苦하며, 大補元氣, 固脫生津, 安精神, 除邪氣 등의 效果가 있고 勞傷虛損, 食少倦怠 等に 광범위하게 사용되는 滋補強壯 興奮劑이다¹³⁾.

인삼은 보통 4-6년간 재배하며, 채굴된 자연 상태의 인삼을 수삼이라 한다. 수삼은 약 75%의 수분을 함유하고 있으며, 이를 자연상태에서 건조시킨 것을 백삼(white ginseng)이라 한다. 또한 백삼을 껍질을 벗기지 않은 상태로 증기로 찌서 건조시킨 것을 홍삼(red-ginseng)이라 한다¹⁴⁾.

인삼에 대한 과학적 연구는 1854년 Garriques¹⁴⁾가 saponin을 분리해 내면서 비롯되었고, 1957년에는 소련의 Brekhman¹⁵⁾이 인삼의 adaptogen 활성과 관련지어 인삼 saponin을 유효성분으로 강조한 이래 saponin에 대한 연구가 활발하였으며, 이 후 이와 관련된 많은 연구가 행해지고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

특히 Brekhman 등²⁰⁾은 인삼이 개체의 비특이적 저항성을 증대시키는 효과가 있다고 보고하였다. 인삼추출물의 유의한 면역능 향진작용에 대하여 Singh 등²¹⁾은 인삼투여로 세포의 항체 생성능이 증가하였고, 자연살해

세포의 활성화도 증가한다고 보고하였다.

암 치료에 있어서 면역계의 반응을 조절하여 암에 대한 치료효과를 유도하는 방법은 많이 보고되어 왔다. 이를테면, IL-2 혹은 IL-3를 이용하여 암을 살해하는 Lymphokine-activated killer(LAK) 세포나 cytotoxic T 세포(CTC)를 생성시키는 방법, NK cell에 의하여 MHC에 제한 없이 암세포 살해 효과를 유발시키는 방법, macrophage에 의한 암세포 살해 작용, 환자에게 암세포에 대한 단일 클론 항체를 투여 했을 때 보여 지는 치료 효과 등이 그것이다. 그런데 보통의 생리적인 상태에서는, 암세포의 빠른 성장과 면역계에 대한 억제 인자 분비 등으로 인하여 면역반응을 이용한 치료 효과를 나타내기가 어렵다. 따라서, 암세포에 대한 면역 반응을 조절하는 기본적인 기전과 조절요소를 이용하여 숙주의 항암 면역능력을 높여주는 암 면역요법의 개선이 필요하다. 비특이적으로 암세포를 살해하는 세포는 IL-2, IFN- γ 등의 Th1 type cytokine 및 IL-1 α , GM-CSF, TNF α 등의 macrophage cytokine에 의하여 활성화된다고 보고하고 있다²⁸. 면역계는 한 개체에서 발암 억제에 중요한 역할을 하며, 면역기능이 억제된 환자나 실험동물에서 종양형성이 증가한다는 사실이 이를 뒷받침해주고 있다²⁹. 서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것이라고 정의되어 있다³⁰.

최근에 들어 한의학에서 암을 치료하기 위하여 여러 가지 치료방법이 사용되고 있고 특히 藥鍼液을 이용한 항암효과와 면역에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 의거하여 한약재를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺針과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法³¹이다.

중류추출식 약침조제법은 약재를 깨끗이 세척하여 煎湯한 후 이를 특수 제작된 조제 세트에 넣고 다시 煎湯하면서 수증기를 모으는 방법으로 八綱藥鍼 抽出法이라고도 한다. 이 방법은 韓藥에 존재하는 氣味 중 氣만을 모아서 사용하는 방법으로 매우 한의학적이며 또한 機能性疾患에 유효하다고 평가된 치료법이다.

人蔘藥鍼과 관련된 연구로는 李 등²⁵은 中脘에 人蔘藥鍼을 주입하였을 때 체중증가와 소화효소분비에 관여한다고 보고하였고, 金 등⁶은 水蔘, 白蔘, 紅蔘藥鍼을 三陰交에 주입하였을 때 유의한 혈당저하효과가 있음

을 보고하였으며, 林 등²⁶은 인삼약침이 항암 및 면역기능에 유의성이 있음을 보고하였다.

지금까지 국내에서 발표된 藥鍼液 抗癌研究로는 韓 등²⁷은 甘豆藥針液을, 朴 등²⁸은 甘草藥針을, 韓 등²⁹은 當歸藥針을, 權 등³⁰은 蜂毒藥鍼을, 金³¹은 金銀花藥鍼을, 金³²은 全蝎藥鍼液을, 朴³³은 益智仁藥鍼을, 李³⁴는 兔絲子藥鍼을, 李³⁵는 魚腥草藥鍼을, 李³⁶는 鱗鱗藥鍼 등 많은 抗癌效果와 免疫作用에 대한 연구보고가 있다. 특히, 權 등³⁷은 산양산삼약침의 항암능과 면역기능계에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 미정맥에 주입하여 생존률과 NK 세포의 독성능, IL-2의 생산능, 그리고 Cytokine의 mRNA 발현을 측정 한 결과 급성·아급성 독성실험에서 모두 독성반응을 보이지 않았으며, 생존율에 있어 115%의 증가를 보여 항암치료에 활용될 수 있을 것이라 보고하였다.

이에 본 연구에서는 위의 山養山蔘藥針이 항암효과와 면역기능계에 유의한 작용을 하는 것을 토대로 산양산삼의 경제성과 희귀성을 고려하여 비교적 경제성이 좋고, 쉽게 구할 수 있는 홍삼증류약침의 항암효과에 미치는 영향을 알아보려고 시도되었다. 이를 위해 실험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 홍삼약침을 처리하여 Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현 여부를 알아보았고, Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse에 주입하여 생존율 및 Flowcytometry를 이용한 IL-2, IL-4의 생산량과 ELISA를 이용한 IL-2 생산량, RT-PCR을 이용한 mRNA 발현여부를 측정하였다.

Wardlaw 등³⁸에 의하면 Cox-2가 폐암 세포주에서는 과발현되며 Cox 억제제를 처리하면 세포성장을 잠시 억제할 수 있다고 보고하였다. 이 Cox는 prostaglandin 합성과정에서 중요한 요소로 Cox-1과 Cox-2가 있는데 Cox-1의 경우 정상적인 상태에서는 항상 발현되며, Cox-2는 염증과정에 관여하여 발현이 증가하게 된다.

Cox-1의 mRNA 발현은 큰 차이를 나타내지 않았으나, Cox-2의 mRNA 발현은 실험군 모두에서 정상군과 같이 감소된 것을 보여주었다<Fig. 2>. 그러므로 홍삼의 경우 직접적으로 염증과정에 관여하는 Cox-2를 감소시킬 수 있으므로 염증형성에 의한 prostaglandin 합성을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.

종양의 성장을 조절하는 인자로서 세포의 증식과 신생혈관의 증식 외에 또 다른 중요한 인자로서 Apoptosis 및 연관 인자들이 있다. Apoptosis의 조절에 관여하는 유전자는 매우 다양하게 보고되고 있는데, 크

게 4가지로 나누며 이 중에서 Bcl-2 유전자는 proto-oncogene으로 세포 사멸의 조절에 관여하는 인자로서 가장 잘 알려져 있고, 이에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. Bcl-2 단백질은 Bax 단백질과 hetero-dimer를 형성하고 있어 상호간에 서로의 기능을 억제하고 있는데, Bax 단백질이 Bcl-2 단백질로부터 분리되면 직접적으로 혹은 Bcl-2의 다른 작용기전을 억제하는 간접적인 경로로 세포사멸의 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁹. Bcl-2 유전자의 과발현에 의한 Bcl-2 단백질의 과생성은 종양 발생을 유도하며, 이는 Bcl-2 유전자가 과발현 될 경우 세포의 증식을 유도하기보다는 apoptosis를 억제하여 세포 사멸을 감소시키기 때문으로 생각되고 있다⁴⁰. 또한, Bax 유전자에 의한 Bax 단백질은 Bax:Bax 동종이합체(homodimer)를 형성하여 세포의 사멸을 유도하므로 Bcl-2 단백질에 길항작용을 한다고 보고되고 있다⁴¹.

홍삼의 세포사에 의한 암세포 사멸능력을 알아보고자 본 실험에서는 농도 의존적으로 홍삼 200 μ /ml well과 400 μ /ml well로 홍삼을 처리한 후 RT-PCR의 방법으로 Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현을 조사한 결과, 대조군에 비해 실험군 I, II에서 Bcl-2의 경우 약간의 감소를 나타내었고, Bax의 경우 대조군과 실험군이 큰 차이를 나타내지 않았으나 홍삼이 암세포사에 관여할 수 있는 가능성을 제시해 준다고 볼 수 있겠다<Fig. 2>.

생존율 측정에서는 실험군 모두 대조군에 비하여 11.1%의 증가율을 보여 홍삼증류약침의 주입이 생존율을 증가시키나 유의성은 인정되지 않았다<Fig. 3>.

T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능항진, B cell 분화인자, NK cell의 활성화에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 종양의 치료에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을 하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다^{42,43}.

IL-2의 생산능 검역 검사결과로 실험군 I, II에서 Flow cytometry와 ELISA 측정법 모두 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않아 홍삼증류약침이 림프구의 활성화, 분화, 증식에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다<Fig. 4, Fig. 6>.

면역반응은 항원에 의해 시작되는데 이 때에 CD⁺ T 세포의 도움이 필요하다⁴⁴. helper T 세포에는 2종류가 있어, 각기 help 작용이 다르다. 제1의 help 작용은 대식세포 활성화작용 및 killer T 세포의 활성화작용이고, 제2의 help 작용은 항체 생산 작용이다⁴⁵.

CD⁺ T helper 임파구는 cytokine의 양상에 따라 T helper 1(Th 1)과 T helper 2(Th 2)로 구분된다. 이 두 세포는 모두 Th 임파구 전구세포로부터 분화되는데 분화를 결정하는 요인은 환경적 요인과 유전적 요인으로 구분된다⁴⁶. 환경적 요인으로는 항원의 유입경로, 항원의 물리적 변형, 항원의 양 등이 알려져 있는 반면 유전적 요인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 이러한 환경적 요인이 Th 임파구의 주변 환경에 존재하는 cytokine을 결정하여 Th1과 Th2로 분화를 유도한다. 즉, 분화 초기에 존재하는 cytokine 중 IL-4가 많이 존재하는 경우 Th2로 분화가 이루어지고, INF- γ 나 IL-12가 많이 존재하면 Th1으로 분화가 촉진된다⁴⁷.

이처럼 분화된 Th1 세포는 INF- γ , IL-12, tumor necrosis- β (TNF- β)를 생성하여 세포매개성 면역반응(cell mediated immune response)에 관여를 하고, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 생성하여 알러지 및 체액성 면역반응(humoral immune response)에 관여를 한다. Th1과 Th2는 서로 억제작용을 하며 숫자적으로 균형을 유지하게 된다⁴⁸.

Th1 세포 및 macrophage로부터 생성되는 cytokine은 암세포에 대한 세포성 면역 반응을 증강시켜 항암작용을 나타내며, Th2 세포로부터 생성되는 cytokine은 세포성 면역 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다^{49,50}.

Internal control로 사용한 β actin과 각각의 cytokine을 비교하였을 때, interleukin-2의 경우 전체적으로 mRNA 발현이 미약하였으나, 실험군 II에서 약간의 발현이 되었음을 확인하였다. 또한 INF- γ 는 실험군 II에서 약간 발현되는 경향을 보였으나, 정상군에 비해 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다.

반면 IL-4에서는 실험군 II에서 정상군이나 대조군 보다 발현이 향상되었으며, 또한 IL-10에서는 정상군과 비교할 때 실험군 I, II에서 비슷한 정도로 발현되었고, 실험군 I, II 모두 대조군 보다 발현이 향상됨을 알 수 있었다<Fig. 7>.

즉, 실험군 II에서 IL-2의 발현이 증가됨을 보이고 있으나, IL-4 및 IL-10에서도 실험군 II가 약간의 증가를 보이고 있어 세포성 면역 반응에 관련시켰을 때 다소 유의성 없는 결과를 나타내었다.

그러나, 시험관내에서 홍삼약침을 처리하였을 때 염증반응에 관여하는 Cox-2 mRNA 발현을 억제하고, 종양 발생을 유도하며 Apoptosis를 억제하는 Bcl-2 유전자의 발현을 억제하는 작용이 있음을 고려해볼 때 홍삼약침

의 소염작용과 항암작용의 가능성을 추정할 수 있었다. 위의 결과를 종합해 볼 때, 홍삼 증류약침은 홍삼의 항암효과에 대한 기존의 연구보고^{7,9)}를 바탕으로 홍삼약침의 농도를 증가시킬 경우 직·간접적으로 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 추후에도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

V. 結 論

홍삼증류약침의 항암효과와 면역능을 관찰하기 위하여 시험관내에서 A549 cell에 대한 Cox-1, Cox-2 그리고 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현여부를 알아본 후, Sarcoma-180 복강암을 유발시킨 mouse에서 생존율과 Cytokine의 mRNA 발현양상을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RT-PCR을 이용한 Cox-1의 mRNA 발현은 대조군과 실험군이 큰 차이를 나타내지 않았고, Cox-2에서는 실험군 모두 정상군과 동일하게 감소되었다.
2. RT-PCR을 이용한 Bcl-2의 mRNA 발현은 대조군에 비해 실험군 모두에서 약간의 감소를 나타내었고, Bax에서는 대조군과 실험군이 큰 차이를 나타내지 않았다.
3. 생존율은 대조군에 비해 실험군 모두 11.1%의 생존율 증가를 나타내었다.
4. Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4의 생산량은 실험군 모두 유의성을 나타내지 않았다.
5. ELISA를 이용한 IL-2의 생산량은 실험군 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다.
6. RT-PCR을 이용한 Cytokine의 mRNA 발현측정 결과, IL-2, IL-4에서 실험군 II에서 대조군에 비해 mRNA 발현이 향상되었고, IL-10에서는 실험군 모두에서 대조군에 비해 발현이 향상되었다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 홍삼증류약침은 농도를 증가시킬 경우 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로

기대되며, 추후에도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

參考文獻

1. 조재선 외, 고려삼의 이해, 도서출판 한림원, 서울, p. 12, 1995.
2. 원도희 외, 상용생약의 성분정량, 서울, 성은출판사, pp. 292-306, 1991.
3. 정기택 외, 고려인삼, 한국인삼연초연구원, p. 44, 1993.
4. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, pp. 13-14, 112-118, 138-203, 1999.
5. 김성훈 외, 고려인삼 고려홍삼 및 total saponin의 항산화 작용, 동의병리학회지, Vol. 12, No. 1, pp. 72-81, 1998.
6. 김웅시 외, 수삼, 백삼, 및 홍삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향, 대한 침구학회지, Vol. 6, No. 1, pp. 1-5, 1989.
7. 장성강 외, 한국 홍삼의 면역활성 및 항암효과에 관한 실험적 연구, 고려인삼학회지, Vol. 18, No. 3, pp. 151-159, 1994.
8. 김기환 외, 홍삼다당체의 항암 면역증강작용 연구, 고려인삼학회지, Vol. 21, No. 2, pp. 78-84, 1997.
9. 양용태 외, Sarcoma-180 복강암면역에 대한 홍삼의 효과, 대한면역학회지, Vol. 5, No. 1, pp. 15-27, 1983.
10. 황우익 외, 한국 및 중국 홍삼의 암세포 증식억제 효과 비교연구(III), 고려인삼학회지, Vol. 17, No. 3, pp. 196-202, 1993.
11. 추형식 외, 자궁 육종에서 p53, bcl-2, bax 단백질 발현에 관한 면역조직화학적 연구, 대한부인종양 콜포스코피학회, Vol. 8, No. 4, pp. 395-416, 1997.
12. 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.
13. 전국한 의과 대학 본초학교수 공편저, 본초학, 서울, 영림사, p. 531, 1994.
14. Garriques. S, Panax Quinquefolia, *Am Chem Pharm*, Vol. 90, p. 331, 1954.

15. Brekhman, I. I., Panax ginseng, *Gosudarts Isdat et Med*, Lit. Leningrad, p. 1, 1957.
16. Shbata, S., tanaka, O., *Chem Pharm Bull*, Vol.14, p. 595, 1966.
17. 하대유, 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구, 대한 면역학회지, Vol. 1, No. 1, pp. 45-52, 1979.
18. Takagi, K., Proceedings International Ginseng Symposium, *The Central Research Institute*, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p. 119, 1974.
19. 최강주, 원료인삼의 성분과 품질관리, 고려인삼학회지, Vol. 15, No. 3, pp. 247-256, 1991.
20. Brekhman, I., I. and Dardymov, I. V. : *Ann. Rev. Pharmacol.*, Vol. 9, p. 419, 1969.
21. Singh, V.K., Agarwal, S. S. and Gupta, B. M. : *Planta Medica*, Vol. 50, No. 6, p. 462, 1984.
22. Beth A. Pulaski et al. : Interleukin 3 Enhances Development of Tumor-reactive Cytotoxic Cells by a CD4-dependent Mechanism, *Cancer Research*, Vol. 53, pp. 2112-2117, 1993.
23. Esumi H et al. : Reduced tumorigenicity of murine tumor cells secreting γ -interferone is due to nonspecific host response and is unrelated to class I major histocompatibility complex expression, *Cancer Research*, Vol. 51, pp. 1185-1189, 1991.
24. Urban J. L. et al. : Tumor necrosis factor : a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 82, pp. 5233-5247, 1986.
25. Miller R. A. et al. : Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 306, pp. 517-522, 1982.
26. 항암면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현, 김기환 외, Vol. 22, No. 4, pp. 324-330, 1998.
27. Prehn, R. T. : *Progr. Exp. Tumor Res.*, Vol. 13, p. 1, 1970.
28. 서울대학교 의과대학, 중양학, 서울대학교 출판부, 서울, pp. 1-3, 137-143, 225, 1992.
29. 이산명 외, 인삼, 녹용 및 목향 수침이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬 분비에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 5, No. 1, pp. 1-5, 1988.
30. 임사비나 외, 인삼약침과 Lidocaine을 첨가한 인삼 약침이 종양 및 면역기능에 미치는 영향, 동서의학회지, Vol. 20, No. 3, pp. 21-39, 1995.
31. 한상훈 외, 감두약침액의 암예방효과, 생명과학회지, Vol. 9, No. 6, pp. 684-691, 1999.
32. 박경미 외, 감초약침액의 항암 및 면역활성에 미치는 영향, 생약학회지, Vol. 31, No. 1, pp. 7-15, 2000.
33. 한상훈 외, 당귀약침액의 암 예방효과, 약학회지, Vol. 44, No. 3, pp. 283-293, 2000.
34. 권기록 외, 봉독약침자극이 3-MCA 유발 상피종에 대한 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 14, No. 2, pp. 151-172, 1997.
35. 김중완, 금은화 약침액이 항암 및 암예방 효과에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 16, No. 2, pp. 261-284, 1999.
36. 김소형, 전갈 약침액의 항돌연변이 및 항암 효과, 대한침구학회지, Vol. 17, No. 3, pp. 151-167, 2000.
37. 박상용, 익지인약침이 항암 및 면역반응에 미치는 실험적 연구, 대한침구학회지, Vol. 18, No. 3, pp. 79-93, 2001.
38. 이재복, 토사자약침이 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구, 대한침구학회지, Vol. 18, No. 3, pp. 94-104, 2001.
39. 이혜정 외, 여성초수침의 항종양효과에 관한 연구, 경희한의대논문집, pp. 467-483, 1989.
40. 이준무 외, 제조약침의 항암작용에 관한 연구, 대한동의병리학회지, Vol. 14, No. 2, pp. 132-143, 2000.
41. 권기록 외, 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성·아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 6, No. 2, pp. 7-27, 2003.
42. Wardlaw SA, March TH, Belinsky SA. Cyclooxygenase-2 expression is abundant in alveolar type II cells in lung cancer-sensitive mouse strains and in premalignant lesions, *Carcinogenesis*, Vol. 21, No. 7, pp. 1371-1377, 2000.
43. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ, Bcl-2 hetero dimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death, *Cell*, Vol. 74, pp. 609- 619, 1993.
44. Reed JC, Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *J Cell Biol*, Vol. 124, No. 1-2, pp. 1-6, 1994.
45. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ, Bcl-2 hetero

- dimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death, *Cell*, Vol. 74, pp. 609-619, 1993.
46. 서울대학교 의과대학, 중앙학, 서울대학교 출판부, 서울, pp. 1-3, 137-143, 225, 1992.
47. 김세종, 면역학, 고려의학, 서울, pp. 134-136, 1994.
48. Paul WE, Seder RA, Lymphocyte responses and cytokines, *Cell*, Vol. 76, pp. 241-251, 1994.
49. 新谷太저 홍천수 역, 내과학(면역 · 알레르기질환), 도서출판 정담, p. 7, 2002.
50. Constant SL, Bottomly K, Induction Th 1 and Th 2 CD4+ T cell response, The alternative approaches, *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 115, pp. 297-322, 1997.
51. Sell, S, Cell mediated immunity *in vitro* in immunology, immunopathology and immunity, Hergestown, Maryland, *Herpers & Row Pub.*, pp. 144-171. 1980.
52. Sher A, Cofferman RL, Regulation of immunity to parasite by T cell-derived cytokines, *Annu. Rev Immunol.* Vol. 46, pp. 111-147, 1992.
53. Sheng-Yuan Wang, Ming-King Hsu, Chi-Kuan Ho : The Anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes, *Int. J. Cancer*, Vol. 70, pp. 699-705, 1997.
54. Thomas F, Gajewski F and Frank W Fitch : Anti-proliferative effect of IFN γ in immune rerulation. I. IFN γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murinne helper T lyphocyte, *J. Immunol.*, Vol. 140, No. 2, pp. 4245- 4252, 1988.