

수종 항암 처방의 조합에 따른 면역조절 작용에 관한 연구

백명현 · 박종대¹ · 이용구² · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:KT&G 중앙연구원, 2:대전대학교 한의과대학 내과

Studies on the Immunomodulatory Effect Using Combinations of Several Kinds of Anti-cancer Prescriptions

Myung hyun Baik, Jong Dae Park¹, Yong Koo Lee, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University, 1:KT&G Research Center
2:Department of Western Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to understand the anti-carcinogenic effects of Boo-jung-bae-bon-bang(扶正培本方-B1), Hwal-hyul-hwa-eo-bang(活血化瘀方-B2), Cheong-youl-hae-dok-bang(清熱解毒方-B3), prescriptions of individual B1, B2, and B3 treatments or combined treatments (B4; B1+B2, B5; B1+B3, B6; B1+B2+B3, B7; B2+B3) were applied to cultured cancer cell lines. The major findings on their anti-carcinogenic effects in terms of mechanism and synergistic interactions are summarized below. Results of cytokine gene expression analyses are summarized as follows; IL-2 gene expression was increased by B1 and B6 treatments, IFN- γ gene expression increased by B3, B1, B6, and B5, and CD28 gene expression increased by B1 and B5. IL-4 expression was not affected by any treatments. In the FACS analysis, increases in numbers of immunoreactive CD3⁺/CD25⁺ T cells by B1 and B5 treatment, CD3⁺/CD69⁺ T cells by B1, B3, B5, and B6 treatments, CD19⁺/CD44⁺ B cells by B1 and B6 treatments were observed when compared to the corresponding non-treated control groups

Key words : Anti-carcinogenic, synergistic interactions, T cell, cytokine, FACS analysis

서론

國民健康保險公團이 發表한 "2002년 健康保險 癌患者 統計 分析"에 의하면 지난해 新規 癌 患者는 11萬 147名으로, 直前 年度보다 4.7% 增加하여 1百60名當 1名꼴로 크게 늘어났다.

西洋醫學에서 癌의 治療는 癌의 完治, 壽命의 延長, 症狀의 調節中 어디에 重點을 둘 것인가를 決定한 다음, 여러 가지 治療法이 選擇되거나 併用되는데, 이 중 化學療法이 가장 많이 應用되고 있다¹⁾. 그러나 大部分의 抗癌劑가 細胞內 遺傳 因子의 本體인 核酸의 合成을 抑制하거나 核酸에 直接 結合하여 그 機能을 損傷시켜 效果를 나타냄으로써 癌細胞에만 選擇의 作用하는 것이 아니라 正常 細胞, 特히 細胞分裂이 活潑한 組織 細胞에도 損傷을 입혀 骨髓 機能 低下, 胃腸管 粘膜炎 損傷, 脫毛 등의 副作用²⁾이 나타나며, 제 2의 發癌 物質이 되기도 한다. 또한 抗癌 效

果 이외에 免疫을 抑制하는 作用이 있어 免疫 低下로 인한 感染의 危險性이 있다.

韓醫學에서의 抗癌 研究는 既存의 中醫學的 理論에 準하여 多樣한 臨床 研究가 整理되어 普及되면서, 1990年 초반부터 本格的으로 進行되었으며, 國家的 課題와 더불어 中·大型 病院에서 이에 대한 臨床 研究가 이루어짐으로써, 臨床 및 實驗 研究가 活潑하게 進行되어 왔다.

實驗的 研究는 多樣한 韓藥과 處方을 試料로 주로 細胞毒性, 抗轉移, 免疫調節 作用을 中心으로 이루어져 왔으며^{3,4)}, 最近에는 韓·洋方의 多學制間의 協力を 통하여 多樣한 信號 傳達 機轉에 미치는 影響 등에 대한 研究^{5,10)}가 活潑하게 이루어지고 있다.

따라서 向後 韓醫學界에서 進行하여야 할 實驗的 研究는 기존의 연구를 기초로 크게 多學制間의 協力を 통한 韓藥劑 有效性分의 抗癌 機轉 研究와 더불어 多樣한 效能의 韓藥材와 處方의 配合를 통한 新規 抗癌 處方 開發에 焦點을 두어야 할 것으로 보인다.

이에 本 實驗에서는 效果的인 抗癌 處方 開發의 基本 作業

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2003/11/17 · 수정 : 2003/12/20 · 채택 : 2004/01/15

으로 扶正培本方(B1)과 活血化癥方(B2), 清熱解毒方(B3)을 單獨(B1) 혹은 相互加味(B4;B1+B2, B5;B1+B3, B6;B1+B2+B3, B7;B2+B3)하여 이들의 免疫調節作用을 통한 抗癌機轉을 實驗的으로 比較考察하고자 脾臟細胞內 T細胞를 中心으로 하는 免疫細胞의 活性化를 評價하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

動物은 雄性 4주령의 C57BL/6 생쥐를 雌雄 음성에 있는 대한실험동물센터에서 購入하여 使用하였고, 實驗 當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2주일간 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 약재

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校附屬韓方病院에서 購入하여 精選하여 使用하였으며, 扶正培本方(B1), 活血化癥方(B2), 清熱解毒方(B3), 扶正培本加活血化癥方(B4), 扶正培本加清熱解毒方(B5), 扶正培本加清熱解毒加活血化癥方(B6), 活血化癥加清熱解毒方(B7)으로 實驗 處方을 構成하였다.

Table 1. Prescription of B1

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6
紅蔘	<i>Red Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
白芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
鷄內金	<i>Galli stomachichum Corium</i>	6
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
神曲(炒)	<i>Massa medicata Fermentata</i>	4
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4

Table 2. Prescription of B2

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
丹蔘	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	6

Table 3. Prescription of B3

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
阿魏	<i>Resina Ferulae</i>	6
紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	6
貴筋羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	6

Table 4. Prescription of B4

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6
紅蔘	<i>Red Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
白芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
鷄內金	<i>Galli stomachichum Corium</i>	6
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
神曲(炒)	<i>Massa medicata Fermentata</i>	4
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4
丹蔘	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	6

Table 5. Prescription of B5

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6
紅蔘	<i>Red Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
白芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
鷄內金	<i>Galli stomachichum Corium</i>	6
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
神曲(炒)	<i>Massa medicata Fermentata</i>	4
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4
阿魏	<i>Resina Ferulae</i>	6
紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	6
貴筋羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	6

Table 6. Prescription of B7

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
丹蔘	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	6
阿魏	<i>Resina Ferulae</i>	6
紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	6
貴筋羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	6

Table 7. Prescription of B6

藥 物 名	生 藥 名	用 量(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	6
紅蔘	<i>Red Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
白芍藥	<i>Paeonia Radix Alba</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
鷄內金	<i>Galli stomachichum Corium</i>	6
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
神曲(炒)	<i>Massa medicata Fermentata</i>	4
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4
丹蔘	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	6
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	6
蘇木	<i>Sappan Lignum</i>	6
阿魏	<i>Resina Ferulae</i>	6
紫草	<i>Lithospermi Radix</i>	6
貴筋羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	6

3) 試藥 및 器機

RPMI 1640(Gibco BRL Co., U.S.A.), fetal bovine serum(FBS: Gibco BRL Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS: Gibco BRL Co., U.S.A.), Hank's balanced salt solution(HBSS: Gibco BRL Co., U.S.A.), glycerol (Sigma Co., U.S.A.), bromophenol blue(Sigma Co., U.S.A.), tris-base (Sigma Co., U.S.A.), boric acid(Sigma Co., U.S.A.), agarose(Sigma Co., U.S.A.), sodim dodecyl sulfate(SDS: Sigma Co., U.S.A.), trypsin-EDTA(Gibco BRL Co., U.S.A.), sulforhodamine-B(SRB: Sigma Co., U.S.A.), anti-biotic (Gibco, BRL Co., U.S.A.), formaldehyde(Sigma Co., U.S.A.), lysophosphatidic acid(Sigma Co., U.S.A.), trypan blue(Sigma Co., U.S.A.), phenol red(Sigma Co., U.S.A.), sodium azide(Sigma Co., U.S.A.), isopropanol(Sigma Co., U.S.A.), ethanol (Merck Co., Germany), HCl(Merck Co., Germany), sodium bicarbonate(Sigma Co., U.S.A.), glacial acetic acid(Sigma Co., U.S.A.), RBC lysis 용액(Sigma Co., U.S.A.), RNAzolB(Tel-Test, Inc., U.S.A.), Taq polymerase(Intron Co., Korea), deoxy- nucleotide triphosphate (Takara Co., Japan), M-MLV RT(Promega Co., U.S.A.), RNase inhibitor (Promega Co., U.S.A.), agarose(Intron Co., Korea), DNA 100bp marker(Intron Co., Korea), etidium Bromide(Sigma Co., U.S.A.), IL-2, IL-4, IFN- γ , PE-anti-CD25, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD3e, FITC- anti-CD28, PE-anti-CD69, FITC-anti-CD19, PE-anti-CD44, PI(Pharmingen Co., U.S.A.), Giemsa 염색 용액 (Sigma Co., U.S.A.)을 사용하였다.

器機는 CO₂ incubator(Forma Co., U.S.A.: Model 3226S), clean bench(Vision scientific Co., Korea: KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.: Model: GS-6R), inverted microscope(Nikon Co., Japan), FACScan (Becton dickinson, U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi Co., Switzer-land), autoclave(Sanyo Co., Japan), micro-pipet(Gilson Co., U.S.A.), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A.), camera(Nikon Co., Japan: 601S), imager system (Kodak Co., U.S.A.), microcentrifuge (한일과학, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Turbo ThermocyclerTM (Bioneer Co., Korea), electrophoresis tank(Cosmos Co., U.S.A.), cool block(FinePCR Co., Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 試料 製造

上記한 B1-B7 2접 分量을 각각 대용약탕기에 넣고 蒸溜水 1,200ml와 함께 넣은 다음 3時間 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vaccum evaporator에서 減壓 濃縮하였다. 이 후 이를 -70℃ deep freezer (Sanyo, Japan)에서 24時間 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12時間를 凍結 乾燥하여 B1은 20.29g을, B2는 25.13g, B3는 16.9g, B4는 23.29g, B5는 13.37g, B6는 17.31g, B7는 26.05g의 粉末을 얻어, 試料로 使用하였다. 動物

實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter(0.22 μ m, Falcon)로 濾過하여 使用하였다.

2) Cytokine 遺傳子 發顯 測定

(1) 細胞 培養 및 藥物 處理

正常 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟細胞를 分離한 후 우태아 혈청결핍 RPMI-1640 培養液에서 1時間 동안 培養하였다. 여기에 B1-B7 實驗群(100 μ g/ml)를 각각 處理하고 3時間 동안 培養器(37℃, CO₂, Napco, U.S.A)에서 培養하였다. 培養한 후 2,000 r.p.m에서 5분간 遠心分離하여 上層液을 除去한 후 RNAzolB를 利用하여 細胞膜을 터트린 후 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다.

(2) RNA의 추출

培養 終了 후 2,000 rpm에서 5분간 遠心分離하여 상층액을 除去한 후 RNAzolB를 利用하여 製造 會社에서 提供하는 方法에 따라서 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 使用하였다.

(3) 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)

逆轉寫(reverse transcription) 反應은 準備된 total RNA 3 μ g 에 해당하는 양을 75℃에서 10분 동안 denaturation 시킨 후, 3 μ g의 RNA에 2.5 μ l의 10 mM dNTPs mix, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l의 100 mM DTT, 4.5 μ l 의 5 × RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 섞은 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 더하고 DEPC 처리된 蒸溜水로서 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 spin down하여 37℃ 恒溫 水槽에서 60분 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95℃에서 10분 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 재 빨리 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 使用하였다.

(4) cDNA의 PCR 증폭

PCR은 water bath 방식의 Turbo ThermocyclerTM 를 利用하여 修行하였다. 反應은 이미 合成된 3 μ l의 first-strand cDNA 를 주형으로 使用하였으며, 使用된 primer는 Table 1에 정리하였다. 각 PCR 반응은 sense primer (10 pmole/ μ l)와 antisense primer (10 pmole/ μ l)를 혼합 후 1 μ l씩 넣어주고, 여기에 3 μ l 의 2.5 mM dNTPs, 3 μ l의 10× PCR buffer (100 mM Tris-Cl, pH8.3, 500 mM KCl, 15mM (MgCl₂), 그리고 0.18 μ l의 Taq. polymerase (5 U/ μ l)를 添加한 뒤, 蒸溜水로서 最終 부피가 30 μ l가 되게 하여 修行하였다.

PCR 條件은, pre-denaturation; 95℃, 5분을 한 다음, annealing; 55℃, 1분, elongation; 72℃, 1분, denaturation; 95℃, 1분을 30 cycles 한 뒤, post- elongation을 72℃에서 10분 동안 해주었다. 각각의 PCR 產物은 20 μ l 씩 1.2%의 agarose gel에 전기 영동하여 分析하였다. PCR 反應에 使用된 primer는 table 8에 정리하였다.

Table 8. Oligonucleotide sequences of primers

Gene	Primer	Sequence
IL-2	Sense	5'-CTCCTTGTCAACAGCGCACC-3'
	Antisense	5'-TCAACAGCTCCAGGTGC-3'
IL-4	Sense	5'-ATTGTCTCTCGTCACTGACG-3'
	Antisense	5'-TGTGAGGACGTTTGGCACATC-3'
IFN- γ	Sense	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
β -actin	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	Antisense	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

3) 유세포 형광분석기(flow cytometer)를 이용한 면역세포 분석

(1)脾臟 면역세포調節

정상 C57BL/6 mouse의脾臟을摘出하여脾臟細胞를分離한 후 미리 α -CD3 mAb(1 μ g/ml)과 α -CD28mAb(1 μ g/ml)을 coating한 24 well plate에 우태아혈청결핍 RPMI-1640 培養液에서 1時間 동안 培養한 후 B1-B7 實驗群(200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)를 각각 處理하고 24時間 동안 培養器(37 $^{\circ}$ C, CO $_2$, Napco, USA)에 培養하였다. 培養 終了 후脾臟細胞를回收하여 유세포 형광분석기를 이용한 면역세포 분석을 修行하였다.

(2) 免疫細胞 分析

脾臟細胞는 각각 4 $^{\circ}$ C에서 免疫 螢光染色(immunofluorescence staining)을 實施하였고, 각각에 PE-anti-CD25, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD3e, FITC- anti-CD28, PE-anti-CD69, FITC-anti-CD19, PE-anti-CD44를 넣고 30분간 얼음에서 反應시켰다. 反應 후 3회 이상 磷酸緩衝生理食鹽水로 水洗한 후 유세포 형광분석기로 免疫 活性細胞를 分析하였다.

4) 統計 處理

實驗 結果는 unpaired student's T-test를 사용하여 統計 處理하였으며 P<0.05 또는 P<0.01, P<0.001 水準에서 有意性을 檢定하였다.

실험성적

1. 정상 생쥐의 T 細胞 活性化에 미치는 影響

1) IL-2 遺傳子 發顯에 미치는 影響

정상 C57BL/6 생쥐의 T 細胞를 分離하여 anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb, 그리고 B1-B7(100 μ g/ml)을 동시 배양하여 IL-2 遺傳子 發顯을 觀察한 結果, 무처리(media) T 細胞의 IL-2 遺傳子 發顯의 Ht 값이 16으로 나타난 반면, anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb로 同時 刺戟한 對照群의 Ht 값은 201로 나타나 무처리군에 비하여 IL-2 遺傳子 發顯이 큰 폭으로 增加를 나타내었다. 여기에 B1 投與群은 221, B2 投與群은 12, B3 投與群은 56, B4 投與群은 70, B5 投與群은 31, B6 投與群은 214, B7 投與群은 62로 觀察되었다(Fig. 1).

2) IL-4 遺傳子 發顯에 미치는 影響

IL-2 方法과 同一한 方法으로 測定한 IL-4 遺傳子 發顯에서는 무처리 (media) T 細胞의 Ht 값이 0으로 나타났고, anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb로 同時 刺戟한 對照群의 Ht 값은 59로 나타나 무처리군에 비하여 IL-2 遺傳子 發顯이 큰 폭으로 增加하

였다. 여기에 B1 投與群은 56, B2 投與群은 0, B3 投與群은 34, B4 投與群은 31, B5 投與群은 56, B6 投與群은 39, B7 投與群은 27로 觀察되었다(Fig. 2).

3) IFN- γ 遺傳子 發顯에 미치는 影響

정상 C57BL/6 생쥐의 T 細胞를 分離하여 anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb, 그리고 B1-B7(100 μ g/ml)을 동시 培養하여 IFN- γ 遺傳子 發顯을 觀察한 結果, 무처리(media) T 細胞의 IFN- γ 遺傳子 發顯의 Ht 값은 55로 나타났고, anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb로 同時 刺戟한 對照群의 Ht 값은 202로 나타나 무처리군에 비하여 큰 폭으로 增加를 나타내었다. 여기에 B1 投與群은 214, B2 投與群은 5, B3 投與群은 220, B4 投與群은 87, B5 投與群은 205, B6 投與群은 212, B7 投與群은 172로 觀察되었다(Fig. 3).

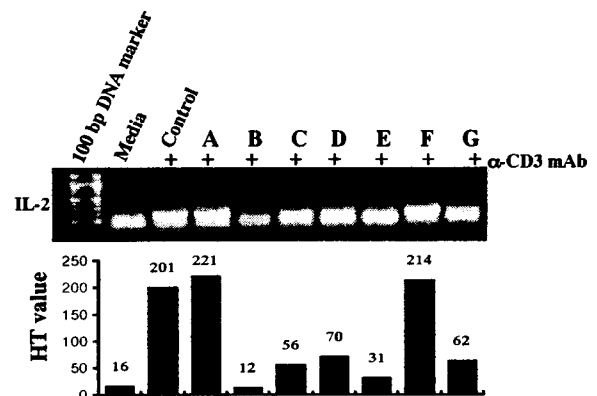


Fig. 1. Synergistic effects of B1-B7 extract on IL-2 mRNA expression in mouse T - lymphocytes. Mouse T lymphocytes were transferred to 24-well plates with coating with anti-CD3 mAb (1mg/ml) and co-cultured in medium supplemented with 100 mg/ml of B1-B7(A-G) for 6 hrs. Amplified IL-2 PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control (b-actin) and the analysis (Ht) was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods

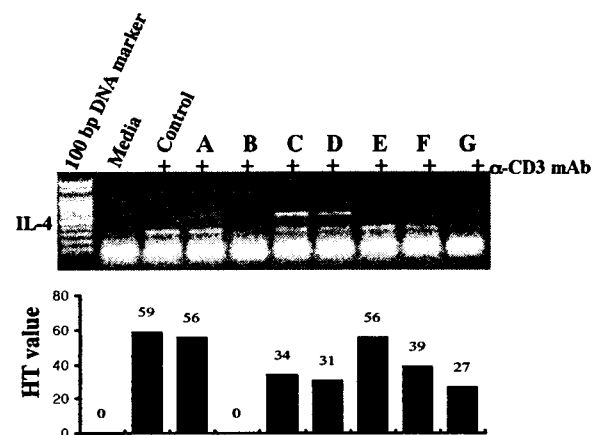


Fig. 2. Synergistic effects of B1-B7 extract on IL-4 mRNA expression in mouse T- lymphocytes.

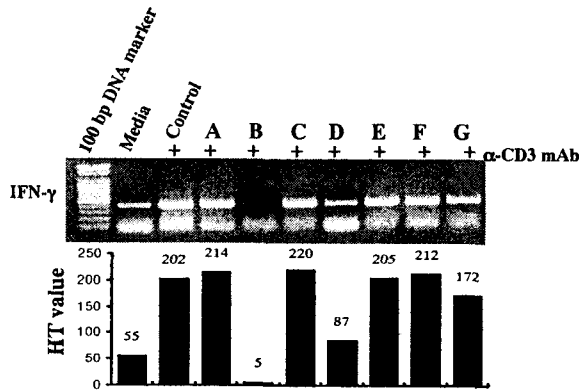


Fig. 3. Synergistic effects of B1-B7 extract on IFN-gamma mRNA expression in mouse T-lymphocytes.

4) CD28 遺傳子 發顯에 미치는 影響

正常 C57BL/6 생쥐의 T 細胞를 分離하여 anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb, 그리고 각각의 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7(100 μ g/ml)을 同時 培養하여 T 細胞活性化의 相乘 效果를 觀察하기 위하여 CD28 遺傳子 發顯을 觀察한 結果, 무처리(media) T 細胞의 CD28 遺傳子 發顯의 Ht 값이 136으로 나타났고, anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb로 同時 刺戟한 對照群은 158로 나타나 무처리군에 비하여 소폭의 增加를 나타내었다. 여기에 B1 投與群은 163, B2 投與群은 0, B3 投與群은 149, B4 投與群은 165, B5 投與群은 135, B6 投與群은 146, B7 投與群은 113으로 觀察되었다(Fig. 4).

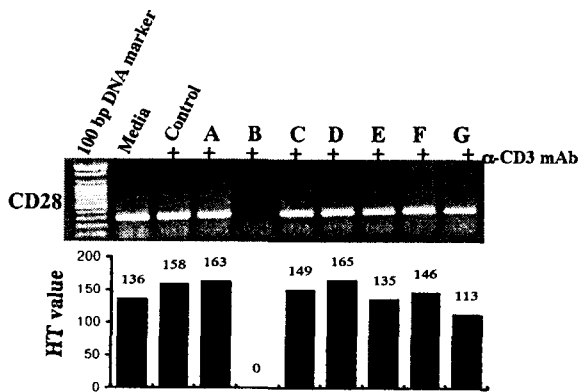


Fig. 4. Synergistic effects of B1-B7 extract on CD28 mRNA expression in mouse T-lymphocytes. Mouse T lymphocytes were transferred to 24-well plates with coating with anti-CD3 mAb (1mg/ml) and co-cultured in medium supplemented with 100 mg/ml of B1-B7(A-G) for 6 hrs. Amplified CD28 PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel and internal control (b-actin) and the analysis (HT) was used to 1D-density program and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods

2. 脾臟 免疫細胞 活性化에 미치는 影響

1) 免疫活性化 CD3⁺/CD25⁺ T 細胞數 變化

무처리군의 CD3⁺/CD25⁺ 細胞數는 4.3%로 나타난 반면,

anti-CD3 mAb와 anti-CD28를 同時 培養한 對照群(control)의 CD3⁺/CD25⁺ 細胞數는 31.8%로 增加하였다. Anti-CD3 mAb와 anti-CD28, 그리고 B1, B5 同時 投與群은 CD3⁺/CD25⁺ 細胞數가 각각 42.3%, 40.1%로 對照群에 비하여 相乘效果가 觀察되었다. 반면 B2, B3, B4 同時 投與群에서는 각각 31.1%, 38.7%, 32.4%로 나타나 對照群에 비하여 相乘效果가 觀察되지 않았다. 또한 B6, B7 同時 投與群은 35.6%, 38.6%로 나타나 對照群에 비하여 소폭의 相乘效果가 觀察되었다(Fig. 5-7).

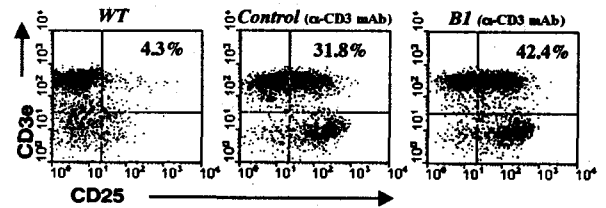


Fig. 5. Effects of B1 extract on CD3⁺/CD25⁺ expression by anti-CD3-stimulated mouse cultured splenocytes. Mouse splenocytes were transferred to 24-well plates with coating with anti-CD3 mAb (1mg/ml) and co-cultured in medium supplemented with 100 mg/ml of B1 for 48 hrs. After 48hrs, The splenocytes were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD3e-FITC versus CD25-PE. WT : Normal C57BL/6 mice of splenocytes Control : Splenocytes + anti-CD3 mAb B1 : Splenocytes + anti-CD3 mAb + B1 (100 mg/ml)

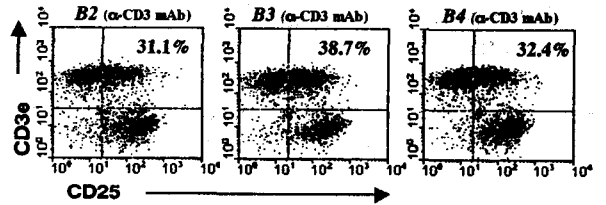


Fig. 6. Effects of B2, B3 and B4 extract on CD3⁺/CD25⁺ expression by anti-CD3-stimulated mouse cultured splenocytes.

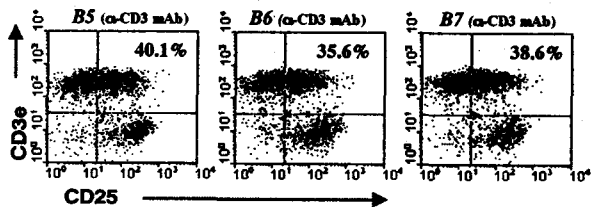


Fig. 7. Effects of B5, B6 and B7 extract on CD3⁺/CD25⁺ expression by anti-CD3-stimulated mouse cultured splenocytes.

2) 免疫活性化 CD3⁺/CD69⁺ T 細胞數 變化

무처리군의 CD3⁺/CD69⁺ 細胞數는 2.3%로 나타난 반면, anti-CD3 mAb와 anti-CD28를 同時 培養한 對照群의 CD3⁺/CD25⁺ 細胞數는 27.8%로 增加하였다. Anti-CD3 mAb와 anti-CD28, 그리고 B1, B3, B5, B6, B7 同時 投與群은 각각 40.6%,

36.2%, 38.4%, 35.1%, 34.8%로 나타나 相乘效果가 觀察되었다.

이와는 달리 Anti-CD3 mAb와 anti-CD28, 그리고 각각 B2, B4 同時 投與群의 CD3e⁺/CD69⁺ 細胞數는 각각 29.5%, 28.4%로 나타나 對照群과 큰 差異가 없었다(Fig. 8-10).

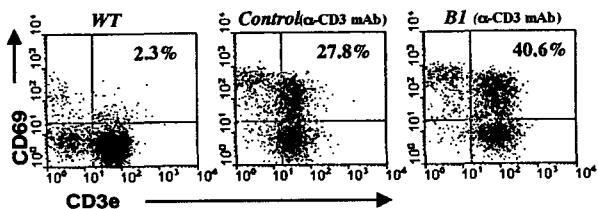


Fig. 8. Effects of B1 extract on CD3⁺/CD69⁺ expression by anti-CD3-stimulated mouse cultured splenocytes. Mouse splenocytes were transferred to 24-well plates with coating with anti-CD3 mAb (1mg/ml) and co-cultured in medium supplemented with 100 mg/ml of B1 for 48 hrs. After 48hrs, The splenocytes were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD3e-PE versus CD69-FITC. WT : Normal C57BL/6 mice of splenocytes Control : Splenocytes + anti-CD3 mAb B1 : Splenocytes + anti-CD3 mAb + B1 (100 mg/ml).

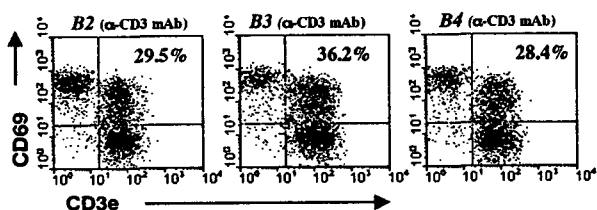


Fig. 9. Effects of B2, B3 and B4 extract on CD3⁺/CD69⁺ Expression by anti-CD3- stimulated mouse cultured splenocytes.

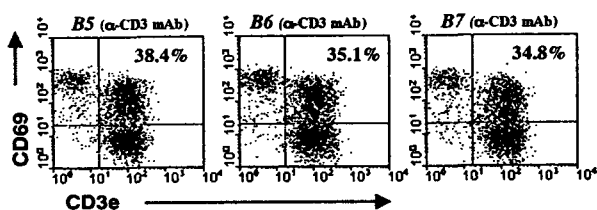


Fig. 10. Effects of B5, B6 and B7 extract on CD3⁺/CD69⁺ expression by anti-CD3- stimulated mouse cultured splenocytes.

3) 免疫活性化 CD19⁺/CD44⁺ B 細胞數 變化

무처리군의 CD19⁺/CD44⁺ 細胞數는 10.4%로 나타난 반면, anti-CD3 mAb와 anti-CD28를 同時 培養한 對照群의 CD19⁺/CD44⁺ 細胞數는 14.3%로 增加하였다. Anti-CD3 mAb와 anti-CD28, 그리고 B1 同時 投與群은 24.1%로 對照群에 比하여 相乘效果가 觀察되었다.

B2, B3, B4, B6 同時 投與群의 CD19⁺/CD44⁺ 細胞數는 각각 17.2%, 18.3%, 21.3%로 對照群에 比하여 소폭의 相乘效果가 나타났고(Fig. 12, 13), B5, B7 同時 投與群은 13.7%, 4.3%로 나타나 對

照群과 차이가 없었다(Fig. 11-13)

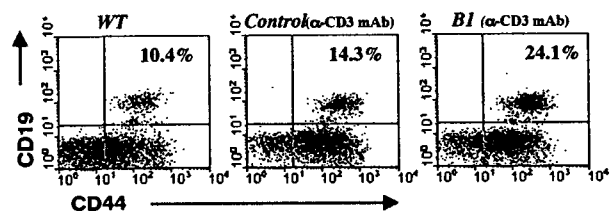


Fig. 11. Effects of B1 extract on CD19⁺/CD44⁺ expression by anti-CD3- stimulated mouse cultured splenocytes. Mouse splenocytes were transferred to 24-well plates with coating with anti-CD3 mAb (1mg/ml) and co-cultured in medium supplemented with 100 mg/ml of B1 for 48 hrs. After 48hrs, The splenocytes were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel were backscattered onto a dot-plot of CD44-PE versus CD19-FITC. WT : Normal C57BL/6 mice of splenocytes Control : Splenocytes + anti-CD3 mAb B1 : Splenocytes + anti-CD3 mAb + B1 (100 mg/ml).

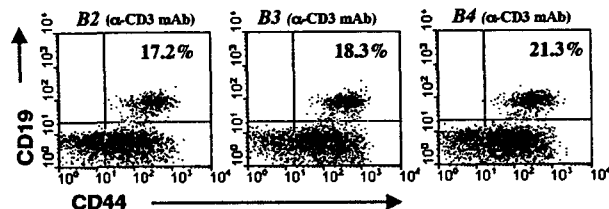


Fig. 12. Effects of B2, B3 and B4 extract on CD19⁺/CD44⁺ expression by anti-CD3- stimulated mouse cultured splenocytes.

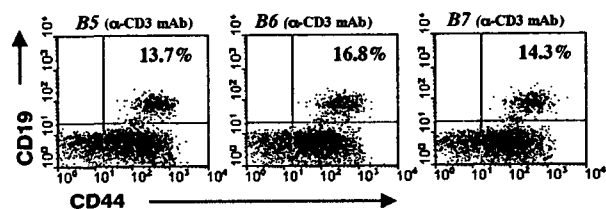


Fig. 13. Effects of B5, B6 and B7 extract on CD19⁺/CD44⁺ expression by anti-CD3- stimulated mouse cultured splenocytes.

고 찰

韓醫學에서 癌에 대한 治療는 體内の 正氣를 補強함으로써 抗病 能力을 增進시키는 扶正培本法과 洋方の 化學療法처럼 直接 癌細胞를 殺傷하는 祛邪法 및 이 두가지 方法을 적절히 配合시킨 扶正祛邪法 등^{11,12)}으로 大別되는데, 現在 大部分 患者가 中期 以後로 韓醫學의 治療法을 選擇하고 있어 扶正祛邪法이 가장 많이 活用되고 있다.

특히 癌의 重要 特徵중 하나인 轉移로 인하여, 特定 部位뿐 만 아니라 全身性 疾患으로 轉換됨에 따라 韓醫學에서는 全體的 인 病理 現象 克服에 초점을 두고 있으며, 大部分의 癌患者가 韓醫學의 治療 당시 共通적으로 나타나는 惡液質과 더불어 抗癌劑,

放射線 治療 過程中 나타나는 消化障礙 등 많은 副作用^{2,3)}을 呼訴하고 있어 이에 대한 治療 對策을 講究하고 있다.

實驗的 研究도 上記 背景에 의해 進行되고 있으며, 洋方과는 달리 韓方의 特性화된 治療 領域을 살리면서 治療 效果를 極大化 할 수 있는 藥物間의 相互作用에 대한 研究도 深度있게 進行되고 있다.

本 實驗에서도 效果의인 抗癌 處方 開發의 基本 作業으로 扶正培本方(B1)과 活血化癥方(B2), 清熱解毒方(B3)을 單獨(B1) 혹은 相互加味(B4;B1+B2, B5;B1+B3, B6;B1+B2+B3, B7;B2+B3)하여 實驗 處方으로 構成하였다.

먼저 扶正培本方은 十全大補湯을 基本方으로 하였는데, 이는 十全大補湯과 加味方의 '免疫 調節作用'과 '難治性 疾患에 대한 活用'에 대하여^{13,14)} 이미 수 차례 報告된 바가 있고, 十全大補湯加味方의 有意性있는 抗癌 作用이 報告^{15,16)}된 바가 있어 이를 基準으로 選定하였다.

活血化癥法은 血液循環을 促進하며 血管을 擴張시켜 微循環을 改善시킴으로써 結締組織의 增殖을 抑制하여 腫瘍의 成長 및 轉移를 抑制함과 아울러 腫瘍을 縮小시키는 作用을 하는데, 臨床에서 癌患者가 正常人에 비하여 全血粘度, 赤血球電泳時間, fibrinogen 및 赤血球 沈降率 등이 높고^{17,18)}, 癌患者에서 血小板 過少症이 자주 發生한다는 점¹⁹⁾은 活血化癥法이 癌의 重要 治療法이 될 수 있음을 示唆하고 있다.

本 實驗에서 活血化癥方은 李²⁰⁾의 實驗 成績에 準하여 鷄血藤, 蘇木, 丹蔘으로 構成하였는데, 이들의 本草學의 效能과 抗癌 關聯 實驗 報告를 살펴보면 다음과 같다.

鷄血藤은 行血補血, 舒筋活絡 作用으로 月經不調, 關節疝痛, 手足麻痺 등을 治하며²¹⁾, 이에 대한 研究로 허²²⁾는 U937 細胞에서 apoptosis에 미치는 影響을, 이²³⁾는 抗炎 活性效果를, 오²⁴⁾는 免疫 調節效果를 각각 報告한 바가 있다.

蘇木은 行血破瘀, 消腫止痛 作用으로 經閉痛經, 產後瘀阻, 胸腹刺痛 등을 治하며²¹⁾, 이에 대한 研究로 허²⁵⁾는 血管 新生 抑制效果를, 이²⁶⁾는 口腔癌 및 골육종 세포주에 대한 抗癌作用을, 진²⁷⁾은 Topo-1 活性 阻害 및 細胞毒성을, 남²⁸⁾은 A549 肺癌 세포주에 대한 抗癌 作用 機轉을 각각 報告한 바가 있다.

丹蔘은 活血祛瘀, 養血消癥, 除煩安神 作用으로 月經不調, 經閉痛經, 癥瘕積聚, 胸腹刺痛 등을 治하고²¹⁾, 최²⁹⁾와 정³⁰⁾은 抗癌性에 대한 研究를, 엄³¹⁾, 이³²⁾, 金³³⁾ 등은 免疫 反應 調節에 미치는 影響을, 李³⁴⁾는 丹蔘의 抗癌活性 物質로 Tanshione IIa를 探索한 바가 있다. 특히 李²⁰⁾는 本 實驗과 同一한 活血化癥 處方과 七葉一枝花의 抗癌活性, 抗轉移 作用, 免疫 調節作用에 대한 檢索을 통하여 丹蔘, 鷄血藤, 蘇木으로 이루어진 活血化癥方이 특히 卵巢 癌에 강한 細胞毒성과 複合基質에서의 附著 阻止作用, MMP-2 活性 抑制作用, 血管 形成 抑制作用 및 血小板 凝集 抑制作用 등에서 매우 有意性있는 結果가 導出되어 항 후 瘀血을 同伴한 多様な 疾患과 下腹部 女性 癌에 效果의으로 應用될 수 있음을 言及한 바가 있다.

清熱解毒藥物은 大部分 抗腫瘍 活性物質을 含有하고 있으며, 단순히 癌細胞의 分裂를 抑制할뿐만 아니라, 直接 癌細胞를

殺傷시키기도 하며, 몇몇 藥物들은 生體의 免疫防禦機能을 增強시켜 抗癌 活性 作用을 만들어내는 것이 報告되기도 하였다³⁵⁾. 또한 臨床에서도 清熱解毒藥은 癌을 發展시키고, 病情을 惡化시키는 要素 中の 하나인 炎症과 感染을 豫防 治療하여, 患者의 病情과 辨證에 根據해서 多用되고 있다.

清熱解毒方 構成 藥物인 紫草는 解毒透疹, 涼血活血 作用으로, 癩疹, 痲疹, 吐血, 衄血, 癰疽 등을 治하고³⁶⁾, 이에 대한 研究로 Sankawa U³⁷⁾는 S-180 腹水癌 抑制를 통한 92.5% 生命延長 效果를, 路³⁸⁾는 胃癌 및 食道癌 細胞의 成長 및 分裂 抑制效果를, Noble R.L.³⁹⁾은 白鼠의 自發性 乳腺癌 發病率 抑制效果를, 組⁴⁰⁾는 HeLa 細胞 DNA 合成(후기-G期) 抑制作用을 각각 報告한 바가 있다.

阿魏는 化癥消積, 殺蟲, 截瘡 作用으로 癥瘕積聚, 胸腹脹滿, 疝疾, 痢疾 등을 治하며³⁶⁾, 貴筋羽는 解毒消腫, 破血痛經 作用으로 癥瘕, 心腹疼痛, 痛經, 瘡腫 등을 治하고³⁶⁾, 이에 대한 研究로 박⁴¹⁾은 鬼筋羽 petroleum ether 抽出物의 細胞毒性에 대한 研究가 있다. 특히 阿魏, 紫草, 貴筋羽는 모두 清熱解毒과 活血化癥 作用을 同時에 지니고 있어 特히 癌에 效果의일 것으로 思料된다. 韓醫學에서 腫瘍 形成은 人體 內部的 正■邪鬪爭의 過程으로 보고, 그 發病은 주로 人體의 正氣虧虛 후 外邪가 虛를 틈타 侵入하여 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結 및 經絡瘀滯 등의 일련의 病理變化가 나타나고, 이러한 變化가 單獨 혹은 相互 錯雜되면서 나타난 結果로 認識하고 있다^{42,43)}.

內經의 “正氣在內 邪不可干” “邪氣所湊 其氣必虛” “邪氣所在 皆爲不足” 등에서 나타난 바와 같이, 正氣를 內外部로부터 病邪에 對抗하는 抵抗力으로 보았고, 邪氣를 各種 發病 因子와 病理的 損害 因子로 認識하여, 上記한 人體 內部的 正■邪鬪爭의 過程을 免疫 概念으로 解釋하고 있다. 이는 人體와 內外 環境間의 協助과 均衡을 重要視하는 整體 觀念의 生命觀에서 비롯되었다고 볼 수 있는데, 이러한 理論的 背景과 最近 報告되고 있는 多様な 臨床 結果 등은 韓醫學의 免疫學의 癌 治療의 無限한 可能性을 提示해 주고 있다.

羌⁴⁴⁾은 論文에서 “國內外 韓醫界에서 腫瘍의 免疫學의 接近은 窮極의으로 生物學的 反應 調節 物質(biological response modifiers; BRM)의 生體內 誘導 및 자연스런 放出을 통한 免疫能의 向上과 調節로 歸結된다. … 既存의 扶正培本の 藥物뿐만 아니라 清熱解毒, 活血化癥 등 作用을 하는 藥物들도 免疫 增進 또는 調節을 통한 一定한 抗腫瘍 效果를 가지고 있다는 점과, 여러 單方 및 複方製劑가 直接的인 腫瘍殺害能 뿐만 아니라 동시에 免疫 增進效能을 가지고 있다는 점이다.”라고 하여 免疫 調節을 통한 癌 治療가 韓醫學의 特色을 가장 잘 反影하고 있음을 多様な 資料를 통하여 立證한 바가 있다.

韓醫學에서 免疫 調節, 혹은 增加를 통한 抗癌 效果에 대한 實驗的 研究는 1990년 初盤을 前後하여 本格的으로 實施되었는데, 이는 免疫學과 分子生物學의 發展과 軌를 같이하고 있다.

洋方에서 免疫學의 癌 治療法에 대한 研究는 現在 使用되고 있는 化學 療法이나 放射線 療法 등이 完璧한 治療 成果를 거두지 못하고, 多様な 副作用을 誘發시키며, 再發의 確率이 높다는

점과 腫瘍 周圍에 T 細胞, NK 細胞 그리고 大食 細胞들이 浸潤 되어 있는 점에 準하여 多樣하고 深度있게 進行되고 있다.

臨床에서 免疫 缺乏症候群이나 免疫 抑制療法를 받은 患者 가 림프계, 망내계 腫瘍을 中心으로 하는 發癌의 頻도가 크고, 免疫能이 低下되는 老年과 免疫 體系가 未成熟된 新生兒期에서 癌의 發生이 높은 事實⁴⁵⁾ 등도 免疫學的 治療法의 重要性을 示唆해 주고 있다.

免疫療法는 특이 T 細胞 클론으로 正常 組織은 損傷시키지 않고 微細 殘存 腫瘍細胞까지 殺害시키며, 自己 恒常性을 통하여 再發을 防止케 할 수 있는 長點을 지님으로써 東洋醫學의 全體의 이고 綜合的인 生命觀과 類似함을 지니고 있다.

癌 治療에 있어 免疫反應은 주로 cytotoxic T 림프구가 癌細胞의 MHC class I 抗原과 結合된 兩抗原을 認識함으로써 이루어지며, 이러한 cytotoxic T 림프구의 完全한 活性化를 위해 helper T 림프구로부터 生成된 lymphokines(특히 IL-2)의 도움이 필요 하다⁴⁶⁾. 이러한 可視的 結論은 이미 많은 實驗을 통해 證明되었고, 現在도 持續적으로 研究되어지고 있다. 免疫 反應에 中樞的인 役割을 擔當하는 T 細胞는 多樣한 抗原에 대하여 特異的인 T 細胞 수용체들을 가지고 있어, APC에 의해 傳達되는 抗原由來 peptide 에 特異的인 T 細胞만이 活性化되는 抗原 認識 過程을 통해, 이 후 展開되는 免疫 反應에 必要한 cytokine들의 分泌와 活性化된 T 細胞 clone 增殖이 일어나게 된다^{46,47)}. 특히 T 細胞 表面에 發顯하는 T 細胞 수용체(T cell receptor; TCR)가 抗原을 認識하여 細胞 內부로 信號를 傳達하는 過程은 여러 가지 細胞 內 信號 傳達 過程을 거쳐 遺傳子 發顯에 影響을 미치므로, 免疫 反應 調節 機構을 理解하기 위해서는 正確한 T 細胞 活性化 機構을 밝히는 研究가 先行되어야 한다.

現在까지 알려진 바로는, 抗原 認識 후 T 細胞 수용체의 CD3 복합체 및 CD28과 같은 costimulatory molecule을 통해 細胞 內부로 信號가 傳達되면 Fyn, Lck 등의 tyrosine kinase 들의 活性化가 일어나고, 이들에 의한 여러 가지 蛋白質들의 磷酸化(phosphorylation)를 통해 多樣한 信號 傳達 過程을 거쳐 NFAT, NF- κ B나 AP-1과 같은 transcription factor를 活性化시킴으로써 結局 遺傳子 發顯의 變化와 T 細胞 活性化를 並行하게 된다^{46,48)}. 그리고 TCR/CD3 complex나 CD2 經路를 통해 刺戟된 T 細胞 活性化와 CD28을 통해 刺戟된 T 細胞 增殖 反應은 IL-2나 phorbol ester에 의한 Ca^{2+} 非依存型 T 細胞 活性化로 나눈다⁴⁹⁾. T 細胞가 TCR/CD3 ligation에 의해 活性化 될 때 IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α , INF- γ , GM-CSF, c-myc, c-rel, IL-2Ra, IL-4R 遺傳子의 發顯이 增加되고, 細胞 表面 分子인 CD69, CD25, CD44, CD28등이 增加하게 된다. T 細胞 活性化는 CTL 細胞로의 增殖, 炎症이나 癌細胞 killing에 必須인 것으로 알려져 있다^{47,48)}.

T 細胞 活性化에 聯關된 信號 傳達에 作用으로는, 現在까지 最少 네 종류가 밝혀져 있는 FKBP (FKBP12, 13, 25, 59)에 特異的으로 結合한다고 알려진 바 있다. 이 FKBP는 peptidylprolyl cis/trans isomerase 또는 rotamase 活性를 가져 蛋白質의 folding에 關與하지만 이는 免疫 抑制 機能과는 直接的인 聯關이 없고, tacrolimus와 FKBP의 結合體가 免疫 機能에 必須的인 役割을 하

는 또 다른 기질과 結合함으로써 免疫 抑制 機能을 나타내는 것으로 알려져 있다. Tacrolimus /FKBP 結合體는 calcineurin의 B subunit과 A subunit의 catalytic region에 結合하여 이 蛋白質이 가지고 있는 phosphatase 活性를 抑制한다.

Calcineurin의 기질 중 하나는 transcription factor인 NF-ATc인데 그 nuclear counterpart인 NF-ATn과 일단 結合한 후 Oct-1, NF- κ B, AP-1과 마찬가지로 IL-2 promoter/enhancer에 作用한다. Transcription factor들이 結合하여 IL-2 遺傳子 transcription을 調節하는 部位는 transcription 개시 위치의 upstream으로 약 300bp 정도가 된다. 다른 transcription factor들이 多樣한 種類의 細胞들에 存在하는 반면 NF-AT는 活性化된 lymphocyte에서만 發見된다고 알려져 있다. Ca^{2+} 依存的 細胞 活性化時 calcineurin은 NF-ATc를 dephosphorylation 시키며 그에 따라 NF-ATc는 核 內으로 移動하게 되어 NF-ATn과 結合하고 이 complex가 DNA에 結合하여 IL-2 遺傳子의 轉寫를 促進한다.

本 研究에서는 생쥐의 脾臟細胞를 分離하여 anti-CD3 抗體와 anti-CD28 抗體로 刺戟하여 T 細胞 活性化를 시키고, 本 實驗의 試料을 處理하여 活性化 相乘 效果를 分析한 결과, IL-2 發顯에서는 B1 投與群과 B6 投與群에서 相乘效果가 觀察되었다(Fig. 1). 그러나 IL-4 發顯에서는 B1, B5 投與群이 타 實驗 處方に 비하여 相對적으로 높은 數値가 나타났으나 相乘 效果는 認定되지 않았다(Fig. 2). IFN- γ 遺傳子 發顯에서는 B3, B1, B6, B5 投與群 순으로 遺傳子 發顯을 增加시켰으며(Fig. 3), CD28 遺傳子 發顯에서는 B1, B5 投與群에서 增加를 나타내었다(Fig. 4). FACS에 의한 免疫活性化 $CD3^+$ / $CD25^+$ T 細胞數 變化에서는 B1, B5 投與群이 對照群에 비하여 相乘效果가 觀察되었으며(Fig. 5-7), $CD3^+$ / $CD69^+$ T 細胞數 變化에서는 B1, B3, B5, B6 投與群이 對照群에 비하여 相乘效果가 觀察되었다(Fig. 8-10). 免疫活性化 $CD19^+$ / $CD44^+$ B 細胞數 變化에서는 B1, B6 投與群에서 相乘效果가 觀察되었다(Fig. 11-13).

生體內에서 免疫 T 細胞 活性化는 抗癌 作用과 自家免疫疾患의 治療와 緩和에 必需的인 作用으로 $CD8^+$ T細胞와 natural killer 細胞에 의하여 作動되는 CTL 活性度(51 Cr release assay)를 測定함으로써 알 수 있다. 따라서 本 實驗의 結果에서 B1과 B6 投與群의 IL-2와 IFN- γ 發顯量의 相乘效果는 Th1 細胞의 活性化로 CD28과 CTLA, 그리고 dendritic (DC) 細胞의 B7 (CD80)과 B7-1 (CD86)의 相互作用으로 發顯되는 싸이토키인과 TCR을 통하여 $CD8^+$ T細胞와 natural killer 細胞를 活性化시켜 癌細胞를 殺害시킨다고 思料된다.

전체적으로 韓醫學的인 면에서 보면 扶正培本方 혹은 加味方이 關聯 遺傳子 發顯 및 免疫活性化 T 細胞에 가장 效果的인 을 알 수 있었다. 이는 지금까지의 效果的인 免疫 抗癌 處方 및 藥物에 대한 實驗 統計 處理에서 扶正培本方 및 扶正培本藥物이 가장 많은 점과 附合된다.

결 론

效果的인 新規 抗癌 處方 開發의 基本 作業으로 扶正培本方

(B1)과 活血化癥方(B2), 清熱解毒方(B3)을 單獨(B1) 혹은 相互加味(B4;B1+B2, B5;B1+B3, B6;B1+ B2+B3, B7;B2+B3)하여 脾臟細胞內 T 細胞의 活性化를 評價하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

IL-2 遺傳子 發顯에서는 B1, B6 投與群에서 對照群에 비하여 增加하였고, IL-4 遺傳子 發顯에서는 모든 實驗群에서 對照群과 차이가 나타나지 않았으며, IFN- γ 遺傳子 發顯에서는 B3, B1, B6, B5 投與群에서 對照群에 비하여 增加하였다. CD28 遺傳子 發顯에서는 B1, B5 投與群에서 對照群에 비하여 增加하였고, 免疫活性化 CD3⁺/CD25⁺ T 細胞數는 B1, B5 投與群이 對照群에 비하여 增加하였으며, CD3⁺/CD69⁺ T 細胞數는 B1, B3, B5, B6 投與群이 對照群에 비하여 增加하였다. CD19⁺/ CD44⁺ B 細胞數는 B1, B6 投與群에서 對照群에 비하여 增加하였다.

이상의 결과로 보아 扶正培本方 혹은 加味方이 關聯 遺傳子 發顯 및 免疫活性化 T 細胞에 가장 效果의임을 알 수 있었다. 또한 活血化癥方의 構成 藥物인 丹蔘, 鷄血藤, 蘇木은 韓醫學의 理論이나 既存의 實驗 結果로 비추어 볼 때 尙 후 臨床의 活用度가 높을 것으로 思料된다.

참고문헌

1. 全國醫科大學教授 譯 : 오늘의 診斷과 治療, 圖書出版 한우 리, p.701, pp. 78-89, 1999.
2. Dalla Via L., Marciari Magno S. Photochemotherapy in the treatment of cancer, *Curr Med Chem.* 8(12):1405-18, 2001.
3. 宋昊哲 : 加味蔘苓白朮散 용매 분획의 抗轉移 및 抗癌活性에 대한 研究, 大田大學校 博士學位論文, 2001.
4. 李世珍 : 五味子の 免疫調節作用 및 L1210 細胞의 Apoptosis 에 미치는 效果, 又石大學校 大學院, 碩士學位論文, 2002.
5. 崔宇鎮 外 : 冬蟲夏草의 抗轉移와 免疫增進에 關한 研究, 大田大學校 碩士學位論文, 2000.
6. 徐珠源 : 枸杞葉藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響, 鍼灸學會誌, 13(2), p.280, 1999.
7. 金聖勳 外 : 白花蛇舌草 핵산 分割과 多糖體가 抗癌 및 抗轉移에 活性化에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 13(1), pp.65-75, 1999.
8. 민영규 : 清熱大補湯의 免疫調節作用을 통한 抗腫瘍效果, 大田大學校 碩士學位論文, 2001.
9. 남향우 외 : 卷柏의 caspase-3 活性化를 통한 HL-60 細胞에서 細胞死滅 誘導 效果, 東醫生理病理學會誌, 17(3):751-758, 2003.
10. 정영목 외 : HL-60 白血病 細胞의 細胞枯死에 미치는 槲根白皮의 效果, 東醫生理病理學會誌, 17(4):914-922, 2003.
11. 손창규 외 : 癌 治療에 있어서 扶正祛邪法의 運用에 關한 考察, 大韓韓方內科學會誌, 제16권 제2호, pp. 30-35, 1995.
12. 李佩文 : 如何正確選用抗癌中成藥, 中醫雜誌, 第9期, pp. 46-48, 1989.
13. 黃忠端 : 十全大補湯加 鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 博士學位論文, 1989.
14. 高漢權 : 十全大補湯이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T細胞數에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文, 1999.
15. 李永宇 外 : 四君子湯·四物湯, 十全大補湯 및 補中益氣湯이 Cisplatin 投與로 誘發된 體重減少와 血液變化에 미치는 影響, 圓光韓醫學, Vol.2, No.1, p.155, 1992.
16. 황규동 외 : 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 關한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol.2, No.1, p.1, 1996.
17. 郁仁存 : 活血化癥與腫瘍治療, 實用中西醫結合雜誌, Vol. 4, No.3, pp.189- 192, 1991.
18. 應榮多 : 活血化癥治則與抗腫瘤研究, 全國第2次中西腫瘍防治 研究協作會議資料, 1981.
19. 陳健民 : 惡性腫瘤活血化癥治療, 中國中西醫結合研究會主編 腫瘍防治研究發展學習班講義, p.98, 1986.
20. 李鎬在 : 七葉一枝花 및 加味複合方의 抗癌活性, 抗轉移作用 및 免疫調節作用에 關한 研究, 大田大學校 博士學位論文, 2003.
21. 전국한의과대학 본초학교수 : 본초학, 영림사, p.419, p.438, p.445, 1991.
22. Ha Eun-Suk : Effect of methylene chloride fraction of spatholobi caulison on apoptosis in U397 cells, 경희대학교 석사학위 논문, 2002.
23. 이진훈 : 鷄血藤의 抗炎症活性 效果, 강원대학교 석사학위 논문, 1999.
24. 오형숙 : 鷄血藤 抽出物이 생쥐의 造血 및 免疫作用에 미치는 影響, 대전대학교 박사학위 논문, 2000.
25. 허정원 : 蘇木 分割의 血管 形成 抑制에 關한 研究, 경희대학교 석사학위 논문, 2002.
26. 이종수 : 蘇木 抽出物의 口腔癌 및 骨肉腫 세포주에 대한 抗癌作用에 關한 研究, 경희대학교 박사학위 논문, 2001.
27. 진원경 : 蘇木 抽出物의 抗菌活性, Topo-1 阻害, 細胞毒性 效果와 마우스를 이용한 急性 毒性 實驗에 關한 研究, 건국대학교 석사학위 논문, 1998.
28. 남용재 : 蘇木 抽出物이 A549 肺癌 세포주에 미치는 抗癌作用 機轉에 關한 研究, 우석대학교 박사학위 논문, 2002.
29. 최선미 : 丹蔘의 抗癌活性和 Apoptosis에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위 논문, 2000.
30. 정국찬 : 丹蔘의 抗癌성에 關한 研究, 고려대학교 박사학위 논문, 2000.
31. 엄승열 : 丹蔘이 마우스 T-lymphocyte 및 macrophage에 미치는 影響, 우석대학교 석사학위 논문, 1998.
32. 이성미 : 丹蔘 抽出物의 免疫 調節 潛在力, 부산대학교 석사학위 논문, 1998.
33. 김삼용 : 丹蔘 抽出物의 免疫反應 調節 潛在力 : 마우스의 싸이토카인 遺傳子 發顯의 亢進, 부산대학교 석사학위 논문, 1998.
34. 이권익 : 丹蔘의 抗癌效果와 活性 物質 分離에 關한 研究, 대전대학교 박사학위논문, 1996.

35. 조종관 : 韓方臨床腫瘍學, 周珉出版社, pp.481-485, 2001.
36. 國家中醫藥管理局 : 中華本草, 上海科學技術出版社, 5(177-179), 5(945- 949), 6(525-530), 1999.
37. Sankawa U., et al. *Chem Pharm Bull*, 25(9):2392, 1977.
38. 로계영 : 中西醫結合雜誌, 10(7):422, 1990.
39. Noble R.L. et al. *J. Endocrinol*, 10:212, 1954.
40. 조배실 : 吉林醫科大學惡性腫瘤資料, p.45, 1974.
41. 朴相鎬 : 鬼箭羽 Petroleum ether 抽出物の 細胞毒性에 關한 研究, 우석대학교 석사학위논문, 1995.
42. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
43. 孫孝洪 : 中醫治療學原理, 四川科學技術出版社, pp.155-157, 196-197, 228-229, 386-395, 513-519, 538-541, 565-566, 593-597, 631-633, 1990.
44. 강연이 : 韓醫學의 抗腫瘍 免疫治療에 關한 研究, 대전대학교 박사학위논문, 2003.
45. Jae-Hyuck Shim, Heung-Kyu Lee, Eun-Joo Chang, Wook-Jin Chae, Duck-Jong Han, Morio Tomohiro, Jung-Jin Yang and Sang-Kyou Lee. Immunosuppressive effects of tautomycetin in vivo and in vitro via T cell-specific Apoptosis Induction. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* Vol 99, no. 16, 10617-10622, 2002.
46. Tomohiro Morio, Silva H. Hanissian, Leonard B. Bacharier, Hirobumi Teraoka, Shigeaki Nonoyama, Makoto Seki, Jun Kondoh, Hiroyasu Nakano, Sang-Kyou Lee. Ku in the Cytoplasm Associates with CD40 in Human B Cells and Translocates into the Nucleus Following Incubation with IL-4 and Anti-CD40 mAb. *Immunity*, Vol. 11, 339-348, 1999.
47. Yi-Sub Kwak, Sang-Kyou Lee, Il-young Paik. The Effects of Prolonged Exercise on Blood Lipid Levels and Immune Response in RICO RAT. *Korean Journal of Immunology*. Vol. 22. 2. 87-95, 2000.
48. WookJin Chae, JinHwan Han, SangWon Kim, YoungSup Song, KyungMin Cho, MyungChull Rhee, and Sang-Kyou Lee. Analysis of Interaction between Vav and TcR Chain in Jurkat T cell Activation. *Korean Journal of Immunology*. Vol. 21, 4 369-375, 1999.