

원저

白鼠의 B16-F10 Melanoma에 대한 旱蓮草藥鍼의 抗癌 및 免疫增強效果

박정현 · 김영일 · 홍권의 · 임윤경 · 이현 · 이병렬

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effect of Anti-Cancer and Immune Response Improvement of ELP(*Ecliptae Herba*) Herbal-Acupuncture into *Chung-wan*(CV12)

Park Jung-hyeun, Kim Young-il, Hong Kwon-eui, Yim Yun-kyoung,
Lee Hyun and Lee Byung-ryul

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objective & Methods : To study the effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement of herbal-acupuncture with *Eclipta prostrata diffusae* herba infusion solution(ELP-HAS), we injected ELP-HAS into *Chung-wan*(CV12) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

We have reached the following conclusion through the effect on the percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in mouse PBMCs, the effect on the pulmonary colony formation number, and the effect on MST(Median Survival Time) and ILS(Increase of Life Span) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

- 접수 : 2004년 10월 11일 · 수정 : 2004년 11월 26일 · 채택 : 2004년 11월 27일
· 교신저자 : 이병렬, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 침구학교실
Tel. 042-280-2641 E-mail : acup@dragon.taejon.ac.kr

Results : The results were obtained as follows :

1. In the experiment groups treated with ELP(*Ecliptae Herba*) Herbal acupuncture, the spleen cell proliferation in BALB/c mouse was significantly increased compared with control group.
2. In the experiment groups treated with ELP(*Ecliptae Herba*) Herbal acupuncture, the percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in C57BL/6 mouse PBMCs was increased compared with control group.
3. In the experiment groups treated with ELP(*Ecliptae Herba*) Herbal acupuncture, the pulmonary colony formation number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma was decreased significantly compared with control group.
4. In the experiment groups treated with ELP(*Ecliptae Herba*) Herbal acupuncture, MST(Median Survival Time) and ILS(Increase of Life Span) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma were increased significantly compared with control group.

Conclusions : ELP Herbal acupuncture injection into Chung-wan(CV12) of C57BL/6 mice is considered to be effective in anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement

Key words : *Ecliptae Herba*(ELP), Herbal acupuncture, Chung-wan(CV12), anti-cancer, immune response improvement

I. 緒 論

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機能이며, 外部로부터 侵入하는 微生物 혹은 同種의 組織이나 生體에 생긴 不必要한 産物 등과 反應하고, 또한 이를 除去함으로써 그 個體의 恒常性(homeostasis)을 維持하는 現象이다¹⁾.

韓醫學에서는 《素問·刺法論》²⁾에 “五疫之至…正氣存內 邪不可干”, 《素問·評熱病論》²⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”, 《素問·百病始生篇》²⁾에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人 卒然逢疾風暴雨而不病者 皆無虛 故邪不能獨傷人”이라 하였으니 이는 疾病의 成立 過程中 生體의 抵抗力으로서의

正氣의 重要性을 強調한 것으로 西洋醫學에서의 免疫 機能의 概念과 類似하다³⁾.

腫瘍免疫 反應에서는 細胞性 免疫이 주된 役割을 하고, 體液性 免疫은 二次的 役割을 擔當하는 것으로 알려져 있어 T cell 및 Macrophage 등의 細胞가 腫瘍免疫作用을 主로 하므로 이러한 細胞들의 活性은 癌의 發生과 進行 및 豫後와 密接한 關係가 있다고 報告되어 있다⁴⁻⁶⁾.

韓醫學에서 腫瘍은 癭⁷⁻⁸⁾, 瘰⁹⁻¹⁰⁾, 癧¹¹⁻¹²⁾, 癥¹³⁻¹⁴⁾, 癥¹⁵⁾, 積¹⁶⁾, 聚¹⁷⁻¹⁸⁾ 등의 範疇에 해당되며, 清熱解毒, 化痰軟堅, 活血祛痰, 行氣散結, 以毒除毒 等の 祛邪法¹⁹⁻²²⁾과 健脾益氣, 健脾益腎, 益氣補血, 滋陰溫陽 等の 扶正法²³⁾ 및 攻補兼施²⁴⁾의 治法이 活用되고 있다.

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法の 原理를 바탕으로 研究된 新鍼治療 中

의 하나이다. 疾病과 有關한 部位인 經穴, 阿是穴 등의 陽性 反應點에 精製한 各種 韓藥物을 選擇 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 對해 綜合的인 作用을 發揮하여 疾病을 豫防하고 治療하는 方法으로, 免疫系疾患의 豫防 및 治療 등에 有效하다고 報告되고 있다²⁵⁻²⁶⁾.

이에 著者는 癌의 治法 中 扶正法을 택하여 涼血補陰, 斂陰止血, 益腎陰²⁷⁻²⁹⁾의 效能이 있는 旱蓮草로 藥鍼液을 製造한 후 調氣理氣, 化濕降逆하는 中脘³⁰⁾(CV12)에 施術하여 腫瘍의 한 종류인 Melanoma에 對한 抗癌 및 免疫增進에 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

動物은 4~5週齡의 雌性인 C57BL/6 mice를 大韓實驗센터에서 公給받아 實驗 當日까지 固型 飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2℃를 維持하여 2週日 間 實驗 室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 使用된 旱蓮草(*Ecliptae Herba* 이하 ELP로 表現함)는 大田대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 精製하여 使用하였다.

3) 藥鍼液의 製造

旱蓮草 物質分劃 藥鍼液은 曠 등³¹⁾의 方法에 따라 Diaion HP-20 수지를 利用하여 調製하였다. 물로 추출한 旱蓮草 原液 100g을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피에 부어 그 폭이 약 25~

30cm될 정도로 방치하였다. 이 후 증류수 1,000ml를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass층) 旱蓮草液을 분리하였다. 계속해서 30% MeOH 500ml, 70% MeOH 500ml, 30% Acetone 500ml, 70% Acetone 500ml를 각각 통과시켜 분리된 分획 中 생쥐의 PBMC세포에서 cytokine 유도에 활성이 있는 分획층을 선정하여 藥鍼液 제조를 하였다.

旱蓮草 30% Acetone층 分획을 3회 여별(3M paper, USA)한 후 rotary evaporator로 減압 농축하였다. 旱蓮草 농축액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 生成된 침전물을 여별하고, 여액을 다시 rotary evaporator로 減압 농축하여 生成된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여 生成된 침전물을 여별하고 다시 여액을 75% ethyl alcohol 30ml를 가한 후 실온에서 교반하고 방치하는 같은 조작을 2회 반복한 다음 침전물을 여별하고 여액 中 ethyl alcohol을 減압 제거하여 잔사전량을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH6.8로 調整하여 저온에서 12시간 방치한 후 미량의 부유액을 여별한 후 멸균하여 10%와 20% 旱蓮草 藥鍼液을 30% Acetone층으로 分획하여 使用하였다.

2. 方 法

1) 藥鍼液의 선정

Acetone과 Methanol의 濃度を 달리해서 추출한 旱蓮草 物質分劃 藥鍼液 中에서 cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 살펴본 結果, 30% acetone 100µg/ml의 旱蓮草 物質分劃 藥鍼液이 cytokine 遺傳子(IL-2, IL-10, IFN-γ, β-actin) 發顯에 우수한 것으로 나타났다.

(1) PBMC 분리 및 약물처리

① PBMC (peripheral blood mononuclear cells) 세포분리

BALB/c mouse를 경추탈골법으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고, 摘出した 脾臟을 100mesh (Sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5分間 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83% NH₄Cl 溶液을 넣고 5分間 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hpaque-1077(Sigma)로 2,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 buffer coat부분을 얻어 실험에 사용하였다.

② 細胞培養 및 藥物처리

PBMC를 24 well plate의 각 well에 1×10^6 cell 씩 분주하고, 旱蓮草 30% Acetone층 藥鍼液 추출물 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) 및 양성대조군 (LPS, 2.5 μ g/ml)을 각각 처리하여 4 시간 동안 培養한 후 D-PBS로 수세하고 total RNA를 분리하였다.

(2) mRNA 유전자 분석

① Total RNA의 抽出

培養 終了後 24-well plate의 上層液을 除去한 後 RNAzol^B(Tel-Test, USA)를 利用하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 溶解시켜 定량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10分間 denaturation 시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

② cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 μ g에 該當하는 量을 75 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 denaturation시키

고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 2.5 μ l의 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25 μ pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNasin (20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 添加한 後 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 後 遠心分離하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 後, 95 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 反應은 이미 合成된 1 μ l의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였으며, 主型에 대한 β -actin, MMP-9, IL-1 β , TNF- α , IL-18 및 NOS-II에 대한 primer는 다음과 같으며, sense primer (20 μ pmole/ μ l)와 antisense primer (20 μ pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 後 최종 부피가 30 μ l 되도록 滅菌증류수를 가하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5分, denaturation; 74 $^{\circ}$ C, 5分, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1分, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1分을 25 cycle한 後 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3分 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading 하여 120V 조건에서 20分간 전기영동을 통하여 분석하였다.

2) 脾臟細胞 측정

비장면역세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 분주하고, 旱蓮草 30% Acetone 층 藥鍼液을 濃度별로 처리하였고, 양성대조군으로 Con-A(cocanavalin A, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 후 세포를 37°C 에서 72시간 培養 후 $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [methyl- ^3H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 후 다시 8시간 培養하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기(Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman) 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

3) *In vivo*에서 면역세포 증진과 활성화 실험

(1) B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10 (ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 mouse의 皮下에 繼代培養하여 形成된 腫瘍組織 部位를 分離하여 腫瘍組織 1g에 10ml의 cold D-PBS(Ca^{2+} & Mg^{2+} -free, Sigma)가 되게 調節한 後, 100mesh(Sigma)로 腫瘍組織을 粉碎한 後 遠心分離($1,500\text{rpm}$, 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase ($1,700\text{U}/\text{mg}$, Type-XI Sigma)를 B16-F10 $0.1\text{g}/\text{ml}$ 에 處理하여 30分間 water bath(37°C)에서 培養시킨 後 遠心分離($1,300\text{rpm}$, 5min.)하였다. 上騰液을 除去한 다음 0.85% NH_4Cl 을 넣어 잘 섞은 것을 37°C 培養器에서 5分間 放置하여 赤血球를 破壞시킨 後 遠心分離하여 B16-F10을 分離하였다. B16-F10 癌細胞株(2×10^5 cells/mouse)를 C57BL/6 mice의 尾靜脈에 移植하였다.

(2) 實驗群의 分類

실험군은 다음과 같이 분류하였다.

대조군-1(Control-1) : B16-F10 癌細胞株를 移植하고 別無處置한 군

대조군-2(Control-2) : 7일간 中脘에 1일 1회 자침한 後 B16-F10 癌細胞株를 移植하고 계속해서 15일간 中脘에 1일 1회 자침한 군

대조군-3(Control-3) : 7일간 생리식염수(0.1ml)를 中脘에 1일 1회 주입한 後 B16-F10 癌細胞株를 移植하고 계속해서 15일간 생리식염수(0.1ml)를 中脘에 1일 1회 주입한 군

실험군(ELP-HAS 10%) : 7일간 中脘에 10% 旱蓮草 藥鍼(30% Acetone층 0.1ml)을 시술한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속해서 15일간 藥鍼시술한 군

실험군(ELP-HAS 1%) : 7일간 中脘에 1% 旱蓮草 藥鍼(30% Acetone층 0.1ml)을 시술한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속해서 15일간 藥鍼시술한 군

(3) 取穴

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

(4) 藥鍼

藥鍼注入器로 1ml 의 注射器를 使用하여 實驗始作 1日부터 22日까지 各各의 實驗群에 따라 中脘에 0.1ml 씩, 1日 1回, 總 22日間 藥鍼 施術하였다.

(5) $\text{CD}3\text{e}^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^+$, $\text{CD}25^+$, $\text{CD}69^+$, $\text{NK}1.1^+$, $\text{B}220^+$ 형광세포 분석

B16-F10 癌細胞株를 移植한지 3일째에 경추탈 골법으로 C57BL/6 mice를 致死시킨 後 脾臟을 분리하였다. 脾臟細胞에 赤血球溶血液을 처리하여 赤血球를 제거하고 4°C 에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti- $\text{CD}3\text{e}$, FITC-anti- $\text{CD}4$, FITC-anti- $\text{CD}8$, PE-anti- $\text{CD}25$, FITC-anti- $\text{CD}69$, PE-anti- $\text{NK}1.1$, PE-anti- $\text{B}220$ 을 넣고 30分間 얼음에서

반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포를 분석(%)하였다.

(6) Pulmonary colonization assay

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

(7) 조직검사

B16-F10 癌細胞株를 移植하고 15日 後에 各群에서 肺를 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8時間동안 水洗한 다음 포매하였다. 이것을 microtome으로 切片을 만들어 Hematoxylin & Eosin染色을 하였다.

(8) 생명연장곡선 측정

B16-F10 癌細胞株를 C57BL/6 mice에 移植한 날부터 시작하여 매일 생존여부를 관찰하여 平均生存日數 및 延命率을 다음과 같이 구하였다.

MST(mean survival time) : 平均生存日數

ILS(Increase in MST over Control-C) : 延命率

$$\text{延命率} = \{(T-C)/C\} \times 100(\%)$$

T : 처치군의 MTS

C : 대조군의 MTS

3. 統計處理

統計는 student's t-test로 하였다.

III. 成 積

1. 旱蓮草 藥鉞液이 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響

30% acetone 100 μ g/ml의 旱蓮草 物質分割 藥鉞液을 健康한 BALB/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1%의 濃度로 처리하여 脾臟細胞의 증식에 미치는 影響을 알아본 結果 세포증식에 有意性 있는 增加를 보였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of ELP-HAS Extract on Spleen Cells Proliferation in BALB/c Mice

Group	Dose	Spleen cells production(cpm)
Media control	0	1,267±146
Con-A($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	38,760±5,194 ^{***}
ELP-HAS(%)	10	8,025±1,032 ^{**}
	1	3,520±459 ^{**}
	0.1	1,468±205 [*]

Mouse B cells from healthy BALB/c mice were treated with ELP-HAS extract(10, 1, 0.1%).

Spleen cells were cultured with Con-A (positive control) and ELP-HAS extract for 48 hrs.

After 40hr incubation, treated 3H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester(Cambridge Tec.U.K).

The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter(LKB, USA) as described in Materials and Methods.

Statistically significant value compared with control data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

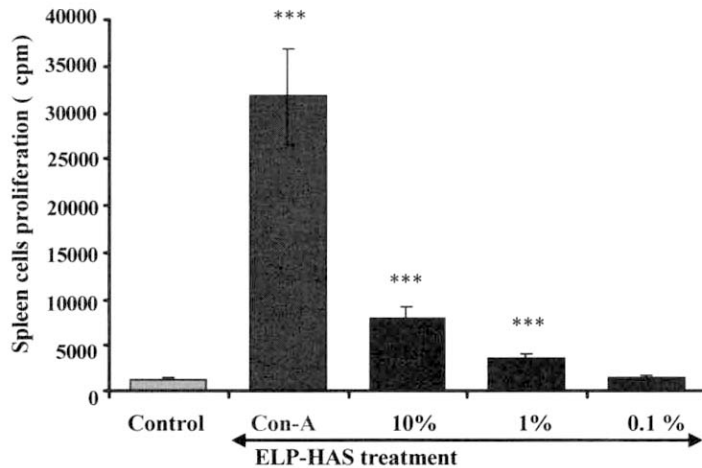


Fig. 1. Effect of ELP-HAS extract on spleen cells proliferation in BALB/c mice

Mouse B cells from healthy BALB/c mice were treated with ELP-HAS extract(10, 1, 0.1%).

Spleen cells were cultured with Con-A(positive control) and ELP-HAS extract for 48 hrs.

After 40hr incubation, treated 3H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester(Cambridge Tec.U.K).

The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter(LKB, USA) as described in Materials and Methods.

Statistically significant value compared with control data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

2. 早蓮草 藥鍼液이 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포 比率에 미치는 影響

1) PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 세포 比率
C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 CD25⁺/CD4⁺

세포의 比率이 Control-1에서는 11.1±2.6%이었고, Control-2에서는 12.2±1.9%이었고, Control-3에서는 12.5±1.6%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 18.0±4.3%와 15.8±3.1%로 增加하였다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effects of ELP-HAS on the Percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD3e⁺/CD8⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ in Mouse PBMCs

Group	Dose	CD25 ⁺ /CD4 ⁺	CD8 ⁺ /CD3e ⁺	CD69 ⁺ /B220 ⁺	NK1.1 ⁺ /CD3 ⁺
Control-1	0	11.1±2.6	5.3±0.5	47.9±3.8	3.7±0.3
Control-2	0	12.2±1.9	8.4±1.3	52.2±4.2	3.5±0.4
Control-3	0	12.5±1.6	8.9±1.0	51.7±3.7	4.2±0.8
ELP-HAS(%)	10	18.0±4.3	13.0±1.5	60.2±5.2	5.7±0.5
	1	15.8±3.1	1.2±1.6	57.2±3.7	5.0±0.4

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at the Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th days, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2×10⁵ cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5×10⁶ cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two groups treated with ELP-HAS showed increased number of CD25⁺/CD4⁺, CD3e⁺/CD8⁺ T cells, CD69⁺/B220⁺ and natural killer (NK1.1⁺)/CD3e⁺ cells.

Control-1: B16-F10 melanoma only.

Control-2: B16-F10 melanoma+single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3: B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS: B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% and 1% ELP-HAS.

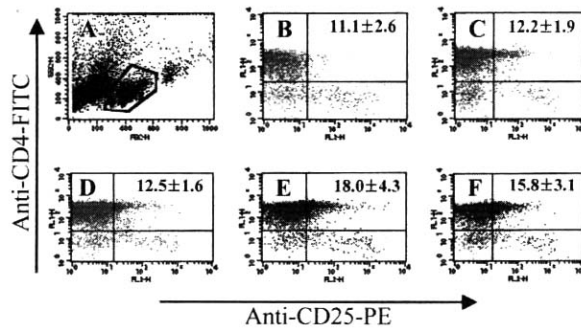


Fig. 2. Effects of ELP-HAS on the percentage of CD25⁺/CD4⁺ in mouse PBMCs

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2×10^5 cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5×10^6 cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A). Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of CD25⁺/CD4⁺ T cells.

Control-1 (B) : B16-F10 melanoma only.

Control-2 (C) : B16-F10 melanoma+single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 (D) : B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS : B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% (E) and 1% (F) ELP-HAS.

2) PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 세포 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs 중 CD8⁺/CD3e⁺ 세포의 比率이 Control-1에서는 5.3±0.5%이었고, Control-2에서는 8.4±1.3%이었던

으며, Control-3에서는 8.9±1.0%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 13.0±1.5%와 12.2±1.6%로 增加하였다(Table 2, Fig. 3).

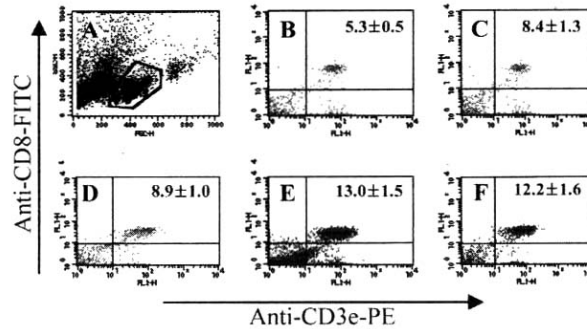


Fig. 3. Effects of ELP-HAS on the percentage of CD8⁺/CD3e⁺ in mouse PBMCs

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2×10^5 cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5×10^6 cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A). Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of CD8⁺/CD3e⁺ T cells.

Control-1 (B): B16-F10 melanoma only.

Control-2 (C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 (D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% (E) and 1% (F) ELP-HAS.

3) PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 세포 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs중 CD69⁺/B220⁺ 세포의 比率이 Control-1에서는 47.9±3.8%이었고, Control-2에서는 52.2±4.2%이었으며,

Control-3에서는 51.7±3.7%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 60.2±5.2%와 57.2±3.7%로 增加하였다(Table 2, Fig. 4).

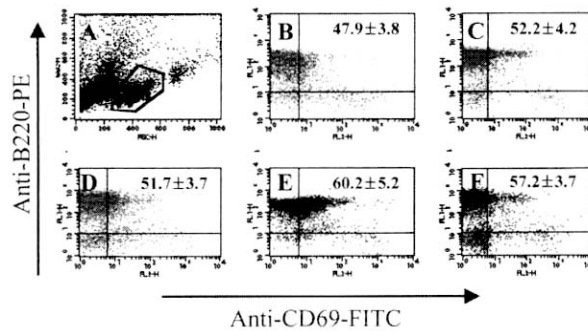


Fig. 4. Effects of ELP-HAS on the percentage of CD69⁺/B220⁺ in mouse PBMCs

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2×10^5 cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5×10^6 cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A). Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of CD69⁺/B220⁺ B cells.

Control-1 (B): B16-F10 melanoma only.

Control-2 (C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 (D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1 of saline.

ELP-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% (E) and 1% (F) ELP-HAS.

4) PBMCs의 NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포 比率

C57BL/6 mouse의 PBMCs중 NK1.1⁺/CD3e⁺세포의 比率이 Control-1에서는 3.7±0.3%이었고, Control-2에서는 3.5±0.4%이었던

으며, Control-3에서는 4.2±0.8%이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 5.7±0.5%와 5.0±0.4%로 增加하였다(Table 2, Fig. 5).

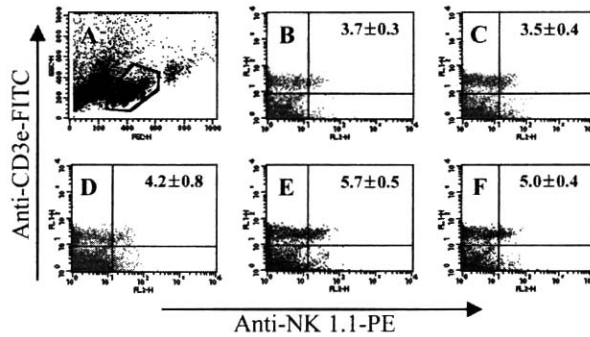


Fig. 5. Effects of ELP-HAS on the percentage of NK1.1⁺/CD3e⁺ in mouse PBMCs

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2×10^5 cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5×10^6 cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A). Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of NK1.1⁺/CD3e⁺ natural killer cells.

Control-1 (B) : B16-F10 melanoma only.

Control-2 (C) : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 (D) : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% (E) and 1% (F) ELP-HAS.

3. Lung colony formation number에 미치는 影響

Control-1에서는 86.3 ± 7.2 개였고, Control-2에서는 72.3 ± 4.3 개였으며, Control-3에서는 63.3 ± 7.8 개였고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS

에서는 각각 31.5 ± 3.4 개와 46.2 ± 5.4 개로 나타났다. 그래프로 정리하면 다음 Fig. 6.과 같으며, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 Lung colony formation number의 減少率이 각각 50.2%, 27.0%로 增加하였다.(Table 3, Fig. 6, 7).

Table 3. Effects of ELP-HAS on Lung Colony Formation Number of C57BL/6 Mice Implanted Intravenously with B16-F10 Melanoma

Group	Dose	No./animal	Lung Colony formation No.	Decrease(%)
Control-1	0	5	86.3±7.2	
Control-2	0	5	72.3±5.3	
Control-3	0	5	63.3±7.8	
ELP-HAS(%)	10	5	31.5±3.4**	50.2
	1	5	46.2±5.4*	27.0

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan(CV12) for 2days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10^5 cells). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with ELP-HAS, they were sacrificed and the pulmonary colony was observed.

Control-1 : B16-F10 melanoma only.

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% and 1% ELP-HAS.

Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control-3 data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

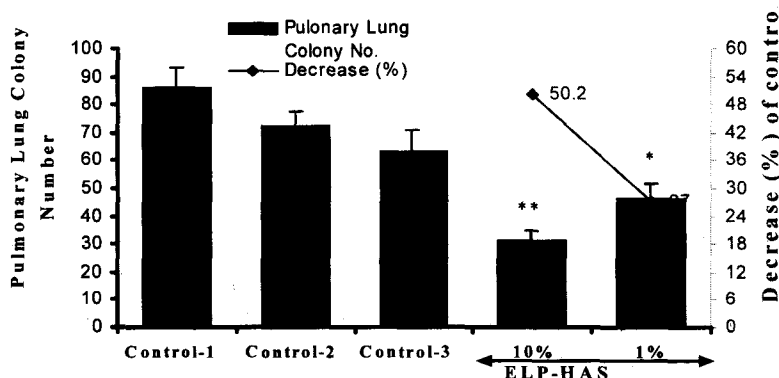


Fig. 6. Effects of ELP-HAS on melanotic colony formation of lung tissue, and lung colony formation number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan(CV12) for 2days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10^5 cells). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with ELP-HAS, they were sacrificed and the pulmonary colony was observed.

Control-1 : B16-F10 melanoma only.

Control-2 : B16-F10 melanoma+single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 : B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS : B16-F10 melanoma+intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% and 1% ELP-HAS.

Each point represents the mean± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control-3 data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

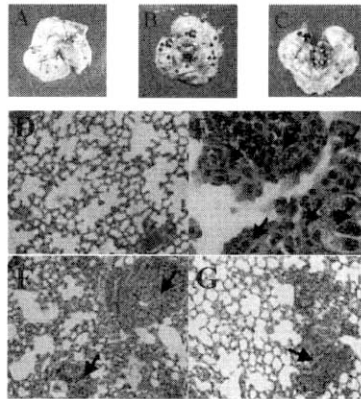


Fig. 7. Representative lungs to show inhibition of melanotic colony formation, and histological analysis of lung tissue of B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice

C57BL/6 mice were i.v. injected with 2.0×10^5 cells of B16-F10 melanoma. 15 days later, tumor pulmonary colonization became palpable, and they were sacrificed, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these tumors (arrow) at bright microscope (Nikon, $\times 100$).

Normal group (A, D).

Control-2: B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan (CV12) (E).

Control-3: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan (CV12) with 0.1ml of saline (B, F).

ELP-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan (CV12) with 0.1ml of 10% ELP-HAS (C, G).

4. 平均生存日數(MST) 및 延命率(ILS)에 미치는 影響

Control-1에서는 16.4 ± 3.5 이었고, Control-2에서는 19.2 ± 2.8 이었으며, Control-3에서는 $19.5 \pm$

3.3 이었고 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 24.7 ± 3.6 과 22.3 ± 3.1 로 나타났으며 延命率(ILS)은 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서 각각 26.7%와 14.5%로 增加하였다 (Table 4, Fig. 8).

Table 4. Effects of ELP-HAS on MST of C57BL/6 Mice Implanted Intravenously with B16-F10 Melanoma

Group	Dose	No./animal	MST (day)	ILS (%)
Control-1	0	12	16.4±3.5	
Control-2	0	12	19.2±2.8	
Control-3	0	12	19.5±3.3	
ELP-HAS(%)	10	12	24.7±3.6*	26.7
	1	12	22.3±3.1	14.5

C57BL/6 mice were treated with ELP-HAS at Chung-wan(CV12). On the 7th day of the experiment, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10^5 cells). 14 days later, the mice were counted once daily to measure MST(median survival time) and ILS(Increase in MST over control).

$$ILS = \{(T-C)/C\} \times 100(\%)$$

T : MST of Sample group

C : MST of Control-3

Control-1 : B16-F10 melanoma only.

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12).

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline.

ELP-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% and 1% ELP-HAS.

Each point represents the mean± S.E of 12 mice.

Statistically significant value compared with control-3 data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

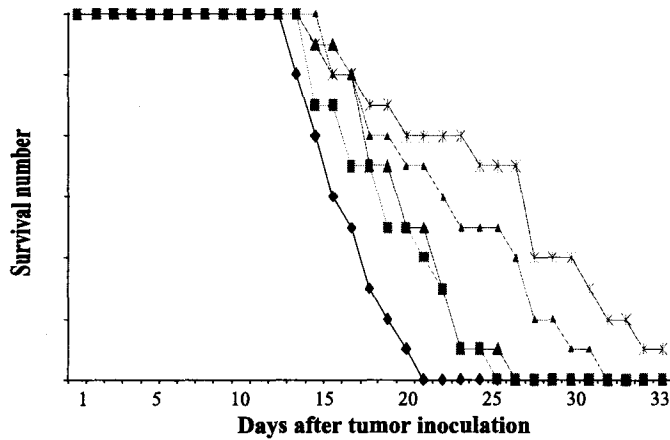


Fig. 8. Effects of ELP-HAS on survival time of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 cells

C57BL/6 mice were i.v. injected with 2.0×10^5 cells of B16-F10 melanoma.

14 days later, the number of alive mice was measured for survival time once daily.

Control-1: B16-F10 melanoma only(◆).

Control-2: B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12)(■).

Control-3: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of saline(▲).

ELP-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into Chung-wan(CV12) with 0.1ml of 10% (×), and 1% ELP-HAS(▲).

Each point represents the mean \pm S.E of 12 mice.

IV. 考 察

免疫이란 個體가 自己와 非自己를 識別하여 非自己를 抗原으로 認識한 後 特異하게 抗體를 生産하고 이에 對處하여 處理함으로써 個體의 恒常性を 維持하려는 人類의 進化 過程에서 獲得한 一種의 自衛能力이다^{1,32}.

免疫機能이란 非自己 物質을 除去함으로써 그 個體 內部的 恒常性を 維持하는 現像으로 人類의 모든 疾病의 發生機轉과 關聯이 있는데^{1,32}, 免疫系에 關與하는 免疫細胞로서는 淋巴球의 細胞膜 表面에 存在하는 受容體에 따라 크게 T

및 B cell로 區分되며 T cell을 中心으로 한 細胞 相互關係에 依한 細胞性 免疫 反應(cell mediated immune response)과 B cell로부터 形成된 免疫 反應에 依한 體液性 免疫 反應(humoral immune response)으로 大別된다³³. 또한 細胞性 免疫 反應은 T cell 外에도 生體의 가장 重要한 免疫 擔當 細胞인 macrophage 活性에 依하여 決定된다³⁴. 특히 腫瘍免疫反應에서는 細胞性 免疫이 主된 役割을 하고 體液性 免疫은 2次的 役割을 하는데, 癌의 發生, 進行 및 豫後를 決定짓는 要素中 macrophage 活性이 매우 重要한 것으로 알려져 있다⁴⁻⁶. 특히 癌患者의 約 40% 程度가 急性 感染病 등의 感染症에 依하여 死亡한다고 하여 癌患者의 非特異的인 macrophage 등의 免疫能 調節에 依한 感染病的 防止는 癌患者의 治療 및 延命率 增加에 큰 目

標가 되고 있다³⁵⁾.

韓醫學的으로 免疫은 《素問·上古天真論》²⁾에 “眞氣從之 精神內守 病安從來”라 하였고, <刺法論>²⁾에 “正氣存內 邪不可干”, <評熱病論>²⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하였으니 邪가 侵犯하는 곳에는 반드시 그 氣가 虛하기 때문이란 뜻으로, 正氣가 外邪를 防禦하고 除去하는 作用이 있음을 示唆하였다. 疾病의 發生過程이 正氣의 盛衰與否와 밀접히 關聯된다는 內容들은 西洋醫學에서의 免疫과 類似하다고 할 수 있다. <刺法論>²⁾에서는 “五疫之至 皆相染易 無問大小 病狀相似 正氣存內 邪不可干”이라 하여 五疫에 對하여도 感染되지 않는 것은 그 原因이 “正氣存內 邪不可干”으로, 正氣가 內에 存在하고 있는 이상 邪가 있더라도 侵入하지 못한다는 뜻이다. 이에 對하여 匡³²⁾은 단지 生體의 正氣가 充實하게 되면 外邪 內邪를 莫論하고 미리 防止할 수가 있고, 싸워서 이길 수 있으며, 人體가 疾病을 免할 수 있게 되지만, 여러 原因에 의하여 正氣 虛衰하게 되면 外邪가 쉽게 虛한 틈을 타서 侵入하고, 한편으로는 內邪가 일어나 各種 疾病을 일으키게 되는 것이라 하여, 疫邪에 대한 正氣의 抵抗性에 對하여 論하고 있다. 또 <玉機眞藏論>²⁾에는 “邪氣勝者 正氣衰也 故病甚”이라 하였으며, <百病始生篇>²⁾에 “風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人”, <口問篇>²⁾에는 “故邪之所在 皆爲不足”, <瘡論>²⁾에 “衛氣之所在 與邪氣相合而病作”, <刺節眞邪篇>²⁾에 “虛邪入於身也深 ... 有所結 其歸之 ... 有所結 深中骨 氣因於骨”이라 하여 疾病의 發生과 進行에 있어서 正氣 不足이 重要한 病因임을 強調하였다.

癌의 原因과 그 治法에 關해, 積에 對해서 李³⁶⁾는 “積之成者 正氣不足 以後邪氣踞之”라 하였고, 張³⁷⁾은 “凡脾胃不足及 虛弱失調之因 多有積聚之病”이라 하여 積의 形成에 正氣虧虛를 癌發病의 가장 重要한 內的 要因으로 여겼으며, 特히 先天과 後天元氣의 根本인 腎과 脾의 正氣를 強調하

였다. 그러므로 癌의 發生은 韓醫學의 大體的 病因論과 같이 正邪의 抗爭이며, 邪氣에 對한 正氣의 抵抗能力의 低下, 免疫能力의 低下로 發生된다고 볼 수 있다.

正氣는 人體의 正常 生理活動 및 體內 抗病能力을 말하고 邪氣는 一切 疾病을 일으키는 素因의 總稱으로서 外界의 六淫之邪 및 體內 陰陽失調로 因한 病理 狀態와 痰飲, 瘀血, 食積 등과 같은 病理產物 등을 指稱한다³⁸⁾.

疾病 發生에 있어서의 正氣와 邪氣의 概念은 西洋醫學의 免疫學 理論과 類似함을 알 수 있는데, 載³⁹⁾는 故人들이 疾病은 正邪抗爭의 過程이고, 疾病의 發生 및 轉變을 決定하는 要因으로 正氣의 強弱을 重要視하였으며, 아울러 扶正祛邪라는 療法을 提示하여 後代에 지대한 影響을 미쳤다고 하였고, 聶⁴⁰⁾은 正氣가 人體의 發病에 決定的 作用을 하는데 正氣는 先天的 支配를 받으며 後天의인 脾胃에 依해서 充滿된다고 하였으며, 史 등⁴¹⁻⁴³⁾은 正氣 虛弱 程度를 免疫反應 低下 程度에 比較하고 非特異的 免疫은 先天之氣에, 特異的 免疫은 後天之氣에 該當한다 하였다. 趙³⁾는 韓醫學에서는 疾病 成立 過程 中에서 治病 素因인 邪氣보다는 오히려 防禦因子인 正氣의 重要性을 強調하였으며 免疫學的인 側面에서 正氣는 非特異的 防禦 反應 및 그에 關與하는 諸 防禦物質을 總稱한다고 하였다.

癌의 治法에 있어서 內經²⁾의 “治病必求本”의 學說에 根據하여 羅⁴⁴⁾는 “養正則積自除”라 하여 扶正培本을 強調하였다. 또한 《素問·至眞要大論》²⁾에서는 “堅者削之”, “結者散之”, “留者攻之”라 하여 攻邪를 더하여 扶正培本과 攻補兼施를 治療의 原則으로 삼았다.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의거하여 東西 藥物을 選擇해서 有關한 穴位, 壓通點, 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性 反應點에 注入하여 刺針과 藥物療法을 통하여 生體의 機能을 조절하고 病理狀態를 변화시켜 疾病을 치료하는 新

針療法^{25,45-46)} 金⁴⁷⁾의 藥鍼治療에서는 俞穴이 多用되고 있고, 여기에 募穴을 첨가하면 이들은 서로 그 氣血이 相通한다는 原則에 따라 같이 사용하면 효과가 좋다⁴⁶⁾고 하였다.

旱蓮草(*Ecliptae Herba*)는 菊花科에 속한 일년생 초본인 *Eclipta prostrata* L.의 全草를 건조한 것으로서 性은 寒無毒하고 味는 甘酸하며 補陰藥으로 분류된다. 旱蓮草는 涼血, 止血, 補腎, 益陰하는 功用을 가지고 있으며 주로 陰虛血熱로 인한 吐血, 咳血등의 각종 出血症과 肝腎陰虛로 인한 頭暈目眩과 鬚髮早白을 치료하는 약물로 알려져 있다²⁷⁻²⁹⁾

中脘(CV12)은 任脈에 속한 足陽明胃經의 募穴로, 調脾胃, 調氣理氣, 化濕降逆, 調中氣, 和腸消滯 理中焦, 調升降하는 作用이 있어^{30,48-49)}, 嘔吐, 霍亂, 腹瀉, 腹痛, 腹部膨滿, 便秘, 消化不良, 食慾不振, 泄瀉, 胃炎, 痢疾 등의 消化器疾患 등의 질환에 廣範圍하게 활용되며, 脾胃의 機能을 調節하여 氣血의 運行을 원활히 하여 正氣를 敦篤히 하여 人體의 免疫機能을 向上시켜 疾病을 治療하고 疾病을 豫防할 수 있을 것으로 思料된다.

CD는 cluster of differentiation의 약자로 CD4⁺인 T cell은 보조 T cell이고, CD8⁺ T cell은 억제 T cell 또는 세포독성 T cell로 CD4, CD8은 T cell을 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있으나, 모든 T cell 표면에 표현되는 표식인자로 CD2가 있다. 말초 T cell은 CD4와 CD8 중 하나만 가진다. CD4⁺인 보조 T cell은 다시 제I형 보조 T cell(T_{H1})과 제II형 보조 T cell(T_{H2})로 구별된다. CD4는 MHC 제II항원을 인식하고 작용하며, CD8은 MHC 제I항원을 알아보고 작용한다.

CD3는 T cell 결정표지인자로, T cell 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고, CD25는 activated T와 B cell에 분포하여 IL-2 수용체의 기능을 하며, CD69는

activated B와 T cell, 대식세포, NK cell에 분포하고, B220은 사람에게엔 없지만 mouse의 B세포 표면에 있는 표식자이다⁵⁰⁾.

MHC 제한도 없고 항원 특이성도 없이 일부 암세포와 바이러스 감염세포에 대하여 세포독성을 나타내는 세포를 일반적으로 자연세포독성세포(natural killer cell : NK cell)라 부르며, 일부 NK-T cell은 CD3를 갖는다. 최근 cytokine등 면역세포 활성화를 이용한 면역요법(immunotherapy)은 癌治療에 새 장을 열고 있다. *in vitro*에서 면역세포를 활성화시켜 말초혈액에 주사한 후 癌細胞를 죽이든지, *in vivo*에서 활성화된 T cell, NK cell, DCs cell 등이 癌細胞를 apoptosis로 유도하는 치료법이다. 이러한 연구에는 생쥐전이(Mouse melanoma)모델이 사용되는데, 이는 癌 연구에서 비교적 잘 정립되어 있는 면역요법, 전이를 研究하기에 적합한 모델이다⁵¹⁾.

抗腫瘍 및 免疫效果에 藥鍼을 이용한 實驗的 研究로는 人蔘⁵²⁾, 金銀花⁵³⁾, 猪苓⁵⁴⁾, 瓦松⁵⁵⁾ 등을 藥鍼하여 各各 抗腫瘍 및 免疫機能增進에 有效하다고 報告되고 있으나, 中脘의 穴位에 旱蓮草 藥鍼을 이용한 抗癌 및 免疫效果에 대한 報告는 아직 接하지 못했다.

이에 著者는 旱蓮草를 藥鍼液으로 調製한 후 實驗動物의 各各에 調脾胃, 調氣理氣, 化濕降逆, 調中氣, 和腸消滯, 理中焦, 調升降하는 作用이 있는^{30,48-49)} 中脘에 藥鍼하여 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響을 實驗的으로 究明하고자, 脾臟細胞 增殖, CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포 比率에 미치는 影響, Lung colony formation number에 미치는 影響, 平均生存日數(MST) 및 延命率(ILS)에 미치는 影響 등을 관찰하였다.

實驗結果, 旱蓮草 藥鍼液이 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響을 살펴보면 30% acetone 100μg/ml의 旱蓮草 物質分劃 藥鍼液을 건강한 BALB/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1%

의 濃度로 처리하여 脾臟細胞의 증식에 미치는 영향을 알아본 結果, 10%에서 8025 ± 1032 cpm으로 나타났고, 1%에서 3520 ± 459 cpm으로 나타나서 對照群의 1267 ± 146 cpm보다 增加하여 濃度の존적으로 增加하였다(Table 1, Fig. 1).

위의 결과에서 旱蓮草 藥鍼液은 脾臟의 기능, 즉 형성된 血球 특히 血小板, 淋巴球, 網狀赤血球를 저장하는 기능 및 면역학적 기능을 주로 담당하는 기능을 활발하게 하여 뚜렷한 抗癌 및 免疫增強效果를 나타내는 것을 알 수 있었다.

旱蓮草 藥鍼이 $CD25^+/CD4^+$, $CD8^+/CD3e^+$, $CD69^+/B220^+$, $NK1.1^+/CD3e^+$ 세포 比率에 미치는 影響을 살펴보면 $CD25^+/CD4^+$ 比率이 對照群 1에서는 $11.1 \pm 2.6\%$ 이었고, 對照群 2에서는 $12.2 \pm 1.9\%$ 이었으며, 對照群 3에서는 $12.5 \pm 1.6\%$ 이었으나, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $18.0 \pm 4.3\%$ 와 $15.8 \pm 3.1\%$ 로 濃度の존적으로 增加하였다(Table 2, Fig. 2).

$CD25^+$ 는 activated T cell을 나타내고 $CD4^+$ 는 모든 T cell을 나타내는데, 위의 결과로 旱蓮草 藥鍼液이 T cell의 活性化를 높여주어 免疫增強效果를 나타냄을 알 수 있다.

$CD8^+/CD3e^+$ 比率이 對照群 1에서는 $5.3 \pm 0.5\%$ 이었고, 對照群 2에서는 $8.4 \pm 1.3\%$ 이었으며, 對照群 3에서는 $8.9 \pm 1.0\%$ 이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $13.0 \pm 1.5\%$ 와 $12.2 \pm 1.6\%$ 로 濃度の존적으로 增加하였다(Table 2, Fig. 3).

$CD8^+$ 은 cytotoxic T cell을 나타내고 $CD3e^+$ 은 원시 또는 분화된 모든 T cell을 나타낸다. 따라서 위의 결과에서 旱蓮草 藥鍼液이 T cell의 세포독성을 活性化하여 免疫增強效果를 나타냄을 알 수 있다.

$CD69^+/B220^+$ 의 比率이 對照群 1에서는 $47.9 \pm 3.8\%$ 이었고, 對照群 2에서는 $52.2 \pm 4.2\%$ 이었으며, 對照群 3에서는 $51.7 \pm 3.7\%$ 이었고, 10% ELP-

HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $60.2 \pm 5.2\%$ 와 $57.2 \pm 3.7\%$ 로 濃度の존적으로 增加하였다(Table 2, Fig. 4).

$CD69^+$ 는 T cell과 B cell을 모두 나타내고 $B220^+$ 은 B cell을 나타내는데, 위의 결과에서 旱蓮草 藥鍼液이 體液性 免疫을 담당하는 B cell의 活性化를 높여주어 免疫增強效果를 나타냄을 알 수 있다

$NK1.1^+/CD3e^+$ 의 比率이 對照群 1에서는 $3.7 \pm 0.3\%$ 이었고, 對照群 2에서는 $3.5 \pm 0.4\%$ 이었으며, 對照群 3에서는 $4.2 \pm 0.8\%$ 이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 $5.7 \pm 0.5\%$ 와 $5.0 \pm 0.4\%$ 로 濃度の존적으로 增加하였다(Table 2, Fig. 5).

$NK1.1^+$ 는 항원 특이성 없이 일부 癌細胞와 바이러스 감염세포에 세포독성을 일으키는 cell을 나타내고 $CD3e^+$ 은 원시 또는 분화된 T cell을 나타내므로 위의 결과에서 旱蓮草 藥鍼液이 cell의 세포독성을 活性化하여 免疫增強效果를 나타냄을 알 수 있다.

위의 실험결과 旱蓮草 藥鍼液을 시술한 군이 對照群에 比하여 增加한 것으로 나타났는데 이것은 旱蓮草가 補腎, 益陰하여 陰虛血熱과 肝腎陰虛를 치료하는 效能과 免疫細胞增加와는 일정한 관련성이 있는 것으로 思料된다.

肺細胞 轉移率을 살펴보면 對照群 1에서는 86.3 ± 7.2 였고, 對照群 2에서는 72.3 ± 5.3 이었으며, 對照群 3에서는 63.3 ± 7.8 이었고, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 31.5 ± 3.4 와 46.2 ± 5.4 로 나타나서, 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서 減少率이 각각 50.2% , 27.0% 로 濃度の존적으로 有意하게 減少를 보였다(Table 3, Fig. 6, 7).

위의 결과에서 旱蓮草 藥鍼液이 Lung colony formation number를 감소시켜 癌의 肺細胞 轉移率을 낮추준다는 사실을 알 수 있다.

平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響을 살

해보면 對照群 1에서는 16.4±3.5이었고, 對照群 2에서는 19.2±2.8이었으며, 對照群 3에서는 19.5±3.3으로 나타났는데 10% ELP-HAS와 1% ELP-HAS에서는 각각 24.7±3.6과 22.3±3.1로 나타나서 延命率(ILS)이 각각 26.7%와 14.5%로 濃度の 존적으로 增加하였다(Table 4, Fig. 8).

위의 結果에서 旱蓮草 藥鍼液이 平均生存日數과 延命率을 증가시켜줌을 알 수 있다.

以上的 實驗結果에서 旱蓮草 藥鍼液을 施術한 實驗群이 手術하지 않은 對照群에 比하여 有意한 結果를 나타내었는데 이는 旱蓮草가 寒性이고 味는 甘酸하여 血熱을 치료하는 補陰藥으로서 補肝腎陰虛하여 抗癌 및 免疫作用에 影響을 미친 것이라 생각되며, 이에 대해서는 向後 持續的인 研究가 필요하리라 思料된다.

V. 結 論

旱蓮草로 藥鍼液을 製造하여 調中氣, 化濕降逆하는 中脘(CV12)에 藥鍼하여 抗癌 및 免疫效果에 對해 考察한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 脾臟細胞의 增殖은 實驗群이 對照群에 比하여 有意性 있게 增加되었다.
2. PBMC의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 比率은 實驗群이 對照群에 比해 增加되었다.
3. Lung colony formation number는 對照群에 比하여 減少를 보였고, 10%가 1%에서 보다 현저히 減少하였다.
4. 實驗群의 平均生存日數 및 延命率은 對照群에 比하여 增加를 나타냈고 그 중 10%에서 현저히 增加하였다.

以上的 結果로 보아 旱蓮草 藥鍼은 抗癌 및 免疫增強 效果가 있는 것으로 생각되며, 向後 持續的인 研究 및 臨床的인 應用이 필요하리라 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 菊地浩吉 외. 最新免疫學. 서울 : 集文堂 1989 : 33-35, 204-205, 211-212, 316-337.
2. 洪元植 編. 精校黃帝內經. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1981 : 37-38, 55, 57, 78, 82, 118-119, 122, 181, 213, 249, 256, 304-305, 319, 326, 347-378.
3. 趙鍾寬. 免疫에 關한 東洋醫學的 考察. 東洋醫學. 1986 ; 12(1) : 19-23.
4. Brunschwig, A., Southam, C.M. and Levin, A.G. Host resistance to cancer. Ann. Surg., 1965 ; 162 : 416.
5. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. Pro. Exp. Tumor Res., 1970 ; 13 : 1.
6. Eiber, F.R. and Morton, D.L. Impaired immunologic reactivity and recurrence of following cancer surgery. Cancer.. 1970 ; 25 : 362.
7. 孫淑英 編譯. 韓方內科學. 서울 : 成輔社 1991 : 178-179.
8. 김진성 외. 腫瘍의 豫防과 治療를 위한 食餌療法. 大韓韓方腫瘍會誌. 1995 ; 1(1) : 231.
9. 徐政周 외. 積聚의 病理에 關한 文獻的 考察. 大韓韓醫會誌. 1978 ; 15(1) : 21.
10. 安圭錫 외. 韓醫學的 診斷類型에 따른 韓藥方劑의 抗癌 및 免疫節作用에 미치는 영향. 東醫病理學會誌. 1994 ; 9 : 1-20.

11. 梁秀烈 외. 癥瘕의 東西醫學의 考察. 大韓韓醫學會誌. 1986 ; 7(1) : 84-87.
12. 張中植 외. 삼부탕이 S-180에 대한 항암효과와 Cyclophosphamide에 의한 부작용 감소에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 1992 ; 13(1) : 313-323.
13. 黃奎東 외. 噎隔·反胃와 胃癌과의 相關性에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995 ; 1(1) : 129.
14. 上海中醫學院編. 中醫內科學. 商務印書館. 1983 : 90.
15. 上海中醫學院編. 中醫外科學. 商務印書館. 1982 : 302-309.
16. 沈連生. 老人保健中成藥. 北京 : 人民衛生出版社. 210-211.
17. 張代劉 編著. 中西醫結合治療癌症. 山西人民出版社. 1984 : 1.
18. 厲暢. 癌의 中醫治療. 東洋醫學. 1992 ; 18(1) : 56.
19. 洪元植. 現代中國의 癌治療法. 서울 : 英文社. 1980 : 17-35, 81-94, 361-388.
20. 邱佳信 외. 惡性腫瘤服藥方法的實驗研究. 中國 : 浙江中醫雜誌. 7 : 985.
21. 楊貴貞 외. 人蔘抗小鼠手術應激的細胞免疫調節效應. 中西醫結合雜誌. 1988 ; 8 : 479-480.
22. 許繼平 외. 惡性腫瘤氣虛陰虛證患者免疫功能觀察. 浙江中醫雜誌. 1983 ; 7 : 744.
23. 林宗廣. 扶正培本法治療中晚期原發性肝癌31例. 上海中醫藥雜誌. 1984 ; 2 : 7.
24. 楊金坤 외. 健脾理氣清熱解毒軟堅化痰方劑治療晚期肝癌的臨床觀察及實驗研究. 中國 : 中西醫結合雜誌. 1987 ; 7 : 275.
25. 催容泰 외. 鍼灸學 下. 서울 : 集文堂. 2001 : 1457.
26. 김대수. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1989 ; 5(1) : 97-105.
27. 이상인. 본초학. 서울 : 修書院. 1981 : 159.
28. 전국한외과대학 본초학교수. 本草學. 서울 : 永林社. 1995 : 599.
29. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典(下). 香港 : 上海科學技術出版社. 1977 : 2615-2617.
30. 安榮基 編著. 經穴學 叢書. 서울 : 成輔社. 1995 : 694-695.
31. 곽이성 외. 난소절제 흰 쥐의 임상화학지수에 미치는 홍삼조사포닌의 영향. 대전 : 고려인삼학회지. 2000 ; 24(1) : 46-50.
32. 匡調元. 中醫病理研究. 上海 : 上海科學出版社. 1980 : 31, 174-175.
33. Biozzi, G., Stiefel, C., Mouton, Bouthillier, Y. and Deceusefound, G.A. kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. J. Immunol.. 1968 ; 14 : 15.
34. Hume, D.A., Loutit, J.F. and Gordon, S. The mononuclearphagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80 ; Macrophages of bone and associated connective tissue J. Cell Sci.. 1984 ; 66 : 189.
35. 有地滋. 現代醫學における漢方藥劑. 東京 : 東洋醫學社. 1986 : 84-98.
36. 李中粹. 醫宗必讀. 上海 : 上海科學出版社. 1987 : 6, 34, 215.
37. 張介賓. 景岳全書. 서울 : 麗江出版社. 1985 : 479.
38. 劉正才. 中醫免疫. 北京 : 北京出版社. 1983 : 9.
39. 載新民. 中醫免疫學. 臺北 : 啓業書局有限公司. 1985 : 1-51.
40. 聶惠民 외. 正常 생쥐 및 Cyclophosphamide에 의해 免疫이 抑制된 생쥐에 對한 健脾金丹의 免疫機能 增強作用. 中西醫結合雜誌한글판. 1993 ; 4 : 42.

41. 史松任 외. 中醫學與免疫學研究. 中西醫結合雜誌. 1984 ; 4(6) : 381-384.
42. 孫燕. 扶正中藥의 免疫調節作用. 中西醫結合雜誌. 1984 ; 4(6) : 368-370.
43. 史知洪. 淺談祖國醫學中正氣與現代免疫學的關係. 新中醫. 1988 ; 9期 : 1-2.
44. 羅天益. 衛生寶鑑. 서울 : 金剛出版社. 1981 : 220.
45. 崔容泰, 李潤浩. 最新針灸學. 서울 : 成輔社. 1979 : 191, 345, 405, 502-522, 599-600.
46. 金延彦. 奇蹟의 藥鍼療法 2. 서울 : 金剛出版社. 1990 : 23.
47. 金澐經 외. 癌백과(癌에 관한 모든 것). 서울 : 瑞音出版社. 1992 : 27-28.
48. 李鐘午, 尹炳和. 傳統鍼術. 서울 : 書苑堂. 1987 : 134.
49. 催容泰 외. 鍼灸學 上. 서울 : 集文堂. 2001 : 730-732.
50. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25-26, 28, 31-32, 134.
51. Seigler HF. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma, Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95 : 13141-13146.
52. 김태운. 人蔘水鍼 前 處置가 發癌豫防에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 碩士學位論文. 1988.
53. 김중완 외. 金銀花藥鍼의 抗腫瘍作用 및 生體臟器에 대한 影響. 大韓鍼灸學會지. 1999 ; 16(1) : 255-267.
54. 서범석. 猪苓藥鍼이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1995.
55. 이정화. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 研究. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1999.