

원저

白鼠의 中脘에 施術한 靑風藤藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響

이현

대전대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Influence on the Anti-cancer and Immune response improvement of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *Chung-wan*(CV12)

Lee Hyun

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

Objective : The purpose of this experiment is to study on the anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement effects of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution(SAL-HAS).

Methods : We injected *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into *Chung-wan*(CV12) of C57BL/6 mouse which is corresponding to human *Chung-wan*(CV12). We observed its effect on the number of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ cells in mouse PBMCs, the number of the pulmonary colony, and the effect on MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

- * 이 논문은 2004년도 대전대학교 한의학연구소 지원에 의하여 수행되었음
· 접수 : 2004년 10월 26일 · 수정 : 2004년 11월 23일 · 채택 : 2004년 11월 27일
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 구성동 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 041-560-8783 E-mail : lh2000@hanmir.com

Results & Conclusions : 1. The spleen cells proliferation of the sample groups treated with SAL-HAS extract has increased significantly compared with that of the control group.

2. The percentage of the CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ cells in C57BL/6 mouse PBMCs of the sample groups treated with SAL herbal-acupuncture has increased compared with that of the control group.

3. The lung colony number of the sample groups SAL Herbal-acupuncture has decreased significantly compared with that of the control group.

4. MST and ILS of the sample groups SAL herbal-acupuncture have increased significantly compared with those of the control group.

Key words : Sinomenii acuti Lignum(SAL), Herbal-Acupuncture, Chung-wan(Cv12), anti-cancer, immune response improvement

I. 緒 論

腫瘍은 組織의 自律的인 過剩成長이며, 正常組織에 대해서 破壞的인 것을 말한다¹⁾. 腫瘍은 現在 人類를 威脅하는 主要한 疾病의 하나로, 傳染性 疾患이 基本的으로 解決된 國家에서는 心腦血管疾患과 더불어 死亡原因의 1·2位를 차지하고 있다²⁾.

韓醫學에서는 腫瘍, 癰疽, 腫毒, 積聚, 癥瘕, 巖, 癭瘤, 癰, 疔瘡, 石癰, 石疽, 疔疽, 疔疔, 陰瘡, 繭, 乳巖, 舌菌 等³⁻⁴⁾이 腫瘍의 範疇에 該當하는데, 腫瘍의 發病機轉으로는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 臟腑失調, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 等 이 있다²⁾.

免疫이란 外部로부터 侵入하는 微生物, 動物의 組織이나 體內에 不必要한 產物 등에 대해 非自己的인 抗原으로 認知하고 이에 特異하게 反應하여 抗體를 만들어 非自己的인 物質들을 排除하여

그 個體의 恒常性을 維持하는 反應이다⁵⁾. 韓醫學에서는 《素問·刺法論》⁶⁾에 “正氣內存 邪不可干”, 《靈樞·百病始生篇》⁷⁾에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人” 및 《素問·評熱病論》⁶⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라고 하여 免疫機能 등으로 包含한 概念을 正氣로 보았다⁸⁾.

藥鍼療法은 經絡學說과 藥物療法에 根據하여 疾病과 相應하는 經穴과 藥物을 選擇하고 藥針液을 經穴內에 注入하여 經穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 充分히 發揮하여 疾病을 治療하는 方法이다⁹⁾.

最近에 많은 種類의 藥鍼液이 抗癌 및 免疫增強에 效果가 있다고 報告되고 있으나, 祛風除濕, 通經止痛하는 效能이 있어 風濕痺痛, 鶴膝風, 水腫, 脚氣治療에 효과적인 靑風藤¹⁰⁻¹²⁾에 대한 研究는 接할 수 없었다.

이에 著者는 靑風藤으로 理脾胃, 調中氣, 和腸消滯, 疎風化濕, 通調經絡氣血, 扶正培元, 祛邪防病하는 中脘¹³⁻¹⁵⁾에 靑風藤藥鍼하여 抗癌 및 免疫機能 效果에 對해 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 생쥐를 대한실험센터에서 공급받아 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°C를 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 사용된 靑風藤(*Sinomenii acuti Lignum*, 이하 SAL로 表現함)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 藥 液의 製 造

靑風藤 物質分劃 藥液(Herbal-Acupuncture Solution, 以下 HAS로 表現함)은 곽¹⁶⁾ 등의 方法에 따라 Diaion HP-20 수지를 이용하여 調製하였다. 물로 추출한 靑風藤원액 100g을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피에 부어 그 폭이 약 25~30cm될 정도로 방치하였다. 이 후 증류수 1,000 ml를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass층) 靑風藤액을 분리하였다. 계속해서 30% MeOH 500 ml, 70% MeOH 500ml, 30% Acetone 500ml, 70% Acetone 500ml를 각각 통과시켜 분리된 분획 중 생쥐의 PBMC에서 싸이토카인 유도에 활성이 있는 분획층을 선정하여 藥液 제조를 하였다.

靑風藤 70% Methanol층 분획을 3회 여별(3M paper)한 후 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 靑風藤 농축액에 95% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 생성된 침

전물을 여별하고, 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여 생성된 침전물을 여별하고 다시 여액을 75% ethyl alcohol 30ml를 가한 후 같은 조작을 2회 반복한 다음 여액 중 ethyl alcohol을 감압 제거하여 잔사전량을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH6.8로 조절하여 저온에서 12 시간 방치한 후 미량의 부유액을 여별한 후 멸균하여 靑風藤藥液을 70% Methanol층 10%와 20%로 희석하여 사용하였다.

2) 藥 液의 選 定

Acetone과 Methanol의 농도를 달리해서 추출한 靑風藤 物質分劃 藥液 중에서 cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 살펴본 結果는 70% Methanol 10µg/ml의 靑風藤 物質分劃 藥液이 cytokine 遺傳子(IL-2, IL-10, IFN-γ, β-actin) 發顯에 다른 것들보다 뛰어난 것으로 나타나 선정하였다.

3) *Sinomenii acuti Lignum* 70% Methanol층 藥液에 의한 PBMCs의 mRNA遺傳子 發顯 調節

(1) PBMCs 分離 및 藥物處理

① PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) 세포분리

Balb/c 생쥐를 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 incubation 시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hipaque-1077(Sigma)로 2,000rpm에서 20분간 원

심분리하여 buffy coat부분을 얻어 실험에 사용하였다.

② 세포배양 및 약물처리

PBMCs를 24 well plate에 1×10^6 세포로 각 well에 분주하고, 靑風藤 70% Methanol층 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 처리하고 4 시간 동안 배양한 후 D-PBS로 수세하여 total RNA를 분리하였다.

(2) mRNA 遺傳子 分析

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 精량하고, RNA를 확인하기 爲하여 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 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 25 μ l의 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/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 다음, 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 利用하여 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 아래와 같으며, sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ 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 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 74 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycle한 後 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

4) 脾臟細胞 測定

脾臟免疫細胞를 分離하여 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 첨가하고, 靑風藤 70% Methanol층 藥鍼液을 농도별로 처리하였고, 양성대조군으로 Con-A(cocanavalin A, 10 μ g/ml)를 처리한 후 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 후 다시 8시간 배양하였다. 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.

5) *In vivo*에서 免疫細胞 增進과 活性化 實驗

(1) B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10 (ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 생쥐의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(1,500rpm, 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase (1,700U/mg, Type-XI Sigma)를 B16-F10 0.1g/ml에 處理하여 30分間 water bath(37°C)에서 培養시킨 後 遠心分離(1,300rpm, 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. 이렇게 얻어진 B16-F10 癌細胞株(2×10^5 cells/mouse)의 尾靜脈에 移植한 後 靑風藤 70% Methanol층 藥鍼液을 中腕에 7일간 藥鍼였다.

(2) 實驗群의 分類

1實驗群은 다음과 같이 分類하였다.

對照群-1(Control-1) : 7일째만 B16-F10 癌細胞株를 移植하고 다른 處置를 하지 않은 群

對照群-2(Control-2) : 6일간 中腕에 1日1回 刺鍼한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 中腕에 1日1回 刺鍼한 群

對照群-3(Control-3) : 6일간 생리식염수(0.1ml)를 中腕에 1日1回 注入한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 생리식염수 0.1ml를 中腕에 1日1回 注入한 群

實驗群-1(10% SAL-HAS) : 6일간 中腕에 10% 靑風藤 藥鍼(70% Methanol층 0.1ml)을 施術한 後, 이후 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 藥鍼 施術한 群

實驗群-2(1% SAL-HAS) : 6일간 中腕에 1% 靑風藤 藥鍼(70% Methanol층 0.1ml)을 施術한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 藥鍼 施術한 群

(3) 取穴

人體의 中腕에 相應하는 實驗動物의 體表面의 털을 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 1ml의 注射器를 使用하여 各各의 實驗群에 따라 中腕에 0.1ml씩, 1日1回, 總 22日間 藥鍼施術하였다.

(5) $CD3e^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, $CD69^+$, $NK1.1^+$, $B220^+$ 螢光細胞 分析

B16-F10 細胞株를 C57BL/6 생쥐에 移植한지 3일째 경추탈골법으로 치사시킨 後 脾臟을 分離하였다. 脾臟細胞에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti- $CD3e$, FITC-anti- $CD4$, FITC-anti- $CD8$, PE-anti- $CD25$, FITC-anti- $CD69$, PE-anti- $NK1.1$, PE-anti- $B220$ 을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 後 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 $CD25^+/CD4^+$, $CD8^+/CD3e^+$, $CD69^+/B220^+$, $NK1.1^+/CD3e^+$ 細胞를 分析(%)하였다.

(6) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 移植 後 靑風藤藥鍼한 後 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15일에 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) 病理組織檢査

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 아래의 過程(Fig.1)을 거쳐 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 아래(Fig. 2)와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin染色을 하였다.

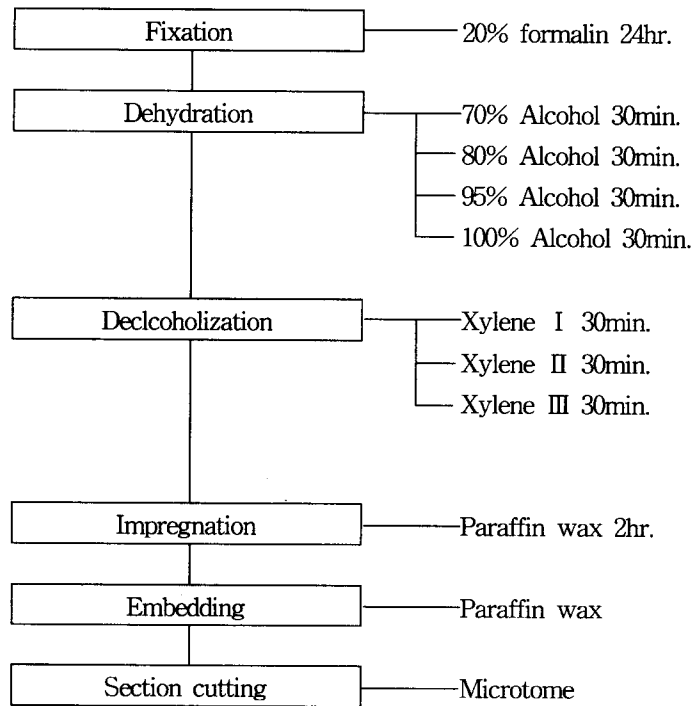


Fig. 1. Tissue Processing

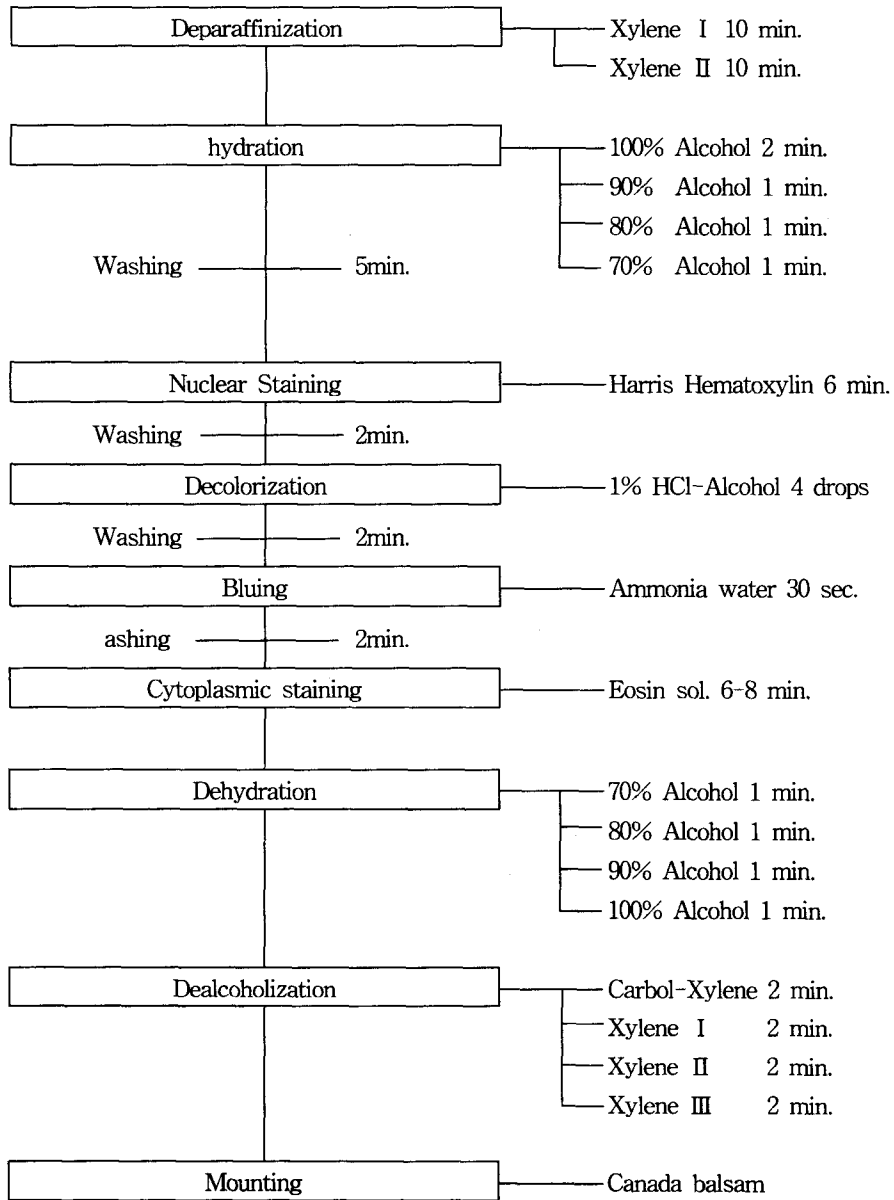


Fig. 2. Harris Hematoxylin & Eosin Staining

(8) 生命延長曲線 測定

B16-F10 癌細胞株를 C57BL/6 생쥐에 移植 후,

B16-F10 細胞株를 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) : 평균생존일수

ILS(Increase in MST over Control-C) : 연명

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

T : 처치군의 MTS

C : 대조군의 MTS

3. 統計處理

統計는 student's t-test로 하였다.

III. 成績

1. 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響

70% Methanol 100 μ g/ml의 靑風藤 物質分割藥鍼液을 건강한 Balb/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1 %의 농도로 처리하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 결과 脾臟細胞는 濃度 依存的으로 有意性있게 증가하였다(Table 1).

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

Group	Dose	Spleen cells production(cpm)
Media control	0	1,267 \pm 146
Con-A(μ g/ml)	0	38,760 \pm 5,194***
SAL-HAS(%)	10	11,530 \pm 3,105**
	1	8,501 \pm 2,123**
	0.1	3,053 \pm 879*

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were treated with SAL-HAS extract(10, 1, 0.1 %). Spleen cells were cultured with Con-A(positive control) and SAL-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. PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞數에 미치는 影響

1) PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 細胞 比率

CD25⁺/CD4⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 11.1 \pm 2.6%이었고, Control-2에서는 12.2 \pm 1.9%이었고, Control-3에서는 12.5 \pm 1.6%이었고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 16.6 \pm 2.7%와 16.0 \pm 1.8%로 각각 증가하였다(Table 2).

Table 2. Effects of SAL-HAS on the Percentage of CD25⁺/CD4⁺ in Mouse PBMCs

Group	Dose	CD25 ⁺ /CD4 ⁺ (%)
Control-1	0	11.1±2.6
Control-2	0	12.2±1.9
Control-3	0	12.5±1.6
SAL-HAS(%)	10	16.6±2.7
	1	16.0±1.8

C57BL/6 mice were treated with SAL-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. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD25⁺/CD4⁺ T 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.

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

2) PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 細胞 比率 으며, Control-3에서는 8.9±1.0%이었고, 10% SAL-CD8⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 14.5±2.0%와 5.3 ± 0.5%이었고, Control-2에서는 8.4±1.3%이었고 13.1±2.4%로 각각 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effects of SAL-HAS on the Percentage of CD8⁺/CD3e⁺ in Mouse PBMCs

Group	Dose	CD8 ⁺ /CD3e ⁺ (%)
Control-1	0	5.3±0.5
Control-2	0	8.4±1.3
Control-3	0	8.9±1.0
SAL-HAS(%)	10	14.5±2.0
	1	13.1±2.4

C57BL/6 mice were treated with SAL-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. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD8⁺/CD3e⁺ T 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.

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

3) PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 細胞 比率 이었으며, Control-3에서는 51.7±3.7%이었고, 10% CD69⁺/B220⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서 SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 57.0±4.6%와 53.8±4.9%로 각각 증가하였다(Table 4).

Table 4. Effects of SAL-HAS on the Percentage of CD69⁺/B220⁺ in Mouse PBMCs

Group	Dose	CD69 ⁺ /B220 ⁺ (%)
Control-1	0	47.9±3.8
Control-2	0	52.2±4.2
Control-3	0	51.7±3.7
SAL-HAS(%)	10	57.0±4.6
	1	53.8±4.9

C57BL/6 mice were treated with SAL-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. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD69⁺/B220⁺ B 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.

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

4) PBMCs의 NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞 比率 이었으며, Control-3에서는 4.2±0.8%이었고, 10% NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서 SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 5.2±0.4%와 4.8±0.2%로 각각 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effects of SAL-HAS on the Percentage of NK1.1⁺/CD3e⁺ in Mouse PBMCs

Group	Dose	NK1.1 ⁺ /CD3e ⁺ (%)
Control-1	0	3.7±0.3
Control-2	0	3.5±0.4
Control-3	0	4.2±0.8
SAL-HAS(%)	10	5.2±0.4
	1	4.8±0.2

C57BL/6 mice were treated with SAL-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. Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of NK1.1⁺/CD3e⁺ natural killer 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.

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

3. Pulmonary colony 數에 미치는 影響

Control-1에서는 86.3±7.2개였고, Control-2에서는 72.3±5.3개였으며, Control-3에서는 63.3±7.8개였고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는

각각 34.2±4.1개와 52.7±6.2개로 각각 감소하였다. 따라서 Pulmonary colony 數의 減少率은 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서 각각 46.0%, 16.7%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Effects of SAL-HAS on Pulmonary Colony Number of C57BL/6 Mice Implanted Intravenously with B16-F10 Melanoma

Group	Dose	No./animal	Pulmonary Colony No.	Decrease(%)
Control-1	0	10	86.3±7.2	
Control-2	0	10	72.3±5.3	
Control-3	0	10	63.3±7.8	
SAL-HAS(%)	10	10	34.2±4.1**	46.0
	1	10	52.7±6.2	16.7

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Chung-wan(CV12) for 21days. 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 SAL-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.

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

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

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

4. 平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響

平均生存日數는 Control-1에서는 16.4±3.5일이었고, Control-2에서는 19.2±2.8일이었으며, Control-3에서는 19.5±3.3일이었고, 10% SAL-HAS와 1%

SAL-HAS에서는 각각 26.6±4.7일과 23.8±3.7일로 증가하였다. 延命率은 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서 각각 36.4%와 21.0 %로 증가하였다(Table 7).

Table 7. Effects of SAL-HAS on MST and ILS 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	
SAL-HAS(%)	10	12	26.6±4.7*	36.4
	1	12	23.8±3.7	21.0

C57BL/6 mice were treated with SAL-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).

$$ILS = \left\{ \frac{T-C}{C} \right\} \times 100 (\%)$$

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.

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

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

Statistically significant value compared with control-5 data by T test(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

IV. 考 察

靑風藤(*Sinomenii acuti Lignum*)은 防己科(Menispermaceae)에 속한 靑藤(靑風藤)의 根莖을 乾燥한 것이다. 靑風藤의 性은 溫하고 味는 辛·苦·平하며, 肝經과 脾經에 歸經하여 祛風除濕, 通經止痛하는 效能으로 風濕痺痛, 鶴膝風, 水腫, 脚氣에 응용되어 왔다¹⁰⁻¹².

靑風藤의 藥理學的인 研究에 의하면 神經系統에 作用하여 鎮痛·鎮靜·鎮咳作用이 있고, 血壓

降下作用, 胃液分泌增加, 抗炎症作用, 히스타민放出作用 등의 效能이 부분적으로 糾明되었고¹², 臨床的으로 消炎鎮痛藥으로서 急性류마티스關節炎 및 打撲·捻挫로 인한 內出血, 腫脹에 사용한다¹⁰. 최근에 靑風藤에 對한 研究로는 血糖을 低下시키는 效能이 있다고 報告되었다¹⁷.

中脘(CV12)는 “太倉, 胃脘, 上紀, 中管, 胃募, 中胃, 胃中”라고도 하며, 奇經八脈 中 任脈에 屬하고, 胃의 募穴이고 八會穴 中 腑會穴이며 手太陽小腸脈·足陽明脈·任脈의 交會穴이고 回陽九針穴의 하나이다. 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調升降하는 穴性으로 胃痛, 腹脹, 水腫, 慢性胃炎, 腸炎,

胃潰瘍, 胃痙攣, 鼓脹, 胃下垂, 消化不良, 吐血, 嘔吐, 吞酸, 腹鳴, 泄瀉, 便秘, 癩亂, 黃疸, 不眠, 頭痛, 怔忡, 癲狂, 脇痛, 暑病, 虛勞, 哮喘, 子宮脫垂, 高血壓, 中風, 蕁麻疹, 脾胃虛弱 등의 活用範圍가 廣範圍한 效果를 지니고 있다¹³⁾.

藥鍼療法은 穴位注射療法⁹⁾이라고 하며, 一種의 東西의 結合形態인 新鍼法으로 患者의 疾病을 根據로 穴位의 經絡作用과 藥物의 藥理作用을 살핀 다음, 相應하는 俞穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하게 하여 疾病을 治療하는 方法으로 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 의하여 穴位 혹은 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併승된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎮痛, 腫瘍誘發抑制등의 治療效果가 있는 것으로, 藥物의 吸收가 빠르고, 經口投與가 不可能한 境遇에 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있다¹³⁾.

腫瘍은 自律性을 가진 組織의 過剩한 發育¹⁾으로, 細胞學的으로 非正常的인 細胞의 過剩增殖으로 因하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織 등에 非正常的인 組織을 形成하는 疾患이다¹⁸⁻¹⁹⁾. 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않고 正常組織에 대하여 破壞的인 것²⁰⁾을 일컫는 것으로 臨床 및 病理形態的인 所見에 依하여 陽性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나눌 수 있는데, 一般的으로 癌이라고 指稱되는 惡性腫瘍은 不規則하고 빠른 成長을 하며, 侵入性 成長을 하여 周圍의 正常組織을 破壞하고 體內 여러 部位로 擴散 轉移시켜 死亡에 이르게 하는 致命的인 疾病이다²¹⁻²²⁾.

西洋醫學에서는 癌의 發生因子로 遺傳, 人種, 地理, 年齡, 免疫學的 因子 등의 內的因子와 化學的 發癌物質, 放射線, 腫瘍性 바이러스 등의 外的因子^{1,23)}로 나누고 있으며, 그 治療方法으로 手術療法, 化學療法, 放射線療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등이 있지만 手術과 化學療法, 放射線療法에는 各各의 限界나 問題點들이 있고²³⁾, 遺傳子療法은

아직 治療方法이 定立되지 못한 實情이나, 患者의 正常組織 특히 免疫系 組織에 被害를 주는 化學療法의 短點을 줄이기 위해 免疫監視機構를 補強함으로써 癌에 對抗하는, 免疫療法이 各광을 받고 있다^{1,24)}.

韓醫學에서 腫瘍에 대한 認識은 殷墟의 甲骨文에 ‘瘤²⁵⁾’라는 病名이 나타났고, 周禮에는 瘍醫라는 表現이 등장하면서 腫瘍에 대한 認識이 始作되어, 『黃帝內經』에서 “伏梁, 癧, 疽, 腸澼, 瘤, 積聚²⁶⁾” 등으로 提示된 以後 癰疽, 痿瘤, 石疽, 反胃, 翻胃, 癰疽, 腸覃, 噎膈, 食噎, 癰, 巖, 痞塊, 疔癬, 失榮, 石疽, 惡核, 癭瘤, 繭脣, 舌菌 등^{3,27-28)}의 範疇에 包含시켜 現代 腫瘍의 概念과 類似하게 認識하였다.

免疫은 初期에는 어떤 傳染性 疾患의 再感染에 對한 防禦反應 즉 特定한 傳染性 疾患에 대하여 特異的인 抵抗性이 부여된 宿主의 能力을 意味하여²⁹⁾ 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機具로서 外部로부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에서 생긴 突然變異產物 등과 特異하게 作用하여 非自己를 除去함으로써 個體의 恒常性을 維持하는 現象이며 非自己를 特異的으로 認識하여 抗體를 形成하거나 細胞性 免疫反應을 보여 非自己를 除去하는 連續的 反應을 免疫反應이라 했지만³⁰⁾, 오늘날에 와서는 免疫의 概念이 점차 확대되어 어떤 종류의 傳染性 疾患에 대하여 先天的으로 가지고 있는 抵抗性도 포함시켜 이를 先天性 혹은 自然免疫이라 하여 매우 重要視하고 있다²⁹⁾.

韓醫學에서 免疫은 正氣와 邪氣의 作用으로 認識하여 『素問』²⁹⁾「上古天眞論」에서 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”라 하여 眞氣를 邪氣에 對稱되는 正氣의 意味로 파악하였다. 正氣는 身體 內에서 一切의 疾病에 抵抗하는 物質로 臟腑經絡 營衛氣血의 正常的인 生理機能을 包含하며, 邪氣는 一切의 疾病을 일으키는 原因 要素를 總稱하고 外界의 六淫之邪를 일컬으며, 또 身體 內 陰陽失調에서 發生된 虛證의 病理變化와 病理的 產物인

瘀血, 痰飲 등의 病邪를 말한다³¹⁾. 『素問』²⁶⁾「刺法論」에 “正氣存內 邪不可干”, 「評熱病論」에 “邪氣所湊 其氣必虛”, “邪之所在 皆爲不足”이라 하여 疾病 發生의 原因을 주로 正氣虛로 보았다. 이것은 身體의 正氣가 充實하여 防禦力이 있고 外邪의 作用이 除去되면, 身體 內의 陰陽平衡을 갖게 되고, 따라서 正氣는 臟腑組織機關의 機能活動을 正常的으로 維持하게하고 內外外部로부터 病邪에 對抗하는 抵抗力으로 길러 正常的인 生理活動을 維持하고 正常的 生理機能이 進行되게 된다.

CD4⁺ T세포는 보조 T림프구이고, CD8⁺ T세포는 억제 T세포 또는 세포독성 T 세포로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있으나, 모든 T세포 표면에 표현되는 표식인자로 CD2가 있다. 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다. CD4⁺ 인 보조 T세포는 다시 제1형 보조 T세포(T_{H1})와 제2형 보조 T세포(T_{H2})로 구별된다. CD4는 MHC 제1항원을 인식하고 작용하며, CD8은 MHC 제2항원을 알아보고 작용한다.

CD3은 T Cell 결정표지인자로, T림프구 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고, CD25는 activated T와 B cell에 분포하며 IL-2 수용체의 기능을 하며, CD69는 activated B와 T cell, 대식세포, NK cell에 분포하고, B220은 사람에겐 없지만 mouse의 B세포 표면에 있는 표식자이다.

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 세포는 CD3을 갖는다³²⁾.

최근 면역세포 활성화를 이용한 면역요법(immunotherapy)은 암치료에 새 장을 열고 있다. *in vitro*에서 면역세포를 활성화시켜 말초혈액에 주사한 후 암세포를 죽이든지, *in vivo*에서 활성화된 T세포, NK세포, DCs 세포 등이 암세포를

apoptosis로 유도하는 치료법이다. 이러한 연구³³⁾에는 생쥐전이(Mouse melanoma)모델이 사용되는데, 이는 암연구에서 비교적 잘 정립되어 있는 면역요법, 전이를 연구하기에 적합한 모델이다³²⁾.

本 研究에서 祛風除濕, 通經止痛의 效能이 있는 靑風藤으로 藥鍼液을 製造하여, 藥鍼液의 濃도 別로 PBMCs에서 cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 분석하여 가장 효과가 좋은 농도의 藥鍼液을 선별하였는데, 70% Methanol 100 μ g/ml의 靑風藤 物質分割 藥鍼液에서 의미있는 결과가 나왔다.

BALB/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1 %의 濃度로 處理하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 결과 脾臟細胞는 濃度 依存的으로 有意性있게 增加하였다(Table 1).

免疫細胞 增進과 活性化 實驗에서는 CD25⁺/CD4⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 11.1 \pm 2.6%이었고, Control-2에서는 12.2 \pm 1.9%이었으며, Control-3에서는 12.5 \pm 1.6%이었고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 16.6 \pm 2.7%와 16.0 \pm 1.8%로 增加하여, Th cell의 增進과 活性化에 濃度 增加에 比例하여 有意性 있는 增加를 보였다(Table 2).

CD8⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 5.3 \pm 0.5%이었고, Control-2에서는 8.4 \pm 1.3%이었으며, Control-3에서는 8.9 \pm 1.0%이었고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 14.5 \pm 2.0%와 13.1 \pm 2.4%로 增加하여, Tc/s cell의 增進과 活性化에 濃度 增加에 比例하여 有意性 있는 增加를 보였다(Table 3).

CD69⁺/B220⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 47.9 \pm 3.8%이었고, Control-2에서는 52.2 \pm 4.2%이었으며, Control-3에서는 51.7 \pm 3.7%이었고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 57.0 \pm 4.6%와 53.8 \pm 4.9%로 增加하여, B cell의 增進과 活性化에 濃度 增加에 比例하여 有意性 있는 增加를 보였다(Table 4).

NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 3.7±0.3 %이었고, Control-2에서는 3.5±0.4 %이었으며, Control-3에서는 4.2±0.8%이었고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 5.2±0.4%와 4.8±0.2%로 增加하여, NK cell의 增進과 活性化에 濃度增加에 比례하여 有意性 있는 增加를 보였다(Table 5).

위의 *in vivo*에서 PBMCs에서의 免疫細胞 增進과 活性化 實驗結果로 미루어 보아 靑風藤 物質分劃 藥鍼液이 특히 Th cell, NK cell을 活性化시켜 有意한 免疫 및 抗癌 效果를 增進시키는 것으로 나타났다. 이러한 結果는 靑風藤의 祛風除濕하고 通經止痛하는 效能과 關聯性이 있을 것으로 思料된다.

Pulmonary colonization assay는 B16-F10 癌細胞株 移植後 靑風藤 物質分劃 藥鍼液을 注入한 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15일에 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡으로 觀察한 結果 pulmonary colony 數는 Control-1에서는 86.3±7.2개였고, Control-2에서는 72.3±5.3개였으며, Control-3에서는 63.3±7.8개였고, 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 34.2±4.1개와 52.7±6.2개로 나타나 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 pulmonary colony number의 減少率이 각각 46.0%, 16.7%로 有意性 있는 結果가 나타났다. 또, 病理組織檢査도 Control-1에서는 肺組織에 轉移된 癌細胞를 많이 볼 수 있었고, Control-2에서는 Control-3보다는 良好했으나 많은 수의 B16-F10 암세포가 나타났으며, 10% SAL-HAS에서는 正常的인 肺細胞와 類似할 정도로 pulmonary colony 수가 顯著하게 減少하였다(Table 6).

平均生存日數는 Control-1에서는 16.4±3.5일이었고, Control-2에서는 19.2±2.8일이었으며, Control-3에서는 19.5±3.3일이었고, 10% SAL-HAS와 1%

SAL-HAS에서는 각각 26.6±4.7일과 23.8±3.7일로 나타나 延命率는 10% SAL-HAS와 1% SAL-HAS에서는 각각 36.4%와 21.0%로 1% SAL-HAS에서 가장 有意性 있었다(Table 7).

以上の 實驗結果를 綜合해 보면 靑風藤藥鍼은 抗癌과 免疫增進에 有效한 效能이 있는 것으로, 腫瘍 및 免疫關聯疾患에 應用될 수 있을 것이며, 앞으로 臨床에 應用 可能할 것으로 思料된다.

V. 結 論

中脛(CV12)에 施術한 靑風藤藥鍼의 抗癌 및 免疫機能을 實驗的으로 究明하고자 C57BL/6 생쥐에 B16-F10 癌株를 移植한 후, 靑風藤藥鍼한 후 PBMCs의 流細胞 螢光分析, 그리고 Pulmonary colony 數, 생쥐의 平均生存日數 및 延命率을 구하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 脾臟細胞의 增殖는 實驗群에서 對照群보다 增加하였다.
2. PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 細胞數의 比率이 全 實驗群에서 對照群에 比해 增加하였다.
3. Pulmonary colony formation은 對照群보다 減少하였다.
4. 平均生存日數와 延命率은 對照群보다 增加하였다.

以上の 結果로 靑風藤 藥鍼은 免疫增進 및 抗癌作用에 效果가 있는 것으로 생각되며, 向後 持續的인 研究 및 臨床的인 應用이 必要하리라 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 중양학. 서울 : 서울대학교출판부. 1996 : 1-5, 43-93.
- 2.崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울 : 행림출판. 1995 : 13, 32-42.
- 3.申天浩. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-29, 31-38.
- 4.金德鎬. 靈菇·山慈花·仙鶴草·卷柏·瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1987 ; 10(1) : 99-115.
- 5.정태호. 면역학 강의. 대구 : 경북대학교출판사. 1993 : 309-317.
- 6.洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 11, 124, 285.
- 7.洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 211, 286.
- 8.李殷鋪. 肉蓯蓉藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(1) : 251-286.
- 9.大韓藥鍼學會. 藥鍼製劑와 臨床應用. 서울 : 大韓藥鍼學會. 1997 : 1-5.
- 10.李尙仁 外. 漢藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1998 : 191.
- 11.顏正華. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 303-304.
- 12.金昌玟 外. 完譯中藥大辭典. 서울 : 圖書出版鼎談. 1997 : 4248-4252.
- 13.全國韓醫科大學. 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學上·下. 서울 : 集文堂. 1991 : 214-234, 730-732, 1457-1467.
- 14.林種國. 鍼灸治療學. 서울 : 集文堂. 1983 : 98, 99, 304-306, 342-343, 490-491.
- 15.崔用泰. 精解針灸學. 서울 : 杏林出版社. 1974 : 279-282, 344-345, 605-607, 615-617, 831-835.
- 16.곽이성 外. 난소절제 흰 쥐의 임상화학지수에 미치는 홍삼조사포닌의 영향. 고려인삼학회지. 2000 ; 24(1) : 46-50.
- 17.손영중 外. 靑風藤과 茯苓이 血糖量에 미치는 影響. 大韓本草學會誌. 2003 ; 18(1) : 65-71.
- 18.洪元植. 現代中共의 癌治療. 서울 : 英文社. 1984 : 81-94, 329-330, 361, 372-375, 378-379, 381-382.
- 19.김예희 外. 중양학. 인제대학교출판부. 1994 : 235-241.
- 20.박찬열 外. 發癌原因에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(1) : 147-159.
- 21.方藥中 外. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1986 : 621-636.
- 22.대한의학협회 분과학회협의회. 癌의 診斷과 治療. 서울 : 여문각. 1992 : 4-7.
- 23.서울대학교 의과대학. 腫瘍의 發生原因 및 危險要因. 서울 : 서울대학교출판부. 1989 : 31-44.
- 24.서울대학교 의과대학. 免疫學. 서울 : 서울대학교출판부. 1994 : 2-3, 72-75, 136-137, 303-304, 308-310.
- 25.王琦 外. 黃帝內經素問今釋. 서울 : 成輔社. 1983 : 146, 192, 227, 247.
- 26.洪元植 篇. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 11, 124, 285.
- 27.殿伯康 外. 中醫外科學. 北京 : 人民衛生出版社. 1987 : 203-210.
- 28.嚴用和. 濟生方. 서울 : 麗江出版社. 1987 : 483.
- 29.趙鍾寬. 韓方臨床腫瘍學. 大田 : 周珉出版社. 2001 : 10-15, 19-21, 70.
- 30.菊地活吉. 最新免疫學. 서울 : 集文堂. 1993 : 31-35.
- 31.安德均 譯. 免疫과 韓方. 서울 : 열린책들. 1998 : 19-21, 45-48.
- 32.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.

33. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25-26, 28, 31-32, 134.