

托裏益氣湯이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 作用 研究

문용아 · 박수연 · 김종한 · 최정화
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

Study of Takliikgi-tang on the Anti-Cancer Action in Mice

Oong-a Moon · Su-yeon Park · Jong-han Kim · Jung-hwa Choi

Objective : This Study was to investigate effects of Takliikgi-tang on the anti-cancer and proliferation of immunocytes, nitric oxide (NO) production of peritoneal macrophages.

Methods : We used Takliikgi-tang extract (TLT) with freeze-dried, 8weeks-old male mice and cancer cell lines (L1210, Sarcoma-180) for this Study. The cytotoxicity and proliferation of cells were tested using a colorimetric tetrazolium assay (MTT assay).

Results :

1. TLT was significantly showed cytotoxicity on the L1210, S-180 cell lines.
2. TLT was significantly increased proliferation of thymocytes in vitro.
3. TLT was significantly increased proliferation of thymocytes and splenocytes in normal mice.
4. TLT was significantly increased NO production from peritoneal macrophages in normal mice.
5. TLT was significantly decreased proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.
6. TLT was significantly increased proliferation of thymocytes and splenocytes by all-dosage in L1210 cells transplanted mice.
7. TLT was significantly increased NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Conclusions : The present author thought that TLT had action of anti-cancer by becoming immunocytes activity (NO production, proliferation of thymocytes).

Key words : Takliikgi-tang, anti-cancer.

1. 서 론

癰疽란 癰과 疽를 합한 말로, 그 원인에 대해

교신저자: 문용아, 광주광역시 남구 월산동 377-13번지
동신대학교 부속한방병원 안이비인후피부과교실
(E-mail: violata0@daum.net)

· 접수 2006/02/23 · 수정 2006/03/13 · 채택 2006/03/21

역대의가들은 外感六淫 · 七情內傷 · 飲食內傷 · 邪毒 등으로 발생된다 하였으며¹⁻⁶⁾, 宋代 以後 病理的인 側面에서 炎症性 疾患이나 腫瘍性 腫塊, 즉 癰과 有關하게 認識되었다^{4,5,7)}.

癰疽의 治法은 크게 消法, 托法, 補法으로 大別되는데 發病 초기에 사용되는 祛邪法 위주의 治法을

消法이라 하며, 증기에 사용되는 扶正祛邪 위주의 治法을 托法이라 하고, 후기에 사용되는 扶正위주의 治法을 補法이라 한다⁸⁾.

托裏益氣湯은 《醫學入門》⁹⁾에 “潰後 氣血大虛, 惟恐毒陷, 托裏之法. 一日 不可缺也. 古方 托裏益氣湯 選用. 蓋托裏則 氣血壯而脾胃盛 膿穢自排 毒氣自解 死肉自潰 新肉自生 瘡口自斂” 이라 하여 최초로 記載된 處方으로, 氣血을 補하는 八物湯에 川芎을 去하고 貝母, 陳皮, 香附子를 가한 형태로 구성되어 托法의 범주에 속하는 처방이다¹⁰⁾.

최근 한의학적 중앙치료법은 補氣·補血을 爲主로 하면서 破積·活血·清熱·解鬱·行氣 등의 治法들을 檢용하여 면역기능을 활성화하면서 항암효과를 나타내는 연구들이 활발히 進行되고 있는데^{7,11-13)}, 그 중 托法을 사용한 중앙에 대한 연구를 살펴보면 高¹⁴⁾는 內消沃雪湯으로, 柳¹⁵⁾ 등은 托裏散으로 항암효과와 면역기능의 증강에 대해 보고하였으나 托裏益氣湯에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 托裏益氣湯의 항암작용 및 면역증강작용을 觀察하여 有意성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

실험에 사용한 托裏益氣湯 (Takliikgi-tang, TLT)은 《東醫寶鑑》¹⁶⁾에 準하였으며, 동신대학교 附屬광주한방병원에서 구입한 후 본초학교실에서 정선을 받아 사용하였다. 실험에 사용한 처방의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table I)¹⁷⁾.

Table I. Prescription of Takliikgi-tang(TLT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	7.50
人參	<i>Ginseng Radix</i>	3.750
白茯苓	<i>Poria Cocos</i>	3.750
貝母	<i>Bulbus Fritillariae Thunbergii</i>	3.750
陳皮	<i>Pericarpium Citri</i>	3.750
香附子	<i>Cyperus rotundus Rhizoma</i>	3.750
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	3.750
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	3.750
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	3.750
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum Radix</i>	1.875
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.875
Totally		41.250

2) 세포주

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 급성백혈병 세포주인 L1210 세포주와 복강암세포주인 sarcoma-180 (S-180) 세포주를 사용하였다.

3) 동물

본 실험에 사용한 마우스는 (주) 다물 사이언스에서 구입한 balb/c계 8 주령된 수컷을 온도 20±3℃, 습도 55±5%, light/dark 12 hr의 사육 조건에서 1 주일 이상 적응시키면서 고형 pellet 사료 (삼양주식회사, Korea)와 물을 자유로이 섭취하게 하였다.

4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약들은 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma R4130), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco LOT. NO. 1006842), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma M2128), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Sigma L5750), Brewer Thioglycollate Medium (TG, Difco 0236-17-7), Interferon-γ (IFN-γ, Sigma I6507) 등으로 특급시약을 사용하였으며, 기기로는 microplate reader (ELX800UV, U.S.A.) rotary

vacuum evaporator (EYELA, Japan)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

TLT의 2 첩분량 (82.50 g)을 1,500 ml 증류수로 상온에서 100 °C 2 시간동안 전탕한 다음, 이 추출액을 1,500 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 그 후 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조시켜 21.2 g (수득율 25.7%)을 얻어 검액으로 사용하였다.

2) 세포 배양조건

암세포주 (L1210 세포주, S-180 세포주)와 면역세포 (흉선 세포, 비장 세포)의 배지로는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하였다. 암세포주의 계대 배양은 1 : 10 ~ 1 : 20 비율로 3 일 간격으로 하였고, 세포 증식에 미치는 약제의 영향을 관찰하기 위한 실험은 계대 배양 2 일째의 세포를 사용하였다.

3) MTT법에 의한 암세포 독성 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann¹⁸⁾이 개발하고 Kotnik¹⁹⁾ 등이 변형시킨 방법으로, 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 100 µl (2×10^5 cells/ml)를 접종하여 37 °C의 CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후 농도별 (1, 10, 100 µg/ml)로 희석된 TLT 100 µl를 넣고 37 °C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양하였다. 배양종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)-A에 희석된 MTT용액 20 µl를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 은박지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 0.01 N HCl에 용해시킨

10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

4) 마우스의 흉선세포 및 비장세포의 분리

마우스의 흉선 및 비장 세포 분리는 Wysocki²⁰⁾ 및 Mizel²¹⁾ 등의 방법을 이용하였다. Balb/c 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 stainless mesh로 여과하여 2 회 세척한 다음 10 ml 주사기로 세포 부유액을 취하여 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3 회 반복 세척한 후 흉선 및 비장 세포를 분리하였다.

5) MTT법에 의한 흉선 및 비장 세포의 증식율 측정

4) 와 같이 분리된 흉선 및 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 흉선 세포에는 Concanavalin A (Con A, Sigma C5275) 5 µg/ml와, 비장 세포에는 Lipopolysaccharide (LPS, Sigma L2637) 5 µg/ml와 함께 다양하게 희석된 TLT의 농도(1, 10, 100 µg/ml)를 100 µl씩 첨가한 후 37 °C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 3) 과 동일한 방법으로 흉선 및 비장 세포의 증식율을 측정하였다.

6) 정상 마우스의 면역 세포 증식율에 미치는 효과 측정

① 실험군

Balb/c 마우스 6 마리를 1 군으로 하여 Control 과 Sample 등으로 분류하였다. Control은 증류수 0.2 ml씩을, Sample A는 TLT 300 mg/kg 0.2 ml

씩을, Sample B는 TLT 500 mg/kg 0.2 ml씩을, 각각 7 일 동안 경구 투여하였다.

② 정상 마우스의 흉선 및 비장세포 증식을 측정

6)-① 과 같이 실시한 후 4) 와 같이 흉선 및 비장 세포를 분리하였다. 이후 분리된 흉선 및 비장 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 흉선세포에는 Con A $5 \mu\text{g/ml}$, 비장세포는 LPS $5 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 후, 37°C 의 CO_2 배양기에서 48 시간 배양한 다음 5) 와 동일한 방법으로 흉선 및 비장세포의 증식율을 측정하였다.

③ 복강 macrophages 분리 및 nitric oxide (NO) 생성능 측정

6)-① 과 같이 실시하면서 경추 탈골시키기 3 일전에 3% TG 2.0 ml를 복강 주사하였다. 이후 도살된 마우스의 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분 원심 분리하고 RPMI 1640 배지로 2 회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 4 시간 동안 배양시켰다. 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한 macrophages만을 cell scraper로 분리하여 24 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/ml로 분주한 후 LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 와 IFN- γ 25 units/ml를 첨가하여 37°C CO_2 배양기에서 24 시간 배양한 후 생성된 NO의 양을 Griess법²³⁾으로 측정하였다. 세포 부유액 100 μl 와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthyl- ethylene-diamine 2 Hcl + 2.5% H_3PO_4) 100 μl 를 혼합하여 96 well plate에 넣고 microplate-reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO_2 의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

7) L1210 세포를 이식한 병태모델의 암세포 및 면역세포 증식율 관찰

① 실험군

Balb/c 마우스 6 마리를 1 군으로 한 후 L1210 세포주를 2) 와 같이 계대 배양하여 2×10^6 cells/mouse로 조제한 다음 마우스의 복강에 1.0 ml를 주사함으로써 암종을 유발시켰다. 실험군은 Control과 Sample 등으로 분류하였다. Control은 증류수 0.2 ml를, Sample A는 TLT 300 mg/kg 0.2 ml를, Sample B는 TLT 500 mg/kg 0.2 ml를, 각각 7 일 동안 경구 투여하였다.

② 암세포 증식율 측정

7)-① 과 같이 실시한 후 마우스를 경추 탈골시켜 도살하였다. 도살 후 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 잘 혼합시킨 다음 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분간 원심 분리하고 RPMI 1640 배지로 2 회 세척한 후 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO_2 배양기에서 배양시켰다. 4 시간 후에 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 4°C 에서 1,500 rpm으로 5 분간 원심 분리하였다. 침전된 세포 분획을 모아 1×10^6 cells/ml로 조제하여 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 100 μl 를 분주하고 배지 100 μl 를 채워 37°C 의 CO_2 배양기에서 48 시간 배양하였다. 이식된 암세포의 증식율은 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

③ 면역세포 증식율 측정

7)-① 과 같이 실시한 후 4) 와 같이 흉선 및 비장 세포를 분리한 다음, 5) 와 동일한 방법으로 흉선 및 비장 세포의 증식율을 측정하였다.

④ 복강 macrophages 분리 및 NO 생성능 측정

7)-① 과 같이 실시하면서 경추 탈골시키기 3 일전에 3% TG 2.0 ml를 복강 주사하였고, 이후 6)-③ 과 같이 복강 macrophages를 분리한 다음, 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양을 NaNO_2 의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

3. 統計處理

통계처리는 Student's paired and/or unpaired t-test²²⁾에 의하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다.

III. 실험결과

1. TLT가 암세포주에 미치는 세포독성 효과

암세포주에 미치는 TLT의 세포독성 효과를 알아보기 위하여 TLT를 각각 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 1).

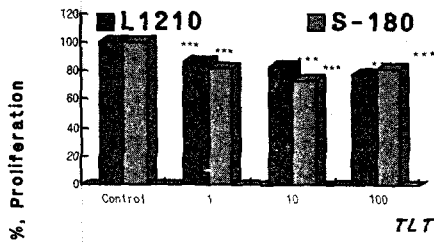


Fig. 1. Cytotoxicity of TLT on the L1210 cell lines and S-180 cell lines.

L1210 ; lymphocytic leukemia cell lines, S-180 ; sarcoma 180 cell lines, TLT ; Takliikgi-tang extract, Control ; TLT non-treated group, 1, 10, 100 ; TLT 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$ treated group.

* : P-value vs Control group (** : P<0.01).

TLT를 투여하지 않은 Control의 L1210 세포주 증식율을 100.00±0.02%라 하였을 때, TLT 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 85.15±0.03%로, TLT를 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 투여하였을 때는 각각 83.45±0.04%와 77.61±0.05%로 모두 Control보다 유의성 (P<0.001) 있게 세포 독성을 나타내었다.

TLT를 투여하지 않은 Control의 S-180 세포주 증식율을 100.00±0.03%라 하였을 때, TLT 1 $\mu\text{g/ml}$

를 투여하였을 때는 81.79±0.02%였으며, TLT 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 투여하였을 때는 81.96±0.04%로 세포 독성을 나타내었고, 특히 TLT 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 73.80±0.01%로 강한 세포 독성을 나타내었다. TLT를 투여한 모든 투여군에서 Control보다 유의성 (P<0.001) 있게 세포 독성을 나타내었다.

2. TLT가 면역세포 증식율에 미치는 효과

면역 세포 증식율에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT를 각각 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 2).

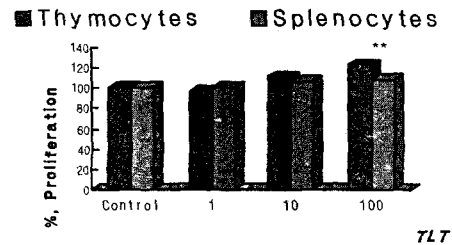


Fig. 2. Effects of TLT on the proliferation of thymocytes and splenocytes in vitro.

Other legends are the same as Fig. 1.

* : P-value vs Control group (** : P<0.01).

TLT를 투여하지 않은 Control의 흉선 세포 증식율을 100.00±0.01%라 하였을 때, TLT 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때의 증식율은 97.14±0.06%로 증식율이 감소되는 경향을 나타내었으나 TLT 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 111.43±0.06%로 Control보다 증가되었고, TLT 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때의 흉선 세포 증식율은 123.21±0.02%로 Control보다 유의성 (P<0.01) 있게 증가되었다.

TLT를 투여하지 않은 Control의 비장 세포 증식율을 100.00±0.02%라 하였을 때, TLT 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때는 100.53±0.03%로, TLT 10

μg/ml를 투여하였을 때는 105.88±0.04%로, TLT 100 μg/ml를 투여하였을 때는 108.20±0.01%로 Control보다 증가되었다.

3. TLT가 정상 마우스의 면역세포 증식에 미치는 효과

정상 마우스의 흉선 세포 및 비장 세포의 증식에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT 300 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 3).

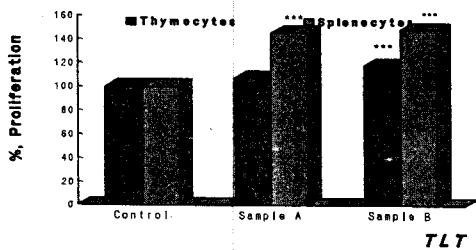


Fig. 3. Effects of TLT on the proliferation of thymocytes and splenocytes in normal mice.

TLT ; Takliiki-tang extract, Control ; DDW 0.2 ml administered group for 7 days, Sample A ; TLT 300 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days, Sample B ; TLT 500 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days.

The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments.

* : P-value vs Control group(*** : P<0.001).

Control의 흉선 세포 증식율을 100.00±0.03%라 하였을 때 Sample A의 흉선 세포 증식율은 107.42 ±0.02%로 Control에 비해 증가되었고, Sample B의 흉선 세포 증식율은 117.60 ±0.02%로 Control에 비해 유의성 (P<0.001) 있게 증가되었다.

Control의 비장 세포 증식율을 100.00±0.01%라 하였을 때 Sample A와 Sample B의 비장 세포 증식율은 각각 145.71±0.01%, 148.62±0.02%로

Control에 비해 유의성 (P<0.001) 있게 증가되었다.

4. TLT가 정상 마우스의 복강 macrophages 에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과

정상 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT 300 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 4).

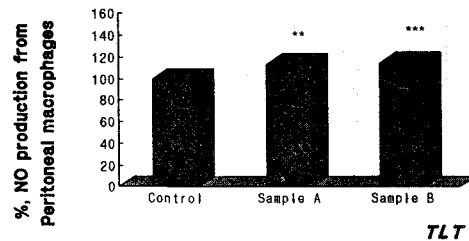


Fig. 4. Effects of TLT on the NO production from peritoneal macrophages in normal mice.

Other legends are the same as Fig. 3.

The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments.

* : P-value vs Control group(** : P<0.01, *** : P<0.001).

Control의 NO 양 11.97±0.97 μM를 100.00±0.05%라 하였을 때 Sample A의 NO 양은 113.06±0.04%로 Control에 비해 유의성 (P<0.01) 있게 증가되었고, Sample B의 NO 양도 114.75±0.03%로 Control에 비해 유의성 (P<0.001) 있게 증가되었다.

5. TLT가 L1210 세포 이식 마우스의 복강내 암세포 증식에 미치는 억제 효과

암세포주 (L1210 세포주)를 이식한 후 암세포의 증식 억제에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT 300 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 다

음과 같았다 (Fig. 5).

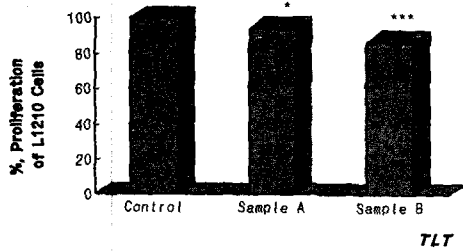


Fig. 5. Effects of TLT on the proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.

L1210 cells (2×10^6 cells/mouse) transplanted to mice of all experimental group.

TLT ; Takliikgi-tang extract, Control ; DDW 0.2 ml administered group for 7 days, Sample A ; TLT 300 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days, Sample B ; TLT 500 mg/kg 0.2 ml administered group for 7 days.

The present data were expressed as mean \pm SE of 6 experiments.

* : P-value vs Control group(* : P<0.05, *** : P<0.001).

Control의 암세포 증식율을 100.00 \pm 0.02%라 하였을 때 Sample A의 증식율은 94.01 \pm 0.05%로 Control보다 유의성 (P<0.05) 있게 억제되었고, Sample B의 증식율도 86.85 \pm 0.01%로 Control에 비해 유의성 (P<0.001) 있게 억제되었다.

6. TLT가 L1210 세포 이식 마우스의 면역 세포 증식에 미치는 효과

암세포주 (L1210 세포주)를 이식한 후 흉선 세포 및 비장 세포의 증식율에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT 300 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 6).

Control의 흉선 세포 증식율을 100.00 \pm 0.01%라 하였을 때 Sample A의 흉선 세포 증식율은 105.74 \pm 0.03%로 Control에 비해 증가하였고,

Sample B의 흉선 세포 증식율은 118.66 \pm 0.01%로 Control에 비하여 유의성 (P<0.001) 있게 증가되었다.

Control의 비장 세포 증식율을 100.00 \pm 0.02%라 하였을 때 Sample A의 비장 세포 증식율은 112.80 \pm 0.01%로, Sample B의 비장 세포 증식율도 115.70 \pm 0.02%로 모두 Control의 증식율보다 유의성 (P<0.01) 있게 증가되었다.

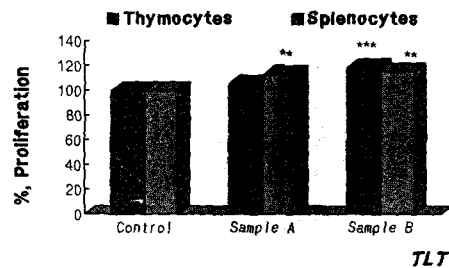


Fig. 6. Effects of TLT on the proliferation of thymocytes and splenocytes in L1210 cells transplanted mice.

Other legends are the same as Fig. 5.

The present data were expressed as mean \pm SE of 6 experiments.

* : P-value vs Control group(** : P<0.01, *** : P<0.001).

7. TLT가 L1210 세포 이식 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과

암세포주 (L1210 세포주)를 이식한 후 복강 대식 세포에서 생산되는 NO의 양에 미치는 TLT의 효과를 알아보기 위하여 TLT 300 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 7).

Control의 NO 양 15.60 μ M을 100.00 \pm 0.01%라 하였을 때 Sample A의 NO 양은 102.79 \pm 0.01%로 유의성 (P<0.05)있게 증가되었고, Sample B의 NO 양도 110.70 \pm 0.02%로 Control에 비해 유의성 (P<0.01) 있게 증가되었다.

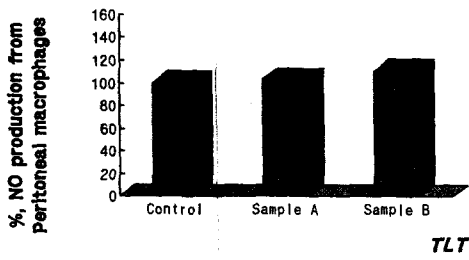


Fig. 7. Effects of TLT on the NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Other legends are the same as Fig. 5.
 The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments.
 * : P-value vs Control group(* : P<0.05, ** : P<0.01).

IV. 고 찰

癰疽의 원인은 《內經·癰疽編》²⁶⁾에서 膏梁厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通 등에 의해, 劉¹⁾는 火熱·風濕之所乘에 의해, 李²⁾는 濕熱에 의해, 朱³⁾는 六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯에 의해 발생된다 하였다. 癰疽는 宋代以後 病理的인 側面에서 炎症性 疾患이나 腫瘍性 腫塊, 즉 癌과 有關하게 認識되고^{4,5,7)}, 또한 上石疽, 骨疽, 緩疽 등과 같이 腫瘍을 지칭하는 개념으로도 사용된다^{7,24,25)}.

癰疽의 치법에는 크게 消法, 托法, 補法이 있으며 消法은 癰疽가 생긴 초기에 쓰이는 치법으로 발산시켜 속으로 삭게 하고, 이미 화농되었을 때는 농을 배출하고, 毒氣를 없애는 방법이다. 托法은 內托 또는 托裏法이라고도 불리며 癰疽를 치료할 때 약물요법을 통해 癰疽를 국한시키거나 낮게 하는 방법이며 邪氣가 表部를 지나서 內陷할 위험이 있을 때 쓴다⁸⁾. 補法은 정기가 消耗되어 邪氣가 內陷하였을 때 쓰는 치법으로 肌寒肉冷·膿汁清稀·毒不出·瘡口不合·成聚積不赤·結核無膿·外證不明한 경우에 사용된다²⁸⁻³⁰⁾.

托裏益氣湯의 구성에 대해 살펴보면 川芎을 去한 八物湯에 香附子, 桔梗, 貝母를 가한 처방으로 구성 약물 중 白朮은 補脾益氣, 燥濕利水, 固表止汗하고, 人蔘은 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴등의 효능이 있고, 白芍藥은 養血斂陰, 柔肝止痛하며, 陳皮는 理氣調中, 燥濕化痰한다. 當歸는 補血活血, 調經止痛, 活血祛瘀하고, 熟地黃은 補血滋陰, 補精益髓하며, 白茯苓은 理水滲濕, 健脾補中하고, 貝母는 化痰止咳, 清熱散結의 효능이 있다. 香附子는 行氣解鬱, 調經止痛하고, 桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿의 하며, 甘草는 補脾益氣, 潤肺止咳, 緩和藥性的 효능이 있다²⁷⁾. 또한 人蔘³¹⁾ 및 白芍藥³²⁾, 甘草³³⁾, 當歸³⁴⁾등의 단미 제제는 물론 八物湯의 항암작용 및 면역세포증강작용³⁵⁾은 이미 보고 된 바 있다. 이와 같은 약물의 효능으로 미루어 볼 때 托裏益氣湯은 正氣를 도와 邪氣를 없애는 托法의 범주에 속하는 처방으로 생각된다.

질병발생에 대해 한의학에서는 《素問·調經論》²⁶⁾에 “百病之生, 皆有虛實”, 《素問·評熱病論》²⁶⁾에 “邪之所湊, 其氣必虛”, 《素問·通評虛實論》²⁶⁾에 “邪氣盛則實, 正氣奪則虛”, 《靈樞·口門篇》²⁶⁾에 “邪之所在, 皆爲不足” 이라 하여 장부조직기관의 기능활동을 정상적으로 유지하게 하는 ‘正氣’가 강하면 강할수록 인체를 발병하게 하는 ‘邪氣’를 능히 물리칠 수 있는 항병력을 갖게 되어 질병이 발생하지 않는다 하였다³⁶⁾. 이는 질병의 발병 및 발전에 한의학에서는 ‘正氣’를 중요시하였다는 것을 알 수 있고, 이러한 한의학의 인식론은 서의학의 면역개념과 밀접한 관련성이 있다³⁷⁻³⁸⁾. 이에 면역기능, 즉 ‘正氣’를 증강시키면서 종양, 즉 ‘邪氣’를 제거하는 방법이 동서의학론적 입장에서 볼 때 가장 효과적인 항암치료법이라 생각되고, 치료약물중에서는 ‘正邪’를 고려하여 치료하는 한의학적 약물요법이 인체기능을 조화롭게 하는데 있어서 유효할 것으로 생각되었다.

면역은 인체 내에 침입한 異物質이나 새로이 발

생된 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상으로 식세포나 보체가 관여하는 선천적 면역과 T 세포와 B 세포가 관여하는 후천적 면역으로 나누어진다. 또한 면역반응에 따라 체액성 면역(humoral immunity)과 세포매개성 면역(cell-mediated immunity)으로 분류되는데, 체액성 면역은 B 세포가 주로 담당하는 것으로 혈액 및 기타의 체액 속에서 방출된 항체로 생체에 감염을 일으킨 세균이나 세균독소, virus 등과 직접 결합하여 용균 또는 독소, virus의 중화, 식균현상을 나타냄으로써 생체를 감염으로부터 방어하는 기능을 담당하고, 세포매개성 면역은 T 세포가 주로 담당하는 것으로 알러지반응, 접촉피부염, 동종이식 거부 등을 나타내는 면역의 종류이며, 화학전달물질(lymphokine)들을 분비함으로써 종양세포나 virus 감염세포에 대해 직접 손상을 준다^{39,41)}.

최근에 한약재를 이용하여 이런 면역기능을 활성화시키면서 항암효과를 나타내는 연구들이 진행되고 있는데, 高¹⁴⁾ 등은 內消沃雪湯이 L1210 혈액암 세포주로 유발한 암세포의 증식을 억제하고 면역세포 증식효과가 있음을, 金⁴²⁾ 등은 加味葶藶湯이 B16-F0 종양세포주로 유발한 폐암세포에 대해 특이적 세포독성과 암세포의 전이억제 및 항 종양효과가 있음을, 柳¹⁵⁾ 등은 托裏散이 L1210 혈액암 세포주로 유발한 암세포의 증식을 억제하고 면역세포 증식효과가 있으며 NO의 양이 증가하여 서로 연관성이 있음을, 高⁴³⁾는 膽癌動物의 생명기간 延長, T cell과 B cell의 증식, 血清抗體價(凝集素價, 溶血素價), NK cell의 활성도를 관찰한 결과 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯이 항암효과가 있을 것으로 추정하는 동시에 그 중에서도 活血化癥之劑와 補氣之劑를 合方하면 더욱 더 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 托裏益氣湯의 항암에 대한 연구를 아직까지 접하지 못하여 托裏益氣湯의 항암작용 및 면역증강 작용을 관찰하고자 하였다.

托裏益氣湯이 암세포주에 미치는 세포독성 효과를 관찰한 결과, L1210 암세포주에 托裏益氣湯을 고농도로 투여할수록 대조군에 비하여 22% 이상 유의성 있는 세포독성을 나타내었고, S-180 세포주의 세포독성에도 유의성을 나타내었다. 그러나 托裏益氣湯의 *in vitro*상 S-180 세포주에 대한 세포 독성은 농도에 의존하지 않았다. 이는 托裏益氣湯이 암세포주에 미치는 세포독성이 선택성이 있음을 보여주는 결과라 생각된다.

면역 세포 (흉선 세포 및 비장 세포)에 미치는 세포 증식을 관찰한 결과 흉선 세포의 증식은 고농도가 투여되었을 때 약 23 % 이상 세포 증식을 유의성 있게 증가시켰지만 비장 세포의 증식에 있어서는 저농도 투여 시 약 8 % 정도 유의성 있는 세포 증식을 나타내 托裏益氣湯은 비장 세포 즉, B 세포보다는 흉선 세포, 즉 세포 매개성 면역을 담당하는 T 세포에 작용하는 것으로 생각된다.

정상 마우스의 면역 세포 증식에 미치는 托裏益氣湯의 효과를 관찰한 결과 *in vitro*상과는 달리 본방은 흉선 세포보다는 비장 세포 즉, B 세포의 증식을 고농도 투여 시 48 % 정도 유의성 있게 증가시켜 托裏益氣湯이 세포 매개성 면역에 관여함은 물론 B 세포의 활성화에도 관여하는 것으로 생각된다.

그러하여 저자는 후천성 면역 중 세포 매개성 면역에 관여하는 것으로 생각되는 托裏益氣湯이 선천성 면역과는 어떠한 관계가 있는지 알아보고자 하였다.

Nitric Oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthase (NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 Neuron에서 발견되는 nNOS, 활성화된 macrophages 등에서 발견되는 iNOS, Endothelial cell에서 발견되는 eNOS가 있다⁴⁴⁾. 이중 iNOS는 macrophages 및 호중구 등과 같이 탐식작용 등에 관여하는 신체의 여러 종류의 세포에서 분비되는 것인데, 그 중

macrophages가 생산하는 NO는 interleukin 1 β · IFN- γ · Tumor Necrosis Factor (TNF)- α 등과 같은 cytokine 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 유도되어 형성된다⁴⁵⁾. 복강 macrophages에 의해 생산되는 NO의 항암작용이 최초로 보고⁴⁶⁾된 이래 많은 연구자들은 활성화된 macrophages가 정상세포보다 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophages-mediated tumor cytotoxicity로 중요한 의미가 있다고 하였다^{47,48)}.

托裏益氣湯이 정상 마우스의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양에 미치는 효과를 관찰한 결과 투여 농도가 높을수록 NO 양도 대조군보다 약 15% 정도 유의성 있게 증가되었다. 따라서 托裏益氣湯은 선천성 면역에도 관여하는 것으로 생각된다.

托裏益氣湯이 *in vitro*상에서 세포 매개성 면역을 관여하여 암세포주에 세포 독성을 나타내고, *in vivo*상에서 후천성 면역과 함께 선천성 면역에도 관여하여 NO의 양을 증가시켰다면, 암세포를 이식한 *in vivo*상에서도 면역 기능 증강과 함께 항암 작용을 나타낼 것으로 생각되었다.

托裏益氣湯이 L1210 세포를 이식한 마우스의 복강 내 암세포 증식에 미치는 억제 효과를 관찰한 결과 본방을 고농도로 투여할수록 약 13% 정도 암세포의 증식을 유의성 있게 억제하였고, 흉선 세포와 비장 세포의 증식율도 각각 18%, 15%이상 증가되었다. 복강 macrophages에서 생성되는 NO 양은 고농도 투여 시 대조군보다 약 11% 이상 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과, 托裏益氣湯은 암세포주에 대해 세포 독성이 있으며 암세포의 증식을 억제시킴을 알 수 있다. 암세포의 증식 억제 효과를 *in vitro*상과 *in vivo*상에서 비교해보면, 후천성 면역인 세포 매개성 면역을 담당하는 T 세포와 체액성 면역을 담당하는 B 세포의 증식을 촉진시키는 동시에, 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있는 iNOS의 생성을 증가시킴으로써 항암 작용을 보인 것으로 생각된다.

또한 托裏益氣湯의 암세포에 대한 세포독성효과가 L1210, S-180 외의 여타 종양세포주에서도 관찰될 것으로 기대되므로 폐암, 유방암등 다른 암종에 대한 연구 및 임상응용이 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

托裏益氣湯의 항암작용에 미치는 작용을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 托裏益氣湯은 L1210 및 S-180 세포주에 대하여 유의성 있는 세포독성을 나타냈다.
2. 托裏益氣湯은 *in vitro* 상 흉선 세포의 증식을 유의성 있게 증가시켰다.
3. 托裏益氣湯은 정상 마우스 및 L1210세포가 이식된 병태 모델의 흉선 세포 및 비장 세포의 증식을 유의성 있게 촉진시켰다.
4. 托裏益氣湯은 정상 마우스 및 L1210세포가 이식된 병태 모델의 복강 macrophages에서 생산되는 NO의 양을 유의성 있게 촉진시켰다.
5. 托裏益氣湯은 L1210세포가 이식된 병태 모델의 복강내 암세포 증식을 유의성 있게 억제하였다.

참고문헌

1. 李聰甫外 1人. 金元四大醫家 學術思想研究. 서울:成輔社, 1985:3637.
2. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:大成文化社, 1994 532-533.
3. 朱丹溪. 丹溪心法附與. 臺灣:五州出版社, 1963 (卷十六) 10, (卷十八) 1.
4. 陳無擇. 三因論. 서울:翰成社, 1977:525- 526.
5. 楊醫立. 中醫學問答(下). 北京:人民衛生出版社 1985:356-357, 369-370.

6. 張潔古. 活法機要. 북경:인민위생출판사. 1984: 11.
7. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 北京:北京科學技術出版社. 1983:110.
8. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:79-81.
9. 李 梴. 醫學入門. 서울:南山堂. 1991:2167
10. 李 岩. 腫瘤臨證備要. 北京:人民衛生出版社. 1983:11-26.
11. 張代釗. 中西醫結合治療癌證. 山西:山西人民出版社. 1984:11-19.
12. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海:上海科學技術出版社. 1980:1-10.
13. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울:杏林出版. 1995: 37-42.
14. 고흥개 외 3인. 內消沃雪湯의 항암효과. 대한안이비인후피부과학회지. 2005;18(1):82-93.
15. 유미경 외 3인. 托裏散이 항암에 미치는 작용기전 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2005;18(1):71-81
16. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1987:841.
17. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1999:531-537, 540-541, 578-583.
18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods. 1983;65(1-2):55-63.
19. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods. 1990;129(1):23-30.
20. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. "Planning" for lymphocytes ; A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 1978;75(6):2844-2848.
21. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. Regulation of lymphocyte-activating factor(LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF. J. Immunol. Methods. 1979;122(6):2173-2179.
22. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical Methods(6th ed). Iowa state Uni(ames). 1967,Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immun. 1991;59(9):3280-3283.
23. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immun. 1991;59(9):3280-3283.
24. 顧佰康외 2인. 증의외과학. 북경:인민위생출판사, 1987:205-210.
25. 김상호 외 4인. 일반병리학. 서울:고문사. 1995 :51-54, 348-349.
26. 楊維傑. 黃帝內經素問靈樞譯解. 서울:成輔社. 1980:(素問) 235, 266, 455, (靈樞) 262.
27. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1997:169, 175, 221, 223, 283, 321, 332, 380, 381, 387, 453, 454, 463, 473, 506, 636.
28. 齊德之 撰. 外科精義. 서울:醫聖堂. 1999:60.
29. 蔡炳允. 漢方外科. 서울:高文社. 1987:52-53.
30. 白洪龍. 辨證診治概要. 서울:의성당. 1986: 502-507.
31. Matsunaga H et al. Chem Pharm Bull. 1989; 22(9):1279.
32. 原田正敏. 國外醫藥·植物藥分冊. 1991;6(3):116.
33. 殷金株 等. 中華微生物學和免疫學雜誌. 1991; 11(4):248
34. Kumazawa Y et al. 國外醫藥中醫中藥分冊.

- 1986;8(3):22.
35. 박혜준 외 1인. 팔물탕이 항암 및 면역기능에 미치는 실험적 효과. 대한한의학회지. 1998;19(1):327-338.
36. 張潔古. 活法機要. 북경:인민위생출판사. 1984: 11
37. 鄭遇悅. 韓方病理學. 裡里:서울공판사. 1985: 5-34.
38. 康命吉. 濟衆新編. 서울:杏林書院. 1982:182.
39. Willson, J.K.V., Bittner, G.N., Oberley, T.D., Meisner, L.F., & Weese, J.L. Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *J. Cancer Res.* 1987;47(10):2704-2713.
40. 김상호 외 4인. 일반병리학. 서울:고문사. 1995:51-54, 348-349.
41. 하대유 외 25인. 免疫學. 서울:高文社. 1994: 1-32.
42. 김성훈외 1인. 葦莖湯, 加味葦莖湯의 B16-Fo에 대한 항종양효과와 조직변화. 대한한의학회지. 1995;16(2):365-385.
43. 高光錫. 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 實驗的 研究. 東醫病理學會誌. 1994;9(1):21-45.
44. Thomas M. D. Textbook of biochemistry with clinical correlation. 5th ed. New York :Wiley-less. 2002;487.
45. Higuchi, M.M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages ; Tumor necrosis factor and L-arginine-depenent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol. Methods.* 1990;144(4):1425-1431.
46. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987;235:473.
47. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uni, K. and Sasada, M. Mechanism of leukemic cell lysis by activated human macrophages ; leukemic cells can be lysed without direct contact. *Int. J. Hematol.* 1994;60(1):51-57.
48. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland, H.E.Jr., Gilleland, L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. Neutrophil-mediated nitrosamine formation ; role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology.* 1992;103(4):1260-1266.