

산양산삼이 Doxorubicin의 급성 및 아급성 독성에 미치는 영향

이현주 · 안대영¹ · 김호현*

세명대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 소백산 산하산삼

Effect of the Water Extract of Cultured Wild Ginseng on the Acute and Subacute Toxicities Induced by Doxorubicin in Mice

Hyun Ju Lee, Dea Young An¹, Ho Hyun Kim*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Semyung University, 1:Sobaeksan(Mt.) Sanha Wild Ginseng Co., Ltd.

This study was carried out to examine the protective effect of Cultured Wild Ginseng(CWG) on the acute and subacute toxicities induced by doxorubicin(Doxo) in mice. Heart and liver weight was decreased following Doxo administration. In contrast, such a decrease was significantly attenuated by CWG administration. The value of serum CPK in Doxo group was increased compared with normal group. But the value of CWG group were decreased significantly compared with the values of Doxo group in the liver of the Doxo group, cloudy swelling of hepatic cells and narrowing of sinusoids were observed. Whereas in the CWG group, well oriented hepatic cell cords and sinusoids were observed. In the testis of the Doxo group, necrotic and degenerative changes of the seminiferous tubules, especially beneath testicular membrane were observed. But those lesions were alleviated in CWG group. Cross sectional area of testis and diameter of seminiferous tubule were significantly increased in CWG group compared with Doxo group. Body weight was reduced in Doxo group compared with normal group. In contrast, such a decrease was significantly attenuated by CWG administration atwa5th day. Spermatogenetic cells in seminiferous tubules were necrotic and desquamated and the cellularity of seminiferous epithelia was reduced in Doxo group. But those lesions were attenuated by CWG administration. Cross sectional area of testis and diameter of seminiferous tubule were significantly increased in CWG group compared with Doxo group. In addition, the increase in lipid peroxidation(LPO) in testis was inaddition, the,iout such a increased was significantly inhibited in CWG group. BrdU labelled cells in the seminiferous tubules were remarkably decreased in Doxo group. Whereas the number of seminiferous tubules labelled with BrdU in spermatogonia was increased by CWG administration. The obtained results suggest that CWG has protective effect on doxorubicin-induced toxicity. This effect might be mediated through the supplementation of vital energy.

Key words : cultured wild ginseng, doxorubicin, testicular toxicity, LPO, BrdU

서 론

생활환경과 의료수준의 향상에도 불구하고 환경오염, 스트레스 등 각종원인에 의한 암 발생률과 사망률이 매년 증가하고 있는 추세이다.

암에 대한 치료는 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등으로 대부분의 경우 수술요법과 화학요법을 병행하는데, 암환자들은 치료과정에서 발생하는 부작용으로 심한 고통

을 겪게 된다. 특히 화학요법과 방사선요법은 치료 후 골수조혈 장기이상, 위장장애, 탈모 등의 각종 부작용이 발생하므로¹⁾ 최근 환자의 삶의 질을 개선할 필요성이 대두되고 있고 항암제의 부작용을 감소시키기 위한 많은 연구도 진행되고 있다.

한의학에서는 인체 생리기능의 저하나 질병의 발생은 正氣와 邪氣의 균형이 失調되어 발생한다는 이론^{2,3)}을 바탕으로 예방과 치료를 시행하므로 항암제의 부작용을 감소시키기 위한 방안도 正氣의 보강이라는 측면에서 접근할 수 있다.

한약재중 人蔘은 神農本草經에서 五臟의 기능을 補益하고 精神과 魂魄을 안정시키며 邪氣를 제거하여 장복하면 신체를 강건하게 하고 長壽케 하는 효능⁴⁾이 있다고 기재되어 있으며, 현재

* 교신저자 : 김호현, 충북 제천시 세명로 117, 세명대학교 한의과대학

· E-mail : binbae@semyung.ac.kr, · Tel : 043-649-1343

· 접수 : 2009/07/20 · 수정 : 2009/08/03 · 채택 : 2009/08/18

까지 여러 가지 신체의 허약함을 補益하고, 正氣를 증진케 하여 체내의 邪氣를 제거하며, 邪氣의 침입을 방어하는 대표적인 補氣劑로 사용하고 있다.

이 人蔘이 野生에서 자연발생적으로 발아하여 성장한 것을 山蔘이라 하고, 人蔘이나 山蔘의 種子 또는 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 人蔘을 山養山蔘(또는 長腦蔘)이라 하여⁵⁾ 최근 山養山蔘의 재배와 효능에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

종양과 관련된 山養山蔘의 연구로는 민 등⁶⁾이 종양 증식 억제 효과와 항암제의 부작용을 감소시키는 것으로, 안 등⁷⁾은 항산화효과와 CT-26 cancer cell의 증식을 억제하고 복강암 유발생쥐의 생존기간을 증가시키는 것으로, 김 등⁸⁾은 HL-60 세포를 이용한 항암효과연구에서 山養山蔘이 人蔘에 비하여 효과가 앞서는 것으로, 이⁹⁾는 혈장 면역단백질(CR2-C3d) 증가, antitrypsin 감소, vitamin D binding protein 증가 등의 효과가 있는 것으로, 곡 등¹⁰⁾은 A549 human lung cancer cell에서 apoptosis 유도에 의해 세포사멸효과를 나타내는 것으로 연구 보고한 바 있다.

이에 저자는 기존의 연구를 통하여 보고된 山養山蔘의 효과가 인체의 正氣를 補益함으로써 저항력을 증강시켜 邪氣에 대한 방어능력을 향상시키고 질병으로부터의 회복을 촉진할 것으로 예상하고, 항암제 doxorubicin의 독성에 미치는 山養山蔘의 영향을 체중과 장기의 병리조직학적 변화를 중심으로 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 山養山蔘 추출액 제조

山養山蔘(Wild Ginseng)은 소백산 산하산삼에서 구입하여 86 g(12뿌리)을 round flask에 넣고, 증류수 350 ml을 가하여 2시간 동안 가열 추출하였다. 추출액을 micro syringe filter(0.2 μm)로 여과하여 최종 300 ml의 추출액을 만들었다.

2. 실험동물

9주령(체중 38 g 내외)의 BALB/c 수컷 생쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 50±5%로 조정된 세명대학교 청정동물사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험 기간동안 사료와 깔짚은 감마 멸균처리 된 것을 사용하였으며, 음수는 자유 섭취케 하였다.

3. Doxorubicin 급성 독성에 미치는 효과

1) 실험군의 분류 및 처치

각 실험군을 10마리로 하여 아래와 같이 실험군을 분류하고 처치하였다.

(1) 정상군 (Normal group)

doxorubicin을 접종하지 않은 군으로 생리식염수 1 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.

(2) 대조군 (Control group)

생리식염수 1 ml을 1일 1회 5일간 전투여하고 doxorubicin (Sigma Co., USA)을 15 mg/kg의 농도로 1회 복강 투여하였으며,

doxorubicin 투여 후 5일간 생리식염수를 투여하였다.

(3) 산삼군 (CWG group)

산양산삼 추출액 1 ml을 1일 1회 5일간 전투여하고 doxorubicin을 15 mg/kg의 농도로 1회 복강 투여하였으며, doxorubicin 투여 후 5일간 산양산삼추출액을 투여하였다.

2) 체중 측정

실험 0일, 3일, 5일(doxorubicin 투여일), 7일 및 10일에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

3) 장기 중량 측정

실험 10일에 모든 개체를 부검하여 심장, 간장, 신장 및 고환을 적출하였으며 장기에 부착된 결합조직을 제거한 후 각 장기의 중량을 측정하였다.

4) CPK, GPT 및 BUN 측정

실험 10일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시키고 심장에서 채혈한 후 3,000rpm에서 10분간 원심하여 혈청을 분리하였으며, 전자동생화학분석기(Hitachi 7150, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5) 병리조직학적 검사

실험 10일에 모든 개체를 부검하여 적출한 심장, 간장, 신장 및 고환을 Bouin's sol.에 24시간 고정하였다. 고정된 조직의 절단면을 일반적인 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5μm 두께의 박절편을 만들었으며 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색한 후 병리조직학적 소견을 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 고환 단면적 측정

H&E 염색한 고환조직을 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 그 단면적을 측정하였다.

7) 정세관 직경 측정

Hematoxylin & Eosin 염색된 고환 조직에서 정세관의 단경 및 장경의 길이가 20% 이상 차이가 나지 않는 비교적 원형에 가까운 정세관 10개를 임의로 선택해서 그 직경을 측정하여 평균치를 구하였다.

4. Doxorubicin 아급성 독성에 미치는 효과

1) 실험군의 분류 및 처치

각 실험군을 10마리로 하여 아래와 같이 실험군을 분류하고 처치하였으며, 실험 종료일 및 종료 전일에 BrdU(Sigma Co., USA)를 50 mg/kg의 농도로 총 2회 복강주사 하였다.

(1) 정상군 (Normal group)

doxorubicin을 접종하지 않은 군으로 생리식염수 1 ml을 1일 1회 15일간 투여하였다.

(2) 대조군 (Control group)

실험개시일에 doxorubicin을 3 mg/kg의 농도로 2일 간격으로 3회 복강 투여하였으며, 실험개시일부터 생리식염수 1 ml을 1일 1회 15일간 투여하였다.

(3) 산삼군 (CWG group)

실험개시일에 doxorubicin을 3 mg/kg의 농도로 2일 간격으로 3회 복강 투여하였으며, 실험개시일부터 산양산삼추출액 1 ml

을 1일 1회 15일간 투여하였다.

2) 체중 측정

실험 0일(doxorubicin 1차 투여일), 3일, 6일, 9일, 12일 및 15일에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

3) 장기 중량 측정

실험 15일에 모든 개체를 부검하여 심장, 간장, 신장 및 고환을 적출하고 장기에 부착된 결합조직을 제거한 후 각 장기의 중량을 측정하였다.

4) 말초혈액검사

실험 15일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시킨 상태에서 심장채혈한 혈액을 EDTA가 담긴 채혈병에 담아 잘 섞은 후, 자동혈구계산기(Advia 120, Leverkusen, Germany)를 이용하여 백혈구수, 백혈구 감별계산, 혈소판수를 측정하였다.

5) 고환조직 내 지질과산화(lipid peroxidation) 정도 측정

고환의 일부분을 적출하여 무게를 측정한 후 50 ml tube에 넣고, 측정된 고환 무게의 10배 분량의 5% Triton X-100(Sigma Co., USA) 용액을 첨가하여 조직균질기(ULTRA-TURRAX T8, IKA Labortechnik, Germany)로 조직균질액을 제조하였다. 조직균질액을 4°C에서 10분간 3,000rpm으로 원심하고 상층액을 지질과산화 정도 및 단백질 정량 분석에 사용하였다. 지질과산화 정도는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay 법¹¹⁾에 준하여 측정하였다. 조직균질액 100 µl에 10% trichloroacetic acid(Sigma Co., USA)를 넣어 4°C에서 10분간 반응시키고 4°C에서 15분간 2200 g로 원심하여 상층액 200 µl를 취하여 1.5ml tube에 분주하였다. 동량의 0.67% thiobarbituric acid(Sigma Co., USA)를 첨가하여 끓는 물에서 10분간 반응시키고 532 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Co., USA)을 1,0n,1,dehyde (MDA) 생성 표준액으로 하여 표준곡선을 작성하였으며 검액의 흡광도를 적용하여 조직내 MDA생성량을 계산하였다. 단백질 정량 분석은 Bradford 방법¹²⁾에 준하여 실시하였다. 조직균질액 10 µl를 취하고 protein assay dye(Bio-Rad Laboratories, USA) 200 µl를 첨가하여 10분간 반응시키고 595 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. Bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하고 검액의 흡광도를 적용하여 단백질 함량을 계산하였다.

조직 내 지질과산화 정도는 조직 단백질 mg 당 생성된 MDA 함량으로 표시하였다.

6) 병리조직학적 검사

실험 15일에 모든 개체를 부검하여 적출한 심장, 간장, 신장 및 고환을 Bouin's sol.에 24시간 고정하였다. 고정된 조직의 절단면을 일반적인 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 µm 두께의 박절편을 만들었으며 Hematoxylin-Eosin 염색한 후 병리조직학적 소견을 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 고환 단면적의 측정

H&E 염색한 고환조직을 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 그 단면적을 측정하였다.

8) 정세관 직경의 측정

Hematoxylin & Eosin 염색된 고환 조직에서 정세관의 단경 및 장경의 길이가 20% 이상 차이가 나지 않는 비교적 원형에 가까운 정세관 10개를 임의로 선택해서 그 직경을 측정하여 평균치를 구하였다.

9) BrdU 면역조직화학 염색 및 BrdU 표지 정세관 수의 측정

탈파리핀과정과 함수과정을 거친 고환 조직을 0.05M PBS(pH 7.4)로 수세한 후 BrdU 면역조직화학 염색을 실시하였다. 조직을 37°C 2N HCl 용액에 담가 1시간 반응하고, 0.05M borate buffer(pH 8.5)로 10분씩 2회 중화시킨 후 PBS로 수세하였다. 600배 희석한 anti-BrdU(Roche, Germany)로 4°C에서 15시간 반응시키고, biotinlated 2nd antibody(Vector Laboratoris, USA)로 30분간 반응시켰으며, ABC 용액(Vector Laboratoris, USA)에서 30분간 반응시키고 DAB로 10분간 발색시켰다. Hematoxylin 액으로 대조 염색을 실시한 후 탈수과정 및 투명화 과정을 걸쳐 Canada balsam으로 봉입하였다. BrdU 양성 세포의 종류 및 분포를 광학현미경으로 관찰하였으며, 단면에서 관찰되는 정세관 중 BrdU 양성 정조세포가 관찰되는 정세관의 수와 BrdU 양성 정모세포 또는 정자세포가 관찰되는 정세관의 수를 각각 계수하였다.

5. 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.1 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다.

결 과

1. Doxorubicin 급성 독성에 미치는 효과

1) 체중의 차이

Doxorubicin을 투여하기 전까지는 모든 군간에 체중의 차이는 없었다. Doxorubicin을 투여한 2일 제인 실험 7일 제에는 대조군이 정상군에 비하여 유의성 있게 체중이 감소되었다. 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 1).

Table 1. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the body weight of BALB/c mice induced acute toxicities by doxorubicin.

Group	Body Weight (g)				
	0	3	5	7	10(day)
Normal	37.9±2.3 ^{a)}	37.9±2.2	38.2±2.2	38.7±2.1	37.3±3.4
Control	37.4±1.9	38.1±2.1	38.2±1.9	36.5±1.7*	34.8±1.7
CWG	37.8±2.2	38.2±2.3	38.4±2.2	35.4±1.5	34.1±0.8

a) : Mean±SD(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 10 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and normal saline 1 ml/day for 10 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 10 days. * : significantly different compared with the value of normal group* : p<0.05).

2) 장기 중량의 차이

정상군에 비하여 대조군의 심장, 간장, 신장 및 고환 중량은 모두 정상군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. 산양산삼군에서

는 대조군에 비하여 심장과 간장의 중량 감소가 유의성 있게 억제되었으며, 신장과 고환은 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the organ weight of BALB/c mice induced acute toxicities by doxorubicin.

Group	Organ Weight (g)			
	Heart	Liver	Kidney	Testis
Normal	0.22±0.02 ^{a)}	2.00±0.19	0.63±0.09	0.25±0.03
Control	0.13±0.02 ^{***}	1.31±0.22 ^{***}	0.49±0.04 ^{***}	0.19±0.02 ^{***}
CWG	0.16±0.01 ^{###}	1.84±0.21 ^{###}	0.56±0.10 [#]	0.18±0.02

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 10 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and normal saline 1 ml/day for 10 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 10 days. * : significantly different compared with the value of normal group*** : p<(0.001). # : significantly different compared with the value of control group# : p<(0.05, ### : p<(0.001).

3) 혈액학적 차이

정상군에 비하여 대조군에서 CPK는 유의성 있게 증가되었으나, 산양산삼군에서는 유의성있게 감소되었다(Table 3). GPT와 BUN의 경우는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

Table 3. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the level of CPK, GOT and creatinine in serum of BALB/c mice induced acute toxicities by doxorubicin.

Group	CPK(IU/L)	GPT(IU/L)	BUN(mg/dL)
Normal	156.0±58.6 ^{a)}	36.8± 8.8	32.3±6.5
Control	411.0±89.6 ^{***}	60.2±43.1	20.1±2.8 ^{***}
CWG	317.8±52.3 [#]	67.3±23.2	21.0±4.2

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 10 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and normal saline 1 ml/day for 10 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 10 days. * : significantly different compared with the value of normal group*** : p<(0.001). # : significantly different compared with the value of control group# : p<(0.05).

4) 병리조직학적 소견

(1) 심장

대조군에서 일부 심근세포에서 황문이 소실되고 세포질이 균질하게 염색되는 변성된 심근세포가 관찰되었다. 산양산삼군의 심장에서도 대조군과 유사한 정도의 변성이 관찰되었으나 두 군 간의 차이는 인정되지 않았다.

(2) 간장

정상군의 간장은 간세포삭(hepatic cell cords) 및 동양모세혈관(sinusoids) 등이 규칙적인 배열을 보였으나, 대조군의 간장에서는 문맥주위영역에 국한된 간세포의 변성이 관찰되었으며 동양모세혈관은 간세포종창으로 인해서 압박되어 있었다(Fig. 1).

산양산삼군에서는 동양모세혈관 및 간세포삭의 구조가 비교적 양호하게 유지되어 있었다(Fig. 2).

(3) 고환

정상군의 고환조직은 모든 발육 단계의 정세관이 활발한 증식상태에 놓여 있으며, 정조세포, 정모세포, 정자세포가 치밀하게 증식되어 있었다. 대조군의 고환조직은 주로 고환막에 접한 정세관에서 변화가 두드러졌다. 모든 예에서 고환막에 접한 일부 정세관의 상피세포는 세포사이의 연결성이 상실되어 있었으며 정자발생세포의 과사 및 탈락이 관찰되었다(Fig. 3). 고환의 중심

부위의 정세관은 상피세포층이 얇아져 있어 내강이 넓게 관찰되었다. 산양산삼군의 고환조직은 대조군에서와 같은 병변이 관찰되었으나 과사된 정세관의 빈도 및 정도는 대조군에 비해서 완화되어 있었다(Fig. 4).

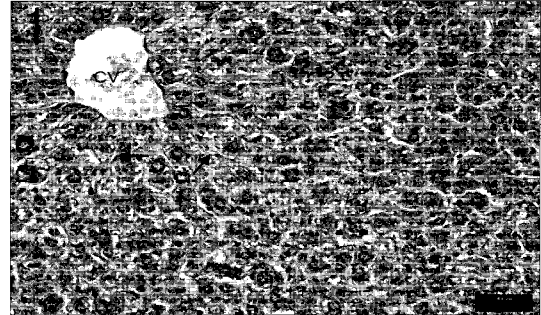


Fig. 1. Liver of control group in experiment I . Cloudy swelling of hepatic cells and narrowing of sinusoids(arrow) were observed. cv : central vein, H&E stain, scale bar = 40 μm

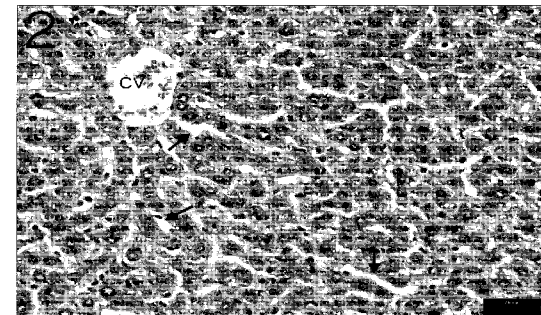


Fig. 2. Liver of CWG treated group in experiment I . Well oriented hepatic cell cords and sinusoids(arrow) were observed. cv : central vein, H&E stain, scale bar = 40 μm

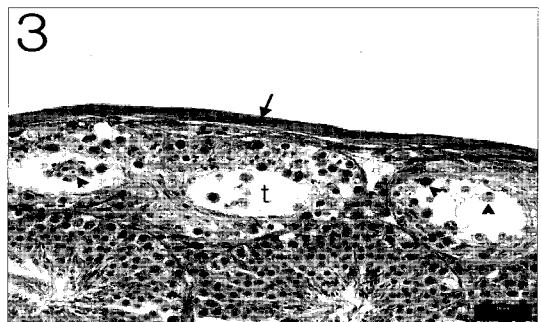


Fig. 3. Testis of control group in experiment I . The structures of seminiferous tubules(t) beneath testicular membrane(arrow) were disrupted. Note the poor cellularity of seminiferous epithelia and desquamated necrotic epithelia(arrow heads). H&E stain, scale bar = 40 μm

(4) 신장

모든 군의 신장 조직에서는 병리조직학적으로 인정할 만한 병변은 관찰되지 않았다.

(5) 고환 단면적과 정세관 직경의 차이

정상군에 비하여 대조군에서는 고환의 단면적과 정세관의 직경이 모두 유의성있게 감소되었다. 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 고환의 단면적과 정세관 직경의 감소가 모두 유의성있게 억제되었다(Table 4).

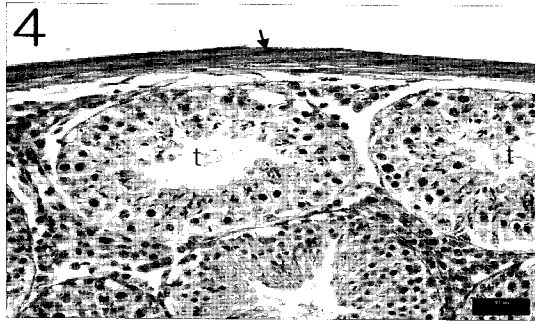


Fig. 4. Testis of CWG treated group in experiment I. Note the dense cellularity of seminiferous tubules(t) beneath testicular membrane(arrow). Compare with Fig. 3. H&E stain, scale bar = 40 μ m

Table 4. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the cross sectional area of testis and the diameter of seminiferous tubules in BALB/c mice induced acute toxicities by doxorubicin.

Group	Area(mm ²)	Diameter(μ m)
Normal	19.4±1.9 ²⁾	46.1±1.6
Control	14.5±0.6 ^{***}	37.0±2.6 ^{***}
CWG	15.8±1.1 [#]	40.7±2.3 [#]

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 15 mg/kg at 5 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 10 days. * : significantly different compared with the value of normal group(*** : p<0.001). # : significantly different compared with the value of control group(# : p<0.05, ## : p<0.01).

2. Doxorubicin 아급성 독성에 미치는 효과

1) 체중의 차이

정상군은 지속적으로 체중이 증가된 반면 대조군에서는 실험 6일째부터 정상군에 비하여 유의성 있게 체중이 감소되었다. 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 실험 15일째에 체중의 감소가 유의성 있게 억제되었다(Table 5).

Table 5. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the body weight of BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

Group	Body Weight (g)					
	0	3	6	9	12	15(day)
Normal	36.9±1.7 ²⁾	37.5±1.9	37.5±1.4	39.4±2.2	38.9±1.4	39.0±1.9
Control	37.2±1.8	36.2±1.6	34.2±1.5 ^{***}	35.1±2.0 ^{***}	33.5±2.5 ^{***}	32.1±2.6 ^{***}
CWG	36.5±2.0	35.8±2.3	33.7±2.4	35.2±2.5	34.6±2.6	36.5±2.9 [#]

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 15 days. * : significantly different compared with the value of normal group(*** : p<0.001). # : significantly different compared with the value of control group(# : p<0.05).

2) 장기 중량의 차이

정상군에 비하여 대조군의 심장, 간장, 신장 및 고환 중량은 모두 정상군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. 양산삼군에서는 대조군에 비하여 심장, 간장, 고환의 중량은 유의한 차이가 없었으나, 신장의 중량은 유의성 있게 감소되었다(Table 6).

3) 고환조직 내 지질과산화 정도 차이

정상군에 비하여 대조군에서 고환조직 내 지질과산화 함량이 유의성 있게 증가되었다. 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 고환조직 내 지질과산화 함량의 증가가 유의성 있게 억제되었다(Table 7).

Table 6. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the organ weight of BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

Group	Organ Weight(g)			
	Heart	Liver	Kidney	Testis
Normal	0.20±0.02 ²⁾	1.91±0.32	0.65±0.07	0.24±0.03
Control	0.14±0.01 ^{***}	1.49±0.17 ^{**}	0.50±0.05 ^{***}	0.23±0.02 ^{***}
CWG	0.14±0.01	1.57±0.14	0.42±0.06 [#]	0.22±0.02

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. * : significant and different compared with the value of normal group(*** : p<0.001, ** : p<0.01). # : significant and different compared with the value of control group(## : p<0.01).

Table 7. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on lipid peroxidation(LPO) level in testis of BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

Group	Malonaldehyde (μ mol/mg protein)
Normal	4.7 ± 0.7 ²⁾
Control	6.4 ± 0.6 ^{***}
CWG	5.6 ± 0.5 ^{##}

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 15 days. * : significantly different compared with the value of normal group(*** : p<0.001). # : significantly different compared with the value of control group(## : p<0.01).

4) 혈액학적 차이

정상군에 비하여 대조군에서 WBC, neutrophil, lymphocyte 와 platelet 모두 증가되었으며, 산양산삼군에서는 platelet가 대조군에 비해서도 더욱 증가하는 결과를 나타내었다(Table 8).

Table 8. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the index of WBC, neutrophil, lymphocyte and platelets of BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

	WBC($\times 10^3/\mu$ l)	Neu(%)	Lym(%)	PLT($\times 10^3/\mu$ l)
Normal	3.1±1.4a)	47.5±22.0	46.9±23.1	817±187
Control	4.7±3.0	65.3±14.6*	29.3±13.1*	998±147*
CWG	5.7±2.0	59.2±13.7	33.1±13.4	1541±213 ^{###}

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 15 days. * : significantly different compared with the value of normal group(* : p<0.05). # : significantly different compared with the value of control group(## : p<0.01).

5) 병리조직학적 소견

(1) 심장, 간장 및 신장

정상군을 비롯한 대조군 및 산양산삼군 모두 심장, 간장 및 신장조직에서 병리조직학적으로 인정할 만한 병변이 관찰되지 않았다.

(2) 고환

대조군의 고환조직은 고환막에 접한 대부분의 정세관 상피세포의 변성 및 괴사가 진행되었다. 이들 부위에서의 정세관 상피세포는 세포사이의 연결성이 상실되어 있었으며, 정자발생세포의 괴사 및 탈락이 진행되어 많은 부위에서 지지세포(Sertoli's cell)가 주된 정세관 상피세포로 관찰되었다(Fig. 5). 고환의 중심 부위에서도 상피세포의 연결성이 상실된 정세관이 곳곳에서 확인되었고 대부분 정세관의 상피세포층은 얇아져 있어 내강이 넓

게 관찰되었으며 정자의 밀도도 정상군에 비해서 현저히 감소되어 있었다. 또한 대부분의 정세관에서 분열중인 정조세포는 관찰되지 않았다. 산양산삼군의 교환조직은 대조군에서와 같은 유사한 병변이 관찰되었으나 괴사된 정세관의 빈도 및 정도는 대조군에 비해서 완화되어 있었으며(Fig. 6), 분열중인 정조세포가 관찰되는 정세관의 빈도도 대조군에 비해서 증가되어 있었다.

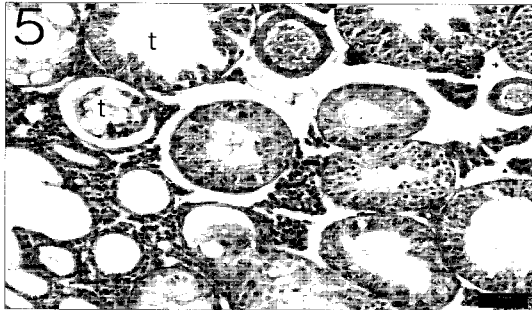


Fig. 5. Testis of control group in experiment II. Spermatogenic cells in seminiferous tubules(t) were necrotic and desquamated. Note flat seminiferous epithelial layers. H&E stain, scale bar = 50 μ m

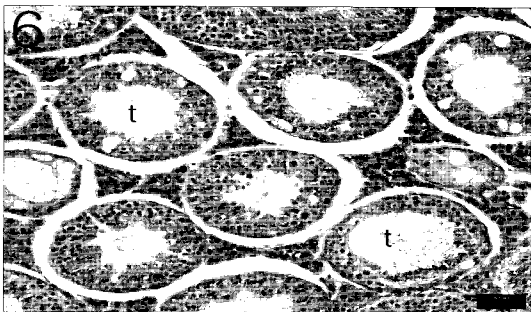


Fig. 6. Testis of CWG treated group in experiment II. The cellularity of seminiferous epithelia was increased compared with control group. Compare with Fig. 5. H&E stain, scale bar = 50 μ m

6) 교환 단면적과 정세관 직경의 차이

정상군에 비하여 대조군에서 교환 단면적과 정세관 직경이 모두 유의성 있게 감소되었다. 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 교환 단면적과 정세관 직경의 감소가 모두 유의성 있게 억제되었다(Table 9).

Table 9. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the cross sectional area of testis and the diameter of seminiferous tubules in BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

Group	Area(mm ²)	Diameter(μ m)
Normal	19.4 \pm 1.4 ^{a)}	44.6 \pm 2.0
Control	12.4 \pm 0.9 ^{***}	36.2 \pm 2.0 ^{***}
CWG	14.0 \pm 0.9 ^{###}	38.7 \pm 1.4 ^{##}

a) : Mean \pm S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. Clin: Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 15 days. *n: saynificantly differontr2, 4 day and nthe value of normal line (**n: p<0.001). #n: saynificantly differontr2, 4 day and nthe value of ormtrol group(## : p<0.01, ### : p<0.001).

7) BrdU 발현 양상 및 BrdU 양성 정세관 수의 차이

정상군은 대부분의 정세관에서 BrdU 양성 반응이 정세관 기저막에 접한 정조세포에서 강하게 발현되었으며, 정모세포와

정자세포에서도 다양한 정도의 양성 반응이 발현되었다(Fig. 7).

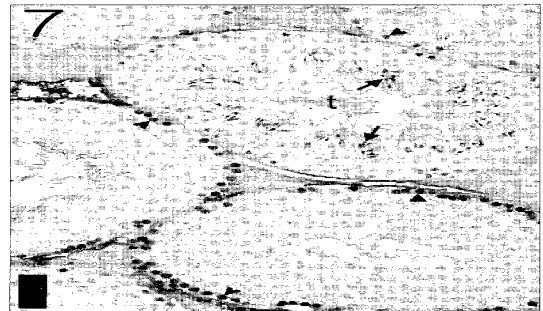


Fig. 7. BrdU immunohistochemistry of testis of normal group in experiment II. Most of spermatogonia(arrow heads) were labelled strongly with BrdU. Ocasionally spermatocytes and spermatids(arrow) were also labelled with BrdU. t : seminiferous tubule. BrdU immunohistochemical stain, scale bar = 40 μ m

대조군 및 산양산삼군의 정세관에서 양성 반응을 보인 정조세포는 매우 드물게 관찰되었으며, 정모세포 또는 정자세포에서 양성반응이 관찰된 정세관은 간혹 관찰되었다(Fig. 8 & Fig. 9).

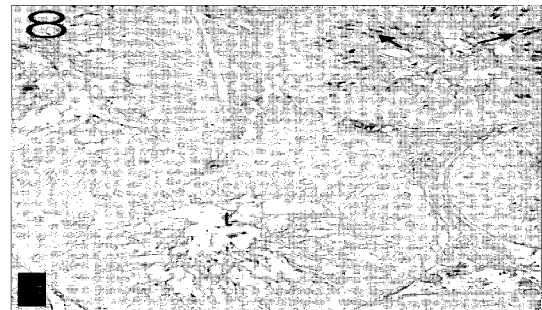


Fig. 8. BrdU immunohistochemistry of testis of control group in experiment II. Any of spermatogonia labelled with BrdU were not observed. But weak labelling with BrdU was observed in some spermatocytes and spermatids(arrow). t : seminiferous tubule. BrdU immunohistochemical stain, scale bar = 40 μ m

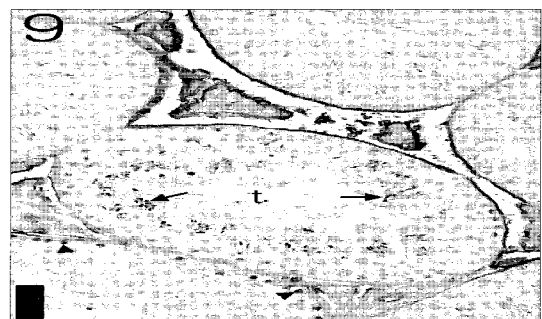


Fig. 9. BrdU immunohistochemistry of testis of CWG treated group in experiment II. A few of spermatogoina(arrow heads) were labelled with BrdU. And the incidence and intensity of BrdU labelled spermatocytes and spermatids(arrow) were increased than those of control group. Compare with Fig. 8. BrdU immunohistochemical stain, scale bar = 40 μ m

BrdU 양성 정조세포가 있는 정세관의 수는 대조군이 정상군에 비하여 현저히 감소되어 있었으며, 산양산삼군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. BrdU 양성 정모세포 또는 정자세포가 있는 정세관 수는 대조군이 정상군에 비하여 유의성 있게 감소되었으며, 산양산삼군은 대조군에 비하여 증가되었으나

유의성 있는 차이는 없었다(Table 10).

Table 10. Effects of the water extract of Cultured Wild Ginseng on the number of seminiferous tubules labelled with BrdU in the testis of BALB/c mice induced subacute toxicities by doxorubicin.

Group	No. of Seminiferous Tubules	
	Labelled with BrdU in Spermatozoa	Labelled with BrdU in Spermatoocytes or Spermatis
Normal	218.5±51.1 ^{a)}	36.2±9.2
Control	1.5± 1.3***	7.2±3.1***
CWG	3.8± 2.4*	9.5±5.1

a) : Mean±S.D.(n=10) Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 1 ml/day for 15 days. Control : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and normal saline 1 ml/day for 15 days. CWG : Intra-peritoneal injection of doxorubicin 3 mg/kg at 0, 2, 4 day and water extract of Cultured Wild Ginseng 1 ml/day for 15 days. * : significantly different compared with the value of normal group*** : p(0.001). # : significantly different compared with the value of control group# : p(0.05).

고찰

항암치료 중 화학요법은 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포에 독성을 나타내어 종양세포의 억제와 함께 골수조혈장기의 기능을 억제하고 소화기와 전신에 반응하여 위장 장애, 식욕부진, 체중감소 등의 부작용을 발생시키고 있다^{1,13}.

특히 doxorubicin은 Streptomyces Peucetius로부터 추출된 항생제로 DNA 염기쌍 사이에 삽입되어 DNA 복제와 전사과정을 억제하여 항암효과를 나타내는 약물^{14,15}로 여러 종류의 종양에 대하여 항암효과를 나타내지만 심장독성^{16,17}, 골수억제¹⁴, 간독성¹⁷, 신독성¹⁸, 고환독성¹⁹ 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.

이러한 항암제의 부작용은 환자에게 많은 고통을 유발하고 삶의 질을 감소시키게 되므로 최근 항암제의 부작용을 감소시켜 환자의 삶의 질을 개선하고자 하는 노력이 이루어지고 있다^{20,22}.

한의학에서는 인체 생리기능의 저하나 질병의 발생은 正氣와 邪氣의 균형이 失調되어 발생한다는 이론²³을 바탕으로 예방과 치료를 시행하므로 항암제의 부작용을 감소시키기 위한 방안도 正氣의 보강이라는 측면에서 접근할 수 있다.

한약재중 人蔘은 味甘하고 微寒하며 補五臟·安精神·定魂魄·止驚悸·除邪氣·明目開心益智·久服輕身延年하는 효능^{4,23}이 있는 대표적인 補氣劑로 신체의 허약으로 유발되는 질병의 치료에 正氣를 補益하고자 많이 활용되고 있으며, 근래에는 人蔘이나 山蔘의 種子 또는 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 人蔘을 山養山蔘이라 하여 대량 재배와 효능에 대한 연구가 진행되고 있다.

지금까지 산양산삼에 대한 연구로는 민 등⁹이 종양 증식 억제 효과와 항암제의 부작용을 감소시키는 것으로, 안 등⁷은 항산화효과와 CT-26 cancer cell의 증식을 억제하고 복강암 유발생쥐의 생존기간을 증가시키는 것으로, 김 등⁸은 HL-60 세포를 이용한 항암효과연구에서 山養山蔘이 人蔘에 비하여 효과가 앞서는 것으로, 곽 등¹⁰은 A549 human lung cancer cell에서 apoptosis 유도에 의해 세포사멸효과를 나타내는 것으로 연구 보고하여 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다.

특히 T 림프구의 생성과 Th 2를 자극 유도하는 IL-4를 증가시키고²⁴, 혈장 면역단백질(CR2-C3d)을 증가시킨다⁹는 결과와 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH),

catalase의 활성을 증가시키는 항산화효과가 있다는^{7,25} 결과로 볼 때 山養山蔘은 인체 正氣의 보강을 통하여 항암제의 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

이에 저자는 doxorubicin을 투여하여 급성과 아급성 독성을 유발시킨 생쥐에 山養山蔘 추출액을 투여하여 체중과 장기 및 고환을 중심으로 doxorubicin의 독성에 미치는 영향을 연구하였다.

본 연구에서 산양산삼이 체중의 변화에 미치는 영향을 측정 한 바, 급성과 아급성 독성 모두 doxorubicin을 투여한 대조군이 정상군에 비하여 유의한 체중 감소를 나타내어 doxorubicin에 의한 독성으로 체중이 감소된다는 보고²⁶⁻²⁸와 동일한 결과가 관찰되었다.

山養山蔘추출액을 투여한 山養山蔘군에서는 급성독성을 유발한 실험에서는 대조군에 비하여 유의한 체중의 변화를 보이지 않았으나 아급성 독성을 유발한 실험에서는 대조군에 비하여 체중 감소가 유의성 있게 억제되어 山養山蔘이 doxorubicin에 의한 독성을 감소시킨 것으로 판단된다. Doxorubicin은 장기에 독성을 유발하여 심장^{27,28}, 간장²⁹, 신장^{29,30} 및 고환^{30,31}의 무게를 감소시킨다고 보고되어 있는 바, 급성과 아급성 독성 모두 대조군이 정상군에 비하여 심장, 간장, 신장, 고환의 무게가 유의성 있게 감소되어 doxorubicin에 의한 독성이 유발되었음을 알 수 있었다.

山養山蔘군에서는 급성독성을 유발한 실험에서는 대조군에 비하여 심장과 간장의 무게 감소가 유의성 있게 억제되어 doxorubicin에 의한 독성을 감소시킨 것으로 판단된다. 그러나 아급성 독성을 유발한 실험에서는 신장의 무게가 대조군 보다 더 감소된 것으로 나타나 급성독성에서의 경황이나 배양산삼이 doxorubicin에 의한 신장무게 감소를 억제한다는 보고³²와 상반되어 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

혈액학적 변화에서 급성 독성을 유발한 경우 CPK는 대조군에서 유의성 있게 증가하였고 산양산삼군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하여 산양산삼에 의하여 심장독성이 감소된 것으로 나타났다. 그러나 GPT의 경우 큰 편차로 통계적 의미를 찾을 수 없었으며, BUN은 doxorubicin의 독성에 의해 상승되는 것이 일반적인 경향이나 doxorubicin 투여 8일 후에 BUN이 감소되었다는 보고³³와 본 실험에서 조직화적인 변화에서도 유의한 변화가 없었던 결과를 종합해 본다면 간장과 신장에서 유익하게 독성이 유발되지 않았을 가능성도 배제할 수 없다.

아급성 독성을 유발한 경우에서는 neutrophil과 lymphocyte에서는 산양산삼의 독성완화작용을 관찰할 수 없었으며, WBC와 platelet는 대조군에서 모두 증가되어 일반적으로 doxorubicin의 독성에 의해 감소된다는 보고와 상반된 결과를 나타내어 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Doxorubicin은 간 조직의 괴사를 유발³⁴하는 것으로 보고되어 있으며, 본 연구에서도 급성독성의 경우 대조군에서 문맥주위 영역에 국한된 간세포의 변성이 관찰되었으며 동양모세혈관(sinusoid)은 간세포종창으로 인해서 압박되어 있었으나 山養山蔘군에서는 동양모세혈관 및 간세포사의 구조가 비교적 양호하게 유지되어 있었다.

Doxorubicin이 고환에 미치는 독성으로는 정세관 상피세포

의 치밀도가 감소되고 정세관 상피세포사이의 연결성이 떨어지며, 정조세포 및 정자세포의 감소와 정세관 상피세포를 괴사를 유발^{26,35)}하는 것으로 알려져 있다.

연구결과 급성독성의 교환조직은 대조군의 모든 예에서 교환막에 접한 일부 정세관의 상피세포는 세포사이의 연결성이 상실되어 있었으며 정자발생세포의 괴사 및 탈락이 관찰되었고, 교환의 중심 부위의 정세관은 상피세포층이 얇아져 있어 내강이 넓게 관찰되었다. 그러나 山養山蔘군의 교환조직은 대조군에서와 같은 병변이 관찰되었으나 괴사된 정세관의 빈도 및 정도는 대조군에 비해서 완화되어 있었다.

아급성 독성의 교환은 대조군의 교환막에 접한 대부분의 정세관 상피세포에서 세포사이의 연결성이 상실되어 있었으며, 정자발생세포의 괴사 및 탈락이 진행되어 많은 부위에서 지지세포 (Sertoli's cell)가 주된 정세관 상피세포로 관찰되었다. 교환의 중심 부위에서도 상피세포의 연결성이 상실된 정세관이 곳곳에서 확인되었고 대부분 정세관의 상피세포층은 얇아져 있어 내강이 넓게 관찰되었으며 정자의 밀도도 정상군에 비해서 현저히 감소되어 있었다. 또한 대부분의 정세관에서 분열중인 정조세포는 관찰되지 않았다. 그러나 山養山蔘군의 교환은 대조군과 유사한 병변이 관찰되었으나 괴사된 정세관의 빈도 및 정도는 대조군에 비해서 완화되어 있었으며, 분열중인 정조세포가 관찰되는 정세관의 빈도도 대조군에 비해서 증가되어 있었다.

교환독성에 대한 영향을 교환 단면적과 정세관 직경의 차이, 지질과산화 정도, BrdU 발현 양상 및 BrdU 양성 정세관 수의 차이에 대하여 중점적으로 관찰하였다.

급성과 아급성 독성이 유발된 대조군의 교환 단면적과 정세관 직경이 모두 유의성 있게 감소되어 doxorubicin의 독성이 유발되었으나 山養山蔘군에서는 유의성 있게 감소가 억제되어 doxorubicin의 독성을 방어한 것으로 나타났다.

Doxorubicin은 DNA 복제 및 전사과정을 억제하기에 생리적으로 분열증식되는 세포에 독성을 초래한다. 또한 doxorubicin은 free radical을 생성을 증가시키고, superoxide dismutase의 활성을 억제하는 등의 항산화 반응 억제를 초래하여 세포내 lipid peroxidation 반응을 증가시켜 분열증식 중이 아닌 일반 세포에도 독성을 초래한다고 알려져 있다¹⁷⁾.

본 연구의 아급성 독성실험에서도 doxorubicin의 투여로 교환조직내 lipid peroxidation 정도가 증가됨이 확인되어 doxorubicin에 의한 장기독성은 항산화반응 억제가 관련됨을 확인할 수 있었다. 본 실험의 산양산삼군에서는 lipid peroxidation 정도가 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되어 있었기에 산양산삼의 항산화효과를 관찰할 수 있었고, 이는 산양산삼의 장기독성 방어효과와 관련이 있을 것으로 생각된다.

BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate)는 thymidine analog로서 세포 DNA 합성 시 thymidine 결합 부위에 결합되기에 세포분열 및 세포 증식을 표지하는 유용한 지표로서 널리 사용되고 있다³⁶⁾.

본 연구의 아급성 독성실험에서 doxorubicin을 투여한 대조군에서는 BrdU에 양성반응을 보인 정조세포는 거의 관찰되지

않았으며, 양성반응을 보인 정모세포 또는 정자세포는 매우 드물게 관찰되어 교환독성이 현저함을 알 수 있었다. 반면 산양산삼군에서는 BrdU 양성 정조세포가 관찰된 정세관 수가 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 유의성은 없었으나 양성반응을 보인 정모세포 또는 정자세포가 관찰된 정세관 수가 대조군에 비해서 증가되어 있었기에 산양산삼은 doxorubicin에 의한 교환독성 방어효과가 있는 것으로 사료되었다.

본 연구의 결과를 종합하면 산양산삼은 doxorubicin에 의한 급성 심장독성 및 간장독성을 완화시키는 작용이 있으며, doxorubicin에 의한 아급성 교환독성을 완화시키는 작용이 있는 것으로 평가되었다.

결론

산양산삼의 항암제 독성에 대한 방어 효과를 검증하고자 생쥐에 doxorubicin (Doxo)을 투여한 대조군과 Doxo와 산양산삼 추출액을 함께 투여한 산양산삼군의 급성 및 아급성 독성 변화를 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

산양산삼군은 대조군에 비하여 심장과 간장의 중량이 유의성 있게 증가되었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 동양모세혈관 및 간세포사의 구조가 비교적 양호하게 유지되었다. 산양산삼군의 교환조직은 대조군에 비하여 괴사된 정세관의 빈도 및 정도가 완화되어 있었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 교환의 단면적과 정세관 직경이 모두 유의성 있게 증가되었다.

산양산삼군은 대조군에 비하여 실험 15일째에 체중이 유의성 있게 증가되었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 교환조직 내 지질과산화 정도가 유의성 있게 감소되었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 괴사된 정세관의 빈도 및 정도가 완화되어 있었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 교환 단면적과 정세관 직경이 모두 유의성 있게 증가되었다. 산양산삼군은 대조군에 비하여 BrdU 양성인 정조세포가 있는 정세관 수가 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과 山養山蔘은 항암제 doxorubicin으로 유발된 급성 및 아급성 독성을 완화시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Skeel, R.T. Handbook of cancer chemotherapy, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, pp 34-55, 89-91, 1999.
2. 김달호, 이종형. 황제내경소문(상), 서울, 도서출판 의성당, pp 726-727, 2001.
3. 김달호, 이종형. 황제내경소문(하), 서울, 도서출판 의성당, pp 746-747, 2001.
4. 徐樹楠, 朱兵占. 中醫經典通釋 神農本草經, 河北科學技術出版社, 河北, pp 10-11 1996.
5. 신순식, 김경철, 최영현, 이용태, 엄현섭, 김창식. 산삼 감정 기준의 객관성, 동의한의연 5: 107-114, 2001.
6. 민병일, 김호현, 서일복. 산양산삼 추출액의 항암효과 및 Doxorubicin에 의한 교환독성 방어효과, 大韓藥鍼學會誌,

- 10(1):85-100, 2007.
7. 안영민, 박희수, 권기록. 산삼과 산양삼 추출물의 항암 및 항산화 효능, 大韓藥鍼學會誌, 10(1):5-16, 2007.
 8. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과에 대한 비교연구, 대한본초학회지 19(2):41-50, 2004.
 9. 이동희, 산양산삼 증류약침의 혈액주입 후 나타나는 혈장의 Proteom 분석, 박사학위논문, 상지대학교, 2005.
 10. 곡경승, 이선구, 권기록. pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약침의 Apoptosis에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 21(6):1-17, 2004.
 11. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95(2):351-358, 1979.
 12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254, 1976.
 13. 김광호, 남철현, 이기남, 이선동, 소경순, 강탁립 등. 예방의학과 보건학 2, 서울, 계축문화사, p 329, 1998.
 14. 홍사석. 이우주의 약리학강의, 서울, 의학문화사, pp 655-656, 1993.
 15. Patrick Labonté, Salam Kadhim, Terry Bowlin, Samir Mounir. Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model, Hepatology Research, 18: 72-85, 2000.
 16. 정희상, 박찬국, 이승일, 문철웅, 김만우, 장경식, 정춘해, 홍순표. Doxorubicin의 백서 심장독성에 관한 연구, 대한내과학회잡지 42(2):209-217, 1992.
 17. Abd El-Aziz, M.A., Othman, A.I., Amer, M. and El-Missiry, M.A. Potential Protective Role of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors, Captopril and Enalapril, against Adriamycin-induced Acute Cardiac and Hepatic Toxicity in Rats, Journal of Applied Toxicology, 21: 469-473, 2001.
 18. Mahmoud, A., Mansour Hassan, A. El-Kashef and Othman, A., Al-Shabanah. Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats, Pharmacological Research, 39(3):233-237, 1999.
 19. Kazutoshi Shinoda, Kunitoshi Mitsumori, Kazuo Yasuhara, Chikako Uneyama, Hisoshi Onodera, Masao Hirose, Masato Uehara. Doxorubicin induces male germ cell apoptosis in rats, Arch Toxicology 73: 274-281, 1999.
 20. 정명수, 정지영, 박혜은. 항암치료 중인 부인암 환자에서 고용량 비타민 C 사용 시 항암제 보조치료효과와 부작용 감소에 대한 연구, 부인종양, 18(2):93-100, 2007.
 21. 김대성, 성혜영, 최경미. 악성종양환자에서 중등도 이상의 오심, 구토를 유발하는 항암화학요법 시급성 및 지연성 오심, 구토의 예방에 대한 Dolasetron의 효과, 한국호스피스·완화의료학회지 7(2):248-257, 2004.
 22. 양영희. 위암환자의 항암 화학요법에 따른 피로와 삶의 질 변화 양상, 대한간호학회지 32(4):482-491, 2002.
 23. 李時珍. 本草綱目, 서울, 高文社, pp 405-412, 1987.
 24. 임세영, 이수진, 권기록. 산삼약침이 Colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델의 항암 및 면역증진에 미치는 영향, 大韓藥鍼學會誌 23(1):121-134, 2006.
 25. 최은주, 이준무, 원승환. 산양산삼약침의 지질강화 및 항산화 효과에 대한 생화학적 및 분자생물학적 검토, 大韓藥鍼學會誌 9(1):5-20, 2006.
 26. Yachi, K., Yamauchi, H., Kikuchi, H. Screening and biological evaluation of liposomal formulations containing Adriamycin, Advanced Drug Delivery Reviews, 24: 123-131, 1997.
 27. Roh, Y.W., Ji, H.J., Chai, H.Y., Hwang, S.Y., Nam, S.Y., Hong, J.T., Sung, J.H., Kim, H.K., Kang, H.G., Kim, Y.B. and Kang, J.K. Antitumor and cardioprotective effects of a ginseng intestinal metabolite in combination with doxorubicin in sarcoma-180 tumor-bearing mice, The Korean Journal of Laboratory Animal Science, 20(4):348-356, 2004.
 28. Zhou, S., Palmeira, C.M., Wallace, K.B. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes, Toxicology letters, 121(3):151-157, 2001.
 29. E. Pereverzeva, I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, K. Langer, S. Dreis, B. Asmussen, J. Kreuter, S. Gelperina. Influence of the formation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats : Focus on cardio- and testicular toxicity, International Journal of Pharmaceutics, 337: 346-356, 2007.
 30. Shri, N., Giri Mohammed, Ali Al-Bayati, Xiaogu Du, Edward Schelegle, F. Charles, Mohr Solomon, B. Margolin. Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone in rats, Cancer Chemother Pharmacol, 53: 141-150, 2004.
 31. Kang, J.K., Lee, Y.J., No, K.O., Jung, E.Y., Sung, J.H., Kim, Y.B., Nam, S.Y., Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis, Reproductive Toxicology, 16: 291-298, 2002.
 32. 최경운. 배양산삼 추출액의 Doxorubicin 독성 완화 효과, 석사학위논문, 세명대학교, 2008.
 33. Brown, H.R., Ni, H., Benavides, G., Yoon, L., Hyder, K., Giridhar, J., Gardner, G., Tyler, R.D., Morgan, K.T. Expression in the Blood and Heart with Known Mechanisms of Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in the Rat, Toxicologic Pathology, 30(4):452-469, 2002.
 34. Eunsung Park, Sundon Kim, Minhye Lee, Heungshik Lee, Jekyung Sung, Yeosung Yoon. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity

- in rats, *Journal of Veterinary Science*, 4(2):129-136, 2003.
35. Sjöblom, T., West, A. and Lähdetie, J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin and diepoxybutane, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31: 133-148, 1998.
36. Hirai, M., van Bull, P.P.W. Serial analysis of chromosomal aberrations and proliferation kinetics of mouse spermatogonia after single or fractionated X-ray exposures. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 93(2):419-437, 1982.