

人蔘養榮湯이 비소세포 폐암세포 이식 마우스에서 항암, 면역활성 및 악액질 억제에 미치는 영향

송광규* · 박미연¹ · 최해윤¹ · 김종대¹

해인부부한의원, 1: 대구한의대학교 한의학과 내과학교실

Anticancer and Related Immunomodulatory and Anticachexic Effects of Insamyangyoung-tang Extracts on Non Small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520, Xenograft Mice

Kwang Kyu Song*, Mee Yeon Park¹, Hae Yun Choi¹, Jong Dae Kim¹

Haein Couple Korean Clinic, 1: Division of Intenal Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

The object of this study was to observe anticancer and related immunomodulatory and anticachexic effects of Insamyangyoung-tang aqueous extracts (ISYYTe) on non small cell lung carcinoma (squamous epithelial carcinoma), NCI-H520, xenograft Balb/c nu-nu nude mice. Changes on the tumor volume and weights, lymphatic organ(spleen and popliteal lymph node), serum interferon (IFN)- γ levels, splenocytes and peritoneal macrophage activities (NK cell activity), splenic tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 contents, splenic T-lymphocyte subsets (CD3+, CD4+ and CD8+) and TNF- α + cells were observed with tumor mass and lymphatic organ histopathology to detect anticancer and immunomodulatory effects. In addition, changes on the body weights, epididymal fat weights and serum IL-6 levels were also detected with the thicknesses of deposited cervical brown adipose tissue and their mean diameters to monitor the tumor related anticachexic effects. The results obtained in this study suggest that over 50 mg/kg of ISYYTe showed favorable anticancer effects on the NCI-H520 cell xenograft with immunomodulatory and anticachexic effects. However, detail mechanism studies should be conducted in future with the screening of the biological active compounds in this herb.

Key words : insamyangyoung-tang(人蔘養榮湯), anticancer, immunomodulatory, cachexia, Non-small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520

서 론

폐암은 전 세계적으로 암에 의한 사망 원인 중 1위를 차지하고 있으며, 우리나라에서도 2007년 통계에서 암 사망률 1위인 동시에 1997년 대비 사망률이 가장 많이 증가한 암으로서 그 비중이 점점 증가하고 있는 추세에 있다¹⁾. 특히 비소세포 폐암(non-small cell lung carcinoma; NSCLC)은 우리 나라에서 전체 폐암의 87%를 차지하며, 조기 진단이 힘들어 진단 당시 이미 국소적으로 진행되거나 전이성 질환을 보이는 경우가 대부분이다²⁾.

모든 다른 암처럼 폐암도 호흡기 증상 외에 피로, 식욕부진,

체중감소를 일으키며 암이 다른 부위로 전이하면 전이된 부위에 관련된 증상을 일으킬 수 있다³⁾. 특히 악액질(cancer cachexia)은 암환자에게서 종양자체에 의하여 혹은 종양치료경과로 인하여 발생하는 오심, 구토와 음식 혐오감으로 인한 식이섭취 부족으로 일어나는 극심한 영양불량상태를 말한다⁴⁾. 이러한 영양불량 상태는 암의 치료를 제한하게 되고 합병증 발생을 증가시키는 결과를 가져와 암환자의 사망의 주원인으로 작용한다⁵⁾. 또한 암환자는 악액질이 생기면, 방사선 치료, 화학 치료에 대한 반응성이 떨어질 뿐 아니라, 생존 기간이 줄어들고, 생활의 질에 심각한 영향을 끼친다⁶⁾. 그러므로 암환자의 삶의 질을 높이기 위해서는 악액질 억제가 선행되어야 할 것이다.

현재 폐암의 서양의학적인 치료법으로는 외과적 수술, 화학적 치료 및 방사선 치료 등이 있는데 폐암을 치료하기 위하여 사

* 교신저자 : 송광규, 서울시 광진구 군자동 103번지 해인부부한의원

· E-mail : silent95@hanmail.net, · Tel : 02-2205-5338

· 접수 : 2012/10/26 · 수정 : 2012/12/17 · 채택 : 2013/01/08

용되는 여러 가지 화학적 치료제로는 5-fluorouracil, doxorubicin, cisplatin, etoposide 및 gemcitabine 등이 있다⁷⁻⁹⁾. 하지만 이러한 화학적 치료제들은 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미치며, 특히 골수 세포와 소장 상피 세포에는 심각한 영향을 주는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 또한 최근 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구가 증가하면서 암과 당뇨, 노화 등의 성인병에 대한 대처방안으로 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물질들이 주목 받고 있다^{12,13)}. 그 중에서도 약초 식물들은 vitamins, carotenoids, flavonoids와 같은 폐놀성 화합물들이 다량 존재하여 항암성, 항산화성, 항알러지성 등 다양한 생리기능을 갖고 있는 것으로 보고되어^{13,14)} 한약 및 한방치방에 대한 연구가 더욱 주목 받고 있다.

이에 저자는 한의학적으로 종양관련 약액질의 범주에 속하는 “虛勞”⁶⁾에 널리 사용되고 있는 대표적인 補益劑인 人蔘養榮湯이 항암제의 부작용 문제에 대한 대안이 될 수 있음과 동시에 종양관련 약액질에 응용이 가능할 것으로 보고, 人蔘養榮湯의 약액질 억제 효과와 더불어 아직 자세한 조절작용의 기전이 규명되지 않은 人蔘養榮湯의 항암 및 면역활성 효과에 대해서도 살펴봄으로써 좀더 다양한 기전의 가능성에 대해 연구해 보고자 하였다. 현재 人蔘養榮湯 자체의 면역활성 효과¹⁵⁾ 및 면역활성을 통한 항암 효과¹⁶⁾가 알려져 있으나, 종양 관련 약액질에 대한 보고는 찾아볼 수 없었다. 또한 人蔘養榮湯과 관련된 이전 연구¹⁶⁾는 Sarcoma-180 세포에 대한 보고로, 사람의 폐암 세포에서 유래한 대표적인 비소세포 폐암 세포주인 NCI-H520 (human NSCLC; squamous carcinoma)에 대한 항암 및 이와 관련된 면역활성과 약액질 억제에 대한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 人蔘養榮湯의 NCI-H520에 대한 항암 및 이와 관련된 면역조절과 종양관련 약액질에 대한 효과를 확인하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 모든 실험동물은 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹⁷⁾”에 준하여 취급하였다. 70마리의 수컷 Balb/c nu-nu 누드 마우스(4weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 14일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전기간동안 온도(20~25℃)와 습도(30~35%)가 조절된 무균 사육실에서 마우스용 filtered cap polycarbonate 사육상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였으며, 멸균 사료(Samyang, Korea)와 멸균 증류수는 자유롭게 공급하였다. 70마리 중 8마리는 종양 세포 이식 대신 phosphate buffered saline (PBS)을 주입하여 정상 대조군으로 사용하였으며, 62마리는 등쪽에 제모한 피하에 NCI-H520 (American Type Culture Collection Center, VA, USA)를 이식한 10일 후, 종양 부피가 대략 94mm³되는 실험동물만 선정하여, 군당 8마리씩, 총 40마리의 종양이식 마우스와 8마리의 정상 대조군을 실험에 사용하였다. 모든 실험동물은 투여 시작일 및 최종 부검일(투여 42일 후)에

각각 18시간 정도 절식을 실시하였으며(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다.

2) 人蔘養榮湯 조성

약제는 약업사(Omniherb, 영천, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용 하였으며, 본 실험에 사용된 人蔘養榮湯 1첩 분량의 조성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Insamyangyoung-tang Used in This Study

Herb name	Scientific name	Amounts (g)
白芍藥酒炒	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	8
當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	4
人蔘	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	4
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	4
黃芪蜜炒	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	4
肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	4
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	4
炙甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	4
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch. ex Steud	3
五味子	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon	3
防風	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	3
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	2
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	4
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder	4
Total		55

2. 방법

1) 실험군의 구분

실험동물은 군당 8마리씩 종양 세포 이식 대신 phosphate buffered saline (PBS)을 주입한 대조군(정상 대조군; intact control), 종양 세포 이식 후 매체인 멸균 증류수 투여 대조군(종양 이식 대조군; tumor bearing control), 종양 세포 이식 후 5-FU (Sigma, MO, USA) 30 mg/kg 투여군(5-FU 투여군; 5-FU), 종양 세포 이식 후 人蔘養榮湯 추출물 50 mg/kg 투여군(人蔘養榮湯 추출물 50 mg/kg 투여군; ISYYTe 50), 종양 세포 이식 후 人蔘養榮湯 추출물 100 mg/kg 투여군(人蔘養榮湯 추출물 100 mg/kg 투여군; ISYYTe 100) 및 종양 세포 이식 후 人蔘養榮湯 추출물 200 mg/kg 투여군(人蔘養榮湯 추출물 200 mg/kg 투여군; ISYYTe 200)의 6군으로 구분하여 실험하였다(Table 2).

Table 2. Experimental Grouping Used in This Study

Groups	Test article/Tumor inoculation/Dose (mg/kg/day)
Control	Intact Distilled water in phosphate buffered saline inoculated mice, 10mL/kg
	Tumor-bearing Distilled water in NCI-H520 cell inoculated mice, 10mL/kg
Reference	5-FU 5-FU in NCI-H520 cell inoculated mice, 30mg/kg (3days interval for 42days)
ISYYTe	ISYYTe 50 ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 50 mg/kg (once a day for 42days)
	ISYYTe 100 ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 100 mg/kg (once a day for 42days)
	ISYYTe 200 ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 200 mg/kg (once a day for 42days)

5-FU, 5-Fluorouracil; ISYYTe, Insamyangyoung-tang aqueous extracts (listed in Table 1); ISYYTe, 5-FU or vehicle (distilled water) were dosed at 10 mL/kg volume, once a day for 42days from 11days after NCI-H520 cell inoculation at dorsal back subcutaneous regions; 8mice per group, total 6groups were used this study; All animals were sacrificed after 42days softest article treatment (52days after tumor cell

inoculation).

2) 人蔘養榮湯 추출

선정된 약제 2첩 분량(110 g)을 취하여 정제수 1100 ml로 6 0°C에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 감압농축기(Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 점조성의 추출물을 얻은 다음 동결건조기(Labconco Freezone1, Labconco Corp., MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 11.01 g(수율 약 10.01%)의 연갈색 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 추출한 人蔘養榮湯 동결 건조물은 -20°C의 냉장고에 보관 후 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 20 mg/ml의 농도까지 연갈색으로 비교적 잘 용해시켜 사용하였다.

3) 검액의 투여

人蔘養榮湯 추출물은 각각 적정량을 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg당 10 ml의 용량으로 종양 세포 이식 10일 후부터 매일 1회씩 42일간 금속제 Sonde가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여 하였다. 또한 5-FU는 멸균 증류수에 용해시켜, 이전의 Itoh 등¹⁸⁾의 방법에 따라, 비교적 독성이 적고 적절한 항암효과를 나타내는 것으로 알려진 30 mg/kg의 농도로, 체중 kg당 10 ml의 용량으로, 3일 간격으로 42일간 복강 투여하였다. 한편 정상 및 종양 이식 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 人蔘養榮湯 추출물과 동일한 방법으로 투여하였다.

4) 종양 세포 이식

실험에 사용한 NCI-H520 세포를 American Type Culture Collection Center (VA, USA)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, NY, USA), penicillin (0.02 UI/ml; Sigma, MO, USA), streptomycin (0.02 µg/ml; Sigma, MO, USA), glutamine (2 mM; Sigma, MO, USA), non essential amino acids (1%; Sigma, MO, USA)가 첨가된 RPMI 1640배지 (Sigma, MO, USA)를 사용하여, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 유지하였으며, 동물 이식 전 NCI-H520 종양 세포는 Balb/c nu-nu 누드 마우스의 피하에 7~10일 간격으로 계대 배양 하여 보존하면서 사용하였다. 즉, 실험동물의 피하에서 7~10일간 배양된 NCI-H520 세포를 취하고 PBS와 함께 1,200rpm에 10분간 원심분리하여 종양 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10⁷cell/ml가 되도록 종양 세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 다시 제모한 등쪽 피하에 주사하여, 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 마우스의 등쪽 제모 부위에 NCI-H520 종양 세포 부유액 0.2 ml(1×10⁷cell/mouse)씩을 피하 이식하여, 고형 종양을 형성하였다. NCI-H520 종양 세포 이식 11일(종양 부피; 94 mm³전후)후부터 약물을 42일간 경구 투여하였다.

5) 체중의 측정

모든 실험동물의 체중을 투여 시작 1일 전(종양 세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 1, 7, 14, 21, 28, 35, 41일 및 최종 희생일에 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰으며, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 下記의 공식 [1]을 이용하여 투여 기간인 6주 동안의 체중 증가량(body weight gains)을 각각 측정하였다.

EQUATION [1]. Body Weigh Gains (g) = Body weight at sacrifice - Body weight at start of the administration

6) 종양 부피의 측정

종양이식 후 정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 종양의 부피를 투여 시작 1일 전(종양 세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35일 및 최종 희생일에 Nishimura 등¹⁹⁾의 방법에 따라 각각 下記의 공식 [2]를 이용하여 측정하였으며, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 종양 부피의 변화를 최소화하기 위해 下記의 공식 [3]을 이용하여 투여 기간인 6주 동안의 종양 부피의 변화량을 각각 측정하였다.

EQUATION [2]. Tumor Volume (mm³) = 1/2 × length × width²

EQUATION [3]. Tumor Volume Changes (mm³) = Tumor volumes at sacrifice - Tumor volumes at start of administration

7) 종양 중량의 측정

정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 종양을 적출하여, 주변 결합조직을 제거한 다음 절대 중량(absolute weight)을 전자저울(Precisa Instrument, Switzerland)을 이용하여 g단위로 각각 측정하였다. 또한 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위하여, 최종 희생일의 체중에 대한 상대 중량(% of body weight)을 下記의 공식 [4]를 이용하여 각각 산출하였다. 또한 투여 물질의 항암효과를 좀더 명확히 하기 위하여 투여군과 종양 이식 대조군과의 percent change, tumor inhibition rate를 Liu 등²⁰⁾의 방법에 따라 下記의 공식 [5]을 이용하여 각각 측정하였다.

EQUATION [4]. Relative Tumor Weight (% of body weights) = [(Absolute tumor weights / body weight at sacrifice) × 100]

EQUATION [5]. Tumor Inhibition Rate = [(Average tumor weights of test groups - average tumor weights of TB control) / average tumor weights of TB control] × 100]

8) 면역장기 및 부고환 주위 지방 중량의 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 비장과 슬와임파절 및 부고환 주위 지방 조직을 적출하여, 주변 결합조직을 제거한 다음 절대 중량(absolute weight)을 전자저울을 이용하여 g단위로 각각 측정하였다. 또한 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위하여, 최종 희생일의 체중에 대한 상대 중량(% of body weight)을 下記의 공식 [6]를 이용하여 각각 산출하였다.

EQUATION [6]. Relative Organ Weights (% of body weights) = [(Absolute organ weights / body weight at sacrifice) × 100]

9) 혈중 IL-6 함량의 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture (Zoletile 50; Virbac Lab., France) 복강 주사로 마취한 다음, 개복하여 복대정맥을 노출하고, 1 ml의 혈액을 채취하고, 상온 13,500rpm에서 10분간 원심 분리하여, 혈청을 분리하였다. 혈중 IL-6 함량은 Iizuka 등²¹⁾의 방법에 따라, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (R&D Systems Inc., MN, USA)를 이용하여, 각각 pg/ml 단위로 측정하였다.

10) 혈중 IFN-γ 함량의 측정

분리된 혈청에서, Mouse IFN-γ ELISA kit (BD Biosciences / Pharmingen, CA, USA)를 이용하여, 측정 manual에 따라 pg/

mL 단위로 측정하였다.

11) 비장내 cytokine 함량의 측정

최종 희생일에 비장 조직의 일부(대략 10~15 mg/head)를 채취하여, Clark²²⁾의 방법에 따라, 1 mL의 PBS(2 mM의 PMSF와 1 mg/mL의 aprotinin, leupeptin 및 pepstatin A가 포함된 인산완충액)을 이용하여 homogenize 하였다. 비장내 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 및 IL-10 함량을 각각 Mouse TNF- α ELISA kit (BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA), Mouse IL-1 β ELISA kit (Genzyme, MA, USA) 및 Mouse IL-10 ELISA kit (Genzyme, MA, USA)를 이용하여 Hotchkiss 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 분석은 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄ sodium ortho-vanadate, 1 μ g/mL leupeptin 포함)에 희석한 100 mL의 standard 또는 10, 50 또는 100 mL의 조직 homogenate에서 실시하였으며, 각 sample을 두 번 반복적으로 측정하였고, 각 sample의 일정부분은 단백질 함량 측정에 이용하였다. 모든 수치는 단백질 mg당 pg (pg/mg of protein)으로 측정하였다. 각 cytokine에 대한 표준곡선 (standard curve)은 흡광도를 이용하여 작성하였으며, 변이율 (average coefficient of variance)은 10% 이하로 산출되었다.

12) 비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성의 측정

비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성은 Raffaghello 등²⁴⁾의 방법에 따라, 일반적인 ⁵¹Cr release assay로 평가하였다. 즉, 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture 마취하에 비장세포 및 복강 대식세포를 수거하였다. 일부 비장 실질조직(10~20 mg)을 4°C 상태에서 RPMI-1640 (Gibco BRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어 있는 peri dish에서 비장 소편을 준비한 다음, 균질화하여 비장세포를 부유 하였다. 복강 대식세포는 복강내에 RPMI-1640 배지를 주입한 다음 세척하여, 부유시켰다. 준비된 비장세포 또는 복강 대식세포 부유액을 스테인레스 철망(Mesh No. 100, Sigma, MO, USA)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포 덩어리를 제거하고, RPMI-1640 배지로 다시 1회, HBSS (Hanks Balanced Salt Solution; Gibco BRL, NY, USA)로 2회 세척하였다. 이후 멸균된 증류수로 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10배 희석한 HBSS로 2회 세척하고, RPMI-1640 배지로 한번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 세포를 재부유 하여 사용하였다. 비장세포는 recombinant IL-2 (1000 IU/mL; Proleukin Chiron, CA, USA) 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, NY, USA)에 overnight 배양하였으며, 복강 대식세포는 수거한 일정량(1 \times 10⁵ cells/mL~2 \times 10⁵ cells/mL)을 complete medium (Sigma, MO, USA)에 overnight 배양하였다. The HTLA-230 neuroblastoma target cells은 Na₂⁵¹CrO₄ (100 μ Ci/1 \times 10⁶ cells) (ICN Biomedicals, Asse, Belgium)으로 2시간 반응시켜 표지한 다음, Target cell (splenocytes or peritoneal macrophages)과 함께 37°C에 6시간 동안 배양하였다. Effector : Target cell 비율은 비장세포 및 복강 대식세포 모두 100 : 1로 조율하였고, 이후 상

층액(Supernatants)을 수거하여, ⁵¹Cr에서 유리된 방사능을 gamma counter (Cobra 5002; Canberra Packard, CT, USA)를 이용하여 측정하였다. Target cell 손상(lysis)은 下記의 공식 [7]을 이용하여 % specific ⁵¹Cr release로 산출하였다.

EQUATION [7]. NK cell activities (% Specific ⁵¹Cr Release) = [(Exp - S)/(M - S)] 100% Exp is the observed released ⁵¹Cr value, S is the spontaneously released ⁵¹Cr value, and M is the maximum released ⁵¹Cr value.

13) 비장 T 입과구 Subset의 측정

준비한 1 \times 10⁶개의 비장 세포를 10 μ L의 1% BSA (bovine serum albumin; Sigma, MO, USA) 및 0.02% azide (Sigma, MO, USA)가 함유된, minimal essential medium (MEM; Gibco BRL, NY, USA)에 재 부유시킨 다음, FITC conjugated 일차 항체와 5°C에서 1시간 반응시켰다. 사용된 FITC conjugate 일차항체는 다음과 같다.

- (1) CD3 : Anti-mouse CD3 (17A2), 555274, BD Biosciences Pharmingen, CA, USA (1:100)
- (2) CD4 : Anti-mouse CD4 (L3T4), 553651, BD Biosciences Pharmingen, CA, USA (1:100)
- (3) CD8 : Anti-mouse CD4 (Ly-2), 553031, BD Biosciences Pharmingen, CA, USA (1:100)
- (4) TNF- α : Anti-mouse TNF- α , 554418, BD Biosciences Pharmingen, CA, USA (1:100)

형광 염색된 세포는 형광 filter가 부착된 FACStar flow cytometry (Becton Dickson, CA, USA)를 이용하여, 총 1 \times 10⁶개의 비장세포 중 CD3+, CD4+, CD8+ 및 TNF- α + 세포의 비율을 각각 산출하였다.

14) 조직 병리학적 관찰

최종 희생일에 장기 중량 측정 후, 종양, 좌측 슬와 입과절, 비장 및 경부 갈색지방의 일부 조직을 10% 중성 포르말린(10% buffered formalin)에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 일반적인 방법으로 파리핀 포매를 실시하고, 3~4 μ m의 절편을 제작하여, hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 이후 광학현미경하에서 각각의 조직 병리학적 관찰을 실시하였다. Histomorphometry - 세로로 절단(cross trimmed)한 1 mm²의 종양 조직에서 종양 세포가 차지하는 비율과 종양 세포 중 apoptosis를 나타내는 세포의 비율을 각각 %/1 mm² 및 %/tumor cells 단위로 자동 조직영상분석장치(DMI CCD image analyzer; DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 측정하였다. 또한 세로로 절단한 비장 조직표본에서 정중부(from apex of anterior border to centre of posterior border)의 비장 전체 두께(mm/spleen), 백색수질(white pulp)의 수(N/1 mm² of spleen) 및 백색수질의 직경(mm/white pulps)을 각각 측정하였으며, 세로로 절단한 슬와 입과절 조직에서 전체(mm/popliteal lymph node) 및 피질의 두께(mm/cortex)를 각각 측정하였다. 갈색지방 두께와 지방세포의 평균직경 역시 각각 mm/fat과 μ m/brown adipocyte 단위로 각각 측정하였다.

15) 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene

test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test 를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

종양 이식 대조군은 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 체중의 감소가 종양이식 10일 후부터 실험 전 기간 동안 인정되어, 투여 전 기간인 42일간의 체중 증가량 역시 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 체중의 감소가 투여 28일후부터 인정되기 시작하여, 42일간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 투여 35, 28 및 21일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 체중의 증가를 나타내어, 42일간의 체중 증가량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 1).

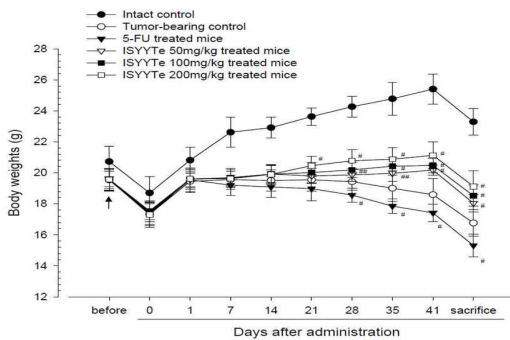


Fig. 1. Changes on the Body Weight after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Day 0 means at start of test article administration (11days after tumor cell inoculation), and before means 1day before start of test article administration. Values are expressed mean \pm SD of eight mice, g; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

2. 종양 부피의 변화

5-FU 투여군에서는 투여 14일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양 부피의 감소를 나타내어, 투여기간 동안의 종양 부피의 변화량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 人蔘養榮湯 추출물 50 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 투여 28일 후부터, 200 mg/kg 투여군에서는 투여 21일 후부터, 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 종양 부피의 감소를 나타내어, 42일간의 종양 부피의 변화량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

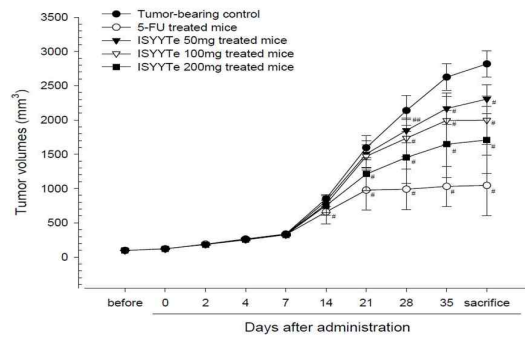


Fig. 2. Changes on the Tumor Volume after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Day 0 means at start of test article administration (11days after tumor cell inoculation), and before means 1day before start of test article administration. Values are expressed mean \pm SD of eight mice, mm³; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

3. 종양 중량의 변화

5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 종양 상대 및 절대 중량치의 감소가 인정되었다(Table 3).

Table 3. Changes on the Tumor Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Tumor weights			
	Absolute weights (g)	Tumor inhibition rate(%)	Relative weights (% of body weights)	Tumor inhibition rate(%)
Tumor-bearing	2.041 \pm 0.299		12.218 \pm 2.061	
5-FU	0.705 \pm 0.136 ^{##}	-65.47	4.621 \pm 0.976 ^{##}	-62.18
ISYYTe 50	1.630 \pm 0.313 [#]	-20.14	9.058 \pm 1.822 ^{##}	-25.86
ISYYTe 100	1.229 \pm 0.128 ^{##}	-39.79	6.654 \pm 0.853 ^{##}	-45.54
ISYYTe 200	1.060 \pm 0.132 ^{##}	-48.06	5.552 \pm 0.723 ^{##}	-54.56

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean \pm SD of eight mice, g; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

4. 비장 중량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 비장 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 경미하게 비장 절대 중량이 감소되었으나 유의성은 없었고, 상대 중량은 종양 이식 대조군과 유사한 중량의 변화를 나타내었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다(Table 4).

Table 4. Changes on the Spleen Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Spleen weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.085 \pm 0.012	0.367 \pm 0.051
Tumor-bearing	0.035 \pm 0.007 ^{**}	0.206 \pm 0.039 ^{**}
5-FU	0.031 \pm 0.009 ^{**}	0.202 \pm 0.064 ^{**}
ISYYTe 50	0.045 \pm 0.004 ^{**##}	0.248 \pm 0.025 ^{**##}
ISYYTe 100	0.048 \pm 0.005 ^{**##}	0.262 \pm 0.031 ^{**##}
ISYYTe 200	0.064 \pm 0.016 ^{**##}	0.338 \pm 0.093 ^{**##}

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean \pm SD of eight mice, g; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

5. 슬와 임파절 중량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 유의성 있는 ($p<0.05$) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 슬와 임파절 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다(Table 5).

Table 5. Changes on the Popliteal Lymph Node Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Popliteal lymph node weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.009±0.002	0.037±0.007
Tumor-bearing	0.003±0.001**	0.018±0.007**
5-FU	0.002±0.001**,#	0.011±0.005**,#
ISYYTe 50	0.005±0.001**,#	0.027±0.008*,#
ISYYTe 100	0.006±0.002**,#	0.030±0.008##
ISYYTe 200	0.008±0.001##	0.039±0.006##

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean ± SD of eight mice, g; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

6. 부고환 주위 지방 중량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 부고환 주위 지방 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 부고환 주위 지방 절대 및 상대 중량이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 부고환 주위 지방 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다(Table 6).

Table 6. Changes on the Epididymal Fat Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Epididymal fat weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.071±0.008	0.306±0.033
Tumor-bearing	0.008±0.003**	0.050±0.020**
5-FU	0.007±0.002**	0.043±0.014**
ISYYTe 50	0.015±0.005**,#	0.084±0.031**,#
ISYYTe 100	0.030±0.008**,#	0.160±0.043**,#
ISYYTe 200	0.041±0.011**,#	0.213±0.048**,#

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean ± SD of eight mice, g; ** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

7. 혈중 IL-6 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 혈중 IL-6 함량의 증가가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 혈중 IL-6 함량이 증가되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 혈중 IL-6 함량의 감소가 인정되었다(Fig. 3).

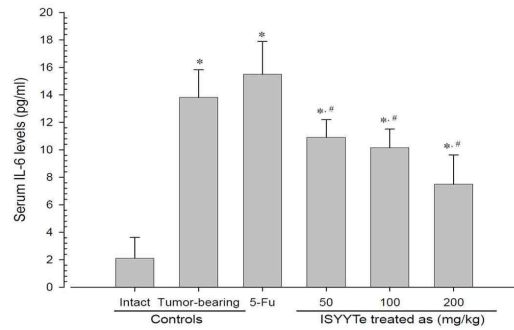


Fig. 3. Changes on the Serum IL-6 Levels after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations in Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean ± SD of eight mice, pg/ml of sera; * $p<0.01$ compared with intact control; ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

8. 혈중 IFN-γ 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 혈중 IFN-γ 함량의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 혈중 IFN-γ 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 혈중 IFN-γ 함량의 증가가 인정되었다(Fig. 4).

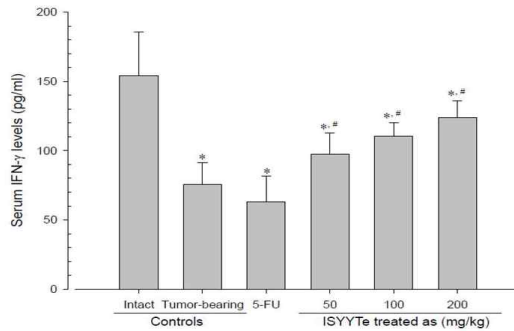


Fig. 4. Changes on the Serum IFN-γ Levels after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations in Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean ± SD of eight mice, pg/ml of sera; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

9. 비장내 cytokine 함량의 변화

1) 비장내 TNF-α 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 비장내 TNF-α 함량의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 TNF-α 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장내 TNF-α 함량의 증가가 인정되었다(Table 7).

2) 비장내 IL-1β 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$) 비장내 IL-1β 함량의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 IL-1β 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장내 IL-1β

함량의 증가가 인정되었다(Table 7).

3) 비장내 IL-10 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 IL-10 함량의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 IL-10 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 비장내 IL-10 함량의 증가가 인정되었다(Table 7).

Table 7. Changes on the Splenic Cytokine Contents Level after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Splenic cytokine contents		
	TNF- α	IL-1 β	IL-10
Intact	115.94 \pm 15.19	36.60 \pm 7.97	102.26 \pm 18.22
Tumor-bearing	48.30 \pm 11.83 [*]	9.80 \pm 1.82 ^{**}	49.31 \pm 11.18 [*]
5-FU	42.21 \pm 10.23 [*]	8.76 \pm 1.90 ^{**}	43.31 \pm 9.50 [*]
ISYYTe 50	60.56 \pm 5.87 ^{**#}	12.51 \pm 1.91 ^{**##}	65.53 \pm 13.54 ^{**#}
ISYYTe 100	66.73 \pm 11.89 ^{**##}	13.24 \pm 1.12 ^{**##}	70.10 \pm 10.77 ^{**##}
ISYYTe 200	79.33 \pm 10.73 ^{**##}	16.48 \pm 2.65 ^{**##}	82.73 \pm 12.76 ^{**##}

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean \pm SD of eight mice, pg/mg protein; ** $p < 0.01$ compared with intact control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with tumor-bearing control.

10. 비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성의 변화

1) 비장 NK 세포 활성

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장세포의 세포독성 활성도, 즉 NK 세포 활성의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장 NK 세포 활성이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 비장 NK 세포 활성의 증가가 인정되었다(Fig. 5).

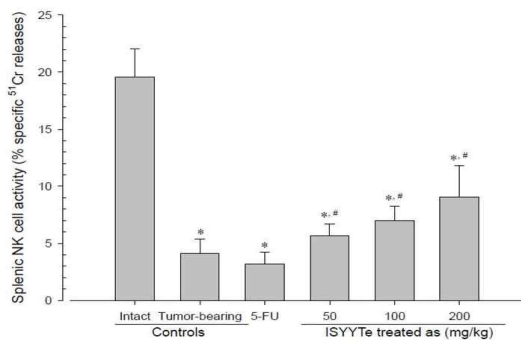


Fig. 5. Changes on the Splenic NK Cell Activities after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, % specific ⁵¹Cr releases; ** $p < 0.01$ compared with intact control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with tumor-bearing control.

2) 복강 대식세포 활성

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 복강 대식세포의 세포독성 활성도의 감소가 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 복강 대식세포 활성이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 복강 대식세포 활성의 증가가 인정되었다(Fig. 6).

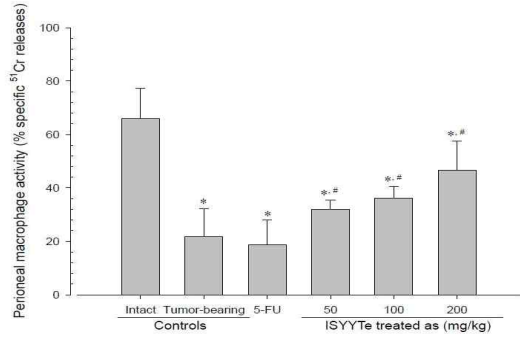


Fig. 6. Changes on the Peritoneal Macrophage Activities after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, % specific ⁵¹Cr releases; ** $p < 0.01$ compared with intact control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with tumor-bearing control.

11. 비장 T 임파구 Subset의 변화

1) 비장내 CD3+ 세포 비율의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 CD3+ 세포 비율의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 CD3+ 세포 비율이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 CD3+ 세포 비율의 증가가 인정되었다(Table 8).

Table 8. Changes on the Splenic T-lymphocyte Subsets after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Splenic T-lymphocyte subset proportions			
	CD3+ cells	CD4+ cells	CD8+ cells	TNF- α + cells
Intact	31.25 \pm 3.92	18.50 \pm 2.31	12.55 \pm 3.59	11.82 \pm 2.36
Tumor-bearing	11.91 \pm 1.95 ^{**}	9.77 \pm 2.08 ^{**}	5.99 \pm 1.77 ^{**}	4.39 \pm 1.11 ^{**}
5-FU	10.82 \pm 2.00 ^{**}	8.75 \pm 1.30 ^{**}	5.24 \pm 2.17 ^{**}	4.06 \pm 0.98 ^{**}
ISYYTe 50	17.20 \pm 5.05 ^{**##}	12.92 \pm 2.38 ^{**##}	8.33 \pm 1.68 ^{**#}	5.92 \pm 0.67 ^{**#}
ISYYTe 100	20.67 \pm 1.32 ^{**##}	14.19 \pm 2.03 ^{**##}	9.77 \pm 1.32 ^{**##}	6.68 \pm 1.47 ^{**##}
ISYYTe 200	24.36 \pm 3.75 ^{**##}	18.60 \pm 1.32 ^{**##}	10.48 \pm 1.41 ^{**##}	8.41 \pm 1.49 ^{**##}

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean \pm SD of eight mice, %/1 \times 10⁶ splenocytes; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with intact control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with tumor-bearing control.

2) 비장내 CD4+ 세포 비율의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 CD4+ 세포 비율의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군과 유사한 비장내 CD4+ 세포 비율의 변화가 인정되었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 CD4+ 세포 비율의 증가가 인정되었다(Table 8).

3) 비장내 CD8+ 세포 비율의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 비장내 CD8+ 세포 비율의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해서 비장내 CD8+ 세포 비율이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 비장내 CD8+ 세포 비율의 증가가 인정되었다(Table 8).

4) 비장내 TNF- α + 세포 비율의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$)

비장내 TNF- α 세포 비율의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해서 비장내 TNF- α 세포 비율이 감소되었으나 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장내 TNF- α 세포 비율의 증가가 인정되었다(Table 8).

12. 조직병리학적 변화

1) 종양의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 NCI-H520 세포로 치밀하게 구성되어 있었으며, 일부 세포에서 apoptosis에 의한 호산성 및 핵 농축이 인정되었다.

5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고, 결과적으로 정상적인 NCI-H520 세포가 차지하는 비율 역시 현저히 감소되었다(Fig. 7). 또한 5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양 조직 1mm² 당 NCI-H520 세포가 차지하는 비율의 감소 및 apoptotic 세포의 수적 증가가 인정되었다(Fig. 8, 9).

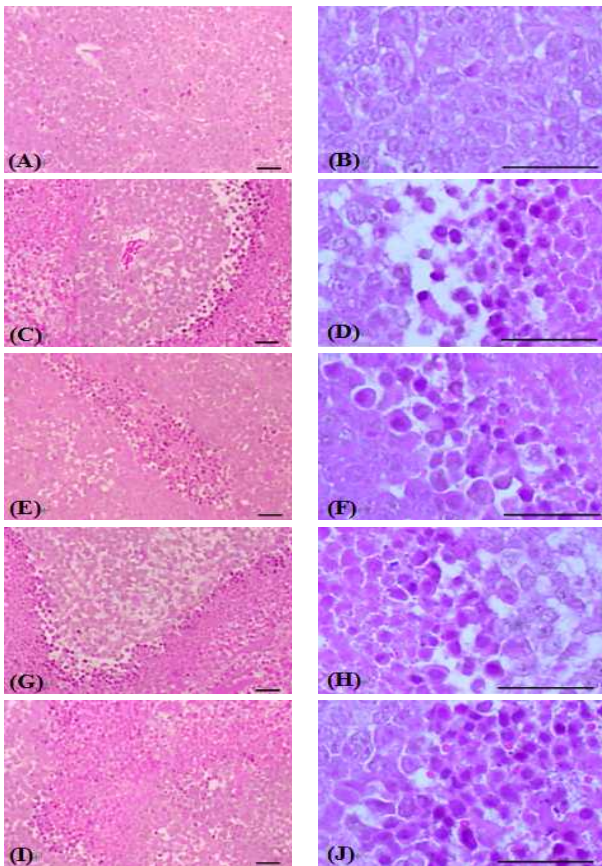


Fig. 7. Changes on the Tumor Mass Histopathological Profiles after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Note that the relatively well-differentiated tumor cells were existed in the tumor mass of tumor-bearing control with rare frequencies of apoptotic cells. However, the apoptotic tumor cells were markedly increased in the tumor masses of 5-FU and all three different dosages of ISYYTe as compared with tumor-bearing control, respectively; consequently, the tumor cells were markedly decreased. A, B: tumor-bearing control; C, D: 5-FU 30 mg/kg treated mice; E, F: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μ m

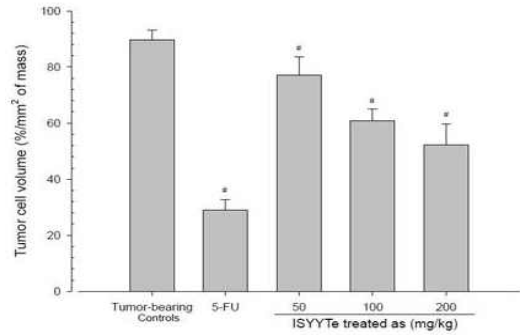


Fig. 8. Changes on the Tumor Cell Volumes in the Tumor Masses after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, %/mm² of mass; ## $p<0.01$ compared with intact control.

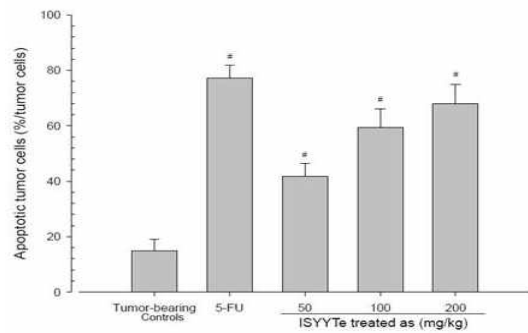


Fig. 9. Changes on the Apoptotic Tumor Cell Numbers in the Tumor Masses after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, %/tumor cells; ## $p<0.01$ compared with intact control.

2) 비장의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 비장 백색수질 부분의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장 두께, 백색수질 직경 및 수가 감소되었으나 유의성은 없었다. 人蔘養榮湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다. 또한 人蔘養榮湯 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장 두께가 증가되었으나 유의성이 없었고, 백색수질 직경 및 수의 증가에서는 각각 유의성이 인정되었다($p<0.01$) (Fig. 10, Table 9).

Table 9. Changes on the Histomorphometry of Spleen after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Splenic histomorphometrical changes		
	Total thickness (mm/central region)	White pulp numbers (N/mm ²)	Diameters of white pulps (mm/white pulp)
Intact	3.81 \pm 0.44	11.75 \pm 2.60	1.41 \pm 0.29
Tumor-bearing	2.16 \pm 0.21**	3.38 \pm 1.19**	0.28 \pm 0.07**
5-FU	1.94 \pm 0.36**	3.00 \pm 1.07**	0.23 \pm 0.05**
ISYYTe 50	2.45 \pm 0.23**	6.75 \pm 1.49**##	0.88 \pm 0.18**##
ISYYTe 100	2.69 \pm 0.28**##	7.75 \pm 1.28**##	1.04 \pm 0.20**##
ISYYTe 200	2.94 \pm 0.41**##	8.75 \pm 2.49**##	1.12 \pm 0.13**##

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean \pm SD of eight mice, pg/mg protein; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with intact control; ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

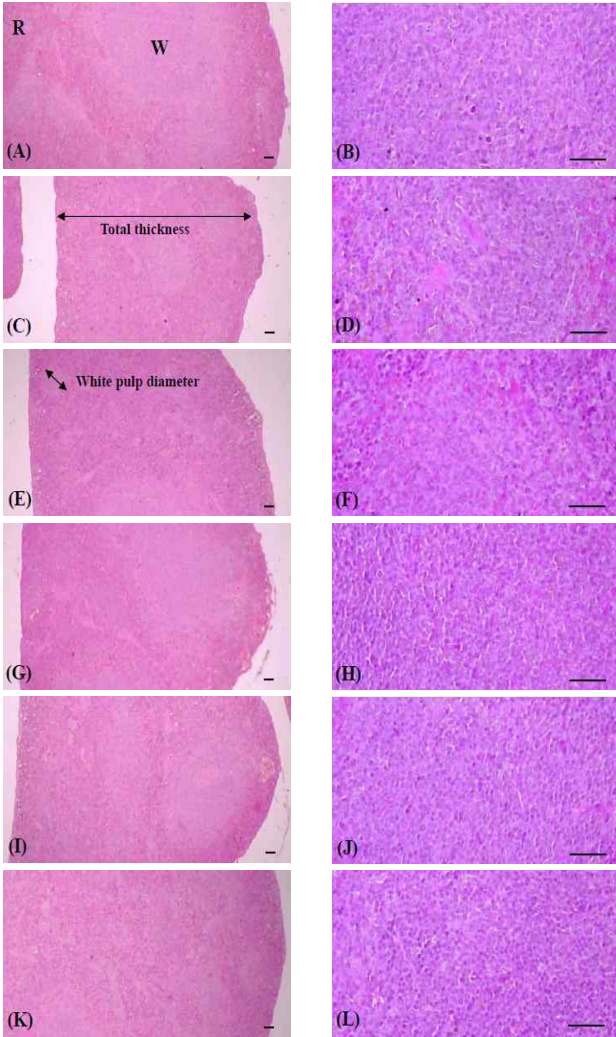


Fig. 10. Changes on the Spleen Histopathological Profiles after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Note that the atrophic changes related to the decrease of splenic white pulp lymphoid cells were detected in tumor bearing control as compared with intact control, consequently the total splenic thicknesses, white pulp numbers and diameters were markedly decreased in tumor bearing mice as compared with intact control, respectively. However, these splenic atrophic changes were markedly inhibited by treatment of all three different dosages of ISYYTe (50, 100 and 200 mg/kg; dose dependently) as compared with tumor bearing control, respectively. The splenic atrophic changes were slightly increased in 5-FU treated mice as compared with tumor bearing control. A, B: intact control; C, D: tumor bearing control; E, F: 5-FU 30 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; K, L: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; W, white pulp; R, red pulps, Arrows indicated the total thicknesses or white pulp diameters measured; All hematoxylin eosin stain; Scale bars = 80µm

3) 슬와 임파절의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 슬와 임파절 피질 부분의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 슬와 임파절 전체 두께의 감소가 인정되었고, 피질 두께의 감소는 관찰되었으나 종양 이식 대조군에 비해 유의성은 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 조직병리학적

으로 인정되었다(Fig. 11, Table 10).

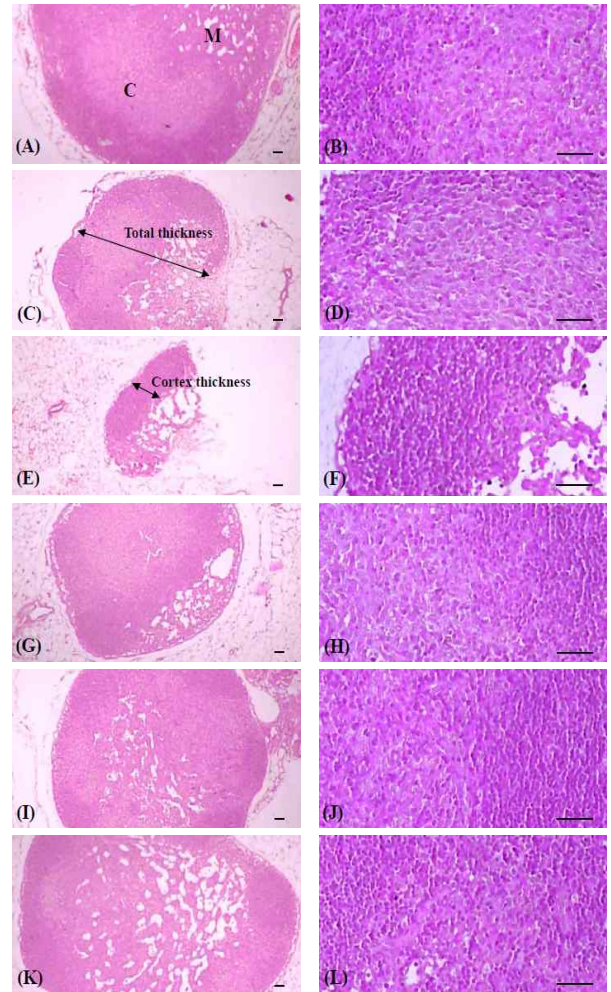


Fig. 11. Changes on the Popliteal Lymph Node Histopathological Profiles after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Note that the atrophic changes related to the decrease of lymph node lymphatic cells were detected in tumor bearing control as compared with intact control, consequently the total and cortex thicknesses were markedly decreased in tumor bearing control as compared with intact control, respectively. However, these lymph node atrophic changes were markedly inhibited by treatment of all three different dosages of ISYYTe (50, 100 and 200 mg/kg; dose dependently) as compared with tumor bearing control, respectively. The lymph node atrophic changes were markedly increased in 5-FU treated mice as compared with tumor bearing control. A, B: intact control; C, D: tumor bearing control; E, F: 5-FU 30 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; K, L: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; C, cortex; M, medullary sinus, Arrows indicated the total or cortex thicknesses measured; All hematoxylin eosin stain; Scale bars = 80µm

Table 10. Changes on the Histomorphometry of Popliteal Lymph Nodes after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Popliteal lymph node histomorphometrical changes	
	Total thickness (mm/central region)	Cortex thickness (mm/cortex)
Intact	3.12±0.38	1.23±0.19
Tumor-bearing	1.47±0.30**	0.46±0.10**
5-FU	0.94±0.23**##	0.36±0.05**
ISYYTe 50	1.97±0.16**##	0.65±0.12**##
ISYYTe 100	2.29±0.23**##	0.78±0.14**##
ISYYTe 200	2.53±0.11**##	0.90±0.17**##

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean ± SD of eight mice, mm; ** p<0.01 compared with intact control; ## p<0.01 compared with tumor-bearing control.

4) 경부 갈색지방의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 갈색지방 세포의 크기 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 경부 갈색지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경의 감소가 각각 인정되었다. 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 경부 갈색지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경의 감소를 보였으나 유의성 없었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 경부 갈색지방 조직의 두께 및 지방 세포 평균 직경의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다(Fig. 12, Table 11).

Table 11. Changes on the Histomorphometry of Cervical Brown Fats after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Cervical brown fat histomorphometrical changes	
	Total thickness (mm/central region)	Diameters of adipocytes (μm/adipocyte)
Intact	2.12±0.37	56.02±7.25
Tumor-bearing	0.62±0.13**	21.37±1.97**
5-FU	0.49±0.17**	19.36±3.50**
ISYYTe 50	0.85±0.18**#	38.86±5.03**##
ISYYTe 100	1.34±0.31**##	45.82±4.46**##
ISYYTe 200	1.60±0.29**##	50.14±3.27**##

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean ± SD of eight mice, mm; * p<0.05 and ** p<0.01 compared with intact control; # p<0.05 and ## p<0.01 compared with tumor-bearing control.

고찰

폐암은 2000년부터 우리나라 암 사망률 1위를 차지하고 있으며^{25,26}, 2005년도의 폐암 사망환자 수는 13,733명으로 우리나라 인구 10만 명 당 약 29.2명이 폐암으로 사망하였다²⁷. 현재 국내에서는 비교적 좋은 예후를 나타내는 선암이 가장 높은 빈도의 폐암이 되었고, 여성의 폐암과 비흡연자의 폐암이 증가 추세에 있다^{2,28}. 폐암은 진단 당시 15% 만이 국소적인 병변을 가지고 있고, 약 25% 정도에서는 지역 림프절 침범이 있으며, 나머지 55% 이상에서 이미 원격전이기가 있기 때문에 조기 진단이 힘들어 치료가 어려운 질환으로 간주되고 있다. 임상적으로 편평세포암, 선암, 대세포암은 병기판정 및 치료방법이 동일하기 때문에 비소세포암으로 총칭하고 있다^{25,26}.

비소세포 폐암의 치료는 병기에 따라 결정되는데, I~II 병기에서는 근치적 목적의 수술적 절제가 원칙이고, IV 병기에서는 완화 목적의 항암화학 치료를 시행한다^{25,26}. 그러나 국소종양의 제거가 어려운 뿐만 아니라 진단 당시 영상 검사로는 발견하기 어려운 미세전이 (micrometastasis) 종양 세포가 존재하여 폐에 국한된 방사선 요법을 시행한 다음 원격 장기에서의 재발을 초래하는 경우가 있으므로, 방사선 단독요법으로는 5년 생존율이 10% 미만으로 좋지 못하다. 따라서 이러한 원격 장기에서의 재발을 막기 위해 다양한 방법의 항암화학요법이 방사선 치료에 병용되고 있고, 이러한 병용 치료가 방사선 단독 치료보다 우수함이 밝혀지고 있다²⁶. 그러나 이러한 시양의학적인 치료에는 각종 부작용이 발생하여 여전히 안정성이 확립되지 않은 상태로 논란의 여지가 많다.

종양에 있어서 매우 중요한 부작용의 일환인 악액질은 악성 종양 환자의 삶의 질을 저하시키는 가장 중요한 요인이 되고 있으며, 현저한 영양실조, 탈수, 체중감소 등을 포함한 각종 만성 합병증을 초래하는 것으로 알려져 있다^{29,30}. 종양의 발생을 예방하고 치료하는 방법에 대해 그 동안 많은 역학조사 및 실험들이 진행되어 왔는데 Grant와 Ropka는 많은 암환자가 영양불량 상태에 놓여 있으며, 말기 암환자의 경우 80% 정도가 영양불량 상태이고, 암환자의 22% 정도가 영양불량으로 사망한다고 보고하였다³¹. 이러한 영양불량환자는 신체에 부담이 되는 화학요법이나 수술요법 등의 암치료를 충분히 받을 수 없으며, 조직과 기능의 재생 능력이 저하된다³²⁻³⁵. 심각한 영양불량과 체중감소는 악

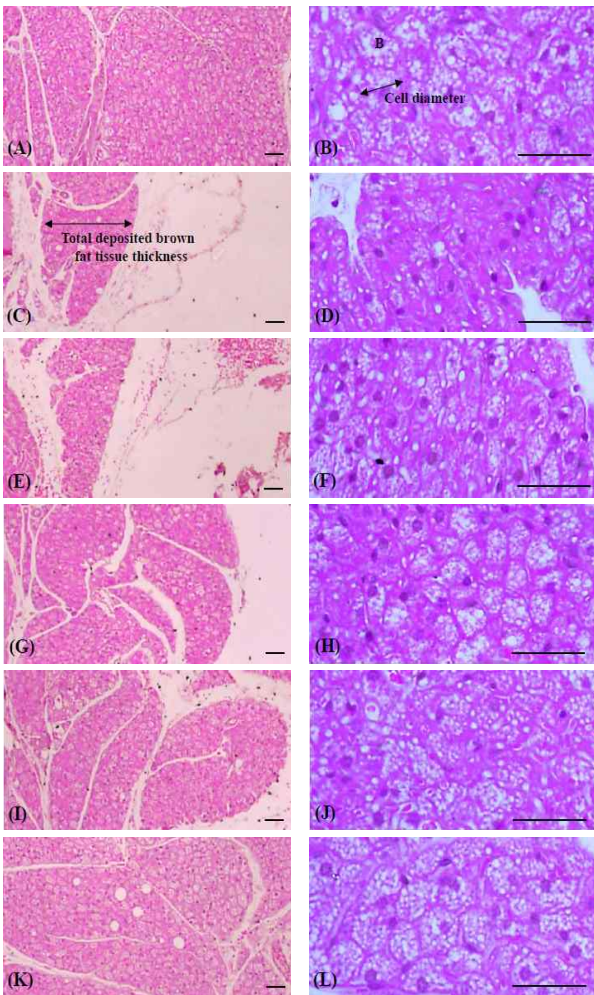


Fig. 12. Changes on the Cervical Brown Adipose Tissue Histopathological Profiles after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations Note that the atrophic changes related to the decreases of the sizes of brown adipose cells were detected in cervical fat tissues of tumor bearing control as compared with intact control, consequently the total deposited fat thicknesses and mean diameters of brown adipocytes were markedly decreased in tumor bearing control as compared with intact control, respectively. However, these atrophic changes on the brown adipose tissues were markedly inhibited by treatment of all three different dosages of ISYYTe (50, 100 and 200 mg/kg; dose dependently) as compared with tumor bearing control, respectively. The atrophic changes on the brown adipose tissues were increased in 5-FU treated mice as compared with tumor bearing control. A, B: intact control; C, D: tumor bearing control; E, F: 5-FU 30 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; K, L: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; B, brown adipocyte; W, white adipocyte; Arrows indicated the total thicknesses or brown adipocyte diameters measured; All hematoxylin eosin stain; Scale bars = 80 μm

악액을 초래하여 면역력을 저하시키고 감염위험을 높이며 상처치유를 지연시킨다. 이는 또한 근육의 감소를 가져와 호흡기능을 저하시키고 사망까지 이르게 한다³⁶⁾. 그러므로 종양으로 인한 사망률을 감소시키기 위해서는 적절한 영양지원을 실시하여 암환자의 악액질을 억제시키는 것이 필요하다³⁷⁾. 특히 한약치료는 종양 관련 악액질에 대해 체중의 증가, 식사량의 증가, 생활의 질의 개선, 혈액검사상의 변화, 임상 증상의 변화에 있어 유효한 치료효과를 보이는 동시에 부작용 발생이 적은 것으로 보고되고 있다³⁸⁾.

人蔘養榮湯은 『太平惠民和劑局方』에 처음 수록된 처방으로, 현재 대표적인 補益劑로 사용되고 있다³⁹⁾. 人蔘養榮湯은 白芍藥, 當歸, 人蔘, 白朮, 黃芪, 肉桂, 陳皮, 炙甘草, 熟地黃, 五味子, 防風, 遠志, 生薑 및 大棗의 14 종류의 약제로 구성된 처방으로 十全大補湯에서 川芎을 去하고 五味子, 遠志, 陳皮 등을 加하여 구성된 방제이다. 益氣補血하고 養心安神하는 功效가 있어, 積勞虛損으로 인한 呼吸少氣, 心虛驚悸, 咽乾 唇燥 등의 증상을 치료하는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾. 萬病回春에서는 “人蔘養榮湯은 虛勞로 말미암아 耗損을 이루고 氣血이 不足하여 여위며 倦怠하고 氣短하며 食少하고 혹은 寒熱, 自汗하는 증을 다스린다.”고 하였다⁴¹⁾.

한의학적으로 종양관련 악액질은 “虛勞”의 범주에 속하며 “虛勞”라는 병명은 張仲景의 『金匱要略』에서 가장 먼저 사용되었고, 발병기제는 五臟陰陽氣血虛損으로 보았다. 종양관련 악액질을 “虛勞”로 보았을 때 환자에게서 나타나는 식욕부진, 形體消瘦 등의 증상은 모두 환자의 병이 오래 낫지 않아서 氣血陰陽이 부족하고 臟腑功能에 장애가 있으며 脾가 運化기능을 상실하고 肌膚가 濡養되지 못했기 때문으로 볼 수 있다⁶⁾.

이에 저자는 임상에서 “虛勞”에 널리 사용되고 있는 人蔘養榮湯이 항암제의 부작용과 같은 안정성에 대한 문제를 경감시킬 수 있음과 동시에 종양관련 악액질에 응용이 가능할 것으로 보고, 人蔘養榮湯의 악액질 억제 효과와 더불어 아직 자세한 조절작용의 기전이 규명되지 않은 人蔘養榮湯의 항암 및 면역활성 효과에 대해서도 살펴 봄으로써 좀더 다양한 기전의 가능성에 대해 연구해 보고자 하였다. 그리하여 본 연구에서는 사람의 폐암세포에서 유래한 대표적인 비소세포 폐암세포주인 NCI-H520를 이식한 후 전형적인 종양관련 면역억제와 악액질 현상이 유발된 누드 마우스를 이용하여 人蔘養榮湯 추출물의 항암, 면역활성 및 종양관련 악액질 억제 효과를 알아 보았다.

NCI-H520 이식 10일(종양 부피; 94 mm³ 전후) 후부터 人蔘養榮湯 추출물을 매일 50, 100 및 200 mg/kg의 농도로 각각 42일간 경구 투여한 다음, 모든 실험동물을 희생하여 관찰하였다. 실험 결과는 비소세포 폐암에 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며^{42,43)}, 항암제 개발에 가장 빈번히 사용되는 대조 약물 중 하나인^{42,44)}, 5-FU 30 mg/kg 복강 투여군과 각각 비교하였다.

종양 부피, 종양 무게, 면역장기(비장 및 슬와임파절)의 중량, 혈중 IFN- γ 함량, 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성화, 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10 함량, 비장 T 임파구 subsets (CD3+, CD4+ 및 CD8+) 및 TNF- α + 반응세포의 수의 변화를 종양 및 면역장기의 조직병리학적 변화 (종양 내 종양 세포가 차지하는 비

율 및 종양 세포 중 apoptosis를 나타내는 세포의 수, 비장 전체 무게, 백색수질의 수 및 직경, 슬와 임파절 전체 및 피질 무게의 변화)와 함께 관찰하여, 항암 및 면역 활성효과를 각각 살펴 보았다. 또한 종양 관련 악액질에 미치는 人蔘養榮湯 추출물의 효과를 알아보기 위하여, 체중의 변화, 부고환 주위 지방 중량의 변화와 혈중 IL-6 함량의 변화를 살펴보았으며, 경부 갈색지방의 무게 및 지방세포의 직경을 조직병리학적으로 각각 관찰하였다.

누드 마우스는 전형적인 athymic 동물로, 동종 유래의 종양 세포뿐만 아니라, 사람 유래의 종양 세포 역시 이식 가능하며, 항암제 개발 시 가장 흔히 사용되는 실험동물^{2,29,45)}로서 이 모델에서 항암효과에 대한 평가는 주로 이식한 종양의 성장 억제를 기준으로 이루어지고 있다^{19,20)}. 본 실험의 결과, 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 종양 부피 및 중량의 감소가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서 종양내 apoptosis 세포의 증가에 의한 종양 세포의 비율 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 용량 의존적으로 관찰되었다. 그러므로 50 mg/kg 이상의 人蔘養榮湯 추출물은 어느 정도 양호한 항암효과를 나타낼 것으로 보이며 이러한 人蔘養榮湯의 항암효과는 조직병리학적 검사에서 관찰된 apoptosis 세포의 증가에 기인한 것으로 판단된다. 한편 5-FU 투여군에서는 이전의 보고들⁴²⁻⁴⁴⁾과 유사하게 현저한 항암효과가 인정되었다. 종양 상대 중량에 대한 성장 억제가 5-FU, 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서 각각 62.18, 25.86, 45.54 및 54.56% 로 관찰되어, 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 5-FU 투여군에 비해 비교적 낮은 항암 효과를 나타내었다.

비장 및 슬와 임파절 중량의 변화를 살펴보면, 실험결과 종양 이식 대조군에 비해 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 절대 및 상대 중량의 감소가 나타났다.

또한 비장 및 슬와 임파절의 조직병리학적 변화를 살펴보면, 실험결과 종양 이식 대조군에 비해 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 무게, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 무게의 증가가 인정되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 무게, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 무게가 각각 감소되는 것으로 나타났다.

TNF- α 는 비장세포를 포함한 여러 종류의 세포에서 생산되는 대표적인 cytokine의 일종으로 T 임파구의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고³⁰⁾ 일반적으로 세포성 면역을 활성화 시키며, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2의 기능을 증가시킨다⁴⁶⁾. 또한 IL-1은 대식세포, 수지상 세포, 임파구, 내피세포, 섬유세포 및 각질세포 등 다양한 세포에서 분비되는 cytokine으로 세포의 분비형태인 IL-1 β 와 막 부착형인 IL-1 α 의 두 종류가 존재하며, 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. IL-10은 전형적인 면역억제 cytokine으로 Th2 세포, 일부 B 림프구 및 활성화된 대식세포에서 분비되고, 주로 활성화된 대식세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다⁴⁶⁾. IFN- γ 는 CD8+ T 림프구, Th1 세포 및 NK 세포에서 분비되며, B 및 T 세포의 기능에 영향을 미치고, NK 세포와 대식세포의 기능을 강화

시킨다⁴⁶⁾. 본 실험의 결과, 이전의 보고들⁴⁸⁻⁵⁰⁾과 유사하게, 종양 이식 대조군에서 면역활성 cytokine인 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 혈중 IFN- γ 의 함량의 감소가 관찰되었으며, T 임파구 및 면역억제에 따른 면역억제 cytokine인 비장내 IL-10의 함량의 감소 역시 인정되었다. 하지만 이러한 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량과 혈중 IFN- γ 의 함량의 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 매우 효과적으로 억제되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량과 혈중 IFN- γ 의 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

종양 관련 면역억제는 주로 T 세포나 대식세포의 수 및 활성의 감소에 의한 것이며^{51,52)}, 이러한 현상은 종양환자에서도 확인되었다^{53,54)}. 본 실험의 결과 이전의 보고들⁵¹⁻⁵⁴⁾과 유사하게, 종양이식 대조군에서 T 임파구 subset (CD3+, CD4+, CD8+) 및 TNF- α 반응세포 비율의 감소가 인정되었으나, 이러한 변화는 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 유의성 있게 억제되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 T 임파구 subset (CD3+, CD4+, CD8+) 및 TNF- α 반응세포 비율이 종양이식 대조군에 비해서도 오히려 더 감소되는 것으로 관찰되었다.

종양관련 면역억제로 인해 NK 세포 및 대식세포 등 면역 담당세포의 기능이 억제되는 것으로 알려져 있고, 이들 면역 담당세포의 활성은 현재 또다른 개념의 항암제 개발에서 각광받고 있다^{55,56)}. 본 실험의 결과에서도, 종양 이식 대조군에서 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성 감소가 인정되었으나, 이들 세포의 활성이 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 매우 효과적으로 증가되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성의 감소가 인정되었다.

이미 알려진 人蔘養榮湯의 면역활성 효과¹⁵⁾에서 나타나듯이 위의 실험결과에서도 50 mg/kg 이상의 人蔘養榮湯 추출물은 종양 관련 면역억제를 억제하는 것으로 보이며, 人蔘養榮湯의 면역활성 효과 역시 항암활성에 어느 정도 관여할 것으로 판단된다. 한편 5-FU는 비소세포 폐암에도 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나⁴²⁻⁴⁴⁾, 정상세포에 대한 세포 독성 역시 강하여, 다양한 독성이 초래되는 것으로 알려져 있다^{57,58)}. 본 연구에서도 종양 관련 면역 억제 조건이 5-FU 투여에 의해 오히려 증가되는 것으로 관찰되었다.

현재까지의 다양한 연구⁵⁹⁻⁶¹⁾에 따르면, 종양 세포에서 생산 분비되는 IL-6이 종양 악액질의 원인으로 밝혀졌으며, 실제 종양환자에서도 혈중 IL-6 함량의 증가가 일어나는 것으로 알려져 있다⁶²⁾. 또한 근래에 들어, Wang 등⁶³⁾은 환자의 영양 상태가 혈중 순환 IL-6 양에 비례하여 악화되는 것으로 보고하였다. 따라서 종양 관련 악액질에 있어서 IL-6는 매우 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며, 이러한 IL-6의 감소는 종양환자에게 문제시되는 악액질 또는 영양불균형 등을 완화시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다²¹⁾. 본 실험의 결과에서도, 종양 이식 대조군에서 혈중 IL-6 함량의 증가와 함께, 체중의 감소, 부고환 지방 중량의 감소 및 조직병리학적으로 경부 갈색지방 조직의 위축 현상이 각각 인정되었다. 이러한 종양관련 악액질 현상이 人蔘養榮湯 추출물

50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 유의성 있게 억제되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 종양관련 악액질을 경미하게 악화시키는 것으로 관찰되었다. 따라서 50 mg/kg 이상의 人蔘養榮湯 추출물은 IL-6 억제를 통해 종양에 의해 유발되는 악액질 현상을 억제하는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 50 mg/kg이상의 人蔘養榮湯 추출물은 5-FU에 비해 낮은 항암효과를 보였지만, apoptosis 증가 및 면역활성에 의한 항암 효과와 종양관련 면역억제 및 악액질 현상을 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다. 반면에 5-FU에서는 종양 관련 면역억제 및 악액질에 대한 억제 효과는 관찰되지 않았다. 향후 人蔘養榮湯은 임상에서 항암제의 부작용 문제에 대한 대안으로 단독 또는 항암치료와 병행하여 응용이 가능할 것으로 보이며, 동시에 암환자의 예후에 결정적인 종양관련 악액질의 치료에 적극적으로 활용하여 암환자의 삶의 질 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 생리활성을 나타내는 화학성분의 검색과 더불어 금후 다양한 방면으로의 기전적인 연구 및 폐암 이외의 다른 암주에 대한 추가적인 연구를 더 수행해야 할 것으로 보인다. 또한 악액질에 대한 한약치료의 다양한 가능성에 대해서 국내의 악액질에 대한 연구가 부족한 실정이므로 향후 더욱 많은 관련 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 사람의 폐암세포에서 유래한 대표적인 비소세포 폐암세포주인 NCI-H520를 이식한 후 종양관련 면역억제와 악액질 현상이 유발된 누드 마우스를 이용하여, 人蔘養榮湯 추출물의 항암, 면역활성 및 종양관련 악액질 억제 효과를 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

人蔘養榮湯 추출물 투여에 의해 종양 부피 및 중량의 감소가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서도 종양내 apoptosis 세포의 증가에 의한 종양 세포의 비율 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 용량 의존적으로 관찰되었다. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 증가가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서 비장 두께, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 관찰되었다. 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량, 혈중 IFN- γ 의 함량, 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성, T 임파구 subset (CD3+, CD4+, CD8+) 및 TNF- α 반응세포 비율의 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 억제되었다. 혈중 IL-6 함량의 증가와 함께 체중의 감소, 축적 지방조직의 위축과 감소와 같은 종양관련 악액질 현상이 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 억제되었다.

참고문헌

1. Korea National Statistic Office. 2007 annualreporton the cause of death statistics. 2008. (<http://nso.go.kr>)
2. Kim, Y.C., Kwon, Y.S., Oh, I.J., Kim, K.S., Kim, S.Y., Ryu,

- J.S. National survey of lung cancer in Korea, 2005. *J. Lung Cancer*, 6: 67-73, 2007.
3. 한용철. 임상호흡기학. 서울. 일조각. p 137, 1995.
 4. Nelson, K.A., Walsh, D., Sheehan, F.A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. *J of Clinical Oncology* 12(1):213-225, 1994.
 5. 김은경, 양영희, 최스미. 입원환 암환자의 영양상태연구. *대한간호학회지* 29(2):271-280, 1999.
 6. 翁家武, 陳培丰. 癌症惡病質의中醫藥治療研究進展. *浙江中西醫結合雜誌* 19(2):123-125, 2009.
 7. Yang, C.H., Tsai, C.M., Wang, L.S., Lee, Y.C., Chang, C.J., Lui, L.T., Yen, S.H., Hsu, C., Cheng, A.L., Liu, M.Y., Chiang, S.C., Chen, Y.M., Luh, K.T., Huang, M.H., Yang, P.C., Perng, R.P. Gemcitabine and cisplatinina multimodality treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 86: 190-195, 2002.
 8. Scarpati, M.D., Vicidomini, G., Santini, M. Gemcitabine and small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34: 313-314, 2001.
 9. Worden, F.P., Kalemkerian, G.P. Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 565-579, 2000.
 10. Massarelli, E., Herbst, R.S. Use of novel second-line targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 33: 9-16, 2006.
 11. Steinke, K. Lung tumors. *Recent Results Cancer Res*, 167: 107-122, 2006.
 12. Lee, H.B., Kim, H.J., Chong, M.S., Cho, H.E., Choi, Y.H., Lim, K.S., Lee, K.N. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor J Herbology* 23: 1-8, 2008.
 13. Ham, Y.A., Choi, H.J., Kim, S.H., Chung, M.J., Ham, S.S. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* Extracts. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 25-31, 2009.
 14. Yu, M.H., Im, H.G., Lee, H.J., Ji, Y.J., Lee, I.S. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J. Food Sci Technol* 38: 128-134, 2006.
 15. 은재순, 김대근, 최훈, 오찬호. 人蔘養榮湯이 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향. *동의병리학회지* 16: 729-733, 2002.
 16. 하지용, 조성연. 人蔘養榮湯이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향. *동의병리학회지* 12: 60-71, 1998.
 17. Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Science, National Research Council, USA). Guide for the care and use of laboratory animals. 7. Washington, D.C., National Academic press. pp 1-118, 1996.
 18. Itoh, H., Ito, H., Amano, H., Noda, H. Inhibitory action of a (1->6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* 66: 265-271, 1994.
 19. Nishimura, G., Yanoma, S., Mizuno, H., Kawakami, K., Tsukuda, M. An antioxidant, probucol, induces anti angiogenesis and apoptosis in athymic nude mouse xenografted human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 90: 1224-1230, 1999.
 20. Liu, L., Jiang, Z., Teng, G.J., Song, J.Z., Zhang, D.S., Guo, Q.M., Fang, W., He, S.C., Guo, J.H. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 5: 492-505, 1999.
 21. Iizuka, N., Miyamoto, K., Hazama, S., Yoshino, S., Yoshimura, K., Okita, K., Fukumoto, T., Yamamoto, S., Tangoku, A., Oka, M. Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett* 158: 35-41, 2000.
 22. Clark, B.D., Bedrosian, I., Schindler, R., Cominelli, F., Cannon, J.G., Shaw, A.R., Dinarello, C.A. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *J Appl Physiol* 71: 2412-2418, 1991.
 23. Hotchkiss, R.S., Osborne, D.F., Lappas, G.D., Karl, I.E. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 beta, and interleukin 1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock* 3: 337-342, 1995.
 24. Raffaghello, L., Marimpietri, D., Pagnan, G., Pastorino, F., Cosimo, E., Brignole, C., Ponzoni, M., Montaldo, P.G. Anti GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett* 197: 205-209, 2003.
 25. 대한병리학회 대구경북지부학회(강유나 등, 44명). *간추린 병리학*. 서울. 정문사. pp 191-217, 2008.
 26. 吳寅在. 비소세포 폐암 세포주에 대한 항암 약제와 방사선 병합치료 방법의 개발. *전남대학교 대학원 박사학위논문*. pp 1-32, 2008.
 27. Korea National Stastical Office. Death rate statistics of Korea, 2005. Seoul, Korea National Stastical Office, 2007.
 28. Scientific Committee of Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases. The national survey of lung cancer in Korea. *Tuberc Respir Dis* 46: 455-465, 1999.
 29. Clark, J.C., Dass, C.R., Choong, P.F.. Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J Surg* 79: 327-336, 2009.
 30. Samira, S., Ferrand, C., Peled, A., Nagler, A., Tovbin, Y.,

- Ben, Hur, H., Taylor, N., Globerson, A., Lapidot, T. Tumor necrosis factor promotes human T cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells* 22: 1085-1100, 2004.
31. Grant, M., Ropka, M.E. Alterations in nutrition. in McCorkle R., Grant, M., Frank, Stromborg, M. and Baird(Eds).S.B. *Cancer Nursing, a comprehensive textbook*. 2nd ed. Philadelphia, london Saunders, 1996.
32. Kim, Y.O., Han, B. Association of Nutritional Status with Clinical Outcome of Stomach Cancer Patients. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 29(6):1185-1189, 2000.
33. Burtis, G., Caviw, J., Martin, S. *Applied nutrition and diet therapy*. Philadelphia, W.B. saunder Company. pp 484-487, 1988.
34. Rivadeneria, .DE., Denis, E., Thomas, J.F., Micheael, D.L., John, M.D. Nutritional support of the cancer patients. *CA Cancer J Clin* 48: 69-80, 1998.
35. Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia, Lea&Feriger. pp 1319-1326, 1994.
36. McWhirter, J.P., Pennington, C.R. Incidence and recognition of malnutrition in hospital. *BMJ* 308: 945-948, 1994.
37. Kim, E.K., Yang, Y.H., Choi, S.M. Nutritional Status of Cancer Patients upon Admission. *J. Korean Nurses Association* 29(2):271-280, 1999.
38. 송광규, 박미연, 최혜윤, 김종대. 암성 악액질의 한약치료에 대한 고찰(2000-2009년까지 중의논문을 중심으로). *한국한의학연구원논문집* 16(2):181-191, 2010.
39. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울. 成輔社. p 42, 1988.
40. 鞠潤範, 金相贊, 朴宣東, 朴性奎, 徐富一, 徐榮培, 申舜植, 李尙仁, 李長泉, 李棣熙, 鄭宗佶, 朱榮丞, 崔湖榮. 方劑學. 서울. 永林社. p 294, 2008.
41. 許俊. 國譯增補 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. p 671, 1992.
42. Hanada, M., Noguchi, T., Yamaoka, T. Amrubicin, a novel 9 aminoanthracycline, enhances the antitumor activity of chemotherapeutic agents against human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 98: 447-454, 2007.
43. Okabe, T., Okamoto, I., Tsukioka, S., Uchida, J., Hatashita, E., Yamada, Y., Yoshida, T., Nishio, K., Fukuoka, M., Jänne, P.A., Nakagawa, K. Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non small cell lung cancer cell lines with MET amplification. *Clin Cancer Res* 15: 907-913, 2009.
44. Natsume, T., Watanabe, J., Horiuchi, T., Kobayashi, M. Combination effect of TZT-1027 (Soblidotin) with other anticancer drugs. *Anticancer Res* 26: 1145-1151, 2006.
45. Foster, P.A. Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol* 33: 27-37, 2008.
46. Isaacs, A. Lymphokines and Cytokines. In: *Immunology an introduction* (Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia, Saunders pp 155-169, 1995.
47. Unanue, E.R. The Mononuclear Phagocytic Sytem. In: *Immunology an introduction* (Tizard IR editor). 4th edition. Philadelphia, Saunders pp 61-74, 1995.
48. Sogn, J.A. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 9: 757-763, 1998.
49. Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A., Ochoa, A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 20: 158-160, 1999.
50. Pawelec, G., Heinzl, S., Kiessling, R., Müller, L., Ouyang, Q., Zeuthen, J. Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update. *Crit Rev Oncog* 11: 97-133, 2000.
51. Jaffe, M.L., Arai, H., Nabel, G.J. Mechanisms of tumor induced immunosuppression: evidence for contact dependent T cell suppression by monocytes. *Mol Med* 2: 692-701, 1996.
52. Wang, R.F. Immune suppression by tumor specific CD4+ regulatory T cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 16: 73-79, 2006.
53. Hsieh, C.L., Chen, D.S., Hwang, L.H. Tumor induced immunosuppression: a barrier to immunotherapy of large tumors by cytokine secreting tumor vaccine. *Hum Gene Ther* 11: 681-692, 2000.
54. Riccobon, A., Gunelli, R., Ridolfi, R., De Paola, F., Flamini, E., Fiori, M., Saltutti, C., Petrini, M., Fiammenghi, L., Stefanelli, M., Granato, A.M., Cuzzocrea, D.E., Amadori, D. Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor infiltrating, near tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest* 22: 871-877, 2004.
55. Ha, E.S., Hwang, S.H., Shin, K.S., Yu, K.W., Lee, K.H., Choi, J.S., Park, W.M., Yoon, T.J. Anti metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthpanax senticosus*, involvement of NK cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res* 27: 217-224, 2004.
56. Yu, G.M., Hwang, I.G. In vitro effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J. Food Sci Technol* 36: 339-344, 2004.
57. Schimmel, K.J., Richel, D.J., van den Brink, R.B., Guchelaar, H.J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Re*, 30: 181-191, 2004.
58. Dalzell, J.R., Samue,l L.M. The spectrum of 5-fluorouracil cardiotoxicity. *Anticancer Drugs* 20: 79-80, 2009.
59. Strassmann, G., Fong, M., Kenney, J.S., Jacob, C.O. Evidence

- for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 89: 1681-1684, 1992.
60. Fujita, J., Tsujinaka, T., Yano, M., Ebisui, C., Saito, H., Katsume, A., Akamatsu, K., Ohsugi, Y., Shiozaki, H., Monden, M. Anti interleukin 6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon 26 adenocarcinoma bearing mice with modulation of lysosomal and ATP ubiquitin dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer* 68: 637-643, 1996.
61. Kurebayashi, J., Yamamoto, S., Otsuki, T., Sonoo, H. Medroxyprogesterone acetate inhibits interleukin 6 secretion from KPL 4 human breast cancer cells both in vitro and in vivo: a possible mechanism of the anticachectic effect. *Br J Cancer* 79: 631-636, 1999.
62. Oka, M., Yamamoto, K., Takahashi, M., Hakozaki, M., Abe, T., Iizuka, N., Hazama, S., Hirazawa, K., Hayashi, H., Tangoku, A., Hirose, K., Ishihara, T., Suzuki, T. Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 2776-2780, 1996.
63. Wang, L.S., Chow, K.C., Wu, C.W. Expression and up regulation of interleukin 6 in oesophageal carcinoma cells by n sodium butyrate. *Br J. Cancer* 80: 1617-1622, 1999.