

## 蟾螬가 마우스 Natural killer 細胞 活性에 미치는 影響

金 己 烈\* · 金 鍾 吳\* · 鄭 智 天\* · 南 景 琦\*\*

### ABSTRACT

### The effect of *Holotrichia* on Natural killer Cell Activity in Mice

Kim Gi-Yeol\* · Kim Jong-Dae\* · Jeong Ji-Cheon\* · Nam Kyung-Soo\*\*

\*Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

\*\*Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University

The effect of *Holotrichia* on natural killer cell activity in normal mouse were studied.

1. The oral administration of *Holotrichia* increased spleen weight about 21.1% and also cell numbers of spleen compared to control mice group.
2. The cytotoxicity of effector cell was most effectively induced in a ratio of 50 : 1 (effector/target cell).
3. Cytotoxicity of effector cells was increased about 24% as compared with control group in *in vivo* test.
4. On the other hand, the administration of *Holotrichia* original solution showed significant increase the cytotoxicity. The cytotoxicity was increased concentration dependently.
5. The cytotoxicity by  $^{3}\text{H}$ -thymidine incorporation assay showed similar effect with LDH enzyme method.

\* 東國大學校 韓醫科大學 内科學教室

\*\* 東國大學校 醫科大學 藥理學教室

6. In the purified NK cells, the cytotoxicity was increased about 31% as compared with control group in *in vivo* system and the ratio of cytotoxicity was generally more increased than that of partially purified NK cell.
7. *In vitro* experiment of the purified NK cells, the cytotoxicity was increased 11.8% as compared with control group and the ratio of cytotoxicity was also more increased than that of partially purified NK cell.

These results suggest that *Holotrichia* is administrated to mice with malignant tumors, the increase of NK cell activity may occur and affect tumor cells.

---

Key Word : *Holotrichia*, NK cell, LDH enzyme method,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay, tumor cell, cytotoxicity

## I. 緒論

韓醫學에서 癌에 대한 治法은 活血祛瘀, 破積散結, 清熱解毒, 化痰軟堅, 理氣散結, 祛濕清熱等의 攻邪法과 益氣補血, 養陰生津, 保養益陰, 益氣健脾 等의 扶正培本法, 이 두 가지 方法을 함께 使用하는 扶正祛邪法으로 要約되는 趨勢에 있다.<sup>1-3)</sup>

生體에서 癌細胞를 特異的으로 認識해서 多樣한 反應을 일으키는 免疫細胞들 중에는 癌細胞를 破壞하는 役割을 擔當하는 細胞들이 알려져 있다. 이중 cytotoxic T 細胞은 癌細胞와 接觸해서 直接 癌細胞에 損傷을 준다고 알려져 있다. 한편 임파구중 T 및 B 細胞의 範疇에 속하지 않으면서도 癌細胞를 非特異적으로 破壞하는 性質을 가진 細胞가 存在하고 있는데 이를 natural killer 細胞(NK 細胞)라고 한다. NK 細胞은 細胞膜 表面形質·遺傳支配·臟器分布 等에서 細胞集團으로서의 균일한 性質을 나타내지는 않으나 細胞質이 크고 과립을 지닌 대형림파구(large granular lymphocyte)로서, 生體의 免疫監視(immune surveillance)의 主役을 擔當한

다.<sup>4-6)</sup>

癌의 治療에 使用된 韓藥材에 대한 實驗 및 研究가 많이 이루어졌는데, 活血祛瘀의 效能이 있는 藥材로는 丹蔘, 三稜, 蓬朮, 乳香, 没藥, 桃仁, 紅花, 水蛭, 蜈蚣, 全蝎, 穿山甲, 五靈脂, 喜樹, 斑貓 等이 있다.<sup>7-9)</sup> 活血化瘀하는 藥物은 癌에 대하여 抗癌作用, 抗凝固 및 fibrin(纖維蛋白)溶解作用, 抗炎症과 抗感染作用, 血液循環의 調節作用, 結締組織 代謝調整作用, 生體 免疫機能調節作用 等이 있다고 報告되고 있다.<sup>8-9)</sup>

또한 免疫擔當細胞와 관련된 研究로 T 細胞의 증식능 및 B 細胞의 항체 생성능 그리고 macrophage의 lysozyme 活性에 관련된 이론바 免疫 擔當細胞를 中心으로 해서 研究가 進行되고 있는데, 특히 馮 等<sup>10)</sup>은 莓麥注射液이 晚期癌患者의 NK 細胞의 活性에 미치는 影響에 대해서 報告하였고, 高 等<sup>11)</sup>은 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK 細胞의 活性에 미치는 影響에 대해서 報告하였다.

蟾蜍는 活血化瘀 藥物로써 풍뎅이의 幼蟲인 굼벵이를 乾燥한 것으로 蟾, 蟾蜍, 蟾齊, 乳齊, 地蠶, 應條, 老母蟲, 核桃蟲 等의 異名이 있다.主治는 여러 文獻에서 主惡血, 血瘀痹氣, 破折

血, 在脇下滿痛, 月閉, 目中涇膚, 清翳白膜, 金瘡內塞, 赤白游疹 等으로 記載되어 있고 主로 癰血의 治療와 除痹氣하는 藥物로 使用되어 왔다.<sup>12-23)</sup>

특히 蟒螬가 들어있는 大黃蟻蟲丸과 七巧守宮丸 等이 喉頭癌, 肝癌, 卵巢癌, 肺癌, 胃癌 等에 有效하다고 하였으나<sup>24-28)</sup> 蟒螬의 抗癌作用에 대한 實驗 및 研究는 거의 찾아볼 수 없었다.

그러므로 著者は 蟒螬가 免疫을 擔當하는 細胞에 미치는 影響을 紛明하기 위하여 癌細胞인 K562 細胞를 대상으로 NK 細胞의 活性을 測定하여 유의한 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 試藥

본 實驗에 使用한 試藥중 배지 RPMI 1640과 Percoll은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.), Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.), Nylon wool은 Wako사(Wako Chem. Co., Tokyo, Japan) 그리고 NK 細胞의活性測定에 使用한 Kit 試藥은 Boehringer사(Boehringer Mannheim Co., GmbH, Germany)의 제품들을 使用하였다. 그 外에 使用한 一般 試藥들은 Sigma사 및 Wako사의 特급제품을 使用하였다.

#### 2) 實驗動物

본 研究에 使用된 實驗動物은 6-7주령의 암컷 ICR mouse로서 한국과학기술연구원 유전자원센터에서 구입하였다.

#### 3) 藥材

본 實驗에 사용한 蟒螬는 市中에서 購入한 후

嚴選하여 使用하였으며, 標本은 東國大學校 附屬韓方病院 內科學教室에서 보관중이다.

### 2. 方法

#### 1) 試料의 조제

蟒螬 18g을 증류수 400ml에 넣어 회전 침압증유기로 가능한 低溫( $60^{\circ}\text{C}$ 가 넘지 않도록)에서 2시간抽出한 다음, 여과지를 使用하여 減壓濾過시키고 남아있는 미량의沈澱物은 원심분리기를 사용하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 3,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 침전물은 제거하고 상층액을濾過滅菌( $0.22\mu\text{m}$ )하여 이濾過液을 원액으로 하여細胞實驗에 使用하였다.

#### 2) 試料의 投與

동물 구입 후 1 주일이상 본 대학 동물사육사에서 적응시킨 후 7마리를 한 群으로 하여 實驗群과 對照群으로 나누었다. 實驗群에서는 원액을 2배 稀釋하여 15일 동안 자유로이 경구로 먹도록 하였으며, 對照群에서는 蟒螬대신 물을 使用하여 같은 條件으로 投與하였다.

#### 3) 脾臟의 무게 및 細胞數 測定

實驗動物을 窒息死시킨 다음 clean bench에서 70%의 알코올로 腹部 全體를 消毒한 후 脾臟을 無菌的으로 RPMI 1640배지가 들어있는 샤템으로 옮기고 滅菌 해부가위로 脾臟 주위의 脂肪組織을 면밀히 除去한 다음 脾臟의 무게를 測定하였다. 그 다음의 한 가운데를 절단한 뒤 消毒된 끝이 굽은 펀셋으로 주물러 가면서 脾臟 속에 들어있는 대부분의 細胞를 회수하였다. 細胞 浮遊液 속에 포함된 赤血球는 lysis buffer( $0.16\text{M NH}_4\text{Cl}-0.17\text{M Tris, pH }7.2$ )를 5ml 넣고 천천히 混合한 다음 1,200rpm에서 5분간 遠心分離하여 除去하였다. 그후 1회 洗滌한 다음 滅菌된 Nylon mesh(#200)를 使用하여 濾過해서 다른 組織의混入을 除去하였으며 Inverted microscope을 이

용하여 細胞數를 測定한 다음 각각의 實驗에 使用하였다.

#### 4) 脾臟細胞의 조제

脾臟에는 NK 細胞뿐만 아니라 T 細胞, B 細胞 및 赤血球 等 여러 種類의 細胞들이 섞여 있다. 脾臟을 無菌的으로 적출한 다음 RPMI 1640 배지가 들어있는 샤리로 옮기고 작은 해부가위로 비장을 몇번 자른 뒤 消毒된 끝이 굽은 펜셋으로 주물러 가면서 脾臟 속에 들어있는 대부분의 細胞를 회수하였다. 細胞 浮遊液 속에 포함된 赤血球는 lysis buffer(0.16M NH<sub>4</sub>Cl-0.17M Tris, pH 7.2)를 5ml 넣고 천천히 혼합한 다음 1,000rpm에서 5분간 遠心分離하여 除去하였다. 그 후 1회 洗滌한 다음 滅菌된 Nylon mesh (#200)를 使用하여 濾過해서 다른 組織의 混入을 除去하였으며 10% FBS-RPMI 1640배지에 懸濁하여 다음 實驗에 使用하였다.

#### 5) Nylon wool column의 製作과 T 細胞분획의 分離<sup>29)</sup>

##### ① Nylon wool column의 製作

Nylon wool(Wako사)의 울을 아주 섬세하게 푸 다음 0.8g씩을 달아 각각 10ml의 주사기에 넣고 滅菌시킨다. 여기에 RPMI 1640배지 10ml를 加하여 氣泡를 除去시키고 column을 충분히 활성화시킨다. 이때 주사바늘은 25게이지를 사용하며 mouse 1마리당 1개씩의 column을 만들어 實驗을 行하였다. 이하 모든 조작은 無菌의 으로 行한다.

##### ② T 細胞분획의 分離

脾臟細胞 부유액을  $1 \times 10^8$  cells/ml로 조제한 다음 미리 준비한 Nylon wool column에 천천히 注入한다. 다시 10% FBS-RPMI 배지를 3ml 더 첨가한 다음 column을 作動시키고 적당한 때에 作動을 中止한 후 37°C에서 1시간 培養시

킨다. 그 후 37°C로 예온시켜 놓은 10% FBS-RPMI 1640배지 7ml를 사용하여 column을 elution한다. 이때 유출되어 나오는 細胞는 대부분 T 細胞(natural killer 細胞 包含)이며, 이들을 10% FBS-RPMI 1640배지로 洗滌하여 實驗에 使用하였다. 한편 *in vitro* 實驗에 使用한 NK 細胞들은 정상 ICR 마우스로 부터 脾臟을 分離하여 위와 같은 方法으로 해서 만든 각 분획 및 정제 NK 細胞를 利用하였다.

#### 6) Natural killer 細胞의 活性測定<sup>30)</sup>

##### ① 酶素法

(lactate dehydrogenase activity)

NK 細胞 活性測定은 lactate dehydrogenase (LDH) activity로 测定하였다. 이는 培養細胞의 上층액에 존재하는 LDH가 기질인 lactate를 NAD<sup>+</sup>의 공여로 NADH/H<sup>+</sup>로 환원되면서 pyruvate를 生成하게 된다. 이때 生成된 NADH/H<sup>+</sup>가 발색제인 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-terezazolium chloride를 formazan salt로 전환시켰을 때 나타나는 黃色을 흡광도 492nm에서 测定하였다. 본 實驗에서는 Cytotoxicity Detection Kit(Boehringer Mannheim사)를 使用하였다.

먼저 분리한 NK 細胞를 밀이 둑근 96 plate에  $1 \times 10^6$  cells/well되게 100μl씩 分주한다. 여기에 표적세포로 배양한 K562 細胞를 1,000rpm으로 3분간 遠心分離하여 洗滌하고 assay medium(1% FBS-RPMI 1640)으로 혼탁시킨 뒤  $2 \times 10^4$  cells/ well 되도록 100μl를 다시 넣는다 (이때, E/T비율을 조절하기 위해서는 표적세포의 수를  $1 \times 10^4$  cells/well 또는  $1 \times 10^5$  cells/well되게 넣는다). 200μl의 혼합액을 가볍게 흔든 뒤 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양시킨다. 배양 후 이 plate를 1,500rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액 100μl를 취한 다음 다른 plate에 옮기고 100μl의 반응혼합액을 각 well에 넣은 다음 실온에서 약 30분간 차광

하여 반응시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 back ground control로는 assay medium 200μl를 넣었으며, positive control로서는 100μl의 표적세포( $2 \times 10^4$  cells)에다 2% Triton X-100-assay medium을 100μl를 첨가하였다. 음성 대조群으로는 100μl의 표적세포에다 assay medium만 100μl를 첨가해서 사용하였다.

### ② $^3\text{H}$ -thymidine incorporation法에 의한 测定<sup>31)</sup>

위에서 조제한 effector 細胞를 10% FBS RPMI 1640 배지에  $1 \times 10^6$  cells/well되도록 조정하여 균등하게 넣는다. 이때 한 시료당 3well 씩 microtiter plate에 균등하게 넣는다. 다음 제조 추출 원액을 배지로 희석(2배 희석=0.5, 10배 희석=0.1)해서 첨가하고 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양했다. 그 후 배양액에 target세포를 10% FBS를 포함하는 RPMI배지에  $2 \times 10^4$  cells/well되도록 조정하여 다시 넣었다. 그리고 같은 조건으로 다시 24시간 배양한다. 이어  $^3\text{H}$ -thymidine을 20μl씩(0.5μCi/ml) 가한 다음 다시 24시간 배양한 후 cell harvester로 세포를 흡입하고, 3번 동일한 조건으로 洗滌하고 filter를 실온에서 30분정도 乾燥시킨 후 방사활성을 liquid scintillation counter로 측정해서 NK 細胞의 활성치를 구했다.

### 7) T 細胞 분획에서 natural killer 細胞의 정제<sup>30)</sup>

#### ① Percoll gradients의 조제

100% Percoll(비중 1.090, Sigma사) 100ml, RPMI 1640배지를 50ml를 가하고 여기에 15ml의 FBS를 넣어 60.6% Percoll-RPMI용액을 만든다. 다음 60.6% Percoll액을 10% FBS-RPMI에 희석해서 각각 56.6, 52.1, 47.6, 43.1 및 38.6%의 Percoll액(4.5% gradients)을 만든다. 15ml의 바닥이 둥근 tube에 조제한 각 농도의 Percoll액을 2ml씩 천천히 넣어 4.5%의 불연속

농도구배를 만든다.

#### ② Natural killer 細胞의 분리

조제한 4.5% 불연속구배에 위의 實驗에서 Nylon wool column에 부착되지 않고 통과된 세포(T 細胞분획) 1ml를 조용히 엎고, 1,600rpm에서 45분간 실온에서 遠心分離를 行한다. 이때 속도는 반드시 5분간에 걸쳐서 천천히 增加되도록 하여야 한다. 遠心分離가 끝나면 각각의 중간층을 순서대로 천천히 회수한다. 본 실험에서는 첫번째 중간층을 NK 細胞로 회수하여 10% FBS-RPMI 1640배지로 2번 세척하여 natural killer 細胞 활성 측정에 사용하였다.

## III. 實驗成績

### 1. 脾臟의 무게 및 細胞數 测定

脾臟은 외관상 区別할 수 있을 정도로 蟑螂를 投與한 群에서 커져 있었으며, 脾臟의 무게는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 물만을 투여한 대조群에서 보다 21.1%정도 增加하였다. 한편 脾臟에서 분리한 細胞의 수도 무게와 比例하게 蟑螂를 投與한 群에서 增加함을 알 수 있었다.

### 2. 정제 전 natural killer 細胞의活性

NK 細胞는 비함식, 비흡착세포로 분리 정제의 과정에서 T 細胞에 包含된다. 그래서 본 實驗에서는 Nylon wool column을 使用하여 흡착 B 細胞를 分離하여 除去하고 T 細胞를 包含한 NK 細胞의 표적세포(암세포주, K562)에 대한 세포손상 활성을 测定하여 세포손상성(cytotoxicity)으로 그活性을 나타내었다.

#### ① NK 細胞의活性測定을 위한 標的細胞(target 細胞, K562)와 效果細胞(effectector 細胞, NK 細胞)의 比率 檢討

NK 細胞와 標的細胞인 K562 細胞와의 비(E/T ratio)를 10 : 1, 50 : 1 그리고 100 : 1로 하여 각각의 NK 細胞活性度를 調査하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 E/T의 比率이 50 : 1인 경우에서 가장 강한 NK 細胞의活性이 誘導됨을 알 수 있었으며, 이하 實驗은 모두 그比率을 50 : 1로 調整하여 行하였다.

### ② *In vivo*에서 정제 전 NK 細胞의活性

Fig. 3에 나타난 바와 같이 蟬螬 抽出液의 投與로 NK 細胞의 標的細胞에 대한 세포손상 활성은 正常群에서보다 약 24% 增加시킴을 알 수 있었다.

### ③ *In vitro*에서 정제 전 NK 細胞의活性

*In vitro* 實驗에서는 蟬螬 抽出液(원액)을 2배 희석(0.5), 및 10배 희석(0.1)하여 각각의濃度를 實驗에 使用하였다. 원액을 投與한 群에서는 對照群에서 보다 NK 細胞의活性이 35.7%, 2배 희석액에서는 27.2%의增加를 보였으나 10배 희석액에서는 별다른影響을 미치지 못함을 알 수 있었다(Fig. 4).

### 3. $^3\text{H}$ -thymidine incorporation法에 의한 NK 細胞의活性測定

이 方法은 지금까지의 酶素(LDH)活性測定과는 달리 NK 細胞에 의해 손상된 K562 細胞가 그 내부로  $^3\text{H}$ -thymidine의 uptake를 하지 못함으로 인해 發生하는  $^3\text{H}$ -thymidine의 양적 차이를 나타낸 것으로 NK 細胞의活性을 测定하는 또 다른 지표로 使用할 수 있다. 損傷을 전혀 받지 않은 K562 細胞에 uptake된  $^3\text{H}$ -thymidine의 양을 100%로 할 때 對照群에서는 11.1% 減少하였고, 蟬螬 抽出液을 投與한 群에서는 약 38.1%의 減少를 보였다(Fig. 5). 이러한 結果도 蟬螬 抽出液 投與群에서는 NK 細胞의活性이

對照群에 비해 有意性있게 增加하고 있음을 나타내고 있다.

### 4. 정제 후 NK 細胞의活性測定

Percoll gradients를 利用하여 T 細胞를 除去한 뒤, 순수 NK 細胞를 利用하여 각각의 標的細胞에 대한 세포손상을 测定하였다.

#### ① *In vivo*에서 정제 후 NK 細胞의活性

Percoll gradients를 利用하여 T 細胞에서 NK 細胞를 정제하여 實驗을 行하였다(Fig. 6). 정제하기 전과 유사하게 蟬螬 抽出液을 投與한 群에서는 對照群에서 보다 31.0%의 NK 細胞의活性增加가 나타났다. 그러나 정제전과 비교해서 對照群에서는 17%, 蟬螬 抽出液 投與群에서는 7%의 NK 細胞活性增加가 각각 나타났다.

#### ② *In vitro*에서 정제 후 NK 細胞의活性

Fig. 7에 정제 후 *in vitro*에서 NK 細胞의活性을 测定하여 세포손상으로 나타내었다.

蟠螬 抽出液(원액)을 投與한 群에서는 對照群에 비해 11.8%, 2배稀釋液에서는 5.7%增加하였으나 10배稀釋液에서는 별다른影響을 미치지 못하였다(2.4%). 한편 정제 전과比較해 볼 때 對照群 및 蟬螬 抽出液 각濃度群에서 정제 전보다 NK 細胞의活性이 다소增加되어 있음을 알았다.

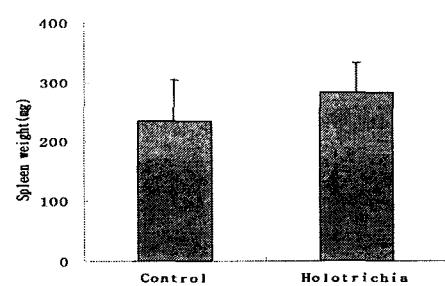


Fig. 1. Effects of *Holotrichia* on the mouse spleen weight.

ICR mouse was killed by suffocation. The abdominal skin is liberally wetted with 70% ethanol, resected well out the way and the abdominal wall cut sterile scissors to expose the spleen.

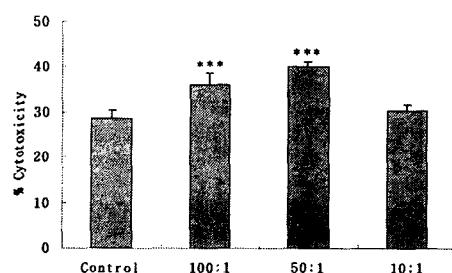


Fig. 2. Effects of effector cell/target cell(E/T) ratio on NK cell activity of nylon wool column-passed spleen cells.

Natural killer(NK) cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) and each ratio of K562 cells( $1 \times 10^4$ cells/well,  $2 \times 10^4$ cells/well and  $1 \times 10^5$ cells/well) were incubated at 37°C for 4 hrs. The ratio of E/T was 100:1, 50:1 and 10:1 respectively. And the microtiter plate was centrifuged at 1,500 rpm for 10min, the supernatant was carefully transferred into corresponding wells of an optically clear 96 well flat bottom microtiter plate. Cytolytic activity in the culture supernatant was measured by LDH assay. The detailed experimental procedures were described in the Materials and methods.

\*\*\* P<0.01.

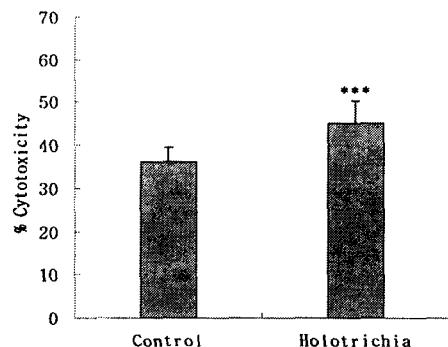


Fig. 3. *In vivo* effects of *Holotrichia* on NK cell activity.

NK cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) and K562 cells( $2 \times 10^4$ cells/well) were incubated at 37°C for 4 hrs. Cytolytic activity in the culture supernatant was measured by LDH assay. The ratio of E/T was 50:1.

\*\*\* P<0.01

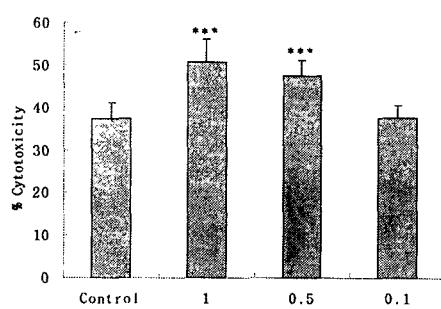


Fig. 4. *In vitro* effects of *Holotrichia* on NK cell activity of nylon wool column-passed spleen cells.

NK cells( $1 \times 10^6$ cells/well) and each dilution solution of *Holotrichia*( $\times 1$ ,  $\times 0.5$  and  $\times 0.1$ ) were incubated at 37°C. After 24hrs incubation, K562 cells( $2 \times 10^4$ cells/well) were added in the well plate that were incubated NK cells. Cytolytic assay was measured as described in Materials and methods. The ratio of E/T was 50:1.

\*\*\* P<0.01

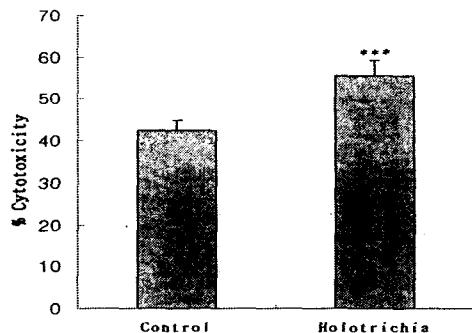


Fig. 6. Effects of *Holotrichia* on the cytotoxic activity of purified NK cells in *in vivo* system.

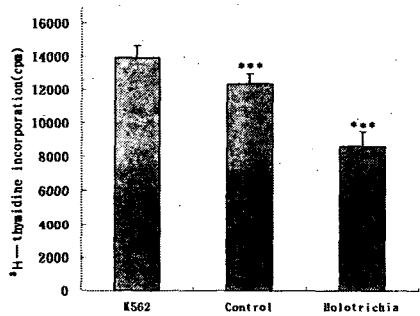


Fig. 5. *In vitro* effects of *Holotrichia* on NK cell activity by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation.

Cytotoxicity was estimated by the decreased uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine in cells. Each values represents the mean  $\pm$  S.E. (n=6). The ratio of E/T was 50:1.

\*\*\* P<0.01

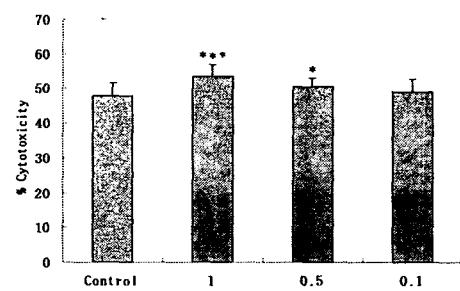


Fig. 7. Effects of *Holotrichia* on the cytotoxic activity of purified NK cells in *in vitro* system.

NK cells were purified by percoll gradients using 38.6–56.6% percoll-RPMI solutions. The detail experimental procedure was indicated in Materials and methods. The ratio of E/T was 50:1.

\* P<0.05, \*\*\* P<0.01

#### IV. 考察

癌은 最近 급격히 增加하여 國內의 경우는 물론 世界的으로도 가장 重要한 死亡 疾患중의 하나로 認識되고 있다.<sup>32-33)</sup>

韓醫學에서 癌과 關聯된 用語로는 殷墟의 甲骨文에서 “瘤”라고 하여 記載된 以後<sup>34)</sup> 癰瘕, 積聚, 反胃, 瘦瘤, 噎膈, 石瘕, 石疽, 失榮, 肺積, 伏梁, 肉瘤, 石瘤 等의 範疇에서 나타나며,<sup>35)</sup> 主要原因으로 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒蘊結, 正氣虛弱, 經絡瘀阻 等이 있으며,<sup>1-2)</sup> 특히 『內經』,<sup>36)</sup> 『金匱要略』,<sup>37)</sup> 『古今醫統』,<sup>38)</sup> 『醫林改錯』<sup>39)</sup> 等의 文獻에서는 癌의 形成 過程에서 血瘀를 重要視하였다.

종양의 임상 및 병리생태학적 구분에서는 모든 악성종양이 암이라고 불리우며,<sup>40)</sup> 악성종양, 암, 신생물의 용어가 서로 바뀌어 사용되기도 한다.<sup>41)</sup>

癌의 原因은 아직 不明確한 部分이 많이 있지만 外界環境 中의 致癌因子 즉 化學的, 物理的, 生物學的 致癌因子가 重要한 原因으로 認識되고 있는데,<sup>42)</sup> 一般的으로 癌發生의 80% 정도가 外界環境 中의 致癌因子와 關係있는 것으로 보고 있다. 이와 關聯하여 韓醫學의 痘因으로 『靈樞·百病始生篇』에서는 “積之始生, 得寒乃生, 厥乃成積也”라고 하였고, 『癰疽篇』에서는 “熱氣淳盛, 下陷肌膚, 筋髓枯, 內連五臟, 血氣竭, 當其癰下, 筋骨良肉皆無餘, 故命曰疽”라고 하여<sup>43)</sup> 寒, 热과 같은 外邪의 侵襲과 關聯이 있다고 하였다.

그러나 이와같은 因子 外 内的所因으로 遺傳

因子, 個個人의 感受性, 精神的인 影響, 人體免疫 監視系統의 機能的 障碍, 內分泌失調 等도 癌發生에 重要한 因子로 認識되고 있는 趨勢이며<sup>40)</sup> 一般的으로 韓醫學에서는 氣滯, 血瘀, 痰結濕聚, 毒熱內蘊, 臟腑失調, 經絡瘀阻 等으로 認識하고 있다.<sup>8-9,34-35)</sup>

이러한 發病의 痘因病機에 關與하는 因子들은 서로 影響을 미치고 相互作用을 거쳐 全體의 癌發生의 痘理過程을 形成하게 된다. 그 중 血瘀는 癌의 形成과 癌發展過程中에서 重要한 痘理機制중의 하나이며 痘이 進行되면서 각 段階에서 나타날 수 있는 痘理的 현상中 하나이기도 하다.<sup>44)</sup>

韓醫學에서 癌의 癌發生과 血瘀의 聯關性에 대한 記錄을 보면 『內經』<sup>36)</sup>에는 “血氣稽留不得行 故宿昔而成積矣”라고 하여 血瘀가 오래되어 “積” 즉 腫塊가 内部에서 形成된다고 하였고, 『金匱要略』<sup>37)</sup>에서는 “病人胸滿脣瘻, 舌青, 口燥, 但欲漱水不欲咽, 無寒熱, 脈微大來遲, 腹不滿, 其人言我滿, 為有瘀血；病者如熱狀, 煩滿, 口乾燥而渴, 其脈反無熱, 此為陰伏, 是瘀血也, 當下之”라고 하였으며, 『古今醫統』<sup>38)</sup>에는 噎膈에 대하여 “凡食下有礙, 覺屈曲而下, 微作痛, 此必有死血”이라고 하였고, 『醫林改錯』<sup>39)</sup>에서는 “肚腹結塊, 必有形之血也, 血受寒則凝結成塊, 血受熱則煎熬成塊, ……血府, 血之根本, 瘓則殞命”이라고 하여 癌의 形成過程에 있어서 血瘀를 重要視하였다.

血瘀로 因한 徵候로는 舌象에 대하여 舌色 青紫, 瘡點이 나타나는 症狀은 肺癌, 肝癌, 食道癌等에서 많이 發見된다고 하였고,<sup>45)</sup> 童等<sup>46)</sup>은 原發性 肝癌患者에게는 舌의 兩邊에 紫色이나 青色의 條紋狀 或은 不規則한 黑斑點이 나타나고 境界가 分明하여 區別하기 쉬운 線이 나타나는데 이것을 “肝瘻線”이라고 命名하고 이러한 血瘀症狀은 末期 肝癌患者에게 많이 보이며 疾病이 加重될수록 血瘀가 增加된다고 하였다.

腫物包塊는 血瘀證을 辨證診斷하는 客觀的 主

要 表示로써 癌증 實質臟器의 癌患者는 病理性腫塊가 存在하는데 不斷히 浸潤生長하며, 肿塊中에는 macrophage, 임파세포 等의 浸潤 및 炎症性 病變을 隨伴하므로 局部의 癰血 症狀이 易게 나타나고, 同時에 肿塊가 周圍의 組織을 壓迫하므로 局部의 充血水腫과 血管發生 等의 異常變化가 蒼起되어 血瘀의 病理는 加重된다.<sup>40,47)</sup>

또한 血瘀로 因하여 固定性 刺痛 혹 紓痛 疼拒按現象, 皮膚粗糙 肌膚甲錯, 微循環障礙 및 血液流變學의 變化가 나타나는데<sup>8-9)</sup>. 黃<sup>48)</sup>은 西洋醫學에서의 血液循環障碍로 因한 雜血, 出血, 血栓 및 水腫 等과 炎症으로 因한 組織의 渗出, 變性, 壞死, 萎縮 혹 增殖 等과 代謝障碍로 因한 組織의 變化 等을 包括한다고 하였다.

報告에 의하면 活血化瘀 藥物인 全蝎, 水蛭, 虻蟲, 川芎, 紅花, 丹蔘, 三棱, 蓬朮, 川棟子, 烏藥, 當歸尾, 大黃, 五靈脂, 鷄血藤, 喜樹, 斑貓 等이 癌에 대하여 抗癌, 抗凝固 및 fibrin(纖維蛋白) 溶解, 抗炎症과 抗感染, 血液循環의 調節, 結締組織 代謝調整, 生體 免疫機能 調節 等의 作用이 있다고 한다.<sup>8-9)</sup>

蜻蛉는 풍뎅이의 幼蟲인 굼벵이를 乾燥한 것으로, 神農本草經에 最初로 記載되어 있으며 蟲, 蟲蟻, 蝗齊, 乳齊, 地蠶, 應條, 老母蟲, 桃核蟲 等의 異名이 있으며 性溫 味鹹하고 肝經에 入하며 主治는 여러 文獻에서 主惡血, 血瘀痞氣, 破折血, 在脇下滿痛, 月閉, 目中淫膚, 清翳白膜, 金瘡內塞, 赤白游疹 等으로 記載되어 있으며 主로 癰血을 治療하는 藥物로 使用되어 왔다.<sup>12-23)</sup>

實際 臨床에서 活血化瘀法을 利用한 癌의 治療에서 蜻蛉가 들어있는 處方은 大黃蟻蟲丸이 가장 많이 利用되었다. 大黃蟻蟲丸은 『金匱要略·血痹虛勞病脈証并治第六』<sup>37)</sup>에서 “五勞虛羸瘦, 腹滿不能飲食, 食傷, 飲傷, 房室傷, 飢傷, 勞傷, 經絡營衛氣傷, 內有干血, 肌膚甲錯, 兩目暗黑, 緩中補虛, 大黃蟻蟲丸主之”라고 하였고, 劉<sup>25)</sup>는 溶血, 活血, 通絡, 軟堅하는 效能이 있으며 腫瘤性疾病에 使用된다고 하였다. 『金匱方論與

臨床』<sup>24)</sup>에서 蜻蛉는 活血通絡, 攻逐瘀血하는 效能이 있다고 하였다. 沈<sup>26)</sup>은 原發性肺癌 62例에 대하여 基本方으로 三棱, 蓬朮, 留行子, 大黃蟻蟲丸, 桃仁, 丹蔘, 海藻 等을 使用하여 有效한 효과를 얻었다. 그 외에도 肝癌의 氣滯血瘀証에 右肋脹痛或刺痛, 胸悶納呆, 腹脹, 乏力, 上腹腫塊, 質硬, 舌質紫暗할 때 小柴胡湯合大黃蟻蟲丸이 利用되었고, 또한 大黃蟻蟲丸이 肝癌, 卵巢癌 혹은 腹腔腫塊가 있을 때 癰血症狀을 同伴한 경우에 使用되었다.<sup>37)</sup> 또한 浸潤型胃癌에 『千金方』의 七巧守宮丸을 使用하였다.<sup>28)</sup>

그러므로 著者는 韓醫學에서 主惡血하는 效能을 가진 動物類 韓藥材인 蜻蛉 抽出物이 免疫을 擔當하는 細胞에게 미치는 影響을 實驗的으로 紛明하여 그 效果를 檢討하였다.

免疫을 擔當하는 細胞는 外部에서 侵入한 抗原을 처리하는 macrophage와 侵入한 異物質을 破壞하거나 抗體의 生成을 도와주는 T 細胞(cytotoxic 및 helper)를 비롯하여, 多樣한 抗體를 만드는데 직접 關與하는 B 細胞로構成되어 있다. 흔히 말하는 免疫增強物質이란 이들 3種類의 細胞 즉 macrophage의 活性화 및 抗原제시 능력, B 細胞에 있어서는 抗體 生成能力과 增殖能 그리고 T 細胞에 있어서는 增殖 및 lymphokine 分泌誘導 等 一連의 免疫應答에 關與하는 細胞들의 機能을 活性화시켜야 하며, 또한 비특이적 生體내 防禦作用에 관여하는 NK 細胞의 活性도 腫瘍免疫應答에 重要한 指標가 되고 있다.

NK 細胞는 特別히 腫瘍細胞 및 바이러스 感染細胞에 대해서 細胞損傷 作用을 가지는 임파계 細胞로 生體의 免疫監視(immune surveillance) 機轉의 主役을 擔當한다고 알려져 있다.<sup>4)</sup> 실제로 生體 内에서 癌細胞가 發生하면 NK 細胞은 自己의 腫瘍細胞의 癌抗原을 認識하여 細胞間의相互作用에 의하여 NK 細胞로부터 막융해 단백질인 perforin에 의하여 癌細胞를 破壞한다고 알려져 있다.<sup>5-6)</sup> 그러나 實際로 癌患者는 NK

細胞의 活性이 低下되어 있으며 면역조절제 등의 投與로 NK 細胞의 活性을 增加시키려는 試圖가 行하여 지고 있다고 報告되고 있다.<sup>49-50)</sup>

본 實驗에서 우선 각各의 脾臟의 크기와 수를 測定하였는데 實驗群에서 약 21.1% 정도 脾臟의 무게가 增加하였고, 또한 이와 比例하여 脾臟細胞의 숫자 增加도 確認되었다. 脾臟細胞의 조성은 임파계 細胞가 主를 이루는데 이로보아 蟒螬 抽出液이 임파계 紡胞에 어떤 影響을 미쳤음을 알 수 있었다.

蟒螬의 마우스 NK 細胞活性을 具體的으로 立證하기 위하여 脾臟을 적출한 다음 赤血球는 lysis buffer法으로 除去하고, B 細胞는 Nylon wool column에 천천히 注入하여 吸着되는 것이고, 通過되는 것은 NK 細胞를 包含한 T 細胞이다.<sup>37)</sup> T 細胞(effecter 細胞)와 K562 細胞(target 細胞)의 비율은 50 : 1인 경우에서 가장 강한 NK 細胞의 活性이 誘導됨을 알 수 있으며 이후 實驗은 活性이 가장 높은 50 : 1로 調整하여 行하였다.

NK 細胞의 活性測定을 위하여 酵素法(lactate dehydrogenase activity)과  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation法에 의하여 測定하였는데 우선 酵素法<sup>30)</sup>에 의한 *in vivo*에서 蟒螬 抽出液의 投與로 T 細胞(NK 細胞 包含)의 標的細胞에 대한 손상활성은 正常群보다 增加됨을 알 수 있었다.

*In vitro*에서 蟒螬 抽出液(原液)을 投與한 群에서는 對照群보다 NK 細胞의 活性이 增加를 보였으나 10배 稀釋液에서는 별다른 影響을 미치지 못함을 알 수 있었다.  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation法<sup>31)</sup>에 의한 測定에서도 손상을 전혀 받지 않은 K562 細胞에 uptake된 量보다 蟒螬 抽出液을 投與한 群에서 減少를 보였다. 이러한 結果는 蟒螬 抽出液이 NK 細胞를 活性化시켜 細胞損傷作用을 有意味하게 增加시키고 있음을 나타내고 있다.

다음으로 NK 細胞와 T 細胞를 分離하기 위하여 Percoll gradients<sup>30)</sup>를 利用하여 순수 NK

細胞를 정제한 후 각各의 細胞에 대한 세포손상성을 測定하였다. *In vivo*에서 蟒螬 抽出液을 投與한 群에서 NK 細胞의 活性增加가 나타났으며, 정제 전과 비교하여도 정제 후의 NK 細胞에서 活性이 다소 增加하였다. 또한 *in vitro*에서도 蟒螬 抽出液을 投與한 群에서 NK 細胞의 活性이 增加되어 있음을 알았다.

이상의 結果로 보아 蟒螬 抽出液의 投與로 마우스 NK 細胞의 活性增加가 誘導되어 癌細胞인 K562 細胞에 대하여 세포손상作用이 增加되는 것으로 생각된다. 또한 韓醫學에서 癌의 治法中 蟒螬을 利用한 것은 攻邪法中의 하나로써 특히 蟒螬와 大黃螵蟲丸을 構成하는 大黃, 桃仁, 蝉蟲, 水蛭, 蟲蟲 等이 함께 使用되었을 때의 抗癌效果 및 扶正培本하는 韓藥材와 함께 使用되었을 경우의 抗癌效果에 대해서도 研究되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結論

韓醫學에서 主로 癔血을 治療하는 動物性 藥物인 蟒螬 抽出液이 免疫을 擔當하는 細胞에 미치는 影響을 紋明하기 위하여 癌細胞인 K562 細胞에 대하여 정제전과 후의 NK 細胞의 活性을 LDH법과  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation법으로 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 脾臟의 무개는 물을 投與한 對照群에 비해 蟒螬 抽出液 投與群(實驗群)에서 약 21.1% 정도 增加하였다. 또한 脾臟의 무개에 比例하여 脾臟細胞의 숫자 增加도 確認되었다.
- 脾臟細胞에서 T 細胞를 포함한 NK 細胞(effecter 細胞)의 癌細胞인 K562(target 세포)細胞에 대한 細胞損傷作用은 effector/target 細胞의 숫자 比가 50 : 1인 경우에서 가장 강하게 誘導되었다.
- LDH법을 이용한 *In vivo* 實驗에서 effector 細胞의 세포손상活性은 實驗群에서 對照群보다

24 % 增加하였다.

4. *In vitro* 實驗에서는 蟻螬 抽出液 원액에서 가장 높은 活性을 보였으며 細胞 배율이 높을 수록 세포손상성은 낮아졌으며 10배 細胞 액에서는 對照群과 별다른 차이점을 찾을 수 없었다.
5. Effector 細胞의 K562 細胞에 대한 세포손상성은  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation법에서도 LDH법과 유사하게 나타남을 알 수 있었다.
6. 脾臟細胞에서 NK 細胞만을 정제한 뒤, *in vivo* 實驗에서 NK 細胞의 세포손상성을 조사한 결과 實驗群이 對照群보다 31% 增加하였으며, 세포손상성은 정제 후의 NK 細胞에서 다소 增加하였다.
7. *In vitro* 實驗에서도 정제 후에는 實驗群에서 NK 細胞의 세포손상성이 11.8% 의 增加를 보였으며, 정제 전에서 보다 전반적으로 높았다.

이상과 같은 實驗 成績을 綜合해 볼 때 蟻螬 抽出液의 投與는 마우스에서 NK 細胞의活性을 增加시키는 것으로 나타났으며, 또한 癌細胞인 K562 細胞의 손상을 增加시키는 것으로 나타났다.

## 參考文獻

1. 李岩 : 腫瘤臨證備要, 人民衛生出版社, 北京, pp.19-28, 1980
2. 鄭偉達 : 中醫治療腫瘤經驗, 中國醫藥科技出版社, 北京, pp.6-10, 1994
3. 邱佳信 : 在惡性腫瘤治療中如何合理應用活血化瘀藥物, 中醫雜誌, 5:384-387, 1987
4. Ortaldo, J.R. and Herberman R.B. : Heterogeneity of Natural Killer Cells. Annual Review of Immunology. 359-394, 1984
5. Podack, E.R. : Molecular mechanisms of cytolysis by complement and by cytolytic lymphocytes. J. Cell. Biochem. 3, 127-164, 1986
6. Ortaldo, J.R. Winkler-Pickett R.T, Nagashima, K. Yagita, H. and Okumura, K. : Direct evidence for release of pore-forming protein during NK cellular lysis. J. Leuk. Biol. 52, 483-488, 1992
7. 錢伯文 : 抗癌中藥的臨床效用, 上海譯譯出版公司, 上海, pp.317-322, 1987
8. 李佩文 : 中西醫臨床腫瘤學, 中國中醫藥出版社, 北京, pp.141-143, 1996
9. 孟琳升 : 中醫治癌大成, 北京科學技術出版社, 北京, pp.130-143, 1997
10. 馮培芳 外 : 蘿蔴注射液對晚期癌症患者 SIL-2R,LAK及NK細胞活性影響, 中國中西醫結合雜誌, 15(2):87-89, 1995
11. 高炳熙 外 : 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK細胞活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 7(2):157-173, 1986
12. 江蘇中醫學院編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 香港, p.2379, 1979
13. 唐慎微 : 重修政和經史證類備用本草, 人民衛生出版社, 北京, p.428, 1986
14. 陶弘景 : 名醫別錄, 人民衛生出版社, 北京, pp.190-191, 1986
15. 蘇敬等選 : 新修本草, 安蘇科學技術出版社, 安徽省, pp.417-418, 1981
16. 蘇頌 : 圖經本草, 曠源出版公司, 福州, pp.433-434, 1988
17. 孫星衍 選 : 神農本草經, 自由出版社, 臺北, pp.185-186, 1973
18. 吳普 : 吳普本草, 人民衛生出版社, 北京, p.72, 1987
19. 王好古 : 湯液本草, 人民衛生出版社, 北京, pp.189-190, 1987
20. 李尚仁 : 本草學, 修書院, 서울, p.471, 1981
21. 李時珍 : 本草綱目, 高文社, 서울, p.1300, 1975
22. 申信求 : 申氏本草學, 壽文社, 서울, pp.568-569, 1979

23. 辛民教 : 臨床本草學, 永林出版社, 서울, p.482, 1988
24. 曲鴻忠 : 金匱方論與臨床, 中國中醫藥出版社, 北京, pp.285-294, 1993
25. 劉光漢 : 淺談大黃蟻蟲丸的臨床應用, 長西中醫 12(6):242, 1991
26. 沈丕安 : 以活血化瘀為主治療原發性肺癌63例的療效觀察, 全國第2次中西結合腫瘤防治研究協作會議料, 1981
27. 陳義文 外 : 中西醫結合腫瘤防治手冊, 新華出版社, 北京, pp.109, 297, 1994
28. 史蘭陵 外 : 癌症中醫治驗, 山東科學技術出版社, 山東, pp.196, 1990
29. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. : Current protocols in Immunology. vol.1, National Institutes of Health, 1991
30. Osawa, T. 外 : 免疫生化學研究法 pp.165-191, 東京化學同人, 1989
31. Mizoguchi, Y., Fujinobu, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S. : The effects of Xiao - Chai - Hu - Tang(Syo-saiko-to) on natural killer(NK) cell activity. Journal of Traditional Medicine(Japan) 3, 184, 1986
32. 서울대학교 의과대학편 : 면역학, 서울대학교출판부, 서울, pp.78-90, 1990
33. 이문호 : 최근 한국의 질병변천, 대한의학회지 32(3):283-290, 1989
34. 方藥中 外 : 實用中醫內科學, 醫聖堂, 서울, pp.621-623, 627, 1993
35. 邵夢揚 外 : 中西醫結合臨床腫瘤內科學, 天津科技翻譯出版公司, 天津, pp.3-7, 1994
36. 王琦 外 : 黃帝內經素問今釋, 成輔社, 서울, p.120, 1983
37. 李克光 : 金匱要略譯釋, 上海科學技術出版社, 上海, pp.164, 520-522, 1993
38. 徐春甫 : 古今醫統大全, 人民衛生出版社, 北京, p.956, 1991
39. 王清任 : 醫林改錯, 中國中醫藥出版社, 北京, p.29, 1995
40. 서울대학교 의과대학편 : 종양학, 서울대학교출판부, 서울, pp.1-3, 23-28, 1993
41. 해리슨 번역 편찬위원회 : HARRISON'S 내과학(I), 정답, 서울, p.1963, 1997
42. 實用腫瘤學 編輯委員會 : 實用腫瘤學 第1冊, 人民衛生出版社, 北京, 1978
43. 郭謁春 : 黃帝內經靈樞校注語譯, 天津科學技術出版社, 天津, pp.386-387, 439, 555, 1989
44. 中國中西醫結合研究會 : 惡性腫瘤中西醫結合研究的成就, 中西醫結合雜誌, 18(2):57, 1988
45. 宋天彬 : 東醫舌診原色圖譜, 高麗醫學, 서울, p.12, 1988
46. 童國泉 : 原發性肝癌舌診特徵的發現, 福建中醫, (7):227, 1962
47. 郁仁存 : 中醫腫瘤學上冊, 科學技術出版社, 北京, pp.23-28, 1983
48. 黃杏開 : 試論祛瘀活血治虛的實質, 遼寧中醫雜誌, 4:5-7, 1985
49. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G. : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor(NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J. Exp. Med. 170, 827-845, 1989
50. Chan, S.H., Perrssia, B., Gupta, J.W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H.A., Wolf S.F., Young, D., Clark, S.C. and Trinchieri, G. : Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. J. Exp. Med. 173, 869-879, 1991