

원저

全蝎 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果

김소형 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The antimutagenic effect and genetic safety of *Buthus martensi* Karsch aqua-acupuncture solution(BMKAS)

So-Houng, Kim · Kap-Sung, Kim

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine
Dong Guk University, Seoul, Korea.

Objective : The aim of this study is to determine the antimutagenic effect and genetic safety of *Buthus martensi* Karsch aqua-acupuncture solution(BMKAS) against various chemical carcinogens.

Method : Ames(Salmonella typhimurium) test and Rec assay(Bacillus subtilis) were used as indicators for DNA damage and antimutagenesis. Furthermore, the levels of umu operon expression by measuring the β -galactosidase activity were monitored with the SOS umu test using *S. typhimurium* 1535 containing plasmid pSK1002. And the host-mediated assay was used to investigate the mutagenicity and antimutagenicity of BMKAS inducing various chemical carcinogens after the activation with in vivo metabolic systems.

Results : From the results, BMKAS did not affect DNA of *S. typhimurium* and *B. subtilis* strains and showed no mutagenicity at the all concentrations of tested solution. Furthermore BMKAS dose-dependently protected the mutagenicity by AF-2, 2-AA and B[a]P. These phenomena was also similar to that after metabolic activation of BMKAS in in vivo system.

· 접수 : 2000년 8월 10일 · 수정 : 8월 22일 · 채택 : 8월 26일
· 교신저자 : 김갑성, 서울 강남구 논현1동 37-21 동국대학교 강남한방병원 침구과 (Tel.02-3416-9739)

Conclusion : These results suggested that BMKAS did not show the mutagenicity and protected the mutagenesis against various chemical carcinogens by four different methods used in this study.

Key Words : BMKAS · Ames test · Rec-assay · SOS umu test · Host-mediated assay

I. 서론

藥鍼療法은 疾病과 有關한 穴位, 壓通點, 陽性 反應點에 藥鍼液을 注入하여 鍼刺戟과 藥物作用을 通하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 改善시켜 疾病을 治療하는 療法이다¹⁻⁶⁾.

韓醫學의 癌은 體內에 發顯되는 腫塊, 質의 堅硬, 岩石과 같은 腫氣등을 指稱하는 것인데, 이는 主로 氣血의 阻滯, 血瘀, 痰凝에 依해 發生되기 때문에 氣無力하고, 全身倦怠感, 食慾不振, 消化不良, 惡心嘔吐, 心窩部飽滿感, 不眠, 脈無力細, 上腹部에 腫塊物의 觸知等の 症狀을 보인다.

治療法으로는 補陽精氣하는 藥劑를 爲主로 破積, 活血, 解鬱, 行氣, 補血하는 藥劑를 兼하여 活血하고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

西洋醫學에서의 抗癌治療는 1950年代까지는 手術療法이, 1960年代에는 放射線療法이, 1970年代에는 抗癌 化學療法이, 1980年代에는 免疫療法이 發展하였는데 各自의 治療方式을 單獨 혹은 複合的으로 適用하여 一部の 腫瘍에서는 顯著的한 治療成績의 向上을 가져온 것이 事實이나, 대부분의 腫瘍에서는 治療成績이 크게 向上되지 못했으며, 既存의 治療方式으로는 癌을 征服하지 못할 것 같은 두려움을 느끼고 있다. 最近에는 癌의 病態生理에 重要

한 役割을 하는 것으로 알려진 遺傳子變換狀態를 遺傳子 水準에서 矯正하고자 하는 Gene Therapy 이 注目받고 있다¹¹⁻¹³⁾.

韓藥物에 依한 癌, 腫瘍 治療에 있어서 金이 肝癌珠와 S-180에 對한 茵蔯의 抗腫瘍效果에 對하여 報告하였으며¹⁴⁾, 李는 Mouse腫瘍細胞後 成長抑制에 미치는 巴豆의 效果에 對하여 報告하였고¹⁵⁾, 金은 生藥의 肝癌細胞에 對한 抗腫瘍效果와 抗癌劑와 의 上昇作用에 對하여 報告하였고¹⁶⁾, 崔는 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍과 免疫反應에 미치는 影響에 對하여 報告 하였고¹⁷⁾, 徐는 枸杞子 藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響을 報告하였으나¹⁸⁾ 全蝎藥鍼液이 抗突然變異 및 抗癌效果에 미치는 影響에 對한 報告는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 全蝎藥鍼液이 發癌誘發物質에 對한 沮害實驗 및 安定性平價를 行하고자 諸風癩疹, 風疹瘡腫하는 全蝎¹⁹⁻²⁴⁾ 藥鍼을 使用하여 調胃理氣, 化濕降逆하는 中脘^{25-29,75-81)}穴에 刺戟하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 實驗 背景

人體 癌은 85% 以上이 環境中에 存在하는 化學

物質에 의해誘發된다고 알려져 있다. 그러므로 우리들이 日常生活에서 손쉽게 접하게되는 醫藥品, 食品添加物, 農藥 등을 비롯한 많은 化學物質 및 生活環境 등이 癌發生 有無와 相互 關聯이 있어 關心이 高調되고 있다. 따라서 우리 周邊의 이러한 環境性 發癌 因子의 除祛 및 化學物質의 誤濫用은 癌을 비롯한 多様な 遺傳的 疾患의 豫防次元에서 매우 重要하다.

環境性 發癌物質에 의한 定常細胞의 癌化 過程은 開始(initiation)과 進行(promotion) 및 增幅(progression)의 3가지過程으로 나누어져 完成된다고 알려져 있다³⁰⁾. 이 중 어느 段階라도 도중에 漏落되거나 發顯이 늦어지면 事實上 癌으로의 進行이 遲延되거나 멈추게 된다. 따라서 이들 各各의 段階에 關與하는 酵素들은 많이 알려져 있으며 이들 酵素의 抑制는 發癌過程의 遮斷과 關聯되기 때문에 生化學的으로 抗癌活性的의 指標로 活用하고 있다³¹⁻³²⁾. 또한 initiation 및 promotion에 關連된 因子抑制는 癌豫防의 次元에서 重要時되고 있으며, 癌 抑制에 關한 BRM(biological response modifier)物質에 대한 關心增加와 아울러 天然物, 海洋生物에서 新物質開發에 많은 努力을 가하고 있다.

한편 發癌성을 檢出하기 위한 生物實驗은 많은 時間과 費用이 逍遙됨으로 短時日 內에 檢索하는 일은 매우 重要的 일이라 생각된다³³⁻³⁵⁾. 現在 化學物質의 發癌性 有無를 檢索하는 方法은 Ames 등에 의해 開發되어졌으며, 이 方法에 의하면 既知의 發癌物質의 約 85% 以上이 細菌에 대해서도 突然變異原성을 가진다고 報告되어졌다. 따라서 이 方法은 Salmonella菌을 使用한 突然變異 實驗으로 發癌性 物質을 短期間 內 스크리닝 할 수 있는 전 世界的으로 가장 널리 利用되는 方法이다. 또한 定量的이고 突然變異원의 作用機轉까지도 判定 할 수 있으며 다른 物質과 同時投與에 의한 發癌 및 突然變異 抑制活性까지 測定할 수 있다.

本 實驗에서는 全蝎藥鍼液이 發癌 誘發物質에 對한 阻害 實驗 및 安全性 評價를 行하고자 한다. 全蝎은 蠍科(Buthidae)에 속하는 昆蟲으로 全蝎(Buthus martensi Karsch)의 乾燥體로 全蝎毒을 비롯한 lecithin, cholesterol, hydorxyl amine 등 多様な 成分 등이 알려져 있으며 特히 抗菌作用 및 癌細胞 抑制作用 등이 報告되어지고 있다.

그래서 本 實驗에서는 살모넬라菌(Salmonella typhimurium)을 利用한 Ames test와 umu test 그리고 고초菌(Bacillus subtilis)을 利用한 Rec assay법 그리고 實驗動物을 利用한 host mediated assay법을 利用하여 全蝎藥鍼液의 遺傳적 安全性 및 抗 突然變異原성에 미치는 影響을 조사하였다.

2. 實驗 材料

1) 藥材

本 實驗에 使用한 全蝎(Buthus martensi Karsch, 이하 BMK로 약칭함)은 東國大學校 附屬 分堂韓方病院(Seoul, Korea)에서 求入한 後 精選하여 使用하였으며, 精選標本 生藥들은 東國大學校 附屬 分堂韓方病院 內에 保管 中이다.

2) 實驗動物

생쥐는 효창 사이언스(Daegu, Korea)에서 求入하여 本 大學 動物飼育室에서 一定한 條件(溫度 20 ± 2℃, 濕度 40~60%)下에서 一週日 以上 適應시킨 7주령의 雄性 Balb/c 생쥐를 使用하였다.

3) 取穴

雄性 Balb/c 생쥐에 人體의 中脘(CV12)과 解剖學的으로 相應하는 部位 및 非穴位인 尾椎部 任意穴(Blank locus)을 選擇하여 實驗에 使用하였으며 1 회 各 濃度로 調劑한 藥鍼液의 使用量은 0.2ml로 하였다.

4) 試藥

B-2 broth, yeast extract 및 agar는 Difco 사(Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)의 製品을 그리고 L-histidine, biotin, glucose-6-phosphate, NADP, NPD (4-nitro-O-phenylene-diamine), NaN₃, 2-aminofluorene (2-AF), benzo[a]pyrene (B_aP) 및 AF-2(furylfuramide)는 Sigma社 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.)의 製品을 使用하였다. 한편 SOS umu test용 kit는 오즈카 製藥社(Oozuka Chem. Co., Tokyo, Japan) 의 製品을 使用하였다. 그 외 使用된 모든 試藥들은 Sigma사 및 Wako사의 特級製品들을 使用하였다.

3. 實驗 方法

1) 全蝎藥鍼液의 調劑

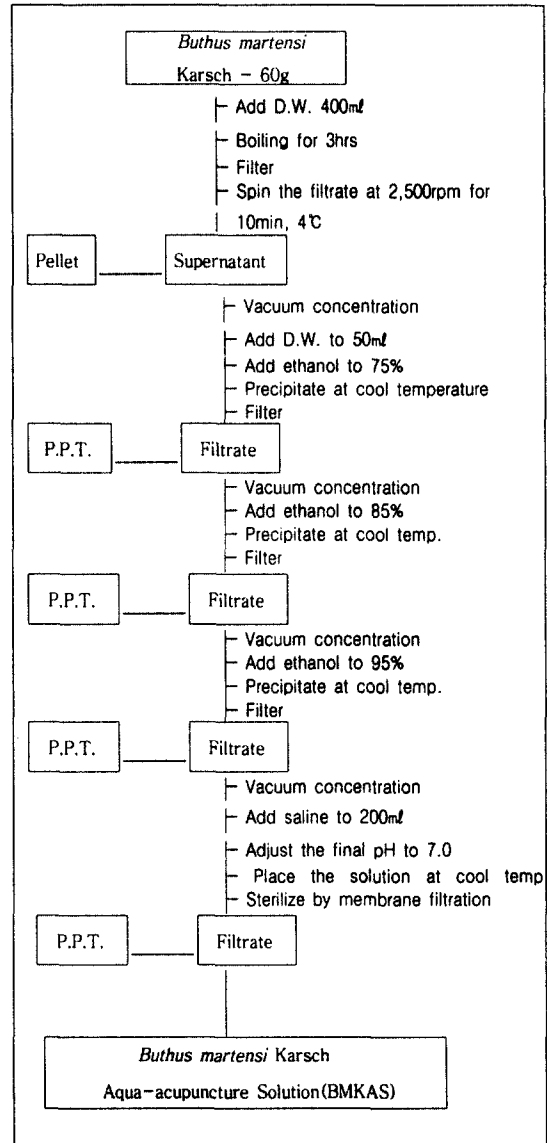
本 實驗에서는 水提-알콜침법에³⁶⁾ 依해 다음과 같이 全蝎藥鍼液을 製造하였다. 먼저 全蝎 60g을 垂直으로 還流 冷却管이 附着된 원저 플라스크에 넣고, 蒸溜水 400ml를 가한 後, 3시간 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 그 後 濾過液 중에 남아 있는 微量의 沈澱物을 除去하기 위해 4℃에서 2,500 rpm으로 10분간 遠心 分離하여, 그 上層液을 取하였다.

上層液을 다시 rotary evaporator(BUCHI RE-121, Switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 50ml이 되도록 한 다음, membrane filter(0.22μm, Whatman®, Germany)로 濾過하였다.

위의 方法으로 製造한 全蝎 抽出液 50ml에 ethanol을 加하여 稀釋하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別 하였다. 이 때 ethanol은 99.9% ethanol을 使用하였으며, 添加量은 全蝎 물 抽出液이 段階別로 75%, 85% 및 95% ethanol 溶液이 되게 하면서 沈澱物을 除去한 다음 減壓 濃縮 하였다.

그 後 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 加하고 1N

NaOH로 pH 7.0으로 調節하여 全量이 200ml가 되게 한 다음, 低溫에서 24時間 放置한 後, membrane filter(0.22μm, Whatman®, Germany)로 濾過하여 全蝎藥鍼液의 原液(1×)으로 使用하였으며 必要에 따라 3倍濃縮(×3), 5倍 濃縮(×5) 및 2倍 稀釋(×0.5)하여 實驗에 使用하였다(Scheme. 1).



Scheme 1. Preparation of Buthus martensi Karsch Aqua-acupuncture Solution(BMKAS)

2) Bacillus 菌株를 사용한 安全性 및 DNA 損傷 抑制能 檢討³⁷⁾

菌株로는 고초균 (Bacillus subtilis)을 사용하며 菌의 性狀으로는 野生菌株인 Rec+(H17)과 DNA 損傷性 收復能 缺損菌株인 Rec-(M45)로 나누어진다. 또한 本 實驗에 사용한 培地의 造成은 B-2 broth 10g, yeast extract 10g 그리고 NaCl 5g을 蒸溜水 1,000 ml에 녹인 다음 pH 7.0으로 調整해서 高壓 滅菌한다. 固形培地 調劑를 위해서는 한천 분말을 1.5% 되도록 加한다. 그 後 사알레에 20ml 씩 부운 다음 實驗에 使用한다.

調劑한 培地를 適當히 乾燥시킨 다음 培地表面에 小型 pipette(1ml)로 Rec+ 및 Rec- 菌을 streak 한다. 이때 pipette 선단에 한천의 表面이 損傷되지 않도록 하였고, 또한 Rec+菌과 Rec- 菌의 起點이 서로 混合되지 않도록 注意한다. 全蝎藥鍼液을 溶媒인 蒸溜水에 녹여 直徑 12mm의 滅菌여지에 均等히 퍼지게 한 다음, 試料을 吸收시킨 滅菌여지를 Rec+ 와 Rec- 菌을 streak한 기점에 덮어서 37℃에서 24시간 培養시킨다. 이때 溶媒인 H2O를 陰性 對照群(negative control)으로 하며, 陽性 對照群(positive control)으로는 低地帶의 길이가 잘 알려진 AF-2를 使用하였다. 培養중인 菌은 培地 위에서 分裂 및 生肉을 계속한다. 試料에 依한 菌의 生育, 沮止의 정도는 菌과 試料의 濃度에 依해 定해진다.

3) Salmonella菌에 依한 遺傳적 安全性 및 抗 突然變異原性 檢討^{38, 39)}

(1) 菌株 및 菌의 性狀

① TA 98 : 이 菌株는 Salmonella typhimurium LT-2의 histidine auxotroph 중 frame shift mutant인 his D 3502를 母菌으로 해서 試藥에 對한 透過性을 높이기 위해 細胞膜의 構成成分인 lipopolysaccharide(LPS)가 缺如된 deep rough(rfa)와 repair system인 uvrB deletion을 導入

시킨 TA 1538에 感受性을 높여줄 目的으로 pla-smid인 pKM 101을 導入한 菌株이다.

② TA 100 : 이 菌株는 Salmonella typhimurium LT-2 histidine auxotroph 중 base pair substitute mutant인 his G 46을 母菌으로 해서, TA 1538과 같이 2가지 突然變異를 導入시킨 菌株 TA 1535에 plasmid인 pKM 101을 導入한 菌株이다.

使用한 菌株들의 genotype 및 mutagenic type 를 要約하면 Table 1과 같다.

Table 1. Genotype and mutagenic types of the strains (Salmonella typhimurium) used for testing mutagens.

Strains	Histidine mutation in Strains	Additional mutations in :		Mutagenic types
		LPS Repair	Introduced R-factor pKM 101	
TA 98	his D 3052	rfa ΔuvrB	+	frame shift
TA 100	his G 46	rfa ΔuvrB	+	base-pair substitution

All strains were originally derived from Salmonella typhimurium LT-2. The deletion(Δ) through uvrB also includes the nitrate reductase(ch1) and biotin(bio) genes. The rfa mutations eliminate the polysaccharide side chain of LPS that coats the bacterial surface.

(2) 培地

① Vogel-Bonner citrate medium E의 調劑

Agar 15g에 蒸溜水 1,000ml을 넣어 加溫하여 녹인 後 高壓蒸氣 滅菌하고(15Lb/in², 15min) 미리 滅菌해둔 50×VB salts 20ml 와 40% glucose 溶液 50ml를 加하여 함께 잘 섞은 後 plate를 만들었다. 또한 50×VB salts의 調劑는 MgSO₄ · 7H₂O 10g, citric acid 100g, K₂HPO₄ 500g 및 NaNH₄ HPO₄ · 4H₂O 175g을 약 45°C의 따뜻한 물에 녹인 다음 滅菌한 뒤 使用한다.

② Top agar 의 調劑

Agar 6.0g에 NaCl 5.0g을 加하여 蒸溜水 1,000 ml에 잘 녹인 後 實驗에 使用하였다. 使用時 高壓蒸氣 滅菌한 100 ml top agar 당 濾過滅菌한 0.5mM L-histidine · HCl · H₂O와 0.5mM biotin 溶液을 각각 10 ml씩 混合하여 使用하며 45℃의 恒溫水槽 中에 保管한다.

4) 突然變異原 活性 및 抑制試驗

凍結保存인 菌 懸濁液으로부터 小量의 菌을 取하여 3 ml의 nutrient broth에 接種하여 37℃에서 18時間 振蕩培養을 行해서 菌液을 얻은 다음, 이 菌을 實驗 直前까지 氷水中에 保存한다.

陰性對照群으로서는 H₂O를 使用하였으며, 陽性對照群으로서는 2-AF 및 B_{1a}P를 使用하였다. 試料溶液은 모두 使用直前에 調劑하여 使用하였다.

乾熱滅菌된 test tube를 45℃의 恒溫水槽에서 10리 20分 정도 豫熱한 뒤, 준비된 top agar를 2ml 加하여 잘 섞고 最終 24시간 培養한 菌 懸濁液을 0.1ml 加했으며, microsomal activation system을 使用할 경우에는 S-9 mixture를 加하여 거품이 일지 않도록 混合하고 준비된 Vogel-Bonner citrate medium E plate 위에 부어 培地上에 고루 퍼지게 하였다.

S-9 mixture는 그 活性이 불과 몇 초밖에 維持되지 않으므로 bacteria를 먼저 加한 後 S-9을 加해야 하며, S-9 mixture를 加하고 plate 위에 부어 고루 퍼지게 하기까지의 時間이 20초가 넘지 않도록 注意하였다.

5) S-9 mixture의 調劑^{40,41)}

S-9 mixture를 調劑하기 위해서 體重 200g 內외의 雄性 rat를 屠殺하기 4일 前부터 3일 동안 phenobarbital(50mg/kg, i.p) 및 β-naphtoflavone (80mg/kg, i.p)을 각각 注射하였고, 그 後 16시간 節食시켜 S-9 fraction을 얻었으며, rat의 盜殺 後 以下 모든 操作은 滅菌의으로 0~4℃에서 行하였

다. 먼저 腹部를 開腹한 다음, 冷却한 生理食鹽水를 肝臟에 貫流시킨 後, 肝臟을 摘出해서 가위로 저민 다음 3배량의 0.15M KCl을 加해 homogenate를 9,000×g에서 20分間 圓心分離해서, 그 supernatant를 取해 S-9 fraction으로 하였다. S-9 fraction은 菌에 處理하기 直前에 NADPH regenerating system을 包含한 S-9 mixture로 만들어졌으며, 그 混合液의 造成은 1ml 당 Table 2와 같았으며, 混合液의 부피를 맞추는 데는 滅菌蒸溜水를 使用하였다.

Table 2. Composition of S-9 mixture

Component	Quantity per ml	Volume per ml	Final concentration
S-9 fraction	300μl	300μl	30%
MgCl ₂	8 μmol	20μl	0.4M
KCl	33 μmol	20μl	1.65M
Glucose-6-phosphate	5 μmol	10μl	0.5M
NADP	4 μmol	40μl	0.1M
Sodium phosphate buffer	100 μmol	400μl	0.25M
Distilled water	210μl	210μl	

6) SOS umu test에 依한 突然變異原性 試驗^{38,42,43)}

全蝸藥鹼液의 抗 突然變異原性を 試驗하기 爲하여 本 實驗에서는 umu test kit를 使用하여 아래와 같이 測定하였다.

먼저 冷凍 保管中인 TGA(Tryptone 10g, NaCl 5g, glucose 2g, ampicillin 20μg/ml) 培養液 10.4 ml을 室溫(10~25℃)에서 溶解하여 umu test용 菌 凍結乾燥品에 넣어서 攪拌하고 10分間 정치시킨 다음, 37℃에서 3시간 培養하였다.

위의 課程동안 陽性對照物質인 AF-2 (furylfuramide, 0.9μg/ml in 10% DMSO)와 S-9 처리용 陽性對照物質인 2-AA(2-aminoanthracene, 30μg

/ml in 10% DMSO)의 3배 段階稀釋液, 陰性對照物 質인 H₂O, 그리고 濃度別 試料을 96 well plate에 10 μ l씩 分注하였다. 그리고 S-9 mixture 凍結乾燥 品에 滅菌蒸溜水 1ml을 넣고, 잘 攪拌한 後, 適定量의 菌液과 混合하여 준비한다.

준비가 完了되면 菌液을 well당 100 μ l씩 分注하고, microsomal activation system을 使用하는 경우에는 위에서 준비한 S-9 mixture를 well당 100 μ l씩 分注하여, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 培養시킨다.

그 後 37 $^{\circ}$ C에서 豫熱한 發色機質液 (O-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside 4mg/0.1M phosphate buffer pH 7.0)을 100 μ l씩 分注하고, 다시 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 培養시킨다.

培養이 完了되면 反應停止液(1M Na₂CO₃)을 100 μ l씩 加하여 反應을 終結시키고, 2~3분간 停止하여 色調를 安定시킨 다음, OD 620nm에서 吸光度를 測定한다.

結果 判定은 陰性對照에 比하여 吸光度가 2배 以上 높으면 그 檢體는 變異原性を 保有하고 있는 것으로 判定하고, 반면 陰性對照보다 吸光度가 오히려 낮을 경우에는 檢體가 菌의 生育을 阻害한 것으로 判定하였다.

7) Host-mediated assay에 依한 全蝎藥鍼液의 生體內 代謝後 抗突然變異原性 檢討⁴⁴⁻⁴⁶⁾

全蝎藥鍼液(1 \times 및 0.5 \times)을 1주 동안 1일 0.2 ml/1회 中腕穴로 投與한다. 이에 반해 對照群에서는 全蝎藥鍼液을 任意穴로 같은 用量을 投與하였다. Salmonella typhimurium TA 98 및 TA100 菌株를 agar slant로부터 小量 取해 tryptone broth에 接種한 다음 37 $^{\circ}$ C 18시간 정도 振蕩培養 한 다음 培養菌液을 주사위로 2ml 취해 雄性 마우스의 腹腔 內로 注射한다.

全蝎藥鍼液을 濃度別로 각각 調劑한 다음 0.1ml 씩 mouse의 中腕穴에 1時間 間隔으로 3회 注射하

고 마지막 注射 1時間 後에 생리식염수 1 ml를 mouse 腹腔內에 다시 注射한다. 그리고 나서 1시간 後에 마우스의 腹腔에서 菌을 같은 條件으로 일정량 回收하여 水中에 넣어놓고 回收菌 0.1 ml를 2ml top agar(0.1 μ mole histidine함유)에 加해 最少培地 위에 퍼지게 한다. 이들 培地를 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 培養시킨 後 各 plate上的 復歸突然變異(revertant)數를 計算한다.

III. 실험 성적

1. 全蝎藥鍼液의 安全性과 DNA 損傷阻 害 作用

微生物의 DNA 損傷回復 方法은 크게 나누어 excision repair와 recombination repair의 2가지의 型이 있는데 前者가 缺如된 菌을 Hcr- 변이주라 하며, 後者가 缺如된 菌을 Rec- 라고한다. 本實驗에서 使用한 高초菌(Bacillus subtilis)의 Rec-는 DNA에 損傷이 생기면 그 損傷을 收復할 수 없기 때문에 收復能을 갖는 Rec+ 에 比하여 變異原에 露出되었을 때 쉽게 죽는다.

여기서 野生菌株와 收復能 缺如株와의 致死感受性を 調査 比較함으로써 DNA損傷性 有無를 간단히 알 수 있다. Rec assay에 依한 實驗結果를 Table 3에 나타내었다. 各 濃度의 全蝎 藥鍼液을 吸着시킨 滅菌여지(직경 12mm)의 起點에서 菌이 성장한 點까지의 길이를 測定하여 Rec+ 와 Rec-菌의 阻止帶의 差異가 2.0 mm 以上일 때에 DNA損傷性이 있는 것으로 判定하였다.

그 結果 全蝎藥鍼液은 調劑한 各 濃度에서 Rec+ 및 Rec-에서 阻止帶가 나타나지 않는 것으로 봐서 本 試料로 인한 DNA損傷性은 觀察되지 않음을 알 수 있었다. 또한 全蝎 藥鍼液은 0.5 \times 의 濃度에서

Table 3. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of BMKAS by the Rec assay.

Groups	Concentration	Length of inhibition zone (mm)	
		M45(Rec-)	H15(Rec+)
Negative control(H ₂ O)		0.0±0.0	0.0±0.0
Positive control(NQO)	0.01(mg/ml)	4.3±0.2*	0.0±0.0
BMKAS	0.5 ×	0.0±0.0	0.0±0.0
	1 ×	0.0±0.0	0.0±0.0
	3 ×	0.0±0.0	0.0±0.0
	5 ×	0.0±0.0	0.0±0.0
**BMKAS	0.5 ×	3.4±0.3	0.0±0.0
	1 ×	2.3±0.2	0.0±0.0
	3 ×	1.9±0.1	0.0±0.0
	5 ×	1.2±0.1	0.0±0.0

* More than 2mm of inhibition zone. Each value represents the mean±SD of three experiments.

** BMKAS and NQO were incubated together for 5 min and the mixture was transferred to the disc.

부터 NQO에 의해 誘發되는 DNA의 損傷을 抑制시켰으며 濃度依存的으로 DNA損傷 阻害能을 增加시켰다(Fig 1).

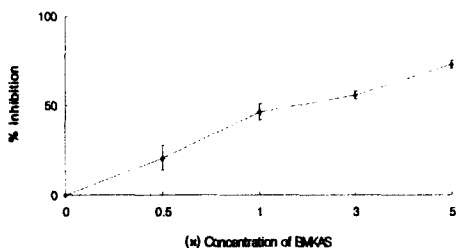


Fig. 1. Inhibitory effect of BMKAS on NQO-induced mutagenesis in Rec assay

2. 全蝎藥碱液의 遺傳的 安全性

Salmonella typhimurium TA98 및 TA100을 使用하여 全蝎藥碱液의 安全性 및 突然變異抑制作

用을 實驗한 結果를 Table 4에 나타내었다. 突然變異原性의 정량은 3개의 plate를 使用하여 얻어지는 結果를 3회 平均하여 나타내었으며, 陰性對照群에 比해서 revertant colony수가 2배 以上일 때 突然變異原性이 있는 것으로 判定하였다.

S-9 mixture를 添加하지 않았을 경우에는 陰性對照群을 H₂O로, 陽性對照群은 TA98에는 2-AF를, TA100에는 B_{1a}P을 각각 使用하였다. 調劑한 各 濃度의 全蝎藥碱液은 TA98 및 TA100을 使用한 實驗에서 revertant colony數가 各各의 陰性對照群의 水準으로 나타났으므로 突然變異原性이 없는 것으로 判定하였다(Table 4). 한편 S-9 mixture를 添加한 경우에도 Table 4에 나타낸 바와 같이 revertant colony수가 調劑한 全蝎藥碱液의 各 濃度에서 陰性對照群 程度 外에 나타나지 않으므로 全蝎藥碱液은 代謝가 된 後에도 突然變異原性이 없는 것으로 判斷되었다.

Table 4. Evaluation of mutagenicity of BMKAS by the Ames test.

Groups	Concentration	-S9 mix		+S9 mix	
		TA98	TA100	TA98	TA100
Negative Control(H ₂ O)		28	146	39	140
Positive Control(2AF)	0.1(mg/plate)	218	-	172	-
Positive Control(B _{1a} P)	10(μg/plate)	-	767	-	348
BMKAS	0.5 ×	22	142	22	127
	1 ×	27	138	34	123
	3 ×	19	153	39	145
	5 ×	42	188	40	144

3. 全蝎藥鍼液의 突然變異 抑制作用

發癌物質인 2AF 및 B[a]P이 S-9에 의해 代謝되어 誘發시키는 突然變異 活性에 미치는 全蝎藥鍼液의 效果를 Table 5 및 Table 6에 나타내었다. TA 100을 사용한 實驗에서 全蝎藥鍼液 投與로 인해 B[a]P에 의해 誘導되는 revertant colony의 수가 有意性 있게 減少하는 것으로 보아 突然變異 抑制效果가 나타남을 알았다(Table 5). 또한 TA 98을

Table 5. The antimutagenic properties of BMKAS against B [a] P in Salmonella typhimurium TA100.

Groups	Concentration (μg/plate)	Revertant colonies	Inhibition(%)
B [a] P	10	741±36	-
BMKAS	0.5 ×	663±45	10.5
	1 ×	543±33	26.7
	3 ×	441±26	40.5
	5 ×	409±29	44.8

Different concentrations of BMKAS solution were tested against the mutagenicity of B [a] P .

* The values are the means of three experiments.

Table 6. The antimutagenic properties of BMKAS against 2-AF in Salmonella typhimurium TA98

Groups	Concentration (μg/plate)	Revertants colonies	Inhibition(%)
2-AF	5	1068±143*	-
BMKAS	0.5 ×	845±120	20.9
	1 ×	635±84	40.5
	3 ×	620±96	41.9
	5 ×	587±61	45.0

Different concentrations of BMKAS solution were tested against the mutagenicity of 2-AF .

* The values are the means of three experiments.

2-AF에 의한 突然變異 誘發이 抑制됨을 觀察하였으며 이러한 抑制效果는 全蝎藥鍼液의 濃度와 比例하여 그 活性이 增加하였다(Table 6).

4. SOS umu test에 의한 突然變異原性 抑制 試驗

Salmonella typhimurium 1535/pSK 1002를 사용하여 全蝎藥鍼液의 突然變異原性を 觀察한 것이 Table 7이다.

Table 7. Evaluation of antimutagenicity of BMKAS by the SOS umu test

Groups	Concentration (μg/ml)	β-galactosidase activity(OD630nm)	
		-S9	+S9
Negative Control(H2O)		0.379	
Positive Control(AF-2)	0.3	0.875	-
Positive Control(2-AA)	3.3	-	0.339
BMKAS	0.5 ×	0.804	0.361
	1 ×	0.770	0.276
	3 ×	0.499	0.246
	5 ×	0.327	0.261

Two-fold increase in β-galactosidase activity above the control levels was defined to be positive. This represents that sample has the role of inhibition on S. typhimurium TA1535/pSK1002. Values are means for triplicate experiments.

陰性對照群(H2O)에 비해 β-galactosidase活性이 2배 이상 增加 할 때 突然變異原性이 있는 것으로 判定하였다. 陰性對照群의 β-galactosidase活性이 S-9을 添加하지 않았을 경우 0.379인데 비해 AF-2로 誘導한 酵素活性은 0.875로 2배 이상이므로 突然變異原性を 觀察할 수 있었다.

한편 全蝎藥鍼液은 實驗한 모든 濃度에서 그 活性을 低下시킴을 알 수 있었다. 한편, S-9을 添加시킨 경우에는 陰性對照群에서 0.124의 吸光度를 보였으며 2-AA를 投與한 陽性對照群의 경우에는 突然變異原性을 나타내었다. 全蝎藥鍼液을 投與한 경우에는 使用한 모든 濃度에서 AF-2 및 2AA로 인한 突然變異 活性이 나타나지 않았으며, 이는 S-9을 添加하지 않은 경우와 마찬가지로 突然變異原性이 抑制되는 것으로 判定된다.

5. Host-mediated assay에 의한 抗突然變異原性 實驗

全蝎藥鍼液의 經穴(中完穴) 投與로 發癌物質인 2-AF와 B_[a]P에 의해 誘導되는 突然變異에 對한 抑制效果를 host-mediated assay法으로 行한 結果 Table 8와 같다. 먼저 中完穴에 投與한 群에서는 全蝎藥鍼液의 각 濃度(3×, 1×)에서 2-AF 및 B_[a]P에 의해 惹起되는 mutant colony數가 점차로 줄어드는 것으로 나타났으며, 이 減少는 全蝎藥鍼液의 濃度增加와 比例하여 나타났다. 한편 對照群으로

Table 8. Evaluation of antimutagenicity of BMKAS by host-mediated assay

Groups	Concentration ($\mu\text{g}/0.1\text{ml}$)	Mutant colonies per plate*	
		TA98	TA100
H2O		42±3.5	79±8.3
2-AF	100	131±8.7	-
B _[a] P	100	-	261±11.3
BMKAS	1 ×	85±7.1	162±16.1
(CV12)	3 ×	63±2.6	138±6.8
BMKAS	1 ×	105±2.4	222±11.9
(BL)	3 ×	83±3.1	181±16.1

*Values are means±SD(standard deviation) of three experiments

任意穴에 投與한 경우에서도 mutant colony수는 줄어 들었으나, 이는 中完穴에 投與한 群에서보다 그 減少率이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 또한 全蝎藥鍼液은 그 자체는 mouse體內에서 代謝된 後에도 別다른 毒作用을 나타내지 않음을 알았으며 (data not shown), 이 경우는 Ames test에서 S9 mixture를 添加 한 경우에서의 結果와 類似하게 나타났다.

IV. 고찰

腫瘍은 組織의 自律的인 過剩의 成長을 特徵으로 하는데, 이것은 個體에 對하여 意義가 없거나 이롭지 않은 뿐더러 正常組織을 破壞하는 것으로, 크게 陽性腫瘍과 惡性腫瘍인 癌으로 나눌 수 있으며 잘 發達되어 있는 生體의 防禦機構에도 不拘하고 發生한다.⁴⁹⁻⁵¹⁾

癌은 生體內 正常細胞가 發癌物質등의 環境의 要因과, 바이러스感染 遺傳的 要因 慢性刺戟 및 突然變異 등에 依하여 어떤 過程을 거쳐 內的原因으로 誘發되는데, 사람의 發癌原因중 80~90%가 環境的 要因에 依한 것으로 알려져 있다.⁵²⁻⁵³⁾

西洋醫學에서의 癌治療方法으로는 外科的 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등이 있으나 轉移된 癌에 對한 治療의 限界와 生體損傷, 正常細胞에 對한 毒性作用, 免疫低下 등의 副作用⁵⁴⁾이 發顯되기 때문에 人體에 無害하면서도 治療效果를 向上시킬 수 있는 새로운 藥材의 開發이 必要하다.

韓醫學에서 癌, 腫瘍에 對한 記述은 殷墟의 胛骨文에서 “瘤”라 한 곳에서 처음 나타나며⁵⁵⁾ 이 後 <內經>⁵⁶⁾에서 積聚, 腸覃, 石段, 溜(瘤), 五臟之積 등에 對하여 具體的으로 言及한 以後, 歷代醫書에서 腫瘍의 位置와 病理的特性에 따라 癭瘤(石癭, 肉癭,

筋癭, 血癭, 氣癭의 五癭, 骨瘤, 胎瘤, 氣瘤, 肉瘤, 膿瘤, 血瘤의 六瘤, 陰菌(陰覃, 陰中息肉), 石疽, 失榮, 惡核, 喉疔(喉菌), 芽菌, 舌疔(舌菌), 兔脣, 缺盆疽 등으로 多樣하게 記述하고 있다

韓醫學에서의 癌에 對한 治療法으로는 朱⁵⁸⁾는 消積의 方法을 쓰되 精氣를 培養하고 清熱, 解毒, 散結 시켜야 한다고 배웠고, 張⁵⁹⁾은 精氣를 培養 하므로 積을 除去할 수 있다 하였으며, 李⁶⁰⁾는 攻伐之藥을 活用할 때에도 元氣를 損傷시키지 않는 範圍에서 使用하여야 한다.

近來의 癌 治療法은 清熱解毒, 化痰軟堅, 活血祛瘀, 行氣散結, 以毒除毒 등의 祛邪法과 健脾益氣, 健脾補腎, 益氣補血, 滋陰補陽등의 扶正法으로 大別⁶⁰⁻⁶¹⁾된다.

이와 같이 韓醫學에서의 癌治療法은 病因要素만을 除去하는 것이 아니라, 內, 外的 要因들이 體內에 나타내는 病理的 機轉에 多樣한 方法으로 對處하여 人體生理를 거스르지 않고 癌을 退治하고자 하는 特性이 있다.

따라서 最近 韓醫學의 癌治療法에 根據하여 自體 抗癌作用을 가지면서 不完全한 既存의 抗癌劑 및 放射線療法의 副作用을 減少시킴으로 抗癌效果의 上乘을 圖謀하기 爲한 韓藥制의 開發 및 藥效研究가 活潑히 進行되고 있다.

韓藥物에 對한 癌, 腫瘍治療에 있어서 金¹⁴⁾이 肝癌珠와 S-180에 對한 茵蔯의 抗腫瘍效果에 對하여 報告하였으며, 李¹⁵⁾는 Mouse腫瘍細胞後 成長抑制에 미치는 巴豆의 效果에 對하여 報告하였고, 金¹⁶⁾은 生藥의 肝癌細胞에 對한 抗腫瘍效果와 抗癌制의 上昇作用에 對하여 報告하였고, 崔¹⁷⁾는 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍과 免疫反應에 미치는 影響에 對하여 報告 하였고, 徐¹⁸⁾는 枸杞子 藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響을 報告하였으나 全蝎藥鍼液이 抗突然變異 및 抗癌效果에 미치는 影響에 對한 報告는 아직 접하지

못하였다.

藥鍼療法은 疾病과 有關한 穴位, 壓通點, 陽性反應點에 藥鍼液을 注入하여 鍼刺戟과 藥物作用을 通하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 改選시켜 疾病을 治療하는 療法이다.¹⁻⁶⁾ 즉, 經絡學說과 藥物療法의 原理를 바탕으로 精製된 藥物을 注入하여 刺針과 藥物作用을 通하여 人體의 機能을 調定하고, 疾病을 治療하는 療法으로, 藥效도 빠르고 用量이 正確하여 藥物이 胃腸에서 破壞되는 것을 防止할 수 있으며, 內服하기 힘든 患者에게 使用할 수 있는 長點이 있다.²⁹⁾

本 論文에 活用한 中完²⁵⁻²⁹⁾은 抗癌 및 免疫과 關聯된 代表的인 經穴中 하나로서⁶³⁾ 穴位는 前正中線上의 臍上4寸이고, 任脈經에 屬하여 胃의 母穴이고, 部位로서 手太陽小腸經, 手少陽三焦經, 足陽明胃經, 任脈의 會血이고, 會陽九鍼穴中的 하나로 和胃氣, 和濕滯, 利中焦, 調乘降, 關中消食하는 穴性이 있어 腸癰, 寒壁, 積聚, 蕁麻疹, 心煩, 腹滿, 闕膈, 反胃, 虛勞, 哮喘, 脾胃虛弱 等에도 活用된다.

全蝎(Buthus martensi Karsch)은 全蝎科에 屬한 全蝎의 蟲體를 乾燥한 것으로서 蝎子, 蠍子, 蠍, 蝎, 全虫 등의 異名을 가지며 氣味는 鹹, 辛, 平, 少毒하고 入肝經하여 熄風鎮痙, 舉風止痛, 解毒散結의 效能으로 驚風, 破傷風, 口眼喎斜, 高血壓症, 急性熱病, 手足痙攣, 卒中風 等を 治한다.^{19-24, 82-83)}

全蝎의 主成分은 katsutoxin(buthotoxin), buthoic acid, lecithin, taurine, trimethylamin, betaine, cholesterol 等이고 抗痙攣, 鎮靜, 降壓, 鎮痛 등의 藥理作用이 臨床의으로 認定되고 있으며, 容量으로 煎劑로는 2.4~4.5g, 研末로는 매회 0.6~0.9g을 服用하는데 全蝎은 煎劑보다는 研末로 噴服한다.⁶⁴⁻⁶⁶⁾

全蝎은 發散의 性質이 強하므로 血虛生風에는 使用치 않으며, 또 妊婦에게는 禁忌되는 藥物로 分類하는데 臨床實驗에 依하면 全蝎의 毒性成分인 buthoic acid가 子宮收縮을 促進한다고 報告되고 있다.^{67, 68, 84)}

全蝎의 修治法으로는 去尾足하여 醋炒, 鹽水炒法 등의 全蝎의 毒性을 除去하는 方法을 使用하는데, 이는 全蝎의 毒性分인 buthotoxin이 尾足에 있고, 100cc에서 30분이면 모두 破壞되는 原理를 利用한 것이다.

이에 著者は 韓藥 全蝎液이 抗 突然變異 變性的 癌細胞와 抗癌效果에 미치는 影響을 보고자 通絡止痛, 熄風止痙, 解毒散結의 效能이 있는 全蝎¹⁹⁻²⁴⁾ 藥鍼液 (*Buthus martens karsch aqua-acupuncture solution*)을 使用하여 實驗하였다.

發癌過程은 代謝 活性化된 initiator가 DNA와 不可逆的으로 結合해서 遺傳子레벨에서 障害를 일으켜 正常細胞를 潛伏性 腫瘍細胞로 誘導하는 段階와 promoter의 反復刺戟에 依해서 initiator로 誘導된 潛伏性 腫瘍細胞의 增殖을 促進시켜 腫瘍細胞의 分化 및 癌化로의 誘導를 促進하는 段階, 그리고 分化된 腫瘍細胞가 急速하게 增殖하게 되는 段階로 區分되어진다. 그러나 불행히도 發癌성을 短期間 內에 檢定할 수 있는 시스템은 없으며 따라서 發癌성을 檢定하기 위한 生物實驗은 많은 時間과 費用이 遺遙됨으로, 微生物 시스템을 利用한 突然變異原性を 測定하여 發癌성을 豫測하고 있다. 이는 大部分의 發癌性 物質이 突然變異原性を 가지기 때문에 可能하다.

Ames 等에 따르면 現在까지 全 世界에서 實驗한 發癌物質의 약 85%가 突然變異原성이 있는 것으로 나타났으며 (例, direct alkylating agent類, nitrosamine類, polycyclic aromatic hydrocarbon [PAH]類, fungal toxin類, antibiotic類 等), 또한 지금까지 人間에게 癌을 일으키는 物質로 알려진 것들도 實驗 結果 陽性反應으로 알려져 突然變異와 發癌사이의 깊은 相關성이 있음을 알 수 있다. 따라서 遺傳적 損傷에 對한 實驗으로는 微生物을 利用한 方法 中에서 *Bacillus subtilis*를 利用한 Rec assay와 *Salmonella typhimurium* histidine aux-

otroph를 利用한 Ames test, 그리고 *Salmonella typhimurium*의 umu 遺傳子(SOS 遺傳子)에 미치는 SOS umu test가 많이 使用되어지며 역시 이러한 菌에 試料添加를 並行하면 發癌物質에 依한 突然變異 및 發癌 抑制 實驗으로도 應用할 수 있다. 특히 Ames test는 1971년 California 大學의 Ames등에 依해 提唱되어 지금까지 急速的인 發展을 거듭하여 짧은 時間에 많은 物質을 檢定할 수 있으며 定量的이고 突然變異의 作用機轉까지도 判定할 수 있다. 즉, TA98은 frame shift형 突然變異를 TA100은 base pair substitution형 突然變異를 檢定하는데 特異的으로 使用된다. Rec assay는 DNA收復 缺損株(Rec-M45)를 使用하여 化學物質에 依해 DNA에 損傷을 입었을 때 그 生育이 沮止 당해 正常的인 수복능을 가진 野生菌株(Rec+H17)에 比해 그 成長이 强하게 沮止되는 原理를 利用한다. 이는 DNA의 損傷이 통상 突然變異 뿐만 아니라 細胞致死의 原因이 되기 때문이다. 한편 SOS umu test는 DNA에 損傷을 주는 物質에 依해 誘發되는 一連의 遺傳子群(SOS遺傳子群)중 突然變異에 直接 關係하는 umu遺傳子群의 發現을 β -galactosidase活性을 指標로 測定하는 方法이다.^{38, 42)}

變異原性 物質 中에는 그 自體로는 DNA에 影響을 주지는 않으나, 體內에서 代謝된 뒤에 變異原성을 가지는 것이 있다. 이와 같은 物質은 rat의 肝臟에서 調劑한 S-9을 加함으로서 代謝活性化되어 變異原성을 나타낸다. 따라서 全蝎藥鍼液에 對해서도 代謝活性化 한 것과 代謝活性化하지 않은 것을 並行해서 測定해야 評價가 可能하다. 이때 陽性物質로는, 2-aminoanthracene(2AA), 2-aminofluorene(2-AF) 및 benzo[a]pyrene (B[a]P)이 +S-9용으로 또한 furylfuramide (AF-2), 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD) 및 sodium azide (NaN₃)등이 -S-9 용으로 많이 使用되고 있다.

Host mediated assay는 微生物 및 微生物과 哺乳動物과의 組合에 依한 實驗으로 全蝎藥鍼液을 動物體內에 먼저 投與하여 놓고 發癌物質을 投與한 뒤, 代謝된 發癌物質에 依해 誘發되는 遺傳子損傷 및 突然變異原性이 全蝎藥鍼液의 前處置로 얼마나 沮害되는가에 關係 檢定하는 方法이다. Legator等에 依해 考案된 方法으로 in vivo 方法으로 가장 많이 利用하는 方法이다¹⁸⁾. 本 研究에서는 이를 약간 修整하여 현재 癌豫防 實驗의 모델 實驗으로 應用하고 있다.

이러한 實驗방법들은 突然變異原性을 測定하는 시스템으로만 使用되는 것이 아니라 抗突然變異原性 및 抗癌活性을 測定하는 시스템으로도 活用되어 지금까지 많은 研究者들에 依해 發癌抑制 物質의 스크리닝에 널리 使用되고 있다^{48, 69-71)}. 本 研究室에서도 또한 天然物 및 海洋生物에서 癌豫防 및 突然變異를 抑制하는 物質을 찾아 내어 그 抑制機轉에 關係 研究하고 있다.⁷²⁻⁷⁴⁾

이와 같이 앞에서 言及한 네가지 形態의 實驗과 아울러 앞으로 姉妹染色分體 交換法(sister chromatid exchanges, SCE), 非週期性 DNA合成法(unscheduled DNA synthesis, UDS) 및 mammalian cell point mutation法等 生食毒性에 關係 實驗도 必要할 것으로 생각된다.

V. 結 論

全蝎藥鍼液을 使用하여 發癌物質이 誘發하는 突然變異原性の 抑制와 遺傳毒性을 알아보았다. 實驗方法으로는 Bacillus subtilis을 使用한 DNA損傷性檢討(rec assay), Salmonella typhimurium을 利用한 突然變異原性實驗 (Ames test 및 SOS umu test) 그리고 생쥐에 全蝎藥鍼液을 直接 注入하여

化學物質에 依한 突然變異原性を 抑制하는 host-mediated assay法을 各各 使用하였으며 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Rec assay에서 全蝎藥鍼液은 Bacillus subtilis의 DNA에는 별다른 影響을 미치지 않았으며 NQO에 依한 DNA損傷을 抑制하였다.
2. Salmonella typhimurium TA 98 및 TA100을 利用한 突然變異原性 實驗에서도 全蝎藥鍼液은 突然變異原性を 일으키지 않았으며, 2-AF 및 B[a]P에 依한 突然變異原性を 濃度依存的으로 抑制하였다. 또한 S-9 mixture의 添加에 依해 代謝가 된 後에도 發癌物質에 依한 突然變異原性を 抑制하였다.
3. SOS umu test의 경우에서도 β-galactosidase活性을 濃度依存的으로 減少시키는 것으로 보아 全蝎藥鍼液은 AF2와 2-AA에 依해 惹起되는 突然變異原性を 抑制하였다.
4. 생쥐를 利用한 host mediated assay에서도 Ames test에서 S-9 mixture를 添加한 경우와 같이 2-AF 및 B[a]P에 依한 突然變異原性を 抑制시키는 것으로 判定되었다.

以上을 綜合해 볼 때 全蝎藥鍼液은 本 實驗에 使用한 4가지 方法에서는 遺傳毒性을 일으키지 않으며 發癌物質에 依해 誘發되는 突然變異原性を 抑制시키는 것으로 나타났다.

VI. 참 고 문 헌

1. 崔容泰 外 : 鍼灸學(上,下). 서울. 集文堂.

- 1988: pp.382~384, 730~732, 1457~1458.
2. 崔述貴 : 實用鍼灸內科學. 서울. 醫聖堂. 1993 : p.82, pp.301~307.
 3. 肅佐桃 : 鍼灸學. 香港. 湖南科學技術出版社. 1986: p.42, 183, pp.118~119.
 4. 苗彥霞 : 水鍼療法. 北京. 人民衛生出版社. 1993: pp.2~3.
 5. 賀普仁 : 鍼灸鍼法. 北京. 科學技術文獻出版社. 1989: pp.368~369.
 6. 上海中醫學院 : 鍼灸學. 香港. 商務印書館. 1982: p.144, pp.89~90, 211~213.
 7. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治. 上海. 上海科學技術出版社, 1980: pp.1~10.
 8. 李岩編 : 腫瘤臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, 1983: pp.11~26.
 9. 劉正村尤煥文 : 中醫免疫, 四川省, 重慶出版社, 1983: p.57.
 10. 張代釗 : 中西醫結合治療癌證, 山西, 山西人民出版社. 1984: pp.11~19.
 11. Mulligan RC : The basic science of gene therapy, Science, 260, 1993: pp.926~932.
 12. Culver KW, Blaese RM : Gen therapy of cancer, Trends Genetics,10, 1994: pp. 174~178.
 13. 허대석 : 癌의 遺傳子治療, 大韓韓醫師協會志. 제39권 제6호: pp.718~723.
 14. 김진웅 外 : 肝癌珠와 S-180에 對한 茵陳分割의 抗腫瘍效果.
 15. 이권익 外 : MOUSE 腫瘍細胞珠 成長抑制에 미치는 巴豆의 效果, 大韓韓醫學會 論文集, 4~1.
 16. 김성훈 外 : 生理學의 肝癌細胞에 對한 抗腫瘍效果와 抗癌劑와의 上昇作用
 17. 최종호 : 枸杞子 및 地骨皮藥鍼이 腫瘍과 免疫反應에 미치는 影響, 대전대, 1996.
 18. 서주원 : 枸杞子藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響. 대전대, 1995.
 19. 李時珍 : 本草綱目4卷. 서울. 醫聖堂. 1993: pp.2285~2288.
 20. 陸昌洙 : 韓國本草學. 서울. 改築文化社. 1981: p.423.
 21. 常敏毅 : 抗癌本草. 서울. 圖書出版 바람과 물결. 1998: pp.219~221.
 22. 申吉求 : 申氏本草學. 서울. 壽門社. 1987: pp.295~297.
 23. 中藥大事典 : pp.709~711.
 24. 李尙仁 : 本草學, pp.506~507.
 25. 楊甲三 外 : 鍼灸學. 中國. 知音出版社. 1978: pp.412~413.
 26. 金定濟 外 : 最新鍼灸學. 서울. 成輔社. 1979: p.191.
 27. 成樂箕 : 現代鍼灸學, 서울, 杏林出版, pp. 475~476, 1987.
 28. 吳齡幸 : 實用鍼灸學, 台北, 馬令出版社, pp.184~185, 1975.
 29. 崔容泰 外 : 鍼灸學(上,下), 서울, 集文堂, pp.214~234, 382~384, 730~732, 1988.
 30. Mukhtar, H. and Ahmad, N.(1999) : Contemporary issues in toxicology, cancer chemoprevention : future holds in multiple agents, Toxicol. Appl. Pharmacol. 158: 207.
 31. Primiano, T., Egner, P. A., Thomas R., Sutter, G. J., Roebuck, K. B. D. and K-ensler T. W. (1995) : Intermittent dosing with oltipraz : relationship between

- chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 55 : 4319.
32. Sharma, S., Stutzman, J. D., Kelloff, G. J. and Steele, V. E. (1994): Screening of potential chemoprevention agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* 54 : 5848.
 33. Doll, S.R. (1977) : Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 265 : 589~596.
 34. Wynder, E.L. and Gori, G.B.(1977) : Contribution of the environment to cancer incidence : An epidemiologic exercise. *J Natl Cancer Inst* 58 : 825 ~ 832.
 35. Sugimura, T.(1982) : Mutagens, carcinogens and tumor promoter in our daily food. *Cancer* 49 : 1970~1984.
 36. 錢百炎 : 中草藥注射劑, 上海, 上海科學技術出版社, 1981: pp.71~132.
 37. Kada, T., Tutikada, K. and Sadale, Y. (1972) : In vitro and host mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens; and Phloxine, A mutagenic Red dye detected. *Mutation Res* 16 : 165~174.
 38. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H. (1985) : Evaluation of the New system(umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res* 147 : 219~229.
 39. Ames, B.N., McCan, J. and Yamasaki, E. (1975) : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31 : 347~364.
 40. Maron, D.M. and Ames, B.N.(1983) : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res* 113 : 173~215.
 41. Prieto-Alamo, M.J., Jurado, J., Abrill, N., Diaz-Pohl, C. and Bolcsfoldi, Pueyo, C.(1996) : Mutational specificity of aflatoxin B1. Comparison of in vivo host mediated assay with in vitro S9 metabolic activation. *Carcinogenesis* 17 : 1997~2002.
 42. Kitagawa, Y., Akaboshi, E., Hinagawa, H., Horii, T. and Ogawa, H.(1985) : Structural analysis of the umu operon responsible for inducible mutagens in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4336~4340.
 43. Quillardet, P. and Hofmumg, M.(1985) : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutation Res* 147 : 65~78.
 44. Hellmer, L. and Bolcsfoldi, G.(1992) : An evaluation of the E. Coli K-12 uvrB/recA DNA repair host-mediated assay. *Mutation Res* 272 : 145~160.
 45. Glatt, H., Bucker, M., Platt, K.L, and Oesch, F.(1985) : Host-mediated mutagenicity experiments with benzo[a]pyrene and two of its metabolites. *Mutation Res* 156 : 163~169.
 46. Alldrick, A.J., Brennan-Craddock, W.E.,

- Lake, B.G. and Rowland, I.R.(1992) : Effect of hepatic cytochrome P-450 inducing agents on mutagen activity in the host-mediated assay. *Mutation Res* 268 : 307~314.
47. Legator, M.S. and Malling, H.V. : The host-mediated assay, a practical procedure for evaluating potential mutagenic agents in mammals. In ; A. Hollander(ed.), *Chemical Mutagens*, New York; Plenum Publishing Corp. 1971: Vol. 2, pp. 569~588.
48. Edenharter, R., Petersdorff, I.V. and Rauscher, R.(1993) : Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quionline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Res* 287 : 261~274.
49. 孫泰重 : 病理學, 서울, 高文社, 1979: pp. 227~229.
50. 서울대학교의과대학 : 종양학, 서울대학교출판부, 1989: pp. 1~3, 91~95, 126.
51. 金春元 : 病理學, 서울, 新光文化社, 1989: p. 84, 99.
52. Bridges B A. : Short-term screenibg tests for carcinogens. *Nature*, 261 : 195~200, 1976.
53. Heidelberger C. : Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 44 : 79~121, 1975.
54. 백남선 : 癌의 藥物治療, 臨床藥學, 1986; 6(1): pp.74~82.
55. 方藥中外 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學出版社, 1986: pp.621~636.
56. 洪元植 : 精校黃帝內經素問.靈樞, 서울, 東洋醫學研究院出版部, 素問, 1985: p.11, 124, 285, 靈樞 p.159, 211, 249, pp.286~287, p.317, 331.
57. 上海中醫學院 : 中醫外科學, 香港, 商務印書館, 1976; pp.302~340.
58. 朱震亨 : 丹溪心法, 中國, 五州出版社, 1963: 卷 68, p. 1.
59. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 大成文化社, 1988: p. 479.
60. 李中梓 : 醫宗必讀, 中國, 文光圖書有限公司, 1977: pp. 254~256.
61. 洪元植 : 現代中共의 癌治療法, 서울, 英文社, 1980: pp. 17~35, 81~84, 361~388.
62. 有地滋 : 現代醫學における漢方藥劑, 東京, 東洋醫學出版社, 1986: pp. 84~98.
63. 서범석 외 : 免疫과 關聯된 輸穴考察, 集文堂 (大田大韓醫學研究所), 1994; 2: 133~166.
64. 허경미 : 全蝎水鍼이 鎮痛 및 鎮痙效果에 미치는影響, 大韓韓醫學會誌, 1996; 13~1.
65. 姜秉秀 외 : 臨床配合本草學, 서울, 永林社, 1994: pp.629~630.
66. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社 pp.490~491, 1982.
67. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社. 1982: p.503.
68. 李尙仁 : 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, 1982 : pp.490~491.
69. Boone, C.W., Kelloff, G.J. and Malone, W.E (1990): Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.* 50 : 2~9.

70. Uenobe, F., Nakamura, S. and Miyazawa, M.(1997) : Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. Mutation Res 373 : 197~200
71. Kaur, S., Grover, I.S., Singh, M. and Kaur, S.(1998) : Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from Terminalia chebula in Salmonella typhimurium. Mutation Res 419 : 168~179
72. Shon, Y.H., Lee, J.S., Lee, H.W. and Nam, K.S.(1999) : Antimutagenic potential of Phellinus igniarius. J Microbiol Biotechnol 9 : 525~528.
73. Shon, Y.H., Lee, J.S., Lee, H.W., Kim, J.W., Lim, J.K., Kim, C.H. and Nam, K.S.(1999) : Antimutagenicity of Phellinus linteus in Salmonella typhimurium. The J of Microbiology 34 : 136~140.
74. Kim, S.Y., Lee, J.S., Shon, Y.H., Kim, C.H. and Nam, K.S.(1999) : Antimutagenic activity of Soybean fermented with some Basidiomycetes in the Ames /Salmonella test. Biotechnology Letter 22 : in press.
75. 채우석 : 經穴集成, 서울,大成文化史, 1995: pp.83~84, 404~405.
76. 정보서 : 鍼灸大事典, 北京, 臨床本草學,科學技術出版社, 1987: p.391, 405.
77. 上海中醫學院 : 鍼灸學, 臨床本草學,, 中國衛生出版社,1977: p.142.
78. 山西中醫學院 川津中醫學院 : 鍼灸經穴事典, 서울, 高麗醫學, 1989: pp.397~398.
79. 安榮基 : 經穴學叢書, 서울, 成輔社, 1986: pp.196~197, 694~695.
80. 上海中醫學院 : 鍼灸學, 香港, 商務印書館香港分館, 1982: pp.89~90, 144.
81. 成樂堃 : 現代鍼灸學, 서울, 杏林出版, 1987: pp.209~210, 475~476.
82. 陳貴廷 主編 : 本草綱目通譯, 北京, 學院出版社, 1992: p.1735~1736.
83. 北京市衛生局編 : 中草藥劑製技術, 北京, 化學工業出版社, 1978: pp.318~322.
84. 金井泉 外 : 臨床檢查法提要, 서울, 高文社, 1984: p.242, 298, 303, 113, 1149.