

## 加味蓼苓白朮散의 B16 흑색종 암모델에 대한 抗腫瘍效果와 免疫增強效果에 관한 研究

임철홍, 금중철, 이상재, 김광호  
경희대학교 한의과대학 예방의학교실

### The Effect of *Gamisamryungbaekchul-san*(加味蓼苓白朮散) on the Tumor and Immune Response in Mouse B16 Melanoma Tumor Model

Cheol-Hong Iem, Jong-Chul Keum, Sang-Jae Lee, Kwang-Ho Kim  
Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University.

**Background** : Gamisamryungbaekchul-san(加味蓼苓白朮散) is a herbal medicine which has been used for the traditional therapeutic agent of augmentation of the spleen and reinforcement of the Qi.

**Objective** : This study was performed to investigate the effect of Gamisamryungbaekchul-san on the tumor and immune response in the mouse B16 melanoma tumor model.

**Materials and Methods** : The tumor was induced by subcutaneous inoculation of B16BL6 melanoma cells in the shaved dorsal region of mice. Mice were orally administered with Gamisamryungbaekchul-san extract(26.3mg/mouse) for 14days after inoculation. For making examination of antitumor effect, the increase of life span, tumor growth inhibition rate, change of body weight were measured and evaluated. For the immune response increasing effect, the percentage of T lymphocyte and B Lymphocyte in the peripheral blood, the percentage of CD4+ T-cell, CD8+ T-cell and CD4+/CD8+ ratio in the peripheral blood and spleen, interleukin-2 productivity were measured and evaluated.

**Results** : Gamisamryungbaekchul-san showed 16.59% increase of life span, 31.64% tumor growth inhibition rate and increase of body weight.

Gamisamryungbaekchul-san increased the percentage of T lymphocyte in the peripheral blood, CD4+ T cell percentage of peripheral blood and spleen, and Interleukin-2 productivity as compared with the Control group. Whereas Gamisamryungbaekchul-san had no effect on the percentage of B lymphocyte in the peripheral blood, the percentage of CD8+ T cell, CD4+/CD8+ T-cell ratio in both of peripheral blood and spleen as compared with the Control group.

**Conclusion** : This study shows that Gamisamryungbaekchul-san has anti-tumor effects and immunoregulatory effects on the B16 melanoma tumor model. It is suggested that Gamisamryungbaekchul-san could be a useful immunomodulator and anti-tumor agent.

---

**Key words**: Immune response, antitumor effect, Immune response, herbal medicine, CD4+, CD8+, IL-2.

---

## 서 론

암은 사망의 주요 원인이 되는 질환으로 세계적으로 매년 증가하는 추세에 있으며 현재 암에 의한 사망률은 우리나라 死因의 1,2위<sup>14)</sup>를 차지하고 있다. 암세포는 정상세포에 비해 생명력이 강하여 암치료에 이용되는 수술요법, 방사선요법, 항암화학요법은 정상세포에 악영향을 미치고 그 부작용은 정상적인 생리기능의 저하, 특히 면역능력의 저하를 유발한다. 그래서 최근에는 악성종양의 치료에 있어 면역요법의 이용을 주목하는 경향이 있으며 이에 따라 악성종양과 면역기능과의 관계가 세포면역학적 개념에 입각한 T세포아군의 분포변화, Interleukin-2를 비롯한 여러 가지 cytokine의 생산능, 자연살해세포 활성도 등을 통해 활발히 연구되고 있다<sup>20,23,24)</sup>.

한의학에서 질병은 外邪의 侵襲, 正氣의 不足, 체내의 陰陽의 平衡 失調로 발생하며 이러한 변화는 正氣와 邪氣의 抗爭 과정으로 설명하고 있다. 《素問·刺法論》<sup>7)</sup>에 의하면 “正氣在內 邪不可干”이라 하여 正氣가 안에 있으면 疫病의 毒氣를 피할 수 있음을 말하였다. 또 《素問·評熱病論》<sup>7)</sup>에서는 “邪之所湊 其氣必虛”라 하고 《靈樞·百病始生》<sup>8)</sup>에서는 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”이라 하여 正氣의 虛弱이 질병의 발생에 근원이 되며 正氣를 邪氣에 대처하는 방어기능으로 파악하였다. 여기서 正氣, 氣는 疾病에 대한 人體의 抵抗力을 말하며 邪氣는 疾病을 일으키는 모든 발병원인을 말한다. 이는 자기와 비자기를 구분하여 자기의 완전성을 유지하려는 免疫防禦機能과 유사하여 正氣와 邪氣간의 相爭은 免疫現象과 밀접한 관계가 있다고 하겠다.

한의학에서의 종양의 범주에 드는 개념으로서 積, 聚, 癰疽, 癥瘕, 痞癥, 反胃 등이 있는데<sup>25,26)</sup> 이 치료 역시 한의학에서의 질병치료의 원칙인 扶正祛邪의 방법을 사용하며 최근의 항종

양치료에 있어 扶正과 扶正祛邪의 방법에 의한 실험적 연구가 많이 진행되고 있다.

그 예로는 김 등<sup>15,16,17)</sup>이 각각 扶正固本의 범주에 드는 補中益氣湯, 十全大補湯 등의 처방으로 실험한 결과 抗癌과 免疫增強 효과가 있음을 보고하였고, 유 등<sup>19,22)</sup>이 扶正祛邪의 범주에 드는 陽和湯, 仙方活命飲 등의 처방으로 실험한 결과 抗癌과 免疫增強 효과가 있음을 보고하였다.

蔘苓白朮散은 大病後를 調理하여 脾胃를 돕는다는 方意<sup>13)</sup>에 따르면 扶正의 治法중 健脾益氣의 처방으로서는 대표적이라 할 수 있어 면역증강 작용에 유의성이 있을 것으로 사료되나 이 처방에 관한 실험적 연구는 없었다.

이에 저자는 《醫方集解》<sup>11,12,13)</sup>에 收載된 蔘苓白朮散에 健脾益氣<sup>35)</sup>, 添精種子 驅風逐水<sup>37)</sup>의 약성을 가져서 添精種子라는 扶正의 의미와 아울러 驅風逐水라는 祛邪의 의미도 있다고 볼 수 있는 白何首烏를 가한 加味蔘苓白朮散이 抗腫瘍과 免疫增強에 유효할 것으로 기대하여 C57BL/6계 생쥐의 등부위에 B16BL6 세포주를 주입하여 B16흑색종을 유발시키고, 加味蔘苓白朮散 액기스를 14일간 경구투여한 후 항종양효과를 알아보기 위해 생존일수, 체중변화, 종양성장억제율을 측정하였고, 면역증강 효과를 알아보기 위해 말초혈액의 B세포율과 T세포율, 말초혈액과 비장에서의 CD4+ T세포율, CD8+ T세포율, 말초혈액과 비장에서의 CD4+/CD8+비율, Interleukin-2 생산능을 관찰한 바 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 實驗材料

#### (1) 動物

대한실험동물센터에서 7주령의 체중 20g 내외의 C57BL/6계 웅성 생쥐를 분양 받아 使用하였으며, 사료는 固形飼料(삼양사료, 한국)와 물을

Herbs	Scientific Name	Latin Name	Dosage
白何首烏	<i>Cynanchum wilfordii</i> HEMSELY	Cynanchi Radix	6g
人參	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY.	Ginseng Radix	6g
白朮	<i>Atractodes macrocephala</i> KOIDZ.	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	6g
白茯苓	<i>Poria cocos</i> (SCHW.) WOLF	Poria	6g
山藥	<i>Dioscorea japonica</i> THUNB	Dioscoreae Radix	6g
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	Clycyrrhizae Radix	6g
薏苡仁	<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>mayuen</i> (ROMAN.) STAPF	Coicis Semen	3g
蓮肉	<i>Nelumbo nucifera</i> GAERTN.	Nelumbo Semen	3g
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> (JACQ.) A. DC.	Platycodi Radix	3g
砂仁	<i>A. xanthioides</i> WALL.	Amomi Semen	3g
白扁豆	<i>Dolichos lablab</i> L.	Dolichi Semen	3g

충분히 供給하면서 實驗室 環境에서 2週 以上 적용시킨 후 사용하였다.

### (2) 세포주

C57BL/6계 생쥐에 흑색종을 유발시키기 위한 암세포주는 서울대학교 내 한국세포주은행에서 분양받은 B16BL6 세포주(KCLB No.80006)로서 이를 계대배양시켜 사용하였다.

### (3) 藥材

實驗에 사용한 藥材를 精選한 후 使用하였으며, 處方은 《醫方集解》에 記載된 蔘苓白朮散에 白何首烏를 가미한 것으로 處方內容과 1첩 分量은 다음과 같다.

## 2. 實驗方法

### (1) 검액의 준비

t上記한 加味蔘苓白朮散 10첩 分量을 5,000ml의 등근 플라스크에 3,000ml의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 여과포로 여과한 여액을 Rotary Vacuum Evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80℃ Deep Freezer(SANYO, Japan)에서 한시간 방치한 후 Freezer

Dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 79g의 엑기스를 얻어 사용시 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 사용하였다.

### (2) 배지의 구성

#### 1) 기본배지

RPMI 1640(GibcoBRL, USA)에 Fungizone(GibcoBRL, USA) 4ml, 10,000units/ml의 Penicillin G(GibcoBRL, USA) 0.1ml, 100mg/ml의 Streptomycin(Sigma, USA) 1ml를 증류수에 넣고 1000ml로 조정후 pH를 7.2로 맞춘 다음 0.22µm disposable sterile bottle top filter(Corning, USA)로 여과하여 사용하였다.

#### 2) 혼합배지

FBS(GibcoBRL, USA)를 56℃에서 30분간 비활성화 시킨 후 기본배지에 10%의 농도가 되도록 조정하여 사용하였으며 이는 암세포의 배양 전반에 사용되었다.

#### (3) 암세포의 배양

C57BL/6 생쥐에 흑색종을 유발시키기 위한 암세포주는 한국세포주은행에서 분양 받은 B16세포주로서, 동결상태로 분양 받아 본 실험실에서 4℃의 물에 빠르게 녹인 후 RPMI 1640

(GibcoBRL, USA) 기본배지에 2회 세척하였다. 그 후 RPMI 1640 혼합배지와 함께 세포배양용 플라스크(Falcon, USA)에 넣어 5% CO2 배양기 (Johnsam corp., Korea)에 넣어 배양하였다. 적정 밀도로 증식된 세포는 0.5% Trypsin (Gibco, USA)으로 처리 하여 단세포상태로 수거하여 RPMI 1640 기본배지로 2회 세척후에 새로운 세포배양용 플라스크에 분주시켜 배양하였다. 이때 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 혼합배지를 이용하여 2일에서 3일 간격으로 갈아주었다.

(4) 實驗動物群 分離

Normal group(정상군), Control group(대조군), SRB group(실험군)으로 구분하여, 한 군에 6마리씩 配定하였다. Normal group은 흑색종을 유발시키지 않은 군으로 固形飼料과 물만을 充分히 供給하였고, Control group은 Normal group과 同一한 環境에서 B16흑색종을 유발시키고, SRB group에 투여하는 검액과 같은 양의 생리식염수를 14일간 경구투여 하였다. SRB group은 Control group과 同一한 方法으로 B16흑색종을 유발시키고, 加味蔘苓白朮散을 14일간 경구투여 하였다.

(5) C57BL/6 생쥐에서 종양의 유도

Ershler<sup>52)</sup> 등이 사용한 방법을 수식하여 사용하였다. SRB group과 Control group의 C57BL/6 계 생쥐의 등 부위를 소독된 면도기를 이용하여 종양세포 주입 하루 전에 털을 제거하고 포비딘으로 닦아주었다. B16BL6 세포를 hemocytometer로 cell counting하여 1×10<sup>6</sup>개/0.1ml의 비율로 조정하고 멸균된 1ml syringe를 이용하여 피하에 주입하였다. 주입 후 7일경부터 종양의 유발이 육안적으로 관찰되었다.

(6) 검액의 투여

종양을 이식한 다음 이틀째 되는 날부터 加味蔘苓白朮散 엑기스를 생쥐 마리당 (20g기준) 26.3mg 씩을 증류수로 희석하여 SRB group의 흰쥐에 1일 1회 14일간 매일 오후 2시경에 경구 투여하였다. Control group은 동량의 식염수를

경구 투여하였다.

(7) 생존일수의 측정

CCCC57BL/6 생쥐를 Control group, SRB group(加味蔘苓白朮散 投與群)으로 각각 10마리씩 나누고 B16 흑색종 세포 溶液을 한 마리당 0.1ml (1.0 x 10<sup>6</sup>개/mouse)씩 이식한 뒤 24시간 후부터 Control group은 생리식염수를, SRB group은 加味蔘苓白朮散을 1일 1회 연속으로 경구 투여하면서 수명을 관찰하고 生存增加率(Increase of life span: ILS)을 구하였다.

$$ILS(\%) = \frac{T - C}{C} \times 100$$

T: mean survival days of the SRB group  
C: mean survival days of the Control group

(8) 체중의 변화 측정

C57BL/6 생쥐를 Control group, SRB group(加味蔘苓白朮散 投與群)으로 각각 10마리씩 나누고 B16 흑색종 세포 溶液을 한 마리당 0.1ml (1.0 x 10<sup>6</sup>개/mouse)씩 이식한 뒤 24시간 후부터 14일간 Control group은 생리식염수를, SRB group은 加味蔘苓白朮散을 1일 1회 연속으로 경구 투여하고 B16 흑색종 세포 이식 후 15일째에 쥐를 致死시킨 후 종양을 적출하여 종양을 제외한 생쥐의 체중을 측정하였다.

(9) 종양 성장 억제 측정

C57BL/6 생쥐를 Control group, SRB group(加味蔘苓白朮散 投與群)으로 각각 10마리씩 나누고 B16 흑색종 세포 溶液을 한 마리당 0.1ml (1.0 x 10<sup>6</sup>개/mouse)씩 이식한 뒤 24시간 후부터 14일간 Control group은 생리식염수를, SRB group은 加味蔘苓白朮散을 1일 1회 연속으로 경구 투여하고 B16 흑색종 세포 이식 후 15일째에 쥐를 致死시킨 후 종양을 적출하여 그 종양을 측정하고 腫瘍成長抑制率(tumor growth inhibition rate : TIR %)을 계산하였다.

$$TIR(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

T: mean tumor weight of the SRB group  
C: mean survival days of the Control group

### (10) 채혈

종양유도후 14일간 검액을 경구투여한 생쥐를 15일째 되는 날에 chloroform으로 마취하고 심장 천자하여 혈액을 Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt(EDTA)가 들어있는 병에 넣어 잘 섞어서 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

### (11) 비장세포의 준비

생쥐를 chloroform으로 마취시키고 복부를 70% 알코올로 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 다음, 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4℃ RPMI 1640 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI 1640이 들어있는 petri dish에서 작은 해부가위로 비장을 잘게 자르고 멸균된 유리막대로 조심스럽게 문질러 비장세포를 부유시켰다. 이 부유액을 스테인레스 철망(mesh No. 100: 청계상공사, 한국)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포덩어리를 제거하고 RPMI 1640으로 1회, HBSS(Hanks Balanced Salt Solution, Cat. No. 21250-089, GibcoBRL, USA)로 2회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10× HBSS로 2회 세척하고 RPMI 1640 배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

### (12) 말초혈액의 B세포율과 T세포율 측정

EDTA를 사용하여 응고방지한 혈액을 시험관에 100 $\mu$ l 넣었다. 여기에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)를 0.1 $\mu$ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)를 0.5  $\mu$ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 압소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS, Becton Dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 압소에 방치하였다. lysis를 확인하고 원심분리기에서

1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 PBS를 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 잘 섞은 후 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)로 분석 하였다.

### (13) 말초혈액과 비장내의 CD4+ T세포율의 변화분석

심장채혈후 EDTA 처리한 혈액과 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 부유한 비장세포를 각각 12 x 75 시험관에 100 $\mu$ l 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody를 0.1 $\mu$ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody 를 0.5  $\mu$ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 압소에 30분간 방치한 후 lysing solution 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 압소에 방치하였다. lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 PBS를 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 잘 섞은 후 flow cytometer로 분석 하였다.

### (14) 말초 혈액과 비장의 CD8+ T세포율의 변화분석

심장채혈후 EDTA 처리한 혈액과 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 부유한 비장세포를 각각 시험관에 100 $\mu$ l씩 넣었다. 여기에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody를 0.1 $\mu$ l 각각 가하고 다시 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody를 0.5  $\mu$ g 가하여 잘 섞고 압소에 30분간 방치한 후 lysing solution 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 압소에 방치하였다. lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 PBS를 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 잘 섞은 후 flow cytometer로 분석 하였다.

### (15) Interleukin-2 생산량 측정

준비된 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 RPMI

1640 혼합배지에  $1 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 재부유하고, 여기에  $100 \mu\text{g/ml}$ 농도의 Concanavalin-A(Sigma, USA)를 가한 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 Interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다. Intertest-2X kit(Endogen, USA)는 고형상 면역효소 측정법을 이용한 Mouse IL-2 측정용 ELISA Kit로서 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2양을 산정할 수 있는 방법이다. 96 well plate의 각 well에 시료를  $10 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 덮개로 덮은 후  $36^\circ\text{C}$ 에서 40분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척한후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 biotinylated polyclonal antimouse IL-2를  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 덮개로 덮은후  $37^\circ\text{C}$ 에서 40분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 streptoavidin-peroxidase를  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤 덮개로 덮은 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 25분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate towel로 습기를 제거하고 각 well에 substrate mix를  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 덮개로 덮은 후 상온에서 10분간 배양하였다. 다시 각 well에 정지용액을  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 ELISA판독기로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve 상에서 측정된 흡광도에 해당하는 IL-2의 농도를 읽었다.

### 3. 통계분석

기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균±표준오차로 요약하였으며, 먼저 ANOVA 방법에 의한 F 검정을 하여 群間의 차이가 있는지를 확인하고 ( $p < 0.05$ ), 차이를 보이는 경우 사후검정으로 Duncan 방법을 사용하여 유의수준 95 % ( $\alpha = 0.05$ )에서 다중 비교하였다.

## 실험성적

### 1. B16흑색종 생쥐의 生存期間 延長에 對한 效果

B16 세포를 C57BL/6생쥐에 이식하여 생존기간을 측정한 결과 생리식염수를 투여한 Control group의 平均生存日數는  $22.10 \pm 1.19$ 일 이었고, 加味蔘苓白朮散을 투여한 SRB group의 平均生存日數는  $25.80 \pm 1.69$ 일 이었으며 生存增加率(increase of life span: ILS %)이 16.59%로 나타났다

### 2. B16흑색종 생쥐의 腫瘍成長抑制에 對한 效果

고형종양의 성장 저지율을 측정하기 위하여 B16세포로 발암시킨 C57BL/6생쥐로부터 종양을 적출하여 중량을 측정한 결과 Control group은  $3.35 \pm 0.40$ , 加味蔘苓白朮散을 투여한 群(SRB group)은  $2.29 \pm 0.16\text{g}$ 을 나타내어 31.64%의 腫瘍成長抑制率(tumor growth inhibition rate: TIR %)을 나타내었다.

### 3. B16흑색종 생쥐의 體重變化에 對한 效果

종양주입 15일째 腫瘍을 摘出한 후 腫瘍을 除外한 體重에서 종양주입 1일째 體重을 뺀 體重變化量을 살펴 본 결과 Normal group은  $4.66 \pm 0.37\text{g}$ , Control group은  $0.69 \pm 0.26\text{g}$ , 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은  $1.70 \pm 0.18\text{g}$ 으로, 집단 간 體重變化量은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며( $F=54.162$ ,  $p=0.0001$ ), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 體重變化量은 Normal group에 비하여 有意한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 통계적으로 有意하게 높았다.

**Table 1.** Effect of Gamisamryungbaekchul-san on the Percentage of B lymphocyte & T lymphocyte in C57BL/6 Mice Peripheral Blood

Group	No. of animals	B lymphocyte in peripheral blood (%)		T lymphocyte in peripheral blood (%)	
Normal	6	42.07±2.64 <sup>a)</sup>	A <sup>b)</sup>	40.38±0.72 <sup>a)</sup>	A <sup>b)</sup>
Control	6	51.79±2.23	B	32.21±1.86	B
SRB	6	48.56±2.24	B	36.77±1.20	A

a) Mean±Standard Error. b) Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test. Control : treated with normal saline for 14 days after B16 melanoma cells transplantation. SRB : treated with Gamisamryungbaekchul-san extract (26.3mg/mouse) for 14 days after B16 melanoma cells transplantation.

**Table 2.** Effect of Gamisamryungbaekchul-san on the Percentage of CD4+ T- Cell, CD8+ T- Cell and CD4+/CD8+ Ratio in C57BL/6 Mice Peripheral Blood

Group	No. of animals	CD4+ T-cell (%)	CD8+ T-cell (%)	CD4+/CD8+ T-cell Ratio
Normal	6	23.41±1.18 <sup>a)</sup> A <sup>b)</sup>	13.86±0.86 <sup>a)</sup>	1.74±0.17 <sup>a)</sup> A <sup>b)</sup>
Control	6	16.38±1.39 B	16.13±1.26	1.06±0.15 B
SRB	6	20.54±1.08 A	15.55±1.30	1.36±0.11 B

a) Mean±Standard Error. b) Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test. Control : treated with normal saline for 14 days after B16 melanoma cells transplantation. SRB : treated with Gamisamryungbaekchul-san extract (26.3mg/mouse) for 14 days after B16 melanoma cells transplantation.

#### 4. 말초혈액내의 B 세포율에 미치는 영향

중앙주입 15일째 말초혈액의 B 세포율을 살펴본 결과 Normal group은 42.07±2.64%, Control group은 51.79±2.23%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 48.56±2.24으로, 집단 간 體重變化量은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=4.333, p=0.033, ANOVA test), 다중 비교 (Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 Control group의 B세포율은 Normal group에 비하여 有意한 증가를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로는 有意하지 않았다(Table 1).

#### 5. 말초혈액내의 T 세포율에 미치는 영향

중앙주입 15일째 말초혈액의 T 세포율을 살펴본 결과 Normal group은 40.38±0.72%, Control group은 32.21±1.82%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 36.77±1.20%으로, 집단 간 T 세포율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=9.557, p=0.002, ANOVA test), 다중 비교 (Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 Control group의 T 세포율은 Normal group에 비하여 有意한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 有意하게 증가하였다(Table 1).

6. 말초혈액내의 CD4+ T세포율에 미치는 영향

종양주입 15일째 말초혈액의 CD4+ T세포율을 살펴본 결과 Normal group은 23.41±1.18%, Control group은 16.38±1.39%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 20.54±1.08%으로, 집단 간 CD4+ T 세포율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=8.355, p=0.004, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 CD4+ T세포율은 Normal group에 비하여 有意한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 有意한 증가를 보였다(Table 2).

7. 말초혈액내의 CD8+ T세포율에 미치는 영향

종양주입 15일째 말초혈액의 CD8+ T세포율을 살펴본 결과 Normal group은 13.86±0.86%, Control group은 16.13±1.26%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 15.55±1.30%으로, 집단 간 CD8+ T세포율은 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=1.038, p=0.378, ANOVA test)(Table 2).

8. 말초혈액내의 CD4+/CD8+ 비율에 미치는 영향

종양주입 15일째 말초혈액의 CD4+/CD8+비율을 살펴본 결과 Normal group은 1.74±0.17, Control group은 1.06±0.15, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 1.36±0.11로, 집단 간 CD4+/CD8+ 비율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=5.527, p=0.016, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 CD4+/CD8+ 비율 Normal group에 비하여 有意한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으

로는 有意하지 않았다(Table 2).

9. 비장내의 CD4+ T세포율에 미치는 영향

종양주입 15일째 비장내의 CD4+ T세포율을 살펴본 결과 Normal group은 28.18±1.43%, Control group은 23.17±0.66%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 26.95±1.25%로, 집단 간 CD4+ T세포율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=5.062, p=0.021, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 CD4+ T세포율은 Normal group에 비하여 有意한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 有意한 증가를 보였다(Table 3).

10. 비장내의 CD8+ T세포율에 미치는 영향

종양주입 15일째 비장의 CD8+ T세포율을 살펴본 결과 Normal group은 17.27±1.16%, Control group은 22.13±1.13%, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 19.66±0.86%로, 집단 간 CD8+ T세포율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=5.257, p=0.019, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 CD8+ T세포율은 Normal group에 비하여 有意한 증가를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 有意하지 않았다(Table 3).

11. 비장내의 CD4+/CD8+ 비율에 미치는 영향

종양주입 15일째 비장내의 CD4+/CD8+비율을 살펴본 결과 Normal group은 1.65±0.10, Control group은 1.06±0.05, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 1.39±0.09로, 집단 간



**Table 3.** Effect of Gamisamryungbaekchul-san on the Percentage of CD4+ T- Cell, CD8+ T- Cell and CD4+/CD8+ Ratio in C57BL/6 Mice Spleen

Group	No. of animals	CD4+ T-cell (%)	CD8+ T-cell (%)	CD4+/CD8+ T-cell Ratio
Normal	6	28.13±1.43 <sup>a)</sup> A <sup>b)</sup>	17.27±1.16 <sup>a)</sup>	1.65±0.10 <sup>a)</sup> A <sup>b)</sup>
Control	6	23.17±0.66 B	22.13±1.13	1.06±0.05 B
SRB	6	26.95±1.25 A	19.66±0.86	1.39±0.09 A

a) Mean±Standard Error. b) Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test. Control : treated with normal saline for 14 days after B16 melanoma cells transplantation. SRB : treated with Gamisamryungbaekchul-san extract (26.3mg/mouse) for 14 days after B16 melanoma cells transplantation.

CD4+/CD8+ 비율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=12.439, p=0.001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 CD4+/CD8+ 비율은 Normal group에 비하여 유의한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table 3).

### 12. IL-2 生産能에 미치는 영향

종양주입 15일째 IL-2 生産能을 살펴본 결과 Normal group은 3.54±0.15ng/ml, Control group은 1.73±0.20, 加味蔘苓白朮散을 投與한 群(SRB group)은 2.58±0.23으로, 집단 간 IL-2 生産能은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=21.558 p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 Control group의 IL-2 生産能은 Normal group에 비하여 유의한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 유의한 증가를 보였다.

## 고 찰

암이란 악성종양을 지칭하는 것으로 통용되고 있으며 인체내에서 급속도로 자라 주위 조직을 고사시키고 파괴하며 다른 조직으로 전이되어

수 개월 혹은 수 년 내로 생명을 빼앗는 무서운 질환으로서<sup>6)</sup> 세계적으로 암에 의한 사망률은 해마다 증가하는 추세에 있으며, 현재 암에 의한 사망률은 우리 나라 사인의 1, 2위<sup>14)</sup>를 차지하고 있다. 암세포는 정상세포에 비해 생명력이 강하여 그 암세포를 치료하는 화학요법제인 항암제의 사용은 정상세포에 악영향을 미치고 그 부작용은 정상적인 생리기능의 저하, 특히 면역능력의 저하를 유발한다. 그래서 최근에는 악성종양의 치료에 있어 면역요법의 이용에 주목되는 경향이 있다<sup>9,10)</sup>.

질병의 발생과 진행은 한의학적 관점에서 보면 인체의 正氣와 발병인자인 邪氣의 抗爭의 과정으로 설명할 수 있다<sup>26)</sup>. 『素問·上高天眞論』<sup>7)</sup>의 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”, 『素問·刺法論』<sup>7)</sup>의 “正氣存內, 邪不可干”, 『素問·評熱病論』<sup>7)</sup>의 “邪之所湊, 其氣必虛” 등의 표현이 그것을 의미하는데, 여기서 眞氣, 正氣는 病因에 대한 抗병력을 뜻하고, 邪氣는 질병을 발생하게 하는 인자를 말한다고 볼 수 있다<sup>5,24)</sup>. 이러한 正邪의 개념은 면역학과 관련하여 正氣 자체가 면역기능을 포괄하는 개념이라 보기도 하고, 正氣의 허약정도를 면역반응 저하정도에 비교하기도 한다<sup>26)</sup>. 여기에서 한의학의 正氣를 돌우는 방법이 腫瘍治療에 응용될 가능성을 찾을 수 있다. “養正 積自除” 라는 개념은 바로 종양의 치료에

있어서 인체면역기능의 중요성을 말하는 것이다<sup>1,26)</sup>. 이러한 개념에 따른 한의학계의 실험적 연구가 많이 진행되고 있으며 그 예로는 한 등<sup>16,17)</sup>이 행한 補中益氣湯, 十全大補湯의 抗癌 및 免疫增強効果에 관한 연구가 있다.

汪 의 《醫方集解》<sup>13)</sup>에 記載된 蓼芩白朮散은 脾胃가 虛弱하여 음식이 消化되지 않고 嘔吐하거나 瀉하는 症을 치료하는데, 脾胃를 治함에는 그 虛를 補하고 그 濕을 除하고 그 滯를 行하고 그 氣를 調하고 大病後를 調理하여 脾胃를 돕는다고 하였다.

처방구성 약물을 각각 살펴보면, 人蔘<sup>35)</sup>은 大補元氣하여 惡性腫瘍, 肝癌, 胃癌 등의 치료에 쓰이며, 白朮<sup>35)</sup>은 補脾益氣, 燥濕利尿하여 肺癌, 胃癌, 象皮癌 등에 항암작용이 있으며, 茯苓<sup>35)</sup>은 滲濕利尿, 益脾和胃하여 膀胱癌, 胃癌, 腸癌 등에 항암작용이 있으며, 山藥<sup>35)</sup>은 補脾養胃, 生津益肺하여 食道癌, 乳腺癌, 肝癌 등에 항암작용이 있으며, 甘草<sup>35)</sup>는 補脾益氣, 清熱解毒하여 消化性潰瘍, 癰疽, 瘡瘍 등에 쓰인다. 또한 薏苡仁<sup>35)</sup>은 健肝滲濕, 清熱排膿하며 肺癌, 腸癌, 胃癌, 絨毛性象皮癌 등에 쓰이며 桔梗<sup>35)</sup>은 宣肺, 利咽, 祛痰, 排膿의 작용이 있으며 淋巴腺癌, 鼻咽癌, 甲狀腺癌 등에 쓰이며 砂仁<sup>35)</sup>은 行氣寬中, 溫脾止瀉하며 肝癌, 食道癌, 白血病 등에 쓰인다. 그리고 白扁豆<sup>35)</sup>는 健脾止瀉, 和胃化濕의 작용이 있어 肝癌, 腸癌, 直腸癌, 食道癌 등에 쓰인다.

이에 저자는 B16 흑색종이 피부에 근원한 종양임에 착안하여 土生金의 의미로 補脾胃하는 대표적 처방중의 하나인 蓼芩白朮散에 健脾益氣<sup>35)</sup>, 添精種子 驅風逐水<sup>37)</sup>의 약성을 가져서 添精種子라는 扶正의 의미와 아울러 驅風逐水라는 祛邪의 의미도 있다고 볼 수 있는 白何首烏를 가한 加味蓼芩白朮散이 抗腫瘍과 免疫增強에 유효할 것으로 기대되어 C57BL/6계 생쥐의 등부위에 B16BL6 세포주를 주입하여 B16흑색종을 유발시키고, 加味蓼芩白朮散 추출물을 14일간 경구투여한 후 생존일수, 체중변화, 종양성장억제율을 측

정하였고, 말초혈액의 B세포율과 T세포율, 말초혈액과 비장에서 CD4+ T세포율, CD8+ T세포율, 말초혈액과 비장에서 CD4+/CD8+비율, Interleukin-2 생산능을 관찰한 바 유의성있는 결과를 얻었기에 이를 고찰하여 보면 다음과 같다.

종양숙주의 생존기간 연장에 대한 加味蓼芩白朮散의 효과를 관찰하기 위하여 B16흑색종 세포 용액을 이식한 뒤 24시간 후부터 Control group은 생리식염수를, SRB group에는 加味蓼芩白朮散을 투여하면서 수명을 관찰한 결과, SRB group은 Control group에 비하여 16.59%의 생존 증가율(Increase of life span : ILS %)이 나타났다. 이런 결과로 볼 때 加味蓼芩白朮散은 항종양 효과를 나타냄을 알 수 있었다. B16흑색종의 종양을 측정하여 비교관찰한 결과, SRB group이 Control group에 비하여 31.64%의 腫瘍成長抑制率(Tumor Growth Inhibition Rate : TIR %)을 나타내어, 加味蓼芩白朮散이 B16흑색종의 성장을 억제하는 효과가 있음이 인정되었다. 종양숙주의 일반상태에 미치는 加味蓼芩白朮散의 효과를 관찰하기 위하여 B16흑색종이 유발된 후 14일간의 체중변화를 관찰하였는데, B16흑색종이 유발된 Control group은 Normal group에 비해 체중의 증가가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 B16흑색종의 성장으로 인하여 숙주의 일반상태가 악화되었음을 의미한다. 이에 비해 SRB group은 Control group에 비하여 체중이 유의성 있게 증가하였다. 이러한 결과로 보아, 加味蓼芩白朮散은 종양의 성장을 억제하면서도 종양숙주의 일반상태를 양호하게 유지시키는 효과가 있다고 생각한다.

加味蓼芩白朮散의 종양숙주에 대한 면역증강효과를 관찰하기 위하여 Flow cytometer을 통하여 말초혈액의 B세포율과 T세포율을 측정하였는데, Control group의 B 세포율은 Normal group에 비하여 유의한 증가를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다. T세포율은

Control group이 Normal group에 비하여 유의한 감소를 보였고, SRB group은 Control group에 비하여 유의하게 증가하였다.

각종 암환자에서 T세포는 감소하고<sup>23)</sup> B세포는 큰 변화가 없는 것으로 알려져 있는데<sup>24)</sup> 본 실험에서도 B세포에서는 큰 변화가 없었으나 T세포율은 유의하게 증가하여 면역증강 효과가 있음을 나타내었다.

말초혈액과 비장의 CD4+ T세포율은 Control group에서 Normal group에 비하여 유의하게 감소하여, 종양숙주에 있어서 CD4+ T세포율은 일반적으로 감소한다는 보고<sup>21)</sup>와 일치하였다. 보조 CD4+ 임파구는 여러종류의 싸이토카인을 생산하여 B임파구가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고, 면역반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 한다<sup>3)</sup>. 말초 CD4+ T세포율은 일반적인 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있으며<sup>21)</sup>, 각종 암환자의 CD4+ T세포율은 대체로 저하된다는 것이 일반적인 견해이다<sup>20,21)</sup>. 종양숙주는 T세포매개면역능이 저하되고 특히 CD4+ T세포를 자극하는 경로에 이상이 생겨서 충분한 사이토카인이 생성되지 않아 효과세포의 활성화가 이루어지지 않는 것이다. 종양숙주의 면역력저하는 바로 이 CD4+ T세포의 기능장애로 선택적으로 표현된다는 보고가 있고, CD4+ T세포가 직접적인 항암작용을 나타낸다는 보고도 있다<sup>2,3,24,49)</sup>. 14일간 加味蔘苓白朮散을 투여한 경우, 관찰한 말초혈액내 CD4+ T세포율은 Control group에 비해 유의한 증가를 보여주었으며 비장내의 CD4+ T세포율도 Control group에 비하여 유의한 증가를 보여 加味蔘苓白朮散이 종양숙주의 말초혈관과 비장내의 CD4+ T세포율을 증가시키는 효과가 있음을 의미한다. 이것은 加味蔘苓白朮散이 면역증강효과가 있음을 나타낸다.

B16흑색종이 유발된 말초혈액의 CD4+/CD8+ 비율에서 SRB group이 Control group에 비하여 증가하는 경향이 있었으나 유의성은 인정되지 않았으며, 비장의 CD4+/CD8+ 비율은 유의하게

증가시켰다.

보조 T세포는 면역응답의 正의 방향으로 작용하고 억제 T세포는 否의 방향으로 작용한다고 알려져 있어 CD4+/CD8+ 비율을 측정하는 것은 면역응답을 알아보는 좋은 지표로 여겨지고 있으며<sup>20,50)</sup> 실험의 결과를 놓고 볼 때 SBR group에서 Control group보다 CD4+/CD8+ 비율이 말초혈액에서 증가하는 경향이 있고 또 비장에서 유의하게 증가한 것은 면역기능을 증진시키는 효능이 있음을 나타내는 것이다.

말초혈액의 CD8+ T세포율의 통계적인 유의성은 인정되지 않았으며, 비장내의 CD8+ T세포율은 SRB group이 Control group에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 역시 통계적인 유의성은 인정되지 않았다.

IL-2은 cytokine의 일종으로 세포성 면역의 중심적 역할을 하고, 주로 활성화된 CD4+ T세포가 생산하며, 암세포를 감시하는 세포상해성 T세포와 자연살해세포를 활성화증진 및 증식시켜서 종양세포를 파괴한다고 알려져 있다. 또한 T임파구의 성장을 자극<sup>3,46,47)</sup>하는 물질이다. 종양숙주에서 IL-2 생산능은 종양의 성장과 밀접한 역상관관계에 있는 것으로 알려져 있는데<sup>24,51)</sup>, 본 실험에서도 B16흑색종이 유발된 Control group의 IL-2생산능은 저하되었다. SRB group의 IL-2생산능은 Normal group 수준에 미치지 못하였으나 Control group에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. IL-2는 활성화된 CD4+ T세포에서 분비된다는 점에서 보면, 加味蔘苓白朮散이 CD4+ T세포율을 증가시킬뿐만 아니라, CD4+ T세포의 기능을 활성화시켜 IL-2의 생산을 촉진하고 여러 가지 효과세포를 활성화시켜 항종양효과를 나타내는 것이라 볼 수 있다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면, 加味蔘苓白朮散은 B16 흑색종에 대하여 항종양효과와 면역증강효과가 있음이 인정되며, 앞으로 加味蔘苓白朮散을 종양의 예방 및 치료에 활용하기 위하여 구체적인 작용양상 및 기전에 대한 다양하고

지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결론

加味蔘苓白朮散의 B16 흑색종 암모델에 대한 抗腫瘍効果와 免疫增強効果を 관찰하기 위하여 C57BL/6계 생쥐에 B16BL6 세포주를 주입하여 B16흑색종을 유발시키고, 加味蔘苓白朮散 엑기스를 14일간 경구투여하였다. 抗腫瘍効果を 검증하기 위하여 생존일수, 체중변화, 중앙성장억제율을 측정하였고, 免疫增強효과를 검증하기 위하여 말초혈액의 B세포율과 T세포율, 말초혈액과 비장에서의 CD4+ T세포율, CD8+ T세포율, CD4+/CD8+비율, Interleukin-2 생산능을 측정하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加味蔘苓白朮散은 B16흑색종에 대하여 생존기간 연장효과(ILS 16.59%)를 나타내었다.
2. 加味蔘苓白朮散은 B16흑색종에 대하여 중앙성장 억제효과(TIR 31.64%)를 나타내었다.
3. 加味蔘苓白朮散은 중앙숙주의 체중변화를 유의(P<0.05)하게 증가시키는 효과를 나타내었다.
4. 加味蔘苓白朮散은 말초혈액내의 B림파구율의 측정에서 B림파구율의 감소를 억제하는 경향은 나타났지만 통계학적인 유의성은 인정되지 않았으며, 말초혈액내의 T림파구율의 측정에서 유의성있는 T림파구율의 감소 억제 효과가 나타났다.
5. 加味蔘苓白朮散은 말초혈액의 CD4+ T세포율을 유의하게 증가시켰으며, 말초혈액의 CD8+ T세포율의 통계적인 유의성은 인정되지 않았으며, 말초혈액의 CD4+/CD8+비율에서 SRB group이 Control group에 비하여 증가하는 경향이 있었으나 유의성은 인정되지 않았다.
6. 加味蔘苓白朮散은 비장의 CD4+ T세포율을 유의하게 증가시켰으며, 비장의 CD8+ T세포율

은 SRB group이 Control group에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았으며, 비장의 CD4+/CD8+비율은 유의하게 증가시켰다.

7. 加味蔘苓白朮散은 Interleukin-2 생산능을 유의하게 증가시키는 효과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 加味蔘苓白朮散은 B16 흑색종모델에 대한 항종양효과와 면역증강효과가 인정되었다.

## 참고문헌

1. 김광호 : 東醫豫防醫學, 경희대학교 한의과대학 예방의학교실, p.270, 1994.
2. 타다 토미오 : 면역의 의미론, 한울, 서울, pp.117-121, 1998.
3. 김광혁, 김영상 외 23인 : 細胞分子免疫學, 서울, 正門閣, pp.58-59, 1998.
4. 金永勳 : 晴崗醫鑑, 서울, 成輔社, pp.174-176, 1984.
5. 안규석, 문준진, 최승훈 : 東醫病理學, 서울, 고문사, pp.78-80, 1990.
6. 김창중 : 병태생리학, 서울, 계축문화사, pp.72-74, 1988
7. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經素問, 東洋醫學研究院 出版部, 서울, p11,124, 285, 1985
8. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經靈樞, 東洋醫學研究院 出版部, 서울, p286, 1985
9. 서울대학교 의과대학편 : 면역학, 서울대학교출판부, 서울, pp.1-3, p.7, 251, 257, 303, 307, 1993
10. 서울대학교 의과대학편 : 중앙학, 서울대학교출판부, 서울, pp.43-71, 83-88, p.138, pp.188-190, 225-234, 1993
11. 黃度淵 : 方藥合編, 南山堂, 서울, pp.147 - 148, 1987.
12. 진사문 등 : 太平惠民和劑局方, 서울, 경희한의과대학, p.115, 242, 1974
13. 王昞 : 醫方集解, 대성문화사, 서울, pp.117-124, 1984

14. 死因原因統計年報. 1980-1987 : 경제기획원 조사통계국
15. 김정현 : 補中益氣湯, 人蔘 및 黃芪 藥鍼이 免疫機能低下에 미치는 影響, 경희대의대의대학원 박사학위논문, 1999.
16. 한성규, 최승훈, 안규석 : 보중익기탕, 수점산 및 보중익기탕 합 수점산의 항암과 면역조절작용에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집 18:15. 1995.
17. 황규동, 류봉하, 박동원, 류기원:십전대보탕, 와송 및 십전대보탕가와송의항암효과와 면역반응에 관한 연구. 대한한방종양학회지 2:1. 1996.
18. 이종률, 채병윤: 3-MCA 유발 上皮腫에 대한 海藻玉壺湯과 昆布의 항종양효과와 면역반응에 미치는 영향, 동의학회지, 2(1): 1-28, 1998.
19. 유혜정, 채병윤 : 양화탕 및 양화탕가미방의 항암효과와 면역반응에 관한 실험적 연구, 경희의학 제 12권 제 3,4호 1996.
20. 정주섭, 허 윤, 김순호 : 위암환자에 있어서 말초혈의 T세포 Subset와 Natural Killer 세포에 관한 연구, 대한소화기병학회지, 24(3): 449-461, 1992.
21. 조덕연, 성인환, 이현영, 김상용, 신영대, 노홍규, 이복희 : 각종 악성 종양질환에서의 세포성 면역기능에 대한 연구, 대한내과학회잡지, 33(3): 292-300, 1987.
22. 최인화, 채병윤 : 선방활명음의 항암 및 면역반응에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집 15:341. 1992.
23. 박해심 등 : 폐암환자의 말초혈액내 T임파구의 아형 및 면역반응, 대한내과학회지, 31(2):148-154, 1986.
24. 박형주, 김금재, 하대유 : 종야마우스 비장세포와 IL-2 생산과 마이트젠으로 유도한 세포증식 반응, 대한면역학회지, 16(4):331-338, 1994.
25. 채우석 : 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지 11:54 1990.
26. 潘敏求, 黎月恒, 陳宁 編 : 中華腫瘤治療大成, 河北, 河北科學技術出版社, pp.3-8, 113-116, 179-180, 190, 908-938, 965-966, 975, 985, 1996.
27. 巢元方 : 諸病源候論校注, 北京, 人民衛生出版社, pp.856-859, 1009, 1991.
28. 施 杞 主編 : 現代中醫藥應用與研究大系 제14권 腫瘤科, 上海, 上海中醫藥大學出版社, pp.276-277, 1996.
29. 吳謙 : 醫宗金鑑, 서울, 대성문화사, pp.157-159, 199, 241, 1983.
30. 王 琦, 李炳文, 邱德文, 王庄其, 彭榮琛 編: 黃帝內經素問今釋, 서울, 정보사, pp.164, 412, 1983.
31. 王維德 : 外科證治全生集, 北京, 人民衛生出版社, pp.35-36, 1989.
32. 郁仁存, 姜延良, 于爾辛 編: 腫瘤研究, 上海, 上海科學技術出版社, p.24, 1989.
33. 郁仁存 : 中醫腫瘤學(上冊), 北京, 北京科學出版社, pp.1-10, 1983.
34. 游士勳, 張錦濤 : 實用中醫方劑學, 台北, 樂群出版事業有限公司, pp.485-487, 1983.
35. 李宇彬 主編 : 抗癌中藥藥理與應用, 黑龍江, 黑龍江科學技術出版社, p.26 ,137, 371 ,447, 898, 908, 965, 982, 1285, 1999.
36. 張民庚, 龔惠明 主編 : 抗腫瘤中藥的臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, p.163, pp.353-354, 363-364, 371-372, p.376, 1998.
37. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 의성당, p15, 1993.
38. 顏正華 : 中藥學 人民衛生出版社 , p.820, 1985.
39. 載新民: 中醫免疫學, 台北, 啓叢書局, pp.1-50, 90-92, 1985.
40. 陳實功: 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.256, 271, 1989.
41. 崔應珉: 中華名醫方薪傳, 河南, 河南醫科大學出版社, pp.31-32, 323-324, 1997.
42. Fujiwara H, Takai Y, Sakamoto K, Hamaoka T : The mechanism of tumor growth inhibition by tumor-specific Lyt-1+2- T cells, J. Immunol., 135(3): 2187-2191, 1985.