

원저

## 紅花子藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 關한 實驗的 研究

안창석\* · 권기록\* · 이선구\*\*

\*상지대학교 부속한방병원 침구과 \*\* 상지대학교 한의과대학 병리학교실

### Abstract

#### The Study on Acute and Subacute Toxicity and Sarcoma-180 Anti-cancer Effects of *Carthami Tinctorii-Fructus* Herbal-acupuncture (CF).

Chang-Suk An\* · Ki-Rok Kwon\* · Seon-Goo, Lee\*\*

\*Department of Acupuncture and Moxibustion SangJi Oriental Medicine Hospital, SangJi University

\*\*Department of Pathology College of Oriental Medicine, SangJi University

**Objective :** The purpose of this study was to investigate acute and subacute toxicity and sarcoma-180 anti-cancer effects of herbal acupuncture with *Carthami-Tinctorii fructus* (CF) in mice and rats.

**Method :** Balb/c mice were injected intraperitoneally with *Carthami-Tinctorii fructus* (CF) for LD<sub>50</sub> and acute toxicity test. Sprague - Dawley rats were injected intraperitoneally with *Carthami-Tinctorii fructus* (CF) for subacute toxicity test.

The *Carthami-Tinctorii fructus* herbal-acupuncture was injected on Chung-wan (CV12) of mice with Sarcoma-180 cancer cell line.

**Results :** 1. LD<sub>50</sub> was uncountable as none of the subjects expired during the test.

2. In acute toxicity test, toxic symptoms were not detected, but the body weight of mice was increased in treatment I, treatment II groups, compared to the normal group.(p<0.05)

3. In acute toxicity test of serum biochemical values of mice, glucose was increased in treatment I and treatment II groups, total cholesterol was increased in treatment I group, GOT was decreased in treatment II group, and GPT was decreased in treatment I group, compared to the normal group.(P<0.05)

4. The clinical signs and the body weight of mice treated with 0.1cc, 0.2cc *Carthami-Tinctorii fructus* (CF) were not affected during the subacute toxicity test.

5. In subacute toxicity test, treatment groups didn't show significant changes in complete blood count test (CBC) of rats, compared to the normal group.(P<0.05)

6. In subacute toxicity test of serum biochemical values of rats, uric acid was decreased in treatment I and treatment II groups, compared to the normal group, triglyceride was decreased in treatment I group, compared to the normal group, GOT and GPT were decreased in treatment I and treatment II groups, and alkaline phosphatase was decreased in treatment I and treatment II groups, compared to the normal group.(P<0.05)

7. Median survival time was increased in all the treatment groups for Sarcoma-180 cancer cell treated with *Carthami-Tinctorii fructus* (CF).(P<0.05)

8. Natural killer cell activity was significantly increased in all the treatment groups compared to the normal group.(P<0.05)

9. Interleukin-2 productivity was decreased in treatment I and treatment II groups.(P<0.05)

**Conclusion :** According to the results, we can conclude herbal-acupuncture of *Carthami-Tinctorii fructus* (CF) caused negligible toxicity, and had anti-tumor effects in mice.

**Key words :** *Carthami-Tinctorii fructus* (CF), Herbal-acupuncture, LD<sub>50</sub>, Acute toxicity, Subacute toxicity, Sarcoma-180 cancer cell, Natural killer cell activity, Interleukin-2 productivity.

## I. 緒 論

紅花子(*Carthami Tinctorii Fructus*)는 국화과에 속한 1년생 초과인 잇꽃(*Carthamus tinctorius L.*)의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 性味는 辛微苦溫하고 活血行瘀, 消腫散結, 解痘毒, 解毒하는 효능을 지니고 있다<sup>1)</sup>.

藥鍼療法은 鍼灸, 經穴이론과 本草이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 제조하여 經穴이나 壓痛點에 주입하여 刺鍼과 약물작용을 통하여 疾病을 치료하는 新鍼療法으로<sup>2)</sup>, 크게 經絡藥鍼, 八綱藥鍼 그리고 蜂藥鍼으로 大別할 수 있다<sup>3)</sup>.

經絡藥針은 질병과 유관한 經絡이나 反應點, 硬結點에 염전된 한약성분을 주입하여 치료효과를 높이고, 면역기능을 증진시키는 약침요법으로, 현재 CF(홍화자), JsD(호도), CC(녹용), BU(우황+웅담), BUM(우황+웅담+사향)등이 이용되고 있으며<sup>4)</sup>, 紅花子藥鍼은 經絡藥鍼 中의 대표적인 潤劑로 臨床에 多用되고 있는 藥鍼製材이다.

최근 들어 紅花子藥鍼에 관한 연구보고로 陸 등<sup>5)</sup>은 骨多孔症에 미치는 영향, 金 등<sup>6)</sup>은 鎮痛과 抗血栓效能에 관한 연구, 金 등<sup>7)</sup>은 痛風에 미치는 영향 등을 발표하였으며, 홍화자약침의 安定性和 毒性에 대한 연구는 任 등<sup>8)</sup>의 피부자극시험 및 안점막자극시험이 있었다. 또한 항암효과에 대한 여러 약침제제에 관한 연구발표가 많아지고 있으나, 아직 홍화자약침의 항암효과는 보고 되지 않았다.

이에 저자는 紅花子藥鍼液을 조제한 후, 檢液의 용량에 따른 독성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호9)에 준하여 急性 및 亞急性 毒性을 평가하였고, 또한 면역반응에 대한 연구로 복강내에 Sarcoma-180 복강암 세포를 이식하여 和胃氣, 利中焦, 調乘降, 寬中하는 中脘(CV12)<sup>9)</sup>에 紅花子藥鍼을 주입한 후, 생존율, NK cell 활성화도 및 Interleukin-2양을 측정하여 면역작용에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 동물 및 재료

#### (1) 동물

급성독성실험과 항암능 측정을 위하여 체중 25±3g 내외의 Balb/c계 웅성 mouse를 사용하였고, 아급성 독성 실험을 위하여 체중 220±30g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였다. 모든 동물은 대한실험동물센터에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 정상군, 대조군, 실험군 모두 각 10마리씩으로 실험하였다.

#### (2) 재료

##### 1) 홍화자약침(CF)의 조제<sup>9)</sup>

실험에 사용한 약침제제는 시중에서 홍화씨(*Carthami Tinctorii Fructus*)를 구입하여 지저분한 씨앗을 기류시스템에 의해 깨끗한 씨와 불필요한 찌꺼기를 분리하였다. 깨끗한 씨는 박피기에 의해 피층을 제거하고 껍질이 제거된 씨의 알맹이는 분쇄물로 분쇄하여 준비된 알맹이를 스크류 프레스에 넣어 열은 가하지 않은 상태에서 압력만 가해 기름성분을 추출하였다. 이때 거친 찌꺼기는 bin에 저장되어 버려지고, 착유된 윤제는 정치탱크에 보관하여 가라앉은 앙금은 제거한 상층액을 취하고 나서, 3일 정도 대한약침학회의 무균실에 보관하였다. 무균실에 보관된 상층액을 먼저 Whatman 여과지로 2번 1차 여과를 한 뒤, 0.45µm, 0.2µm 여과막 순으로 3차 여과하였다. 여과된 윤제를 오염되지 않게 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 산화방지를 위하여 질소가스를 충전한 다음 밀봉하여 random sampling하여 시료를 준비하였다.(Fig 1.)

##### 2) 약침기

26 gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

\* 교신저자 : 안창석, 강원도 원주시 우산동 283  
상지대학교부속한방병원 침구2과  
(Tel. 033-741-9380, E-mail : routine74hanmail.net)

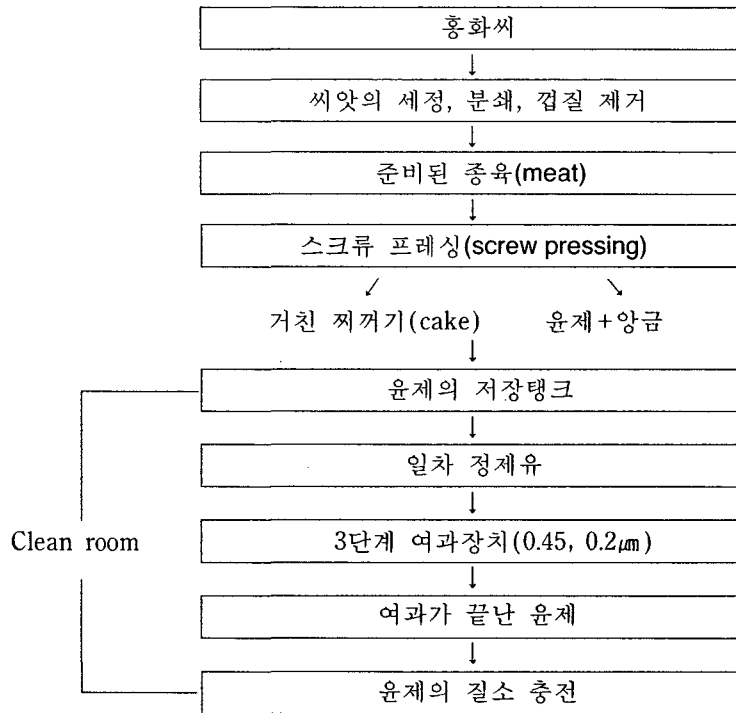


Fig. 1. Manufacturing process of Carthami Tinctorii-Fructus Herbal acupuncture (CF)

## 2. 방법

### (1) 약침의 시술

#### 1) 급성 독성실험

① LD<sub>50</sub> 측정실험을 위해 실험군을 각각 0.05cc, 0.1cc 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 복강내로 홍화자약침을 1회 주입한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였다.

② 홍화자약침의 독성반응 유무를 관찰하기 위해 실험군을 각각 0.05cc, 0.1cc 홍화자약침 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 복강내로 1회 주입한 후 1주일간 독성반응 상태를 관찰하였고, 대조군은 0.1cc의 생리식염수를 주입한 후, 1주일 동안 경과를 비교 관찰하였다.

#### 2) 아급성 독성실험

실험군을 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 Sprague-Dawley rat의 복강내로 1주일에 2회씩 총 8회 약침 시술을 하였고, 대조군의 경우 0.2cc의 생리식염수를 동일한 방법으로 시행하였다.

#### 3) Sarcoma-180 항암효과 실험

Sarcoma-180 복강암 세포를 Balb/c mouse의 복강내에 이식한 후, 2일 뒤부터 매주 2회 홍화자약침을 0.2cc씩 인체의 骨度分寸法에 준하여 中院(CV12)에 상응하는 혈위에 체표면의 털을 제거한 후 경혈탐지기(D-J3형, 이 전침기, 상해의료기)로 측정하여 총 8회 주입하였고, 대조군의 경우 동일한 방법으로 동량의 생리식염수를 주입하였다.

### (2) 암세포의 배양

#### 1) 배지의 구성

##### ① 기본배지의 준비

RPMI 1640(Gibco, U.S.A.)에 sodium bicarbonate(Shinyo-pure Chemicals Co., LTD., Japan) 2g과 fungizone(Gibco, U.S.A.) 4ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1ml, streptomycin(100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정후 pH를 7.2로 맞춘후 0.22μm disposable sterile bottle top filter(Corning, U.S.A.)로 여과하여 기본배지로 사용하였다.

② 혼합배지의 준비

FBS(fetal bovine serum, Gibco, U.S.A.)를 56°C에서 30분간 inactivation시킨 후 RPMI 1640 기본배지에 10%의 농도가 되도록 조정하여 사용하였으며(이하 혼합배지라 칭함) 이는 암세포의 배양전반에 사용되었다.

2) 암세포의 배양

Balb/c계 생쥐에 복강암을 유발시키기 위한 암 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태의 sarcoma-180 세포주를 분양받아 이를 녹인 후 혼합배지에 부유시켜 5% CO<sub>2</sub> 배양기(존샘, 한국)안에서 배양시킨후 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

3) 암세포 유발

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 대조군과 홍화자약침 투여군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다.

NK cell activity와 IL-2의 측정 경우는 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5 10<sup>6</sup>cells/ml로 조정한 후 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하고 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

3. 측정항목

(1) 급성 독성

1) LD<sub>50</sub> 측정

홍화자약침을 0.05cc로 주입한 실험군 I, 0.1cc로 주입한 실험군 II로 나누어 Balb/c mouse에 각각 주입한 후, 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다.

2) 임상관찰 및 체중측정

홍화자약침을 Balb/c mouse에 0.05cc를 주입한 실험군 I과 0.1cc를 주입한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.1cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 약침 주입 후부터 실험 종료일까지 1일 1회 mouse의 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타 독성반응 등의 상태를 관찰하였다.

체중은 실험 첫째 날과 7일째에 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다.

3) 생화학 혈청검사

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, mouse의 심장을 통하여 1cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣어, 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분간 원심분리한 뒤, 혈청을 분리하여 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase, A/G ratio, BUN/CR ratio를 측정하였다.

(2) 아급성 독성

1) 임상관찰 및 체중측정

Sprague-Dawley rat에 홍화자약침 0.1cc를 주입한 실험군 I, 0.2cc를 주입한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.2cc를 주입한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 약침 주입 후부터 실험 종료일까지 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타 독성반응 등의 상태를 총 4주간 관찰하였다.

체중은 1주일에 1회씩 저울을 이용하여 4주간 측정하였다.

2) 장기의 무게 측정

실험 종료일에 체중을 측정하고, 채혈을 한 뒤 간장, 심장, 비장, 폐장, 신장을 적출하여 저울(EB-200HU, SHIMADZU, Japan)을 이용하여 무게를 측정하였다.

3) 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle(녹십자의료공업, 한국)에 넣고, 나머지는 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000 rpm으로 5분 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

4) Complete blood count 측정

EDTA bottle에 보존한 혈액을 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)를 이용하여 WBC, RBC, Hemoglobin,

Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet를 측정하였다.

5) 생화학 혈청검사

vacutainer tube에 보존한 혈청을 Biochemical Analyser (TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase, A/G ratio, BUN/CR ratio를 측정하였다.

(3) Sarcoma-180에 대한 항암효과

1) 생존율 측정

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 실험군의 복강에  $5 \times 10^6$  cells/0.2 ml씩 주입하여 30일동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존율 계산에서 제외하였다. Geran<sup>10)</sup> 등이 기술한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X+Y}{2}$$

$$\text{생존증가율} = \frac{T-C}{C} \times 100$$

- X: 생존수가 전체동물의 1/2이 되는 최초의 시간(일)
- Y: 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(일)
- T: 실험군의 median survival time(일)
- C: 대조군의 median survival time(일)

2) 비장 세포의 준비

생쥐를 경추탈골로 치사시킨 후 복부를 알콜로 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 뒤, 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4°C 기본배지로 2회 세척한 다음 cell dissociation sieve-tissue grinder kit (Sigma, U.S.A.)로써 잘게 으갠 후 조직파편을 제거하고 기본배지로 3회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로써 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤 10×HBSS(Gibco, U.S.A.)로 2회 세척하고 기본배지로 한 번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

3) NK cell 활성화 측정

가. 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

나. 표적세포의 준비

NK 세포의 살해능 측정시의 표적세포는 한국세포주 은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1임파종 세포(KCLB 40160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 실험실에서 FBS가 10% 첨가된 혼합배지로 계대배양하여 사용하였다.

다. 세포독성의 측정

① 기본방법

세포독성실험은 Promega사의 cytotox96™ non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은 색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 가시광선영역의 파장(490nm)에서 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

② 대조 well의 준비

오차를 보정하기 위하여 5종류의 대조 well을 두었다. 표적세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 1은 최적수의 표적세포 100 μl와 배지 100 μl로 구성하였고, 표적세포의 LDH 최대방출량을 나타내는 대조 well 2는 최적수의 표적세포 100 μl와 배지 100 μl로 구성하였고, 작동세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 3은 최적수의 작동세포 100 μl와 배지 100 μl로 구성하였고, 부피를 보정하기 위한 대조 well 4는 용해용액을 첨가하여 발생하는 부피의 변화에 의한 오차를 보정하기 위한 것으로 배지 200 μl와 용해용액(10×) 20 μl로 구성하였으며 배지의 background로서 배지내 혈청이나 phenol red에 기인한 LDH의 활동능을 보정하기 위한 대조 well 5는 배지 200 μl로 구성하였다.

③ 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well microtitration plate에 well당 100 μl씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가

100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각  $5 \times 10^6$  cells/ml,  $2.5 \times 10^6$  cells/ml,  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ l를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ l/well이 되도록 한 후 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100 $\mu$ l 당 10 $\mu$ l의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료 시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$ l 옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든 후 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 $\mu$ l의 정지용액을 각 well에 넣은 후 주사기로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 실험값, 표적세포 LDH 자연방출량, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 뺐고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 뺐다. 즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{(A-B)-C}{D-C} \times 100$$

- A: Experimental - culture medium background
- B: Effect cell spontaneous LDH release - culture medium background
- C: Target cell spontaneous LDH release - culture medium background
- D: Target cell maximum LDH release - volume correction control

#### 4) Interleukin-2 생산량 측정

Sarcoma-180 세포를 Balb/c계 생쥐에 주입하고 21일째에 생쥐를 처사하여 비장을 적출하였다. 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 혼합배지에  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 채부유한 후, 여기에 concanavalin-A(Sigma, U.S.A.)를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 Interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다.

생쥐 IL-2의 생산량 측정은 Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit(R&D system, U.S.A.)를 이용하였다. Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit는 고형상 면역효소 측정법을 이용한 mouse Interleukin-2 측정용 kit로서 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2량을 산정할 수 있는 방법이다.

96 well plate의 각 well에 50 $\mu$ l의 Assay Diluent solution을 분주하고 준비된 standard, control, 실험군의 비장세포

상층액 50 $\mu$ l 첨가한 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well을 미리 준비된 Wash buffer로 5회 세척하여 물기를 깨끗이 제거하고 100 $\mu$ l의 Conjugate solution을 각 well에 분주하였다. 그 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 Wash buffer로 5회 세척하여 물기를 제거하고 100 $\mu$ l의 Substrate Solution을 각 well에 분주한 후 빛이 차단된 장소에서 실온에서 30분간 배양하였다. 그 후 100 $\mu$ l의 Stop Solution을 각 well에 분주한 후 ELISA 판독기(Emax, Molecular device, U.S.A)로 450nm 파장에서 흡광도를 읽었다. 이 때 흡광도의 교정을 위하여 540nm에서 한번 더 읽었다.

#### 4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS(Release 10.0.7)를 이용하였으며, student's T-test를 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

### III. 結 果

#### 1. 급성 독성

##### (1) LD<sub>50</sub> 측정

LD<sub>50</sub>을 측정하기 위하여 실험군을 각각 0.05cc, 0.1cc 주입군으로 나누어 Balb/c mouse의 복강내로 홍화자약침을 1회 주입한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였으나, 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD<sub>50</sub>은 산출할 수 없었다.(Table 1.)

##### (2) 임상관찰

급성 독성실험에서 홍화자약침을 주입한 후, 7일간 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들은 관찰되지 않았다.(Table 2, 3.) 간조직의 손상유무를 알아보기 위하여 조직검사를 시행한 결과 홍화자약침 투여군이 대조군과 비교하여 변화를 나타내지 않았다.(Fig. 2, 3, 4, 5)

Table 1. Mortality of mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF).

Group	Hours after treatment								Final Mortality
	1	12	24	48	72	96	120	144	
Normal (10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Control (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Treat I (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Treat II (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

\* : Number of Animal

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.05cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Table 2. Clinical findings in mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.05cc in acute toxicity test

Clinical observation	Hours after treatment								
	1	12	24	48	72	96	120	144	
Tachypnea (10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

### (3) 체중측정

급성 독성실험에서 홍화자약침을 0.05cc, 0.1cc를 주입한 실험군들과 생리식염수 0.1cc를 주입한 대조군의 체중 변화는 정상군에 비해 실험군 모두 유의한 체중 증가를 나타내었으나, 대조군에 비해서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 4.)

### (4) 생화학 혈청검사

급성 독성실험의 생화학 혈청검사를 시행한 결과

BUN은 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 정상군과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. Creatinine은 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 감소를 나타내었고, Uric acid는 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 증가를 나타내었다. Glucose는 정상군에 비하여 실험군 모두가 유의한 증가를 나타내었으나, 대조군과는 유의한 차이를 나타내지 않았고, Total cholesterol은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. GOT는 실험군 I에서, GPT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. (Table 5.)

Table 3. Clinical findings in mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.1cc in acute toxicity test.

Clinical observation	Hours after treatment								
	1	12	24	48	72	96	120	144	
Tachypnea (10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

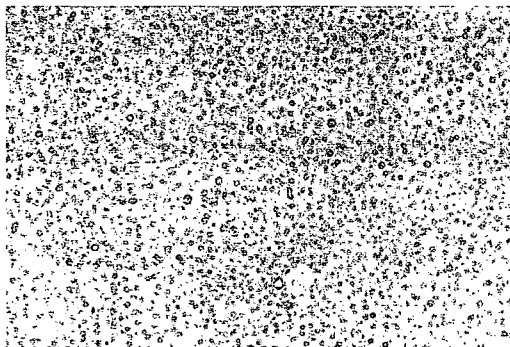


Fig. 2. The liver cells in mice treated with normal saline × 200

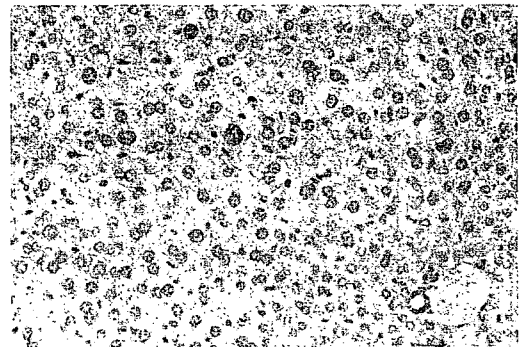


Fig. 3. The liver cells in mice treated with normal saline × 400

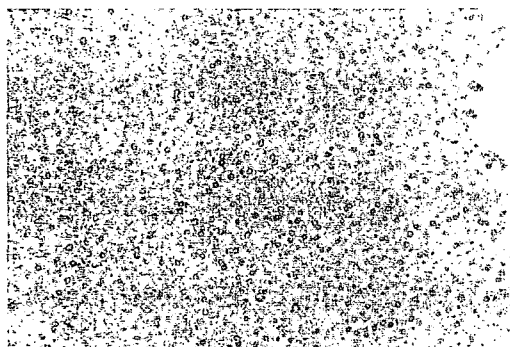


Fig. 4. The liver cells in mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.1cc × 200

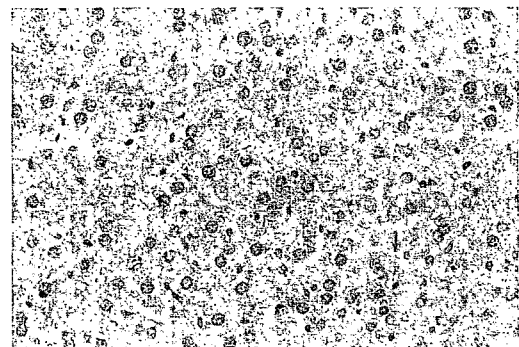


Fig. 5. The liver cells in mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.1cc × 400



Table 4. Body weight of mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in acute toxicity test.(unit : g)

Group	day1	day7
Normal	25.59 ± 1.35	28.84 ± 2.52
Control	26.89 ± 1.78	29.01 ± 3.64
Treat I	26.03 ± 1.53	31.41 ± 0.97 <sup>a</sup>
Treat II	26.83 ± 1.30	31.16 ± 1.67 <sup>a</sup>

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.05cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Table 5. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in acute toxicity test.

CBC	Group	Normal	Control	Treat I	Treat II
Total protein (g/dl)		5.22 ± 0.60	5.09 ± 0.37	5.13 ± 0.44	4.96 ± 0.12
Albumin (g/dl)		2.99 ± 0.15	3.05 ± 0.21	3.02 ± 0.25	6.39 ± 9.66
BUN (mg/dl)		29.61 ± 8.64	33.42 ± 1.92	28.14 ± 6.25 <sup>b</sup>	28.58 ± 2.56 <sup>b</sup>
Creatinine (mg/dl)		0.60 ± 0.35	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.35
Uric Acid (mg/dl)		5.35 ± 3.65	3.53 ± 0.93	4.36 ± 0.81 <sup>b</sup>	3.91 ± 0.82
Glucose (mg/dl)		199.50 ± 34.19	239.44 ± 38.64	254.71 ± 38.63 <sup>a</sup>	243.75 ± 36.98 <sup>a</sup>
Triglyceride (mg/dl)		193.63 ± 73.13	172.33 ± 96.37	240.57 ± 73.08	189.00 ± 36.70
Total cholesterol (mg/dl)		108.75 ± 22.08	113.11 ± 24.89	142.71 ± 23.46 <sup>ab</sup>	122.75 ± 13.63
GOT (U/L)		96.13 ± 40.49	78.33 ± 27.67	58.00 ± 20.99 <sup>a</sup>	80.75 ± 27.98
GPT (U/L)		30.00 ± 5.73	28.00 ± 7.28	26.41 ± 9.67	23.75 ± 5.90 <sup>a</sup>
Alkaline phosphatase (U/L)		205.38 ± 72.83	242.89 ± 37.64	222.14 ± 85.80	207.25 ± 77.24
A/G ratio		1.46 ± 0.07	1.49 ± 0.06	1.44 ± 0.11	1.51 ± 0.10
BUN/CR		57.46 ± 16.33	62.08 ± 5.08	61.60 ± 9.13	61.71 ± 5.52

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.05cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

2. 아급성 독성

(2) 체중변화

(1) 임상 관찰

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험에서, 홍화자약침을 주입하고 관찰한 결과 주요 중독증상들은 관찰되지 않았다.(Table 6, 7.)

아급성 독성실험에서 각 군의 체중 변화는 실험군 II에서 홍화자약침 주입후 21일째에 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나, 정상군과는 별다른 차이를 나타내지 않았다.(Table 8.)

Table 6. Clinical findings rats treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.1cc in subacute toxicity test.

Clinical observation		Days after treatment								
		1	4	7	11	14	18	21	25	28
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 7. Clinical findings rats treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) 0.2cc in subacute toxicity test.

Clinical observation		Days after treatment								
		1	4	7	11	14	18	21	25	28
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 8. Body weight of rats treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in subacute toxicity test.(unit : g)

Group	day7	day14	day21	day28
Normal	200.44 ± 9.36	256.92 ± 10.32	280.95 ± 34.68	320.62 ± 15.02
Control	213.61 ± 6.74	253.32 ± 7.02	277.63 ± 29.99	310.15 ± 9.56
Treat I	254.98 ± 8.21	214.88 ± 8.46	291.99 ± 7.80	318.46 ± 9.58
Treat II	214.39 ± 9.89	256.03 ± 8.84	292.82 ± 9.94 <sup>b</sup>	324.00 ± 10.14

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

(3) 장기의 무게 측정

아급성 독성실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정된 결과 실험군 모두 정상군이나 대조군에 비하여 간, 심장, 비장, 폐, 그리고 신장의 무게에 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 9.)

(4) Complete blood count

아급성 독성실험에서 CBC를 측정된 결과 HCT에서는 대조군에 비하여 실험군 II가 유의한 감소를 나타내었으나 정상군과는 차이를 나타내지 않았다. MCHC에서는 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나 정상군과는 차이를 나타내지 않았다. (Table 10.)

Table 9. Absolute and relative organ weights in rats treated intraperitoneally with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in subacute toxicity test.(unit : g)

Group	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
Normal	3.99 ± 0.18	0.37 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.70 ± 0.03
Control	3.92 ± 0.33	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.52	0.42 ± 0.02	0.69 ± 0.05
Treat I	3.83 ± 0.26	0.35 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.70 ± 0.05
Treat II	3.87 ± 0.20	0.35 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.69 ± 0.04

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

Table 10. Complete blood count values in mice treated intraperitoneally with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
WBC (x10 <sup>9</sup> /μl)	8.32 ± 1.62	7.01 ± 1.60	7.42 ± 2.33	7.48 ± 2.16
RBC (x10 <sup>6</sup> /μl)	7.46 ± 0.28	7.66 ± 0.29	7.65 ± 0.19	7.44 ± 0.16
HGB (g/dl)	14.80 ± 0.33	15.03 ± 0.42	15.04 ± 0.57	14.79 ± 0.24
HCT (%)	45.52 ± 1.19	47.60 ± 1.36 <sup>a</sup>	46.63 ± 1.59	45.90 ± 1.22 <sup>b</sup>
MCV (fL)	61.10 ± 2.48	62.21 ± 1.55	60.91 ± 1.61	55.00 ± 19.36
MCH (pg)	19.85 ± 0.69	19.65 ± 0.56	19.63 ± 0.59	19.88 ± 0.49
MCHC (g/dl)	32.53 ± 0.59	31.58 ± 0.42 <sup>a</sup>	32.25 ± 0.38 <sup>b</sup>	32.23 ± 0.67 <sup>b</sup>
PLT (x10 <sup>9</sup> /μl)	1040.00 ± 75.51	1082.67 ± 89.11	1050.82 ± 114.34	1031.44 ± 65.53

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

RBC : Red blood cell

WBC : White blood cell

MCV : Mean corpuscular volume

MCH : Mean corpuscular hemoglobin

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration

### (5) 생화학 혈청검사

아급성 독성실험의 생화학 혈청검사를 측정된 결과는 아래와 같다. (Table 11.) Uric acid가 실험군 모두에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, Triglyceride가 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. GOT에서 실험군 I은 정상군과 대조군에 비해, 실험군 II는 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, GPT는 실험군 모두에서 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. Alkaline phosphatase는 실험군 모두에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.

### 3. Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험

#### (1) 생존율 측정

Median survival time은 대조군은 25일, treat-1군은 31일, treat-2군은 30일을 보여 주어 생존율은 각각 treat-1군이 24%, treat-2군이 20% 증가하였다.(Fig. 6)

### (2) NK cell 활성도 측정

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 정상군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때 44.74±2.73, 50:1일 때 41.89±5.48, 10:1일 때 40.80±6.06를 나타내었으며, 대조군의 경우 100:1일 때 46.87±8.35, 50:1일 때 44.38±6.05, 10:1일 때 44.95±10.91을 나타내었다. 실험군 I의 경우 100:1일 때 44.91±9.00, 50:1일 때 51.66±11.01, 10:1일 때 42.28±9.75를 나타냈으며, 실험군 II의 경우 100:1일 때 44.63±5.90, 50:1일 때 41.24±4.42, 10:1일 때 52.26±8.52를 나타내었다.(Table 12, Fig 7.)

실험군 I에서는 작동세포와 표적세포의 비율이 50:1일 때 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었고, 10:1일 때는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. 실험군 II에서는 작동세포와 표적세포의 비율이 10:1일 때 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. (p<0.05)

Table 11. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
Total protein (g/dl)	6.21 ± 0.25	6.26 ± 0.19	6.24 ± 0.22	6.32 ± 0.18
Albumin (g/dl)	3.71 ± 0.25	3.90 ± 0.15	3.86 ± 0.13	3.87 ± 0.13
BUN (mg/dl)	26.18 ± 3.77	23.23 ± 1.66	23.35 ± 3.27	23.87 ± 2.27
Creatinine (mg/dl)	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.08	0.61 ± 0.03
Uric Acid (mg/dl)	2.37 ± 0.18	2.49 ± 0.34	1.64 ± 0.37 <sup>ab</sup>	1.62 ± 0.71 <sup>ab</sup>
Glucose (mg/dl)	234.00 ± 56.57	201.25 ± 30.84	217.91 ± 14.08	213.11 ± 17.03
Triglyceride (mg/dl)	106.83 ± 23.33	81.83 ± 28.52	86.09 ± 19.94	72.22 ± 24.31 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	92.50 ± 11.79	83.50 ± 8.46	87.73 ± 8.83	86.00 ± 13.17
GOT (U/L)	121.00 ± 14.17	135.25 ± 20.23	102.91 ± 17.63 <sup>ab</sup>	96.49 ± 38.04 <sup>b</sup>
GPT (U/L)	58.00 ± 7.90	54.75 ± 3.96	47.82 ± 4.29 <sup>ab</sup>	48.78 ± 4.97 <sup>ab</sup>
Alkaline phosphatase (U/L)	550.17 ± 44.01	557.50 ± 71.09	490.27 ± 71.91 <sup>a</sup>	493.78 ± 62.53 <sup>a</sup>
A/G ratio	1.58 ± 0.10	1.66 ± 0.09	1.63 ± 0.08	1.58 ± 0.10
BUN/CR	40.27 ± 3.54	37.02 ± 2.39	38.52 ± 6.50	39.20 ± 2.34

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

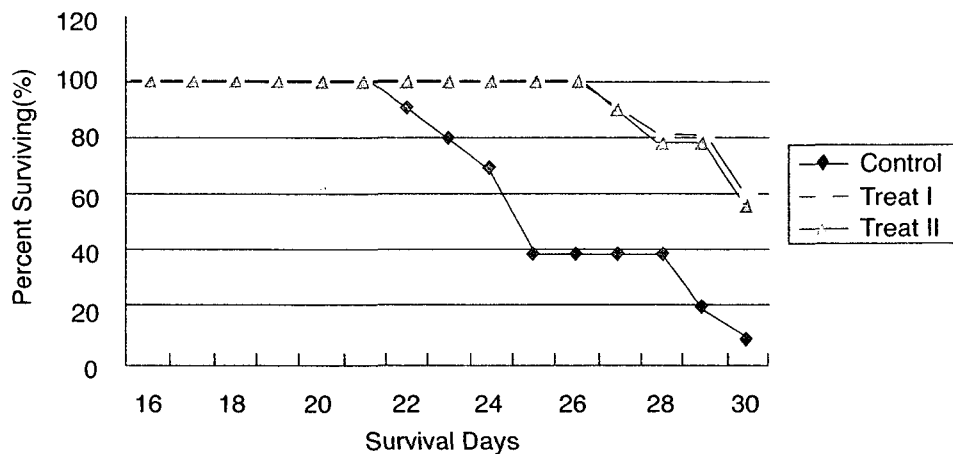


Fig. 6. Median survival time of mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) in vivo.

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

Table 12. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) according to E/T ratio.

Group	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	44.74 ± 2.73
	50:1	41.89 ± 5.48
	10:1	40.80 ± 6.06
Control	100:1	46.87 ± 8.35
	50:1	44.38 ± 6.05
	10:1	44.95 ± 10.91
Treat I	100:1	44.91 ± 9.00
	50:1	51.66 ± 11.01 <sup>ab</sup>
	10:1	42.28 ± 9.75 <sup>b</sup>
Treat II	100:1	44.63 ± 5.90
	50:1	41.24 ± 4.42
	10:1	52.26 ± 8.52 <sup>ab</sup>

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

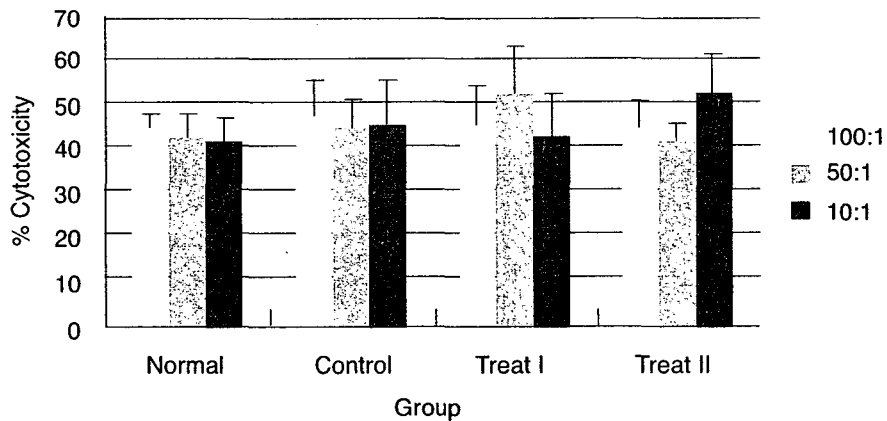


Fig. 7. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) according to E/T ratio.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal- acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal- acupuncture (CF) (0.2cc)

(3) Interleukin-2 양 측정

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 21일 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정한 결과 정상군은  $272.35 \pm 27.16$  pg/ml, 대조군은  $233.54 \pm 16.25$  pg/ml, 실험군 I은  $123.82 \pm 6.12$  pg/ml을 나타냈으며, 실험군 II에서는  $162.41 \pm 14.74$  pg/ml로, 실험군 I, II에서 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.(Table 13, Fig 8)

IV. 考 察

紅花子는(*Carthami Tinctorii Fructus*)는 菊花科에 속하는 잇꽃의 종자로, 종자가 성숙한 여름철에 채취하여 햇볕에 건조하여 사용한다. 성분은 linoleic acid와 oleic acid의 glyceride가 주성분인 20~30%의 脂肪油와 serotonin, serotonin conjugate, serotobenin으로 밝혀져 있다. 性은 溫하고 味는 甘하며, 心脾 二經에 歸經한다. 活血祛瘀, 解毒, 通絡止痛의 效能이 있어 瘀血腹痛, 動脈硬化症, 産後瘀血腹痛, 腦血栓등에 활용하며 최근에는 骨

Table 13. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF).

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	$272.35 \pm 27.16$
Control	$233.54 \pm 16.25^a$
Treat I	$123.82 \pm 6.12^{ab}$
Treat II	$162.41 \pm 14.74^{ab}$

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF) (0.2cc)

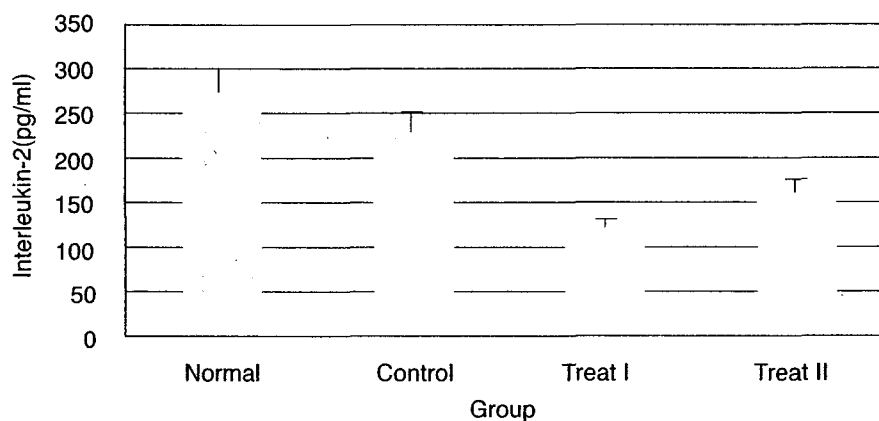


Fig. 8. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal-acupuncture (CF).

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.2cc)

Treat I : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal- acupuncture (CF) (0.1cc)

Treat II : treated with Carthami Tinctorii Fructus Herbal- acupuncture (CF) (0.2cc)

에 미치는 영향에 관한 연구들이 많이 발표되고 있다<sup>1)</sup>.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의거하여 한약재를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하여 刺針과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法<sup>10)</sup>이다.

현재 藥鍼療法은 크게 經絡藥鍼, 八綱藥鍼 그리고 蜂藥鍼으로 大別할 수 있으며<sup>3)</sup>, 紅花子藥鍼은 經絡藥鍼中의 대표적인 潤劑로 關節疾患과 각종 筋骨格系疾患에 多用되고 있는 藥鍼製材이다<sup>3)</sup>.

최근에 들어 紅花子藥鍼에 관한 연구보고로 육 등<sup>5)</sup>은 骨多孔隙에 미치는 영향, 김 등<sup>6)</sup>은 鎮痛과 抗血栓효능에 관한 연구, 김 등<sup>7)</sup>은 痛風에 미치는 영향 등을 발표하였으며, 紅花子藥鍼의 安定성과 毒性에 대한 연구는 임 등<sup>8)</sup>의 피부자극시험 및 안점막자극시험이 있었다.

이와 같이 홍화자약침은 실험적 연구에서 여러 효능들이 보고되고 있으나, 약침액의 안정성에 대한 연구가 미진하였으며, 또한 임상에서도 많이 활용되고 있는 만큼 안정성에 대한 검토가 필요하다.

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다<sup>11)</sup>. 약침요법이 임상적으로 먼저 연구가 되어 한의학계에서 많이 사용되고 있지만, 서양의학에서의 주사제제와 유사한 치료법이므로 이에 '의약품 독성시험 기준'<sup>12)</sup> 등에 의거하여 홍화자약침의 안정성 실험을 시행하였다.

독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로, 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아급성 독성실험(1개월 반복투여 독성시험), 그리고 만성 독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나누는데, 본 실험에서는 급성 독성실험과 아급성 독성실험을 시행하였다.

급성 독성실험에서는 LD<sub>50</sub>(반수치사량 측정)과 최대 내용량 측정을 위해 실험군을 각각 0.05cc, 0.1cc로 나누었으며, 대조군은 생리식염수 0.1cc를 복강내에 주입하였다. 이들 각각을 mouse의 복강 내에 주입한 후 초기 6시간동안에는 매시간 관찰하고, 그후 1주일간은 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타증상들을 관찰하였다. 체중은 CF투여 직전과 1주일 후에 측정하였고, 관찰기간 종료 후, 에테르로 마취하고 경추탈골로 치사시킨 후 내부장기를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 그 결과 실험군

모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD<sub>50</sub>의 측정이 불가능하였으며, 기타 관찰에서도 급성 독성에 대한 중독 증상은 나타나지 않았다. 체중의 변화는 실험군 I, II가 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.(Table 4.) 생화학 혈청검사를 시행한 결과, BUN은 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 정상군과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. Creatinine은 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 감소를 나타내었고, Uric acid는 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 증가를 나타내었다. Glucose는 정상군에 비하여 실험군 모두가 유의한 증가를 나타내었으나, 대조군과는 유의한 차이를 나타내지 않았고, Total cholesterol은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. GOT는 실험군 I에서, GPT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.(Table 5.) 이상과 같이 급성 독성실험에서 임상관찰과 간조직 검사 등에서 독성반응이 나타나지 않았으며, 혈액학적 검사에서도 큰 독성이 없는 것으로 나타났다. Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험은 매주 2회씩 4주에 걸쳐서 홍화자약침을 0.1cc를 복강 내로 주입한 실험군 I과 0.2cc를 투여한 실험군 II, 그리고, 생리식염수 0.2cc를 주입한 대조군으로 나누었으며, 1일 1회씩 급성 독성실험에서와 마찬가지로 Rat를 관찰하였다. 그 결과 중독 증상은 나타나지 않았으며 사망한 개체도 존재하지 않았다. 또 체중측정에서는 21일째 실험군 II가 대조군에 비하여 약간 유의한 증가를 나타내었고,(Table 8.) 또한 실험 종료 후 회복 하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과, 모든 실험군에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.(Table 9.) 아급성 독성실험에서 CBC를 측정한 결과 MCHC에서 실험군 모두 대조군에 비하여 감소하였으나, 실험군 모두에서 정상군에 비하여 유의성 있는 변화가 관찰된 항목은 없었다.(Table 10.) 또한 생화학 혈청검사 중 Uric acid가 실험군 모두에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, Triglyceride가 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었으며, GOT와 GPT는 실험군 모두에서 유의한 감소를 나타내었고, Alkaline phosphatase 역시 실험군 모두에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.(Table 11.) 급성 독성과 마찬가지로 아급성 독성실험에서도 임상관찰과 혈액학적 검사에서 큰 독성이 없는 것으로 나타났다.

홍화자약침의 급성 및 아급성 독성실험을 한 결과,



mouse와 rat에 있어 임상관찰과 내부장기의 육안적 관찰에서는 독성 반응이 발견되지 않았으나, 혈청검사 상 Uric acid의 감소와 GOT, GPT의 감소 등 약간의 이상이 나타나 홍화자약침의 혈액학적 영향이나 구체적인 기전에 대하여는 앞으로 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 보이며, 이와 같은 실험결과를 종합해 볼 때 비교적 안전한 약침제재라고 할 수 있겠다.

최근 생활상의 변화로 질병에서도 각종 성인병과 중앙질환이 증가되고 있는 추세이다. 이러한 추세는 앞으로도 인구구조의 노령화, 식생활습관의 변화, 흡연율의 증가 및 스트레스 등으로 더욱 심화될 것으로 전망된다<sup>3)</sup>.

서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의되어 있다<sup>4)</sup>. 암의 발생은 여러 가지 요인과 원인에 의해서 일어나는데 대표적인 원인으로서는 전리방사선, 담배, 음주 약물 및 식이요인이 있으며, 이러한 요인을 바탕으로 발암원에 자극된 세포가 암으로 발전하게 되는 것이다<sup>5)</sup>. 서양의학의 종양에 대한 치료법은 예방적인 면에서 일차예방으로 생활습관의 개선, 화학예방이며, 이차예방은 조기 진단을 들 수 있다<sup>6)</sup>. 癌의 治療를 위해 외과적 수술요법은 轉移腫瘍의 治療에서 불가능하다는 한계점이 있고<sup>7)</sup>, 放射線療法은 국소적 浸潤性 腫瘍의 治療에는 유효하나 轉移腫瘍의 治療에 대한 制限性, 照射量의 증가에 따른 정상조직의 손상과 합병증 증가와 같은 단점이 있으며<sup>8,9)</sup>, 化學療法은 全身的 轉移에 활용되나 化學製劑의 腫瘍에 대한 선택성, 정상 세포에 대한 毒性作用 등으로 인해 발생하는 부작용과 합병증이 나타나고 있고<sup>10,11)</sup>, 免疫療法은 기존의 수술, 방사선 및 화학요법의 한계를 극복할 수 있는 방법으로 일부 사용되고 있으나 아직까지도 임상적 이용은 제한되어 있다<sup>12,13)</sup>.

韓醫學에서 腫瘍에 對한 記述은 殷墟의 甲骨文에서 "瘤"라 한 곳에서 처음 나타나며<sup>14)</sup> 以後《內經》<sup>15)</sup>에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積 등에 對하여 具體的으로 言及한 以來로 腫瘍을 腫瘍, 腸覃, 癭瘤, 癭贅, 贅疣, 癥瘕, 積聚, 疝膈, 反胃, 惡瘡, 岩, 崑, 癌 등의 範疇에서 取扱하고 있는데<sup>16,17)</sup>, 醫家들의 說을 綜合하면 腫瘍의 發生은 外感邪氣, 七情의 變化, 飲食失調 및 正氣虛弱 등으로 인하여 氣滯血瘀케 되거나 臟腑의 機能이 失調되어 發生하는 것으로 볼 수 있다<sup>18)</sup>.

腫瘍의 治法으로는 健脾益氣 養血滋陰 養陰生津 溫補腎陽 滋補強壯 등의 扶正培本法, 清熱解毒 活血化瘀 化痰散結 疏肝利氣 行氣散結 攻堅破積 消脹 등의 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 大別된다<sup>19,20)</sup>.

최근에 들어 한의학에서 암을 치료하기 위하여 여러 가지 치료방법이 사용되고 있는데, 이 중에서 藥鍼液을 이용한 抗癌效果和 免疫에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 국내에서 발표된 藥鍼液 抗癌研究로는 朴 등<sup>21)</sup>이 甘草藥針을, 韓 등<sup>22)</sup>이 當歸藥針을, 金<sup>23)</sup>이 人蔘水鍼을, 權 등<sup>24)</sup>은 蜂毒藥鍼을, 金<sup>25)</sup>은 金銀花藥鍼을, 金<sup>26)</sup>은 全蝎藥鍼液을, 朴<sup>27)</sup>은 益智仁藥鍼을, 李<sup>28)</sup>는 菟絲子藥鍼을, 李<sup>29)</sup>는 魚腥草藥鍼을 李<sup>30)</sup>는 螻蛄藥針으로 抗癌效果和 免疫作用에 대한 연구보고를 하였다. 그러나 活血祛瘀, 通絡止痛, 解毒의 效能<sup>31)</sup>을 가진 紅花子藥鍼의 抗癌效果和 免疫效果에 대한 보고는 접할 수가 없었다.

이에 홍화자약침의 항암능과 면역기능에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 복강 내에 주입하여 NK 세포의 독성능과 IL-2의 생산능을 측정하였다.

면역이란 외부로부터 미생물, 동물의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 抗體를 만들고 개체의 恒常性을 유지하는 현상으로 생체가 自己와 非自己를 識別하는 기구이며, 면역반응이란 非自己를 抗原으로 인식하고 특이하게 抗體를 생산하여 이를 처리하는 연쇄적인 반응이다<sup>32)</sup>.

면역반응의 종류는 T-림프구에 의한 세포성 면역반응, B-림프구에 의한 체액성 면역반응, K세포에 의한 항체의존성 세포독성반응 및 NK 세포에 의한 비특이적 자연살해 세포독성이 있으며, 세포성 면역반응은 주로 암세포를 파괴하는 주역할을 하고, 체액성 면역반응은 2차적 역할을 하고 있다<sup>33)</sup>.

NK cell은 주요조직적복합체(Major histocompatibility complex: MHC)의 제한현상도 없고, 항원 특이성도 없이 일부 암세포와 바이러스 감염세포에 대하여 세포독성을 나타내는 세포로 일반적으로 자연세포독성세포(NK cell : natural killer cell)라고 하고, 이는 일종의 자연면역 기능을 보이는 세포이다<sup>34)</sup>.

T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능항진, B cell 분화인자, NK cell의 활성화에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 腫瘍의 치료에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을

하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다<sup>4,50</sup>.

Sarcoma-180 복강암에서 홍화자약침의 생존율을 측정 한 결과 median survival time은 대조군은 25일, 실험군 I은 31일을 나타내었고, 실험군 II는 30일을 나타내어 생존율은 실험군 I이 24%, 실험군 II가 20%의 증가하였다.(Fig 6.)

NK cell 활성화 측정 검정결과, 작동세포와 표적세포의 비율이 실험군 I에서는 50:1일 때, 실험군 II에서는 10:1일 때 NK cell의 활성화에서 유의성 있는 증가가 나타남을 알 수 있었으며, 이는 항원 비특이적인 세포 면역에 관여하여 암세포의 증식을 억제하는 것으로 보인다.

IL-2의 생산능 검액 검사에서 결과를 보면 실험군 모두 유의성 있는 감소를 나타낸 것으로 보아 림프구의 활성화, 분화, 증식에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 사려된다.(Table 13.)

이상과 같은 실험결과로 보아 홍화자약침에서 실험한 0.05cc, 0.1cc, 0.2cc등은 인체의 기준으로 환산해 볼 때, 0.1cc는 60kg의 사람에게 약 200cc정도의 양을 투여하게 되는 것으로, 이와 같은 양으로도 큰 독성반응이 없는 것으로 나타났으며, sarcoma-180 복강암 세포를 이용한 항암효과에서는 생존율이 유의성 있는 증가를 하였고, NK cell의 활성화도 일정비율에서 증가하는 것으로 나타났으나, IL-2 생산능의 경우에서 정상군에 비해 오히려 감소한 것으로 볼 때, 비특이성 면역에 관여하여 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 위의 결과를 종합해 볼 때, 홍화자약침은 임상에서 사용함에 비교적 안전한 약침제제이며, 향후 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로 기대되어 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

## V. 結 論

홍화자약침액의 안정성을 규명하기 위하여 mouse와 rat를 이용한 LD<sub>50</sub>, 급성·아급성 독성실험을 하였으며, 홍화자약침의 항암효과를 관찰하기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 주입한 mouse에서 생존율, NK cell 활성화도 및 IL-2양을 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.(p<0.05)

1. 급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>을 측정한 결과 실험군 모두에서 사망한 개체가 발견되지 않아 산출할 수 없었다.
2. 급성 독성실험에서 독성반응 상태를 관찰한 결과, 아무런 중독 증상이 나타나지 않았으나, 실험군에서 정상군에 비해 약간의 체중증가가 나타났다.
3. 급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, BUN은 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 정상군과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. Creatinine은 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 감소를 나타내었고, Uric acid는 대조군에 비하여 실험군 I에서 유의한 증가를 나타내었다. Glucose는 정상군에 비하여 실험군 모두가 유의한 증가를 나타내었으나, 대조군과는 유의한 차이를 나타내지 않았고, Total cholesterol은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. GOT는 실험군 I에서, GPT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.
4. 아급성 독성실험에서는 실험군 모두 중독증상을 나타내지 않았으며, 정상군에 비해 체중의 변화도 나타내지 않았다.
5. 아급성 독성실험에서 CBC를 측정한 결과 정상군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다.
6. 아급성 독성실험의 생화학 혈청검사에서 Uric acid가 실험군 모두에서 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, Triglyceride에서는 실험군 II가 정상군에 비해 유의하게 감소하였으며, GOT와 GPT는 실험군 모두 유의한 감소를 나타내었고, Alkaline phosphatase 역시 실험군 모두 정상군에 비해 유의한 감소가 나타났다.
7. Sarcoma-180 복강암 항암효과 실험에서 생존율을 측정한 결과, 실험군 모두 유의한 생존율의 증가를 나타내었다.
8. NK cell 활성화 측정 검정결과 작동세포와 표적세

포의 비율이 실험군 I에서는 50:1일 때, 실험군 II에서는 10:1일 때 NK 세포의 활성화에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

9. Interleukin-2의 생산능 측정결과 실험군 모두에서 유의한 감소를 나타내었다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 홍화자약침은 임상에서 사용함에 비교적 안전한 약침제제이며, 향후 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로 기대되어 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

### 參 考 文 獻

1. 張貴君, 常用中藥鑑定大全, 黑龍江科學技術出版社, 哈爾濱, pp.383-384, 1993.1.
2. 崔容泰, 鍼灸學(上, 下), 集文堂, 서울, pp.1457-1467, 1993.
3. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, pp.13-14, 112-118, 138-203, 1999.
4. 임사비나 외, 우황·웅담약침액의 급성독성에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 4, No.3, 2001. 12.
5. 육태한 외, 홍화자·녹용·자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. Vol. 18. No. 1. pp.61-75. 2001.
6. 김동환 외, 桃仁 및 紅花 藥鍼의 鎮痛·抗血栓 效能에 關한 研究, 大韓韓方婦人科學會誌 Vol. 13, No. 2 pp.60-73, 2000. 8.
7. 김선혁 외, 홍화유(紅花油) 약침이 Microcrystalline Sodium Urate로 유발된 흰쥐의 통풍에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol 15, No. 1, p. 9, 1998
8. 임사비나 외, 홍화자약침의 피부자극시험 및 안점막자극시험, 대한약침학회지, Vol 3. No. 1, July 2000.
9. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제 98-116호.
10. R. I. Geran, N. H. Greenberg, M. M. Macdinald, A. M. Schumacher, and B. J. Abbot : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against Animal Tumors and other Biological system(3rd Edition), Cancer chemotherapy Reports, pp.48-59, 1972.
11. 金昌玟 外, 完譯 中藥大辭典, 圖書出版 鼎談, 서울, pp.4826-4829, 1997.
12. 김양강, 독성학, 동화기술, 서울, pp. 15-18, 1994.
13. 김진복, 암면역학과 면역요법, 대한면역학회지, Vol 8, No. 1, pp. 73-83, 1986.
14. 서울대학교 의과대학, 중앙학, 서울대학교 출판부, 서울, pp.1-3, 137-143, 225-234, 1992.
15. 박찬열, 발암원인에 대한 고찰, 대한침구학회지, Vol. 16, No. 1, pp.147-160, 1999.
16. 전국의과대학교수 역, Current Medical Diagnosis & Treatment, 도서출판 한우리, 서울, pp.69-107, 1999.
17. 李文鎬 外, 內科學, 서울, 박애출판사, pp..2466~2479, 1976.
18. 박재갑, 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp.621~671, 1994.
19. 方藥中 外, 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.621~636, 1986.
20. 楊維傑 編, 黃帝內經素問靈樞譯解, 成輔社, 서울, pp.41, 45, 97, 168, 243, 295-296, 407, 447, 469, 473, 577, 1980.
21. 許 浚, 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, pp.486~496, 720, 1988
22. 金定濟, 金賢濟 : 東醫臨床要覽, 書苑堂, 부천, p.254, 1981.
23. 賈 莖(申天浩 編譯) : 癌瘤防治研究, 成輔社, 서울, pp.25~27, 1984.
24. 田炳旭, 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 關한 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol 1, No 1, pp.29~54, 1995
25. 박경미 외, 감초약침액의 항암 및 면역활성에 미치는 영향, 생약학회지, Vol 31. No. 1, pp.7-15, 2000.
26. 한상훈 외, 당귀약침액의 암예방효과, 약학회지, Vol. 44, No 3. pp. 283-293, 2000.
27. 한상원 외, 인삼약침과 Lidocaine을 첨가한 인삼약침이 종양 및 면역기능에 미치는 영향, 동서의학, Vol. 20. NO. 3. pp.21-39, 1995
28. 權奇祿 外, 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 14. No. 2. pp.151-172, 1997.
29. 김중완, 金銀花 藥鍼液이 抗癌 및 癌豫防 效果에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 16. No. 2, pp.261-284, 1999.
30. 김소형, 全蝎 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果,

- 大韓鍼灸學會誌, Vol. 17. No. 3, pp.151-167. 2000.
31. 朴祥鎔, 益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 18. No. 3. pp.79-93, 2001.
  32. 이재복, 菟絲子藥鍼이 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 18. No. 3, pp.94-104, 2001.
  33. 이해정 외, 魚腥草水鍼의 抗腫瘍效果에 관한 연구. 경희한의대논문집, pp. 467-483, 1989.
  34. 이준무 외, 제조약침의 항암작용에 관한 연구, 대한동의병리학회지, VOL. 14, No. 2, pp. 132-143, 2000
  35. 菊地浩吉 外(李淵台 譯), 最新 免疫學, 集文堂, 서울 p.33, 335, 1989.
  36. 김세중, 면역학, 고려의학, 서울, pp.134-136, 1994.