

원저

# 杏仁藥鍼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

김옥\* · 권기록\*

\*상지대학교 한의과대학 대학원 침구과

## Abstract The Study on Acute and Subacute Toxicity and Sarcoma-180 Anti-cancer Effects of *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In)

Ok, Kim\* · Ki-Rok, Kwon\*

\*Dept. of Acupuncture and Moxibustion, Oriental Medical college, 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 *Armeniacae amarum semen* (Haeng-in) in mice and rats.

**Method :** Balb/c mice were injected intraperitoneally with Haeng-In extract for LD<sub>50</sub> and acute toxicity test. Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with Haeng-In extract for subacute toxicity test. The *Armeniacae amarum semen* 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 from the treatment groups during the test.
  2. The clinical signs and the body weight of mice treated with 0.1cc and 0.2cc Haeng-In extract were not affected during the acute toxicity test.
  3. In acute toxicity test of serum biochemical values of mice, total protein and albumin were decreased in treatment group I. Glucose was increased, and total cholesterol was decreased in treatment groups. GPT was increased in treatment group I.
  4. In subacute toxicity test, toxic symptoms were not detected in the treatment groups.
  5. In subacute toxicity test, the body weight was increased in treatment groups on 14th and 21st day.
  6. In subacute toxicity test, liver weight was increased in treatment group II, and spleen weight was increased in treatment group II. Lung weight was increased in all the treatment groups.(P<0.05)
  7. In subacute toxicity test, severe tissue injury was found in lung and liver, especially treatment group II showed more significant lung damage compared to treatment group I.
  8. In subacute toxicity test, WBC, MCH and MCHC were increased in all the treatment groups, RBC, HGB and HCT were decreased in treatment group II(P<0.05).
  9. In subacute toxicity test of serum biochemical values of rats, triglyceride was decreased in all the treatment groups. ALP was decreased in treatment group I, and creatinine was decreased in treatment group II. BUN/CR was increased in treatment group II(P<0.05).
  10. Median survival time of Sarcoma-180 cancer cell treated with Haeng-In was increased in all the treatment groups by twenty percent, compared to the control group(P<0.05).
  11. Natural killer cell activity about the Sarcoma-180 cell was decreased at the ratio of 100:1, but was increased at the ratio of 10:1. In treatment group II, increase was found at the ratio of 100:1 and 50:1(P<0.05).
  12. Interleukin-2 productivity of the Sarcoma-180 cell was decreased in treatment group I, but was increased in treatment group II(P<0.05).

**Conclusion :** According to the results, we can conclude Herbal-acupuncture with *Armeniacae amarum semen* caused toxicity, and had effects in Sarcoma-180 cancer cell.

**Key words :** *Armeniacae amarum semen*, Herbal-acupuncture, LD<sub>50</sub>, Acute toxicity, Subacute toxicity, Sarcoma-180 cancer cell, Natural killer cell activity, Interleukin-2 productivity.

## I. 緒 論

藥鍼療法은 환자의 질병을 근거로 腧穴과 藥物을 선택하여 藥液을 腧穴내에 注入함으로써 腧穴과 藥物이 질병에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하게 하는 新鍼療法이며<sup>1)</sup>, 크게 經絡藥鍼, 八綱藥鍼 그리고 蜂藥鍼으로 대별할 수 있다<sup>2)</sup>.

杏仁은 薔薇科에 속한 落葉喬木인 살구(*Prunus armeniaca* L. var. *ansu* MAXIM.), 遼杏(*P. mandshurica* KOEHN), 시베리아살구나무(*P. sibirica* L.) 및 同屬近緣植物의 成熟한 種子를 乾燥한 것으로, 하계에 果實이 익었을 때 채취하여 果肉과 核殼을 제거하고 種仁을 취하여 그늘에서 말린다<sup>3)</sup>. 性은 溫有小毒하고 味는 甘苦(一云 苦辛)하며<sup>4)</sup> 肺大腸으로 歸經한다<sup>5)</sup>. 效能은 降氣止咳平喘 潤腸通便하고 咳嗽氣喘 胸滿痰多 血虛津枯 腸燥便秘를 治療하는 효과가 있다<sup>6)</sup>.

국내에 발표된杏仁관련논문의 경향을 보면 나<sup>7)</sup>는 당뇨병환자의 치주질환에 대한 항염증작용, 정<sup>8)</sup> 등은 IL-4, IL-5, IL-6의 전사억제 효과, 최<sup>9)</sup>는 Amygdalin의 최적 추출조건과 최대추출 및 안정성, 박<sup>10)</sup> 등은 폐암치료에 대해서 발표하였으나杏仁藥鍼의 독성연구 및 항암효과에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다.

杏仁의 주성분인 Amygdalin은杏仁의 또다른 성분인 효소 emulsin에 의해 가수분해되는데, 이 분해산물의 호흡중추와 기침중추에 대해 진정, 진해작용과 함께 말기 암환자에 대한 항암성이 밝혀지면서 항암제로써도 인정을 받고 있다<sup>11)</sup>. 또한 항암·항종양작용뿐만 아니라 전신성 대사질환 및 고혈압환자의 혈압 정상화, 식욕증진, 혈액소증가, 진통작용에 효과가 있어 폐암을 포함한 여러 난치성 질환에 대한 치료제로서의 가능성을 보여주고 있는 藥鍼材料이다.

국외에서는 80년대 초에 미국에서 Amygdalin을 포함한 Laetrile이란 암치료제가 개발되어 암치료에 널리 쓰이게 되었으나, Laetrile 복용 후 cyanide 중독으로 인해 사망했다는 임상보고가 나오면서 사용이 중단되었다. 그 후 이 약을 경구투여했을 때는 신경독을 유발하기 쉽지만 정맥주사와 경구투여를 동시에 했을 경우에는 오히려 암치료에 유효하다는 상반된 보고와 다른 식물

인 무화과 나무에서 추출한 Amygdalin의 벤즈알데히드가 항암효과에 관여한다는 보고가 나오면서부터 laetrile의 항암활성에 대한 연구가 다시 활발히 진행되고 있다<sup>12)</sup>.

이에 저자는杏仁을 원료로 조제한 약침액의 용량에 따른 독성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 의약품 독성시험기준 제 98-116호<sup>13)</sup>에 준해杏仁藥鍼의 급성 및 아급성 독성을 평가하여 새로운 약침제제로 개발이 가능한가에 대한 검토를 시행하였고, 항암효과를 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 생쥐의 복강에 이식한 후 和胃氣, 利中焦, 調升降, 寬中하는 中脘穴(CV12)에杏仁藥鍼을 주입하여 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

LD<sub>50</sub>과 항암능 측정을 위하여 체중 25 3g 내외의 Balb/c계 웅성 mouse를 한 군당 10마리로 하여 사용하였고, 아급성 독성실험을 위하여 체중 220 30g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 rat을 한 군당 10마리로 하여 사용하였다. 모든 동물은 대한실험동물센터에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

#### (2) 재료

실험에 사용한 약침제제는杏仁藥鍼으로서, 약침학회 실험실에서 다음과 같이 조제하여 사용하였다.

#### 1)杏仁藥鍼의 조제<sup>14)</sup>

실험에 사용한 약침제제는 시중에서杏仁(*Armeniaca amarum semen*)을 구입하여 지저분한 씨앗을 기류시스템에 의해 깨끗한 씨와 불필요한 찌꺼기를 분리하였다. 깨끗한 씨는 박피기에 의해 피층을 제거하고 껍질이 제거된 씨의 알맹이는 분쇄롤로 분쇄하여 준비된 알맹

\* 교신저자 : 김 욱, 강원도 횡성군 횡성읍 읍하리 86-10, 오행한의원 (Tel. 033-345-8275, E-mail : oktokki9@hanmail.net)

이를 스크류 프레스에 넣어 열은 가하지 않은 상태에서 압력만 가해 기름성분을 추출하였다. 이때 거친 찌거기는 bin에 저장되어 버려지고, 착유된 윤제는 정치탱크에 보관하여 가라앉은 앙금은 제거한 상층액을 취하고 나서, 3일 정도 대한약침학회의 무균실에 보관하였다. 무균실에 보관된 상층액을 먼저 와트만 여과지로 2번 1차 여과를 한 뒤, 0.45 $\mu$ m, 0.2 $\mu$ m 여과막 순으로 3차 여과하였다. 여과된 윤제를 오염되지 않게 멸균된 바이엘에 일정 용량 주입하였고, 산화방지를 위하여 질소가스를 충전한 다음 밀봉하여 랜덤식 샘플링하여 시료를 준비하였다.(Fig. 1)

2) 약침기

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

2. 방법

(1) 약침 기술

1) 급성 독성

① LD<sub>50</sub> 측정실험을 위하여 실험군을 각각 0.1cc,

0.2cc 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 복강에 杏仁藥鍼을 1주일에 1회 주입한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였다.

② 杏仁藥鍼의 독성반응 유무를 관찰하기 위하여 실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 복강에 1회 주입한 후 1주일간 독성반응 상태를 관찰하였고, 대조군은 0.2cc의 생리식염수를 주입한 후 1주일 동안 경과를 비교 관찰하였다.

2) 아급성 독성

아급성 독성 실험의 경우는 Sprague-Dawley rat의 복강에 1주일에 2회씩 4주동안 총 8회 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 복강 주입하였고, 대조군의 경우는 0.2cc의 생리식염수를 사용하였다.

3) Sarcoma-180 항암효과

항암능 측정 실험의 경우는 Sarcoma-180 복강암 세포를 Balb/c mouse의 복강에 이식한 후, 2일 후부터 매주 2회씩 총 8회 杏仁藥鍼을 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 해부학적 骨度分寸法에 준하여 中腕穴에 주입하였고, 대조군의 경우 Sarcoma-180 복강암 세포 이식 후 2일 후부터 매주 2회씩 동량의 생리식염수를 주입하였다.

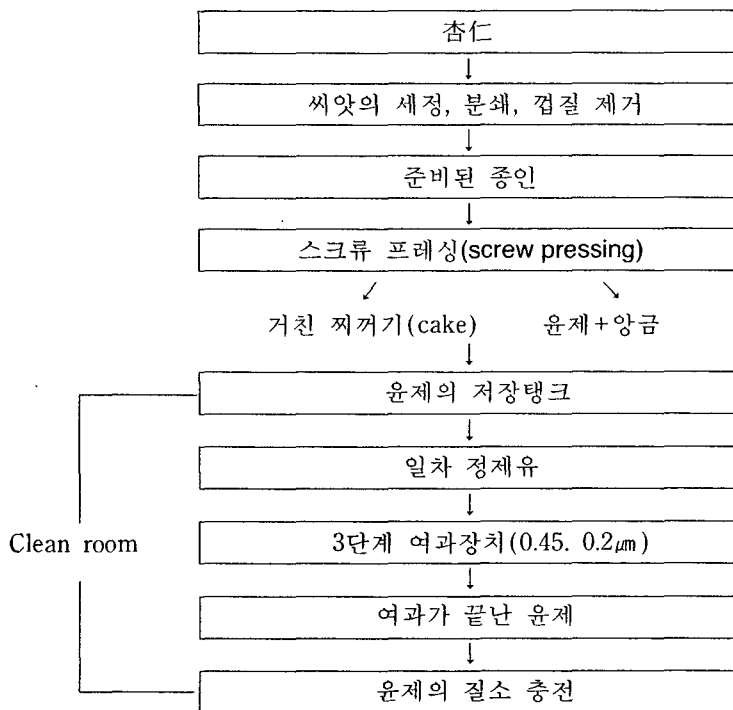


Fig. 1. Manufacturing process of Armeniaca amarum semen Herbal-Acupuncture (Haeng-In)

(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.) 4 ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1 ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1 ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정 한 후 pH를 7.2로 맞추어 0.22 m 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 에서 30분 간 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 배양시켜 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

3) 암세포 유발

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 복강암 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 대조군과 杏仁藥鍼 투여군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일 동안 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 조정 한 후 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하고 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

(3) 채혈 및 혈청의 분리

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 급성 독성실험에서는 심장에서 혈액을 채취하고, 아급성 독성실험에서는

복대정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 급성 독성실험에서는 전체 혈액을 채혈 후 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣어 생화학 혈청검사에 사용하였다. 아급성 독성실험에서는 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle(녹십자의료공업, 한국)에 넣어 CBC를 측정하였고, 나머지는 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣어, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분간 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 생화학 혈청검사에 사용하였다.

3. 항목 및 내용

(1) 급성 독성

1) LD50 측정

Balb/c mouse를 각각 0.1cc, 0.2cc 주입한 실험군으로 나누어 杏仁藥鍼을 투여한 후 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다.

2) 체중측정

Balb/c mouse에 杏仁藥鍼을 각각 0.1cc, 0.2cc주입한 실험군과 생리식염수 0.2cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였고, 체중은 첫째날과 7일째에 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다.

3) 임상관찰

처음 투여일은 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 하였고, 다음날부터 실험 종료시까지 1일 1회 1시간씩 상기 임상관찰을 하였다.

4) 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 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 생화학 혈청검사인 total protein, albumin, BUN, creatine, UA, glucose, triglyceride, total cholesterol, GOT, GPT, alkaline phosphatase, A/G, BUN/CR 측정에 사용하였다.

(2) 아급성 독성실험

1) 체중측정

Sprague-Dawley rat에 杏仁藥鍼을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입한 실험군과 생리식염수 0.2cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였고, 체중은 1주일에 1회씩 4주간 총 4회 저울을 이용하여 측정하였다.

2) 임상관찰

처음 투여일은 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 하였고, 다음날부터 실험 종료시까지 1일 1회 1시간씩 상기 임상관찰을 하였다.

3) 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.

4) 장기의 손상 관찰

개복하여 각 장기의 조직의 변화 및 지방의 축적정도를 관찰하였다.

5) CBC(Complete Blood Count)측정

EDTA bottle에 보존한 혈액을 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)14)기계를 이용하여 WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT를 측정하였다.

6) 생화학 혈청 검사

vacutainer tube에 보존한 혈청을 Biochemical Analysor (TBA-20R, Toshiba, Japan)15)기계를 이용하여 total protein, albumin, BUN, creatine, UA, glucose, triglyceride, total cholesterol, GOT, GPT, alkaline phosphatase, A/G, BUN/CR을 측정하였다.

(3) Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험

1) 생존율 측정

지수증식기에 이른 sarcoma-180 복강암 세포를 수거하여 PBS(phosphatebuffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 실험군의 복강에  $5 \times 10^6$ cells/0.2ml씩 주입하여 30일 동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경

우는 생존율을 계산에서 제외하였다. Geran<sup>16)</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 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 한번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

3) NK cell 활성화 측정

① 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

② 표적세포의 준비

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

③ 세포독성의 측정

㉠ 기본방법

세포독성실험은 Promega사의 <sup>51</sup>Cr assay를 대체하는 것으로 알려져 있는 cytotox96™ non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라

칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 가시광선영역의 파장(490nm)에서 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

㉠ 대조 well의 준비

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

㉡ 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 2 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well microtitration plate에 well당 100 $\mu$ l씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml, 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml, 5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ l를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ l/well이 되도록 한후 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100 $\mu$ l당 10 $\mu$ l의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$ l 옮겨, 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 자연방출값, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 뺀고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 뺀다.

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 치사하여 비장을 적출하였다. 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 재부유한 후, 여기에 concanavalin-A (Sigma, U.S.A.)를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 가하고, 37 $^{\circ}$ 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 고품상 면역효소 측정법을 이용한 mouse Interleukin-2측정용 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 세척한 후 물기를 제거한 후 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-test<sup>17)</sup>를 시행하여 각각의

경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

한 개체가 발견되지 않아 LD<sub>50</sub>은 산출할 수 없었다.

### Ⅲ. 實驗成績

#### 1. 급성독성

##### (1) LD<sub>50</sub> 측정

LD<sub>50</sub>의 측정에서는 Balb/c mouse를 각각 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 杏仁藥鍼을 복강에 투여한 후 7일 동안 사망유무를 관찰하였으나 실험군 모두에서 사망

##### (2) 체중측정

杏仁藥鍼을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입한 실험군과 생리식염수를 0.2cc 주입한 대조군의 체중 변화를 살펴본 결과 유의한 체중변화는 없었다.(Table 1)

##### (3) 임상관찰

Balb/c mouse를 이용한 급성독성실험에서 杏仁藥鍼을 투여하고 7일간 임상관찰을 한 결과, 주요 독성 증상은 관찰되지 않았다.(Table 2, 3)

Table 1. Body weight of mice treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In) in acute toxicity test (unit : g).

Group	day1	day7
Normal	25.89 ± 1.31	31.78 ± 1.43
Control	26.94 ± 1.68	32.63 ± 2.92
Treat I	26.83 ± 1.30	31.49 ± 2.73
Treat II	26.40 ± 1.51	31.45 ± 1.28

Normal : Non-treated group

Control : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Table 2. Clinical findings rats treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) 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
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 3. Clinical findings rats treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) 0.2cc 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
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

(4) 생화학 혈청검사

급성 독성실험의 생화학 혈청검사를 한 결과, total protein은 대조군이 정상군에 비하여 유의성있는 증가를 보였고, 실험군 1은 대조군에 비하여 감소하였다. albumine은 대조군이 정상군에 비해 증가하였고 실험군 1이 대조군에 비하여 감소하였다. UA는 실험군이 정상군에 비해 감소하였다. glucose는 실험군이 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였고, total cholesterol은 실험군이 대조군에 비해 감소하였다. GOT는 실험군 1에서 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었고, GPT는 실험군 1이 정상군과 대조군 모두에 비해 증가하였다. BUN/CR은 실험군 2가 정상군에 비해 감소하였다. (Table 4)

2. 아급성 독성 실험

(1) 체중 측정

실험 개시 후 1주일에 1회씩 총 4회 측정된 체중의 변화를 살펴보면 14일과 21일째에 실험군이 정상군과 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 28일째에는 정상군 및 대조군과 차이를 나타내지 않았다.(Table 5)

(2) 임상관찰

Sprague Dawley rat을 이용한 아급성 독성 실험에서, 杏仁藥鍼을 투여 후 주요 증독증상들은 관찰되지 않았다.(Table 6, 7)

(3) 장기의 무게 측정

실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정된 결과, 간의 무게는 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 증가하였고, 비장의 무게는 실험군 1이 대조군에 비해 증가하였으며, 폐의 무게는 실험군이 정상군과 대조군에 비해 증가하였다. 다른 장기의 경우는 정상군과 차이가 없었다.(Table 8)

(4) 장기의 손상

실험 종료 후 회복하여 각 장기를 관찰한 결과 폐와 간에 심대한 조직 이상이 발견되었고 특히 0.1cc 투여군보다 0.2cc 투여군인 실험군 2의 폐의 이상이 뚜렷이 관찰되었다.(Fig. 2 A-F)

실험군은 모두 간조직에 붉은 점이 전체적으로 확산



Table 4. Serum biochemical values of mice treated intraperitoneally with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) in acute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
TP(g/dl)	4.82 ± 0.24	5.18 ± 0.37 <sup>a</sup>	4.74 ± 0.19 <sup>b</sup>	5.04 ± 0.36
ALB(g/dl)	2.83 ± 0.14	3.09 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.21
BUN(mg/dl)	34.31 ± 12.40	29.53 ± 4.83	28.31 ± 2.11	28.28 ± 3.92
CRTN(mg/dl)	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.53 ± 0.08
UA(mg/dl)	5.25 ± 1.69	4.10 ± 1.69	3.45 ± 0.97 <sup>a</sup>	3.42 ± 1.73 <sup>a</sup>
GLU(mg/dl)	261.50 ± 49.19	230.33 ± 32.47	279.25 ± 48.25 <sup>b</sup>	308.00 ± 57.85 <sup>b</sup>
TG(mg/dl)	201.13 ± 51.41	210.00 ± 81.70	173.75 ± 52.07	182.20 ± 71.26
T-C(mg/dl)	116.00 ± 18.06	133.44 ± 21.99	108.13 ± 18.03 <sup>b</sup>	112.10 ± 12.80 <sup>b</sup>
GOT(U/L)	61.75 ± 11.26	73.89 ± 28.68	104.38 ± 44.43 <sup>a</sup>	90.90 ± 43.73
GPT(U/L)	23.88 ± 6.13	26.44 ± 4.13	33.13 ± 6.94 <sup>ab</sup>	27.50 ± 5.89
ALP(U/L)	286.75 ± 58.97	247.89 ± 55.79	309.63 ± 95.07	284.30 ± 53.55
A/G	1.44 ± 0.05	1.48 ± 0.10	1.44 ± 0.13	1.41 ± 0.10
BUN/CR	63.23 ± 9.17	58.31 ± 9.78	58.18 ± 7.30	54.47 ± 7.30 <sup>a</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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Table 5. Body weight of rats treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) in subacute toxicity test (unit : g).

Group	day7	day14	day21	day28
Normal	223.23 ± 8.64	256.15 ± 11.16	284.70 ± 10.71	323.38 ± 15.45
Control	225.23 ± 15.36	253.98 ± 8.24	286.19 ± 7.88	311.99 ± 10.59
Treat I	222.35 ± 5.94	270.90 ± 8.09 <sup>ab</sup>	302.00 ± 10.79 <sup>ab</sup>	306.42 ± 35.90
Treat II	231.48 ± 7.87	271.65 ± 11.86 <sup>ab</sup>	300.55 ± 13.37 <sup>ab</sup>	313.77 ± 12.36

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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Table 6. Clinical findings rats treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) 0.1cc in subacute toxicity test.

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

Table 7. Clinical findings rats treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) 0.2cc in subacute toxicity test.

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

Table 8. Absolute and relative organ weights in rats treated intraperitoneally with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) in subacute toxicity test (unit : g).

Group	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
Normal	3.97 ± 0.16	0.37 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.45 ± 0.08	0.69 ± 0.03
Control	3.96 ± 0.36	0.36 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.69 ± 0.06
Treat I	3.86 ± 0.51	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.72 ± 0.09
Treat II	4.37 ± 0.23 <sup>ab</sup>	0.35 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.63 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.70 ± 0.02

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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

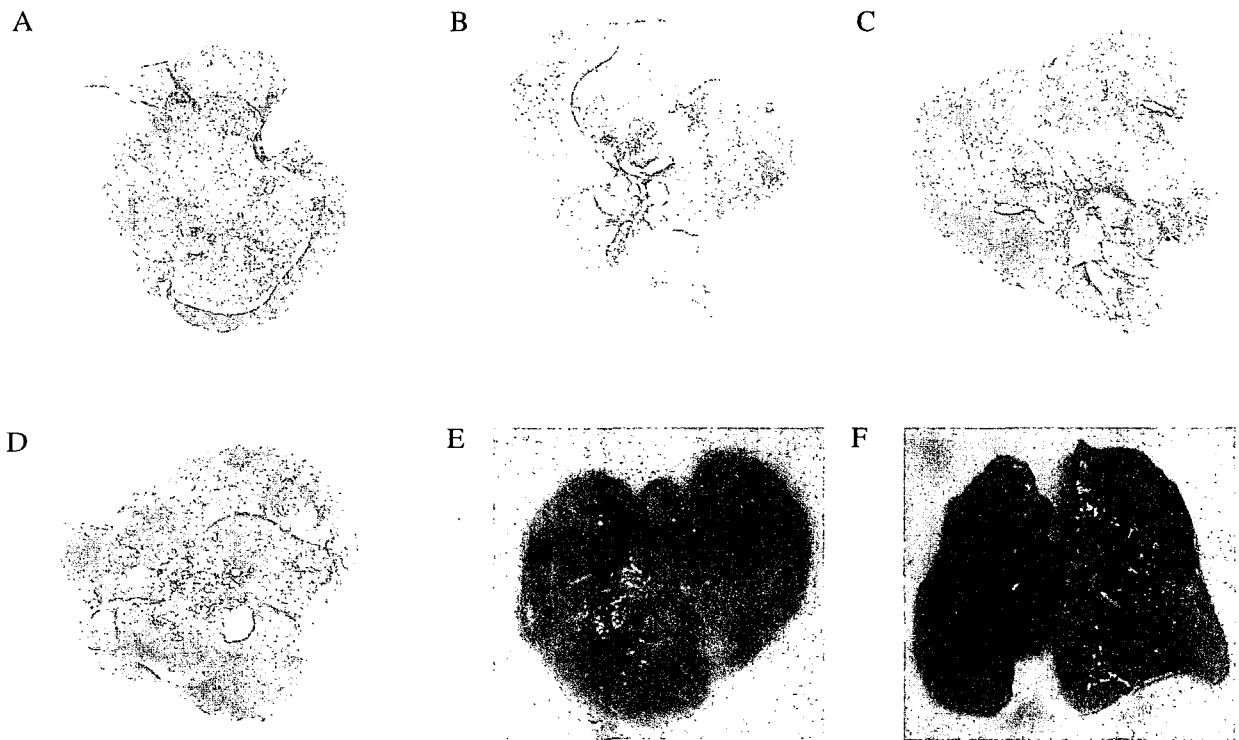


Fig. 2. The observation for liver and lung of rats with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In) in subacute toxicity test.

A, B : Liver of treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture.

C, D : Liver of treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture.

E : Lung of treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture.

F : Lung of treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture.

되어 있었으며 지방의 축적이 육안적으로 관찰되었다. 그림 D의 우측에서 볼 수 있듯이 간조직에 상흔이 발견되었으며 그 주위로 조직이 용기된 모습을 관찰할 수 있었다.

폐의 형태변화도 관찰되었는데 폐의 전면에선 큰 변화를 관찰할 수 없었으나 폐의 뒷면에서 조직의 색이 어둡고 용기된 형태의 조직 변화가 관찰되었다. 그림 E, F에서 보여지는 밝은 부분이 정상적인 폐조직이며 어두운 부분은 변형된 폐조직이다.

(5) CBC(Complete Blood Count) 측정

아급성 실험의 전혈구 계산치를 측정된 결과 WBC에서 대조군이 정상군에 비해 감소하였고 실험군이 대조군에 비해 증가하였으나 정상군과는 유의한 차이가 없었다. RBC는 대조군이 정상군에 비해 증가하였고 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 감소를 보였다. HGB는 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 감소하였고, HCT는 대조군이 정상군에 비해 증가를 보이고 실험군 2는 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. MCH는 대조군이 정상군에 비해 감소하였고, 실험군이 대조군에 비해 증가하였다. MCHC에서 대조군은 정상군에 비해 감소를

보였고 실험군 1은 정상군과 대조군에 비해 증가를 보이고 실험군 2는 대조군에 비해 증가하였다.(Table 9)

(6) 생화학 혈청 검사

아급성 실험의 혈청검사를 측정된 결과, albumine에서는 대조군이 정상군에 비해 증가하였고, BUN은 실험군 2가 정상군에 비해 증가하였으며, creatinine은 실험군 2가 대조군에 비해 감소를 나타내었다. glucose는 실험군 2가 정상군에 비하여 유의성있는 증가를 보였고 triglyceride의 경우는 대조군과 실험군이 정상군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다. ALP의 경우는 실험군 1이 정상군과 대조군에 비해 감소하였고 BUN/CR은 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다.(Table 10)

3. Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험

(1) 생존율 측정

Median survival time은 대조군은 25일, 실험군 1과 실험군 2는 모두 30일을 나타내었고, 생존 증가율은 실험

Table 9. Complete blood count values of treated intraperitoneally with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
WBC (x10 <sup>3</sup> /ul)	8.85 ± 1.34	6.39 ± 1.30 <sup>a</sup>	10.52 ± 2.56 <sup>b</sup>	10.35 ± 2.24 <sup>b</sup>
RBC (x10 <sup>6</sup> /ul)	7.37 ± 0.21	7.76 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.47 ± 0.38	7.14 ± 0.10 <sup>ab</sup>
HGB (g/dl)	14.88 ± 0.19	15.11 ± 0.40	15.38 ± 0.95	14.40 ± 0.30 <sup>ab</sup>
HCT (%)	46.53 ± 1.17	48.28 ± 1.20 <sup>a</sup>	46.60 ± 2.20	44.47 ± 0.73 <sup>ab</sup>
MCV (fL)	63.15 ± 1.24	62.29 ± 1.91	62.40 ± 0.60	62.45 ± 0.94
MCH (pg)	20.17 ± 0.44	19.50 ± 0.60 <sup>a</sup>	20.58 ± 0.37 <sup>b</sup>	20.17 ± 0.43 <sup>b</sup>
MCHC (g/dl)	31.98 ± 0.59	31.31 ± 0.29 <sup>a</sup>	33.00 ± 0.59 <sup>ab</sup>	32.38 ± 0.25 <sup>b</sup>
PLT (x10 <sup>3</sup> /ul)	1012.00 ± 68.84	1068.00 ± 108.10	1090.33 ± 130.69	1020.83 ± 94.28

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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Table 10. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) in subacute toxicity test.

CBC	Group	Normal	Control	Treat I	Treat II
TP (g/dl)		6.14 ± 0.19	6.30 ± 0.20	6.11 ± 0.25	4.91 ± 2.39
ALB (g/dl)		3.67 ± 0.23	3.92 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.16	3.02 ± 25.47
BUN (mg/dl)		23.43 ± 1.56	23.91 ± 1.64	23.30 ± 3.69	25.47 ± 1.31 <sup>a</sup>
CRTN (mg/dl)		0.62 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.03	0.56 ± 0.08 <sup>b</sup>
UA (mg/dl)		2.47 ± 0.23	2.49 ± 0.30	2.82 ± 0.79	2.37 ± 0.42
GLU (mg/dl)		190.00 ± 17.19	210.86 ± 37.56	185.17 ± 15.64	225.17 ± 19.18 <sup>a</sup>
TG (mg/dl)		119.67 ± 21.07	83.43 ± 31.09 <sup>a</sup>	77.33 ± 21.72 <sup>a</sup>	85.83 ± 20.63 <sup>a</sup>
T-CHO (mg/dl)		88.33 ± 6.25	84.14 ± 9.92	101.67 ± 18.41	80.00 ± 9.44
GOT (U/L)		139.67 ± 18.81	140.57 ± 16.51	299.17 ± 291.79	134.33 ± 17.05
GPT (U/L)		55.33 ± 0.52	56.71 ± 2.36	146.00 ± 177.65	60.83 ± 11.14
ALP (U/L)		530.83 ± 45.04	572.43 ± 69.75	456.67 ± 64.38 <sup>ab</sup>	573.17 ± 88.29
A/G		1.58 ± 0.12	1.62 ± 0.16	1.62 ± 0.16	1.38 ± 0.53
BUN/CR		37.78 ± 1.69	37.21 ± 2.84	37.28 ± 6.41	46.03 ± 7.39 <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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

군이 대조군에 비하여 20%의 증가율을 나타내었다. (Fig. 3)

(2) NK cell 활성도 측정

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 대조군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100 : 1일 때 46.87±8.35, 50 : 1일 때 44.38±6.05, 10 : 1일 때 44.95±10.91을 나타내었다. 실험군 1의 경우 100 : 1일 때 27.39±16.60, 50 : 1일 때 34.36±16.91, 10 : 1일 때 47.82±15.00를 나타내었고 실험군 2의 경우 100 : 1일 때 62.13±12.39, 50 : 1일 때 66.78±18.79, 10 : 1일 때 44.97±5.83을 나타내었다.(Table 11 & Fig. 4)

실험군 1은 작동세포와 표적세포의 비율이 100 : 1일 때 정상군과 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었고, 10 : 1일 때 대조군에 비해 증가를 나타내었다. 실험군 2의 경우는 작동세포와 표적세포의 비율이 100 : 1

일 때와 50 : 1일 때 정상군과 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며 10 : 1일 때는 대조군에 비해 차이를 나타내지 않았다.

(3) Interleukin-2 양 측정

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 21일이 지난 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정하였다.(Table 12 & Fig. 5)

정상군은 275.66±24.29pg/ml, 대조군은 225.82±20.38pg/ml, 실험군 1은 148.19±20.83pg/ml, 실험군 2는 314.98±17.13를 나타내어 대조군은 정상군에 비해 감소를 보였고, 실험군 1은 정상군과 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었고, 실험군 2는 정상군과 대조군에 비해 증가를 나타내었다.

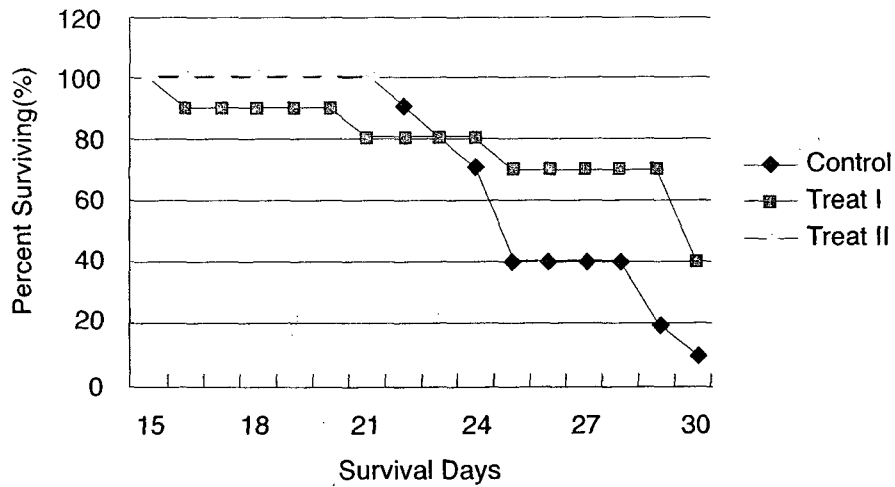


Fig. 3. Median survival time of mice treated *Armeniaca amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In) in vivo.

Control : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture(Haeng-In)

Table 11. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with *Armeniaca amarum semen* Herbal-Acupuncture(Haeng-In) 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	27.39 ± 16.60 <sup>ab</sup>
	50:1	34.36 ± 16.91
	10:1	47.82 ± 15.00 <sup>b</sup>
Treat II	100:1	62.13 ± 12.39 <sup>ab</sup>
	50:1	66.78 ± 18.79 <sup>ab</sup>
	10:1	44.97 ± 5.83 <sup>b</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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

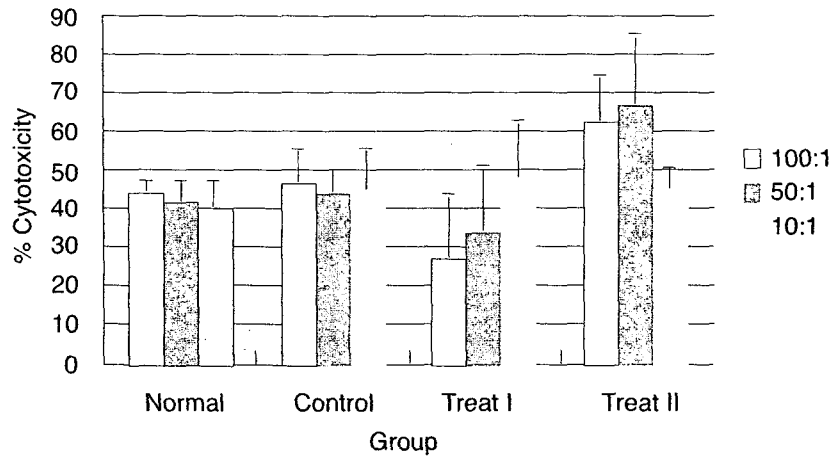


Fig. 4. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture(Haeng-In)according to E/T ratio.

Normal : Non-treated group

Control : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Table 12. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with *Armeniacae amarum semen* Herbal-Acupuncture (Haeng-In).

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	275.66 ± 24.29
Control	225.82 ± 20.38 <sup>a</sup>
Treat I	148.19 ± 20.83 <sup>ab</sup>
Treat II	314.98 ± 17.13 <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 : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniacae amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

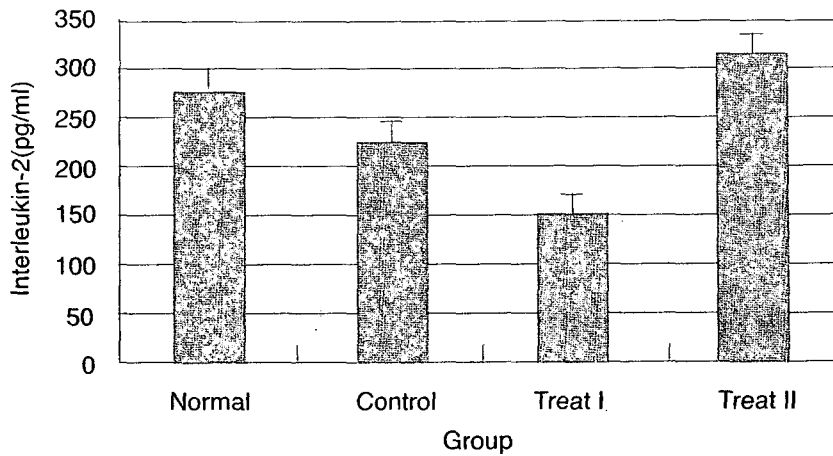


Fig. 5. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with *Armeniaca amarum semen* Herbal-Acupuncture(Haeng-In)

Normal : Non-treated group

Control : Control group was treated with normal saline

Treat I : Treat I group was treated 0.1cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

Treat II : Treat II group was treated 0.2cc with *Armeniaca amarum semen* Herbal- Acupuncture (Haeng-In)

#### IV. 考 察

杏仁은 薔薇科에 속한 落葉喬木인 살구(*Prunus armeniaca* L. var. *ansu* MAXIM.), 遼杏(*P. mandshurica* KOEHNE), 시베리아살구나무(*P. sibirica* L.) 및 同屬近緣植物의 成熟한 種子를 乾燥한 것으로<sup>3)</sup>, 하계에 果實이 익었을 때 果肉과 核殼을 제거하고 種仁을 취하여 그늘에서 말린다<sup>4)</sup>. 性은 溫有小毒하고 味는 甘苦<sup>5)</sup>하며 肺大腸으로 歸經<sup>6)</sup>하고 降氣止咳平喘 潤腸通便의 효능을 가지고 있어 咳嗽氣喘 胸滿痰多 血虛津枯 腸燥便秘에 사용된다<sup>3)</sup>. 杏仁의 성분은 靑산배당체(cyanogenic glycoside)의 일종인 amygdalin( $C_{20}H_{27}NO_{11}$ )이 약 3%, 脂肪油(杏仁油)가 약 50%를 차지하며 이 밖에 emulsin이라는 단백질발효소 및 각종 유리 amino acid가 함유되어 있다<sup>7)</sup>. 杏仁의 주성분인 amygdalin은 아미노산으로부터 생합성되며 효소나 산에 의해 가수분해되어 HCN과 keton유도체가 생성되는 靑산배당체(cyanogenic glycoside)의 일종이다. 그 분해산물로 인하여 호흡중추와 기침중추에 대해 진정, 진해작용을 가지며 폐암을 포함한 다른 종류의 암환자의 항암제로도 이용되고 있

다<sup>8)</sup>. amygdalin은 두 개의 포도당과 벤즈알데히드 및 시안화합물로 구성되며 시안화합물의 독성때문에 암치료제로서 반대의 여론도 높다. 그러나 시안화합물을 유리시키는 -glucosidase라는 분해효소가 정상세포에는 거의 없고 암세포에 주로 있으며, 또한 시안화합물을 중화반응시키는 효소인 rhodanese는 반대로 암세포에는 없고 정상세포에만 존재하기 때문에 암세포 병소들은 amygdalin에 노출시 보호받을 수 없고 정상세포는 이중의 안정장치에 의해 보호받게 되며, 벤즈알데히드 성분도 강력하지는 않지만 암세포 주변에서 독성을 발휘하는데 이 성분도 정상세포에 접촉하면 산화되어 안식향산이 되고 amygdalin의 통증완화기능은 여기에서 비롯되기 때문에 amygdalin을 함유하고 있는 杏仁은 항암제로서의 가능성이 있는 약침재료라 할 수 있다. 杏仁 관련 연구자료로서 나<sup>9)</sup>는 정상인에 비해 치주질환 발병율이 높은 당뇨병환자들에 있어서, 행인 추출물이 선택적으로 치주인대세포에 작용하여 표준배양액 상태에서 세포활성을 증가시키고 prostaglandin E<sub>2</sub> 등과 같은 염증매개물질의 활성을 억제한다고 하였으며, 정<sup>10)</sup> 등은 杏仁이 喘息機轉에 주요한 역할로 작용하는 대표적



cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫를 억제하는 효과가 있다고 하였으며, 최<sup>9)</sup>는 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 행인 중에 Amygdalin의 최적 추출조건과 최대추출 및 안정성을 실험하였으며, 박<sup>10)</sup> 등은杏仁이 폐암의 치료법 중 하나인 活血化瘀의 주요약물임을 밝히고 있다. 이 외에 박<sup>11)</sup>의 행인추출물이 마우스 대식세포주의 iNOS발현 및 Superoxide형성에 미치는 영향과 서<sup>12)</sup>의 麻杏甘石湯이 오존 및 사염화탄소로 인한 흰쥐에 미치는 영향 및 김<sup>13)</sup>의 살구의 유리아미노산 및 유리당에 관한 연구 등이 있으나 항암제로서 杏仁藥鍼의 효용성에 대한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 우선 항암제로서의 안정성을 평가하기 위하여 杏仁약침의 급성·아급성 독성실험을 한 후에 Sarcoma-180 복강암세포에 대한 杏仁藥鍼의 항암효과를 실험해보았다.

Balb/c mouse를 이용한 급성독성실험에서는 LD<sub>50</sub> 측정을 위해 실험군을 두 군으로 나누어 각각 0.1cc, 0.2cc의 杏仁藥鍼을 생쥐의 복강에 주입한 후 7일 동안 사망유무를 관찰하였으나 실험군 모두에서 사망한 개체가 발견되지 않아 산출할 수 없었다. 체중측정은 첫째 날과 7일째에 정상군과 대조군 및 실험군에 있어서 거의 동일하게 체중이 증가하여 유의성이 없었다.(Table 1) 독성 증상들을 관찰하기 위하여 杏仁藥鍼 0.1cc, 0.2cc를 각각 복강내로 주입 후 7일간 mouse의 이상 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들이 관찰되지 않았다.(Table 2, 3) 생화학 혈청검사를 측정한 결과 total protein은 대조군이 정상군에 비하여 유의성있는 증가를 보였고, 실험군 1은 대조군에 비해 감소하였다. albumine은 대조군이 정상군에 비해 증가하였고 실험군 1이 대조군에 비하여 감소하였으며, UA는 실험군이 정상군에 비해 감소하였다. glucose는 실험군이 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였고 total cholesterol은 실험군이 대조군에 비해 감소하였다. GOT는 실험군 1에서 정상군에 비해 유의성있는 증가를 나타냈고 GPT는 실험군 1이 정상군과 대조군 모두에 비해 증가하였다. BUN/CR은 실험군 2가 정상군에 비해 감소하였다.(Table 4)

Sprague Dawley rat을 이용한 아급성 독성 실험에서, 1주일에 1회씩 측정한 체중의 변화는 14일과 21일째에 실험군이 정상군과 대조군에 비해 유의성있게 체중이 증가하였다.(Table 5) 杏仁藥鍼을 4주간 각각 0.1cc, 0.2cc 복강투여한 실험군에서 주요 중독 증상들은 관찰되지

않았다.(Table 6, 7) 또한 실험 종료 후 회복하여 적출한 장기의 무게를 측정한 결과 간의 무게는 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 증가하였고, 비장의 무게는 실험군 1이 대조군에 비해 증가하였으며, 폐의 무게는 실험군이 정상군과 대조군에 비해 증가하였다. 다른 장기의 경우는 정상군과 차이가 없었다.(Table 8) 실험 종료 후 회복하여 각 장기를 관찰한 결과 폐와 간에 심한 조직 이상이 발견되었고 특히 0.1cc 투여군 보다 0.2cc 투여군인 실험군 2의 폐의 이상이 뚜렷히 관찰되었다.(Fig. 2 A-F) 실험군은 모두 간조직에 붉은 점이 전체적으로 확산되어 있었으며 지방의 축적이 육안적으로 관찰되었다.(Fig. 2 A-D) 폐의 형태변화도 관찰되었는데 폐의 전면에선 큰 변화를 관찰할 수 없었으나 폐의 뒷면에서 조직의 색이 어둡고 융기된 형태의 조직 변화가 관찰되었다.(Fig. 2 E, F) 이런 사실은 杏仁의 독성이 생체에 상당한 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸 것으로 사료되며 本草學에 小毒하다고 기록된 것과 일치된다.

CBC 측정결과는 WBC에서 대조군이 정상군에 비해 감소하였고 실험군이 대조군에 비해 증가하였다. RBC는 대조군이 정상군에 비해 증가하였고 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 감소를 보였다. HGB는 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 감소하였고, HCT는 대조군이 정상군에 비해 증가를 보이고 실험군 2는 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. MCH는 대조군이 정상군에 비해 감소하였고 실험군이 대조군에 비해 증가하였다. MCHC에서 대조군은 정상군에 비해 감소를 보였고 실험군 1은 정상군과 대조군에 비해 증가를 보이고 실험군 2는 대조군에 비해 증가하였다.(Table 9)

생화학 혈청 검사에서 albumine은 대조군이 정상군에 비해 증가하였고, BUN은 실험군 2가 정상군에 비해 증가하였으며, CRTN은 실험군 2가 대조군에 비해 감소를 나타내었다. glucose는 실험군 2가 정상군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였고 triglyceride의 경우는 대조군과 실험군이 정상군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. ALP의 경우는 실험군 1이 정상군과 대조군에 비해 감소하였고 BUN/CR은 실험군 2가 정상군과 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.(Table 6)

杏仁藥鍼의 급성 및 아급성 독성실험을 한 결과, mouse와 rat에 있어서 임상관찰시에는 주요 독성반응이 발견되지 않았으나 급성 독성실험의 경우 생화학 혈청 검사에서, 아급성 독성실험의 경우는 체중의 변화와 장

기의 무게 및 손상에 있어서 간과 폐의 심한 손상을 발견할 수 있었으며, CBC와 생화학 혈청 검사에서도 독성 반응이 발견되어 비교적 안전한 약침제재로 볼 수 없었다. 따라서 杏仁을 약침제재로 사용하기 위해서는 보다 많은 연구가 선행되어야 할 것으로 여겨진다.

Sarcoma-180 복강암세포에서 杏仁藥鍼의 생존율을 측정 한 결과 Median survival time은 대조군은 25일, 실험군 모두 30일을 나타내었고, 생존 증가율은 실험군이 대조군에 비하여 20%의 증가율을 나타내었다(Fig. 3). Natural killer 세포는 주로 혈류 중에 감작되지 않은 상태에서 항종양 활성이나 항체생산계에 대한 조절작용이 있는 세포이다.<sup>20)</sup> NK 세포의 활성도를 측정 한 결과 실험군 1은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때 정상군과 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었고, 10:1일 때 대조군에 비해 증가를 나타내어 NK 세포의 활성도가 작동세포와 표적세포의 비율에 따라 많이 변화함을 알 수 있었고, 실험군 2의 경우는 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때와 50:1일 때 정상군과 대조군에 비해 증가하였으며 10:1일 때는 대조군에 비해 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다.(Table 11 & Fig. 4)

T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능향진에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 종양의 치료에 이용되며, 면역반응의 향진과 저하에 중요한 역할을 하여 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하므로써 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다.<sup>21)</sup> Interleukin-2의 생산능을 측정 한 결과 대조군은 정상군에 비해, 실험군 1은 정상군과 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었고, 실험군 2는 정상군과 대조군에 비해 증가를 나타내었다.(Table 12 & Fig. 5) 이로써 杏仁藥鍼의 주입량에 따라 IL-2의 생산능이 억제 혹은 증가됨을 알 수 있었다.

이상과 같은 실험결과로 보아 杏仁藥鍼은 특히 肝과 肺에 선택적인 조직손상을 일으킬 뿐만 아니라 CBC와 생화학 혈청검사결과 안전성이 있다고 판단하기는 어려웠다. Sarcoma-180 복강암세포를 이용한 항암효과실험에서는 실험군 1에서는 NK cell의 활성도가 저하되었고 실험군 2의 경우엔 반대로 증가하였으며, Interleukin-2의 생산능도 마찬가지로 실험군 1에서는 감소하였고 실험군 2는 증가를 나타내어 일관된 항암효과를 나타내지 않아 향후 이에 대한 보다 구체적인 연구가 선행되어야 함을 알 수 있었다. 따라서 杏仁藥鍼을 약침제재로

임상에 사용하기 위해서는 향후 제형의 변화나 추출방법, 적절한 주입용량에 대한 규명 등 많은 연구가 필요 하리라 사료된다.

## V. 結 論

杏仁약침의 안전성을 규명하기 위한 mouse와 rat를 이용한 급성·아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 복강암 세포에 대한 항암효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>을 측정 한 결과 실험군 모두에서 사망한 개체가 발견되지 않아 산출할 수 없었다.
2. 급성 독성실험에서 독성반응 상태를 관찰한 결과 주요 중독 증상이 나타나지 않았고 체중변화도 없었다.
3. 급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, total protein과 albumine은 실험군 I이 유의성있게 감소하였고, total cholesterol은 실험군이 유의성있게 감소하였다. Glucose는 실험군 모두 유의성있게 증가하였다.
4. 아급성 독성실험에서 실험군 모두 주요 중독 증상을 나타내지 않았다.
5. 아급성 독성실험에서 체중측정결과 14일과 21일째에 실험군 모두 유의성있게 체중이 증가하였다.
6. 아급성 독성실험에서 실험 종료 후 회복하여 적출한 장기의 무게를 측정 한 결과 간의 무게는 실험군 II가, 비장의 무게는 실험군 I이 유의성있게 증가하였으며, 폐의 무게는 실험군 모두 증가하였다.
7. 아급성 독성실험에서 실험 종료 후 회복하여 각 장기를 관찰한 결과 폐와 간에 심한 조직 이상이 발견되었고 특히 0.1cc 투여군 보다 0.2cc 투여군인 실험군 2의 폐의 이상이 뚜렷이 관찰되었다.

8. 아급성 독성실험에서 CBC 측정결과, WBC, MCH, MCHC는 실험군 모두 유의한 증가를 나타내었고, RBC, HGB, HCT는 실험군 2에서 유의한 감소를 나타내었다.
9. 아급성 독성실험의 생화학 혈청 검사 결과, Triglyceride는 실험군 모두에서, ALP는 실험군 1에서, Creatinine은 실험군 2에서 유의성있는 감소를 나타내었다. BUN/CR은 실험군 2에서 유의성있는 증가를 나타내었다.
10. Sarcoma-180 복강암세포에 대한 항암효과 실험에서 생존율을 측정한 결과 실험군이 대조군에 비하여 20%의 증가율을 나타내었다.
11. NK 세포의 활성도를 측정한 결과 실험군 1은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때는 유의성 있는 감소를 나타내었고, 10:1일 때는 유의성 있는 증가를 나타내었다. 실험군 2에서는 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때와 50:1일 때 유의성있게 증가하였다.
12. Interleukin-2의 생산능은 실험군 1은 유의성있는 감소를, 실험군 2는 증가를 나타내었다.

### 參考文獻

1. 대한약침학회, 약침제제와 임상응용(I), 대한약침학회, p1, 1999.
2. 강대인, 권기록, KGMP를 대비한 국내약침제제의 조제현황과 미생물 검사보고. The 1' st Journal of International Congress of KIHA. Vol. 4. No. pp49~62, 2001.
3. 金先熙 외, 本草學, 永林社, pp478~479, 1994.
4. 傳統醫學研究所, 本草藥材圖鑑, 成輔社, p45, 1994.
5. 申佶求, 申氏本草學, 壽文社, p479, 1988.
6. 辛民教, 原色臨床本草學, 永林社, p564, 1992.
7. 나성윤, 행인 추출물이 고포도당 상태의 치은섬유아세포 및 치주인대세포에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 치의학과 석사, 2000.
8. 鄭旭 外, 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, 대한한방내과학회지 제 21권 1호, p 31, 2000.
9. 崔允瑛, 고성능 액체크로마토그래피를 이용한 행인 중에 Amygdalin의 추출과 분석에 관한 연구, 숭실대학교 대학원 화학과 석사, p2, 1998.
10. 박정희 外, 肺癌의 韓醫治療에 關한 文獻的 考察, 대한한의학회지, 제16권 제1호, p93, 1995.
11. 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3제정)의 '의약품 독성시험기준' 제98-116호.
12. 최용태, 鍼灸學 上, 集文堂, pp1457~1467, 1993.
13. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, pp13~14, 1999.
14. AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER KX-21, SYSMEX CORPORATION KOBE, JAPAN, 1998.
15. AUTOMATED BIOCHEMICAL ANALYZER MODEL TOSHIBA TBA-20R/JN (2B586-127E)
16. 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, pp48~59, 1972.
17. Daniel, W. W, A foundation for analysis in the health sciences. New York, Willey 3rd edition. pp136~146, 1983.
18. 박정운, 杏仁 瓜蒌仁 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주의 iNOS발현 및 Superoxide 형성에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 석사, 1999.
19. 서성숙, 麻杏甘石湯이 오존 및 사업화탄소로 인한 흰쥐에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 석사, 1981.
20. 김동순, 살구의 유리아미노산 및 유리당에 관한 연구, 영남대학교 대학원, 석사, 1974.
21. 이귀녕 외, 임상병리과일 제2판, 의학문화사, p1087, 1996.
22. 서울대학교 의과대학, 종양학, 서울대학교 출판부, pp1~3, 137~143, 225~234, 1992.