

加味慈桃丸의 抗癌 및 免疫增強效果에 관한 實驗的 研究

전영수 · 심범상 · 최승훈 · 안규석

경희대학교 한의과대학 병리학교실

Experimental Studies on the Anti-tumor and the Immunomodulatory Effects of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸)

Young-Soo Jeon, Bum-Sang Shim, Seung-Hoon Choi, Kyoo-Sook Ahn

Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

This experimental study was carried out to evaluate the anti-tumor and the immunomodulatory effects of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) against cancer. The in vitro anti-tumor effects were evaluated by MTT assay. The cytotoxicity, extension of survival days, the effect of inhibition solid tumor which was induced sarcoma 180, and the changes of body weight were evaluated for in vivo effects of anti-tumor. To evaluate the immunomodulatory effects of Jiawei- citaowan(加未慈桃丸), delayed type hypersensitivity, hemagglutinin, hemolysin titers for humoral immune response, rosette forming cells for cell-mediated immune response, natural killer cell activity, proliferation of lymphocyte, productivity of Interleukin-2, and carbon clearance were measured with methotrexate treated mice.

The results were as follows;

1. In the case of existence ability of tumor cell, IC50 had an anti-tumor ativity resulted 2.52mg/ml to SNU-C4, 0.41mg/ml to SNU-396, resulted to 0.09mg/ml SNU-1.
2. The groups of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) 10mg/kg, 20mg/kg had no body weight loss. reduction in intake of water and feed, so these had no toxicity.
3. In the case of the effect of extention of existence, the group of 20mg/kg Jiaweicitaowan(加未慈桃

- 丸) extract treated group was showed 250% in ILS.
4. The effect of inhibition solid tumor was significantly decreased in both 10mg/kg, 20mg/kg of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups as compared with control group.
 5. The groups of 10mg/kg, 20mg/kg Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) had significant effect of body weight change compared to control group.
 6. Delayed type hypersensitivity was not significant in both Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups as compared with control group.
 7. Hemagglutinin and Hemolysin titers were significantly increased by dose-dependent. so these results showed that the humoral immune response was activated.
 8. For the effect of rosette forming cells was not significant in both Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups as compared with control group.
 9. Natural killer cell activity was significantly increased in both Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups as compared with control group in the ratio of 100:1, 50:1 of effector and target cells, but in the ratio of 10:1, the Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups were not significant.
 10. The proliferation of lymphocyte and productivity of Interleukin-2 were significantly increased by dose-dependent in both 10mg/kg, 20mg/kg of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated groups as compared with control group.
 11. In the phagocytic effect, the 20mg/kg of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) extract treated group showed the increasing effect with significance as compared with control group.

According to the results, we can suggest that Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) has the antitumor and the immunomodulatory effects.

I. 序 論

癌은 현재 人類의 健康을 위협하는 주요한 疾病의 하나로, 傳染性 疾患이 기본적으로 해결된 국가에서는 心腦血管疾患과 더불어 주요 死亡原因이 되고있다. 세계적으로 매년 癌에 의해 死亡하는 사람은 700만 명에 이르고, 우리나라의 경우 癌은 1988년 이래 전체 疾病死亡原因 가운데 首位를 차지하면서 國民保健을 위협하는 가장 큰 原因으로 등장하였다³³⁾.

癌의 發生原因과 機轉은 아직까지 명백히 밝혀져 있지 않고 또 그 生物學的 性狀이 복잡하

기 때문에 적절한 定義를 내리기는 어렵지만, 일반적으로 腫瘍이란 組織의 自律的인 過剩性 成長이며, 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대하여 破壞的인 것을 말한다¹⁴⁾. 특히 惡性 腫瘍에 해당하는 癌은 周圍 組織을 浸潤하고 轉移를 일으키므로써 결국 個體를 死亡에 이르게 한다.

癌에 대한 治療는 20세기 중반부터 化學療法, 放射線療法 등이 개발되어 治愈率의 점진적인 향상을 가져왔다. 최근 들어서는 腫瘍疫學, 腫瘍免疫學, 바이러스腫瘍學, 細胞生物學, 分子生物學 등의 발달에 힘입어 癌에 대한 이

해 및 治療에 關목할 만한 발전을 이루었다¹²⁾. 이와 더불어 최근 中國과 우리나라에서는 韓藥 등을 병용하는 東西醫學의 治療가 시도됨으로써 癌의 正복을 위한 綜合療法은 이제 새로운 국면에 접어들고 있다³³⁾.

癌에 대한 한의학적 치료는 扶正祛邪의 治療 원칙에 입각하여, 扶正은 健脾益氣法을 위주로, 祛邪를 위해서는 清熱解毒法, 軟堅散結法, 活血祛瘀法, 化痰祛濕法과 함께 消腫止痛藥을 활용하고 있다.^{33,47)} 전통적인 처방 가운데, 이러한 治療 이론을 고루 갖추고 있으면서 실제 임상적으로 활용되고 있는 加味慈桃丸은 『段鳳舞腫瘤積驗方』에 癌轉移의 抑制 및 再發 防止를 목적으로 수록된 處方이다⁵⁰⁾.

加味慈桃丸의 구성 약물 가운데, 山慈菇는 清熱解毒, 消癰散結하여 각종 癰疽나 惡瘡, 瘰癧, 結核 등을 治療하는 동시에 抗癌成分을 함유하고 있으며^{30,43,46)}, 桃仁은 活血祛瘀, 潤腸通便하여 瘰癧痞塊를 治療하고³⁰⁾, 薏苡仁은 利濕健脾, 清熱排膿하여 水腫, 脚氣, 肺癰, 腸癰 등을 治療하며³⁰⁾, 白芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하여 胸腹脇肋疼痛, 瀉痢疼痛, 崩漏, 帶下를 治療한다³⁰⁾.

최근 韓藥의 抗癌效果가 다양하게 연구되는 가운데, 임상적으로는 中西醫 結合에 의한 腫瘍 治療를 통해 腫瘍 환자의 生存率 上昇, 放射線 및 化學療法의 副作用 減少, 腫瘍의 外科 治療效果 向上, 腫瘍 發生에 대한 豫防 效果 등의 성과를 거두고 있으며^{44,45)}, 扶正培本劑 등을 이용한 動物 實驗을 통해 免疫機能 向上, 骨髓의 造血 機能 改善, 內分泌 및 體液에 대한 調節, 細胞內的 cAMP, cGMP의 比例 調節, 人體內的 해로운 自由基에 대한 拮抗 및 除去 등의 效果가 검증되고 있다⁴⁹⁾.

그러나 臨床에서 癌의 治療에 활용되고 있는 加味慈桃丸의 抗癌 및 免疫增強效果에 대해서

는 아직까지 客觀的인 研究가 이루어지지 않고 있다. 本 研究는 加味慈桃丸의 抗癌 및 免疫增強 效果를 實驗的으로 檢證함으로써 그 臨床的인 適用 妥當性을 確認하고자 하였다.

먼저 抗癌效果를 알아 보기 위하여 癌細胞의 生存能과 擔癌 생쥐의 生存日數, 腫瘍의 成長 抑制와 體重 등을 測定하였으며, 藥物의 毒性 與否 및 適正한 投與量의 選擇을 위하여 毒性 實驗을 하였다. 그리고 免疫 效果를 알아보기 위하여 遲延型 過敏反應, 赤血球 凝集素價와 溶血素價, Rosette 形成 細胞, 自然殺害細胞의 活性度, 淋巴球 增殖能, IL-2 生産能, carbon clearance에 의한 食食能 등을 測定하여 다음과 같이 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

實驗動物은 大韓實驗動物센터에서 분양받은 週齡 16~17週, 體重 18~22g의 ICR系 숫컷 흰색 생쥐를 實驗群과 對照群으로 나누어 사용

藥材名	生藥名(學名)	重量
山慈菇	Cremastrae Appendiculatae Tuber (<i>Cremastra appendiculata</i> NAKINO)	3.6g
桃仁	Persicae Semen (<i>Prunus persica</i> (L.) BATSCH)	3.6g
薏苡仁	Coicis Semen (<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>mayuen</i> STAPF)	7.2g
白芍藥	Paeoniae Radix Alba (<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.)	3.6g
合 計		18g

하였고, 赤血球 溶血素價의 測定을 위한 血清을 얻기 위하여 體重 2.5~3kg의 家兔를 사용하였다. 固形飼料(三養油脂, 小動物用)와 물은 制限없이 供給하면서 12시간 낮, 12시간 밤의 생활 리듬을 주었으며 飼育 溫度는 20~25℃를 유지한채 滅菌狀態에서 적어도 2週日間 適應시킨 후 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 사용한 藥材는 市中에서 구입하여 精選한 다음 사용하였으며, 處方은 『段鳳舞腫瘤積驗方』에 收載된 加味慈桃丸⁵⁰⁾으로, 그 內容 및 1日 服用分量은 다음과 같다.

2. 方法

1) 試料의 調製

加味慈桃丸 5日 分量, 90g을 각각 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 蒸溜水를 가하여 冷却器를 부착하고, 3시간 加熱煎湯한 뒤 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓濃縮한 후 凍結乾燥시켜 加味慈桃丸 乾燥엑기스 27.675g(收得率:30.75%)를 얻어 檢液으로 使用하였다.

2) 抗腫瘍에 대한 實驗

(1) 癌細胞의 生存能 測定

① 細胞株

實驗에 사용한 細胞株들은 成長速度는 빠르나 일부 抗癌劑에 耐性을 갖는 SNU-C4(大腸癌細胞株), 대부분의 기존 抗癌劑에 耐性을 나타내는 SNU-396(肝癌 細胞株)와 成長速度가 빠르고 비교적 抗癌劑 感受性이 예민한 SNU-1(胃癌 細胞株)를 사용하였다.

② MTT 檢索法

指數增殖期의 SNU-C4, SNU-396, SNU-1 細

胞를 1×10^4 cells/ml로 調整한 다음, 96 well 微細細胞培養板 (Falcon, U.S.A.)에 penicillin(100units/ml), streptomycin(100 μ g/ml), 10% 牛胎兒血清(fetal bovine serum;FBS)이 들어있는 RPMI-1640 細胞培養液 180 μ l에 20 μ l의 檢液을 넣었다. 檢液의 濃度는 최초의 濃度를 25mg/ml로 調整한 후 2배씩 稀釋시켜서 사용하였으며, 96 well 微細細胞培養板에 分株 직전에 0.22 μ m의 syringe filter로 濾過하여 사용하였다.

이후 3~4일간 37℃, 5% CO₂의 培養器에서 培養하면서 細胞의 增殖 程度를 位相差顯微鏡으로 수시로 觀察하였다.

藥物이 처리되지 않은 對照 well의 細胞들이 충분히 成長한 후, 培養液을 제거하고 각 well에 20 μ l의 MTT solution(5mg/ml in phosphate buffered saline : PBS)(Sigma, USA)에 넣고 37℃, 5% CO₂의 培養器에서 3시간 培養하였다. 그 후 100 μ l의 0.04M HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT 溶液과 反應하여 생긴 푸른 색의 formazan 結晶을 녹인 후 30분 안에 540nm에서의 吸光度(optical density)를 ELISA reader(BioTec, EL312e, U.S.A.)를 이용하여 測定하였다. 이때 參考波長으로 630nm를 이용하였다.

이 吸光度는 MTT가 細胞에 의해 formazan(bile)으로 分解된 量을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 細胞數(viable cells)와 비례한다. 이와 같이 吸光度를 測定한 후 아래의 公式와 같이 實驗群의 吸光度를 對照群의 吸光도와 비교하여 生存率을 구하였다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{實驗群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}}{\text{對照群의 平均 吸光度} - \text{基準 吸光度}} \times 100$$

③ 結果 分析

實驗群에서 각 well로부터 한 칼럼의 平均

OD540(파장 540nm에서의 optical density)값을 구하여 위의 공식에 의하여 對照群(100% 生存群)의 平均 OD540 값에 대한 百分率 값을 算出하였다. 이 百分率은 對照群과 비교한 實驗群의 細胞生存率에 해당하는 값이다. 50% 抑制濃度(inhibitory concentration : IC50)는 이 生存率 50%가 되도록 하는 藥物의 濃度로 正義하였으며, 이 IC50 값이 0.23mg/ml 이상으로 나타난 抽出物에 대해서는 抗癌活性이 없거나 미약한 것으로 看做하였다.

(2) 檢液의 投與

毒性實驗을 통해 생쥐에게 檢液을 10mg/kg, 20mg/kg 投與하였을 때 毒性이 誘導되지 않음을 확인한 후, 생쥐 10마리를 1군으로 하여 對照群, 加味慈桃丸 엑기스(Sample 投與群) 10mg/kg, 20mg/kg 투여군으로 나누었으며, 각 생쥐의 體重을 測定하여 檢液 1g/ml을 蒸溜水로 稀釋한 후 sample 投與群은 10mg/kg, 20mg/kg을 1일 1회 10일간 연속으로 經口投與하였다. 對照群에는 같은 양의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

(3) In vivo 抗腫瘍效果

① 生存日數의 測定

美國 National Cancer Institute(NCI)의 實驗方法⁶⁹⁾에 준하여 생쥐를 對照群, sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群으로 각각 10마리씩 나누고, L-12¹⁰cell 溶液을 한 마리당 0.1ml (2.0 × 10⁶cells/mouse)씩 腹腔內에 移植한 뒤 24시간 후부터 檢液을 10mg/kg, 20mg/kg씩 1일 1회 연속으로 經口投與하면서 壽命을 관찰하고 生存增加率(increase of life span : ILS%)을 구하였

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

T : Mean survival days of the sample group

C : Mean survival days of the control group

다. 對照群에는 같은 양의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

② 腫瘍成長抑制의 測定

美國 National Cancer Institute(NCI)의 實驗方法⁶⁹⁾에 준하여 생쥐를 對照群, sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群으로 각각 10마리씩 나누고, Sarcoma-180 細胞 溶液을 한 마리당 0.2ml (4.0 × 10⁶cells/mouse)씩을 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24시간 후부터 10일간 檢液을 1일 1회 연속으로 經口投與하고, Sarcoma-180 cell 投與 후 15일째 致死시켜 固型癌을 摘出하여 그 重量을 測定하고 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 sample group

C : Mean tumor weight of the control group

③ 體重의 測定

생쥐를 對照群과 sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群으로 각각 10마리씩 나누고, Sarcoma-180 cell 溶液을 한 마리당 0.2ml (4.0 × 10⁶ cells/mouse)씩을 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24시간 후부터 10일간 檢液을 1일 1회 연속으로 經口投與하고, Sarcoma-180cell 投與 후 15일째 致死시켜 固型癌을 摘出した 후 固型癌을 제외한 생쥐의 體重을 測定하였다.

3) 毒性 實驗

생쥐 10마리를 1군으로 하여 對照群, sample 投與群으로 나누었으며, 각 생쥐의 體重을 測定하여 sample 1g/ml을 蒸溜水로 稀釋한 후 sample 投與群에는 10mg/kg, 20mg/kg씩 1일 1회 10일간 연속으로 經口投與하면서 體重變化, 물

攝取量, 飼料 攝取量을 生理食鹽水를 經口投與한 對照群과 비교하였다.

4) 免疫에 대한 實驗

(1) 檢液의 投與

생쥐 10마리를 1군으로 하여 對照群과 sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群으로 나누었으며, 각 생쥐의 體重을 測定하여 sample 1g/ml을 蒸溜水로 稀釋하여 1일 1회 21일간 연속으로 經口投與하였다. 對照群에는 같은 양의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

(2) 抗原 55,64,65)

抗原으로는 緬羊 赤血球(Alsever sheep red blood cell, KOREA MEDIA CORP.)를 사용하여 4℃에서 보존하고, 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다.

(3) 免疫 55,64,65)

檢液 및 生理食鹽水를 1일 1회 21일간 經口投與한 후 對照群과 sample 投與群의 尾靜脈에 5×10^8 cells/ml의 濃度로 緬羊赤血球 浮遊液 0.2 ml을 注射하여 免疫시킨다.

(4) 免疫機能低下 誘發 26)

免疫機能低下 誘發은 檢液을 21일간 經口投與한 후 對照群과 sample 投與群에 methotrexate(유한메트트렉세이트정, 유한양행) 1mg/kg을 1일 1회 4일간 經口投與하여 免疫機能을 低下시켰다.

(5) 遲延型 過敏反應의 測定 36,38,65,67,71)

遲延型 過敏反應(delayed type hypersensitivity : DTH)의 測定은 Mitsuoka 등⁴⁾의 方法에 따라 免疫시킨 4일 후에 2×10^9 cells/ml로 調整된 緬

羊 赤血球 浮遊液 0.05ml을 左側後肢 足跖皮內에 注射하고, 24시간이 경과한 다음 足跖腫脹反應檢査를 시행하였다. 足跖腫脹 程度는 생쥐를 ether로 가볍게 痲醉시키고, digimatic caliper(Mitutoyo, Co. Tokyo, Japan)을 사용하여 左右側後肢足跖의 두께를 0.01mm까지 測定하여 左右足跖 두께의 차이를 계산하였다.

(6) 採血 및 血清의 分離

足跖腫脹反應檢査가 끝난 생쥐를 ether로 가볍게 痲醉하여 海부판에 고정하고 1회용 注射器(syring, 보인)로 心臟에서 약 1ml 採血한 다음 5ml용 plastic tube(Falcon, No.2058, Oxford, CA., U.S.A.)에 옮긴 후 1시간동안 室溫에서 방치하고 작은 유리봉으로 凝固된 血液을 수회 휘저은 후 遠心分離器로 2,000rpm에서 30분간 遠心分離시켜 上層의 血清을 다른 tube에 취하였다. 이 血清을 56℃에서 30분간 非動化시킨 후 赤血球 凝集素價와 赤血球 溶血素價의 測定에 사용하였다.

赤血球 溶血素價의 測定에 輔體로 사용된 家兔의 血清도 상기와 같은 方法으로 分離하여 非動化하지 않은 상태로 사용하였다.

(7) 赤血球 凝集素價의 測定 27,57,58,66,68,72)

緬羊赤血球에 대한 凝集素價(hemagglutinin titer)를 測定하기 위하여 생쥐의 心臟에서 採血한 血液을 分離하여 얻은 血清을 56℃에서 30분간 定置시키고 microtitration plate(Limbro chemical Co., Conn., U.S.A.)의 각 well에 磷酸鹽 緩衝食鹽液(phosphate buffered saline : PBS, pH 7.2)으로 2배 系列稀釋한 血清 25μl에 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液 50μl씩 가하여 잘 혼합한 다음 37℃, 5% CO₂培養器내에서 18시간 放置한 후 赤血球凝集反應을 관찰판독하였으며, 赤血球凝集을 일으키는 血清의 最大稀釋倍數를 凝

集素價로 測定하였다.

(8) 赤血球 溶血素價의 測定 27,57,58,66,68,72)

緬羊赤血球에 대한 溶血素價(hemolysin titer)를 測定하기 위하여 위의 方法으로 定置시킨 血清을 microtitration plate의 각 well에 PBS로 2배 系列稀釋한 血清 25 μ l에 0.5% 緬羊赤血球 浮遊液 50 μ l씩 가한 다음 각 well에 輔體로서 5배 稀釋한 집토끼의 血清을 25 μ l씩 가하여 잘 混合하고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器내에서 1시간 동안 放置한 후 緬羊赤血球가 완전히 溶血을 일으키는 最大稀釋倍數를 溶血數價로 算定하였다.

(9) 脾臟細胞浮遊液의 準備

採血이 끝난 생쥐를 頸椎脫骨로 致死시킨 후 腹部를 alcohol로 완전히 塗布하여 無菌의으로 脾臟을 摘出した 다음 脾臟 주위의 組織들을 조심스럽게 제거하고나서 차가운 完全 培養液 RPMI-1640으로 洗滌하였다. 準備된 脾臟을 cell dissociation sieve-tissue grinder kit(Sigma U.S.A.)로 잘게 으갠 뒤 組織破片을 제거한 후 RPMI-1640으로 2회 洗滌하였다.

그 후 滅菌된 蒸溜水로서 hypotonic shock를 일으켜 赤血球를 파괴한 후 10배의 Hank's balanced salt solution(HBSS : Gibco, NO. 310-4020)으로 2회 洗滌하고 다시 RPMI-1640으로 1회 洗滌한 후, 10% 牛胎兒血清(fetal bovine serum : FBS)이 添加된 RPMI-1640培地에 脾臟 淋巴球를 재부유시켰다.

(10) Rosette 形成細胞數의 測定 53,54,66)

Rosette 形成細胞(rosette forming cells : RFC)의 測定은 Bach68) 등의 方法에 준하여 測定하였으며, 遠心洗滌한 脾臟細胞浮遊液을 1 10⁷cells/ml의 濃度로 調整한 것과 3 \times 10⁸cells/ml의 濃度로 調整한 緬羊赤血球浮遊液을 12 75

mm plastic tube(Falcon No.2058, Oxford, CA., U.S.A.)에 각각 0.5ml씩 넣고 混合하여 遠心分離器로 980 rpm에서 5분간 遠心分離 시킨 후 4 $^{\circ}$ C 冷水槽에서 30분간 放置 후 HBSS 1ml를 가하면서 細胞를 재부유시킨 다음, 細胞培養液을 血球計算板(American Optica Buffalo, N.Y., U.S.A.)위에 한 방울 떨어 뜨리고 450倍率로 檢鏡觀察 하였다.

脾臟細胞에 緬羊赤血球가 4개 이상 부착된 경우를 rosette形成細胞로 정하여 106 脾臟細胞當 103 rosette 形成細胞數를 算定하였다.

(11) 自然殺害細胞의 活性度 測定 7,9,16,56,62,63)

① 作動細胞 및 標의細胞의 準備

위의 實驗方法에 의해 準備한 脾臟細胞를 作動細胞로 사용하고, 自然殺害細胞의 殺害能測定時의 標의細胞는 韓國細胞株銀行에서 분양 받은 생쥐 유래 YAC-1 淋巴腫細胞(TIB-160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 實驗室에서 10% FBS가 添加된 RPMI 1640 培養液으로 繼代 培養하면서 測定하였다.

② 細胞毒性的 測定

i) 基本方法

細胞毒性實驗은 Promega社의 Cytotox 96TM Non-radioactive Cyto-toxicity Assay KIT를 이용하였다. 이 KIT는 53Cr assay를 代替하는 方法으로 細胞의 溶解時에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 酵素反應의 結果로 붉은색의 formazan 結晶을 생성하는데, 이를 ELISA 판독기를 이용하여 可視光線領域의 波長(490nm)으로 吸光度를 測定함으로써 溶解된 細胞의 數를 測定하는 것이다.

이것을 이용하여 cell-mediated cytotoxicity를 測定할 수 있다.

ii) 對照 well의 準備

5종류의 對照 well을 두었는데, 이는 誤差를 補整하기 위한 것이다. 對照 well 1은 標的細胞의 LDH 自然放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ l와 培地 100 μ l로 구성하였고, 對照 well 2는 標的細胞의 LDH 最大放出量을 나타내는 것으로 最適數의 標的細胞 100 μ l와 培地 100 μ l로 구성하였으며 培養이 끝나기 45분전에 20 μ l의 lysis solution(溶解溶液)을 添加하였다. 對照 well 3은 作動細胞의 LDH 自然放出量을 나타낸 것으로 最適數의 作動細胞 100 μ l와 培地 100 μ l로 구성하였고, 對照 well 4는 溶解溶液을 添加하여 발생하는 부피의 變化에 의한 誤差를 補整하기 위한 것으로 培地 200 μ l와 溶解溶液(10 \times) 20 μ l로 구성하였다. 對照 well 5는 培地の background로서 培地內 血清이나 phenol red에 기인한 LDH의 活動能을 補整하기 위한 것으로 培地 200 μ l로 구성하였다.

iii) 測定方法

NK 活性度の 細胞毒性能 測定은 YAC-1細胞를 標的細胞로 이용하여, 10% FBS가 添加된 混合培地에 5 \times 10⁴cells/ml의 濃度로 제조하고, 96 well 微細細胞培養板(U-bottom plate)에 100 μ l/well씩 分株한 후, 作動細胞와 標的細胞의 比가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, 10% FBS가 添加된 混合培地에 각각 5 \times 10⁶cells/ml, 2.5 \times 10⁶cells/ml, 5 \times 10⁵cells/ml의 濃度로 調整된 脾臟細胞 100 μ l를 分株하여 최종 부피가 200 μ l/well이 되도록 하였다.

對照 well은 위의 方法에 의해 準備하였으며, 그리고 나서 微細細胞培養板을 1,100rpm에서 4분간 遠心分離시킨 후, 4시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養器에서 培養하였다. 또한 培養完了 45분전에 對照 well 2에 100 μ l당 10 μ l의 溶解溶液(\times 10)을 添加하였다. 培養이 끝난 뒤 37 $^{\circ}$ C,

1,100rpm에서 4분간 遠心分離하고, 새로운 96 well plate(Flat-bottom plate)에 上層液을 50 μ l 옮긴 후 測定 buffer 12ml를 基質 混合器에 넣어 再造合基質을 만든 후, 각 well에 50 μ l씩 넣고 常溫에서 30분간 培養하였다. 이때 알루미늄 호일로 빛을 차단하였다. 培養後 50 μ l의 停止溶液(stop solution)을 각 well에 넣은 후 注射器로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490nm에서 吸光度를 測定하였다. 測定된 實驗값, 標的細胞 LDH 自然放出값, 作動細胞 LDH 自然放出量에서 培地の background값을 빼고, 標的細胞 LDH 最大放出量에서 부피 補整값을 뺐다.

그 후 다음의 公式에 의하여 細胞 毒性能을 測定하였다.

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

A : 測定된 實驗값 - 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

(12) 淋巴球增殖值 測定^{55,70)}

위의 方法으로 浮遊된 脾臟淋巴球를 1 \times 10⁶ cells/ml의 濃度로 調整한 뒤, T-細胞 有絲分裂 誘導物質인 Concanavalin-A(Sigma, U.S.A.)를 10 μ l/ml의 濃度로 添加하고, 96 well microplate에 100 μ l/well씩 分株한 후, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培養器에서 72시간 培養한 다음 細胞株를 採集하였다. [3H]-thymidine(New England Nuclear, Boston MA, U.S.A.)을 각 well당 1 μ Ci씩 가하여 18시간 동안 追加 培養하였다. 그 후 自動細胞收集器(SKATRON, Skatron instrument, Norway)로 glass fiber filter상에 收去한 후 이를 室溫에서

乾燥시킨 뒤 counting vial에 넣어 5ml의 cocktail 용액(5g ppo., 250mg popop을 toluene 1 l 에 녹임)으로 용해시킨 후 同位元素 測定器인 β -counter(Beckman, LS 3801, U.S.A.)에서 DNA合成時 陷入된 [3H]-thymidine量을 counter per minute(cpm)으로 測定하고, 實驗도 3倍數로 하였다.

(13) Interleukin-2 生産能 測定 30,31)

檢液投與후 생쥐를 致死시켜 脾臟을 摘出한 다음, 脾臟細胞를 10% FBS-RPMI 1640 培養液에 5×10^6 cells/ml의 濃度로 調整하고, 여기에 Concanavalin-A를 100 μ g/ml의 濃度로 添加한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養器에서 24시간동안 각각 培養한 후 遠心分離하여 上層液을 收去하여 Interleukin-2(이하 IL-2)의 生産能을 測定하였다.

생쥐 IL-2의 測定은 Intertest-2X Kit(Genzyme, USA)를 이용하여 測定하였다. Intertest-2X Kit는 mouse IL-2 測定用 ELISA Kit로서 固形相 酵素免疫法을 이용한 測定法으로 450nm의 波長에서 吸光度를 測定하여 標準曲線으로부터 試料 내의 IL-2 量을 算定할 수 있는 方法이다.

96 well plate의 각 well에 sample을 100 μ l씩 分株하고 덮개를 덮고나서 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 培養하였다. Well의 액체를 제거하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 biotinylated polyclonal anti-mouse IL-2를 100 μ l씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 培養하였다. 그 후 well의 反應溶液을 제거하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 streptoavidin-peroxidase를 100 μ l씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 培養하였다. 다시 well의 反應溶液을 제거하고 洗滌用 buffer로 4번 洗滌 후 plate를 濾過紙로 말리고 각 well에 基

質을 100 μ l씩 分株하여 다시 덮개로 덮은 후 常溫에서 10분간 培養하였다.

다시 각 well에 停止溶液을 100 μ l씩 分株한 후 ELISA 判讀機(Emax precision microplate reader, Molecular devices, U.S.A.)로 波長 450nm에서 吸光度를 測定하였다.

(14) Carbon clearance에 의한 食食能 測定 1,27,29)

細網內皮系 食食能의 測定은 Biozzi 등의 方法에 의하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon 16mg을 注射하고 1분, 5분 후에 眼窩에서 25 μ l씩 血液을 micropipette로 채취하고 0.1% Na₂CO₃ 2ml에 溶血시켜 分光光度計(Spectrophotometer, U-2000, Hitachi, Japan)를 사용하여 波長 675nm에서 微小血管內 炭素濃度를 測定하였으며, 食食指數 K는 아래의 公式에 의하여 算出하였다.

$$\text{Phagocytic index } K = \frac{\log C_1 - \log_2}{T_2 - T_1}$$

C₁: 시간 T₁에서의 sample 血液中の carbon 濃度

C₂: 시간 T₂에서의 sample 血液中の carbon 濃度

T₁: 처음 採血時間

T₂: 마지막 採血時間

III. 實驗成績

1. 癌細胞 生存能에 대한 效果

加味慈桃丸 액기스(sample)가 SNU-C4(大腸癌 細胞株), SNU-396(肝癌 細胞株) 및 SNU-1(胃癌 細胞株)의 成長에 미치는 影響을 MTT 檢索法을 통하여 관찰한 結果 SNU-C4, SNU-396 및 SNU-1에 대한 IC50 (50% 抑制濃度)의

Table I. IC₅₀ of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) on SNU-C4, SNU-396 and SNU-1

Groups	IC ₅₀ ^{a)} (mg/ml)		
Groups	SNU-C4	SNU-396	SNU-1
Sample	2.52	0.41	0.09

a) : IC₅₀ = 50% Inhibitory Concentration
 Sample : Group of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) administered.

값이 sample 投與群에서는 각각 2.52mg/ml, 0.41 mg/ml 및 0.09mg/ml으로 나타났다(Table I).

2. 毒性實驗

Sample을 經口로 投與했을 때의 毒性程度를 알아 보기 위해 25g 전후의 생쥐에게 10mg/kg, 20mg/kg의 Sample을 投與한 實驗群 및 生理食鹽水を 投與한 對照群에 있어서의 體重變化를 보았다.

10일간의 投與期間 중 처음 7일간은 sample 投與群의 경우 2~3g의 體重低下가 보였으나, 이후 계속 增加하여 18일째에는 2g 程度의 體重增加가 나타났다. 같은 期間 對照群은 18일째에 3g 程度의 體重增加를 보였다.

이 期間中 물 및 飼料 攝取量도 對照群에 비해 처음 7일에는 3ml/日, 1g/日로 감소하였으나 이후 계속 增加하여 18일째에는 오히려 飼料攝

取量이 2g/日 程度 增加하는 傾向을 보였다.

따라서 加味慈桃丸 10mg/kg, 20mg/kg 投與로는 毒性이 誘導되지 않음을 확인할 수 있었다 (Table II).

3. 生存期間延長에 대한 效果

L-1210 cell을 腹腔內에 移植한 생쥐의 生存 期間은 生理食鹽水を 投與한 對照群의 平均生存日數가 15.25±1.21日인데 비하여, sample 投與群의 平均生存日數는 10mg/kg 投與群에서 40.72±1.12日, 20mg/kg 投與群에서 53.38±0.89日로 對照群에 비하여 增加하였으며 有意性(P < 0.001)이 認定되었다(Table III).

4. 腫瘍成長抑制에 대한 效果

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24시간 후부터 각 檢液을 10일간 연속으로 投與하고 Sarcoma-180 cell 投與後 15일째 致死시켜 固型癌을 摘出하여 그 重量을 測定하고 腫瘍成長抑制率(TIR%)을 계산한 바, 生理食鹽水を 投與한 對照群이 平均 2.58 0.28g의 腫瘍成長을 보인 반면, sample 投與群에서는 10mg/kg 投與群에서 平均 1.95 0.15g으로 24.4%의 腫瘍成長抑制率을 보였고, 20mg/kg 投與群에서는 1.33 0.11g으로 48.4%의 腫瘍成長

Table II. Body weight of mice treated with Jiaweicitaowan(加未慈桃丸)

Groups	Number of Animals	Dose(mg/kg)	Body Weight (g)		
			1 day	7 day	18 day
Control Sample	10	-	25.1 0.15a)	26.4 0.24	27.8 0.23
	10	10	24.8 0.19	23.1 0.24	27.1 0.19
	10	20	25.2 0.23	22.9 0.21	27.5 0.33

a) : Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
 Control : Group of normal saline administered.

Table III. Mean survival days of mice treated with *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸), after L-1210 cells transplantation into the peritoneal cavity

Groups	Number of Animals	Dose(mg/kg)	Mean Survival Days	ILS ^b (%)
ControlSample	10	-	15.25 ± 1.21a)	-
	10	10	40.72 ± 1.12***	167
	10	20	53.38 ± 0.89***	250

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

*** : Statistically significant as compared with control group(p<0.001).

b) : ILS (%) (T-C)/C 100

where, T Mean survival days of the sample group.

C Mean survival days of the control group.

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered..

Table IV. Tumor weight of mice treated with *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) after Sarcoma-180 cells transplantation into the left groin.

Groups	Number of Animals	Dose(mg/kg)	Tumor Weight(g)	TIR ^b (%)
Control Sample	10	-	2.58 ± 0.28 ^a)	-
	10	10	1.95 ± 0.15	24.4
	10	20	1.33 ± 0.11***	48.4

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

*** : Statistically significant as compared with control group(p<0.001).

b) : TIR (%) (C-T)/C 100

where, T Mean tumor weight of the sample group.

C Mean tumor weight of the control group.

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

抑制率을 보여 대조군에 비하여 有意性(P < 0.001)이 認定되었다(Table IV).

5. 體重變化에 대한 效果

Sarcoma-180 cell 溶液을 생쥐의 왼쪽 鼠蹊部에 注入한 뒤 24시간 후부터 각 檢液을 10일간 연속으로 投與하고 Sarcoma-180 cell 投與후 15일째 致死시켜 固型癌을 摘出した 후 固型癌을

제외한 생쥐의 體重을 測定한 바, 生理食鹽水를 投與한 對照群의 1일, 15일째 體重은 각각 19.46 ± 0.14g, 19.13 ± 0.25g으로 0.33 ± 0.30g의 體重감소를 보인데 비하여, sample 投與群은 10mg/kg 投與群에서 0.65 ± 0.11g의 體重增加를 보여 對照群에 비하여 P<0.01의 有意性이 認定되었고, 20mg/kg 投與群에서는 0.49 ± 0.12g의 體重增加를 보여 對照群에 비하여 P<0.05의 有意性이 認定되었다(Table V).

6. 遲延型 過敏反應에 대한 效果

加味慈桃丸(10mg/kg, 20mg/kg) 및 生理食鹽水를 21일간 經口投與한 후 實驗群과 對照群간의 遲延型 過敏反應을 비교하기 위하여 緬羊赤血球로 免疫시킨 4일 후 緬羊赤血球를 右側後肢 足跖皮內에 注射한 다음 24시간이 경과한 후, 左右側後肢 足跖의 腫脹程度를 測定하여 차이를 計算하였던 바, 對照群이 0.19 ± 0.02mm, sample

Table VI. Effects of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) on the delayed type hypersensitivity (DTH) response in methotrexate-pretreated mice at 24 hours after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Footpad
			Swelling(mm)
Controls	10	-	0.19 ± 0.02 ^{a)}
Sample	10	10	0.21 ± 0.03
	10	20	0.18 ± 0.02

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) administered.

Table V. Body weight of mice treated with Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) after Sarcoma-180 cells transplantation into the left groin.

Groups	Number of Animals	Dose(mg/kg)	Body Weight (g)		
			1 day	15 day	15-1 day
Controls Sample	10	-	19.46 ± 0.14a)	19.13 ± 0.25	-0.33 ± 0.30
	10	10	19.41 ± 0.20	20.06 ± 0.22	0.65 ± 0.11**
	10	20	19.45 ± 0.18	19.94 ± 0.21	0.49 ± 0.12*

a) : Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(p<0.05).

** : Statistically significant as compared with control group(p<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of Jiaweicitaowan(加未慈桃丸) administered.

投與群은 10mg/kg 投與群이 0.21 ± 0.03mm, 20mg/kg 投與群이 0.18 ± 0.02mm로 나타나 對照群에 비하여 實驗群은 모두 별다른 차이를 안 보여 有意性이 認定되지 않았다(Table VI).

7. 赤血球 凝集素價에 대한 效果

實驗群과 對照群간의 緬羊赤血球에 대한 凝集素價를 測定하여 log₂ 값으로 計算하였던 바, 對照群이 6.84 ± 2.10, sample 投與群은 10mg/kg 投與群이 9.64 ± 1.88, 20mg/kg 投與群이 10.33 ± 2.04로 對照群에 비하여 實驗群 모두에서 增加하는 傾向을 나타내었다(Table VII).

8. 赤血球 溶血素價에 대한 效果

實驗群과 對照群간의 緬羊赤血球에 대한 溶血素價를 測定하여 log₂ 값으로 計算하였던 바, 對照群이 6.92 ± 1.21, sample 投與群은 10mg/kg 投與群이 9.04 ± 1.12, 20mg/kg 投與群은 11.42 ± 0.89로 對照群에 비하여 P<0.01의 有意性 있는 增加를 나타내었다(Table VIII).

Table VII. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the hemagglutinin titer in methotrexate-pretreated mice at 24 hours after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Hemagglutinin (Log ₂ titer)
Controls	10	-	6.84 ± 2.10 ^{a)}
	10	10	9.64 ± 1.88
Sample	10	20	10.33 ± 2.04

a) : Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
 Control : Group of normal saline administered.
 Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

Table VIII. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the hemolysin titer in methotrexate-pretreated mice at 24 hours after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Hemolysin (log ₂ titer)
Controls	10	-	6.92 ± 1.21 ^{a)}
	10	10	9.04 ± 1.12
Sample	10	20	11.42 ± 0.89 ^{**}

a) : Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
^{**} : Statistically significant as compared with control group(p<0.01).
 Control : Group of normal saline administered.
 Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

9. Rosette 形成細胞數에 대한 效果

抗原인 緬羊赤血球에 대한 實驗群과 對照群 간의 免疫反應細胞數를 비교하기 위하여 脾臟 소포에 緬羊赤血球가 4개 이상 부착된 경우를 Rosette 形成細胞로 정하여 106 脾臟細胞當 103 Rosette 形成細胞數를 算定한 結果, 對照群이

22.14 ± 1.21인데 비하여, sample 投與群은 10mg/kg 投與群이 23.08 ± 1.13로 對照群에 비하여 약간 增加하는 傾向을 보였으나 有意性은 認定되지 않았고, 20mg/kg 投與群은 31.42 ± 1.14로 나타나 有意性(P<0.001)이 認定되었다.(Table IX).

Table IX. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the appearance of rosette forming cells in methotrexate-pretreated mice at 24 hours after challenge with SRBC

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	103 RFC / 106 spleen cells
Controls	10	-	22.14 ± 1.21 ^{a)}
	10	10	23.08 ± 1.13
Sample	10	20	31.42 ± 1.14 ^{***}

a) : Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
 Control : Group of normal saline administered.
 Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

10. 自然殺害細胞活性에 대한 效果

自然殺害細胞의 活性度를 비교하기 위하여 作動細胞와 標的細胞의 비가 각각 100:1, 50:1, 10:1이 되도록 調整하여 實驗한 후 % Cytotoxicity를 測定하였던 바, 作動細胞와 標的細胞의 비가 100:1의 경우 對照群에서는 23.31 ± 2.44%인데 비하여 sample 投與群은 10mg/kg, 20mg/kg 投與群에서는 각각 36.83 ± 5.04%와 43.88 ± 6.42%로 有意性있는 增加를 보였고, 50:1의 경우 對照群 39.88 ± 5.87%, sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群 48.31 ± 7.48%, 51.82 ± 4.12%로 增加하는 傾向을 보였으나 유의성은 인정되지 않았으며, 10:1의 경우 對照群 40.62 ± 7.62%, sample 投與群 10mg/kg, 20mg/kg 投與

Table X. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the natural killer cell activity at Effector/Target Cell Ratio with 100:1, 50:1, 10:1 in methotrexate- pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose(mg/kg)	Cytotoxicity (%)		
			100 : 1	50 : 1	10 : 1
Controls Sample	10	-	23.31±2.44a)	39.88±5.87	40.62±7.62
	10	10	36.83±5.04*	48.31±7.48	50.13±9.08
	10	20	43.88±6.42**	51.82±4.12	41.64±7.42

a): Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

* : Statistically significant as compared with control group(p<0.05).

** : Statistically significant as compared with control group(p<0.01).

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

群 각각 50.13±9.08%와 41.64±7.42%로 증가하는 傾向을 보였다(Table X).

群이 178.42±31.44cpm 인데 비하여, sample 10 mg/kg, 20mg/kg 投與群이 각각 483.44±33.56cpm, 866.12±86.42cpm으로 증가하여 모두 P<0.001의 有意성이 認定되었다(Table XI).

11. 淋巴球 增殖能에 대한 效果

생쥐 脾臟細胞를 Concanvalin-A로 刺戟 培養한 후 그 增殖을 비교하기 위하여 [3H]-thymidine의 吸收 程度를 測定하였던 바, 對照

12. Interleukin-2 生産能에 대한 效果

Interleukin-2 生産能을 비교하기 위하여 이를 測定하였던 바, 對照群이 182.11±5.63pg/ml인 데 비하여, sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群이 각각 232.42±10.52pg/ml와 631.35±13.47pg/ml로 각각 P<0.001의 有意성이 認定되었다(Table XII).

Table XI. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the Lymphocyte Transformation in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Proliferation (cpm)
Controls Sample	10	-	178.42±31.44 ^{a)}
	10	10	483.44±33.56 ^{***}
	10	20	866.12±86.42 ^{***}

a): Mean ± standard error.

Student's t-test was used as statistical method.

*** : Statistically significant as compared with control group(p<0.001).

Control : Group of normal saline administered.

Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

13. Carbon clearance에 의한 食食能에 대한 效果

實驗群과 對照群간의 巨食細胞 活性度를 비교해보기 위하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon을 注射하여 carbon clearance를 測定하였던 바, 對照群의 phagocytic index K값이 0.00713±0.00038인 데 비하여, sample 10mg/kg, 20mg/kg 投與群은 각각 0.00889±0.00063, 0.02134±0.00113로 증

IV. 考 察

Table XII. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the Interleukin-2 Productivity in methotrexate-pretreated mice

Group	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Interleukin-2 (pg/ml)
Controls	10	-	182.11 ± 5.63 ^{a)}
	10	10	232.42 ± 10.52***
Sample	10	20	631.35 ± 13.47***

a): Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
 *** : Statistically significant as compared with control group(p<0.001).
 Control : Group of normal saline administered.
 Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.administered.

Table XIII. Effects of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) on the phagocytic index K in methotrexate-pretreated mice

Groups	Number of Animals	Dose (mg/kg)	Carbon clearance (K-index: × 10 ⁻³)
Controls	10	-	7.13 ± 0.38 ^{a)}
	10	10	8.89 ± 0.63*
Sample	10	20	21.34 ± 1.13***

a) : Mean ± standard error.
 Student's t-test was used as statistical method.
 * : Statistically significant as compared with control group(p<0.05).
 *** : Statistically significant as compared with control group(p<0.001).
 Control : Group of normal saline administered.
 Sample : Group of *Jiaweicitaowan*(加未慈桃丸) administered.

加하여 對照群에 비하여 有意性이 認定되었다 (Table XIII).

1940년대 이전까지 不治病으로 여겨졌던 癌疾患은 그동안 관련 학문의 비약적인 발전에 따라 점차 관리 가능한 질환으로 인식이 바뀌었고, 최근에는 분자생물학적 연구의 발달로 가까운 시일내에 癌정복이 가능하리라는 전망을 낳고 있다. 그럼에도 불구하고 癌은 최근 50년간 급격히 增加하여 세계적으로 가장 중요한 死亡原因의 하나로 되었고 특히 산업의 발달에 따른 환경의 변화는 암질환의 발생 양태에도 변화를 주어서 우리나라의 경우 소화기계 종양에서 大腸癌과 肝臟癌의 증가와 직업적 폭로의 증가에 따른 肺癌의 발생 빈도가 높아질 것으로 추정되고 있다^{14,21)}.

서양의학에서의 종양 치료 방법은 手術, 放射線療法, 化學療法, 免疫療法^{12,14,22)} 등이 있는데, 手術은 조기에 치료할 경우 완치가 가능하지만 말기환자나 전이되어 재발하는 경우에는 적절하지 못하다. 放射線療法은 국소치료를 통해 암세포 소멸, 억제효과가 뛰어나지만 조혈계통, 소화기계통, 면역계통 등에 대한 부작용을 갖고 있다. 化學療法은 전신적인 치료법이지만 정상세포와 암세포를 구분하지 못하는 단점이 있으며, 암세포를 특이적으로 인식하는 免疫療法 역시 종양의 크기나 일부 요인에 의해 작용이 차단되는 경우가 있는 등의 임상적 한계를 갖고 있다¹²⁾.

최근 中國에서는 中西醫 結合에 의한 종양 치료를 통해 종양 환자의 생존을 향상, 방사선 및 화학치료의 부작용 감소, 종양의 외과치료 효과 향상, 종양 발생에 대한 예방 효과 등의 임상적 성과를 거두고 있으며⁴⁵⁾, 실험적으로도 실험동물의 면역기능 향상, 골수의 조혈 기능 개선, 내분비 및 체액에 대한 조절, 세포내의 cAMP, cGMP의 비례 조절, 인체내의 해로운 자

由基에 대한 길항 및 제거 등의 효과를 입증한 바 있다⁴⁹⁾.

韓醫學에서 腫瘍에 관한 기록은 오래 전부터 전해져 왔는데, 『黃帝內經』에서는 ‘營衛不通’, ‘寒氣客於腸外與衛氣相搏’, ‘喜怒不適, … 寒溫不時, 邪氣勝之, 積聚已留’ 등으로 종양의 病因을 설명하였고³³⁾, 膈中, 積聚, 石瘕 등 종양과 유사한 질병에 대한 설명이 기재되어 있다³⁵⁾. 한의학에서 종양의 병인에 대한 인식은 『靈樞·九鍼論』에 “四時八風之客於經絡之中, 爲瘤病者也”, 『靈樞·刺節眞邪』에 “虛邪之入於身也, 寒與熱相搏, 久留而內著, … 發爲筋瘤, … 腸瘤”, 『靈樞·百病始生』에 “積之所生, 得寒乃生, 關乃成積也”라 하여 六淫이 인체를 침범하여 오래도록 낫지 않으면 종양이 될 수 있다³⁵⁾고 하였다. 특히 精神의 因子를 중시하였는데, 지나친 흥분과 억제는 氣血과 臟腑의 기능에 영향을 미치기 때문에 七情의 변화는 종양의 병인 가운데 중요한 위치를 차지하였다. 『內經』에서 胃腸管의 腫瘍에 해당하는 噎膈을 ‘暴憂之病’^{34,51)}이라 한 것이 그 예이다. 또한 飲食의 장기적인 物理的 刺戟이나 厚味過多, 飲食不節 등이 모두 종양의 원인이 된다. 癭癧, 瘰癧의 痰飲이나 癥瘕, 積聚의 瘀血 등 續發性 病因도 종양의 중요한 병인으로 작용한다³³⁾.

이러한 六淫, 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 病因이 인체에 작용하여 종양을 형성하는 病理는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 臟腑失調 氣血虧虛, 經絡痞阻 등의 변화를 거치게 된다³³⁾.

治療法으로는 辨證論治에 근거한 扶正과 祛邪의 輕重緩急이 조절되어야 한다는 理論을 바탕으로, 正氣의 補養을 위주로 하면서 破積, 活血, 解鬱, 行氣 등의 治法을 겸용하고 있다. 특히 최근에는 健脾益氣法를 위주로 한 扶正祛邪法과 扶正培本法이 많이 이용되고 있으며, 祛邪의 方法으로는 活血化瘀法, 清熱解毒法,

軟堅散結法 등이 활용되고 있다⁴⁷⁾.

이러한 治法을 두루 갖추고 있으면서 현재 암치료에 활용되고 있는 처방중에는 加味慈桃丸이 있다. 이 처방의 구성약물에 대해 살펴 보면, 山慈菇는 辛寒有小毒清하여 清熱解毒시키 消癰散結하므로 각종 癰疽나 惡瘡, 瘰癧, 結核 등을 治療한다³⁰⁾. 山慈菇의 藥理成分인 colchicine은 微細小管(tubulin)과 결합하여 方錘體의 형성을 저지하는 細胞周期 特異性 藥物로서 腫瘍의 성장을 정체시킨다. 특히 분열이 왕성하고 대사속도가 빠를수록 colchicine의 공격을 잘 받는다^{43,46)}. 桃仁은 活血祛瘀, 潤腸通便하여 癥瘕痞塊를 治療하며³⁰⁾, 藥理成分인 amygdalin은 종양환자의 貧血을 개선시키고 疼痛을 완해한다. 다른 藥物과 配伍하여 사용하였을 때에는 腦腫瘍, 骨腫瘍, 鼻咽腔癌 등에 유효한 것으로 보고되었다⁴⁸⁾. 薏苡仁은 利濕健脾, 清熱排膿하여 水腫, 脚氣, 肺癰, 腸癰 등을 治療하고³⁰⁾, 암세포 살상, 억제작용이 있어 肺癌, 腸癌, 胃癌, 子宮頸部癌, 絨毛膜上皮癌 등을 治療한다^{46,48)}. 白芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하여 胸腹脇肋疼痛, 瀉痢疼痛, 崩漏, 帶下를 治療하며³⁰⁾. 淋巴母細胞의 轉化를 촉진하여 종양의 성장을 억제하며 細胞性, 體液性 免疫系統에 모두 촉진 작용이 있다⁴⁸⁾.

최근 단일약물의 항암효과에 대한 실험연구로는 人蔘^{5,32,37)}, 鹿茸⁵⁾, 鹿血²⁹⁾, 猪芥²⁹⁾, 穿山甲²⁹⁾, 地榆, 金銀花²⁹⁾, 荊芥²⁹⁾, 貢砂仁²⁹⁾, 魚腥草^{18,29)}, 東風菜²⁷⁾, 靈芝¹⁷⁾, 仙鶴草¹⁷⁾, 巴豆³¹⁾ 등이 있다.

複合處方의 臨床報告로는 李 등²⁴⁾이 242명의 癌患者를 대상으로 消積白朮散을 洋方 抗癌治療와 併用하여 抗癌劑 副作用 抑制效果가 있음을 報告하였다.

실험적 연구로는 息賁丸¹⁾, 痞氣丸³⁹⁾, 肥氣丸^{1,4)}이 白血病과 淋巴腫患者에서 추출한 癌細胞

에 抗癌效果가 있다는 報告 및 伏梁丸³⁾, 消積正元散⁴⁾이 각종 癌細胞株의 成長을 抑制하는 效果가 있다는 報告, 六君子湯¹⁸⁾, 小柴胡湯¹⁸⁾, 四妙湯¹⁰⁾, 大柴胡湯¹⁰⁾, 防毒湯²³⁾, 半夏白朮天麻湯¹³⁾, 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯²⁵⁾등이 抗癌作用 및 免疫反應에 效果를 보인다는 報告가 있다.

十全大補湯 및 그 加味方에 관한 연구⁴²⁾에서는 擔癌생쥐의 生存期間 延長과 免疫機能을 저하시킨 생쥐의 遲延型 過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, rosette 形成細胞數, 自然殺害細胞活性化度 및 食食能 測定 등에서 비교적 有意性있는 結果를 보였다. 消積保中丸¹¹⁾에 관한 연구에서는 濃度依存的으로 癌細胞의 成長을 抑制하며, 平均生存期間이 延長되었고, 自然殺害細胞活性化도를 증가시켰음을 報告하였다.

李 등²⁰⁾은 마우스 脾臟細胞의 增殖能을 放射線 照射후에 補中益氣湯과 四六湯을 투여하여 血細胞의 增殖이 촉진됨을 보고하였으며, 金 등⁸⁾은 參茸扶正湯이 脾臟細胞의 增殖 促進效果, 造血促進因子 分泌效果, 淋巴球와 造血細胞에 대한 放射線 防禦效果에 있어 모두 有意性있는 效果를 나타내었음을 報告하였다.

四物湯¹⁵⁾의 抗癌劑 副作用 抑制에 실험적 연구에서는 정상 白鼠의 抗癌劑 副作用 抑制效果는 인정되나 擔癌생쥐에서의 抗癌劑 副作用 抑制效果는 有意성이 인정되지 않았다고 報告하였다.

膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯²⁾의 抗癌 및 免疫調節作用에 관한 연구에서는 B cell의 含量과 淋巴球 增殖을 有意성있게 증가시켰다고 報告하였다.

加味慈桃丸은 『段鳳舞腫瘤積驗方』에 수록되어 있으며⁵⁰⁾, 乳房癌이나 腦腫瘍의 수술후 전이 및 재발을 예방하거나 수술, 방사선, 화학

요법과의 병용치료에 활용되어지고 있는데, 아직까지 그 항암 및 면역강화효과에 대한 객관적인 연구는 보고된 바 없다.

加味慈桃丸의 in vitro에서의 抗癌效果를 알아보기 위해 SNU-C4(大腸癌 細胞株), SNU-396(肝癌 細胞株), SNU-1(胃癌 細胞株)의 增殖에 미치는 영향을 검토한 결과, 각각의 IC50치가 2.52mg/ml, 0.41mg/ml, 0.09mg/ml로 나타났으며, 이는 적어도 1×10^{-4} mg/ml 정도가 되어야 기존 抗癌劑와 비교가 된다는 점에서 癌細胞에 대한 直接 毒性效果는 낮은 것으로 판단되었다.

그러나 加味慈桃丸의 투여로 암세포에 대한 직접적인 殺細胞效果 이외에 면역기구의 활성화를 통한 간접적인 抗癌效果도 나타날 가능성이 있으므로 이를 확인하기 위해 우선 투여용량 決定實驗(毒性實驗)을 실시하였다. 그 결과, 생쥐에게 加味慈桃丸 엑기스 10mg/kg, 20mg/kg을 투여한 경우에는 일시적으로 체중의 감소가 나타나지만 곧 회복되었으며, 물이나 사료섭취량은 이와 같은 경향을 보여 이 용량들에서는 毒性이 유도되지 않음을 알 수 있었다. 용량을 40mg/kg으로 높여 본 결과, 실험에 사용한 생쥐 가운데 死亡例(4/10)가 나타났으므로 이후의 in vivo 抗癌實驗은 10mg/kg, 20mg/kg의 용량으로 실시하였다.

In vivo에서의 抗癌效果는 L-1210을 腹腔內에 투여하여 腹水癌을 유발한 실험계와 Sarcoma-180을 근육내에 주사하여 固型癌을 유발한 실험계에 대해 실시하였다. L-1210으로 유도한 腹水癌에 대하여 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群에서 ILS가 167%, 20mg/kg 投與群에서 250%로 나타나 20mg/kg 投與群에서 有意性있는 抗癌效果가 있음을 확인할 수 있었다.

Sarcoma-180으로 유도한 固型癌에 대해서도 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群의 腫瘍抑制率(TIR)

이 24.4%, 20mg/kg 投與群의 경우에는 48.4%로 매우 우수한 腫瘍成長抑制率을 보였다.

Sarcoma-180에 의한 固型癌을 외과적으로 제거한 생쥐의 體重變化에 있어서도 對照群이 癌에 의한 體重低下를 보인 반면, 加味慈桃丸 10mg/kg, 20mg/kg 投與群에서는 0.5~0.6g의 體重增加를 보임으로써 효과적으로 癌을 제어하여 건강상태를 비교적 양호하게 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

遲延型 過敏反應은 細胞性 免疫反應을 측정하기 위한 대표적인 방법으로 抗原에 感作된 T細胞를 활성화 시킴으로써 cytokine을 분비하게 되고 이로 인하여 주위에 巨食細胞와 非特異的 炎症細胞가 모여들어 활성화됨으로써 시간적 간격을 두고 효과적인 抗原 殺害效果를 나타나게 하는 免疫反應이다. 본 실험에서는 緬羊赤血球로 감작시킨 4일 후에 다시 緬羊赤血球를 右側後肢 足跖皮內에 注射한 후 24시간이 경과한 다음 左右肢足跖의 膨脹程度를 비교하였던 바 對照群이 $0.19 \pm 0.02mm$, 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群이 $0.21 \pm 0.03mm$, 20mg/kg 投與群이 $0.18 \pm 0.02mm$ 로 별다른 차이를 보이지 않아 有意性이 認定되지 않았다.

體液性 免疫反應으로서 抗體 生産能을 비교하기 위하여 赤血球 表面抗原과 그에 대한 抗體의 결합으로 생기는 凝集反應을 보는 赤血球 凝集素價와 赤血球表面抗原과 抗體의 결합체에 輔體를 가함으로써 溶血反應을 보는 赤血球 溶血素價를 測定하여 보았다.

赤血球凝集素價는 對照群이 6.84 ± 2.10 , 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群에서 $9.64 \pm 1.88mm$, 20mg/kg 投與群에서 10.33 ± 2.04 로 對照群에 비해 實驗群 모두에서 有意性있는 增加가 확인되었다.

赤血球溶血素價는 對照群이 6.92 ± 1.21 , 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群이 9.04 ± 1.12 ,

20mg/kg 投與群이 11.42 ± 0.89 로 對照群에 비해 有意性 있게 增加하였다. 따라서, 加味慈桃丸 投與群에 있어 抗體生成能 즉 體液性免疫이 增加되어 있음을 확인할 수 있었다.

인체의 T細胞와 緬羊赤血球의 결합현상을 보는 Rosette 형성실험은 細胞性免疫을 측정하는 간접적인 방법이다. 본 실험에서는 in vitro 에서 이를 측정하였으며 脾臟細胞에 緬羊赤血球가 4개이상 부착된 경우를 Rosette 形成細胞로 측정하였던 바 對照群이 22.14 ± 1.21 , 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群이 23.08 ± 1.13 , 20mg/kg 投與群이 31.42 ± 1.14 로 약간 증가하는 경향을 보였으나 有意性이 認定되지 않아 遲延型 免疫反應의 결과와 함께 細胞性 免疫에 대해서는 有意性 있는 增加效果가 없음을 알 수 있었다.

다음으로 腫瘍細胞를 비특이적으로 인식하여 살해하는 自然殺害細胞(Natural killer cell)의 활성정도를 보기위해 作動細胞와 標的細胞의 비가 각각 100:1, 50:1, 10:1이 되도록 조절하여 細胞毒性을 %로 비교하여 보았다. 그 결과, 100:1의 경우 對照群이 $23.31 \pm 2.44\%$ 인데 반하여 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群에서 $36.83 \pm 5.04\%$, 20mg/kg 投與群이 $43.88 \pm 6.42\%$ 로 有意性있는 增加를 보였으며 50:1에서도 對照群이 $39.88 \pm 5.87\%$ 인데 반하여 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群에서 $48.31 \pm 7.48\%$, 20mg/kg 投與群에서 $51.82 \pm 4.12\%$ 로 增加함을 알 수 있었다. 10:1에서는 加味慈桃丸 10mg/kg 投與群에 있어 對照群에 비해서 增加되는 傾向을 보였으나 20mg/kg 投與群에서는 별다른 차이를 보이지 않았다.

淋巴球增殖能의 측정은 淋巴球에 대한 免疫 增強效果를 볼 수 있는 간접적인 방법으로 항원 비특이적 자극에 의해서 IL-2 의존성 T임파구의 증식이 발현된다고 하여 淋巴球 活性增加

나 數的增加를 측정하는 방법이라 하겠다. 淋巴球增殖能은 [3H]-thymidine의 세포내 流入 정도로서 측정하였으며 對照群이 $178.42 \pm 31.44\text{cpm}$, 加味慈桃丸 엑기스 10mg/kg 投與群에 있어서 $483.44 \pm 33.56\text{cpm}$, 20mg/kg 投與群에서 $866.12 \pm 86.42\text{cpm}$ 으로 濃度 依存的이며 有意性 있는 增加를 보였다.

IL-2 生成能에 있어서도 對照群의 IL-2 생성량이 $182.11 \pm 5.63\text{pg/ml}$ 인데 비하여, 加味慈桃丸 엑기스 10mg/kg 投與群에서 $232.42 \pm 10.52\text{pg/ml}$, 20mg/kg 投與群에서 $631.35 \pm 13.47\text{pg/ml}$ 로 濃度 依存的이며 有意性 있는 增加를 나타내었다. 위와같은 결과로 부터 加味慈桃丸은 淋巴球의 增殖 뿐만 아니라 分化에도 관여하고 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

非特異性 免疫反應의 하나인 食食作用을 본 결과 phagocytic index K값이 對照群이 0.00713 ± 0.00038 인데 비하여, 加味慈桃丸 엑기스 10mg/kg 投與群에서 0.00889 ± 0.00063 , 20mg/kg 投與群에서 0.02134 ± 0.00113 으로 20mg/kg 投與群에서 有意性 있는 增加가 보였다.

본 실험에서의 體液性 免疫增強效果, NK 細胞活性增加, 淋巴球 增殖 및 IL-2 生成增加, 비특이성 탐식능 증가 등 결과는 가미자도환이 항암활성을 가질 수 있음을 시사하는 것이다.

한편 이전의 실험결과로서 金 등⁶⁾의 四君子湯, 四物湯 등은 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價 측정에서 有意性 있는 증가, 八物湯은 赤血球凝集素價, Rosette 形成實驗, 食食作用 등에서 有意性 있는 증가를 보고하였고, 白 등¹³⁾의 半夏白朮天麻湯 실험 연구에서는 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球凝集素價, 食食作用 등에서 有意性 있는 증가를 보고하였고, 黃 등⁴²⁾의 十全大補湯 실험에서는 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球凝集素價, Rosette 形成實驗, 自然殺害細胞 活性度, 食食作用 등

에서 高루 有意性 있는 증가를 보고하였다.

이러한 연구결과는 대체로 補益之劑가 免疫力을 增加시킴을 보여주고 있고, 또한 免疫力은 韓醫學에서 正氣에 해당하는 개념이기 때문에 '扶正即續自除'의 正氣가 충실해지면 邪氣를 물리친다는 개념과 같은 맥락에서 補益之劑의 항암효과는 면역력의 증가에 의한 항암효과의 발현으로 이해되어 왔다. 그러나 加味慈桃丸은 補益之劑라기 보다는 攻補兼施의 처방이고 그 중에서도 祛邪의 작용이 강하게 작용할 것으로 이해되는 처방이다. 白芍藥^{10,48)}의 단일 약물 실험에서 細胞性, 體液性 免疫機構 增強 效果가 인정되고 있지만 加味慈桃丸의 免疫增強效果가 白芍藥의 단일 작용에 의한 것으로 평가될 수는 없으며, 비록 직접적인 암세포 살상 효과는 없었으나 清熱解毒, 消癰散結, 活血祛瘀 등의 祛邪作用에 의하여 邪氣의 감퇴에 의한 正氣의 회복이 白芍藥에 의한 免疫力의 增強을 더욱 強化시킨 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아, 실제 임상적으로 癌轉移의 억제 및 재발방지를 목적으로 활용되고 있는 加味慈桃丸의 效果는 直接的인 癌細胞의 殺傷이라기 보다는 免疫機構의 活性化를 통한 間接的인 抗癌效果를 가지는 것으로 생각된다.

V. 結 論

加味慈桃丸 엑기스의 抗癌作用을 검토하기 위해 MTT 檢索法에 의한 癌細胞의 生存能과 L-1210을 腹腔에 移植한 腹水癌생쥐의 生存期間, Sarcoma 180을 筋肉內에 移植시켜 誘導한 固型癌의 腫瘍成長抑制作用 및 體重變化를 관찰하였고, 免疫 效果를 알아보기 위하여 遲延型 過敏反應, 赤血球 凝集素價와 溶血素價,

Rosette 形成 細胞, 自然殺害細胞의 活性度, 淋巴球 增殖能, IL-2 生産能, carbon clearance에 의한 食食能 등을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 癌細胞의 生存能의 경우, SNU-C4에 대한 IC50이 2.52mg/ml, SNU-396에 있어 0.41mg/ml, SNU-1에 대해 0.09mg/ml로 나타나 抗癌活性이 있음을 확인할 수 있었다.
2. 加味慈桃丸 액기스 10mg/kg, 20mg/kg 投與群의 경우, 體重減少, 飼料, 물 攝取量의 減少는 보이지 않아 이 用量에서는 毒性이 나타나지 않음을 알 수 있었다.
3. 生存期間延長效果는 加味慈桃丸 액기스 20mg/kg 投與群의 경우, ILS가 250%로 나타나 有意性있는 生命延長效果가 보였다.
4. 腫瘍成長抑制效果는 加味慈桃丸 액기스 10mg/kg, 20mg/kg 投與群에서 모두 對照群에 비해 P<0.01의 有意性이 認定되었다.
5. 體重變化에 대한 效果는 加味慈桃丸 액기스 10mg/kg, 20mg/kg 投與群에서 모두 對照群에 비해 P<0.05의 有意性있는 增加를 보였다.
6. 遲延型 過敏反應에 있어 加味慈桃丸 投與群과 對照群의 有意性 있는 差異는 認定되지 않았다.
7. 赤血球凝集素價 및 溶血素價는 加味慈桃丸 投與群이 對照群에 비해 濃度 依存的으로 有意性있게 增加하여 體液性免疫이 活性化 됨을 알 수 있었다.
8. Rosette 形成細胞數에 있어서는 加味慈桃丸 投與群과 對照群의 有意性있는 差異가 보이지 않았다.
9. 自然殺害細胞 活性도에 있어서는 加味慈桃丸 投與群이 對照群에 비해 100:1, 50:1에서 有意性 있는 增加를 보였으나, 10:1

에서는 別다른 差異를 보이지 않았다.

10. 淋巴球增殖能 및 Interleukin-2 生産能은 加味慈桃丸 投與群이 對照群에 비해 濃度 依存的이며 有意性있는 增加를 보였다.
11. 巨食細胞의 繁殖能을 測定하는 Carbon clearance에 있어 加味慈桃丸 20mg/kg 投與群이 對照群에 비해 有意性있는 增加를 보였다.

以上の 實驗結果들로 부터 加味慈桃丸이 直接的인 毒性效果는 약하지만 免疫機構의 活性化를 통한 間接的인 抗癌效果가 있는 것으로 評價되며, 또한 體液性 免疫增強效果, NK細胞 活性增加, 淋巴球 增殖 및 IL-2 生成增加, 非特異的 繁殖能 增加를 통해 抗癌活性을 나타냄을 확인할 수 있었다. 結論的으로 加味慈桃丸은 癌의 治療와 豫防에 있어 臨床的 應用이 可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 姜大根 : 息賁丸 및 肥氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 效果, 圓光大學校, 大學院, 1991.
2. 高광석, 최승훈, 문준진, 안규석 : 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 관한 實驗的 研究, 東醫病理學會誌, Vol. 9:21-46, 1994.
3. 金剛山 : 伏梁丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 效果, 圓光大學校, 大學院, 1989.
4. 金剛山 : 肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞株의 成長沮碍에 미치는 效果, 圓光大學校, 大學院, 1992.

5. 金光湖 외 : 數種 韓藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲紀念論文集, pp.1041, 1981.
6. 金尙勳 : 紫菀이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校, 大學院, 1990.
7. 김재광 외 : 암환자에서의 T, K, NK 세포 및 단구의 기능저하, 대한면역학회지, 5(1):106, 1983.
8. 김정수, 최승훈 : 蔘茸扶正湯의 방사선 조사로 손상된 조직 회복 및 조절촉진 효과, '96 International Symposium of Traditional Chinese Medicine on Oncology', 1996.11.1-4
9. 김진복 외 : 정상인 및 암환자의 자연살해능력에 관한 연구, 대한면역학회지, 6(1):2-8, 1984.
10. 김한섭 : 四妙湯 大柴胡湯 및 構成藥劑들의 抗癌作用과 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 서울, 慶熙大學校, 大學院, 1989.
11. 魯勳政 외 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):43, 1996
12. 박재갑 : 인간생명과과학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.662-673, 1994.
13. 白泰鉉 : 半夏白朮天麻湯과 半夏白朮天麻湯加味方의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 경희대학교, 대학원, 1994.
14. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, p.1, 23-42, 137-143, 1992.
15. 안희덕, 최승훈, 안규석 : 사물탕의 항암제 부작용 억제에 관한 실험적 연구, 대한동 의병리학회지, 10:341-359, 1995.
16. 양규환 : 면역항진효과 검정방법; 전통약물로부터 신약개발 연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, pp.114-121, 1993.
17. 吳千植 : 靈芝 山慈菇 仙鶴草 卷柏 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校, 大學院, 1987.
18. 尹相協 : 六君子湯, 小柴胡湯, 魚腥草 및 加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1991.
19. 尹星默 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):91, 1996
20. 이능기, 崔昇勳 : 放射線 照射後의 N:GP(S)mouse 脾臟細胞 增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):91, 1996
21. 이문호 등 : 최근 한국의 질병변천, 대한의 학협회지, 32(3):283-290, 1989.
22. 이문호 외 : 내과학, 서울, 박애출판사, pp.2446-2450, 2466-2475, 1976.
23. 李鳳雨 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 大田大學校, 大學院, 1993.
24. 李淵月, 趙鍾寬 : 消積白朮散을 投與한 各種 癌患者 242例大에 대한 臨床的 考察, 韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):101-112, 1996.
25. 李永燦 : 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 抗癌效果에 대한 研究, 圓光大學校, 大學院, 1993.
26. 이우주 : 약리학강의, 서울, 태광문화사, pp.498-499, 1984.
27. 李鍾訓 : 病原微生物學, 서울, 壽文社, pp.133-138, 1973.
28. 李學喆 : 東風菜가 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校, 大學院, 1990.
29. 任宰訓 : 數種의 韓藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1986.

30. 전국한의과대학 본초학교수 공편 : 본초학, 서울, 영림사, pp.228-229, 306-308, 423-424, 581-582, 1991
31. 趙誠珩 : 修治巴豆 및 巴豆加黃連의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 관한 實驗的研究. 圓光大學校, 大學院, 1994.
32. 조혁규 : 인삼 Crude Saponin이 저하된 면역 반응 및 망내계 기능의 회복에 미치는 영향, 인삼의 약리연구 및 효능연구, 한국인삼연구초연구소, pp.1-20, 1983.
33. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 행림출판, p.13-14, 25-27, 32-36, 1995.
34. 崔昇勳 : 內經病理學, 서울, 통나무, p.147, 1995.
35. 崔昇勳 : 한의학의 증양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1(1):11-28, 1995
36. 하대유 외 : Colchicine이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향, 대한의학협회지, 30(4):409-420, 1987.
37. 하대유 외 : 고려인삼이 3-Methylcholanthrene의 발암능에 미치는 영향, 대한의학협회지, 27(6):541, 1984.
38. 하대유 외 : 면역적혈구 감각량이 Mice의 지연형 과민반응과 항체생산에 미치는 영향, 전북의대논문집, 3(1):95-100, 1979.
39. 韓相日 : 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 效果, 圓光大學校, 大學院, 1991.
40. 한성규, 최승훈, 안규석 : 보중익기탕, 수점산 및 보중익기탕수점산의 항암과 면역 조절 작용에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집, 18(1):15-29, 1995.
41. 한승섭, 최승훈, 안규석 : Experimental Study of Shenlingbaichusan on Reducing Side-effect of the Anti-cancer Agents. 제8회 국제 동양의학 학술대회, 대한한의사협회, 1995.
42. 黃奎東, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠 : 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):1- 24, 1996.
43. 孟琳升 등 : 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, pp.235-236, 1995
44. 徐龍玉, 扶正培本治在腫瘤臨床上的應用, 浙江中醫學院學報, 12(3):22- 24, 1988.
45. 余桂清 : 中國 傳統醫學에 의한 癌治療의 方法 및 研究近況, 第1回 東洋醫學國際 Symposium 發表論文集, pp.10-23, 1995.
46. 王浴生 主編 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.107-113, 1240-44, 1983.
47. 郁仁存 : 中醫腫瘤學(上), 北京, 科學技術出版社, pp.1-25, 95-146, 123-124, 1991.
48. 劉春安, 彭明 主編 : 抗癌中草藥大辭典, 洪湖, 湖北科學技術出版社, pp. 91-94, 322-326, 811-813, 1120-1124, 1994.
49. 丁瑞 : 中醫藥防治癌症實驗研究, 建國40年中醫科技成就, 中國古籍出版社, pp.488-493, 1989.
50. 趙建成 : 段鳳舞腫瘤積驗方, 合肥, 安徽科學技術出版社, pp.537-538, 1991.
51. 趙景芳, 精神因素與癌症: 附200例臨床調查, 腫瘤, 8(3):182-184, 1988.
52. 中華書局 編 : 四部備要 經部 周禮正義 一, 北京, 中華書局出版, p.12, 1989.
53. Avrames, S. et al : Antibody formation at the cellular level in immunology, New York, John Wiley & Son's Inc., pp.503-513, 1982.
54. Bach, J. F. and Dardenne, M. : Antigen recognition by T-lymphocytes I, thymus and marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in mouse. Cell Immuno., 3:1, 1972.

55. Biozzi, G. et al : A kinetic study of antibody producing cell in the spleen with sheeperythrocytes, *Immuno.*, 14:7, 1968.
56. Brander, C. et al : Carrier-mediated uptake and presentation of a major histocompatibility complex class I-restricted peptide, *Eur. J. Immunol.*, 23:3217-3223, 1993.
57. Clamen, H. N. et al : Thymus marrow cell combination, synergism in antibody production, *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 122:1167, 1966.
58. Davis, A. J. S. et al : The failure of thymus derived cells to produce antibody, *Transplantation*, 5:222, 1967.
59. Decker, T. et al : A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor(TNF) activity, *J. Immunol. Methods*, 15:61-69, 1988.
60. Gillis, S. et al : T cell growth factor; Parameters of production and a quantitative microassay for activity, *J. Immunol.*, 120:1245, 1978.
61. Gullberg, M. and Larsson, E. L. : Studies on induction and effector function of concanvalin A-induced suppressor cells that TCGF production, *J. Immunol.*, 128(2):746-750, 1982.
62. Kiessling, R. et al. : Natural Killer cells in the mouse. *Eur. J. Immuno.*, 5:112, 1975.
63. Korzeniewski, C. and Callewaert, D. M. : An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 64:313-320, 1983.
64. Miller, T. E. et al : Immunopotiation with BCG II, Modulation of referance to the sheep red blood cells, *J. Nat. Cancer Inst.*, 51:1669, 1973.
65. Mitsuoka, A. et al : Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tubercurin type delayed hypersensitivity of the reaction, *Immuno.*, 13:363, 1978.
66. Nowotny, A. : Antigen-Antibody interactions in basic exercises immuno-chemistry, Berlin, Heidelberg, N.Y., Springer-Verlag, pp.217-271, 285-287, 1979.
67. Revillard, J. P. : Investigation of delayed hypersensitivity in man in *Immunology*, New York, John Wiley & Sons Inc., pp.393-394, 1982.
68. Sell, S. : Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hagerston, Maryland, Harper & Row Pub., pp.144-171, 1980.
69. Siegel I. et al : Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 78:271, 1987.
70. Thorbeck, G. J. et al : The affinity of the reticulo-endothelial system farvorious serum proteins, *Birt. J. Exp. Path.*, 41(2):190-198, 1960.
71. Wing, E. J. et al : Delayed hypersensitivity reaction in basic and clinical immunology, California, Lange Med. Pub., pp.129-134, 1980.
72. Zaalberg, O. B. : A simple method for detecting single antibody forming cell, *Nature*, 202:1231, 196473..