

원저

靈砂의 急性·亞急性 毒性 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 關한 實驗的 研究

권기록*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

The Study on Acute and Subacute Toxicity and Sarcoma-180 Anti-cancer Effects of Vermilionum

Ki-Rok, Kwon*

* Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

Abstract

Background & Methods : In order to measure the acute and subacute toxicity of Vermilionum and its anti-cancer effects, Sarcoma-180 abdominal cancer cells were injected intravenously. The following results were obtained after measuring the survival rate, toxicity of the NK cells, and IL-2 productivity.

Results :

1. It was impossible to measure LD₅₀ value in the acute toxicity test and no toxic effects were witnessed in the clinical observation.
2. No significant differences were shown in the weight changes between the experiment groups and the control group in the acute toxicity test.
3. No peculiar toxic effects were shown in the subacute toxicity test and the weight changes were insignificant between the experiment groups and the control group.
4. In measuring the survival rate after inducing abdominal cancer by Sarcoma-180, the experiment groups showed increased of 9.52% compared to the control group.
5. In measuring the activity of NK cells, no significant changes were shown between the experiment groups and the control group.
6. In measuring the productivity of IL-2, significant reduction was shown in the experiment groups compared to the normal group, but no significance was witnessed compared to the control group.

Key words : Vermilionum, LD₅₀ value, toxicity test, anti-cancer effects, Sarcoma-180, the activity of NK cells, productivity of IL-2

1. 緒 論

靈砂는 朱砂와 더불어 대표적인 수은함유 한약재로 수은과 유황을 水火鍛鍊하여 인공적으로 만든^{1,2)} 적색의 황화이수은(HgS)이다³⁾. 成分의 구성은 수은 86.2%,

유황 13.8%를 함유하지만 늘 여러 가지의 물질이 혼합되어 있다. 그 중에서 가장 흔히 보이는 것은 雄黃, 磷灰石, asphalt 등이다. 心汞, 紫粉霜, 氣砂, 二氣砂 등^{3,6)}의 異名을 가지고 있으며 性은 溫하고 味는 甘 혹은 辛하다^{3,6)}. 宋代 唐의 經史證類備急本草에 처음으로 採用되었고

歸經은 心, 肝, 肺, 胃經이며, 調和五臟, 扶助元氣, 破積滯, 墮痰涎, 益氣明目, 通血脈. 止煩滿, 益精神, 安魂魄하고 久服하면 通神明不老, 經身神仙, 令人心靈하는 功效가 있어 一切痼冷, 五臟百病, 上盛下虛, 痰涎壅盛, 霍亂, 反胃, 心腹冷痛, 梅毒, 高血壓, 不眠, 神經衰弱, 心悸, 怔忡, 驚癇 등을 治한다 하였다^{2,68)}.

水銀은 古代부터 鍊金術의 主要對象이었고 各種 疾病이 治療에 使用되어 왔으나, 이를 使用함으로써 健康 障害를 일으키는 가장 오래된 重金屬 중의 하나이기도 하다⁹⁾.

수은은 인체의 호흡기, 소화기, 피부를 통하여 흡수되며, 흡수된 수은은 腎, 肝, 心, 肺, 腸, 神經, 筋肉, 毛髮, 爪甲등에 축적되므로, 중독증상은 주로 신, 간기능 장애, 중추신경계 장애 및 신경증 증후군 등의 증상들이 나타난다. 수은중독의 진단은 수은에 노출된 과거력 및 직업력, 임상증상, 신, 간기능 검사 등으로 참고할 수 있고, 血, 尿, 모발 중의 수은농도측정으로 확진할 수 있다¹⁰⁾.

영사는 水銀과 硫黃을 3:1 혹은 4:1로 배합한 후 불로 가열하여 만드는데 이 과정을 9번 반복하여 만든 九蒸靈砂를 細末하여 환으로 만든 후 복용해야 부작용을 줄일 수 있다고 한다⁹⁾.

따라서 본 연구는 靈砂의 독성과 안전성 그리고 항암 효과의 유무를 평가하기 위하여 시도되었다. 먼저 독성 및 안전성을 실험적으로 관찰하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호(14)에 준하여 急性 및 亞急性 毒性을 평가하였고, 또한 항암효과에 대한 연구로 ICR계 mouse의 복강 내에 Sarcoma-180 복강암 세포를 이식한 후, 靈砂를 경구투여하고 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

먼저 화로를 설치하고 硫黃 二兩을 넣어 文火로 용해시키고, 그 속에 水銀 八兩을 넣어 쇠숫가락으로 급히 교반하여 靑砂頭를 만들었다. 水銀의 반짝이는 광채가 없어지기를 기다렸다가 꺼내어 細研한다. 다시 솥에 넣은 후 틈 사이를 소금과 흙을 반죽하여 단단히 막고 自然火로서 煨하는데, 水十二盞이 乾함을 限度로 한다. 하룻밤 식힌 뒤 뚜껑을 열면 뚜껑의 下面에 올라 붙어있는 束針紋이 形成되는데 이것을 긁어모은 것이 一轉靈砂이며, 다시 이것을 上記의 方法으로 솥에 넣어 自然化로 煨하기를 九回 反復하여 精製한 후 실험에 사용할 靈砂를 얻었다⁹⁾.

2. 방법

1) 급성 독성실험

영사의 독성반응 유무를 관찰하기 위해 실험군을 각각 0.1mg, 0.2mg 영사 투여군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 경구내로 투여한 후 1주일간 독성반응 상태를 관찰하였다.

2) 아급성 독성실험

실험군을 0.1mg, 0.2mg 투여군으로 나누어 Sprague-Dawley rat의 경구내로 1주일에 2회씩 총 8회 투여한 후 경과를 관찰하였다.

3) Sarcoma-180 항암효과 실험

Sarcoma-180 복강암 세포를 Balb/c mouse의 복강 내에 이식한 후, 2일 뒤부터 매주 2회 0.1mg의 영사를 경구내로 총 8회 투여하였고, 대조군의 경우 동일한 방법으로 동량의 생리식염수를 주입하였다.

* 이 논문은 2002년도 상지대학교 연구비 지원에 의한 것임.

3. 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 조정한후 pH를 7.2로 맞춘후 0.22 μ 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°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% CO₂ 배양기(존샘, 한국)안에서 배양시킨 후 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

3) 암세포 유발

생존을 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5 \times 10⁶cells/ml로 조정하여 대조군과 홍화자약침 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 \times 10⁶cells/ml로 조정한 후 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하고 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

4. 측정 항목

1) 급성 독성

• 임상관찰 및 체중측정

Balb/c mouse에 영사 0.1mg을 경구투여한 실험군 I과 0.2mg를 경구투여한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.1cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 투여 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.

2) 아급성 독성

① 임상관찰 및 체중측정

Sprague-Dawley rat에 영사 0.1mg을 경구투여한 실험군 I과 0.2mg를 경구투여한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.1cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 경구투여 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 3000rpm으로 5분 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

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 5×10^6 cells/0.2ml씩 주입하여 30일 동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다. Geran¹⁵⁾ 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 한국세포주은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1임파종 세포(KCLB 40160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 실험실에서 FBS가 10% 첨가된 혼합배지로 계대배양하여 사용하였다.

다) 세포독성의 측정

i) 기본방법

세포독성실험은 Promega사의 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.

ii) 대조 well의 준비

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

iii) 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 2×10^6 cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well microtitration plate에 well당 100µl씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각 5×10^6 cells/ml, 2.5×10^6 cells/ml, 5×10^5 cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100µl를 분주하여 최종부피가 200µl/well이 되도록 한 후 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100µl당 10µl의 용해용액(10×)을 첨가하고 배양 종료시 250×g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50µl 옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든 후 각 well에 50µl씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50µl

의 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 뺀고, 표적세포 LDH 최대 방출량에서 부피 보정값을 뺀다.

즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였다.

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

(가) A : Experimental - culture medium background

(나) B : Effect cell spontaneous LDH release - culture medium background

(다) C : Target cell spontaneous LDH release - culture medium background

(라) 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 5×10^6 cells/ml의 농도로 재부유한 후, 여기에 concanavalin-A(Sigma, U.S.A.)를 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하고, 37°C , 5% CO_2 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-2 측정용 kit로서 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2량을 산정할 수 있는 방법이다.

96 well plate의 각 well에 $50 \mu\text{l}$ 의 Assay Diluent solution을 분주하고 준비된 standard, control, 실험군의 비장세포 상층액 $50 \mu\text{l}$ 첨가한 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well을 미리 준비된 Wash buffer로 5회 세척하여 물기를 깨끗이 제거하고 $100 \mu\text{l}$ 의 Conjugate solution을 각 well에 분주하였다. 그 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 Wash buffer로 5회 세척하여 물기를 제거하고 $100 \mu\text{l}$ 의 Substrate Solution을 각 well에 분주한 후 빛이

차단된 장소에서 실온에서 30분간 배양하였다. 그 후 $100 \mu\text{l}$ 의 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 다시 읽었다.

5. 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) LD₅₀ 측정

LD₅₀을 측정하기 위하여 실험군을 각각 0.1mg, 0.2mg 경구투여군으로 나누어 Balb/c mouse에 1회 투여한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였으나, 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD₅₀은 산출할 수 없었다 (Table. 1).

2) 임상경과관찰

급성 독성실험에서 영사를 경구투여한 후, 7일간 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들은 관찰되지 않았다 (Table. 1).

3) 체중측정

급성 독성실험에서 영사를 경구투여한 후, 생리식염수를 투여한 대조군과 체중 변화를 측정한 결과 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았고 정상군에 비해서는 유의한 증가를 나타내었다 (Table. 2).

2. 아급성 독성

1) 임상경과관찰

Table 1. Clinical findings in mice treated with Vermilionum in acute toxicity test. Clinical observation Hours after treatment

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

* : Number of Animal

Table 2. Body weight of mice treated with Vermilionum in acute toxicity test.(unit : g)

Group	day1	day7
Normal	25.59±1.35	28.84±2.52
Control	26.89±1.7	29.01±3.64
Treat G	26.03±1.53	31.41±0.97 ^a

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 G : treated with Vermilionum

아급성 독성실험에서 영사를 경구투여한 후, 4주간 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들은 관찰되지 않았다(Table. 3).

2) 체중변화

아급성 독성실험에서 각 군의 체중 변화는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table. 4).

3. Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험

Table 3. Clinical findings in rats treated with Vermilionum in subacute toxicity test.

Clinical observation	Hours after treatment							
	1	3	6	9	14	19	24	28
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0

* : Number of Animal

Table 4. Body weight of rats treated with treated with Vermilionum in acute 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 G	254.98±8.21	214.88±8.46	291.99±7.80	318.46±9.58

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Treat G : treated with Vermilionum

1) 생존율 측정

30일 동안 생존율을 측정한 결과, Control 군은 median survival time이 21.5일, 실험군은 23일로 대조군에 비하여 9.52%의 생존 증가율을 보여 주었다.

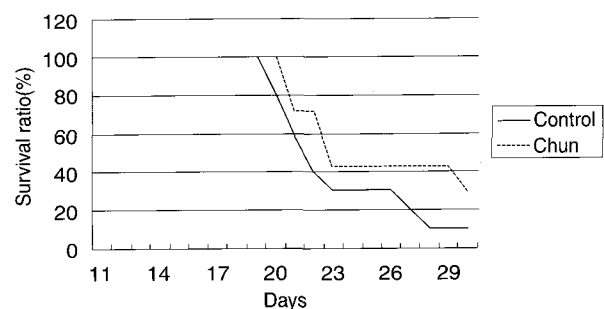


Fig 1. Survival Time of the Sarcoma-180 Cell Bearing ICR Mice Treated with Vermilionum

2) NK cell 활성도 측정

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 정상군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때 -38.65 ± 99.36 , 50:1일 때 -137.95 ± 400.45 , 10:1일 때 -19.02 ± 39.84 를 나타내었으며, 대조군의 경우 100:1일 때 557.12 ± 49.40 , 50:1일 때 -41.94 ± 98.14 , 10:1일 때 -53.43 ± 52.69 를 나타내었다. 실험군의 경우 100:1일 때 -125.38 ± 110.83 , 50:1일 때 -101.61 ± 99.85 , 10:1일 때 -64.70 ± 58.55 를 나타내어 정상군과 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table. 5).

Table 5. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with Vermilionum according to E/T ratio.

Group	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	-38.65 ± 99.36
	50:1	-137.95 ± 400.45
	10:1	-19.02 ± 39.84
Contro	100:1	-57.12 ± 49.40
	150:1	-41.94 ± 98.14
	10:1	-53.43 ± 52.69
Treat G	100:1	-125.38 ± 110.83
	50:1	-101.61 ± 99.85
	10:1	-64.70 ± 58.55

E/T ratio : Effector cell/Target cell

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Treat G : treated with Vermilionum

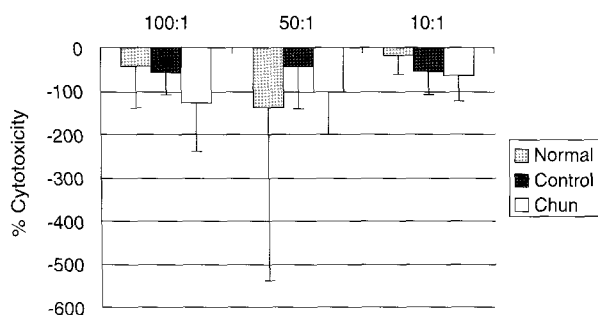


Fig 2. Natural Killer Cell Activity of the Sarcoma-180 Cell Bearing ICR Mice Treated with Vermilionum According to E/T Ratio

3. Interleukin-2 양 측정

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 15일 후에 대조군 및 실험군의 mouse로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정된 결과 정상군은 $1315.585 \pm 244.32 \text{pg/ml}$, 대조군은 $893.90 \pm 58.36 \text{pg/ml}$, 실험군은 $878.33 \pm 72.69 \text{pg/ml}$ 를 나타내어 대조군과 실험군은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 실험군은 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table. 6, Fig. 3).

Table 5. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture.

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	1315.58 ± 2443.32
Control	893.90 ± 58.36^a
Treat G	878.33 ± 72.69^a

a : Control and treat group 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 G : treated with Vermilionum

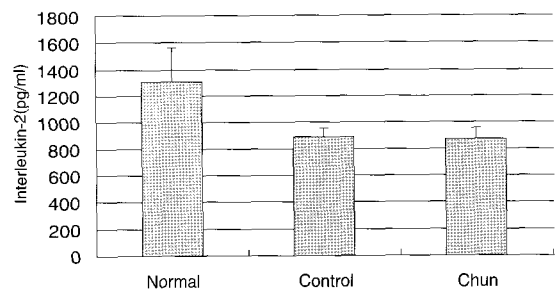


Fig 3. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing ICR Mice Treated with Vermilionum

IV. 考 察

靈砂는 水銀과 硫磺을 法製하여 만든 적색의 황화이수은(HgS)으로 味는 辛, 甘하고 性은 溫하며 心, 肺, 胃經에 入한다⁴⁾. 效能은 寄生蟲을 제거하고, 去痰除濕하며 安神寧心하여 五臟의 百病을 主治하고 魂魄을 安靜

시키며 益氣明目한다. 장기적으로 과량 복용하면 水銀中毒의 증상이 나타날 수 있으므로 副作用을 피하기 위하여 服用方法이나 使用量 등에 대한 지속적인 연구가 요구되는 약재 중의 하나이다. 水銀은 古代부터 鍊金術의 主要對象이었고 各種 疾病이 治療에 使用되어 왔으나, 이를 使用함으로써 健康障害를 일으키는 가장 오래된 重金屬 중의 하나이기도 하다⁹⁾.

본 연구는 영사의 주 효능인 寄生蟲을 제거하고, 去痰除濕하며 安神寧心하는 작용이 항암 효과와 직접적인 연관성이 있는가를 확인하기 위하여 시도되었다. 이를 위해 먼저 영사의 독성 및 안전성에 대한 독성 실험을 시도하였다.

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다¹⁰⁾. 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 '의약품 독성시험 기준' 등에 의거하여 시행하였다.

급성 독성실험에서는 LD₅₀(반수치사량 측정)과 최대 내용량 측정을 위해 실험군을 각각 0.1mg, 0.2mg 영사 투여군으로 나누었으며, 대조군은 생리식염수 0.1cc를 경구투여 하였다. 경구투여 후 초기 6시간 동안에는 매 시간 관찰하고, 그후 1주일간은 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근 긴장 및 기타증상들을 관찰하였다. 체중은 영사투여 직전과 1주일 후에 측정하였고, 관찰기간 종료 후 마취하여 치사시킨 후 내부장기를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 그 결과 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD₅₀의 측정이 불가능하였으며(Table. 1), 기타 관찰에서도 급성 독성에 대한 중독 증상은 나타나지 않았다(Table. 1). 체중의 변화는 대조군과 실험군 모두 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나 실험군은 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table. 2). Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험은 매주 2회씩 4주에 걸쳐서 靈砂 0.1mg을 투여한 실험군과 생리식염수 0.1cc를 경구투여한 대조군으로 나누었으며, 1일 1회씩 급성 독성실험에서와 마찬가지로 rat를 관찰하였다. 그 결과 중독 증상은 나타나지 않았으며 사망한 개체도 존재하지 않았다(Table. 3). 체중측정에서도

대조군과 실험군 모두 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table. 4).

이상의 결과를 고찰해 보면 급성 독성과 마찬가지로 아급성 독성실험에서도 임상관찰결과 영사의 경구 복용이 큰 부작용이 없는 것으로 추정되었다.

영사의 항암능과 면역기능계에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 미정맥에 주입하여 생존률과 NK 세포의 독성능, IL-2의 생산능을 측정하였다.

생존률 측정에서 대조군은 median survival time이 21.5일, 실험군은 23일로 대조군에 비하여 9.52%의 유의한 생존증가율을 나타내었다(Fig. 1).

NK cell(NK cell : natural killer cell)은 일반적으로 자연 세포 독성세포라고 하는 일종의 자연면역 기능을 보이는 세포이다¹⁶⁾. NK cell 활성화 측정 검정결과, 전 구간에 서 정상군과 대조군에 비하여 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않아 영사의 작용기전이 비특이적 세포면역에 관여하는 것이 아님을 알 수 있었다(Table. 5, Fig. 2).

T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능항진, B cell 분화인자, NK cell의 활성화에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 종양의 치료에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을 하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

IL-2의 생산능 검액 검사에서 결과 역시 실험군에서 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 대조군과는 차이를 나타내지 않아 영사의 경구투여가 림프구의 활성화, 분화, 증식에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다(Table. 6, Fig. 3).

이상의 결과를 종합해보면 영사의 경구복용은 단기간의 독성은 유발하지 않는 것으로 추정되었고, 약간의 항암능을 나타내지만 세포성이나 체액성 면역대사에 관여하는 것은 아님을 추정할 수 있었다. 또한 항암능 자체가 크지 않아 임상에서 암치료를 목적으로 사용하는 것은 바람직하지 않고 보조적인 치료제로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

V. 結 論

靈砂의 급성·아급성 독성과 항암능을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 미정맥에 주입

하여 생존률과 NK 세포의 독성능, IL-2의 생산능을 측정
한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 급성독성 실험에서 LD₅₀의 측정이 불가능하였으며
임상 관찰에서도 급성 독성에 대한 중독 증상은 나
타나지 않았다.
2. 급성독성 실험에서 체중의 변화는 실험군에서 대
조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다.
3. 아급성 독성실험에서도 특이한 중독 증상은 나타
나지 않았으며 체중의 변화에서도 대조군과 실험
군 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다.
4. Sarcoma-180 복강암 유발 후 생존률 측정에서 실험
군은 대조군에 비하여 9.52%의 유의한 생존증가율
을 나타내었다.
5. NK cell 활성화 측정 결과, 전 구간에서 실험군은
대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.
6. IL-2의 생산능 검사 결과 실험군은 정상군에 비하
여 유의한 감소를 나타내었으나 대조군과는 차이
를 나타내지 않았다.

參考文獻

1. 李尙仁 外, 韓藥臨床應用, 成輔社, 서울, p. 412, 503,
1986.
2. 吳普, 神農本草經, 文光圖書有限公司印行, pp. 22-24,
1987.
3. 江蘇新醫學院, 中藥大辭典, 成輔出版社, 서울, p. 912,
913, 2166, 2167, 1982.

4. 金昌玟 外, 中藥大辭典, 圖書出判鼎談, 서울, pp. 206-
209, 1998.
5. 李挺編纂, 安秉國譯: 國譯編註醫學入門 IV, 南山堂, 서
울 p. 909, 1995.
6. 申吉求, 申氏本草學, 壽文社, 서울, p. 516, 686, 712,
715 1988.
7. 許浚, 東醫寶鑑, 南山堂, p. 747, 1984.
8. 唐宗海 著, 金俊錡 驛 : 國譯本草問答, 大星文化社,
서울, pp. 14-18, 1994.
9. 芮鏡旭, 靈砂法製 回數에 따른 흰쥐의 혈청중 수
은농도 및 간. 신기능에 미치는 영향, 慶山大學校
大學院 碩士學位論文, 1993.
10. 崔光敦, 土茯苓을 이용한 Rats의 水銀中毒 해독에
관한 연구, 圓光大大學院 碩士學位論文, 1997.
11. 대한병리학회, 병리학 I, 고문사, 서울, p. 389, 1995.
12. 최삼섭 외, 豫防醫學과 公衆保健, 癸丑文化社, 서울,
pp. 296-300, 1997.
13. 李鴻超 외, 東醫鑛物學, 부산대학교 출판부, 부산,
pp. 335-345, 1998.
14. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제
98-116호. 1996.
15. 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.
16. 김세중, 면역학, 고려의학, 서울, pp.134-136, 1994.
17. Sher A, Cofferman RL, Regulation of immunity to
parasite by T cell-derived cytokines, Annu. Rev
Immunol. 46:111-147, 1992.
18. Sell, S, Cell mediated immunity in vitro in
immunology, immunopathology and immunity,
Hergestown, Maryland, Hergers & Row Pub., pp. 144-
171. 1980.