

## 白鼠의 足三里에 시술한 靑風藤藥鍼이 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

김태한<sup>1</sup> · 김영일<sup>2</sup> · 홍권의<sup>2</sup> · 임윤경<sup>1</sup> · 이현<sup>2</sup> · 이병렬<sup>2</sup>

대전대학교 한의과대학 <sup>1</sup>경혈학교실, <sup>2</sup>침구학교실

### Influence on the Anti-cancer and Immune response improvement of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti* *Lignum* infusion solution into Joksanmi(ST<sub>36</sub>)

Tae-Han Kim<sup>1</sup>, Young-il Kim<sup>2</sup>, Kwon-Eui Hong<sup>2</sup>, Yun-Kyoung Yim<sup>1</sup>, Byung-Ryul Lee<sup>2</sup>

Dept. of <sup>1</sup>Meridian & Acupoint, <sup>2</sup>Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University

#### Abstract

**Objectives and methods :** To study on the anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement effects of Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution(SAL-HAS), we injected *Sinomenii acuti Lignum* infusion solution into Joksanmi(ST<sub>36</sub>) of C57BL/6 mouse which is corresponding to human Joksanmi(ST<sub>36</sub>). We observed its effect on the number of CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> cells in mouse PBMCs(peripheral blood mononuclear cells), the number of the pulmonary colony, and the effect on MST(mean survival time) and ILS(increase in MST over control) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

#### Results and Conclusions :

1. The spleen cells proliferation of the sample groups treated with SAL-HAS extract has increased significantly compared with that of the control group.
2. The percentage of the CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> cells in C57BL/6 mouse PBMCs of the sample groups treated with SAL-HAS has increased compared with that of the control group.
3. The pulmonary colony number of the sample groups SAL-HAS has decreased significantly compared with that of the control group.
4. MST and ILS of the sample groups SAL-HAS have increased significantly compared with those of the control group.

**Key words :** *Sinomenii acuti Lignum*(SAL), Herbal-Acupuncture, Joksanmi (ST<sub>36</sub>), Anti-cancer, Immune response improvement

#### I. 緒論

腫瘍은 조직의 자율적인 과잉성장이며, 정상

- 교신저자: 김태한, 대전 동구 용운동 963 대전대학교 한의과대학 경혈 학교실, Tel. 042-280-2641, Fax. 042-280-2610,  
E-mail : hanorbit@naver.com  
• 접수 : 2004/02/11 • 수정 : 2004/03/05 • 채택 : 2004/03/10

조직에 대해서 파괴적인 것을 말한다<sup>1)</sup>. 종양은 현재 인류를 위협하는 주요한 질병의 하나로, 전염성 질환이 기본적으로 해결된 국가에서는 심뇌혈관질환과 더불어 사망원인의 1·2위를 차지하고 있다<sup>2)</sup>.

한의학에서는 腫瘍, 癰疽, 肿毒, 積聚, 燥癥, 巖, 瘤瘤, 癰, 痱癬, 石癰, 石疽, 疽瘡, 噯膈, 陰瘡, 蔭脣, 乳巖, 舌菌 等<sup>3,4)</sup>이 종양의 범주에 해당하는데, 종양의 발병기전으로는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 热毒內蘊, 臟腑失調, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 등이 있다<sup>2)</sup>.

免疫이란 외부로부터 침입하는 미생물, 동물의 조직이나 체내에 불필요한 산물 등에 대해 非自己的인 抗原으로 인지하고 이에 특이하게 반응하여 항체를 만들어 非自己的인 물질들을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 반응이다<sup>5)</sup>. 한의학에서는 《素問·刺法論》<sup>6)</sup>에 “正氣內存 邪不可干”, 《靈樞·百病始生篇》<sup>7)</sup>에 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人” 및 《素問·評熱病論》<sup>6)</sup>에 “邪之所湊 其氣必虛”라고 하여 면역기능 등으로 포함한 개념을 正氣로 보았다<sup>8)</sup>.

藥鍼療法은 경락학설과 약물요법에 근거하여 질병과 상응하는 경혈과 약물을 선택하고 藥針液을 경혈내에 주입하여 경혈과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하여 질병을 치료하는 방법이다<sup>9)</sup>.

최근에 많은 종류의 藥針液이 抗癌 및 免疫增強에 효과가 있다고 보고되고 있으나, 祛風除濕, 通經止痛하는 효능이 있어 風濕痺痛, 鶴膝風, 水腫, 腳氣治療에 효과적인 青風藤<sup>10~12)</sup>에 대한 연구는 접할 수 없었다.

이에 著者は 青風藤으로 調中氣, 疏風化濕, 通調經絡氣血, 祛邪防病하는 足三里<sup>13~17)</sup>에 青風藤 藥鍼하여 항암 및 면역기능 효과에 대해 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

동물은 4~5週齡의 雌性인 C57BL/6 생쥐를 대한 실험센터에서 공급받아 실험 당일까지 固型飼料(抗生素 無添加, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2 °C를 유지하여 2주일 간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 藥材

실험에 사용된 青風藤(*Sinomenii acuti Lignum*, 以下 SAL로 표현함)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

## 2. 方 法

#### 1) 藥鍼液의 製造

青風藤 物質分割 藥鍼液(Herbal-Acupuncture Solution, 以下 HAS로 표현함)은 곽<sup>18)</sup> 등의 방법에 따라 Diaion HP-20 수지를 이용하여 조제하였다. 물로 추출한 청풍등원액 100 g을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피에 부어 그 폭이 약 25~30 cm될 정도로 방치하였다. 이 후 중류수 1,000 mL를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass 층) 청풍등액을 분리하였다. 계속해서 30 % MeOH 500 mL, 70 % MeOH 500 mL, 30 % Acetone 500 mL, 70 % Acetone 500 mL를 각각 통과시켜 분리된 분획 중 생쥐의 PBMC에서 싸이토카인 유도에 활성이 있는 분획층을 선정하여 약침액 제조를 하였다.

青風藤 70% Methanol 층 분획을 3회 여별(3M paper)한 후 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 青風藤 농축액에 95 % ethyl alcohol 30 mL를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 생성된 침전물을 여별하고, 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 85 % ethyl alcohol 30 mL를 가하여 잠시 교반 후 방치하여 생성된 침전물을 여별하고 다시 여액을 75 % ethyl

## 白鼠의 足三里에 시술한 青風藤藥鍼의 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

alcohol 30 ml를 가한 후 같은 조작을 2회 반복한 다음 여액 중 ethyl alcohol을 감압 제거하여 잔사전량을 20 g이 되게 하고 1N NaOH로 pH6.8로 조절하여 저온에서 12시간 방치한 후 미량의 부유액을 여별한 후 멸균하여 青風藤藥鍼液을 70 % Methanol층 10 %와 20 %로 생리식염수를 희석하여 사용하였다.

### 2) 藥鍼液의 選定

Acetone과 Methanol의 농도를 달리해서 추출한 青風藤 物質分割 藥鍼液 중에서 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과는 70 % Methanol 10 µg/ml의 青風藤 物質分割 藥鍼液이 cytokine 遺傳子(IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ ,  $\beta$ -actin) 발현에 다른 것들보다 뛰어난 것으로 나타났다.

### 3) *Sinomenii acuti Lignum* 70 % Methanol층 藥鍼液에 의한 PBMCs의 mRNA遺傳子 發顯 調節

#### ① PBMCs 分離 및 藥物處理

##### ⓐ PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) 세포분리

Balb/c 생쥐를 경추탈골법으로 致死시킨 후脾臟을 摘出하고, 摘出한 脾臟을 100 mesh(Sigma)에 옮려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15 ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5분간 放置하여 조직 덩어리를沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83 % NH4Cl 溶液을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hipaque-1077(Sigma)로 2,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 buffy coat부분을 얻어 실험에 사용하였다.

##### ⓑ 세포배양 및 藥物처리

PBMCs를 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 青風藤 70 % Methanol층 藥鍼液 추출물 (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml) 및 양성대조군 (LPS, 2.5 µg/ml)을 각각 처리하고 4시간 동안 배양한 후 D-PBS로 수세하여 total RNA를 분리하였다.

#### ② mRNA 遺傳子 分析

##### ⓐ Total RNA의 抽出

培養 終了 後 24-well plate의 上層液을 제거한 후 RNAzol<sup>B</sup>(Tel- Test, USA)를 이용하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 처리한 20 µl의 蒸溜水에 溶解시켜 정량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 µg을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 °C에서 10분간 denaturation 시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5 % agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

##### ⓑ cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 µg에 該當하는 量을 75 °C에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denatured total RNA 3 µg에 2.5 µl의 10 mM dNTPs, 1 µl의 random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl의 RNasin(20 U/µl), 1 µl의 100 mM DTT 및 4 µl의 5×RT buffer(250 mM Tris-Cl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를混合한 後, 1 µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를添加한 後 DEPC 처리된 蒸溜水를 더하여 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 後 遠心分離하여 37 °C 恒

溫水槽에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

#### © cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 μl의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였으며, 主型에 대한  $\beta$ -actin, MMP-9, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-18 및 NOS-II에 대한 primer는 아래와 같으며, sense primer (20 pmole/μl)와 antisense primer (20 pmole/μl)를 혼합하여 1 μl를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3 μl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 및 0.18 μl Taq polymerase (5 U/μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멀균증류수를 가하고 predenaturation; 95 °C, 5분, denaturation; 74 °C, 5분, annealing; 55 °C, 1분, elongation; 72 °C, 1분을 25 cycle한 뒤 postelongation을 72 °C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

#### 4) 脾臟細胞 測定

비장면역세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cell씩 첨가하고, 靑風藤 70 % Methanol총 약침액을 농도별로 처리하였고, 양성대조군으로 Con-A(cocanavalin A, 10 μg/ml)를 처리한 후 세포를 37 °C에서 72시간 배양 후 50

IL-1 $\beta$	sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGC AAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCCATT CAC-3'
IL-4	sense oligonucleotide	5'-ATGAACTCCTCTCCAC AAGCGC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GAAGAGCCCTCAGGCT GGACTG-3'
IL-5	sense oligonucleotide	5'-GTGCAAATGCAAGGGA TACC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TCCATCTCCAGCACTTC ATG-3'
IL-6	sense oligonucleotide	5'-ATGAAGTCCCTCTCTGC AAGA-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGTTTGCCGAGTAGAT CTCAA-3'
IL-10	sense oligonucleotide	5'-TCCCTTAATGCAGGACTT TAAGGGTTACTTGTG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GACACCTGGTCITGG AGCTTATTAATC-3'
IL-12	sense oligonucleotide	5'-GCTCCTTCAGGAATCTG TTC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGCTCATGTACTITCAT GAG-3'
TNF- $\alpha$	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGTCAG ATTGTTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTCAGCTG TATAGGG-3'
$\beta$ -actin	sense oligonucleotide	5'-TCCAATCTGTGGTCC ATGAAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TAAAACGCAAGCTCAGT AACAGTCCG-3'
IFN- $\gamma$	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGAACT CAGATTGTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTCAGCTG TATAGGG-3'

$\mu$  Ci/ml의 [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 후 다시 8시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기(Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

## 白鼠의 足三里에 시술한 青風藤藥鍼이 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

### 5) *In vivo*에서 免疫細胞 增進과 活性化 實驗

#### ① B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10 (ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 생쥐의 皮下에 繼代培養하여 形成된 肿瘍組織部位를 分리하여 종양조직 1 g에 10 ml의 cold D-PBS(Ca<sup>2+</sup>&Mg<sup>2+</sup>-free, Sigma)가 되게 조절한 후, 100 mesh(Sigma)로 종양조직을 분쇄한 후 원심분리(1,500 rpm, 5 min.)하였다. 이 pellet에 collagenase (1,700 U/mg, Type-XI Sigma)를 B16-F10 0.1 g/ml에 처리하여 30분간 water bath(37 °C)에서 배양시킨 후 원심분리(1,300 rpm, 5 min.)하였다. 上騰液을 제거한 다음 0.85 % NH<sub>4</sub>Cl을 넣어 잘 섞은 것을 37 °C 培養器에서 5분간 방치하여 적혈구를 파괴시킨 후 원심분리하여 B16-F10을 분리하였다. 이렇게 얻어진 B16-F10 癌細胞株( $2 \times 10^5$  cells/mouse)의 尾靜脈에 이식한 후 青風藤 70 % Methanol 총 약침액을 足三里에 7일간 藥鍼하였다.

#### ② 實驗군의 分류

實驗군은 다음과 같이 分류하였다.

대조군-1(Control-1) : 7일째만 B16-F10 癌細胞株를 移植하고 다른 處置를 하지 않은 群

대조군-2(Control-2) : 6일간 足三里에 1日 1回 刺鍼한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 足三里에 1日 1回 刺鍼한 群

대조군-3(Control-3) : 6일간 生理식염수(0.1 ml)를 足三里에 1日 1回 注入한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 生理식염수 0.1ml를 足三里에 1日 1回 注入한 群

실험군-1(10% SAL-HAS) : 6일간 足三里에 10 % 青風藤 藥鍼(70 % Methanol 총 0.1

ml)을 施術한 後, 이후 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 藥鍼 施術한 群

실험군-2(1% SAL-HAS) : 6일간 足三里에 1 % 青風藤 藥鍼(70 % Methanol 총 0.1 ml)을 施術한 後, 7일째 B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 8일째부터 다시 15일간 藥鍼 施術한 群

#### ③ 取穴

인체의 足三里에 상응하는 實驗동물의 체표면의 털을 제거한 후 골도분총법에 의거하여 경혈탐지기(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 사용하여 취혈하였다.

#### ④ 藥鍼

藥鍼注入器로 1 ml의 주사기를 사용하여 각각의 實驗군에 따라 足三里에 0.1 ml씩, 1일 1회, 총 22일간 약침시술하였다.

#### ⑤ CD3e<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> 融光細胞 分析

B16-F10 細胞株를 C57BL/6 생쥐에 移植한지 3일째 경추탈골법으로 치사시킨 후 脾臟을 분리하였다. 脾臟細胞에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4 °C에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-NK1.1, PE-anti-B220을 넣고 30분간 염색에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 細胞를 分析(%)하였다.

#### ⑥ Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 移植 後 青風藤藥鍼한 후 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 이식 후 15日에 colony assay를 實施하였다. Pulmonary colonization assay는 肺臟의 외부에 나타난 黑色의 colony 數를 현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

#### ⑦ 病理組織検査

B16-F10 癌細胞株를 移植하고 15日 後에 各群에서 肺를 分離하여 10 % formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8시간동안 水洗한 포매하였다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다.

#### ⑧ 生命延長曲線 測定

B16-F10 癌細胞株를 C57BL/6 生쥐에 移植后, B16-F10 細胞株를 移植한 날부터 시작하여 매일 生存여부를 관찰하여 平均生存日數 및 延命率을 다음과 같이 구하였다.

MST(mean survival time) : 평균生存日數

ILS(Increase in MST over Control-C)

: 연명율

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

T : 처치군의 MST

C : 대조군의 MST

### 3. 統計處理

統計는 student's t-test로 하였다.

## III. 結 果

### 1. 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響

70 % Methanol 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 青風藤 物質分

割 藥鍼液을 건강한 Balb/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1 %의 농도로 처리하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 영향을 알아본 결과 脾臟細胞는 濃度 依存的으로 有意性있게 증가하였다(Table 1).

Table 1. Effect of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum Infusion Solution*) Extract on Spleen Cells Proliferation in Balb/c Mice.

Group	Dose	Spleen cells production(cpm)
Media control	0	1,267± 146
Con-A( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	38,760±5,194***
	10	11,530±3,105**
SAL-HAS(%)	1	8,501±2,123**
	0.1	3,053± 879*

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were treated with SAL-HAS extract (10, 1, 0.1 %). Spleen cells were cultured with Con-A (positive control) and SAL-HAS extract for 48 hrs. After 40hr incubation, treated 3H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester (Cambridge Tec.U.K.). The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter (LKB, USA) as described in Materials and Methods.

Statistically significant value compared with control data by T test.

(\* :  $p<0.05$ , \*\* :  $p<0.01$ , \*\*\* :  $p<0.001$ )

2. PBMCs의  $\text{CD25}^+/\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+/\text{CD3e}^+$ ,  $\text{CD69}^+/\text{B220}^+$ ,  $\text{NK1.1}^+/\text{CD3e}^+$  細胞數에 미치는 影響

#### (1) PBMCs의 $\text{CD25}^+/\text{CD4}^+$ 細胞 比率

$\text{CD25}^+/\text{CD4}^+$  세포수의 比率이 Control-1에서 10.4 ± 1.1 %이었고, Control-2에서는 12.7 ± 2.2 %이었으며, Control-3에서는 13.8 ± 2.5 %이었고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에

## 白鼠의 足三里에 시술한 靑風藤藥鍼O| 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

**Table 2. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on the percentage of CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> in mouse PBMCs.**

Group	Dose	CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)
Control-1	0	10.4 ± 1.1
Control-2	0	12.7 ± 2.2
Control-3	0	13.8 ± 2.5
SAL-HAS(%)	10	17.8 ± 1.1
	1	14.6 ± 1.8

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). C57BL/6 mouse PBMCs ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells.

Control-1 : B16-F10 melanoma only.

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Joksamni (ST<sub>36</sub>).

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of saline. SAL-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of 10% and 1% SAL-HAS.

서는 각각 17.8 ± 1.1 %와 14.6 ± 1.8 %로 각각 증가하였다(Table 2, Fig. 1).

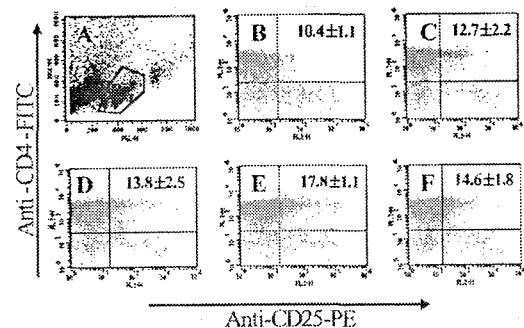
### (2) PBMCs의 CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 細胞 比率

CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 세포수의 比率이 Control-1에서는 4.7 ± 0.2 %이었고, Control-2에서는 7.9 ± 0.5 %이었으며, Control-3에서는 8.1 ± 0.4 %이었고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 11.0 ± 0.8 %와 10.8 ± 0.8 %로 각각 증가하였다(Table 3).

### (3) PBMCs의 CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 細胞 比率

CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수의 比率이 Control-1에서는 44.6 ± 3.7 %이었고, Control-2에서는 49.6

**Fig 1. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on the percentage of CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> in mouse PBMCs.**



C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). C57BL/6 mouse PBMCs ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC (A). Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells.

Control-1 (B) : B16-F10 melanoma only.

Control-2 (C) : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Joksamni (ST<sub>36</sub>).

Control-3 (D) : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of saline.

SAL-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of 10% (E) and 1% (F) SAL-HAS.

± 2.6 %이었으며, Control-3에서는 49.1 ± 3.8 %이었고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 55.4 ± 2.7 %와 53.3 ± 2.1 %로 각각 증가하였다(Table 4).

### (4) PBMCs의 NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 細胞 比率

NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 세포수의 比率이 Control-1에서는 2.2 ± 0.1 %이었고, Control-2에서는 2.6 ± 0.2 %이었으며, Control-3에서는 2.8 ± 0.2 %이었고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는

Table 3. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on the percentage of CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> in mouse PBMCs.

Group	Dose	CD8+/CD3e+ (%)
Control-1	0	4.7 ± 0.2
Control-2	0	7.9 ± 0.5
Control-3	0	8.1 ± 0.4
SAL-HAS(%)	10 1	11.0 ± 0.8 10.8 ± 0.8

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). C57BL/6 mouse PBMCs ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> T cells.

Table 5. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on the percentage of NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> in mouse PBMCs.

Group	Dose	NK1.1+/CD3e+ (%)
Control-1	0	2.2 ± 0.1
Control-2	0	2.6 ± 0.2
Control-3	0	2.8 ± 0.2
SAL-HAS(%)	10 1	3.8 ± 0.1 3.4 ± 0.2

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). C57BL/6 mouse PBMCs ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC. Two groups treated with ELP-HAS showed increased numbers of NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> natural killer cells.

각각 3.8 ± 0.1 %와 3.4 ± 0.2 %로 각각 증가하였다(Table 5).

Table 4. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on the percentage of CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> in mouse PBMCs.

Group	Dose	CD69+/B220+ (%)
Control-1	0	44.6 ± 3.7
Control-2	0	49.6 ± 2.6
Control-3	0	49.1 ± 3.8
SAL-HAS(%)	10 1	55.4 ± 2.7 53.3 ± 2.1

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). C57BL/6 mouse PBMCs ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC. Two groups treated with SAL-HAS showed increased numbers of CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> B cells.

Table 6. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on Pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./animal	Pulmonary Colony No.	Decrease (%)
Control-1	0	10	76.4±6.9	
Control-2	0	10	67.2±4.2	
Control-3	0	10	69.1±3.7	
SAL-HAS (%)	10 1	10	9.3±1.8*** 35.1±3.2***	86.5 49.2

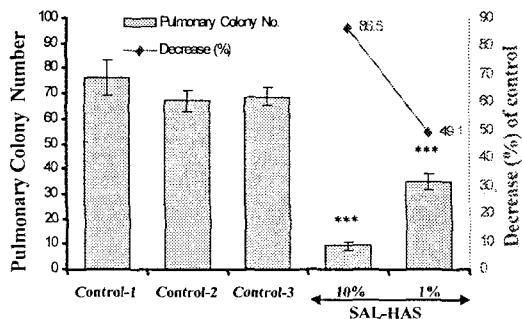
C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with SAL-HAS, they were sacrificed and the pulmonary colony was observed.

Each point represents the mean ± S.E of 5 mice. Statistically significant value compared with control-3 data by T test.

(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001)

## 白鼠의 足三里에 시술한 青風藤藥鍼O| 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

Fig. 2. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on melanotic colony formation of pulmonary tissue, and pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.



C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>) for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with SAL-HAS, they were sacrificed and the pulmonary colony was observed. Each point represents the mean  $\pm$  S.E of 5 mice. Statistically significant value compared with control-3 data by T test. (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001)

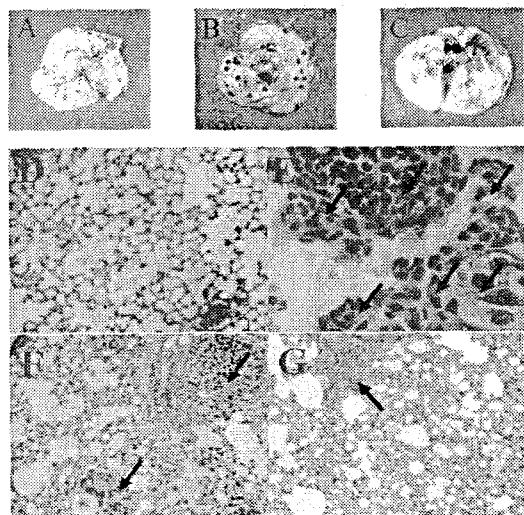
### 3. Pulmonary colony 數에 미치는 影響

Control-1에서는  $76.4 \pm 6.9$ 개였고, Control-2에서는  $67.2 \pm 4.2$ 개였으며, Control-3에서는  $69.1 \pm 3.7$ 개였고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $9.3 \pm 1.8$ 개와  $35.1 \pm 3.2$ 개로 각각 감소하였다. 따라서 Pulmonary colony 數의 減少率은 10 % AKL-HAS와 1 % AKL-HAS에서의 각각 86.5 %, 49.2 %가 되었다(Table 6, Fig. 2,3).

### 4. 平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響

平均生存日數는 Control-1에서는  $17.1 \pm 2.7$

Fig. 3. Representative lungs to show inhibition of melanotic colony formation, and histological analysis of pulmonary tissue of B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice.



C57BL/6 mice were i.v. injected with  $2.0 \times 10^5$  cells of B16-F10 melanoma. 15 days later, tumor pulmonary colonization became palpable, and they were sacrificed, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these tumors (arrow) at bright microscope (Nikon,  $\times 100$ ).

Normal group (A, D).

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Joksamni (ST<sub>36</sub>) (E).

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of saline (B, F).

SAL-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of 10% SAL-HAS (C, G).

일이었고, Control-2에서는  $18.4 \pm 3.4$ 일이었으며, Control-3에서는  $17.6 \pm 2.6$ 일이었고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $26.0 \pm 2.7$ 일과  $24.4 \pm 2.3$ 일로 증가하였다. 延命率은 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 47.7 %와 38.6 %로 증가하였다(Table 7, Fig. 4).

Table 7. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./animal	MST (day)	ILS (%)
Control-1	0	12	17.1±2.7	
Control-2	0	12	18.4±3.4	
Control-3	0	12	17.6±2.6	
SAL-HAS (%)	10	12	26.0±2.7*	47.7
	1	12	24.4±2.3	38.6

C57BL/6 mice were treated with SAL-HAS at Joksamni (ST<sub>36</sub>). On the 7th day of the experiment, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma ( $2 \times 10^5$  cells). 14 days later, the mice were counted once daily to measure MST (Median Survival Time) and ILS (Increase in MST over control).

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

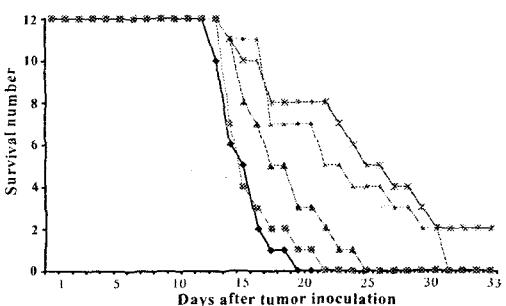
T : MST of Sample group

C : MST of Control-3

Each point represents the mean± S.E of 12 mice. Statistically significant value compared with control-5 data by T test.

(\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001)

Fig. 4. Effects of SAL-HAS(Herbal-acupuncture with *Sinomenii acuti Lignum* Infusion Solution) on survival time of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 cells.



C57BL/6 mice were i.v. injected with  $2.0 \times 10^5$  cells of B16-F10 melanoma. 14 days later, the number of alive mice was measured for survival time once daily.

Control-1 : B16-F10 melanoma only (◆).

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Joksamni (ST<sub>36</sub>) (■).

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of saline (▲).

SAL-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection into Joksamni (ST<sub>36</sub>) with 0.1ml of 10% (\*). and 1% SAL-HAS (▲).

Each point represents the mean±S.E of 12 mice.

저하시키는 효능이 있다고 보고되었다<sup>19)</sup>.

足三里(ST<sub>36</sub>)는 膝下三寸 腰骨外廉 大筋 兩筋間으로 足陽明胃經에 속하고, 胃經의 合穴이며 六腑下合穴, 回陽九鍼穴, 四總穴, 中風七處穴 중의 하나로, 理脾胃, 調中氣, 和腸消滯, 消風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 去邪防病, 强健脾胃 등의 효능이 있어 嘔吐, 霍亂, 腹瀉, 腹痛, 腹部膨滿, 便秘, 消化不良, 食慾不振, 泄瀉, 胃炎, 痢疾 등의 消化器疾患에 應用<sup>13~17)</sup>하고, 免疫을 調整하고 전신을 強壯시키는 효능<sup>20)</sup>도 있어, 癌에 대한 항암효과 및 면역반응에 미치는 영향을 규명하는 연구에서 많이 활용된다<sup>21~23)</sup>.

藥鍼療法은 穴位注射療法<sup>9)</sup>이라고 하며, 一種

#### IV. 考 察

青風藤(*Sinomenii acuti Lignum*)은 防己科(Menispermaceae)에 속한 青藤(青風藤)의 根莖을 乾燥한 것이다. 青風藤의 性은 溫하고 味는 辛苦平하며, 肝經과 脾經에 歸經하여 祛風除濕, 通經止痛하는 效能으로 風濕痺痛, 鶴膝風, 水腫, 腳氣에 응용되어 왔다<sup>10~12)</sup>.

青風藤의 약리학적인 연구에 의하면 신경계통에 작용하여 鎮痛·鎮靜·鎮咳作用이 있고, 血壓降下作用, 胃液分泌增加, 抗炎症作用, 히스타민放出作用 등의 효능이 부분적으로 규명되었고<sup>12)</sup>, 임상적으로 消炎鎮痛藥으로서 급성류마티스관절염 및 타박·염좌로 인한 内出血, 腫脹에 사용한다<sup>10)</sup>. 최근에 青風藤에 대한 연구로는 혈당을

## 白鼠의 足三里에 시술한 靑風藤藥鍼이 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

의 東西의 結合形態인 新鍼法으로 患者의 疾病을 根據로 穴位의 경락작용과 藥物의 약리작용을 살핀 다음, 相應하는 瘓穴과 藥物이 疾病에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하게 하여 질병을 치료하는 방법으로 질병에 따라 선택된 약물의 藥液을 經絡學說에 의하여 穴位 혹은 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併合된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎮痛, 腫瘍誘發抑制 등의 치료효과가 있는 것으로, 약물의 흡수가 빠르고, 經口投與가 불가능한 경우에 치치할 수 있으며, 患處에 치치할 수 있는 등의 장점이 있다<sup>13)</sup>.

腫瘍은 자율성을 가진 조직의 過剩한 發育<sup>1)</sup>으로, 細胞學的으로 非正常的인 細胞의 過剩增殖으로 인하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織 등에 非正常的인 조직을 형성하는 질환이다<sup>24~25)</sup>. 이것은 개체에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않고 정상조직에 대하여 파괴적인 것<sup>26)</sup>을 일컫는 것으로 임상 및 병리형태적인 소견에 의하여 陽性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나눌 수 있는데, 일반적으로 癌이라고 지칭되는 惡性腫瘍은 불규칙하고 빠른 성장을 하며, 침입성 성장을 하여 주위의 정상조직을 파괴하고 체내 여러 부위로 확산 전이시켜 사망에 이르게 하는 치명적인 질병이다<sup>27~28)</sup>.

서양의학에서는 癌의 발생인자로 유전, 인종, 지리, 연령, 면역학적 인자 등의 내적인자와 화학적 발암물질, 방사선, 종양성 바이러스 등의 외적인자<sup>1,29)</sup>로 나누고 있으며, 그 치료방법으로 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 유전자요법 등이 있지만 수술과 화학요법, 방사선요법에는 각각의 한계나 문제점들이 있고<sup>29)</sup>, 유전자요법은 아직 치료방법이 정립되지 못한 실정이나, 환자의 정상조직 특히 면역계 조직에 피해를 주는 화학요법의 단점을 줄이기 위해 면

역감시기구를 보강함으로써 암에 대항하는 면역요법이 각광을 받고 있다<sup>1,30)</sup>.

한의학에서 腫瘍에 대한 인식은 殷墟의 甲骨文에 '瘤'<sup>31)</sup>라는 痘名이 나타났고, 周禮에는 瘡醫라는 표현이 등장하면서 腫瘍에 대한 인식이 시작되어, 「黃帝內經」에서 "伏梁, 瘰, 瘤, 腸澼, 瘤, 積聚"<sup>32)</sup> 등으로 提示된 以後 癥瘕, 瘰瘤, 石瘕, 反胃, 翻胃, 癰疽, 腸覃, 噋膈, 食噎, 癰, 嚢, 岩, 痢塊, 痘癧, 失榮, 石疽, 惡核, 瘰瘤, 蘭脣, 舌菌等<sup>33,34)</sup>의 범주에 포함시켜 현대 종양의 개념과 유사하게 인식하였다.

종양에 대한 한의학적인 치료법은 扶正法, 祛邪法, 및 扶正祛邪法의 3가지로 분류할 수 있는데<sup>31~38)</sup>, 張<sup>39)</sup>은 養陰生津法을 중시하였고, 王<sup>40)</sup> 등은 扶正爲主에 活血化瘀法을 겸하여 활용하여야 한다고 하였으며, 徐<sup>41)</sup> 등은 補氣, 補血, 滋陰補腎, 溫腎助陽의 扶正培本法을 주로 활용하였다.

면역은 초기에는 어떤 전염성 질환의 재감염에 대한 방어반응 즉 특정한 전염성질환에 대하여 특이적인 저항성이 부여된 숙주의 능력을 의미하여<sup>42)</sup> 생체가 自己와 非自己를 식별하는 기구로서 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에서 생긴 돌연변이산물 등과 특이하게 작용하여 非自己를 제거함으로써 개체의 항상성을 유지하는 현상이며 非自己를 특이적으로 인식하여 항체를 형성하거나 세포성 면역반응을 보여 非自己를 제거하는 연속적 반응을 면역반응이라 했지만<sup>43)</sup>, 오늘날에 와서는 면역의 개념이 점차 확대되어 어떤 종류의 전염성질환에 대하여 선천적으로 가지고 있는 저항성도 포함시켜 이를 선천성 혹은 자연면역이라 하여 매우 중요시하고 있다<sup>42)</sup>.

한의학에서 면역은 正氣와 邪氣의 작용으로 인식하여 『素問』<sup>32)</sup>「上古天真論」에서 “眞氣從之,

精神內守, 痘安從來”라 하여 真氣를 邪氣에 대칭되는 正氣의 의미로 파악하였다. 正氣는 신체 내에서一切의 질병에 저항하는 물질로 膽腑經絡 营衛氣血의 정상적인 생리기능을 포함하며, 邪氣는一切의 질병을 일으키는 원인 요소를 충칭하고 외계의 六淫之邪를 일컬으며, 또 신체 내 陰陽失調에서 발생된 虛證의 병리변화와 병리적 산물인 痰血, 痰飲 등의 痘邪를 말한다<sup>44)</sup>. 『素問』<sup>32)</sup>「刺法論」에 “正氣存內 邪不可干”, 「評熱病論」에 “邪氣所湊 其氣必虛”, “邪之所在 皆爲不足”이라 하여 질병 발생의 원인을 주로 正氣虛로 보았다. 이것은 신체의 正氣가 충실하여 방어력이 있고 外邪의 작용이 제거되면, 신체 내의 陰陽平衡을 갖게 되고, 따라서 正氣는 膽腑組織機關의 기능활동을 정상적으로 유지하게하고 内外部로부터 痘邪에 대항하는 저항력으로 길러 정상적인 생리활동을 유지하고 정상의 생리기능이 진행되게 된다.

CD4<sup>+</sup> T세포는 보조 T림프구이고, CD8<sup>+</sup> T세포는 억제 T세포 또는 세포독성 T 세포로 CD4, CD8은 T림프구를 다시 세분하는 표식인자로 이용되고 있으나, 모든 T세포 표면에 표현되는 표식인자로 CD2가 있다. 말초 T림프구는 CD4와 CD8 중 하나만 가진다. CD4<sup>+</sup> 인 보조 T세포는 다시 제일형 보조 T세포(T<sub>H1</sub>)와 제이형 보조 T세포(T<sub>H2</sub>)로 구별된다. CD4는 MHC 제일항원을 인식하고 작용하며, CD8은 MHC 제일항원을 알아보고 작용한다.

CD3은 T Cell 결정표지인자로, T림프구 항원수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하고, CD25는 activated T와 B cell에 분포하며 IL-2 수용체의 기능을 하며, CD69는 activated B와 T cell, 대식세포, NK cell에 분포하고, B220은 사람에겐 없지만 mouse의 B세포 표면에 있는 표식자이다.

MHC 제한도 없고 항원 특이성도 없이 일부 암세포와 바이러스 감염세포에 대하여 세포독성을 나타내는 세포를 일반적으로 자연세포독성세포(natural killer cell:NK cell)라 부르며, 일부 NK-T 세포는 CD3을 갖는다<sup>45)</sup>.

최근 면역세포 활성화를 이용한 면역요법(immunotherapy)은 암치료에 새 장을 열고 있다. *in vitro*에서 면역세포를 활성화시켜 말초혈액에 주사한 후 암세포를 죽이든지, *in vivo*에서 활성화된 T세포, NK세포, DCs 세포 등이 암세포를 apoptosis로 유도하는 치료법이다. 이러한 연구에는 생쥐전이(Mouse melanoma)모델이 사용되는데, 이는 암연구에서 비교적 잘 정립되어 있는 면역요법, 전이를 연구하기에 적합한 모델이다<sup>45)</sup>.

본 연구에서 祛風除濕, 通經止痛의 효능이 있는 青風藤으로 藥鍼液을 제조하여, 藥鍼液의 농도별로 PBMCs에서 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하여 가장 효과가 좋은 농도의 藥鍼液을 선별하였는데, 70 % Methanol 100 µg/ml의 青風藤 物質分割 藥鍼液에서 의미있는 결과가 나왔다.

BALB/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1 %의 濃度로 處理하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 결과 脾臟細胞는 濃度 依存的으로 有意味 있게 增加하였다(Table 1, Fig. 1).

면역세포 증진과 활성화 실험에서는 CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 세포수의 比率이 Control-1에서는 10.4 ± 1.1 %이었고, Control-2에서는 12.7 ± 2.2 %이었으며, Control-3에서는 13.8 ± 2.5 %이었으나, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 17.8 ± 1.1 %과 14.6 ± 1.8 %로 증가하여, Th cell의 증진과 활성화에 농도증가에 비례하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 2).

## 白鼠의 足三里에 시술한 青風藤藥鍼이 抗癌 및 免疫增强에 미치는 영향

CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 세포수의 比率이 Control-1에서는  $4.7 \pm 0.2\%$ 이었고, Control-2에서는  $7.9 \pm 0.5\%$ 였으며, Control-3에서는  $8.1 \pm 0.4\%$ 이었으나, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $11.0 \pm 0.8\%$ 과  $10.8 \pm 0.8\%$ 로 증가하여, Tc/s cell의 증진과 활성화에 농도증가에 비례하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 3).

CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수의 비율이 Control-1에서는  $44.6 \pm 3.7\%$ 이었고, Control-2에서는  $49.6 \pm 2.6\%$ 이었으며, Control-3에서는  $49.1 \pm 3.8\%$ 이었으나, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $55.4 \pm 2.7\%$ 과  $53.3 \pm 2.1\%$ 로 증가하여, B cell의 증진과 활성화에 농도증가에 비례하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 4).

NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 세포수의 비율이 Control-1에서는  $2.2 \pm 0.1\%$ 이었고, Control-2에서는  $2.6 \pm 0.2\%$ 이었으며, Control-3에서는  $2.8 \pm 0.2\%$ 이었으나, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $3.8 \pm 0.1\%$ 과  $3.4 \pm 0.2\%$ 로 증가하여, NK cell의 증진과 활성화에 농도증가에 비례하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 5).

위의 *in vivo*에서 PBMCs에서의 면역세포 증진과 활성화 실험결과로 미루어 보아 青風藤 物質分劃 藥鍼液이 특히 Th cell, NK cell을 활성화시켜 유의한 면역 및 항암 효과를 증진시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 青風藤의 祛風除濕하고 通經止痛하는 효능과 관련성이 있을 것으로 사료된다.

Pulmonary colonization assay는 B16-F10癌細胞株 移植後 青風藤 物質分劃 藥鍼液을 注入한 C57BL/6 생쥐에서 암세포주 이식 후 15日에 肺臟의 외부에 나타난 黑色의 colony 數를 현미경으로 관찰한 결과 pulmonary colony 수는 Control-1에서는  $76.4 \pm 6.9$ 개였고, Control-2에서는  $67.2 \pm 4.2$ 개였으며, Control-3에서는

$69.1 \pm 3.7$ 개였고, 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $9.3 \pm 1.8$ 개와  $35.1 \pm 3.2$ 개로 나타나 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 pulmonary colony number의 감소율이 각각 86.5 %, 49.2 %로 유의성 있는 결과가 나타났다. 또, 병리조직검사도 Control-1에서는 폐조직에 전이된 암세포를 많이 볼 수 있었고, Control-2에서는 Control-3보다는 양호했으나 많은 수의 B16-F10 암세포주가 나타났으며, 10 % SAL-HAS에서는 정상적인 肺細胞와 유사할 정도로 pulmonary colony 수가 현저하게 감소하였다(Table 6, Fig. 2,3).

평균생존일수는 Control-1에서는  $17.1 \pm 2.7$ 일이었고, Control-2에서는  $18.4 \pm 3.4$ 일이었으며, Control-3에서는  $17.6 \pm 2.6$ 일이었고 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각  $26.0 \pm 2.7$ 와  $24.4 \pm 2.3$ 일로 나타나 延命率는 10 % SAL-HAS와 1 % SAL-HAS에서는 각각 47.7 %와 38.6 %로 1 % SAL-HAS에서 가장 有意性 있었다(Table 7, Fig. 4).

이상의 실험결과를 종합해 보면 青風藤藥鍼은 항암과 면역증진에 유효한 효능이 있는 것으로, 종양 및 면역관련질환에 응용될 수 있을 것이며, 앞으로 임상에 응용 가능할 것으로 사료된다.

## V. 結論

足三里(ST<sub>36</sub>)에 시술한 青風藤藥鍼의 항암 및 면역기능을 실험적으로 究明하고자 C57BL/6 생쥐에 B16-F10 癌株를 이식한 후, 青風藤藥鍼한 후 PBMCs의 流細胞 螢光分析, 그리고 Pulmonary colony 數, 생쥐의 平均生存日數 및 延命率을 구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 脾臟細胞의 증식은 실험군에서 대조군보다 증가하였다.
2. PBMCs의 CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup>,

CD69<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> 세포수의 비율이 모든 실험군에서 대조군에 비해 증가하였다.

3. Pulmonary colony formation은 대조군보다 감소하였다.
4. 평균生存日數와 延命率은 대조군보다 증가하였다.

이상의 결과로 青風藤 藥鍼은 면역증진 및 항암작용에 효과가 있는 것으로 생각되며, 향후 지속적인 연구 및 임상적인 응용이 필요하리라 사료된다.

## 参考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울 : 서울대학교출판부. 1996 : 1-5, 43-93.
2. 崔昇勳. 東醫腫瘍學. 서울 : 행림출판. 1995 : 13, 32-42.
3. 申天浩. 癌瘤防治研究. 서울 : 成輔社. 1984 : 25-9, 31-8.
4. 金德鎬. 靈姑·山慈花·仙鶴草·卷柏·瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1987 ; 10(1) : 99-115.
5. 정태호. 면역학 강의. 대구 : 경북대학교출판사. 1993 : 309-17.
6. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 11, 124, 285.
7. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 211, 286.
8. 李殷鏞. 肉蓴蓉藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(1) : 251-286.
9. 大韓藥鍼學會. 藥鍼製劑와 臨床應用. 서울 : 大韓藥鍼學會. 1997 : 1-5.
10. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李暎鍾, 金善熙. 漢藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1998 : 191.
11. 顏正華. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 303-4.
12. 金昌玟, 辛民教, 安德均, 李京淳. 完譯中藥大辭典. 서울 : 圖書出版鼎談. 1997 : 4248-52.
13. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學上·下. 서울 : 集文堂. 1991 : 382-4, 1457-67.
14. 고려의학출판부. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 고려의학. 1989 : 138-9.
15. 程寶書. 鍼灸大辭典. 北京 : 北京科學技術出版社. 1988 : 405.
16. 李挺. 編註醫學入門. 서울 : 大星文化社. 1981 : 267-8.
17. 孫震寔, 高立山. 鍼灸心悟. 北京 : 人民衛生出版社. 1985 : 77.
18. 곽이성, 위재준, 황석연, 경종수, 남기열, 김시관. 난소절제 흰 쥐의 임상화학지수에 미치는 홍삼조사포닌의 영향. 고려인삼학회지. 2000 ; 24(1) : 46-50.
19. 손영종, 이영종. 青風藤과 茯苓이 血糖量에 미치는 影響. 大韓本草學會誌. 2003 ; 18(1) : 65-71.
20. 安營基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 196-7.
21. Yu Y. 外. Role of endogenous interferon-gamma on the enhancement of splenic NK cell activity by electro-acupuncture stimulation in mice. J Neuroimmunol. 1998 ; 90(2) : 176-86.
22. Wu B.. Effect of acupuncture on immuno-modulation in patients with malignant tumors. Zhen Ci Yan Jiu. 1995 ; 20(3) : 67-71.
23. Wu B. 外. Effect of acupuncture on interleukin-2 level and NK cell immunoactivity of peripheral blood of malignant tumor patients. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1994

白鼠의 足三里에 시술한 靑風藤葉鍼이 抗癌 및 免疫增強에 미치는 영향

- ; 14(9) : 537-9.
24. 洪元植. 現代中共의 癌治療. 서울 : 英文社, 1984 : 81-94, 329-30, 361, 372-5, 378-9, 381-2.
25. 김예희 외. 종양학, 인제대학교출판부. 1994 : 235-41.
26. 박찬열 외. 發癌原因에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(1) : 147-59.
27. 方藥中 외. 實用中醫內科學, 上海. 上海科學技術出版社, 1986 : 621-36.
28. 대한의학협회 분과학회협의회. 癌의 診斷과 治療. 서울 : 여문각. 1982 : 4-7.
29. 서울대학교 의과대학. 腫瘍의 發生原因 및 危險要因. 서울 : 서울대학교출판부. 1989 : 31-44.
30. 서울대학교 의과대학. 免疫學. 서울 : 서울대학교출판부, 1994 : 2-3, 72-5, 136-7, 303-4, 308-10.
31. 王琦 외. 黃帝內經素問今釋. 서울 : 成輔社. 1983 : 146, 192, 227, 247.
32. 洪元植 編. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 11, 124, 285.
33. 殷伯康 외. 中醫外科學, 北京 : 人民衛生出版社. 1987 : 203-10.
34. 嚴用和. 濟生方. 서울 : 麗江出版社, 1987 : 483.
35. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1981 : 575-6, 623-5, 644, 691-2, 879.
36. 崔昇勳. 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1995 ; 1(1) : 11-28.
37. 張代釗. 中西醫結合治療癌症. 山西 : 山西人民出版社. 1984 : 1-10, 25-35.
38. 廣暢. 癌의 中醫治療. 서울 : 東洋醫學. 1992 ; 18(1) : 56-63.
39. 張毓玲. 養陰生津法在腫瘤病治療中的應用, 浙江 : 中醫學院學報. 1990 : 14(1) ; 20.
40. 王濟民 외. 中醫藥防治癌症的體會. 浙江中醫雜誌. 1991 ; 1 : 32-3.
41. 徐龍生 외. 扶正培本法在腫瘤臨床上的應用. 浙江中醫學院學報. 1988 ; 12(3) : 22-4.
42. 趙鍾寬. 韓方臨床腫瘍學. 大田 : 周珉出版社. 2001 : 10-5, 19-21.
43. 菊地活吉. 最新免疫學. 서울 : 集文堂. 1993 : 31-5.
44. 安德均 譯. 免疫과 韓方. 서울 : 열린책들. 1998 : 19-21, 45-8.
45. Seigler HF. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte -macrophage colony stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95 : 13141-6.