

원 저

A549 폐암세포와 Sarcoma-180 복강암에 대한 人蔘 蒸溜藥鍼의 영향에 關한 實驗的 研究

위종성* · 권기록* · 박희수*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

An Experimental Study on Effects of Distilled White-ginseng Herbal Acupuncture on A549 human epithelial lung cancer cell *in vitro* and implanted Sarcoma-180 *in vivo*

Jong-Seong We* · Ki-Rok Kwon* · Hee-Soo Park*

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

Abstract

Objectives : In order to investigate effects and immune improvement of distilled white-ginseng herbal extract, expression of Cox-1, Cox-2, and mRNA of Bcl-2 and Bax were analyzed in A549 cell *in vitro*. Survival time and expression of cytokine mRNA were measured for the mice with Sarcoma-180 induced abdominal cancer.

Methods : Balb/c mouse was treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₁₁) and Chung-wan(CV₁₂) to investigate anti-cancer effects and immune response.

Results :

1. For expression of mRNA of Cox-1 using RT-PCR, the control group and the experiment groups show significant increase. For Cox-2, both experiment groups and the normal group showed significant decrease. For Bcl-2, experiment groups showed slight decrease compared to the control group. For Bax, no significant changes were shown between the control group and experiment groups.
2. For survival time, all of experiment groups didn't show significant differences.
3. IL-2 productivity using Flow cytometry, experiment group I didn't show any significance, For IL-4, all of experiment groups showed slight decrease compared to the control group.
4. For IL-2 productivity using ELISA, experiment group I showed slight decrease compared to the control group, experiment group II didn't show any significance.
5. For expression of cytokine mRNA using RT-PCR, significant increase of IL-2 and IL-4 were witnessed in the experiment group I compared to the control group. Significant decrease of IL-10 was shown in all of experiment groups compared to the control group.

Conclusion : According to the results, we can expect that distilled white-ginseng Herbal Acupuncture may be further effects in anti-cancer and immune improvement if increasing concentration.

Key words : Distilled white-ginseng, Herbal Acupuncture, Sarcoma-180 cancer cell, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , Cytokine mRNA.

I. 緒 論

인삼은 五加科(두릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 인삼(*panax ginseng* C. A. Meyer)의 뿌리를 건조한 것으로¹⁾ 人蓐, 鬼蓋²⁾, 土精, 神草, 黃參, 血參, 人微, 玉精³⁾, 人蓐, 海腴, 皴面還丹⁴⁾, 神草, 地精⁵⁾, 二精⁶⁾ 등으로 불리운다.

人蓐에 대한 최초의 문헌적 기록은 BC 48~33년대에 해당하는 중국 前漢의 元帝 시대 때 쓰여진 史遊의 《急就章》이며, 이후 前漢末 《春秋緯》와 《禮緯》에 參에 관한 기록이 있다. 그 이후 後漢·安帝 시대에 許慎의 《說文》에 “人(廿蓐 - 一)이란 명칭이 나온다”. 處方에 관한 기록으로는 AD 196~220년대의 《傷寒論》이 처음이며, 113개의 처방 중 21개에 人蓐이 포함되어 있다⁷⁾.

人蓐은 보통 4~6근을 사용하는데, 氣는 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦이며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年의 효능이 있다⁸⁾.

채굴된 자연 상태의 人蓐을 水蓐(fresh-ginseng)이라 한다. 水蓐을 자연상태에서 건조시킨 것을 白蓐(white-ginseng)이라 하고, 白蓐을 껍질을 벗기지 않은 상태로 증기로 쪄서 건조시킨 것을 紅蓐(red-ginseng)이라 한다⁹⁾.

현재까지 보고된 人蓐의 효능은 혈당저하효과, 항스트레스 및 항피로, 강정작용, 면역 활성화 및 항암작용 등 많은 연구 결과가 있다⁹⁾.

藥鍼療法은 針灸, 經絡, 本草 이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 제조하여 經穴이나 壓痛點에 주입하여, 치료하는 新鍼療法이다¹⁰⁾.

이에 저자는 증류추출식 인삼약침의 항암효과와 면역능을 알아보기 위하여 人蓐을 이용하여 藥鍼을 조제한 후 mouse의 복강내에 Sarcoma-180 복강암 세포를 이식하여 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降하는 中脘(CV₁₂)¹²⁾과 健脾和胃, 化濕消滯, 扶中氣虛弱하는 胃俞(BL₂₁)¹²⁾에 인삼증류약침을 주입한 후, 시험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 인삼약침을 처리한 후 RT-PCR을 이용한 Cox-1, Cox-2, Bcl-2, Bax의 mRNA 발현을 관찰하였고, Sarcoma-180으로 mouse에 복강암을 유발한 후 인삼약침을 처리하여 생존율, Flow cytometry를 이용한 Interleukin-2(이하 IL-2라고 칭함), Interleukin-4(이하 IL-4라고 칭함) 생산량 측정 및 ELISA를 이용한 IL-2생산능 측정 및 RT-PCR을 이용한 IL-2, IL-4, Interleukin-10(이하 IL-10라고 칭함), Interferon-

γ(이하 IFN-γ라고 칭함)의 mRNA의 발현 유도를 관찰하여 유의한 결론을 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 동물 및 재료

1) 동물

생존율과 항암능 측정을 위하여 4주령된 체중 20±3 g 내외의 Balb/c계 음성 mouse를 사용하였고, 사용된 동물은 대한바이오링크에서 구입하여 2주 동안 고품사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 생존율은 대조군, 실험군 I, II 모두 각 10마리씩으로 실험하였으며, 그 밖의 항암 및 면역능 실험은 대조군, 실험군 I, II 모두 6마리씩 실험하였다.

2) 재료

(1) 인삼증류약침의 조제¹¹⁾

실험에 사용한 인삼은 한국담배인삼공사 제품을 구입하여 사용하였다. 먼저 인삼을 깨끗이 세척한 후 증류수와 배합하여 2시간 전탕한 후, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 인삼 100g으로 1000ml의 약침액을 얻었다. 얻어진 약침액을 0.45μm, 0.2μm 여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다. (Fig. 1.)

(2) 약침기

30gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 방법

1) A549 human epithelial lung cancer cell *in vitro*

(1) Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

가. 배지의 구성

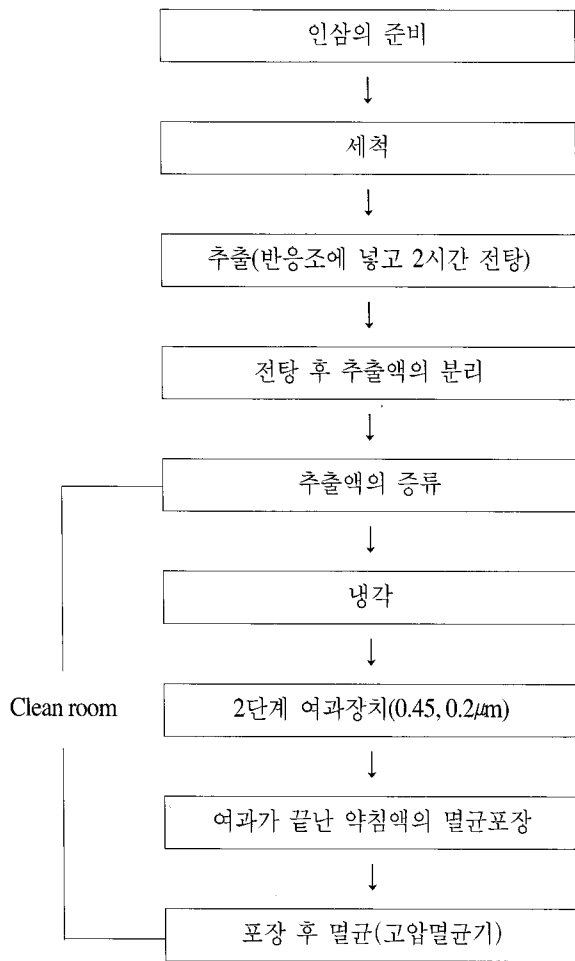


Fig. 1 Manufacturing process of Distilled white-ginseng Herbal Acupuncture.

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, streptomycine (100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정한 후 pH를 7.2로 맞추고 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.

나. 암세포의 배양

① A549 human epithelial lung cancer cells

암 세포주는 한국세포주은행(KCLB 10185, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태로 분양받아 이를 녹인 후 혼합배지에 부유시켜 5% CO₂ 배양기(Jouan IGO-150A, France)안에서 배양시킨 후 실험에 사용하였다.

2) Sarcoma-180 복강암

(1) 약침의 시술

가. 생존율 실험

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10⁶cells/ml로 조정하여 mouse의 복강에 주입한 후 복강암을 유발하였다. 실험군은 대조군과 실험군 I, II(인삼약침군)로 분류하여 매일(1회/1일) 中脘에 0.1ml의 생리식염수를 주입한 대조군, 0.1ml의 인삼 증류 약침액을 胃脘에 주입한 실험군 I, 그리고 0.1ml의 인삼 증류 약침액을 中脘에 주입한 실험군 II의 생존여부를 관찰하였다.

나. Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역능 측정

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5×10⁶cells/ml로 조정한 후 생쥐의 복강에 0.2ml를 주입하여 암을 유발한 후 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

(2) 암세포의 배양

가. 배지의 구성

기본배지와 혼합배지의 구성은 A549 human epithelial lung cancer cells 실험과 동일하게 준비하였다.

나. 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(Jouan IGO-150A, France) 안에서 배양시킨 후 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

다. 암세포 유발

IL-2, IL-4 및 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현유무 측정의 경우는 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5×10⁶cells/ml로 조정된 후 생쥐의 복강에 0.2ml를 주입한 후 14일째 치사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

3. 측정 항목

1) A549 human epithelial lung cancer cell에 대한 영향

(1) Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

가. Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같이 A549 세포로부터 total RNA를 추출하였다.

A549 세포 1×10⁷를 1ml의 lysis buffer를 넣고 세계 흔들어 준 다음 얼음에 5분간 방치하였다가 0.4배의 chloroform를 첨가하고 다시 얼음에 5분간 방치한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 여기에 동량의 phenol : chloroform(5 : 1) (Sigma, USA)를 넣고 다시 원심분리하여 새 튜브에 상층액을 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 1시간 방치한 후 다시 원심분리하였다. Pellet에 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에 용해시켜 UV spectrophotometer(Hitachi, Japan)로 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 정량하였다.

나. Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction

A549 세포로부터 분리한 total RNA 2μg에 oligo-(dT) 15mer(Promega, USA) 10pmol를 첨가한 후 여기에 PCR 완충용액, AMV reverse transcriptase 20U, RNasin 10U 그

리고 2mM dNTP를 첨가하였다. 그리고 RNase-free water에 용해시켜 최종부피를 20μl로 조정된 후 57°C에서 10분, 42°C에서 60분간 반응시킨 후 cDNA를 만들었으며 95°C에서 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 차후 PCR 실험에 사용하기 위하여 -20°C에 보관하였다.

준비된 cDNA를 주형으로 Table 1에 예시되어있는 primer를 사용하였으며 cDNA 2μl, dNTP 200μM, primer 300 nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl (pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U를 섞어 최종부피가 40μl가 되도록 하여 PCR에 사용하였다. PCR반응은 thermocycler에서 94°C/2min(1회), 94°C/1min(1회), annealing (1회, Cox-1, 65°C ; Cox-2, 55°C ; Bcl-2, 65°C ; Bax, 59°C) 그리고 72°C/1 min(1회)를 40회 반복하였고, 마지막 신장반응을 72°C에 1회 수행하였다. PCR products를 확인하기 위하여 ethidium bromide (0.5mg/ml)가 포함된 agarose(2%)를 TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH8.3)에 녹여 사용하였으며, 시료 5μl와 3 μl loading buffer(6x ; Sambrook 등, 1989)를 gel에 주입하여 100V로 30분간 전기영동하였다. 전기영동 끝난 gel을 UV trans- illuminator(Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)을 사용하여 자외선 조명 하에서 촬영하였다. 이때 사용한 Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax 유전자의 specific primer는 다음과 같다.(Table 1.)

Table 1. Specific primers for Cox-1, Cox-2 and Bcl-2, Bax

Name (Product size)	primer
Cox-1 forward (303 bp)	5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3'
reverse	5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'
Cox-2 forward (305 bp)	5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'
reverse	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'
Bax forward (205 bp)	5'-GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC-3'
reverse	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA-3'
Bcl-2 forward (318 bp)	5'-CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3'
reverse	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'

2) Sarcoma-180에 대한 항암 및 면역능

(1) 생존율

생리식염수를 증완혈에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한

군(이하 control 군)과 인삼 증류 약침액을 胃俞에 0.1ml 씩 매일(1회/1일) 주입한 군(이하 실험군 I)과 中脘에 0.1ml 씩 매일(1회/1일) 주입한 군(이하 실험군 II)에 대하여 30일 동안 생존여부를 비교 관찰하였다.

가. 측정 방법

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS (phosphate buffered saline, pH7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 실험군의 복강에 5×10^6 cells/0.2ml를 주입하여 30일 동안 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다. Geran 등²⁰⁾이 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(day)
Y: 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(day)
T: 실험군의 median survival time(day)
C: 대조군의 median survival time(day)

나. 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 $10 \times \text{HBSS}$ (Gibco, U. S. A.)로 2회 세척하고 기본배지로 한 번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

(2) Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4 생산량

마우스의 비장세포를 추출한 후 IL-2, IL-4를 Flow cytometry(Beckton Dickinson, USA)를 통하여 측정하였다. 추출한 splenocyte를 1×10^6 cells/ml로 조정된 후

brefeldin A(eBioscience, USA)를 1 μ /ml의 농도로 넣고 5% CO₂와 95% air의 배양기에서 3시간 배양하였다.

배양 후 세포를 500 \times g, 10°C로 5분간 2회 원심 분리하여 얻은 세포에 1ml의 staining buffer(0.15M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH7.3)와 250 μ l의 BD Cytotfix/Cytoperm(BD bioscience, USA)를 넣고 4°C에서 20분 동안 배양하며 세포를 고정하였다.

고정이 끝난 후 2ml의 BD Perm/Wash solution(BD bioscience, USA)로 세척 하고 500 \times g로 5분간 원심 분리하였다. 이후에 100 μ l의 BD Perm/Wash solution에 고정된 세포에 2 μ l의 PE-con jugated anti-IL-2 antibody, PE-conjugated anti-IL-4 anti body를 각각 넣고 4°C에서 30분간 배양하였다.

그 후 BD Perm/Wash solution을 넣고 500 \times g로 5분간 원심 분리한 후 다시 500 μ l PBS/2 % paraformaldehyde solution에 넣은 후 Flow cytometry(Beckton Dickinson, USA)로 측정하였다.

(3) ELISA를 이용한 IL-2 생산량

IL-2 측정은 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate 에 plate reagent 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well 에 50 μ l 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l 씩 첨가 후 37°C Incubator(Jouan IGO- 150A, France)에서 1시간 동안 반응하였다. 반응 후 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응하였다. 반응을 멈추기 위해 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550nm 에 측정하였다.

Sarcoma-180 세포를 Balb/c계 생쥐에 주입하고 14일째에 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 μ g/ml의 농도로 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 IL-2의 생산량을 측정하였다.

Mouse의 IL-2 생산량 측정은 Quantikine M ELISA Kit (R&D system, U. S. A.)를 이용하였다. 이 ELISA Kit는

sandwich enzyme immunoassay technique를 이용하는 것으로, micro plate에 pre-coated된 정제된 polyclonal antibody에 시료를 처리하여 결합시킨 후 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 Standard sample의 표준곡선으로부터 시료의 IL-2양을 계산하는 방법으로 모든 과정은 제조회사의 지침을 따랐다. 96 well microtiter plate의 각 well에 50 μ l의 Assay Diluent를 넣고, 다시 Standard, Control, 시료를 각 well에 50 μ l씩 분주하고 1분 정도 tapping하고 plate cover로 덮은 후 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100 μ l의 Conjugate를 넣고, plate cover로 덮은 뒤 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100 μ l의 Substrate Solution을 넣고 실온에서 30분 동안 빛을 차단하며 반응하였다. 반응 종료 후에 100 μ l의 Stop solution을 넣고 반응을 중지하였다. 그 후 ELISA reader(Emax, USA)로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) RT-PCR을 mRNA 발현

가. Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 마우스의 비장으로부터 total RNA를 추출하였다.

비장 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응하였다. chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 후, 14,328 \times g에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액만을 분리한 후, Phenol : Chloroform(5 : 1)(Sigma, USA)을 동부피로 처리하여 원심분리 하였고 다시 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 동부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한 후 다시 원심분리 하였다. Pellet을 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에서 용해시켜 얻어진 total RNA를 UV spectrophotometer(Hitachi, Japan) (260/280nm)로 정량하였다.

나. Reverse transcription-polymerase chain reaction

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2 μ g를 가지고 β -

actin과 IFN- γ 에 대해서는 oligo-(dT) 15primer(Promega, USA) 1 μ l를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-10에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1 μ M를 사용하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 pre-incubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25 $^{\circ}$ C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), RNasin ribonuclease inhibitor(Promega, USA) 1U/ μ l, AMV reverse transcriptase (Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2 μ l씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

Reverse transcripton으로부터 얻은 cDNA 2 μ l를 dNTP mixture 200 μ M, gene specific primer 300 nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25 $^{\circ}$ C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR thermal cycler(Hybaidd, UK)에서 denaturation은 94 $^{\circ}$ C 5min으로, annealing은 IL-2은 60 $^{\circ}$ C, IL-4은 48 $^{\circ}$ C, IL-10은 72 $^{\circ}$ C, IFN- γ 은 56 $^{\circ}$ C, β -actin은 60 $^{\circ}$ C로 35cycles를 하였고, extension은 72 $^{\circ}$ C 10min하였다. PCR product를 확인하기 위하여 agarose(2%) TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer (pH8.3)에 녹여 사용하였으며 시료 5 μ l를 loading buffer를 gel에 주입하여 100volt에서 30분간 전기영동하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 DNA는 UV transil luminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였다. 이때 사용한 cytokine과 β -actin의 specific primer는 다음과 같다.(Table 2.)

Table 2. Specific primers for cytokines and β -actin

Name (Product size)		primer
β -actin (349 bp)	forward	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
	reverse	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
IL-2 (168 bp)	forward	5'-TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G-3'
	reverse	5'-GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G-3'
IL-4 (220 bp)	forward	5'-TTC TCG AAT GTA CCA GGA GC-3'
	reverse	5'-AAC GCT ACA CAC TGC ATC TT-3'
IL-10 (421 bp)	forward	5'-AGA CTT TCT TTL AAA CAA AGG ACC AGC TGG A-3'
	reverse	5'-CCT GGA GTC CAG CAG ACT CAA TAC ACA CTG C-3'
IFN- γ (247 bp)	forward	5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3'
	reverse	5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'

4. 통계처리

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

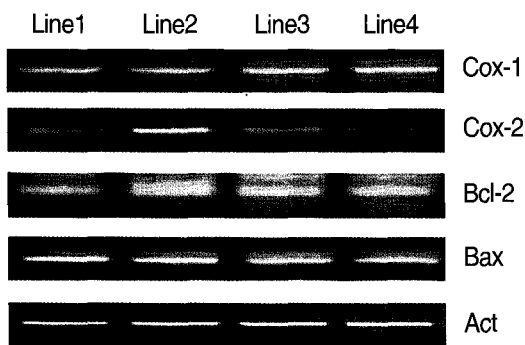
III. 結果

1. A549 human epithelial lung cancer cell에 대한 영향

1) Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현

인삼증류약침의 면역학적 기능 이외에 직접적으로 A549 human epithelial lung cancer cell에서 Cox-1과 Cox-2, Bcl-2 및 Bax에 대하여 어떠한 영향이 있는가를 알아보기 위해 total RNA를 회수하여 RT-PCR에 의해 mRNA의 발현양상을 알아보았다.

Prostaglandin 합성과정에서 정상적 생리기능에 관여하는 Cox-1의 경우 실험군 모두 약간의 증가를 보였고,



Line1 : Normal
 Line2 : LPS
 Line3 : LPS + white-ginseng Herbal Acupuncture 200mg/ml
 Line4 : LPS + white-ginseng Herbal Acupuncture 400 mg/ml

Fig. 2. Expression of Cox-1, Cox-2, Bcl-2, and Bax in A549 human epithelial lung cancer cells, with and without lipopolysaccharide and distilled white-ginseng Herbal Acupuncture, respectively.

염증 반응에 관여하는 Cox-2의 경우 LPS 처리시 발현이 증가하였던 것을 인삼을 처리하면 발현이 normal 상태와 같이 감소된 것을 보여주었다. 그러므로 인삼의 경우 직접적으로 염증과정에 관여하는 Cox-2를 감소시킴으로써 염증형성에 의한 prostaglandin 합성을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.(Fig. 2.)

Apoptosis의 조절에 관여하는 인자인 Bcl-2, Bax의 mRNA 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 Bcl-2의 경우 약간의 감소를 보여주고 있으며, Bax의 경우 Line 3에서 약간의 증가를 보여주었고, Line 4에선 별 변화를 보이지 않았다. 이를 통해 인삼이 癌細胞死에 어느 정도 관여할 수 있는 가능성을 제시해준다고 볼 수 있겠다.(Fig. 2.)

2. Sarcoma-180 대한 항암 및 면역능

1) 생존율

① 생존율 측정

Median survival time은 대조군(Control)은 27일, 실험군 I은 22일, 실험군 II는 26일을 나타내어 실험군 모두 대조군에 비하여 별 차이가 없었다.(Fig. 3.)

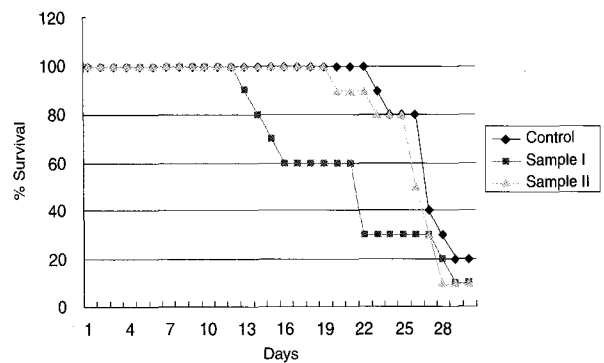


Fig. 3. Median survival time of mouse treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture *in vivo*.

Control : treated with normal saline(0.1cc)
 Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)
 Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

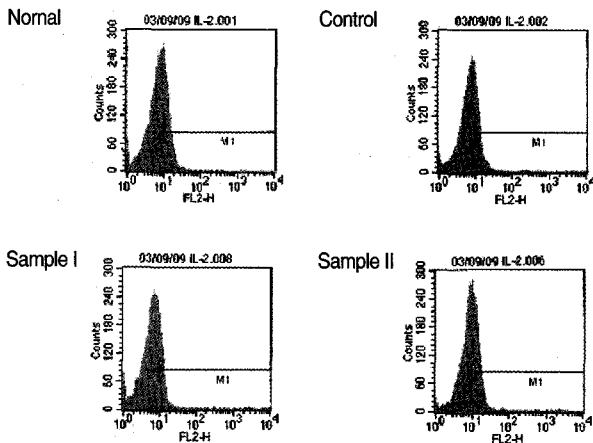


Fig. 4. IL-2 Productivity by Flow cytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline(0.1cc)

Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)

Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

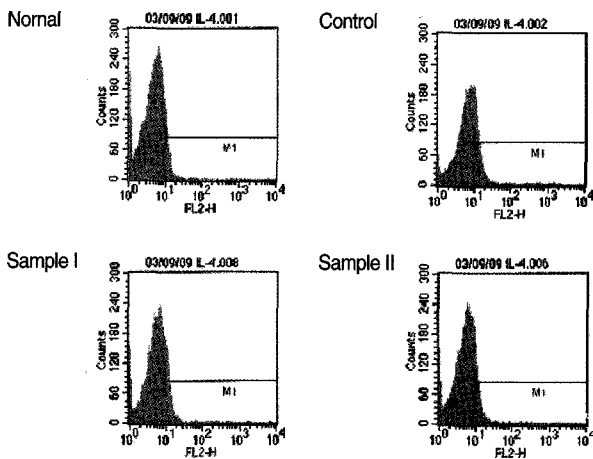


Fig. 5. IL-4 Productivity by Flow cytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline(0.1cc)

c) Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁)(0.1cc)

d) Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂)(0.1cc)

2) Flow cytometry를 이용한 IL-2 및 IL-4 생산량

① IL-2 생산량

수치는 큰 의미 없었으나 실험군 I에서는 별 변화를 보이지 못하였고, 정상군이나 대조군보다 실험군 II에서는 약간의 증가가 보였다.(Fig. 4.)

② IL-4 생산량

수치는 큰 의미 없었으나 정상군이나 대조군보다 실험군 I, II 모두에서 약간의 감소가 보였다.(Fig. 5.)

3) ELISA를 이용한 IL-2 생산량

검액 투여 후 14일 후에 정상군, 대조군 및 실험군의 mouse로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 IL-2의 생산능을 측정된 결과 정상군은 919.38±19.53pg/ml, 대조군은 921.43±15.03 pg/ml, 실험군 I은 121.22±11.15pg/ml, 실험군 II는 905.58±16.77pg/ml를 나타내어 실험군 I에서는 대조군에 비해 감소하였고, 실험군 II는 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Fig. 6., Table 3.)

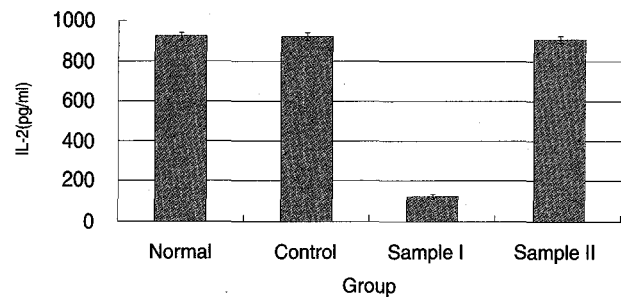


Fig. 6. IL-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline(0.1cc)

Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)

Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

Table 3. IL-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture.

Group	IL-2(pg/ml)
Normal	919.38 ± 19.53
Control	921.43 ± 15.03
Sample I	121.22 ± 11.15 ^{a), b)}
Sample II	905.38 ± 16.77 ^{a), b)}

a) : Statistical significant (vs Normal) (P<0.05)

b) : Statistical significant (vs Control) (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)

Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

4) RT-PCR을 이용한 Cytokine의 mRNA 발현

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 투여한 후 人蔘증류 약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, Normal saline

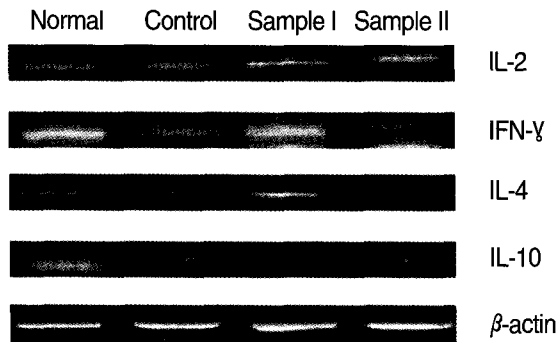


Fig. 7. Expression of cytokine mRNA extracted from spleen by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. After a mouse was inoculated with Sarcoma-180, it was treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture in variable content.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Wisu(BL₂₁) (0.1cc)

Sample II : treated with distilled white-ginseng Herbal Acupuncture at Chung-wan(CV₁₂) (0.1cc)

만을 투여한 대조군, 약침 0.1cc를 위수에 주입한 실험군 I, 약침 0.1cc를 중완에 주입한 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다.

Internal control로 사용한 β-actin과 각각의 cytokine을 비교하였을 때, 실험군 I의 경우 IL-2, IL-4에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였고, IFN-γ는 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다. 반면 IL-10에서는 정상군에 비해 실험군 I, II에서 발현이 감소되었음을 보였다. (Fig. 7.)

IV. 考 察

人蔘은 五加皮科에 속한 蔘의 根으로 性은 微寒^{2,4,14-18}, 小寒³, 微溫^{6,19-20}, 溫^{5,14-16,21-22}하고, 味는 甘^{2-5,14-23}, 苦³, 微苦^{14,22}하며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年², 大補肺中元氣²³등의 效果가 있고 五勞七傷, 虛損肺脾, 陽氣不足, 短氣少氣, 腸胃中冷, 心腹鼓痛, 胸脇鼓滿, 霍亂吐逆等¹⁹에 광범위하게 사용되는 滋補強壯 興奮劑이다.

인삼에 대한 실험적 연구는 1854년 Garriques가 saponin을 분리해 내면서 비롯되었고²⁴, 1957년에는 소련의 Brekhman이 인삼의 adaptogen 활성과 관련지어 인삼 saponin을 유효성분으로 강조한 이래²⁵많은 연구가 진행되었다.

특히 그중 인삼의 항암작용에 관해서는 黃²⁶⁻²⁷, 鄭²⁸, 金²⁹, 權³⁰, 張³¹, 全³², 尹³³, 李³⁴, 全³⁵ 등이 人蔘의 면역증강 및 항암효과에 대하여 보고하였다.

서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 ‘조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것’이라고 정의되어 있다³⁶.

腫瘍은 韓醫學에서 殷墟의 갑골문에 ‘瘤’라는 병명이 나타나고³⁷, 《周禮》에는 瘍醫라는 표현이 등장하면서 腫瘍에 대한 인식이 시작되었다³⁸. 《內經》에서는 腫瘍을 “伏梁, 腸覃, 石瘕, 厥疝, 息賁, 昔瘤, 積聚” 등으로 언급하고, 있으며, ‘瘤’자는 宋代의 《衛濟寶書》에서 찾아볼 수 있다³⁹.

腫瘍의 病因 病機는 《靈樞》水脹論³⁹에 “寒氣客于腸外與衛氣相搏, 氣不得營, 因有所系癖而, 內着惡氣乃起, 瘕肉乃生, 其始得也, 大如鷄卵 …”, “石瘕生于胞中, 寒氣客于子門, 氣不得通, 惡血當瀉不瀉”, 百病始生篇³⁹에 “積

之始生, 得寒內生”, 九鍼論³⁹⁾에 “四時八風之客于經絡之中, 爲癰疽者也”로 外感을 원인으로 刺節眞邪篇³⁹⁾에선 “虛邪之人于於身也深, 寒與熱相搏久留而內着.” 正氣虛를 원인으로 보았고, 五變篇³⁹⁾에서는 “皮膚薄而不澤, 肉不堅而掉澤 如此則腸胃惡 惡則邪氣留止 積聚乃傷 脾胃之間, 寒溫不次, 邪氣稍之, 蓄積留止, 大聚乃起 … 津液血氣 腸胃之所生也. 腸胃惡則 邪氣留止而成積聚 內傷腸胃之間, 若在飲食之寒溫不次 邪氣稍之則蓄積”라 하여 飲食傷과 外感을 巢⁴⁰⁾는 “積聚者 內陰陽不和 臟腑虛弱 受于風邪 搏于腑臟之氣少爲也”라 하여 正氣虛와 外感風邪를 원인으로 보았으며, 陳⁴¹⁾은 “乳岩由于憂思鬱結 所願不遂 肝脾氣逆 以致經絡阻塞 結積成核.”이라 하여 七情變化에 의해 유발한다고 하였다.

약침요법은 經絡學說 원리에 의거하여 질병과 유관한 穴位, 壓痛點, 陽性反應點에 약침액을 주입하여 침 자극과 약물작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고, 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 요법이다⁴²⁾.

인삼약침에 관한 연구는 金 등⁴³⁾이 中脘에 인삼증류약침을 주입하였을 때 주정해독능력이 있음을 보고하였고, 李 등⁴⁴⁾은 氣海, 腎俞에 人蔘藥鍼 주입시 임파구활성을 통한 면역기능 향상능력이 있음을 보고하였고, 金 등⁴⁵⁾은 수삼, 백삼, 홍삼약침을 삼음교에 주입시 혈당저하효과가 있음을 보고하였으며, 李 등⁴⁶⁾은 인삼증류약침의 중완 주입시에 체중 증가 및 소화관 호르몬 관여한다고 보고하였고, 林⁴⁶⁾은 인삼증류약침의 항암작용에 관한 유의성 있는 보고를 하였다.

中脘은 太倉, 胃脘, 上紀, 中管, 胃募, 中胃, 胃中이라고도 하며, 臍上 4寸에 위치하여 任脈經에 속하고, 手太陽少陽, 足陽明, 任脈의 會穴이며, 胃의 募穴, 八會穴중 腑會穴이고 回陽九針穴중의 하나로, 穴性은 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降하여, 胃痛, 腹脹, 腸炎, 癲狂, 子宮脫出 등에 활용할 수 있으며¹²⁾, 朴⁴⁷⁾, 崔⁴⁸⁾, 徐⁴⁹⁾, 洪⁵⁰⁾, 許⁵¹⁾, 金⁵²⁾, 李⁵³⁾, 崔⁵⁴⁾, 金 등⁵⁵⁾, 李 등⁵⁶⁾, 李⁵⁷⁾, 李⁵⁸⁾, 朴 등⁵⁹⁾, 權 등⁶⁰⁾이 抗癌에 관련된 논문에서 中脘을 사용하였다.

胃俞는 제12胸椎下兩傍 각 1寸 5분에 위치하며, 穴性은 健脾和胃, 化濕消滯, 扶中氣虛弱이며, 胃炎, 胃潰瘍, 胃下垂, 中濕 등에 쓰인다⁴²⁾.

이에 본 연구는 항암효과와 면역기능에 어느 정도의 유의성이 규명된 인삼증류약침을 이용하여 염증반응에 관여하는 Cox-1,2 및 종양의 성장조절 인자로서 Apoptosis의 조절에 관여하는 Bcl-2, BAX의 mRNA 발현 여부를 측정하고, sarcoma-180으로 복강암이 유발된

mouse에 인삼증류약침을 中脘과 胃俞에 주입하여, 생존율 및 Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4의 생산량과 ELISA를 이용한 IL-2 생산량, RT-PCR을 이용한 mRNA 발현여부를 관찰하였다.

Wardlaw 등⁶¹⁾은 폐암 세포주에서 Cox-2는 과발현되며 Cox 억제제를 처리하면 세포성장을 잠시 억제할 수 있다고 보고하였다. Cox-2는 細胞의 인지질에 있는 Aracchidonic acid를 prosta-glandins(PGE2)로 代謝시키는 물질이며 특히 炎症反應과 관계있는 유전자로서 炎症反應 시 유도되는 유도형(inducible type)이다. 아스피린, 인도메타신 및 다른 비스테로이드계의 消炎劑의 기전은 Cox-2의 기능을 抑制함으로써 prostaglandin과 같은 염증매개물의 生産을 抑制함으로써 강력한 抗炎效果가 있는 것이다⁶²⁾.

이 Cox는 prostaglandin 합성과정에서 중요한 요소로 Cox-1과 Cox-2가 있는데 Cox-1의 경우 정상적인 상태에서는 항상 발현되며, Cox-2는 염증과정에 관여하여 발현이 증가하게 된다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Cox-1의 경우 실험군 모두 약간의 증가를 보였고, Cox-2의 경우 LPS 처리시 발현이 증가하였던 것을 인삼을 처리하면 발현이 normal 상태와 같이 감소된 것을 보여주고 있다. 그러므로 인삼의 경우 직접적으로 염증과정에 관여하는 Cox-2를 감소시킴으로써 염증형성에 의한 prostaglandin 합성을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.

다른 한편으로 인삼의 세포사에 의한 암세포 사멸능력을 알아보았다. 위와 같은 농도에서 인삼을 처리한 후 RT-PCR에 의하여 Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현을 조사하였다. Apoptosis(programmed cell death : PCD)를 억제하는 Bcl-2 유전자는 B세포 백혈병과 여포형 림프구에도 자주 보이는 t(14 ; 18) 염색체 전좌를 연구하던 중 발견되었으며⁶³⁾, 각종 암조직에서는 Bcl-2의 이상 혹은 과잉 발현이 나타나는데 colorectal cancer의 90%, 위암의 60%, 전립선암의 50%, non-small cell lung cancer의 20%, 신경모세포종의 30%, 흑색종과 급,만성 백혈병에서 90% 이상으로 아주 높은 발현을 하고 있어, Bcl-2가 이들 암의 발생에 관련하는 것으로 알려져 있다⁶⁴⁾. Bcl-2 관련 단백질은 세포와 조직에서 apoptosis를 조절하는 것이 특징이며, Bcl-2처럼 apoptosis를 억제하는 단백질로는 Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 등이 있으며, 반면 apoptosis를 유도하는 단백질로는 Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bik, Hrk 등이 보고되고 있는데⁶⁵⁾, Fig. 2에서 보여

주는바와 같이 대조군에 비해 실험군에서 Bcl-2의 경우 약간의 감소를 보여주고 있으며, Bax의 경우 Line 3에서 약간의 증가를 보여주고, Line 4에선 별 변화를 보이지 않았다. 약간의 증가를 보여주고 있으므로 인삼이 癌細胞死에 관여할 수 있는 가능성을 제시해준다고 볼 수 있겠다.

생존율에 있어서 증완과 위수에 인삼증류약침을 주입한 실험군이 대조군에 비하여 다소 생존증가율이 떨어짐을 나타내었다.(Fig. 3.)

면역은 외부로부터 미생물, 동물의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들고, 개체의 항상성을 유지하는 현상으로 생체가 자기(self)와 비자기(non-self)를 식별하는 것이며, 면역반응이란 비자기를 항원으로 인식하고 특이하게 항체를 생산하여 이를 처리하는 연쇄적인 반응이다⁶⁾.

면역을 담당하는 세포중 하나인 림프구에 있는 T세포는 세포막에 존재하는 단백질 종류에 의해 크게 CD4라는 단백질을 갖는 CD4+T세포와 CD8이라는 단백질을 갖는 CD8+T세포로 나뉘어 지는데, 그중 CD4+T세포는 일명 helper T세포라고도 불리며, Th1과 Th2 2가지로 나뉘어지는데, Th1세포는 대식세포 활성화작용 및 killer T세포의 활성화작용을 하는 T세포이고, Th2세포는 항체생산작용을 하는 T세포이다. Th1과 Th2는 같은 CD4+T세포이지만 방출하는 cytokine이 다르다. Th1이 방출하는 cytokine은 IL-2, IFN- γ 등이고, Th2가 방출하는 cytokine은 IL-4, IL-5, IL-6이다⁷⁾.

그 중 IL-2는 killer 세포의 활성화 및 B세포와 NK세포의 증식을 촉진시키며, IFN- γ 는 대식세포와 NK세포를 활성화시키며, IL-4는 B세포를 형질세포로 분화시켜, 항체 생산을 촉진하는 작용을 하며 IL-10은 Th1세포의 cytokine의 생성억제와 증식을 억제하는 작용을 한다⁸⁾.

Flow cytometry를 이용한 IL-2의 생산능 검액 검사결과에선 수치는 크게 의미 없게 나왔으나 실험군 I에서는 별변화를 보이지 못하였고, 정상군이나 대조군보다 실험군 II에서는 약간의 증가가 보였다.(Fig.4.)

Flow cytometry를 이용한 IL-4 생산능 검액 검사에서 수치는 크게 의미 없게 나왔으나 정상군이나 대조군보다 인삼증류약침을 실험군 I, II 모두에서 약간의 감소가 보였다.(Fig. 5.)

ELISA 측정법에선 실험군 I에서는 대조군에 비해 감소하였고, 실험군 II는 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않아서,(Table 3., Fig. 6.)인삼증류약침이 림

프구의 활성화, 분화, 증식에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다.

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 투여한 후 인삼증류약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, 대조군, 실험군 I, 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다.

Internal control로 사용한 β -actin과 각각의 cytokine을 비교하였을 때, 실험군 I의 경우 IL-2, IL-4에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였고, IFN- γ 는 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다. 반면 IL-10에서는 정상군에 비해 실험군 I, II에서 발현이 감소되었음을 확인하였다.(Fig. 7.)

V. 結 論

인삼증류약침의 항암효과와 면역능 관찰을 위하여 시험관내에서 A549 cell에 대한 Cox-1, Cox-2 효소와 Bcl-2 및 Bax의 mRNA 발현여부를 알아본 후, Sarcoma-180 복강암 세포를 주입한 mouse에서 생존율과 Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4생성능 및 ELISA를 이용한 IL-2측정과 RT-PCR을 이용한 면역능에 관여하는 Cytokine(IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10)의 mRNA 발현양상을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현측정 결과, Cox-1의 경우 실험군 모두 약간의 증가를 보였다. Cox-2는 LPS 처리시 발현이 증가하였던 것을 인삼을 처리하면 발현이 normal 상태와 같이 감소되었다. Bcl-2의 경우 대조군에 비해 실험군에서 약간의 감소를 보였다. Bax의 경우 Line3(200mg/ml)에서 약간의 증가를 나타내었다.
2. 생존율에 있어서 실험군이 대조군에 비하여 다소 생존증가율이 떨어짐을 나타내었다.
3. Flow cytometry를 이용한 IL-2 생산능 측정에서 실험군 I에서는 별변화를 보이지 못하였고, 정상군이나 대조군보다 실험군 II에서는 약간의 증가가 보였다. IL-4 생산능 측정에서 정상군이나 대조군보다 실험군 I, II 모두에서 약간의 감소가 보였다.

- 4. ELISA를 이용한 IL-2 생산능 실험에서 실험군 I에서는 대조군에 비해 감소하였고, 실험군 II는 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.
- 5. RT-PCR을 이용한 Cytokine의 mRNA 발현측정 결과, 실험군 I의 경우 IL-2,4 에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였다. IFN-γ는 실험군에서 큰 차이를 보이지는 않았다. IL-10에서는 정상군에 비해 실험군 I, II에서 발현이 감소되었음을 보였다.

參考文獻

1. 전국한의과대학 본초학교수공편저, 본초학, 서울, 영림사, p. 531, 1994.
2. 單書健, 神農本草經校證, 吉林科學技術出版社 p. 150, 1988.
3. 吳普, 吳普本草, 人民衛生出版社, p. 14, 1987.
4. 李時珍, 本草綱目, 人民衛生出版社, p. 699, 701, 1982.
5. 李梴, 醫學入門, 서울, 대성출판사, p. 400, 1997.
6. 唐慎微, 重修政和經史證類備用本草, 南天書局有限公司, p. 145.
7. 朝鮮總督府專賣局, 人蔘史, 서울, 法人文化社, pp. 3-4, 5.
8. 김성훈 외, 고려인삼의 주요 효능과 그 임상적 응용, 고려인삼학회지, Vol. 23, No. 1 p. 21, 1999.
9. 중약대사전편찬위원회, 완역중약대사전 권7, 서울, 정담, pp. 3473-3479, 1997.
10. 조재선 외, 고려삼의 이해, 서울, 도서출판 한림원, p. 12, 1995.
11. 대한약침학회, 약침요법시술지침서, 대한약침학회, 서울, pp. 13-14 112-118, 138-203, 1999.
12. 박희수, 수혈연구침구학, 서울, 의성당, p. 127, 246, 1996.
13. 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.
14. 王好古, 湯液本草, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 30-31, 1998.
15. 王綸 撰, 本草集要, 歷代本草精華叢書 三, 上海中醫藥大學出版社.
16. 陳嘉謨, 本草蒙筌, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 80-81, 1998.
17. 徐靈胎, 神農本草經百種錄, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 1102, 1998.
18. 張志聰, 本草崇原, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 1033, 1998.
19. 徐彥純, 本草發揮, 歷代本草精華叢書 二, 上海中醫藥大學出版社.
20. 朱輪, 本草詩箋, 台北, 旋風出版社 p. 37.
21. 張璐, 本經逢源, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 369-370, 1998.
22. 吳儀洛, 本草從新, 서울, 행림출판, p. 1, 1989.
23. 汪昂, 本草備要, 本草名著集成 華夏出版社, pp. 242-243, 1998.
24. Garriques. S, Panax Quinquefolia, Am Chem Pharm, 90 : 331, 1954.
25. Brekhman, I.I, Panax ginseng, Gosudarts Isdat et Med, Lit. Leningrad, p. 1, 1957.
26. 황우익, 고려인삼의 항암효과에 관한 연구, 고려인삼학회지, Vol. 25, No. 1, pp. 31-36, 2001.
27. 황우익 외, 인삼의 지용성 성분과 사포닌 유도체의 항암작용 연구, Vol. 8, No. 2, pp. 153-166, 1984.
28. 정노팔 외, 백삼과 인삼의 암세포에 대한 세포독성 및 세포주기에 미치는 영향, 고려인삼학회지, Vol. 24, No. 4 pp. 183-187, 2000.
29. 김기환 외, 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA 의 발현, 고려인삼학회지 Vol. 22, No. 4 pp. 324-330, 1998.
30. 권형철 외, 한국인삼의 항종양 효과 ; 세포독성과 종양의 성장억제에 미치는 영향, 전북의대논문집 Vol. 20, No. 1, 1995.
31. 장형철 외, 한국 인삼의 면역활성 및 항암효과에 관한 실험적 연구, 고려인삼학회지, Vol. 18, No. 3, pp. 151-199, 1994.
32. 전병선 외, CA 저장기 수삼 및 인삼의 항산화 작용과 항암작용에 미치는 영향, Vol. 20, No. 3 pp. 262-268, 1996.
33. 윤택구 외, 인삼복용과 암에 관한 전향성 역학적 연구, 고려인삼학회지, Vol. 19, No. 2 pp. 87-92, 1995.
34. 이원영, 인삼 특수성분에 의한 마우스 복강거식세

- 포의 항암특성, 한국암학회지 Vol. 20, No. 2 pp. 126-132, 1988
35. 전해경 외, 생쥐의 대식세포 종양치사활성과 항암 효과에 미치는 인삼 Saponin 분획물과 Cyclophosphamide 의 영향, 고려인삼학회지, Vol. 15, No. 2 pp. 99-105, 1991.
 36. 서울대학교 의과대학, 증양학, 서울대학교 출판부, 서울, pp. 1-3, 137- 143, 225, 1992.
 37. 최승훈, 동의종양학, 서울, 행림서원, pp. 13-42, 1995.
 38. 方藥中, 實用中醫內科學, 上海, 上海科技技術出版社, pp. 621- 628, 1986.
 39. 배병철, 今釋 黃帝內經靈樞, 서울, 정보사, p. 358, 427, 494, 567, 590. 1995.
 40. 巢元方, 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, p. 576, 1979.
 41. 陳實功, 外科正宗, 上海, 上海科技技術出版社, p. 75, 1987.
 42. 김민수 외, 인삼 약침이 에탄올 중독 흰쥐의 해마에서 c-fos 생성에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 20, No. 3, pp. 131- 140, 2003.
 43. 이은홍 외, 인삼 약침요법이 Glucocorticoid 투여 마우스의 임파구활성에 미치는 영향, 대한면역학회지, Vol. 19 pp. 355-362, 1997.
 44. 김웅시 외, 수삼, 백삼 및 인삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 6, No. 1, pp. 1-5, 1989.
 45. 이산명 외, 인삼, 녹용 및 목향수침이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬분비에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol. 5, No. 1, pp. 1-5, 1988.
 46. 임사비나 외 인삼약침과 Lidocaine을 첨가한 인삼 약침이 종양 및 면역기능에 미치는 영향, 동서의학, Vol.20, No.3 pp21-39, 1995.
 47. 박상용, 의이인수침이 종양에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1994.
 48. 최원환, 고삼약침이 항종양 및 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1994.
 49. 서주원, 구기엽약침이 S-180에 대한 항종양 효과와 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교대학원 석사학위논문, 1996.
 50. 홍영식, 대극약침이 항암 및 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1997.
 51. 허부, 대극 분획약침이 S-180에 대한 항종양 효과 및 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교대학원 석사학위논문, 1998.
 52. 김중완, 금은화약침의 항종양 작용 및 생체장기에 대한 영향, 대한침구학회지, Vol. 16, No. 1, pp. 255-267, 1999.
 53. 이정화, 와송약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구, 대전대학교대학원, 박사학위논문, 1999.
 54. 최종호, 구기자 및 지골피약침이 종양과 면역반응에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 박사학위논문, 1999.
 55. 김소형 외, 전갈 약침액의 항돌연변이 및 항암효과, 대한침구학회지, Vol. 17, No. 3, pp. 151-167, 2000.
 56. 이준무 외, 제조약침의 항암작용에 관한 연구, 대한동의병리학회지, Vol. 14, No. 2, pp. 132-143, 2000.
 57. 이은용, 육종용약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구, 대전대학교대학원, 박사학위논문, 2000.
 58. 이선희, 항암 및 면역효과에 복분자약침이 미치는 영향, 대전대학교 박사학위논문, 2000.
 59. 박상용 외, 익지인약침이 항암 및 면역기능에 미치는 실험적 연구, 대한침구학회지, Vol. 18, No. 3, pp. 79-93, 2001.
 60. 권기록 외, 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성·아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 대한약침학회지, Vol. 6, No. 2, pp. 7-27, 2003.
 61. Wardlaw SA, March TH, Belinsky SA. Cyclooxygenase -2 expression is abundant in alveolar type II cells in lung cancer-sensitive mouse strains and in premalignant lesions. *Carcinogenesis*. 2000 Jul ; 21(7) : 1371-7.
 62. 송계용 외, 핵심병리학, 서울, 고려의학, pp. 63-94, 1998.
 63. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science*, 1985 ; 228 : pp. 1440-3.
 64. Reed J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 1994 ; 124 : 1-6.
 65. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*, 1997 ; 3 : 614-20.
 66. 菊地浩吉 外, 最新 免疫學, 集文堂, 서울, p. 33,335, 1989.
 67. 新谷太, Pathophysiology로 이해하는 내과학 권7 면역, 알레르기 질환, 정담, pp. 5-11, 2002.