

원저

A549 human lung cancer cell과 Sarcoma-180 복강암에 대한 水蔘 蒸溜藥鍼의 抗癌效果

장해영* · 권기록* · 박희수*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

The Study on Anti-cancer Effects of Distilling Fresh-ginseng Herbal acupuncture against implanted Sarcoma-180 *in vivo* and A549 human epithelial lung cancer cells *in vitro*

Hae-Young, Jang* · Ki-Rok Kwon* · Hee-Soo Park*

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

Abstract

Objectives : This study was to investigate the anti-cancer effects of herbal acupuncture with distilled fresh ginseng. The herbal acupuncture was injected to Chung-wan(C.V12) and Wisu(BL21) of mice that were subjected to Sarcoma-180 abdominal cancer cell and A549 human epithelial lung cancer cells *in vitro*.

Methods : Anti-cancer effects of distilled fresh ginseng herbal acupuncture were tested by measuring Cox, Bcl-2, and Bax by using RT-PCR in A549 human epithelial lung cancer cells *in vitro*. And four weeks old Balb/c line male mice weighing around 20±3g were used to measure survival rate and anti-cancer effect to outputs of interleukin-2 and interleukin-4 using flow cytometry, possibility of mRNA manifestation using RT-PCR, and Cox mRNA. The results are as follows.

Results :

1. In measuring mRNA manifestation in Cox, Bcl-2, and Bax by using RT-PCR in A549 human epithelial lung cancer cells *in vitro*, the result showed that fresh ginseng decreased Cox-2 which is directly involved in inflammation process.
2. Survival rate was measured in an anti-cancer effect experiment against Sarcoma-180 abdominal cancer. Median survival time of controlled group was 27 days, of experiment group I was 21 days, and of experiment group II was 27 days. Therefore, experiment group I showed -22.2% increase in survival rate and experiment group II showed no difference compare to controlled group.
3. There was no difference between condition group and controlled and experiment group in measuring outputs of interleukin-2 and interleukin 4 by using flow cytometry
4. In measuring outputs of interleukin-2 by using ELISA, there was no significant difference between condition group and controlled group and there was decrease in experiment group II compared to conditioned and controlled group.
5. In measuring cytokine mRNA manifestation by using RT-PCR, experiment group I showed increase of mRNA manifestation in interleukin-2,4 and interferon-γ and experiment group II showed no significant difference in interferon-γ.

Conclusion : According to the results, fresh ginseng herbal-acupuncture took a little effects in cancer. In using distilled fresh ginseng herbal acupuncture has effect on Cox-2 decrease. However, the difference in concentration of fresh ginseng showed no effect on killing cancer cell. It is assumed that inaccurate concentration of herbal acupuncture and fresh ginseng component could be the reason for this result. Therefore, future consideration will be studies on herbal acupuncture concentration.

Key words : fresh ginseng, herbal acupuncture, Sarcoma-180 cancer cell, Interleukin-2 productivity, Interleukin-4 productivity, cytokine mRNA.

I. 緒 論

人蔘은 Panax ginseng C.A. Meyer로 1843년 구소련의 C.A. Meyer에 의해 명명된 바 있으며¹⁾ 한국과 중국을 비롯한 동아시아로부터 시베리아 동부 및 북미에 걸쳐 분포하고 있다. 人蔘은 보통 4-6년간 재배하며, 채굴된 자연 상태의 人蔘을 水蔘이라 하는데 약 75%의 수분을 함유하고 있다. 이를 자연 상태에서 건조시킨 것을 白蔘(white ginseng)이라 한다. 또한 白蔘을 껍질을 벗기지 않은 상태로 증기로 쪄서 건조시킨 것을 紅蔘(red ginseng)이라 한다²⁾.

우리 나라에서 人蔘은 주로 紅蔘이나 白蔘으로 1차 가공되거나 엑스, 차, 드링크 등으로 2차 가공되어 판매되고 있으나 최근에는 소비자층의 저변 확대와 인삼에 대한 인식 제고로 水蔘의 소비량도 날로 증가하고 있다. 즉, 水蔘은 향미가 좋으며 쓴맛이 적고 맛이 부드러워 노약자들뿐만 아니라 젊은 사람이나 여성들의 기호에도 잘 부합된다³⁾.

藥鍼療法은 鍼灸, 經絡이론과 本草이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 제조하여 經穴이나 壓痛點에 주입하여 刺鍼과 藥物作用을 통하여 疾病을 치료하는 新鍼療法이다⁴⁾.

人蔘藥鍼과 관련된 연구로는 李 등⁵⁾이 中脘에 人蔘藥鍼을 주입하였을 때 체중증가와 소화효소분비에 관여한다고 보고하였고, 金 등⁶⁾은 水蔘, 白蔘, 紅蔘藥鍼을 三陰交에 주입하였을 때 유의한 혈당저하효과가 있음을 보고하였으며, 南은⁷⁾ 紅蔘藥鍼의 독성 실험에서 아무런 독성이 나타나지 않는다고 보고하였다.

人蔘의 抗腫瘍 효과에 관한 연구로는 Park 등⁸⁾이 紅蔘 추출물인 phorbol-12-myristate-13-acetate에 phorbol-12-myristate-13-acetate에 의한 혈소판의 40KD 및 20KD 단백질 인산화를 억제함으로써 암 발생을 억제한다고 보고하였다. 人蔘의 癌細胞 致死活性에 관한 연구는 크게 직접적인 인삼 성분의 암세포치사 활성 및 면역계의 활성을 통한 항암작용 등으로 구분할 수 있다. Choi 등⁹⁾은 인삼 추출물이 대식세포를 활성화시키므로 암세포치사활성을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구는 증류추출식 수삼약침의 항암효과와 면역

능을 알아보기 위하여 시험관내에서 A549 human epithelial lung cancer cells에 수삼약침을 처리한 후 RT-PCR을 이용한 Cox-1, Cox-2, Bcl-2, Bax의 mRNA 발현을 관찰하였다. 또한 Sarcoma-180으로 mouse에 복강암을 유발한 후, 水蔘 증류약침(이하 水蔘藥鍼)을 和胃氣, 化濕滯, 理中焦, 調升降 등의 效能있는 中脘(CV12)과 健脾和胃, 化濕消滯, 扶中氣虛弱 등의 效能이 있는 胃俞(BL21)에 주입하여¹⁰⁾ 생존율, IL-2, IL-4 및 RT-PCR을 이용한 Cytokine mRNA 발현유도의 관찰을 통해 水蔘 藥鍼이 암세포를 살해하는 세포의 생성에 미치는 영향에 대해 실험 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 동물 및 재료

1) 동물

생존율과 항암능 측정을 위하여 4주령된 체중 20±3g 내외의 Balb/c계 음성 mouse를 사용하였고, 사용된 동물은 대한바이오링크에서 구입하여 2주 동안 고탄사료(삼양사료, 한국)와 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) 水蔘증류약침의 조제⁴⁾

실험에 사용한 水蔘은 한국담배인삼공사 제품을 구입하여 사용하였다. 먼저 水蔘을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후 증류수와 배합하여 2시간 가량 전탕한 후 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 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

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

* 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283
상지대학교 부속한방병원 침구과
(Tel : 033-738-7503, E-mail : beevenom@paran.com)

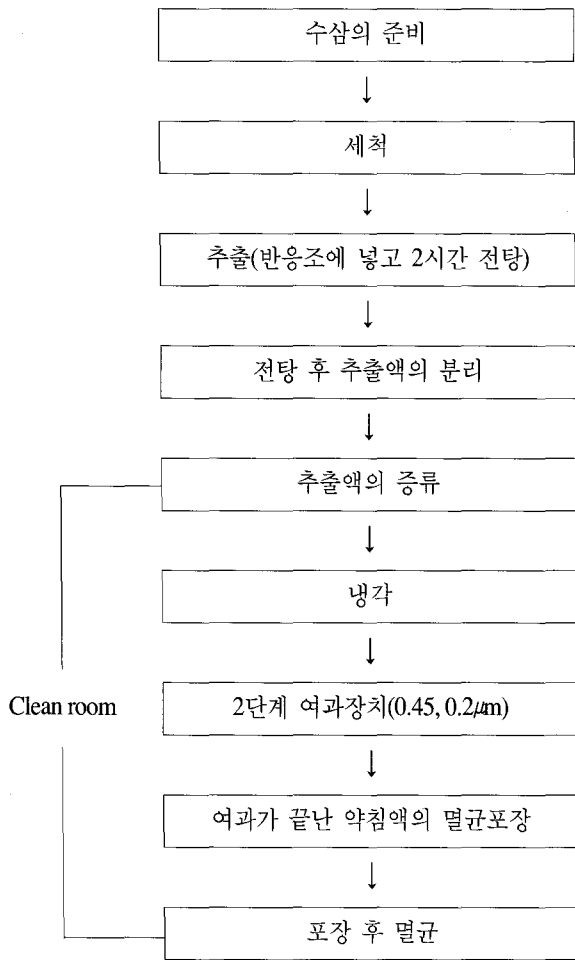


Fig. 1 Manufacturing process of Distilling fresh-ginseng Herbal acupuncture.

2. 방 법

1) 시험관내의 A549 human epithelial lung cancer cells 에 대한 수삼증류약침의 Cox-1, Cox-2, Bcl-2, Bax mRNA 발현

(1) 암세포의 배양

가. 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(100,000units/ml) 1ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에

넣고 1,000ml로 조정한 후 pH를 7.2로 맞추고 0.22µm 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, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태로 분양받아 이를 녹인 후 혼합배지에 부유시켜 5% CO₂ 배양기(존샘, 한국)안에서 배양시킨 후 실험에 사용하였다.

2) Sarcoma-180의 복강암을 유발 후 약침 처리한 mouse의 생존율, IL-2, IL-4 및 RT-PCR을 이용한 Cytokine mRNA 발현

(1) 수삼 증류 약침의 시술

가. 생존율 실험

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10⁶cells/ml로 조정하여 복강에 투여한 후 복강암을 유발하였으며, 대조군과 수삼약침군(실험군 I, II)의 생쥐에 saline과 수삼 증류 약침액을 胃脘(실험군 I)과 中脘(실험군 II)에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입하여 30일 동안 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

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(100,000units/ml) 1ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정 한 후 pH를 7.2로 맞추고 0.22µm 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

Balb/c계 생쥐에 복강암을 유발시키기 위한 암 세포주는 한국세포주은행(KCLB)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.

다. 암 유발

생존율 측정의 경우 지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 2.5×10⁶cells/ml로 조정하여 대조군과 수삼약침군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 복강암을 유발시켜 30일 동안 생존율을 측정하였다.

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

3. 측정항목

1) A549 human epithelial lung cancer cell에 대한 수삼약침의 영향

(1) Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 발현

가. Total RNA isolation

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

폐 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응하였다. chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4°C에서 5분 동안 반응한 후, 14,328×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°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

폐 조직으로부터 분리한 total RNA 2µg으로 Cox-1, Cox-2 및 Bcl-2, Bax의 발현에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1µm를 사용하여 70°C에서 10분 동안 preincubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-27), RNasin ribonuclease inhibitor(Promega, USA) 1U/µl, AMV reverse transcriptase(Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2µl씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다.

Reverse transcripton으로부터 얻은 cDNA 2µl를 dNTP mixture 200µM, gene specific primer 300nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-27), Taq polymerase 2U을 잘 섞어

PCR thermal cycler(Hybaid, UK)에서 denaturation은 94°C 5min으로, annealing에서 β-actin은 60°C, Cox-1은 65°C, Cox-2은 52°C, Bcl-2은 65°C, Bax은 59°C으로 35cycles를 하였고, extension은 72°C 10min하였다. PCR product를 확인하기 위하여 agarose(2%) TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하였으며 시료 5μl를 loading buffer를 gel에 주입하여 100volt에서 30분간 전기 영동 하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 DNA는 UV transiluminator(Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였다.

이때 사용한 Cox 효소와 Bcl-2와 Bax 단백질의 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 (303 bp)	forward	5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3'
	reverse	5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'
Cox-2 (305 bp)	forward	5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'
	reverse	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'
Bax (205 bp)	forward	5'-GTG CAC CAA GGT GCC GGA AC-3'
	reverse	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA-3'
Bcl-2 (318 bp)	forward	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 항암효과

(1) 생존율 측정

대조군(control 군)과 수삼 증류 약침액을 胃俞에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한 군(실험군 I)과 中脘에 0.1ml씩 매일(1회/1일) 주입한 군(실험군 II)에 대하여 30일 동안 생존여부를 비교 관찰하였다. 대조군은 실험군과 동량의 생리식염수를 中脘에 주입하였다.

가. 측정 방법

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 실험군의 복강에 5×10⁵cells/0.2ml를 주입하여 30일 동안 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다. Geran11) 등이 기술한 median survival time을 이

용하여 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 알코올로 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.)로 잘게 으갠 후 조직과편을 제거하고 기본배지로 3회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수으로써 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.

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

마우스의 비장세포를 추출한 후 IL-2, IL-4, cytokines 량을 Flow cytometry(Beckton Dickinson, USA)를 통하여 측정하였다.

추출한 splenocyte를 1×10⁶cells/ml로 조정 한 후 brefeldin A(eBi- science, USA)를 1μl/ml의 농도로 넣고 5% CO₂와 95% air의 배양기에서 3시간 배양하였다.

배양 후 세포를 500×g, 10°C로 5분간 2회 원심 분리 하여 얻은 세포에 1ml의 staining buffer(0.15M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3와 250μl의 BD Cytofix/Cytoperm(BD bioscience, USA)를 넣고 4°C에서 20분동안 배양하며 세포를 고정하였다.

고정이 끝난 후 2ml의 BD Perm/Wash solution(BD bioscience, USA)로 세척하고 500×g로 5분간 원심 분리 하였다. 이후에 100μl의 BD Perm/Wash solution에 고정된 세포에 2μl의 PE-conjugated anti-Interleukin-2 antibody,

PE-conjugated anti-Interleukin-4 antibody를 각각 넣고 4°C에서 30분간 배양하였다.

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

(3) ELISA를 이용한 Interleukin-2 생산량 측정

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

(4) RT-PCR을 이용한 mRNA 발현여부 측정

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°C에서 5분 동안 반응한 후, 14,328×g에서 10분동안 원심 분리하여 상층액만을 분리한 후, Phenol : Chloroform(5:1)(Sigma, USA)을 동부피로 처리하여 원심 분리하였고 다시 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 동부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20°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 2μg를 가지고 β actin과 IFN-γ에 대해서는 oligo-(dT)15 primer (Promega, USA) 1μl를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-10에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1μM를 사용하여 70°C에서 10분 동안 preincubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-27), RNasin ribonuclease inhibitor(Promega, USA) 1U/μl, AMV reverse transcriptase(Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2μl씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다.

Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2μl를 dNTP mixture 200μM, gene specific primer 300nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-27), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR thermal cycler(Hybaidd, UK)에서 denaturation은 94°C 5min으로, annealing은 IL-2은 60°C, IL-4은 48°C, IL-10은 72°C, IFN-γ은 56°C, β-actin은 60°C로 35cycles를 하였고, extension은 72°C 10min하였다. PCR product를 확인하기 위하여 agarose(2%) TAE(Tris-Acetate-EDTA) buffer(pH 8.3)에 녹여 사용하였으며 시료 5μl를 loading buffer를 gel에 주입하여 100 volt에서 30분간 전기영동하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 DNA는 UV transilluminator (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'

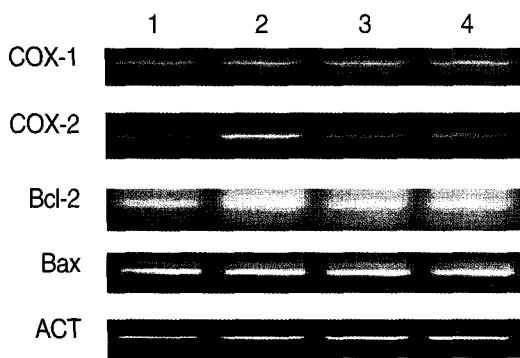
4. 통계처리

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 cell에서 RT-PCR을 이용한 Cox, Bcl-2 및 Bax의 mRNA 발현

수삼약침의 면역학적 기능 이외에 직접적으로 A549 human epithelial lung cancer cell에서 Cox-1과 -2, Bcl-2 및 Bax에 대한 어떠한 영향이 있는가를 알아보기 위해 total RNA를 회수하여 RT-PCR에 의해 mRNA의 발현양상을 실험했다. 수삼약침을 처리하였을 때 Cox-1의 경우 변화가 없었고, Cox-2의 경우 LPS 처리시 발현이 증가하였지만 수삼을 처리하면 발현이 normal 상태와 같이 감소된 것을 보여주고 있다. 그러므로 수삼의 경우 직접적으로 염증과정에 관여하는 Cox-2를 감소시킴으로써 염증형성에 의한 prostaglandin 합성을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.(Fig. 2.)



1 : Normal
2 : LPS
3 : LPS+fresh ginseng Herbal Acupuncture 200mg/ml
4 : LPS+fresh ginseng Herbal Acupuncture 400mg/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 distilling fresh ginseng Herbal Acupuncture respectively.

수삼의 세포사에 의한 암세포 사멸능력에서도 위와 같은 농도에서 수삼을 처리하여 Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현을 조사하였는데 그림에서 보여 주는 바와 같이 거의 차이를 보여 주지 않았다.

2. 생존율

Sarcoma-180 복강암 유발 마우스에서 Median survival time은 대조군(Control)은 27일, 실험군 I은 21일, 실험군 II는 27일을 나타내어 실험군 I은 대조군에 비하여 약 -22.2%의 생존증가율을 나타내었고, 실험군 II는 0%의 생존증가율을 나타내었다.(Fig. 3)

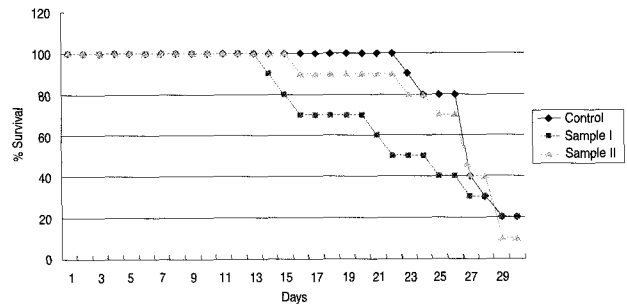


Fig. 3. Median survival time of mice treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture in Sarcoma-180 cancer.

Control : treated with normal saline(0.1cc)

Sample I : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)

Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

3. Flow cytometry를 이용한 IL-2 및 IL-4 생산량

1) IL-2 생산량

정상군에 비하여 대조군, 실험군의 차이를 확인할 수 없었다.(Fig. 4)

2) IL-4 생산량

정상군에 비하여 대조군, 실험군의 차이를 확인할 수 없었다.(Fig. 5)

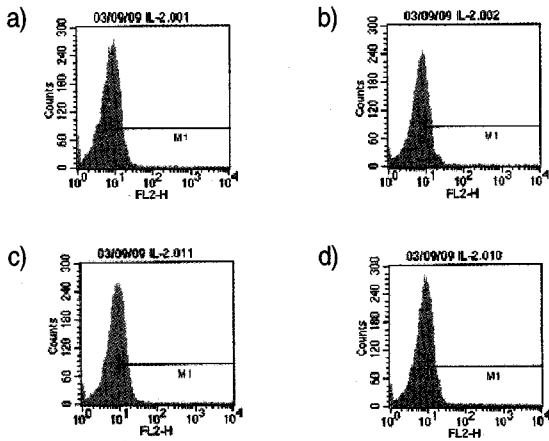


Fig. 4. IL-2 Productivity by Flow cytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture.

- a) Normal : Non-treated group
- b) Control : treated with normal saline(0.1cc)
- c) Sample I : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

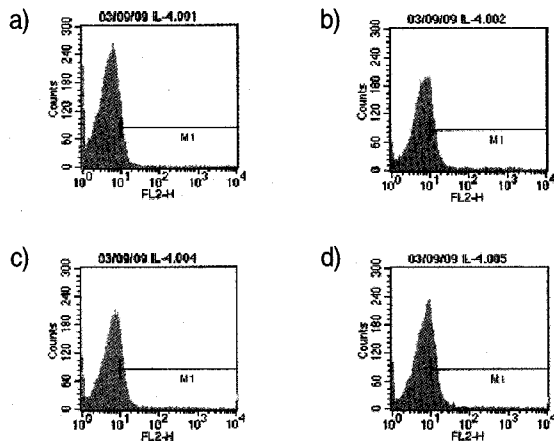


Fig. 5. IL-4 Productivity by Flow cytometry of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture.

- a) Normal : Non-treated group
- b) Control : treated with normal saline(0.1cc)
- c) Sample I : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

4. 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 측정할 결

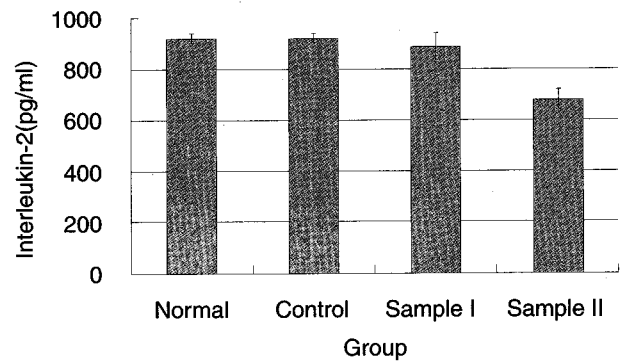


Fig. 6. IL-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with fresh ginseng Herbal acupuncture.

- a) Normal : Non-treated group
- b) Control : treated with normal saline(0.1cc)
- c) Sample I : with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

Table 3. IL-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mouse Treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	919.38 ± 19.53
Control	921.43 ± 15.03
Sample I	881.50 ± 55.95
Sample II	679.75 ± 41.26 ^{a)}

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

- Normal : Non-treated group
- Control : treated with normal saline(0.1cc)
- Sample I : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)
- Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

과, 정상군은 $919.38 \pm 19.53 \text{ pg/ml}$, 대조군은 $921.43 \pm 15.03 \text{ pg/ml}$, 실험군 I은 $881.50 \pm 55.95 \text{ pg/ml}$, 실험군 II는 $679.75 \pm 41.26 \text{ pg/ml}$ 를 나타내었다. 따라서 실험군 I은 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았고, 실험군 II는 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.(Table 3., Fig. 6)

5. RT-PCR을 이용한 Cytokine의 mRNA 발현

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 투여한 후 수삼약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, Normal saline만을 투여한 대조군, 수삼약침 0.1cc를 위수에 주입한 실험군 I, 수삼약침 0.1cc를 중완에 주입한 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다. 실험군 I의 경우 interleukin-2, interleukin-4, interferon- γ 에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였고, 실험군 II의 경우 interleukin-2에서는 mRNA 발현이 향상됨을 보였으나 interferon- γ 과 interleukin-10은 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다.(Fig. 7)

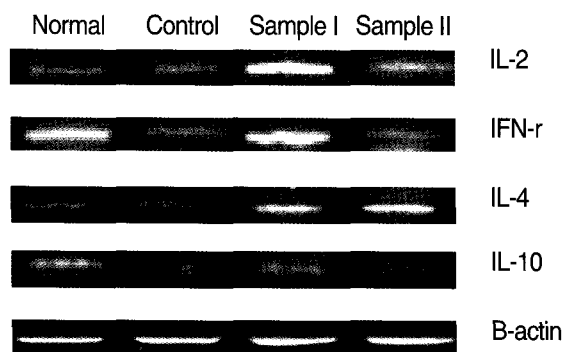


Fig. 7. Expression of cytokines mRNA from spleens by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. After a mouse was inoculated with Sarcoma-180, it was treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture in variable content.

- a) Normal : Non-treated group
- b) Control : treated with normal saline(0.1cc)
- c) Sample I : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Wisu(0.1cc)
- d) Sample II : treated with distilling fresh ginseng Herbal acupuncture at Chung-wan(0.1cc)

N. 考 察

암은 인체 내에서 성숙 또는 발육중인 정상세포가 여러 가지 유관인소의 장기간의 작용 하에서 출현하는 과도한 증가나 이상분화로 형성되는 신생물을 말하며 불규칙적으로 신속하게 주위의 기관조직으로 확산 전이되어 인간의 건강과 생명에 위해를 주는 엄중한 질병이다²⁾. 서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의되어 있다.

암 치료에 있어서 면역계의 반응을 조절하여 암에 대한 치료효과를 유도하는 방법은 암세포에 대한 면역 반응을 조절하는 기본적인 기전과 조절요소를 이용하여 숙주의 항암 면역능력을 높여주는 암 면역요법 등이 다양하게 시도되고 있다.

人蓼은 五加皮科에 속한 蓼의 根으로 대표적인 滋補 强壯 興奮劑이다³⁾. 人蓼은 최소한 2000년 이전부터 韓方에서 藥材로 사용되어 온 것으로 기록되어 있다⁴⁾. 그러나 人蓼에 대한 과학적인 연구는 1854년 Garriques¹⁵⁻¹⁶⁾가 미국삼(Panax quinquefoloum L.)으로부터 얻은 무정형의 사포닌 혼합물을 Panaquilon이라고 命名한 것이 최초이며 본격적으로 과학적 연구가 시작된 것은 1957년 소련의 약리학자인 Brekhman¹⁷⁻¹⁸⁾이 人蓼 사포닌 성분의 中樞神經系 興奮作用과 抗疲勞 效果를 보고하면서 人蓼의 有效成分이 사포닌임을 암시한 후였다. 人蓼에 함유된 다양한 성분은 각기 다른 藥理 效能을 갖는다. 사포닌에 대해서는 중추 신경 진정작용¹⁹⁻²⁰⁾, 단백질 합성촉진작용²¹⁻²²⁾, 부신피질 호르몬분비 촉진작용²³⁻²⁴⁾, 해독작용²⁵⁾, 항염증, 동맥경화억제²⁶⁾, 소염작용, 이뇨작용, 항암효과²⁷⁾, 피로회복²⁸⁾ 등 많은 효능이 보고되어 있으며, 각각의 Ginsenoside별로 약리 효능이 다른 것으로 밝혀지고 있다. 또한 인삼 petroleum ether 분획의 폴리 아세틸렌 성분은 항암²⁹⁻³⁰⁾ 및 간 보호작용³¹⁻³²⁾이 폐놀계 화합물은 항산화 효과와 노화억제 효과³³⁾가 있는 것으로 보고되었다. 최근의 연구보고에서 권 등³⁴⁾은 산양산삼약침의 항암능과 면역기능계에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 미정맥에 주입하여 생존률과 NK 세포의 독성능, IL-2의 생산능, 그리고 Cytokine의 mRNA 발현을 측정한 결과 급성·아급성 독성실험에서 모두 독성반응을 보이지 않았으며, 생존율에 있어 11.5%의 증가를 보여 항암치료에 활용될

수 있을 것이라 보고한 바 있다.

이에 저자는 위의 산양산삼약침이 항암효과와 면역 기능계에 유의한 작용을 하는 것을 토대로 산양산삼의 경제성과 희귀성을 고려하여 水蓼蒸溜藥鍼의 抗癌效果에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

먼저 *in vitro*에서 A549 human epithelial lung cancer cell 을 이용하여 RT-PCR을 이용한 Cox, Bcl-2 및 Bax의 mRNA 발현을 측정하였고, *in vivo*에서 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse에 주입하여 Sarcoma-180으로 종양을 유발한 뒤, 中脘(CV12)과 胃脘(BL21)를 택하여 주입하였다. 이후 생존율 및 Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4의 생산량과 ELISA를 이용한 IL-2 생산량, RT-PCR을 이용한 mRNA 발현여부를 측정하여 알아보았다.

Wardlaw 등³⁵⁾에 의하면 Cox-2가 폐암 세포주에서는 과발현되며 Cox 억제제를 처리하면 세포성장을 잠시 억제할 수 있다고 보고하였다. 이 Cox는 prostaglandin 합성과정에서 중요한 요소로 Cox-1과 -2가 있는데 Cox-1의 경우 정상적인 상태에서는 항상 발현되며, Cox-2는 염증과정에 관여하여 발현이 증가하게 된다.

Fig. 2.에서 보여 주는 바와 같이 水蓼藥鍼을 처리하였을 때 Cox-1의 경우 변화가 없었고, Cox-2의 경우 LPS 처리시 발현이 증가하였지만 水蓼를 처리하면 발현이 normal 상태와 같이 감소된 것을 보여주고 있다. 그러므로 水蓼의 경우 직접적으로 炎症과정에 관여하는 Cox-2를 감소시킴으로써 炎症形成에 의한 prostaglandin 合成을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.

水蓼의 세포사에 의한 암세포 사멸능력을 알아보고자 농도 의존적으로 水蓼 200 ml/ml well과 400 ml/ml well로 水蓼를 처리한 후 RT-PCR의 방법으로 Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현을 조사한 결과, Fig. 2.에서 보여 주는 바와 같이 거의 차이를 보여 주지 않고 있다. 이러한 결과에 의하면 사용된 水蓼濃도에 의하여 癌細胞의 細胞死滅를 일으킬 수 없음을 시사한다고 추정된다.

Sarcoma-180 복강암세포를 마우스에 이식하여 수삼약침의 항암효과를 관찰하였다. 실험결과 Median survival time은 대조군은 27일, 실험군 I은 21일, 실험군 II는 27일을 나타내어 실험군 I은 대조군에 비하여 약 -22.2%의 생존증가율을 나타내었고, 실험군 II는 0%의 생존증가율을 나타내어 유의성을 나타내지 않았다.(Fig. 3)

T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능항진, B cell 분화인자, NK cell의 활성화에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 腫瘍의 치료

에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을 하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다³⁶⁾.

IL-2과 IL-4의 생산능 검액 검사에서 정상군에 비하여 대조군, 실험군의 차이는 확인할 수 없었다.(Fig. 4, 5)

또한 ELISA를 이용한 IL-2 생산량 실험에서는 정상군은 919.38 ± 19.53 pg/ml, 대조군은 921.43 ± 15.03 pg/ml, 실험군 I은 881.50 ± 55.95 pg/ml, 실험군 II는 679.75 ± 41.26 pg/ml를 나타내어 실험군 I, II는 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 3. Fig. 6)

면역반응은 항원에 의해 시작되는데 이 때에 CD⁴⁺T 세포의 도움이 필요하다³⁷⁾. helper T 세포에는 2종류가 있어, 각기 help 작용이 다르다. 제1의 help 작용은, 대식세포 활성화작용 및 killer T 세포의 활성화작용이고, 제2의 help 작용은, 항체 생산 작용이다³⁸⁾.

CD⁴⁺T helper 임파구는 cytokine의 양상에 따라 T helper 1(Th 1)과 T helper 2(Th 2)로 구분된다. 이 두 세포는 모두 Th 임파구 전구세포로부터 분화되는데 분화를 결정하는 요인은 환경적 요인과 유전적 요인으로 구분된다. 환경적 요인으로는 항원의 유입경로, 항원의 물리적 변형, 항원의 양 등이 알려져 있는 반면 유전적 요인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 이러한 환경적 요인이 Th 임파구의 주변 환경에 존재하는 cytokine을 결정하여 Th 1과 Th 2로 분화를 유도한다. 즉, 분화 초기에 존재하는 cytokine 중 IL-4가 많이 존재하는 경우 Th 2로 분화가 이루어지고, INF- γ 나 IL-12가 많이 존재하면 Th 1으로 분화가 촉진된다. 이처럼 분화된 Th 1 세포는 INF- γ , IL-12, tumor necrosis- β (TNF- β)를 생성하여 세포매개성 면역반응에 관여를 하고 Th 2임파구는 interleukin 4, 5, 10, 13을 생성하여 알러지 및 체액성 면역반응에 관여를 한다. Th 1과 Th 2는 서로 억제작용을 하며 숫자적으로 균형을 유지하게 된다.

RT-PCR법을 이용한 cytokine mRNA 발현에서는, 실험군 I의 경우 interleukin-2, interleukin-4, interferon- γ 에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였고, 실험군 II의 경우 interleukin-2에서는 mRNA 발현이 향상됨을 보였으나 interferon- γ 과 interleukin-10은 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 水蓼 蒸溜藥鍼은 水蓼의 경우 직접적으로 炎症過程에 관여하는 Cox-2를 減少시킴으로써 炎症形成에 의한 prostaglandin 合成을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다. 그러나 水蓼의 세포사에 의

한 암세포 사멸능력에서는 사용된 水蓼濃度로는 암세포의 세포사멸을 일으킬 수 없음을 보여주었기 때문에 항암효과가 있는가에 대해서는 신뢰성 있는 실험적 결과가 나타나지 않았다. 그러나 이미 발표된 논문⁸⁾이나 임상데이터에 의하면 水蓼의 성분에는 암세포를 사멸할 수 있는 능력이 있음이 증명된 바 있으므로, 본 실험 관찰과 비교하건대 水蓼에 함유된 성분을 증가시킬 경우 직접적으로 암세포를 사멸할 수 있지 않을까 추측된다. 따라서 이러한 결과가 도출된 것은 藥鍼 농도가 명확하게 규명되어 있지 않고, 藥鍼에서 水蓼에 함유된 성분의 농도가 문제가 되지 않았을까 추측된다. 그러므로 향후 藥鍼의 농도에 관한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

V. 結 論

수삼증류약침의 抗癌효과에 미치는 영향을 연구하고자, *in vitro*에서 A 549 human lung cancer cell을 이용하여 Cox-1, Cox-2 효소와 Bcl-2 및 Bax의 mRNA 발현을 측정하였고, *in vivo*에서 Sarcoma-180으로 종양을 유발한 mouse에 수삼증류약침 주입하여 生存率 및 Flow cytometry를 이용한 IL-2, IL-4의 생산량과 ELISA를 이용한 IL-2 생산량, RT-PCR을 이용한 mRNA 발현여부를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. ($p < 0.05$)

1. RT-PCR을 이용한 Cox, Bcl-2 및 Bax의 mRNA 발현에서는 수삼의 경우 직접적으로 염증과정에 관여하는 Cox-2를 감소시켰다.
2. Sarcoma-180 복강암 항암효과 실험에서 생존율 측정한 결과 실험군 I은 대조군에 비하여 약 -22.2%의 생존증가율을 나타내었고, 실험군 II는 0%의 생존증가율을 나타내어 유의성이 없었다.
3. Flow cytometry를 이용한 IL-2과 IL-4의 생산량 측정에서 정상군에 비하여 대조군, 실험군의 차이는 확인할 수 없었다.
4. ELISA를 이용한 IL-2 생산량 측정한 결과 실험군 I은 정상군 및 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았고, 실험군 II는 정상군 및 대조군에 비해 유의하

게 감소하였다.

5. RT-PCR을 이용한 cytokine mRNA 발현양상에서는 실험군 I의 경우 IL-2, IL-4, INF- γ 에서 mRNA 발현이 향상됨을 보였고, 실험군 II의 경우, IL-2에서는 mRNA 발현이 증가됨을 보였으나 INF- γ 과 IL-10은 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다.

參考文獻

1. 홍문화, 한국 인삼사(상권), 삼화인쇄(주), 48, 1980.
2. 조재선 외, 고려삼의 이해, 도서출판 한림원, 서울, 12, 1995.
3. 노길봉, 천연물질을 이용한 수삼의 저장성 향상 연구, 서울대학교 대학원 농화학과, 3,4, 1999.
4. 대한약침학회, 약침요법 기술 지침서, 대한약침학회, 서울, 13,14, 112, 118, 138, 203, 1999.
5. 이산명 외, 인삼, 녹용 및 목향 수침이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬 분비에 미치는 영향, 대한침구학회지, Vol.5, No.1, 1-5, 1988.
6. 김용시 외, 수삼, 백삼, 및 홍삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향, 대한 침구학회지, Vol.6, No.1, 1-5, 1989.
7. 남윤석, 약침용 홍삼추출액의 안전성 연구, 경희대학교 대학원, 1996.
8. Park, H. J., Park, K. M. and Park, K. H. : Korean J. ginseng. Sci. 17, 135, 1993.
9. Choi, S. U., Jung, N. P. and Kim, S. C. : Effect of ginseng saponin fractions and lipopolisaccharide on the tumoricidal activity of mouse macrophage, Korean J. Ginseng Sci. 14 ; 364-372, 1990.
10. 박희수, 수혈연구침구학, 의성당, 서울, 127, 246, 1998
11. 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, 48-59, 1972.
12. 서울대학교 의과대학, 종양학, 서울대학교 출판부, 서울, 1-3, 137-143, 225, 1992.
13. 전국한의원 대학 본초학교수 공편저, 본초학, 서울, 영림사, 531, 1994.

14. 이상인 : 한국인삼사(하권), 삼화인쇄(주), 서울, 501, 1980.
15. Brekhman, I. I. *Panax Ginseng*. Gosudaarst Isdat et Med. Lit, Legrad, 1957.
16. Garriques. S, *Panax Quinquefolia*, Am Chem Pharm, 90 : 331, 1954.
17. Brekhman, I. I, *Panax ginseng*, Gosudaarst Isdat et Med, Lit. Leningrad, 1957.
18. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. : New substance of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann. Rev. Pharm.*, 9, 419, 1969.
19. Takagi, K. : Pharmacological studies in ginseng, *Proc. of 1st Int'l Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 119, 1974.
20. Saito, H. and Lee, Y. M. : Pharmacological properties of *Panax ginseng* root, *Proc. of 2nd Int'l Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 109, 1978.
21. Oura, H. and Hiai, S. : Biochemical action of *Panax ginseng* principles, *Proc of 1st Int'l Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 23, 1974.
22. Lee, K. S. : Effect of ginseng saponin on protein synthesis in heart muscle, *Proc. of 2nd Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 93, 1978.
23. Hiai, S., et al. : Evaluation of corticosterone secretion-inducing activities of ginsenosides and their porsapogenins and sapogenins, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 168, 1983.
24. Ho, W. K., et al. : Ginseng saponin treatment does not alter brain or pituitary levels of β -endorphin and dynorphin, *Biochem. Pharm.*, 34, 2044, 1985.
25. Lee, F. C., Park, J. K., Ko, J. H., Lee, J. S., Kim, K. Y. and Kim, E. K. : Effect of *Panax ginseng* extraction the benzo(a)pyrene metabolizing enzyme system, *Drug and Chemical Toxicology*, 10(3), 227, 1987.
26. Yamamoto, M. and Uemura, T. : Endocrinological and metabolic actions of ginseng principles, *Proc. of 3rd Int'l Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 115, 1980.
27. Hwang, W. I. and Cha, S. M. : A cytotoxic activity of extract of panax ginseng root against some cancer cells in vitro and in vivo, *Proc. 2nd Int'l Ginseng Symp.*, 43, 1978.
28. Saito, H., Yoshida, Y. and Takagi, K. : Effect of *Panax ginseng* root on exhaustive exercise in mice, *Japan J. Pharmacol.*, 24, 119, 1974.
29. 김신일 : 인삼의 항암성분에 관한 연구, 충남대학교 박사학위 논문, 1988.
30. Kim, Y. S., Jin, S. H., Kim, S. I. and Han, D. Y. : Studies on the Mechanism of Cytotoxicities of Polyacetylene against L1210 Cell. *Arch. Pharm. Res.*, 12(3), 207, 1989.
31. Joo, C. N. : The preventive effect of saponin fraction of panax ginseng C. A. Meyer against ethanol intoxication of rat liver, *Proc. 4th Int'l Ginseng Symp.*, 63, 1989.
32. Kwak, H. S. and Joo, C. N. : Effect of ginseng saponin fraction on ethanol metabolism in rat liver, *Korean J. Ginseng Sci.*, 12(1), 76, 1988.
33. 한병훈 외 : 고려인삼의 항산화물질에 대한 화학적, 생화학적 연구, *Advances in Chinese Medicinal Materials Res.*, 485, 1985.
34. 권기록 외, 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성·아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, *대한약침학회지*, Vol.6, No.2, 7-27, 2003.
35. 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)
36. Constant SL, Bottomly K, Induction Th 1 and Th 2 CD* T cell response, The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 115 : 297-322, 1997.)
37. Paul WE, Seder RA, Lymphocyte responses and cytokines, *Cell*, 76 : pp. 241-251, 1994.
38. 新谷太저 홍천수 역, 내과학(면역·알레르기질환), 도서출판 정담, 7, 2002.