

원저

산삼약침이 Colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델의 항암 및 면역증진에 미치는 영향

임세영* · 이수진** · 권기록*

*상지대학교 한의과대학 침구학교실

**상지대학교 한의과대학 생리학교실

Abstract

Anti-cancer and Immune Promoting Effects of Cultivated Wild Ginseng Herbal Acupuncture on Hepatic Metastatic Model Using Colon26-L5 Carcinoma Cells

Lim Se-young*, Lee Soo-jin** and Kwon Ki-rok*

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

**Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Objectives : This experiment was conducted to evaluate inhibitory effects against hepatic metastasis and promotion of immunocytes by cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture.

Methods : Colon26-L5 carcinoma cells were injected through hepatic portal vein to induce hepatic metastatic cancer. Changes in weight, morphology of the cancer, histological impressions were evaluated and cytokine level was analyzed to yield immunological changes. Colon26-L5 carcinoma cells were injected through hepatic portal vein to induce hepatic metastatic cancer. Changes in weight, morphology of the cancer, histological impressions were evaluated and cytokine level was analyzed to yield immunological changes.

Results : 1. Mice treated with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture reduced metastatic size compared to the control group.

2. No distinctive differences were witnessed between the cancer cells of control and experimental group in histological observation, but experimental group was closer to the normal tissue condition.

· 접수 : 2006년 1월 10일 · 수정 : 2006년 1월 13일 · 채택 : 2006년 1월 13일
· 교신저자 : 권기록, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 033-741-9257 E-mail : beevenom@paran.com

3. Observing immunocytes from the spleen of experimental group, T-lymphocytes were significantly increased.

4. Measuring the level of cytokine IL-4 which stimulates Th 2 were significantly increased.

These findings strongly indicate cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture enhances immunity to inhibit the growth of cancer and metastasis.

Key words : Cultivated wild ginseng, herbal acupuncture, cytokine, Colon26-L5 carcinoma cell

I. 緒 論

암의 전이는 암환자에게 있어서 사망에 이르게 하는 주요 원인이다¹⁾. 간은 위장관계통의 암환자에게 있어서 전이가 잘 되는 장기 중 하나로, 특히 우리나라에서 4번째로 많은 대장암과 같은 경우 간의로의 전이가 가장 흔하게 일어나며 결과 또한 매우 치명적이다²⁻⁴⁾.

산삼은 오가피과에 속한 다년생 초본인 인삼이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 삼을 일컫으며, 산양산삼(장뇌삼)은 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 채배한 삼을 말한다⁵⁾.

산양산삼약침(이하 산삼약침)이란 약침요법의 일종으로 산양산삼을 증류식으로 추출하여, 침구, 경락이론과 본초이론에 의거하여 경혈이나 압통점⁶⁾에 주입하거나 혈맥주입⁷⁾하는 방법으로 침자극과 산양산삼의 약물작용을 통하여 질병을 치료하는 신침요법이다.

본 연구진은 그동안 산삼약침을 이용하여 독성, 안전성 실험과 항암효과와 관련된 동물실험, 그리고 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구 등⁸⁻⁹⁾을 진행하였으며, 전이암에 대한 연구를 시도하고자 본 연구를 기획하였다. 이에 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델에 산삼약침의 항암 및 면역증진효과를 관찰하고자, 암세포주를 생쥐의 간문맥에 주입하여 간전이암을 유발한 후 생쥐의 肝俞에 해당하는 경혈에 산삼약침을 시술하였다. 그리고 실험군과 대조군과의 간의 무게 및 조직학적 소견, spleen으로부터 분리한 면역세포의 활성화 정도 및 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法 및 材料

1. 동물 및 재료

1) 동물

실험에 사용하기 위한 동물로는 4주령 BALB/c계 암컷 mice를 사용하였고 대한바이오링크에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 암세포의 준비

BALB/c계 mice에 간전이암을 유발시키기 위한 암세포주는 colon 26-L5로 일본 토야마의약대학 화학약연구소에서 분양받아, 5% CO₂와 95% air의 배양기에서 37°C를 유지하며 배양하였다.

3) 배지의 준비

RPMI-1640(Gibco, U.S.A.)에 sodium bicarbonate (Amresco, U.S.A.) 2g 과 HEPES(Amresco, U.S.A.) 3.77g, penicillin-streptomycin(penicillin 10,000unit/ml, streptomycin 10,000µg/ml, Gibco, U.S.A.) 10ml 를 증류수에 넣고 1ℓ로 조정후 pH를 7.2로 맞추고 0.22µm disposable sterile bottle top filter (Corning, U.S.A.)로 여과하여 기본배지로 사용하였으며 암세포 및 비장세포의 배양시 FBS(Fetal Bovine Serum, JRH bioscience, U.S.A.) 농도가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

4) 산삼약침의 조제

산양산삼은 산삼의 종자를 적절한 환경에서 채배

한 것으로 수령은 10년 전후로, 무게는 4g내외의 것을 사용하였다. 먼저 산삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 뇌두를 제거하지 않은 200g의 산삼을 증류수와 배합한 후 2시간 전탕하여 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전

탕하여 1,000cc의 약침을 얻었다. 얻어진 약침을 0.45 μ m, 0.2 μ m여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다(Fig. 1~3).

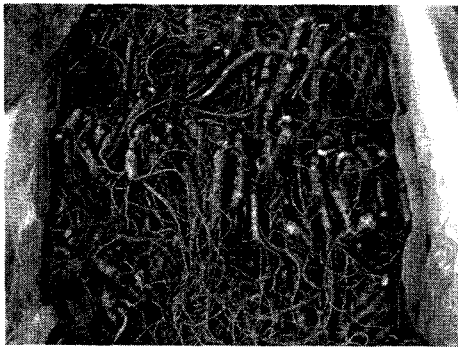


Fig. 1. The shapes of cultivated wild ginseng

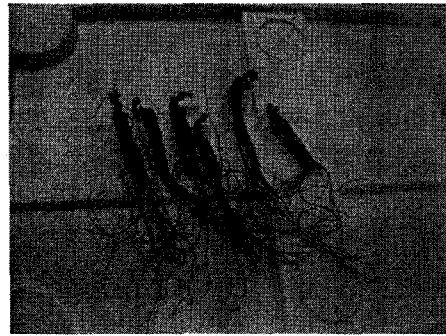


Fig. 2. The shapes of cultivated wild ginseng

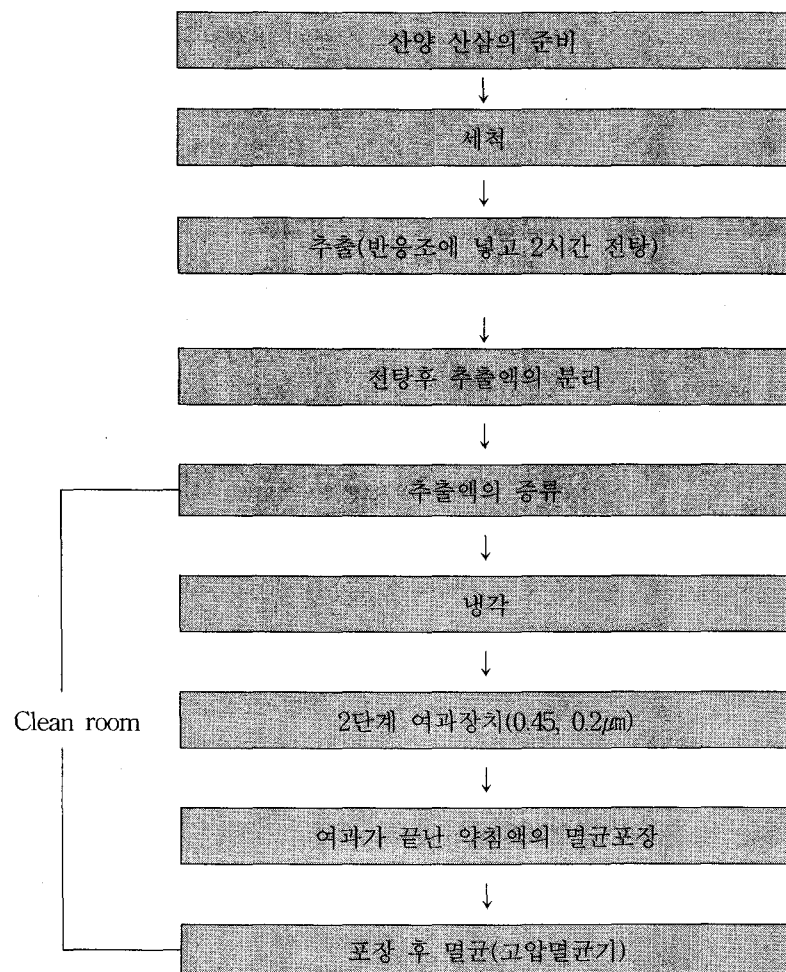


Fig. 3. Manufacturing process of distilled cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture

2. 방법

1) Colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델

(1) 산삼약침에 의한 암전이 억제 효과

실험적 간전이 모델은 Ohnishi 등¹⁰⁾의 방법에 준하였다. 실험군(산삼약침 시술군)과 대조군으로 그룹을 나누고 *in vitro*상에서 배양한 colon26-L5 대장암 세포를 1×10^5 cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들어 14~16g의 BALB/c계 mice를 개복한 후 1×10^4 cells/0.1ml을 간문맥을 통하여 주사하였다. 간문맥으로 주사된 대장암 세포는 간에 전이암을 형성하게 된다. 암세포 주사 다음날부터 20일 동안 매일 兩肝俞穴에 각각 0.1ml 씩 총 4.0ml의 산삼약침을 각각 주입하였고 대조군은 PBS(phosphate-buffered saline)를 주사하였다. 마지막 시술 다음날 cervical dislocation으로 mice를 치사시킨 다음 개복하여 간에 전이된 전이암을 대조군과 그 무게를 비교하여 평가하였다. 한편, 실험기간 동안 주 3회 몸무게를 측정하여 산삼약침이 생체에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다.

(2) 조직검사

실험적 간전이 모델을 이용한 실험의 결과로 얻어진 간 조직을 $10 \times 20 \times 4$ mm의 크기로 sampling하였다. 단백질 응고와 살균, 그리고 생체에 가깝게 세포구성성분을 보호하기 위하여 10% formalin으로 조직을 fixation한 후 formalin색소와 고정액의 주성분을 제거하기 위하여 흐르는 물에 12~24hr 동안 씻었다. 이후 70%부터 100%까지 1시간씩 alcohol농도를 증가시키면서 dehydration시킨 후 xylene과 chloroform을 사용하여 clearing시켰다.

이 후 paraffin을 처리하여 embedding center의 warming chamber에서 60℃로 2hr 동안 방치하여 impregnation한 후 조직을 잘라 균등하게 냉각 후 냉동실에 보관하였다. 이를 4~5 μ m두께로 자른 후, 박절된 조직을 붓으로 조심히 떼어내어 50% 알콜에 띄워 floating bath로 옮겨서 잘된 절편을 albumin이 얇게 발라진 slide위에 접착하여 labelling하였다. 완전히 물방울을 제거한 뒤 60℃의 부란기에 2~3hr 방치하여 조직을 고착시켜 현미경으로 관찰하였다. 염색법은 mercuric oxide를 산화제로 사용하여 hematoxylin을 숙성시키는 Harris-Hematoxylin stain을 사용하였다.

2) 산삼약침에 의한 면역증진 효과

(1) 비장세포의 분리 및 비장부유세포의 준비
BALB/c계 mice에 산삼약침시술을 20일간 시행하고 마지막 시술 다음 날 mice를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하여 PBS(Phosphate-buffered saline)로 세척하고 RPMI배지가 들어있는 Petri dish(35 \times 100mm)에서 작은 해부가위로 절단한 다음 cell strainer(40 μ m, Becton Dickinson, U.S.A.)로 여과하여 조직편 및 분리되지 않은 세포덩어리를 제거한 후 1500rpm에서 3분간 3회 원심분리하여 세척하고 complete RPMI배지에 부유시켰다.

(2) 비장세포의 proliferation assay

mice로부터 분리한 비장세포를 1×10^6 cells/ml로 complete RPMI배지에 부유시킨 후 100 μ l씩 96-well culture plate에 가하고 1 μ g/ml의 Con A(concanavalin A, Sigma, U.S.A.), LPS(lipopolysaccharide, Sigma, U.S.A.)와 함께 72시간 배양한 후 XTT법에 의해 proliferation을 관찰하였다. ELISA-reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Cytokine 생산능 조사

Splenocytes에 의해 분비되는 Th 1 type cytokine (IFN- γ) 및 Th 2 type cytokine(IL-4)의 양을 specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 비장세포는 1×10^6 cells/well로 24-well culture plate에 가하고 1 μ g/ml의 Con A와 함께 24, 48, 72시간 배양한 후 cell-free상등액을 준비하여 실험에 사용하였으며, cell-free상등액은 실험에 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

3. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS 10.0을 사용하였으며 ANOVA test 및 Tukey's Multiple comparison을 시행하여 각각의 경우 p value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 結 果

1. 산삼약침에 의한 암전이 억제 효과

1) mice의 몸무게 측정 결과

정상군과 대조군, 실험군의 BALB/c계 mice의 몸무게를 1주일에 3회씩 관찰하였다. 정상군은 21일간 조금씩 몸무게가 증가하는 정상적인 성장상태를 보

였고, 대조군과 실험군은 시술 후 몸무게가 0.6~0.7g정도 감소하였다가 점차 다시 증가하는 상태를 보였는데 대조군에 비해 실험군의 몸무게가 더 많이 증가하는 결과를 보였다.

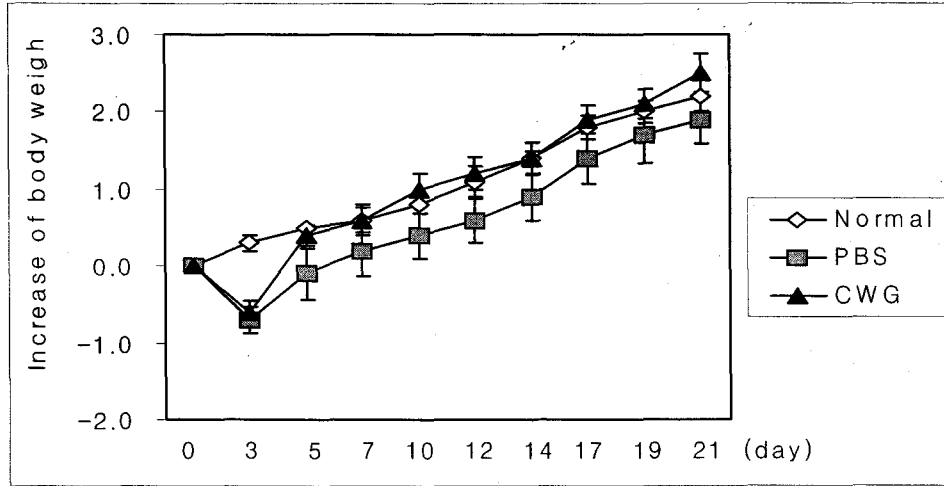


Fig. 4. Increase of body weight of normal group, ontrl group & experimental group

Table 1. Weight of Liver (* p<0.05)

	Number of animals	Mean ± SE
Normal	2	1.1000 ± 0.1414
PBS	6	4.8500 ± 1.2373*
CWG	6	2.2833 ± 0.7910*
Total	14	3.2143 ± 1.7758

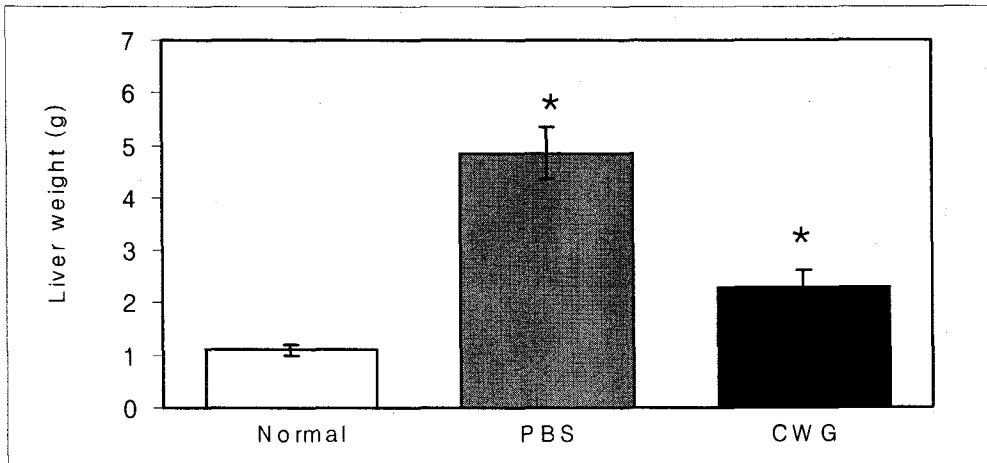


Fig. 5. Effect of treatment with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture on experimental hepatic metastasis produced by intraportal injection of colon 26-L5 carcinoma cells
 Female BALB/c mice were inoculated intraportally with colon 26-L5 cells(1×10^4). Female BALB/c mice were treated with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture or PBS for 20 days. One day after the last treatment, mice were sacrificed and the liver weight was measured. These data represent the mean \pm SE. By the ANOVA test there was a significant difference among the three group and through Tukey's Multiple comparison the mean liver weight of control group and experimental group showed significant difference.(* p<0.05)

2) 간 무게 측정

Colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델에서 20일간 매일 兩 肝俞에 각각 0.1ml씩 총 4.0ml 산삼 약침을 주입한 실험군과 PBS를 兩 肝俞에 각각 0.1 ml씩 총 4.0ml를 주입한 대조군과의 간의 무게는 실험군이 대조군에 비해 유의하게 간 무게의 증가가 억제되었으며, 실험군과 정상군과의 간 무게는 유의한 차이가 나지 않았다.

3) 간의 육안적 관찰 소견

정상군과 대조군, 실험군에서 적출된 간을 육안적으로 확인한 결과 정상군에 비해 대조군은 3~4배 정도 크며, 간의 암중양으로 보이는 종양성 모양이 많이 보이는데 반해, 산삼약침을 시술한 실험군은 거

의 정상군과 같이 매끄러운 모양으로 종양모습이 많이 보이지 않고, 크기 또한 정상군과 비슷함을 확인할 수 있었다.

4) 조직학적 소견

실험적 간전이 모델을 이용한 실험의 결과로 얻어진 간 조직을 paraffin block을 만들어 조직절편을 만든 후 H-E staining으로 염색한 후 간 조직의 병리소견을 살펴보았다. 그 결과 정상군의 간 조직은 정상이었고, 대조군과 실험군에서는 모두 세포핵들이 변형된 암세포들이 관찰되어 두 군 간의 큰 차이가 나타나지 않았으나, 실험군에서 대조군에 비해 상대적으로 정상조직의 소견이 많이 나타났다.

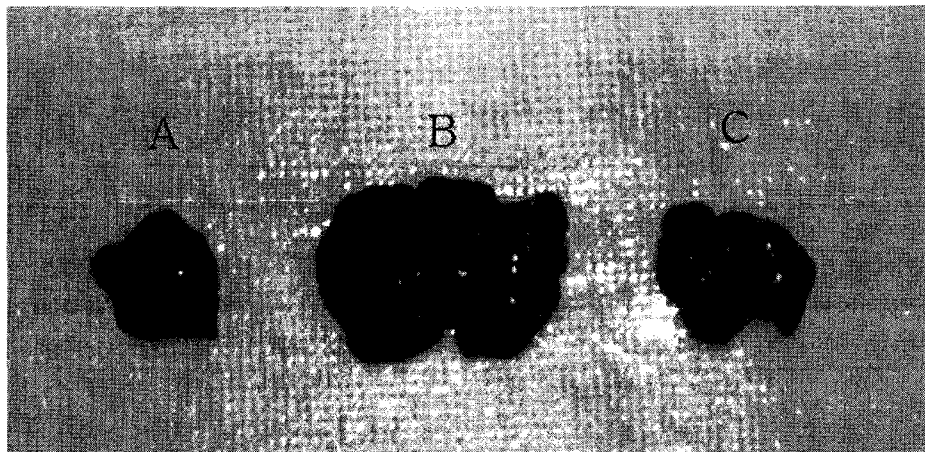


Fig. 6. Macroscopic observation of liver
A-normal group, B-control group, C-experimental group

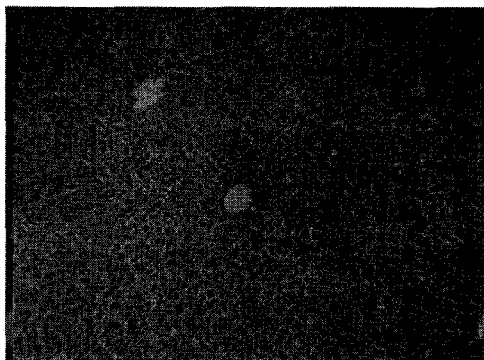


Fig. 7. The liver cells in normal group (x100)

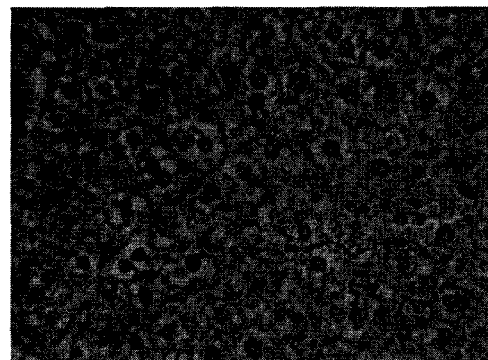


Fig. 8. The liver cells in normal group (x400)



Fig. 9. The liver cells in control group ($\times 100$)

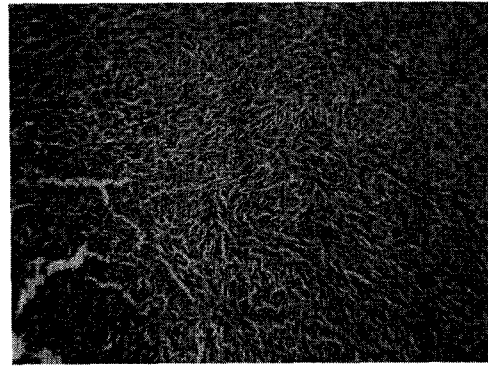


Fig. 10. The liver cells in control group ($\times 100$)

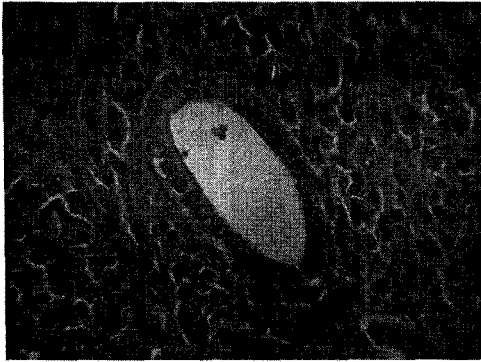


Fig. 11. The liver cells in control group ($\times 400$)

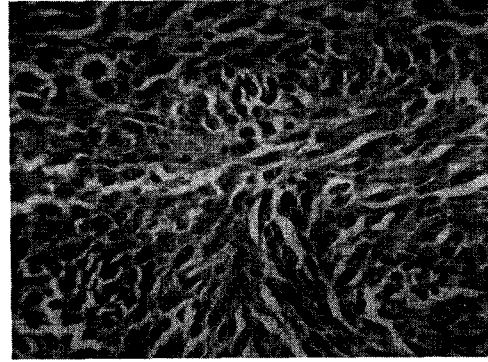


Fig. 12. The liver cells in control group ($\times 400$)

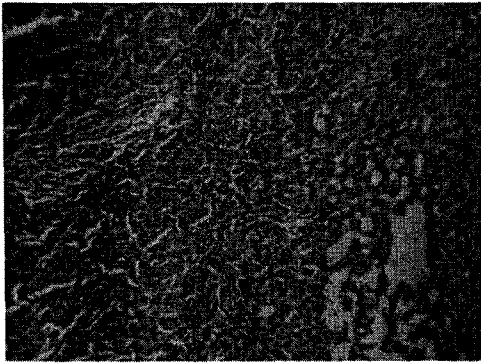


Fig. 13. The liver cells in experimental group ($\times 100$)

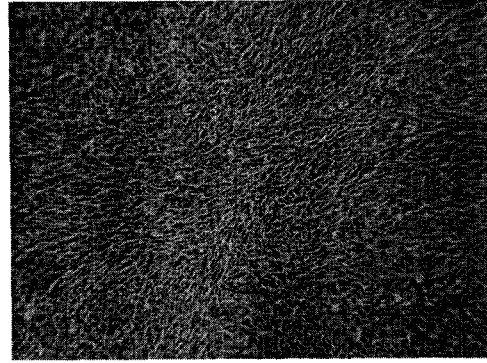


Fig. 14. The liver cells in experimental group ($\times 100$)



Fig. 15. The liver cells in experimental group($\times 400$)

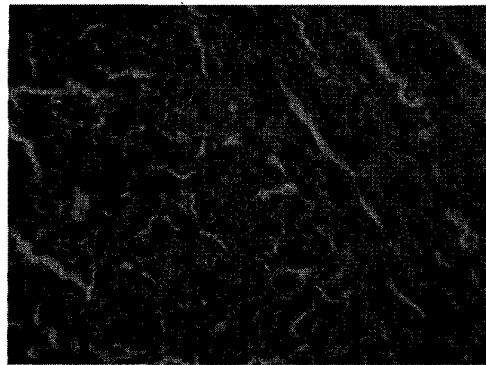


Fig. 16. The liver cells in experimental group($\times 400$)

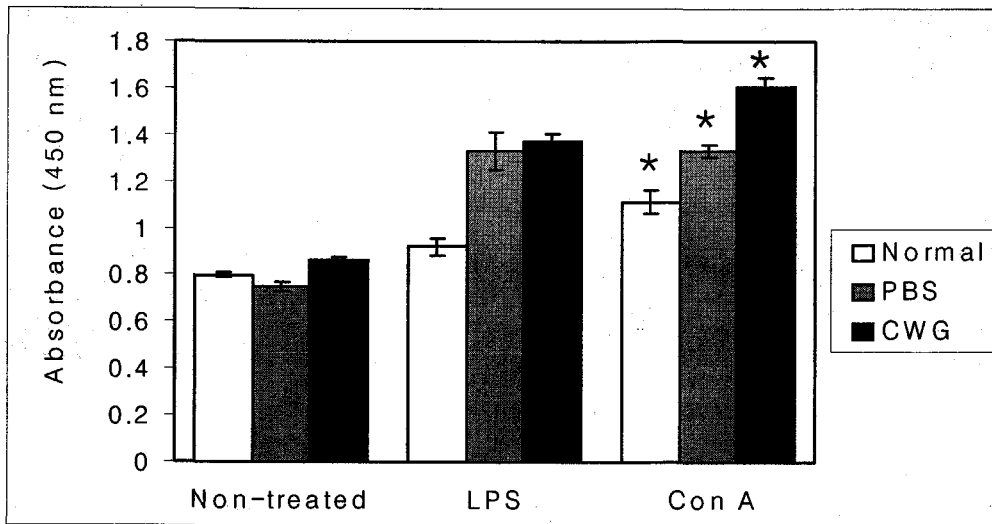


Fig. 17. Effect of treatment with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture on the proliferation of mouse splenocytes in response to various mitogenic stimuli

Female BALB/c mice were treated with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture or PBS for 20 days. One day after the last treatment, mice were sacrificed and the splenocytes (1×10^5 cells/well) suspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS were cultured with or without Con A ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 hr. XTT assay method were conducted for evaluating spleen cell proliferation. The absorbance of the culture was measured at 450 nm. These data represent the mean \pm SD of triplicate wells. By the ANOVA test there was a significant difference in the treated and the control group for all culture. Especially for the Con A, the absorbance mean of the mice treated with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture had a significant difference (* $p < 0.05$) with normal and PBS control group through the Tukey's Multiple comparison

2. 산삼약침에 의한 면역증진 효과

1) 비장세포의 proliferation assay

mice로부터 분리한 비장세포를 72시간 배양한 후 XTT법에 의해 proliferation을 측정된 결과 non-treated group에 비해 LPS처리군 및 Con A처리군에서 각각 정상군에 비해 대조군과 실험군이 모두 흡광도 수치가 유의하게 증가하였는데, LPS처리군

에서는 대조군과 실험군과의 유의한 차이는 나타나지 않았고, Con A처리군에서 대조군에 비해 실험군의 흡광도 수치가 유의하게 증가하였다.

2) Cytokine 생산능 조사

splenocytes에 의해 분비되는 Th 1 type cytokine (IFN- γ) 및 Th 2 type cytokine(IL-4)의 양을 specific

ELISA kits(BD pharmingen, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

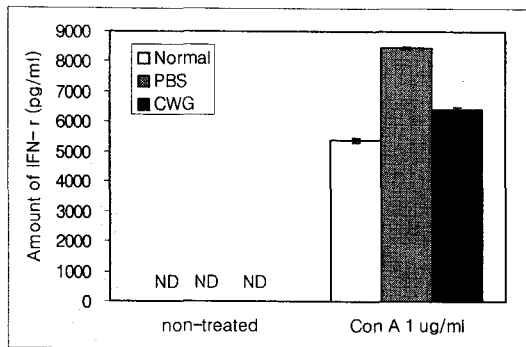
(1) IFN- γ (helper T cell type 1 cytokine) splenocytes에 의해 분비되는 Th 1 type cytokine (IFN- γ)의 양을 specific ELISA kits(BD pharmingen, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 non-treated group

에서는 24, 48, 72시간 배양 모두에서 IFN- γ 가 검출되지 않았다. Con A처리군에서는 정상군과 대조군, 실험군에서 모두 IFN- γ 가 검출되었는데 대조군은 24, 48시간에서 정상군에 비해 유의적으로 증가하였으나 72시간에서는 유의성을 보이지 않았고, 실험군은 48, 72시간에서 정상군이나 대조군에 비해 증가하였으나 유의한 차이는 없었다.

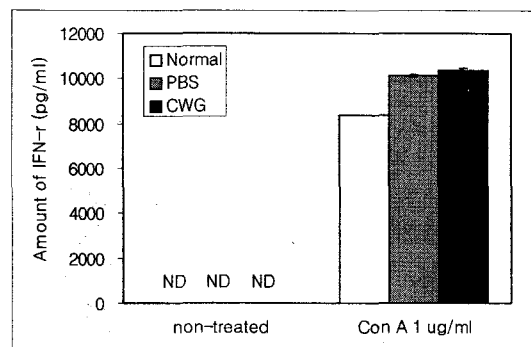
Table 2. Increase of IFN- γ (ND; Not detected)

	Non-treated			Con A 1 $\mu\text{g/ml}$ -treated (mean \pm SD)		
	Normal	PBS	CWG	Normal	PBS	CWG
24hr	ND	ND	ND	5388.61 \pm 65.87	8460.24 \pm 33.30	6429.40 \pm 73.07
48hr	ND	ND	ND	8376.32 \pm 1.78	10121.83 \pm 41.60	10340.01 \pm 89.73
72hr	ND	ND	ND	7637.83 \pm 10.68	8661.64 \pm 25.55	8997.32 \pm 17.68

가) 24hr



나) 48 hr



다) 72 hr

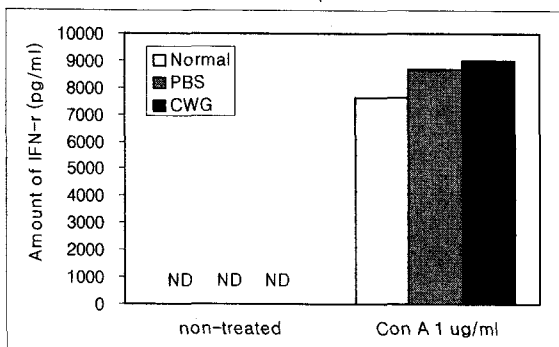


Fig. 18. Effect of treatment with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture on production of IFN- γ from splenocytes. These data represent the mean \pm SD of triplicate wells(* $p < 0.05$, ND; Not detected)

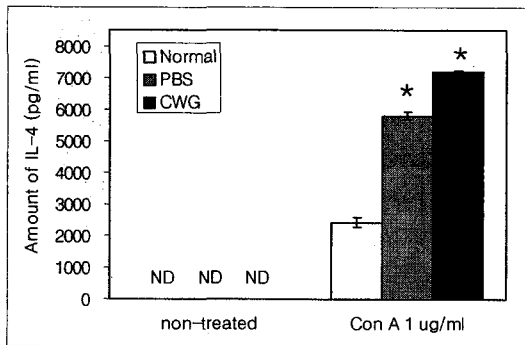
(2) IL-4 (helper T cell type 2 cytokine) splenocytes에 의해 분비되는 Th 2 type cytokine (IL-4)의 양을 specific ELISA kits(BD pharmingen, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 non-treated group에서는 24, 48, 72시간 배양 모두에서 IL-4가 검출되지 않았다. Con A처리군에서 24시간 배양시에 정상군, 대조군, 실험군 순으로 IL-4가 모두 유의한 차이로 검출되었고, 48시간 배양시에는 정상군과 실험군

에서는 24시간 배양시보다 IL-4가 증가하게 검출되었는데, 대조군에서는 오히려 감소하여 정상군과 대조군의 유의한 차이는 없었으며, 실험군에서 정상군과 대조군에 비해 IL-4가 유의하게 증가하였다. 72시간 배양시에는 정상군, 대조군, 실험군에서 IL-4가 모두 감소되었는데, 실험군이 정상군이나 대조군에 비해 유의하게 감소가 억제되는 것으로 나타났다.

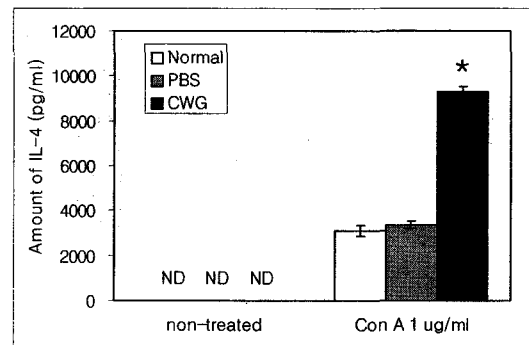
Table 3. Increase of IL-4(* p<0.05, ND; not detective)

	Non-treated			Con A 1 $\mu\text{g/ml}$ -treated (mean \pm SD)		
	Normal	PBS	CWG	Normal	PBS	CWG
24hr	ND	ND	ND	2425.67 \pm 140.60	5792.66 \pm 119.00*	7190.69 \pm 28.71*
48hr	ND	ND	ND	3104.24 \pm 241.04	3350.87 \pm 177.68	9298.63 \pm 225.62*
72hr	ND	ND	ND	227.79 \pm 37.09	902.28 \pm 44.48	1872.45 \pm 138.36*

가) 24 hr



나) 48 hr



다) 72 hr

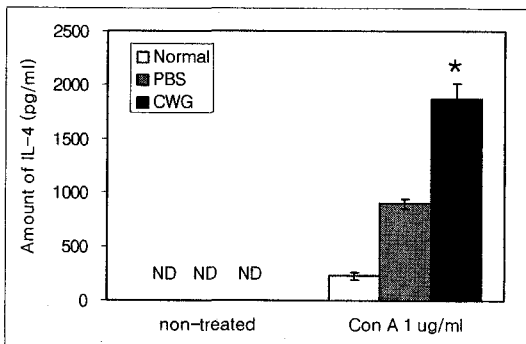


Fig. 19. Effect of treatment with cultivated wild ginseng Herbal Acupuncture on production of IL-4 from splenocytes. These data represent the mean \pm SD of triplicate wells(* p<0.05, ND; not detective)

IV. 考 察

산삼은 대표적인 補氣劑로서, 예로부터 靈藥으로 여겨져 왔으며, 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 인삼으로 표현되어 왔다. 性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등으로 표현되어 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服延身延年 등의 효능¹¹⁻¹²⁾이 있다. 蔘에 대한 최초의 문헌은 BC 50년 경에 보이고¹³⁾, AD 196~220년대의 傷寒論¹⁴⁾에서 최초로 처방에 사용되었으며, 14C에 국가적 차원에서 인삼의 재배가 장려되기 이전에 기술된 모든 古書에 기록된 인삼은 모두 산삼을 지칭함을 알 수 있다.

인삼의 효능에 관한 연구로는 신경의 기능을 조절하고¹⁵⁻¹⁶⁾, 체액과 신진대사기능을 조절하며¹⁷⁾, 강심, 향이뇨 및 성기능 증강효과가 있고¹⁸⁾, stress에 대한 저항력을 높이며¹⁹⁾, 소화흡수 및 면역항체 생산을 촉진시키는 등²⁰⁾의 보고가 있었다.

한편, 권²¹⁾과 김 등²²⁾의 연구에 의하면 산삼과 장뇌삼, 인삼에 대한 비교연구에서 항암 및 면역증진 효과가 각각 산삼이 가장 우수하며, 차례로 장뇌삼, 인삼 순이었음을 보고되었다.

약침요법은 경락학설의 원리에 의거하여 한약재를 선택하여 유관한 혈위, 압통점 및 양성반응점에 주입하여 자침과 약물작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 신침요법이다⁶⁾.

최근 산삼을 이용한 혈맥주입용 약침에 관한 연구가 시행되어 유의한 결과가 보고되고 있는데, 급성, 아급성 독성 및 항암효과를 관찰한 결과, mice와 rat을 이용한 독성 실험에서 산삼약침은 아무런 독성 반응을 나타내지 않았고, Sarcoma-180 복강암에서는 생존율을 115%이상 증가시키는 결론을 얻은 바 있다⁸⁾. 한편 무작위 대조 임상실험을 시행하여 산삼약침의 혈맥주입이 인체에 심각하게 유해한 반응을 일으키지는 않으나 자각적인 임상증후를 유도할 수 있음을 보고하였으며⁹⁾, 산삼약침의 농도별 및 pH 및 전해질 조절여부에 따라, 산삼약침이 A549 human lung cancer cell에 대한 apoptosis를 유도하여 세포사멸을 증가케 함²³⁻²⁴⁾을 보고 하였다.

대장암은 우리나라에서 4번째로 흔한 암으로 진단 당시 이미 환자의 약 15~20%는 간으로의 전이를 동반하고 있으며, 계속적으로 환자의 60%에서

간으로의 전이가 발생한다. 이렇게 간은 가장 흔하게 대장암의 전이가 발생하는 장기로, 치료하지 않은 경우 평균 생존기간은 3.7개월~11개월 정도로 간전이의 발생 및 진전은 환자의 생존에 영향을 미치는 중요한 요인이 된다²⁻⁴⁾. 본 연구에 사용된 실험적 간전이 모델은 대장암 세포주가 혈행성 전이를 통하여 간에 전이암을 형성하는 모델로서 임상적인 내용을 반영한 모델이라고 할 수 있다.

본 연구는 산삼약침이 Ohnish 등¹⁰⁾의 방법에 의한 colon26-L5암세포주를 이용한 간전이 모델의 항암 및 면역증진효과를 관찰하고자, colon26-L5 암세포주를 생쥐의 간문맥에 주입하여 간전이암을 유발하고 산삼약침을 시술한 후, 간의 무게 및 조직을 검사하고 spleen의 면역세포 활성화를 관찰하고, 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰하였다.

먼저 산삼약침의 암전이 억제효과를 알아보기 위하여 실험군(산삼약침 시술군)과 대조군으로 그룹을 나누고 *in vitro*상에서 배양한 colon26-L5 암세포주를 1×10^4 cells/ml가 되도록 세포현탁액을 만들어 14~16g의 BALB/c계 mice에 1×10^4 cells/0.1ml를 간문맥을 통하여 주사하였다. 간문맥으로 주사된 대장암 세포주는 혈행성 전이를 일으켜 간에 전이암을 만들게 되며, 이후 20일간 BALB/c계 mice의 肝俞에 해당되는 지점에 실험군에는 산삼약침을 매일 한쪽에 각각 0.1ml 씩 총 4.0ml를 시술하고 대조군에게는 PBS를 각각 0.1ml 씩 총 4.0ml를 시술하였다. 마지막 시술 하루 후에 cervical dislocation으로 mice를 치사시킨 다음 개복하여 간에 전이된 전이암을 정상군과 그 무게를 비교하여 평가하였다.

정상군의 간무게는 평균 1.10g 이고 대조군은 평균 4.85g, 그리고 실험군의 간무게는 평균 2.25g 으로 실험군의 간무게는 대조군의 그것보다 유의하게 감소하였으며, 정상군과 실험군과의 간무게의 차이는 유의하지 않았다(Fig. 5).

한편, 정상군과 대조군, 실험군의 BALB/c계 mice의 몸무게를 1주일 3회씩 관찰하였는데, 정상군은 21일간 조금씩 몸무게가 증가하는 정상적인 성장상태를 보였고, 대조군과 실험군은 시술 후 몸무게가 0.6~0.7g정도 줄었다가 점차 다시 증가하는 상태를 보였는데 대조군에 비해 실험군의 몸무게가 더 많이 증가하는 결과를 보였다(Fig. 4). 이는 정상군에 비해 대조군과 실험군은 모두 실험 시작시 간문맥에 colon26-L5암세포주를 주사하기 위해 개복함으로써 인체 수술 후유증과 general condition저하로 몸무게가

줄었으며, 이후 서서히 회복의 상처로부터 회복되고 또한, 대조군의 경우 평균 4.85g의 전이암이 성장함에 따라 mice의 몸무게도 증가한 것으로 생각된다. 대조군보다 실험군의 몸무게가 더 증가하는 것은 산삼약침의 효과로 상처가 빨리 회복되고 정상화되어 가는 소치로 여겨진다.

정상군과 대조군, 실험군에서 적출된 간을 육안적으로 확인한 결과 정상군에 비해 대조군은 3~4배 정도 크며, 간의 암종양으로 보이는 종양성 모양이 많이 보이는데 반해, 산삼약침을 시술한 실험군은 거의 정상군과 같이 매끄러운 모양으로 종양의 모습이 많이 보이지 않고, 크기 또한 정상군과 비슷함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

이를 조직학적으로 관찰하기 위해 실험의 결과로 얻어진 간 조직을 paraffin block을 만들어 조직절편을 만든 후 H-E staining으로 염색한 후 간 조직의 병리소견을 살펴보았다. 그 결과 정상군의 간 조직과 비교하여 대조군과 실험군에서는 모두 세포핵들이 변형된 암세포들이 관찰되어 두 군 간의 큰 차이가 나타나지는 않았으나, 실험군에서 대조군에 비해 상대적으로 정상조직의 소견이 많이 나타났다(Fig. 7~16).

다음으로 산삼약침의 면역증진효과를 알아보기 위하여 sacrifice된 mice로 부터 적출한 spleen으로부터 분리한 면역세포의 활성화를 관찰하고, 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰하였다.

mice로부터 분리한 비장세포를 1×10^6 cells/ml로 complete RPMI배지에 부유시킨 후 $100 \mu\text{l}$ 씩 96-well culture plate에 가하고 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 Con A (concanavalin A, Sigma, U.S.A.), LPS(lipopolysaccharide, Sigma, U.S.A.)와 함께 72시간 배양한 후 XTT법에 의해 proliferation을 측정된 결과 non-treated group에 비해 LPS처리군 및 Con A처리군에서 각각 정상군에 비해 대조군과 실험군이 모두 흡광도 수치가 유의하게 증가하였는데, LPS처리군에서는 대조군과 실험군과의 유의한 차이는 나타나지 않았고, Con A처리군에서 대조군에 비해 실험군의 흡광도 수치가 유의하게 증가하였다(Fig. 17).

이는 non-treated group에 비해 B림프구를 유도 자극하는 LPS 및 T림프구를 유도 자극하는 Con A의 처리로 인해 각기 정상군과 대조군, 실험군에서 모두 면역세포인 B림프구 및 T림프구가 증식하였고, 정상군에 비해 전이암을 유발한 대조군 및 실험군에서 암세포의 항원에 의한 반응으로 B림프구 및

T림프구가 더 많이 증식되었다고 생각할 수 있다. 한편, 실험군은 정상군이나 대조군에 비해서 산삼약침을 시술함으로 인해 더욱 많은 면역세포를 생성하였는데, 항체매개성 면역세포인 B림프구보다 세포매개 면역세포인 T림프구에 특화하여 더 많이 증식하고 생성증가한 것으로 생각할 수 있다.

면역세포들은 골수에서 유래되며, 골수 또는 가슴샘에서 성숙된다. 이와 같이 면역세포들이 성숙, 분화되는 장소를 일차림프기구라 하며, 성숙된 림프구들이 항원과 반응하여 면역반응이 시작되는 장소를 이차림프기구라 하는데 림프절과 함께 비장이 이에 해당된다. 림프계 세포인 림프구는 획득면역의 중추적 역할을 하는 세포로 면역반응의 특성인 나와 남의 구별, 특이성, 다양성, 그리고 면역기억을 가진다. 림프구는 성숙된 중추림프구에서 B림프구와 T림프구로 구별되는데, B림프구는 항체매개 면역반응에 관계하며, T림프구는 세포매개 면역반응에 관계한다²⁵⁾.

면역반응은 항원에 의해 시작되는데 이때에 CD4+ T세포의 도움이 필요하다²⁶⁾. CD4+ T helper림프구는 cytokines의 양상에 따라 T helper 1(Th 1)과 T helper 2(Th 2)로 구분된다²⁷⁾. 이 두 세포는 모두 Th림프구 전구세포로부터 분화되는데 분화를 결정하는 요인은 유전적 요인과 항원의 유입경로, 항원의 물리적 변형, 항원의 양 등의 환경적 요인으로 구분된다. 이러한 환경적 요인이 Th림프구의 주변 환경에 존재하는 cytokines를 결정하여 Th 1과 Th 2로 분화를 유도한다²⁸⁾. IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-12의 생성은 Th 1 세포성 면역반응에 관여하고 있는 반면에, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 생성은 Th 2 체액성 면역반응에 관여한다²⁹⁻³⁰⁾.

이에 본 실험은 산삼약침이 Th 1 세포성 면역과 Th 2 체액성 면역 중 어디에 더 관계하고 있는가를 알아보기 위하여 Th 1 면역반응에 관여하고 있는 cytokine 중에 IFN- γ 와 Th 2 면역반응에 관여하고 있는 cytokine 중에 IL-4를 선택하여 검출실험을 하였다.

IFN- γ 는 면역에 기여하는 다양한 생리적 반응을 유도하고, 미생물의 병원균의 침입에 대항해서 숙주를 방어할 수 있는 세포활성 물질이고³¹⁾, IL-4는 많은 세포활성 물질과 마찬가지로 다양한 경로로 다양한 표적세포에 영향을 주며, 항체생성, hematopoiesis, 염증조절 그리고 T세포반응을 발달시키는데 중요한 역할을 하는 prototypic면역조절 세포활성 물질이다³²⁾.

한편, 뇌경색, 알러지, 천식과 같은 다양한 질환에서는 Th 1 세포활성 물질보다 Th 2 세포활성 물질이 더 중요하게 관계하는 것으로 알려져 있다³³⁾.

splenocytes에 의해 분비되는 Th 1 type cytokine (IFN- γ) 및 Th 2 type cytokine(IL-4)의 양을 specific ELISA kits(BD pharmingen, U.S.A.)를 사용하여 측정 한 결과 non-treated group에서는 24, 48, 72시간 배양 모두에서 IFN- γ 및 IL-4가 검출되지 않았고, Con A처리군에서만 24, 48, 72시간 배양시에 정상군, 대조군, 실험군에서 모두 각각 IFN- γ 및 IL-4가 검출되었으나, IFN- γ 검출 실험에서는 오히려 대조군이 24, 48시간에서 정상군에 비해 유의적으로 증가하였고, 실험군은 48, 72시간에서 정상군이나 대조군에 비해 증가하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 18).

IL-4검출실험에서는 24시간 배양시에 정상군, 대조군, 실험군 순으로 IL-4가 모두 유의한 차이로 검출되었고, 48시간 배양시에는 정상군과 실험군에서는 24시간 배양시보다 IL-4가 증가하게 검출되었는데, 대조군에서는 오히려 감소하여 정상군과 대조군과의 유의한 차이는 없었으며, 실험군에서 정상군과 대조군에 비해 IL-4가 유의하게 증가하였다. 72시간 배양시에는 정상군, 대조군, 실험군에서 IL-4가 모두 감소되었는데, 실험군이 정상군이나 대조군에 비해 유의하게 감소가 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 19).

이는 산삼약침이 Th 1 세포성 면역과 크게 관계가 없고, Th 2 체액성 면역과 관계가 있음을 의미한다.

결론적으로 본 연구에서 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델을 통하여 암이 전이된 간의 무게를 관찰하고 육안적 소견과 조직학적 소견으로 산삼약침이 암의 전이를 억제하고 암의 성장을 둔화시킨 것을 하였고, 비장의 면역세포를 증식하여 산삼약침이 세포성 면역에 관계된 T림프구를 생성 증가시키는 것을 알았으며, 마지막으로 면역세포로부터 분비되는 cytokine을 관찰하여 산삼약침이 Th 2 체액성 면역에 관계되어 면역세포들을 자극 유도하는 것을 확인하였다.

이는 산삼약침이 세포매개 면역반응에 관계하여 체액성면역을 강화시켜 항암면역을 증가시키고 암의 성장을 감소시키거나 막을 수 있을 뿐만 아니라, 뇌경색, 알러지, 천식과 같은 다양한 질환의 치료에 효과적일 수 있음을 시사하는 결과로서 앞으로 더 많은 산삼약침 혹은 산삼에 대한 임상적 연구가 이루어

어져 하루 빨리 암이나 난치병 치료에 사용되어져야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

본 연구는 colon26-L5 암세포주를 생쥐의 간문맥에 주입하여 간전이암을 유발한 후 산삼약침의 암전이 억제효과 및 면역세포 증진 효과를 실험적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간전이암이 유발된 생쥐에게 산삼약침을 시술한 군은 대조군에 비해서 암의 전이 및 증식이 감소하였다.
2. 대조군과 실험군의 암세포를 조직학적으로 관찰한 결과 큰 차이를 나타내지 않았으나, 실험군에서 정상조직의 소견이 상대적으로 많이 나타남을 알 수 있었다.
3. 산삼약침을 시술한 군의 비장에서 면역세포의 활성화를 관찰한 결과 세포성 면역에 관계된 T림프구가 유의한 증가를 나타내었다.
4. 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰한 결과 Th 2를 자극 유도하는 IL-4에서 유의할 만한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 산삼약침이 세포매개 면역반응에 관계하여 체액성면역을 강화시켜 암의 성장을 감소시키거나 전이력을 억제하는 것으로 나타났다.

VI. 參考文獻

1. 류재현, 김광호, 심강섭, 박용범, 서정수. 대장직장암의 전이성 간암에 대한 항암색전술. 대한외과학회지. 2000 ; 58(1) : 109-114.
2. Cascino S, Walder S. Chemo-embolization in the treatment of liver metastases from colorectal cancer. Cancer Treatment Reviews. 1996 ; 22 : 355.
3. Isenberg J, Fischbach R, Lruer I, Keller HW. Treatment of liver metastases from

- colorectal cancer. *Anticancer Reserch*. 1996 ; 16 : 1291.
4. 선병호, 안병권, 김병수, 김만기, 김지현. 원발성 및 전이성 간암에 대한 외과적 항암 Lipiodol 색전술. *대한외과학회지*. 1996 ; 50(10) : 47.
 5. 신순식, 김경철, 최영현, 이용태, 엄현섭, 김창식. 산삼 감정 기준의 객관성. *東義韓醫研*. 2001 ; 5 : 107-114.
 6. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 대한약침학회. 1999 : 13-14, 112-118, 138-203.
 7. 이종영, 조병준, 권기록, 강대인. 혈맥에 대한 문헌적 고찰. *대한약침학회지*. 2005 ; 8(3) : 11-20.
 8. 권기록 외. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성, 아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. *대한약침학회지*. 2003 ; 6(2) : 7-27.
 9. 권기록. 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. *대한약침학회지*. 2004 ; 7(1) : 15-26.
 10. Ohnishi Y, Sakamoto T, Fujii H et al. Characterization of a liver metastatic variant of murine colon 26 carcinoma cells. *Tumour Biol*. 1997 ; 18 : 112-122.
 11. 전국한외과대학 본초학교수공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1994 : 531.
 12. 중앙대사전편찬위원회. *완역중앙대사전*. 정담. 1997 ; 7 : 3473- 3479.
 13. 조선총독부전매국. *인삼사*. 서울 : 법인문화사 : 3-5.
 14. 張中景. 中景全書. 대성문화사. 1999 : 130, 150, 153, 155, 166, 167, 176, 199, 201, 205, 208, 209, 214, 217.
 15. 이상인 외. *한약임상응용*. 정보사. 1982 : 345-350.
 16. 하대유. 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구. *대한면역학회지*. 1979 ; 1(1) : 45-52.
 17. 山田昌之. 朝鮮人蔘의 研究. *日本藥理學會誌*. 1955 ; 51 : 390.
 18. Brekhman, I.I. *Panax ginseng*, Gosudarst Isdat et Med, Lit. Leningard, 1957 : 1.
 19. 최진호. *인삼의 신비*. 서울 : 교문사. 1984 : 13-14.
 20. Takagi K. *Proceedings International Ginseng Symposium The Central Research Institute. Office of Monopoly*. Seoul, Korea. 1974 ; 119.
 21. 권순주. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 면역증강효과 비교연구. 박사논문. 대구대학교. 2003.
 22. 김성진, 신순식, 서부일, 이선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과에 대한 비교연구. *대한본초학회지*. 2004 ; 19(2) : 41-50.
 23. 조희철, 이선구, 권기록. 농도별 산양산삼 증류약침의 apoptosis 에 관한 실험적 연구. 석사논문. 상지대학교. 2004.
 24. 곡경승, 이선구, 권기록. pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약침의 apoptosis에 관한 실험적 연구. *대한침구학회지*. 2004 ; 21(6) : 1-17.
 25. 김세종. *면역학 길라잡이*. 서울 : 고려의학. 2000 : 15-17.
 26. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994 ; 76 : 241-251.
 27. Constant SL, Bottomly K. Induction Th 1 and Th 2 CD4+ T cell response, The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol*. 1997 ; 114 : 297-322.
 28. Sell S. Cell mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity. Hergestown, Maryland ; Herpers & Row Pub. 1980 : 144-171.
 29. Romgnani S. Human Th1 and Th2 subsets : doubt no more. *Immuol., Today*. 1991 ; 12 : 256-257.
 30. Zurawski G, De Vries J.E. Interlukin 13, an interlukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol., Today*. 1994 ; 15 : 19-26.
 31. Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev*. 2001 ; 14 : 778-809.
 32. Brown M. A., Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit. Rev. Immunol*. 1997 ; 17 : 1-32.
 33. Kim H. M., Shin H. Y., Jeong H. J., et al. Reduced IL-2 but elevated IL-4, IL-6 and IgE serum levels in patients with cerebral infarction during the acute stage. *J. Mol. Neurosci*. 2000 ; 14 : 191-196.