

원저

金銀花藥鍼의 항암 및 면역반응에 관한 실험적 연구

한재섭 · 박희수

상지대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of Anti-cancer and Immune Response of *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture

Han Jae-sub and Park Hee-soo

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Sang-Ji University

Objectives : This study was performed to investigate the effects of anti-cancer and changes in immune response of *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture.

Methods : Experimental studies were evaluated through the anti-cancer and immune response activities such as, cell viability, DNA fragmentation, Apoptosis, survival time, pulmonary colonization, and productivity of interleukins & interferon- γ .

In order to study the effects of anti-cancer and changes in immune response of *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture, the groups were divided into five groups ; Normal group(non treated group), Control A group(0.2ml Normal saline for oral administration), Control B group(administration of intramuscular injection with 0.2ml *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture solution), Acupuncture group(AT, administration of acupuncture at Chungbu(L1)), and Herbal-Acupuncture group(HAT, administration of *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture at Chungbu(L1)).

Results : 1. *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture(>300mg/ml) could lead cancer cell to cell death.

2. *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture(400mg/ml) caused DNA cleavage.

3. *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture(400mg/ml) caused apoptosis in the cancer cell line.

4. In mouse survival time, all of experimental groups didn't show any significant compared to the control group.

5. In pulmonary colonization assay, *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture group was less than Control A group at 7 days after induction of cancer.
6. In comparison Control A group, there was significant decrease of Interleukin-2 level in *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture group.
7. In comparison Control group, there was decrease of Interleukin-4 level in the Acupuncture group.
8. In comparison Control group, there was decrease of Interleukin-10 level in the Acupuncture group.
9. In comparison Control group, there was significant increase of Interleukin-12 level in Acupuncture group and *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture group.
10. In comparison Control group, there was significant increase of Interferon- γ level in Acupuncture group.

Conclusion : According to above mentioned results, *Lonicerae Flos* Herbal-acupuncture is expected to be effective for anticancer and improvement in immune response.

Key words : *Lonicerae Flos*, anti-cancer, immune response, Herbal-acupuncture

I. 緒 論

癌은 세포의 기본적인 규칙이 깨어져 나타나는 하나의 질환이다¹⁾. 이는 세포에서 일부가 돌연변이를 일으켜 무질서하게 증식하여 덩어리를 만들고, 이것이 주위 장기를 압박할 뿐만 아니라 여기에 인접한 정상조직 및 장기에 침윤하는 것으로 악성종양이라고 일컫는다²⁾.

특히 폐암은 20세기에 들어서면서 세계적으로 발생빈도가 급격히 늘기 시작하였고³⁾, 우리나라의 경우 암의 발생 부위별 빈도는 2001년도에 위암(20.3%)에 이어 폐암(11.9%)이 두 번째로 많은 것으로 조사되었다⁴⁾.

韓醫學에서 癌에 대한 기록은 기원전 16~11세기 중국의 商, 周 시대의 殷虛甲骨文에 “瘤”의 병명이 기재되어 있는 것을 필두로 하여⁵⁾ 《黃帝內經》⁶⁻⁸⁾에 石瘤, 腸覃, 石瘕, 積聚, 癥瘕, 噎膈, 反胃 등의 증상이 기재되어 있고, 《難經·五十六難》⁹⁾에 肥氣, 伏梁, 痞氣, 息賁, 賁豚의 증상이 기재되었으며, 이후 翻胃¹⁰⁻¹¹⁾, 石癰¹²⁾ 등 다양한 병명으로 기술하고 있다.

면역(immunity)은 특정한 감염질병에 대하여 저항하기 위한 신체의 방어 능력을 의미한다¹³⁻¹⁴⁾. 최근에는 면역이란 신체의 방어기작을 총괄하는 과학으로 폭넓게 해석하고 있다.¹³⁻¹⁵⁾

韓醫學에서는 《素問·玉機眞藏論》⁶⁾에 “邪氣勝者 正氣衰也 故病甚”이라 하였고《素問·刺法論》⁶⁾에서 “五疫之至 皆相染易 無間大小 病狀相似 正氣存內 邪不可干”이라 하여 질병의 발생은 正邪抗爭의 과정에서 邪氣가 正氣보다 우세하면 병이 진행하며, 正氣가 내부에 충만하면 邪氣가 가히 犯할 수 없다 하였으니 體內的 正氣의 충실함의 여부가 면역의 關鍵이라 설명하고 있다.

최근 抗癌 및 免疫效果에 대한 실험적 연구로는 李¹⁶⁾의 覆盆子藥鍼, 金¹⁷⁾ 등의 全蝎藥鍼, 鄭¹⁸⁾ 등의 旱蓮草藥鍼, 李¹⁹⁾의 瓦松藥鍼, 朴²⁰⁾ 등의 益智仁藥鍼, 李²¹⁾ 등의 兔絲子藥鍼 등 藥鍼液을 사용한 연구와 安²²⁾의 補益劑, 李²³⁾의 抗癌白朮散, 曹²⁴⁾의 抗癌丹, 金²⁵⁾의 免疫丹 등 複方을 이용한 연구가 보고 된 바 있으나, 金銀花藥鍼을 肺癌에 응용하여 抗癌 및 免疫效果를 입증한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 金銀花藥鍼液의 항암 및 면역효과를 확인하기 위하여 A549 인체폐암세포와 B16F10 폐암세포를 이용하여 시험관내에서의 항암효과와 mouse에서의 항암 및 면역반응을 관찰한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험동물 및 취혈

생후 4주령, 체중 20g내외의 웅성 C57BL/6를 대 한바이오텍로부터 구입하여 시판사료(삼양사료(주), Korea)와 수돗물을 자유롭게 급식시키면서, 온도 21±2°C, 습도 55±3%의 항온항습기(명진기계, Korea)에서 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 刺鍼부위는는 인체의 中府(L1, Chungbu)穴에 상응하는 부위를 선택하였고, 체포의 털을 제거한 후 골도법에 의해 取穴하였으며, 실험 전반에 좌우 교대로 사용하였다.

2. 약침의 제조

실험에 사용한 金銀花(Lonicerae Flos)는 시중 건 재상에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 약침의 제조는 300g의 金銀花를 물 3000ml와 함께 5000ml의 등근 플라스크에 넣어 3시간 전탕 한 후 전탕액을 300ml로 농축하였다. 농축액을 95%의 ethanol 100 ml과 함께 넣어 침전 시켰다. 침전물을 제거 후 다시 100ml로 농축하고, 85%의 ethanol 100ml과 함께 침전 시켰다. 침전물을 제거하고 다시 100ml로 농축 하였고, 75%의 ethanol 100ml과 함께 다시 침전 시켰다. 침전물을 제거 후 100ml로 농축 한 뒤 500ml의 생리 식염수와 함께 혼합하여 0.2µm의 filter (corning, USA)로 멸균 여과한 후 약침용 vial에 넣어 가압 멸균하여 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

1) 세포

본 실험에 사용한 세포는 B16-F10(KCLB 80008) mouse melanoma cell과 A549 인체폐암세포를 사용 하였고, 모두 한국 세포주은행으로부터 분양받아 5 % CO₂와 95 % air의 배양기(존샘, Korea)에서 37 °C를 유지하며 배양하였다.

2) 배지

기본배지는 RPMI 1640(Gibco, USA)에 3.7g/L sodium bicarbonate (Shinyopture Chemicals Co, Japan), Penicillin G(100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1ml, Streptomycin (100mg/ml, Sigma, USA) 1ml, fungizone (Gibco, USA) 4ml을 첨가하여 혼합한 뒤,

bottle top filter (Corning, USA)로 멸균하여 사용하였다.

FBS(Gibco, USA)는 56°C의 항온수조에서 30분 간 inactivation시킨 후 사용하였다.

혼합배지는 RPMI 1640 기본배지에 FBS를 10% 첨가하여 사용하였으며, 암세포 배양 전반에 사용하였다.

4. 암 유발 및 군 분리

암을 유발하는 B16-F10 세포를 5×10⁶cells/ml로 맞춘 후, 0.2 ml씩 C57BL/6의 미정맥을 통하여 주입 하여 암을 유발 시켰다.

군의 분류는 정상군(Normal), 대조군으로 0.2ml의 생리 식염수를 경구 투여한 Control A, 金銀花藥鍼液 0.2ml를 마우스의 대퇴부에 주입한 Control B, 실험 군으로 中府穴에 침을 30초 간 자침한 AT (acupuncture treatment), 金銀花藥鍼液을 0.2ml씩 中府穴에 주입한 HAT(herbal-acupuncture treatment)로 나누었다.

5. 비장(脾臟)세포의 분리 및 Colony의 관찰

1) 비장세포의 분리

비장세포는 각각의 실험 마지막 날 치사시킨 마우스에서 무균상태로 적출하여 4°C의 HBSS(Gibco, USA)로 2회 세척 한 뒤 이를 직경 60mm의 세포배양 용 접시에 옮기고, HBSS를 가한 후 두 장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 잘게 부순 뒤 반복 여과시켜 작은 조직편을 제거하고 부유세포를 모았다.

이 세포 부유액을 원심 분리한 후 1ml의 증류수로 5-6초간 처리하여 Hypotonic shock으로 적혈구를 용해시킨 뒤 10×HBSS로 희석하고 원심분리하여 임파구를 분리하였다. 분리된 임파구는 완전배지에 재부유시킨 후, 각각의 실험 항목에 맞추어 세포수를 조정된 뒤 본 실험에 사용하였다.

비장에서 얻은 임파구를 5×10⁶ cells/ml로 조정 한 뒤, 여기에 100µg/ml로 조정된 Concavalin-A 100 µl를 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 상층액을 수거하여 IL-2, 4, 12의 생산능을 측정하였다.

2) Colony의 관찰

실험이 시작된 후 7일, 14일, 21일째에 개복하여 시료를 채취한 후, 폐를 적출하여 폐에 형성된 Colony를 관찰하였다.

6. 측정항목 및 방법

1) Apoptosis

(1) A549 폐암 세포주 배양 및 세포생존율 측정

A549 폐암세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI(GibcoBRL, USA)에 5% FBS와 Fungizone를 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10⁵ cells를 넣어 배양한 후 금은화약침을 50, 100, 200, 300, 400mg/ml 농도로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300μl/well로 첨가하여 상온에서 5분 간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 1% SDS를 100μl 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570nm (reference 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷ 세포 당 lysis buffer(10mM Tris·HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(3) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액을 이용하여 bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)을 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1μg/μl)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16μg/μl에 BCA 용액 100μl를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2μl와 BCA 용액 100μl을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(4) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100μg를 caspase-3와 cytochrome C를 확인하기 위하여 15% SDS-polyacrylamide gel에, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% milk를 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. 이 membrane을 PARP, cytochrome c, caspase-3 등의 monoclonal 항체(PharMingen, USA)를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization시키고 난 후 PBS-Tween으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 antimouse IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Kodak X-Omat film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

(5) DNA fragmentation

처리한 배양세포를 얼음으로 차게 한 PBS로 한번 세척한 후 세포 침전물을 700μl의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 현탁시키고, 얼음에서 45분간 항온시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 lysis를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4°C에서 13,000 ×g로 20분간 원심분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40μl의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA)로 용해시키고, 200μg/ml의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37°C에서 1시간 항온시켰다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 사진을 찍어 가시화하였다.

2) 생존율 측정

대조군과 실험군의 C57BL/6mouse에 5×10⁶cells/ml로 맞춘 B16-F10 세포를 0.2ml씩 29G의 주사기를 이용하여 미정맥으로 주입하였다.

주입 다음날부터 오전 10시에서 12시 사이에 동물 상태를 확인 하였고, 이 시간을 기준으로 생존여

부를 결정하였다.

생존율은 Geran 등이 기술한 바와 같이 아래의 Median Survival time을 이용하여 생존증가율을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

$$\text{생존증가율} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

X : 생존 동물이 전체 동물수의 1/2이 되는 최초의 시간 (일)

Y : 생존 동물이 전체 동물수의 1/2이 되는 최초의 시간 -1(일)

T : 실험군의 median survival time(일)

C : 대조군의 median survival time(일)

3) Flow-cytometry assay

mouse의 비장세포를 추출한 후 IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ 의 cytokines량을 Flow cytometry (Beckton Dickinson, USA)를 통하여 측정하였다.

추출한 splenocyte를 1×10^6 cells/ml로 조정된 후 brefeldin A (eBioscience, USA)를 $1 \mu\text{l}/\text{ml}$ 의 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(0.15 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.3)와 250 μl 의 BD Cytofix/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 세척하고 $500 \times g$ 로 5분간 원심 분리하였다. 이후에 100 μl 의 BD Perm/Wash solution에 고정된 세포에 2 μl 의 PE-conjugated anti-Interleukin-2 antibody, PE-conjugated anti-Interleukin-4 antibody, PE-conjugated anti-Interleukin-12 antibody, PE-conjugated anti-Interferon gamma antibody를 각각 넣고 4°C에서 30분간 배양하였다.

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

4) mRNA RT-PCR

(1) Total RNA 추출

Tissue RNA PrepMate kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 mouse의 비장으로 부터 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 $\times g$ 에서 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) (260/280 nm)로 정량하였다.

(2) RT-PCR

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2 μg 를 가지고 β -actin과 IFN- γ 에 대해서는 oligo-(dT)15 primer (Promega, USA) 1 μl 를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-12에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1 μM 를 사용하여 70 °C에서 10분 동안 pre-incubation한 후, dNTP mixture 1 mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl[pH 9.0 at 25 °C], 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA) 1U/ μl , AMV reverse transcriptase(Promega, USA) 15 U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2 μl 씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다.

Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2 μl 를 dNTP mixture 200 μM , gene specific primer 300 nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH 9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR machine에서 denaturation은 94°C에서 5min으로, annealing은 94°C에서 30sec, 56°C에서 30sec, 72°C에서 1min으로 35cycles를 하였고, extension은 72°C에서 10min하였다. PCR product를 1.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

5) ELISA assay

(1) Interleukin-2 활성 측정

IL-2 측정은 mouse IL-2 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate에 plate reagent 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한 바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l씩 첨가 후 37 $^{\circ}$ 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 550 nm에 측정하였다.

(2) Interleukin-4 활성 측정

IL-4 측정은 mouse IL-4 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate에 plate reagent 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한 바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은 채 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 2시간 방치하였다. 세척용액으로 5번 세척하고 각 well에 conjugate reagent를 100 μ l씩 첨가 후 plate에 cover를 덮은 후 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 1시간 동안 반응하였다. 반응 후 세척용액으로 5번 동안 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 550nm에 측정하였다.

(3) Interleukin-10 활성 측정

IL-10 측정은 mouse IL-10 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate에 assay buffer 용액을 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한 바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은 채 실온에서 3시간 방치하였다. 계속해서 미리 조제된 biotinylated antibody reagent를 50 μ l 첨가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 각 well

에 희석시킨 streptavidin-HRP 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응하고 세척용액으로 3번 세척하였으며 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가한 후 30분간 반응하였다. 반응을 멈추기 위해 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550nm에 측정하였다.

(4) Interleukin-12 활성 측정

IL-12 측정은 mouse IL-12 ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. 96 well polystyrene plate에 standard diluent를 각 well에 50 μ l 첨가하고 mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한바와 같이 처리한 것을 각 well에 50 μ l 첨가하고 plate cover를 덮은 채 실온에서 1시간 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 각 well에 biotinylated antibody reagent를 100 μ l 첨가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 각 well에 streptavidin-HRP 용액을 100 μ l 첨가 후 실온에서 30분간 반응하였으며 반복해서 세척용액으로 3번 세척하였다. 각 well에 TMB substrate 용액을 100 μ l 첨가한 후 암실에서 30분간 반응하였다. 반응을 멈추기 위해 0.18 M의 황산을 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550nm에 측정하였다.

(5) Interferon- γ 활성 측정

IFN- γ 측정은 mouse IFN- γ ELISA kit(PIERCE, USA)를 사용하였다. mouse에서 분리한 spleen으로부터 얻은 백혈구를 위에서 기술한 바와 같이 처리한 것을 96 well polystyrene plate에 50 μ l 첨가하였고 실온에서 2시간 방치하였으며 biotinylated antibody를 각 well에 50 μ l 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용액으로 3번 세척하고 streptavidin-HRP 용액을 각 well에 100 μ l 첨가한 후 실온에서 30분 반응하였으며 상기와 같은 방법으로 3번 세척하였다. 계속해서 TMB substrate 용액을 각 well에 100 μ l 첨가하고 30분 동안 반응 후 0.18 M의 황산 100 μ l 첨가하여 반응을 멈추고 ELISA 판독기(Emax, Molecular Device, USA)를 이용하여 550nm에 측정하였다.

7. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STATISTICA 6.0(Statsoft, USA)를 이용하였으며, 통계방법은 student's T-test를 하였고, 시험관내 세포독성에서 구한 IC50은 회귀분석을 통하여, P<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

Ⅲ. 成 績

1. Cell viability

金銀花藥鍼의 경우 농도의존적 세포사멸 결과를 나타내었고, 특히 300 mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. DNA fragmentation

金銀花藥鍼 400 mg/ml에서 DNA 분절현상이 나타났다. 그러나 金銀花藥鍼 300 mg/ml에서는 DNA 분절현상이 나타나지 않았다(Fig. 2).

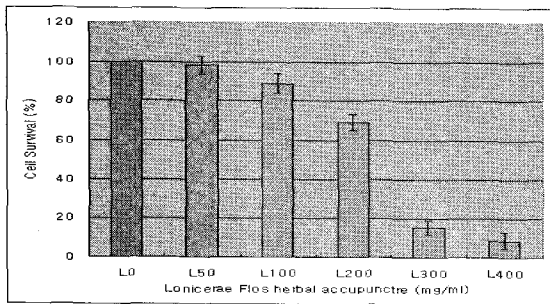


Fig. 1. Cell survival by Lonicerae Flos herbal-acupuncture in A549 lung cancer cell line

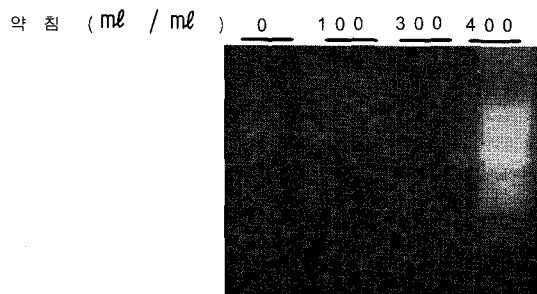


Fig. 2. DNA fragmentation by Lonicerae Flos herbal-acupuncture in A549 lung cancer cell line

3. Western blotting

金銀花藥鍼의 농도가 400 mg/ml에서만 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다(Fig. 3).

4. 마우스 생존율

Control A의 median survival time은 23일이었고, AT, HAT, Control B 모두 22일을 나타내었다. 그러나 HAT는 주입 22일부터 28일 사이에 상대적으로 생존율이 높은 것으로 나타났다(Fig. 4).

5. Colony Morphogenesis의 관찰

B16-F10 세포를 C57BL/6에 주입 후 시간 경과에 따른 Colony의 발현을 관찰 한 결과, 7일에서 AT와 HAT가 다른 군에 비하여 colony의 수가 적게 관찰되었고, 14일째에는 명확한 차이가 관찰되지 않았다. 21일째에는 Colony의 정도를 확인 할 수 없을 정도로 많이 관찰 되었다(Fig. 5).

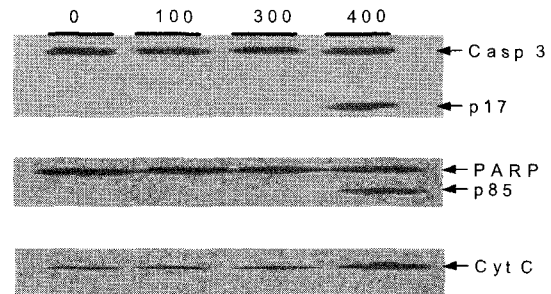


Fig. 3. caspase-3 activation, PARP fragmentation, and cytochrome C release in A549 lung cancer cell line

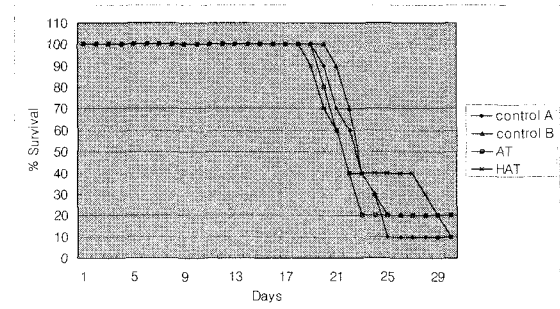


Fig. 4. Survival numbers of the B16-F10 cell bearing mice treated with Lonicerae Flos herbal-acupuncture

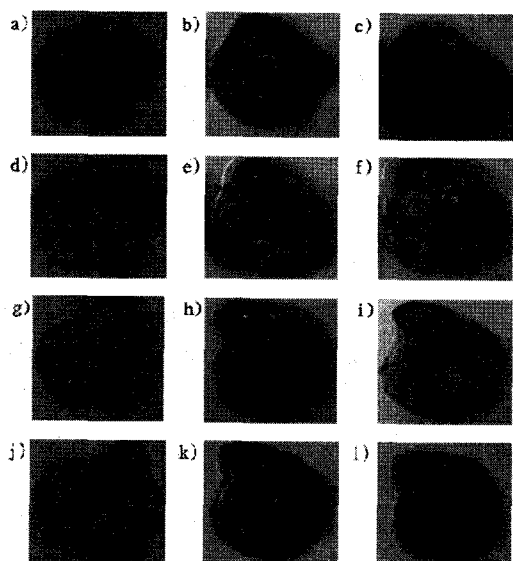


Fig. 5. Pulmonary colony of the B16-F10 cell bearing mice treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

Control A : a)7days, b)14days, c)21days.

Control B : d)7days, e)14days, f)21days.

AT : g)7days, h)14days, I)21days .

HAT : j)7days, k)14days, l)21days.

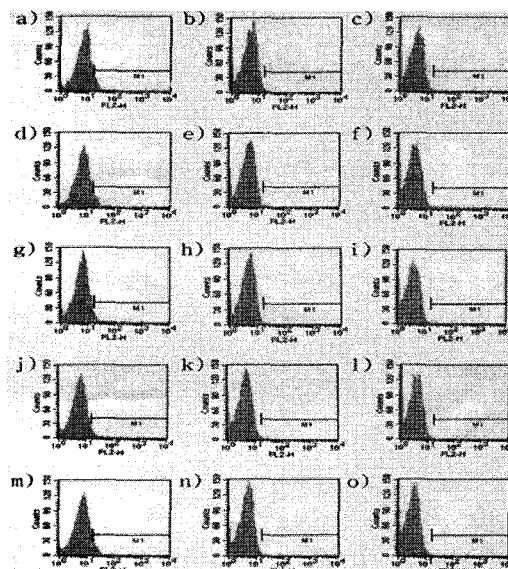


Fig. 7. Interleukin-4 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

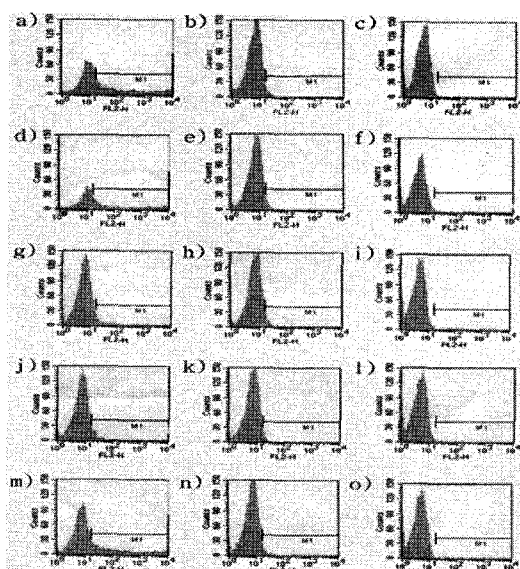


Fig. 6 Interleukin-2 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture.

Normal : a)7days, b)14days, c)21days.

Control A : d)7days, e)14days, f) 21days.

Control B : g)7days, h)14days, i)21days.

AT : j)7days, k)14days, l)21days.

HAT :m)7days, n)14days, o)21days.

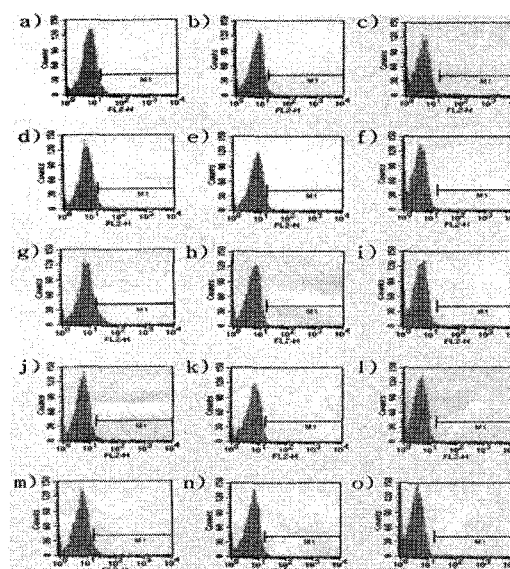


Fig. 8. Interleukin-12 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

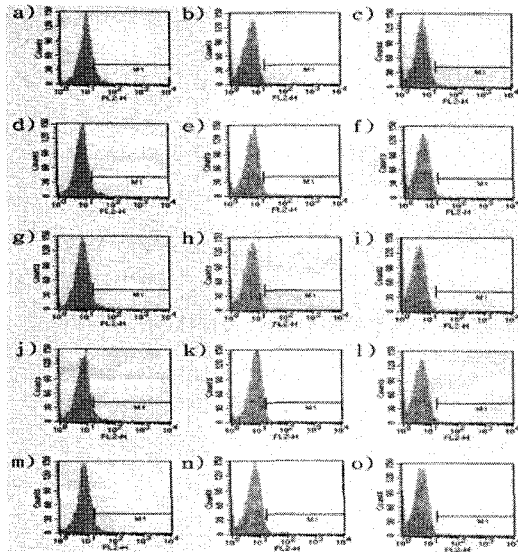


Fig. 9. Interferon- γ Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

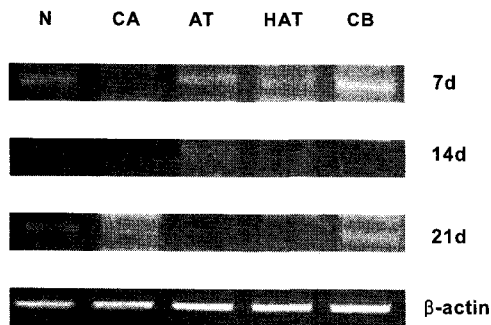


Fig. 10. Interleukin-2 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

6. Flow-cytometry assay

1) Interleukin-2의 측정

Flow-cytometry를 이용하여 Interleukin-2의 발현정도를 시간별로 측정 한 결과 7일째에는 실험군 모두에서 Control A에 비하여 증가되는 경향을 보였고, 14일째, 21일째에는 각 군별 차이가 명확하게 보이지 않았다(Fig. 6).

2) Interleukin-4의 측정

Flow-cytometry를 이용하여 Interleukin-4의 발현정도를 시간별로 측정 한 결과 각 군별 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 7).

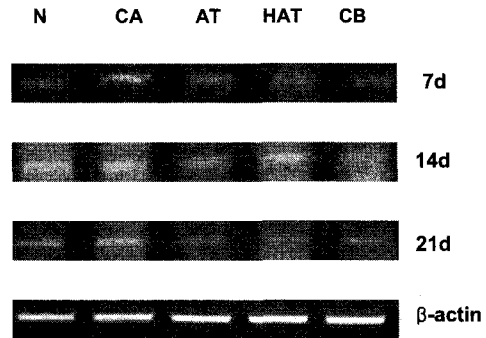


Fig. 11. Interleukin-4 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

3) Interleukin-12의 측정

Flow-cytometry를 이용하여 Interleukin-12의 발현정도를 시간별로 측정 한 결과 각 군별 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 8).

4) Interferon- γ 의 측정

Flow-cytometry를 이용하여 Interferon- γ 의 발현정도를 시간별로 측정 한 결과 각 군별 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 9).

7. mRNA RT-PCR

1) Interleukin-2의 측정

Interleukin-2 mRNA의 발현양상은 Control A에 비하여 실험군 모두에서 7일과 14일 구간에서 증가함을 알 수 있었다(Fig. 10).

2) Interleukin-4의 측정

각 군들에서 발현의 차이는 어느 정도 있었으나 Control A에 비하여 실험군 모두 전 구간에서 발현이 저하되었음을 알 수 있었다(Fig. 11).

3) Interleukin-10의 측정

AT에서 7일에 증가하였다가 14일에는 감소하였고, 21일에는 다시 증가하였다. HAT에서는 14일에 가장 높게 나타났다가 21일에 감소하였다(Fig. 12).

4) Interleukin-12의 측정

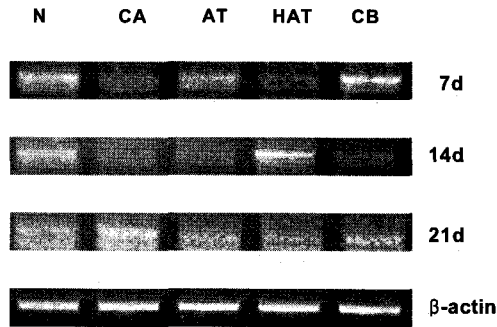


Fig. 12. Interleukin-10 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

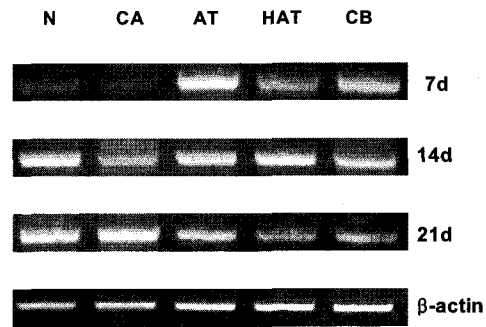


Fig. 13. Interleukin-12 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

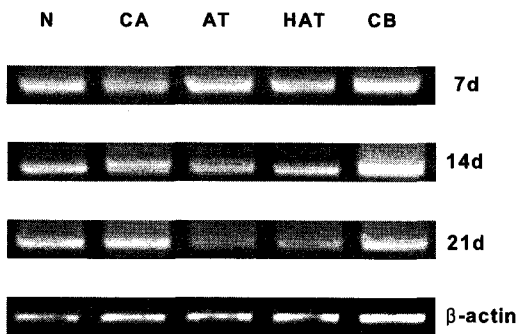


Fig. 14. Interferon- γ Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

AT와 HAT 및 Control B에서는 7일과 14일에서 증가하였다가 21일 후 약간 감소하였지만 전체적으로 증가하는 양상을 보여주고 있다(Fig. 13).

5) Interferon- γ 의 측정

각 군들에서 발현의 차이는 있으나 발현이 7일, 14일 및 21일에서 모두 증가하는 양상을 보여주고 있으며 AT와 HAT는 21에서 약간 감소한 것으로 나타났다(Fig. 14).

8. ELISA assay

1) Interleukin-2의 측정

Interleukin-2의 함량은 HAT에서 Control A에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 1).

2) Interleukin-4의 측정

Table 1. Interleukin-2 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with *Lonicerae Flos* herbal-acupuncture

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	3040.42 \pm 38.26
Control A	3051.37 \pm 37.90
Control B	3039.66 \pm 17.39
AT	3075.53 \pm 36.61
HAT	2811.61 \pm 92.51a)b)c)d)

Values are the Mean \pm Standard deviation.

- a) Statistical significant (vs Normal) ($p < 0.05$).
- b) Statistical significant (vs Control A) ($p < 0.05$).
- c) Statistical significant (vs Control B) ($p < 0.05$).
- d) Statistical significant (vs AT) ($p < 0.05$).

Interleukin-4의 함량은 AT만이 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고, HAT는 유의성이 인정되지 않았다(Table 2).

3) Interleukin-10의 측정

Interleukin-10의 함량은 AT에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었고, HAT는 AT에 비해 유의한 감소를 나타내었으나 대조군과는 차이를 나타내지 않았다(Table 3).

4) Interleukin-12의 측정

Interleukin-12의 함량은 AT에서 모든 실험군에 비하여 유의한 증가를 나타내었고, HAT는 Control B에 비하여 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 4).

5) Interferon- γ 의 측정

Table 2. Interleukin-4 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with Lonicerae Flos herbal-acupuncture

Group	Interleukin-4 (pg/ml)
Normal	24.38±7.39
Control A	41.28±15.52a)
Control B	61.96±18.27a)b)
AT	30.09±3.91c)
HAT	32.53±22.11

Values are the Mean±Standard deviation.

- a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05).
- b) Statistical significant (vs Control A) (p<0.05).
- c) Statistical significant (vs Control B) (p<0.05).

Table 4. Interleukin-12 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with Lonicerae Flos herbal-acupuncture

Group	Interleukin-12 (pg/ml)
Normal	353.89±67.74
Control A	277.08±51.60
Control B	213.50±11.10a)b)
AT	492.08±19.53a)b)c)
HAT	236.97±18.62a)c)d)

Values are the Mean±Standard deviation.

- a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05).
- b) Statistical significant (vs Control A) (p<0.05).
- c) Statistical significant (vs Control B) (p<0.05).
- d) Statistical significant (vs AT) (p<0.05).

Interferon-γ의 함량은 AT에서 Control A와 Control B에 비해 모두 유의한 증가를 나타내었고(p<0.05), HAT는 Control A에 비해 유의한 증가를 나타내었다(p<0.05)(Table 5).

IV. 考 察

金銀花(Lonicerae Flos)는 인동과에 속한 다년생 半常綠大質藤木인 인동(Lonicera japonica THUNB), 紅腺忍冬(Lonicera hypoglaus MIQ), 山銀花(Lonicera confusa DC) 및 毛花柱忍冬(Lonicera dasystyla REHD)의 花蕾를 여름철 꽃이 피기 전에 採取하여 乾燥한 것으로^{26,28,30-33,35)} 異名은 銀花, 忍藤, 忍冬藤, 忍冬, 二花, 土銀花, 銀花子 등이 있다^{26,28-31,33,34)}. 性

Table 3. Interleukin-10 Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with Lonicerae Flos herbal-acupuncture

Group	Interleukin-10 (pg/ml)
Normal	105.70±14.00
Control A	117.18±29.34
Control B	118.26±4.91
AT	142.78±6.58a)b)
HAT	113.03±12.44c)

Values are the Mean±Standard deviation.

- a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05).
- b) Statistical significant (vs Control B) (p<0.05).
- c) Statistical significant (vs AT) (p<0.05).

Table 5. Interferon-γ Productivity of the B16-F10 Cell Bearing C57BL/6 Mice Treated with Lonicerae Flos herbal-acupuncture

Group	Interferon-γ (pg/ml)
Normal	5252.60±91.36
Control A	3988.06±431.20a)
Control B	4898.72±316.52a)b)
AT	5353.98±59.06a)b)c)
HAT	4786.15±177.50a)b)d)

Values are the Mean±Standard deviation.

- a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05).
- b) Statistical significant (vs Control A) (p<0.05).
- c) Statistical significant (vs Control B) (p<0.05).
- d) Statistical significant (vs AT) (p<0.05).

味는 寒, 無毒, 甘하며²⁶⁻³⁵⁾ 肺, 胃, 心으로 歸經하고^{26-28,30-35)} 清熱解毒, 涼散風熱의 효능이 있어 癰腫 疔瘡, 腫瘍, 喉痺, 丹毒, 疥癬, 楊梅惡瘡, 五種尸疔, 瘰癧, 痔漏, 熱毒血痢, 風熱感冒, 溫病發熱을 치료한다²⁶⁻³⁵⁾. 張³⁶⁾은 “善於化毒 故治癰疽 腫毒 瘡癬 楊梅 風濕諸毒 誠爲要藥 毒未成者能散 毒已成者能潰”라 하였고 朴³⁷⁾은 항바이러스작용을 하며 황색포도상구균, 용혈성 연쇄상구균, 폐렴쌍구균, 결핵균 등의 억제작용이 있다고 하였고, 金³²⁾은 항균, 항바이러스작용 및 항내독소작용, 소염작용, 면역증강작용 등이 있다고 하였다.

中府(LI, Chungbu)는 乳上三肋間의 動脈應手處에 위치하고³⁸⁻⁴³⁾ 手太陰肺經의 募穴이며 手足太陰經의 交會穴이다^{38-40,42-43)}. 清宣上焦, 疏調肺氣하는 穴性이 있어 喉頭炎, 氣管支炎, 喘息, 胸中熱, 肺炎, 胸痛, 肩背痛, 呼吸困難, 食慾不振, 消化不良 등을 치료하는

작용이 있다³⁸⁻⁴²⁾.

실험결과에서 金銀花(Lonicerae Flos)의 세포사멸 효과를 알아보기 위하여 A549 폐암세포주에 金銀花藥鍼液을 50, 100, 200, 300, 400mg/ml 농도로 처리하여 세포생존율을 조사하였더니, 각각 98.2, 88.9, 69.3, 15.4, 8.85%로 나타났다. 따라서 金銀花藥鍼의 경우 300mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

이러한 암세포사멸이 어떠한 기작에 의하여 일어나는지를 확인하기 위하여 위에서 확인된 농도를 근거로 하여 DNA 분절실험을 실시한 결과 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 DNA 분절현상이 나타났다. 그러나 金銀花藥鍼 300mg/ml에서는 DNA 분절현상이 나타나지 않은 것으로 보아 암세포의 경우 金銀花藥鍼 300mg/ml에서는 세포사 과정 중 세포괴사(necrosis)가 일어나 DNA 분절현상이 나타나지 않는 것으로 추측되며, 金銀花藥鍼 400mg/ml에서는 이와는 달리 apoptosis가 일어나 DNA 분절현상이 나타난 것으로 추측된다(Fig. 2).

金銀花藥鍼에서 apoptosis 과정을 통하여 세포사가 일어났는지를 확인하기 위하여 caspase-3, poly(ADP-riboseyl) polymerase(PARP) 및 cytochrome C에 대하여 Western blot를 수행한 결과 金銀花藥鍼 400mg/ml에서만 caspase-3가 활성화되어 p17이 보였으며 PARP의 p85 분절화 및 cytochrome C의 방출이 일어남을 확인하였다. 즉 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 먼저 cytochrome C의 방출되어 caspase-3가 활성화됨으로써 PARP의 p85 분절화를 불활성화를 시킴으로써 결국은 DNA가 분절되어 세포가 죽는 것으로 결론내릴 수 있다(Fig. 3).

B16-F10 melanoma로 유발된 폐암 mouse의 생존율을 살펴보면 Control A의 median survival time은 23일이었고, AT, HAT, Control B 모두 22일을 나타내어 실험군에서의 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 4).

암세포를 주입한 후 7일 간격으로 폐에 생긴 colony를 관찰한 결과, 전반적으로 7일에서 21일이 가까워지면서 colony의 수가 증가함을 볼 수 있었으며, 7일째에 HTA에서 Control A보다 적은 수의 colony가 발견되었음을 알 수 있다(Fig. 5).

Flow-cytometry를 이용하여 Interleukin-2의 발현 정도를 시간별로 측정 한 결과 7일째에 실험군 모두에서 Control A에 비하여 증가되는 경향을 보였고, 이후에는 각 군별 차이가 명확하게 보이지 않았다.

Interleukin-4, 12, 그리고 Interferon- γ 에서는 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6, 7, 8, 9).

RT-PCR을 이용하여 mRNA의 발현양상을 살펴본 결과, Interleukin-2에서는 Control A에 비하여 실험군 모두에서 7일이 경과하였을 때 증가하였다가 14일 후 감소하였다(Fig. 10).

Interleukin-4에서는 Control A에 비하여 전 구간에서 실험군 모두 발현이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 11).

Interleukin-10에서는 HAT에서 14일째에 발현이 향상되었으나 7일과 21일에는 Control A에 비하여 발현이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 12).

Interleukin-12에서는 7일과 14일에서 Control A에 비하여 실험군 모두 발현이 향상되었으나 21일에는 오히려 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 13).

Interferon- γ 에서는 21일에 실험군 모두 발현이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 14).

ELISA assay를 통한 Interleukin-2, 4, 10, 12 그리고 Interferon- γ 의 정량적 분석을 시행하였다.

그 결과 Interleukin-2에서 HAT는 Control A에 비해 유의성 있는 감소를 한 것으로 나타났다(Table 1).

Interleukin-4에서는 AT군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었고(Table 3, Fig. 16), Interleukin-10에서는 AT에서 Normal이나 Control A, B에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Table 2).

Interleukin-12에서는 AT에서 모든 실험군에 비하여 유의한 증가를 나타내었고 HAT는 AT에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Table 4).

Interferon- γ 는 AT에서 Control A와 Control B에 비해 모두 유의성 있는 증가를 나타내었고, HAT는 Control A에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 5).

이상과 같은 실험결과로 보아 金銀花藥鍼液은 농도의존적 항암효과가 있으며 B16-F10 폐암세포로 유발된 폐암에 대하여 어느 정도 항암 및 면역작용을 한다고 생각되어져, 앞으로 더욱 심도 있는 연구로써 항암제 개발에 활용되어질 수 있다고 사료된다.

V. 結 論

金銀花藥鍼液의 항암 및 면역효과를 확인하기 위하여 A549 인체폐암세포와 B16F10 폐암세포를 이용하여 시험관내에서의 항암효과와 mouse에서의 항암 및 면역반응을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 金銀花藥鍼은 300mg/ml 이상의 농도에서 암세포를 사멸시킬 수 있음을 알 수 있었다.
2. 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 DNA 분절현상이 나타났다.
3. 金銀花藥鍼 400mg/ml에서 apoptosis가 유발되었다.
4. 마우스의 생존율을 살펴보면 실험군 모두 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다.
5. 암 발생 7일째에 HAT군에서 Control A군보다 적은 수의 colony가 발견되었다.
6. Interleukin-2의 함량은 HAT군에서 Control A군에 비해 유의성 있게 감소하였다.
7. Interleukin-4의 함량은 AT군에서 유의한 감소를 나타내었다.
8. Interleukin-10의 함량은 AT군에서 유의한 감소를 나타내었다.
9. Interleukin-12의 함량은 AT군과 HAT에서 유의한 증가를 나타내었다.
10. Interferon- γ 의 함량은 AT군에서 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 金銀花藥鍼液은 A549 인체폐암세포에 대하여 농도의존적 세포사멸의 효과가 있고, B16-F10 melanoma 세포로 유발시킨 실험동물의 항암 및 면역반응에 영향을 미침을 알 수 있었고, 앞으로 金銀花를 응용한 다양한 방법으로서의 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. 백문기, 홍경만. 암유전자. 서울 : 월드사이언스, 2000 : 3.
2. 이찬영. 알기 쉬운 암의학(상)-암의 모든 것-. 서울 : 단국대학교출판부, 2002 : 27, 31-40, 85.
3. 문구, 정병화, 김병주. 암 동서의 결합치료. 의산 : 원광대학교출판국, 1999 : Vol. 2 : 117-124.
4. 박재갑 외 13인. 한국중앙암등록 사업 연례보고서. 국립암센터, 2003 : 12.
5. 문구, 정병화, 김병주. 암 동서의 결합치료. 의산 : 원광대학교출판국, 1999 : Vol. 1 : 1-23, 35-43, 55-62, 68-98, 219.
6. 楊維傑. 黃帝內經素問解釋. 서울 : 一中社, 1991 : 3, 25, 32-33, 42, 50-52, 59, 171, 234, 276, 304, 331, 412, 661-662, 664-665.
7. 河北醫學院. 靈樞經校釋. 北京 : 人民衛生出版社, 1992 : Vol. 1 : 484.
8. 河北醫學院. 靈樞經校釋. 北京 : 人民衛生出版社, 1992 : Vol. 2 : 237, 246, 355-356, 395, 468.
9. 成樂箕. 八十一難經解釋. 서울 : 高文社, 1975 : 77-79.
10. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울 : 大星文化社, 1990 : 349-354.
11. 陳自明. 婦人良方大全. 文光圖書有限公司. 券七 : 13, 37.
12. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 人民衛生出版社. Vol. 2 : 839-846, 857, 879, 1487.
13. 장혜영. 기본면역학. 부산 : 현대출판사, 2002 : 9.
14. 서설. 기초임상면역학. 서울 : 고려의학, 2001 : 9-10.
15. 최승구. 필수임상면역학. 서울 : 청구문화사, 1998 : 13, 232.
16. 李秉烈. 抗癌 및 免疫效果에 覆盆子藥鍼이 미치는 影響. 대전 : 大田大學校大學院, 1999.
17. 김소형, 김갑성. 全蝎 藥針液의 抗突然變異 및 抗癌 效果. 大韓針灸學會誌, 17(3) : 2000 : 151-167.
18. 정영돈, 이현, 이병렬, 임윤경. 足三里에 施術한 旱蓮草 藥鍼의 免疫增進과 抗癌作用에 관한 研究. 大韓針灸學會誌, 20(3) : 2003 : 141-153.
19. 李貞和. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌, 16(4) : 1999 : 175-212.
20. 박상용, 이병렬. 益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機

- 能에 미치는 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 18(3) : 2001 : 79-93.
21. 이재복, 이병렬. 兔絲子藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. 大韓鍼灸學會誌. 18(3) : 2001 : 94-104
 22. 安文生. 抗癌劑 Mitomycin C와 數種 補益劑의 併用投與 效果에 對한 研究. 익산 : 圓光大學校大學院. 1992.
 23. 李錫雨. 抗癌白朮散의 抗癌 및 抗轉移 效果에 關한 研究. 대전 : 大田大學校大學院. 1996.
 24. 曹政孝. 抗癌丹을 投與한 各種 癌患者 320例에 對한 考察. 대전 : 大田大學校大學院. 2000.
 25. 金載容. 免疫丹의 Macrophage와 NK cell의 活性化에 미치는 影響. 대전 : 大田大學校大學院. 2002.
 26. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울 : 永林社. 1992 : 198-199.
 27. 楊東善. 本草備要解釋. 서울 : 一中社. 1991 : 264-265.
 28. 顏正華. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 163-165.
 29. 李時珍. 本草綱目. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : Vol. 1 : 1334.
 30. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균. 완역중약대사전. 도서출판 정담. 1999 : Vol. 2 : 582-587.
 31. 梁基相. 處方構成을 위한 漢藥의 配合과 應用. 서울 : 傳統醫學研究所. 1993 : 212.
 32. 김호철. 한약 약리학. 서울 : 集文堂. 2001 : 150-152.
 33. 張相文, 崔炆, 金鍾元, 朴炳允, 朴宣東. 韓藥資源植物學. 서울 : 學文出版. 1996 : 471-473.
 34. 上海中醫學院 中草藥學. 香港 : 商務印書館. 1983 : 137.
 35. 康秉秀, 金永坂. 方劑의 體系的 構成을 위한 臨床配合本草學. 서울 : 永林社. 1994 : 230-231.
 36. 張介賓. 景岳全書. 上海 : 科學技術出版社. 1984 : Vol. 1 : 382, 387, 407, 933.
 37. 박영순. 한방의 약리 해설. 서울 : 아카데미서적. 2002 : 120-121.
 38. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 1988 : Vol. 1 : 302-304.
 39. 台北啓業書局有限公司. 鍼灸大成校釋. 大星文化社. 1996 : 714-715.
 40. 朴喜守. 腧穴研究針灸學. 서울 : 醫聖堂. 1996 : 37-38.
 41. 金昌煥. 鍼灸穴位解剖圖譜. 서울 : 大星文化社. 127.
 42. 安榮基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 2002 : 76-77.
 43. 李芳遠. 鍼灸精要. 서울 : 一中社. 2002 : 3.