

원저

## 紅花子藥鍼의 암전이 억제와 면역 활성화에 관한 연구

박기철 · 박희수

상지대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### The Study on Anti-Metastasis and Immune Activation of Carthami Semen Herbal Acupuncture

Park Ki-chul and Park Hee-soo

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

*Objectives* : This study was guided to estimate inhibitory effects against hepatic metastasis and activation of immunocytes by Carthami Semen 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 were estimated and cytokine level was analyzed to produce immunological changes.

*Results* : The experimental group was significantly decreased metastatic size and proliferation compared with the control group. Observing immunocytes from the spleen of experimental group T-lymphocytes were significantly increased. As compared with control group, the differentiation of total T cell, helper T cell, cytotoxic T cell, Macrophage and NK cell was increased. Measuring the level of cytokine IFN- $\gamma$  which stimulates Th 1 was significantly increased in splenocyte with Con A stimuli. IFN- $\gamma$  and IL-12 were significantly increased in peritoneal exudate macrophage with LPS stimuli.

*Conclusion* : These findings strongly indicate Carthami Semen Herbal Acupuncture improves immunity to inhibit the growth of cancer and metastasis.

*Key words* : Carthami Semen, Anti-Metastasis, Anti-cancer, Immune Activation

## I. 緒 論

최근 우리나라는 식생활 및 생활습관의 서구화로 대장암 발생빈도가 점차 증가하는 추세이며, 실제로 2003년 통계청 자료에 의하면, 대장암으로 인한 사망률은 전체 암 사망률 중 상위에 해당된다고 한다. 이는 선진국형 암으로만 인식되어 왔던 대장암이 식이적, 환경적 요인의 변화로 인해 급속도로 증가했다고 볼 수 있다. 한편 전이(metastasis)에 있어 대장암은 주로 肝으로 血行性 전이를 하며, 직장암은 肝이나 肺로 전이 된다<sup>1)</sup>. 藥鍼療法은 질병과 관련된 부위인 經穴, 阿是穴 등의 양성 반응점에 정제한 각종 韓藥物을 선택 주입함으로써 경혈과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하여 질병을 예방하고 치료하는 방법<sup>2)</sup>으로, 면역계질환의 예방 및 치료 등에 유효하다고 보고<sup>3-6)</sup>되고 있다. 紅花子(Carthami Semen)는 국화과에 속하는 잇꽃의 種子로 性溫, 味甘하다. 活血化癥, 通經止痛, 解毒의 효능이 있어 癥瘕腹痛, 創傷腫痛, 中風, 動脈硬化症, 腦血栓 등에 활용하며 최근 骨에 미치는 영향에 관한 연구들이 많이 발표되고 있다<sup>7)</sup>. 근래에 紅花子藥鍼에 관한 연구에는 김 등<sup>8)</sup>의 痛風에 미치는 영향, 육 등<sup>9)</sup>과 황<sup>10)</sup>의 骨多孔症에 미치는 영향, 김 등<sup>11)</sup>의 鎮痛과 抗血栓 효능에 관한 연구 등이 있고, 홍화자약침의 安定性과 毒性에 대한 연구로는 임 등<sup>12)</sup>의 피부 자극시험 및 안점막자극시험, 안<sup>13)</sup>의 急性·亞急性 毒性實驗 등이 있다.

이에 著者は 活血化癥하고 通經止痛하는 효능이 있어 癥瘕痞塊, 瘡瘍腫毒치료에 효과적인 홍화자를 사용하여 제조한 약침이 대장암의 간전이 억제와 면역 활성화에 효과가 있는지를 관찰하고자 colon26-L5 암세포주를 이용하여 *in vitro* 상에서 XTT법에 의한 세포독성을 측정하였고, mouse의 肝門脈에 주입하여 간전이암을 유발한 후 肝俞(BL18)에 해당하는 부위에 홍화자약침을 시술하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 실험재료

#### 1) 동물

본 실험에 사용된 동물은 6주령 암컷 Balb/c계 mouse인데, 모든 동물은 대한바이오링크에서 구입하여 2주 동안 고형사료(삼양사료(주), 한국)와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다.

#### 2) 取穴

mouse에서 인체의 肝俞(Kansu, BL18)<sup>2)</sup>에 상응하는 부위를 선택하였는데, 체표의 털을 제거한 후 骨度法에 의거하여 取穴하였다.

#### 3) 약침 주입기

mouse에게 홍화자약침을 투여하기 위한 도구로는 26gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

#### 4) 홍화자약침의 조제<sup>14)</sup>

약재는 상지대학교 부속한방병원에서 구입하여 기류시스템에 의해 깨끗한 씨와 불필요한 찌꺼기를 분리하였다. 그 후 깨끗한 씨는 박피기에 의해 皮層을 제거하고 껍질이 제거된 씨의 알맹이는 분쇄로로 분쇄한 후 알맹이를 screw press에 넣어 열은 가지 않은 상태에서 압력만 가해 기름성분을 추출하였다. 이때 거친 찌꺼기는 bin에 저장되어 버려지고, 착유된 윤제는 정치탱크에 보관하여 앙금이 가라앉은 뒤에 상층액을 취하고 나서, 3일 정도 大韓藥鍼學會의 무균실에 보관하였다. 무균실에 보관된 상층액을 먼저 와트만 여과지로 2번의 1차 여과를 한 후, 0.45 μm, 0.2 μm 여과막 순으로 3차 여과하였다. 여과된 윤제를 오염되지 않게 멸균된 바이엘에 일정 용량 주입하였고, 산화방지를 위해 질소가스를 충전한 다음 random으로 sampling하여 시료를 준비하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 홍화자약침의 시술

(1) 암전이 억제, 항암 및 면역 활성화 실험  
실험군은 mouse에서 인체의 肝俞에 해당하는 부위에 홍화자약침액을 2주일 동안 매일 좌우 각 0.1 ml씩 주입하였고, 대조군은 PBS(phosphate buffered saline)를 동일한 방법으로 주입하였다.

## 2) 세포의 배양

### (1) 배지의 구성

RPMI-1640(Gibco BRL, U.S.A.)에 sodium bicarbonate (Amresco, U.S.A.) 2 g과 HEPES(Amresco, U.S.A.) 3.77g, penicillin-streptomycine(penicillin 10,000 unit/ml, streptomycine 10,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Gibco BRL, U.S.A.) 10 ml를 증류수에 넣고 1 l로 조정된 다음 pH를 7.2로 맞추고 0.22 $\mu\text{m}$  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.)의 농도가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

### (2) 암세포의 배양

Balb/c계 mouse에 간전이암을 유발시키기 위한 암세포주는 colon 26-L5 carcinoma cell line으로 일본 토야마의약대학 화한약연구소에서 분양받아 5% CO<sub>2</sub>와 95% air의 배양기에서 37 °C를 유지하며 배양하였다.

### (3) 암전이 유발

실험적 간전이 모델은 Ohnishi<sup>15)</sup> 등의 방법에 준하였다. *in vitro*상에서 배양한 colon26-L5 대장암세포를 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들어 Balb/c계 mouse를 개복한 후 간문맥을 통하여 0.1ml씩 주입하였다. 간문맥으로 주사된 대장암세포는 간에 전이암을 형성하게 된다.

### (4) 둔부종양 유발

*in vitro*상에서 배양한 colon26-L5 대장암세포를 6 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들어 Balb/c계 mouse 등부위의 털을 제거하고 양측 둔부에 각각 50 $\mu\text{l}$ 씩 피내주사하여 암을 유발하였다. mouse는 그룹당 6마리로 하였다.

### (5) 비장세포의 준비

Balb/c계 mouse에 홍화자약침의 시술을 2주일간 시행하고 마지막 시술 다음 날 mouse를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하여 PBS로 세척하고 RPMI배지가 들어있는 Petri dish(35 $\times$ 100 mm)에서 작은 해부가위로 절단한 다음 cell strainer (40 $\mu\text{m}$ , Becton Dickinson, U.S.A.)로 여과하여 조직편 및 분리되지 않은 세포덩어리를 제거한 후 1500

rpm에서 3분간 3회 원심분리를 통하여 세척하고 complete RPMI배지에 부유시켰다.

### (6) 복강세포의 준비

Balb/c계 mouse에 홍화자약침의 시술을 2주일간 시행하고 마지막 시술 다음 날 mouse를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 21gauge 10ml syringe (두원메디텍, 한국)를 이용하여 복강으로부터 복강면역세포를 회수한다. 복강세포를 채취하기 4일 전 3% thioglycolate를 2ml씩 복강을 통하여 주입하여 복강세포를 활성화시킨다. 채취된 복강세포는 1500rpm에서 3분간 3회 원심분리하여 세척하고 complete RPMI 배지에 부유시켰다.

## 3. 측정항목

### 1) 항암 효과

#### (1) in vitro 암세포 증식 억제 작용

지수증식기(미생물이 일정한 속도로 이분법에 의하여 지수적으로 증식하는 단계)에 이른 colon26-L5 carcinoma cell을 수거하여 PBS로 2회 세척한 다음 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 만든 후 96-well microplate에 100 $\mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤 24시간 동안 preincubation하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 약침을 희석하여 첨가한 다음 다시 48시간 동안 배양한 뒤 XTT법에 의해 세포독성을 측정하였다.

#### (2) in vivo 암전이 억제 작용

##### ① 체중 측정

실험기간 동안 1주일에 2회씩 체중을 측정하였다.

##### ② 간의 무게 측정

실험기간 종료 후 mouse로부터 간을 적출한 뒤 무게를 측정하여 실험군, 대조군 및 정상군의 간 무게 차이를 비교하였다.

##### ③ 간의 육안적 관찰

적출한 간을 육안적으로 관찰한 뒤 사진을 찍어 비교하였다.

##### ④ 비장, 신장의 무게 측정

mouse로부터 간을 적출한 후, 비장과 신장을 적출하고 그 무게를 측정하여 실험군, 대조군 및 정상

군의 장기 무게차이를 비교하였다.

(3) in vivo 항암 작용

① 암종의 크기 측정

피내 주사한 암세포가 형성한 암종의 크기 변화를 실험기간 동안 1주일에 2회씩 caliper(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 암종의 크기는 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$A \times B^2 \text{ Tumor volumes (mm}^3\text{)} = 2$$

A : shorter axis

B : longer axis

2) 면역 활성화 효과

(1) 비장세포의 proliferation assay

mouse로부터 분리한 비장세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml로 complete RPMI배지에 부유시킨 다음  $100 \mu\text{l}$ 씩 96-well microplate에 분주하고  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 Con A(concanavalin A, Sigma), LPS(lipopolysaccharide, Sigma)와 함께 72시간 배양한 후 XTT법에 의해 cell proliferation을 ELISA-reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 비장세포로부터의 면역세포 분포조사

① 면역형광염색 (immunofluorescence staining)

비장세포 현탁액을  $1 \times 10^6$  cells/ml씩 counting하여 5ml tube에  $1 \text{ml}$ 씩 분주하였다. 이후 CD3, CD4, Mac-1 FITC-conjugated antibody를  $50 \mu\text{l}$ 씩 가한 다음 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 double staining으로 CD19, CD8, NK1.1 PE-conjugated antibody를  $50 \mu\text{l}$ 씩 가한 뒤 실온에서 30분 반응시켰으며, 이상의 면역형광염색 과정은 빙욕(ice bath) 상에서 시행하였다.

② 세포의 flow cytometry analysis

염색이 완료된 세포들을  $0.5 \text{ml}$ 의 완충액에 부유시켜 Flow cytometry analysis vantage(Becton Dickinson Co., U.S.A.)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대해 list mode로 자료를 취합하였으며 Cell Quest 프로그램을 이용하여 분석하였다. data의 분석은 forward scatter (FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및

lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 Total T cell, B cell, CD4+ T cell, CD8+ T cell, Mac-1+ cell, NK1.1 cell의 비율(gated %)을 산출하였다.

(3) 비장세포로부터의 cytokine 생산능

Splenoctyes에 의해 분비되는 Th-1 type cytokine (IFN- $\gamma$ ) 및 Th-2 type cytokine(IL-4)의 양을 specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 비장세포는  $1 \times 10^6$  cells/ml로 96-well microplate에 분주하고  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 Con A와 함께 24시간 배양한 후 cell-free 상등액을 준비하여 실험에 사용하였으며, cell-free 상등액은 실험에 사용할 때까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

(4) 복강대식세포로부터의 cytokine 생산능

복강세포로부터 분비되는 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 양을 specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. mouse로부터 분리한 복강세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml로 96-well microplate에 분주하고  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS와 함께 24시간 배양한 후 cell-free 상등액을 준비하여 실험에 사용하였으며, cell-free 상등액은 실험에 사용할 때까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS for Windows (version 10.0, SPSS Inc.)을 사용하였으며 ANOVA (Analysis of Variance) test 및 Tukey's multiple comparison을 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 結 果

1. in vitro 암세포 증식 억제효과

XTT법에 의해 ELISA-reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과 1/256~1/32의 희석 홍화자약침에서는 흡광도가 0.600~0.700 사이의 값으로 비슷하게 높게 나타났으며, 1/8에서는 현저히 감소했고, 홍화자약침 원액을 사용한 경우 흡광도가

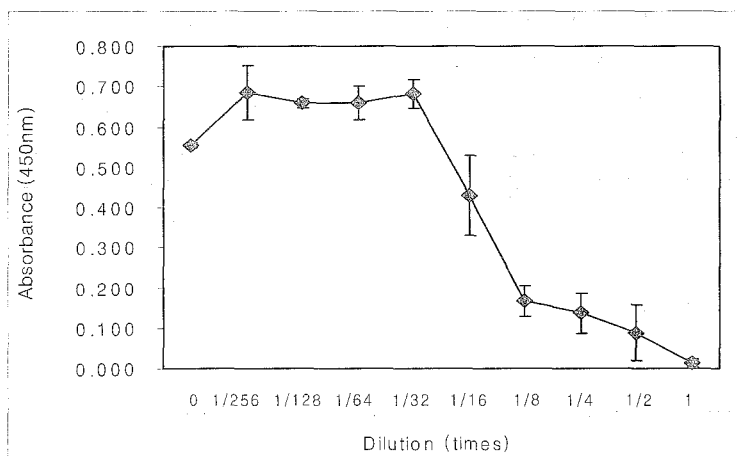


Fig. 1. Cytotoxicity of *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on colon26-L5 carcinoma cell

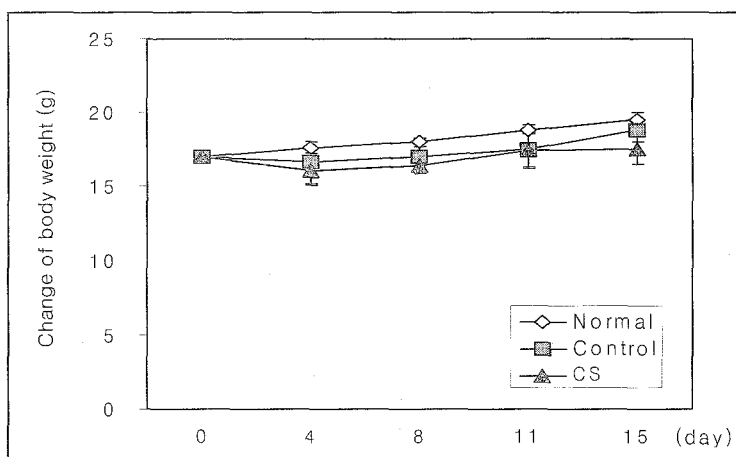


Fig. 2. Body weight change of mice treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture in experimental liver metastasis model

Normal : Non-treated group.

Control : Administration of injection with 0.1 ml PBS at Kansu(BL18) for 2 weeks(one time per a day).

CS : Administration of injection with 0.1 ml *Carthami Semen* Herbal Acupuncture at Kansu(BL18) for 2 weeks(one time per a day).

거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

## 2. in vivo 암전이 억제효과

### 1) 체중 변화

정상군과 대조군, 실험군의 Balb/c계 mouse 체중을 실험기간 동안 1주일에 2회씩 측정하였다. 정상군은 조금씩 체중이 증가하는 정상적인 상태를 보였고, 대조군과 실험군은 수술 후 체중이 조금 감소하였다가 점차 다시 증가하는 상태를 보였으나 군 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

### 2) 간무게 측정

Colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델에서 2주간 매일 兩 肝俞(BL18)에 각각 0.1ml씩 홍화차약 침액을 주입한 실험군과 PBS를 각각 0.1 ml씩 주입한 대조군과의 간 무게를 살펴보면 대조군은 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 하였다(Table 1, Fig. 3).

### 3) 간의 육안적 관찰조건

정상군, 대조군과 실험군에서 적출한 간을 육안적

으로 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군은 4-5배 정도 크며 간의 압축양으로 보이는 종양성 모양이 많이 보인데 비해, 홍화자약침을 시술한 실험군은 크기가 정상군과 비슷하고 모양도 거의 정상군과 같이 매끄러운 모양으로 종양모습이 많이 보이지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

정상군, 대조군과 실험군에서 간을 적출한 후 비장과 신장을 적출하여 그 무게를 측정된 결과, 정상군에 비해 대조군에서 비장의 무게가 유의성 있게 증가하였고 실험군에서는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다. 신장의 무게는 세 그룹에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 2).

#### 4) 비장, 신장의 무게 측정

Table 1. Weight of liver treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture in experimental liver metastasis model

	Number of animals	Mean $\pm$ SE
Normal	4	1.20 $\pm$ 0.02
Control	7	5.38 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>
CS	7	2.64 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>

unit : g.

mean  $\pm$  SE(standard error).

a : p<0.05 compared with normal group.

b : p<0.05 compared with control group.

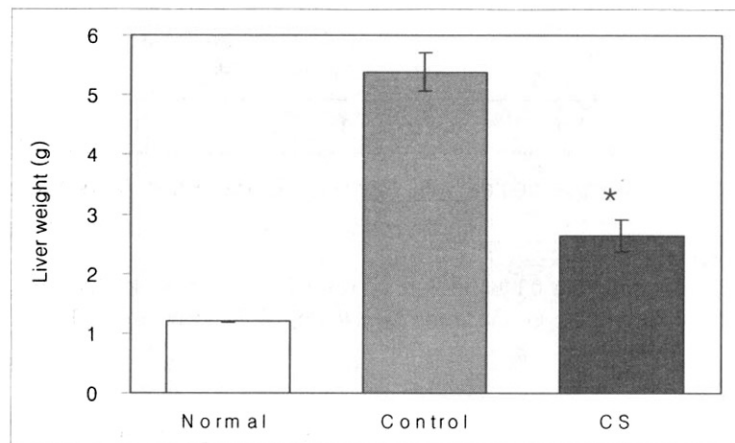


Fig. 3. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on experimental liver metastasis produced by intraportal injection of colon26-L5 carcinoma cells

\* p<0.05 compared with control group.

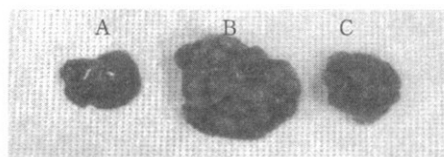


Fig. 4. Macroscopic observation of liver treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture  
A - Normal. B - Control. C - CS.

Table 2. Weight of spleen and kidney in mouse treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture in experimental liver metastasis model

	Spleen	Kidney
Normal	0.099 ± 0.013	0.188 ± 0.011
Control	0.232 ± 0.066*	0.193 ± 0.023
CS	0.184 ± 0.043	0.164 ± 0.009

unit : g.

mean ± SE.

\* p<0.05 compared with normal group.

Table 3. Primary tumor size in mice treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on intradermal tumor model

	Number of animals	0 day	4 day	9 day	15 day
Control	6	0	7.5 ± 0.5	52.4 ± 6.7	132.3 ± 12.0
CS	6	0	6.1 ± 3.9	37.7 ± 6.6*	97.4 ± 10.3*

unit : mm<sup>3</sup>.

mean ± SE.

\* p<0.05 compared with control group.

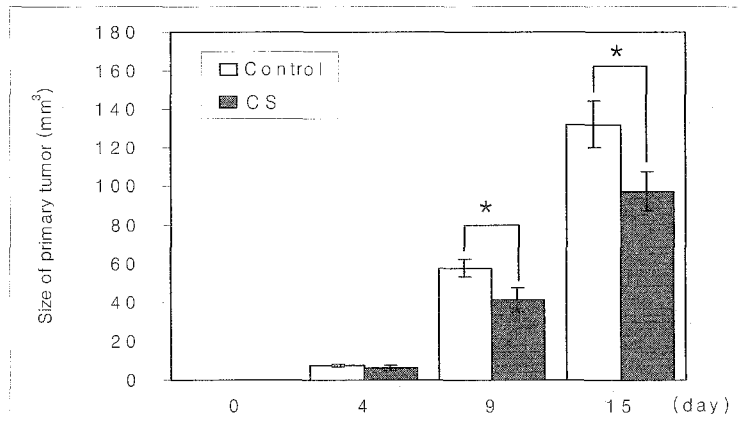


Fig. 5. Primary tumor size in mice treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on intradermal tumor model  
\* p<0.05 compared with control group.

### 3. 항암 효과

#### 1) 암종의 크기 변화

실험기간 동안 1주일에 2회씩 암종의 크기변화를 측정하였는데 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 암종의 크기 증가를 억제하였다(Table 3, Fig. 5).

### 4. 면역 활성화 효과

#### 1) 비장세포의 proliferation assay

mouse로부터 분리한 비장세포를 72시간 배양한 다음 XTT법에 의해 proliferation을 측정된 결과,

non-treated group에 비해 Con A처리군 및 LPS처리군에서 각각 정상군에 비해 대조군과 실험군이 모두 흡광도 수치가 유의하게 증가하였다. 그중에 Con A 처리군에서 대조군에 비해 실험군의 흡광도 수치가 유의하게 증가하였고, LPS처리군에서는 대조군과 실험군과의 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6).

#### 2) 비장세포로부터의 면역세포 분포조사

Total T cell, helper T cell, cytotoxic T cell, Macrophage, NK cell의 분포는 실험군에서 대조군에 비해 증가하였으며, B cell의 경우 실험군은 대조군에 비해 분포가 감소하였다(Table 4, Fig. 7).

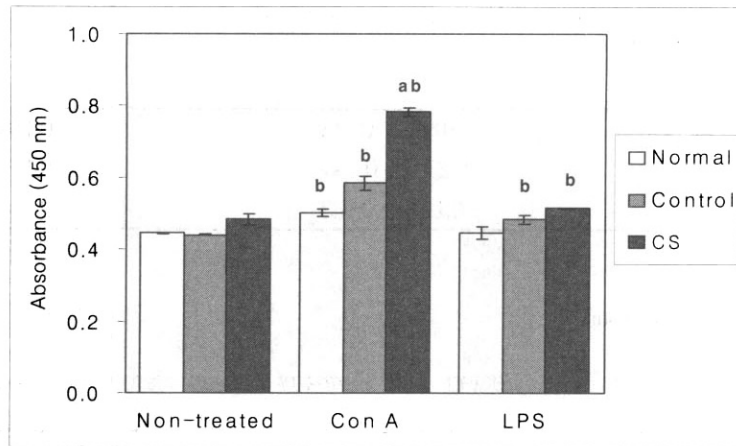


Fig. 6. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on the proliferation of mice splenocytes in response to various mitogenic stimuli mean  $\pm$  SD(standard deviation).

a :  $p < 0.05$  compared with control group.

b :  $p < 0.05$  compared with non-treated group.

Table 4. Immune cells population in mice treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture

	CD3	CD19	CD4	CD8	Mac-1	NK1.1
Control	48.69	43.46	40.02	13.53	3.16	4.21
CS	56.33	35.08	45.71	17.89	3.34	5.11

Values are % of gated.

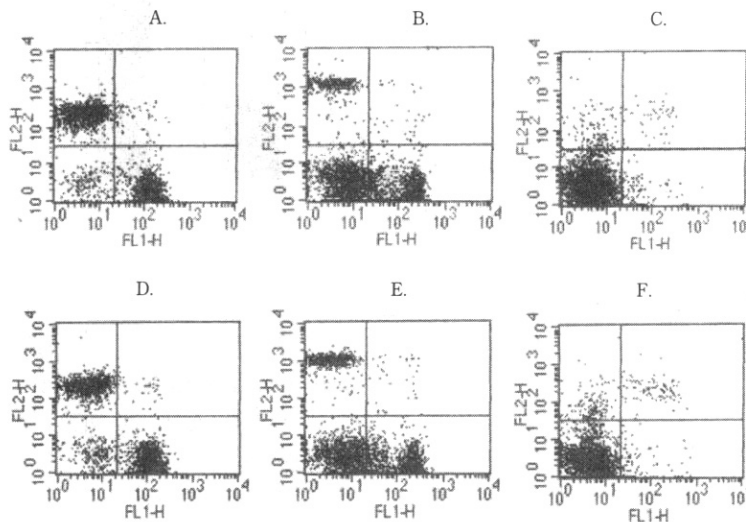


Fig. 7. Immune cells population in mice treated with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture

A, B and C : Control group.

D, E and F : *Carthami Semen* Herbal Acupuncture-treated group.

A and D : CD3 & CD19 staining.

B and E : CD4 & CD8 staining.

C and F : Mac-1 & NK1.1 staining.



3) 비장세포로부터의 cytokine 생산능 조사

(1) IFN- $\gamma$  생산능

specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 Con A로 처리된 상황에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의성 있게 증가하였다(Table 5, Fig. 8).

(2) IL-4 생산능

specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 Con A로 처리된 상황에서 실험군은 대조군에 비하여 IL-4의 생산이 유의성 있게 감소하였다(Table 6, Fig. 9).

Table 5. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IFN- $\gamma$  from splenocytes

	Non-treated	Con A-treated
Normal	393.99 $\pm$ 27.14	735.60 $\pm$ 93.08
Control	484.88 $\pm$ 38.00	843.73 $\pm$ 6.65
CS	514.65 $\pm$ 59.83	970.65 $\pm$ 39.89*

unit : pg/ml.

mean  $\pm$  SD.

\* p<0.05 compared with control group.

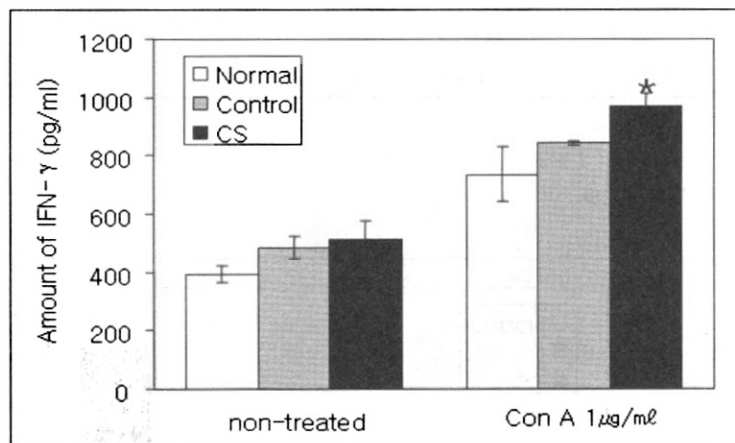


Fig. 8. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IFN- $\gamma$  from splenocytes

\* p<0.05 compared with control group.

Table 6. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IL-4 from splenocytes

	Non-treated	Con A-treated
Normal	1235.03 $\pm$ 18.71	1715.19 $\pm$ 88.41
Control	1833.67 $\pm$ 275.58	2740.97 $\pm$ 39.68
CS	1415.87 $\pm$ 283.30	2376.18 $\pm$ 64.80*

unit : pg/ml.

mean  $\pm$  SD.

\* p<0.05 compared with control group.

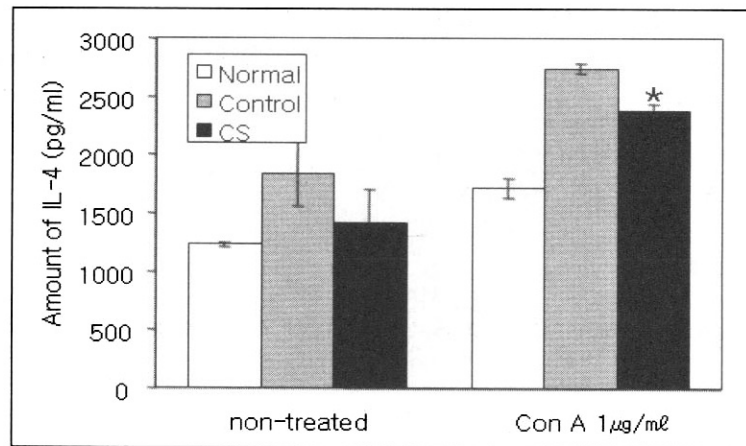


Fig. 9. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IL-4 from splenocytes  
\* p<0.05 compared with control group.

Table 7. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IFN-γ from Peritoneal exudate macrophages

	Non-treated	LPS-treated
Normal	580.70 ± 40.68	542.35 ± 54.24
Control	603.07 ± 5.54	580.70 ± 67.80
CS	580.70 ± 16.61	993.01 ± 67.80*

unit : pg/ml.

mean ± SD.

\* p<0.05 compared with control group.

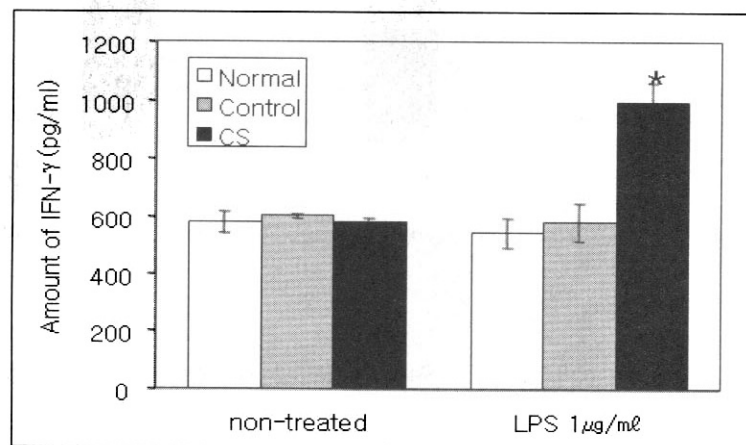


Fig. 10. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IFN-γ from Peritoneal exudate macrophages

\* p<0.05 compared with control group.

#### 4) 복강대식세포로부터의 cytokine 생산능 조사

##### (1) IFN-γ 생산능

specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 LPS로 처리된 상황에서 실험군

은 대조군에 비하여 IFN-γ의 생산이 유의성 있게 증가하였다(Table 7, Fig. 10).

##### (2) IL-12 생산능

Table 8. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IL-12 from Peritoneal exudate macrophages

	Non-treated	LPS-treated
Normal	556.72 ± 59.53	1210.09 ± 109.61
Control	626.87 ± 125.84	1147.73 ± 141.65
CS	536.51 ± 39.68	1503.17 ± 47.08*

unit : pg/ml.

mean ± SD.

\* p<0.05 compared with control group.

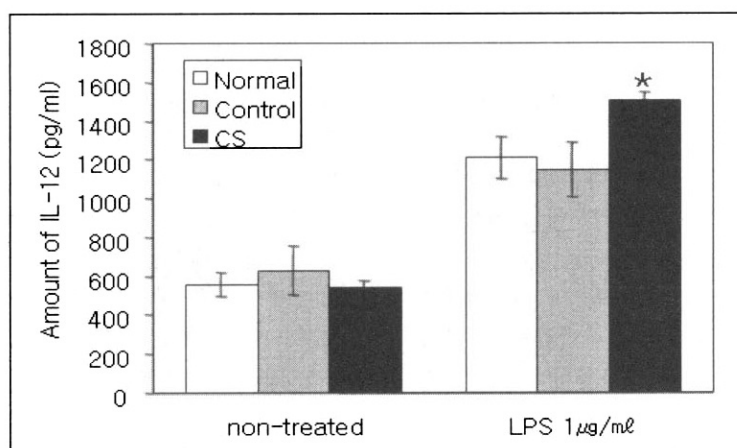


Fig. 11. Effect of treatment with *Carthami Semen* Herbal Acupuncture on production of IL-12 from Peritoneal exudate macrophages

\* p<0.05 compared with control group.

specific ELISA kits(BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하여 측정된 결과 LPS로 처리된 상황에서 실험군은 대조군에 비하여 IL-12의 생산이 유의성 있게 증가하였다(Table 8, Fig. 11).

#### IV. 考 察

癌(cancer)이라 지칭되는 악성 종양은 불규칙하고 빠른 성장을 하며, 침입성 성장을 하여 주위 정상조직을 파괴하고, 체내의 여러 부위로 확산 전이되어 사망에 이르게 하는 치명적인 질병이다<sup>16)</sup>. 암은 진행과정 중에 주위로 무단히 침윤하고 확대되어 주위 조직을 직접 침범하는 외에, 각종 경로를 통하여 하나의 암세포나 작은 그룹의 세포가 일차 종양피로부터 분리되어 원격부위의 조직이나 장기에 착상하여 성장하는데, 이것은 암세포의 특징 가운데 하나로서

이러한 현상을 轉移라고 한다. 실제로 암환자 사망의 주요 원인은 전이이다<sup>17)</sup>. 양성 종양은 비교적 서서히 성장하며 주변 조직으로 확산되지 않기 때문에 수술에 의해 치유될 수 있는 반면 악성 종양은 빠른 성장을 주된 특징으로 하며, 국소적으로 발생한 상태 그대로 있지 않고 주위의 조직이나 체내 순환기관으로 침투하여 본래 발생 부위로부터 먼 부위까지 확산된다<sup>18)</sup>. 肝은 전이성 암이 가장 많이 침범되는 인체내 기관중의 하나로 전이암 성장에 있어서 좋은 환경을 가지고 있고, 인체 내에서 가장 큰 실질성장으로 분당 혈류량이 많아 문맥 및 체순환으로 혈류를 공급 받는다. 위암 등 대부분의 소화기계 암에서 암세포가 원발병소에서 떨어져 문맥계를 통해 간으로 운반되어 간에서 증식하게 되는데, 소화기계의 혈류가 문맥순환을 통해 간으로 들어가므로 간전이의 빈도가 높게 관찰되고 있다<sup>19)</sup>.

대장암의 發病은 유전적 요인보다 식이, 환경적 요인이 크게 작용하는 것으로 알려지고 있는데, 식

이 습관의 차이에 따라 발병률이 다르며 육체적 활동량이 많은 직업에서 대장암 발병률이 낮아진다는 보고도 있다<sup>20,21)</sup>. 대장암의 간전은 대부분 血行性 경로를 통해 이루어지는데, 특히 간문맥을 통한 전이를 하게 된다. 대장암 수술 환자의 15-20 %에서 간전이 발견되고, 수술 당시 간전이가 없었던 환자의 29 %에서 2년 이내에 간전이가 발생하여 간전이의 빈도는 50 %에 이르는 것으로 알려져 있으며, 또한 대장암 수술 후 사망하는 환자의 반 수 이상이 간전이에 의한 2차적 간부전에 의한 것으로 보고되고 있어 수술 전후 간전이의 발견은 임상적으로 매우 중요한 사안이다<sup>22)</sup>. 대장 및 직장암의 간전이에 대해 근치적 절제술을 시행하지 않은 경우 6-12개월의 생존율을 보이며 3년 생존율은 3-7 %, 5년 생존율은 1-2 %밖에 되지 않는다<sup>23)</sup>. 대장 및 직장암의 간전이 환자에서 간절제를 시행한 경우에도 대개 5년 생존율은 25-35 %로 보고하고 있는 실정이다<sup>24,25)</sup>. 본 연구에 사용된 실험적 간전이 모델은 대장암 세포주가 혈행성 전이를 통하여 간에 전이암을 형성하는 것으로서 임상적인 내용을 반영했다고 볼 수 있다.

藥鍼療法은 일종의 東西 종합형태인 新鍼法으로 질병에 따라 약물의 흡수가 빠르고, 경구투여가 불가능한 경우에 처치할 수 있으며, 환처에 처치할 수 있는 등의 장점이 있다<sup>2)</sup>. 取穴은 mouse에서 인체의 肝俞(Kansu, BL18)에 해당되는 부위를 선택하였다. 이 肝俞는 第9胸椎棘突下(筋縮) 兩傍 各 1.5寸에 위치하며 補營血, 消癥瘕, 除肝膽濕熱, 能寧神明目의穴性を 가지고 있고, 肝病, 急慢性肝炎, 黃疸, 頭痛, 眩暈, 口苦, 脇痛, 臍躁, 神經衰弱, 不眠, 眼病 등을 치료한다<sup>2)</sup>. 또한 腸機能障導로 인한 소화력 약화를 향상시킬 뿐만 아니라 위, 십이지장궤양에 효과적이며, 혈당을 조절하고, 면역기능과 호르몬 분비작용을 증가시킨다는 연구도 있다<sup>26)</sup>. 최근 한의학계에서는 중앙 연구에 대해 항암재료, 처방 및 약침이 암세포와 세포성 면역, 체액성 면역에 미치는 영향에 관한 연구가 주로 이루어지고 있다<sup>27)</sup>. 그 중에서도 여러 약침을 이용한 항암효과와 면역에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이 등<sup>28-36)</sup>이 각각의 약침을 사용하여 항암효과와 면역작용에 대한 보고를 하였다. 한편 홍화자약침에 관한 연구 중 安<sup>13)</sup>이 홍화자약침의 急性·亞急性 毒性實驗을 한 결과, mice와 rat을 이용한 독성 실험에서 임상관찰과 육안적 관찰에서는 독성 반응을 나타내지 않았으나 혈청검사상 Uric

acid의 감소와 GOT, GPT의 감소가 나타났으며, 실험결과를 종합해 보면 홍화자약침은 비교적 안전한 약침제재라고 하였다.

이제 본 연구의 결과를 아래에서 하나씩 살펴보기로 하겠다.

*in vitro* 암세포 증식 억제효과 실험에서 XTT법에 의해 ELISA-reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과 1/256~1/32의 희석 홍화자약침에서는 흡광도가 0.600~0.700 사이의 값으로 비슷하게 높게 나타났으며, 1/8에서는 현저히 감소했고, 홍화자약침 원액을 사용한 경우 흡광도가 거의 나타나지 않았다(Fig. 1). 이는 1/256~1/32의 희석 홍화자약침에서는 세포독성이 적다는 뜻으로 생체에 주는 자극은 적으면서 항암과 관련된 면역반응에 관여할 것으로 여겨진다.

홍화자약침의 암전이 억제효과를 알아보기 위해 colon26-L5 대장암세포를 간문맥을 통하여 주입하였고 간문맥으로 주사된 대장암세포는 간에 전이암을 형성하게 되는데, 이후 2주일간 mouse에서 인체의 肝俞(BL18)에 해당하는 부위에 실험군에는 홍화자약침을 매일 좌우 각 0.1 ml씩 시술하고 대조군에게는 PBS를 동일한 방법으로 시술하였다.

정상군과 대조군, 실험군의 체중을 살펴보니 정상군은 조금씩 몸무게가 증가하는 정상적인 상태를 보였고, 대조군과 실험군은 시술 후 몸무게가 조금 감소하였다가 점차 다시 증가하는 상태를 보였으나 군간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2). 이는 정상군에 비해 대조군과 실험군은 모두 실험을 시작할 때 간문맥에 colon26-L5 암세포주를 주사하기 위해 개복함으로써 인한 수술 후유증과 general condition 저하로 몸무게가 줄었지만 이후에 서서히 개복의 상처가 회복되었고, 대조군의 경우에는 전이암이 성장함에 따라 mouse의 몸무게도 함께 증가한 것으로 여겨진다.

간의 무게를 측정하여 비교한 결과 대조군은 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 하였고, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 하였다(Table 1, Fig. 3). 이는 대조군에서 전이암이 유발되었으며, 실험군에서는 전이암이 억제되고 있음을 의미하는 것이다.

정상군과 대조군, 실험군에서 적출한 간을 육안적으로도 확인한 결과 정상군에 비해 대조군은 4-5 배 정도 크며, 간의 암종양으로 보이는 종양성 모양이 많이 보이는데 반해, 홍화자약침을 시술한 실험군은

거의 정상군과 같이 매끄러운 모양으로 종양의 모습이 많이 보이지 않고, 크기 또한 정상군과 비슷함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이것 역시 실험군에서 전이암이 억제되고 있음을 나타내는 것이다. 면역항진과 관련하여 비장을, 신독성에 영향이 있을까 하는 의미로 신장을 각각 정상군, 대조군과 실험군에서 적출하여 그 무게를 측정된 결과, 정상군에 비해 대조군에서 비장의 무게가 유의성 있게 증가하였고 실험군에서는 대조군에 비해 비장의 무게가 감소함을 관찰할 수 있었으며, 신장의 무게는 세 그룹에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 2). 이는 전이암이 유발된 대조군에서 면역반응에 있어 중요한 장기인 비장에 과부하가 걸려 유의한 증가를 나타내었고, 이에 비해 암전이가 억제된 실험군에서는 감소를 나타낸 것으로 보인다. 한편 신독성에는 영향이 없는 것으로 여겨진다. 또한 항암 효과를 알아보기 위해 colon26-L5 대장암세포를 양측 둔부에 피내주사하여 암을 유발한 후 그 변화를 관찰하였는데, 시간이 경과할수록 실험군이 대조군에 비해 암종의 크기 증가를 유의성 있게 억제하였다(Table 3, Fig. 5). 이는 홍화자약침이 항암 효과에 유의할 만한 반응을 나타낸 것이라고 볼 수 있다.

다음으로 홍화자약침의 면역 활성화 효과를 알아보기 위해 mouse의 비장으로부터 분리한 면역세포의 활성화를 관찰하고, 그 분포를 조사하였으며 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰하였다. 보조 T세포(T helper cell)는 그들이 분비하는 cytokine의 종류에 따라 1형 보조 T세포(Th 1)과 2형 보조 T세포(Th 2)로 나누어진다. Th 1은 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12를 생산하고 탐식세포를 활성화시켜 세포성 면역반응을 항진시키고, Th 2는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13을 생산하여 체액성 면역반응을 항진시키며 항체 중에서 IgE를 생산케 하든지 비만세포를 활성화하여 과민반응을 야기한다고 보고되었다<sup>37-40</sup>.

IFN- $\gamma$ 는 대식세포의 탐식기능을 촉진하고, MHC (Major Histocompatibility Complex: 주요조직합복합체) Class I, Class II의 발현을 자극하며 항원제공세포와 협동할 뿐만 아니라 보조 T전구세포가 Th 1으로 분화하도록 작용한다. 강한 항종양작용이 있으며 암세포 사멸에 대해 가장 중요한 열쇠를 쥐는 cytokine의 하나로 판명되었다. IL-12는 주로 대식세포로부터 생성성되어 NK세포와 T세포로 하여금 IFN- $\gamma$ 를 분비하게 한다. 보조 T전구세포를 자극해서 Th 1로 분화를 촉진하여 IFN- $\gamma$ 와 함께 협조하

여 암을 사멸하는 중요한 cytokine이다. IL-4는 보조 T세포중 주로 Th 2가 생산하는데 Th 2는 B세포에 의한 항체생산에도 필요하다. 주요기능은 면역글로불린 IgE iso type으로 전환되는 것을 자극하는 것이다<sup>41-43</sup>.

XTT법으로 비장세포의 proliferation을 측정해 본 결과 non-treated group에 비해 Con A처리군 및 LPS처리군에서 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. 6). 이는 T림프구를 유도 자극하는 Con A의 처리로 인하여 non-treated group에 비해 대조군과 실험군에서 모두 면역세포인 T림프구가 증식되었고, 정상군에 비해 전이암을 유발한 대조군 및 실험군에서 암세포 항원에 의한 반응으로 T림프구가 더 증식되었다고 볼 수 있다. 또한, 홍화자약침을 시술함으로 인해 실험군은 대조군에 비해서 더 많은 면역세포를 생성하였는데, 항체매개성 면역세포인 B림프구보다 세포매개성 면역세포인 T림프구가 더 많이 증식하고 생성 증가한 것으로 여겨진다. 한편, 비장세포로부터의 면역세포 분포를 조사한 결과 Total T cell, helper T cell, cytotoxic T cell, Macrophage, NK cell의 분포는 실험군에서 대조군에 비해 증가하였으며, B cell의 경우 실험군은 대조군에 비해 분포가 감소하였다(Table 4, Fig. 7). 이는 홍화자약침의 시술이 B cell보다 T cell이나 macrophage와 같은 immune effector cell에 관련이 있다는 것이다.

이에 본 실험은 홍화자약침이 Th 1세포성 면역과 Th 2체액성 면역중 어디에 더 관계하고 있는가를 알아보기 위하여 Th 1면역반응에 관여하고 있는 cytokine중 IFN- $\gamma$ 와 Th 2면역반응에 관여하고 있는 cytokine중 IL-4를 선택하여 그 생산능을 조사하였다.

Splenocytes에 의해 분비되는 IFN- $\gamma$ (Th 1 type cytokine)와 IL-4(Th 2 type cytokine)의 양을 측정된 결과, Con A로 처리된 상황에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의성 있게 증가하였고(Table 5, Fig. 8), IL-4의 생산은 유의성 있게 감소하였다(Table 6, Fig. 9). 이는 홍화자약침이 Th 2체액성 면역과는 크게 관계가 없고, Th 1세포성 면역과 관계가 있음을 나타낸다. 복강대식세포로부터 분비되는 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 양을 측정하

결과, LPS로 처리된 상황에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의성 있게 증가하였고 (Table 7, Fig. 10), IL-12의 생산도 유의성 있게 증가하였다 (Table 8, Fig. 11). 이는 홍화자약침이 대식세포를 활성화하여 분비되는 cytokine의 양을 증가시키는데, 증가된 IFN- $\gamma$ 와 IL-12 등이 Th 1으로 분화를 촉진하고 이것이 다시 대식세포를 활성화시켜 항암 작용이 증가함을 의미한다.

결론적으로, 본 연구에서 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델을 통해 암이 전이된 간 무게의 관찰과 육안적 소견으로 홍화자약침이 암의 전이를 억제하고 암의 성장을 둔화시킨 것을 확인하였고, 항암 효과를 알아보기 위해 colon26-L5 대장암세포를 양측 둔부에 피내주사하여 암을 유발한 후 암종의 크기변화를 측정된 결과, 암종의 크기 증가를 유의성 있게 억제하는 것을 볼 수 있었다. 비장의 면역세포를 증식하여 홍화자약침이 세포매개 면역에 관계된 T림프구를 생성 증가시키는 것을 알았으며, 면역세포로부터 분비되는 cytokine을 관찰하여 홍화자약침이 Th 1세포성 면역에 관계되어 면역세포들을 자극 유도하는 것을 확인하였다. 또한 복강대식세포에서 분비되는 cytokine의 양도 증가시켜 면역활성화에 효과가 있는 것을 관찰하였다.

이는 홍화자약침이 세포매개 면역반응에 관계하여 세포성 면역을 활성화시켜 암의 전이를 억제하거나 암의 성장을 감소시키는 항암 작용이 있음을 시사하며, 앞으로 홍화자약침에 관하여 더욱 활발한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

본 연구는 colon26-L5 암세포주를 mouse의 간문맥에 주입하여 간전이암을 유발한 후 인체의 肝俞 (BL18)에 해당하는 부위에 시술한 홍화자약침의 암전이 억제와 면역 활성화 효과를 실험적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍화자약침을 시술한 실험군은 대조군에 비하여 *in vitro*와 *in vivo*의 암전이 억제 실험에서 암의 전이 및 증식이 유의성 있게 감소되었다.
2. 홍화자약침을 시술한 실험군의 비장에서 면역세

포의 활성화를 관찰한 결과, 세포성 면역에 관계된 T림프구가 유의성 있게 증가되었다.

3. 홍화자약침은 비장세포로부터 total T cell, helper T cell, cytotoxic T cell, Macrophage, NK cell의 분포를 증가시켰다.
4. 비장세포에서 분비된 cytokine의 양을 관찰한 결과, Th 1을 자극 유도하는 IFN- $\gamma$ 가 유의성 있게 증가되었다.
5. 복강대식세포에서 분비된 cytokine의 양을 관찰한 결과, 항암 작용이 있는 IFN- $\gamma$ 와 IL-12가 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과에서 홍화자약침이 세포매개 면역반응에 관계하여 세포성 면역을 활성화시켜 암의 전이를 억제하거나 암의 성장을 감소시키는 항암효과가 있다는 것을 실험적으로 확인하였다.

## VI. 參考文獻

1. 조종관. 韓方臨床腫瘍學. 民衆出版社. 2001 : 651-666.
2. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室 編著. 鍼灸學 (上·下). 集文堂. 1993 : 484-485, 1457-1467.
3. 박상용. 薏苡仁水鍼이 腫瘍에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 碩士學位論文. 1994.
4. 김중완, 임종국. 金銀花藥鍼의 抗腫瘍 作用 및 生體臟器에 대한 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(1) : 255-267.
5. 김태윤. 人蔘水鍼 前處置가 發癌豫防에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 碩士學位論文. 1998.
6. 최종호. 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍 및 免疫에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 博士學位論文. 1996.
7. 中藥大辭典 編纂委員會. 完譯 中藥大辭典. 鼎談. 1997 : 4826-4829.
8. 김선혁, 이준무. 紅花油藥鍼이 Microcrystalline Sodium Urate로 유발된 尿酸의 痛風에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1998 ; 15(1) : 483-491.
9. 육태한, 이창현, 이학인. 紅花子·鹿茸·紫河車藥鍼이 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(1) : 61-75.

10. 황우량. 紅花子藥鍼液 및 Estrogen이 實驗的 骨多孔症에 미치는 影響. 又石大學校大學院. 碩士學位論文. 1998.
11. 김동환, 이경섭, 송병기. 桃仁 및 紅花 藥鍼의 鎮痛·抗血栓 效能에 關한 研究. 大韓韓方腫瘍學會誌. 2000 ; 13(2) : 60-73.
12. 임사비나, 강동철. 紅花子藥鍼의 피부자극시험 및 안점막자극시험. 大韓藥鍼學會誌. 2000 ; 3(1) : 53-63.
13. 안창식. 紅花子藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 關한 實驗的 研究. 尙志大學校大學院. 碩士學位論文. 2002.
14. 大韓藥鍼學會. 藥鍼療法 施術 指針書. 大韓藥鍼學會. 1999 : 112-118, 138-203.
15. 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.
16. 大韓醫學協會 分科學會協議會 編著. 癌의 診斷과 治療. 역문각. 1992 : 4-7.
17. Sugarbaker EV, Weingard DN, Roseman JM. *Cancer Invasion and Metastases(L.A.Liotta and I.R. Hart ed.). Boston. Nijhoff. 1982 : 427-465.*
18. 서울大學校 醫科大學. 腫瘍學. 서울大學校出版部. 1988 : 1-22.
19. Noguchi Y. Blood vessel Invasion in gastric carcinoma Surgery. 1990 : 107 : 140.
20. 이정호, 나양원, 서병조 외. 대장암의 시대적 변화. 대한소화기학회지. 1999 : 33 : 51-57.
21. 김미숙. 대장암 환자의 생활양상에 관한 연구. 東義大學校大學院. 碩士學位論文. 2002.
22. 한준구, 김세형. 大腸癌의 肝轉移. 大韓肝學會誌. 2002 : 8(2) : 220-230.
23. Blumgart LH, Fong Y. Surgical options in the treatment of hepatic metastasis from colorectal cancer. *Curr Probl Surg.* 1995 : 32 : 333-421.
24. Nordlinger B., Guiguet M., Vaillant JC., Balladur P., Boudjema K., Bachellier P., *et. al.* Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver, A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Cancer.* 1996 : 77 : 1254-1262.
25. Scheele J., Stangl R., Altendorf-Hofmann A., Gall FP. Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries *Surgery.* 1991 : 110 : 13-29.
26. 박희수. 腧穴研究鍼灸學. 醫聖堂. 1996 : 126.
27. 김현아, 임성우, 이원철. 韓藥을 이용한 抗癌實驗 研究의 傾向에 關한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1998 : 4(1) : 211-232.
28. 임사비나, 안병철, 이혜정. 魚腥草水鍼의 抗腫瘍 效果에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1989 ; 12 : 467-483.
29. 임사비나, 한상원, 변부형. 人蔘藥鍼과 Lidocaine 을 첨가한 人蔘藥鍼이 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 영향. 東西醫學. 1995 : 20(3) : 21-39.
30. 권기록, 고희균, 김용석, 박영배, 김창환, 강성길. 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1997 : 14(2) : 151-172.
31. 이준무, 하지용. 다양한 발암병태모형에 따른 蟻蟻藥鍼의 항암 및 면역증강에 關한 研究. 보건복지부. 1999.
32. 박경미, 조경희, 손윤희, 임종국, 남경수. 甘草藥鍼液의 抗癌 및 免疫活性에 미치는 영향. 生藥學會誌. 2000 : 31(1) : 7-15.
33. 김소형. 全蝎藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果. 大韓鍼灸學會誌. 2000 : 17(3) : 151-167.
34. 김영기, 조경희, 손윤희, 최혜경, 김소연, 임종국 외. 當歸藥鍼液의 癌豫防 效果. 藥學會誌. 2000 : 44(3) : 283-293.
35. 이은용. 肉蓯蓉藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. 大田大學校大學院. 博士學位論文. 2000.
36. 이재복, 이병렬. 菟絲子藥鍼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. 2001 : 18(3) : 94-104.
37. 全南大學校 醫科大學 編. 면역 및 알레르기학. 全南大學校 出版部. 1999 : 8-11, 19-30.
38. 서울大學校 醫科大學 編. 免疫學. 서울大學校 出版部. 1994 : 2-3, 72-75, 136-137.
39. 하대유. 그림으로 본 免疫學. 高文社. 1994 : 282-283, 294-296.
40. Lopez AF., Sanderson CJ., Gamble JR., Campbell HR., Young IG., Vadas MA. Recombinant human Interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 1988 : 167, 219-224.

41. 김세중. 면역학 길라잡이. 고려의학. 2000 : 65-68.
42. 우노 가즈아키(김태식 譯). 암치료와 면역요법. 열음사. 2002 : 153-154.
43. 강태숙, 김선희, 김양호, 김영권, 김유현, 김윤희 外. 임상면역학. 청구문화사. 2005 : 222-229.