

원저

## 瓦松 藥鍼이 mouse의 간전이 암모델에 미치는 영향

손승현 · 박희수

상지대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### Effects of *Orostachys Japhonicus* Herbal-Acupuncture on Transferred Hepatic Cancer of Mouse Induced by Colon26-L5 Human Colon Cancer Cells

Sohn Seong-hyoun and Park Hee-soo

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, SangJi University

To study the effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement effects of herbal-acupuncture with *Orostachys Japhonicus A.Berger*, infusion solution put into Kansu(BL18) of mouse induced by Colon26-L5 human colon cancer cells, which are corresponding to humanbody.

We observed the change of body weight, surviving number, median surviving time, increase of life span, changes in amount of leukocyte, erythrocyte, platelet, total protein, creatinine, glucose and LDH, weight of spleen and kidney, histological analysis on tissue metastasis of liver, splenic cell proliferation, the expression of cytokine gene, the number of CD4+, CD8+, CD9+ and NK cell, and concluded like this.

The results were obtained as follows ;

1. In acute and sub-acute cytotoxicity experiment, significantly signs were not appeared in all groups.
2. Antimetastatic experiment in vitro and in vivo showed that *Orostachys Japhonicus A.Berger* Herbal-acupuncture at Kansu(BL18) has antimetastatic effects.
3. The spleen cells proliferation of the experimental groups treated with *Orostachys Japhonicus A.Berger* infusion solution extract has increased significantly compared with that of the control group.
4. As compared with control, the population of total T cell, helper T cell, cytotoxic T cell and macrophage were increased.

5. The production of Th 1 type cytokines from splenocyte and cytokines which is associated with anti-tumor activity form macrophage were increased significantly.

Above the results revealed that herbal-accupunture with *Orostachys Japhonicus* A.Berger infusion solution has effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement.

*Key words* : *Orostachys Japhonicus* A.Berger, metastasis, immunomodulating

## I. 緒 論

암은 대체로 국소질환으로 시작하여 전신으로 전이되기 때문에 조기 발견에 의한 조기 치료만이 좋은 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 암의 전이는 암환자를 사망에 이르게 하는 주요 원인으로<sup>3)</sup> 특히 대장암은 간으로의 전이가 가장 흔하게 일어나며 결과 또한 매우 치명적이다<sup>4-6)</sup>.

한의학에서는 腫瘍, 癰疽, 腫毒, 積聚, 癥瘕, 巖, 陰瘡, 癭瘤, 肺癰, 肝癰, 腸癰, 疔瘡, 疔疽 등이 腫瘍의 範疇에 해당하고, 원인은 六淫外邪의 外因과 七情內傷의 內因, 飲食失調와 過勞, 房勞過度의 不內外因 등으로 區分<sup>7)</sup>되며, 치법으로 益氣健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎하는 扶正法과 行氣理氣, 軟堅散結, 活血化瘀, 通絡解毒, 疏氣濕熱등의 祛邪法 및 두 가지 방법을 併用하는 扶正祛邪法이 있다<sup>8)</sup>.

약침요법은 경락요법과 약물요법의 원리를 바탕으로 연구된 자침요법으로, 경혈 또는 질병과 유관한 부위나 혈맥<sup>9)</sup>에 精製된 한약을 주입하여 刺針과 藥物의 효과를 병행하여 질병을 예방하고 치료하는 방법으로<sup>10)</sup> 면역계질환의 예방 및 치료에 유의하다는 보고가 있으며<sup>11)</sup> 임상에서 널리 사용되고 있다.

최근 종양연구 동향은 김 등<sup>12)</sup>의 항암재료, 처방 및 약침이 암세포와 세포성면역, 체액성 면역에 미치는 영향에 관한 연구와, 세포독성과 면역반응에 대한 연구가 진행되었다고 하였으며, 이 등<sup>13-20)</sup>은 와송, 고삼, 구기자, 지골피, 저령, 금은화, 감초, 인삼 등을 약침으로 만들어 항암 및 면역기능에 증가 효과가 있다고 보고하였고, 권 등<sup>21-22)</sup>은 산삼약침을 이용하여 독성, 안전성 실험과 항암효과와 관련된 동물실험, 그리고 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구를 보고하였다. 그러나 전이암에 대한 와송

약침의 연구는 시도된 바 없었다.

이에 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델에 清熱解毒, 消腫, 癰毒 등의 작용이 있는 와송(*Orostachys Japhonicus* A.Berger)을 증류약침으로 만들어 mouse의 肝俞(BL18)에 해당하는 부위에 약침을 시술하여 간의 무게 및 조직학적 소견, spleen으로부터 분리한 면역세포의 활성화 정도 및 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗動物 및 材料

#### 1) 동물

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

#### 2) 취혈

실험에 사용한 자침부위로는 실험동물에 있어서 인체의 肝俞(BL18)穴에 상응하는 부위를 선택하였고, 체표의 털을 제거한 후 骨度分寸法에 의거하여 취혈하였다.

#### 3) 약침

##### (1) 약침의 제조

상지대학교 부속 한방병원에서 구입한 300g의 瓦松을 흐르는 물에 깨끗이 세척하여 증류수와 배합하

여 2시간 전탕하고 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 1000 ml의 약침을 얻었다. 얻어진 약침을 0.45 $\mu$ m, 0.2 $\mu$ m여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다.

## (2) 약침 주입기

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

## 2. 實驗方法

### 1) 약침의 시술

#### (1) 급성 독성실험

실험군을 각각 약침액 0.1ml, 0.2ml 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 肝俞(BL18) 부위에 1회 주입한 후 1주일간 사망유무 및 독성반응 유무를 관찰하였으며 대조군은 PBS(Phosphate Buffered Saline) 0.2ml을 동일한 방법으로 주입하였다.

#### (2) 아급성 독성실험

실험군을 각각 약침액 0.05ml, 0.1ml 주입군으로 나누어 mouse의 肝俞(BL18) 부위에 1주일에 2회씩 총 8회 주입하였고 대조군은 PBS 0.1ml을 동일한 방법으로 주입하였다.

#### (3) 암전이 억제실험

실험군은 mouse의 肝俞(BL18) 부위에 약침액을 2주일 동안 매일 좌우 각 0.1ml씩 주입하였고 대조군은 PBS를 동일한 방법으로 주입하였다.

#### (4) 면역증진효과 실험

실험군은 mouse의 肝俞(BL18) 부위에 약침액을 2주일 동안 매일 좌우 각 0.1ml씩 주입하였고 대조군은 PBS를 동일한 방법으로 주입하였다.

### 2) 세포의 배양

#### (1) 배지의 구성

RPMI-1640(Gibco, U.S.A.)에 sodium bicarbonate (Amresco, U.S.A.) 2g과 HEPES(Amresco, U.S.A.)

3.77g, penicillin-streptomycin(penicillin 10,000unit/ml, streptomycin 10,000 $\mu$ g/ml, Gibco, U.S.A.) 10ml를 증류수에 넣고 1l로 조정한 후 pH를 7.2로 맞추고 0.22 $\mu$ 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.) 농도가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

#### (2) 암세포의 배양

BALB/c계 mouse에 간전이암을 유발시키기 위한 암세포주는 colon 26-L5로 일본 토야마의약대학 화학약연구소에서 분양받아, 5% CO<sub>2</sub>와 95% air의 배양기에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하며 배양하였다.

#### (3) 암전이 유발

실험적 간전이 모델은 Ohnishi 등<sup>35)</sup>의 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) 비장세포의 준비

BALB/c계 mouse에 약침을 2주일간 시행하고 마지막 시술 다음 날 mouse를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하여 PBS로 세척하고 RPMI배지가 들어있는 Petri dish(35 $\times$ 100mm)에서 작은 해부가위로 절단한 다음 cell strainer(40 $\mu$ m, Becton Dickinson, U.S.A.)로 여과하여 조직편 및 분리되지 않은 세포덩어리를 제거한 후 1500rpm에서 3분간 3회 원심분리하여 세척하고 complete RPMI배지에 부유시켰다.

#### (5) 복강세포의 준비

Balb/c계 mouse에 약침을 2주일간 주입한 후 마지막 시술 다음 날 mouse를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 21 gauge 10ml syringe를 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. 測定項目

#### 1) 급성독성

##### (1) LD50 측정

약침을 0.1ml, 0.2ml로 주입한 실험군, PBS를 0.2cc로 주입한 대조군 및 아무런 처치도 하지 않은 정상군을 일주일동안 1, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144시간 별로 관찰하면서 사망한 개체수를 측정하였다.

##### (2) 임상관찰 및 체중측정

약침을 0.1ml, 0.2ml로 주입한 실험군, PBS를 0.2ml로 주입한 대조군 및 아무런 처치도 하지 않은 정상군을 일주일동안 관찰하면서, 약침 주입 후부터 실험종료일까지 1일 1회 호흡(Tachypnea), 운동성(Motor activities), 경련(Opisthotonus), 반사(Reflex), 안구증상(Ocular signs), 심혈관계 증상(Cardiovascular signs), 입모(Piloerection), 통각(Analgesia), 근긴장(Muscle-tone), 위장관계 증상(Gastrointestinal signs), 피부(Skin) 및 기타 독성반응(Others) 등의 상태를 관찰하였다.

체중은 실험기간 동안 실험시작일, 2일, 5일, 7일 차에 총 4회 측정하였다.

##### (3) 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1ml는 EDTA tube(BD vacutainer)에 넣어 CBC(Complete blood count)검사에 사용하였고, 나머지는 SST 진공 tube(BD vacutainere)에 넣어 원심분리기를 이용하여 3,000rpm으로 20분간 원심분리한 뒤 혈청을 분리하여 생화학적 검사에 사용하였다.

##### (4) CBC(Complete blood count) 측정

분리된 혈청을 EDTA bottle에 보존한 혈액을 이용하여 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)를 이용하여 WBC(White Blood cell Count), RBC(Red Blood cell Count), Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), Platelet를 측정하였다.

##### (5) 생화학적 혈청검사

vacutainer tube에 넣은 후 분리한 혈청을 이용하

여 Biochemical Analyser(TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 total protein, albumin, BUN(Blood Urea Nitrogen), creatinine, B/C ratio, uric acid, glucose, globulin, A/G ratio, AST, ALT, ALP, triglyceride를 측정하였다.

#### 2) 아급성 독성

##### (1) 임상관찰 및 체중측정

약침을 0.05ml, 0.1ml로 주입한 실험군, PBS를 0.1ml로 주입한 대조군 및 아무런 처치도 하지 않은 정상군으로 나누어, 약침 주입 후부터 실험종료일까지 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심혈관계 증상, 입모, 통각, 근긴장, 위장관계 증상, 피부 및 기타 독성반응 등의 상태를 관찰하였다.

##### (2) 관련 장기의 무게 측정

실험 종료일에 체중을 측정하고 채혈을 한 뒤, 간장, 비장, 신장을 적출하여 저울을 이용하여 무게를 측정하였다.

##### (3) 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1ml는 EDTA tube에 넣어 CBC 검사에 사용하였고, 나머지는 SST 진공tube에 넣어 원심분리기를 이용하여 3,000rpm으로 20분간 원심분리한 뒤 혈청을 분리하여 생화학적 검사에 사용하였다.

##### (4) CBC 측정

EDTA bottle에 보존한 혈액을 이용하여 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)를 이용하여 WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet를 측정하였다.

##### (5) 생화학적 혈청검사

vacutainer tube에 넣은 후 분리한 혈청을 이용하여 Biochemical Analyser(TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 Total protein, albumin, BUN, Creatinine, B/C ratio, uric acid, glucose, globulin, A/G ratio, AST, ALT, ALP, triglyceride를 측정하였다.

### 3) 항암효과

## (1) in vitro 암세포 증식 억제 작용

지수증식기에 이른 colon26-L5 carcinoma cell을 수거하여 PBS로 2회 세척한 후  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 만든 후 96-well microplate에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 24시간 동안 preincubation하고, 24시간 후 배지를 제거하고 약침을 희석하여 첨가한 후 다시 48시간 동안 배양한 뒤 XTT법에 의해 ELISA-reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (2) in vivo 암전이 억제작용

## ① 체중측정

실험기간 동안 1주 2회씩 체중을 측정하였다.

## ② 간의 무게 측정

실험기간 종료 후 mouse로부터 간을 적출한 뒤 무게를 측정하여 실험군과 대조군 및 정상군의 간무게의 차이를 비교하였다.

## ③ 관련 장기의 무게 측정

mouse로부터 간을 적출한 후 비장과 신장을 적출하고 그 무게를 측정하여 실험군, 대조군과 정상군의 장기의 무게차이를 비교하였다.

## ④ 간의 육안적 관찰

적출한 간을 육안적으로 관찰한 뒤 사진을 찍어 비교하였다.

## 4) 면역증진 효과

## (1) 비장세포의 증식작용

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

## (2) 비장세포로부터 면역세포 분포조사

## ① 면역형광염색 (immunofluorescence staining)

비장세포 현탁액을  $1 \times 10^6$ /ml 씩 counting 하여 5 ml tube에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한후 CD3, CD4, Mac-1 FITC-conjugated antibody를  $50 \mu\text{l}$ 씩 가한 후 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 double staining으로 CD19,

CD8, NK1.1 PE-conjugated antibody를  $50 \mu\text{l}$  씩 가한 후 실온에서 15분 반응시켰으며 이상의 면역형광염색(immunofluorescence staining) 과정을 빙욕(ice bath) 상에서 시행하였다.

## ② 세포의 유식 분리 분석

염색이 완료된 세포들을 0.5ml의 완충액에 부유시켜 Flow cytometry analysis(FACS) vantage(Becton Dickinson Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며 Cell Quest 프로그램을 이용, 분석하도록 하였다. data의 분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte의 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 B cell(CD19), T cell(CD3), Helper T cell(CD4), cytotoxic T cell(CD8), Macrophage(Mac-1), Natural Killer cell(NK1.1)의 비율(gated %)을 산출하였다.

## (3) 비장세포로부터의 cytokine 산생능

Splenocytes에 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  $1 \times 10^6$ /well로 24-well culture plate에 가하고  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Con A와 함께 24시간 배양한 후 cell-free상등액을 준비하여 실험에 사용하였으며, cell-free상등액은 실험에 사용할 때까지  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

## (4) 복강대식세포로부터의 cytokine 산생능

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

## 4. 統計處理

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 미만

인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

### Ⅲ. 實驗 結果

#### 1. 急性 毒性

##### 1) LD50

정상군, 실험군, 대조군 모두 사망한 개체가 나오지 않아 LD<sub>50</sub>을 구할 수 없었다.

##### 2) 임상적 변화관찰

약침을 0.1ml, 0.2ml로 주입한 실험군, PBS를 0.2ml로 주입한 대조군 및 아무런 처치도 하지 않은 정상군을 일주일 동안 관찰하면서, 약침 주입 후부터 실험종료일까지 1일 1회 상태를 관찰하였으나 모든 군에서 전혀 독성반응을 나타내지 않았다.

#### 3) 체중변화

약침 주입 후부터 실험종료일까지 총 4회 측정하였다. 실험개시 후 2일째까지 실험군이 정상군, 대조군에 비해 각각 2.6g, 3.0g씩 유의성 없게 감소하였다가 다시 점차 증가하여 실험 7일에는 정상군, 대조군과의 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

#### 4) CBC

채혈을 통해 얻어진 혈청의 측정결과, 모든 실험군, 대조군에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Table 1).

#### 5) 생화학적 혈청검사

혈청 검사 결과 0.2ml 실험군에서 BUN이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, ALT는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였고, AST는 정상군과 대조군 모두에 비해 유의성 있게 증가하는 변화가 있었다( $p < 0.05$ )(Table 2).

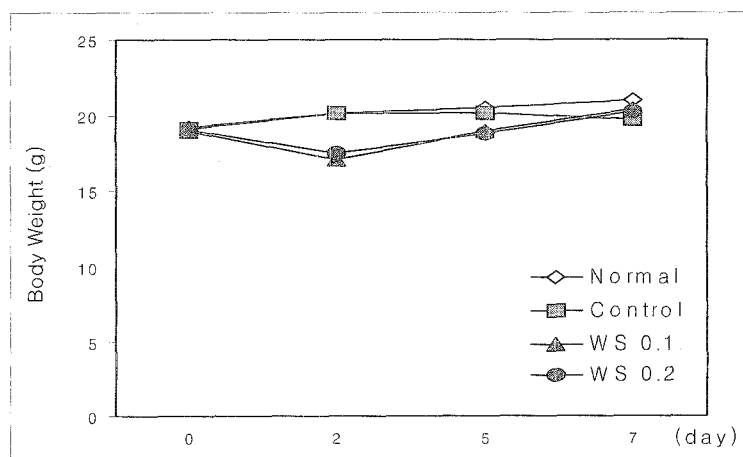


Fig. 1. Body weight change of mice treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in acute toxicity test

Normal : Non-treated group.

Control : Administration of injection with 0.2ml PBS at Kansu(BL18).

WS 0.1ml : Administration of injection with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* Herbal-acupuncture at Kansu(BL18).

WS 0.2ml : Administration of injection with 0.2ml *Orostachys Japhonicus* Herbal-acupuncture at Kansu(BL18).

Table 1. Complete blood count values in mice treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in acute toxicity test

	Normal	Control	WS 0.1	WS 0.2
WBC( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1.05 $\pm$ 0.15	0.95 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.11
RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	10.25 $\pm$ 1.14	9.52 $\pm$ 0.21	10.10 $\pm$ 1.58	10.01 $\pm$ 0.25
Hb(g/dL)	16.80 $\pm$ 0.05	16.27 $\pm$ 0.26	16.67 $\pm$ 2.76	16.80 $\pm$ 0.32
HCT(%)	53.05 $\pm$ 0.15	51.80 $\pm$ 0.75	53.18 $\pm$ 0.85	53.88 $\pm$ 1.28
MCV(fL)	53.90 $\pm$ 2.98	54.43 $\pm$ 0.74	53.18 $\pm$ 0.74	53.88 $\pm$ 0.49
MCH(pg)	17.05 $\pm$ 1.95	17.10 $\pm$ 0.36	16.50 $\pm$ 0.74	16.80 $\pm$ 0.49
MCHC(%)	30.25 $\pm$ 1.45	31.43 $\pm$ 0.26	30.30 $\pm$ 0.64	31.20 $\pm$ 0.33
Platelet( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1051.00 $\pm$ 25.35	1040.50 $\pm$ 72.33	1102.00 $\pm$ 54.97	1014.67 $\pm$ 15.30

All data are represented as the mean  $\pm$  SE(Standard Error).

Table 2. Serum biochemical values of treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in acute toxicity test

	Normal	Control	WS 0.1	WS 0.2
T. protein(g/dL)	4.95 $\pm$ 0.15	5.05 $\pm$ 0.09	5.18 $\pm$ 0.13	5.13 $\pm$ 0.05
Albumin(g/dL)	3.10 $\pm$ 0.10	3.25 $\pm$ 0.03	3.38 $\pm$ 0.10	3.20 $\pm$ 0.05
Globulin(g/dL)	1.75 $\pm$ 0.05	1.80 $\pm$ 0.07	1.80 $\pm$ 0.04	1.83 $\pm$ 0.03
A/G ratio(ratio)	1.77 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.07	1.87 $\pm$ 0.05	1.74 $\pm$ 0.04
BUN(mg/dL)	30.35 $\pm$ 5.55	39.55 $\pm$ 2.20	35.65 $\pm$ 2.09	31.03 $\pm$ 2.89b
Creatinine(mg/dL)	0.48 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.02
B/C ratio(ratio)	72.10 $\pm$ 10.55	76.23 $\pm$ 4.50	72.10 $\pm$ 4.22	64.68 $\pm$ 6.50
Uric acid(mg/dL)	6.60 $\pm$ 0.20	6.13 $\pm$ 0.83	6.80 $\pm$ 0.25	6.70 $\pm$ 0.40
Glucose(mg/dL)	129.00 $\pm$ 12.00	121.25 $\pm$ 13.24	109.50 $\pm$ 12.50	153.00 $\pm$ 3.44
AST(IU/L)	100.00 $\pm$ 2.22	97.25 $\pm$ 5.57	143.75 $\pm$ 2.39	215.00 $\pm$ 11.62ab
ALT(IU/L)	56.00 $\pm$ 5.2	51.75 $\pm$ 2.29	69.50 $\pm$ 5.41	97.50 $\pm$ 8.65b
ALP(U/L)	69.50 $\pm$ 2.35	71.00 $\pm$ 2.74	59.25 $\pm$ 1.95	62.00 $\pm$ 8.66
T.Cholesterol(mg/dL)	68.50 $\pm$ 4.50	68.25 $\pm$ 4.65	64.50 $\pm$ 1.71	69.50 $\pm$ 1.55
Triglyceride(mg/dL)	191.50 $\pm$ 16.50	178.50 $\pm$ 12.74	183.25 $\pm$ 13.99	209.33 $\pm$ 17.10

All data are represented as the mean  $\pm$  SE.

a :  $p < 0.05$ , compared with normal group.

b :  $p < 0.05$ , compared with control group.

## 2. 亞急性 毒性

### 1) 임상적 변화관찰

약침을 0.05ml, 0.1ml로 주입한 실험군, PBS를 0.1ml로 주입한 대조군 및 아무런 처치도 하지 않은 정상군을 일주일 동안 관찰하면서, 약침 주입 후부터

실험종료일까지 1일 1회 상태를 관찰하였으나 모든 군에서 전혀 독성반응을 나타내지 않았다.

### 2) 체중변화

약침 주입 후부터 실험종료일까지 1주 2회씩 측정된 결과, 대조군, 실험군 간의 유의성 있는 체중변

화는 없었다(Fig. 2).

### 3) 관련 장기의 무게 측정

실험 종료일에 체중을 측정하고 채혈을 한 뒤, 간장, 비장 그리고 신장을 적출한 후 저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 측정 결과 간장의 무게에 있어서 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 감소한 반면, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ )(Table 6).

비장과 신장 등 관련 장기에서의 유의성 있는 차이는 없었다(Table 3).

### 4) CBC

측정 결과 외송 0.2ml 주입군의 MCV수치가 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며 기타 검사에서는 유의성 있는 변화는 없었다( $p < 0.05$ )(Table 4).

### 5) 생화학적 혈청검사

혈청검사 결과 대조군은 T. protein, Albumin, Creatinine이 유의성 있게 증가하였고, B/C ratio가 유의성 있게 감소하였다. 0.1ml 실험군은 Creatinine이 유의성 있게 증가하였고, B/C ratio와 T. cholesterol이 유의성 있게 감소하였다. 0.2ml 실험군은 Albumin과 Creatinine이 유의성 있게 증가하였고, B/C ratio와 T. cholesterol이 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Table 5).

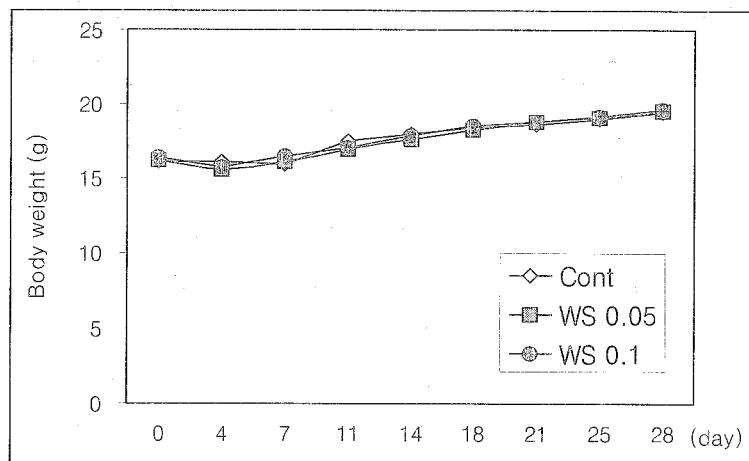


Fig. 2. Body weight change of mice treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in subacute toxicity test

Control : Administration of injection with 0.1ml PBS at Kansu(BL18).

WS 0.05ml : Administration of injection with 0.05ml *Orostachys Japhonicus* Herbal-acupuncture at Kansu(BL18).

WS 0.1ml : Administration of injection with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* Herbal-acupuncture at Kansu(BL18).

Table 3. Absolute and relative organ weights in mice treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in subacute toxicity test

Group	Liver	Spleen	Kidney
Normal	1.186 ± 0.003	0.099 ± 0.009	0.188 ± 0.011
Control	1.173 ± 0.046a	0.099 ± 0.011	0.182 ± 0.006
WS	1.175 ± 0.040ab	0.100 ± 0.005	0.188 ± 0.006

unit : g

All data are represented as the mean ± SE.

a :  $p < 0.05$ , compared with normal group.

b :  $p < 0.05$ , compared with control group.



Table 4. Complete blood count values in mice treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in subacute toxicity test

	Normal	Control	WS 0.1	WS 0.2
WBC( $\times 10^3/uL$ )	1.25 $\pm$ 0.15	1.08 $\pm$ 0.81	1.08 $\pm$ 0.28	1.10 $\pm$ 0.45
RBC( $\times 10^6/uL$ )	9.75 $\pm$ 1.14	9.60 $\pm$ 0.25	8.76 $\pm$ 0.55	9.73 $\pm$ 0.06
Hb(g/dL)	16.05 $\pm$ 1.95	15.88 $\pm$ 0.40	15.55 $\pm$ 0.78	16.00 $\pm$ 0.11
HCT(%)	53.05 $\pm$ 6.45	54.18 $\pm$ 1.56	50.58 $\pm$ 3.96	54.60 $\pm$ 1.46
MCV(fL)	57.65 $\pm$ 0.25	56.45 $\pm$ 0.65	56.83 $\pm$ 0.44	55.98 $\pm$ 0.34a
MCH(pg)	16.70 $\pm$ 0.11	16.55 $\pm$ 0.10	17.13 $\pm$ 0.40	16.40 $\pm$ 0.06
MCHC(%)	28.55 $\pm$ 0.15	29.28 $\pm$ 0.39	30.15 $\pm$ 0.93	29.28 $\pm$ 0.20
Platelet( $\times 10^3/uL$ )	829.00 $\pm$ 198.00	835.25 $\pm$ 221.14	833.23 $\pm$ 134.54	896.25 $\pm$ 34.63

All data are represented as the mean  $\pm$  SE.

a :  $p < 0.05$ , compared with normal group.

Table 5. Serum biochemical values of treated with *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in subacute toxicity test

	Normal	Control	WS 0.1	WS 0.2
T. protein(g/dL)	5.05 $\pm$ 0.15	5.16 $\pm$ 0.04a	5.14 $\pm$ 0.05	5.12 $\pm$ 0.04
Albumin(g/dL)	3.15 $\pm$ 0.10	3.34 $\pm$ 0.02a	3.30 $\pm$ 0.04	3.32 $\pm$ 0.04a
Globulin(g/dL)	1.80 $\pm$ 0.05	1.82 $\pm$ 0.02	1.84 $\pm$ 0.08	1.80 $\pm$ 0.01
A/G ratio(ratio)	1.80 $\pm$ 0.03	1.82 $\pm$ 0.02	1.84 $\pm$ 0.03	1.80 $\pm$ 0.02
BUN(mg/dL)	31.35 $\pm$ 5.55	32.02 $\pm$ 0.70	30.50 $\pm$ 4.97	29.60 $\pm$ 1.82
Creatinine(mg/dL)	0.43 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.05a	0.54 $\pm$ 0.02a	0.50 $\pm$ 0.01a
B/C ratio(ratio)	71.05 $\pm$ 10.55	59.24 $\pm$ 1.49a	56.04 $\pm$ 8.23a	48.60 $\pm$ 4.72ab
Uric acid(mg/dL)	4.60 $\pm$ 0.20	5.82 $\pm$ 0.96	4.88 $\pm$ 1.20	5.56 $\pm$ 0.70
Glucose(mg/dL)	190.00 $\pm$ 20.00	187.60 $\pm$ 7.51	163.80 $\pm$ 14.72	174.80 $\pm$ 9.60
AST(IU/L)	100.00 $\pm$ 22.00	118.80 $\pm$ 21.96	125.00 $\pm$ 15.69	109.80 $\pm$ 19.61
ALT(IU/L)	56.00 $\pm$ 11.00	61.40 $\pm$ 13.87	64.20 $\pm$ 8.60	69.80 $\pm$ 12.52
ALP(U/L)	179.50 $\pm$ 13.50	182.00 $\pm$ 10.75	192.00 $\pm$ 11.41	178.60 $\pm$ 9.06
T.Cholesterol(mg/dL)	68.50 $\pm$ 4.50	67.40 $\pm$ 2.66	58.20 $\pm$ 2.15b	56.60 $\pm$ 2.19ab
Triglyceride(mg/dL)	144.50 $\pm$ 26.50	144.20 $\pm$ 17.30	106.20 $\pm$ 4.51	103.80 $\pm$ 7.10

All data are represented as the mean  $\pm$  SE.

a :  $p < 0.05$ , compared with normal group.

b :  $p < 0.05$ , compared with control group.

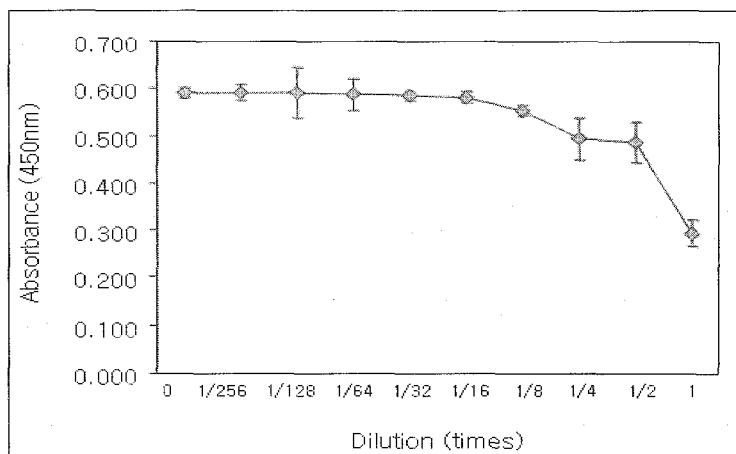


Fig. 3. Cytotoxicity of 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture on colon26-L5 carcinoma cell

### 3. in vitro 癌細胞 增殖 抑制效果

실험군에서 1/256~1/2의 희석 약침에서는 흡광도가 0.500~0.600 사이의 값으로 비슷하다가 약침 원액을 사용한 경우 흡광도가 절반 정도로 떨어진 것으로 나타났다(Fig. 3).

### 4. in vivo 癌轉移 抑制效果

#### 1) 체중변화

실험기간 동안 1주 2회씩 체중을 측정하였으며 실험군간에 각 구간별 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4).

#### 2) 간 무게 측정

대조군이 정상군보다 유의성 있게 증가한 반면, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 간 무게의 증가가 억제되었다( $p < 0.05$ )(Table 6).

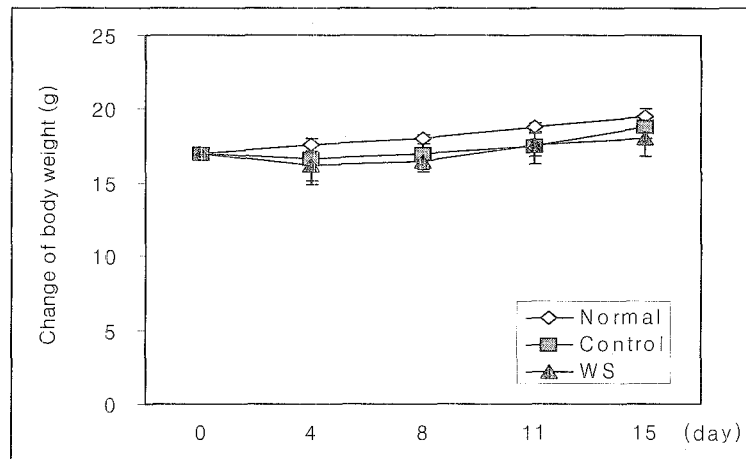


Fig. 4. Body weight change of mice treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in experimental liver metastasis model

All data are represented as the mean  $\pm$  SD(Standard Deviation).

Table 6. Weight of liver treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* 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>
WS	7	2.04 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>

unit : g.

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

b :  $p < 0.05$  compared with Control group.

Table 7. Absolute and relative organ weights in mice treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture in experimental liver metastasis model

	Spleen	Kidney
Normal	0.099 $\pm$ 0.013	0.188 $\pm$ 0.011
Control	0.232 $\pm$ 0.066 <sup>a</sup>	0.193 $\pm$ 0.023
WS	0.169 $\pm$ 0.020	0.181 $\pm$ 0.014

All data are represented as the mean  $\pm$  SE.

a :  $p < 0.05$ , compared with Normal group.

### 3) 관련 장기의 무게 측정

대조군이 정상군에 비해 비장의 무게가 유의성 있게 증가한 반면, 실험군은 대조군에 비해 약간의 감소는 있었으나 유의성은 없었다. 신장의 무게에서는 유의성 있는 차이가 없었다( $p < 0.05$ )(Table 7, Fig. 6, 7).

### 4) 간의 육안적 관찰소견

적출한 간을 육안적으로 관찰한 뒤 사진을 찍어 비교하였다. 정상군과 대조군, 실험군에서 적출된 간을 육안적으로 확인한 결과 정상군에 비해 대조군은 4~5배 정도 크며, 간의 암종양으로 보이는 종양성 모양이 많이 보인 데 반해, 와송약침을 시술한 실험군은 거의 정상군과 같이 매끄러운 모양으로 말단부 위에만 종양모습이 보였고, 크기 또한 정상군과 비슷함을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

## 5. 면역증진효과

### 1) 비장세포의 증식효과

Con A로 반응시킨 비장세포에서 정상군, 대조군, 실험군 모두 비처리 비장세포에 비해 유의성 있는 흡광도를 보였고, 특히 와송 실험군은 대조군과도 유의성 있는 흡광도 차이를 보였다. LPS로 반응시킨 비장세포에서는 대조군과 실험군이 비처리 비장세포에 비해 유의성 있는 흡광도 차이를 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 6).

### 2) 비장세포로부터 면역세포의 분포능조사

와송 주입군은 대조군에 비해 Total T cell, Hel per T cell, TC cell, Macrophage, NK cell의 분포가 증가하였고, B cell이 감소하였다(Table 8, Fig. 7).

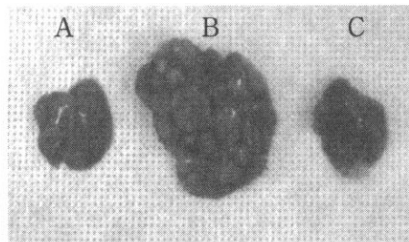


Fig. 5. Macroscopic observation of liver treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture (A) normal group. (B) control group. (C) experimental group.

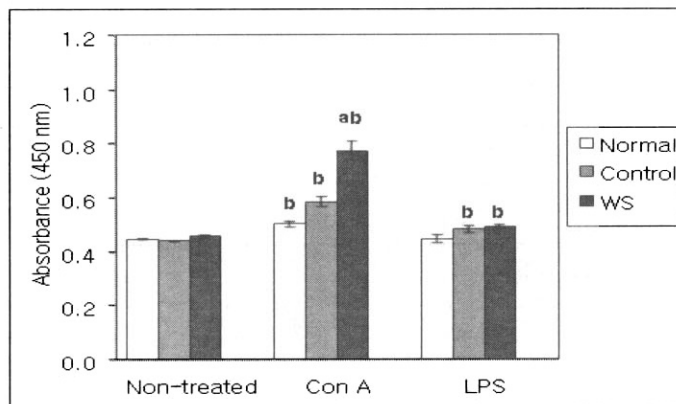


Fig. 6. Effect of treatment with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture on the proliferation of mice splenocytes in response to various mitogenic stimuli

All data are represented as the mean  $\pm$  SD.

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

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

Table 8. Immune cells population in mice treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture

	CD3	CD19	CD4	CD8	Mac-1	NK1.1
Control	48.69	43.46	40.02	13.53	3.16	4.21
WS	55.69	34.32	44.97	17.28	11.23	6.00

unit : % gated.

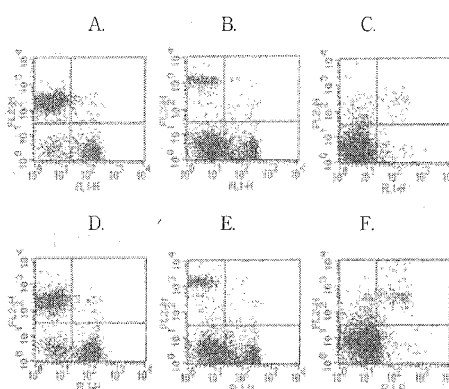


Fig. 7. Immune cells population in mice treated with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture

A, B and C : Control group.  
 D, E and F : WS-treated group.  
 A, D : CD3 & CD19 staining.  
 B, E : CD4 & CD8 staining.  
 C, F : Mac-1 & NK1.1 staining.

Table 9. Effect of treatment with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* 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
WS	647.85 $\pm$ 312.16	1041.17 $\pm$ 73.13*

All data are represented as the mean  $\pm$  SD.

\* : p<0.05, compared with control group.

Table 10. Effect of treatment with 0.1ml *Orostachys Japhonicus* 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
WS	1528.11 $\pm$ 216.82	2189.11 $\pm$ 185.19 <sup>a</sup>

All data are represented as the mean  $\pm$  SD.

a : p<0.05, compared with control group.

### 3) 비장세포로부터 cytokine의 산생능조사

(1) IFN- $\gamma$ (helper T cell type 1 cytokine) 산생능  
 Con A로 처리된 상황 하에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의성 있게 증가하였다(p<0.05)(Table 9).

### (2) IL-4

Con A로 처리된 상황 하에서 실험군은 대조군에 비하여 IL-4의 생산이 유의성 있게 감소하였다(p<0.05) (Table 10).

Table 11. Effect of treatment with 0.1<sup>m</sup>l *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture on production of IFN- $\gamma$  from Peritoneal exudate macrophages

	Non-treated	LPS-treated
Normal	580.70 $\pm$ 40.68	542.35 $\pm$ 54.24
Control	603.07 $\pm$ 5.54	580.70 $\pm$ 67.80
WS	663.80 $\pm$ 105.18	1064.93 $\pm$ 128.82 <sup>a</sup>

All data are represented as the mean  $\pm$  SD.  
a : p<0.05, compared with control group.

Table 12. Effect of treatment with 0.1<sup>m</sup>l *Orostachys Japhonicus* herbal-acupuncture on production of IL-12 from Peritoneal exudate macrophages

	Non-treated	LPS-treated
Normal	556.72 $\pm$ 59.53	1210.09 $\pm$ 109.61
Control	626.87 $\pm$ 125.84	1147.73 $\pm$ 141.65
WS	542.69 $\pm$ 9.35	1571.77 $\pm$ 153.13 <sup>a</sup>

All data are represented as the mean  $\pm$  SD.  
a : p<0.05, compared with control group.

#### 4) 복강대식세포로부터의 cytokine 산생능 조사

##### (1) IFN- $\gamma$

LPS 자극 하에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의성 있게 증가하였다(p<0.05)(Table 11).

##### (2) IL-12

LPS 자극 하에서 실험군은 대조군에 비하여 IL-12의 생산이 유의성 있게 증가하였다(p<0.05)(Table 12).

## IV. 考 察

대장암은 우리나라에서 위암 다음으로 흔한 소화기암<sup>23)</sup>으로 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 3.7~11개월 정도로 간전이의 발생 및 진전은 환자의 생존에 영향을 미치는 중요한 요인이 된다<sup>4-6)</sup>. 본 연구에 사용된 실험적 간전이 모델은 대장암 세포주가 혈행성 전이를 통하여 간에 전이암을 형성하는 모델로서 임

상적인 내용을 반영한 모델이라고 할 수 있다.

瓦松은 돌나물과에 속한 다년생 육질초본인 바위솔 및 등근 바위솔의 전초로서 여름, 가을 양 계절에 채취하여 근을 제거하고 햇볕에 말린 것을 이른다. 氣味가 凉, 無毒, 酸, 苦, 平하고 清熱解毒, 利濕, 消腫, 癰毒, 通經破血, 牙齦腫痛, 脣裂生瘡, 惡瘡不斂 등을 다스리는 효능이 있다<sup>24,25)</sup>. 이에 윤 등<sup>26)</sup>은 와송약침액이 신경세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인한 apoptosis를 예방한다고 하였고, 박 등<sup>27)</sup>은 와송약침액이 oxidant에 의해 처리된 opossum kidney(OK) 세포에서 세포사망과 DNA 손상을 예방할 수 있다고 하였다.

背俞穴은 오장육부의 기가 배부의 한 특정한 혈위에 輸注하는 곳<sup>28)</sup>으로 背俞穴을 자극함으로써 내장의 질환을 치료할 수 있다고 하였다<sup>29)</sup>. 또한 <醫學入門·臟腑論>에 “肝與大腸相通 肝病宜疏通大腸 大腸病宜平肝經爲主”라 하여 간과 대장이 서로 생리적 병리적으로 상통하여 肝病에는 大腸을 소통시키고 大腸病에는 肝經을 소통시켜야 한다고 밝힌 바 있다<sup>30)</sup>. 背俞穴 중 肝俞穴(BL18)은 제9 흉추 극돌기 양방 1.5수에 위치하는 足太陽膀胱經의 經穴로 利肝膽, 清濕熱, 調氣滯 등의 효능이 있고, 급·만성간염, 담낭염, 위 질환 등에 사용하며, 積聚痞痛 등을 치료한다고 하였다<sup>31)</sup>. 박 등<sup>32)</sup>은 肝俞가 간손상을 회복시키는 효과가 있다고 보고하였다. 이로부터 肝俞(BL18)가 대장으로부터 간으로 전이되는 전이암을 예방 및 치료하는데, 효과가 있을 것으로 판단하여

선택하였다.

약침요법은 경락학설의 원리에 의거하여 한약재를 선택하여 유관한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 주입하여 자침과 약물작용을 통하여 생체의 기능을 조정하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 자침요법이다<sup>33)</sup>. 穴位注射療法이라고도 하며, 김<sup>34)</sup>은 주로 膻穴을 多用하며, 여기에 募穴을 첨가하면 서로 氣血이 相通하여 효과가 좋다고 하였다.

이에 본 연구는 와송의 증류식 약침시술을 통해 Ohnishi 등<sup>35)</sup>의 방법에 의한 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델의 급성 및 아급성 독성 실험을 하였고, *in vitro* 암세포 증식 억제효과, *in vivo* 암전이 억제효과, 면역증진효과를 관찰하고자, 비장세포를 proliferation 시킨 후 세포의 flow cytometry analysis를 통하여 B cell, T cell, CD4<sup>+</sup> T cell, CD8<sup>+</sup> T cell, Mac-1<sup>+</sup> cell, NK1.1 cell의 비율을 산출하였다. 또한 비장세포 및 복강대식세포로부터의 cytokine 산생능을 측정하여 관찰하였다.

먼저 와송 약침의 급성 및 아급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>과 임상적 관찰, 체중측정, CBC측정, 생화학적 혈청검사 등을 실시하였으나 유의할만한 독성반응은 나타나지 않았다(Table 1~8). CBC와 생화학적 혈청검사에서 몇몇 유의성 있는 변화가 보이기도 했지만 임상적으로 유의할 만한 수준은 아닌 것으로 사료된다. 그러나 아급성 독성실험에서 간장의 무게측정을 한바, 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가한 반면, 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이는 대조군의 암세포가 전이 및 증식됨에 따라 간장의 무게가 증가한 반면, 실험군에서는 암세포의 증식억제를 통해 간장의 무게가 줄어든 것으로 사료된다(Table 6).

다음은 와송 약침의 *in vitro* 암세포 증식 억제효과를 알아본 결과 1/256~1/2의 희석 와송약침이 모두 0.500~0.600 사이의 값으로 비슷하게 높게 나타났는데(Fig. 4), 이는 세포독성이 적다는 의미로 생체에 주는 자극은 적으면서 항암과 관련된 면역반응을 매개할 수 있을 것으로 사료된다.

와송 약침의 암전이 억제효과에 있어서 체중변화와 관련장기의 무게측정상 유의성 있는 차이는 없는 반면, 간장의 무게는 정상군에 비해 대조군은 약 4배 이상 증가한 반면, 실험군의 간무게는 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며(Table 6), 육안

적 관찰에서도 양호한 상태를 보여주었다(Fig. 5).

다음으로 와송 약침의 면역증진효과 면에서 와송 약침 실험군이 대조군에 비해 LPS처리군 및 Con A 처리군에서 흡광도 수치가 유의하게 증가하였다(Fig. 7). 이는 정상군에 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 증식되었다고 생각할 수 있다. 한편, 실험군은 정상군이나 대조군에 비해서 와송약침을 시술함으로 인해 더 많은 면역세포를 생성하였는데, 항체매개성 면역세포인 B림프구보다 세포매개 면역세포인 T림프구에 특화하여 더 많이 증식하고 생성이 증가한 것으로 생각할 수 있다.

다음 실험에서 와송 약침이 Th 1 세포성 면역과 Th 2 체액성 면역 중 어디에 더 관계하고 있는가를 알아보기 위하여 Th 1 면역반응에 관여하고 있는 cytokine중에 IFN- $\gamma$ 와 Th 2 면역반응에 관여하고 있는 cytokine중에 IL-4를 선택하여 검출실험을 하였다. 와송약침 실험군이 대조군에 비해 IFN- $\gamma$ 의 산생능은 유의성 있는 증가를 보였고(Table 9), IL-4의 산생능에서는 유의성 있는 감소를 보였다(Table 10). 이는 Th 2 체액성 면역과 크게 관계가 없고, Th 1 세포성 면역과 관계가 있음을 의미한다.

또한 복강세포로부터 분비되는 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 양을 측정된 결과 LPS 자극 하에서 실험군은 대조군에 비하여 IFN- $\gamma$ (Table 11)와 IL-12(Table 12)의 생산이 유의성 있게 증가하였다. 이는 와송 약침에 면역증진효과가 있음을 시사한다.

이상과 같은 결과로 보아 colon26-L5 암세포주를 이용한 간전이 모델을 통하여 유발된 암에 있어서, 간의 무게, 육안적 소견과 조직학적 소견을 통해 와송 약침이 암의 전이를 억제하고 암의 성장을 둔화시킨 것을 확인하였다. 그리고, 비장의 면역세포를 증식하여 와송 약침이 세포매개 면역에 관계된 T림프구를 생성 증가시키는 것을 알았으며, 마지막으로 면역세포로부터 분비되는 cytokine을 관찰하여 와송 약침이 Th 1 세포성 면역에 관계되어 면역세포들을 자극 유도하는 것을 확인하였다.

## V. 結 論

외송 약침의 급성 및 아급성 독성, 항암효과 그리고 면역효과를 관찰하고자 colon26-L5 암세포주를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo*에 전이암 모델을 만들어 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 실험군에서 유의한 급성 및 아급성 독성 반응이 관찰되지 않았다.
2. *in vitro*에서 실험군은 모두 50% 전후의 흡광도를 나타내었다.
3. *in vivo*에서 실험군은 대조군에 비해서 유의하게 간으로의 암전이를 억제하였다.
4. 실험군의 비장에서 면역세포의 활성화를 관찰한 결과 세포성 면역에 관계된 T림프구가 유의한 증가를 나타내었다.
5. 비장세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰한 결과 실험군은 대조군에 비해 IFN- $\gamma$ 는 유의하게 증가하였고, IL-4는 유의하게 감소하였다.
6. 복강 대식세포로부터 분비되는 cytokine의 양을 관찰한 결과 IFN- $\gamma$ 와 IL-12에서 유의할 만한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 외송 약침이 세포매개 면역 반응에 관계하여 세포성면역을 강화시켜 암의 성장을 감소시키거나 전이력을 억제하는 것으로 나타나 앞으로 외송의 임상적 연구를 통해 암 치료율을 제고하는 데 도움이 될 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

1. 최성양 외. 조기위암. 대한소화기병학회지. 1993 ; 25(5) : 853-859.
2. 허만석, 백남선, 문남모. 조기위암에 관한 임상적 고찰. 대한암학회지. 1990 ; 22(2) : 334-340.
3. 류재현 외. 대장직장암의 전이성 간암에 대한 항암 색전술. 대한외과학회지. 2000 ; 58(1) : 109-114.
4. Cascino S, Walder S. Chemo-embolization in the treatment of liver metastases from colorectal cancer. Cancer Treatment Reviews. 1996 ; 22 : 355.
5. Isenberg J, Fischbach R, Lruer I, Keller HW. Treatment of liver metastases from colorectal cancer. Anticancer Reserch. 1996 ; 16 : 1291.
6. 선병호, 안병권, 김병수, 김만기, 김지현. 원발성 및 전이성 간암에 대한 외과적 항암 Lipiodol 색전술. 대한외과학회지. 1996 ; 50(10) : 47.
7. 전병욱. 암종의 병인병리에 대한 문헌적 고찰. 대한한방종양학회지. 1995 ; 1(1) : 83-101.
8. 박기홍. 오수유약침이 항암 및 면역기능에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2003.
9. 손인철 외. 약침요법. 일지사. 1999 : 17-18.
10. 대한약침학회 편찬. 약침정제와 임상응용. 대한침구학회. 1997 : 1-5.
11. 이정화. 외송약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. 대전대학교대학원. 박사학위논문. 1999.
12. 김현아, 임성우, 이원철. 한약을 이용한 항암실험 연구의 경향에 관한 고찰. 대한한방종양학회지. 1998 ; 4(1) : 211-232.
13. 이정화. 외송약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원, 박사학위논문. 1999.
14. 최원학. 고삼약침이 항종양 및 면역반응에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 석사학위논문. 1999.
15. 최종호. 구기자 및 지골피약침이 종양과 면역기능에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 박사학위논문. 1996.
16. 서주원. 구기엽약침이 S-180에 대한 항종양 효과와 면역반응에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 석사학위논문. 1996.
17. 서범식. 저령약침이 S-180에 대한 항종양 효과와 면역반응에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 박사학위논문. 1995.
18. 김중완. 금은화 약침액이 항암 및 암예방효과에 미치는 영향. 동국대학교대학원. 박사학위논문. 1999.
19. 박경미. 감초약침액이 항암 및 면역활성에 미치는 영향. 동국대학교대학원. 박사학위논문. 1999.
20. 김태운. 인삼수침 전처치가 발암예방에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 석사학위논문. 1988.
21. 권기록 외. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성, 아급성 독성 실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. 대한약침학회지. 2003 ; 6(2) : 7-27.

22. 권기록. 정맥주입용 산삼약침이 인체에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. 대한약침학회지. 2004 ; 7(1) : 15-26.
23. 중앙암등록사업본부. 제20차 중앙 암등록사업 연례보고서. 1999 : 12.
24. 李時珍. 本草綱目. 고문사. 1983 : 814.
25. 이상인. 本草學. 수서원. 1981 : 531.
26. Yoon Y 외. Protective effects of *Orostachys japonicus* A.berger on  $H_2O_2$ -induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. J Ethnopharmacol. 2000 ; 69 : 73-78.
27. 박상원, 송춘호. 와송 약침액이 신장세포에서  $H_2O_2$ 에 의한 세포사망 및 DNA손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 : 88-99.
28. 임종국. 침구치료학. 집문당. 1983 : 154-155.
29. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 동양의학연구원출판부. 1985 : 128, 235.
30. 李梴. 編注醫學入門. 대성문화사 1982 : 369.
31. 김예희 등. 종양학. 인제대학교출판부. 1994 : 235-241.
32. 박찬열, 남상수, 이재동, 최도영, 안병철, 박동석, 이운호, 최용태. 발암원인에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1999 ; 16(1) : 147-159.
33. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 대한약침학회. 1999 : 13-14, 112-118, 138-203.
34. 김연연. 기적의 약침요법2. 금강출판사. 1990 : 23.
35. 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.