

원저

산양산삼 추출액의 항암효과 및 Doxorubicin에 의한 고환독성 방어효과

민병일* · 김호현* · 서일복** · 권기록***

* 세명대학교 한의과대학 병리학교실

** 세명대학교 한의과대학 해부학교실

*** 상지대학교 한의과대학 침구학교실

Antitumor Effects and Protective Effects Against Doxorubicin-induced Testicular Toxicity of Cultivated Wild Ginseng Extract in the B16/F10 Melanoma-Bearing C57BL/6 Mice

Min, Byung-II* · Kim, Ho-Hyun* · Seo, Il-Bok** · Kwon, Ki-Rok***

* Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Semyung University

** Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine, Semyung University

*** Dept. of Acup & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Sangji University

Abstract

Objectives : This research was executed to verify antitumor effect and protective effect on doxorubicin(Doxo)-induced toxicity of Cultivated Wild Ginseng(CWG) and synergic effect of CWG with Doxo in B16/F10 melanomas-bearing C57BL/6 mice.

Methods : To evaluate protective effect on doxorubicin(Doxo)-induced toxicity and enhancing effect on the antitumor activity of Doxo, CWG water extract(0.5 ml) was intraperitoneally injected for 10 days, in combination with intraperitoneal injection of Doxo(4 mg/kg) on days 12, 16, 19, to mice subcutaneously inoculated with 2×10^6 /ml B16/F10 melanoma cells.

In order to investigate antitumor effect of CWG, CWG water extract(0.5 ml) was intraperitoneally injected for 10 days to mice subcutaneously inoculated with 2×10^6 /ml B16/F10 melanoma cells.

Results : The body weights of melanoma-bearing mice increased following B16/F10 cells inoculation. In contrast, such an increase in body weights was significantly attenuated by Doxo administration. Whereas CWG inhibits the decrease in body weights induced by Doxo. The tumor volume and tumor weights of melanomas-bearing mice dramatically increased following B16/F10 cells inoculation, In contrast, such an increase in tumor volume and tumor weights were significantly attenuated by Doxo or CWG administration. But the synergic effect of CWG with Doxo was not observed. The reduction of cellularity of seminiferous epithelia, level of spermatogonium and spermatid induced by Doxo was recovered by CWG administration.

BrdU labeling index of spermatogonium was remarkably decreased in Doxo group but was no change in CWG group. Whereas the incidence and intensity of BrdU labelled spermatocytes and spermatids were increased by CWG administration than those of Doxo group.

Conclusions : The obtained results suggest that CWG have antitumor effect and protective effect on doxo-induced testicular toxicity. This effect might be mediated through the supplementation of vital energy.

Key words : antitumor effect, Cultivated Wild Ginseng, doxorubicin, testicular toxicity

* 교신저자 : 강원도 원주시 우산동 283

상지대학교 부속 한방병원 침구과

(Tel : 033-741-9257 E-mail: beevenom@paran.com)

I. 緒 論

종양(암)은 조직의 자율적인 과잉성장으로 정상적인 조직에 대해서 파괴적인 것을 말하는데¹⁾, 장기이식 등으로 면역억제제를 투여하거나 선천성 면역능력 결핍증 환자에서 암발생률이 높고, 면역능력이 저하된 환자에서 암성장이 더 빠른 것²⁾으로 알려져 있다.

이는 한의학에서 인체의 모든 질병은 正氣와 邪氣의 균형이 失調되어 발생한다는 이론^{3,4)}과 많은 상관성이 있고, 종양의 치료 시에 扶正祛邪의 治法^{5,6)}을 적용하는 이론적 배경이 된다.

한약재중 人蔘은 元氣를 補益하고 정신을 안정시키며 邪氣를 제거하는 작용이 있어 長服하면 신체를 강건하게 하고 長壽케 하는 藥物⁷⁾로 알려져 있고, 신경계와 내분비계, 순환계, 물질대사를 비롯한 생체 전반에 영향을 미치지 않는 곳이 없을 정도로 다양한 효능⁸⁾을 나타내고 있으며, 종양의 치료에도 많이 활용되는 扶正祛邪의 대표적 藥物이다.

이 人蔘이 野生에서 자연발생적으로 발아하여 성장한 人蔘을 山蔘이라 하고, 人蔘이나 山蔘의 種子 또는 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 人蔘을 山養山蔘이라 한다⁹⁾.

山蔘은 희귀성과 高價의 藥物인 점등으로 山蔘 자체에 대한 연구는 찾아보기 힘든 실정이나 최근 山養山蔘에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 특히 김 등¹⁰⁾은 HL-60 세포를 이용한 항암효과연구에서 山養山蔘이 人蔘에 비하여 효과가 앞서는 것으로 보고하였고, 이 등¹¹⁾은 山養山蔘 藥鍼液을 인체의 血脈에 주입하였을 때 혈장 면역단백질(CR2-C3d) 증가, antitrypsin 감소, vitamin D binding protein 증가 등의 효과가 있는 것으로 보고하였으며, 곡 등¹²⁾은 山養山蔘 藥鍼液이 A549 human lung cancer cell에서 apoptosis 유도에 의해 세포사멸효과를 나타내는 것으로 보고하였다.

이와 같은 山養山蔘의 효과는 인체의 元氣를 補益하여 邪氣와 질병에 대한 저항력 또는 면역력을 증강시키는 효능에 의한 것으로 추측되기에 저자는 B16/F10 세포를 이식하여 종양을 유발한 C57BL/6 생쥐에서 山養山蔘의 항암효과를 검증하고, 山養山蔘이 항암제 doxorubicin에 의하여 발생하는 고환독성을 억제할 수 있는지를 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 산삼 추출액 제조

山養山蔘(Cultivated Wild Ginseng) 10뿌리(87 g)을 round flask에 넣고, 증류수 350 ml을 가하여 2시간 동안 가열 추출하였다. 추출액을 micro syringe filter(0.2 μm)로 여과하여 300 ml의 추출액을 얻었다(Fig. 1).

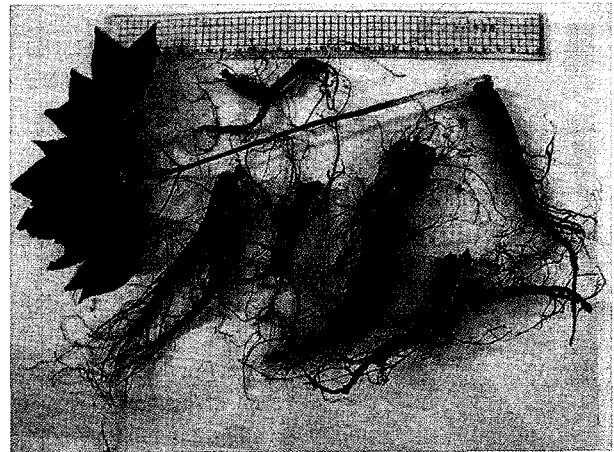


Fig. 1 Cultivated wild ginseng 10 years old.

2. 실험동물

5주령의 수컷 C57BL/6 생쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1 °C, 습도 55±5%로 조정된 항온 항습실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간 동안 사료와 깔짚은 감마 멸균처리 된 것을 사용하였으며, 음수는 자유 섭취케 하였다.

3. 종양세포의 배양 및 이식

이식에 사용된 종양세포는 murine melanoma에서 유래된 B16/F10 세포로 한국세포주은행에서 분양받아 10% FBS(Gibco BRL., Grand Island, NY, USA)가 첨가된 RPMI1640 배양액(Gibco BRL., Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37 °C, 5% CO2 조건하에서 2~3일 간격으로 5회 계대배양하였다. 배양세포를 trypan blue로 염색하여 세포수를 측정 후 FBS를 첨가하지 않은 RPMI1640배지로 배양액내 세포수가 2×10⁶/ml이 되도록 조정하였다. 실험동물의 복부를 면도하고 소독한 후

배양액 0.1 ml을 피하주사하여 종양세포를 이식하였다.

4. 실험군의 분류

종양세포를 이식한 5일 후부터 육안적인 크기의 종양이 발생되기 시작하였으며 8일 후부터 집중적으로 종양이 발생되어 12일 후에는 총 84마리 중 78마리가 발생하여 93%의 종양발생률을 나타내었다. 종양이 발생된 78마리 중 그 크기가 현저히 작거나 또는 현저히 큰 개체는 실험군에서 제외하였으며 종양의 체적(장경 × 단경²)이 100~400mm³인 개체(Fig. 1)를 선별하여 다음과 같이 6마리를 1군으로 하여 분류하고 10일간 처치를 하였다. 또한 정상군 및 모든 실험군의 개체에 BrdU(50mg/kg)를 실험 8, 9, 10일에 각각 복강 내 주사하여 DNA를 합성하는 세포를 표지하였다.

실험군의 구성은 아래와 같다.

- 정상군(normal group) : 종양세포를 이식하지 않은 음성대조군으로 생리식염수 0.5 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.
- 대조군(control group) : 종양이 발생된 양성대조군으로 생리식염수 0.5 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.
- Doxo군(Doxo group) : 1일, 4일 및 7일에 각각 doxorubicin(4 mg/kg)을 복강 내 투여하였고, 생리식염수 0.5 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.
- Doxo+CWG군(Doxo+CWG group) : 실험 1일, 4일 및 7일에 doxorubicin(4 mg/kg)을 복강 내 투여하였으며, 산삼 추출액 0.5 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.
- CWG군(CWG) group : 산삼 추출액 0.5 ml을 1일 1회 10일간 복강 내 투여하였다.

5. 체중, 종양 체적 및 종양 무게 측정

실험개시일(1일)부터 실험종료일(10일)까지 매일 체중 및 종양 체적을 측정하였다. 종양 체적은 digital caliper(Mitutoyo, CD-15CP, Japan)로 종양의 장경 및 단경을 측정하여 아래의 공식으로 산출하였다.

$$\text{종양 체적(mm}^3\text{)} = \text{장경(mm)} \times \text{단경(mm)}^2 \times \frac{1}{2}$$

종양 무게는 실험종료일에 적출된 종양의 주변을 정리한 후 측정하였다.

6. 말초혈액검사

실험종료일에 모든 개체를 ether로 가볍게 마취시킨 상태에서 심장채혈한 혈액을 EDTA가 담긴 채혈병에 담아 잘 섞은 후, 자동혈구계산기(Advia 120, Leverkusen, Germany)를 이용하여 백혈구수, 백혈구 감별계산, 적혈구수, 혈색소, 헤마토크리트, 혈소판수를 측정하였다. 망상적혈구수는 new methylene blue 염색을 하여 계수하였으며 적혈구 1000개당 망상적혈구수의 %로 산출하였다.

7. 병리조직학적 검사

실험종료일에 희생하여 종양조직, 고환, 간장 및 신장을 적출하여 고환은 Bouin's sol.에 고정하고 나머지 장기들은 10% neutral buffered formalin 액에 2일간 고정하였다. 모든 조직을 통상적인 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5 μm 두께의 박절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 일반적인 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

8. 고환의 정세관 직경의 측정

Hematoxylin & Eosin 염색된 고환 조직에서 정세관의 단경 및 장경의 길이가 20% 이상 차이가 나지 않는 비교적 원형에 가까운 정세관 10개를 임의로 선택해서 그 직경을 측정하여 평균치를 구하였다.

9. BrdU 면역조직화학 염색

탈파라핀과정과 함수과정을 거친 고환 조직을 0.05M PBS(pH 7.4)로 수세한 후 BrdU 면역조직화학 염색을 실시하였다. 조직을 37 °C 2N HCl 용액에 담가 1시간 반응하고, 0.05 M borate buffer(pH 8.5)로 10분씩 2회 중화시킨 후 PBS로 수세하였다. 600배 희석한 Anti-BrdU(Roche, Germany)로 4 °C에서 15시간 반응시키고, biotinlated 2nd antibody(Vector Laboratoris, USA)로 30분간 반응시켰으며, ABC 용액(Vector Laboratoris, USA)에서 30분간 반응시키고 DAB로 10분간 발색시켰다. Hematoxylin 액으로 대조 염색을 실시한 후 탈수과정 및 투명화 과정을 걸쳐 Canada balsam으로 봉입하였다.

10. 고환의 정세관당 정조세포수의 측정

BrdU 면역조직화학 염색을 실시한 고환 조직에서 정세관의 단경 및 장경의 길이가 20% 이상 차이가 나지 않는 비교적 원형에 가까운, 그리고 정세관 발달주기 중 정자세포(spermatid)가 정세관 강내로 완전히 방출되는 제 IX 단계에 있는 정세관 5개를 임의로 선택하여 총 정조세포수를 계수하여 평균치를 구하였다.

11. BrdU 양성 반응 세포의 종류 및 BrdU 양성 정조세포비율의 측정

BrdU 면역조직화학 염색을 실시한 고환 조직에서 정세관의 단경 및 장경의 길이가 20% 이상 차이가 나지 않는 비교적 원형에 가까운, 그리고 정세관 발달주기 중 정자세포(spermatid)가 정세관 강내로 완전히 방출되는 제 IX 단계에 있는 정세관 5개를 임의로 선택하였다. BrdU에 염색된 세포의 종류 및 분포를 광학현미경으로 관찰하였고, BrdU에 염색된 정조세포수를 측정하여 총 정조세포수당 염색된 정조세포수의 평균 비율을 구하였다.

12. 고환의 TUNEL 염색 및 TUNEL 양성 정조세포수의 측정

탈파리핀과정과 함수과정을 거친 고환 조직을 0.05 M PBS(pH 7.4)로 수세한 후 TUNEL 염색을 실시하였다. 내인성 과산화효소 반응을 차단하기 위해서 조직을 3% H2O2 용액에 30분간 처리하고, 항원을 노출시키기 위해서 proteinase K(Roche, Germany) 용액으로 20분간 처리하였다. 비 특이 반응을 억제하기 위해서 3% bovine serum albumin(Sigma, USA)액에 30분간 처리한 후, TUNEL reaction mixture(Roche, Germany)로 37 °C에서 1 시간 반응시키고, converter-POD 용액으로 37 °C에서 30 분간 반응시킨 다음 DAB로 10분간 발색시켰다. Hematoxylin 액으로 대조 염색을 실시한 후 탈수과정 및 투명화 과정을 걸쳐 Canada balsam으로 봉입하였다.

TUNEL에 염색된 세포의 종류 및 분포를 광학현미경으로 관찰하였으며, 고환 단면의 모든 정세관에서 염색된 정조세포의 수를 측정하였다.

13. 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 9.0 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다.

III. 實驗成績

1. 체중의 변화

정상군과 대조군에서는 모두 유사한 정도로 체중이 증가되었으나, doxorubicin을 투여한 Doxo군은 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었다.

Doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서는 Doxo군에 비하여 다소 체중이 증가되었으나 유의성은 없었다(Table 1).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 체중이 증가하였으며, 대조군과의 차이는 없었다(Table 1).

2. 종양의 육안소견

대조군에서는 시간의 경과에 따라 종양 크기가 현저히 증가되었으며, 실험 6일부터는 종양의 중심부가 괴사되어 출혈이 진행되고 표면에 가피가 형성되었다(Fig. 2).

Doxorubicin을 투여한 Doxo군에서는 실험 5일부터 종양의 단단한 경도가 감소되어 종양이 원형을 유지하지 못하고 다소간 평평하게 퍼지는 형태로 관찰되었으며, 7일부터는 종양의 중심부에 궤양이 형성되고 붕괴된 종양조직이 외부로 유출되기도 하였다(Fig. 3).

Doxorubicin과 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서의 육안적인 소견은 doxorubicin을 투여한 Doxo군에서 관찰된 소견과 유사하였으며, 산삼추출액만 투여한 CWG군의 육안 소견은 대조군에서 관찰된 소견과 유사하였다.

3. 종양의 체적 및 무게 변화

종양이 유발된 대조군에 비하여 doxorubicin을 투여한 Doxo군은 유의성있게 종양의 체적과 무게가 감소하였다(Table 2).

Table 1. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the body weights of the B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice.

Group	Day after administration			
	0		9	
	g	%	g	%
Normal	22.6±1.0 ^a	100	24.4±0.8	108.2± 1.8
Control	22.5±1.3	100	24.9±2.3	110.7±12.6
Doxo	23.7±0.8	100	23.1±1.5	97.5± 5.0*
Doxo+CWG	23.2±1.2	100	23.3±2.5	100.4±10.0
CWG	24.7±1.3	100	27.8±2.4	112.7± 6.8

a : Mean±S.D.(n=6)

Normal : Intra-peritoneal injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanoma-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanoma-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanoma-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanoma-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

* : significantly different from the value with control group(* : p<0.05).

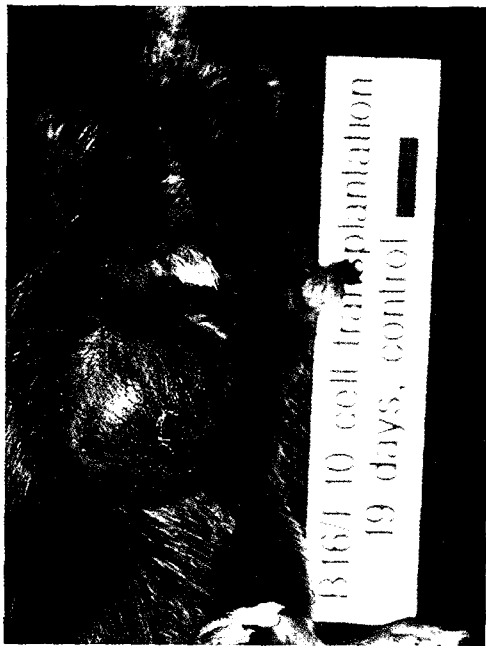


Fig. 2 19 days(control group at 9 days of experiment) after im- plantation of B16/F10 cells. Note the large tumor mass and central scar tissue)

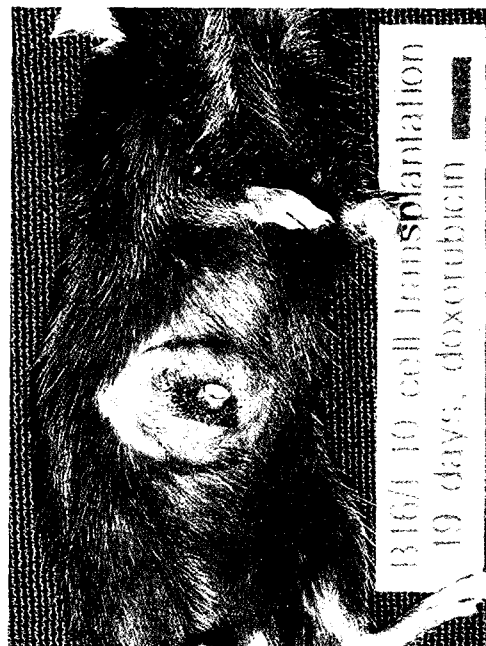


Fig. 3 19 days(doxorubicin group at 9 days of experiment) after im- plantation of B16/F10 cells. Ulceration and fistulation of the tumor mass were observed.

Doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서도 종양의 체적과 무게가 감소하였으나 Doxo군과의 차이는 없었다(Table 2).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 대조군에 비하여 종양의 체적과 무게가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 종양의 무게는 유의성있게 감소되었다(Table 2).

4. 말초혈액 RBC Index의 변화

정상군에 비하여 종양이 유발된 대조군은 RBC, hemoglobin, hematocrit은 유의성있게 감소되었고, reticulocytes는 유의성있게 증가되었다(Table 3).

Doxorubicin을 투여한 Doxo군에서는 대조군에 비하여 RBC, hemoglobin, hematocrit, reticulocytes 모두 감소하는 경향을 보였으며, 특히 reticulocytes는 유의성있게 감소되었다(Table 3).

Doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서도 RBC, hemoglobin, hematocrit, reticulocytes 모두 감소하여 Doxo군과의 차이는 없었다(Table 3).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 RBC, hemoglobin, hematocrit은 감소되고, reticulocytes는 증가되었으나 대조군과 차이를 보이지 않았다(Table 3).

5. 말초혈액 WBC 및 Platelets의 변화

정상군에 비하여 종양이 유발된 대조군에서는 neutrophil은 유의성있게 증가되고, lymphocyte, platelet은 유의성있게 감소되었다(Table 4).

Doxorubicin을 투여한 Doxo군에서는 대조군에 비하여 platelet이 유의성있게 증가되었다(Table 4).

Doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서는 Doxo군과 같은 경향을 나타내어 차이는 없었다(Table 4).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 대조군과 같은 경향을 나타내어 차이는 없었다(Table 4).

6. 병리조직학적 소견

(1) 종양조직

모든 군에서의 종양조직은 밝고 큰 타원형의 핵을 지니고 있는 방추형의 세포로 구성되어 있었으며 여러 개의 뚜렷한 핵소체와 핵분열상이 곳곳에서 관찰되었다(Fig. 4).

종양이 유발된 대조군의 종양조직 중심부의 대부분은 출혈 및 광범위한 괴사가 진행되었으며, 종양조직과 괴사조직사이에 많은 수의 호중구가 침윤되어 있었다

Table 2. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the tumor volume and weights of B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice.

Group	Day after administration			
	0		9	
	Volume(mm ³)	Weight(g)	Volume(mm ³)	Weight(g)
Normal	-	-	-	-
Control	197.0±62.1 ^a	-	2182.3±1211.2	3.20±0.78
Doxo	184.5±40.9	-	742.2±343.8*	1.20±0.51***
Doxo+CWG	189.5±45.9	-	887.3±298.4	1.06±0.33
CWG	192.0±89.7	-	1821.3±235.1	2.11±0.57*

a : Mean ± S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

* : significantly different from the value with control group(* : p<0.05, *** : p<0.001).

Table 3. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the index of RBC, hemoglobin, hematocrit and reticulocytes of B16/F10 melanomas-bearing C57BL/6 mice.

Group	RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb(g/dl)	Hct(%)	Reti(%)
Normal	9.5 \pm 0.3 ^a	14.4 \pm 0.7	56.3 \pm 2.0	4.4 \pm 1.2
Control	6.1 \pm 1.0 ^{###}	9.1 \pm 1.5 ^{###}	35.7 \pm 5.6 ^{###}	12.6 \pm 9.4 ^{###}
Doxo	5.1 \pm 1.7	8.6 \pm 2.7	31.1 \pm 10.4	0.3 \pm 0.2 ^{**}
Doxo+CWG	6.1 \pm 1.1	9.0 \pm 1.6	34.2 \pm 4.7	0.7 \pm 0.5
CWG	6.0 \pm 1.2	8.7 \pm 1.8	35.7 \pm 5.2	15.2 \pm 14.5

a : Mean \pm S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

: significantly different from the value with normal group(## : p<0.01, ### : p<0.001).

* : significantly different from the value with control group(** : p<0.01).

Table 4. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the index of WBC, neutrophil, lymphocyte and platelets of B16/F10 melanomas-bearing C57BL/6 mice.

	WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Neu(%)	Lym(%)	PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)
Normal	1.8 \pm 0.8 ^a	15.7 \pm 5.0	81.8 \pm 6.4	1013 \pm 125
Control	2.2 \pm 0.4	38.7 \pm 15.1 [#]	58.3 \pm 16.2 [#]	626 \pm 182 [#]
Doxo	1.7 \pm 0.5	43.7 \pm 20.5	53.2 \pm 19.4	1593 \pm 441 ^{***}
Doxo+CWG	1.7 \pm 0.4	41.2 \pm 8.2	55.8 \pm 8.1	1709 \pm 291
CWG	2.3 \pm 0.6	39.8 \pm 24.4	58.5 \pm 22.5	704 \pm 197

a : Mean \pm S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

: significantly different from the value with normal group(## : p<0.01).

* : significantly different from the value with control group(*** : p<0.001).

(Fig.5).

Doxorubicin을 투여한 Doxo군 및 doxorubicin과 산삼 추출액을 병용투여한 Doxo+CWG군에서는 괴사된 부위가 대조군에 비해서 월등히 넓게 관찰되었으며 중앙조직은 중앙괴 주변에 얇은 띠를 이루는 정도로 관찰되었다(Fig. 6).

산삼추출액만 투여한 CWG군의 병리조직학적 소견은 대조군과 유사한 정도로 관찰되었다.

(2) 고환조직

정상군의 고환조직은 모든 발육 단계의 정세관이 활

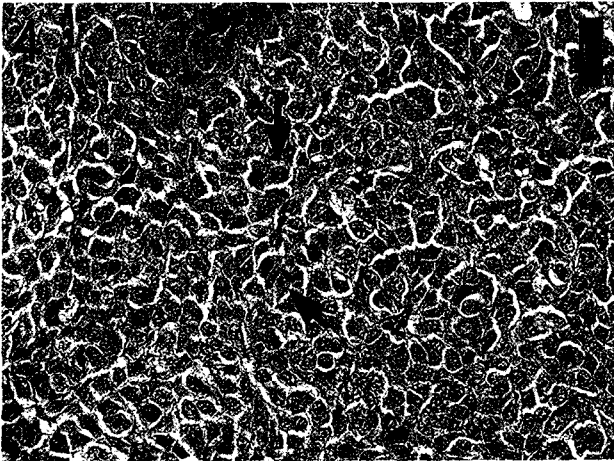


Fig. 4 Histology of B16/F10 cell implanted tumor tissue. Tumor tissue were consisted with large spindle shaped cells with round nuclei and many mitotic figures(arrows) were seen. H&E stain, scale bar = 20 μ m

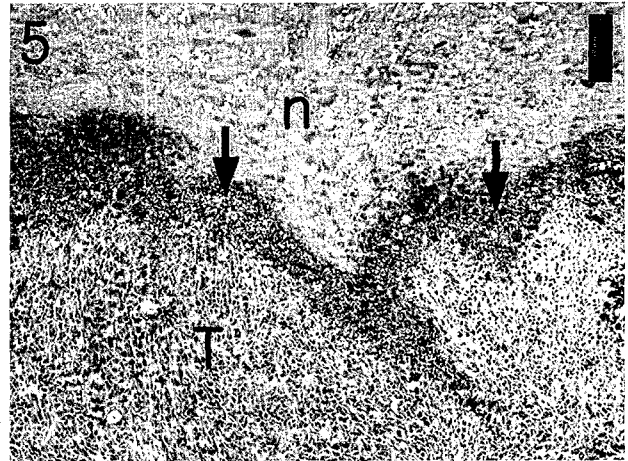


Fig. 5 Histology of B16/F10 cell implanted tumor tissue of control group. Massive necrosis(n) and infiltration of inflammatory cells(arrows) were seen at periphery of tumor tissue(T). H&E stain, scale bar = 200 μ m

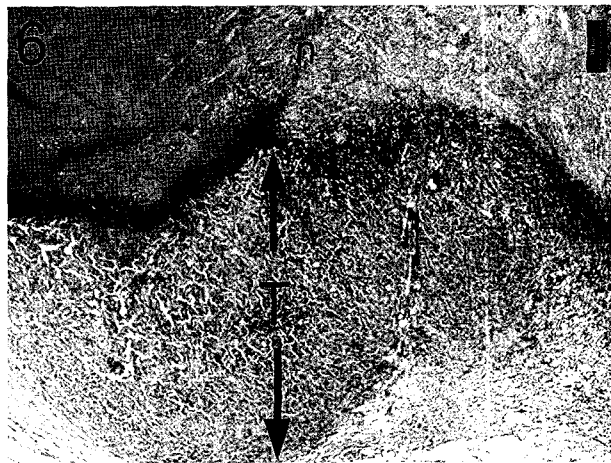


Fig. 6 Histology of B16/F10 cell implanted tumor tissue of Doxo group. Massive necrosis(n) and relatively thin area of alived tumor tissue(T between arrows) were observed. H&E stain, scale bar = 400 μ m

발한 증식상태에 놓여 있으며, 정조세포, 정모세포, 정자세포가 치밀하게 증식되어 있었다(Fig. 7).

중양이 유발된 대조군과 산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 모두 정상군과 유사한 정도로 관찰되었다.

Doxorubicin을 투여한 Doxo군에서는 대부분 정세관 상피세포의 치밀도가 현저히 감소되어 있었으며, 정세관 상피세포사이의 연결성이 상실되어 있었다(Fig. 8). 성숙중인 정자세포(spermatid)의 증식이 많은 정세관에서 확인되고 있었으나, 정조세포 및 정자세포의 수는

현저히 감소되어 있었고 지지세포(Sertoli's cell)가 주된 정세관 상피세포로 관찰되었다. 또한 많은 부위에서 정세관상피세포가 괴사되고 탈락되어 정세관 내강에 저류되어 있는 소견도 관찰되었다(Fig. 8)

Doxorubicin과 산삼추출액을 병용투여한 Doxo+CWG군에서는 정상군에 비해서 정세관상피세포층의 두께가 다소 감소되어 관찰되기는 하였으나 세포사이의 연결성이 모두 유지되고 있으며, 정자세포의 활발한 증식이 대부분의 정세관에서 관찰되어 정상과 유사한 소견을



Fig. 7 Histological structure of testis of normal group. Well developed variable stages of seminiferous tubules. H&E stain, scale bar = 50 μ m

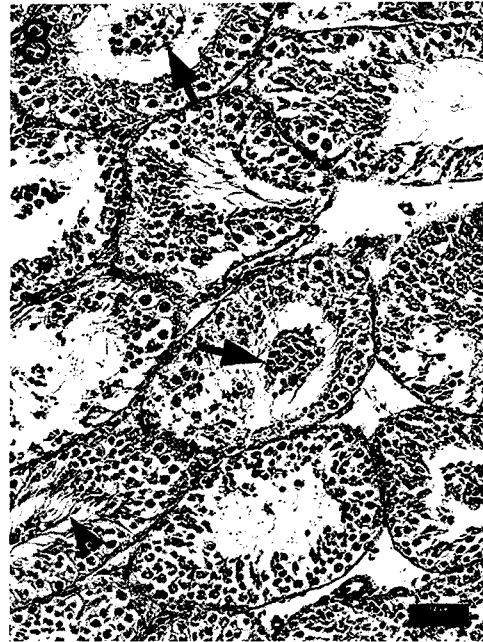


Fig. 8 Histological structure of testis of Doxo group. The structure of most seminiferous tubules were disrupted. Note the poor cellularity of seminiferous epithelia and desquamated necrotic epithelia (arrows). Occasionally spermiogenesis were seen in some tubule (arrowhead). H&E stain, scale bar = 50 μ m

나타내었다(Fig. 9). 병리조직학적 독성 소견을 보인 경우에서도 Doxo군에 비해서 세포간의 연결성 및 정자세포의 증식정도가 양호하게 관찰되었다(Fig. 10).

(3) 간장 및 신장

간장 및 신장은 doxorubicin을 투여한 Doxo군을 비롯한 모든 group에서 정상범위 수준의 소견만이 관찰되었다.

7. 고환의 정세관 직경과 정세관당 정조세포 수의 변화

모든 group에서 정세관 직경은 큰 차이를 보이지 않았다.

정세관당 정조세포의 수는 종양이 유발된 대조군과 정상군의 차이는 없었으나, doxorubicin을 투여한 Doxo군이 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

Doxorubicin과 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+

CWG군에서는 Doxo군에 비하여 유의성있게 증가하였고, 산삼추출액만 투여한 CWG군에서도 대조군에 비하여 유의성있게 증가되었다(Table 5).

8. 고환조직의 BrdU 양성 반응 세포의 종류

정상군에서는 대부분의 주기에 있는 정세관의 정조세포에서 BrdU 양성 반응이 강하게 확인되었다(Fig. 11). 정세관 주기에 따라서는 정조세포외에도 정모세포(spermatocyte) 및 정자세포(spermatid)에서도 미약한 정도의 양성반응이 곳곳에서 관찰되었다.

종양이 유발된 대조군에서는 정상군과 유사한 정도로 BrdU 양성 반응 및 양성세포가 관찰되었다.

Doxorubicin을 투여한 Doxo군에서의 BrdU 양성반응은 정조세포에서는 전혀 관찰되지 않았으며, 정상군에 비해서 드물기는 하였으나 정모세포(spermatocyte) 및 정자세포(spermatid)에서 미약한 정도의 양성반응을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

Doxorubicin과 산삼추출액을 병용투여한 Doxo+CWG

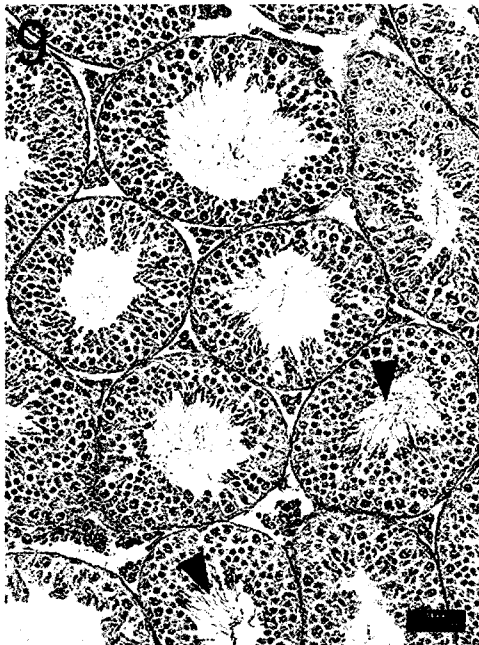


Fig. 9 Histological structure of testis of Doxo+CWG group. Note the dense cellularity of seminiferous epithelia and active spermiogenesis (arrowheads). Compare with Fig. 8. H&E stain, scale bar = 50 μ m

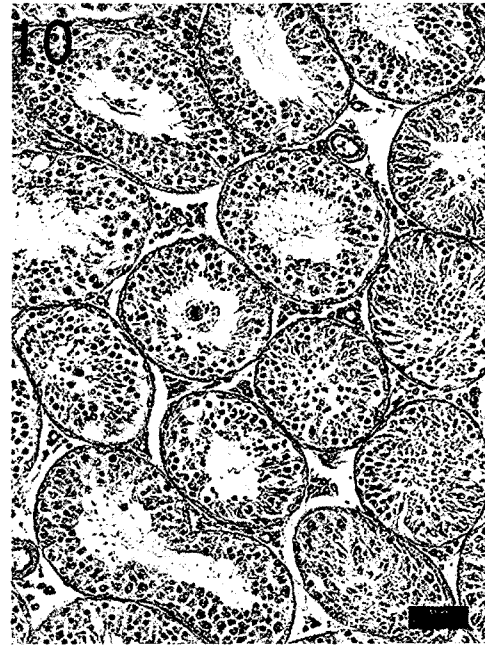


Fig. 10 Histological structure of testis of Doxo+CWG group. Most severe case of testotoxicity in this group. Cellularity of seminiferous epithelia was increased than that of doxorubicin treated group. Compare with Fig. 8. H&E stain, scale bar = 50 μ m

Table 5. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the diameter of seminiferous tubules and numbers of spermatogonia of B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice.

	diameter(mm)	spermatogonia
Normal	0.18 \pm 0.01 *	66.2 \pm 2.0
Control	0.19 \pm 0.01	64.4 \pm 3.0
Doxo	0.18 \pm 0.01	38.5 \pm 3.0 ***
Doxo+CWG	0.19 \pm 0.01	47.0 \pm 3.3 ###
CWG	0.19 \pm 0.01	69.3 \pm 4.2 *

a : Mean \pm S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

* : significantly different from the value with control group(* : p<0.05, *** : p<0.001).

: significantly different from the value with Doxo group(### : p<0.001).



Fig. 11 BrdU immunohistochemistry of testis of normal group. Most of spermatogonia (arrowheads) were labelled strongly with BrdU. Occasionally spermatocytes and spermatids (arrows) were also labelled with BrdU. scale bar = 30 μ m

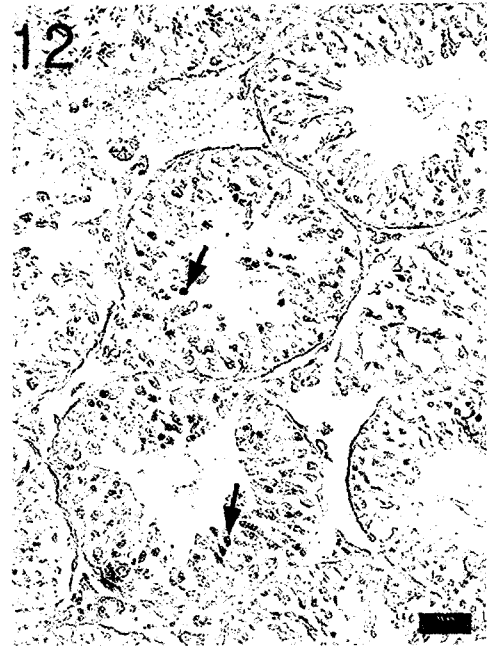


Fig. 12 BrdU immunohistochemistry of testis of Doxo group. Any of spermatogonia labelled with BrdU were not observed. But weak labelling with BrdU was observed in some spermatocytes and spermatids (arrows). scale bar = 30 μ m

군에서는 정조세포에서의 BrdU 양성 반응은 모든 단계의 정세관에서 일정한 빈도로 관찰되었으며, 정모세포 및 정자세포에서의 BrdU 양성 반응은 Doxo군은 물론 정상군에 비해서도 월등히 강한 강도 및 빈도로 관찰되었다(Fig. 13).

산삼추출액만 투여한 CWG군의 정조세포에서의 BrdU 양성반응은 정상군 및 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나, 정모세포 및 정자세포의 양성 반응의 강도 및 빈도는 증가되어 있었다(Fig. 14).

9. 고환조직의 BrdU 정조세포수의 변화

정상군을 비롯하여 종양이 유발된 대조군은 동일한 결과를 나타내었으나, doxorubicin을 투여한 Doxo군은 대조군에 비하여 BrdU 양성세포는 전무한 결과를 나타내었다(Table 6).

Doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서는 Doxo군에 비하여 BrdU 양성세포가 유의성있게 증가하였다(Table 6).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서는 정상과 같은 수준을 나타내었다(Table 6).

10. 고환조직의 TUNEL 양성 반응 세포의 종류

정상군을 비롯한 모든 group에서 TUNEL 양성 세포는 백막 주위의 정세관내 정조세포(Fig. 15)에서 간혹 관찰되었으며 정모세포 및 정자세포에서는 매우 드물게 관찰되었다.

11. 고환조직의 TUNEL 양성 정조세포 수의 변화

정상군을 비롯하여 종양이 유발된 대조군은 동일한 결과를 나타내었다.

Doxorubicin을 투여한 Doxo군은 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였고, doxorubicin 및 산삼추출액을 병용 투여한 Doxo+CWG군에서는 Doxo군에 비하여 TUNEL 양성세포가 감소하는 경향은 있었으나 유의한 차이는 없었다(Table 7).

산삼추출액만 투여한 CWG군에서도 TUNEL 양성세포가 증가하는 경향을 보였으나 대조군과의 유의성은 없었다(Table 7).

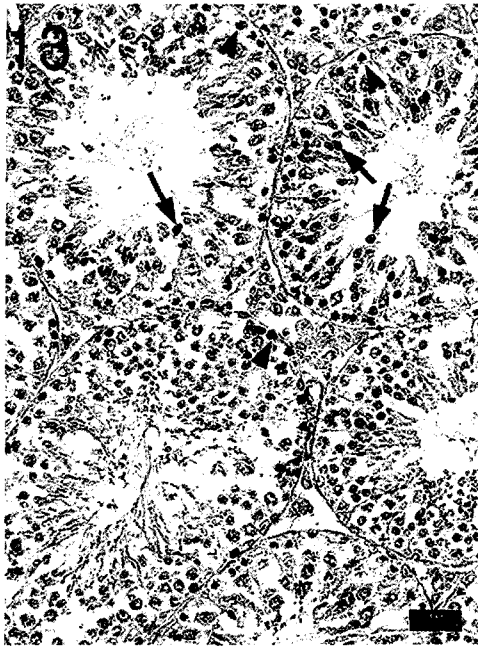


Fig. 13 BrdU immunohisto- chemistry of testis of Doxo+CWG group. Many spermatogonia (arrow heads) were labelled with BrdU. And the incidence and intensity of BrdU labelled spermatocytes and spermatids (arrows) were increased than those of doxorubicin group. Compare with Fig. 12. scale bar = 30 μ m

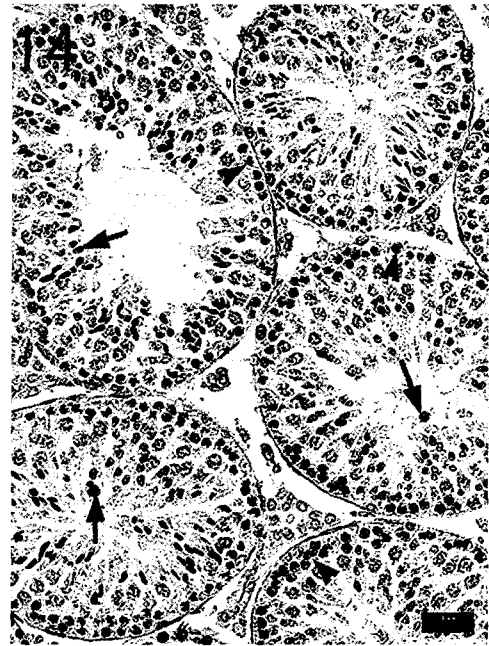


Fig. 14 BrdU immunohisto- chemistry of testis of CWG group. Most of spermatogonia (arrow heads) were labelled strongly with BrdU. And the incidence and intensity of BrdU labelled spermatocytes and spermatids (arrows) were increased than those of normal group. scale bar = 30 μ m

Table 6. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the numbers of spermatogonia labelled with BrdU of B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice.

	BrdU +		BrdU -	
	count	%	count	%
Normal	57.3 \pm 2.5 ^a	86.4 \pm 3.2	9.0 \pm 2.1	13.6 \pm 3.2
Control	55.5 \pm 2.1	86.1 \pm 2.1	9.0 \pm 1.6	13.9 \pm 2.1
Doxo	0.0 \pm 0.0 ^{***}	0.0 \pm 0.0 ^{***}	38.5 \pm 3.0 ^{***}	100.0 \pm 0.0 ^{***}
Doxo+CWG	6.9 \pm 1.2 ^{###}	14.8 \pm 2.9 ^{###}	40.1 \pm 3.5	85.2 \pm 2.9 ^{###}
CWG	60.7 \pm 2.8 ^{**}	87.7 \pm 2.2	8.6 \pm 1.9	12.3 \pm 2.2

a : Mean \pm S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

* : significantly different from the value with control group(** : p<0.01, *** : p<0.001).

: significantly different from the value with Doxo group(### : p<0.001).

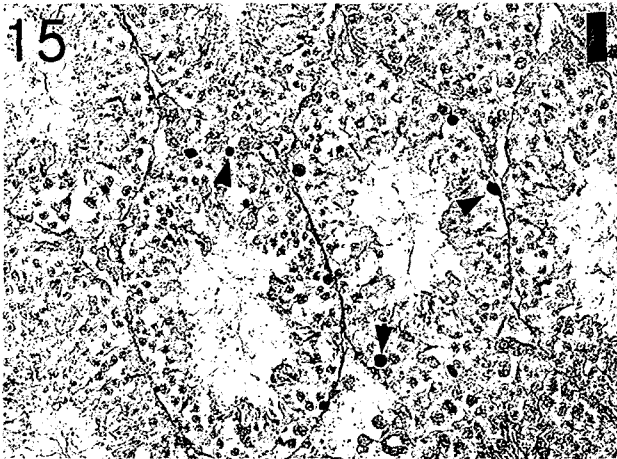


Fig. 15 TUNEL immunohistochemistry of testis of Doxo group. A few of spermatogonia were labelled with TUNEL. scale bar = 30 μ m

Table 7. Effects of Cultivated Wild Ginseng water extract on the numbers of spermatogonia labelled with TUNEL of B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice.

TUNEL	+
Normal	37.3 \pm 12.9 ^a
Control	40.5 \pm 8.7
Doxo	61.7 \pm 24.4
Doxo+CWG	54.3 \pm 17.1
CWG	48.8 \pm 9.3

a : Mean \pm S.D.(n=6)

Normal : i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Control : Melanona-bearing, and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and i.p. injection of normal saline 0.5 ml/day for 10 days.

Doxo+CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of doxorubicin 4 mg/kg at 1, 4, 7 day and Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

CWG : Melanona-bearing, and i.p. injection of Cultivated Wild Ginseng water extract 0.5 ml/day for 10 days.

IV. 考 察

山蔘은 五加科(두릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 多年生 草本인 人蔘(Panax ginseng C. A. Meyer)이 야생에서 자연발생적으로 발아하여 성장한 人蔘을 말하며, 人蔘이나 山蔘의 種子 또는 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 人蔘을 山養山蔘이라 한다⁹⁾.

人蔘은 味甘하고 微寒無毒하며 定魂魄·止驚悸·除邪氣·明目開心益智·久服輕身延年하는 효능¹⁰⁾이 있다고 기재되어 있으며, 신경계·내분비계·순환계·물질대사를 비롯한 생체 전반에 영향을 미치지 않는 곳이 없을 정도로 다양한 효능¹¹⁾을 나타내는 약물이다.

山蔘은 희귀성과 高價의 약물인 점등으로 山蔘 자체에 대한 연구는 찾아보기 힘든 실정이나 최근 山養山蔘의 재배뿐만 아니라 山蔘의 성장점을 배양한 培養山蔘의 생산이 많아져 이를 이용한 제품개발과 효능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

山養山蔘의 효능에 대한 연구로 김 등¹²⁾은 HL-60 세포를 이용한 항암효과연구에서 山養山蔘이 人蔘에 비하여 효과가 앞서는 것으로 보고하였고, 이 등¹³⁾은 山養

山蔘 藥液을 인체의 血脈에 주입하였을 때 혈장 면역단백질(CR2-C3d) 증가, antitrypsin 감소, vitamin D binding protein 증가 등의 효과가 있는 것으로 보고하였으며, 곽 등¹⁴⁾은 山養山蔘 藥液이 A549 human lung cancer cell에서 apoptosis 유도에 의해 세포사멸효과를 나타내는 것으로 보고하였다.

이와 같은 山養山蔘의 항암효과와 면역단백질을 증가시킨 효과는 山養山蔘이 인체의 元氣를 補益하여 邪氣와 질병에 대한 저항력 또는 면역력을 강화시킨 결과로 추측할 수 있다.

특히 장기이식 등으로 면역억제제를 투여하거나 선천성 면역능력 결핍증 환자에서 암발생율이 높고, 면역능력이 저하된 환자에서 암성장이 더 빠르다는 것¹⁵⁾은 한의학에서 인체의 모든 질병은 正氣와 邪氣의 균형이 失調되어 발생한다는 이론^{3,4)}과 많은 상관성이 있으므로 扶正祛邪의 治法^{5,6)}은 중앙의 치료뿐만 아니라 암환자 삶의 질을 향상시키는 측면에서도 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이에 저자는 본 실험에서 B16/F10 세포를 이식하여 중앙을 유발한 C57BL/6 생쥐를 이용하여 山養山蔘이

항암효과가 있는가, *Streptomyces Peucetius*로부터 추출된 항생제로 DNA 염기쌍 사이에 삽입되어 DNA 복제와 전사과정을 억제하여 항암효과를 나타내는 doxorubicin¹⁵과 山養山蔘을 병용투여하였을 때 상승효과를 나타내는가, doxorubicin이 여러 종류의 종양에 대하여 항암효과를 나타내지만 심장독성^{15,16}, 골수억제¹⁵, 간독성¹⁶, 신독성¹⁷, 고환독성¹⁸ 등을 유발하는 것으로 알려져 있기에 山養山蔘이 항암제의 독성을 완화시킬 수 있는가의 세 가지 측면에서 연구하였다.

각 실험군의 체중변화를 측정한 결과 Doxo군은 다른 연구결과^{19,20}와 동일하게 체중이 감소하였으나 Doxo+CWG군에서는 체중이 감소되지 않았고 CWG군에서는 체중이 정상적으로 증가하여 山養山蔘이 doxorubicin의 독성에 의한 체중감소를 방지한 것으로 판단된다.

종양을 육안으로 관찰한 바, 대조군에서는 종양 크기가 현저히 증가되었고 종양의 중심부가 괴사되어 출혈이 진행되면서 표면에 가피가 형성되었으나 Doxo군에서는 종양의 단단한 경도가 감소되면서 종양이 원형을 유지하지 못하고 다소간 평평하게 퍼지는 형태로 변하였고 종양의 중심부에 궤양이 형성되는 것이 관찰되어 doxorubicin의 항암효과를 확인할 수 있었다.

그러나 Doxo+CWG군에서의 소견은 Doxo군에서 관찰된 소견과 유사하여 山養山蔘에 의한 항암효과의 상승작용을 관찰 할 수는 없었으며, CWG군의 육안 소견은 대조군에서 관찰된 소견과 유사하여 山養山蔘의 항암효과를 관찰할 수 없었다.

종양의 체적과 무게를 측정한 결과 대조군에 비하여 Doxo군에서 종양의 체적과 무게가 감소하여 doxorubicin의 항암효과를 확인할 수 있었으며, Doxo+CWG군에서도 Doxo군과 동일한 결과를 나타내어 山養山蔘에 의한 항암효과의 상승작용을 관찰 할 수는 없었다. 그러나 CWG군이 대조군에 비하여 종양의 체적과 무게가 감소하여 山養山蔘이 단독으로 항암효과를 나타내는 것으로 보인다.

종양의 병리조직학적 소견에서 Doxo군과 Doxo+CWG군에서 모두 대조군 보다 괴사된 부위가 넓게 나타났고 종양조직은 종양피 주변에 얇은 띠를 이루는 정도로 나타나 山養山蔘의 투여에 의한 상승효과를 관찰할 수 없었으며, CWG군은 대조군과 유사한 정도로 관찰되어 山養山蔘 투여에 의한 종양조직에서의 특이한 변화는 관찰할 수 없었다.

고환의 병리조직학적 소견에서 대조군은 정상군과 유사하였으나 Doxo군에서는 정세관 상피세포의 치밀도가 감소되고 정세관 상피세포사이의 연결성이 상실되었으며, 정조세포 및 정자세포의 수가 감소되고 많은 부위에서 정세관상피세포가 괴사되고 탈락되는 등 다른 연구보고^{19,20}와 동일한 doxorubicin에 의한 고환독성을 확인할 수 있었다. 그러나 Doxo+CWG군에서는 정세관 상피세포 사이의 연결성이 모두 유지되고 있었고 정자세포의 증식이 대부분의 정세관에서 정상과 유사한 소견을 나타내었으며, 독성 소견을 보인 경우에도 Doxo군에 비하여 세포간의 연결성 및 정자세포의 증식 정도가 양호하게 관찰되어 山養山蔘이 doxorubicin에 의한 고환독성을 감소된 것으로 나타났다.

정세관당 정조세포의 수는 대조군은 정상군의 차이는 없었으나, Doxo군이 대조군에 비하여 감소되어 doxorubicin에 의하여 독성이 유발된 것을 확인할 수 있었다^{21,22}. 그러나 Doxo+CWG군에서는 Doxo군에 비하여 증가되었고, CWG군에서는 대조군 보다도 증가된 것으로 나타나 山養山蔘이 doxorubicin에 의한 고환독성을 경감시킨 것으로 판단된다.

BrdU 염색에서 정상군은 대부분의 주기에 있는 정세관의 정조세포에서 강한 양성 반응이 확인되었고, 주기에 따라서 정모세포(spermatocyte)와 정자세포(spermatid)에서도 미약한 양성반응이 관찰되었으며, 종양이 유발된 대조군에서도 정상군과 유사한 정도로 BrdU 양성 반응 및 양성세포가 관찰되었다.

Doxo군에서는 정조세포에서는 BrdU 양성반응이 전혀 관찰되지 않았으며, 정모세포(spermatocyte) 및 정자세포(spermatid)에서 미약하게 양성반응이 나타나 doxorubicin이 정자의 형성에 심각한 손상을 미친 것을 확인할 수 있었다²³.

그러나 Doxo+CWG군에서는 정조세포에서의 BrdU 양성 반응은 모든 단계의 정세관에서 일정한 빈도로 관찰되고, 정모세포 및 정자세포에서의 BrdU 양성 반응은 정상군에 비해서도 월등히 강한 강도 및 빈도로 관찰되었으며, CWG군에서도 정조세포에서의 BrdU 양성 반응은 정상군 및 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나, 정모세포 및 정자세포의 양성 반응의 강도 및 빈도는 증가되어 있었다.

또한 BrdU 염색에 양성반응을 나타낸 정조세포의 수도 정상군과 대조군은 동일한 결과를 나타내었으나, Doxo군은 대조군에 비하여 BrdU 양성세포는 전무하였

으며, Doxo+CWG군은 Doxo군에 비하여 BrdU 양성세포가 유의성있게 증가하였고 CWG군에서는 정상과 같은 수준을 나타내었다.

Doxorubicin이 정세관 상피세포와 정조세포 및 정모세포에서 독성을 유발하는 데는 apoptosis가 중요한 역할을 하는 것으로 보고^{24,25)}되었으나, 본 실험에서는 고환조직의 TUNEL 염색에서 정상군을 비롯한 모든 group에서 TUNEL 양성 세포가 백막 주위의 정세관내 정조세포에서 간혹 관찰되었으며 정모세포 및 정자세포에서는 매우 드물게 관찰되었고, 양성세포의 수도 각 group 사이에 유의한 차이를 보이지 않아 apoptosis가 고환독성에 관계하는지와 apoptosis와 관련한 山養山蔘의 작용여부에 대하여 결론을 내릴 수는 없었다. 이것은 실험결과의 편차가 큰 점으로 보아 실험과정에 문제점이 발생하였을 가능성도 있으므로 다시 실험연구를 통하여 검증할 필요가 있다고 생각된다.

이상의 실험결과 山養山蔘은 B16/F10 세포를 이식하여 종양을 유발한 생쥐에서 종양의 증식을 억제하는 효과가 있으며, 항암제 doxorubicin에 의한 체중의 감소와 고환독성을 방어하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

V. 結 論

산양산삼의 항암효과와 항암제의 독성에 미치는 영향을 검증하고자 C57BL/6 생쥐에 B16/F10 세포를 이식하여 종양을 유발한 다음 doxorubicin 투여, 산양산삼 투여, doxorubicin과 산양산삼의 병용 투여한 군으로 구분하여 실험하였다.

실험결과 Doxo군은 대조군에 비하여 체중이 감소되었으나 Doxo+CWG군은 체중이 감소되지 않았으며, CWG군에서는 정상적인 체중의 증가를 나타내었다.

Doxo군과 Doxo+CWG군은 대조군에 비하여 종양의 체적과 무게가 현저하게 감소되었으며, CWG군에서도 종양의 무게는 유의성있게 감소되었고 체적도 감소되는 경향을 보였다. 그러나 Doxo군과 Doxo+CWG군의 차이점은 발견할 수 없었다. Doxo군은 대조군에 비하여 고환에서 정세관 상피세포의 치밀도, 정조세포 및 정자세포의 수가 현저히 감소되었다. 그러나 Doxo+CWG군에서는 세포사이의 연결성이 모두 유지되었고, 정자세포의 활발한 증식이 대부분의 정세관에서 관찰되어 정상과 유사하게 관찰되었다. CWG군은 정상군과 동일한

소견을 나타내었다.

또한 정세관 당 정조세포의 수도 Doxo군에서는 현저하게 감소되었으나 Doxo+CWG군에서는 유의성있게 증가되었고, CWG군에서는 대조군보다 증가되었다. 정세관의 BrdU 염색에서도 Doxo군은 정조세포에서는 BrdU 양성반응이 전혀 관찰되지 않았고 정모세포와 정자세포에서 미약하게 나타났다. 그러나 Doxo+CWG군에서는 정조세포의 BrdU 양성 반응이 모든 단계의 정세관에서 일정한 빈도로 관찰되었으며, 정모세포와 정자세포에서의 BrdU 양성반응도 Doxo군은 물론 정상군에 비해서도 월등히 강한 강도 및 빈도로 관찰되었다.

이상의 결과 山養山蔘은 종양의 증식을 억제하는 효과가 있으며, 항암제 doxorubicin에 의한 체중의 감소와 고환독성을 방어하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

Acknowledgement

"This study was supported by a grant of the Oriental Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (B050054)"

參考文獻

1. 서울대학교 의과대학. 종양학, 서울대학교출판부, 서울, 1, 1996.
2. 김진복. 암면역학과 면역요법, 대한면역학회지, 8(1): 73-83, 1986.
3. 김달호, 이종형. 황제내경소문(상), 도서출판 의성당, 서울, 726-727, 2001.
4. 김달호, 이종형. 황제내경소문(하), 도서출판 의성당, 서울, 746-747, 2001.
5. 손창규, 조종관. 癌 治療에 있어서 扶正祛邪法의 운용에 관한 고찰, 대한한방내과학회지, 16(2): 30-35, 1995.
6. 공현식, 유봉하, 박동원, 유기원. 한국한의학의 종양 연구에 대한 현황, 대한한방종양학회지, 1(1): 55-81, 1995.
7. 李時珍. 本草綱目, 高文社, 서울, 405-412, 1987.
8. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典, 大成出版社, 대구, 29-36, 1984.
9. 신순식, 김경철, 최영현, 이용태, 엄현섭, 김창식. 산삼

- 감정 기준의 객관성, 동의한의연, 5 : 107-114, 2001.
10. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과에 대한 비교연구, 대한본초학회지, 19(2) : 41-50, 2004.
 11. 이동희, 권기록. 산양산삼 증류약침의 혈맥주입 후 나타나는 혈장의 Proteom 분석, 대한약침학회지, 2006 ; 9(2) : 17-38.
 12. 곡경승, 이선구, 권기록, pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약침의 Apoptosis에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 21(6) : 1-17, 2004.
 13. 홍사석, 이우주의 약리학강의, 의학문화사, 서울, 655-656, 1993.
 14. Labonté P., Kadhim S., Bowlin T., Mounir S., Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model, Hepatology Research, 18 : 72-85, 2000.
 15. 정희상, 박찬국, 이승일, 문철웅, 김만우, 장경식, 정춘해, 홍순표. Doxorubicin의 백서 심장독성에 관한 연구, 대한내과학회잡지, 42(2) : 209-217, 1992.
 16. Abd El-Aziz M.A. Othman, A.I., Amer M. and El-Missiry M.A., Potential Protective Role of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors Captopril and Enalapril against Adrimycin-induced Acute Cardiac and Hepatic Toxicity in Rats, J. Appl. Toxicol., 21 : 469-473, 2001.
 17. Mansour M. A., El-Kashef H. A. and Al-Shabanah O. A., Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats, Pharmacological Research, 39(3) : 233-237, 1999.
 18. Shinoda K., Mitsumori K., Yasuhara K., Uneyama C., Onodera H., Hirose M., Uehara M., Doxorubicin induces male germ cell apoptosis in rats, Arch. Toxicology, 73 : 274-281, 1999.
 19. Yachi K., Yamauchi H., Kikuchi H., Screening and biological evaluation of liposomal formulations containing Adriamycin, Advanced Drug Delivery Reviews, 24 : 123-131, 1997.
 20. Roh Y. W., Ji H. J., Chai H. Y., Hwang S. Y., Nam S. Y., Hong J. T., Sung J. H., Kim H. K., Kang H. G., Kim Y. B. and Kang J. K., Antitumor and cardioprotective effects of a ginseng intestinal metabolite in combination with doxorubicin in sarcoma-180 tumor-bearing mice, The Korean Journal of Laboratory Animal Science, 20(4) : 348-356, 2004.
 21. Sjöblom T., West A. and Lähdetie J., Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin and diepoxybutane, Environmental and Molecular Mutagenesis, 31 : 133-148, 1998.
 22. Park E. S., Kim S. D., Lee M. H., Lee H. S., Lee I. S., Sung J. K. and Yoon Y. S., Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats, Journal of Veterinary Science, 4(2) : 129-136, 2003.
 23. Kang J. K., Lee Y. J., No K. O., Jung E. Y., Sung J. H., Kim Y. B., Nam S. Y., Ginseng intestinal metabolite- I (GIM- I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis, Reproductive Toxicology, 16 : 291-298, 2002.
 24. 손우찬, 김형진, 이영순. BrdU에 의한 DNA 표지법과 형태측정 방법을 이용한 랫트의 정소독성 연구, Korean J. Toxicol, 7(1) : 83-92, 1991.
 25. Suominen J. S., Linderborg J., Nikula H., Hakovitra H., Parvinen M., Toppari J., The effects of mono-2-ethylhexyl phthalate, adriamycin and N-ethyl-N-nitrosourea on stage-specific apoptosis and DNA synthesis in the mouse spermatogenesis, Toxicology Letters, 143 : 163-173, 2003.