

增損五積丸 脾積方이 생쥐의 복강암에 미치는 영향

이유진 · 김종한 · 박수연 · 최정화
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of Jeungson-Ojeok-Hwan-Bijukbang on Solid Tumor in Mice

Yu-Jin Lee · Jong-Han kim · Su-Yeon Park · Jeong-Hwa Choi

Objective : Jeungson-Ojeok-Hwan Bijukbang(JOH) has been used to treat patients with tumor etc. In the theory of Korean medicine, JOH can treat Juk-Chui. JOH is known to have treat Juk-Chui. Juk-Chui is analogous to tumor.

Methods : For these reasons, the present study was designed to investigate the effects of JOH on solid tumor in mice in terms of immune-potentiating and direct cytotoxic action of JOH in *vitro* and *vivo* study. The present author investigated thymocyte and splenocyte proliferation to confirm immune-potentiating activity of JOH and also investigated tumor/body weight ratio and survival rates in tumor bearing mice.

Results : In this study, administration of JOH decreased tumor/body weight ratio significantly, and prolonged survival duration compared to non-treated control. In addition, treatment with JOH suppressed proliferation rate of Sarcoma 180 (S-180) cells significantly, and elevated proliferation rates of thymocytes isolated from normal mice. These results were co-related with *in vivo* study.

Conclusion : these results suggest that JOH is useful to treat patient with solid tumor, because JOH has direct toxic action for tumor cell and immune-potentiating action for T cells. Further study will need to elucidate exact mechanisms related in anti-cancer action of JOH.

Key words : Jeungson-Ojeok-Hwan-Bijukbang, Juk-Chui, Solid Tumor, Tumor/body weight ratio, Survival rates, Thymocyte, Sarcoma 180 (S-180) cells.

1. 서론

醫學入門에 最初로 收錄된 增損五積丸은 「治五積及一切積塊之在臍上下左右者」라하여 積聚에 使用되어 온 처방으로, 五積(肝積, 心積, 脾積, 肺積, 腎積)의 치료시 각 약물의 용량을 변화시키고 수종의 약물을 가감하여 五積治療에 통용되어 왔다^{1,2)}.

교신저자 : 최정화. 동신대학교부속광주한방병원. 안이비인후피부과학교실.

(Tel, 062-350-7217, E-mail, eu211@hanmail.net)

• 접수 2010/03/05 • 수정 2010/04/02 • 채택 2010/04/05

‘積’은 원래 ‘跡’의 의미로 고형 성분이 쌓여서 일정한 형태의 병변을 형성함을 말하고, ‘聚’는 ‘緒’와 같은 뜻으로 무형 성분이 모여서 유형적인 병변을 초래하기는 하나 聚散이 일정치 않은 것을 말한다. 積聚는 암에 해당하며, 積은 유형의 덩어리로 암과 더욱 관련이 깊은 것으로 인식되고 있다³⁾.

2009년 통계청 발표에 따르면, 2008년 우리나라 3대 사망원인은 악성신생물, 뇌혈관질환, 심장질환순으로 악성신생물이 1위를 차지 하였으며, 암에 의한 사망률은 해마다 증가하고 있는 것으로 나타났다⁴⁾. 암을 치료하기 위하여 다양한 치료방법들이 사용되고 있으나, 수술요법 및 방사선 요법과 같은 국소요법은 한계점이 있으며, 전신요법 및 면역요법도 현재로는 치료방법이 정립되어 있지 않은 상태이다⁵⁾. 이에 세계의 의료계에서는 암에 대한 연구에 큰 비중을 두고 있으며, 최근 한약 및 침구를 병용하는 종합치료를 시도함으로써 암치료를 위한 새로운 국면으로 나아가고 있다.⁶⁾.

增損五積丸에 관한 기존 연구로 金⁷⁾등은 增損五積丸 腎積方의, 李⁸⁾등은 增損五積丸 脾積方의 항암효과를 연구하였으나 *in vitro*에 그쳤다.

이에 저자는 增損五積丸 脾積方의 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항암효과 및 그 작용 기전을 규명하기 위하여 Sarcoma 180세포를 이용하여 복강암을 유발하고, 체중 및 암종의 무게에 미치는 영향 및 생존을 변화를 관찰하고, 실험관 내에서 S-180세포, 비장세포 및 흉선세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주 및 배양환경

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 복강암 세

포주인 Sarcoma-180세포를 사용하였다. Sarcoma-180 세포주와 비장세포 및 흉선세포의 유지를 위하여 RPMI 1640 (Sigma R4130) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco, LOT# 1006842)과 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/µl)을 첨가하여 사용하였다. 세포주와 면역세포는 37 °C, 5% CO₂ 환경 하에 유지 하였다.

2) 실험 동물

Balb/c계 8 주령된 수컷 생쥐를 샘타코 (Samtako, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 사육 조건은 온도 20±3 °C, 습도 55±5%, light/dark 12 hr하에서 고형 사료와 물을 자유로이 섭취케 하였다. 모든 실험 동물은 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 약재

增損五積丸 脾積方(JOH)은 동신대학교 광주한방병원을 통하여 구입, 정선하여 사용하였다. 처방 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of JOH

韓藥名 (Herbal Name)	生藥名 (Scientific Name)	重量(g) (Amount)
黃連	<i>Rhizoma coptidis</i>	28g
厚朴	<i>Cortex Magnoliae</i>	32g
川烏	<i>Radix Aconiti</i>	2g
乾薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	6g
人蔘	<i>Radix Ginseng</i>	8g
茯苓	<i>Poria</i>	6g
巴豆	<i>Semen Tiglii</i>	2g
吳茱萸	<i>Fructus Eviduae</i>	8g
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	8g
砂仁	<i>Fructus amomi</i>	8g
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4g
茵陳	<i>Herba Artemisiae Capillaris</i>	4g
川椒	<i>Pericarpium Zanthoxyli</i>	2g
	TOTAL AMOUNT	118g

2. 방법

1) 시료의 제조

JOH 2첩분량 (236 g)을 증류수 1,500 ml와 함께 전기 약탕기를 이용하여 3시간 가열하고 전탕액을 여과지로 여과하여 5,000 ×g로 10분 원심분리하여 상청액을 취하였다. 얻어진 상청액을 감압농축기 (EYELA, Japan)로 감압농축한 다음, 동결건조하여 동결건조 분말을 조제하였다. 최종적으로 얻어진 건조 분말은 20.1g로 수율은 8.51%였다.

2) 복강암의 유발 및 실험군 선정

실험 첫 날, Balb/c 생쥐 1마리당 2×10⁶개의 S-180 세포주를 200 ml의 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)에 풀어준 다음, 복강에 1회 주사하여 복강암을 유발 하였다. 정상군 (Normal)은 200 ml의 PBS를 1회 복강 주사하였다. 제 1 실험군 (500 mg/kg)은 JOH 추출액을 500 mg/kg 농도로 3 주간 투여하였고, 제 2 실험군 (1000 mg/kg)은 JOH 추출액을 1000 mg/kg 농도로 3 주간 투여하였다. 실험 대조군 (CTL)은 같은 부피의 증류수를 3주간 투여하였다. 각 군은 8마리로 하였다.

3) 복강암의 무게 및 체중 측정

21일간의 약물 투여가 끝난 후, 생쥐를 경추 탈구로 희생시키고 복강암 및 삼출물의 중량을 측정하였다. 복강암과 체중은 전자저울을 이용하여 측정하였으며, 각각의 생쥐에 대하여 체중에 대한 복강암의 무게 비율로 나타내었다.

4) 생존율 관찰

생존을 측정을 위하여 500 mg/kg 및 1000 mg/kg의 분량으로 21일동안 투여 후, 날짜별로 사망하는 생쥐의 수를 확인하였다. 통계적 유의성은 3분기로 나누어 각각의 평균 생존 개체수를 비교하였으며, Median survival time을 계산하여 참고하였다.

Median survival time의 계산 공식은 아래와 같다. 총 10마리의 생쥐로 실험을 진행하였다.

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

X ; 생존수가 전체동물수의 1/2 이 되는 최초의 시간(일)
Y ; 생존수가 전체동물수의 1/2 에서 1 일 뺀 최초의 시간(일)

단, 전체동물의 수가 홀수인 경우는 Median survival time은 X/2가 된다.

5) 면역세포 분리

상기 방법과 같이 연구가 종료된 다음 생쥐에서 비장세포 및 흉선세포의 분리를 Wysocki⁹⁾ 및 Mizel¹⁰⁾ 등의 방법에 의하여 실시하였다. 분리된 흉선세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.0×10⁶ cells/ml 농도로 접종한 다음, 비장세포는 lipopolysaccharide (LPS), 흉선세포는 concanavalin A (Con A)를 각각 5 µg/ml 를 첨가한 후 37 °C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양하였다.

6) S-180 복강암 세포주 및 면역세포의 증식률 측정

96-well plate에 1.0×10⁴ cells/well 의 농도로 S-180 복강암 세포주 및 면역세포를 분주한 다음, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml 농도로 약물을 투여하고, 37°C의 5% CO₂환경에서 24시간 동안 방치한 다음 변형된 MTT 법¹¹⁾으로 증식률을 측정 한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식률을 백분율로 환산하였다.

3. 통계 처리

본 연구의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 성 적

1. 암증이 유발된 생쥐의 체중에 미치는 영향

실험군간에 통계적으로 유의한 체중 증가량의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

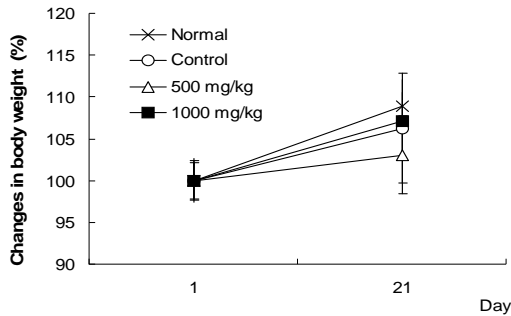


Fig. 1. Effects of JOH on changes in body weights

Body weights were measured at the beginning (day 1) and end (day 21) of experiment. Changes in body weight were represented as average weights on indicated days, which were expressed as percentages of weight on day 1. Normal: naive group, Control: tumor bearing control, 500 mg/kg: 500 mg/kg of JOH treated group, 1000 mg/kg: 1000 mg/kg of JOH treated group. Result are represented as mean±SD (n=8).

2. 암증이 유발된 생쥐의 암중/체중 비율에 미치는 영향

모든 군에서 특별한 체중의 차이는 관찰되지 않았고, 1000 mg/kg 투여군의 암중 및 삼출물 함량은 7.2±1.1 g로 나타나, 9.8±1.1 g을 보인 대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소된 암중 및 삼출물 함량을 보였다(Fig. 2A).

측정된 체중과 암중 및 삼출물의 결과를 이용하여 암중 및 삼출물/체중의 비율을 계산한 결과, 대조군의 암중 및 삼출물/체중 비는 28.3±1.8% 인 데 반해, 1000 mg/kg 투여군에서는 21.4±3.3%로 유의한 수준의 암중 및 삼출물/체중 비율 감소가 관찰되었다(Fig. 2B).

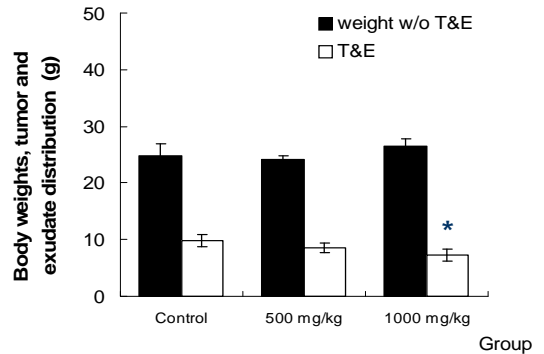


Fig. 2A. Effects of JOH on body weights, tumor and exudate distribution in tumor bearing mice

Body and tumor/exudate weights were measured at the end (day 21) of experiment. T&E : weights of tumor and exudate, weight w/o T&E : weights without tumor and exudate of each group. Control: tumor bearing control, 500 mg/kg: 500 mg/kg of JOH treated group, 1000 mg/kg: 1000 mg/kg of JOH treated group. Result are represented as mean±SD. *P < 0.05 vs. Control (n=8).

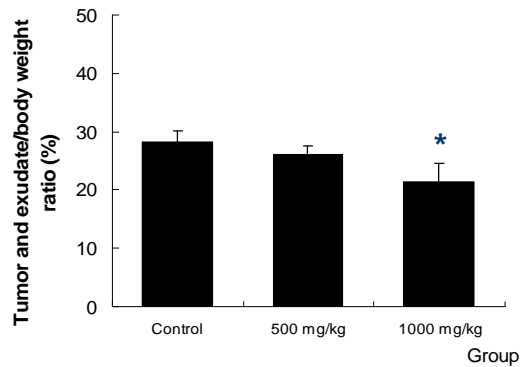


Fig. 2B. Effects of JOH on tumor and exudate / body weight ratio in tumor bearing mice

Body and tumor/exudate weights were measured on day 21. Control: tumor bearing control, 500 mg/kg: 500 mg/kg of JOH treated group, 1000 mg/kg: 1000 mg/kg of JOH treated group. Values are expressed as ratio between tumor+exudate and body weight (w/w). Results are represented as mean±SD. *P < 0.05 vs. Control. (n=8)

3. 암증이 유발된 생쥐의 생존율에 미치는 영향

S-180을 복강 주사하여 암을 유발하고, 21일간의 약물 투여를 마친 후, 30일까지 사망 개체수를 관찰하였다. 대조군의 경우 이식 30일 째에 모든 개체가 사망하였으나, 1000 mg/kg군에서 4마리가 30일 이상 생존 하였다. Median survival time을 보면, 대조군과 500 mg/kg군은 26.5일이었으며, 1000 mg/kg군은 각각 27.5일이었다(Fig. 3A).

생쥐의 생존 개체수를 3분기로 나누어 평균 생존율을 비교한 결과 상반기와 중반기 8일간은 특별한 생존 개체수의 차이가 없었고, 하반기 4일 동안에는 1000 mg/kg군에서 유의한 수준의 생존 개체수 증가를 보였다(Fig. 3B).

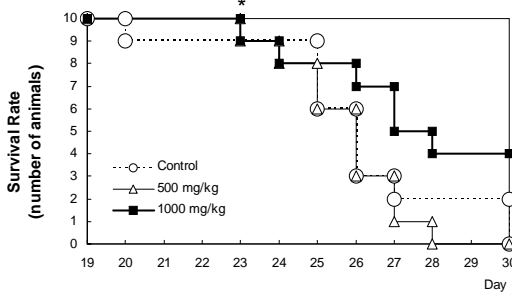


Fig. 3A. Effects of JOH on survival rates in tumor bearing mice

After 21 day treatment, Survival rate was observed till day 30. Control: tumor bearing control, 500 mg/kg: 500 mg/kg of JOH treated group, 1000 mg/kg: 1000 mg/kg of JOH treated group. Values are expressed as number of live animal. P value was calculated with survival days of each mice in tree different groups. *P < 0.05 vs. Control. (n=10)

4. S-180 복강암 세포주의 증식률에 미치는 영향

JOH가 S-180 복강암 세포주의 증식률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 농도별로 S-180 복강암 세포주에 처리하고 증식률을 관찰하였다. 실험 결과를 살펴보면, JOH의 투여 농도 250 µg/ml에서 부터 유의하게 S-180 복강암 세포주 증식률 감소

가 관찰되었다. 대조군의 증식률을 100(%)로 하였을 때, 250, 500, 1000 µg/ml 투여에 의한 증식률은 각각 92.6±1.8, 88.1±2.7, 79.0±4.0%였다(Fig. 4).

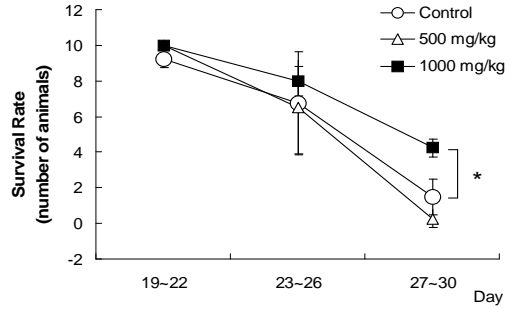


Fig. 3B. Effects of JOH on survival rates in tumor bearing mice

After 21 day treatment, Survival rate was observed till day 30. The first period contains day 19 ~ 22, second contains day 23 ~ 26, final period contains day 27 ~ 30. Control: tumor bearing control, 500 mg/kg: 500 mg/kg of JOH treated group, 1000 mg/kg: 1000 mg/kg of JOH treated group. Values are expressed as average of live animals in each periods. *P < 0.05 vs. Control in each periods. (n=10)

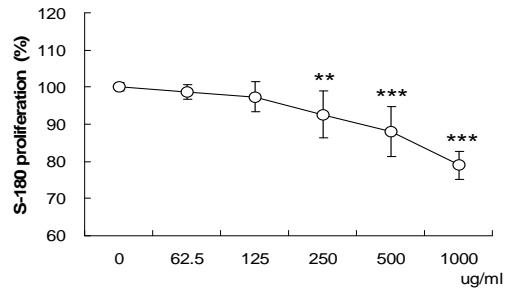


Fig. 4. Effects of JOH on proliferation of tumor cells in vitro

S-180 Cells were attached 96-well plate, and added JOH as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, proliferation rates were measured using modified MTT methods. Values are expressed as percentage of non-treated control. Result are represented as mean±SD. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. non-treated control. (n=6)

5. 흉선 세포의 증식률에 미치는 영향

JOH가 흉선 세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 농도별로 흉선세포에 처리하고 증식률을 관찰하였다. 실험 결과를 살펴보면, JOH 투여 농도 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의한 증식률 증가를 관찰 할 수 있었다. 대조군의 증식률을 100(%)로 하였을 때, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 투여에 의한 증식률은 각각 $161.2 \pm 24.3\%$ 였다(Fig. 5).

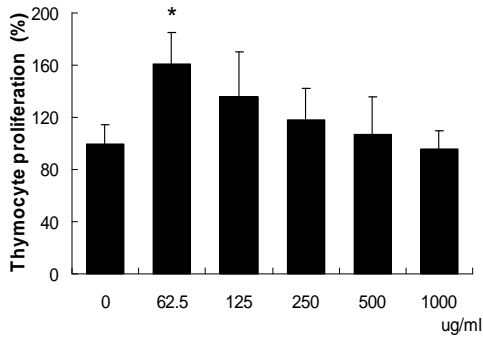


Fig. 5. Effects of JOH on proliferation of thymocytes *in vitro*

Thymocytes were isolated from normal mice and, attached 96-well plate, then added JOH as indicated concentrations respectively. After 48 hr incubation, proliferation rates were measured using modified MTT methods. Values are expressed as percentage of control. Result are represented as mean \pm SD. *P < 0.05 vs. Control. (n=6)

6. 비장 세포의 증식률에 미치는 영향

JOH가 비장 세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 농도별로 비장세포에 처리하고 증식률을 관찰하였다. 실험 결과를 살펴보면, 모든 JOH 투여 농도에서 유의할 만한 증식률 변화 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 6).

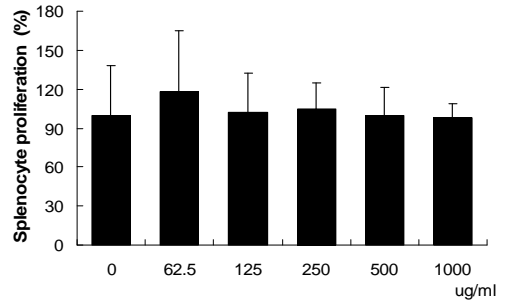


Fig. 6. Effects of JOH on proliferation of splenocyte *in vitro*

Splenocytes were isolated from normal mice and, attached 96-well plate, then added JOH as indicated concentrations respectively. After 48 hr incubation, proliferation rates were measured using modified MTT methods. Values are expressed as percentage of control. Result are represented as mean \pm SD (n=6).

IV. 고 찰

국민의 전반적인 삶의 질이 향상되고, 식생활이 서구화되면서 질병의 양상도 크게 바뀌어 영양부족으로 인한 질환은 감소한 반면, 비만, 관상동맥 질환, 암과 같은 만성퇴행성질환은 크게 증가하고 있다. 특히 이들 만성퇴행성 질환 중에서도 암은 서구 선진국은 물론 국내에서도 꾸준히 증가하고 있다.

2009년 통계청 발표에 따르면, 2008년 우리나라 3대 사망원인은 악성신생물, 뇌혈관질환, 심장질환순으로 악성신생물이 1위를 차지 하였으며, 뇌혈관질환과 당뇨병 사망률은 감소하고 있는 반면, 폐렴, 자살 사망률과 더불어 암에 의한 사망률은 해마다 증가하고 있는 것으로 나타났다⁴⁾.

종양이란 자율성을 가진 비정상적인 세포의 과잉증식으로 말미암아 실질장기, 유강장기, 골조직 및 피부조직 등에 비정상적인 조직의 성장발육 현상을 야기함으로써 개체와 정상조직에 대하여 파괴성을 나타내는 악성 질환을 말한다^{5,12)}.

積聚에 대하여 난경에서 ‘積’은 오장에서 발생하며 부위가 이동하지 않는 것이며, ‘聚’는 육부에서 생하여 유동적인 것이라 하였다¹³⁾.

‘積’이라 함은 원래 ‘跡’과 같은 뜻으로 瘀血과 같은 고형 성분이 積聚하여 일정한 형태의 병변을 형성함을 말하고, ‘聚’는 ‘緒’와 같은 뜻으로 氣와 같은 무형 성분이 취집되어 유형적인 병변을 초래하기는 하나 聚散이 일정치 않은 것을 말한다. 積聚는 암에 해당하며, 積은 유형의 덩어리로 종양과 더욱 관련이 깊은 것으로 인식되고 있다³⁾.

積에는 肝積, 心積, 脾積, 肺積, 腎積의 5가지가 있다. 肝積은 肝壅, 肝脹, 癰黃으로 불리며 그 증상이 간암증상과 비슷하고, 心積은 伏梁이라고 하며 위암과 간, 담, 췌장의 종괴를 포함하고 있다. 脾積은 痞氣라고 하였는데 이것은 간장의 종양에 해당되며, 간암과 담관암종을 포함하고, 肺積은 息賁이라고 하며 폐부의 종양을 가르키는데 폐암을 포함하고 있으며 증상이 폐암말기의 증상과 비슷하다. 腎積은 奔豚이라 하는데, 서술된 증상으로는 종양과 밀접한 관계를 보이지는 않는다^{3,14)}.

五積에 사용되는 처방으로 肝積에 사용되는 肥氣丸, 心積에 사용되는 伏梁丸, 痞積에 사용되는 痞氣丸, 肺積에 사용되는 息賁丸 그리고 腎積에 사용되는 奔豚丸이 있는데, 김¹⁵⁾등은 伏梁丸이 간암과 백혈병 환자에서 抽出한 암세포에, 한¹⁶⁾은 痞氣丸이 백혈병과 임파종 환자에서 抽出한 암세포에 치사효과가 높았다고 보고하였다. 김¹⁷⁾은 肥氣丸이 간암, 자궁암, 위암 유래의 암세포주에 消積正元散보다 월등한 항암효과가 있음을 보고하였다.

增損五積丸은 李의 醫學入門에 最初로 收錄되어 「治五積及一切積塊之在臍上下左右者」라하여 積聚에 使用되어 왔는데, 增損五積丸 脾積方은 黃連, 厚朴, 川烏, 乾薑, 人蔘, 茯苓, 巴豆想 등의 7가지 약물로 구성되어 있으며 五積에 따라 各各의 藥物을 달리하여, 각 약물의 用量을 변화시키고 數種의 藥物을 加味하여 五積治療에 通用되었다^{1,2)}.

增損五積丸을 구성하고 있는 약물에 대해서는 일찍부터 그 항암효과가 연구, 인정되고 있다.

茵陳의 항암효과에 관하여 인진을 포함한 처방-인진호탕, 인진항암단 등-의 항암효과를 증명한 윤¹⁸⁾, 이¹⁹⁾의 논문 및 인진속 Methanol추출물 및 인진속 성분의 항암효과를 증명한 김^{20,21)}, 정²²⁾, 백²³⁾ 등의 논문등 다수의 연구결과가 있었다.

吳茱萸에 관하여 차²⁴⁾등은 오수유 약침이 면역기능 증진을 통해 항암효과를 발휘한다고 하였으며, 巴豆의 종양억제효과에 있어서는 성²⁵⁾의 논문이 있었다. 그 외 조²⁶⁾이²⁷⁾등은 수치상태에 따른 파두의 항암효과 및 파두 단독으로 또는 타처방에 파두를 가감하여 투약하였을 경우 항암효과에 관해 비교연구 하였다.

人蔘과 관련되어 일찍부터 다양한 연구가 이루어지고 있어, 김²⁷⁾은 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과 비교하였고, 곽²⁸⁾은 인삼과 항암제의 병용투여시 효과를 연구하였다. 그 외 김²⁹⁾, 윤³⁰⁾, 전³¹⁾등 고려인삼학회 및 면역학회 등에서 다수의 논문에서는 인삼이 포함하고있는 성분들의 항암작용에 대해 다루고 있었다.

增損五積丸에 관한 연구로 김⁷⁾등은 增損五積丸 腎積方의 항암효과를, 이⁸⁾등은 增損五積丸 脾積方의 항암효과를 연구, 보고하였다.

김⁷⁾은 增損五積丸 중 腎積方, 肝積方, 心積方을 A549 cell(肺癌細胞), HCT-15 cell(腸癌細胞), Caki-1 cell(腎癌細胞)에 각각 투여하여, 각 세포주의 성장저애에 미치는 항암효과를 관찰하였다. A549 cell, HCT-15 cell, Caki-1 cell 모두에서 대조군에 비하여 실험군이 암세포의 성장을 억제하였고, Caki-1 cell에서는 腎積方이 대조군에 비해서도 우월한 효과가 있었다.

이⁸⁾는 增損五積丸 중 脾積方, 肺積方, 腎積方을 HeLa cell(子宮上皮細胞), Hep 3B cell(肝癌細胞), HCT-15 cell(腸癌細胞)에 각각 투여, 각 세포주의 성장저애에 미치는 항암효과를 관찰하였다. HeLa

cell, Hep 3B cell, HCT-15 cell 모두에서 대조군에 비하여 실험군이 암세포 성장저해 효과를 보였으며, HCT-15 cell에서는 脾積方이 가장 두드러진 암세포 성장저해 효과를 보였다.

상기 연구들은 增損五積丸이 각 세포주의 성장저해에 미치는 항암효과를 증명하였으나, *in vitro*에서의 효과확인에 머물렀다.

이에 저자는 增損五積丸처방중 腹腔癌과 연관 깊은 脾積方으로, *in vitro*와 더불어 *in vivo*에서의 항암효과와 유효성과 그 작용 기전을 규명하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. Sarcoma 180 (S-180) 세포를 생쥐의 복강에 주사하여 암종을 유발하고 약물을 투여한 다음, 생존율과 암중/체중비를 관찰하였다. 또한, 어떤 기전에 의하여 항암효과를 발휘하는지를 규명하기 위하여 복강암 세포인 S-180에 JOH를 농도별로 투여하여 증식률 억제 효과를 관찰하고, 정상 생쥐로부터 비장세포와 흉선세포를 분리하여 JOH의 농도별 세포 증식률 증가 효과를 관찰하였다.

본 연구에서는 S-180 세포주를 복강에 주사하여 복강암을 유발하는 동물 모델을 사용하였다. S-180 세포주를 이용한 암종 동물 모델은 복강 내에 암을 유발하며, 그 기간은 최소 일주일 이상임이 알려져 있기 때문에 약물의 투여기간을 3주로 하였다³³⁻³⁵⁾. 본 실험에서 S-180 세포주를 이용하여 암종을 유발 시킨 결과 암종과 삼출물이 동시에 발생하였는데, 일부에서는 삼출물을 발생시킨다는 보고³⁶⁾와 일치하였다.

본 연구의 결과에서 암종이 유발된 생쥐의 체중변화를 관찰한 결과 모든 군에서 특별한 체중의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 일반적으로 암종이 유발된 경우 체중은 암종과 삼출물의 제외한 실질 체중과 병리적 산물인 암종과 삼출물의 무게의 합산으로 분석할 수 있는데, 말기 암 환자에서는 일반적으로 체중이 감소하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 체내에 종양이 발생한 경우 종양에 의

하여 체중이 증가되는 경우도 있음 또한 알려져 있다³⁷⁾. 이러한 이유로, 실질 체중과 삼출물 또는 암종 등 병리적 산물의 무게를 분석해본 결과 모든 군에서 체중의 차이는 없었지만, 1000 mg/kg 투여군의 암종 및 삼출물 함량이 대조군에 비하여 평균 2.6 g 감소하여 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 2A). 이러한 결과를 각각의 체중에 대한 병리적 산물의 비율로 계산해본 결과에서도 역시 체중 대비 6.9% 정도가 감소하여 유의성을 나타냈다(Fig. 2B). 이러한 결과는 JOH가 생체 내에서 암종 및 삼출물의 생성을 억제할 수 있다는 증거로 해석된다.

항암제의 일차적인 목표는 생존율의 연장이다. 따라서, 상기한 바와 같이 JOH 투여에 의하여 암종/체중 비가 감소하는 것을 관찰한 후, 실제로 이러한 항암 작용이 생쥐의 생존율을 연장시킬 수 있는지 관찰하기 위하여 동일한 방법으로 복강암을 유발하고 JOH를 3주간 투여한 후 각 군별 생존율을 관찰한 결과 1000 mg/kg 투여군에서 4마리 이상이 20일 이상 생존 하는 등 주목할 만한 생존율 연장 소견을 보였다(Fig. 3A). 이러한 생존율의 연장의 분기별 효과 및 통계적 유의성 검증을 위하여 최초 사망 생쥐가 발생하기 하루 전날부터 4일씩 3분기로 나누어 생존율을 관찰한 결과 1, 2 분기에는 모든 군에서 특별한 생존율 연장소견을 보이지 않았지만, 3분기에는 1000 mg/kg 투여군에서 유의한 수준의 평균 생존율 연장 소견을 보였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 암종/체중 비율의 감소와 함께 JOH가 생체 내에서 항암 작용을 가진다는 일련의 증거로 해석된다.

본 저자는 상기한 결과들로부터 增損五積丸 脾積方의 항암 활성을 확인 할 수 있었지만, 어떤 기전에 의하여 JOH가 항암 작용을 가지는지 알 수 없었다. 따라서, 이러한 의문점을 해결하기 위하여 시험관 내에서 면역세포와 암세포의 증식률에 미치는 영향을 관찰하였다. 복강암 유발을 위하

여 사용한 S-180세포를 대상으로 JOH의 농도별 처리가 복강암 세포주의 증식률에 미치는 영향을 관찰 한 결과, 투여 농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 S-180 복강암 세포주의 증식률을 유의하게 감소시켰고 그 경향은 농도의존적이었다(Fig. 4). 이러한 결과는 JOH가 직접적으로 암세포의 생장을 억제할 수 있는 가능성이 있을 것으로 사료되어진다.

흉선은 T 세포의 분화 및 성숙에 관여하는 기관으로 흉선세포는 미성숙 T 세포로 구성되어 있으며, 분리된 미성숙 T 세포인 흉선세포는 concanavalin A (Con A)에 의하여 활성화 시킬 수 있음이 알려져 있다³⁸⁻⁴⁰⁾. 비장에서 분리해낸 비장세포는 T 세포, B 세포가 주를 이루고, 소량의 수지상 세포(dendritic cell)와 대식세포(macrophage) 등으로 구성되어 있다⁴⁰⁾. 이러한 비장세포를 분리하여 LPS로 자극하는 과정에서 T 세포는 도태되고 비교적 B 세포의 비율이 높아지게 된다⁴¹⁾.

본 연구의 결과에서 JOH는 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 직접적으로 흉선세포의 증식률을 증가시킴이 관찰되었고, 특별한 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 5). 또한, JOH는 비장세포의 증식률에 특별한 영향을 미치지 않았고, 세포 독성 또한 발견되지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과는 JOH의 항암효과에 T 세포가 관여할 가능성이 높을 것으로 해석된다.

이상의 내용을 종합해보면, JOH의 투여는 암종이 유발된 생쥐에서 암중/체중 비율을 감소시켰고, 생존율을 연장시킴으로써 항암작용을 보였다. JOH가 가진 항암작용의 기전을 확인하기 위하여 시행된 시험관 내 실험을 통하여, 복강암 세포에 대한 직접적인 증식률 억제 작용과 흉선세포에 대한 증식률 항진 작용이 있음을 알 수 있었다.

이러한 결과로부터 본 저자는 JOH가 항암제 또는 암의 예방 목적으로 사용 할 수 있으며, 그 기전으로는 복강암에 대한 직접적인 증식 억제 작용과 면역세포의 항진 작용을 아울러 가짐을 확인하

였다. 더불어 增損五積丸 肝積方, 心積方, 肺積方, 腎積方에 대한 실험, 연구를 통해 각 처방의 비교실험이 진행된다면 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

1. 1000 mg/kg의 增損五積丸 脾積方 추출물 투여는 복강암이 유발된 생쥐에서 암중/체중 비율을 유의성 있게 감소시켰다.
2. 1000 mg/kg의 增損五積丸 脾積方 추출물 투여는 복강암이 유발된 생쥐의 생존율을 유의성 있게 연장시켰다.
3. 增損五積丸 脾積方 추출물은 시험관 내에서 복강암 세포의 증식을 농도에 비례하여 억제시켰다.
4. 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 增損五積丸 脾積方 추출물은 정상 생쥐에서 분리한 흉선세포의 증식을 유의성 있게 증가시켰다.

참 고 문 헌

1. 李 槿, 編註醫學入門. 서울. 大星文化社. 外集卷二.卷三 1984:331,419-20.
2. 許浚. 東醫寶鑑. 경남합천. 동의보감출판사. 2005:1389.
3. 박종현, 신상우. 한의학의 종양에 대한 인식론. 동의생리병리학회지. 2002;16(5):867-72.
4. www.kostat.go.kr. 2008년 사망 및 사망원인 통계결과. 통계청. 2009.
5. 서울대학교 의과대학. 종양학. 서울. 서울대학교출판부. 1996:1-5,43-59.
6. 楊寶仁. 癌症的中藥治療. 河北. 河北科學技術出版社. 1992.
7. 김질수, 전병훈, 우원홍, 정우열. 增損五積丸

- 腎積方이 종양세포에 미치는 영향. 이리. 원광한의학. 1994;4(1):167-90.
8. 이병구, 원진희, 문석재, 금동용, 원경숙, 문구. 增損五積丸 脾積方이 사람의 각종 암세포주의 성장저에 미치는 효과. 한국전통의학지. 2002;12(1):51-66.
 9. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Planning" for lymphocytes ; A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 1978;75(6):2844-8.
 10. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. : Regulation of lymphocyte-activating factor (LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF. J. Immunol. Methods, 1979;122(6):2173-9.
 11. Mari M, Seiji K, Kenji F, Airo T and Toshimasa N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MfT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2006;209(5):413-21.
 12. 홍원식. 現代中共의 癌治療. 서울. 英文社. 1984:81-94, 329-30, 361,372-5, 378-82.
 13. 최승훈. 難經入門. 법인문화사. 1998:160.
 14. 문구, 정병학, 김병주. 癌 동서의 결합치료. 1999:17-8.
 15. 김강산, 강병기. 伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果. 이리. 원광한의학. 1991;1(1):153-68.
 16. 한상일, 강병기. 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果. 대한한방내과학회지. 1991;12(2):1-15.
 17. 김강산. 肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 效果. 이리. 원광대학교대학원. 한의학박사논문. 1993.
 18. 윤현정, 김병완, 이창현, 정재하, 허숙경, 박원환, 박선동. 사람 간암 세포주인 HepG2에 대한 茵陳蒿湯의 항암 효과. 대한본초학회지(본초분과학회지). 2007;22(3):27-37.
 19. 이견업, 문석재, 문구, 원진희, 김동욱, 김형균, 문영호, 이종범, 윤준철, 김훈준. 팔진항암단의 인간 전골수성 백혈병 세포 사멸 효과. 동의생리병리학회지. 2002;16(3):514-20.
 20. 김홍태, 구세광, 김주완, 진태원, 임미경, 김지은, 장혜숙, 여상건, 장광호, 오태호, 이근우. 조직병리학 및 Histomorphometry 기법으로 관찰한 종양 유발 마우스의 주요 장기에 인진쑥 Methanol 추출물이 미치는 영향. 한국임상수의학회지. 2008;25(4):259-66.
 21. 김홍태, 김주완, 진태원, 김지은, 임미경, 여상건, 장광호, 오태호, 이근우. 인진쑥 methanol 추출물의 투여가 암이 유발된 마우스에서 보인 혈액생화학적 및 종양 무게에 미치는 영향. 한국임상수의학회지. 2007;24(3):372-8.
 22. 정미정, 윤유, 허성일, 왕명현. 인진쑥 추출물의 항산화 및 항암 활성. 생약학회지. 2008; 39(3):194-8.
 23. 백태웅, 이경애 안민정, 주혜경, 조민철, 강정우, 김희서, 심정현, 이희구, 오현철, 안종석, 조용권, 명평근, 윤도영. 인진에서 분리한 3,5-di-O-Caffeoylquinic acid가 자궁경부암 바이러스 발암단백질의 기능에 미치는 영향. 한국생약학회지. 2004;35(4):368-74.
 24. 차관배, 김윤식, 유호룡, 조현경, 오영선, 설인찬. 吳茱萸黃芩의 항암효과에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(5):1261-70.
 25. 이권익, 서영배, 성낙기. Mouse 종양세포주 성장억제에 미치는 파두의 (바豆) 효과. 대전대학교 한의학논문집. 1995;4(1):199-209.
 26. 조성각, 문구, 문석재. 修治巴豆 및 巴豆加黃連

- 의 細胞毒性和 抗腫瘍效果에 關한 實驗的 研究. 대한한방종양학회지. 1995;1(1):191-211.
27. 이영찬, 전병훈. 바토 가미한 四君子湯 및 四物湯의 항암효과에 대한 연구. 동의병리학회지. 1994;9(0):79-100.
28. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암 효과에 대한 비교연구. 대한본초학회지(본초분과학회지). 2004;19(2):41-50.
29. 광이성, 김영숙, 신한재, 송용범, 박종대. 홍삼 산성다당체 (RGAP)와 항암제의 병용투여에 의한 항암시너지 효과. 고려인삼학회지. 2003; 27(2):47-51.
30. 김기환, 정인성, 정희용, 조성기, 윤연숙. 홍삼 다당체의 항암면역증강작용 연구. 고려인삼학회지. 1997;21(2):78-84.
31. 윤연숙 외. 인삼으로부터 분리된 다당체 분획 Ginsan의 항암면역증강작용. 대한면역학회지. 1994;16(40):425-6.
32. 전혜경, 김세창, 정노팔. 생쥐의 대식세포 중앙 치사활성과 항암효과에 미치는 인삼 Saponin 분획물과 Cyclophosphamide 의 영향. 고려인삼학회지. 1991;15(2):99-105.
33. H. W. Kim, S. Jeong, G. H. Beak, S. I. Cho, B. G. Jeon, G. Y. Kim, Y. L. Cho, H. W. Jeong. Therapeutic Efficacy of extracts from root of *Acanthopanax Sessiliflorus* as anti-cancer drug; in vivo and vitro study. Korean J. Oriental physiology & pathology 2007;21(2):518-22.
34. 백원철. 운동량이 NK Cell 및 LAK Cell 의 활성화도, 복강암 마우스의 생존기간에 미치는 영향. 한국체육학회지. 2001;40(4):719-28.
35. 김형우, 조수인, 김계엽, 전병관, 조영림, 정현우. 방사선이 조사된 오갈피 나무의 추출물이 생쥐의 복강암 및 면역세포에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(3):736-40.
36. Ozge C, Calikoglu M, Cinel L, Apaydin FD, Ozgur ES. Massive pleural effusion in an 18-year-old girl with Ewing sarcoma. *Can Respir J*. 2004;11(5):363-5.
37. 김진복, 박재갑. 암환자에서 체중감소와 DNCB 무감작과의 관계에 관한 연구. 대한외과학회지. 1977;19(1):17-23.
38. Kriukova IN, Litvinov SV. Expression of Thy 1 thymocyte differentiation antigen in mouse mammary cancer cells in vitro. *Biull Eksp Biol Med*. 1983;96(8):81-4.
39. Dwyer JM, Johnson C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin Exp Immunol*. 1981;46(2):237-49.
40. T. J. Kindt, R. A. Goldsby, B. A. Osborne, Kuby immunology. New York:W. H. Freedman and Company. 6th edition, 2004:41,44-6.
41. 최의규, 홍정희, 한유정, 백문기. 단백질ase 억제제 5'-Isobutyl-5'-deoxyadenosine 과 sinefungin에 의한 BALB/c mouse 비장세포의 증식과 분화의 억제 대한면역학회지. 1995;17(3):223-32.