대한한방내과학회지 제33권 4호(2012년 12월)
Korean J. Orient. Int. Med. 2012:33(4)387-404

歸脾湯이 비소세포 폐암세포(NCI-H520) 이식 마우스에서 항암 및 면역 활성에 미치는 영향

손지영, 최해윤, 김종대
대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Anticancer and Related Immunomodulatory Effects of *Kwibi-tang* on Non-small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520, Xenograft Mice

Ji-young Son, Hae-yun Choi, Jong-dae Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : This study was to observe anticancer and related immunomodulatory effects of *Kwibi-tang* extracts (KBTe) on non-small cell lung carcinoma (squamous epithelial carcinoma), NCI-H520, xenograft Balb/c nu-nu nude mice.

Methods : Three different dosages of KBTe, 50, 100 and 200 mg/kg were orally administered once a day for 42 days from 11 days after tumor cell inoculation. Six groups, each of 8 mice per group were used in the present study. Changes in body weight, tumor volume and weight, lymphatic organs (spleen and popliteal lymph node), serum interferon (IFN)-γ levels, splenocytes NK cell activity and peritoneal macrophage activities, splenic tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β and IL-10 contents were observed with tumor mass and lymphatic organ histopathology to detect anticancer and immunomodulatory effects. The results were compared with a potent cytotoxic anticancer agent, 5-FU (5-Fluorouracil) 30 mg/kg, intraperitoneal treatment (3-day intervals for 42 days, the optimal effective treatment regimes already confirmed).

Results & Conclusions : This study suggest that over 50 mg/kg of KBTe showed favorable anticancer effects on the NCI-H520 cell xenograft with immunomodulatory effects. Although relatively lower anticancer effects were observed in KBTe 200 mg/kg treated mice as compared with 5-FU 30 mg/kg treated mice, no meaningful favorable immunomodulatory effects were observed after 5-FU treatment in the present study.

Key words : *Kwibi-tang* (*Guipi-tang*) extracts, anticancer effects, immunomodulatory effects, non-small cell lung carcinoma, Balb/c nu-nu nude mice

Ⅰ. 서 론

폐암의 발생빈도는 전 세계적으로 증가하는 추세에 있으며, 우리나라에서도 발생빈도가 점차 증가하여 위암에 이어 두 번째로 많은 부분을 차지하고 있다. 또한 예후가 불량하여 전체 암 사망률 중에서 폐암으로 인한 사망률은 2000년부터 1위를 차지하고 있다[1].

폐암은 조직학적으로 소세포 폐암과 비소세포 폐암으로 구분되며 소세포성 폐암의 경우 화학적 치료와 방사선 치료가 권장되고 비소세포 폐암은 근치적 절제술이 최선의 방법으로 알려져 있다. 선진국의 경우 진단 당시에 수술이 가능한 초기 병기

· 교신저자: 김종대 대구시 수성구 상동 165번지
대구한의대한방병원
TEL: 053-770-2122 FAX: 053-770-2189
E-mail: omendoim@dhu.ac.kr

(Ⅰ기 또는 Ⅱ기)가 비소세포 폐암의 25%이며 절제 불가능한 Ⅲ기가 60%를 차지한다[2]. Ⅳ기 비소세포 폐암 환자들의 경우 예후가 불량하여 최선의 보존적 치료를 하더라도 생존 기간이 16~17주이다[3].

폐암은 국소 종양의 제어가 어렵고 진단 당시 영상검사로는 발견하기 어려운 미세전이 암세포가 존재하여 폐에 국한된 방사선 요법 시행 후, 원격 장기에서의 재발을 초래하는 경우가 있어 방사선 단독요법으로는 5년 생존율이 10% 미만으로 좋지 않다. 따라서 이러한 원격 장기에서의 재발을 막기 위해 다양한 방법으로 항암 화학요법이 방사선 치료에 병용되고 있고, 이러한 병용 치료가 방사선 단독 치료보다 우수함이 밝혀지고 있다[4]. 최근에는 방사선과 항암화학요법의 병합 방법으로 시간 간격을 두는 순차적 항암화학 방사선 치료 보다는 동시 항암화학 방사선치료가 선호되고 있다[5]. 그러나 여전히 부작용과 안정성 등이 확립되지 않은 상태로 논란의 여지가 많다[6,7].

폐암에 관한 한방 연구로는 주로 폐암 환자에 대한 증례 보고가 주를 이루고 있고[8-11], 실험적으로도 다양한 보고[12-14]가 있었으나 歸脾湯을 이용한 항암, 면역 활성에 관한 연구는 없었다.

본 실험에 사용된 歸脾湯은 宋代 嚴用和[15]가 처음 創方한 것으로 기존 연구를 살펴보면 항스트레스 효과[16], 항산화 효과[17], 면역조절 효과[18,19] 및 방사선 보호 효과[20]가 보고되어 있다. 그러나 항암과 관련된 보고는 찾아볼 수 없었다.

이에 본 연구에서는 歸脾湯 추출물로 항암 및 면역 활성 효과를 사람의 폐암 세포에서 유래한 대표적인 편평세포암(squamous epithelia carcinoma cell) 세포주로 비소세포 폐암(non small cell lung cancer)에 주로 사용되고 있는 세포 중 하나인[21-23] NCI-H520(비소세포폐암 세포주, squamous carcinoma American Type Culture Collection Center, VA, USA)을 이식한 누드 마우스를 이용하여 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 歸脾湯 추출

본 실험에 사용된 약재는 약업사(Omniherb, 영천, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 歸脾湯 1 첩 분량의 조성은 Table 1과 같다. 선정된 약제 3 첩 분량(128.1 g)을 취하여 정제수 1,300 ml로 60 ℃에서 3 시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 감압농축기(Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzland)로 점조성의 추출물을 얻은 다음 동결건조기(Labconco Freezone1, Labconco Corp, MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 22.11 g(수율 약 17.26%)의 연갈색 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 추출한 歸脾湯 동결 건조물은 -20 ℃의 냉장고에 보관 후, 본 실험에 사용한 용매인 증류수에 20 mg/ml의 농도까지 용해시켜 사용하였다.

Table 1. Composition of *Kwibi-tang* Used in This Study.

Herb name	Scientific name	Amounts (g)
當 歸	*Angelica gigas* NAKAI.	4.00
龍眼肉	*Euphoria longan* STEUD.	4.00
酸棗仁 炒	*Ziziyphus spinosa* Hu.	4.00
遠 志	*Polygala tenuifolia* WILLD.	4.00
人 蔘	*Panax ginseng* C.A. MEY.	4.00
黃 芪	*Astragalus membranaceus* BUNGE.	4.00
白 朮	*Atractylodes macrocephala* KOIDZ.	4.00
白茯神	*Poria cocos* WOLF.	4.00
木 香	*Aucklandia lappa* DECNE.	2.00
甘 草	*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.	1.20
生 薑	*Zingiber officinale* ROSC.	3.75
大 棗	*Zizyphus jujuba* MILL. var. *inermis* REHDER	3.75
	Total	42.70

All individual herbs were purchases from local voucher (Omniherb, Youngcheon, Korea) after confirm the morphology under microscopy.

2) 실험동물 및 사양 관리

본 실험에 사용된 모든 실험동물은 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[24]에 준하여 취급하였다.

4주령 수컷 Balb/c nu-nu nude 마우스(SLC, Japan) 70마리를 14일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였다. 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 20-25 ℃와 습도 30-35%로 조절된 무균 사육실에서 마우스용 filtered cap polycarbonate 사육상자에 4마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기는 12시간 주기로 조절하였다. 멸균 사료(Samyang, Korea)와 멸균 증류수는 자유롭게 공급하였으나 약물 투여시작과 최종 부검 전 18시간 동안은 사료를 공급하지 않았다.

70마리 중 8마리는 종양세포 이식 대신 phosphate buffered saline(PBS)을 주입하여 정상 대조군으로 사용하였으며, 62마리는 등쪽 피하에 NCI-H520를 이식한 10일 후, 종양 부피가 대략 94 mm^3되는 40마리를 선별하여 5개 군에 8마리씩 배정하였다.

2. 방 법

1) 실험군 분리

실험동물은 군당 8마리씩 정상 대조군(intact), 종양세포 이식 후 매체인 멸균 증류수 투여 대조군(종양 이식 대조군, tumor bearing), 종양세포 이식 후 5-FU(5-Fluorouracil, Sigma, MO, USA) 30 mg/kg 투여군(5-FU), 종양세포 이식 후 歸脾湯 추출물 50 mg/kg 투여군(KBTe50), 종양세포 이식 후 歸脾湯 추출물 100 mg/kg 투여군(KBTe100) 및 종양세포 이식 후 歸脾湯 추출물 200 mg/kg 투여군(KBTe200)의 6군으로 구분하여 실험하였다(Table 2).

2) 약물의 투여

歸脾湯 추출물은 적정량을 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 10 ml의 용량으로 종양세포 이식 11일 후부터 매일 1회씩 6주간 금속제 Sonde가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여 하였다. 또한 5-FU는 Itoh[25]의 방법에 따라 30 mg/kg의 농도로, 체중 kg 당 10 ml의 용량으로, 3일 간격으로 6주간 복강 투여하였다. 한편 정상 및 종양 이식 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 동일한 방법으로 투여하였다. 한편 정상 및 종양 이식 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수를 歸脾湯 추출물과 동일한 방법으로 투여하였다(Table 2).

Table 2. Experimental Design Used in This Study.

Group ID		Test article/Tumor inoculation/Dose (mg/kg/day)
Controls	Intact	Distilled water in phosphate buffered saline inoculated mice, 10 ml/kg
	Tumor-bearing	Distilled water in NCI-H520 cell inoculated mice, 10 ml/kg
Reference	5-FU	5-FU in NCI-H520 cell inoculated mice, 30 mg/kg(3-day interval for 6 weeks)
KBTe	KBTe50	KBTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 50 mg/kg
	KBTe100	KBTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 100 mg/kg
	KBTe200	KBTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 200 mg/kg

5-FU : 5-Fluorouracil
KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts (listed in Table 1)
KBTe and vehicle (distilled water) were dosed at 10 ml/kg volume once a day and 5-FU was treated intraperitonealy at 10 ml/kg volume with a 3-day intervals for 42 days from 11 days after NCI-H520 cell inoculation at dorsal back subcutaneous regions; 8 mice per group, total 6 groups were used this study.
All animals were sacrificed after 42 days of test article treatment.

3) 종양세포 이식

실험에 사용한 NCI-H520 세포를 American Type Culture Collection Center(VA, USA)로부터 분양받아 10% fetal bovine serum(FBS; Invitrogen, NY, USA), penicillin(0.02 UI/ml; Sigma, MO,

USA), streptomycin(0.02 ㎍/ml; Sigma, MO, USA), glutamine(2 mM; Sigma, MO, USA), non-essential amino acids(1%; Sigma, MO, USA)가 첨가된 RPMI 1640 배지(Sigma, MO, USA)를 사용하여, 37 ℃, 5% CO_2 incubator에서 계대 배양하여 유지하였으며, 동물 이식 전 NCI-H520 세포는 Balb/c nu-nu mouse의 피하에 7~10일 간격으로 계대 배양 하여 보존하면서 사용하였다. 즉, 실험동물의 피하에서 7~10일간 배양된 NCI-H520 세포를 취하고 PBS와 함께 1,200 rpm에 10분간 원심 분리하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10^7 cell/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 다시 등쪽 피하에 주사하여, 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 마우스의 등쪽 부위에 NCI-H520 세포 부유액 0.2 ml(1×10^7 cell/mouse) 씩을 피하 이식하여, 고형 종양를 형성하였다. NCI-H520 세포 이식 11일(종양 부피; 94 mm^3 전후) 후부터 약물을 6주간 경구 투여하였다.

4) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여 시작 1일전(종양세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 1, 7, 14, 21, 28, 35, 41 및 최종 희생일에 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 투여 시작일 및 최종 희생일에 모든 실험동물은 18시간 정도 절식시켰으며, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 아래의 공식 [1]을 이용하여 투여 기간인 6주 동안의 체중 변화량인 체중 증가량(body weight gains)을 각각 측정하였다.

EQUATION [1]. Body Weight Gains (g) = Body weight at sacrifice - Body weight at start of the administration.

5) 종양 부피의 측정

종양이식 후 정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 종양의 부피를 투여 시작 1일전(종양세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 및 최종 희생일에 아래의 공식 [2][26]를 이용하여 측정하였으며, 실험 시작시의 개체 차이에 의한 종양 부피의 변화를 최소화하기 위해 아래의 공식 [3]을 이용하여 투여 기간인 6주 동안의 종양 부피의 변화량을 각각 측정하였다.

EQUATION [2]. Tumor Volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$.

The tumor size was measured once a week by determining two perpendicular dimensions with calipers, and the volume in mm^3 was calculated from the formula $(a \times b^2)/2$, where a is the longer and b is the smaller dimension.

EQUATION [3]. Tumor Volume Changes (mm^3) = Tumor volumes at sacrifice - Tumor volumes at start of administration.

6) 종양 중량의 측정

정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 종양을 적출하여, 주변 결합조직을 제거한 다음 절대 중량(absolute weight)을 전자저울(Precisa Instrument, Switzland)을 이용하여 g 단위로 각각 측정하였다. 또한 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위하여, 최종 희생의 체중에 대한 상대 중량(% of body weight)을 아래의 공식 [4]를 이용하여 각각 산출하였다.

투여 물질의 항암효과를 좀 더 명확히 하기 위하여 투여군과 종양 이식 대조군과의 tumor inhibition rate를 Liu 등[27]의 방법에 따라 아래의 공식 [5]을 이용하여 각각 측정하였다.

EQUATION [4]. Relative Tumor Weight (% of body weight) = [(Absolute tumor weight / body weight at sacrifice) × 100]

EQUATION [5]. Tumor Inhibition Rate = [((Average tumor weight of test group - average tumor weight of tumor-bearing control)/ (average tumor weight of tumor-bearing control) × 100].

7) 면역장기 중량의 측정

정상 대조군을 포함한 모든 실험동물에서 최종 희생일에 비장과 슬와 임파절을 적출하여, 주변 결합조직을 제거한 다음 절대 중량(absolute weight)을 전자저울을 이용하여 g 단위로 각각 측정하였다. 또한 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위하여, 최종 희생의 체중에 대한 상대 중량(% of body weight)을 아래의 공식 [6]을 이용하여 각각 산출하였다.

EQUATION [6]. Relative Organ Weight (% of body weight) = [(Absolute organ weight / body weight at sacrifice) × 100].

8) 혈중 IFN-γ 함량의 측정

분리된 혈청에서, Mouse IFN-γ ELISA kit (BD Biosciences/Pharmingen, CA, USA)를 이용하여, 측정 manual에 따라 pg/ml 단위로 측정하였다.

9) 비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성 측정

비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성은 일반적인 ^{51}Cr (sodium chromate) release assay로 평가하였다[28]. 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile mixture 마취하에 비장세포 및 복강 대식세포(macrophage)를 수거하였다. 일부 비장 실질조직(10~20 mg)을 4 ℃ 상태에서 RPMI-1640(Gibco BRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어 있는 peri dish에서 비장 소편을 준비한 다음, 균질화하여 비장세포를 부유하였다.

복강 대식세포는 복강내에 RPMI-1640 배지를 주입한 다음 세척하여 부유시켰다. 준비된 복강 대식세포 또는 비장세포 부유액을 스테인레스 철망(Mesh No. 100, Sigma, MO, USA)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포 덩어리를 제거하고, RPMI-1640 배지로 1차, HBSS(Hanks Balanced Salt Solution; Gibco BRL, NY, USA)로 2회 세척하였다. 이후 멸균된 증류수로 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10배 희석한 HBSS로 2회 세척하고, RPMI-1640 배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 세포를 재부유하여 사용하였다.

수거한 일정량(1×10^5 cells/ml~2×10^5 cells/ml)을 complete medium(Sigma, MO, USA)에 overnight 배양하였으며, 비장 세포는 recombinant IL-2(1000 IU/ml; Proleukin Chiron, CA, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen, NY, USA)에 overnight 배양하였다. The HTLA-230 neuroblastoma target cells은 $Na_2{}^{51}CrO_4$(100 μCi/1×10^6 cells)(ICN Biomedicals, Asse, Belgium)으로 2시간 반응시켜 표지한 다음, 표적세포(splenocytes 또는 peritoneal macrophages)와 함께 37 ℃에 6시간 동안 배양하였다. Effector : 표적 세포 비율은 비장 및 복강 대식세포 모두 100 : 1 로 조율하였고, 이후 상층액(Supernatants)을 수거하여, ^{51}Cr에서 유리된 방사능을 gamma counter(Cobra 5002; Canberra Packard, CT, USA)를 이용하여 측정하였다. 표적세포 손상(lysis)은 아래의 공식 [7]을 이용하여 % specific ^{51}Cr release 로 산출하였다.

EQUATION [7]. NK cell activities % Specific ^{51}Cr Release = [(Exp-S)/(M-S)× 100]

Exp is the observed released ^{51}Cr value, S is the spontaneously released ^{51}Cr value, and M is the maximum released ^{51}Cr value.

10) 비장내 사이토카인 함량의 측정

최종 희생일에 비장 조직의 일부(대략 10~15 mg/head)를 채취하여, Clark[29]의 방법에 따라 1 ml의 인산완충액(2 mM의 PMSF와 1 mg/ml의 aprotinin, leupeptin 및 pepstatin A가 포함된 인산완충액, PBS)을 이용하여 homogenize 하였다. 비장 내 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β 및 IL-10 함량을 각각 Mouse TNF-α ELISA kit(BD Biosciences /Pharmingen, CA, USA), Mouse IL-1β ELISA kit (Genzyme, MA, USA) 및 Mouse IL-10 ELISA kit (Genzyme, MA, USA)를 이용하여 측정하였다[30]. 분석은 lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 sodium ortho-

vanadaye, 1 ug/ml leupeptin 함유)에 희석한 100 ml의 standard 또는 10, 50, 또는 100 ml의 조직 homogenate에서 실시하였으며, 각 sample을 두 번 반복적으로 측정하였고, 각 sample의 일정부분은 단백질 함량 측정에 이용하였다. 모든 수치는 단백질 mg당 pg(pg/mg of protein)으로 측정하였다. 각 사이토카인에 대한 표준곡선은 흡광도를 이용하여 작성하였으며, 변이율(average coefficient of variance)은 10% 이하로 산출되었다.

11) 조직 병리학적 관찰

최종 희생일에 장기 중량 측정 후, 종양, 좌측 슬와 임파절, 비장의 조직을 10% 중성 포르말린(10% buffered formalin)에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포맷으로 고정하여 3-4 μm의 절편을 제작하였다. Hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 각각의 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

Histomorphometry - 세로로 절단(cross trimmed)한 1 mm^2의 종양 조직에서 종양 세포가 차지하는 비율과 종양세포 중 세포사멸(apoptosis)을 나타내는 세포의 비율을 각각 %/1 mm^2 및 %/tumor cells 단위로 자동 조직영상분석장치(DMI CCD image analyzer; DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 측정하였다. 또한 세로로 절단한 비장 조직표본에서 정중부(from apex of anterior border to center of posterior border)의 비장 전체 두께(mm/spleen), 백색수질(white pulp)의 수(N/1 mm^2 of spleen) 및 백색수질의 직경(mm/white pulps)을 각각 측정하였으며, 세로로 절단한 슬와 임파절 조직에서 전체(mm/popliteal lymph node) 및 피질의 두께(mm/cortex)를 각각 측정하였다.

12) 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로 사후검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test 를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중의 변화

모든 종양 이식군에서 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 체중의 감소가 종양이식 10일 후부터 실험 전 기간 동안 인정되었고, 투여 시작 후 6주간의 체중 증가량 역시 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다.

5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 체중의 감소가 투여 28일후부터 인정되기 시작하여, 6주간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.05$) 감소를 나타내었다.

歸脾湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 투여 28일후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 체중의 증가를 나타내어, 6주간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다.

歸脾湯 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 투여 35일후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 체중의 증가를 나타냈으며, 6주간의 체중 증가량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Changes on the Body Weight Gains after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Body weight at		Body weight gains (B-A)
	Start of administration (A)	Sacrifice (B)	
Intact	18.83±1.13	23.23±1.04	4.40±0.92
Tumor-bearing	17.33±0.67*	16.58±0.62*	-0.75±0.78*
5-FU	17.38±0.79*	15.45±0.83*,†	-1.93±0.64*,†
KBTe50	17.26±0.72*	18.29±0.94*,‡	1.03±0.56*,‡
KBTe100	17.43±0.67*	18.98±0.98*,‡	1.55±0.81*,‡
KBTe200	17.35±0.76*	19.82±1.79*,‡	2.47±1.40*,‡

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, g.
* $p<0.01$ compared with intact control; † $p<0.05$ and ‡ $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

2. 종양 부피의 변화

5-FU 투여군에서는 투여 14일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양 부피의 감소를 나타내어, 투여기간 동안의 종양 부피의 변화량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다.

歸脾湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 투여 28 일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양 부피의 감소를 나타내어, 6주간의 종양 부피의 변화량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 歸脾湯 50 mg/kg 투여군에서는 종양 이식 대조군과 유사한 종량 부피의 변화를 나타내었다(Table 4).

3. 종양 중량의 변화

5-FU 및 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양 상대 및 절대 중량치의 감소가 인정되었다(Table 5).

Table 4. Changes on the Tumor Volume after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Tumor volumes at		Tumor volumes changes (B-A)
	Start of administration (A)	Sacrifice (B)	
Tumor-bearing	121.68 ±9.66	2791.59 ±220.10	2669.91 ±217.16
5-FU	120.19 ±6.98	993.06 ±335.41*	872.88 ±335.47*
KBTe50	120.38 ±6.62	2626.41 ±482.62	2506.04 ±479.46
KBTe100	120.56 ±6.33	2269.65 ±343.96*	2149.09 ±345.54*
KBTe200	119.81 ±7.15	2112.38 ±435.57*	1992.56 ±430.20*

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, mm^3.
* $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

Table 5. Changes on the Tumor Weight after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Groups	Tumor weight			
	Absolute weight (g)	Tumor inhibition rate (%)	Relative weight (% of body weight)	Tumor inhibition rate (%)
Tumor-bearing	2.062 ±0.301		12.467 ±1.987	
5-FU	0.645 ±0.134*	-68.73	4.206 ±1.012*	-66.26
KBTe50	1.741 ±0.192*	-15.58	9.548 ±1.217*	-23.41
KBTe100	1.562 ±0.105*	-24.27	8.258 ±0.815*	-33.76
KBTe200	1.354 ±0.238*	-34.34	6.923 ±1.605*	-44.47

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, g.
* $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

4. 비장 중량의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유

의성 있는($p<0.01$) 비장 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장 절대 및 상대 중량치의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 없는 경미한 비장 절대 및 상대 중량의 감소를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Changes on the Spleen Weight after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Spleen weight	
	Absolute weight (g)	Relative weight (% of body weight)
Intact	0.082±0.011	0.354±0.045
Tumor-bearing	0.031±0.005*	0.189±0.026*
5-FU	0.027±0.008*	0.176±0.058*
KBTe50	0.044±0.007*,‡	0.239±0.036*,†
KBTe100	0.047±0.010*,‡	0.248±0.059*†
KBTe200	0.051±0.008*,‡	0.258±0.045*,‡

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, g.
* $p<0.01$ compared with intact control; † $p<0.05$ and ‡ $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

5. 슬와 임파절 중량의 변화

종양 이식 대조군, 5-FU 투여군, 歸脾湯 50 mg/kg 추출물 투여군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량의 감소가 인정되었고, 歸脾湯 100 mg/kg 추출물 투여군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.05$) 절대 중량의 감소만 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량치의 증가가 인정되었다. 歸脾湯 200 mg/kg 추출물 투여군에서는 정상 대조군과 유사한 절대 및 상대 중량이 관찰되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.05$) 슬와 임파절 절대 중량의 감소와 유의성 없는 상대 중량의 감소가 함께 관찰되었다(Table 7).

Table 7. Changes on the Popliteal Lymph Node Weight after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Popliteal lymph node weight	
	Absolute weight (g)	Relative weight (% of body weight)
Intact	0.010±0.003	0.041±0.012
Tumor-bearing	0.003±0.001†	0.019±0.007†
5-FU	0.002±0.001†,‡	0.011±0.004†
KBTe50	0.005±0.001†,§	0.027±0.004*,‡
KBTe100	0.006±0.002*,§	0.033±0.014‡
KBTe200	0.008±0.001§	0.042±0.004§

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, g.
* $p<0.05$ and † $p<0.01$ compared with intact control; ‡ $p<0.05$ and § $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

6. 혈중 IFN-γ 함량의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 혈중 IFN-γ 함량의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 혈중 IFN-γ함량의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 없는 혈중 IFN-γ함량의 감소가 인정되었다(Fig. 1).

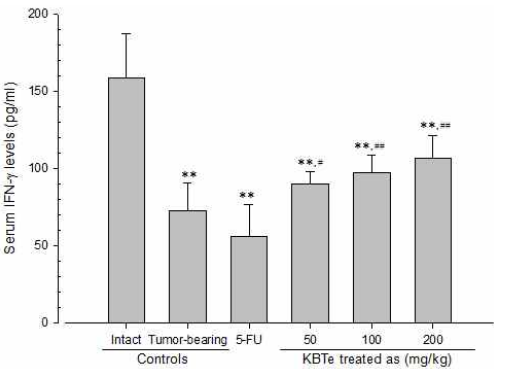

Fig. 1. Changes of the serum IFN-γ levels after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
IFN : interferon
Values are expressed mean ± SD of eight mice, pg/ml of sera.
** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

7. 비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성의 변화

1) 비장 NK 세포 활성

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장세포의 세포독성 활성도, 즉 NK cell 활성의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장 NK cell 활성의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 비장 NK cell 활성의 감소가 인정되었다(Fig. 2).

2) 복강 대식세포 활성

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 복강 대식세포의 세포독성 활성도의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 복강 대식세포 활성의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 복강 대식세포 활성의 감소가 인정되었다(Fig. 3).

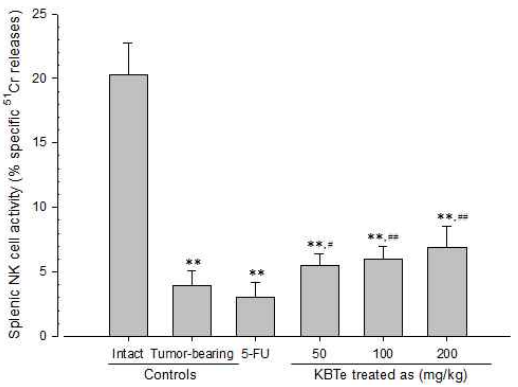

Fig. 2. Changes of the splenic NK Cell activities after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
NK : natural killer
Values are expressed mean ± SD of eight mice, % specific ^{51}Cr releases.
** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

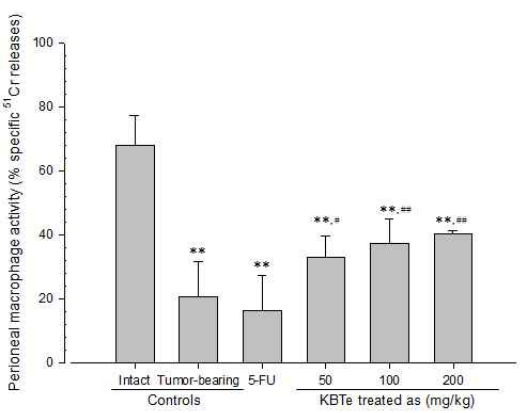

Fig. 3. Changes of the peritoneal macrophage activities after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
Values are expressed mean ± SD of eight mice, % specific ^{51}Cr releases.
** $p<0.01$ compared with intact control; # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

8. 비장내 사이토카인 함량의 변화

1) 비장내 TNF-α 함량의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장내 TNF-α 함량의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장내 TNF-α 함량의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 비장 내 TNF-α 함량의 감소가 인정되었다(Table 8).

2) 비장내 IL-1β 함량의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장내 IL-1β 함량의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장내 IL-1β 함량의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 비장 내 IL-1β 함량의 감소가 인정되었다(Table 8).

3) 비장내 IL-10 함량의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 비장내 IL-10 함량의 감소가 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장내 IL-10 함량의 증가가 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 비장내 IL-10 함량의 감소가 인정되었다(Table 8).

Table 8. Changes on the Splenic Cytokine Contents after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Splenic cytokine contents		
	TNF-α	IL-1β	IL-10
Intact	119.14±11.76	37.76±8.18	104.09±18.68
Tumor-bearing	45.09±10.45*	9.68±1.85*	47.05±13.02*
5-FU	38.60±11.81*	8.28±2.12*	41.94±10.69*
KBTe50	56.65±5.98*,†	12.31±1.92*,†	63.94±9.56*,†
KBTe100	62.29±8.49*,‡	12.44±1.56*,‡	65.66±7.18*,‡
KBTe200	64.90±7.33*,‡	13.03±2.06*,‡	70.19±14.92*,‡

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice, pg/mg protein.
* $p<0.01$ compared with intact control; † $p<0.05$ and ‡ $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

9. 조직병리학적 변화

1) 종양의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 NCI-H520 세포로 치밀하게 구성되어 있었으며, 일부 세포에서 세포사멸에 의한 호산성 및 핵 농축이 인정되었다. 한편 5-FU 및 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고, 결과적으로 정상적인 NCI-H520 세포가 차지하는 비율 역시 현저히 감소되었다(Fig. 4).

5-FU 및 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 종양조직 1 mm^2 당 NCI-H520 세포가 차지하는 비율의 감소 및 apoptotic 세포의 수적 증가가 인정되었다(Fig. 5, 6).

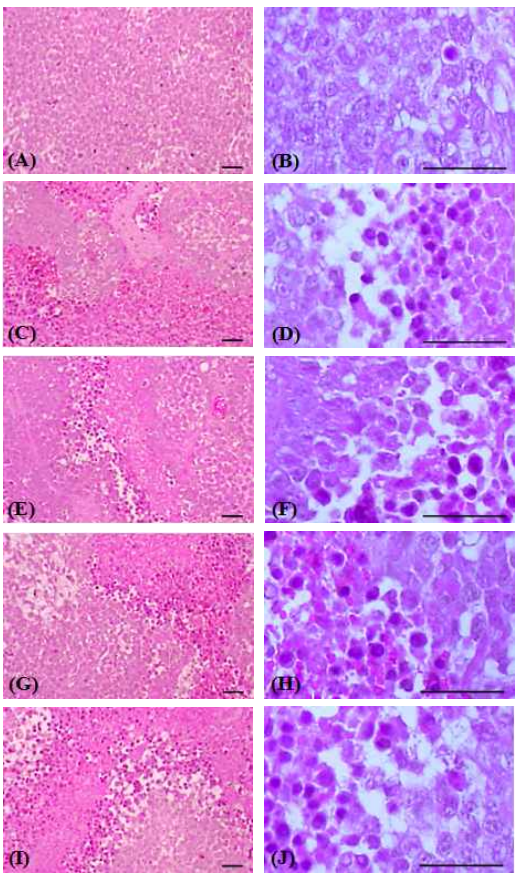

Fig. 4. Changes on the tumor mass histopathological profiles after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
A, B : tumor-bearing control
C, D : 5-FU 30 mg/kg treated mice
E, F : KBTe 50 mg/kg treated mice
G, H : KBTe 100 mg/kg treated mice
I, J : KBTe 200 mg/kg treated group
All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μm

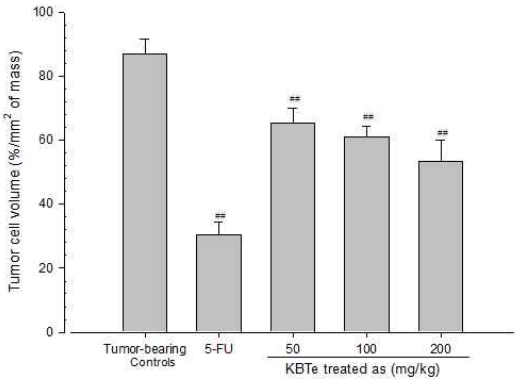

Fig. 5. Changes of the tumor cell volumes in the tumor masses after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
Values are expressed mean ± SD of eight mice, %/mm^2 of mass.
$p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

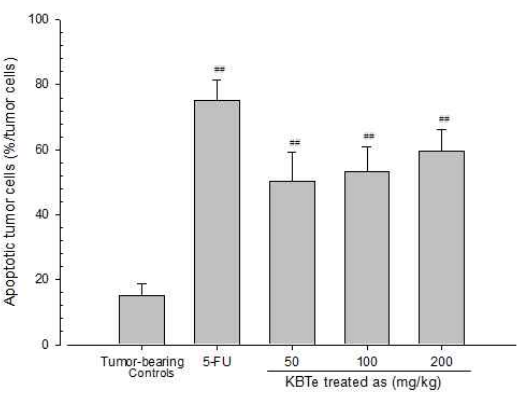

Fig. 6. Changes of the apoptotic tumor cell numbers in the tumor masses after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
Values are expressed mean ± SD of eight mice, %/tumor cells.
$p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

2) 비장의 조직병리학적의 변화

모든 종양 이식군에서는 정상 대조군 비해 비장 백색수질 부분의 현저한 림프구 감소를 특징으로

하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장 두께, 백색수질의 수(N/1 mm^2 of spleen) 및 백색수질의 직경(mm/white pulps)의 감소가 각각 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 비장 두께, 백색수질 수 및 직경의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다.

한편 5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 없는 비장 두께, 백색수질 수 및 직경의 감소가 인정되었다(Fig. 7, Table 9).

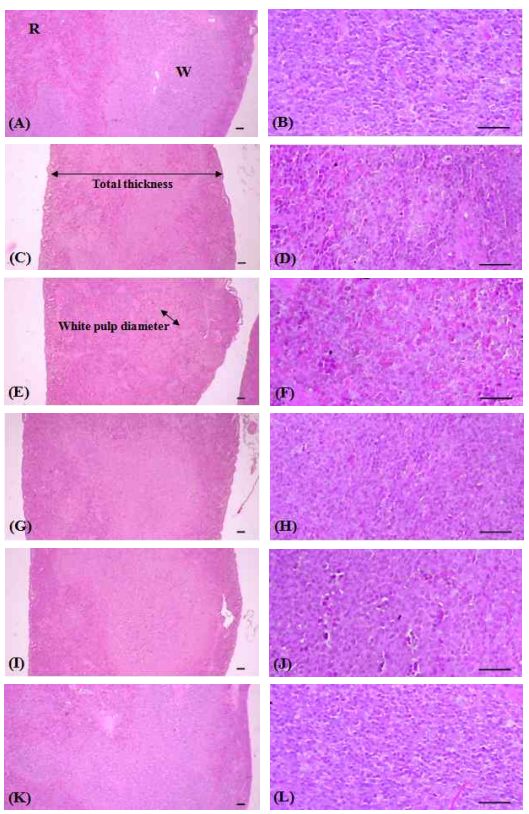

Fig. 7. Changes on the spleen histopathological profiles after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
A, B : intact control
C, D : tumor-bearing control
E, F : 5-FU 30 mg/kg treated mice
G, H : KBTe 50 mg/kg treated mice
I, J : KBTe 100 mg/kg treated mice
K, L : KBTe 200 mg/kg treated group
W : white pulp
R : red pulps
Arrows indicated the total thicknesses or white pulp diameters measured
All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μm

Table 9. Changes on the Histomorphometry of Spleen after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Splenic histomorphometrical changes		
	Total thickness (mm/central region)	White pulp numbers (N/mm^2)	Diameters of white pulps (mm/white pulp)
Intact	3.68±0.47	12.25±3.11	1.46±0.25
Tumor-bearing	2.07±0.22†	3.88±1.73†	0.28±0.06†
5-FU	1.86±0.24†	3.50±0.93†	0.24±0.07†
KBTe50	2.46±0.26†,‡	6.13±1.46†,‡	0.95±0.19†,§
KBTe100	2.56±0.19†,§	7.63±1.30†,§	1.07±0.14†,§
KBTe200	2.96±0.29†,§	9.38±0.92*,§	1.19±0.09*,§

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice.
* $p<0.05$ and $^{\dagger}p<0.01$ compared with intact control; $^{\ddagger}p<0.05$ and § $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

3) 슬와 임파절의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군, 5-FU 투여군, 歸脾湯 추출물 50 및 100 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 슬와 임파절 전체 두께와 피질의 감소가 각각 인정되었다.

모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다. 歸脾湯 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 슬와 임파절 피질 두께가 증가하여 정상대조군과 유사하게 관찰되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 슬와 임파절 전체 두께의 감소와 유의성 없는 피질 두께의 감소가 각각 관찰되었다(Fig. 8, Table 10).

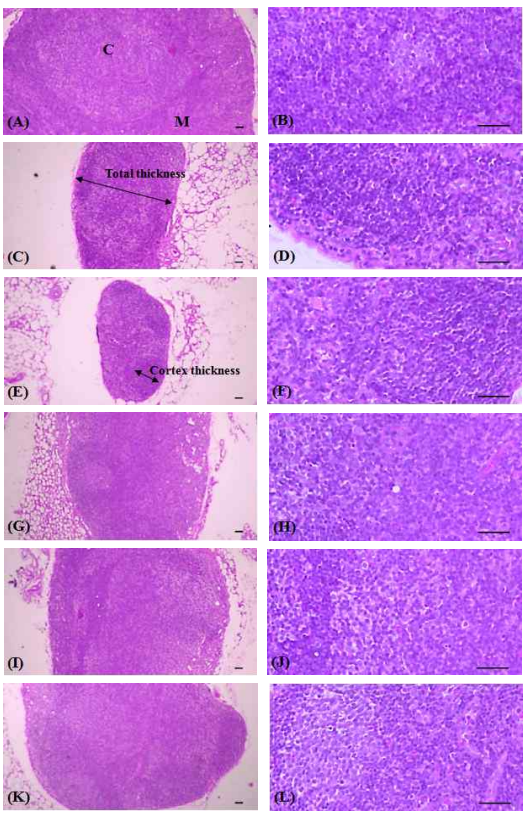

Fig. 8. Changes on the popliteal lymph node histopathological profiles after 5-FU and *Kwibi-tang* extracts administrations.

KBTe : *Kwibi-tang* aqueous extracts
5-FU : 5-Fluorouracil
A, B : intact control
C, D : tumor-bearing control
E, F : 5-FU 30 mg/kg treated mice
G, H : KBTe 50 mg/kg treated mice
I, J : KBTe 100 mg/kg treated mice
K, L : KBTe 200 mg/kg treated group
C : cortex
M : medullary sinus
Arrows indicated the total or cortex thicknesses measured.
All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μm

Table 10. Changes on the Histomorphometry of Popliteal Lymph Nodes after 5-FU and *Kwibi-tang* Extracts Administrations.

Group ID	Popliteal lymph node histomorphometrical changes	
	Total thickness (mm/central region)	Diameters of cortex (mm/cortex)
Intact	3.14±0.39	1.26±0.16
Tumor-bearing	1.41±0.26*	0.47±0.09*
5-FU	0.92±0.25*,†	0.37±0.06*
KBTe50	1.75±0.19*,†	0.73±0.17*,†
KBTe100	2.01±0.13*,†	1.03±0.25*,†
KBTe200	2.32±0.21*,†	1.12±0.22†

Group ID was listed in Table 2.
Values are expressed mean ± SD of eight mice.
* $p<0.01$ compared with intact control; † $p<0.01$ compared with tumor-bearing control.

Ⅳ. 고 찰

한국 통계청 자료에 따르면 2009년도의 폐암 사망자 수는 14,919명으로 우리나라 인구 10만 명당 약 30.0명이 폐암으로 사망하였다[1]. 비소세포 폐암의 경우 진단 당시 진행된 상태로 수술 적응증이 되지 못하는 경우가 많으며 이런 경우 방사선 치료, 항암화학요법을 시도하기도 하는데 이들의 효과는 매우 제한적이다. 또한 Ⅳ병기 비소세포 폐암 환자들의 경우 최선의 보존적 치료를 한다 해도 중앙생존기간이 16~17주로 예후가 극히 불량하다[31]. 또한 현재 사용되고 있는 암치료제의 대부분이 합성화학약품이나 방사선을 이용한 것으로서 이들은 대개가 강한 독성을 보이고 있으며 특히 면역 및 조혈기능에 심각한 장애를 나타낸다고 알려져 있다[32]. 그래서 항암 치료에 대하여 각종 부작용이 문제시 되고 안정성이 확립되지 않아 치료법에 대한 논란이 계속되고 있다[6,7].

한의학에서 암의 治法으로는 健脾益氣, 養血滋陰, 滋補肝腎, 滋陰溫陽, 理氣和血 등의 扶正培本法과 活血和瘀, 化痰軟堅, 淸熱解毒, 行氣散結, 以毒

攻毒 등의 祛邪法, 扶正과 祛邪를 兼施하는 扶正祛邪法으로 대별하는데 그중에서 인체의 항암능력을 강화시켜주는 扶正培本法과 祛邪하되 인체의 정기를 補益하고 정기를 손상시키지 않는 扶正祛邪法을 가장효과적인 방법으로 보고 있다[33,34].

본 실험에서는 扶正培本法의 의미로 當歸, 龍眼肉, 酸棗仁, 遠志, 人蔘, 黃芪, 白朮, 白茯神, 木香, 甘草, 生薑, 大棗의 총 12가지 약재로 구성되어 益氣補血, 健脾養心하는 효능[35]이 있는 歸脾湯을 이용하여 항암 및 면역 활성 및 종양과 관련된 악액질에 대하여 살펴봄으로써 다양한 기전의 가능성에 대해 연구해 보고자 한다.

NCI-H520 비소세포 폐암 세포주 이식 11일(종양 부피: 94 mm^3 전후) 후부터 歸脾湯 추출물을 매일 50, 100 및 200 mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 다음, 모든 실험동물을 희생하여 관찰하였다. 모든 실험 항목에서 활성제품 5-FU를 투여한 대조군을 설정하였는데, 5-FU는 비소세포 폐암에 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며[36,37], 항암제 개발에서 많이 사용되는 대조 약물 중 하나[36,38]이다.

누드 마우스는 전형적인 athymic 동물로 무모와 무흉선 돌연변이종으로 동종 유래의 종양 세포뿐만 아니라, 사람 유래의 종양세포 역시 이식 가능하여 항암제 개발 시에 가장 흔히 사용되는 실험동물이다[39,40]. 특히 Balb C nu/nu mouse는 human tumor xenografts 발현이 양호하여 종양과 관련된 연구에 널리 사용하며[41], 이 모델에서 항암효과에 대한 평가는 주로 이식한 종양의 성장 억제를 기준으로 이루어지고 있다[26,27].

본 실험의 결과, 歸脾湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 투여 28일후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 증가를 나타내어, 6주간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 歸脾湯 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 투여 35일후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 증가를 나타내어, 6주간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 감소가 투여 28일후부터 인정되기 시작하여, 6주간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 5-FU 투여군에서 가장 심한 체중 감소가 확인되었고, 歸脾湯 추출물 투여군에서는 용량 의존적으로 체중감소가 억제된 결과를 나타내었다. 5-FU 투여군에서는 암세포의 증식으로 인한 체중감소와 함께 5-FU로 인한 부작용이 복합적으로 작용한 것으로 판단된다.

종양의 부피와 중량의 변화를 살펴보면, 5-FU 투여군에서는 이전의 보고들[36-38]과 유사하게 현저한 종양 증식에 대하여 억제효과가 관찰되었다. 歸脾湯 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 의미 있는 종양 부피의 변화가 인정되지 않았으나, 歸脾湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 종양 부피의 감소가 인정되었으며 종양 중량은 모든 歸脾湯 추출물 투여에 의해 용량 의존적으로 현저한 감소를 나타내었다. 50 mg/kg 이상의 歸脾湯 추출물은 어느 정도 양호한 항암 활성을 나타낼 것으로 판단된다.

비장 및 슬와 임파절 중량의 변화를 살펴보면, 종양 이식 대조군에서 비장 및 슬와 임파절 중량의 감소가 인정되었으나 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다. 특히 歸脾湯 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 정상 대조군과 유사한 상대 중량이 관찰되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 절대 및 상대 중량의 감소가 나타났다.

또한 비장 및 슬와 임파절의 조직병리학적 변화를 살펴보면 종양 이식 대조군에서 비장 백색수질 부분과 슬와 임파절 피질 부분의 현저한 림프구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되었으나 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서는 비장 두께, 백색수질 직

경 및 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 인정되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 두께, 백색수질 직경 및 슬와 임파절의 절대 및 피질 두께가 감소되는 것으로 나타났다.

이전의 보고들[42-44]과 유사하게, 종양 이식 대조군에서 면역 활성 사이토카인인 IFN-γ의 혈중 함량 및 TNF-α, IL-1β의 비장 내 함량의 감소가 관찰되었으며, T 림프구 및 면역억제에 따른 면역 억제성 사이토카인인 IL-10의 비장 내 감소 역시 인정되었다. 한편 이러한 IFN-γ의 혈중 함량 및 TNF-α, IL-1β, IL-10의 비장 내 함량의 감소가 모든 歸脾湯 추출물 투여에 의해 매우 효과적으로 억제되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 IFN-γ의 혈중 함량 및 TNF-α, IL-1β, IL-10의 비장내 함량의 유의성 없는 감소가 인정되었다.

종양관련 면역억제의 일환으로, 종양시 NK 세포 및 대식세포 등 면역 담당세포의 기능이 억제되는 것으로 알려져 있고, 이들 면역 담당세포의 활성은 현재 또 다른 개념의 항암제 개발에 각광받고 있다[45,46]. 본 실험의 결과에서도 종양 이식 대조군에 의해 비장세포 및 복강 대식세포의 활성 감소가 인정되었으나, 이들 세포의 활성이 모든 歸脾湯 추출물 투여에 의해 매우 효과적으로 증가되었다.

누드 마우스는 가슴샘이 없어, T 임파구 매개성 세포 면역이 현저히 억제되어, 사람의 종양세포를 포함한 다양한 종양 이식 동물모델로 이용되고 있으나[47], 연령이 증가함에 따라, 가슴샘 밖에서 T 임파구의 성숙이 서서히 일어나며, 말초 혈액에서도 완전히 T 임파구가 소실되는 것이 아니라, 연령에 따라, 천천히 증가되는 것으로 알려져 있고, 특히 세포독성 T cell(CD8+) 이 helper T cell(CD4+)에 비해 현저히 많은 것으로 알려져 있다[48,49]. 따라서 본 연구의 결과 인정된 귀비탕 추출물의 항암효과 역시, Nude 마우스의 가슴샘 외 T 임파구의 성숙 등, 면역 활성 효과에 의해 매개될 것으로 판단된다.

이미 알려진 歸脾湯의 면역 활성 효과[18,19]에서 나타나듯이 위의 실험결과에서도 50 mg/kg 이상의 歸脾湯 추출물은 종양 관련 면역 억제를 억제하는 것으로 판단되며, 歸脾湯의 면역 활성 효과 역시 항암 활성에 어느 정도 관여할 것으로 판단된다. 한편 5-FU는 비소세포 폐암에 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나[36-38], 정상세포에 대한 독성 역시 강하여, 다양한 독성이 초래되는 것으로 알려져 있다[50,51]. 본 연구에서도 종양 관련 면역 억제 소견이 5-FU 투여에 의해 오히려 증가되는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에서 50 mg/kg 이상의 歸脾湯 추출물은 5-FU에 비해 낮은 항암효과를 보였지만, 세포사멸 증가 및 면역 활성에 의한 항암효과와 종양 관련 면역억제를 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었으며, 반면에 5-FU에서는 종양 관련 면역억제에 대한 효과는 인정되지 않았다. 歸脾湯의 임상에서의 단독 또는 항암치료와 병행하여 응용하기 위해서는 향후 생리활성을 나타내는 화학성분의 검색과 다양한 방면으로의 기전적 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

비소세포 폐암 세포주인 NCI-H520를 이식한 후 전형적인 종양관련 면역억제 현상이 유발된 누드 마우스를 이용하여, 歸脾湯 추출물의 항암, 면역 활성 효과를 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 歸脾湯 추출물 50 mg/kg 투여군에서는 의미 있는 종양 부피의 변화가 인정되지 않았으나, 歸脾湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 종양 부피의 증가를 유의하게 억제하였다. 그리고 종양 중량은 모든 歸脾湯 추출물 투여에 의해 용량 의존적으로 감소를 나타내었다.
2. 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되

었으며 조직병리학적 검사에서 비장 두께, 백색수질 직경 및 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 인정되었다.

3. 모든 歸脾湯 추출물 투여군에서 혈중 IFN-γ 함량, 비장내 TNF-α, IL-1β 및 IL-10 함량, 비장 NK세포 및 복강 대식세포 활성 감소가 효과적으로 억제되었다.

참고문헌

1. 통계청. 보건/사망원인시군구/사망원인(50항목)/성/사망자수, 사망률, 연령표준화 사망률(2005~) [internet]. 국가통계포털. [cited 2012 Nov 01]. Available at: http://kosis.kr.
2. 박재갑, 박찬일, 김노경. 종양학. 서울: 일조각; 2003, p. 304.
3. 김선영, 김근화. 폐암 항암화학요법의 최신지견. 결핵 및 호흡기질환 2000;49(5):533-45.
4. 오인재. 비소세포 폐암 세포주에 대한 항암 약제와 방사선 병합치료 방법의 개발. 학위논문(박사). 전남대학교 대학원; 2008.
5. Curran W, Scott C, Langer C, Komaki R, Lee JS, Hauser S. Phase Ⅲ comparison of sequential vs comcurrent chemoradiation for patients (Pts) with unresected stage Ⅲ non-small cell lung cancer (NSCLC): Initial report of radiation teraphy oncology group (RTPG) 9410. *Proc Am Sco Clin Oncol* 2000;19:484a.
6. 박철규, 김규식, 오인재, Tseden-Ish Manaljav, 최유덕, 권용수, 등. 재발성 비소세포 폐암에서 Pemetrexed 치료 효과와 Thymidylate Synthase 발현의 관계. 결핵 및 호흡기질환 2009;67:191-8.
7. 조광현. 새로운 항암제 의한 피부부작용. 대한피부과학회지 2010;48(4):257-65.
8. 유승후, 유화승, 조종관, 이연월. 항암단을 투여한 재발성 편평상피폐암 환자에 대한 7년간의 추적조사. 대한한방내과학회지 2007;28(2):385-90.
9. 박봉기, 유화승, 이연월, 한성수, 조정효, 손창규, 등. 수레바퀴 암치료를 시행한 폐암환자에 대한 후향적 코호트 분석. 대한한방내과학회지 2008; spr(1):45-56.
10. 손지영, 최규호, 유효정, 김희준, 구자환, 박미연, 등. 호흡곤란을 주소로 한 폐암환자의 한방치료 증례보고. 대한한방내과학회지 2009;30(1):233-40.
11. 김경순, 정태영, 유화승, 이연월, 조종관. 항암플러스 투여로 호전된 진행성 비소세포성 폐암 연속환자 증례. 대한한방내과학회지 2009;30(4):893-900.
12. 이승언, 홍재의, 이시형, 신조영, 노승석. 폐암세포주 H460에 대한 補中益氣湯의 세포괴사효과 및 기전연구. 대한한방내과학회지 2004;25(4):274-88.
13. 강윤경, 박동일, 이준혁, 최영현. 潤肺散에 의한 폐암 세포 증식억제기전에 관한 연구. 동의생리병리학회지 2002;164:745-55.
14. 김진영, 김현중, 정광식, 박철, 감철우, 박동일, 등. A539 및 NCI-H460 인체 폐암 세포의 증식 및 세포사멸 유도에 미치는 加味蔘芪補肺湯의 영향 대한한방내과학회지 2008;29(1):130-48.
15. 嚴用和. 濟生方. 北京: 人民衛生出版社; 1980, p. 117.
16. 김형철, 정대규. 歸脾湯, 加味溫膽湯 및 歸脾溫膽湯의 抗 Stress 效能 比較硏究. 동의신경정신과학회지 1993;4:99-119.
17. 박선동, 박현준, 주왕석. 歸脾湯 및 그 구성약물군이 항산화효과에 미치는 영향. 대한본초학회지 2001;16:11-27.
18. 임동욱, 유동열, 김동희. 加味歸碑湯 免疫調節作用에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지 1999;12:253-80.
19. Busta I, Xie HS, Kim MS. The use of Gui-Pi-Tang in small animals with immune-mediated blood disorders. *J Vet Clin* 2009; 26:181-4.

20. 김성호, 이송은, 오헌, 양정아, 정치영, 장종식, 등. 생쥐에서 歸脾湯 및 구성단미의 방사선 방호효과. 한국식품영양과학회지 1999;28:698-704.
21. Deveau AM, Costa NE, Joshi E, Macdonald L. Synthesis of diketopiperazine-based carboline homodimers and in vitro growth inhibition of human carcinomas. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:3522-5.
22. Shimizu Y, Kinoshita I, Kikuchi J, Yamazaki K, Nishimura M, Birrer MJ, *et al.* Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by AP-1 blockade using a cJun dominant-negative mutant. *Br J Cancer* 2008;98:915-22.
23. Cooks T, Schmidt M, Bittan H, Lazarov E, Arazi L, Kelson I, *et al.* Local control of lung derived tumors by diffusing alpha-emitting atoms released from intratumoral wires loaded with radium-224. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74:966-73.
24. Institute of Laboratory Animal Resourcis (Commission on Life Science, National Research Council, USA), Guide for the care and use of laboratory animals. 7. Washington, D.C.: National Academic press; 1996, p. 1-118.
25. Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. Inhibitory action of a (1-->6)-beta-D-glucan-protein complex (F Ⅲ-2-b) isolated from *Agaricus blazei Murill* ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* 1994;66:265-71.
26. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami, Tsukuda M. An antioxidant, probucol, induces anti-angiogenesis and apoptosis in athymic nude mouse xenografted human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(11):1224-30.
27. Liu L, Jiang Z, Teng GJ, Song JZ, Zhang DS, Guo QM, *et al.* Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:492-505.
28. Raffaghello L, Marimpietri D, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C, *et al.* Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett* 2003;197:205-9.
29. Clark BD, Bedrosian I, Schindler R, Cominelli F, Cannon JG, Shaw AR, *et al.* Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *J Appl Physiol* 1991;71:2412-8.
30. Hotchkiss RS, Osborne DF, Lappas GD, Karl IE. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock* 1995;3:337-42.
31. 김명훈, 박희선, 강현모, 장필순, 이연선, 안진영, 등. 제 Ⅳ병기 비소세포 폐암의 예후인자. 결핵 및 호흡기질환 2002;53:380.
32. 김동희, 김성훈. 항암제 및 방사선 부작용에 대한 한방요법. 대한동의병리학회지 1994;9:239-64.
33. 方葯中, 鄧鐵淺, 李克光, 陳可冀, 金壽山, 黃星垣, 등. 실용중의내과학. 상해: 상해과학기술출판사; 1986, p. 621-36.
34. 문구, 정병학, 김병주. 암동서의결합치료(Ⅰ). 익산: 원광대학교출판국; 1999, p. 253-303, 383-460.
35. 국윤범, 김상찬, 박선동, 박성규, 서부일, 서영배, 등. 方劑學. 서울: 영림사; 2008, p. 290-2.
36. Hanada M, Noguchi T, Yamaoka T. Amrubicin, a novel 9-aminoanthracycline, enhances the antitumor activity of chemotherapeutic agents against human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 2007;98:447-54.

37. Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Hatashita E, Yamada Y, *et al.* Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification. *Clin Cancer Res* 2009;15:907-13.
38. Natsume T, Watanabe J, Horiuchi T, Kobayashi M. Combination effect of TZT-1027 (Soblidotin) with other anticancer drugs. *Anticancer Res* 2006;26:1145-51.
39. Foster PA. Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol* 2008;33:27-37.
40. Kim YC, Kwon YS, Oh IJ, Kim KS, Kim SY, *et al.* National survey of lung cancer in Korea, 2005. *J Lung Cancer* 2007;6:67-73.
41. Kondo H, Kanzawa F, Saito S, Saijo N. In vitro and in vivo effects of cisplatin and etoposide in combination on small cell lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(10):1050-6.
42. Sogn JA. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 1998;9:757-63.
43. Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 1999;20:158-60.
44. Pawelec G, Heinzel S, Kiessling R, Müller L, Ouyang Q, Zeuthen J. Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update. *Crit Rev Oncog* 2000;97-133.
45. Ha ES, Hwang SH, Shin KS, Yu KW, Lee KH, Choi JS, *et al.* Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from Acanthpanax senticosus, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res* 2004;27:217-24.
46. Yu GM, Hwang IG. In vitro effect of Yuza (Citrus junos SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 2004;36:339-44.
47. Sharkey FE, Fogh J. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 1984;3:341-60.
48. Kennedy JD, Pierce CW, Lake JP. Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J Immunol* 1992;148:1620-9.
49. Cheng WH, Holmstrom A, Li X, Wu R., Zeng H, Xiao Z. Effect of dietary selenium and cancer cell xenograft on peripheral T and B lymphocytes in adult nude mice. *Biol Trace Elem Res* 2012;146(2):230-5.
50. Ferguson T. Prevention and delay of spontaneous mammary and pituitary tumors by long- and short-term ingestion of 5-fluorouracil in Wistar-Furth rats. *Oncology* 1980;37:353-6.
51. Habs M, Schmähl D, Lin PZ. Carcinogenic activity in rats of combined treatment with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1981;28:91-6.