



Original Article / 원저

人蔘養榮湯이 비소세포 폐암세포(NCI-H520) 이식 마우스에서 항암 및 면역 활성화에 미치는 영향

송광규·곽민아·김종대*

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

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

Kwang-Kyu Song · Min-A Kwak · Jong-Dae Kim*

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine,
Daegu Haany University

ABSTRACT

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

Methods : Three different dosages of ISYYTe, 50, 100 and 200 mg/kg were orally administered once a day for 42 days from 11 days after tumor cell inoculation. Six groups, which are intact control, tumor bearing control, 5-fluorouracil (FU) 30 mg/kg, ISYYTe 50 mg/kg, ISYYTe 100 mg/kg, ISYYTe 200 mg/kg, each of 8 mice per group were used in the present study. Changes on the body weight, tumor volume and weight, lymphatic organ (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)-1 β and IL-10 contents were observed with tumor mass and lymphatic organ histopathology to detect anticancer and immunomodulatory effects.

Results : As results of ISYYTe 50, 100 and 200 mg/kg treatment, decreases in the tumor volumes and weights were detected. At histopathological observations, decreases of tumor cell volumes in tumor masses were dose-dependently decreased mediated by increases of apoptosis among tumor cells by treatment of all three different dosages of ISYYTe. As results of tumor cell inoculation, marked decreases of spleen and popliteal lymph node weights, serum IFN- γ , splenic TNF- α , IL-1 β and IL-10 contents and splenocytes were observed with histopathological atrophic changes of spleen and popliteal lymph nodes.

Conclusions : Over 50 mg/kg of ISYYTe showed favorable anticancer effects on the NCI-H520 cell xenograft with immunomodulatory effects. Although relatively lower anticancer effects were observed in ISYYTe 200 mg/kg treated mice as compared with 5-FU 30 mg/kg treated mice, there are no meaningful favorable immunomodulatory effects were observed after 5-FU treatment in the present study.

Keyword : Insamyangyoung-tang extracts, Anticancer effects, Immunomodulatory effects, Non-small Cell Lung Carcinoma

I. 서 론

폐암은 전 세계적으로 암에 의한 사망 원인 중 1위를 차지하고 있으며, 우리나라에서도 2007년 통계에서 암 사망률 1위인 동시에 1997년 대비 사망률이 가장 많이 증가한 암으로서 그 비중이 점점 증가하고 있다¹⁾.

특히 비소세포 폐암(non-small cell lung carcinoma; NSCLC)은 우리 나라에서 전체 폐암의 87%를 차지하며, 조기 진단이 힘들어 진단 당시 이미 국소적으로 진행되거나 전이성 질환을 보이는 경우가 대부분이다²⁾. 현재 폐암의 서양의학적인 치료법으로는 외과적 수술, 화학적 치료 및 방사선 치료 등이 있는데 폐암을 치료하기 위하여 사용되는 여러 가지 화학적 치료제로는 5-fluor-

ouracil, doxorubicin, cisplatin, etoposide 및 gemcitabine 등이 있다³⁻⁵⁾.

하지만 이러한 화학적 치료제들은 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미치며, 특히 골수 세포와 소장 상피 세포에는 심각한 영향을 주는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁷⁾. 또한 최근 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구가 증가하면서 암과 당뇨, 노화 등의 성인병에 대한 대처방안으로 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물질들이 주목 받고 있다⁸⁻⁹⁾. 그 중에서도 약초식물들은 vitamins, carotenoids, flavonoids와 같은 폐놀성 화합물들이 다량 존재하여 항암성, 항산화성, 항알러지성 등 다양한 생리기능을 갖고 있는 것으로 보고되어⁹⁻¹⁰⁾ 한약 및 한방치방에 대한 연구가 더욱 주목 받고 있다.

人蔘養榮湯은 면역활성 효과¹¹⁾, 면역활성을 통한 항암 효과¹²⁾가 알려져 있으나, 人蔘養榮湯과 관련된 이전 연구는 Sarcoma-180 세포에 대한 보고로¹²⁾, 사람의 폐암 세포에서 유래한 대표적인 비소세포 폐암 세포주인 NCI-H520(human NSCLC;

*교신저자 : 김종태
소 속 : 대구한의대학교 한의과대학 폐계내과학교실
주 소 : 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대한방병원
·Tel. 053-770-2122 ·Fax. 053-770-2189
·HP. 011-820-9782 ·Email. omendoim@dhu.ac.kr
·접수 2013/05/20 ·수정 2013/05/27 ·채택 2013/06/07



squamous carcinoma)에 대한 항암 및 이와 관련된 면역활성과 약액질 억제에 대한 연구는 찾아볼 수 없었다.

이에 본 연구에서는 人蔘養榮湯의 NCI-H520에 대한 항암 및 이와 관련된 면역조절에 대한 효과를 확인하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 人蔘養榮湯 추출

본 실험에 사용된 약제는 약업사(Omniherb, 영천, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 판능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 人蔘養榮湯 1첩 분량의 조성은 Table 1과 같다. 선정된 약제 2첩 분량(110 g)을 취하여 정제수 1,100 ml로 60℃에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 감압농축기(Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzzland)로 점조성의 추출물을 얻은 다음 동결건조기(Labconco Freezone1, Labconco Corp, MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 11.01 g (수율 약 10.01%)의 연갈색 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 추출한 人蔘養榮湯 동결 건조물은 -20℃의 냉장고에 보관 후, 본 실험에 사용한 용매인 증류수에 20 mg/ml의 농도까지 용해시켜 사용하였다.

2) 실험동물 및 사양 관리

본 실험에 사용된 모든 실험동물은“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹³⁾에 준하여 취급하였다.

70마리의 수컷 Balb/c nu-nu 누드 마우스(4weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 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 4마

리씩 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 mm³되는 40마리를 선별하여 5개 군에 8마리씩 배정하였다.

Table 1. Composition of Insamyangyoung-tang Used in This Study

Herb name	Scientific name	Amounts (g)
白芍藥酒炒	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	8
當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	4
人蔘	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	4
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	4
黃芪蜜炒	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	4
肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	4
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	4
炙甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	4
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch. ex Steud	3
五味子	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon	3
防風	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	3
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	2
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	4
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder	4
Total		55

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

2. 방법

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 人蔘養榮湯 추출물 50 mg/kg 투여군(ISYYTe 50), 종양세포 이식 후 人蔘養榮湯 추출물 100 mg/kg 투여군(ISYYTe 100) 및 종양세포 이식 후 人蔘養榮湯 추출물 200 mg/kg 투여군(ISYYTe 200)의 6군으로 구분하여 실험하였다(Table 2).

2) 약물의 투여

人蔘養榮湯 추출물은 적정량을 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg 당 10 ml의 용량으로 종양 세포 이식 10일 후부터 매일 1회씩 42일간 금속제 Sonde가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여 하였다. 또한 5-FU는 Itoh¹⁴⁾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 人蔘養榮湯 추출물과 동일한 방법으로 투여하였다(Table 2).

3) 종양세포 이식

실험에 사용한 NCI-H520 세포를 American Type Culture Collection Center (VA, USA)로부터 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, NY, USA), penicillin (0.02 UI/ml; Sigma, MO, USA), streptomycin (0.02 µg/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°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하여 유지하였으며, 동물 이식 전 NCI-H520 세포는 Balb/c nu-nu 누드 마우스의 피하에 7~10일 간격으로 계대 배양하여 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 1.0×10⁷ cell/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 다시 등쪽 피하에 주사하여, 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에서 마우스의 등쪽 부위에 NCI-H520 종양 세포 부유액 0.2 ml (1×10⁷ cell/mouse) 씩을 피하 이식하여, 고형 종양을 형성하였다. NCI-H520 세포 이식 11일(종양 부피; 94 mm³ 전후) 후부터 약물을 42일간 경구 투여하였다.

Table 2. Experimental Grouping Used in This Study

Groups		Test article/Tumor inoculation/Dose (mg/kg/day)
Control	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 (3days interval for 42days)
ISYYTe	ISYYTe 50	ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 50 mg/kg (once a day for 42days)
	ISYYTe 100	ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 100 mg/kg (once a day for 42days)
	ISYYTe 200	ISYYTe in NCI-H520 cell inoculated mice, 200 mg/kg (once a day for 42days)

5-FU, 5-Fluorouracil; ISYYTe, Insamyangyoung-tang aqueous extracts (listed in Table 1); ISYYTe, 5-FU or vehicle (distilled water) were dosed at 10 ml/kg volume, once a day for 42days from 11days after NCI-H520 cell inoculation at dorsal back subcutaneous regions; 8mice per group, total 6groups were used this study; All animals were sacrificed after 42days softest article treatment (52days after tumor cell inoculation).

4) 체중 측정

모든 실험동물의 체중을 투여 시작 1일 전(종양 세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 1, 7, 14, 21, 28, 35, 41일 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 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 1일 전(종양 세포 이식 10일 후), 투여 시작일, 투여 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35일 및 최종 희생일에 Nishimura 등¹⁵⁾의 방법에 따라 각각 아래의 공식 [2]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 (mm³)
 = 1/2 × length × width²

EQUATION [3]. Tumor Volume Changes (mm³)
 = 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, Switzerland)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 percent change, tumor inhibition rate를 Liu 등¹⁶⁾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 ⁵¹Cr (sodium chromate) release assay로 평가하였다.¹⁷⁾ 최종 희생일에 25 mg/kg의 Zoletile

mixture 마취하에 비장세포 및 복강 대식세포 (macrophage)를 수거하였다. 일부 비장 실질조직 (10~20 mg)을 4°C 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 한번 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 Na²⁵¹CrO₄ (100 μ Ci/ 1×10^6 cells) (ICN Biomedicals, Assen, Belgium)으로 2시간 반응시켜 표지한 다음, 표적세포(splenocytes 또는 peritoneal macrophages)와 함께 37°C에 6시간 동안 배양하였다. Effector : 표적 세포 비율은 비장 및 복강 대식세포 모두 100 : 1로 조율하였고, 이후 상층액(Supernatants)을 수거하여, 51Cr에서 유리된 방사능을 gamma counter (Cobra 5002; Canberra Packard, CT, USA)를 이용하여 측정하였다. 표적 세포 손상(lysis)은 아래의 공식 [7]을 이용하여 % specific 51Cr release로 산출하였다.

$$\text{EQUATION [7]. NK cell activities \% Specific 51Cr Release} \\ = \frac{[(\text{Exp}-\text{S})/(\text{M}-\text{S}) \times 100]}{}$$

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

10) 비장내 사이토카인 함량의 측정

최종 희생일에 비장 조직의 일부(대략 10~15 mg/head)를 채취하여, Clark¹⁸⁾의 방법에 따라 1ml의 PBS(2 mM의 PMSF와 1 mg/ml의 aprotinin, leupeptin 및 pepstatin A가 포함된 인산완충액)을 이용하여 homogenize 하였다. 비장내 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 및 IL-10 함량을 각각 Mouse TNF- α ELISA kit (BD Biosciences/ Pharmingen, CA, USA), Mouse IL-1 β ELISA kit (Genzyme, MA, USA) 및 Mouse IL-10 ELISA kit (Genzyme, MA, USA)를 이용하여 Hotchkiss 등¹⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 분석은 lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄ sodium ortho-vanadate, 1 μ g/ml leupeptin 포함)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 cytokine에 대한 표준곡선(standard curve)은 흡광도를 이용하여 작성하였으며, 변이율(average coefficient of variance)은 10% 이하로 산출되었다.

11) 조직 병리학적 관찰

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

Histomorphometry - 세로로 절단(cross tri-

mmed)한 1 mm²의 종양 조직에서 종양 세포가 차지하는 비율과 종양세포 중 세포사멸(apoptosis)을 나타내는 세포의 비율을 각각 %/1mm² 및 %/tumor cells 단위로 자동 조직영상분석장치(DMI CCD image analyzer; DMI, Daegu, Korea)를 이용하여 측정하였다. 또한 세로로 절단한 비장 조직 표본에서 정중부(from apex of anterior border to center of posterior border)의 비장 전체 두께(mm/spleen), 백색수질(white pulp)의 수(N/1 mm² 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) 통계분석

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 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test를 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

종양 이식 대조군은 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 체중의 감소가 종양이식 10일 후부터 실험 전 기간 동안 인정되어, 투여 전 기간인 42일간의 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) 체중의 감소가 투여 28일 후부터 인정되기 시작하여, 42일간의 체중 증가량 역시 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 투여 35, 28 및 21일 후부터 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 체중의 증가를 나타내어, 42일간의 체중 증가량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었다(Table 3).

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.

人蔘養榮湯 추출물 50 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 투여 28일 후부터, 200 mg/kg 투여군에서는 투여 21일 후부터, 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 종양 부피의 감소를 나타내어, 42일간의 종양 부피의 변화량 역시 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었다(Table 4).

Table 3. Changes on the Body Weight Gains after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Body weight at		Body weight gains (B - A)
	Start of administration (A)	Sacrifice (B)	
Intact	18.70±1.06	23.29±0.86	4.59±0.85
Tumor-bearing	17.33±0.67**	16.76±0.86**	-0.56±0.83**
5-FU	17.40±0.80**	15.31±0.74***	-2.09±0.45***
ISYYTe 50	17.46±0.60**	18.04±0.57***	0.58±0.88***
ISYYTe 100	17.54±0.58**	18.53±0.68***	0.99±0.66***
ISYYTe 200	17.30±0.81**	19.13±0.99***	1.83±0.98***

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

Table 4. Changes on the Tumor Volume Changes after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Tumor volumes at		Tumor volume changes (B - A)
	Start of administration (A)	Sacrifice (B)	
Tumor-bearing	120.21±7.53	2818.03±193.48	2697.81±189.91
5-FU	120.04±6.96	1045.29±443.79 ^{##}	925.25±442.59 ^{##}
ISYYTe 50	119.89±7.44	2305.60±208.09 ^{##}	2185.71±207.16 ^{##}
ISYYTe 100	119.71±8.24	1996.95±351.12 ^{##}	1877.24±345.72 ^{##}
ISYYTe 200	121.23±9.44	1707.69±488.88 ^{##}	1586.46±482.96 ^{##}

Group ID was listed in Table 2; Values are expressed Mean ± SD of eight mice, ^{###}; ^{##} p<0.01 compared with tumor-bearing control.

3. 종양 중량의 변화

5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 종양 상대 및 절대 중량치의 감소가 인정되었다(Table 5).

4. 비장 중량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 경미하게 비장 절대 중량이 감소되었으나 유의성은 없었고, 상대 중량은 종양 이식 대조군과 유사한 중량의 변화를 나타내었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 비장 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정

되었다(Table 6).

5. 슬와 임파절 중량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해서 유의성 있는 (p<0.05) 슬와 임파절 절대 및 상대 중량의 감소가 각각 인정되었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 슬와 임파절 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다(Table 7).

6. 혈중 IFN-γ 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 IFN-γ 함량의 감소가

Table 5. Changes on the Tumor Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Tumor weights			
	Absolute weights (g)	Tumor inhibition rate(%)	Relative weights (% of body weights)	Tumor inhibition rate(%)
Tumor-bearing	2.041±0.299		12.218±2.061	
5-FU	0.705±0.136 ^{##}	-65.47	4.621±0.976 ^{##}	-62.18
ISYYTe 50	1.630±0.313 [#]	-20.14	9.058±1.822 ^{##}	-25.86
ISYYTe 100	1.229±0.128 ^{##}	-39.79	6.654±0.853 ^{##}	-45.54
ISYYTe 200	1.060±0.132 ^{##}	-48.06	5.552±0.723 ^{##}	-54.56

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 tumor-bearing control.

Table 6. Changes on the Spleen Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Spleen weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.085±0.012	0.367±0.051
Tumor-bearing	0.035±0.007**	0.206±0.039**
5-FU	0.031±0.009**	0.202±0.064**
ISYYTe 50	0.045±0.004**##	0.248±0.025**#
ISYYTe 100	0.048±0.005**##	0.262±0.031**##
ISYYTe 200	0.064±0.016*##	0.338±0.093##

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.

인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 혈중 IFN- γ 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 혈중 IFN- γ 함량의 증가가 인정되었다 (Fig. 1).

7. 비장 NK 세포와 복강 대식세포 활성화의 변화

Table 7. Changes on the Popliteal Lymph Node Weights after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Popliteal lymph node weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.009±0.002	0.037±0.007
Tumor-bearing	0.003±0.001**	0.018±0.007**
5-FU	0.002±0.001**#	0.011±0.005**#
ISYYTe 50	0.005±0.001**##	0.027±0.008*#
ISYYTe 100	0.006±0.002**##	0.030±0.008##
ISYYTe 200	0.008±0.001##	0.039±0.006##

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.

1) 비장 NK 세포 활성화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장세포의 세포독성 활성화도, 즉 NK 세포 활성화의 감소가 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장 NK 세포 활성화가 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는

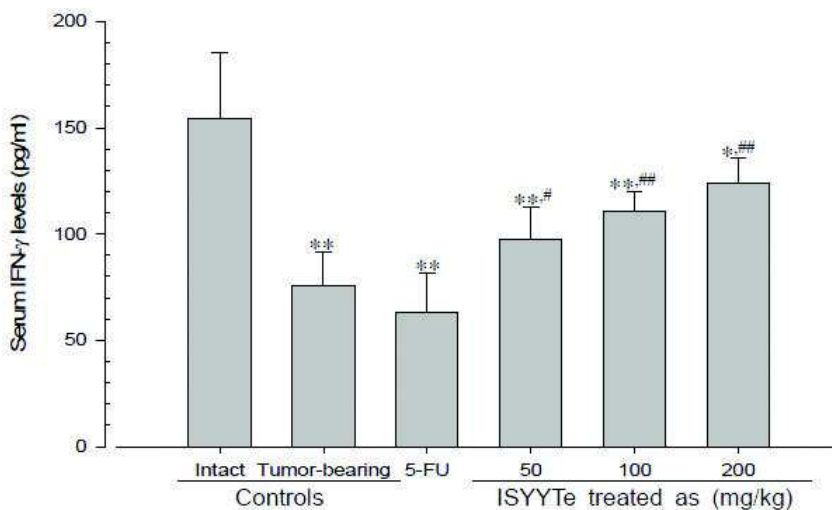


Fig. 1. Changes on the serum IFN- γ levels after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean ± SD of eight mice, pg/ml of sera; * p<0.05 and ** p<0.01 compared with intact control; # p<0.05 and ## p<0.01 compared with tumor-bearing control.

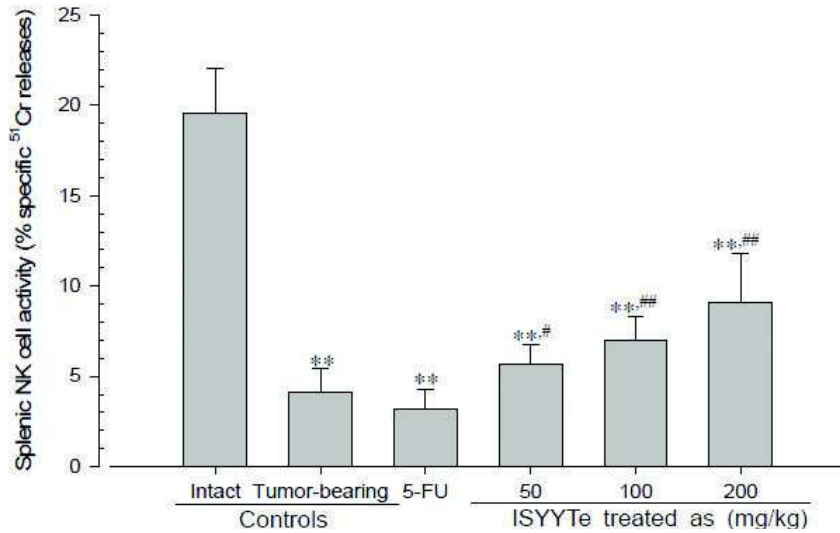


Fig. 2. Changes on the splenic NK cell activities after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, % specific ⁵¹Cr releases; ** p<0.01 compared with intact control; # p<0.05 and ## p<0.01 compared with tumor-bearing control.

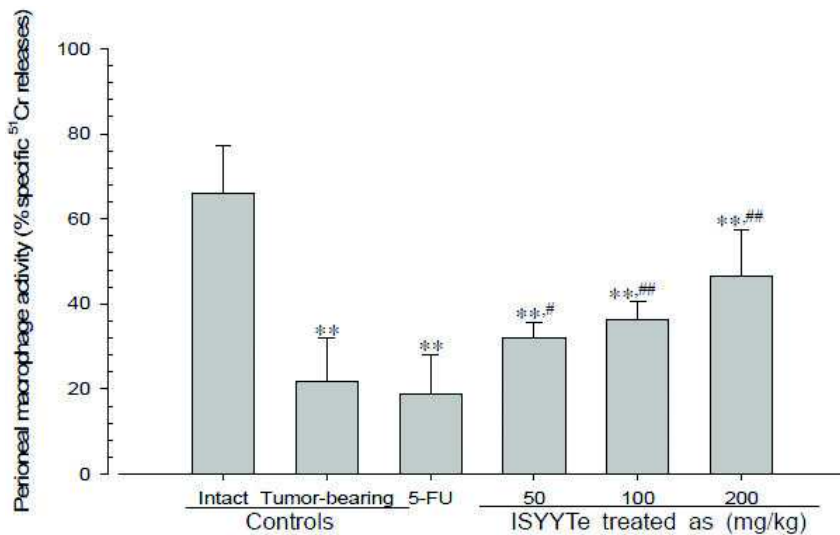


Fig. 3. Changes on the peritoneal macrophage activities after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, % specific ⁵¹Cr releases; ** p<0.01 compared with intact control; # p<0.05 and ## p<0.01 compared with tumor-bearing control.

는 p<0.05) 비장 NK 세포 활성의 증가가 인정되었다(Fig. 2).

2) 복강 대식세포 활성화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 복강 대식세포의 세포독성 활성도의 감소가 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 복강 대식세포 활성이 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01 또는 p<0.05) 복강 대식세포 활성의 증가가 인정되었다(Fig. 3).

Table 8. Changes on the Splenic Cytokine Contents Level after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Spleen weights	
	Absolute weights (g)	Relative weights (% of body weights)
Intact	0.085±0.012	0.367±0.051
Tumor-bearing	0.035±0.007**	0.206±0.039**
5-FU	0.031±0.009**	0.202±0.064**
ISYYTe 50	0.045±0.004**##	0.248±0.025**##
ISYYTe 100	0.048±0.005**##	0.262±0.031**##
ISYYTe 200	0.064±0.016*##	0.338±0.093##

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.

8. 비장내 사이토카인 함량의 변화

1) 비장내 TNF-α 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장내 TNF-α 함량의 감소가 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 TNF-α 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 비장내 TNF-α 함량의 증가가 인정되었다(Table 8).

2) 비장내 IL-1β 함량의 변화

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

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 IL-1β 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장내 IL-1β 함량의 증가가 인정되었다(Table 8).

3) 비장내 IL-10 함량의 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군에 비해

유의성 있는(p<0.01) 비장내 IL-10 함량의 감소가 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장내 IL-10 함량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 비장내 IL-10 함량의 증가가 인정되었다(Table 8).

9. 조직병리학적 변화

1) 종양의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 비교적 잘 분화된 NCI-H520 세포로 치밀하게 구성되어 있었으며, 일부 세포에서 apoptosis에 의한 호산성 및 핵 농축이 인정되었다.

5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 apoptotic 세포의 현저한 증가가 인정되었고, 결과적으로 정상적인 NCI-H520 세포가 차지하는 비율 역시 현저히 감소되었다(Fig. 4).

또한 5-FU 및 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 종양 조직 1mm² 당 NCI-H520 세포가 차지하는 비율의 감소 및 apoptotic 세포의 수적 증가가 인정되었다(Fig. 5, 6)

2) 비장의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 비장 백색수질 부분의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수의 감소가 각각 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 비장 두께, 백색수질 직경 및 수가 감소되었으나 유의성은 없었다.

人蔘養榮湯 추출물 100 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다. 또한 人蔘

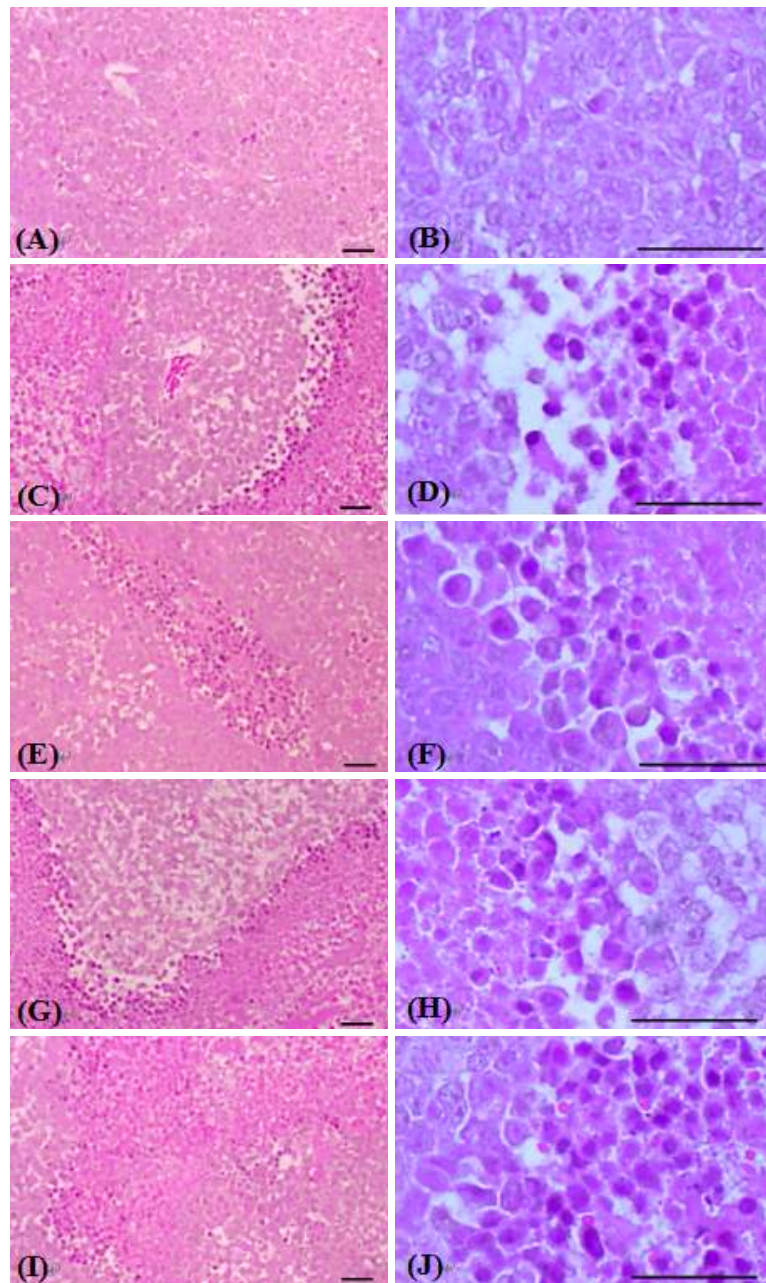


Fig. 4. Changes on the tumor mass histopathological profiles after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Note that the relatively well-differentiated tumor cells were existed in the tumor mass of tumor-bearing control with rare frequencies of apoptotic cells. However, the apoptotic tumor cells were markedly increased in the tumor masses of 5-FU and all three different dosages of ISYYTe as compared with tumor-bearing control, respectively; consequently, the tumor cells were markedly decreased. A, B: tumor-bearing control; C, D: 5-FU 30 mg/kg treated mice; E, F: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μ m

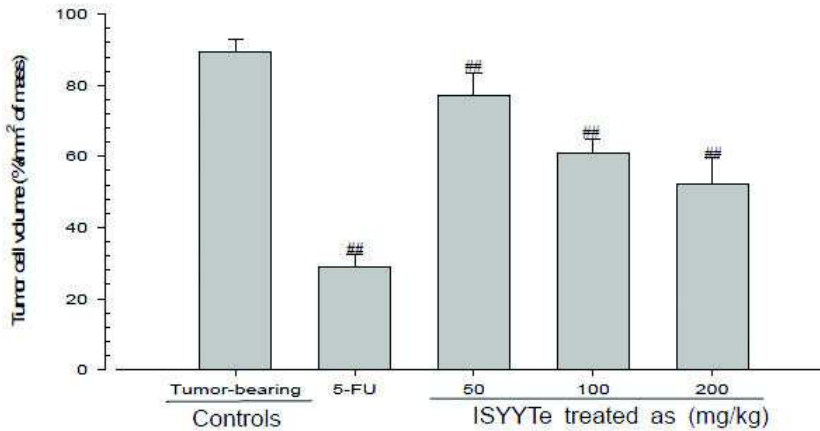


Fig. 5. Changes on the tumor cell volumes in the tumor masses after *Insamyangyoung-tang* extracts administrations. Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, %/mm² of mass; ## $p < 0.01$ compared with intact control.

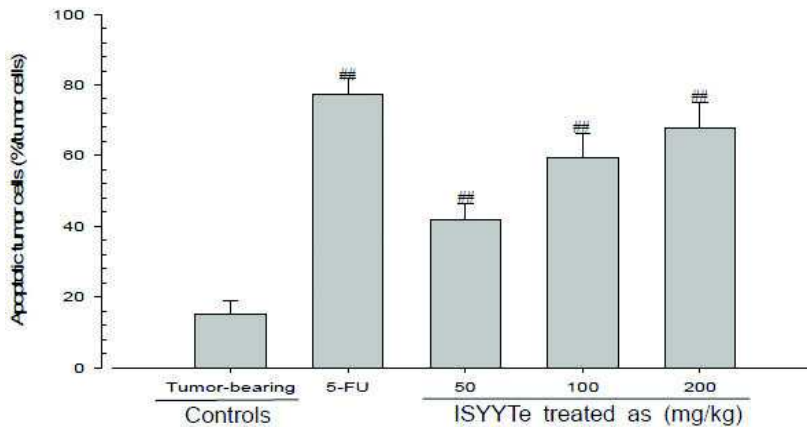


Fig. 6. Changes on the apoptotic tumor cell numbers in the tumor masses after *Insamyangyoung-tang* extracts administrations. Group ID was listed in Table 2; Values are expressed mean \pm SD of eight mice, %/tumor cells; ## $p < 0.01$ compared with intact control.

榮湯 추출물 50mg/kg 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장 두께가 증가되었으나 유의성이 없었고, 백색수질 직경 및 수의 증가에서는 각각 유의성이 인정되었다($p < 0.01$) (Fig. 7, Table 9).

3) 슬와 임파절의 조직병리학적 변화

종양 이식 대조군에서는 정상 대조군 비해 슬와 임파절 피질 부분의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 정상 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 감소가 각각 인정되었다.

5-FU 투여군에서는 종양이식 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 슬와 임파절 전체 두께의

감소가 인정되었고, 피질 두께의 감소는 관찰되었으나 종양이식 대조군에 비해 유의성은 없었다.

모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 각각 종양 이식 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 조직병리학적으로 인정되었다(Fig. 8, Table 10).

IV. 고 찰

폐암은 2000년부터 우리나라 암 사망률 1위를 차지하고 있으며²⁰⁻²³, 2005년도의 폐암 사망환자

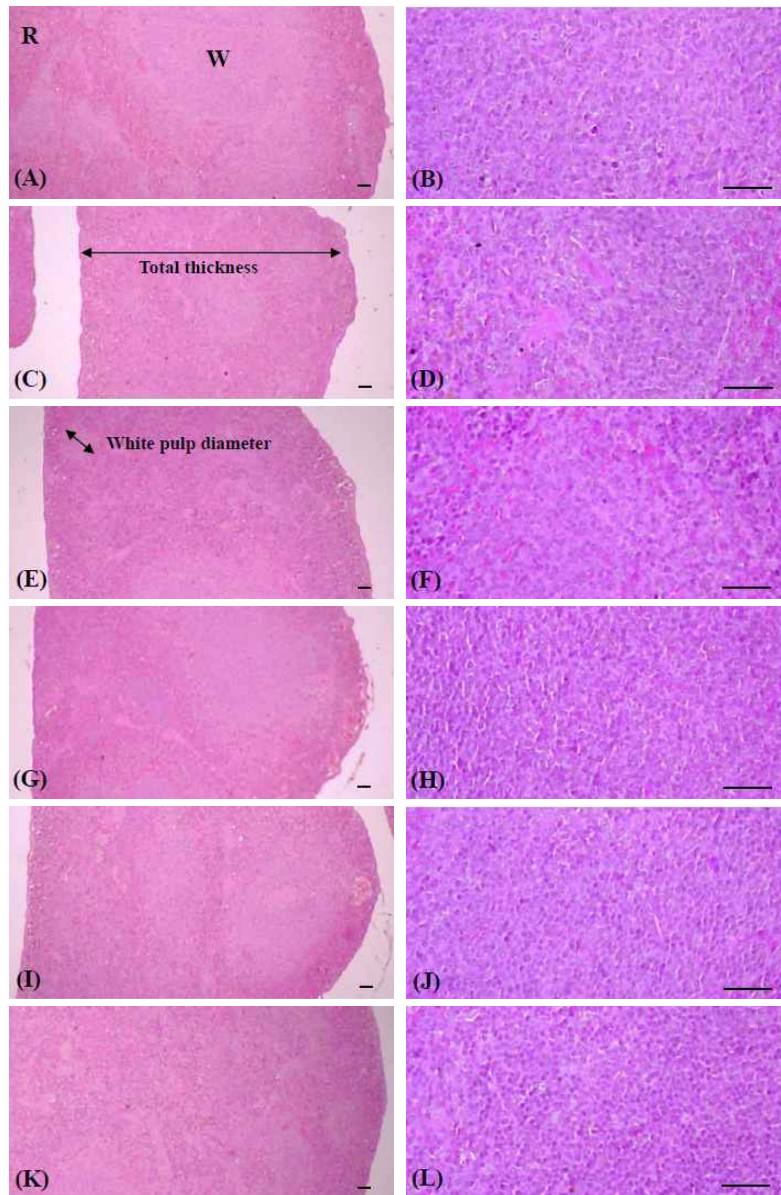


Fig. 7. Changes on the spleen histopathological profiles after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Note that the atrophic changes related to the decrease of splenic white pulp lymphoid cells were detected in tumor-bearing control as compared with intact control, consequently the total splenic thicknesses, white pulp numbers and diameters were markedly decreased in tumor-bearing mice as compared with intact control, respectively. However, these splenic atrophic changes were markedly inhibited by treatment of all three different dosages of ISYYTe (50, 100 and 200 mg/kg; dose-dependently) as compared with tumor-bearing control, respectively. The splenic atrophic changes were slightly increased in 5-FU treated mice as compared with tumor-bearing control. A, B: intact control; C, D: tumor-bearing control; E, F: 5-FU 30 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; K, L: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; W, white pulp; R, red pulps, Arrows indicated the total thicknesses or white pulp diameters measured; All hematoxylin-eosin stain; Scale bars = 80 μ m

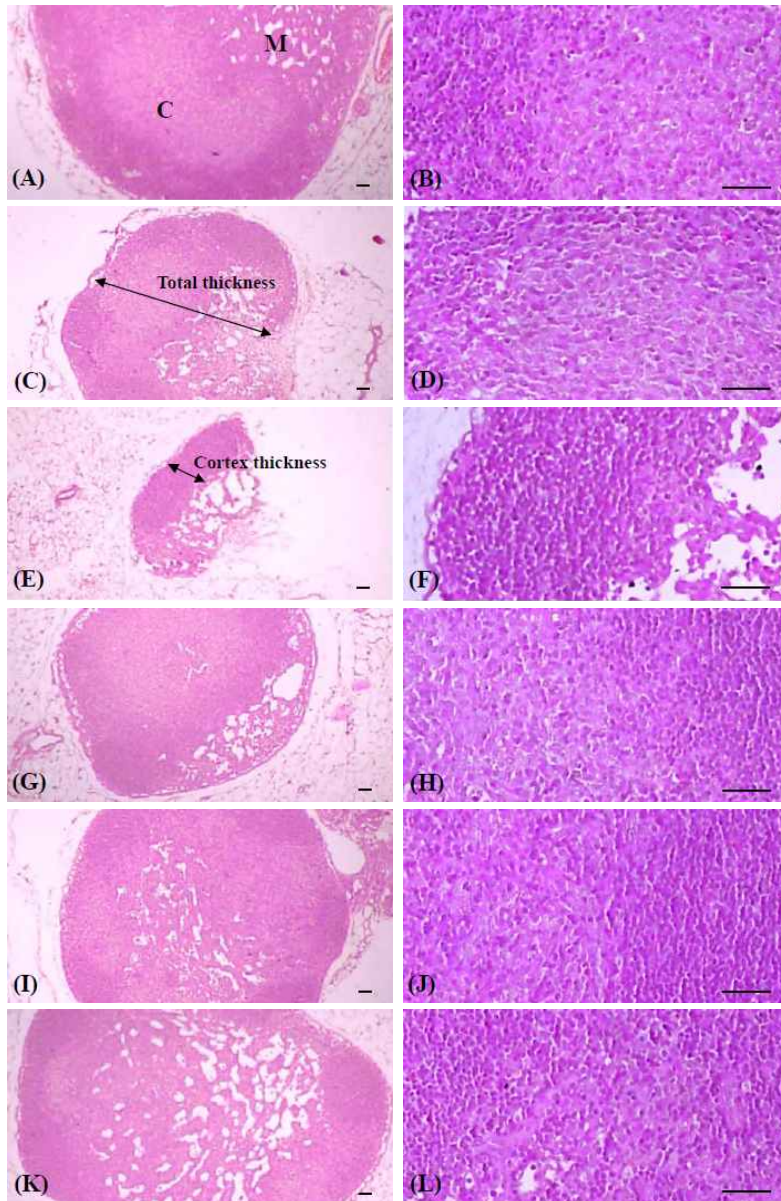


Fig. 8. Changes on the popliteal lymph node histopathological profiles after Insamyangyoung-tang extracts administrations. Note that the atrophic changes related to the decrease of lymph node lymphatic cells were detected in tumor-bearing control as compared with intact control, consequently the total and cortex thicknesses were markedly decreased in tumor-bearing control as compared with intact control, respectively. However, these lymph node atrophic changes were markedly inhibited by treatment of all three different dosages of ISYYTe (50, 100 and 200 mg/kg; dose-dependently) as compared with tumor-bearing control, respectively. The lymph node atrophic changes were markedly increased in 5-FU treated mice as compared with tumor-bearing control. A, B: intact control; C, D: tumor-bearing control; E, F: 5-FU 30 mg/kg treated mice; G, H: ISYYTe 50 mg/kg treated mice; I, J: ISYYTe 100 mg/kg treated mice; K, L: ISYYTe 200 mg/kg treated group. Group ID was listed in Table 2; C, cortex; M, medullary sinus, Arrows indicated the total or cortex thicknesses measured; All hematoxylin- eosin stain; Scale bars = 80 μ m

Table 9. Changes on the Histomorphometry of Spleen after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Splenic histomorphometrical changes		
	Total thickness (mm/central region)	White pulp numbers (N/mm ²)	Diameters of white pulps (mm/white pulp)
Intact	3.81±0.44	11.75±2.60	1.41±0.29
Tumor-bearing	2.16±0.21**	3.38±1.19**	0.28±0.07**
5-FU	1.94±0.36**	3.00±1.07**	0.23±0.05**
ISYYTe 50	2.45±0.23**	6.75±1.49***	0.88±0.18***
ISYYTe 100	2.69±0.28***	7.75±1.28***	1.04±0.20***
ISYYTe 200	2.94±0.41***	8.75±2.49***	1.12±0.13***

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

수는 13,733명으로 우리나라 인구 10만명 당 약 29.2명이 폐암으로 사망하였다²²⁾. 현재 국내에서는 비교적 좋은 예후를 나타내는 선암이 가장 높은 빈도의 폐암이 되었고, 여성의 폐암과 비흡연자의 폐암이 증가 추세에 있다^{2,23)}. 폐암은 진단 당시 15% 만이 국소적인 병변을 가지고 있고, 약 25% 정도에서는 지역 림프절 침범이 있으며, 나머지 55% 이상에서 이미 원격전이가 있기 때문에 조기 진단이 힘들어 치료가 어려운 질환으로 간주되고 있다. 임상적으로 편평세포암, 선암, 대세포암은 병기판정 및 치료방법이 동일하기 때문에 비소세포암으로 총칭하고 있다²⁰⁻³⁾.

비소세포 폐암의 치료는 병기에 따라 결정되는데, I~II 병기에서는 근치적 목적의 수술적 절제가 원칙이고, IV 병기에서는 완화 목적의 항암화학 치료를 시행한다²⁰⁻¹⁾. 그러나 국소종양의 제어가 어려울 뿐만 아니라 진단 당시 영상 검사로는 발견하기 어려운 미세전이 (micrometastasis) 종양 세포가 존재하여 폐에 국한된 방사선 요법을 시행한 다음 원격 장기에서의 재발을 초래하는 경우가 있으므로, 방사선 단독요법으로는 5년 생존율이 10% 미만으로 좋지 못하다. 따라서 이러한 원격 장기에서의 재발을 막기 위해 다양한 방법의 항암화학요법이 방사선 치료에 병용되고 있고, 이러한 병용 치료가 방사선 단독 치료보다 우수함이 밝혀지고 있다²¹⁾. 그러나 이러한 서양의학적인 치

Table 10. Changes on the Histomorphometry of Popliteal Lymph Nodes after Insamyangyoung-tang Extracts Administrations

Groups	Popliteal lymph node histomorphometrical changes	
	Total thickness (mm/central region)	Cortex thickness (mm/cortex)
Intact	3.12±0.38	1.23±0.19
Tumor-bearing	1.47±0.30**	0.46±0.10**
5-FU	0.94±0.23***	0.36±0.05**
ISYYTe 50	1.97±0.16***	0.65±0.12***
ISYYTe 100	2.29±0.23***	0.78±0.14***
ISYYTe 200	2.53±0.11***	0.90±0.17***

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

료에는 각종 부작용이 발생하여 여전히 안정성이 확립되지 않은 상태로 논란의 여지가 많다.

人蔘養榮湯은 『三因極一病證方論』에 처음 수록된 처방²⁴⁾으로, 현재 대표적인 補益劑로 사용되고 있다. 人蔘養榮湯은 白芍藥, 當歸, 人蔘, 白朮, 黃芪, 肉桂, 陳皮, 炙甘草, 熟地黃, 五味子, 防風, 遠志, 生薑 및 大棗의 14 종류의 약제로 구성된 처방으로 十全大補湯에서 川芎을 去하고 五味子, 遠志, 陳皮 등을 加하여 구성된 방제이다. 益氣補血하고 養心安神하는 功效가 있어, 積勞虛損으로 인한 呼吸少氣, 心虛驚悸, 咽乾 唇燥 등의 증상을 치료하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 萬病回春에서는 “人蔘養榮湯은 虛勞로 말미암아 耗損을 이루고 氣血이 不足하여 여위며 倦怠하고 氣短하며 食少하고 혹은 寒熱, 自汗하는 증을 다스린다.”고 하였다²⁶⁾.

虛勞는 항암제의 부작용에 의한 면역기능의 저하로 인한 증상과 유사하며 人蔘養榮湯이 항암제의 부작용과 같은 안정성에 대한 문제를 경감시킬 수 있을 것으로 예상되어, 아직 자세한 조절작용의 기전이 규명되지 않은 人蔘養榮湯의 항암 및 면역활성 효과에 대해 살펴 봄으로써 좀 더 다양한 기전의 가능성에 대해 연구해 보고자 하였다. 그리하여 본 연구에서는 사람의 폐암세포에서 유래한 대표적인 비소세포 폐암세포주인 NCI-H520를 이식한 후 전형적인 종양관련 면역억제 현상이

유발된 nude 마우스를 이용하여 人蔘養榮湯 추출물의 항암, 면역활성 효과를 알아보았다.

NCI-H520 이식 10일(종양 부피; 94 mm³ 전후) 후부터 人蔘養榮湯 추출물을 매일 50, 100 및 200mg/kg의 농도로 각각 42일간 경구 투여한 다음, 모든 실험동물을 희생하여 관찰하였다. 실험 결과는 비소세포 폐암에 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며²⁷⁻⁸⁾, 항암제 개발에 가장 빈번히 사용되는 대조 약물 중 하나인^{27,29)} 5-FU 30mg/kg 복강 투여군과 각각 비교하였다.

종양 부피, 종양 무게, 면역장기(비장 및 슬와 임파절)의 중량, 혈중 IFN- γ 함량, 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성도, 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10 함량, 종양 및 면역장기의 조직병리학적 변화(종양 내 종양 세포가 차지하는 비율 및 종양 세포 중 apoptosis를 나타내는 세포의 수, 비장 전체 두께, 백색수질의 수 및 직경, 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 변화)와 함께 관찰하여, 항암 및 면역 활성화효과를 각각 살펴 보았다.

본 실험의 결과, 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 종양 부피 및 중량의 감소가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서 종양 내 apoptosis 세포의 증가에 의한 종양 세포의 비율 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 용량 의존적으로 관찰되었다. 그러므로 50 mg/kg 이상의 人蔘養榮湯 추출물은 어느 정도 양호한 항암효과를 나타낼 것으로 보이며 이러한 人蔘養榮湯의 항암효과는 조직병리학적 검사에서 관찰된 apoptosis 세포의 증가에 기인한 것으로 판단된다. 한편 5-FU 투여군에서는 이전의 보고들²⁷⁻⁹⁾과 유사하게 현저한 항암효과가 인정되었다. 종양 상대 중량에 대한 성장 억제율이 5-FU, 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서 각각 62.18, 25.86, 45.54 및 54.56% 로 관찰되어, 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 5-FU 투여군에 비해 비교적 낮은 항암 효과를 나타내었다.

비장 및 슬와 임파절 중량의 변화를 살펴보면, 실험결과 종양 이식 대조군에 비해 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절

의 상대 및 절대 중량치의 증가가 인정되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 절대 및 상대 중량의 감소가 나타났다.

또한 비장 및 슬와 임파절의 조직병리학적 변화를 살펴보면, 실험결과 종양 이식 대조군에 비해 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 두께, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 인정되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 두께, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 두께가 각각 감소되는 것으로 나타났다.

TNF- α 는 비장세포를 포함한 여러 종류의 세포에서 생산되는 대표적인 cytokine의 일종으로 T 임파구의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고³⁰⁾ 일반적으로 세포성 면역을 활성화 시키며, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2의 기능을 증가시킨다³¹⁾. 또한 IL-1은 대식세포, 수지상 세포, 임파구, 내피세포, 섬유세포 및 각질세포 등 다양한 세포에서 분비되는 cytokine으로 세포의 분비형태인 IL-1 β 와 막 부착형인 IL-1 α 의 두 종류가 존재하며, 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³²⁾. IL-10은 전형적인 면역억제 cytokine으로 Th2 세포, 일부 B 림프구 및 활성화된 대식세포에서 분비되고, 주로 활성화된 대식세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. IFN- γ 는 CD8+ T 림프구, Th1 세포 및 NK 세포에서 분비되며, B 및 T 세포의 기능에 영향을 미치고, NK 세포와 대식세포의 기능을 강화시킨다³¹⁾. 본 실험의 결과, 이전의 보고들³³⁻⁵⁾과 유사하게, 종양 이식 대조군에서 면역활성 cytokine인 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 혈중 IFN- γ 의 함량의 감소가 관찰되었으며, T 임파구 및 면역억제에 따른 면역억제 cytokine인 비장내 IL-10의 함량의 감소 역시 인정되었다. 하지만 이러한 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량과 혈중 IFN- γ 의 함량의 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 매우 효과적으로 억제되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 종양 이식 대조군에 비해 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량과 혈중 IFN- γ 의 함

량이 감소되었으나 유의성은 없었다.

종양관련 면역억제로 인해 NK 세포 및 대식세포 등 면역 담당세포의 기능이 억제되는 것으로 알려져 있고, 이들 면역 담당세포의 활성화는 현재 또다른 개념의 항암제 개발에서 각광받고 있다³⁶⁻⁷⁾. 본 실험의 결과에서도, 종양 이식 대조군에서 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성화 감소가 인정되었으나, 이들 세포의 활성화가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 매우 효과적으로 증가되었다. 한편 5-FU 투여군에서는 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성화의 감소가 인정되었다.

이미 알려진 人蔘養榮湯의 면역활성 효과¹¹⁾에서 나타나듯이 위의 실험결과에서도 50 mg/kg 이상의 人蔘養榮湯 추출물은 종양 관련 면역저하를 억제하는 것으로 보이며, 人蔘養榮湯의 면역활성 효과 역시 항암활성에 어느 정도 관여할 것으로 판단된다. 한편 5-FU는 비소세포 폐암에도 비교적 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나²⁷⁻⁹⁾, 정상세포에 대한 세포 독성 역시 강하여, 다양한 독성이 초래되는 것으로 알려져 있다³⁸⁻⁹⁾. 본 연구에서도 종양 관련 면역 억제 소견이 5-FU 투여에 의해 오히려 증가되는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에서 50 mg/kg이상의 人蔘養榮湯 추출물은 5-FU에 비해 낮은 항암효과를 보였지만, apoptosis 증가 및 면역 활성화에 의한 항암 효과와 종양관련 면역저하를 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었다. 반면에 5-FU에서는 종양 관련 면역저하에 대한 억제 효과는 관찰되지 않았다. 향후 人蔘養榮湯은 임상에서 항암제의 부작용 문제에 대한 대안으로 단독 또는 항암치료와 병행하여 응용이 가능할 것으로 보인다. 그러나 생리활성을 나타내는 화학성분의 검색과 더불어 급후 다양한 방면으로의 기전적인 연구 및 폐암이외의 다른 암주에 대한 추가적인 연구를 더 수행해야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

비소세포 폐암 세포주인 NCI-H520를 이식한 후 전형적인 종양관련 면역억제 현상이 유발된 누드마우스를 이용하여, 人蔘養榮湯 추출물의 항암, 면역 활성화 효과를 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 人蔘養榮湯 추출물 투여에 의해 종양 부피 및 중량의 감소가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서도 종양내 apoptosis 세포의 증가에 의한 종양 세포의 비율 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 용량 의존적으로 관찰되었다.

2. 모든 人蔘養榮湯 추출물 투여군에서는 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 증가가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서 비장 두께, 백색수질 직경 및 수와 슬와 임파절 전체 및 피질 두께의 증가가 관찰되었다.

3. 비장내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 함량, 혈중 IFN- γ 의 함량, 비장 NK 세포 및 복강 대식세포의 활성화의 감소가 人蔘養榮湯 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 투여에 의해 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Korea National Statistic Office. 2007 annual report on the cause of death statistics. 2008. Available from: URL:http://nso.go.kr
2. Kim YC, Kwon YS, Oh IJ, Kim KS, Kim SY, Ryu JS. National survey of lung cancer in Korea, 2005. J Lung Cancer. 2007;6:67-73.
3. Yang CH, Tsai CM, Wang LS, Lee YC, Chang CJ, Lui LT, Yen SH, Hsu C, Cheng AL, Liu MY, Chiang SC, Chen YM, Luh KT, Huang MH, Yang PC, Perng RP. Gemcitabine and cisplatin multimodality treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. Br J Cancer. 2002; 86:190-5.
4. Scarpato MD, Vicidomini G, Santini M. Gem-

- citabine and small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;34:313-4.
- Worden FP, Kalemkerian GP. Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9:565-79.
 - Massarelli E, Herbst RS. Use of novel second-line targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*. 2006;33:9-16.
 - Steinke K. Lung tumors. *Recent Results Cancer Res*. 2006;167:107-22.
 - Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS, Lee KN. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor J Herbology*. 2008;23:1-8.
 - Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009;38:25-31.
 - Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J Food Sci Technol*. 2006;38:128-34.
 - Eun JS, Kim DK, Choi H, Oh CH. Effect of *Insamyangyoung-tang* on the Specific Immune Response in BALB/c Mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2002;16:729-33.
 - Ha JY, Jo SY. Effect of *Insamyangyoung-tang* on the Anticancer and Immunomodulating effect. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 1998;12:60-71.
 - Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Science, National Research Council, USA). Guide for the care and use of laboratory animals. 7th ed. Washington:National Academic press. 1996:1-118.
 - Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. Inhibitory action of a (1->6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-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.
 - Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, 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;90:1224-30.
 - Liu L, Jiang Z, Teng GJ, Song JZ, Zhang DS, Guo QM, Fang W, He SC, Guo JH. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol*. 1999;5:492-505.
 - Raffaghello L, Marimpietri D, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C, Ponzoni M, Montaldo PG. Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett*. 2003;197:205-9.
 - Clark BD, Bedrosian I, Schindler R, Cominelli F, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *J Appl Physiol*. 1991;71:2412-8.
 - 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.
 - Society for Pathology of Korea. Chapter of Daegu Kyungbuk. *Pathology Digest*. Seoul: Jeongmoonsa, 2008:191-217.
 - Oh IJ. Development of Combination Treatment of Anticancer drug and Radiotherapy in Non-small Cell Lung Carcinoma. Doctoral thesis of Chonnam University. 2008.
 - Korea National Statistical Office. Death rate statistics of Korea, 2005. Seoul, Korea National Statistical Office, 2007.

23. Scientific Committee of Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases. The national survey of lung cancer in Korea. *Tuberc Respir Dis.* 1999;46:455-65.
24. Peng HR. Dictionary of formulas of traditional chinese medicine(first book). Beijing:People's Health Publishing House. 1995;467.
25. Kuk YB, Kim SC, Park SD, Park SK, Seo BI, Seo YB, etc. *Oriental Medicine Prescription.* Seoul:Younglimsa, 2008:294.
26. Hur J. Translated with Korean Enlarged Donggeuibogam. Seoul:Namsandang. 1992:671.
27. 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.
28. Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Hatashita E, Yamada Y, Yoshida T, Nishio K, Fukuoka M, Jänne PA, Nakagawa K. 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.
29. Natsume T, Watanabe J, Horiuchi T, Kobayashi M. Combination effect of TZT-1027 (Soblidotin) with other anticancer drugs. *Anticancer Res.* 2006;26:1145-51.
30. Samira S, Ferrand C, Peled A, Nagler A, Tovbin Y, Ben-Hur H, Taylor N, Globerson A, Lapidot T. Tumor necrosis factor promotes human T-cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells.* 2004;22:1085-100.
31. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: Tizard IR. *Immunology an introduction.* 4th ed. Philadelphia:Saunders. 1995:155-69.
32. Unanue ER. The Mononuclear Phagocytic System. In: Tizard IR. *Immunology an introduction.* 4th ed. Philadelphia:Saunders, 1995:61-74.
33. Sogn JA. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity.* 1998;9:757-63.
34. 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.
35. 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;11:97-133.
36. Ha ES, Hwang SH, Shin KS, Yu KW, Lee KH, Choi JS, Park WM, Yoon TJ. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthpanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res.* 2004;27:217-24.
37. 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.
38. Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004;30:181-91.
39. Dalzell JR, Samuel LM. The spectrum of 5-fluorouracil cardiotoxicity. *Anticancer Drugs.* 2009;20:79-80.