

## 五積散 경구투여에 의한 면역활성과 종양 전이 억제 효과

경희대학교 한방부인과 한방부인과학교실  
이미주, 황덕상, 이진우, 장준복, 이경섭, 이창훈

### ABSTRACT

#### Activation of Immune System & Antimetastatic Effects of *Ojeok-san* by Oral Administration

Mi-Joo Lee, Deok-Sang Hwang, Jin-Moo Lee  
Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee, Chang-Hoon Lee

Dept. of Korean Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

**Objectives:** This study was designed to investigate intestinal immune system activation and antimetastatic effect of *Ojeok-san* on cancer cells by oral administration.

**Methods:** Cell viability of *Ojeok-san* was tested with colon 26-M3.1 carcinoma cells and Peyer's patch cells *in vitro*. Antimetastatic experiments were conducted *in vivo* mouse model by using colon 26-M3.1 carcinoma cell. To observe immunomodulating effects of *Ojeok-san* on Peyer's patch cells, we measured interleukin (IL)-4, GM-CSF. In addition to observing effects of *Ojeok-san* on hematopoiesis, we measured proliferation of bone marrow cells mediated by Peyer's patch cells *in vitro*.

IgA induction activated in serum and intestinal content was measured to observe the effect of orally administered *Ojeok-san* on mucosal immune system. After administering Ovalbumin (OVA) with *Ojeok-san*, Proliferation of Peyer's patch cell was measured to investigate gut immunostimulatory effect.

**Results:** *in vitro* cytotoxicity analysis, the inhibitory concentration (IC)<sub>50</sub> of the colon 26-M3.1 carcinoma cell was 890 µg/ml. IC<sub>50</sub> of the Peyer's patch cells with LPS was 990 µg/ml. We found that orally administered *Ojeok-san* significantly inhibited tumor metastasis *in vivo*. In addition, the amounts of IL-4 and GM-CSF in the culture supernatant of Peyer's patch cells were significantly increased compared to the control group. The proliferation of bone marrow cell was significantly up-regulated with *Ojeok-san*. These results indicate that oral administration of *Ojeok-san* enhances the secretion of hematopoietic growth factors such as GM-CSF and IL-4 from Peyer's patch cells, and these cytokines also act on modulator of bone marrow cell proliferation.

After orally administering Ovalbumin (OVA) with *Ojeok-san*, IgA induction and Proliferation of peyer's patch cell was up-regulated with *Ojeok-san*. These results means orally administered *Ojeok-san* activates intestinal immune system and has an inhibitory effect on tumor metastasis.

**Conclusions:** Orally administered *Ojeok-san* appears to have considerable activity on the anti-metastasis by activation of immune system.

**Key Words:** *Ojeok-san*, Cancer, Anti-Metastasis, Complementary Therapies, Immune System

## I. 서 론

우리나라 사망 원인 분석에 따르면 2001년 암으로 인한 사망률은 인구 10만명당 122.9명이었고 2011년에는 142.8명으로 매년 그 비중이 증가 추세에 있다<sup>1)</sup>. 특히 1999년부터 2008년 사이에 남성 암환자는 61.5% 증가했지만 여성 암환자는 97.5% 늘어 여성의 암 발생속도가 남성보다 빠른 것으로 조사되었다<sup>2)</sup>.

인구의 노령화와 산업화로 인한 환경 파괴 및 오염물질의 증가, 잘못된 식습관으로 인해 암의 발생억제와 화학요법, 수술요법, 방사선 요법 등의 다양한 암 치료법의 개발에도 불구하고 근원적 치료에 대해서는 임상적 한계에 부딪히고 있는 실정이다<sup>3)</sup>. 이에 면역요법 및 기존의 치료방법을 혼합한 병용요법이 암 극복을 위해 개발되어야 할 가장 중요한 도구로 인정되고 있다<sup>4)</sup>.

암은 한의학적으로 癥瘕, 積聚 및 癰疽의 범주에 속한다<sup>5)</sup>. 치료는 癰疽의 경우 托裏, 內消의 치법을 시행하고 癥瘕와 積聚는 順氣, 降火, 化痰시키고 正氣가 虛한 경우에는 虛한 것을 補하여 積을 치료하는 養正積自除의 治法을 사용하였다<sup>6)</sup>. 면역요법이란 養正積自除의 치법과 같은 원리로 사료되며 이에 따라 한약재를 이용한 종양 전이 억제 연구가 진행된 바 있다<sup>7-9)</sup>.

五積散은 《太平惠民和劑局方》<sup>10)</sup>에 처음 收載되어 있고 만성 虛寒으로 인한 月經不順이나 帶下 등 부인병 치료에 다용되어 왔으며 寒積, 食積, 氣積, 血積, 痰積의 다섯 가지 積을 치료하는 처방<sup>11)</sup>으로 유명하다. 따라서 五積散을 이용한 종양 억제 연구<sup>12,13)</sup>가 진행되어 왔다. 최근 복

강주사를 통한 면역활성 및 종양 전이 억제 효과에 대한 보고<sup>12)</sup>가 있었지만 경구투여를 통한 면역기능 활성화 및 종양 전이 억제 효과에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 五積散의 경구 투여가 장관면역 활성화와 종양 전이억제에 미치는 영향을 알아보기로 五積散 추출물을 경구 투여한 후 Peyer's patch cell의 골수세포 활성화 및 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 및 Interlukine-4(IL-4)의 분비 활성화, 혈청과 소장분비물의 IgA 증식, 항원 재자극으로 인한 Peyer's patch cell의 활성화도 및 종양세포 전이를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

실험에 사용한 五積散 추출물은 1첩의 약재 구성과 분량이 Table 1과 같은 썬무라 제약 제품(오체산)에 phosphate buffer saline(PBS)를 첨가하여 20 mg/ml의 stock solution을 제조하여 -20℃에 보관하였다 (Table 1).

#### 2) 동 물

생후 6~7주령의 C3H/He, 雌性 BALB/c 마우스를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 정수된 물과 사료(Samyang Co. Ltd., Korea)를 자유 공급하였다. 실험실 환경은 온도 22℃, 습도 50% 및 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

Table 1. The Constitution of *Ojeok-san*

Herbs	Pharmacology name	Dose (g)
蒼朮	<i>Atractylodes Rhizoma</i>	3
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	2
茯苓	<i>Hoelen</i>	2
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	1
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	1
枳實	<i>Ponciri Fructus</i>	1
芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	1
桂皮	<i>Cinnamomi Cortex</i>	1
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	1
白芷	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	1
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	1
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	1
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	1
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1
Total amount		22

3) 시 약

실험에 사용한 Roswell park memorial institute(RPMI)-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), PBS, Hank's balanced salt solution(HBSS), Tween20는 Gibco(Rockville, MD, USA)에서, cell counting kit(EZ-Cytox)는 Daeil Lab(Seoul, Korea)에서 cytokine 분석 kit는 Pharmingen(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Ovalbumin(OVA), Bouin's 용액, lipopolysaccharides(LPS), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

4) 세포주 및 세포배양

Colon26-M3.1 carcinoma cell은 일본 북해도대학 면역과학연구소에서 기증받은 것으로 7.5% FBS가 함유된 EMEM으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 및 37°C의 환경에서

배양하였다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

96-well plate에 colon26-M3.1 carcinoma cell은 5×10<sup>3</sup>cells/well, Peyer's patch cell은 5×10<sup>5</sup>cells/well이 되도록 나누어 분주하고 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 五積散 추출물을 첨가하고 Peyer's patch cell은 다시 5 µg/ml 농도의 LPS를 각 well에 첨가 후 72시간 배양하였다. 그 후 각 well에 EZ-Cytox 용액을 처리하고 2시간 동안 배양한 후 ELx800(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 평가는 五積散 추출물을 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율(%)과 세포생존을 반으로 억제시키는 농도 inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>)으로 표시하였다.

2) 장관면역 활성화 측정

(1) Peyer's patch cell의 회수 방법

6주령 female C3H/He 마우스의 소장 외벽에 존재하는 Peyer's patch를 잘라내어 HBSS를 이용하여 조직을 파괴하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 RPMI 1640-5% FBS를 이용하여 원심분리를 통해 세척 후 사용하였다.

(2) 골수세포 회수 방법

주사기를 이용하여 대퇴부의 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 RPMI 1640-5% FBS를 이용하여 원심분리를 통해 세척 후 사용하였다.

(3) 골수세포 증식 활성 측정

2.5×10<sup>6</sup>cells/ml의 골수세포를 96-well plate에 100 µl씩 분주하고 Peyer's patch cell과 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500

$\mu\text{g/ml}$ 의 五積散 추출물을 반응시켜 회수한 상등액을 각각  $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  배양기에서 6일 동안 배양하였다. 배양 완료 후 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 4시간 후 ELx800을 이용하여  $450 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 saline을 첨가하였다.

#### (4) GM-CSF 및 IL-4의 측정

Peyer's patch cell을  $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로 조정하여 96-well plate에 각각  $180 \mu\text{l}$  plating하고  $0 \mu\text{g/ml}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$  및  $500 \mu\text{g/ml}$  농도의 五積散 추출물  $20 \mu\text{l}$ 와 함께 처리하여  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  배양기에서 5일 동안 배양하였다. 상등액을 회수하여 GM-CSF 및 IL-4를 각 cytokine 분석 kit를 이용하여 조사하였다.

#### 3) 면역증강 측정

##### (1) 혈청 및 소장내용물의 회수방법

OVA의 IgA 항체가 측정을 위한 혈액 및 소장내용물의 채취는 OVA 단독 혹은 OVA에 五積散 추출물  $0.2 \text{ mg}$ ,  $2 \text{ mg}$ 을 혼합하여 2주 간격으로 총 2회 경구투여 방법으로 면역 하였다. 최종 면역 7일 후에 마우스를 희생시켜 혈액을 얻어 10분 동안  $6000 \text{ rpm}$ 으로 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 소장내용물은 대장 경계로부터 소장 부분  $20 \text{ cm}$ 를 잘라내어  $200 \mu\text{l}$ 의 버퍼로 두 번 세척하여 수거하고 10분 동안  $1000 \text{ rpm}$ 으로 원심분리 한 후 상등액을 수집하였다. 수집된 혈청과 소장내용물은  $-20^\circ\text{C}$ 에서 항체 분석까지 보관하였다.

##### (2) IgA 항체 역가 측정

96-well plate에 항원으로 사용한 OVA를 코팅용액( $50 \text{ mM}$  sodium bicarbonate buffer,  $\text{pH}9.6$ )에  $50 \mu\text{g/ml}$ 로 용해 후 각 well 당  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 코팅하였다. 세척용액( $\text{PBS}+0.05\%$

Tween20)을 이용하여 plate를 세척 한 후,  $10\%$  탈지분유를 이용하여 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. 세척용액으로 plate를 세척 후 혈청과 소장 내용물의 항체 양에 따라 적정농도를 맞추었다<sup>14)</sup>. 혈청의 경우 100배 및 소장내용물의 경우 2배 희석용액을 첨가하여 2시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시킨 후 효소 HRP가 표지된 2차 항체를 첨가하여 반응시켰다. HRP의 기질로는 TMB를 사용하였다. 발색 완료 후 2M 황산용액  $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 발색을 중지시킨 후 ELx800을 이용하여  $450 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

#### (3) Peyer's patch cell의 항원 재 자극에 의한 활성 측정

OVA 단독 및 OVA와 五積散 추출물  $2 \text{ mg}$ 을 같이 경구 투여하여 총 2회 면역하고 7일 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell의 농도가  $3 \times 10^5 \text{ cells/well}$ 이 되도록 96-well culture plate에 분주하였다. 각 well에 OVA를 최종농도  $2 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$  및  $50 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 조정하여 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  incubator에서 72시간 배양시켰다. Peyer's patch cell 활성은 배양 완료 후 EZ-Cytox 용액을 첨가하고 ELx800을 이용하여  $450 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 경구투여에 의한 종양 전이 억제 측정

군당 각각 5마리의 마우스를 이용하여 종양접종 10일전부터 매일 1회 五積散 추출물  $0.125 \text{ mg}$ ,  $0.5 \text{ mg}$  및  $2 \text{ mg}$ 을 경구 투여하고 암 전이를 측정하기 위하여 각 마우스에  $3 \times 10^4$  colon26-M3.1 carcinoma cell을 정맥주사 하였다. 종양 접종 1일 후 부터, 2일 간격으로 동량의 시료를 총 7회 경구투여 하였으며 종양 접종 14일

후 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액으로 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 균집수를 dissecting microscope(Olympus SZ61, Center Valley, PA, USA)로 측정하였다. 대조군은 종양만 정맥 주사하여 조사하였다.

5) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS (version 17.0)를 이용하였고, 실험군과 대조군의 비교는 One way ANOVA를 시행하였다. 사후검정은 Turkey의 B test를 시행하였으며  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성 평가

Colon26-M3.1 carcinoma cell과 Peyer's patch cell의 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$  및 2000  $\mu\text{g/ml}$  농도의 五積散 추출물에 의한 세포생존율을 측정 한 결과, colon26-M3.1 carcinoma cell은 각각  $103.0 \pm 3.1\%$ ,  $101.0 \pm 3.0\%$ ,  $86.4 \pm 6.1\%$ ,  $40.7 \pm 5.6\%$  및  $9.4 \pm 2.0\%$ 로 나타났고 IC50은 890  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Peyer's patch cell은 LPS를 첨가한 경우 각각  $100.8 \pm 0.4\%$ ,  $101.1 \pm 4.7\%$ ,  $88.0 \pm 5.6\%$ ,  $47.7 \pm 11.2\%$  및  $9.6 \pm 1.4\%$ 로 나타났고 IC50은 990  $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 1, 2).

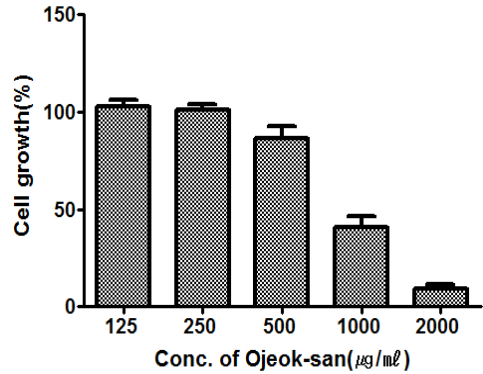


Fig. 1. Cytotoxicity of *Ojeok-san* on Colon26-M3.1 Carcinoma Cell.

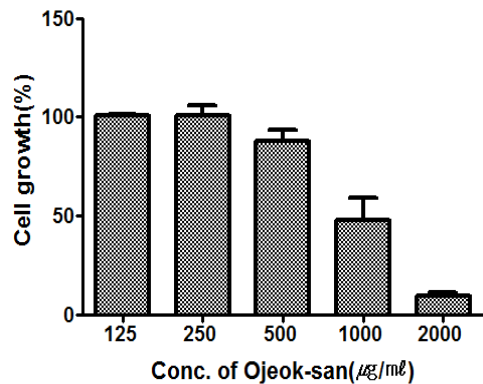


Fig. 2. Cytotoxicity of *Ojeok-san* on Peyer's Patch Cell with LPS.

2. 장관 면역 활성화 효과

1) 골수세포 활성화 효과

Peyer's patch cell을 0  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  및 500  $\mu\text{g/ml}$  농도의 五積散 추출물로 자극하여 얻은 배양 상등액의 골수세포 활성도를 관찰한 결과 대조군  $0.26 \pm 0.01$ 에 비하여 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서  $0.33 \pm 0.02$ 로 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.0001$ ) 활성화되었다(Fig. 3).

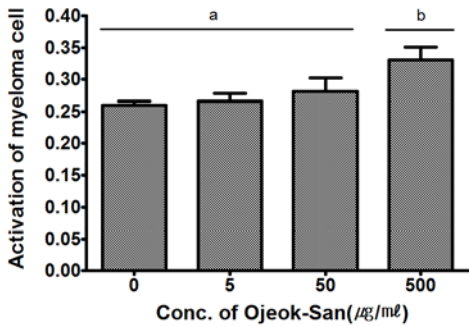


Fig. 3. Effect of *Ojeok-san* on Hematopoiesis. a, b : Statistically different groups by Turkey B

2) Peyer's patch cell의 cytokines 분비 효과

(1) GM-CSF

Peyer's patch cell을 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물로 자극하여 GM-CSF의 분비를 측정 한 결과 대조군 17.45±4.30 pg/ml에 비하여 500 µg/ml 농도에서 75.40±17.96 pg/ml로 통계적으로 유의하게(p<0.05) 증가하였다 (Fig. 4).

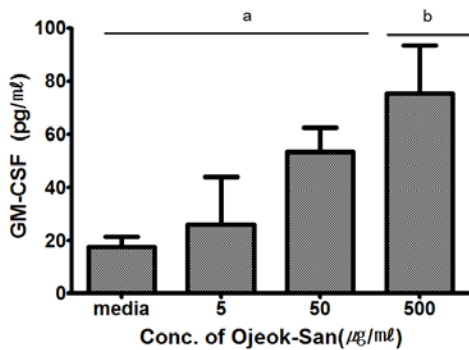


Fig. 4. GM-CSF Induction Activated with *Ojeok-san* Extracts. a, b : Statistically different groups by Turkey B

(2) IL-4

Peyer's patch cell을 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물로 자극하여 IL-4의 분비를 측정 한

결과 대조군 3.25±0.78 pg/ml에 비하여 500 µg/ml 농도에서 11.00±1.56 pg/ml으로 통계적으로 유의하게(p<0.05) 증가하였다 (Fig. 5).

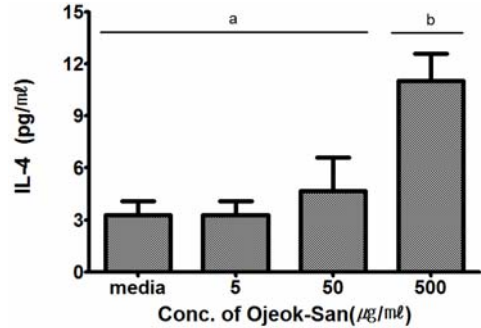


Fig. 5. IL-4 Induction Activated with *Ojeok-san* Extracts. a, b : Statistically different groups by Turkey B

3. 면역 증강 효과

1) IgA 형성 효과

(1) 소장내용물에 함유된 IgA 항체 역가

OVA 단독 혹은 OVA에 五積散 추출물 0.2 mg 및 2 mg을 혼합하여 경구 투여한 후 소장내용물에 포함된 IgA 항체 역가를 측정 한 결과, OVA 단독 투여군 0.45±0.07에 비해서 OVA와 五積散 추출물 2 mg 투여군에서 0.62±0.10으로 증가 되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 6).

(2) 혈청에 함유된 IgA 항체 역가

OVA 단독 혹은 OVA에 五積散 추출물 0.2 mg 및 2 mg을 혼합하여 경구 투여한 후 혈청에 포함된 IgA 항체 역가를 측정 한 결과 OVA 단독에 비하여 증가 되었으나 통계학적인 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 7).

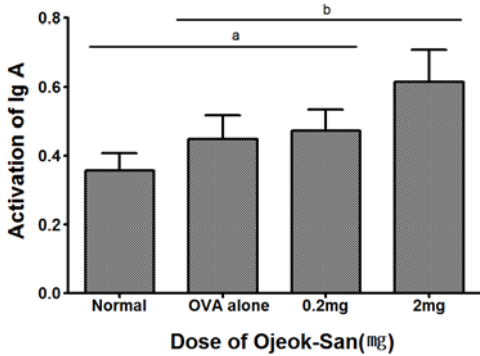


Fig. 6. IgA Induction Activated in Intestinal Content with *Ojeok-san* Extracts.  
a, b : Statistically different groups by Turkey B

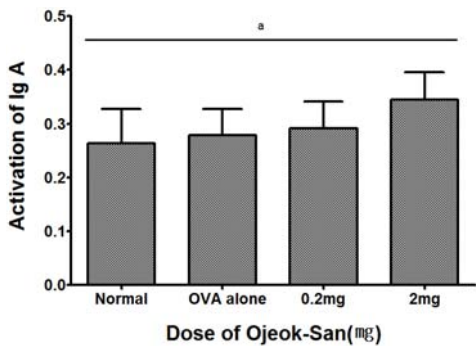


Fig. 7. IgA Induction Activated in Serum with *Ojeok-san* Extracts.

2) Peyer's patch cell의 항원 재자극에 의한 활성화 효과

OVA 단독 및 OVA와 五積散 추출물 2 mg을 같이 경구투여한 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell에 2 µg/ml, 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA를 재자극한 후 Peyer's patch cell의 활성화도를 측정된 결과 정상군 및 OVA 단독 투여군에 비해서 五積散 추출물과 OVA를 같이 투여한 군에서 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA 자극이 통계적으로 유의하게 활성화시켰다(Fig. 8).

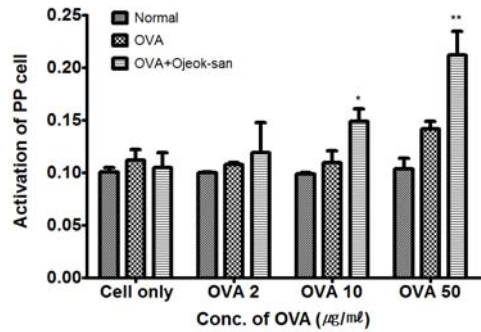


Fig. 8. Proliferation of Peyer's Patch Cell with *Ojeok-san* Extract.  
PP : Peyer's patch cell  
OVA 2 : Ovalbumin at the concentration of 2 µg/ml  
OVA 10 : Ovalbumin at the concentration of 10 µg/ml  
OVA 50 : Ovalbumin at the concentration of 50 µg/ml  
\* : p<0.05, compared with indicated three groups  
\*\* : p<0.01, compared with indicated three groups

4. 경구투여에 의한 종양전이 억제 효과

종양접종 전 후 五積散 추출물 0.25 mg, 0.5 mg 및 2 mg을 경구 투여하고 폐에 전이된 종양 군집수를 측정된 결과 대조군 116±19.60개에 비하여 0.5 mg 및 2 mg 농도에서 각각 83.60±12.97개 및 61.60±14.31개로 통계적으로 유의하게(p<0.0001) 억제되었다(Fig. 9).

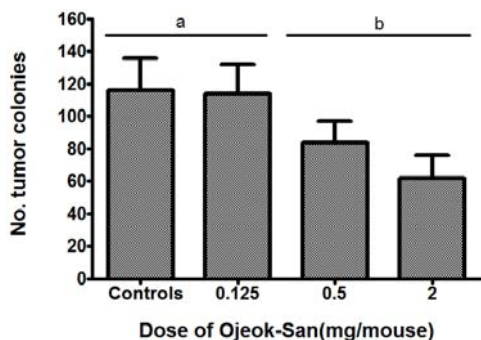


Fig. 9. Effect of *Ojeok-san* in Metastasis Model.  
a, b : Statistically different groups by Turkey B

## IV. 고찰

암은 침윤적이고 빠른 성장 속도를 가지고 있으며 체내 각 부위에 전이되는 특성을 가지고 있기에 생명에 위협을 초래할 수 있다<sup>15)</sup>. 2011년 통계조사<sup>1)</sup> 결과 우리나라 사망원인 1위를 차지하고 있으며 암의 발병과 그로 인한 희생은 인류가 극복해야 할 가장 중요한 질병의 하나로 인식되고 있다.

현재까지 서양의학에서는 암 치료에 수술요법, 방사선 요법, 화학요법, 면역요법 및 유전자 요법 등이 적용되고 있으나 방사선 요법이나 화학요법의 경우 조혈 및 면역 기능에 대한 부작용이 보고되고 있으며, 항암제에 대한 암세포의 빠른 내성의 형성, 전이 억제 효과의 감소 등의 부작용이 보고되고 있다<sup>16)</sup>. 따라서 부작용이 없는 물질을 찾으려는 시도로서, 과거로부터 사용되어온 한약에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근의 연구에서 한약은 면역 작용을 증진하는 것으로 알려져 있으며 암 전이 억제나 암 발생 예방 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>17-19)</sup>.

韓醫學에서 癌의 범주에 속하는 것은 積聚, 癥瘕, 癰疽 등으로<sup>20)</sup> 치료는 益氣養血, 養陰生津, 健脾益氣 등 인체 抗病능력을 증진시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥 등 직접 암세포를 살상하는 祛邪法 및 이 두 가지 방법을 적절히 배합시켜 正氣補養을 위주로 扶正祛邪法을 응용하고 있다<sup>20)</sup>. 이에 따라 紅花<sup>7)</sup>와 桔梗<sup>8)</sup>, 夏枯草<sup>9)</sup> 등 單味劑와 四物湯加味方<sup>21)</sup>과 白頭翁湯<sup>22)</sup> 등 處方의 항암효과에 대한 연구가 진행된 바 있다.

五積散은 《太平惠民和劑局方》에 처음

수록되었고 東醫寶鑑<sup>6)</sup> 및 方藥合編<sup>23)</sup> 등에 수록되어 있는 처방으로 發表溫裏, 燥濕健脾, 順氣化痰, 活血消積 등의 효능이 있다<sup>24)</sup>. 처방 내용을 살펴보면 平胃散, 二陳湯, 理中湯, 四物湯, 桂枝湯이 혼합된 처방으로 蒼朮, 麻黃, 白芷는 外感病을 치료하고 乾薑, 桂枝, 芍藥, 甘草는 內傷生冷을 치료하며 當歸, 川芎, 芍藥은 血病, 蒼朮, 厚朴, 陳皮, 甘草는 食傷, 枳殼, 桔梗, 厚朴, 陳皮는 氣病, 半夏, 陳皮, 茯苓, 甘草는 痰病을 치료하여, 寒, 食, 氣, 血, 痰의 5가지 積을 치료하는 처방이다<sup>11)</sup>. 따라서 五積散의 5가지 積을 치료하는 효능을 이용하여 積聚, 癥瘕에 해당되는 암을 치료하는 데 응용해볼 수 있다고 사료되었다.

五積散을 이용한 연구 중 종양과 관련된 연구를 살펴보면 다낭성 난소<sup>28)</sup>, 자궁근종세포<sup>13)</sup>에 관한 연구가 있었고 암과 관련하여 국외에서 유전자변이억제효과 보고<sup>29)</sup>와 최근 五積散을 복강 주사 후 선천면역 증진 및 종양 전이 억제 효과를 보고<sup>12)</sup>하고 있으나 한약은 경구투여 후 효과를 관찰하는 것으로 五積散 경구 투여 후 면역반응이나 종양 전이 억제에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 五積散의 경구 투여가 장관면역 활성화와 종양 전이 억제에 미치는 영향을 알아보려고 五積散 추출물을 경구 투여한 후 Peyer's patch cell의 골수세포 활성화 및 GM-CSF와 IL-4의 분비 활성화, 혈청과 소장분비물의 IgA 증식, 항원 재자극에 의한 Peyer's patch cell의 활성화도 및 종양세포 전이를 관찰하였다.

五積散 추출물의 종양세포와 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 colon26-M3.1 carcinoma cell과 마우스의 Peyer's patch



cell를 이용하여 세포 생존율을 *in vitro*에서 조사한 결과 종양세포 및 Peyer's patch cell에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각 890 µg/ml 및 990 µg/ml이었다. 따라서 五積散의 종양세포 및 정상세포에 대한 직접적인 세포독성 효과가 매우 낮은 500 µg/ml 농도 이하의 五積散 추출물을 실험에 사용하였다.

장관관련 림프조직은 생체 내에서 가장 큰 림프상 조직으로 장관의 점막부위에 존재하며 장관면역계 내 IgA 면역반응을 비롯하여 생체방어에서 대단히 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 장관관련 림프조직에서 여러 면역기관 중 Peyer's patch는 대개 소장내의 가장 아래쪽 부분인 회장에 존재하며 용모가 없고 작은 좁쌀 형태의 다발이나 반점을 형성하는 림프성 세포 결절로 외부에서 침입한 유해 물질을 인식하여 임파구 및 항체를 만들어내는 관문이다<sup>30)</sup>.

GM-CSF는 활성화된 T세포, 대식세포, 골수 기질세포에 의해 생성되어 골수세포를 수지상세포와 단핵구로 성숙하도록 촉진하는 사이토카인이다. 이러한 기능 때문에 임상적으로도 암치료를 위해 화학요법이나 골수이식 후 빠른 회복을 위하여 재조합 GM-CSF가 사용되는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. IL-4는 B세포의 면역글로블린을 IgE와 같은 형태로 전환하도록 자극하는 주요한 사이토카인으로서 항체 생산 기능을 가진 B세포의 분화 및 성장을 촉진시키는 주요한 역할을 하며 주로 제2형 보조 T세포(Th2)가 생산한다<sup>31)</sup>.

五積散 추출물의 장관면역 활성을 알아보기 위하여 *in vitro*에서 Peyer's patch cell과 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물을 반응시켜 회수

한 상등액을 이용하여 골수세포의 활성도를 관찰한 결과 대조군에 비해서 五積散 추출물 500 µg/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 증가되었고, 상등액의 GM-CSF 및 IL-4의 분비 활성도를 관찰한 결과 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이는 Hong 등<sup>32)</sup>의 연구 결과와 같이 五積散 추출물이 Peyer's patch의 면역세포를 자극하여 골수세포의 증식에 관련된 GM-CSF와 IL-4의 생성을 활성화하고 전신순환 후 최종적으로 조혈 세포계에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

혈청 면역글로블린의 약 15-20%를 차지하는 IgA는 주로 소화관, 호흡기, 생식기, 비뇨기의 정액, 타액, 유즙 등 다양한 분비물 속에 존재함으로써 점막면역 기관의 방어 기능을 가진 발견되는 주요한 항체이다. 혈청과 분비액 중에 발견되는 IgA는 2개의 IgA단위체가 j사슬에 의해 결합된 형태인 2량체 또는 3량체의 구조를 가지고 있다. 특히 분비액 중의 IgA는 이들 2량체에 분비요소를 포함하는데, 이 분비요소는 항체가 형질세포에서 생산되어 상피세포를 통해 분비액 중으로 분비되는 도중에 단백질 분해 효소로부터의 분해를 막고, 상피세포를 통한 분비과정을 도와준다. 주로 항원과 결합하여 항원으로 하여금 분해효소 등의 작용을 받도록 하여 그들 항원이 체내로 흡수, 유입되는 것을 막는다<sup>33)</sup>.

五積散은 구강을 통해 섭취하여 위와 장에서 소화효소 혹은 장내 세균에 의해 분해될 수 있으므로 경구투여를 통한 면역 증강 효과에 대해 알아보기 위해 OVA 단독 혹은 OVA에 五積散 추출물을 혼합하여 경구 투여한 후 혈청 및 소장내용물

에 포함된 IgA 항체 역가를 측정하고 또 Peyer's patch cell을 회수하여 농도별 OVA로 재자극 후 활성도를 확인한 결과 혈청과 소장내용물의 항체가는 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았고, OVA 재자극에 의한 Peyer's patch cell의 활성도는 OVA에 五積散 추출물을 혼합 투여 시 OVA 10 µg/ml 및 OVA 50 µg/ml농도에서 통계적으로 유의하게 활성화되었다. 이는 경구 투여된 五積散 추출물이 선천면역의 보강제로써 사용된 桔梗<sup>8)</sup>과 夏枯草<sup>34)</sup>와 같이 Peyer's patch cell를 자극하고 면역력을 증강시키는 보강제로 작용하여 장관면역계를 활성화시킴을 알 수 있다.

종양접종 전후 五積散 추출물 0.25 mg, 0.5 mg 및 2 mg을 경구 투여하고 폐에 전이된 종양 군집수를 측정한 결과 0.5 mg 및 2 mg 투여군에서 통계적으로 유의하게 억제되었다.

五積散의 경구 투여에 의한 항종양 활성 유도 결과는 구강을 통하여 섭취된 추출물의 유효성분이 소장의 Peyer's patch를 자극하게 되면 활성화된 Peyer's patch cell들은 다양한 cytokine 등을 생산하게 되고 활성화된 세포와 물질이 순환하면서 전신 면역계에 영향을 주어 종양전이를 억제하는 것으로 볼 수 있다<sup>35)</sup>.

이번 연구를 통해 五積散 추출물이 *in vitro*에서 장관 면역을 활성화하고 경구 투여 후 면역 증강 및 암 전이 억제 효과가 있음을 확인하였으나 항암 효과의 구체적인 기전을 밝히는 데는 한계가 있었다. 향후 인간 암 세포주를 이용한 암세포 사멸 및 항암제와의 병용투여 시의 항암효과, 다른 종양에서의 항암 효과에 대한 연구가 시행된다면 五積散이 한의학적 암치료에 적합한 한약으로서 항암요법의 보조제

또는 면역 보조제로써 임상에서 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

五積散의 경구 투여가 장관면역활성과 종양 전이 억제에 미치는 영향을 알아보고자 五積散 추출물을 경구 투여한 후 Peyer's patch cell의 골수세포의 활성 및 GM-CSF와 IL-4의 분비 활성, OVA와 함께 五積散을 경구 투여 후 혈청과 소장분비물의 IgA 증식과 OVA 재자극에 의한 Peyer's patch 활성 및 종양세포 전이 억제를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五積散 추출물에서 세포생존율을 측정한 결과 종양세포의 IC<sub>50</sub>은 890 µg/ml 이었고 Peyer's patch cell에 LPS를 첨가 시 IC<sub>50</sub>은 990 µg/ml이었다.
2. Peyer's patch cell을 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물로 자극하여 골수세포 활성도를 조사한 결과 500 µg/ml 농도에서 유의하게 활성화되었다.
3. Peyer's patch cell을 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 五積散 추출물로 자극하여 GM-CSF 및 IL-4의 분비를 관찰한 결과 500 µg/ml 농도에서 유의하게 증가하였다.
4. OVA 단독 혹은 OVA에 五積散 추출물 0.2 mg 및 2 mg을 혼합하여 경구 투여한 후 혈청 및 소장내용물에 포함된 IgA 항체의 역가를 측정한 결과 혈청 및 소장내용물에서 모두 증가되었으나 통계학적인 차이는 없었다.
5. OVA 단독 및 OVA와 五積散 추출물

2 mg을 같이 경구투여한 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell에 2 µg/ml, 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA를 재자극한 후 활성도를 측정한 결과 五積散 추출물과 OVA를 같이 투여한 군에서 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA 자극이 통계적으로 유의하게 활성화시켰다.

6. 종양접종 전 후 五積散 추출물 0.25 mg, 0.5 mg 및 2 mg을 경구 투여하고 폐에 전이된 종양 군집수를 측정한 결과 0.5 mg 및 2 mg 투여군에서 유의하게 억제되었다.

- 투 고 일 : 2014년 4월 28일
- 심 사 일 : 2014년 4월 28일
- 게재확정일 : 2014년 5월 10일

## 참고문헌

1. 통계청. 2011년 사망원인통계. 대전:통계청. 2011.
2. 국가암정보센터. 2008년 국가암등록통계. 2010. Available from : URL : <http://www.cancer.go.kr/>
3. 이진영, 안명수. 가열산화홍화유의 돌연변이 원성에 관한 연구. 한국식품영양과학회지. 2000;29(1):120-7.
4. Kadhim S, et al. Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. Int J Immunopharmacol. 2000;22(9):659-71.
5. 한의부인과학교재편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담. 2002:303-5.
6. 허준. 東醫寶鑑. 서울:東醫寶鑑출판사. 2005:1379, 1382, 1393, 1539-43, 1070.
7. 한송이 등. 紅花가 인체 대장암세포에 미치는 효과. 한국한의학연구원 논문집. 2011;17(2):129-34.
8. 이지영 등. 桔梗이 면역활성 및 항암에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(4):10-9.
9. 허자경 등. 면역활성에 의한 夏枯草의 압전이 억제 효과. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):41-52.
10. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 沈陽:遼寧科學技術出版社. 1999:59.
11. 강순수. 바른 방제학. 서울:대성문화사. 1996:260-1.
12. 이윤재. 면역활성화 및 전이억제 측면에서 五積散이 암에 미치는 영향. 경희대학교 박사학위논문. 2012.
13. 전미혜 등. 五積散이 자궁근종세포의 사멸과 Cell Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):45-55.
14. Lavelle EC, et al. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunology. 2000;99(1):30-7.
15. 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학. vol 1. 서울:도서출판MIP. 2003:514-5.
16. 박재우, 윤성우. 중국의 암치료 현황. 대한암한학회지. 2006;11(1):65-73.
17. Ohnishi Y, et al. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. Jpn J Cancer Res. 1998;89(2):206-3.
18. Chino A, et al. Juzentaihoto, a Kampo medicine, enhances IL-12 production by modulating Toll-like receptor 4 signaling

- pathways in murine peritoneal exudate macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(5):871-82.
19. Tsuchiya M, et al. Protective effect of Juzen-taiho-to on hepatocarcinogenesis is mediated through the inhibition of Kupffer cell-induced oxidative stress. *Int J Cancer*. 2008;123(11):2503-11.
  20. 郁仁存. 中醫腫瘤學. 北京:北京科學出版社. 1983:1-11, 120-53.
  21. 정재중 등. 四物湯加味方の 항암효과에 대한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 2010;23(3):38-55.
  22. 김종욱 등. 백두옹탕(白頭翁湯)의 대장암 세포주 HCT-116 항암효과와 세포자멸사에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2010;31(2):273-89.
  23. 황도연. 方藥合編. 서울:일월서각. 2003:352-3.
  24. 金想贊 등. 方劑學. 서울:永林社. 1999:268-70.
  25. Ha H, et al. Genotoxicity assessment of a herbal formula, Ojeok-san. *J Ethnopharmacol*. 2011;135(2):586-9.
  26. Ha H, et al. Evaluation of safety of the herbal formula Ojeok-san: acute and sub-chronic toxicity studies in rats. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(2):410-6.
  27. 김재형 등. 五積散이 흰쥐의 고지혈증에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 대한예방의학회지. 2004;8(2):185-202.
  28. 김종대 등. 五積散이 Estradiol Valerate로 유발된 다낭성 난소 모델에서 난포의 성숙 및 NGF발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회. 2011;24(1):27-41.
  29. Saito J, Shibuya K, Nagase H. Anti-clastogenic effect of magnolol on benzo(a)pyrene-induced clastogenicity in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):694-700.
  30. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-41.
  31. 미생물 면역 분과학회. 최신면역학. 서울:라이프사이언스. 2011:170, 173.
  32. Hong T, et al. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine*. 1998;5:353-60.
  33. Peter JD, et al. 면역학. 12th edition. 서울:(주)교보문고. 2012:72.
  34. 정재혁 등. 桑白皮의 선천면역 활성화에 의한 항암 효과. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):31-40.
  35. Lai YH, D'Souza MJ. Microparticle transport in the human intestinal M cell model. *J Drug Target*. 2008;16:36-42.