

八物湯이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 效果

朴惠峻·高祐新*

ABSTRACT

The Experimental Effects of *PalMulTang* on Anti-Cancer and Immunologic Function

Hae Jun, Park · Woo Shin, Ko

Dept. of Driental Surgery and Dermatology, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

To investigate effect of water extract of *PalMulTang*(PMT) on human cancer cell-lines and immunocytes, this research estimated proliferation of A431 cell line, KHOS-NP cell line, mouse thymocytes and mouse splenocytes, Nitric Oxide(NO) from macrophage, apoptosis and subpopulation of the mouse thymocytes.

The results were obtained as follows;

1. PMT inhibited the proliferation of A431 cell line, but it is not significant.
2. PMT inhibited the proliferation of KHOS-NP cell line, but it is not significant.
3. PMT stimulated the proliferation of mouse thymocytes, being compared Con A non-treated group.
4. PMT stimulated the proliferation of mouse splenocytes, being compared LPS treated group.
5. PMT 100 μ g/ml inhibited the production of NO from macrophages in vitro, being compared NPS+IFN treated group.
6. PMT inhibited the production of NO from macrophages in vivo, being compared LPS+IFN treated group.
7. PMT accelerated the induction of apoptosis of the mouse thymocytes.
8. In subpopulation PMT decreased T_H of the mouse thymocytes, but increased T_C/T_S of the mouse thymocytes.

* 동의대학교 한의과대학 외관과학교실

1. 서 론

瘡은 皮膚淺表에 발생한 丘疹, 疱疹 등을 포함하는 皮膚損害를 가지고 있으며 破潰된 후에는 糜爛되는 皮膚疾患을 總稱하여 瘡이라 하였고,¹⁾ 原因에 대하여 《素問·至眞要大論》²⁾에서는 “諸瘡痛痒 皆屬心火”라 하였다.

翻花瘡의 原因으로 巢 등³⁻⁴⁾은 “風毒相搏”, “風毒之邪가 肌膚를 客하여 內로는 陰血이 耗損, 肝血이 枯燥하여 肌肉과 皮膚를 滋養하지 못해 失榮한다.”라 하여 風毒을 原因으로 보았고, 陳⁵⁾은 淫毒之氣에 感해서 發한다고 하였다.

症狀에 있어서는 巢³⁾는 “처음에는 飯粒같은 것이 發生한 후, 그 頭가 破則 出血한다. 다시 甚하여지면 惡肉이 發生하고 膿汁이 나오며 肉이 花狀으로 뒤집혀져 나온다. 이로 인해 反花瘡이라 名한다.” 라고 했다.

西洋醫學의 原因으로, 《皮膚과학》¹³⁾에서는 日光에의 過多한 露出, 放射線, 熱傷, 火傷, 慢性潰瘍, 化學物質, 慢性機械刺戟, 職業的인 原因, 癌 등이 있다고 하였고, 症狀으로는 日光에 의한 損傷, 각화증, 潰瘍같은 것이 先行된 部位에서 흔히 發生한다. 境界가 뚜렷하고 둥근 사마귀 같은 홍갈색 또는 피부색의 단단한 結締을 형성하게 되며 나중에는 하부조직까지 침윤하며 중심부에 潰瘍을 형성한다. 潰瘍은 痂皮로 덮여있어 이를 제거하면 분화구와 같이 주변부가 隆起되고 底面은 꽃 양배추 모양으로 增殖되며 농즙 또는 점액으로 덮여있고 癌의 특유한 악취가 난다.

翻花瘡을 顧¹⁴⁾는 西洋醫學의 皮膚癌중 편평상피細胞癌과 서로 類似하다고 하였다. 그리고 皮膚癌의 最近 治療方法으로는 抗癌劑 投與, 外科의 手術療法, 放射線 療法, 化學療法, 免疫療法 등이 활용되고 있으나¹⁵⁻¹⁷⁾, 生體에 대한 副作用, 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題點으로 提起되고 있는바, 韓藥과 抗癌劑의 併用 投與 및 韓藥劑를 利用한 體質改善 등의 方法이 試圖되고 있다.¹⁷⁻²¹⁾

韓醫學의인 治療로는 內服으로 補脾胃土, 養血去風滋肝, 疏肝清熱, 活血化痰, 利濕解毒시키는 治法을 爲主로 하고, 外用으로는 軟堅消腫解毒, 止血 去腐肉시키고, 또 導引養生, 心理治療, 豫防醫學的 攝生法 등이 있다.²²⁾ 그 중 許²³⁾의 《東醫寶鑑·諸瘡門》에서는 “雄黃末, 敷之. 內服, 十全大補湯 或 八物湯 倍蓼芪歸朮”이라고 하여 十全大補湯과 八物湯을 內服한다고 설명하고 있다.

八物湯은 補氣하는 四君子湯과 補血, 活血, 行血하는 四物湯을 王²⁴⁾이 처음으로 合方하여 使用하였으며, 氣血兩虛를 調和하는 效能을 가지고 있다. 이러한 效能을 가진 八物湯의 研究로는, 李²⁵⁾의 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 筋肉疲勞恢復에 미치는 實驗的 研究, 金²⁶⁾의 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 白鼠 子宮筋의 收縮力과 自發運動에 미치는 影響, 嚴²⁷⁾의 八珍湯 및 八珍湯加杜續丸料煎湯液이 白鼠의 妊娠維持에 미치는 影響, 金²⁸⁾의 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 대한 報告 등이 있으며, 八物湯 構成의 基本方인 四物湯과 四君子湯에 대한 實驗研究로 金 등²⁹⁻³¹⁾의 것이 있다. 또한 翻花瘡에 대한 實驗的 研究로는 金 등³²⁻³⁴⁾이 있으나 八物湯의 翻花瘡에 대한 實驗的 研究는 아직 接하여보지 못하였기에 本人은 八物湯이 癌細胞의 增殖抑制와 免疫增強에 有意할 것으로 생각되어 八物湯이 皮膚癌細胞柱와 骨髓癌細胞柱에 미치는 影響을 觀察하였고 또한, 마우스의 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 影響과 마우스 腹腔 macrophage의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 動物

實驗에 使用한 動物은 生後 8주령된 Balb/c계 융성 마우스를 使用하였으며, 動物 飼育條件은

溫度 20±2 °C, 濕度 55±3 %, light/dark(12hrs.)
으로 하였다.

2) 藥材

本實驗에 사용된 方劑는 市中에서 購入한 후 東新大學校 韓醫科大學 本草學 教室에서 精選하여 사용하였고, 處方內容은 許²³⁾의 《東醫寶鑑》에 準하였으며, 한 첩 分量은 다음과 같다.

構成藥物	生藥名	重量(g)
人蔘	RADIX GINSENG	9.0
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE	9.0
白茯苓	PORIA	4.5
甘草	RADIX GLYCYRRHIZAE	4.5
熟地黃	RHIZOMA REHMANNIAE	4.5
當歸	RADIX ANGELICAE GIGANTIS	9.0
川芎	RHIZOMA CNIDII	4.5
白芍藥	RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE	4.5
總量		49.5

2. 方法

1) 試料의 製造

實驗에 사용한 八物湯 49.5g에 증류수 500ml를 가하여 가열 추출한 후, 여과하여 濾液을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말을 얻었다(Table I). 그 후 細胞 실험시에 증류수에 용해시킨 뒤 membrane filter(d 0.45µm)로 여과 멸균하여 사용하였다.

Table I. Yield of *Palmultang* (PMT)

韓藥材	Yield(%)
PMT	20.3

2) 細胞柱 및 細胞 培養條件

A431 및 KHOS-NP 細胞柱는 DMEM 培地를, 마우스 胸腺 및 脾臟細胞는 RPMI 1640 培地를 사용하였으며, 培地에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100units/ml, 100µg/µl)을 첨가하여 사용하였다. 繼代培養은 1 : 10 ~ 1 : 20 비율로 3일 간격으로 하였고, 細胞 증식에 미치는 八物湯의 영향을 관찰하기 위한 實驗은 繼代培養 2일 째의 細胞를 사용하였다.

3) MTT法에 의한 細胞 增殖率 測定

實驗에 사용한 MTT法은 Mosmann³⁵⁾이 개발하여 Kotnik 등³⁶⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 細胞 부유액 100µl (2x10⁵cells/ml)를 접종하여 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 농도별로 희석된 八物湯 100µl를 넣고 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20µl를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 은박지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 배양액을 제거한 후 생성된 formazan crystal을 DMSO 100µl로 용출시킨 다음 發色된 각 well의 흡광도를 microplate reader를 이용하여 570nm에서 측정하고, 대조군의 흡광도와 비교하여 細胞 증식율을 백분율로 환산하였다.

4) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞의 分離

마우스의 胸腺 및 脾臟細胞 分離는 Wysocki³⁷⁾ 및 Mizel 등³⁸⁾의 방법을 이용하였다. Balb/c 3T3 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 적절한 胸腺 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음 10ml 주사기로 조심스럽게 細胞부유액을 취하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 細胞를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척

한 후 胸腺 및 脾臟細胞를 분리하였으며, 분리한 胸腺 및 脾臟細胞의 생존을 및 총 細胞數를 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

5) 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 영향

胸腺 및 脾臟細胞 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1.2×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 Concanavalin A $1 \mu\text{g/ml}$ 및 八物湯을 첨가한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 發色된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

6) 마우스 복강 macrophage의 분리 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향

In vitro 실험에서는 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하고 3일후에 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 복강에 cold PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척한 후 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO₂-incubator에서 배양시키고 2시간후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 macrophage를 24 well plate에 well당 1×10^6 cells을 분주한 후 각 well에 LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 에다가 γ -IFN 25units/ml를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군으로 분류하여, 37°C CO₂-incubator에서 24시간 배양한 후에 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess法³⁹⁾으로 측정하였다.

배지 100 μl 와 Griess reagent(1% sulfanilamide +0.2% N-naphthylethylene diamine 2HCl+2.5% H₃PO₄) 100 μl 를 혼합하여 96 well plate에 넣고

570nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO양을 측정하였다.

In vivo 실험에서는 八物湯 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하고 8일째 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하였다. 3일후에 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 복강에 cold PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하여 동일한 방법으로 실험하여 NO양을 측정하였다.

7) T-lymphocytes의 apoptosis와 subpopulation에 미치는 영향

八物湯 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하고 8일째 경추탈골하여 胸腺細胞현탁액을 조제하였다. 이렇게 조제한 마우스의 T-lymphocyte를 96 well plate에 well당 1×10^5 cells을 분주하여, 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 八物湯 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 12시간 배양하였다. 배양 후 세포를 수거하여 eppendorf tube에 넣어 5분간 원심분리(4°C, 2,500 rpm)한 후, 세포를 모아 PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 $\mu\text{g/ml}$) 20 μl 를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후 flow cytometer로 sub-G1 peak를 관찰하였다⁴⁰⁾.

또한 조제한 세포현탁액을 96 well plate에 1×10^6 cells씩 분주하고, 형광항체인 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로 二重染色하여 4°C에서 反應시킨 다음, flow cytometer (excitation : 488nm, emission : 525nm-FITC, 575 nm-PE)를 利用하여 胸腺細胞중의 subpopulation을 測定하였다⁴¹⁾.

8) 統計處理

統計的 有意性 檢討는 對照群에 대한 變動을 "one way ANOVA test"로 하였으며, p값이 5% 미만일 때는 統計的으로 有意性이 있다고 判定하였다.

III. 실험성적

1. MTT法에 의한 癌細胞 增殖率 測定

八物湯이 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line과 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP cell line에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각각의 細胞에 八物湯을 1, 10, 100 μ g/ml의 농도별로 각각 투여하였다. 그 결과 八物湯을 투여하지 않은 A431細胞의 對照群을 100(%)로 하였을 때, 八物湯을 투여한 實驗群들은 모두 對照群에 비하여 抗癌作用을 보였지만 有意性을 나타나지 않았고, KHOS-NP細胞의 경우에 있어서도 對照群에 비하여 癌細胞의 增殖을 억제하였지만 A431細胞와 마찬가지로 有意性은 없었다(Table II).

Table II. The Cytotoxic Effects of *Palmultang* on A431 and KHOS-NP Cell Lines

Cancer cell line	Concentration	Cytotoxicity(%)			
	Control	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	
A431	100 \pm 1.8	65.2 \pm 1.8	94.1 \pm 1.1	93.9 \pm 1.2	
KHOS-NP	100 \pm 1.1	101.7 \pm 1.0	97.4 \pm 0.9	96.0 \pm 0.9	

2. 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 미치는 影響

八物湯이 免疫細胞의 增殖에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 胸腺 및 脾臟細胞를 분리한 다음 각각의 세포에 八物湯을 1, 10, 100 μ g/ml의 농도별로 각각 투여한 결과 다음과 같았다. 胸腺細胞는 concanavalin-A 1 μ g/ml를 처리한 對照群의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 con-A를 처리하지 않은 群의 細胞生存率은 85.2 \pm 1.5(%)로 감소하였고, 八物湯을 투여한 實驗群들은 1 μ g/ml를 투여한 실험군에서만 對照群에 비하여 免疫細胞의 活性이 약간 증가시켰을 뿐 모두 細胞毒性을 나타내었다. 또한 脾臟

細胞의 경우에 있어서는 lipopolysaccharide 10 μ g/ml를 투여한 對照群의 細胞生存率을 100(%)로 하였을 때 LPS를 투여하지 않은 群의 細胞生存率은 83.9 \pm 1.7(%)로 감소하였고, 八物湯을 투여한 모든 實驗群에서는 對照群에 비하여 10%정도의 有意性있는 免疫細胞 活性化를 나타내었다 (Table III).

Table III. Effects of *Palmultang* on the Proliferation of Immunocytes

Immunocytes	Concentration	Cytotoxicity(%)			
	Control	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	
Thymocytes	100 \pm 1.7	100.4 \pm 2.7	97.2 \pm 1.9	97.4 \pm 1.2	
Splenocytes	100 \pm 1.7	109.9 \pm 2.4*	111.5 \pm 2.1**	111.8 \pm 1.8**	

Thymocytes : * ; P<0.01, ** ; P<0.001, Con. A non-treated group 85.2 \pm 1.5%
Splenocytes : * ; P<0.01, ** ; P<0.001, LPS non-treated group 83.9 \pm 1.7%

3. 마우스 腹腔 macrophage의 nitric oxide 生成에 미치는 영향

八物湯이 免疫細胞의 增殖에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 腹腔內에 있는 macrophage의 NO를 측정된 결과는 다음과 같다. In vitro上에서 NO의 量은 LPS만을 투여한 對照群은 0.76 \pm 0.1(%)인데 반하여 LPS와 IFN를 투여한 對照群은 21.2 \pm 0.5(%)였다. 그리고 八物湯을 투여한 實驗群에서는 IFN과 LPS를 투여한 control(+)에 비하여 1, 10, 100 μ g/ml를 투여하였을 때 각각 22.6 \pm 0.4(%), 21.3 \pm 0.6(%), 20.8 \pm 0.4로 감소하는 추세를 보였지만 有意性은 인정되지 않았다. 또한 In vivo上에서는 LPS만을 투여한 對照群이 4.2 \pm 0.1(%)인 반면 LPS와 IFN를 투여한 對照群은 15.5 \pm 1.0(%)으로 현저히 증가하였다. 그러나 八物湯을 투여한 實

驗群에서는 control(+)보다 NO의 量이 有意性있게 減少현상을 보였다(Table IV).

Table IV. Effects of *Palmultang* on Nitric Oxide Production from Mice Peritoneal Macrophage in vitro and in vivo

	Cytotoxicity(%)	
	In vitro	In Vivo
Control (+)	21.2±0.5	15.5±1.0
Control (-)	0.76±0.1***	4.2±0.1**
PMT 1 μ g/ml	22.6±0.4	
PMT 10 μ g/ml	21.3±0.6	
PMT 100 μ g/ml	20.8±0.4	
P M T		9.4±1.3*

* ; P<0.05, ** ; P<0.01, *** ; P<0.001 vs control(+), PMT; *Palmultang* In Vivo ; PMT(500mg/kg) were administered p.o. for 7 days.

4. T 림프구의 apoptosis와 subpopulation에 미치는 八物湯의 影響

八物湯이 마우스 胸腺細胞의 apoptosis와 subpopulation에 어떠한 影響을 미치는가에 대하여 알아보기 위하여 마우스의 胸腺細胞에 八物湯을 각각 濃度別로 투여한 결과 다음과 같았다. Apoptosis의 경우 八物湯을 투여한 實驗群은 對照群보다 증가하였고, subpopulation의 경우에 있어서는 對照群에 비하여 CD4로 染色된 TH cell이 減소한 반면, CD8로 染色된 Tc/Ts cell은 有意性있는 增加를 나타내었다(Table V).

Table V. Effects of *Palmultang* on T-lymphocyte Apoptosis and Subpopulation in Mice

	Apoptosis(%)	CD4+(%)	CD8+(%)
Control (+)	4.3±0.4	8.0±0.7	2.4±0.3
P M T	12.3±2.8	3.5±0.6**	6.5±1.1*

* ; P<0.05, ** ; P<0.01

PMT(500mg/kg) were administered p.o. for 7 days.

IV. 고찰

李 등⁶⁻⁹⁾과 《中醫外科學》¹⁰⁾에서는 “肝火血燥生風所致”라 하여 元氣가 虛弱해져 있는데, 肝虛로 因해 血燥하여 怒氣가 盛해서 發한다 했으며, 顧¹¹⁾는 長時間의 日光에 露出되어 火毒이 外侵한데다가 內로는 痰濁凝結, 氣滯血瘀하여 皮膚로 外拔한 所致라고 하였다. 楊¹²⁾은 脾胃機能이 虛弱, 濕痰이 內生하여 凝滯된데다가 腎虛로 精氣가 虧損, 經脈의 運行이 不調하여 氣血이 鬱滯되어 局部의 腫塊가 생기거나 情志不遂로 肝氣가 鬱滯하여 久則化火하고 陰血을 耗傷, 血이 燥해져 肌膚가 失養해서 發病한다고 하였다.

症狀에 있어서는 陳 등⁷⁻⁸⁾은 頭大而蒂小하고 無痛無痒, 無苦無疼하며 甚則 蝕損, 鮮血이 流하여 久則 虧虛해진다고 하였다.

癌은 정신적인 요인, 선천적인 臟腑機能失調 등을 비롯하여 飲食不節, 外邪, 臟腑의 機能失調 등의 病因으로 인하여 頭暈, 失眠, 多夢, 大小便失調 등의 全身症狀과 胃腸障礙, 백혈구減소, 혈소판減소, 골수생성억제, 출혈 등의 骨髓造血障礙 등이 발생하고, 또한 疼痛이나 肢體麻木 등의 신경손상 및 각 臟器·皮膚·毛髮 등에도 影響을 끼치게 된다.⁴²⁻⁴⁴⁾

韓醫學의으로는 正氣補養 및 補血을 爲主로 하면서 破積·活血·解鬱·行氣 등의 治法들을 兼用하고 있고, 현재 中國 등에서는 各種의 腫瘍 治

療法으로 淸熱解鬱法 등의 祛邪法과 함께 扶正培本法들을 利用하고 있고,^{42,45-48)} 許²³⁾의 《東醫寶鑑·諸瘡門》에서는 “雄黃末, 敷之. 內服, 十全大補湯 或 八物湯 倍蓼芪歸朮”이라고 하여 十全大補湯과 八物湯을 內服한다고 설명하고 있다.

西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 化學療法 및 免疫療法과 遺傳子療法등을 使用하나 手術療法과 放射線療법은 局所的인 治療法이기 때문에 限界性이 있고, 全身療法인 免疫療法도 현재로서는 治療方法이 定立되어 있지 않은 상태이기 때문에 化學療法の 發展만이 癌治療率을 向上 시킬수 있는 것이나 化學療法 自體도 化學 藥材의 毒性問題를 해결하지 못하고 있는 실정이다⁴⁹⁻⁵³⁾.

즉, 外科的 處置法, 放射線 治療法, 化學療法, 免疫療法 등이 癌腫에 따른 感受性과 治療 후의 經過 그리고 副作用이 각기 다르고, 또 이에 따른 많은 문제점들을 안고 있는 것이다.

癌細胞의 增殖을 抑制하는 方法에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, apoptosis란 necrosis와는 대조되는 용어로 초기에 핵의 응축, 세포질의 응축, 수포상의 세포들기 형성등이 관찰되지만 necrosis는 독성물질이나 산소부족에 의하여 세포막투과성이 항진되어 세포내로 물이 들어가서 팽윤되며 mitochondria 내로 Ca^{2+} 유입이 일어나 ATP 생성이 저하되어 에너지 부족의 결과에 의해 세포사가 일어나는 것으로 알려져 있다⁵⁴⁻⁵⁷⁾

生體內의 腫瘍에서 발견되는 apoptosis는 macrophage에서 분비되는 각종 cytokine에 의해 일어나거나, cytotoxic T-lymphocyte에 의해 일어나는 것으로⁵⁸⁾ 抗癌劑들의 부작용 및 tumor regression과 관계가 있는 것으로 알려져 있으며⁵⁹⁻⁶⁰⁾, apoptosis에 의해 抗癌劑의 치료효과가 mediate될 수 있다는 연구들이 많이 보고되고 있지만⁶¹⁻⁶³⁾, 아직까지 抗癌劑의 apoptosis 기전에 대해서는 명확하지 않다.

한편 nitric oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthetase (NOS)가 작용하여 생성되는 것으로

NOS는 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS(iNOS) 2 종류가 있으며 cNOS는 vascular endothelium 및 brain에서 iNOS는 활성화된 macrophage 및 여러 세포에서 발견되었다⁶⁴⁾. Macrophage가 생산하는 NO가 抗癌作用이 있다고 최초로 보고한 것은 1987년 Hibbs 등⁶⁵⁾이 마우스에 BCG를 접종 후 macrophage를 분리하여 LPS를 첨가하여 배양하였을 때 腫瘍細胞의 增殖이 抑制되고, 여기에 N-MMA를 가하면 抗癌作用이 없어진다고 하였다. 이것은 여러 자극제에 의해 活性化된 macrophage가 정상세포보다는 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophage-mediated tumor cytotoxicity는 중요한 의미가 있다⁶⁶⁾. 이러한 NO는 生體內에서 癌細胞를 공격하여 傷害시키는 癌免疫의 effector로서 그 역할을 하고 있어 腹腔 macrophage에서 분비되는 NO가 癌細胞의 增殖을 抑制할 것으로 보인다. 그러나 NO의 이러한 공격을 피하는 癌細胞들은 惡性化될 가능성도 시사되고 있기 때문에 NO의 裏面性이라 불리고 있다⁶⁷⁾.

현재까지 癌細胞에 대한 研究로서, 鄭⁶⁸⁾은 內託羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 영향, 沈⁶⁹⁾은 白鼠를 이용한 枳實, 魚腥草, 穿山甲 및 猪苓의 抗癌效果, 金⁷⁰⁻⁷¹⁾은 伏梁丸과 肥氣丸 등이 各種 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 抗癌效果, 鄭 등⁷²⁻⁷³⁾은 單一藥物로 金銀花 및 魚腥草 그리고 白鮮皮와 穿山甲의 抗癌效果, 李⁷⁴⁾는 增損五積丸을 이용하여 癌細胞柱의 成長阻礙에 미치는 영향, 宋³³⁾은 仙方活命散加蟾酥가 皮膚癌細胞(A431)에 미치는 영향, 金³²⁾은 淸熱消毒散加蟾酥가 皮膚癌細胞(A431)에 미치는 影響을 報告하였다.

그러나 八物湯을 사용한 癌細胞의 增殖 및 免疫機能 增強에 관한 研究는 없었기에, 鱗花瘡에 사용되고있는 八物湯이 癌細胞의 增殖抑制와 免疫增強에 有意할 것으로 생각되어 本 研究를 試圖하였다.

四君子湯을 陳⁷⁵⁾은 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로

構成하였고, 各 效能⁷⁶⁻⁷⁹⁾은 人蔘이 扶脾養胃, 補中益氣하고, 白朮은 健脾燥濕, 扶助運化하고, 白茯苓은 健脾滲濕하고, 甘草는 益氣補中和胃하니 方劑學的으로 보면 益氣健脾養胃하는 效가 있어 補氣의 主方이 되므로 여러가지 原因으로 말미암아 元氣가 不足해지거나 臟腑機能이 衰退해져서 일어나는 頭暈目眩, 少氣懶言, 疲倦無力, 自汗, 舌淡苔少, 脈虛無力 등의 氣虛證을 治療한다⁸⁰⁾고 하였다.

또한 四物湯에 대하여 陳⁷⁵⁾은 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃으로 構成하였고, 各 效能⁸¹⁾은 熟地黃이 補血하고, 當歸는 養血和血하며, 白芍藥은 和榮理血하고 川芎은 行血活血하여 方劑學的으로 補血調血의 主方이 되므로 面色蒼白或萎黃, 脣色淡白, 頭暈眼花, 心悸, 失眠, 舌質淡, 脈細無力 등의 血虛證을 治療한다⁸⁰⁾고 하였다.

八物湯은 王²⁴⁾이 四物湯과 四君子湯을 최초로 合劑 記錄한 以後 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃, 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로 構成되어 醫家들^{23,81-84)}에 의해 氣血雙補劑로 活用되고 있으며 少氣懶言, 乏力自汗, 面色蒼白或萎黃, 心悸, 失眠, 舌淡嫩, 脈細弱 등의 氣虛와 血虛가 竝存하는 氣血兩虛證을 治療한다⁸⁰⁾고 하였다.

In vitro上에서 MTT法으로 測定한 結果, 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line과 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP cell line에 八物湯은 抗癌作用이 있는 것으로 생각되지만 有意性은 인정되지 않았다. 또한 八物湯이 免疫細胞의 增強에 미치는 作用을 살펴보기 위하여 마우스 胸腺 및 脾臟細胞에 八物湯을 투여한 結果, T cell은 對照群보다 약간 감소하는 추세를 보였지만 B cell의 경우에 있어서는 對照群보다도 10%정도의 有意性있는 免疫細胞 活性化를 나타내어 八物湯이 免疫細胞중 脾臟細胞의 活性化에 有意할 것으로 생각된다. 그러므로, 八物湯은 癌細胞에 직접적인 作用을 하면서 癌細胞를 死滅시키는 것이 아니라 免疫細胞의 機能을 增強시킴으로써 間接적으로 癌細胞의

增殖을 抑制하는 것으로 생각되는 바, 이는 韓醫學的 正邪鬪爭의 觀點에서 살펴볼 때 補氣血의 代表方인 八物湯이 正氣를 補充시킴으로써 邪氣인 癌細胞의 增殖에 관계하는 것으로 보인다.

또한 八物湯이 免疫細胞中 胸腺細胞를 감소시킨 原因을 살펴보고자 마우스 腹腔內 macrophage의 NO (nitric oxide) 生成과 apoptosis 및 subpopulation의 影響을 고찰하여 다음과 같은 結果를 얻었다. 즉 In vitro上에서는 NO의 量은 LPS와 IFN를 동시에 투여한 對照群보다 八物湯을 投與한 實驗群이 對照群보다 增加되었지만 藥物의 量을 높일수록 對照群보다 감소되었다. 그리고, In vivo上에서는 control(+).보다 有意性있는 減少를 보였으며, T 림프구의 apoptosis는 對照群보다 增加한 結果를 나타내었다. 또한 T cell의 subpopulation은 T cell의 보조세포항체인 CD4+를 처리한 結果 T_H cell은 有意性있게 減少되었고, 이에 반해 억제세포항체인 CD8+로 처리한 結果 T_C/T_S cell은 有意性있게 增加되었다. 이러한 結果들을 綜合할 때 八物湯은 T cell의 免疫力 增強보다는 B cell의 免疫力를 增強시키고, 또한 皮膚癌이나 骨髓癌과 같은 癌腫이 발생하였을 때에는 八物湯을 過多하게 服用하기보다는 少量을 長期服用함으로써 NO의 生成을 增加시켜 癌細胞의 apoptosis를 促進시킬 것으로 생각되며, 차후 八物湯加減方 등을 이용한 抗癌 및 免疫增加에 대해 다양하고 체계적인 實驗研究가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

以上과 같이 八物湯이 癌細胞의 增殖에 미치는 影響과 免疫細胞에 미치는 影響을 살펴본 結果 다음과 같았다.

1. 八物湯은 皮膚癌細胞柱인 A431 cell line의 增殖을 抑制하였지만 有意性은 認定되지 않았다.

2. 八物湯은 骨髓癌細胞柱인 KHOS-NP cell line의 增殖을 抑制하였지만 有意性은 認定되지 않았다.

3. 八物湯은 對照群에 比하여 濃度가 짙을수록 胸腺細胞의 增殖을 감소시켰다.

4. 八物湯은 對照群보다 脾臟細胞의 增殖을 有意性있게 增加시켰다.

5. 八物湯은 In Vitro上에서 LPS와 IFN을 동시에 투여한 對照群보다 마우스의 腹腔內 NO를 濃度가 짙을수록 減少시켰다.

6. 八物湯은 In Vivo上에서 LPS와 IFN를 동시에 투여한 對照群보다 마우스의 腹腔內 NO를 減少시켰다.

7. 八物湯은 마우스 胸腺細胞의 apoptosis를 증가시켰다.

8. 八物湯은 마우스 胸腺細胞에 있는 T_H cell의 subpopulation를 對照群보다 有意性있게 減少시켰다.

9. 八物湯은 마우스 胸腺細胞에 있는 T_C/T_S cell의 subpopulation를 對照群보다 有意性있게 增加시켰다.

참고문헌

1. 上海中醫學院 編, 『中醫外科學』, 香港, 商務印書館, 1976, p. 5.
2. 馬 蒔·張志聰, 『黃帝內經素問靈樞合篇』, 台北, 台聯國風出版社, 1981, p.().
3. 巢元方, 『諸病源候論』, 台中, 昭人出版社, 1988, pp. 593~594.
4. 凌耀星, 『中醫治癌秘訣』, 서울, 文匯出版社, 1995, p. 256.
5. 陳士擇, 『外科秘錄』, 서울, 醫聖堂, 1993, pp. 132~133.
6. 李 梴, 『編註 醫學入門』, 서울, 大星文化社, 1990, p. 289.
7. 陳夢雷 外, 『圖書集成醫部全錄』, 서울, 大星文化社, 1992, pp. 370~390.
8. 吳 謙 外, 『醫宗金鑑』, 서울, 大星文化社, 1983, pp. 414~415.
9. 祁 坤, 『外科大成』, 台北, 文光圖書有限公司, 1979, p. 322.
10. 上海中醫學院, 『中醫外科學』, 上海, 上海科學技術出版社, 1981, pp. 325~327.
11. 顧伯康 外, 『中醫外科臨床手冊』, 上海, 上海科學技術出版社, p. 430.
12. 楊思樹 外, 『中醫臨床大全(下冊)』, 北京, 科學技術出版社, 1991, pp. 894~895.
13. 대한피부과학회, 『피부과학』, 서울, 麗文閣, 1990, pp. 272~279.
14. 顧伯康, 『實用中醫外科學』, 上海, 上海科學技術出版社, 1985, pp. 552~553.
15. 서울대학교 의과대학, 『腫瘍學』, 서울, 서울대학교출판부, 1990, pp. 1~3, 91~95, 126.
16. 서울대학교 의과대학, 『免疫學』, 서울, 서울대학교출판부, 1991, pp. 1~2, 265~266, 271~272.
17. 洪元植, 『現代中國의 癌治療』, 서울, 英文社, 1980, pp. 81~85, 366~367, 372~375, 378~379.
18. 裴元植, “癌의 韓洋方併用治療에 대한 報告”, 大韓韓醫學會誌, Vol.7, No.2, 1986, pp. 53~57.
19. 張代鈞, “中醫藥對腫瘤放化學的 增敏減毒作用”, 中國中西醫藥結合誌, Vol.12, No.3, 1992, pp. 135~138.
20. 孫華麗·余桂清, “中醫中藥配合放射治療癌症

- 概況”, 中醫雜誌, Vol.31, No.1, 1991, pp. 4
4~46.
21. 王濟民·王俊茹, “中醫藥防治癌症的體會”, 浙江中醫雜誌, Vol.26, No.1, 1991, pp. 32~33.
 22. 高祐新·朴惠峻, “鬪花瘡의 原因, 症狀 및 治方에 대한 文獻的 考察”, 大韓外官科學會誌, Vol.10, No.1, 1997, pp. 122~138.
 23. 許 浚, 『東醫寶鑑』, 서울, 南山堂, 1983, pp. 77, 90, 106, 113, 447, 573.
 24. 王肯堂, 『六科準繩』, 서울, 柳林社, 1975, pp. 66~67.
 25. 李哲浣, “四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 筋肉疲勞恢復에 미치는 實驗的 研究”, 서울: 慶熙大學校 大學院, 1988.
 26. 金羊鎬, “四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 白鼠子宮筋의 收縮力과 自發運動에 미치는 影響”, 圓光大學校 大學院, 1991.
 27. 嚴柱五, “八珍湯 및 八珍湯加杜續丸料煎湯液이 白鼠의 妊娠維持에 미치는 影響”, 圓光大學校 大學院, 1988.
 28. 金聖勳, “四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響”, 慶熙大學校 大學院, 1987.
 29. 金世吉, “四物湯이 貧血家兔의 造血效果에 미치는 影響”, 圓光大學校 大學院, 1982.
 30. 裴鐘局, “四君子湯과 四物湯 Extract 投與가 Rat의 成長에 미치는 影響”, 慶熙大學校 大學院, 1978.
 31. 林圭庠, “四君子湯煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響”, 圓光大學校 大學院, 1988.
 32. 金喜澤, “淸熱消毒散加蟾酥가 皮膚癌細胞(A431)에 미치는 影響”, 大田: 大田大學校 大學院, 1995.
 33. 宋格鎬, “仙方活命飲加蟾酥가 皮膚癌細胞(A431)에 미치는 影響”, 大田: 大田大學校 大學院, 1995.
 34. 崔政和, “當歸飲子加蟾酥가 皮膚癌細胞(A431)의 細胞毒性에 미치는 影響”, 大韓外官科學會誌, Vol.9, No.1, 1996, pp. 1~15.
 35. Mosmann, T. : J. Immunol. methods. 65, 55~63 (1983).
 36. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : J. Immunol. methods. 129, 23 (1990).
 37. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2844 (1978).
 38. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. : J. Immunol. 120, 1497 (1979).
 39. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. : Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity, 59(9), 3280 (1991).
 40. Tomei, L.D., Cauter, P. and Wenner, C.E. : Inhibition of radiation induced apoptosis in vitro by tumor promoters. Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 324 (1988).
 41. Shortman, K. and Backson, H. : The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulation of mouse thymus cells. Cell. Immunol., 12, 230, 1974.
 42. 錢伯文, 『腫瘤的辨證施治』, 上海, 上海科學技術出版社, 1980, pp. 1~10.
 43. 郁仁存, 『中醫腫瘤學』, 北京, 北京科學技術出版社, 1983, pp. 1~10.
 44. 金完熙·崔達永, 『臟腑辨證論治』, 서울, 成輔社, 1985, pp. 140~42, 168~70, 281~84.
 45. 李 岩, 『腫瘤病』, 北京, 人民衛生出版社, 1982, pp. 2~8.
 46. 崔昇勳, 『東醫腫瘍學』, 서울, 杏林出版, 1995, pp. 37~42.
 47. 李 岩, 『腫瘤臨證備要』, 北京, 人民衛生出版社, 1983, pp. 11~26.
 48. 張代釗, 『中西醫結合治療癌證』, 山西, 山西

- 人民出版社, 1984, pp. 11~19.
49. Fish B : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, *Cancer*, 54 : 2609, 1984.
 50. Kim, SH : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, *J. Kor. Cancer Assoc*, 21 : 11, 1989.
 51. Park CG, Lim DK, Kook YH, Cha CR, and Paik CG : In vitro chemosensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J. Kor. Cancer Assoc*, 22 : 61, 1990.
 52. Willson JK, V, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, & Weese JL : Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *Cancer Res*, 47 : 2704, 1987.
 53. 이창혜 · 이봉기 · 이원형 · 김주덕, "시험관 및 생체내 암細胞(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성細胞의 염색체 분포특성", 연세의대 논문집, 16 : 180, 1983.
 54. Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, E., Jenkinson, J. and Owen, J.J.T. : Antibodies to CD/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337, 181-184 (1989)
 55. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G. : Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, 181, 1661-1672 (1995)
 56. Zhou, T., Edwards, C.K. and Mounts, J.D. : Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 182, 129-137 (1995)
 57. McConkey, D.J. et al : Cellular signaling in programmed cell death(apoptosis). *Immunol. Today.*, 11, 120-121 (1990)
 58. Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, et al : The topoisomerase II inhibitor teniposide(VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, 200, 416-424 (1992).
 59. Hickman JA : Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, 11, 121-139 (1992).
 60. Collins MKL, Marvel J, Malde P and Lopez-Rivas A : Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J. Exp. Med.*, 17, 1043-1051 (1992).
 61. Lotem J and Sachs L : Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*, 80, 1750-1757 (1992).
 62. Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, et al : Bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.*, 53, 3321-3326 (1993).
 63. Okamoto, A., Okabe, M. and Gomi, K. : Analysis of DNA Fragmentation in Human Uterine Cervix Carcinoma HeLa Cells treated with Duocarmycins or other Anti-tumor agents by Pulse Field Gel Electrophoresis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 93-98 (1993)
 64. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6, 3051-3064 (1992).

65. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235, 473 (1987).
66. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uno, K. and Sasada, M. : Leukemic cell lysis by activated human macrophages. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 1174-1180 (1993).
67. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland, H.E.Jr., Gilleland L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. : Neutrophil-mediated nitrosamine formation : Role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology*, 103(4), 1260-1266 (1992)
68. 鄭鉉雨, “內託羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 實驗的 研究”, 益山, 圓光大學校 大學院, 1996.
69. 沈載然, “白鼠를 이용한 枳實 魚腥草 穿山甲 및 猪苓의 抗癌效果에 관한 研究”, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1988.
70. 金剛山, “伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果”, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1989.
71. 金剛山, “肥氣丸 및 消積正元散이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長沮碍에 미치는 效果”, 裡里, 圓光大學校 大學院, 1992.
72. 鄭鉉雨·崔政和·陳千植, “金銀花 및 魚腥草가 癌細胞柱에 미치는 影響”, 東醫病理學會誌 Vol. 10, No.1, 1996, pp. 126~132.
73. 鄭鉉雨·田炳薰, “白蘚皮와 穿山甲이 人體 癌細胞柱에 미치는 細胞毒性的 效果”, 東醫病理學會誌, Vol. 11, No.1, 1997, pp. 58~64.
74. 李竝求, “增損五積丸(脾積方)이 사람의 各種 癌細胞柱의 成長沮碍에 미치는 效果”, 益山, 圓光大學校 大學院, 1993.
75. 陳師文, 『太平惠民和劑局方』, 上海校經山局成記發行, 1924, p.115.
76. 王 昂, 『醫方集解』, 臺北, 大方出版社, 1978, pp. 79~82.
77. 李尚仁·康舜洙, 『方劑學』, 서울, 癸丑文化社, 1979, pp. 35~37.
78. 游士勳·張錦清, 『實用中醫方劑學』, 臺北, 藥群出版事業有限公司, 1983, pp. 366~372.
79. 中國醫學院編, 『中醫方劑選講』, 廣東, 廣東科學技術出版社, 1984, pp. 12~19.
80. 金完熙·崔達永, 『臟腑辨證論治』, 서울, 成輔社, 1985, pp. 50~62.
81. 南京中醫學院, 『中醫方劑學』, 上海科學技術出版社, 1974, pp. 23~24, 155, 162, 166, 195.
82. 黃渡淵, 『方藥合編』, 서울, 杏林書院, 1974, pp. 31~32, 64, 68, 132, 168, 173.
83. 尹吉榮, 『東醫方劑學』, 미네르사, 서울, 1964, pp. 46~48.
84. 王新華, 『中醫歷代醫論選』, 商務印書館, 1983, pp. 536~537, 562.