

랫드의 실험적 간암발생과 자연살해세포의 활성화에 미치는 녹용의 효과

정자영* · 길광섭 · 이영순¹
식품의약품안전청, ¹서울대학교, 수의과대학

Effects of the Pilose Antler on the Experimental Hepatocarcinogenesis and the Natural Killer Cell Activity in Rats

Ja Young Jeong*, Kwang Sup Kil and Yong Soon Lee¹

Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul Nat'l University, Suwon, 441-744, Korea

(Received September 12, 1998)

(Accepted November 11, 1998)

ABSTRACT : This study was performed to investigate the modifying effect of the general (GPA) and the fermented pilose antler (FPA) on experimental hepatocarcinogenesis and Natural Killer cell activity in rats. Specific pathogen free, 5-week male Sprague-Dawley rats were divided into four groups. To induce hepatocarcinogenesis, diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg, i.p.) was used as a tumor initiator and was given in a single dose at experimental onset. All rats were given a partial hepatectomy (PH) at 3 weeks after experimental onset. Sodium phenobarbital (PB, 0.05% in diet), GPA (0.075% in diet) and FPA (0.075% in diet) were given from 2 to 8 weeks. Group I of the initiation control group was only given DEN. As initiation-promotion group, Group II was given DEN and then PB. Group III and IV were given DEN-PB-GPA and DEN-PB-FPA, respectively. In hematological analysis, as compared with Group I, the number of white blood cells were significantly increased in the GPA ($p < 0.01$) and the FPA treated group ($p < 0.05$), respectively. Natural killer (NK) cell activity by flow cytometer (FCM) analysis was higher in group of treated with the GPA (35%) than that of the FPA (27.5%), but not significant. Result of the immunohistochemical staining of the glutathione S-transferase placental form (GST-p) indicated that the number of and area of the pre-neoplastic lesions was not significantly changed in Group III and IV compared Group II, respectively. In conclusion, the GPA and the FPA treatment significantly increased the number of WBC in peripheral blood, but the enhancing NK activity and the modifying effect on the experimental hepatocarcinogenesis were not observed.

Key Words : Fermented pilose antler, General pilose antler, NK cell activity, GST-p, Hepatocarcinogenesis, Flow cytometer

I. 서 론

녹용(鹿茸)은 숫사슴의 뿔인데 아직 뼈 성분이 형성되지 않고, 내부에는 혈관이 있으며, 내부 조직이 유연한 것을 채취하여 건조시킨 것이다. 녹각은 사슴의 뿔이 나온지 60~70일이 지나 각질화(角質化)되어 신체에서 떨어진 것을 말하며 녹용보다는 딱딱하다. 즉 녹용은 성장기 과정에 채취하여 각질이 유연하며 각모(角毛)가 있는데 반하여, 녹각은 단단한 각질(角質)이 되어 떨어진 것으로서 각모가 없다(보건사회부, 1985).

녹용의 맛은 달면서 짜고, 한방에서 말하는 이의 성질은 온성(溫性)이다. 우리나라에서 유통되는 녹용은 매화용·화용(꽃사슴의 일종인 매화사슴과 꽃사슴의 뿔), 뉴질랜드용 적록(red deer의 뿔로 호주와 뉴질랜드에서 대부분 수입됨), 원용(소련산으로 적록 및 엘크 종류의 사슴뿔) 그리고 알라스카용(알라스카에서 자라고 있는 순록의 뿔)등이다. 특히 한방에서 녹용은 인삼과 더불어 가장 우수한 보혈 강장제로 사용되어온 전통 한약제로서 국민보건에 큰 이바지를 해오고 있다. 또한 녹용에 대한 최근의 과학적 연구에서 이들의 효능이 입증되고 있고, 활력강화 및 성장촉진 약제로 보편화되는 추세에 있어 그 소비가 폭발적으로 늘고 있다.

*To whom correspondence should be addressed

일반적으로 녹용은 건조시켜 유통되기 때문에 한약으로 조제할때 알콜에 담근 후 세절하여 사용한다. 그러나 녹용을 알콜에 담가 절편을 만들때, 유효성분의 유실이 있을 것으로 예상되며, 이러한 단점을 막기 위하여 개발된 이용방법 중 하나가 녹용의 발효법이다. 즉 녹용을 물에 담그고 *Bacillus PY92* 균주를 첨가하여 발효시킨 후, 멸균하여 사용하면 녹용 성분의 유실없이 전량 이용할 수 있게된다(김 등 1994a). 그러나 이와 같은 방법으로 처리한 발효녹용의 약효검색에 대한 연구보고가 거의 없는 실정이어서 이의 효용성을 과학적으로 평가할 필요가 있다.

지금까지 녹용이나 녹각으로부터 각종 아미노산과 peptide(Zhu, 1986), 수종의 미량원소, 다양한 종류의 지질과 fatty acid, 산성 다당류를 포함한 당류(Liu, 1981), estradiol을 포함한 steroid계와 prostaglandin류의 호르몬, 핵산등이 분리 동정되었다(김 등, 1975, 한 등, 1994a, 한 등, 1994b). 녹용의 약리작용과 임상적 효과는 실험적 연구에 의하여 증명된 것과 민간에서 전해오는 것으로 나눌 수 있다. 우선 실험적 연구에 의해 증명된 녹용의 약리작용으로는, 심혈관계의 심방수축(Huang, et al., 1991), 심박동수 억제, 혈압강하 작용, 신경계의 교감신경 흥분작용(Wang, et al., 1991), 항염증 작용(Zhang, et al., 1992, Zhang, et al., 1994), 핵산과 단백질 합성촉진(Wang, et al., 1990a, Wang, et al., 1990b), monoamine oxidase(MAO) 억제효과(Chen, et al., 1992), 면역기능 강화 작용(Zhao, et al., 1992) 및 항위궤양 작용(Wang, et al., 1985) 등이며, 이외에 민간에 전통적으로 알려져 오는 효과로는 항암, 항스트레스 작용, 성기능 항진, 창상치유 작용 및 학습능력 촉진작용 등이다.

이상과 같이 폭넓은 녹용의 약리 및 임상효과중 생체를 이용한(*in vivo*) 항암 및 암발생에 미치는 녹용의 효과에 대한 과학적 연구는 아직까지 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 중기 간 발암모델을 이용하여 일반녹용과 발효녹용의 투여가 실험적 간암발생 과정에 어떤 조절효과가 있는지를 알아보고, 또한 녹용의 면역증강 기능과 관련하여 이들 시험물질의 투여가 미치는 자연살해세포의 활성 변화에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

뉴질랜드산 녹용(赤鹿, *Cervus elaphus*) 상대를 시중에서 구입하여 사용하였다. 시약으로는 diethylnitrosamine (DEN), sodium phenobarbital(PB), diaminobenzidine

(DAB)은 Sigma(U.S.A.)사의 제품을, rabbit anti-GST-p 항체는 나고야 시립대학 의학부의 Sato 교수로부터 공급받았으며, biotin labeled goat anti-rabbit IgG와 ABC kit는 Vectastain(U.S.A.) 제품을 이용하였다.

2. 녹용추출액의 조제

녹용을 0.075%가 되도록 증류수에 수침하여 15 과운드로 20분간 멸균한 다음, 일반녹용은 곧바로 여과하여 여액을 얻었다. 발효녹용의 경우에는 증류수에 넣어 멸균한 녹용을 상온에서 식힌 다음 *Bacillus PY92* 균주를 첨가하여 8~10일간 배양한 후, 녹용이 완전히 분해되었을때 여과하고 그 여액을 멸균하여 사용하였다(김 등, 1994a).

3. 실험동물 및 사육조건

국립독성연구소 실험동물실에서 분양된 5주령, Sprague-Dawley계 수컷 랫드 40마리를 사용하였다. 동물의 사육조건은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5% 그리고 명암교대 12시간을 각각 유지하였다. 모든 동물은 분양 후 사육실내에서 1주간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 또한 사료(신촌사료, 서울)와 음수는 자유로이 급식 시켰고, polycarbonate 케이지에 4마리씩 넣어 관리 하였다.

4. 실험설계 및 시험물질 투여

5주령의 S.D. 랫드 수컷 40마리를 4군으로 나누어

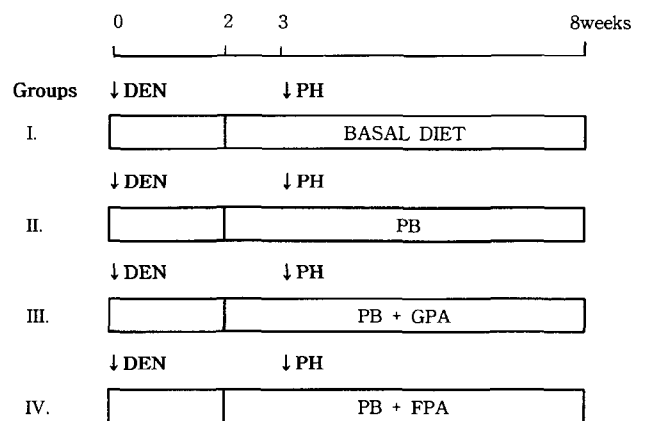


Fig. 1. Experimental design to examine the effects of the general and fermented pilose antler treatments. DEN: diethylnitrosamine (200 mg/kg, i.p.), PH: partial hepatectomy, PB: sodium phenobarbital (0.05% in diet), GPA: general pilose antler (0.075% in diet), FPA: fermented pilose antler (0.075% in diet).

실험하였다. 각 실험군 모두에게 간암 유발물질인 DEN을 생리식염수에 용해시켜 실험개시일에 체중 kg 당 200 mg씩 복강 내 1회 주사하였다. 3주 후에 간세포의 증폭을 위하여 간의 2/3(좌우 중심엽과 좌측외엽)를 절제하였으며, 8주 후에 부검하였다. 제 I군은 대조군으로서 DEN 투여 후 정상적인 사료를 주었다. DEN 투여 2주후에 II군은 발암촉진제인 PB를 사료 0.05%로, III군은 0.05%의 PB와 0.075%의 일반녹용을, IV군은 0.05%의 PB와 0.075%의 발효녹용을 사료에 각각 첨가하여 2주에서 8주까지 6주 동안 자유 섭취하도록 하였다(Fig. 1).

5. 혈액학적 검사

EDTA 처리한 혈액을 자동혈구 측정기(H*1, Technikon, Co. Ltd., U.S.A)를 이용하여 적혈구수(RBC), 백혈구수(WBC), 혈색소(Hgb), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV) 및 평균적혈구혈색소량(MCHC) 등을 측정하였으며, 백혈구 감별계산도 수행하였다.

6. 자연살해 세포의 활성화검사

1) NK 세포에 대한 표적세포 YAC-1의 준비

국립보건원으로부터 분양받은 mouse YAC-1 lymphoma cell을 10% 소태아 혈청(fetal calf serum, GIBCO, U.S.A)을 첨가한 RPMI 1640 배지(GIBCO, U.S.A)에 부유 시켜, 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 유지 및 계대 배양하였으며, 일부는 -70°C 냉동고에 8% dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가한 배지에 넣어 동결 보존하였다. 95%의 생존율 및 형태학적으로 정상인 YAC-1만을 실험에 사용하였고, YAC-1 세포의 형광소실에 의하여 NK 활성이 간접적으로 측정되기 때문에 NK 활성검사 때마다 YAC-1 세포의 자연적 형광소실을 결정하여 NK 활성을 최종적으로 산정하는데 보정하였다.

2) 림프구의 준비

말초혈액으로부터 림프구를 분리하기 위하여 헤파린(100 I.U./ml blood) 처리된 10 ml 주사기로 심장 채혈하여, PBS(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free)로 동량 희석한 다음, 원심분리관에 ficoll-hypaque(LKB, Sweden) 5 ml를 넣은 다음 그위에 희석된 동량의 혈액을 중층하고, 1500 rpm으로 20분간 원심하여 림프구를 분리 하였다. 이렇게 분리된 림프구를 PBS(-)로 2회 씻어낸 후, 100 unit penicillin, 100 g streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM

pyruvate와 10 mM HEPES를 첨가한 10% 소태아 혈청이 들어 있는 RPMI 1640 배지에 다시 부유 시켰다.

3) 탐식세포 및 B 림프구의 제거

탐식세포(단핵구, monocyte)의 제거를 위하여 plastic culture dish(corning Glass, U.S.A)에 세포 부유액을 넣고 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양하였다. 플라스틱 배양용기에 부착된 단핵구를 제거하고, 상층의 세포 부유액을 얻어 다음과 같이 처리하였다. B 림프구의 제거를 위하여 nylon wool(Wako, Japan) 5 g을 10 ml 주사기에 넣어 column을 만든 후 세포 부유액을 넣고 37°C, 95% O₂, 5% CO₂, 배양기에서 60분간 배양한 다음, nylon wool 미부착 세포를 따뜻한 RPMI 1640 배지 50 ml로 씻어서 회수하였다.

4) Large granular lymphocyte의 분리

Percoll(비중 1.130 g/ml, Pharmacia) 9 part에 10배 농축 RPMI 1640 배지 1 part를 가하여 등장화하고, 이것을 100% percoll(비중 1.22 g/ml, 290 mOs)로 하였다. 100% percoll 용액을 66.7%, 55.0%, 50.8%, 44.2%로 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배지로 희석하고, 15 ml 원심분리관(Costar, U.S.A)에 밀도가 높은순으로 불연속 밀도분배를 만든 후(percoll gradient method), 위의 과정에서 회수된 총림프구 부유액(약 1.0~2.0 ml)을 맨 위에 중층하였다. 이어서 30분간 실온에서 3000 rpm으로 원심분리 하여 4개의 분획을 확인한 후 이중에서 pasteur pipette으로 분획 2, 즉 percoll 44.2%와 50.8% 사이의 분획내 세포를 회수하였고, 회수된 세포를 Giemsa 염색하여 형태적으로 LGL 세포임을 확인하였다. 회수된 LGL 세포는 percoll을 제거하기 위하여 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 이들 세포의 수와 생존율을 확인하기 위하여 20 µl 세포부유액과 20 µl의 tryphan blue를 잘 섞은 후 혈구계산판을 이용하여 세포수를 계산하였다. 세포의 생존율은 tryphan blue에 염색된 세포를 죽은 세포로 계산하여, 분리한 세포의 생존율이 95% 이상인 것을 실험에 사용하였다.

5) Flow cytometer(FCM)를 이용한 natural killer 세포의 활성측정

NK세포의 활성측정은 FCM을 이용하였다. 표적세포인 YAC-1의 형광염색을 위하여 carboxyfluorescein diacetate(cFDA; 20 mg/ml in acetone)를 사용하였고, 표적세포수 1×10⁶/ml당 7.5 µl씩 사용하였다. cFDA를 섞은 세포부유액을 37°C 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 FCM(Coulter Epics V, U.S.A)을 이용

하여 NK 세포에 대한 YAC-1 세포의 살해효과를 측정하였으며, 전 과정은 4°C 하에서 수행하였다.

FCM은 488 nm에서 작동되는 spectrophysics argon ion laser와 400 mW light 출력을 갖추었다. Scattered laser light를 차단하기 위하여 515 nm long pass absorption filter를 조합하였다. 형광은 590 nm dichroic filter를 통과하면서 적색과 녹색으로 분리되고, 적색은 다시 630 nm long pass absorption filter를 통과하게 하였다. 각 분석 시료에는 internal control로서 분석 전에 DNA check(Coulter Epics Co., 10 um beads, U.S.A) 500 µl를 PBS(-) 1 ml에 희석한 액을 분리된 LGL 세포 수의 1/100 비율로 첨가하였다. cFDA에 의한 YAC-1의 형광을 forward angle light scatter fluorescence(FALS)에 gating된 log integrated green fluorescence(LGFL) channel에 모아 분석하였으며, bead의 적색 형광을 peak red fluorescence(RFL)에 모아 bead가 1,000개 세어지면 분석을 종료케 하였다. 한 시료의 측정은 2~3회 반복하여 측정하였고, 표적세포 YAC-1의 specific lysis는 다음과 같이 구하였다.

$$\% \text{ specific lysis} = k \frac{CT - TE}{CT} \times 100$$

여기서 k는 YAC-1 세포 만의 자연적 형광 소실을 [4시간 배양 후 형광을 갖는 YAC-1 세포수/배양직전(0시간)에 형광을 갖는 YAC-1 세포수]이며, CT는 NK : YAC-1 세포를 100 : 1로 섞은 직후 FCM으로 측정된 형광을 갖는 세포의 평균수이며, TE는 같은 sample을 4시간 배양한 후 측정된 형광을 갖는 세포의 평균수이다.

7. 병리조직학적 검사 및 GST-p의 면역조직학적 검사

간을 육안으로 관찰한 후 두께 2~3 mm로 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린으로 24시간 고정하고, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고, Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 GST-p의 면역조직학적 검사를 위하여 다른 간조직을 cold acetone에 1주일간 고정한 후, xylene으로 1시간씩 3회 세척하고 파라핀 포매하였다. 간 조직내의 GST-p 양성 증식소 및 증식성 결절의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC) 법을 이용하여 면역염색하였다. 파라핀 조직 절편은 xylene으로 파라핀을 녹여내고, 알콜농도 하강순의 단계적 함수과정을 거쳐, moisture chamber에서 비 특이적인 반응을 줄이기 위해 정상 goat 혈청으로 blocking 시키고, rabbit anti-rabbit IgG, avidin biotin

complex를 각각 moisture chamber에서 반응시킨 후 H₂O₂와 0.03% diaminobenzidine(DAB : 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.6)으로 발색반응을 일으켰다. 이와같이 면역염색된 슬라이드는 화상분석기(Image Analyzer, Kontron Electronics, Germany)를 이용하여 GST-p 양성증식소 및 증식성 결절의 수와 면적을 측정하였다.

8. 자료의 통계적 처리

자료에 대한 통계적 처리는 체중, 상대장기 무게비, 화상분석 결과 및 자연살해 세포 활성도에 대하여는 ANOVA 후 군간 다중비교(Student's *t* test)를 하였으며, 혈액학적 검사 자료는 독성시험 처리프로그램인 LABCAT(Innovative Programming Associates, Inc. U.S.A)을 이용하여 군간 다중비교(Dunnnett's test)를 하였다.

III. 결 과

1. 체중변화

실험기간 동안 랫드의 체중은 모든 군에서 동물성장에 따라 증가하는 양상이었다. 특히 일반농용 투여군의 경우 다른군에 비하여 체중증가가 다소 높았으나, 유의차는 인정되지 않았다. 발암 유발 및 촉진 물질을 투여한 II군의 체중증가 역시 감소되지 않고, 다른 군과 유사하게 나타났다(Fig. 2).

2. 혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과 백혈구 및 림프구 총수를 제외

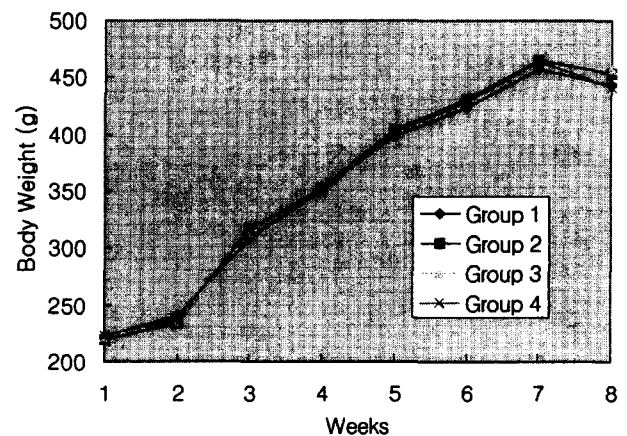


Fig. 2. Body weight changes after administration of the general and the fermented pilose antler in hepatocarcinogenesis rats.

Table 1. Hematological values in hepatocarcinogenesis rat treated with the general and the fermented pilose antler

Groups	Tests (unit)	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	HGB (g/dl)	PCV (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
I		9.69±3.15	7.84±0.45	14.8±0.69	43.0±2.06	54.8±1.16	18.9±0.64	34.6±0.90
II		11.44±3.35	8.09±0.50	15.7±0.78*	45.1±2.39*	55.8±1.26	19.4±0.30	34.7±0.49
III		15.28±5.14**	7.93±0.27	15.0±0.61	42.3±1.40	53.2±1.23*	18.9±0.96	35.5±1.73
IV		14.49±3.59*	8.12±0.29	15.4±0.46	44.6±1.22	55.0±1.80	19.0±0.62	34.4±0.34

All values are expressed as mean±S.D.

*: Significantly different from Group I at $p<0.05$.

** : Significantly different from Group I at $p<0.01$.

하고는 비교적 균일한 값의 분포를 보였다. 백혈구 총수의 경우, 일반녹용 투여군($p<0.01$)과 발효녹용 투여군($p<0.05$)에서 대조군에 비하여 각각 유의성있는 증가를 나타내었다. 이중 림프구 총수 역시 일반녹용 투여군($p<0.05$)과 발효녹용 투여군($p<0.01$)에서 대조군에 비하여 각각 유의성 있게 증가하였다(Table 1).

3. 자연살해 세포의 활성검사

유세포 측정기를 이용한 자연살해 세포의 활성은 군에 따라 27%에서 35%까지 조사 되었다. 일반녹용 투여군의 값이 약 35% 로서 다른 군들에 비해 약간 높았으며, 발효녹용 투여군에서는 27%로 조사되었다. 그러나 처치 군간 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

4. 병리조직학적 검사

각 군에서 적출되어 조직처리된 간 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과 중기 간발암 모델에서 확인되는

병변이 관찰되었다. 즉 발암물질 DEN 투여에 의한 특이적 병변인 호산성(acidophilic) 및 호염기성(basophilic)의 증식성 결절과 병소가 뚜렷하게 관찰되었지만, 이러한 소견 외에 녹용투여에 의한 특별한 소견은 발견되지 않았다.

5. GST-p 양성 증식소 및 증식성 결절의 면적

체중에 대한 간의 상대 증량은 대조군에 비하여 녹용 투여군에서 유의적 증가를 나타내었다($p<0.01$). 아세톤 고정후 GST-p 면역조직 화학적으로 염색한 결과, 정상 간세포와 구별되는 GST-p 양성 증식소 및 증식성 결절 등을 관찰할 수 있었다. 각 실험군의 간 단위조직(cm^2)당 GST-p 양성 증식소 및 증식성 결절의 수와 면적은 대조군을 제외한 녹용 투여군에서 유의적($p<0.01$)으로 증가하였다. 그러나 발암 촉진제인 PB를 투여한 II군과, PB에 녹용을 첨가하여 투여한 III군, IV군과의 유의차는 인정되지 않았다. 따라서, 일반녹용과 발효녹

Table 2. Total WBC, % lymphocytes and natural killer cell activity in hepatocarcinogenesis rat treated with the general and the fermented pilose antler

Groups	Treatment	No. of Rats	Total WBC ($10^3/\text{ul}$)	% Lymphocytes	No. of Rats	NK Activity (100 : 1) ^{a)}
I	DEN+PH	10	9.69±3.2	69.33±5.4	5	28.42±11.4 ^{b)}
II	DEN+PH+PB	8	11.43±3.3	68.36±3.4	3	29.03±9.5
III	DEN+PH+PB+GPA	7	15.28±5.1**	71.93±5.3	4	34.96±1.8
IV	DEN+PH+PB+FPA	10	14.49±3.6*	75.27±4.3	5	27.48±8.8

All values are expressed as mean±S.D.

a): 100 : 1=effector cell(LGL) : target cell (YAC-1), b): % specific lysis = $k \frac{CT - TE}{CT} \times 100$ (k: spontaneous loss rate of between 0 and 4 hours fluorescent YAC-1 cell, CT: mean number of fluorescent YAC-1 cell in control tubes, TE: mean number fluorescent YAC-1 cells in target+effector tubes), GPA: gneral pilose antler, FPA: fermented pilose antler.

*: Significantly different from Group I at $p<0.05$.

** : Significantly different from Group I at $p<0.01$.

Table 3. Effect of the general and the fermented pilose antler on the GST-p positive lesion in hepatocarcinogenesis rat

Groups	Treatment	No. of Rats	Liver/Body weight (%)	No. of Nodule & Foci/Liver (No/ cm^2)	Area of lesions (mm^2)/Liver (cm^2)
I	DEN+PH	7	2.44±0.17	3.05±0.85	0.158±0.071
II	DEN+PH+PB	8	3.22±0.47**	4.95±0.97	0.442±0.158**
III	DEN+PH+PB+GPA	8	3.26±0.17**	5.02±2.77	0.357±0.248**
IV	DEN+PH+PB+FPA	10	3.11±0.21**	6.24±1.54	0.434±0.126**

All values are expressed as mean±S.D.

** : Significantly different from Group I at $p<0.01$.

용의 투여가 랫드 간 발암화 과정에서 촉진 또는 억제 효과는 없는 것으로 확인되었다(Table 3).

IV. 고 찰

우리나라에서는 60년대부터 녹용의 생체내 작용에 관한 과학적 연구가 시작되었으나, 지금까지 발표된 연구보고는 극히 부족한 실정이다. 녹용의 체중증가 및 성장 촉진에 대한 보고는 랫드에 8주간 투여한 경우(허 등, 1960)와, 토끼에 4주간 투여한 경우(제갈 등, 1982)에서 각각 유의있는 체중증가가 관찰되었다. 본 실험에서도 S.D. 랫드에 8주간 일반 및 발효녹용을 투여한 결과 대조군과 비교할때 유의있는 체중증가는 없었지만, 일반녹용을 투여한 군에서 다소 체중 증가율이 높게 나타났다. 한편 제갈(1982)은 녹용투여 후 조사한 혈액학적 검사에서 백혈구 수의 감소를 보고하였고, 김(1982) 등은 S.D. 랫드 수컷을 이용하여 phenylhydrazine · HCl로 빈혈을 유도시킨뒤 4일간 녹용 추출물을 투여 하였더니, 15~25%의 적혈구 생성이 촉진되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 일반 및 발효녹용을 투여한 군에서 적혈구수의 증가는 없었으나, 백혈구 및 림프구수의 유의적 증가가 인정되었다. 그러나 백혈구중 림프구가 차지하는 백분율은 대조군과 비슷한 값을 갖는 것으로 조사되었다. 이로부터 녹용 투여에 의한 백혈구수의 증가는 백혈구의 어떤 특정 세포군이 증가한 것이 아닌 백혈구 전체가 증가한 것으로 사료되며, 녹용이 백혈구의 생성, 분화 및 증식에 어떤 영향을 주었을 것으로 사료된다. 특히 발효녹용 투여군보다 일반 녹용에서 더 뚜렷한 백혈구 수의 증가가 나타났다.

녹용은 전통적으로 한방에서 가장 일반적인 보약제로 사용하고 있으며, 녹용의 면역기능 증강효과에 대한 언급이 많으므로, 주로 체액성 면역기능과 암치료 기전에 중요한 의미를 가지는 자연살해 세포에 대한 활성검사를 FCM을 이용하여 수행하였다(McGinnes, *et al.*, 1986, Callewaert, *et al.*, 1991). 강(1986) 등은 녹용 추출물을 투여한 랫드의 자연살해 세포 활성이 향상되었다고 하였으며, 고(1990) 등은 뉴질랜드산 적록에서 생산된 녹각을 투여한 ICR 마우스의 세포성 및 체액성 면역반응 향상과 자연살해세포의 활성화도 유의하게 향상되었다고 하였다. 본 실험에서 FCM을 이용하여 조사한 자연살해 세포의 활성화도는 전체적으로 27.5%~35%로 조사되었다. 일반녹용을 투여한 군에서 활성화도가 제일 높았던 반면에 발효녹용을 투여한 군에서는 제일 낮게 조사되었다. 그러나 이들 구간 유의차는 인정되지 않았다. 자연살해 세포의 활성화도 검사에서 일반녹용과 발효

녹용의 차이가 가장 뚜렷하게 인정되었는데 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

실험적 간암 모델에 투여한 일반 및 발효녹용의 간암 발생에 대한 조절효과는 각 군에 대한 간의 상대중량비, 병리조직학적 검사, 간의 전암지표효소인 GST-p 양성 병소에 대한 화상분석 등의 결과로 평가하였다. 우선 체중에 대한 간의 상대 중량비는 대조군을 제외한 모든군에서 유의성있는 증가가 관찰되었다. 이는 녹용투여에 의한 결과라기 보다는 간암촉진 물질인 sodium phenobarbital에 의한 간의 비대화 현상때문인 것으로 사료된다. 간의 병리조직학적 검사에서는 발암 물질 투여에 의한 특이적 병변인 호산성(acidophilic) 및 호염기성(basophilic)의 증식성 결절과 병소가 뚜렷하게 관찰되었지만, 이러한 소견 외에 녹용투여에 의한 특별한 소견은 발견되지 않았다. 또한 GST-p 양성 병소에 대한 수와 면적에 있어서 간암모델의 유발물질과 촉진물질이 투여된 제 II군에 비하여, 일반 및 발효 녹용 투여군에서 유의차가 인정되지 않았으므로, 일반 및 발효녹용의 투여가 실험적 간암 발생과정에 미치는 조절효과는 없는 것으로 사료된다. 그러나 Sarcoma 180 세포주를 ICR 마우스에 복강주사한 후, 본 실험에서 사용된 발효녹용을 투여한 결과 생존 시간의 연장 과 생존율의 증가를 보고한 바 있다(김 등, 1994b). 암에 대한 녹용의 효과가 임상적으로 연구된 보고로는 유방암 환자에게 녹용제제를 주사하였을때 통증이 없어졌고, 종양이 제거되었으며, 환자 혈액중 대식세포의 탐식능력이 증가하였다는 보고가 있다(杜 등, 1981). 본 연구에서는 실험적 간암화 과정에 투여된 녹용성분이 전암병변의 억제나 촉진 등에 아무런 효과를 나타내지 못한 것으로 조사되었다. 또한 일반녹용 보다는 발효녹용의 효과가 더 있을 것으로 예상하였으나, 그런 차이 역시 발견하지 못하였다. 그러나 여러 종류의 종양에 대한 녹용의 효과 연구는 아직 부족한 실정이므로 좀더 지속적인 연구가 요구된다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 발효녹용의 조제에 협조하여 주신 경희대학교 약학대학 김동현 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- Callewaert, D.M., Radcliff, G., Waite, R., LeFevre, J. and Poulik, M.D. (1991): Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells

- by flow cytometry. *Cytometry*, **12(7)**, 666-676.
- Chen, X., Jia, Y. and Wang, B. (1992): Inhibitory effects of the extract of pilose antler on monoamine oxidase in aged mice. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin*, **17(2)**, 107-110.
- Huang, S.L., Kakiuchi, N., Hattori, M. and Namba, T. (1991): A new monitoring system of cultured myocardial cell motion: effect of pilose antler extract and cardioactive agents on spontaneous beating of myocardial cell sheets. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **39(2)**, 384-387.
- Liu, W.J. (1981): Remarks on Chinese materia medica-young Pilose antler-a precious drug. *Chung Yao Tung Pao*, **6(4)**, 43-45.
- McGinnes, K., Chapman, G., Marks, R. and Penny, R. (1986): A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **86(1)**, 7-15.
- Wang, B.X., Liu, A.J., Cheng, X.J., Wang, Q.G., Wei, G.R. and Cui, J.C. (1985): Anti-ulcer action of the polysaccharides isolated from pilose antler. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **20(5)**, 321-325.
- Wang, B.X., Chen, X.G., Xu, H.B., Zhang, W. and Zhang, J. (1990a): Effect of polyamines isolated from pilose antler (PASPA) on RNA polymerase activities in mouse liver. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **25(9)**, 652-657.
- Wang, B.X., Chen, X.G. and Zhang, W. (1990b): Influence of the active compounds isolated from pilose antler on syntheses of protein and RNA in mouse liver. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **25(5)**, 321-325.
- Wang, B.X. and Zhou, Q.L. (1991): Advances in the chemical, pharmacological and clinical studies on pilose antler. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **26(9)**, 714-720.
- Zhang, Z.Q., Zhang, Y., Wang, B.X., Zhou, H.O., Wang, Y. and Zhang, H. (1992): Purification and partial characterization of anti-inflammatory peptide from pilose antler of *Cervus nippon Temminck*. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **27(5)**, 321-324.
- Zhang, Z.Q., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, W., Zhang, Y. and Wang, B.X. (1994): Anti-inflammatory effects of pilose antler peptide. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, **15(3)**, 282-284.
- Zhao, Q.C., Kiyohara, H., Nagai, T. and Yamada, H. (1992): Structure of the complement-activating proteoglycan from the pilose antler of *Cervus nippon Temminck*. *Carbohydr. Res.*, **230(2)**, 361-372.
- Zhu, J.Z. (1986): Acid hydrolysis of protein in the residue of pilose antler and the isolation of amino-acids in hydrolyzate. *Chung Yao Tung Pao*, **11(4)**, 44-45.
- 강윤호, 김병윤 (1986): 수종의 한약물이 백서의 자연살해 세포 활성화에 미치는 영향. *경희한의대논문집*, **9**, 217-240.
- 고병희, 송일병 (1990): 녹각, 숙지황, 인삼, 오가피가 면역반응 및 NK 세포활성도에 미치는 영향. *대한약학회지*, **7(2)**, 157-173.
- 김길현, 박시원 (1982): 녹용추출액의 조혈작용에 관한 연구. *한국생화학회지*, **15(2)**, 151-157.
- 김동현, 한상범, 박주식, 한명주 (1994a): 녹용발효와 생리활성. *생약학회지*, **25(3)**, 233-237.
- 김동현, 한상범, 유기웅, 김유숙, 한명주 (1994b): 복수암 생쥐에 대한 발효녹용의 항암작용. *약학회지*, **38(6)**, 795-799.
- 김영은, 이승기, 윤웅찬, 김정숙 (1975): 녹용의 약효 성분에 관한 연구(1) 녹용, 녹각, 고래 코 연골, 상어 척수 연골의 화학조성에 관하여. *한국생화학회지*, **8(2)**, 89-106.
- 보건사회부. (1985): 대한약전의 한약(생약) 규격집. **74**.
- 杜玉堂 (1981): 鹿角注射液對乳癌患者巨細胞功能影響. *中醫雜誌*, **22(3)**, 36-37.
- 제갈승주 (1982): 녹용추출액이 대장균 항체 생산에 미치는 영향. 석사학위청구논문, 건국대학교대학원.
- 한대석, 김영중, 김진웅, 허 훈 (1994a): 녹용, 생산, 성분, 효능 및 임상 응용에 관한 논문집. 도서출판 한림원, 5-53.
- 한용남, 황금희, 김경옥 (1994b): 녹용과 명태중의 핵산 대사물질의 함량. *생약학회지*, **25(1)**, 76-77.
- 허 금, 최숙영, 이해빈, 정규찬, 고돈이 (1960): 녹용에 관한 연구(제 2보), 녹용이 실험용 백서의 성장에 미치는 영향에 대하여. *대한약학회지*, **5(10)**, 10.