

內托千金散加味方이 3-MCA로 誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響

金喜澤* · 盧石善*

ABSTRACT

Effect of Naetakchungumsankamibang on Skin tumor induced by 3-MCA and Immunological Response

Kim Hee-taek · Roh Seok-seon

In order to investigate the effect of Naetakchungumsankamibang(NTCGS) water extract on the skin tumor induced by 3-MCA and immunological responses in mice, the cytotoxicity against SK-MEL-2 cells and total number of tumors induced by 3-MCA were measured. The numbers of WBC, platelets and RBC, plaque forming cells, hemagglutinin titer, hemolysis titer, carbon clearance, proliferation of splenocyte by thymidine uptake assay, splenic leukocyte by FACS analysis and TNF- α were also measured for the evaluation of the immunological responses.

The results were obtained as follows:

1. In cytotoxicity against SK-MEL-2 cells, concentration inhibiting cell growth up to below 20% of control was recognized at 1mg/ml of NTCGS.
2. In Inhibitory effect on the skin tumor induced by 3-MCA, the results showed a strong inhibitory effect of NTCGS.
3. In hematological changes in the tumor bearing mice, the numbers of WBC decreased significantly in NTCGS treated group as compared with control.

* 大田大學校 韓醫科大學 外官科學教室

4. In hematological changes in the tumor bearing mice, the numbers of platelets increased significantly in NTCGS treated group as compared with control.
5. In hematological changes in the tumor bearing mice, the numbers of RBC increased with no significance in NTCGS treated group as compared with control.
6. Effects of the plaque forming cells in the tumor bearing mice, NTCGS treated group exhibited a significant effect compared with control.
7. In terms of the effects on hemagglutinin titer, NTCGS treated group showed higher level than control, without significance.
8. In terms of the effects on hemolysis titer, NTCGS treated group showed higher level than control, without significance.
9. In terms of the effects on phagocytic index K in Balb/C mice, NTCGS treated group showed significant difference from control.
10. In terms of the effects on proliferation of splenocyte by thymidine uptake assay, NTCGS showed significant effect at the concentration of 0.5mg/ml.
11. In terms of the effects on splenic leukocyte of Balb/C mice by FACS analysis, NTCGS treated group showed significantly higher level of helper T cell, B cell and macrophage than in control.
12. In terms of the effects on the secretion of TNF- α , the treated group showed significant effect at the concentration of 1mg/ml of NTCGS.

Based on the results summarized above, NTCGS is considered to have antitumor activity and immunological responses against skin tumor, and to be usable for the treatment.

I. 緒 論

腫瘍이란 組織이 正常的인 細胞에 대한 統制機轉을 벗어나 過剩的 生産을 하는 것으로, 體內的 各 部位에 擴散 浸潤하여 正常 組織을 破壞하는 것을 말하며¹⁻³⁾, 이러한 癌의 發生은 發癌物質 등의 環境의 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 藥物, 放射線, 慢性刺戟, 스트레스 및 突然變異 등으로 인하여 人體의 免疫機能이 弱화되면 癌細胞化된 非正常細胞를 破壞 除去하지 못하게 되어 發生하는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾.

韓醫學에서 腫瘍에 대한 認識은 비교적 일찍부터 있었던 것으로 여겨지는데⁹⁻¹⁰⁾ 《內經》¹¹⁻¹²⁾에서는 積聚, 息賁, 鼓脹, 石瘕, 腸覃, 伏梁 등의 病證名으로 說明하였고, 이후 여러 文獻^{9,13-19)}에서 癥瘕, 疝瘕, 癰瘕, 舌菌, 失榮, 乳巖, 石疽, 癰疽, 惡瘡 등의 病名으로 거론되는데 그 症狀를 보면 現在의 癌과는 전적으로 일치하지는 않지만 腫瘍의 範疇에서 認識되고 있다. 그 중 특히 癰疽는 西洋醫學의 腫瘍性 疾患과 炎症性 疾患을 包括하는 概念으로, 皮膚에 나타나는 腫瘍은 癰疽 중 “翻花瘡, 黑疔, 石疔, 失榮, 疔, 贅瘤, 黑痣, 惡瘡” 등이 이에 해당한다^{9,17,19-20)}.

韓醫學에서 腫瘍의 治療는 益氣養血, 健脾益氣, 養陰生津, 補肝益腎, 健脾益腎 등 人體의 抗病 能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化癥, 化痰消癥, 理氣消腫 등 癌細胞를 직접 攻擊하는 祛邪法 및 이 두 가지 方法을 配合한 扶正祛邪法²¹⁻²⁷⁾ 등으로 區分할 수 있는데 “扶正祛邪”로 요약되는 癌 治療法은 免疫力를 增強시켜 癌細胞의 成長을 抑制하는 腫瘍免疫學的 治療法과 類似性을 갖고 있다²⁸⁻²⁹⁾. 따라서 이러한 韓醫學의 治療原則은 腫瘍疾患에 대하여 臨床的인 效果를 얻을 수 있을 것으로 기대되고 있는데, 最近의 研究 動向을 살펴보면 각종 韓藥 抽出物의 癌細胞 殺傷作用

³⁰⁻³⁵⁾과 發癌能 抑制 作用³⁶⁾을 비롯한 腫瘍細胞에 대한 직접적인 抑制效果, methotrexate³⁷⁻⁴⁰⁾나 cyclophosphamide⁴¹⁻⁴³⁾ 및 放射線 治療의 副作用을 抑制하는 實驗的 研究⁴⁴⁻⁴⁸⁾, 抗轉移^{30,49-51)}, 抗癌劑의 副作用 減少⁵²⁻⁵⁴⁾, 抗癌劑와의 併用投與로 治療效果 提高^{34,55-58)} 등에 관한 報告가 있다.

皮膚癌에 대한 實驗的 研究로는 李 등⁵⁹⁻⁶⁰⁾은 3-MCA 誘發 上皮腫에 대한 免疫反應을, 林 등⁶¹⁾은 3-MCA 皮膚癌에 대한 刺戟部位別 抗癌 및 免疫增強效果를, 金 등⁶²⁻⁶⁴⁾은 皮膚癌細胞 A431에 대한 實驗的 研究를 報告하였으나 현재까지 皮膚 腫瘍에 대한 韓醫學의 理解와 治療 藥物에 대한 研究가 미흡한 實情이다.

內托千金散은 清代 陳⁶⁵⁾의 《外科正宗》에서 “治腦疽發背諸毒惡瘡, 已成不消者, 服之易潰.”라고 收載된 이래 腫瘍의 症狀과 關聯이 있는 癰疽疾患의 治療에 應用되고 있으나 腫瘍治療, 특히 皮膚癌에 대한 實驗研究는 찾아보기 어려웠다.

이에 著者는 內托千金散에 이미 抗癌效果가 報告된 白花蛇舌草⁶⁶⁻⁶⁸⁾, 仙鶴草⁶⁸⁻⁶⁹⁾, 魚腥草^{68,70-71)}를 加味한 內托千金散加味方이 3-MCA로 誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響을 檢索하고자 SK-MEL-2 癌株에 대한 細胞毒性을 觀察하였고, 化學的 發癌劑인 3-methylcholanthrene를 이용해 생쥐의 背部 皮膚에 皮膚癌을 誘發시켜 腫瘍의 개수를 測定하였으며, 免疫反應에 미치는 影響을 알아보기 위하여 白血球數, 血小板數, 赤血球數, Plaque forming cell, 赤血球 凝集素價, 赤血球 溶血素價, Carbon clearance에 의한 食食能, 淋巴球 增殖 反應과 脾臟 免疫細胞의 變化, TNF- α 등을 觀察하여 有意性 있는 實驗 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

動物은 雄性 4週齡의 ICR(International Cancer Research, U.S.A) 생쥐와 Balb/C 생쥐를 韓國化學 研究所에서 供給받아 實驗 당일까지 固形飼料(抗 生劑 無添加, 三養飼料 Co.)와 물을 충분히 供給하 고 실온 22±2℃를 계속 維持하면서 2 주일간 實 驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 사용하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 사용된 藥材는 大田大學校 附屬韓方 病院에서 購入한 후 精選하여 사용하였다. 處方의 內容과 用量은 《外科正宗》⁶⁾에 準한 內托千金散 에 白花蛇舌草, 仙鶴草, 魚腥草를 加하였으며, 處 方의 1貼 分量은 아래와 같다.(但, 1錢은 4g으로 換算함)

Prescription of Naetakchungumsankamibang(NT- CGS)

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	4
黃 芪	Astragali Radix	4
川 芎	Cnidii Rhizoma	4
當 歸	Angelicae gigantis Radix	4
防 風	Ledebouriellae Radix	4
桔 梗	Platycodi Radix	4
天花粉	Trichosanthis Radix	4
金銀花	Lonicerae Flos	4
人 蔘	Ginseng Radix	4
肉 桂	Cinnamomi Cortex	2
白 芷	Angelicae Dahuricae Radix	2
甘 草	Glycyrrhizae Radix	2
乳 香	Olibanum	2
沒 藥	Myrrha	2
白花蛇舌草	Oldenlandiae diffusae Herba	12
仙鶴草	Agrimoniae Herba	8
魚腥草	Houttuyniae Herba	8
Total amount		74

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), HBSS(Hank's balanced salt solution), trypsin-EDTA, sulforhodamine-B(SRB), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, phenol red 및 sodium azide, 3-methylcholanthrene, acetone, prostaglandin-F2 α , NH₄Cl 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate, guinea pig complement는 Gibco 製品, glacial acetic acid는 덕산 製品, SRBC는 Serotec社 製品, pentothal sodium은 중외제약 製品을 각각 사용하 였다.

機器는 CO₂ incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted microscope (Nikon Co, Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon), linear accelerator(Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader(Emax, U.S.A), FACS(Becton dickinson, U.S.A), rotary vaccum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama, Japan), micro-pipet(Gilson, U.S.A), autostill WG25(Japan), titer plate shaker(Labline Inst., U.S.A), culture flask(Falcon 3024), multiwell plate(96-well, Falcon), microtitration plate, V Bottom(Becton dickinson, Falcon, U.S.A.), conical tube, disposable pipet(5ml, 10ml, 25ml, Falcon), camera(601S, Nikon), syringe filter(0.22 μ m, Falcon) 및 spectrophotometer(UV2100, Shimadzu) 등을 사용하였다.

2. 方 法

1) 試料의 製造

上記한 內托千金散加味方の 2貼 分量(148g)을 藥湯器에 넣고 蒸溜水 1,200ml와 함께 넣은 다음

2시간 동안 加熱하여 濾過한 濾液을 rotary vaccum evaporator(Büchi 461)에서 減壓 濃縮하였고, 이 round flask를 -84°C deep freezer(Sanyo, Japan)에서 24시간 동안 放置하고 freeze dryer(Eyela, Japan)로 12시간을 凍結 乾燥하여 50g의 粉末을 얻어, 檢液으로 製造하여 사용하였다. 動物 實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 사용하였으며, 細胞毒性 實驗時에는 RPMI 1640 free medium에 溶解시켜 syringe filter($0.22\mu\text{m}$, Falcon)로 濾過하여 사용하였다.

2) 細胞 培養

In vitro 細胞毒性 測定에는 SK-MEL-2(ATCC HTB 77)를 사용하였는데 이들의 培養液은 모두 L-glutamine이 包含된 RPMI 1640 培地에 56°C 水槽에서 30분간 加溫하여 不活性化시킨 fetal bovine serum(FBS)을 10% 包含하고 1% 抗生劑(penicillin-G 10萬 units/ streptomycin 100mg)와 NaHCO_3 2g을 添加하여 製造하였다.

3) SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性 測定

Solid tumor에 대한 細胞毒性은 1989년에 美國의 國立癌研究所에서 藥物의 in vitro 抗癌活性度를 測定하기 위하여 개발된 sulforhodamine-B (SRB) assay 法⁷²⁻⁷³⁾을 사용하였다. 繼代中인 이들 細胞들을 實驗에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA 溶液으로 附着面으로부터 分離시키고, 96-well flat-bottom microplate(Falcon)에 well당 細胞數가 2×10^4 개가 되도록 분주하였다.

분주된 細胞들은 CO_2 incubator내에서 24시간 培養하여 바닥 면에 附着시킨 후, medium에 濃度別(0.25, 0.5, 1mg/ml)로 稀釋된 試料溶液들을 細胞가 들어있는 well에 각각 $20\mu\text{l}$ 씩 넣어주고 다시 48시간 동안 培養하였다.

試料는 加하기 전에 $0.22\mu\text{m}$ filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 藥物과 함께 48시간

培養이 끝난 후, 각 well의 medium을 除去하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 加하여 4°C 에서 1시간 동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 면에 固定시켰다.

細胞의 固定이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 洗滌하여 남아 있는 TCA 溶液을 완전히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 완전히 乾燥된 plate는 well당 $250\mu\text{l}$ 의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色 溶液을 加하여 30분간 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5~6회 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 SRB를 除去하였다.

染色된 cell plate들은 다시 室溫에서 乾燥시킨 후, control의 O.D.(optical density) 값이 520nm 에서 0.8~1.0A(吸光度) 값이 되도록 一定量의 10mM Tris로 染色液을 잘 녹여 낸 다음 520nm 에서 0.8~1.0A(吸光度) 값을 구하여 藥物의 癌細胞 成長을 50% 抑制하는 濃度인 50% effective dose(ED_{50})값을 얻었다. 癌細胞들에 대한 藥物의 效果를 評價하기 위하여 細胞數의 測定은 藥物을 加할때의 細胞數(T_z)와 藥物이 들어 있지 않은 medium을 加하여 48시간 동안 培養했을 때의 細胞數(C) 및 각 濃度の 藥物과 함께 48시간 培養했을 때의 細胞數(T) 등을 測定하였다(Scheme 1).

다음의 數式에 의해 抗癌活性 程度를 測定하였다. 즉, $T_z \geq T$ 인 경우에는 $(T - T_z) / (C - T_z) \times 100$ 의 數式으로 計算하였고, $T_z < T$ 인 경우에는 $(T - T_z) / T_z \times 100$ 의 數式으로 計算하였으며, 이렇게 計算된 값들로부터 lotus program의 data regression 機能을 이용하여 ED_{50} 값을 計算하여 각 藥物의 細胞毒性 程度를 비교하였다. ED_{50} 값은 對照群의 50% 水準으로 癌細胞의 成長을 抑制하는 試料의 濃度($\mu\text{g/ml}$)로 주어지며, 美國의 國立癌研究所인 NCI(National Cancer Institute, U.S.A) manual의 方法⁷⁴⁾에 따라서 決定하였다. 試驗群의 각 濃度에 대한 成長率 Y(%)는 다음과 같

이 計算하였다.

$$Y(\%) = [(T - C_0) / (C - C_0)] \times 100$$

이때,

T = 試驗群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)

C = 對照群의 48시간 培養 후 평균 細胞數(cells/ml)

C₀ = 培養 始作時 평균 細胞數 (cells/ml)

각각 濃度の Y(%)값과 Log₁₀ dose를 圖式化하고 다음과 같은 式에 의하여 回歸線을 구했다. 이때 각각의 濃도에 대하여 計算한 Y(%)값이 모두 50 %보다 작으면 再實驗을 實施하였다.

$$B = \text{slope} = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \cdot \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \text{intercept} = \frac{\sum Y_i}{N} - B \frac{\sum X_i}{N}$$

이때, N=number of points selected

[≤ number of dose level & > 2]

X_i = log dose i

Y_i = growth ratio calculated dose i

여기서 구한 기울기와 절편을 이용하여 回歸線 Y = A + BX 를 얻었으며 이 回歸線의 기울기와 절편으로부터 ED₅₀ 값을 計算하였다.

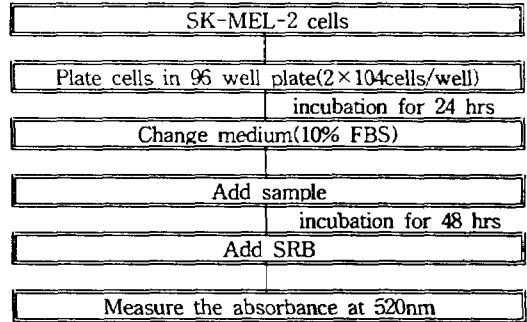
$$50 = A + B (\log_{10} ED_{50})$$

$$\log_{10} ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log_{10} ED_{50}} \mu\text{g/ml}$$

NCI manual에 따르면 細胞毒性 評價는 植物 抽出物인 경우 20μg/ml 이하, 合成物인 경우 4μg/ml 이하일 경우 抗癌作用이 있다고 規定⁷⁵⁾하고 있다.

cytotoxicity of NTCGS on SK-MEL-2 cells



4) 3-Methylcholanthrene에 의한 皮膚癌 誘發76-78)

털을 깎은 ICR 생쥐의 背部皮膚에 化學的 皮膚癌 誘發物質인 3-methylcholanthrene(3-MCA; Sigma, U.S.A.)을 acetone에 녹여 0.4 %의 溶液으로 하여 주 3회(월, 수 및 金요일)씩 8주간(2개월) 日週期 變動의 차를 줄이기 위하여 오후 2시에서 3시 사이에 micro pipette을 이용하여 0.2ml씩 局所塗布한 후 滅菌蒸溜水에 prostaglandin-F2α (PG-F2)⁷⁹⁻⁸⁰⁾ 10μg을 3-MCA 局所塗布部分으로부터 對稱되는 腹部에 筋肉注射하였다.

5) 藥物處置

8주간 3-MCA와 PG-F2를 塗布하여 皮膚癌이 3개 이상 誘發된 생쥐를 選別하여 8마리를 1群으로 하여 生理食鹽水 溶液을 處理한 群을 對照群으로 하였고, 內托千金散加味方을 50mg/20g/day의 濃度로 生理食鹽水에 녹여 經口投與한 群을 實驗群으로 구분하여 2주간 1일 1회 經口投與하였다.

6) 抗原

抗原으로 사용된 緬洋赤血球는 緬洋의 頸動脈으로부터 採血한 것을 Serotec社에서 供給받아 實驗에 사용하였다. 採血한 血液은 동량의 Alsever 溶液(dextrose 20.5g/l, sodium citrate 8.0g/l,

Scheme 1. The experimental scheme for

sodium chloride 4.2g/l)을 加하여 4℃에서 保存 하였으며 保存 2주일 이내의 것만을 사용하였다.

7) 免疫

皮膚癌이 誘發된 8마리의 생쥐를 1群으로 하여 實驗 終了 4일전에 ICR系 생쥐 尾靜脈에 4×10^8 cells의 緬羊細胞를 i.v. 注射하여 免疫시켰다.

8) 採血 및 血清의 分離

ICR 생쥐를 pentothal sodium(30mg/kg, 중의제 약)으로 麻醉하고 미리 heparin이 들어있는 1회용 주사기(23G \times 1 $\frac{1}{4}$, Samwoo Co.)로 心臟 穿刺하여 血液을 採取하고 血小板數, 白血球數를 Finio法⁸¹⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다. 또한 2ml의 血液을 1회용 주사기(21G, Samwoo Co.)로 取한 뒤 20분 후 원심분리기에 넣고 3,000rpm으로 20분 간 上層의 血清을 serum separator에 取하였다. 血清은 56℃에 30분간 非動化시킨 후 凝集素價 및 溶血素價의 測定에 사용하였다.

9) WBC 測定

White blood cell 測定은 Finio法⁸¹⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

10) PLT 測定

Platelet 測定은 Finio法⁸¹⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

11) RBC 測定

Red blood cell 測定은 Finio法⁸¹⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

12) 脾臟의 分離 및 脾臟細胞 浮遊液의 準備

採血이 끝난 ICR 생쥐로부터 脾臟을 摘出하여 electronic chemical balance로 重量을 測定하고난 후 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)

로 洗滌한 후 D-PBS가 들어있는 petri dish(35 \times 100mm)에서 작은 해부 가위로 단절한 다음 滅菌된 유리 막대로 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 浮遊시켰다. 이 浮遊液을 screen mesh로 濾過하여 組織片 및 分離되지 않은 細胞 덩어리를 除去하고 D-PBS로 1,500rpm에서 5분간 3회 원심분리하였다.

13) 脾臟細胞數 測定 및 plaque forming cell(PFC) 測定 方法

냉각시킨 D-PBS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)에 spleen cell을 screen 100mesh로 分離 濾過하여 組織片 및 分離되지 않은 細胞 덩어리를 除去하고 D-PBS로 1,500rpm에서 5분간 원심분리하였다. Cell pellet을 5ml Tris-buffer 0.83% NH₄Cl(pH 7.2)에 懸탁하여 37℃에서 5분간 培養시키고, D-PBS로 1,500rpm에서 5분간 2회 원심분리한 후 5×10^6 cells/ml(50% v/v) 조절하여 준비하였다. 緬羊赤血球 浮遊液(SRBC)은 5회 D-PBS로 洗滌하고 4×10^9 cells/ml(50% v/v)로 조절한 후 guinea pig complement를 蒸溜水에 녹이고 SRBC와 guinea pig complement의 混合液(1:2)을 ice bath 상에서 30분간 放置시켰다. 脾臟細胞 浮遊液 1000 μ l와 complement-SRBC 230 μ l를 잘 混合한 후 약 200 μ l를 cunningham microchamber에 注入하고 paraffin-wax(1:1)로 밀봉하여 37℃ 배양기에 1시간 이상 放置한 후 生成된 plaque를 counting 하였다.

14) 赤血球 凝集素價 測定

緬羊赤血球에 對한 凝集素價(hemagglutinin titer)의 測定은 Zaaberg의 方法⁸²⁾에 準하여 생쥐의 心臟으로부터 採血하였다. 分離한 血清을 56℃에서 30분간 非動化하여 microtitration plate. V Bottom(Becton dickinson, Falcon, U.S.A.)의 각 well에 磷酸緩衝食鹽水液으로 2배 계열 희석(원액

2, 4, 8, 16, 64, 128, 256, 512, 1024 회석)한 血清 25 μ l에 綿羊赤血球 浮游液(1×10^8 cells/ml) 50 μ l씩 加하여 잘 混化한 다음 덮개를 하고 37 $^{\circ}$ C 배양기 에서 24시간 培養 후 응집정도를 판독하였으며, 判定은 赤血球 凝集을 일으키는 血清의 최고 회석 배수를 \log_2 값으로 計算하여 凝集素價를 定하였다.

15) 赤血球 溶血素價 測定

綿羊赤血球에 對한 溶血素價(hemolysin titer)의 測定은 分離한 血清을 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 非動化하여 microtitration plate, V Bottom의 각 well에 磷酸緩衝食鹽水液으로 2배 계열 회석(원액 2, 4, 8, 16, 64, 128, 256, 512, 1024 회석)한 血清 25 μ l에 綿羊赤血球 浮游液(1×10^8 cells/ml) 50 μ l씩 加하여 잘 混化하고 guinea pig complement를 20 μ l씩 各에 加하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 培養한 후 赤血球 溶血을 일으키는 血清의 최고 회석배수를 \log_2 값으로 計算하여 溶血素價를 定하였다.

16) Carbon clearance 測定

Carbon clearance는 Balb/C 생쥐에 10일간 檢液을 投與한 후 Thorbecke⁸³⁾ 등의 方法에 準하여 測定하며, carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 retroorbital venous plexus로 부터 heparin 처리된 capillary로 0.025 %씩 1분, 5분, 9분 동안 各々 採血하여 各 血液 sample을 0.1 % sodium carbonate 2ml에 溶血시켜 spectrophotometer(UV2100, SHIMADZU, JAPAN)를 사용하여 675nm에서 carbon의 濃度を 測定하였다. Carbon clearance는 아래의 공식에 의해 phagocytic Index인 K값을 구하였다.

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

C1은 시간 T1에서의 sample 血中の carbon 濃度이고, C2는 시간 T2에서의 sample 血中の carbon 濃度이다.

17) 淋巴球의 增殖反應 測定

檢液과 mitogen 등을 處理한 細胞의 增殖程度를 測定하기 위하여 各 群의 생쥐의 脾臟細胞를 96 well plate의 各 well에 5×10^5 cell씩 添加하고, 檢液과 Con A를 濃度別로 處理한 후 細胞를 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 培養 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-3H] Thymidine 을 添加하고 다시 18시간 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線 同位元素의 量을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集器(Cell harvester)를 使用하여 유리섬유 여지(Glass microfiber filter)위에 捕獲하고 乾燥한 후 放射線 測程器(Liquid scintillation counter)를 이용하여 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

18) FACS에 의한 脾臟 免疫細胞 變化測定

(1) 脾臟 淋巴球 懸濁液 造製

Balb/C를 cervical dislocation으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고 Scheme 2-3에서와 같이 脾臟 淋巴球 懸濁液을 製造하였다. 細胞 處理 및 螢光染色用 緩衝液으로는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어 있지 않은 staining buffer를 使用하였다. 摘出した 脾臟을 100 mesh (Sigma)에 올려 놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5분간 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83 % NH_4Cl 溶液을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고 RPMI 1640-10 % FBS(Sigma)로 5×10^6 cells/ml가 되도록 稀釋하였다.

(2) 免疫 螢光染色 (Immunofluorescence staining)

免疫 螢光染色은 全 過程을 0-4℃에서 實施하였고, 培養한 脾臟 細胞를 回收하여 PBS로 3회 洗滌한 후 5ml FACS tube (*Becton Dickinson*, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300rpm, 5min)하였다. 각각의 1차 抗體 Culture sup.을 100μl 씩 5ml FACS tube 에 넣고 vortex한 후 40분간 얼음에서 反應시켰다. 사용한 1차 抗體는 3회 洗滌 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat Ig F(ab)₂ fragment 1:100 (*Tago*, U.S.A) 稀釋液 50μl을 加하여 40분간 反應시키고, 3회 洗滌 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACS can(*Becton dickinson*, U.S.A)으로 분석하였다.

(3) 免疫細胞 分析

染色이 完了된 細胞들을 0.3ml의 staining buffer에 浮游시켜 FACS-can (*Becton dickinson*, U.S.A)를 이용하여 分析하였다. 試料 당 5,000개의 細胞에 대하여 list mode로 資料를 聚合하였으며, consort 30 프로그램을 이용하여 分析하였다. Data의 分析은 forward scatter (FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 全體 脾臟細胞와 small lymphocyte 領域 및 lymphoblast 領域을 구분하여 그 中の B cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell 그리고 Mac-1⁺ cell의 比率(gated, %)을 算出하였다.

Scheme 2. Preparation of splenic leukocyte suspension

Balb/C mouse

| Sacrifice of mouse by cervical dislocation

| Excise the spleen out

Spleen

| Transfer onto a prewetted 100 mesh stainless-steel screen

| Cut into pieces

| Squeeze through the screen

| Transfer to a 15 ml conical tube

| Keep it for 5 min on ice

| Take the upper layer

| Wash 2 times with buffer

(PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺)

Hemolysis with 0.83 % NH₄Cl

Adjust the cell concentration to 5×10⁶ cells/ml in 10% FBS-RPMI 1640

Splenic leukocyte suspension

Scheme 3. Staining with fluorescein conjugated antibody

Cell culture

| Pool the cells into 5ml tube

| Wash 3 times with the staining buffer

| Resuspend in 0.5ml of the staining buffer

Cell suspension (100μl)

| Add 100μl of the primary Ab

| Incubate for 60 min

| Wash 3 times with the staining buffer

mAb-bound cells

| Add 100μl of F(ab)₂ fragment of

FITC-conjugated goat anti-rat Ig

| Incubate for 60min on ice

| Wash 2 times with the staining buffer

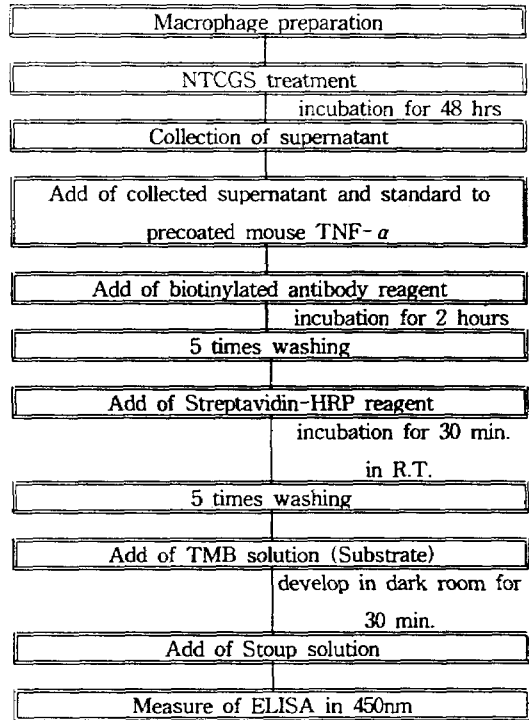
| Resuspend in 0.5ml of staining buffer

Immunofluorescence stained cell

19) TNF- α 測定(ELISA)

Balb/C 생쥐로부터 분리한 Macrophage를 1×10^6 cells/well로 하여 96well에 plating한 후 12시간 후 内托千金散加味方을 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml 濃度로 각각 duplicate plating 하여 48시간 培養하였다. 培養 후 1200 R.P.M.으로 5분 동안 원심분리하여 Supernatant만을 모아서 4℃에서 보관하였다. Mouse TNF- α 抗體로 precoated 되어진 96well 각 well에 위의 Supernatant 각각과 표준 물질을 50 μ l씩 첨가하였다. Biotin으로 mouse TNF- α 抗體를 표지하기 위해 biotinylated antibody reagent를 50 μ l씩 각 well에 첨가하여 2시간 동안 incubation 하였다. 5회 washing한 후 secondary antibody로 Streptavidin-HRP 시료를 넣어 R.T.에서 30분 동안 incubation하였다. 그 후 5회 washing한 후 Substrate인 TMB 溶液을 100 μ l씩 添加하였다. 빛을 차단하고 20℃~25℃에서 30분 동안 develop시킨 후 Stop solution을 100 μ l씩 넣어 反應을 차단한 후 450nm에서 吸光度를 測定한 후 standard curve를 작성하여 内托千金散加味方에 의해 분비된 TNF- α 의 濃度를 測定하였다(Scheme 4).

Scheme 4. The experimental scheme for TNF- α secretion of NTCGS on macrophages



III. 實驗成績

1. SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性에 미치는 效果

SK-MEL-2 癌株에 對한 細胞毒性은 0.25, 0.5, 1mg/ml 濃度에서 對照群에 비해 각각 102.45 ± 6.93 , 90.73 ± 5.07 , $78.76 \pm 5.65\%$ 로 1mg/ml의 高濃度에서만 20% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table 1, Fig. 1).

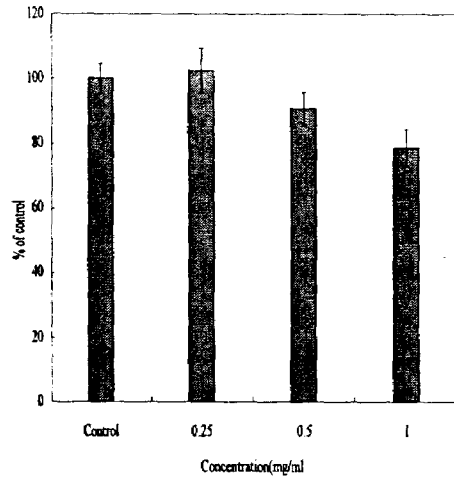


Table 1. Cytotoxic Effect of NTCGS on SK-MEL-2 Cells

Concentration(mg/ml)	Percent of control
Control	100.00 ± 4.68a)
0.25	102.45 ± 6.93
0.5	90.73 ± 5.07
1	78.76 ± 5.65

a) : Mean ± standard error

Control : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml NTCGS treated group

0.5 : 0.5mg/ml NTCGS treated group

1 : 1mg/ml NTCGS treated group

Fig. 1. Cytotoxic effect of NTCGS on SK-MEL-2 cells

Control : Non-treated group

0.25 : 0.25mg/ml NTCGS treated group

0.5 : 0.5mg/ml NTCGS treated group

1 : 1mg/ml NTCGS treated group

2. 皮膚癌 發生에 미치는 效果

化學的 發癌劑인 3-methylcholanthrene와 prostaglandin F2 α 에 의해서 誘發된 皮膚癌 發生數는 對照群의 경우는 8.27 ± 1.46 개로 나타났다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 경우는 4.95 ± 0.98 개로써 對照群에 비해 有意性(P<0.05) 있게 減少하였다(Table II, Fig. 2).

Table II. Effects of NTCGS on the Total Number of Tumors induced by 3-Methylcholanthrene and Prostaglandin F2 α

Group	No. of animals	No. of tumors
Control	8	$8.27 \pm 1.46a$
NTCGS	8	$4.95 \pm 0.98*$

a) : Mean ± standard error

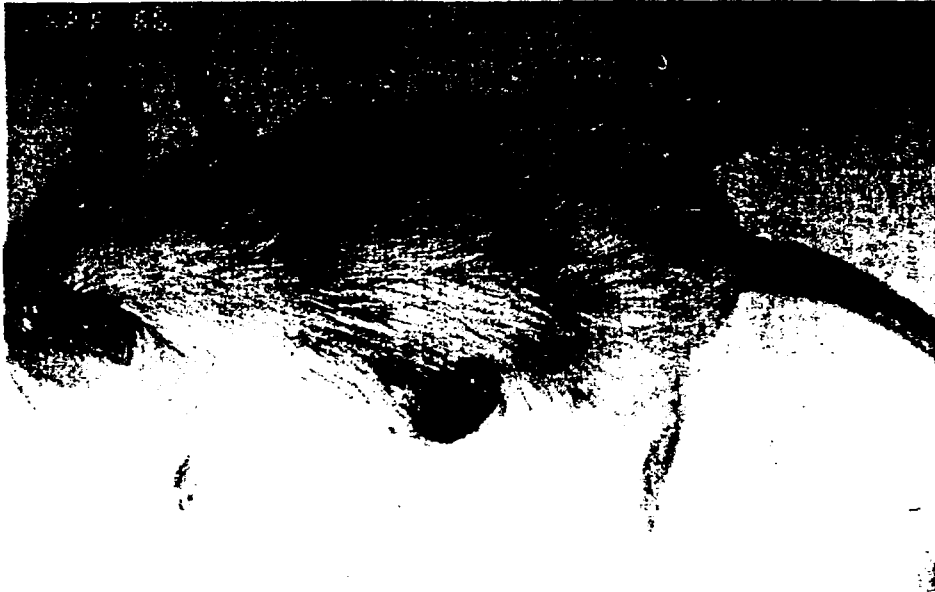
Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day)
treated group for 2 weeks after induction of tumor by
MCA and PG-F2 α for 8 weeks

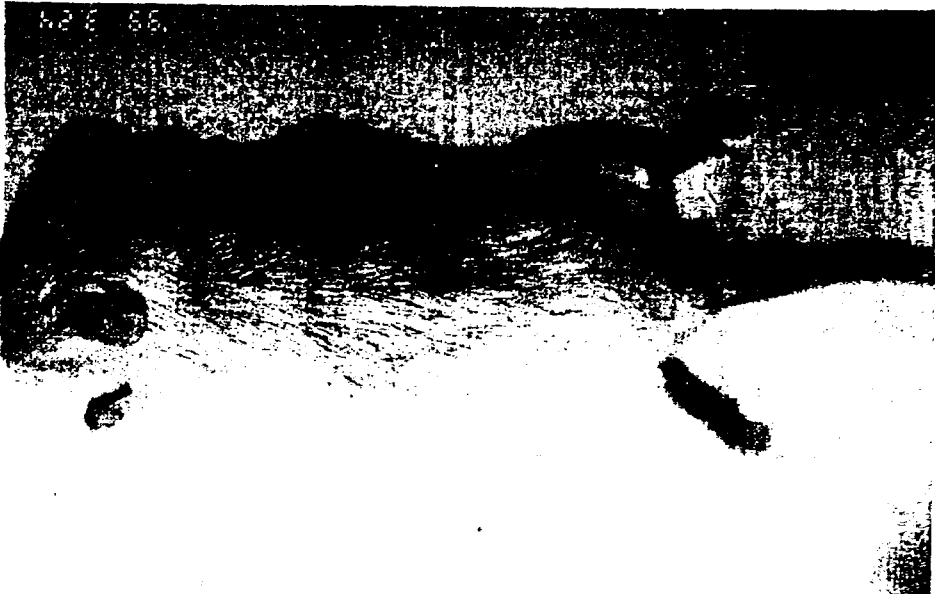
Fig. 2. Effects of NTCGS on the total number of
tumors induced by 3-methylcholanthrene and
prostaglandin F2 α

* P-value : Statistical significance value compared
with control data

(*: P<0.05)



Control group



NTCGS treated group

3. 白血球數에 미치는 效果

正常群의 白血球數는 $3.18 \pm 0.83(10^3/\text{mm}^3)$ 인데 비해 對照群의 白血球數는 $6.75 \pm 0.59(10^3/\text{mm}^3)$ 로 增加하였다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 白血球數는 $5.18 \pm 0.45(10^3/\text{mm}^3)$ 로 나타나 異常의으로 증가된 對照群에 비해 정상 수준으로 減少되었다(Table III, Fig 3).

Table III. Effects of NTCGS on the Number of White Blood Cells in the Tumor Bearing Mice

Group	No. of animals	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Normal.	8	$3.18 \pm 0.83a$
Control	8	6.75 ± 0.59
NTCGS	8	$5.18 \pm 0.45*$

a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

* P-value : Statistical significance value compared with control data

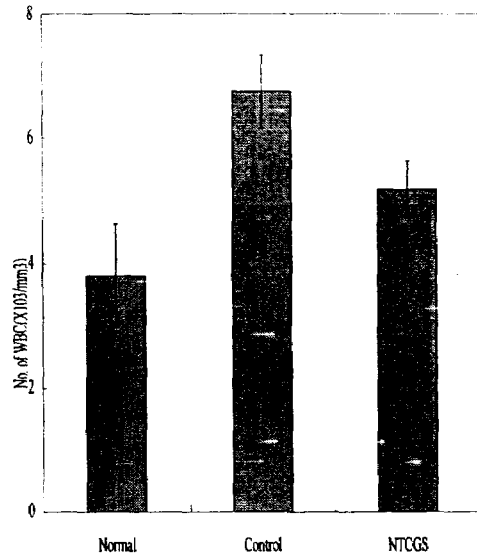
(*: P<0.05)

Fig. 3. Effects of NTCGS on the number of white blood cells in the tumor bearing mice

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 week



4. 血小板數에 미치는 效果

正常群의 血小板數는 $11.23 \pm 0.79(10^5/\text{mm}^3)$ 인데 비해 對照群의 血小板數는 $6.38 \pm 0.68(10^5/\text{mm}^3)$ 로 血小板數는 減少하였다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 血小板數는 $8.07 \pm 0.58(10^5/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비하여 有意性(P<0.05) 있게 增加하였다(Table IV, Fig 4).

Table IV. Effects of NTCGS on the Number of Platelet in the Tumor Bearing Mice

Group	No. of animals	PLT ($\times 10^5/\text{mm}^3$)
Normal.	8	$11.23 \pm 0.79a$
Control	8	6.38 ± 0.68
NTCGS	8	$8.07 \pm 0.58*$

a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

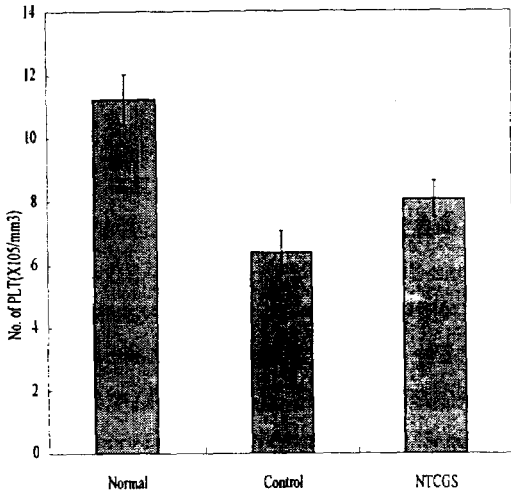
Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

* P-value : Statistical significance value compared with control data

(*: P<0.05)

Fig. 4. Effects of NTCGS on the number of PLT in the tumor bearing mice



Normal : Non-treated group
 Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks
 NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

5. 赤血球數에 미치는 效果

正常群의 赤血球數는 $8.83 \pm 0.72(10^4/\text{mm}^3)$ 인데 비해 對照群의 赤血球數는 $5.49 \pm 0.87(10^4/\text{mm}^3)$ 로 減少하였다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 赤血球數는 $7.01 \pm 0.51(10^4/\text{mm}^3)$ 로 나타나 對照群에 비하여 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다(Table V, Fig 5).

Table V. Effects of NTCGS on the Number of Red Blood Cells in the Tumor Bearing Mice

Group	No. of animals	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
Normal.	8	$8.83 \pm 0.72a$
Control	8	5.49 ± 0.87
NTCGS	8	7.01 ± 0.51

a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

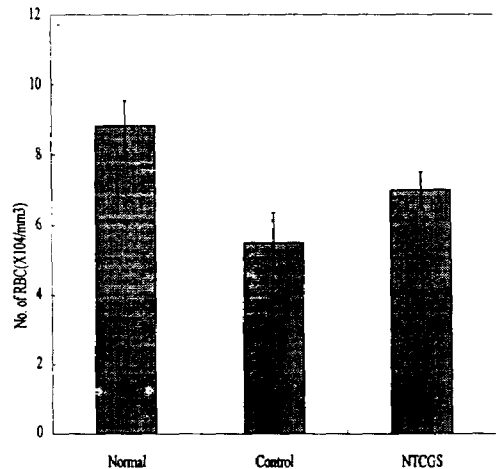
NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

Fig. 5. Effects of NTCGS on the number of RBC in the tumor bearing mice

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks



6. Plaque forming cell(PFC)에 미치는 效果

PFC數는 正常群에서 2.87 ± 0.23 개 이었고, 對照群은 2.96 ± 0.53 개로 나타났다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 경우는 3.78 ± 0.37 개로써 有意性($P < 0.05$) 있게 增加하였다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Effects of NTCGS on the Plaque Forming Cells in the Tumor Bearing Mice

Group	Dosage (mg/20g/day)	No. of animals	PFC(103/106 spleen cells)
Normal	-	8	$2.87 \pm 0.23a$
Control	-	8	2.96 ± 0.53
NTCGS	50	8	$3.78 \pm 0.37*$

a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

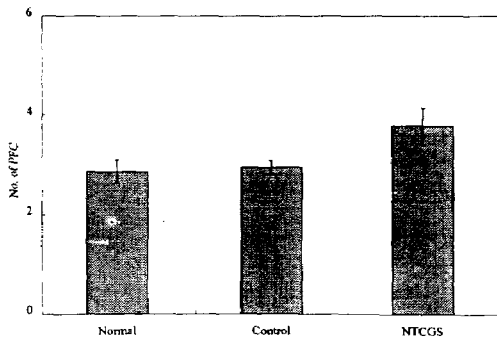
Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

* P-value : Statistical significance value compared with control data

(*: $P < 0.05$)

Fig. 6. Effects of NTCGS on the plaque forming cells in the tumor bearing mice



Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

7. 赤血球 凝集素價에 미치는 效果

抗原刺戟에 대한 抗體形成能을 보기 위하여 赤血球 凝集素價를 測定한 結果 正常群은 $5.86 \pm 0.89(\log_2 \text{ titer})$ 이었으며 對照群은 $5.98 \pm 0.65(\log_2 \text{ titer})$ 이었다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群의 경우는 $6.94 \pm 0.52(\log_2 \text{ titer})$ 로써 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다(Table VII, Fig. 7).

Table VII. Effects of NTCGS on the Hemagglutinin Titer in the Tumor Bearing Mice

Group	Dosage (mg/20g/day)	No. of animals	Hemagglutinin titer($\log_2 \text{ titer}$)
Normal	-	8	$5.86 \pm 0.89a$
Control	-	8	5.98 ± 0.65
NTCGS	50	8	6.94 ± 0.52

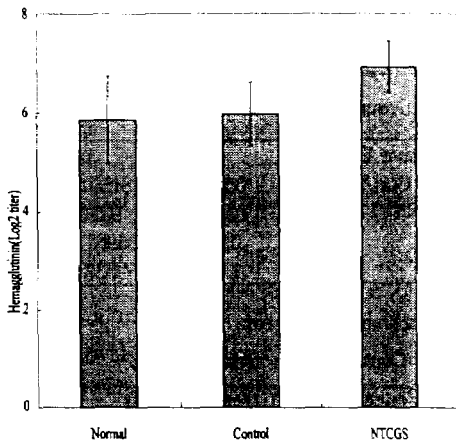
a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

Fig. 7. Effects of NTCGS on the hemagglutinin titer in the tumor bearing mice



Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

8. 赤血球 溶血素價에 미치는 效果

抗原刺戟에 대한 抗體形成能을 보기 위하여 赤血球 溶血素價를 測定한 結果 正常群은 $6.03 \pm 0.62(\log_2 \text{ titer})$ 이었으며 對照群은 $6.34 \pm 0.94(\log_2 \text{ titer})$ 이었다. 이에 비해 内托千金散加味方 投與群의 경우는 $7.74 \pm 0.57(\log_2 \text{ titer})$ 로써 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다(Table VIII, Fig. 8).

Table VIII. Effects of NTCGS on the Hemolysis Titer in the Tumor Bearing Mice

Group	Dosage (mg/20g/day)	No. of animals	Hemolysin (log ₂ titer)
Normal	-	8	$6.03 \pm 0.62a$
Control	-	8	6.34 ± 0.94
NTCGS 50	-	8	7.74 ± 0.57

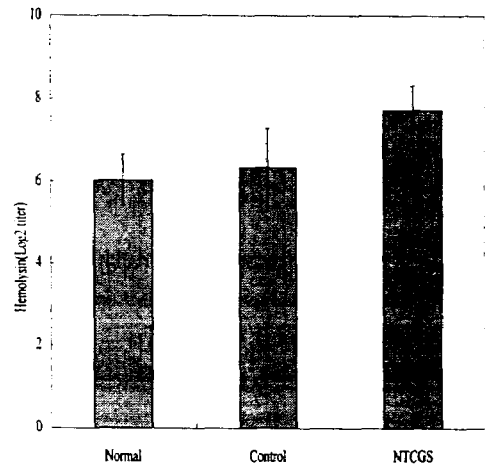
a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

Fig. 8. Effects of NTCGS on the hemolysin titer in the tumor bearing mice



Normal : Non-treated group

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2 α for 8 weeks

9. Carbon clearance에 미치는 效果

Carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 1분, 5분 후 採血하여 carbon의 濃度를 測定한 結果, 對照群에서는 T1(carbon 注入 후 1분)에서 $0.452 \pm 0.085(\mu\text{M})$, T2(carbon 注入 후 5분)에서는

0.349±0.062(uM)로 phagocytic index K가 0.028±0.019로 나타났다. 이에 비해 內托千金散加味方 投與群은 T1, T2에서 각각 0.367±0.057, 0.159±0.048(uM)로 시간에 따른 變化가 나타나 phagocytic index K가 0.090±0.018로 對照群에 비하여 有意性(p<0.05) 있게 增加하였다(Table IX).

Table IX. Effect of NTCGS on Phagocytic Index K in Balb/C Mice

Group	T1	T2	K
Control	0.452±0.065	0.349±0.052	0.028±0.019a)
NTCGS	0.367±0.057	0.159±0.048	0.090±0.018*

a) : Mean±standard error

Control : Saline treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2α for 8 weeks

NTCGS : Naetakchungumsankamibang(50mg/20g/day) treated group for 2 weeks after induction of tumor by MCA and PG-F2α for 8 weeks

* P-value : Statistical significance value compared with data of control group(P<0.05)

10. 淋巴球의 增殖 反應에 대한 效果

脾臟 免疫細胞에 대한 內托千金散加味方 投與群의 影響을 알아보기 위하여 [3H] thymidine uptake assay를 實施한 結果, 陰性 對照群(negative control)에서는 451.33±12.2(CPM)으로 나타났고, Con A를 處理한 良性 對照群(positive control)에서는 18150±2580 (CPM)으로 陰性 對照群에 비하여 큰 폭으로 有意性(p<0.001) 있게 增加하였고, 內托千金散加味方 投與群은 0.5mg/ml의 濃度에서 135967±4471(p<0.001)로 淋巴球 增殖效果를 나타내었다(Table X).

Table X. Effect of NTCGS on Proliferation of Splenocyte by Thymidine Uptake

Group	Conc.(mg/ml)	thymidine uptake
Negative Control		451.33±12.2a)
ConA	0.25	18150±2580***
NTCGS	0.25	9310±346*
	0.5	135967±4471***
	1.0	62533±1335**

a) : Mean±standard error

Negative Control : Non-treated group

ConA : Concanavalin A treated group

NTCGS : 0.5mg/ml Naetakchungumsankamibang treated group

* P-value : Statistical significance value compared with data of ConA treated group(*P<0.05, **P<0.01,***P<0.001)

11. 脾臟 免疫細胞에 대한 效果

In vitro에서 免疫細胞의 增殖을 誘導하는 濃度에서의 內托千金散加味方을 投與한 후 3일 동안 incubation하여 helper T cell, cytotoxic T cell, B cell과 macrophage의 population의 變化를 각 receptor의 marker를 이용하여 FACS로 分析한 結果, helper T 細胞에 있어서는 正常群은 12.05(% positive cells), 內托千金散加味方 投與群은 14.27, cytotoxic T 細胞에 있어서는 正常群은 5.12, 內托千金散加味方 投與群은 5.24, B 細胞에 있어서는 正常群은 11.75, 內托千金散加味方 投與群은 13.30으로 나타났으며, macrophage에서도 正常群이 38.26, 內托千金散加味方 投與群이 49.28로 有意性 있는 population 增加를 보였다 (Table XI).

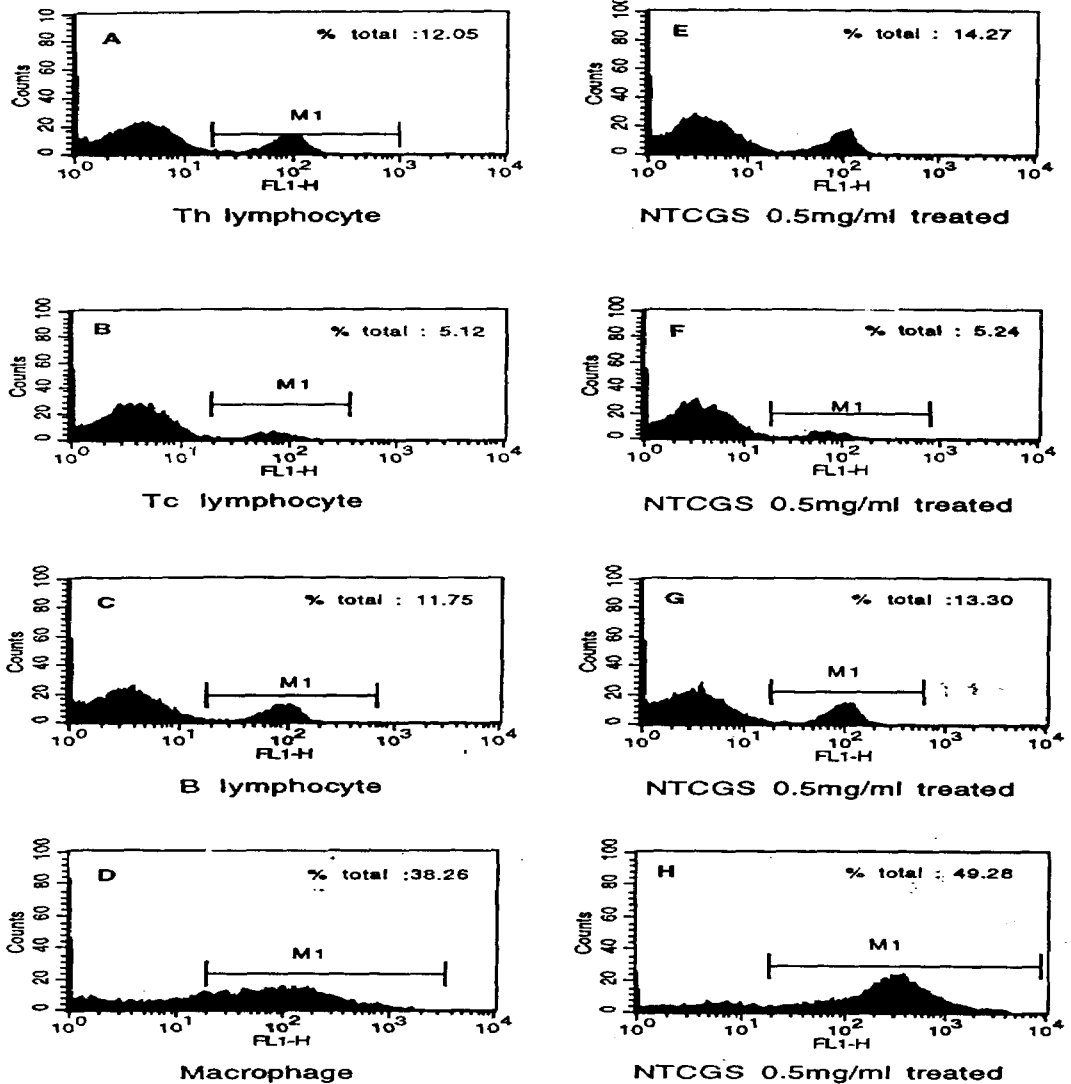
Table XI. Effects of NTCGS on Splenic Leukocyte of Balb/C Mice by FACS analysis

Group	% Positive cells			
	CD4	CD8	CD19	Mac-1
Normal	12.05	5.12	11.75	38.26
NTCGS	14.27	5.24	13.30	49.28

Normal : Non-treated group

NTCGS : 0.5mg/ml Naetakchungumsankamibang treated group

Fig. 9. Effects of NTCGS on Splenic Leukocyte of Balb/C Mice by FACS analysis



12. 大食細胞의 TNF- α 분비에 미치는 效果

Tumor necrosis factor인 TNF- α 는 LPS에 의해 刺戟된 mononuclear phagocytes에서 분비되는 cytokine으로써 antigen stimulated T 細胞와 活性化된 NK 細胞, 그리고 活性化된 mast cell에서 분비되는 物質으로써 先天的 免疫反應과 特異的 免疫作用에 중요한 매개체(mediator)이다. LPS 만을 처리한 對照群에서는 $136 \pm 5.7 \text{ pg/ml}$ TNF- α 를 분비하였고, 內托千金散加味方을 濃度別로 처리하였을 때 1 mg/ml 濃度에서 $137 \pm 3.4 \text{ pg/ml}$ 을 분비하여 상당히 效果적인 TNF- α 분비의 agonist로 作用하였음이 測定되었다(Table XII, Fig. 10).

Table XII. Effects of NTCGS on the secretion of TNF- α

Stimulus	ConC.(mg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Normal	-	$0.1 \pm 0.009a$
LPS	0.001	136 ± 5.7
NTCGS	0.25	43 ± 6.0
	0.5	69 ± 1.7
	1	137 ± 3.4

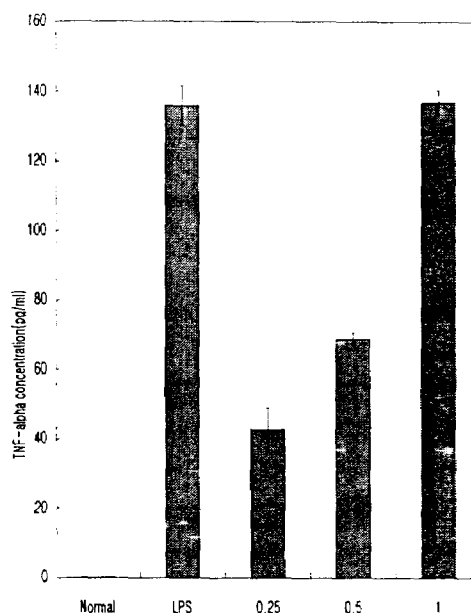
a) : Mean \pm standard error

Normal : Non-treated group

LPS : TNF- α stimulator

NTCGS : Naetakchungumsankamibang treated group for 48 hours

Fig. 10. Effect of NTCGS on the secretion of TNF- α . Spleen cell was cultured with LPS($1 \mu\text{g/ml}$) and NTCGS 0.25 (mg/ml) , 0.5 mg/ml . and 1.0 mg/ml . After 48 hours the cultured supernatant was collected.



IV. 考 察

腫瘍은 組織이 自律的으로 過剩的 成長을 하는 것으로 個體에 대해서 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 正常組織에 대해서 破壞的인 것으로¹⁻³⁾, 發生 原因은 發癌物質 등의 環境的 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 藥物, 放射線, 慢性刺戟, 스트레스 및 突然變異 등으로 人體의 免疫機能이 弱화 되면 癌細胞化된 非正常細胞를 破壞 除去하지 못하게 되어 發生하는 것으로 알려져 있다^{1,4-8)}.

皮膚에 發生하는 惡性腫瘍은 크게 基底細胞癌, 扁平上皮細胞癌, 惡性 黑色腫 등으로 크게 나눌 수 있다. 基底細胞癌과 扁平上皮細胞癌의 原因은 環境要因과 宿主要因으로 大別할 수 있는데 宿主要因으로는 年齡, 性, 白人, 日光에 의한 sunburn이 잦을 때, 放射線 皮膚炎, 火傷, 慢性 潰瘍, 특정의 傷處 및 遺傳疾患으로 색소성 건피증 등이 있으며, 環境要因으로는 태양광선의 노출(특히

UV-B선)이 가장 중요하다⁸⁴⁻⁸⁸⁾. 惡性 黑色腫은 表皮에 存在하는 色素細胞로부터 由來하는데 火傷을 일으킬 정도의 강도가 높은 紫外線이 決定的인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁸⁹⁾. 最近 全體 惡性 腫瘍 중 차지하는 比率이 2.4~4.4%로 계속 增加하는 趨勢에 있으며⁹⁰⁾, 특히 生活의 풍요로 여가시간의 대부분을 야외에서 보내는 경우가 많아졌고 産業化로 인한 지구의 오존층 파괴에 따라 皮膚癌 發生이 增加할 것으로 예견되므로⁹¹⁻⁹²⁾ 韓醫學의 治療 方法의 摸索이 필요하다고 생각된다.

臨床症狀에 있어 基底細胞癌은 表皮의 基底細胞 및 그 附屬器에서 發生하는 惡性腫瘍이나 轉移는 거의 일어나지 않으며, 單發 또는 수 개의 작은 丘疹으로 시작하여 表面에 血管擴張을 보인다. 丘疹은 서서히 커지면서 中心部는 陷沒되고 潰瘍과 痂皮를 形成하며, 시일이 경과하면 潰瘍의 주변부는 堤防 모양으로 약간 隆起되고 潰瘍은 잠식되어 주변부의 皮膚가 안으로 말려 들어가는 것 같은 특이한 모양을 나타낸다.

扁平上皮細胞癌은 表皮 角質細胞의 惡性 腫瘍으로 細胞의 角化傾向이 많고 주로 日光에 露出되는 皮膚 또는 粘膜에 好發하는데 正常的인 皮膚 위에 突然히 나타나는 것은 적고 表皮의 慢性 營養障 碍을 招來하는 先行 病變 위에 發生하는 경우가 많다. 처음에는 경계가 뚜렷하고 둥근 사마귀 같은 紅褐色 또는 皮膚色의 단단한 結節을 形成하게 되는데 基底細胞癌과는 달리 그 結節은 수개월 이내에 빨리 퍼져 나중에는 下部組織까지 浸潤하며 中心部에 潰瘍을 形成한다^{84-88,93-100)}.

惡性 黑色腫은 患者 10명 중 1명에서 家族歴이 發見되며 非典型的 mole, 거대한 크기 혹은 중간 크기 이하의 先天性 色素細胞性 母斑, 정상보다 많은 수의 色素性 母斑을 가진 사람, 免疫이 抑制된 경우에서 危險性이 높다. 臨床樣相에 있어 4가지 組織型으로 分類하는데 표재파종형 흑색종 (Superficial spreading melanoma), 악성 흑점양

흑색종(Lentigo maligna melanoma), 말단 흑점양 흑색종(Acral lentiginous melanoma) 등은 表在性으로 자라며 깊이 浸潤하지 않는 期間이 있어 外科的 切除로 完治가 可能하다. 그러나 結절성 흑색종(Nodular melanoma)은 처음부터 깊게 浸潤하는 型으로 早期에 轉移를 일으키며, 初期 病變의 70%에서 다양한 色素樣相과 色調에 變異가 나타난다. 악성흑점양 흑색종은 老人들에서 태양광선에 露出된 部位에서 發見되며, 표재파종형 흑색종은 주로 白人에서, 말단 흑점양 흑색종은 結절성 흑색종과 함께 黑人이나 東洋人에서 높 이 發生하는데 주로 손바닥, 발바닥, 손발톱 아래, 粘膜 등에서 發見된다^{84-86,101-102)}.

韓醫學에서 腫瘍에 대한 認識은 비교적 일찍부터 있었던 것으로 생각되는데 癌이라는 用語에 대한 記載는 宋代의 《衞濟寶書》^{19,103-104)}에서 最初로 記載되었으나 모든 新生物을 命名하기 보다는 腫塊의 形態, 位置, 特徵 및 症狀에 따라 다양한 名稱을 使用하였다⁹⁻¹⁶⁾. 그러므로 비록 癌이라는 名稱은 使用하지 않았으나 疾病의 特性上 癌의 範疇에 屬한다고 볼 수 있는 疾患에 대하여 《內經》¹¹⁻¹²⁾에서는 積聚, 息賁, 鼓脹, 石瘕, 腸覃, 伏梁, 厥疝, 昔瘤, 癰病, 癧聚 등의 病證名으로 說明하였고, 이후 여러 文獻^{9,13-19)}에서 癧瘕, 瘰癧, 反胃, 疝瘕, 石瘤, 痞塊, 癭瘤, 痞氣, 癰瘡, 舌菌, 失榮, 乳巖, 石疽, 癰疽, 血蠱, 息肉, 馬刀, 腎岩, 缺癧, 惡瘡 등이 現在의 癌과는 全적으로 일치하지는 않지만 腫瘍의 範疇에서 認識되고 있다. 특히 癰疽는 西洋醫學의 腫瘍性 疾患과 炎症性 疾患을 包括하는 概念으로 皮膚에 나타나는 腫瘍은 癰疽 중 “翻花瘡, 黑疔, 石疔, 失榮, 疔, 贅瘤, 黑痣, 惡瘡” 등이 이에 해당한다^{9,17,19-20)}.

翻花瘡과 關係되는 內容으로는 《諸病源候論》¹⁰⁵⁾에 “初生如飯粒, 其頭破則血出, 便生惡肉, ……凡諸惡瘡久不瘥者, 亦惡肉反出如反花形”라 하여 原因 및 瘡의 形態, 症狀에 대하여 言及하였고, 이

후 發病 原因에 대하여 諸家들은 多様な 說을 提示하였지만 크게 外因으로는 風毒¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾, 淫穢之毒¹⁰⁸⁾, 內因으로는 肝火血燥生風¹⁰⁹⁾, 穢氣入于腸胃¹¹⁰⁾, 肝腎二經濕熱¹¹¹⁾을, 不內外因으로는 色慾太過¹¹¹⁾ 등으로 發生하며 最近 文獻^{13,17,95-98)}에서는 濕痰與氣血凝結, 病久鬱而化火, 耗傷氣血, 陰虛內熱, 肌膚失養 등으로 發生한다고 하였다.

黑疔과 關係되는 內容으로는 《內經》〈生氣通天論〉¹²⁾에서 “膏粱之變, 足生大疔”이라 하여 最初로 記錄된 以後 疔瘡 또는 疔疽의 範疇에서 言及되어 왔다. 疔瘡은 外科領域에서 흔히 볼 수 있는 疾病으로 經過가 빠르고 全身 症狀이 비교적 심하며 뿌리가 깊어서 마치 못이 박힌 것 같은 형태를 나타내는 것으로 身體 어느 部位에나 發生될 수 있으나 一般的으로 顔面과 四肢에 好發한다¹¹¹⁻¹¹²⁾. 疔瘡의 病名은 發生部位와 그 形象에 따라 顔面疔瘡, 手足疔瘡, 紅絲疔, 蛇眼疔 등 多樣하게 表現되고 있지만 《中藏經》¹¹³⁾에서 言及한 五疔과 《千金方》¹¹⁴⁾에서 言及한 13疔으로 要約할 수 있으며, 이후 55種¹¹⁵⁾의 疔瘡으로 細分化 되었다. 華 등^{65,111,113-114,116)} 歷代 醫家들은 疔을 五色으로 區分하여 五臟에 配屬시켜 說明하였으며, 그 發生 原因으로는 喜怒憂思, 衝寒冒熱, 恣飲醇酒, 多嗜甘肥, 毒魚酢醬, 色慾過度 등으로 인한 毒邪가 臟腑에 浸漬되어 發生한다고 하였는데 五疔 중 하나인 黑疔은 腎經에 毒邪가 侵犯하여 耳竅와 胸腹 및 腰背部에 黑色의 斑과 紫色의 泡가 나타나며 점차 皮膚와 肌肉을 損傷시킨다고 하였다.

最近 顧 등^{13,16-17,117)}은 全體 皮膚癌을 翻花瘡의 範疇에서 言及하면서 具體的으로는 西洋醫學의 基底細胞癌과 扁平上皮細胞癌과 類似하다고 하였고, 余 등^{9,20,118)}은 黑疔, 黑痣, 惡瘡을 惡性 黑色腫으로 分類하였으며, 李 등^{17,96,119)}은 惡性 黑色腫을 厲疽나 脫疽의 範疇에 屬한다고 하였다. 이는 皮膚癌 發生時 腫瘍의 形態나 部位 및 特徵에 따라 다양한 韓方의 疾患名을 使用한 結果로 皮膚癌 중 基

底細胞癌과 扁平上皮細胞癌은 翻花瘡에, 惡性 黑色腫은 黑疔의 範疇에 屬한다고 思料된다.

現在 癌에 대한 治療法으로 西洋醫學에서는 手術療法, 放射線療法, 抗癌化學療法, 免疫療法 및 遺傳子療法 등을 중심으로 單獨 또는 다른 療法과 並行하여 治療하고 있다. 癌細胞가 原發臟器나 局所 淋巴節에만 局限되어 있는 1·2期 癌일 때에는 局所的 療法인 手術療法과 放射線療法을, 3·4期 癌일 경우 全身療法으로 化學療法과 免疫療法을 使用하고 있다. 그러나 手術療法은 轉移된 腫瘍의 治療가 어려운 限界點을 가지고 있고, 放射線 治療는 全身性 轉移 腫瘍의 경우에는 治療의 限制性이 있으며, 化學療法은 化學製劑의 腫瘍에 대한 選擇性, 正常細胞에 대한 毒性作用이 問題點으로 指摘되고 있다. 또한 全身療法인 免疫療法도 現在로서는 治療方法이 완전히 定立되지 않은 常態이다.^{1,4,6,120-124)}

따라서 이제까지의 研究들은 주로 강한 細胞毒性을 갖는 物質들의 探索에 主力하였으나, 最近에는 抗癌作用은 弱하지만 正常細胞에 毒性이 적은 物質의 探索 또는 既存 抗癌劑와 併用하여 抗癌作用을 增強시키고 正常細胞에 대한 毒性을 減少시킬 수 있는 方法들에 대해 研究가 進行되고 있다¹²⁵⁻¹²⁶⁾.

韓醫學에서는 疾病의 發生 및 進行을 크게 人體 內部的 正氣와 病因이 되는 邪氣와의 關係로 認識하였는데, 正氣가 強할수록 邪氣에 대한 抵抗力이 強化되어 비록 邪氣가 侵犯하여도 正氣가 이를 防禦하고 正氣가 弱하면 邪氣에 대한 對處能力이 低下되어 쉽게 發病하게 된다고 하여 正氣를 매우 重視하였다¹²⁷⁻¹²⁸⁾. 正氣는 病邪로부터 人體를 護衛하거나 病邪와 抗爭하는 生命活動의 原動力으로 臟腑, 經絡, 營衛氣血의 正常的인 生理功能을 包括하며, 邪氣는 모든 病因素의 總稱으로 六淫之邪나 機體內의 陰陽(臟腑, 經絡, 營衛氣血을 包括함)失調에 의한 病理改變(虛證), 病理產物(瘀血, 痰飲)

等の 病邪가 모두 邪氣에 屬한다고 볼 수 있다¹²⁹⁻¹³¹⁾. 이는 體外로부터 侵入하는 微生物이나 同種의 組織, 體 내에서 생긴 불필요한 産物 등을 非自己的 抗原으로 認識하여 이를 排除함으로써 個體의 恒常性を 維持하는 免疫機能과 類似하며¹³²⁾, 自己와 非自己的 相反反應인 免疫反應은 正氣와 邪氣가 서로 싸워서 나타나는 現象, 즉 “正邪抗爭”으로 表現할 수 있다^{131,133)}.

韓醫學에서 癌의 治療는 益氣養血, 健脾益氣, 養陰生津, 補肝益腎, 健脾益腎 등 人體의 抗病 能力을 增進시키는 扶正培本法과 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消癥, 理氣消腫 등 癌細胞를 직접 攻擊하는 祛邪法 및 이 두 가지 方法을 配合한 扶正祛邪法 등으로 區分할 수 있다²¹⁻²⁷⁾. 또한 全身의 情況과 病情에 따라 攻法爲主, 攻補兼治, 扶正爲主로 하는 治療法과 初期에는 攻法爲主, 中期에는 攻補兼法, 末期에는 先補後攻法 등의 治療原則이 活用되고 있다¹³⁴⁻¹³⁵⁾. 扶正과 祛邪는 患者의 體力과 疾病의 樣相에 따라 어느 것을 爲主로 하느냐 하는 차이가 있을 뿐 “扶正祛邪”로 要約되는 癌 治療法은 免疫力를 增進시켜 癌細胞의 成長을 抑制하는 腫瘍免疫學的 治療法과 類似성을 갖고 있다²⁸⁻²⁹⁾.

最近의 研究 動向을 살펴보면 각종 韓藥 抽出物의 癌細胞 殺傷作用^{30,31-35)}과 發癌能 抑制作用³⁶⁾을 비롯한 腫瘍細胞에 대한 직접적인 抑制效果, 抗轉移^{30,49-51)}, methotrexate³⁷⁻⁴⁰⁾나 cyclophosphamide⁴¹⁻⁴³⁾, 抗癌劑⁵²⁻⁵⁴⁾ 및 放射線 治療의 副作用을 抑制하는 實驗的 研究⁴⁴⁻⁴⁸⁾가 활발히 進行되고 있으며, 癌 治療時 既存 抗癌劑와의 併用治療가 骨髓의 造血機能障礙, 臟器損傷, 脫毛, 皮膚異常 등 抗癌劑의 副作用, 正常 細胞에 대한 毒性作用, 化學製劑의 選擇的 作用과 免疫能低下 등을 減少시킬 수 있고 單獨 治療時보다 더욱 좋은 抗癌效果가 있음이 報告되고 있다^{34,55-58,136-146)}. 따라서 腫瘍治療에 있어서 東西醫學이 서로의 長點을 取하고 短點을 補完해 줌으로써, 즉 韓醫學

의 扶正(免疫)과 西洋醫學의 祛邪(抗癌)의 治療方法이 서로 結合할 때 보다 效果的인 治療法이 開發될 수 있을 것으로 思料된다.

本 實驗에서 選用한 內托千金散은 清代 陳⁶⁵⁾의 《外科正宗》에서 “治腦疽發背諸毒惡瘡, 已成不消者, 服之易潰.”라 하여 記載된 處方으로 補氣補血하는 人蔘 黃芪 當歸 川芎 白芍藥 肉桂 甘草와 清熱解毒降火하는 金銀花 天花粉, 發散風濕하는 防風 白芷, 活血通絡하는 乳香 沒藥으로 構成되어 있다. 構成藥物의 實驗的 抗癌研究로 人蔘은 細胞性 및 體液性 免疫反應을 增進시키고 肝癌을 비롯한 多樣한 癌株에 抗癌活性이 있음이 報告되었고¹⁴⁷⁻¹⁵¹⁾, 黃芪는 그 多糖質이 免疫 調節劑의 效果가 있어서 抗腫瘍 作用이 있는 細胞因子를 活性化시키며 NK와 LAK 細胞의 殺傷作用을 增進시켜 肺癌, 海綿狀血管腫, 鼻咽癌 등에 使用되며^{147-149,152-155)}, 當歸는 免疫增強效果와 여러 藥物과 配合하여 多樣한 癌에 基本藥으로 使用된다^{147-148,152)}. 甘草는 消化器 腫瘍에¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾, 桔梗은 肺癌, 咽喉癌 등 呼吸器 腫瘍에¹⁴⁷⁻¹⁴⁸⁾, 天花粉은 絨毛膜上皮癌, 乳腺癌, 胃癌, 肺癌 등에¹⁴⁸⁻¹⁴⁹⁾, 金銀花는 鼻腔腺癌, 乳腺癌, 子宮頸癌 등에^{70,148-149)} 使用된다. 加味된 白花蛇舌草는 肺癌, 食道癌, 胃癌, 直腸癌 등 各種 癌에 使用되며^{66-67,147-149,156)}, 仙鶴草는 NK 細胞를 活性化 시키고 肺癌, 食道癌, 消化器 腫瘍 등에 使用되고^{69,147,149)}, 魚腥草는 細胞性 및 體液性 免疫反應과 NK 細胞를 增加시키고 癌細胞에 대한 抗轉移 效果가 있으며 扁桃腺癌, 肺癌, 絨毛膜上皮癌 등에 使用되고 있다^{68,70-71,147-149)}.

그러므로 本 處方은 攻補兼治하는 治療法, 특히 益氣養血을 위주로 한 扶正祛邪法에 해당한다고 볼 수 있음으로 抗癌 效果 및 免疫增進에도 効果적일 것으로 思料되어 癰疽뿐만 아니라 皮膚의 惡性腫瘍에도 應用할 수 있을 것으로 기대되었다.

이에 著者는 內托千金散에 이미 抗癌效果가 있는 것으로 報告된 白花蛇舌草⁶⁶⁻⁶⁸⁾, 仙鶴草⁶⁸⁻⁶⁹⁾, 魚

腥草^{68,70-71})를 加味한 內托千金散加味方이 3-MCA로 誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響을 檢索하고자 SK-MEL-2 癌株에 대한 細胞毒성을 觀察하였고, 化學的 發癌劑인 3-methylcholanthrene를 이용해 생쥐의 背部 皮膚에 皮膚癌을 誘發시켜 腫瘍의 개수를 測定하였으며, 免疫反應에 미치는 影響을 알아보기 위하여 白血球數, 血小板數, 赤血球數, Plaque forming cell, 赤血球 凝集素價, 赤血球 溶血素價, Carbon clearance에 의한 食食能, 淋巴球 增殖 反應과 脾臟 免疫細胞의 變化, TNF- α 등을 觀察하였다.

本 實驗에서는 內托千金散加味方の 腫瘍細胞에 대한 增殖抑制作用을 觀察하고자 SK-MEL-2 癌株를 對象으로 癌細胞 成長抑制를 測定하는 SRB法⁷²⁻⁷³)을 使用하여 細胞毒성을 測定하였는데 對照群에 비해 1mg/ml의 高濃度에서만 20% 以上 癌細胞 成長을 抑制하였다(Table I, Fig. 1). 또한 皮膚癌 發生에 미치는 效果를 觀察하고자 化學的 發癌劑인 3-methylcholanthrene를 使用하여 생쥐의 背部 皮膚에 皮膚癌을 誘發시키고 發生 개수를 測定한 結果 內托千金散加味方 投與群의 경우 4.95 ± 0.98 개로 減少하여 對照群에 비해 有意性 있는 細胞毒성을 나타내었다(Table II, Fig. 2).

3-methylcholanthrene와 prostaglandin-F 2α 를 塗布하여 皮膚癌이 3개 이상 誘發된 생쥐에 대한 血液學的 檢査에서는 癌 形成에 밀접한 관련이 있는 白血球 數, 血小板數 및 赤血球 數値를 測定하였다. 白血球는 藥物中毒, 急性 出血, 急性 溶血, 腫瘍增殖 등에서 그 數가 增加하고 바이리스 感染, 化學療法, 血液疾患, 自家免疫疾患 등에서는 減少하여 各種 血液疾患의 診斷과 腫瘍治療의 指標로 活用되는데¹⁵⁷⁻¹⁵⁹), 本 實驗에서는 異常으로 증가된 對照群에 비하여 정상 수준으로 減少되었다(Table III, Fig. 3). 血小板數는 血液 疾患과 더불어 惡性腫瘍, 炎症性 疾患, 藥物 등의 影響으로 變化하며 骨髓機能이 亢進되거나 抗癌劑나 放射線

治療 후에 減少되는데¹⁵⁷⁻¹⁵⁹), 最近 Yong 등¹⁶⁰)은 癌細胞가 血小板의 凝集을 促進하고 癌患者에서 자주 血小板減少症이 發生하는 것으로 보아 血小板 數値의 變化 역시 癌의 診斷 및 治療의 指標로 使用되는데, 本 實驗에서는 對照群에 비해 有意性 있는 增加效果를 나타내었다(Table IV, Fig. 4). 또한 赤血球數는 모든 疾患에 가장 기본적인 측정 항목의 하나로, 임상적으로 赤血球의 減少는 白血病, 骨髓腫, 再生不良性 貧血 등과 같이 造血機能이 低下된 경우나 出血 등에서 나타날 수 있는데, 本 實驗에서는 對照群에 비해 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化는 없었다(Table V, Fig. 5).

生體의 防禦作用은 特異的 免疫反應과 非特異的 免疫反應으로 大別할 수 있는데 特異的 免疫反應은 細胞性 免疫反應과 體液性 免疫反應으로 나눌 수 있다^{4,161}). 細胞性 免疫反應은 주로 T 淋巴球에 의해 이루어지며 경우에 따라서는 T 細胞나 B 細胞가 아닌 淋巴球, 多形核白血球, 大食細胞 등에 의하여 이루어진다. 體液性 免疫反應은 抗原特異的 分子인 抗體에 의하여 이루어지며 細胞보다는 血清內에 存在하며 身體 各 部位에 傳達된다. 이러한 抗體는 T 細胞의 도움을 얻어 B 細胞에 의해 抗體가 形成되며^{4,132,162}), 抗體는 細菌毒素, 細菌表面의 抗原 등과 結合하여 大食細胞에 의하여 食食되게 하거나 補體에 의해 溶解되기 쉽게 만든다³). 이러한 體液性 免疫反應을 測定하고 抗體生産能을 비교하기 위하여 가장 쉽게 抗體의 力價를 측정하는 방법으로 plaque forming cell, 赤血球 凝集素價 및 赤血球 溶血素價를 測定하는 方法이 있다.

Plaque forming cell(PFC)는 體液性 免疫反應을 測定하는 방법으로 脾臟이나 淋巴結에 定着할 때 IgM, IgD가 共存한 상태의 B 細胞가 抗原刺戟을 받으면 IgM, LgG, IgA의 免疫 글로블린을 生成하는 抗體生産細胞로 分化한다. PFC의 測定法은 緬

羊赤血球로 免疫시킨 動物細胞를 過剩의 緋羊赤血球와 補體를 혼합하여 배양하면 抗體生産細胞는 免疫 글로블린을 放出하고 이것이 주위의 赤血球와 붙는데 여기에 補體가 結合하면 주위에 抗體가 붙은 赤血球는 溶解되고 赤血球가 없어진 plaque가 각 抗體生産細胞를 감싼다. 이러한 방법으로 얻어진 plaque는 IgM이 효과적으로 溶血을 일으키므로 주로 Ig 生産細胞를 보이는데^{4,132}, 本 實驗에서 PFC數를 測定한 結果 對照群은 2.96 ± 0.53 개인데 비해 內托千金散加味方 投與群은 3.78 ± 0.37 개로 對照群에 비해 증가하여 有意性($P < 0.05$)이 認定되었다 (Table VI, Fig. 6).

赤血球 凝集素價의 測定法은 赤血球 表面 抗原과 그에 대한 抗體가 反應하여 赤血球가 凝集을 일으키는 것을 指標로 하여 可溶性 抗原에 대한 抗體를 確認하기 위한 方法이며, 赤血球 溶血素價의 測定法은 赤血球 表面抗原과 抗體의 結合體에 異種의 補體가 加해짐으로써 생기는 溶血反應을 觀察하는 方法이다¹³². 本 實驗에서 抗原刺戟에 대한 抗體形成能을 보기 위하여 赤血球 凝集素價를 測定한 結果 對照群에 비해 內托千金散加味方 投與群의 경우는 6.94 ± 0.52 (log₂ titer)로써 增加效果를 나타내었으나 有意性은 없었다(Table VII, Fig. 7). 또한 赤血球 溶血素價를 測定한 結果 對照群에 비해 增加效果를 나타내었으나 有意性은 없었다 (Table VIII, Fig. 8).

非特異的인 免疫反應의 하나로 食食作用과 抗原 提供細胞로서의 역할뿐만 아니라 腫瘍에 대하여 細胞毒성을 일으키는 大食細胞¹⁶³의 活性度를 비교해 보기 위하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon을 注射하여 carbon clearance를 측정한 結果 對照群에서는 phagocytic index K가 0.028 ± 0.019 인데 비해 內托千金散加味方 投與群은 0.090 ± 0.018 로 對照群에 비해 有意性 있는($p < 0.05$) 增加效果를 나타냈다(Table IX).

淋巴球는 末梢血液 白血球 중 正常에서는 약 20%를 차지하며 機能上 대개 T 淋巴球, B 淋巴球 및 null 細胞로 分類하고 있는데¹⁶⁴, 현재 腫瘍免疫은 주로 T 淋巴球 細胞에 의한 細胞性 免疫反應으로 알려져 있다. 淋巴球 增殖能의 측정은 淋巴球에 대한 免疫增強效果를 간접적으로 파악할 수 있는 免疫指標로 抗原 非特異的 刺戟에 의해서 IL-2 依存性 T 淋巴球 및 B 淋巴球의 增殖이 발현된다고 하여 淋巴球 增殖能의 增加는 淋巴球의 活性 增加나 數의 增加로 간주하는데¹⁶², 本 實驗에서는 [3H] thymidine uptake assay를 實施한 結果 陰性 對照群(negative control)에 비해 Con A를 處理한 良性 對照群(positive control)과 內托千金散加味方 投與群 모두 有意性 있는 增加를 보였다(Table X).

最近에는 淋巴球系 細胞의 表面抗原을 特異적으로 認識하는 단클론항체를 이용하여 T 淋巴球를 다시 助力/誘發(helper/inducer, CD4+) 細胞와 抑制/細胞 傷害(suppressor/cytotoxic, CD8+) 細胞로 分類하고 있는데, CD4+ 細胞는 抗原을 B 淋巴球에 傳達하여 抗體 生成을 誘發시키는 機能이 있고, CD8+ 細胞는 癌細胞와 같은 非正常的인 細胞를 直接 除去할 수 있는 機能이 있는 것으로 報告되고 있다¹⁶⁵. 이에 準하여 本 實驗에서는 流細胞 分析機(FACS)에 의한 脾臟內의 免疫細胞 變化를 觀察하였는데 Table XI에서 보는 바와 같이 內托千金散加味方 投與群에서는 對照群에 비해 T helper cell, B cell, macrophage가 모두 有意性 있게 活性 增加를 보여 內托千金散加味方이 免疫細胞 모두에서 効果적인 活性 增加 作用이 있음을 알 수 있었다.

T helper cell(Th)은 두 종류로 나뉜다. IL-2, IL3, IFN- γ 를 분비하는 Th1 type과 IL-4, IL-5, TNF- α 를 분비하는 Th2 type이 있는데, 外部의 刺戟에 의해 活性化된 T 細胞는 Th2 type으로부터 TNF- α 가 분비되고 TNF- α 는 大食細胞의

NOS(nitric oxide synthase)를活性化시켜大食細胞로부터 NO를 분비하도록誘導하는데¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾, 本實驗의 結果 內托千金散加味方을 腹腔細胞에 1mg/ml 濃度로 처리하였을 때 對照群인 TNF- α 의 分比 活性劑로 報告된 LPS가 136 \pm 5.7pg/ml 濃度로 分비된 것과 비교하여 內托千金散加味方 投與群은 137 \pm 3.4 pg/ml 濃度로 分비되어서 매우 效果的으로 T helper cell의 活性化를 誘導하였음을 알 수 있었다(Table XII, Fig. 10).

以上の 實驗結果를 綜合하면 內托千金散加味方은 SK-MEL-2 癌株에 대한 細胞毒性和 化學的 發癌劑인 3-MCA로 誘發된 皮膚癌에 대하여 抗腫瘍效果를 나타내었으며, 免疫反應에서는 TNF- α 에 의해 活性化된 T 임파구에 의한 細胞性 免疫反應과 大食細胞의 活性度를 촉진하였지만 體液性 免疫反應은 PFC를 제외한 赤血球 凝集素價 및 溶血素價에서는 뚜렷한 效果가 없었다. 그러므로 內托千金散加味方은 免疫調節作用을 통해 抗癌效果를 나타내는 것으로 보아 皮膚癌 등에도 活用할 수 있을 것으로 보이지만, 臨床 및 實驗의 補充 研究가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

內托千金散加味方이 3-MCA로 誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響을 檢索하고자 SK-MEL-2 癌株에 대한 細胞毒성을 觀察하였고, 化學的 發癌劑인 3-methylcholanthrene을 이용해 誘發된 皮膚癌에 內托千金散加味方을 2週間 投與하여 發生하는 腫瘍의 개수를 測定하였으며, 免疫反應에 미치는 影響을 알아보기 위하여 白血球數, 血小板數, 赤血球數, plaque forming cell, 赤血球 凝集素價, 赤血球 溶血素價, carbon clearance에

의한 貪食能, 淋巴球 增殖 反應과 脾臟 免疫細胞의 變化, TNF- α 등을 測定하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 皮膚癌株인 SK-MEL-2 에 대해서 高濃度인 1mg/ml 濃度에서만 20% 以上の 細胞 成長을 抑制하였다.

2. 3-MCA에 의해서 誘發된 皮膚癌에 대한 效果에서는 有意性 있는 減少效果를 나타내었다.

3. 血液學的 變化에서 白血球數는 對照群에 비하여 有意性 있게 減少하였다.

4. 血小板數는 對照群에 비하여 有意性 있게 增加하였다.

5. 赤血球數는 對照群에 비하여 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다.

6. PFC에 미치는 效果에서는 有意性 있게 增加하였다.

7. 赤血球 凝集素價에 미치는 效果에서는 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다.

8. 赤血球 溶血素價에 미치는 效果에서는 增加效果를 나타내었으나 有意性 있는 變化가 없었다.

9. Carbon clearance에 미치는 效果에서는 有意性 있게 增加하였다.

10. 淋巴球 增殖效果에서는 0.5mg/ml의 濃度에서 有意性 있게 增加하였다.

11. 脾臟 免疫細胞에 대한 效果에서 helper T cell, B cell과 macrophage가 有意性 있게 增加하였다.

12. 大食細胞의 TNF- α 분비에 미치는 效果에서 1mg/ml의 濃度에서 有意性 있게 增加하였다.

以上的 結果를 보아 內托千金散加味方은 皮膚癌에 대한 抗癌活性 및 免疫調節作用을 나타내어 皮膚癌 治療에 活用 可能할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 서울대학교 醫科大學 : 腫瘍學, 서울, 서울대학교 出版部, pp.1-3, 86-87, 225-234, 1993.
2. 金昌種 : 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp. 72-74, 1988.
3. 大韓病理學會 : 病理學, 서울, 高文社, pp.183-185, 196-197, p.201, 225, pp.229-234, 239-244, 250-254, 265-267, 1998.
4. 서울대학교 醫科大學 : 免疫學, 서울, 서울대학교 出版部, pp.2-3, 152-153, p.251, 257, pp.303-310, 1993.
5. 이대일, 최종상 : 病理學概論, 서울, 新光出版社, p.29, pp.35-36, 1987.
6. 李文鎬 外 : 內科學(下卷), 서울, 博愛出版社, pp.2458-2460, 2524-2528, 1976.
7. Bridges BA : Short-term screening tests for carcinogens. Nature 261:195-200, 1976.
8. Heidelberger C : Chemical carcinogenesis. Ann Rev Biochem 44:79-121, 1975.
9. 余朋千, 睢文發 : 實用中西醫腫瘤治療大全, 重慶, 重慶大學出版社, pp.2-15, p.19, pp.86-87, 399-400, 1995.
10. 厲暢 : 癌의 中醫治療, 東洋醫學, 18(1) : 56-63, 1992.
11. 河北醫學院 : 靈樞經校釋, 北京, 人民衛生出版社, 上卷 p.78, 219, 下卷 p.37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.
12. 王洪圖 : 黃帝內經素問, 春秋出版社, p.71, 237, 271, 1988.
13. 顧佰華 外 : 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.148-149, 552-553, 1985.
14. 黃文東 等 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.486-493, 621-623, 627-634, 1988.
15. 賈堃 : 癌瘤中醫防治研究, 西安, 陝西科學技術出版社, pp.1-3, 1988.
16. 上海中醫學院 編 : 中醫外科學, 香港, 商務印書館, p.302, pp.317-318, 325-327, 1982.
17. 李家庚 外 : 中醫腫瘤防治大全, 北京, 科學技術文獻出版社, pp.1-7, 185-194, 1994.
18. 金定濟 : 東醫臨床要覽, 서울, 書苑堂, pp. 253-254, 1981.
19. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學出版社, pp.1-10, 1991.
20. 陳貴廷 外 : 實用中西醫結合診斷治療學, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.1220-1221, 1991.
21. 孟琳升 外 : 中醫治癌大成, 北京, 北京科學技術出版社, pp.111-112, 122-143, 232-233, 1995.
22. 郭瑞林 : 扶正祛邪與腫瘤免疫, 實用中西醫結合雜誌, 4(4):205-208, 1991.
23. 邢雪梅 : 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況, 한글판 中醫雜誌, No.3. pp.85-90, 1994.
24. 楊今詳 : 臨床抗癌中草藥, 서울, 成輔社, p.340, 1990.
25. 李岩 : 腫瘤學, 北京, 人民衛生出版社, pp.

- 2-5, 1985.
26. 錢伯文 : 腫瘤的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.10-15, 1983.
27. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 7:33-34, 1992.
28. 金鍾烈, 金又重 : 東西醫學 比較研究, 서울, 癸丑文化社, pp.31-36, 41-44, 1994.
29. 정태호 : 免疫學講義, 大邱, 慶北大學校出版部, pp.293-303, 309-311, 1993.
30. 康坵林 : 數種 韓藥劑의 抗癌活性 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 3(2), pp.315-321, 1995.
31. 노훈정 외 : 消積保中丸의 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):43-56, 1996.
32. 오천식 외 : 靈芝 山慈 仙鶴草 卷柏 瓦松이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10:99-115, 1987.
33. 윤성목 외 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):25-42, 1996.
34. 李鳳雨 외 : 防毒湯의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 15(1):263-280, 1994.
35. 조성각 외 : 修治巴豆 및 巴豆加黃連의 細胞毒性과 抗腫瘍效果에 대한 實驗的 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):191-210, 1995.
36. 하대유 외 : 고려인삼이 3-Methylcholanthrene의 발암능에 미치는 영향, 대한의학협회지, 27(6):541-552, 1984.
37. 고정석 외 : 人蔘水銀이 Methotrexate를 誘發한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 11:37-54, 1988.
38. 권현 외 : 淸離滋坎湯 및 淸離滋坎湯加味方이 肺損傷과 免疫機能에 미치는 影響에 관한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 15:5-28, 1992.
39. 김성수 외 : 人蔘 및 熟地黃이 Methotrexate로 誘發된 생쥐의 免疫反應 低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 9:355-366, 1986.
40. 최평락 외 : 鹿茸이 Methotrexate로 誘發된 免疫低下에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 10:589-604, 1987.
41. 장중식 외 : 蔘茸湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 의한 副作用 減少에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 13(1):313-323, 1992.
42. 이수진 : 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1993.
43. 이성래 외 : 鹿血生化湯이 마우스의 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14:85-130, 1991.
44. 崔昇勳 : 放射線 照射後의 N:GP(S) mouse 脾臟細胞增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 第1回 東洋醫學 國際심포지움論文集, pp.110-239, 1995.
45. 李綾基 : 數種 韓藥劑가 생쥐의 骨髓 및 脾臟細胞의 造血促進과 放射線 防禦에 미치는 影響, 慶熙大學校論文集, 19(2):157-173, 1996.
46. 金東熙 : 加味地黃湯, 加味四君子湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性과 放射線 副作用 減少效果, 大田大學校 大學院, 1998.
47. 朴陽春 : 加味沙蔘麥門冬湯이 抗癌活性和 放射線 副作用 抑制效果에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1999.
48. 金正洙 외 : 蔘茸扶正湯의 放射線 照射로 損傷된 組織 恢復 및 造血促進 效果, 大韓韓方腫瘍學會誌, 3(1):129-147, 1997.

49. 고광석 外 : 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 關한 研究, 東醫病理學會誌 9, pp.1-20, 1994.
50. 서울大學校 天然物科學研究所 篇 : 傳統東洋醫學研究 및 新東醫藥開發, pp.166-201, 1995.
51. 윤재호 외 : 十全大補湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 4(1): 131-146, 1998.
52. 孫甲鎬 外 : 柴胡 茵陳의 肝癌細胞에 대한 抗癌活性 및 抗癌劑와의 相乘效果, 大韓韓醫師協會誌, 16(2), pp.414-432, 1995.
53. 안희진 : 사물탕의 항암제 부작용 억제에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 석사학위논문, 1995.
54. 유경대 외 : 君理湯加減方이 抗腫瘍 免疫反應과 抗癌劑로 誘發한 副作用에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 4(1):71-87, 1998.
55. 鄭鎭鴻 : 蓬莪茂丸 煎湯液과 抗癌劑 併用投與時 子宮癌 細胞에 미치는 效果, 大田大學校 大學院, 博士學位論文, 1993.
56. 曹賢珠 외 : 逍遙散加味方이 抗癌化學療法劑의 抗腫瘍效果 및 腫瘍細胞의 lysosomal enzymes에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 18(2):119-136, 1997.
57. 安文生 : 抗癌劑 Mitomycin C와 數種 補益劑의 併用投與 效果에 대한 研究, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1992.
58. 안석원 : 인체 만성골수성 백혈병 세포 (K562)에 미치는 우황과 각 항암제의 병용 투여 효과, 대전대학교 대학원, 석사학위논문, 1993.
59. 李鍾律 : 3-MCA 誘發 上皮腫에 대한 海藻玉壺湯과 昆布의 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1998.
60. 金倫範 : 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 香貝養榮湯과 貝母單味劑가 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):191-210, 1995.
61. 임사비나 외 : 3-methylcholantrene 皮膚癌에 대한 刺鍼部位別 抗癌 및 免疫增強效果, 慶熙韓醫大論文集, 16:149-179, 1993.
62. 金喜澤 : 清熱消毒散加蟾酥가 皮膚癌細胞 (A431)에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 碩士學位論文, 1995.
63. 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, 9(1):1-15, 1996.
64. 朴惠峻 외 : 八物湯이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 效果, 大韓韓醫學會誌, 19(1):327-338, 1998.
65. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.93, pp.224-225, 1989.
66. 金聖勳 : 白花蛇舌草로부터 分離된 抗癌性物質에 關한 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 4(2):273-297, 1996.
67. 金聖勳 : 白花蛇舌草로부터 分離한 ursolic acid의 自然殺害效果와 抗轉移作用, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 5(2):523-533, 1997.
68. 金聖勳 외 : 항암활성 수종생약의 B16-Fo와 A549 암세포에 대한 항전이 효과(I), 大韓韓醫學會誌, 17(1):111-131, 1996.
69. 梁緒賢 外 : 靈芝·山慈菇·仙鶴草·卷柏·瓦松이 흰쥐의 自然殺害細胞에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 10(2):103-114, 1989.
70. 鄭鉉雨 外 : 金銀花 및 魚腥草가 人體 癌細胞株에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 10(1):126-132, 1996.
71. 吉永星 外 : 魚腥草 및 桑菊飲이 免疫機能에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 16(1): 295-318, 1995.

72. Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. : Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, p.2418, 1989.
73. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., Mc Mahon, J.D., Vistica, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82(13), 1107-1112, 1990.
74. National Cancer Institute, Cell Culture Screen, KB, Protocol 1600, Cancer Chemother. Res., (part 3), 3, p.17, 1972.
75. Spjut, R.W. and Perdue, R.E. : Plant folklore, a tool for predicting sources of antitumor activity, Cancer Treat. Rep., 60, p.979, 1966.
76. 정현택 외 : 3-Methylcholanthrene에 의하여 유발된 腫瘍 마우스의 면역적혈구에 대한 면역반응, 대한면역학회지, 1(1):35, 1979
77. Berenblum, I : The carcinogenic action of croton resin, Cancer Res., 1:44, 1944
78. Friedls Wald, W.F. and Rous, P : The initiating and promoting elements in tumor production, An analysis if the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin, J. Exp. Med., 80:101, 1944
79. Ha, T.Y. : Experiments on cancer producing substances, Brit. Med. J., 2:1, 1925
80. Lupulescu, A. : Enhancement of carcinogenesis by prostaglandin in male albino swiss mice. J. Natl. Cancer Inst., 61:97, 1978
81. 金井泉 外 : 臨床検査法提要, 서울, 高文社, p242, 298, 303, 1111, 1149, 1984.
82. Zaalberg O.B. : A simple method for detecting single antibody forming cells, Nature., 202:1231, 1964.
83. Thorbecke, G. J. et al. : The affinity of the reticulo-endothelial system to various serum proteins, Brit. J. Exp. Path., 41(2):190, 1979.
84. 해리슨 내과학 편찬위원회 : 내과학, 서울, 도서출판 정담, pp.2019-2022, 1997.
85. 曹珖鉉, 李惟信 : 皮膚惡性腫瘍, 서울, 麗文閣, p.3, 6, pp.55-56, 77-78, p.93, 1992.
86. 대한피부과학회 간행위원회 : 피부과학, 서울, 麗文閣, pp.277-279, 1992.
87. KWA RE : Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. J Am Acad Dermatol 26:1, 1992.
88. Aubry F, et al : Risk factors of squamous cell carcinoma of the skin. Cancer 55:907, 1985.
89. Mallory S.B., Watts J.C.: Sunburn, sun reactions and sun protection, Pediatr. Ann., 16(1):77-84, 1987.
90. 하석준 外 : 水原, 京畿南部 地域의 皮膚腫瘍의 考察, 大韓皮膚科學會誌, 34(2): 199-205, 1996.
91. 朴憲烈 : 地球環境論, 서울, 도서출판 예경, pp.41-43, 1992.
92. 임명규 外 : 皮膚 扁平細胞癌의 原因疾患에 관한 臨床的 考察, 大韓皮膚科學會誌, 34(1):85-92, 1996.

93. Friedman RJ, et al(eds) : Cancer of the Skin. Philadelphia, Saunders, 1991, pp.27-94.
94. Gallagher RP, et al : Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma of the skin from 1973 through 1987. J Am Acad Dermatol 23:413, 1990.
95. 李連生, 白俊昆 : 皮膚病鍼灸療法, 天津科學技術出版社, 天津, pp.418-420, 1993.
96. 劉永生 : 治癌處方大全, 天津, 天津科學技術出版社, pp.331-333, 1994.
97. 孟立春 : 抗癌中藥一千方, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.441-442, 1994.
98. 楊柱星, 林中昌, 譚紹珍 : 名醫治癌良方, 南寧, 廣西科學技術出版社, pp.218-225, 1993.
99. 牛孺子 : 癌症治驗錄, 北京, 中醫古籍出版社, pp.235-238, 1994.
100. 西山茂夫 : 圖解 皮膚科學, 서울, 第一醫學, p.223, 1991.
101. Rigel DS, et al : Dysplastic nevi. Markers for increased risk for melanoma. Cance 63:386, 1989.
102. Albert L, et al : Dysplastic melanocytic nevi and cutaneous melanoma: Markers of increased melanoma risk for affected individuals and blood relatives. J Am Acad Dermatol 7:69, 1990.
103. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
104. 東軒居士 : 衛濟寶書(文淵閣四庫全書 卷9), 서울, 麗江出版社, p.817, 1987.
105. 南京中醫學院 校釋 : 諸病源候論校釋, 北京, 人民衛生出版社, p.975, 1982.
106. 王燾 ; 外臺秘要, 서울, 成輔社, p.789, 1975.
107. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, pp.2223-2224, 1987.
108. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, pp.889-890, 1984.
109. 薛己 : 薛氏醫案, 서울, 麗江出版社, pp. 128-129, 1992.
110. 陳夢雷 : 醫部全錄, 北京, 人民衛生出版社, 卷374, p.351, 1985.
111. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, pp.250-252, 1989.
112. 손병권 외 : 동의외과학, 서울, 여강출판사, p.162, 1992.
113. 華佗 : 中藏經, 北京, 人民衛生出版社, pp. 67-68, 1990.
114. 孫思邈 : 千金方, 北京, 人民衛生出版社, pp.134-136, 1985.
115. 孫震元 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.615-626, 1987.
116. 李槿 : 醫學入門, 서울, 大成文化社, pp. 520-521, 1989.
117. 劉輔仁 外 : 實用皮膚科學, 北京, 人民衛生出版社, pp.558-560, 1996.
118. 季光 外 : 現代治癌驗方精選, 南京, 東南大學出版社, p.260, 1992.
119. 牛孺子 外 : 癌症治驗錄, 北京, 中醫古籍出版社, p.239, 1994.
120. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, pp. 37-42, 1995.
121. 洪元植 : 現代中國의 癌治療, 서울, 英文社, pp.81-85, 366-367, 372-375, 378-379, 1980.
122. Fish B : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy, Cancer, 54:2609, 1984.
123. Kim, SH : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay, J. Kor, Cancer Assoc, 21:11, 1989.

124. Wilson JK, V, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, & Weese JL : Cell culture human colon adenomas and carcinomas. *Cancer Res*, 47:2704, 1987.
125. Connel JR. and Duncan S. J.: The effect of non-phorbol promoters as compared with phorbol myristate on sister chromatid exchange induction in cultured chinese hamster cells. *Cancer Lett(netherlands)* 11(4), 351, 1981.
126. Yu Z.J.: Chinese material medica combined with cisplatin and lipidol through transcatheter arterial embolization in the treatment of primary hepatoma. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih(China)* 13(10), 327, 1993.
127. 金聖勳, 鄭燦吉, 郭桂豪 : 東醫病理學, 대전, 한림원, pp.99-100, 1994.
128. 안덕균 역 : 면역과 한방, 서울, 도서출판 열린책들, pp.47-48, 1992.
129. 劉正才, 太煥文 : 中醫免疫, 重慶出版社, pp.8-37, 46-62, 1983.
130. 金完熙, 崔達永 編 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p.90, 1993.
131. 蔡禹錫 : 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻의 考察, 大韓韓醫學會誌, 11(2): 54-91, 1990.
132. 李淵台 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp.21-35, 60-62, 162-163, 316-337, 1993.
133. 黃義玉 外 : 免疫學에 關한 文獻의 考察, 大韓韓醫學會誌, 10(1):193-226, 1989.
134. 陳紹東 : 治癌芻議, 上海中醫藥雜誌, 第4期, pp.12-13, 1989.
135. 구입분, 최달영 : 腫瘍의 化學療法 治療에 따른 副作用에 對한 東醫學의 研究(養正積自除을 中心으로), 東醫病理學會誌, Vol.10. 163-195, 1995.
136. 裴元植 : 癌의 韓洋方併用治療에 대한 報告, 서울, 大韓韓醫師協會, 大韓韓 醫學會誌 Vol.7. No.2. pp.53-57, 1986.
137. 張代釧 : 中醫藥對腫瘤放化療의 增敏減毒作用, 中國中西醫結合雜誌, 12(3):135-138, 1992.
138. 孫華麗, 余桂清 : 中醫中藥配合放射治療癌症概況, 中醫雜誌, 31(1):44-46, 1991.
139. 王濟民, 王俊茹 ; 中醫藥防治癌症的體會, 浙江中醫雜誌, 26(1):32-33, 1991.
140. Komiyama, K., Hirokawa, Y. and Yang, Z.B. : Potentiation of chemotherapeutic activity by a Chines herb medicine Juzen-Tai-Ho-Toh. *Japan J. Cancer Chemother.* 15, 1715, 1988.
141. Masaki Aburada : Protective effects of Juzen-Taiho-Toh against adverse reactions associated with mitomycin C. *Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine.* 275, 1988.
142. Hitoshi Ito and Keishiro Shimura : Antitumor effects of Juzen-taiho-to and other Kampo Medicines. *Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine.* 281, 1988.
143. Ruriko H., Hideyuki O., Ritsuko H., Song Ja H., Ai Min L., Shigeki N., Nobuko S., Akiko S. and Katsuyuki H. : Antitumor activity of combination therapy with Kampo prescriptions and anticancer agents. *Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine.* 304, 1988.
144. Iwao U. and Kanki K. : Potentiation of the chemotherapeutic activity of

- antineoplastic agents by Juzen-taiho-to. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine. 320, 1988.
145. Osamu T., Yuichi F., Masaki A. and Eikichi H. : Protective effects of Juzen-taiho-to against the adverse effects of some antitumor agents. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine. 353, 1988.
146. Makoto H., Yumiko M., Shohei H., Shoji S. Yih-chi T. and Nobuo Y. : Effect of Juzen-taiho-to on various immune responses in tumor bearing mice. Recent Advances in the pharmacology of Kampo Medicine. 328, 1988.
147. 金有景 : 抗癌食藥本草, 中國食品出版社, p.110, 152, 251, 363, 472, 483, 1989.
148. 王冰 : 抗癌中藥方選, 人民軍醫出版社, pp.1-2, p.6, 20, 22, 24, 28, 30, 1990.
149. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南科學技術出版社, pp.7-9, 53-55, 96-98, 119-122, 126-128, 185-186, 188-190, 256-258, 1987.
150. 이재훈 : 高麗人蔘이 肝 再生 및 肝癌 發生 過程中 肝細胞膜 Transferrin receptor 變動에 미치는 影響, 高麗人蔘學會誌 20(1):114-115, 1996.
151. 吳勇性 : 水蔘·白蔘·紅蔘이 細胞性免疫反應 및 體液性免疫反應에 미치는 影響, 四象醫學會誌 1(1):125-137, 1989.
152. 오민철 : 黃芪 및 當歸의 免疫增強 效果에 관한 研究, 慶熙大學校 大學院, 1986.
153. 宋峰根 : 수종 한약재가 면역반응에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌 18(2):43-57, 1997.
154. 趙克勝 外 : 黃芪多糖質이 人體 주위혈 單核細胞의 腫瘍壞死因子 生産을 增強시키는 데 對한 研究, 한글판 中西醫結合雜誌 5:3, 1983.
155. 劉海洋 整理 : 黃芪의 臨床應用과 研究, 中西醫結合雜誌, 9(6):328, 1989.
156. 洪性範 譯 : 臨床抗癌中草藥, 서울, 成輔社, pp.100-103, 1990.
157. 이귀녕 : 임상병리과일, 서울, 醫學文化社, pp.54-57, 82-89, 216-218, 740-744, 767-773, 1993.
158. 李三悅 : 臨床病理檢査法, 서울, 연세대학교 出版部, pp.202-207, 1994.
159. 金相仁 外 : 一次診療의 臨床病理檢査, 서울, 高麗醫學, pp.70-77, 1991.
160. Yong Q.C. : Fatty acid modulation of tumor cell-platelet vessel wall interaction. Cancer and Metastasis Review, 11, pp.389-410, 1992.
161. Hyde R.M. : Immunology(3rd Edn.), Malvern, Williams and Wilkins, pp.1-2, p.13, 268, 1995.
162. Sell, S. : Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hagerstown, Maryland, Hapers & Row pub., pp.144-171, 1980.
163. 윤정구 : 종양에 대한 생체방어기전, 대한 의학협회지, 32(10):1073-1077, 1989.
164. Hsu HY, Hau DM, Lin CC : Effects of Kueipi-tang on cellular immunocompetence of γ -irradiated mice. American J Chinese medicine, 11(2):151-158, 1993.
165. Schulof RS, et al. : T-cell abnormalities after mediastinal irradiation for lung cancer. Cancer 55:974, 1985.
166. Uma Raman, Devarajan Eswaran, et al : Proinflammatory Cytokines Secreted by

Monocytes of Filarial Patients, Microbiol.
Immunol., 43(2), 279-283, 1999.

167 : Jun Yang, Woody Denham, et al :
Macrophage Pacification Reduces Rodent
Pancreatitis-Induced Hepatocellular Injury
Through Down-regulation of Hepatic Tumor
Necrosis Factor α and Interleukin-1 β ,
Hepatology, 28:1282-1288, 1998.

168 : Ferdy J Lejeune, Curzio Rüegg, et al :
Clinical applications of TNF- α in cancer,
Current Opinion in Immunology, 10:573-580,
1998.