

## 當歸活血湯의 肺轉移抑制 및 免疫調節作用에 의한 抗癌效果

고은태 · 하지용 · 이선구 · 유병길

### Antitumor and Immunomodulatory Effects of Dangguihwalyultang on Murine Melanoma-induced Lung Metastasis

Eun Tae Ko, Jee Yong Ha, Seon Goo Lee, Byeong Gil You

*Dept. of Oriental Medicine Graduate school Sangji University*

In order to investigate the antitumor effect by *Dangguihwalyultang* after B-16 cells were transplanted in C57BL/6 mice, and the immune responses in mice induced by methotrexate, the extract of *Dangguihwalyultang* was orally administered to the ICR mice.

Experimental studies were performed for measurance of metastasis, cell cytotoxicity in vitro, life extention, weight of cancer, natural killer cell activity, productivity of interleukin-2.

The results were summarized as follows:

1. Mean survival time in *Dangguihwalyultang*-treated group was prolonged, as compared with control group(14.63%) significantly( $P < 0.05$ ).
2. Inhibition of metastasis in *Dangguihwalyultang*-treated group was higher than control group with significance on 14th day( $P < 0.05$ ).
3. On the weight of solid tumor, *Dangguihwalyultang*-treated group was less than control group with significance( $P < 0.05$ ).
4. On the MTT assay, *Dangguihwalyultang* concentration inhibited cell viability was 368.8 $\mu$ g/well.
5. Natural killer cell activity in *Dangguihwalyultang*-treated group was significantly increased on 100:1, 50:1 E/T(effect cell/target cell) ratio( $P < 0.05$ ).

\* 慶山大學校 附屬韓方病院 內科學教室

6. Production of interleukin-2 in *Dangguihwalyultang*-treated group was significantly increased ( $P < 0.05$ ).

Key words: *Dangguihwalyultang*, anti-tumor, immunomodulatory, B-16, C57BL/6, metastasis, cell-cytotoxicity, interleukin-2, natural killer cell activity.

## I. 서 론

오늘날 암은 인류를 위협하는 주요 질환의 하나로 1940년 이전까지만 해도 암은 노화에 동반되어 발생하는 피할수 없는 질병으로 여겨졌기에 의사는 단순히 외과적 처치만을 수행했을 뿐이나 현재 눈부신 문명의 발달에 힘입어 모든 암질환의 80% 이상이 환경적요인에 의한다고 보고되고 있으며 이에 따라 질병의 관리도 치료보다는 예방으로 관심이 몰리고 있다<sup>1)</sup>. 국내에서는 연간 인구 10만명당 남자는 140명, 여자는 115명의 환자가 발생하는 것으로 추정되고 있는 실정으로<sup>1)</sup> 발병원인은 생체내 정상세포가 발암물질 등의 환경적요인과 바이러스 감염, 유전적요인, 만성자극 및 돌연변이 등에 의하여 어떤 과정을 거쳐 내적원인으로 유발되는 것으로 보고 있다<sup>2,3)</sup>.

현재의 암 치료법으로는 수술, 방사선치료 및 항암화학요법등이 병행되고 있지만 그에 따른 부작용으로 한계점에 도달하고 있어 암세포를 선택적으로 특이적 파괴하며 완전 섬멸시킬 수 있는 방법(total cell kill)을 만족시켜 줄 수 있는 면역학적 치료방법이 대두되고 있는 실정이다<sup>4,5)</sup>.

한의학에는 癌이라는 직접적인 병명을 사용하지는 않았지만 역대문헌들을 검색하여 보면 이와 유사한 병명이 상당히 많음을 알수 있다. 예를 들면 噎膈, 反胃, 癥, 積, 脾積(痞氣), 肝積(肥氣, 癰黃, 肝着), 肺積, 心積(伏梁), 失榮, 上

石疽, 乳岩(乳石癰), 妒乳, 石癭, 腎癌, 莖脣, 舌菌, 喉百葉, 五色帶下, 骨疽, 石癧, 緩疽(肉色疽), 石疔, 黑疔, 青疔, 翻花瘡, 腸覃, 肉瘤 등은 악성종양에 해당되고 痰包, 痰核, 脂瘤, 血瘤, 氣瘤, 筋瘤, 耳菌, 骨瘤, 肉瘤, 疣痣 등은 양성종양에 해당된다.<sup>6)</sup>

최근에 한의학에서는 종양연구에 대한 관심이 집중되고 있는데, 대부분 실험연구로서 한약의 투여와 비약물요법을 이용한 항암능의 증진에 초점을 두고 있다. 또한 기존의 처방을 중심으로 항암에 대한 문헌고찰 및 동물실험, 그리고 임상에서 검증이 이루어지고 있다. 즉, 噎膈<sup>7,8)</sup>, 反胃<sup>7)</sup>, 積聚<sup>9)</sup>, 癥瘕<sup>10,11,12)</sup>, 胃癌<sup>13)</sup>, 肺癌<sup>14)</sup>, 肺癰<sup>15)</sup>에 대한 문헌고찰이 이루어졌고, 기존의 處方<sup>16,17,18,19)</sup>과 單味 약재<sup>20,21,22)</sup> 및 溫鍼<sup>23)</sup>, 藥針<sup>24)</sup> 등을 이용한 면역력 증강 실험이 이루어—沮넙만 어느 정도 유의성 있는 결과를 도출하고 있다.

당귀활혈탕(當歸活血湯)은 동의보감 적취문에 나오는 처방으로서 주치증은 혈을증에 쓴다고 하였다.

이에 저자는 당귀활혈탕의 처방 구성과 주치증으로 보아 항암과 면역작용에 적용될 수 있을 것으로 추측되어 실험에 임하였다. 본 연구에서는 癌을 유발시킨 雄性생쥐에 당귀활혈탕 검액을 투여하여 抗癌效果 및 免疫能을 측정하였다. 測定項目은 MTT법에 의한 시험관내 세포독성능 측정 및 IC50(50% Inhibition concentration)을 구하였고, , 복강암생쥐의 생존

기간 및 고형중양의 억제율, 肺轉移 흑색종의 집락수, IL-2 (Interleukin-2) 생산능, NK (Natural Killer cell)-활성도를 測定하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 정도산업에서 4주령의 체중 25g내외의 C57BL/6계 웅성 생쥐와 ICR계 웅성 생쥐를 분양받아 항생제가 첨가되지 않은 고형사료(삼양사료(주), 한국, 표 1)를 수돗물과 함께 충분히 공급하면서 1주일간 본 실험실의 항온항습기(명진기계 MJ-721cs, 한국)에서 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of Pellet

Component	Composition(%)
Crude protein	22.1
Crude fat	3.5
Crude fiber	5.0
Crude ash	8.0
Ca	0.6
P	0.4
Others	60.4
Total	100.0

#### 2) 실험 약재

실험에 사용된 당귀활혈탕을 구성하는 약재를 건조된 상태로 구입하여 잡질을 제거하고 형태가 완전한 것만을 정선하여 사용하였다. 당귀활혈탕의 구성약재<sup>16)</sup>와 1첩 분량은 Table 2와 같다.

Table 2. Prescription of Dangguihwallyutang.

Herbal name	Scientific name	Amount (g)
적작약	PAEONIAE RADIX RUBRA	4
당귀	ANGLICAE GIGANTIS RADIX	4
지각	AURANTII FRUCTUS	3.2
건강	ZINGBERIS RHIZOMA	1.2
홍화	CARTHAMI FLOS	1.2
향부자	CYPERI RHIZOMA	3.2
목단피	MOUTAN CORTEX	3.2
청피	CITRI RETICULATAE VIRIDE PERICARPIUM	3.2
오약	LINDERAE RADIX	3.2
감초	GLYCYRRHIZAE RADIX	1.2
천궁	CNIDII RHIZOMA	4
계피	CASSIAE CORTEX	1.2
도인	PERSICAE SEMEN	4
생강	ZINGBERIS RHIZOMA RECENS	4
Total amount		40.8

### 2. 실험방법

#### 1) 당귀활혈탕의 조제

실험에 사용할 10첩 분량의 당귀활혈탕 408g을 3000ml의 둥근 플라스크에 증류수 1700ml 함께 넣어 3시간동안 전탕한 후 8점의 거즈로 여과시킨후 이를 증발농축기(Yamato, Japan)에서 농축하였다. 그후 동결건조기(일신 Engineering Co., 한국)에서 -40℃로 72시간동안 완전히 건조시켜 65g(득수율 22.52%)의 엑스를 얻었다.

시험관내 독성실험에 필요한 경구용 건조된 엑스를 실험당일 적정 농도로 조정하여 사용하였으며 동물의 항암능과 면역능을 측정하기 위해서는 건조된 엑스를 실험에 필요한 농도가 되도록 조정하여 증류수에 녹여 conical

tube에 넣어 -4℃의 냉동실에서 보관하며 사용할 때 필요한 양만큼 완전히 녹여 사용하되 실험도중 생긴 침전물은 수시로 vortex-mixer(Maxi II, USA)로 충분히 흔들어 원액이 골고루 섞이도록 하였으며 부유물이 생기면 이를 폐기하고 건조엑스를 적정농도로 새로 만들어 사용하였다.

## 2) 검액의 투여

10척분량에서 얻은 엑스가 65g으로 이를 60kg의 사람이 5일동안 복용한다고 볼수 있으며 마우스의 무게가 25g이므로 마우스의 1일 복용량은 5.4mg이 된다고 보았다. 그리하여 당귀활혈탕 투여군에는 당귀활혈탕 엑스를 5.4mg/0.2ml 투여하고 대조군에는 동량의 생리식염수를 1일 1회 21일간 연속으로 각각 경구투여하였다.

## 3) 배지의 구성

### (1) 기본배지

RPMI 1640(Gibco, USA)에 sodium bicarbonate(Shinyo-pure Chemicals Co., LTD., Japan) 2g과 fungizone(Gibco, USA) 4ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1ml, streptomycine (100mg/ml, Sigma, USA) 1ml을 증류수에 넣고 1000ml로 조정후 pH를 7.2로 맞춘후 0.22µm disposable sterile bottle top filter(Cornig, USA)로 여과하여 사용하였다.

### (2) 혼합배지

FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)를 56℃에서 30분간 inactivation시킨 후 기본배지에 10%의 농도가 되도록 조정하여 사용하였으며 이는 암세포의 배양전반에 사용되었다.

## 4) 암세포의 배양

BALB/c계와 ICR계의 생쥐에 폐전이와 복강

암을 유발시키기 위한 암 세포주는 한국세포주 은행에서 B16 murine melanoma cells과 S-180 murine sarcoma cells을 분양받아 이를 실험에 사용하였다.

## 5) 면역기능저하 유발<sup>25)</sup>

면역기능저하 유발은 검액을 21일간 경구투여한후 실험군 및 대조군에 methotrexate(유한메토티렉세이트정, 유한양행) 1ml/kg을 1일 1회 4일간 경구투여하여 면역기능저하를 유발시켰다.

## 6) 생쥐 비장세포의 준비<sup>26, 27, 28)</sup>

생쥐를 경추탈골로 치사시킨후 복부를 알콜로서 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 뒤, 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4℃ RPMI-1640배지(Gibco, USA)로 2회 세척한 다음 cell dissociator sieve-tissue grinder kit(Sigma, USA)로서 잘게 으갠후 조직파편을 제거하고 RPMI-1640으로 3회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로서 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤 10×HBSS(Gibco, USA)로 2회 세척하고 RPMI-1640배지로 한번더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

## 7) 폐암의 유발과 약물투여

실험적 폐전이 흑색종을 유발하기 위해서 실험에 사용될 B16세포를 배양시킨 후 Trypsin으로 처리하고 PBS로 3회 세척하여 2×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하고, 충분히 Vortexing하여 세포들이 골고루 섞이도록 한 후 10분정도 실온에 방치하여, 종괴상의 세포들을 침전시킨 후 C57BL/6계 생쥐의 꼬리정맥에 27× $\frac{3}{8}$ " Gauge 주사기로 0.2ml씩 정확히 주입하여 폐의 흑색종을 유발시켰다. 하루 경과 후 당귀활혈탕 투여군은

0.2ml씩 매일 경구투여하였고, 대조군은 0.9% 생리식염수(중외제약) 같은 양을 매일 경구투여하였다.

### 8) 고행암유발과 약물투여

실험적 복강내 고행암을 유발하기 위해서 실험에 사용될 S-180세포를 배양시킨 후 Trypsin으로 처리하고 PBS로 3회 세척하여  $2 \times 10^6$  cells/ml로 조정하고, 충분히 Vortexing하여 세포들이 골고루 섞이도록 한 후 10분정도 실온에 방치하여, 종피상의 세포들을 침전시킨 후 ICR계 생쥐의 복강내에 27 # Gauge 주사기로 0.2ml씩 정확히 주입하여 복강암을 유발시켰다. 하루 경과 후 당귀활혈탕 투여군은 0.2ml씩 매일 경구투여하였고, 대조군은 0.9%생리식염수(중외제약) 같은 양을 매일 경구투여하였다.

## III. 측정 항목

### 1. 생존기간 관찰

계대용 생쥐의 복강에 S-180 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후  $4 \times 10^6$  cells/ml로 조정하여 대조군과 당귀활혈탕 투여군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다. Geran 등<sup>30)</sup>이 기술한 다음의 방법에 의하여 구한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

$$\text{생존증가율} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

X : 생존수가 전체동물의  $\frac{1}{2}$ 이 되는 최초의 시간(일)

Y : 생존수가 전체동물의  $\frac{1}{2}$ 에서 1을 뺀 최초의 시간(일)

단, 전체 동물의 수가 홀수인 경우는 median survival time은  $X/2$ 가 된다.

T : 실험군의 median survival time(일)

C : 대조군의 median survival time(일)

### 2. 시험관내 세포독성능 측정

당귀활혈탕의 시험관내 세포독성능을 측정하기 위하여 Freshney 등<sup>31)</sup>이 개발한 MTT법을 변형하여 실시하였다. 지수증식기의 CT 세포를  $1 \times 10^4$  cells/ml로 조정한 다음, 96 well microtitration plate(Falcon, USA)에  $180 \mu$ 의 세포부유액과  $20 \mu$ 의 당귀활혈탕을 넣었다. 당귀활혈탕의 농도는 최초의 농도를  $5 \mu$ g/well로 조정한 후 2배씩 희석시켜서 사용하였으며, 96 well microtitration plate에 분주직전에  $0.22 \mu$ m의 syringe filter로 여과하여 사용하였다. 이후 3-4일간  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 incubator에서 배양하면서 수시로 위상차현미경으로 당귀활혈탕이 처리되지 않은 세포의 증식정도를 관찰하여 대조 well의 세포들이 충분히 성장하면 배양액을 제거하고 각 well에  $20 \mu$ 의 MTT 용액( $5 \text{mg/ml}$  in PBS)(Sigma, USA)을 넣고  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  Incubator에서 3시간 배양하였다. 그 후  $100 \mu$ 의 0.04M HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT 용액과 반응하여 생긴 푸른색의 formazan 결정을 완전히 녹인 후 30분 안에 ELISA 판독기(Emax precision mBALB/coplate reader, Molecular devices, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도(Optical Densitity)를 측정하였다. 이때 참고파장으로 650nm를 이용하였다. 각 실험은 4개의

well을 사용하여 그 평균치를 구하였고, 동시에 동일 실험을 반복하여 두차례 실시 후 아래의 공식과 같이 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{실험군의 평균흡광도} - \text{기준 흡광도}}{\text{대조군의 평균흡광도} - \text{기준 흡광도}} \times 100$$

IC<sub>50</sub>(50% inhibition concentration)은 생존율에 의거 구하였다(Table 3). 즉, MTT검사법에서 흡광도가 대조 well에 비하여 50% 감소하는 값을 의미하는 IC<sub>50</sub>은 약물의 농도를 X 축으로, 각 well의 흡광도에서 환산한 생존율을 Y축으로 설정하여 다중회귀방정식에 의하여 산출하였다.

이상의 내용을 도식화하면 Figure 1.과 같다.

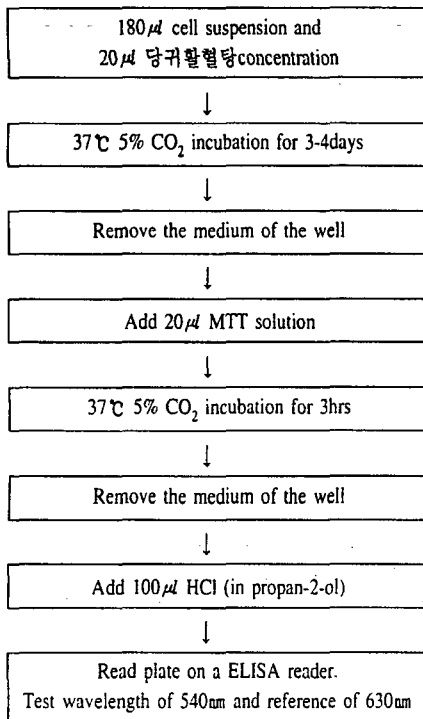


Fig. 1. Flow chart for measurement of In vitro cytotoxicity

### 3. 폐전이 억제능 측정

실험적 폐전이 흑색종의 억제능 실험은 B16 세포를 C57BL/6생쥐에 주입 후 24시간 후부터 매일 당귀활혈탕을 경구투여한 뒤 14일째에 폐를 적출하여 폐의 표면에 생긴 흑색종의 집락(Colony)수를 측정하였다. 이때 경계가 불분명한 것은 한 개로 간주하였다.

### 4. 고형암 생성 억제능 측정

실험적 고형암의 무게측정실험은 S-180 세포를 ICR계 생쥐에 주입한 후 14일 동안 매일 당귀활혈탕을 경구투여 하였고, 각 실험군의 복강내에 생성된 고형암을 적출하여 무게를 측정하였다.

### 5. NK-activity 측정

#### 1) 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 처사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

#### 2) 표적세포의 준비

NK cell의 살해능측정시의 표적세포는 한국 세포주은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1임파종 세포(TIB-160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 실험실에서 FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)가 10% 첨가된 혼합배지로 계대배양하면서 측정에 임하였다.

#### 3) 세포독성의 측정

##### (1) 기본방법

세포독성실험은 Promega사의 Cr assay를 대체하는 것으로 알려져 있는 cytotox96™ non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실

시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 가시광선영역의 파장(490nm)으로 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

### (2) 대조 Well의 준비

오차를 보정하기 위하여 5종류의 대조 well 을 두었다. 표적세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 1은 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l 와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 표적세포의 LDH 최대방출량을 나타내는 대조 well 2는 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 작동세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 3은 최적수의 작동세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 부피를 보정하기 위한 대조 well 4는 용해용액을 첨가하여 발생하는 부피의 변화에 의한 오차를 보정하기 위한 것으로 배지 200 $\mu$ l 와 용해용액(10 $\times$ )로 구성하였으며 배지의 background로서 배지내 혈청이나 phenol red에 기인한 LDH의 활동능을 보정하기 위한 대조 well 5는 배지 200 $\mu$ l로 구성하였다.

### (3) 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합 배지에 5 $\times 10^4$ cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well mBALB/cotitration plate에 well당 100 $\mu$ l씩 분주한 후, 작동세포와 표적... 10:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각 5 $\times 10^6$ cells/ml, 2.5 $\times 10^6$ cells/ml, 5 $\times 10^5$ cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ l를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ l/well이 되도록 한후 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> incubator에서 4

시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100 $\mu$ l당 10 $\mu$ l의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리 한후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$ l 옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든후 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 $\mu$ l의 정지용액을 각 well에 넣은 후 주사기로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 실험값, 표적세포 LDH 자연방출값, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 뺀고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피 보정값을 뺀다.

즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였으며 이상을 도식화하면 Fig. 2.와 같다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{(A-B)-C}{D-C} \times 100$$

- A: Experimental - culture medium background
- B: Effect cell spontaneous LDH release - culture medium background
- C: Target cell spontaneous LDH release - culture medium background
- D: Target cell maximum LDH release - volume correction control

## 6. Interleukin-2 생산 및 측정

14일동안 검액처리후 면역기능저하를 유발시킨 BALB/c계 생쥐를 치사하여 비장을 적출한 다음, 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 혼합 배지에 5 $\times 10^6$ cells/ml의 농도로 재부유하고, 여기에 concanavalin-A(Sigma, USA)를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 상층액을 수거하여 interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다.

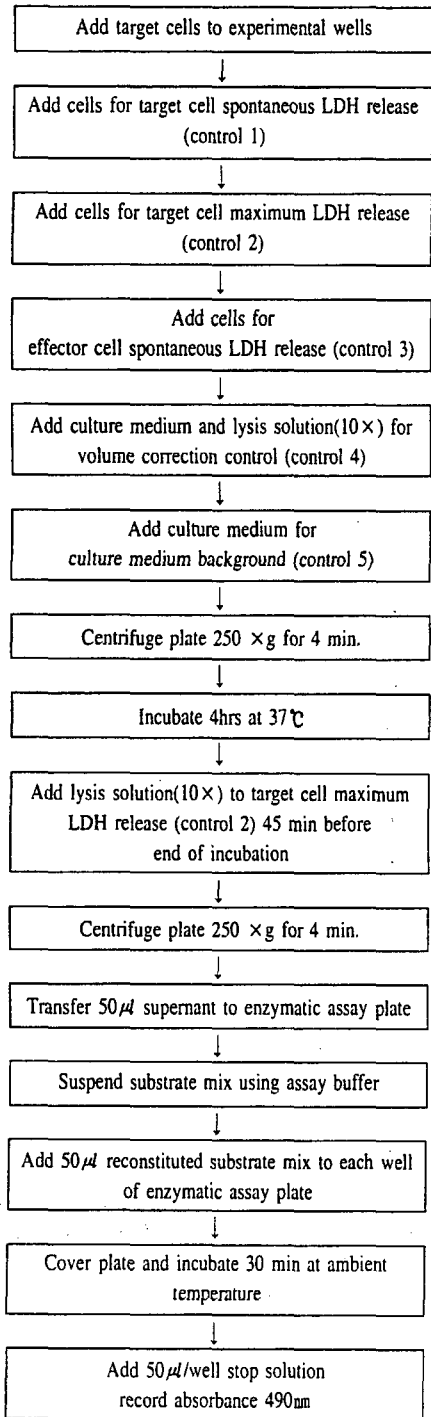


Fig. 2. Flow chart for measurement of NK-activity.

생쥐 IL-2의 측정에는 intertest-2X Kit(Genzyme, USA)를 이용하여 측정하였다. Intertest-2X kit는 고형상 면역효소 측정법을 이용한 mouse IL-2 측정용 ELISA Kit로서 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2양을 산정할 수 있는 방법이다. 96 well plate의 각 well에 시료를 100µl씩 분주하고 덮개로 덮은 후 37°C에서 40분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척한 후 plate에서 paper towel

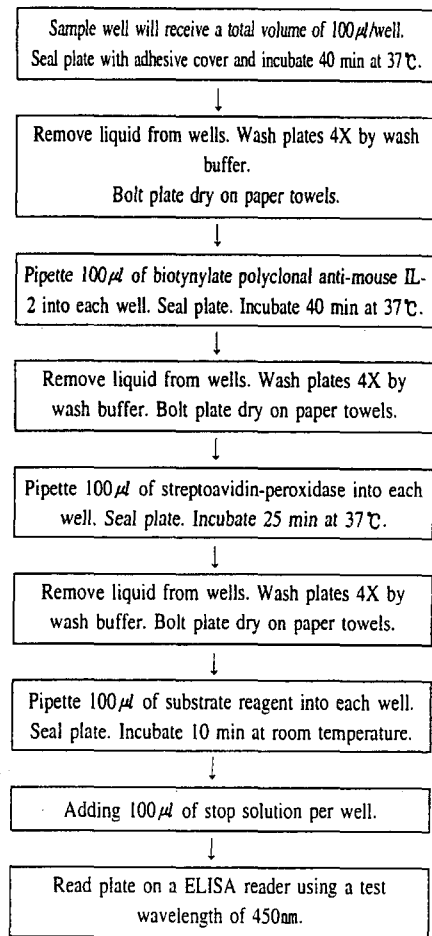


Fig. 3. Flow chart for measurement of IL-2 production



로 습기를 제거하고 각 well에 biotinylated polyclonal antimouse IL-2를 100 $\mu$ 씩 분주하고 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 streptoavidin-peroxidase를 100 $\mu$ 씩 분주한 뒤 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 substrate mix를 100 $\mu$ 씩 분주하여 다시 덮개로 덮은 후 상온에서 10분간 배양하였다. 다시 각 well에 정지용액을 100 $\mu$ 씩 분주한 후 ELISA 판독기로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 도표화 하면 Fig. 3과 같다.

## 7. 통계처리

실험결과는 SPSS for windows release 5.0.2 (SPSS. INC.,1993)를 이용하여 independent-sample t-test로서 검정하였다.<sup>22)</sup> 그 결과가  $P < 0.05$  수준인 경우 유의성이 있다고 보았다.

## IV. 실험결과

### 1. 생존율 측정

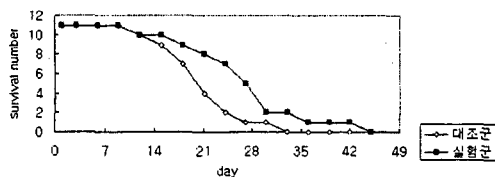
당귀활혈탕의 생존율 측정 실험결과는 Table 3, Fig. 4과 같았다. 항암효과를 조사하기 위하여 sarcoma-180cell로 복강암을 유발시킨 생쥐에 당귀활혈탕 엑스를 투여하고 대조군에는 식염수를 투여하며 생존기간을 관찰한 결과 대조군에서 평균생존일수는 20.5 $\pm$ 5.98일임에 반하여 당귀활혈탕투여군은 23.5 $\pm$ 10.25일로 증가하였다.대조군에 비해 실험군은 유의성있는 증

가를 보였고( $P < 0.05$ ), Median survival time은 각각 20일과 23일로서 당귀활혈탕 투여군에서 대조군에 비하여 14.63%의 생명연장 효과를 보였다.

**Table 3.** The Median Survival Days of Control and Treated Mice

Group <sup>a)</sup>	Route	No. of animals	Median Survival Time(days)	ILS (%) <sup>b)</sup>
대조군	P.O <sup>c)</sup>	10	20.5 $\pm$ 5.98 <sup>d)</sup>	14.63
실험군	P.O	10	23.5 $\pm$ 10.25	

- a) 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg
- b) ILS(Increase of life span) : (treated G.- control G.) / control G.  $\times$  100
- c) P.O : Oral administration
- d) mean  $\pm$  Standard deviation ( $P < 0.05$ )



**Fig. 4.** Median Survival Curve of Control and Treated Mice with Dangguihwalyultang *in vivo*

- 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg

### 2. 시험관내 세포독성능 및 IC<sub>50</sub>

B16 murine melanoma cells의 당귀활혈탕의 세포독성능은 368.8 $\mu$ g/well로 나왔고, 각각의 단방들에 대한 세포독성능은 Table 3-2에서 나타난 바와 같이 52.92 $\mu$ g/well에서 25670 $\mu$ g/well 까지 넓은 범위의 세포독성능을 보였다. 특히 단방들중에서 천궁과 당귀가 B16 melanoma

cells에 강한 독성을 나타내었다.

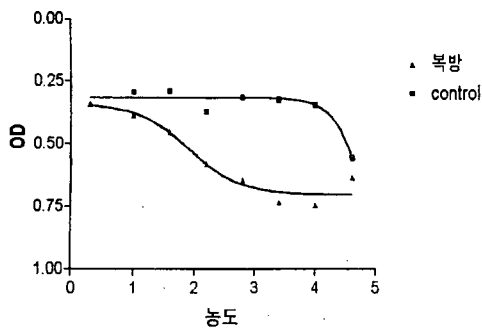
Fig. 5는 당귀활혈탕에 대한 농도별 survival curve로 약제의 50 $\mu$ g/well농도부터 세포에 작용하는 것으로 나타났다.

**Table 4-1.** IC<sub>50</sub> Value of Danggyuhoarhyertang

복방	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/well)
당귀활혈탕	368.8

**Table 4-2.** IC<sub>50</sub> Values of each Drug in Contain with Dangguihwalyultang

단 방	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/well)
천궁	52.92
당귀	194.0
지각	221.3
향부자	240.3
건강	253.9
홍화	270.6
오약	311.6
감초	353.3
계피	1538
적작약	4316
목단피	4338
청피	4957
생강	23950
도인	25670



**Fig. 5.** Survival Curve of Dangguihwalyultang on B 16 cells *in vitro* The Value of Logarithm of Concentration

X axis : 1 - 50 ng/well, 2 - 100 ng/well  
 3 - 500 ng/well 4 - 5  $\mu$ g/well  
 5 - 10  $\mu$ g/well

### 3. B16 melanoma cell의 肺轉移抑制능

B16 melanoma cell의 폐전이 억제능 실험결과는 Table 5, Fig. 6과 같다. B16 암세포를 C57BL/6의 꼬리정맥에 주입하여 폐에 전이된 집락수를 측정하였다. 대조군의 경우 14일째 31.20 $\pm$ 17.34개였고, 당귀활혈탕을 세포전이 후 계속 경구투여한 실험군에서의 집락수는 14.20 $\pm$ 9.91개를 보였다. 대조군과 당귀활혈탕 투여 실험군의 비교시 유의성 있는 감소를 보였다(P<0.05).

**Table 5.** Colonies of Metastasis of B16 cells in lung

Group <sup>a)</sup>	Route	No. of animals	Colonies number	Inhibition rate(% <sup>b)</sup> )
대조군	P.O <sup>c)</sup>	10	31.20 $\pm$ 17.34 <sup>d)</sup>	
실험군	P.O	10	14.20 $\pm$ 9.91	54.49

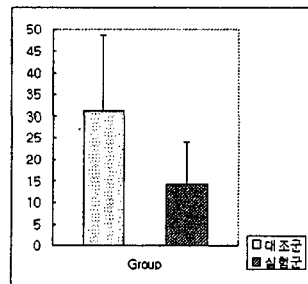
a) 대조군 : Treated with 0.9% saline

실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg

b) Inhibition rate = ((대조군-실험군)/대조군)  $\times$  100

c) P.O : Oral administration

d) mean  $\pm$  Standard deviation (P<0.05)



**Fig. 6.** Colony number change in lung mtastasis by B16 cells after administration of Dangguihwalyultang

대조군 : Treated with 0.9% saline

실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg

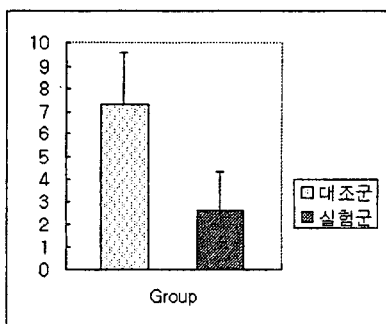
#### 4. 고형암의 무게 측정

고형암의 무게 측정은 Table 6, Fig. 7과 같다. 고형종양의 성장 저지율을 측정하기 위하여 S-180 세포로 발암시킨 ICR계 생쥐로부터 고형암 종양을 적출하여 중량을 측정한 결과 대조군  $7.31 \pm 2.26g$ , 실험군(당귀활혈탕투여군)은  $2.63 \pm 1.69g$ 을 나타내어 64.02%의 유의성있는 ( $P < 0.05$ ) 감소를 보였다.

**Table 6.** Weight of Solide Tumor Induced by S-180 sarcoma cells

Group <sup>a)</sup>	Route	No. of animals	Weight of Solid tumor(g)	Inhibition rate(% <sup>b)</sup> )
대조군	P.O <sup>c)</sup>	10	$7.31 \pm 2.26^d$	
실험군	P.O	10	$2.63 \pm 1.69$	64.02

- a) 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg
- b) Inhibition rate =  $\{(\text{대조군}-\text{실험군})/\text{대조군}\} \times 100$
- c) P.O : Oral administration
- d) Mean  $\pm$  Standard deviation ( $P < 0.05$ )



**Fig. 7.** Weight of Solide Tumor Induced by S-180 sarcoma cells

- 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg

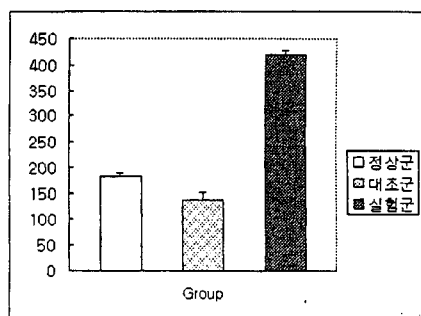
#### 5. Interleukin-2의 생산능 측정

Interleukin-2의 생산능 측정은 Table 7, Fig. 8과 같다. Interleukin-2의 생산능을 측정하기 위하여, 당귀활혈탕투여 7일, 14일, 21일 후 정상군, 대조군, 당귀활혈탕투여군의 비장세포를 사용하여 Concanavalin-A 자극 후 24시간 배양하여 측정한 결과를 보면 당귀활혈탕투여 후 정상군이  $183.90 \pm 6.32pg/ml$ , 대조군이  $137.93$

**Table 7.** Production of Interleukin-2 on S-180 sarcoma bearing mice.

Group <sup>a)</sup>	Route	No. of animals	Interleukin-2 (pg/ml) <sup>b)</sup>
정상군	P.O <sup>c)</sup>	10	$183.90 \pm 6.32^d$
대조군	P.O	10	$137.93 \pm 13.89$
실험군	P.O	10	$429.71 \pm 8.57$

- a) 정상군 : Non-treated mice  
 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200 mg/kg
- b) E/T ratio = Effect cell/Target cell
- c) P.O. : Oral administration
- d) Mean  $\pm$  Standard Deviation ( $P < 0.05$ )



**Fig. 8.** Production of Interleukin-2 on S-180 sarcoma bearing mice.

- 정상군 : Non-treated mice  
 대조군 : Treated with 0.9% saline  
 실험군 : Treated with Dangguihwalyultang 200mg/kg

±13.89pg/ml, 실험군은 429.71±8.57pg/ml을 나타내었다. 대조군이나 정상군에 비해 실험군은 300배정도의 높은 Interleukin-2의 생산능을 보이며 유의성있는 증가를 나타내었다(P<0.05).

## 6. NK cells의 활성화 측정

NK cells의 활성화 측정은 Table 8, Fig. 9과 같다. 자연살해세포의 세포독성능을 측정한 결과 작동세포와 표적세포의 비율에 따라 흡광도를 구한 뒤, 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였다. 대조군은 작동세포와 표적세포의 비율에 따라 100:1일 때 59.88±8.22, 50:1일 때 84.99±10.36, 10:1일 때 101.00±12.70이었으며, 당귀활혈탕투여군인 실험군은 100:1일 때 92.72±11.67, 50:1일 때 101.79±11.35, 10:1일 때 140.25±34.18이었다. 모두 활성도가 높게 나타났으나 각 군의 비교시 유의성있게 실험군이 대조군보다 NK cells 활성도가 높은 것으로 나왔다.

**Table 8.** Activity of NK cells

Group	Route	No. of animals	E/T Ratio <sup>a)</sup>	%Cytotoxicity <sup>b)</sup>
대조군	P.O	10	10:1	59.88±8.22
			50:1	84.99±10.36
			100:1	101.00±12.70
실험군	P.O	10	10:1	92.72±11.67
			50:1	101.79±11.35
			100:1	140.25±34.18

Control group : Treated with 0.9% saline

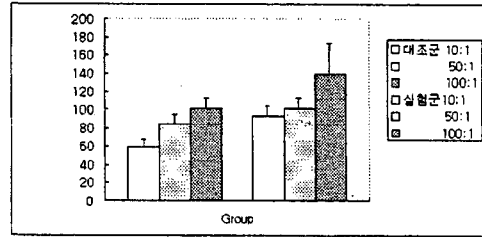
Treated group : Treated with *Dangguihwallyutang* 200mg/kg

P.O. : Oral administration

a) : E/T ratio = Effect cell/Target cell

b) : Mean ± standard deviation

\* : P<0.05 ( vs corresponding control)



**Fig.9.** Comparison of NK activity between saline or *Dangguihwallyutang*-treated mice

## V. 고 찰

한의학에서 말하는 '癌'이란 현대의학이 말하는 암과 좀 다른 양상을 띠고 있는데 한의학에서의 암이란 그 종괴가 암석과 같이 단단하고 형상이 불규칙적이어서 명명된데 비하여<sup>32)</sup> 현대의학에서 말하는 암, 즉 종양의 개념은 '자율성을 지닌 조직의 과잉발육'을 뜻하며 정상조직과 증식의 균형을 이루지 못하고 그러한 변화를 일으키는 자극이 없어도 지속적인 증식이 진행되는 모든 것을 통틀어 말한다<sup>33)</sup>.

오늘날 암은 인류를 위협하는 주요 질환의 하나이며 우리나라에서 질환으로 인한 사망원인중 수위를 차지하고 있는 질환중 하나로 생체내 정상세포가 발암물질 등의 환경적요인과 바이러스감염, 유전적요인, 만성자극 및 돌연변이 등에 의하여 어떤 과정을 거쳐 내적원인으로 유발되는데 사람의 발암 원인중 89-90%가 환경적요인에 의한 것으로 보고되고 있다<sup>2,3)</sup>.

일찍이 한의학에서는 殷墟의 갑골문에서 瘤라는 글이 나온 이래로<sup>34)</sup> 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積 등을 內經에서 자세히 기술하고 역대 의서에서 癭瘤, 陰菌, 石疽, 失榮, 惡核, 喉疔, 芽疔, 舌疔, 兔脣, 缺盆疽 등 종양의 위치와 병리적 특성에 따라 다양하게 기술하고 있다<sup>35)</sup>.

종양의 원인에 대해서 黃帝內經<sup>36,37)</sup>에서는 虛와 寒氣, 熱로 보았고 巢元方은 陰陽不和로-, 趙佶編은 溜滯라 하였고<sup>39)</sup> 李梴은 外感內傷으로<sup>40)</sup> 張介賓은 內虛<sup>41)</sup> 등으로 보았고 현대에 이르러는 精氣가 不足한 상태에서 外邪가 停滯하여 氣滯血瘀하고 痰飲濁聚하므로 서로 交結하고 蘊鬱하여 발생한다고 보고 있다.<sup>42)</sup>

1930년대 이전만 하더라도 폐암에 의한 사망은 드문 일이었다. 그러나 흡연인구의 증가 이후 폐암은 빠른 속도로 증가되고 있다.<sup>43)</sup> 폐암이란 명칭은 한의학적으로 발병과정 및 증상면에서 해수(咳嗽), 폐적(肺積), 폐저(肺疽), 폐위(肺痿), 폐옹(肺癰), 객혈(咯血)등에서 현대의 폐암과의 유사점을 찾을 수 있다.<sup>44)</sup> 최근에 폐암에 관한 연구로는 오 등<sup>45)</sup>의 '폐암에 대한 동서의학적 고찰'을, 한 등<sup>46)</sup>의 '폐적, 폐옹, 폐저, 폐암의 문헌적 고찰'을, 윤 등<sup>47)</sup>의 '식분당이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향'을, 강 등<sup>48)</sup>의 '반하후박탕의 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향'을, 이<sup>49)</sup>의 '이공산이 마우스 흑색종의 폐전이억제에 미치는 항암 및 면역작용에 관한 연구' 등이 있다.

동의보감에 이르길 당귀활혈탕은 적취 중 혈울에 사용한다고 하였으며 이를 구성하는 약재의 각각의 효능 및 主治는 다음과 같다.

赤적적적赤족적적芍藥의 性은 微寒無毒하고 味는 苦하며 肝으로 歸經하며 淸熱涼血, 散瘀止痛, 治溫毒發斑, 目赤腫痛에 效能이 있으며 當歸의 性은 溫無毒하고 味는 甘辛하며 心肝脾經으로 入하며 補血和血, 調經止痛, 腸하는 效能이 있으며 枳殼의 性은 涼無毒하고 味는 苦辛하며 脾肺大腸經으로 入하고 破氣行痰消積하여 胸痞, 脇脹食積에 效能이 있고 乾薑의 性은 熱無毒하고 味는 辛하며 脾胃肺經으로 入하여 溫中逐寒, 回陽通脈, 治心腹冷痛, 吐瀉에 效能이 있고 紅花의 性은 溫無毒하고

味는 辛하며 心肝經으로 入하여 活血通經, 散瘀止痛, 治經閉, 痛經에 效能이 있으며 香附子의 性은 平無毒하고 味는 辛微苦甘하며 肝脾三焦經으로 入하여 理氣解鬱 止痛調經 治肝胃不和 氣鬱不舒에 效能이 있으며 牡丹皮의 性은 微寒無毒하고 味는 苦辛하며 心肝腎經으로 入하여 淸熱涼血 活血散瘀 治溫毒發斑 吐血衄血에 效能이 있으며 靑皮의 性은 微溫無毒하고 味는 苦辛하며 肝膽經으로 入하여 疏肝破氣, 散結消痰, 治胸脇胃脘疼痛, 疝氣, 食積에 效能이 있으며 烏藥의 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 脾肺腎膀胱經으로 入하여 順氣, 開鬱, 散寒止痛, 治氣逆胸腹脹痛, 宿食不消에 效能이 있으며 甘草의 性은 平無毒하고 味는 甘하며 心肺脾胃經으로 入하여 和中緩急, 潤肺解毒하는 效能이 있으며 川芎의 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 肝膽心包經으로 入하여 活血行氣, 祛風止痛, 治月經不調, 經閉痛經에 效能이 있으며 肉桂의 性은 熱無毒하고 味는 辛甘하며 腎脾膀胱經으로 入하며 補元陽, 通血脈하는 效能이 있고 桃仁의 性은 平無毒하고 味는 苦甘하며 心肝大腸經으로 入하여 活血祛瘀, 治經閉痛經 癥瘕痞塊에 效能이 있으며 生薑의 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 脾胃經으로 入하며 解表散寒, 溫中止嘔, 化痰止咳하는 效能이 있다.<sup>50)</sup>

본 실험은 당귀활혈탕의 항암효과를 측정하기 위하여 생쥐의 생존을 검사와 시험관내 세포독성실험을 수행하였으며 면역조절작용을 살펴 보기 위하여 적혈구 溶血素價 및 凝集素價, NK-activity, 임파구 증식반응, IL-2 생산능을 측정하였다.

Sarcoma-180 세포로 복강암을 유발시킨 생쥐의 생존기간 연장효과에서 당귀활혈탕 투여군의 mean survival time은 23.5±10.25일로 대조군의 20.5±5.98일에 비하여 14.63%의 유의성

있는 생존연장률을 보였다(Table 3, Fig. 4)

MTT 검사법에 의한 B16 murine melanoma cells의 당귀활혈탕의 IC<sub>50</sub>은 368.8 $\mu$ g/well로 나왔고, 구성약제별로 보면 천궁이 52.92 $\mu$ g/well, 당귀가 194.0  $\mu$ g/well 지각이 221.3 $\mu$ g/well 향부자 240.3 $\mu$ g/well 건강 253.9  $\mu$ g/well 홍화 270.6  $\mu$ g/well 오약 311.6  $\mu$ g/well 감초 353.3 $\mu$ g/well 계피 1538  $\mu$ g/well 적작약 4316 $\mu$ g/well 목단피 4338  $\mu$ g/well 청피 4957 $\mu$ g/well 생강 23950 $\mu$ g/well 도인 25670  $\mu$ g/well로 나타났고 특히 단방들중에서 천궁과 당귀가 B16 melanoma cells에 강한 독성을 나타낸 것으로 보아 당귀활혈탕 중 세포에 직접작용하는 약제는 천궁과 당귀의 성분으로 추정된다.(Table 4-1, Table 4-2, Fig. 5)

폐전이 흑색종의 집락의 수는 세포전이 후 14일 째에 대조군이 31.20 $\pm$ 17.34개, 당귀활혈탕투여군이 14.20 $\pm$ 9.91개를 나타내어 유의성 있는 감소를 나타내었다(P<0.001).(Table 5, Fig. 6)

고형암의 중량은 대조군의 경우 7.31 $\pm$ 2.26g, 당귀활혈탕투여군의 경우 2.63 $\pm$ 1.69g을 나타내어 유의성 있는 감소를 나타내었다(P<0.05)(Table 6, Fig. 7)

면역반응은 어떤 면역세포 단독으로 일어나는 반응이 아닌 모든 면역세포와 그외의 조직세포등이 함께 관여하여 나타나는 협동작용이라 볼수도 있는데 이때 세포 상호간에 신호전달을 담당하고 있는 물질이 바로 cytokine으로 여기엔 interferon, interleukin, CSFs 등이 속한다. Interleukin의 일부는 단핵식세포 또는 조직세포에 의해서도 생산이 되지만 대부분이 T cell에 의해서 생산되며 이들은 특이한 수용체를 가진 특이한 제한된 그룹의 세포에 작용하여 다른 세포들의 분열과 분화를 자극하는데 이중 IL-2는 T cell과 NK cell에서 유래되어 T cell 및 B cell, 단구를 자극하여 이들을 증식시

키고 활성화시킨다<sup>51)</sup>. IL-2의 생산능을 측정 한 결과 당귀활혈탕 투여군이 429.71 $\pm$ 8.57pg/ml로 대조군에 비하여 상당히 유의성있는 증가를 보여(Table 7, Fig. 8) 당귀활혈탕은 IL-2를 생산하는 T cell 및 NK cell을 활성화시켜 준다고 생각된다.

T cell이나 B cell같은 임파구의 면역반응은 특이적 면역반응으로 어떤 특이한 항원에만 작용하는 단점이 있지만 일단 이에 감작된 경험이 있으면 더욱 활발한 면역반응을 수행할수 있다는 점에 반해 NK cell은 비특이적 면역반응을 수행하는 대표적인 임파구로서 MHC (major histocompatibility complex) 제약을 받지 않을 뿐만 아니라 사전 감작없이도 종양세포를 파괴 할수 있으며 IL-2에 의해 직접적으로 자극되면 더욱 활성화 $\propto$ 폼 | 신선한 종양세포를 살해하고 바이러스 감염세포에 세포독성을 나타내며 IgG 항체로 덮인 표적세포를 살해할수도 있게 된다<sup>52)</sup>. 당귀활혈탕 투여군의 NK-activity를 관찰한 결과 작동세포(spleenic cell)와 표적세포(YAC-1)의 비율이 100:1일 경우 140.2534.18%, 50:1일 경우 101.79 $\pm$ 11.35%, 10:1일 경우 97.72 $\pm$ 11.67%로 대조군의 101.00 $\pm$ 12.70%, 84.99 $\pm$ 10.36%, 59.88 $\pm$ 8.22%의 cytotoxicity에 비하여 유의성있는 증가를 보여주었다.(Table 8, Fig. 9)

이를 종합하여 보면 당귀활혈탕은 sarcoma-180 암세포에 직접적으로 작용하여 이의 성 X揚= 억제시켜 주며 임파구 특히 NK cell에 직접적으로 작용하여 이를 활성화시킴으로써 IL-2의 생산을 증가시키고 종양세포를 살해하여 암환자의 경우 생명연장의 효과를 유발시키는 것으로 사료된다.

## VI. 결 론

당귀활혈탕의 생쥐에 대한 항암효과와 면역 반응에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 생존 기간과 NK-activity, 고형암의 크기, 폐전이 흑색종의 집락수, 시험관내 세포독성능 측정, IL-2의 생산능을 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 擔癌 생쥐의 생존기간 측정에 있어서 당귀활혈탕 투여군은  $23.5 \pm 10.25$ 일로 대조군의  $20.5 \pm 5.98$ 일에 비하여 생존율이 14.63% 증가하여 유의성있는 연장률을 보였다.( $P < 0.05$ )
2. MIT 검사법에 의한 sarcoma-180 세포에 대한 당귀활혈탕의 IC50은  $368.8 \mu\text{g}/\text{well}$  이었다.
3. 고형암 무게 측정에 있어서 당귀활혈탕 투여군이  $2.63 \pm 1.69$ , 대조군이  $7.31 \pm 2.26$ 으로 유의성있게 감소하였다.( $P < 0.05$ )
4. B16 melanoma cell의 폐전이 억제능에서 당귀활혈탕 투여군이  $14.20 \pm 9.91$ 을 보여 대조군의  $31.20 \pm 17.34$ 에 비하여 유의성 있는 감소가 나타났다.( $P < 0.05$ )
5. NK-activity의 측정에 있어서 당귀활혈탕 투여군의 경우 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1, 50:1의 경우에 있어서  $140.25 \pm 34.18\%$ ,  $101.79 \pm 11.35\%$ 를 보여 대조군의  $101.00 \pm 12.70\%$ 와  $84.99 \pm 10.36\%$ 에 비하여 각각 유의성있는 증가를 보였다.( $P < 0.05$ )
6. Interleukin-2의 생산능을 측정한 결과 당귀활혈탕 투여군이  $429.71 \pm 8.57 \text{pg}/\text{ml}$  나 타내 대조군의  $137.93 \pm 13.89 \text{pg}/\text{ml}$ 에 비해 유의성있는 증가를 보였다.( $P < 0.05$ )

이상의 결과를 종합하여 볼 때 당귀활혈탕이 sarcoma-180 세포에 대하여 직접적으로 작용하여 종양세포의 성장을 억제시키는 한편 NK cell과 림프구를 자극하여 활발한 활동을 하여 면역기능을 증강시켜 종양으로 인한 사망을 지연시켜 주는 것을 알수 있었다. 따라서 당귀활혈탕은 항암 및 면역증강에 미치는 영향이 큰 것으로 생각되어 앞으로 이에 대해 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 서울대학교 의과대학 : 腫瘍學, 서울대학교 출판부, pp.1-3, pp.23-24, p.27, pp.137-143, pp.225-234, 1992.
2. Maeda, H. : Carcinogenesis via microbial infection. Gan Tokagaku Ryoho., Vol. 25(10), pp.1474-85, 1998.
3. Cox, R. : The multi-step nature of carcinogenesis and the implication for risk analysis. Int. J. Radiat. Biol., Vol.73(4), pp.373-6, 1998.
4. 김동집 : 免疫療法の 最近 動向, 대한의학 협회지, Vol.23., No.9., p.762.1980.
5. 김진복 : 癌免疫學과 免疫療法, 대한면역 학회지, Vol.8., No.1., pp.2-8.1984.
6. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 행림서원, pp.19,32-42, 1995. 이문호 등 : 최근 한국의 질병 변천, 대한의학협회지, Vol. 32., No.3., pp.283-290.1989.
7. 朴東源 외 : 噎膈. 反胃에 對한 文獻의 考察 (I), 大韓韓醫學會誌, Vol.2.No.1, pp.107-129. 1991.
8. 尹泰汝 외 : 噎膈의 病因에 對한 小考, 大韓韓醫學會誌, Vol.4.No.2, pp.83-86. 1983.

9. 徐政周 : 積聚의 病理에 關한 文獻의 考察, 東醫病理學會誌, Vol.1, pp.42-45, 1984.
10. 申鎮湜 외 : 比較醫學의 側面에서 본 癥瘕의 疾病에 關한 文獻의 考察, 東醫病理學會誌, Vol.1, pp.67-70, 1984.
11. 梁秀烈 외 : 癥瘕의 東西醫學의 考察, 大韓韓醫學會誌, Vol.7, No.1, pp.84-88, 1986.
12. 李京燮 외 : 癥瘕治方에 關한 文獻考察, 大韓韓醫學會誌, Vol.3, No.2, pp.54-62, 1982.
13. 沈範相 외 : 胃癌에서의 辨胡 薑 芩 關한 文獻의 考察, 東醫病理學會誌, Vol.8, pp.295-303, 1993.
14. 吳泰煥 외 : 肺癌에 關한 東西醫學의 文獻考察, 大韓韓醫學會誌, Vol.12, No.2, pp.52-65, 1991.
15. 李東健 외 : 肺癰의 治療에 關한 文獻의 考察, 大韓韓醫學會誌, Vol.13, No.1, pp.9-22, 1992.
16. 許 浚 : 東醫寶鑑(3雜病篇), p.1779, 1994.
17. 金秀鎮 외 : 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 依한 副作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, Vol.8, pp.119-136, 1993.
18. 李南九 외 : 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK細胞의 細胞毒性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol.10, No.2, pp.115-121, 1989.
19. 朴恩貞 외 : 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫反應의 效能에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, Vol.11, No.2, pp.149-165, 1990.
20. 강운호 외 : 數種의 韓藥物이 白鼠의 自然殺害細胞活性에 미치는 影響, 대한한의학회지, Vol.8, No.1., pp.53-74, 1987.
21. 오천식 : 영지, 산자고, 선학초, 권백, 와송이 암세포 감수성에 미치는 영향, 경희한의대는문집, Vol.10., pp.99-116, 1987.
22. 정충영, 최이규 : Windows용 SPSS SPSSWIN을 이용한 통계분석. 무역경영사, pp.197-206, 1996.
23. 林사비나 : 穴位別 溫鍼이 放射線被曝에 의한 免疫機能低下에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol.15, No.2, pp.191-203, 1995.
24. 朴鎮雄 : 濃度差에 따른 黃芪藥針이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol.11, No.1, pp.67-69, 1994.
25. Wilson, T. D. and Miler, J. F. A. P : T and B rosett-forming cells. Eur. J.Immunology, , Vol. 1., pp.501, 1971.
26. Ryn, S. Y., Jeong, K. S., Park, S. J., etc. : Effect oftransferrin on the modulation of cytokine production of mouse spleen cells. In Vivo, Vol. 12(2), pp.187-94, 1998.
27. Takemoto, D. J. : Effect of trichosanthin an anti-leukemia protein on normal mouse spleen cells. Anticancer Res., Vol. 18(1A), pp.357-61, 1998.
28. Iwai, H., Tomoda, K., Hosaka, N., etc. : Induction of immune-mediated hearing loss in SCID mice by injection of MRL/lpr mouse spleen cells. Hear Res., Vol.117(1-2), pp.173-177, 1998.
29. 조철호 : 마우스 악성 흑색종의 실험적 폐전이에 대한 Monophosphoryl Lipid, Polyadenylic-polyuridylic Acid 및 isplatin의 항암효과, 연세의대학위논문집, p.348. 1993.
30. R. I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. Macdinald, A.M.Schumacher, and B.J. Abbot : Protocol for screening chemical Agents and



- Natural products against Animal Tumors and other Biological system(Third Edition), Cancer chemotherapy Reports,pp.48-59. 1972.
31. R.I. Freshney : Culture of animal cells, Wiley-liss,pp.296-298,1994.
  32. 김정범, 안규석 : 大腸癌의 東西醫學的 比較研究, 동의병리학회지, Vol. 9.,No.10., pp.89-128,1995.
  33. 예방의학과 공중보건편찬위원회 : 예방의학과 공중보건, 서울, 계축문화사, pp.549-553, 1998.
  34. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 행림서원, p.19,pp.32-42, 1995.
  35. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠 : 癌腫의 病因病理에 관한 文獻의 考察, 대한한방종양학회지, Vol.1., No.1., pp.83-101, 1995.
  36. 王琦 외 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 정보사, pp.60-61,182,223,1979.
  37. 하북중의의원 : 靈樞經校釋, 중국, 인민위생출판사 하권, p.55, p.142, p.246, p.335, 1982.
  38. 巢元方 : 諸病源候論, 북경, 인민위생출판사, p.575, p.624, p.625, p.879,1983.
  39. 조길편 : 聖濟總錄, 북경, 인민위생출판사, p.213, 1982.
  40. 李梴 : 醫學入門, 서울, 한성사,pp.484-485, 1984.
  41. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 대성문화사, pp.479, 1988.
  42. 洪元植 ; 현대 中共의 癌治療, 서울, 영문사, pp.81-860, pp.373-375,1984.
  43. Bruce E. Johnson M. D., Davis H. Johnson M. D. : Lung cancer, Wiley-liss Inc., pp. 8-9, 1995.
  44. 北京中醫學院 編 : 中醫學臨床病理, 정보사, pp.572, 1983.
  45. 오태환, 정승기, 이연구 : 폐암에 관한 동서의학적 문헌고찰, 대한한의학회지 제12권 제2호, pp.52-65, 1991.
  46. 한재수 외 : 폐적 폐용 폐저 폐암에 관한 문헌적 고찰(원인 증상을 중심으로), 대한한의학회지 제15권 제1호. pp.26-35, 1994.
  47. 윤성목, 하지용 : 식분당이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 한방종양학회지 제2권 제1호, pp.25-42, 1996.
  48. 강재만, 강재춘, 하지용 : 반하후박당이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향, 한방종양학회지 제2권 제1호, pp.57-73, 1996.
  49. 이선구 : 이공산이 마우스 흑색종의 폐전이 억제에 미치는 항암 및 면역작용에 관한 연구, 상지대학교 대학원, 1995.
  50. 이상인 : 본초학, 경희대학교 한의과대학 본초학교실, 학림사, 1986.
  51. 하대유 외 25인 편역 : 면역학 3판, 고문사, 서울, pp.6.13-32, 101-103, 1994.
  52. 이재익 외 : 위암환자에서 세포성면역에 대한 연구, 대한암학회지, Vol.39..No.6., pp.774-782,1990.