

香砂平胃散이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響

하지용 · 조영호 · 이지숙

Antitumor and Immunomodulator Effects of Hyangsapyungwisan in ICR-mice

Jee-Yong Ha, Young-Ho Jo, Jee-Suk Lee

Dept. of Oriental Medicine Graduate school Sangji University

In order to investigate antitumor and immune response effect by Hyangsapyungwisan after Sarcoma-180 cells and methotrexate were treated each other, the extract of Hyangsapyungwisan was orally administered to ICR mice for 14 days.

To evaluate the effects of the Hyangsapyungwisan, 50% inhibition concentration(IC₅₀), mean survival days, tumor weight for antitumor effects, hemagglutinin titer, hemolysin titer, rosette forming cells, natural killer cell activity and productivity of interleukin-2 for immune responses measured in ICR mice.

The results were summarized as follows:

1. Mean survival time in Hyangsapyungwisan-treated group was slightly prolonged, as compared with control group(13.46%).
2. On the MTT assay, cell viability was significantly inhibited by 5 μ g/well, 2.5 μ g/well, 1.25 μ g/well, and 0.625 μ g/well of Hyangsapyung-wisan concentration inhibited cell viability significantly. IC₅₀ for cell viability was 11.59 μ g/well.
3. Tumor weight in Hyangsapyungwisan treated group was depressed, as compared with the control group(P<0.05).
4. Hemagglutinin titer in Hyangsapyungwisan-treated group was slightly increased with no significance, as compared with the control group.

*圓光大學校 韓醫科大學 脾系內科學教室

5. Hemolysin titer in Hyangsapyungwisan-treated group was slightly increased, as compared with the control group($P<0.05$).
6. Rosette forming cells in Hyangsapyungwisan-treated group was slightly increased, as compared with the control group($P<0.05$).
7. Natural killer cell activity in Hyangsapyungwisan-treated group was significantly increased($P<0.05$).
8. Production of interleukin-2 was significantly increased($P<0.05$).

According to the above results, Hyangsapyungwisan had prominent antitumor effects, and enhance both cellular and humoral immunity in mice.

Key words: Hyangsapyungwisan, anti-tumor, immunomodulatory, cell-cytotoxicity, interleukin-2, rosette forming cells, natural killer cell activity.

I. 서 론

오늘날 대부분의 질병 발생과 사망원인이 과거의 급성 전염성 질환에서 순환계, 암, 당뇨, 중풍 등은 만성외향성질환으로 질병 양상이 변화하고 있으며, 특히 평균수명의 증가, 환경오염 등이 암의 발생빈도를 높히고 있고, 또한 진단 기술의 발달로 과거에는 찾아내지 못하던 다양한 암종을 探出해냄으로써, 그 결과 최근까지 급진적으로 증가되어 왔다¹⁾.

암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉 성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것' 이라고 정의되어 있다¹⁾. 福祉部는 '96년도 한국中央癌登錄事業 조사결과에서 '96년도 암등록 환자는 7만2천323명이며 이중의 남자 癌患者는 3만9천565명으로 54.7%이며 여자는 3만2천754명으로 43.5%로 남자 암환자에 비해 9.4%가 적었다. 따라서 '95년에 6만4천761명에 비해서는 11.7%가 증가한 것이며, 10년 전인 1986년에 비해서는 99.9%로 거의 2배로 증가하였다. 한편 장기별 암발생빈도는 위암이 28.8%로 가장 높았으며 다음은 간암이 11.7%, 폐암이 11.5%,

자궁경부암 10.0%, 대장암이 8.2%, 유방암이 5.7%순으로 나타났다. 거의 不治病이라하여 공포의 대상이 되고 있는 암의 발생의 80-90%는 우리 생활주변에 산재해 있는 발암성 화학물질에 의하여 발생하는것으리 조사됐으며 나머지 10-20%는 방사선, 자외선 및 일부 바이러스, 그리고 유전적 요인에 의해서 발생한다고 보고있다. 그러므로 발암성 화학물질 등에 노출을 피한다면 대부분의 암에 의한 발병은 예방될수 있는 것이다. 물론, 공기, 물, 식품속에 들어있는 발암물질중에서 피할수 없는 것이 있으며 또 발암성의 강도는 생활양식에 크게 영향을 받는다는 사실은 예방을 하는데 매우 중요한 것이다²⁾.

이러한 연구의 일환으로 최근에는 양약에 비해 상대적으로 부작용이 적고, 인체의 면역증강 및 조절의 효과가 있다고 인정되는 한약의 항종양효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 韓醫學系의 動向 역시, 면역기능의 증강을 목적으로 扶正固本과 扶正祛邪의 兩部類의 治療方法을 爲主로 실험적 연구가 진행되고 있다^{3,4,5,6,7,8,9,10)}. 한의학에서는 암의 질병범주로 乳岩 腎岩 榮膈 舌菌 失榮 癭瘤 石疽 石癭 石

瘕 등의 可視的인 體表的 癍과 癥瘕 積聚 噎膈 反胃 痞氣 茯苓 腸覃 疝瘕 痔漏 등의 內部臟器的 癍을 들 수 있다^{11,12)}. 암의 발생은 질병 발생의 일반적인 규율¹³⁾과 마찬가지로 원발성 원인으로 風·寒·暑·濕·燥·火의 외감원인과 정지울결(情志鬱結)·음식상(飮食傷)·과로(過勞)의 내상원인이 있고, 속발성 원인으로 담음(痰飲)·어혈(瘀血)로 분류하고 있다¹⁴⁾.

암에 대한 치료법으로는 공(攻)·소(消)·산(散)·제(制)·보(補) 등의 방법이나 서간리기(舒肝理氣)·강역지구(降逆止嘔)·활혈화어(活血化瘀)·리기화결(理氣化結)·건비조습(健脾燥濕)·화담산결(化痰散結)·양음청열(養陰清熱)·생진화담(生津化痰)의 방법을 사용하고 있다¹⁵⁾.

서양에서의 면역이란 인체내에서 어떤 요인으로 인하여 이물의 침입이나 변이세포가 발생하면 생체방어물질, 즉 면역체계가 관여하여 이물은 물론 세포이 발생된 변이세포를 비자기로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상으로서 항원자극에 의해 항체가 만들어지는 면역반응을 항체매개면역 또는 체액성면역이라하고 항원자극을 받은 T임파구나 B임파구가 만들어낸 여러 단백질에 의한 면역반응을 세포매개면역 또는 세포성면역이라 한다¹⁶⁾.

이에 著者는 方藥合編 下統二十四에 나오는 '香砂平胃散'의 처방이 항암과 면역작용에 적용될 수 있을 것으로 추측되어 실험에 임하였다. 본 연구에서는 암을 유발시킨 雄性생쥐에 향사평위산검액을 투여하여 항암효과 및 면역능을 측정하였다. 측정항목은 복강암생쥐의 생존율 측정, MTT법에 의한 시험관내 세포독성능 측정, IC₅₀(50% Inhibition concentration), 고형암의 무게측정, 적혈구응집소가의 측정, 적혈구용혈소가의 측정, Rosette 형성세포수의 측

정, NK cells의 활성화도 측정 그리고 In interleukin-2의 생산능을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 (주)대한실험동물센터에서 4주령의 체중 25g내외의 ICR계 웅성 생쥐를 분양받아 항생제가 첨가되지 않은 고형사료(삼양사료(주), 한국, 표 1)를 물과 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 향사평위산을 구성하는 약재를 건조된 상태로 구입하여 잡질을 제거하고 형태가 완전한 것만을 정선하여 사용하였다. 향사평위산의 구성약재와 1첩 분량은 Table 2와 같다.

Table 2. Prescription of Hangsapunuisa.

Herbal Name	Scientific Name	Unit(g)
창출	ATRACTYLOIDS RHIZOMA	8.0
진피	AUTANTII NOBILIS PERICARPIUM	4.0
향부자	CYPERI RHIZOMA	4.0
지실	PONCIRI FRUCTUS	3.2
곽향	AGASRTACHIS HERBA	3.2
후박	MACHILI CORTEX	2.8
사인	AMOMI SEMEN	2.8
목향	HELENII RADIX	2.0
감초	GLYCYRRHIZAE RADIX	2.0
Total Amount		32.0

2. 실험방법

1) 향사평위산의 조제

실험에 사용할 10첩 분량의 향사평위산 320g을 3000ml의 등근 플라스크에 증류수 1700ml과 함께 넣어 3시간동안 전탕한 후 8겹의 거즈로 여과시킨후 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 경우는 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 제거하고 건조엑스를 적정농도로 새로 만들어 사용하였다.

2) 검액의 투여

10첩분량에서 얻은 엑스가 65g으로 이를 60kg의 사람이 5일동안 복용할 용량이며 마우스의 평균무게가 25g이므로 마우스의 1일 복용량은 5.4mg이다. 이를 근거로 향사평위산투여군에는 향사평위산 엑스를 5.4mg/0.2ml 투여하고 대조군에는 같은 량의 생리식염수를 1일 1회 14일간 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) 1ml를 증류수에 넣고 1000ml로 조정 한후 pH를 7.2로 맞춘후 0.22µm disposable sterile bottle top filter(Cornuig, 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

ICR계의 생쥐에 복강암을 유발시키기 위한 암세포주는 한국세포주은행에서 S-180 murine sarcoma cells을 분양받아 실험에 사용하였다.

5) 고형암 유발과 약물투여

실험적 복강내 고형암을 유발하기 위해서 실험에 사용될 S-180세포를 배양시킨 후 PBS로 3회 세척하여 2×10^6 cells/ml로 조정하고, 충분히

Vortexing하여 세포들이 끌고루 섞이도록 한 후 10분동안 실온에 방치하여, 종피상의 세포들을 침전시킨 후 ICR계생쥐의 복강내에 27궽” Gauge 주사기로 0.2ml씩 정확히 주입하여 복강압을 유발시켰다. 하루 경과 후 향사평위산투여군은 0.2ml씩 매일 경구투여하였고, 대조군은 같은 양의 0.9% 생리식염수(중외제약)를 매일 경구투여하였다.

6) 면양적혈구에 대한 항체 유발

생리식염수 및 향사평위산을 1주 1회 14일간 경구투여한 후 대조군과 실험군의 복강내 5×10⁸cells/ml의 농도로 조정된 면양적혈구 부유액을 0.2ml를 주사하여 면역시켰다. 면양적혈구(Alsever sheep red blood cell)는 4℃에서 보존하였으며, 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다.

7) 면역기능저하 유발

면역기능저하 유발은 검액을 14일간 경구투여한후 실험군 및 대조군에 methotrexate(유한메토티레세이트정, 유한양행) 1ml/kg을 1일 1회 4일간 경구투여하여 면역기능저하를 유발시켰다.

8) 채혈 및 혈청의 분리

생쥐를 ether로 마취하여 해부판에 고정하고 1회용 주사기로 심장에서 약 1ml 채혈한 다음 5ml plastic tube에 옮긴 후 1시간동안 실온에서 방치하고 작은 유리병으로 응고된 혈액을 수회저은 후 원심분리기로 2000rpm에서 30분간 원심분리시켜 상층의 혈액을 다른 tube에 취하였다. 이 혈청을 56℃에서 30분간 비동화 시킨후 적혈구응집소와 적혈구용혈소의 측정에 사용하였다. 적혈구용혈소가 측정에 보체로 사용된 가토의 혈청도 상기와 같은 방법으로 분리하여 비동화하지 않은 상태로 사용하였다.

9) 생쥐 비장세포의 준비

생쥐를 경추탈골로 처사시킨후 복부를 알콜로서 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 뒤, 비장주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4℃ RPMI-1640배지(Gibco, USA)로 2회 세척한 다음 cell dissociator sieve-tissue grinder kit(Sigma, USA)를 사용하여 잘게 으갠후 조직파편을 제거하고 RPMI-1640으로 3회 세척하였다. 그후 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.

Ⅲ. 측정 항목

1. 생존기간 관찰

계대용 생쥐의 복강에 S-180 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 4×10⁶cells/ml로 조정하여 대조군과 향사평위산 투여군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일동안 복강압의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강압이 유발되지 않은 경우는 생존을 계산에서 제외하였다. Geran 등¹⁷⁾이 기술한 다음의 방법에 의하여 구한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

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

$$\text{생존증가율} = \frac{T - C}{C}$$

X : 생존수가 전체동물의 ½이 되는 최초의

시간(일)

Y : 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(일)

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

T : 실험군의 median survival time(일)

C : 대조군의 median survival time(일)

2. 시험관내 세포독성능 측정

항사평위산의 시험관내 세포독성능을 측정하기 위하여 Freshney 등¹⁸⁾이 개발한 MTT법을 변형하여 실시하였다. 지수증식기의 CT 세포를 1×10^4 cells/ml로 조정 한 다음, 96 well microtitration plate(Falcon, USA)에 180μ 의 세포부유액과 20μ 의 항사평위산을 넣었다. 항사평위산의 농도는 최초의 농도를 5μ g/well로 조정 한 후 2배씩 희석시켜서 사용하였으며, 96 well microtitration plate에 분주직전에 0.22μ m의 syringe filter로 여과하여 사용하였다. 이후 3-4 일간 37°C , 5% CO_2 의 incubator에서 배양하면서 수시로 위상차현미경으로 항사평위산이 처리되지 않은 세포의 증식정도를 관찰하여 대조 well의 세포들이 충분히 성장하면 배양액을 제거하고 각 well에 20μ 의 MTT 용액(5mg/ml in PBS, Sigma, USA)을 넣고 37°C 5% CO_2 배양기에서 3시간 배양하였다. 그 후 100μ 의 0.04M HCl(in propan-2-ol)을 넣어 MTT 용액과 반응하여 생긴 푸른색의 formazan결정을 완전히 녹인 후 30분 안에 ELISA 판독기(Emax precision mBALB/coplate reader, Molecular devices, USA)를 이용하여 540nm 에서 흡광도(Optical Densitity)를 측정하였다. 이때 참고파장으로 650nm 를 이용하였다. 각 실험은 4개의 well을 사용하여 그 평균치를 구하였고, 동시에 동일 실험을 반복하여 두차례 실시 후 아래의 공식

과 같이 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

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

IC_{50} (50% inhibition concentration)은 생존율에 의거하여 구하였다. 즉, MTT검사법에서 흡광도가 대조 well에 비하여 50% 감소하는 값을 의미하는 IC_{50} 은 약물의 농도를 X축으로, 각 well의 흡광도에서 환산한 생존율을 Y축으로 설정하여 다중회귀방정식에 의하여 산출하였다.

이상의 내용을 도식화하면 Figure 1과 같다.

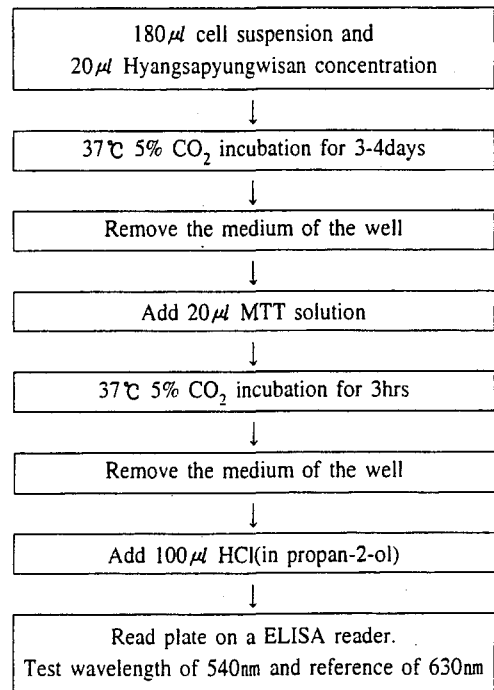


Fig. 1. Flow chart for measurement of In vitro cytotoxicity

3. 고행암 생성 억제능 측정

실험적 고행암의 무게측정실험은 S-180세포를 ICR계생쥐에 주입한 후 14일 동안 매일 항사평위산을 경구투여 하였고, 각 실험군의 복강내에 생성된 고행암을 적출하여 무게를 측정하였다.

4. 적혈구응집소가의 측정

면양적혈구에 대한 응집소가를 측정하기 위하여 생쥐의 심장에서 채혈한 혈액을 분리하여 얻은 혈청을 56℃에서 30분간 비동화시키고 microtitration plate의 각 well에 인산염완충식염수로 2배 계열희석한 혈청 25 μ 에 0.5% 면양적혈구 부유액을 50 μ 씩 가하여 잘 혼합한다음 37℃ 5% CO₂ 배양기내에서 18시간 배양한 후 적혈구응집반응을 관찰판독하였으며, 적혈구응집반응을 일으키는 혈청의 최대희석배수를 응집소가로 측정하였다.

5. 적혈구용혈소가의 측정

면양적혈구에 대한 용혈소가를 측정하기 위하여 위의 방법으로 비동화시킨 혈청을 microtitration plate의 각 well에 PBS로 2배 계열희석한 혈청 25 μ 에 0.5%면양적혈구 부유액을 50 μ 씩 가한 다음 각 well에 보체로서 5배 희석한 가토의 혈청을 25 μ 씩 가하여 잘 혼합하고 37℃ 5% CO₂ 배양기내에서 1시간동안 방치한 후 면양적혈구가 완전히 용혈을 일으키는 최대희석배수를 용혈수가로 산정하였다.

6. Rosette형성세포수의 측정

Rosette형성세포의 측정은 Bach등 방법¹⁹⁾에

준하여 측정하였으며 원심세척한 비장세포부유액을 1 \times 10⁷cell/ml의 농도로 조정 한 것과 3 \times 10⁸cells/ml 농도로 조정 한 면양적혈구부유액을 12 \times 75mm plastic tube에 각각 0.5ml씩 넣고 혼합하여 원심분리기로 980rpm에서 5분간 원심분리시킨 후, 4℃ 냉장조에서 30분간 방치 후 HBSS 1ml를 가하면서 세포를 재부유시킨 다음 세포부유액을 혈구계산판위에 한 방울 떨어 뜨리고 450배율로 검경관찰하였다. 비장세포에 면양적혈구가 4배이상 부착된 경우를 Rosette형성세포로 정하여 10⁶비장세포당 10³ Rosette형성세포수를 산정하였다.

7. NK-activity 측정

1) 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

2) 표적세포의 준비

NK cell의 살해능측정시의 표적세포는 한국세포주은행에서 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 cytotox96TM non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, USA)를 이용

하여 가시광선영역의 파장(490nm)으로 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

(2) 대조 Well의 준비

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

(3) 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 5×10^4 cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well mBALB/cotitration plate에 well당 100 μ 씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10%첨가된 혼합배지에 각각 5×10^6 cells/ml, 2.5×10^6 cells/ml, 5×10^5 cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 μ 를 분주하여 최종부피가 200 μ /well이 되도록 한후 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100 μ 당 10 μ 의 용해용액($\times 10$)을 첨가하고 배양 종료시 250 \times g로 4분간 원심분리한후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 μ 옮긴 후, assay

buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든후 각 well에 50 μ 씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 μ 의 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 빼고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 뺐다. 즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였으며 이상을 도식화하면 Fig. 2와 같다.

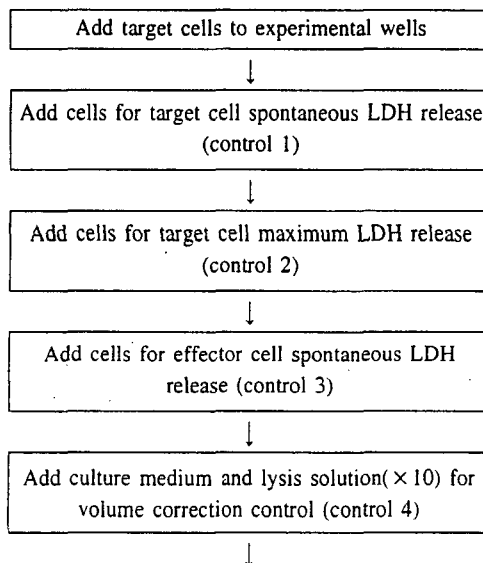
$$\% \text{ Cytotoxicity} = (A-B)-C \text{ OVER } D-C \times 100$$

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



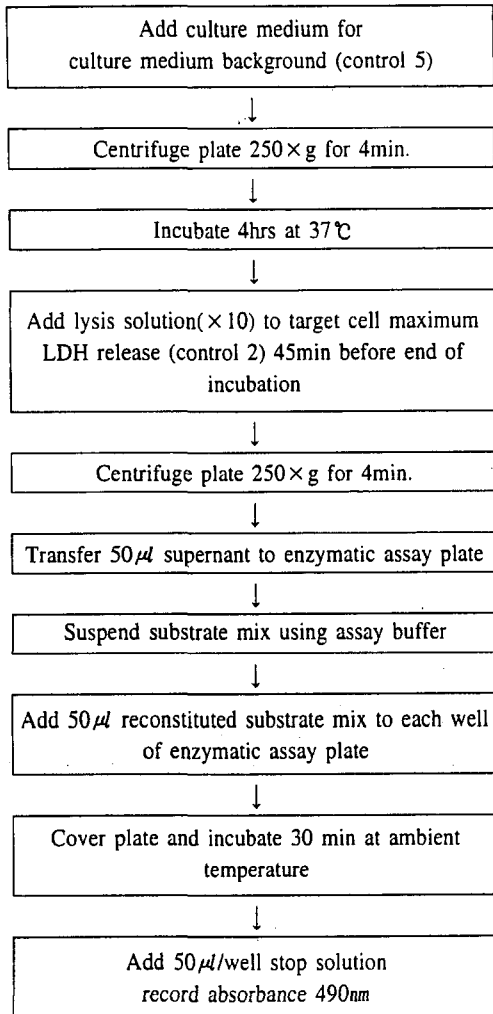


Fig. 2. Flow chart for measurement of NK-activity.

8. Interleukin-2 생산 및 측정

14일동안 검액처리후 면역기능저하를 유발시킨 ICR계생쥐를 치사하여 비장을 적출한 다음, 비장세포를 FBS가 10%첨가된 혼합배지에 5×10^6 cells/ml의 농도로 재부유하고, 여기에 concanavalin-A(Sigma, USA)를 100 μ g/ml의 농도

로 가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다.

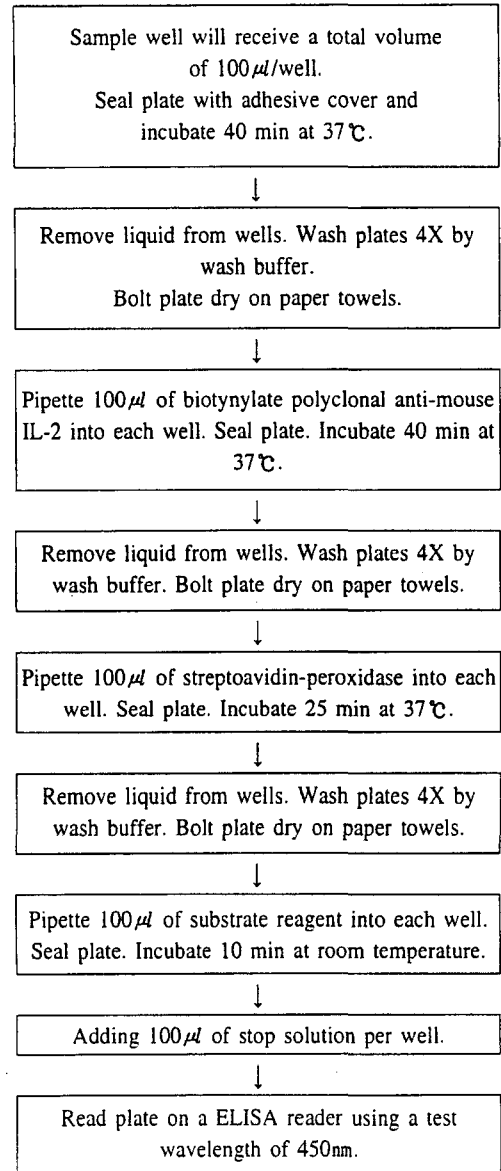


Fig. 3. Flow chart for measurement of IL-2 production

생쥐 IL-2의 측정은 intertest-2X Kit(Genzyme, USA)를 이용하여 측정하였다. Intertest-2X kit는 고형상 면역효소측정법을 이용한 mouse IL-2측정용 ELISA Kit로서 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2양을 산정할 수 있는 방법이다. 96 well plate의 각 well에 시료를 100 μ 씩 분주하고 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척한 후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 biotinylated polyclonal antimouse IL-2를 100 μ 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 μ 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 μ 씩 분주하여 다시 덮개로 덮은 후 상온에서 10분간 배양하였다. 다시 각 well에 정지용액을 100 μ 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 검정하였다²⁰⁾. 그 결과가 P<0.05 수준인 경우 유의성이 있다고 보았다.

IV. 실험 결과

1. 생존율 측정

항사평위산의 생존율 측정 실험결과는 Table 3, Fig. 4와 같았다. 대조군의 평균생존일수는 20.8 \pm 3.04일이었으나 항사평위산투여군은 23.6 \pm 3.65일로 유의하게 증가하였다(P<0.05). Median survival time은 각각 20일과 23일로서 항사평위산투여군에서 대조군에 비하여 13.46%의 생명연장 효과를 보였다.

Table 3. The Median Survival Days

Groups	Route	No. of animals	Median Survival Time(days) ^{a)}	ILS(%) ^{b)}
Control	P.O	10	20.8 \pm 3.04	
Treated	P.O	10	23.6 \pm 3.65	13.46

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean \pm Standard Deviation

b) ILS : Increase of Life Span=(Treated G.-Control G.)/Control G. \times 100

* : P<0.05

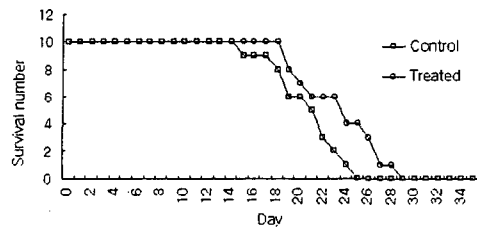


Fig. 4. Median survival curve with

Hyangsapyungwisan in vivo

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

2. 시험관내 세포독성능 및 IC₅₀

Sarcoma-180cells의 향사평위산의 세포독성능은 11.59 $\mu\text{g}/\text{well}$ 로 나왔고, 각각의 단일약들에 대한 세포독성능은 Table 4-2에서 나타난 바와 같이 238.00 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서 958.43 $\mu\text{g}/\text{well}$ 까지 넓은 범위의 세포독성능을 보였다. 특히 단방들중에서 창출과 곽향이 sarcoma-180cells에 강한 독성을 나타내었다.

Table 4-1. IC₅₀ Value of Hyangsapyungwisan.

복합재제	IC ₅₀
향사평위산	11.59

(Unit: $\mu\text{g}/\text{well}$)

Table 4-2. IC₅₀ Values of each Drug

단일재제	IC ₅₀
창 출	238.00
진 피	907.12
향부자	679.74
지 실	778.24
곽 향	485.65
후 박	689.51
사 인	877.12
목 향	958.43
감 초	953.42

(Unit: $\mu\text{g}/\text{well}$)

3. 고형암의 무게측정

고형암의 무게측정은 Table 5, Fig. 5과 같다. 고형암 종양을 적출하여 중량을 측정한 결과 대조군 8.60 \pm 0.98g, 향사평위산투여군은 4.03 \pm 1.44g을 나타내어 53.17%의 유의하게 감소하였다(P<0.05).

Table 5. Weight of Solid Tumor Induced by S-180 sarcoma cells

Groups	Route	No. of animals	Weight of Solid tumor(g) ^{a)}	Inhibition rate(%) ^{b)}
Control	P.O	10	8.60 \pm 0.98	
Treated	P.O	10	4.03 \pm 1.44	53.17*

(Unit:g)

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean \pm Standard Deviation

b) : Inhibition rate = $\{(\text{대조군} - \text{실험군}) / \text{대조군}\} \times 100$

* : P<0.05

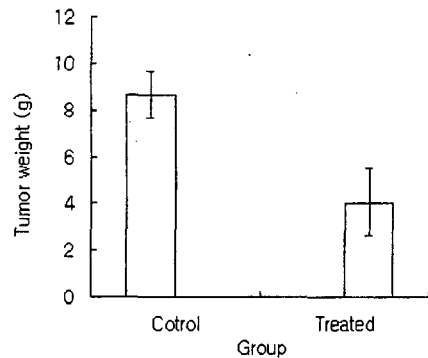


Fig. 5. Weight of solid tumor induced by S-180 sarcoma cells

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

4. 적혈구응집소가의 측정

적혈구응집소가의 측정결과는 Table 6과 같다. 대조군과 실험군간의 면양적혈구에 대한 응집소가를 측정하여 log2값으로 계산하였던 바, 대조군이 3.96 \pm 0.70, 향사평위산투여군은

5.50±1.02 로 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다.

Table 6. Effects of Hyangsapyungwisan on the hemagglutinin titer in methotrexate pretreated mice at 24hrs after challenge with SRBC.

Groups	Route	No. of animals	Hemagglutinin ^{a)}
Control	P.O	10	3.96±0.70
Treated	P.O	10	5.50±1.02

(Unit:Log2 titer)

Control group : Treated with 0.9% saline
Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean ± Standard Deviation

* : P<0.05

5. 적혈구용혈소가의 측정

적혈구용혈소가의 측정결과는 Table 7과 같다. 대조군과 실험군간의 면양적혈구에 대한 용혈소가를 측정하여 log2 값으로 계산하여, 대조군이 4.00±0.93, 향사평위산 투여군은 6.29±0.74 로 대조군에 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였다(P<0.05).

6. Rosette 형성세포수의 측정

Rosette형성세포수의 측정은 Table 8과 같다. 면역반응 세포수를 비교하기 위해 비장세포에 면양적혈구가 4개 이상 부착된 경우를 Rosette형성세포로 정하여 10⁶비장세포당 10³ Rosette형성세포수를 산정한 결과 대조군은 24.44±2.01, 향사평위산투여군은 35.33±2.17을 보였다.

Table 7. Effects of Hyangsapyungwisan on the hemolysin titer in methotrexate pretreated mice at 24hrs after challenge with SRBC.

Groups	Route	No. of animals	Hemolysin ^{a)}
Control	P.O	10	4.00±0.93
Treated	P.O	10	6.29±0.74*

(Unit:Log2 titer)

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean ± Standard Deviation

* : P<0.05

Table 8. Effects of Hyangsapyungwisan on the appearance of rosette forming cells in methotrexate pretreated mice at 24hrs after challenge with SRBC.

Groups	Route	No. of animals	10 ³ RFC/10 ⁶ spleen cells ^{a)}
Control	P.O	10	24.44±2.01
Treated	P.O	10	35.33±2.17*

(Unit:Log2 titer)

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean ± Standard Deviation

* : P<0.05

7. NK cells 활성화 측정

NK cells의 활성화 측정은 Table 9와 같다. 대조군은 작동세포와 표적세포의 비율에 따라

100:1일 때 56.14 ± 7.08 , 50:1일 때 45.94 ± 5.04 , 10:1일 때 35.84 ± 5.95 이었으며, 향사평위산투여군인 실험군은 100:1일 때 78.61 ± 10.90 , 50:1일 때 60.36 ± 8.06 , 10:1일 때 44.74 ± 6.90 이었다. 모두 활성도가 높게 나타났으나 각 군의 비교시 100:1에서 유의성있게 실험군이 대조군보다 NK cells 활성도가 높은 것으로 나왔다.

Table 9. Activity of NK cells

Groups	Route	No. of animals	Cytotoxicity ^{a)}		
			100:1 ^{b)}	50:1	10:1
Control	P.O	10	56.14 ± 7.08	45.94 ± 5.04	35.84 ± 5.95
Treated	P.O	10	$78.61 \pm 10.90^*$	60.36 ± 8.06	44.74 ± 6.90

(Unit:%)

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean \pm Standard Deviation

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

* : P<0.05

8. Interleukin-2의 생산능 측정

Interleukin-2의 생산능 측정은 Table 10, Fig. 6과 같다. Interleukin-2의 생산능을 측정하기 위하여, 향사평위산을 14일간 경구투여한 후 정상군, 대조군, 향사평위산 투여군의 비장세포를 사용하여 Concanavalin-A 자극 후 24시간 배양하여 측정한 결과를 보면 향사평위산투여 후 정상군이 177.58 ± 17.06 pg/ml, 대조군이 157.75 ± 6.09 pg/ml, 실험군은 313.79 ± 14.62 pg/ml을 나타내었다. 대조군이나 정상군에 비해 실험군은 Interleukin-2의 생산능에서 유의성있는 증가를 나타내었다(P<0.05).

Table 10. Production of Interleukin-2 on S-180 sarcoma bearing mice.

Groups	Route	No. of animals	Interleukin-2 ^{a)}
Normal	P.O	10	177.58 ± 17.06
Control	P.O	10	157.75 ± 6.09
Treated	P.O	10	$313.79 \pm 14.62^*$

(Unit:pg/ml)

Normal group : Non-treated mice

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

P.O : Oral administration

a) : Mean \pm Standard Deviation

* : P<0.05

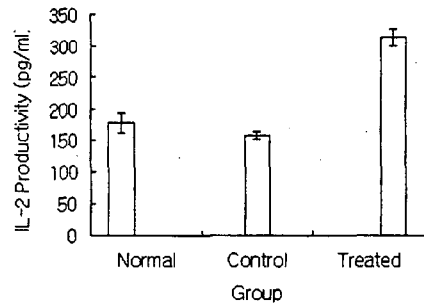


Fig. 6. Production of Interleukin-2 on S-180 sarcoma bearing mice.

Normal group : Non-treated mice

Control group : Treated with 0.9% saline

Treated group : Treated with Hyangsapyungwisan (200mg/kg)

V. 고 찰

한의학에서 말하는 '癌'이란 그 종괴가 암석과 같이 단단하고 형상이 불규칙적이어서 명명된데 비하여²¹⁾ 현대의학에서 말하는 암, 즉 중

양의 개념은 '자율성을 지닌 조직의 과잉발육'을 뜻하며 정상조직과 증식의 균형을 이루지 못하고 그러한 변화를 일으키는 자극이 없어도 계속적인 증식이 진행되는 모든 것을 통틀어 말한다²²⁾.

오늘날 과학의 발달에 따른 의학의 진보와 인간생활의 변화는 과거 전염성질환의 감소를 가져온 반면 각종 성인병과 종양성 질환의 증가를 가져왔으며, 특히 봉양발생의 빈도는 최근 급격히 증가하여 왔다. 福祉部는 '96년도 한국中央癌登錄事業 조사결과에서 '96년도 암등록 환자는 7만2천323명이며 이중의 남자 癌患者는 3만9천565명으로 54.7%이며 여자는 3만2천754명으로 43.5%로 남자 암환자에 비해 9.4%가 적었다. 따라서 '95년에 6만4천761명에 비해서는 11.7%가 증가한 것이며, 10년 전인 1986년에 비해서는 99.9%로 거의 2배로 증가하였다. 한편 장기별 암발생빈도는 위암이 28.8%로 가장 높았으며 다음은 간암이 11.7%, 폐암이 11.5%, 자궁경부암 10.0%, 대장암이 8.2%, 유방암이 5.7%순으로 나타났다²⁾.

일찍이 한의학에서는 殷墟의 갑골문에서 瘤라는 글이 나온 이래로²³⁾ 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積 등을 內經에서 자세히 기술하였고 역대 의서에서 癭瘤, 陰菌, 石疽, 失榮, 惡核, 喉疳, 芽疳, 舌疳, 兔脣, 缺盆疽 등 종양의 위치와 병리적 특성에 따라 다양하게 기술하고 있다²⁴⁾.

종양의 원인에 대해서 黃帝內經^{25,26)}에서는 虛와 寒氣, 熱로 보았고 巢元方은 陰陽不和로²⁷⁾, 趙佶編은 溜滯라 하였고²⁸⁾ 李梴은 外感內傷으로²⁹⁾ 張介賓은 內虛³⁰⁾ 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 있다³¹⁾.

방약합편에 飢寒위산은 傷食을 다스린다

고 하였으며, 이를 구성하는 약재의 각각의 효능 및 주치는 다음과 같다.

蒼朮의 性은 溫無毒하고 味는 苦辛하며, 肺·脾·胃·大腸·小腸으로 歸經하며, 燥胃強脾·發汗除濕·能升發胃中陽氣의 效能이 있으며^{32,33)}, 陳皮는 性은 溫無毒하고, 味는 苦辛하며, 脾·肺·胃에 歸經하며, 理氣調中, 燥濕化痰하는 作用을 하며, 각종 腫瘤에 대해 일정한 정도의 緩解作用이 있다. 胃癌, 原發性肝癌, 鼻咽喉癌, 晚期骨肉腫을 治療하고 免疫機能을 增強시킨다^{32,33)}. 香附子의 性은 溫無毒하고 味는 辛微甘苦하며, 肝兼肺·三焦에 入하며, 調氣開鬱하는 良品이며, 通行十二經脈氣分의 效能이 있다^{32,33)}. 枳實은 性이 微寒無毒하며, 脾·胃에 入하며, 能破氣, 行痰喘止, 痞脹消, 刺痛息, 後重除의 效能이 있다^{32,33)}. 藿香은 性이 微溫無毒하며, 味辛하며, 肺·脾에 入하며, 兼하여 胃經에 入하고, 快氣和中, 開胃止嘔, 去惡氣, 進飲食의 效能이 있다^{32,33)}.

厚朴은 性이 溫無毒하며, 味는 苦辛하고, 脾胃二經 兼 大腸經에 入한다. 能瀉實滿, 能散濕滿, 平胃調中, 消痰化食의 效能이 있다^{32,33)}. 砂仁의 性은 溫無毒하고, 味는 辛하며, 肝·腎·脾·胃에 入하며, 兼하여 肺·大腸·心包에 入하고, 和胃醒脾, 快氣調中, 通行結滯의 效能이 있다^{32,33)}. 木香의 性은 溫無毒하고, 味는 辛苦하며, 三焦·肝·脾에 入하고, 利三焦, 破氣滯, 升降諸氣, 泄肺氣, 疎肝氣, 和脾氣의 效能이 있다^{32,33)}. 甘草의 性은 平無毒하며, 味甘하며, 肝·脾에 入하고, 緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하고, 中氣不足에 使用하며, 纖維上皮癌, 食道癌, 脊髓腔腫瘍, 胃癌, 舌癌, 肺癌, 乳腺癌을 治療하는데 이용한다. 또한 鎮痛作用이 있어 癌性疼痛을 除去하는데 補助作用을 할 수 있고, 免疫增強作用이 있다^{32,33)}.

면역학적으로 임파구는 T세포와 B세포로 나

뉘며 T세포는 다시 기능이 많은 아세포로 이루어져 있다. 성숙한 T세포는 다양한 기능을 가지며 항원인식과 면역반응의 성립에 중요한 작용을 하는데 이들의 기능은 한 종류의 T세포에 할당되어 있는 것이 아니고 각각 다른 T세포의 아세포에 할당되어 있다. T세포의 아세포에는 보조 T임파구, 억제 T임파구, 세포독성 T임파구, 지연형과민면역반응 T임파구로 구성되어 있으며 그중에서 보조T임파구는 여러 종류의 사이토카인을 생산하여 B임파구가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 또한 세포매개면역반응의 행동세포인 세포독성 T임파구가 잘 생기도록 도와주며 억제 T임파구는 필요이상으로 항체 또는 행동세포인 세포독성 T임파구가 생산되는 것을 제재하여 적절한 면역반응이 일어나도록 조절하는 기능을 갖고있으며 세포독성 T임파구는 표적이되는 세포와 직접 접촉하여 표적세포를 파괴하는 작용을 한다³⁴⁾. 이러한 T임파구에는 항원전달세포가 제공하는 항원정보를 받는 특수문자가 있어 이를 T임포 수용체라하며 이것은 TCR1와 TCR2으로 구분된다. 이 중 TCR2를 가진 말초세포가 특이표식인자로서 CD4분자를 갖고있는 즉 CD4⁺인 T세포는 보조 T임파구로서 여러 종류의 Cytokine을 생산하여 B임파구가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 또한 세포매개면역반응의 행동세포인 세포독성 T임파구(cytokine T lymphocyte)가 잘 생기도록 도와주는 등의 면역기능을 보조하는 역할을 담당한다^{35,36,37)}. 본 연구에서는 항사평위산의 항암효과를 측정하기 위하여 생쥐의 생존을 검사와 시험관내 세포독성실험을 수행하였으며 면역조절작용을 살펴보기 위하여 적혈구 용血素價 및 凝集素價, NK-activity, 임파구 증식반응, IL-2생산능을 측정하였다. Sarcoma-180세포로 복강암을 유발시킨 생쥐의 생존기간 연장효과에서 항사평위산

투여군의 mean survival time은 23.60 ± 3.65 일로 대조군의 평균생존일수는 20.80 ± 3.04 일에 비하여 유의성있는 증가를 보였고($P < 0.05$), Median survival time은 각각 20일과 23일로서 항사평 위산투여군에서 대조군에 비하여 13.46%의 생명연장 효과를 보였다(Table 3, Fig. 4).

MTT 검사법에 의한 sarcoma-180 세포에 대한 항사평위산의 세포독성능(IC₅₀)은 $11.59 \mu\text{g}/\text{well}$ 로 나왔고, 각각의 단일재제들에 대한 세포독성능은 Table 4-2에서 나타난 것과 같이 $238.00 \mu\text{g}/\text{well}$ 에서 $958.43 \mu\text{g}/\text{well}$ 까지 넓은 범위의 세포독성능을 보였다. 특히 단일재제중에서 창출과 광향이 sarcoma-180cells에 강한 독성을 나타낸 것으로 보아 항사평위산중 세포에 직접 작용하는 약제는 창출과 광향의 성분으로 추정된다(Table 4-1, Table 4-2).

고형암의 무게 측정은 대조군의 경우 $8.60 \pm 0.98\text{g}$, 항사평위산투여군은 $4.03 \pm 1.44\text{g}$ 을 나타내어 53.17%의 유의성있는($P < 0.05$) 감소를 보였다(Table 5, Fig. 5).

여기서, 체액성면역운동으로서 항체생성능을 비교하기 위하여 적혈구 표면항원과 그에 대한 항체와의 결합에 의하여 생기는 응집반응을 보는 적혈구응집소와 적혈구표면항원과 항체의 결합체에 이종의 보체가 가해짐으로써 생기는 용혈반응을 보는 적혈구용혈소가를 측정하였다^{38,39)}. 대조군과 실험군간의 면양적혈구에 대한 응집소가를 측정하여 log₂값으로 계산하였던 바, 대조군이 3.96 ± 0.7 , 항사평위산 투여군은 5.5 ± 1.02 로 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다(Table. 6). 용혈소가는 대조군이 4.0 ± 0.93 , 항사평위산 투여군은 6.29 ± 0.74 로 대조군에 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였다($P < 0.05$)(Table 7).

인체의 T세포와 면양적혈구가 결합하는 현

상을 보는 rosette형성실험은 T세포의 분리 및 배포를 측정하는 방법으로서 세포주면역반응을 측정하는 간접적인 방법으로 사용된다⁴⁰⁾. 항원인 면양적혈구에 대한 대조군과 실험군간의 면역반응 세포수를 비교하기 위해 비장세포에 면양적혈구가 4개이상 부착된 경우를 rosette형성세포로 정하여 10⁶개의 비장세포당 10³개의 rosette형성세포수를 산정한 결과 대조군은 24.44±2.01, 향사평위산투여군은 35.33±2.17을 보였다(Table 6).

면역감시기능의 주역제를 맡고 있다고 알려진 T와 B림파구 그리고 이들의 Subset 림파구 이외에 항원에 사전감작없이 그리고 주요조직적복합체(Major histocompatibility complex: MHC)제한현상없이 종양세포를 인지하고 비특이적인 자발성 또는 자연성 세포독성(Spontaneous or natural cytotoxicity)을 나타내어 종양세포를 파괴하기 때문에 종양에 대한 면역감시기능에 있어서 제 1선을 담당하고 있다고 할수 있는 작동세포를 말초혈림파구이며 이를 자연살해세포(Natural Killer cells)라고 하는데, 세포표면에 B림파구나 T림파구의 특이적인 표식인자를 가지지 않으며 과거 감작을 받지 않은 암세포나 바이러스에 감염된 세포도 인지하여 타파할 수 있다. 정상적으로 존재하는 순종마우스에서 NK세포수가 감소함에 암발생율이 높아지고 암환자에서 NK세포기능이 현저히 저하되어 있는 점으로 보아 종양에 대한 면역감시에 NK세포가 중요한 역할을 하는것을 알 수 있다^{41,42,43)}. NK세포의 활성화는 NK세포의 숫자가 아닌 표적세포와의 결합능력, 결합된 표적세포의 상해능력, 한 개의 작동세포가 몇 개의 표적세포를 상해시킬수 있는가에 따라 좌우되는 것으로 사려된다. 향사평위산투여군의 NK-activity를 관찰한 결과 작동세포(spleenic cell)와 표적세포(YAC-1)의 비율에 따라 100:1

일 때 56.14±7.08, 50:1일 때 45.94±5.04, 10:1일 때 35.84±5.95이었으며, 향사평위산투여군인 실험군은 100:1일 때 78.61±10.90, 50:1일 때 60.36±8.06, 10:1일 때 44.74±6.90이었다. 모두 활성도가 높게 나타났으나 각 군의 비교시 100:1에서 유의성있게 실험군이 대조군보다 NK cells 활성도가 높은 것으로 나왔다.

Morgan⁴⁴⁾ 등에 의해서 최초로 발견된 interleukin-2는 T림파구 증식인자로서 그 기능은 T림파구의 성장, B림파구의 분화인자 유도 와 세포독성 T림파구, NK세포, LAK세포 및 거식세포등의 증식 및 활성화에 관여하여,개체내에서 면역반응의 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾. 림파구의 IL-2생성기전은 활성화 증폭의 2단계로 첫째는 T세포 수용체 활성화에 의한 것인데 이때 T세포에서는 여러 면역조절 Lymphokine이 합성되며 동시에 T세포 증식을 직접적으로 조절할수 있는 단백질등이 합성되고 둘째는 T세포의 활성화 분화로 나타나는 IL-2, IL-2수용체의 발현, 이들 두 물질의 상호작용에 의한 자가증식 및 분필방법이다. 따라서 생성되는 Lymphokine의 양을 측정하면 T세포의 활성화 과정을 알 수있다. 본실험에서 림파구를 CON-A로 억제 배양시 향사평위산이 특정 아집단에 작용하여 IL-2에 감수성이 높은 세포주기로 변화시켜서 IL-2의 Autocrine system이 증폭되거나 또는 T세포의 표면이 수식되어 IL-2 및 다른 Lymphokine에 대한 감수성이 촉진되었으리라 생각된다. mitogen에 의한 림파구증식능이 최초 보고된 이래 림파구 증식능측정은 림파구 기능을 간접적으로 할 수 있는 면역지표로 응용되고 있으며 항원특이적반응 및 비특이적 조절에 의해서 IL-2의존성 T림파구의 증식이 발현된다고 하여 이것의 증가는 림파구 활성화의 항진이나 수적증가를 반영하고 있다⁴⁶⁾. 향사평위산투여 후 정상군이 177.58±

17.06pg/ml, 대조군이 157.75±6.09pg/ml, 향사평위산투여군은 313.79±14.62pg/ml를 나타내었다. 대조군이나 정상군에 비해 향사평위산투여군은 interleukin-2의 생산능에서 유의성있는 증가를 나타내었다(P<0.05).

이를 종합하여 보면 향사평위산은 면역학적으로 체액성 면역 및 세포성 면역에 관여하여 면역기능을 항진시키고 또한 sarcoma-180암세포에 직접적으로 작용하여 이의 성장을 억제시켜 주며 임파구 특히 NK cell에 직접적으로 작용하여 이를 활성화시킴으로써 IL-2의 생산을 증가시키고 종양세포를 살해하여 mice의 경우 생명연장의 효과를 유발시키는 것으로 사료된다.

VI. 결 론

본 연구에서는 향사평위산의 항암효과를 측정하기 위하여 ICR계생쥐의 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 측정 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 향사평위산투여군의 평균생존일수는 23.6±3.65일로 대조군의 20.8±3.04에 비해 유의하게 증가하였으며(P<0.05), 대조군에 비해 13.46%의 생명연장효과를 나타냈다.
2. MTT검사법에 의한 Sarcoma-180cells의 향사평위산의 세포독성능 IC₅₀은 11.59µg/well이었다.
3. 고형암의 무게 측정은 대조군의 경우 8.6±0.98g 실험군(향사평위산투여군)은 4.03±1.44g을 나타내어 53.17%의 유의한 감소를 보였다(P<0.05).

4. 면양적혈구에 대한 응집소가를 측정한 결과 대조군이 3.96±0.7, 향사평위산투여군은 5.5±1.02로 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다.

5. 면양적혈구에 대한 용혈소가는 대조군이 4.0±0.93, 향사평위산 투여군은 6.29±0.74로 대조군에 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였다(P<0.05).

6. 인체의 T세포와 면양적혈구가 결합하는 현상을 보는 rosette 형성실험에서 rosette형성세포로 정하여 10⁶비장세포당 10³ rosette형성세포수를 산정한 결과 대조군은 24.44±2.01, 향사평위산투여군은 35.33±2.17을 보였다.

7. NK-activity의 측정에 있어서 관찰한 결과 작동세포와 표적세포의 비율에 따라 100:1일 때 56.14±7.08, 50:1일 때 45.94±5.04, 10:1일 때 35.84±5.95이었으며, 향사평위산투여군은 100:1일 때 78.61±10.90, 50:1일 때 60.36±8.06, 10:1일 때 44.74±6.90이었다. 이 중에서 특히 100:1에서 유의성은 증가를 보였다(P<0.05).

8. Interleukin-2의 생산능은 정상군이 177.58±17.06pg/ml, 대조군이 157.75±6.09pg/ml, 향사평위산투여군은 313.79±14.62pg/ml를 나타내었다. 대조군이나 정상군에 비해 향사평위산투여군은 Interleukin-2의 생산능에서 유의하게 증가하였다(P<0.05).

이상의 결과를 종합하여 볼 때 향사평위산이 sarcoma-180세포에 대하여 직접적으로 작용하여 종양세포의 성장을 억제시키는 한편 NK cell과 림프구를 자극하여 활발한 활동을 하여 면역기능을 증강시켜 종양으로 인한 ICR계생쥐의 사망을 지연시켜 주는 것을 알 수 있었다. 따라서 향사평위산은 항암 및 면역증강에 미치

는 영향이 큰 것으로 생각되어 앞으로 이에 대해 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울대학교 출판부. pp.1-3, 137-143, 225-234. 1992
2. 보건연감 : 보건신문사, 서울, 高文社, p.474-475, 1999
3. 김성훈 : 한의학계의 암연구동향과 연구전략에 대한 연구, 대한한의학회지 19(1):470-499, 1998.
4. 김세은 : 약용식물의 암세포 다제내성 조절 활성 검색, 생약회지 28(4):174-178, 1997.
5. 문병하 : 氣丸이 항종양 면역반응에 미치는 영향, 대한한방종양학회지 1(1):167-190, 1995.
6. 박성희 : 수종의 한국산 야생식물에서 항암효과검색, 생약학회지 27(47):383-388, 1996.
7. 박재갑 : 항암제의 검색방법, 전통약물로부터 신약개발연구법, 서울대학교 천연물 과학 연구소 174-181, 1993.
8. 은재순 : 암세포주에 대한 유근피 n-BuOH 분획과 항암제의 병용효과, 생화학학회지 25(2):144-152. 1994.
9. 한두석 : 소엽의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구, 생약학회지 25(3):249-257, 1994.
10. 현진원 : 전통 약용식물 및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구, 생약학회지 25(2):171-177, 1994.
11. 方藥中 : 實用中外內科學, 上海, 上海科學技術出版社. pp.621-623, 630-631, 1984.
12. 揚寶仁 : 臨床的中藥治療, 河北, 河北科學技術出版社. pp.1-24, 1992.
13. 최승훈 : 동의종약학, 행림서원, pp.19, 24, pp.207-218, 1995.
14. 김완희 : 한의학원론, 성보사, p.191, 1990.
15. 안규석, 최승훈, 김정범, 박종현 : 한의학적 진단모형에 따른 한방체계의 항암 및 면역 조절작용에 미치는 영향, 동의병리학회지, Vol. 9, No.1, p.1-20, 1994.
16. Silverstein S., Unleliss J., eds. Innate immunity. *curr OpinImmunol.*, (3):47-97, 1991.
17. 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.
18. R. Ian Freshney : Culture of animal cell Wiley-Liss, p.296-298. 1994.
19. Bach, J.F. and Dardenne, M : Antigen reconition by T-lymphocyte I, Thymus and marrow dependence of spontaneous rpsette forming cells in moyse, *Cell Immunol.*, 3:1, 1972.
20. 정충영, 최이규 : Windows용 SPSS SPSSWIN을 이용한 통계분석. 무역경영사, pp.197-206, 1996.
21. 김정범, 안규석 : 大腸癌의 東西醫學의 比較研究, 동의병리학회지, Vol. 9., No.10., pp.89-128, 1995.
22. 예방의학과 공중보건편찬위원회 : 예방의학과 공중보건, 서울, 계축문화사, pp.549-553, 1998.
23. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 행림서원, p.19, pp.32-42, 1995.
24. 田炳旭, 柳逢夏, 朴東源, 柳基遠 : 癌腫의

- 病因病理에 관한 文獻的 考察, 대한한방중앙 학회지, Vol. 1, No. 1., pp.83-101, 1995.
25. 王琦 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 정보사, pp.60-61, 182, 223, 1979.
 26. 하복중의의원 : 靈樞經校釋, 중국, 인민위생출판사 하권, p.55, p.142, p.246, p.335, 1982.
 27. 巢元方 : 諸病源候論, 북경, 인민위생출판사, p.575, p.624, p.625, p.879, 1983.
 28. 조길편 : 聖濟總錄, 북경, 인민위생출판사, p.213, 1982.
 29. 李 梴 : 醫學入門, 서울, 한성사, pp.484-485, 1984.
 30. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 대성문화사, pp.479, 1988.
 31. 洪元植 : 현대 中共의 癌治療, 서울, 영문사, pp.81-860, pp.373-375, 1984.
 32. 李尙仁 : 本草學, 서울, 學林社, pp.58, 244, 334, 355, 369, 373, 393, 399, 401, 1987.
 33. 韓大錫 : 生藥學, 서울, 東明社, pp.134, 154, 178, 191, 204, 294, 29, 1997.
 34. Gordon J.R., Burd P.R., Galli S.J. Mast cells as a source of Multifunctional cytokines. Immunol Today (11):458, 1990
 35. Manolios N., Lecourneur F., Bonifaccino J.S., Klausner R.D. Paiewise cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of T-cell antigen receptor. EMBO J., 10:1643 -51, 1991.
 36. Davies D.R., Metzger H. structural basis of antibody function. Annu Rev Immunol., 1:87-117, 1983.
 37. Germain R.N. The ins and outs of antigen processing and presentation. Nature, 322: 687-89, 1986.
 38. Hudson L., Hay F.C. Practical immunology. 3rd ed. Oxford:Blackwell Scientific Publications, 1989.
 39. Nowotny, A. : Antigen-Antibody interactions in basic exercises immuno-chemistry, Berlin, Heidelberg, N.Y., Spinger-verlag, pp.217-271, 285-287, 1979.
 40. Sell, S. : Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hagerston, Maryland, Harper & Row Pub., p.129-134, 1980.
 41. Barlozzari, T. et al : In vivo role of natural killer cells : Involvement of Large Granular Lymphocytes in the clearance of Tumor cells in Anti-assialo GMI-Treated Rats, J. Immunol., 131(2)1024-1027, 1983.
 42. Kiessling, R et al : Natural Killer cells in the mouse, Eur. J., Immunol, 5:112, 1975. Kuby J Cells and organs of the Immune system. New York:W.H. Freeman and co, 39-71, 1992.
 43. Warner J.F., Dennert G. Effect of cloned cell line NK activity on bone marrow transplants, tumour development, and metastasis In vivo. Nature., (300):37, 1982.
 44. Morgan D.A. et al : Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow, Science, 193:1007-1008, 1976
 45. Talmadge, J.E. et al : Systematic Preclinical Study on the Therapeutic Properties of recombinant human interleukin-2 for the treatment of metastatic Disease, Cancer Res., 47:5725-5732, 1987.
 46. Mosmann T.R., Choffman R.L. Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol., (7)145-173, 1989.