

## 托裏黃芪湯이 抗癌 및 免疫作用에 미치는 實驗的 效果

정동환\* · 최정화\* · 김종한\* · 정현우\*

### ABSTRACT

#### Experimental Effects of *Taklihwangki-Tang* on the Anti-Cancer And Immuno-Action

*Dong-Hwan Jeong · Jung-Hwa Choi · Han-Jong Kim · Woo-Hyun Jeong*

Taklihwangki-Tang was a drug that treated carbuncle and cellulitis. So, the purpose of this study was to investigate effect of Taklihwangki-Tang on the anti-cancer and proliferation of immunocytes, nitric oxide(NO) production of peritoneal macrophages.

We used Taklihwangki-Tang extract(THT) with freeze-dried, 8wks-old male mice and cancer cell lines(L1210, S-180) for this study. The proliferation of cells was tested using a colorimetric tetrazolium assay(MTT assay).

The results of this study were obtained as follow ; THT was showed cytotoxicity on the L1210 and S-180 cell lines, increased proliferation of thymocytes. And the combined effects of THT and vincristine were became cytotoxicity of cancer cell lines and increased significantly proliferation of thymocytes.

THT accelerated proliferation of thymocytes in normal mice, and decreased significantly proliferation of L1210 cells and accelerated significantly NO production of peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

This results suggest that THT inhibit

---

\* 동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

proliferation of cancer cells by becoming immunocytes activity(NO production, proliferation of T-cell).

## I. 緒 論

托裏黃芪湯은 《東醫寶鑑》<sup>1)</sup>에 “治癰疽潰後，膿多出內虛”라고 기록된 處方으로 癰疽內托法에 사용된다. 癰疽는 《內經》<sup>2)</sup>에서 “陰氣不足，陽氣有餘，營氣不行，乃發爲癰疽”라고 論한 이후로 여러 醫家들의 說이 있으나 크기와 部位, 症狀에 따라 癰·癰·疽·癌 등으로 구분된다. 癰은 腫根이 있고 紅赤色을 띄며 肌肉間에 發生하고, 疽는 腫根이 堅固하고 熱이 없으며 筋骨에서 發生하고, 癰은 腫根이 뚜렷하지 않고 약간 赤色을 띄며 피부 사이에서 發生하고, 癌은 紫黑色을 띄며 堅固하거나 심하게 潰瘍을 일으킨다<sup>3)</sup>.

韓醫學에서는 疾病의 發生과 病程을 正邪論으로 설명하고 있는데 이는 癌의 發生과 成長에 있어서 西洋醫學의 免疫反應과 유사성을 가지고 있다<sup>4)</sup>.

癌이란 人體內에서 成熟한 또는 發育中인 정상 세포가 여러 가지 요인으로 인하여 과도하게 增殖하거나 이상 분화하여 형성되는 新生物로, 인간의 건강과 생명에 危害를 주는 疾病이다<sup>5)</sup>.

免疫은 生體가 自己와 非自己를 鑑別하는 것이고, 免疫反應은 生體가 非自己를 鑑別하여 自己의 恒常性을 유지하기 위하여 취하는 일련의 生體反應이다. 만약에 免疫反應이 不足하게 되면 各種 感染性 疾患 내지 惡性腫瘍에 걸리기 쉽고, 반대로 免疫反應이 지나친 경우 각종 알레르기나 自己 免疫疾患을 일으킨다<sup>6)</sup>.

최근 韓藥材를 이용하여 免疫機能을 활성화시키면서도 抗癌效果가 있는지를 알아보기 위한 연구들이<sup>7-10)</sup> 활발히 進行되고 있는데, 癰疽의 內托法에 사용되는 托裏黃芪湯에 대한 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 저자는 托裏黃芪湯의 抗癌作用과 免疫增強作用에 미치는 영향을 관찰하여 有意性 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 약재

실험에 사용한 托裏黃芪湯은 東醫寶鑑<sup>1)</sup>에 準하였으며, 동신대학교 부속광주한방병원에서 구입한 후 본초학 교실의 정선을 받아 사용하였다. 실험에 사용한 처방의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table I).

Table I. Prescription of Taklihwangki-Tang (THT)

구성약물	생약명	분량 (g)
人 蔘	RADIX GINSENG	3.75
當 歸	RADIX ANGELICAE SINENS	3.75
黃 芪	RADIX ASTRAGALI	3.75
桂 皮	CORTEX CINNAMOMI	3.75
白茯苓	PORIA COCOS	3.75
遠 志	RADIX POLYGALAE	3.75
麥門冬	RADIX OPHIOPOGONIS	3.75
五味子	FRUCTUS SCHISANDRAE	3.75
總 計		30.0

#### 2) 세포주

세포주는 한국세포주은행에서 구입한 급성백혈병세포주인 L1210세포주와 복강암세포주인 sarcoma-180(S-180)세포주를 사용하였다.

#### 3) 동물

본 실험에 사용한 mouse는 (주)대한실험동물에

서 구입한 balb/c계 22±1(g) 수컷을 온도 20±3 (°C), 습도 55±5(%), light/dark 12(hr)의 사육조건에서 1주일 이상 적응시키면서 고품질 pellet 사료(삼양주식회사, Korea)와 물을 자유로이 섭취케 하였다.

#### 4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약들은 Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI 1640, Sigma R4130), Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco LOT. NO. 1006842), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma M2128), Sodium Dodecyl Sulfate(SDS, Sigma L5750), Vincristine(Sigma, V8879), Concanavalin A(Con-A, Sigma C5275), Lipopolysaccharide(LPS, Sigma L2637) 등으로 특급시약을 사용하였으며, 기기로는 Microplate Reader(ELX800UV, U.S.A.) 등을 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 검액의 조제

THT의 2첩분량(60.0g)을 1,500ml 증류수로 상온에서 100°C 2시간동안 전탕한 다음 이 추출액을 1,500rpm으로 30분간 원심분리기(VS 6000CFN, vision, Korea)로 원심분리하였다. 그 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 100.0ml로 농축한 다음 freeze dryer로 동결건조시킨 결과 14.1g을 얻었다.

### 2) 세포 배양조건

L1210세포주, S-180세포주, 마우스의 흉선세포 및 비장세포는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100units/ml, 100µg/µl)을

첨가하여 사용하였다. 암세포주의 계대 배양은 1 : 10~1 : 20 비율로 3일 간격으로 하였고, 세포 증식에 미치는 약재의 영향을 관찰하기 위한 실험은 계대배양 2일째의 세포를 사용하였다.

### 3) MTT법에 의한 암세포 독성 측정

본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann<sup>11)</sup>이 개발하고 Kotnik<sup>12)</sup> 등이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100µl(2×10<sup>5</sup>cells/ml)를 접종하여 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 농도별(1, 10, 100µg/ml)로 희석된 THT 100µl를 넣고 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5mg/ml 농도로 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)-A에 희석된 MTT용액 20µl를 각 well에 첨가하고 배양 종료시까지 은박지로 빛을 차단하였다. 배양 종료시 0.01N HCl에 용해시킨 10% SDS 100µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570nm에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

### 4) 마우스의 흉선세포 및 비장세포의 분리

마우스의 흉선 및 비장세포 분리는 Wysocki<sup>13)</sup> 및 Mizel 등<sup>14)</sup>의 방법을 이용하였다. Balb/c 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음 10ml 주사기로 조심스럽게 세포부유액을 취하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 흉선 및 비장세포를 분리하였다.

### 5) MTT법에 의한 흉선 및 비장세포의 증식 율 측정

4)와 같이 분리된 흉선 및 비장세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종하여 흉선세포에는 Con-A  $5 \mu\text{g/ml}$ 와, 비장세포에는 LPS  $5 \mu\text{g/ml}$ 와 함께 다양하게 희석된 THT의 농도(1, 10,  $100 \mu\text{g/ml}$ )를  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ 의  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양한 다음 3)과 동일한 방법으로 흉선 및 비장세포의 증식율을 측정하였다.

### 6) 암세포주에 대한 vincristine의 $\text{IC}_{50}$ 측정

암세포주의 증식을 50% 억제할 수 있는 vincristine의 농도( $\text{IC}_{50}$ )를 구하기 위해 각 well에 L1210 암세포주를  $2 \times 10^5$  cells/ml로 접종하고 24시간 동안 배양한 후 vincristine을 다양한 농도로 암세포주에 처리하여 3)과 동일한 방법으로  $\text{IC}_{50}$ 을 계산하였다.

### 7) 세포증식에 미치는 THT와 항암제 병 용처리 효과 측정

각각의 세포에 미치는 THT와 항암제의 병용처리 효과를 알아보기 위하여 각 well에 암세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 접종하고 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 THT와 vincristine의  $\text{IC}_{50}$  농도( $5 \times 10^{-6}$  g/ml)를 병용처리하여 3)과 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 면역세포는 각 well에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종한 후 흉선세포에는 Con-A  $5 \mu\text{g/ml}$ 와, 비장세포에는 LPS  $5 \mu\text{g/ml}$ 와 함께 다양하게 희석된 THT의 농도(1, 10,  $100 \mu\text{g/ml}$ )와 vincristine의  $\text{IC}_{50}$  농도( $5 \times 10^{-6}$  g/ml)를 병용처리하여 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

### 8) 실험군

Balb/c 마우스 7마리를 1군으로 하여 Control group(이후 Control로 함)과 Sample group(이후 Sample로 함) 등으로 분류하였다. Control은 1일 1회씩 7일 동안 증류수를  $0.2 \text{ml}$ 씩을 투여하였고, Sample A는 THT  $300 \text{mg/kg}$ 을, Sample B는 THT  $500 \text{mg/kg}$ 을 각각 7일 동안 1일 1회  $0.2 \text{ml}$ 씩 경구투여하였다.

### 9) 정상동물의 흉선 및 비장세포 증식율 측정

8)과 같이 실시한 후 4)와 같이 흉선 및 비장세포를 분리하였다. 이 후 분리된 흉선 및 비장세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종하여 흉선세포에는 Con-A  $5 \mu\text{g/ml}$ , 비장세포는 LPS  $5 \mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ 의  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양한 다음 3)과 동일한 방법으로 흉선 및 비장세포의 증식율을 측정하였다.

### 10) 암세포의 이식

L1210세포주를 2)와 같이 계대배양하여  $2 \times 10^6$  cells/mouse로 조제한 다음 마우스의 복강에  $1.0 \text{ml}$ 를 주사함으로써 암세포를 이식하였다.

### 11) L1210세포가 이식된 마우스의 암세포 증 식율 측정

10)과 같이 암세포를 이식한 후 8)과 같이 실시한 후 마우스를 경추탈골시켜 도살하였다. 도살 후 복강에 cold PBS  $10 \text{ml}$ 를 주입하여 잘 혼합시킨 다음 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를  $4^\circ\text{C}$ 에서  $1,500 \text{rpm}$ 으로 5분간 원심분리하고 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후 직경  $120 \text{mm}$  petri dish에 분주하여  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양시키고 4시간 후에 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아  $4^\circ\text{C}$ 에서  $1,500 \text{rpm}$ 으로 5분간 원심분리를 하였다. 침전된 세포분획을 모아  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조

제하여 96 well plate의 각 well에 세포부유액 100  $\mu$ l를 분주하고 배지 100 $\mu$ l를 채워 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 이식된 암세포의 증식율은 3)과 동일한 방법으로 측정하였다.

### 12) L1210세포가 이식된 마우스의 복강 macrophages 분리 및 NO 생성능 측정

10)과 같이 암세포를 이식한 후 8)과 같이 실시하면서 경추탈골시키기 3일전에 3% TG 2.0ml를 복강주사하였다. 이 후 도살된 마우스의 복강에 cold PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,500rpm으로 5분간 원심분리하고 RPMI 1640배지로 2회 세척한 후 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양시킨 후 부착되지 않은 세포를 제거한 다음 부착한 macrophages만을 cell scraper로 분리하여 24 well plate에 각 well당  $1 \times 10^6$  cells/ml로 분주한 후 LPS 1 $\mu$ g/ml와 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 25units/ml를 첨가하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 생성된 NO의 양을 Griess법<sup>15)</sup>으로 측정하였다. 세포부유액 100  $\mu$ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthyl- ethylene-diamine 2Hcl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100 $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고 microplate-reader로 570nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

### 3. 統計處理

통계처리는 Student's paired and/or unpaired t-test에 의하였으며, p-value가 0.05이하인 경우에만 유의성을 인정하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 암세포주에 미치는 THT의 세포독성

L1210세포주와 S-180세포주에 미치는 THT의 세포독성을 알아보기 위하여 THT를 각각 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml를 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 1).

THT를 투여하지 않은 Control의 L1210 세포주 증식율을 100.00 $\pm$ 3.70(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 각각 87.82 $\pm$ 3.85(%), 90.00 $\pm$ 2.52(%), 78.38 $\pm$ 2.58(%)로 Control보다 감소되었다. 특히 THT 100 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 Control에 비해 유의성(P<0.05) 있게 감소되었다.

THT를 투여하지 않은 Control의 S-180 세포주 증식율을 100.00 $\pm$ 0.72(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 각각 84.80 $\pm$ 2.13(%), 88.08 $\pm$ 1.27(%), 89.43 $\pm$ 2.07(%)로 Control보다 유의성(P<0.001)있게 감소되었다.

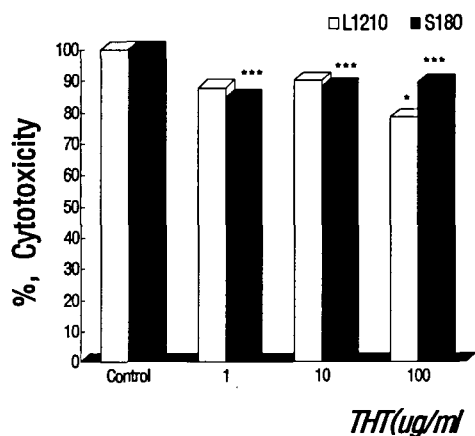


Fig. 1. Cytotoxicity of THT on the L1210 cell lines and S-180 cell lines. L1210 ; lymphocytic leukemia cell lines, S-180 ; sarcoma cell lines, THT ; Taklihwanfki-Tang extract, Control ; THT non-treated group, 1 ; THT 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group, 10 ; THT 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group, 100 ; THT 100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
\* : P-value vs Control group(\* : P<0.05, \*\*\* : P<0.001).

## 2. 암세포 억제에 미치는 THT와 항암제 병용투여 효과

암세포에 미치는 항암효과를 관찰하기 위하여 THT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 항암제 vincristine의 IC<sub>50</sub>인 5 $\times 10^{-6}\text{g}/\text{ml}$ 를 병용 투여하였을 때 암세포의 증식억제 효과는 다음과 같았다 (Fig. 2).

THT와 항암제를 투여하지 않은 Normal의 L1210 세포주 증식율을 100.00 $\pm 1.16(\%)$ 라 하였을 때, 항암제만을 투여한 Control은 45.67 $\pm 0.52(\%)$ 이었고, THT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 항암제를 병용투여하였을 때는 각각 47.15 $\pm 0.33(\%)$ , 46.61 $\pm 0.47(\%)$ , 45.51 $\pm 0.39(\%)$ 로 Control의 증식율과 유사하였으나 THT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 항암제를 병용투여하였을 때 Control에 비해 유의성(P<0.05)있게

증가되었다.

THT와 항암제를 투여하지 않은 Normal의 S-180 세포주 증식율을 100.00 $\pm 2.24(\%)$ 라 하였을 때, 항암제만을 투여한 Control은 85.96 $\pm 0.51(\%)$ 이었고, THT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 항암제를 병용투여하였을 때는 각각 85.48 $\pm 0.81(\%)$ , 86.01 $\pm 0.43(\%)$ , 84.42 $\pm 0.89(\%)$ 로 Control의 증식율과 유사하였다.

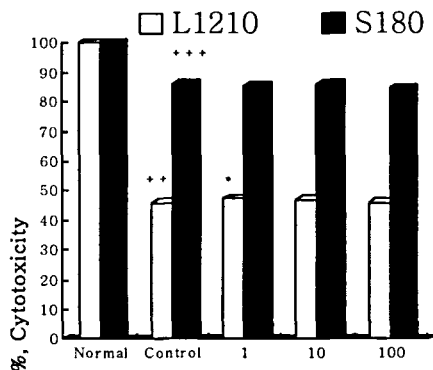


Fig. 2. The combined effects of THT and vincristine on the cytotoxicity of L1210 cell lines and S-180 cell lines. THT ; Taklihwanfki-Tang extract, Normal ; THT and vincristine non-treated group, Control ; vincristine 5 $\times 10^{-6}\text{g}/\text{ml}$  treated group, 1 ; THT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  and vincristine 5 $\times 10^{-6}\text{g}/\text{ml}$  treated group, 10 ; THT 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  and vincristine 5 $\times 10^{-6}\text{g}/\text{ml}$  treated group, 100 ; THT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  and vincristine 5 $\times 10^{-6}\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
+ : P-value vs Normal group(+++ : P<0.001).  
\* : P-value vs Control group(\* : P<0.05).

### 3. 면역세포의 증식율에 미치는 THT의 효과

흉선세포와 비장세포의 증식율에 미치는 THT의 효과를 알아보기 위하여 THT를 각각 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml를 투여한 결과 다음과 같았다 (Fig. 3).

THT를 투여하지 않은 Control의 흉선세포 증식율을 100.00 $\pm$ 3.69(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml 투여하였을 때는 각각 120.92 $\pm$ 5.56(%), 119.06 $\pm$ 2.59(%)로 Control보다 유의성(P<0.01)있게 증가되었고, THT 100 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 98.39 $\pm$ 4.88(%)로 Control과 유사하였다.

THT를 투여하지 않은 Control의 비장세포 증식율을 100.00 $\pm$ 0.73(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 각각 95.57 $\pm$ 1.23(%), 97.68 $\pm$ 1.66(%), 90.13 $\pm$ 1.39(%)로 감소되었고, 특히 THT 1 $\mu$ g/ml를 투여하였을 때는 Control에 비해 유의성(P<0.01)이 감소되었다.

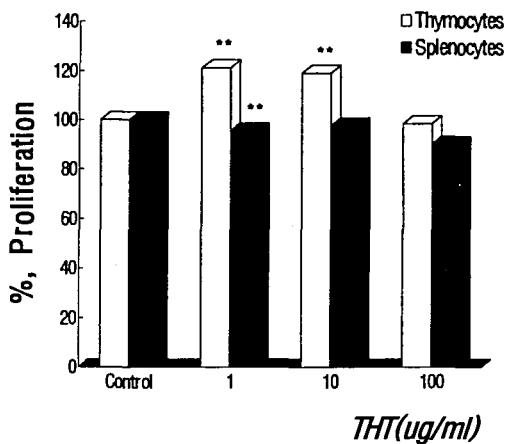


Fig. 3. Effects of THT on the proliferation of thymocytes and splenocytes.

Other legends are the same as Fig. 1.

\* : P-value vs Control group(\*\* : P<0.01).

### 4. 면역세포 증식율에 미치는 THT와 항암제 병용투여 효과

항암제 투여로 감소된 면역세포의 증식율에 미치는 THT의 효과를 알아보기 위하여 THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml와 항암제 vincristine의 IC<sub>50</sub>인 5 $\times$ 10<sup>-6</sup>g/ml를 병용 투여하였을 때 면역세포의 증식율은 다음과 같았다(Fig. 4).

항암제를 투여한 Control의 흉선세포 증식율을 100.00 $\pm$ 0.90(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml와 항암제를 병용투여하였을 때는 각각 108.60 $\pm$ 1.55(%), 116.37 $\pm$ 1.28(%), 107.09 $\pm$ 1.28(%)로 Control보다 증가되었다.

항암제를 투여한 Control의 비장세포 증식율을 100.00 $\pm$ 0.72(%)라 하였을 때, THT 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml와 항암제를 병용투여하였을 때는 각각 101.67 $\pm$ 0.84(%), 103.07 $\pm$ 1.21(%), 96.10 $\pm$ 0.81(%)로 Control과 유사하였고, 특히 THT 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml와 항암제를 병용투여하였을 때는 Control에 비해 유의성(P<0.05, P<0.001)있는 증감상태를 나타내었다.

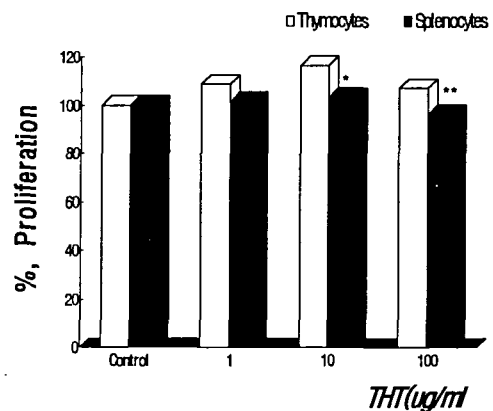


Fig. 4. The combined effects of THT and vincristine on the proliferation of thymocytes and splenocytes.

Other legends are the same as Fig. 2.

\* : P-value vs Control group(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01).

## 5. 생체내 면역세포 증식율에 미치는 THT의 효과

생체내 면역세포의 증식율에 미치는 THT의 효과를 알아보기 위하여 THT 300mg/kg, 500mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 5).

Control의 흉선세포 증식율을  $100.00 \pm 2.43(\%)$ 라 하였을 때, Sample A의 증식율은  $103.08 \pm 2.27(\%)$ 이었으나 Sample B의 증식율은  $121.37 \pm 7.42(\%)$ 로 Control에 비해 유의성( $P < 0.05$ )있게 증가되었다.

Control의 비장세포 증식율을  $100.00 \pm 1.25(\%)$ 라 하였을 때, Sample A의 증식율은  $100.36 \pm 1.84(\%)$ 이었고, Sample B의 증식율은  $102.92 \pm 1.38(\%)$ 로 Control과 유사하게 나타났다.

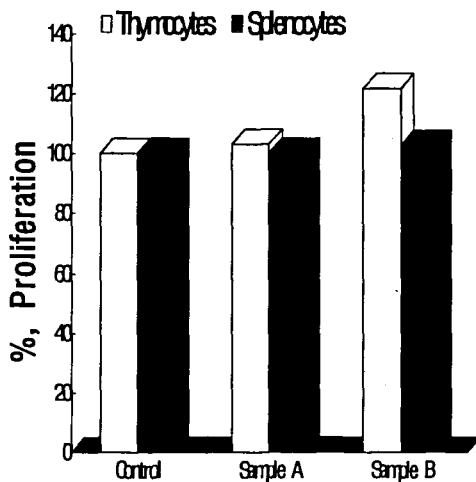


Fig. 5. Effects of THT on the proliferation of thymocytes and splenocytes in normal balb/c mice.

THT ; Taklihwanki-Tang extract, Control ; DDW 0.2ml administered group for 7 days to mice, Sample A ; THT 300mg/kg 0.2ml administered group for 7 days to mice, Sample B ; THT 500mg/kg 0.2ml administered group for 7 days to mice.

\* : P-value vs Control group(\* :  $P < 0.05$ ).

## 6. 이식된 암세포의 증식율에 미치는 THT의 효과

암세포(L1210)를 이식한 후 암세포의 증식율에 미치는 THT의 효과를 알아보기 위하여 THT 300mg/kg, 500mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 6).

Control의 암세포 증식율을  $100.00 \pm 2.25(\%)$ 라 하였을 때, Sample A의 증식율은  $35.94 \pm 0.23(\%)$ , Sample B의 증식율은  $30.52 \pm 0.19(\%)$ 로 Control에 비해 유의성( $P < 0.001$ )있게 감소되었다.

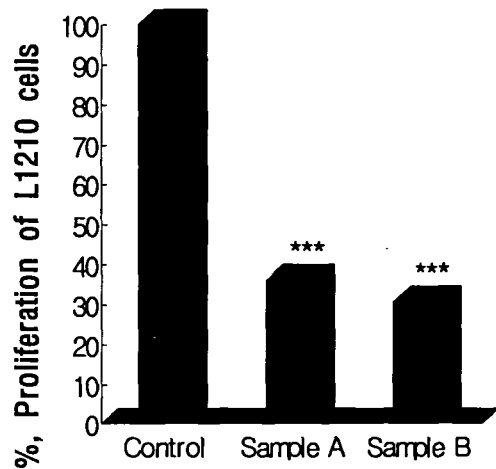


Fig. 6. Effects of THT on the proliferation of L1210 cells in L1210 cells transplanted mice.

L1210 cells( $2 \times 10^6$  cells/mouse) transplanted to mice of all experimental group.

Control ; DDW 0.2ml administered group for 7 days to mice, Sample A ; THT 300mg/kg 0.2ml administered group for 7 days to mice, Sample B ; THT 500mg/kg 0.2ml administered group for 7 days to mice.

\* : P-value vs Control group(\*\*\* :  $P < 0.001$ ).



## 7. 암세포 이식 마우스의 복강 macrophages에서 생성되는 NO의 양에 미치는 THT의 효과

암세포(L1210)가 이식된 마우스의 복강 macrophages에서 생성되는 NO의 양에 미치는 THT의 효과를 관찰하기 위하여 THT 300mg/kg, 500mg/kg을 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 7).

Normal의 NO 양은  $2.95 \pm 0.12(\mu\text{M})$ 이었고, Control의 NO 양은  $4.06 \pm 0.14(\mu\text{M})$ 이었다. 그러나 Sample A의 NO 양은  $7.19 \pm 0.18(\mu\text{M})$ , Sample B의 NO 양은  $6.14 \pm 0.15(\mu\text{M})$ 로 대조군보다 유의성( $P < 0.001$ )있게 증가되었다.

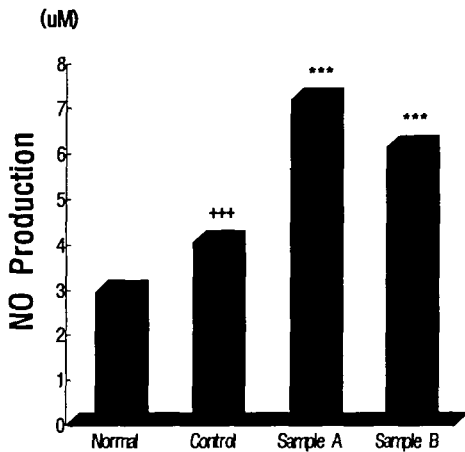


Fig. 7. Effects of THT on the NO production from peritoneal macrophages in L1210 cells transplanted mice.

Normal ; DDW 0.2ml administered group for 7 days to normal mice.

Other legends are the same as Fig. 6.

+ : P-value vs Normal group(+++ :  $P < 0.001$ ).

\* : P-value vs Control group(\*\*\* :  $P < 0.001$ ).

## IV. 考 察

托裏黃芪湯은 癰疽의 內托法에 사용되는 方劑로 《外科精義》<sup>16)</sup>와 《東醫寶鑑》<sup>1)</sup>에서 “治癰疽潰後, 膿多出內虛. 人蔘, 黃芪, 當歸, 桂皮, 白茯苓, 遠志, 麥門冬, 五味子各一錢, 右粗末, 水煎服”이라고 하였다. 《外科正宗》<sup>17)</sup>에서는 內補黃芪湯이라는 處方名으로 “治癰疽·發背·諸瘡已破後虛弱無力, 體倦懶言, 精神短少, 飲食無味, 自汗口乾, 脈澀不睡并效”한다고 하였다.

托裏黃芪湯에 사용된 藥物의 效能을 살펴보면 人蔘은 大補元氣, 補裨益氣, 生津止渴 등의 效能이 있고, 黃芪는 補氣扶正, 托裏排膿, 生肌 등의 效能이 있으며, 當歸는 補血活血, 調經止痛, 活血祛瘀하는 效能이 있다. 麥門冬은 滋陰潤肺, 益胃生津, 清心除煩하는 效能이 있고, 五味子は 斂肺滋腎, 生津斂汗, 寧神安神 등의 效能이 있으며, 桂皮는 溫中散寒, 溫照氣血 등의 效能이 있다. 遠志는 祛痰利竅, 消癰腫 등의 效能이 있고, 白茯苓은 利水滲濕, 健脾補中하는 效能이 있는데 모두 外科疾患의 托裏排膿에 일정한 作用이 있다<sup>27)</sup>.

癰疽는 癰과 疽를 합해서 이르는 말로 癰疽의 原因을 《內經》<sup>2)</sup>에서는 膏粱厚味·營氣不從·五臟不和·九竅不通 등에 의해, 劉<sup>18)</sup>는 火熱·風濕之所乘에 의해, 李<sup>19)</sup>는 濕熱에 의해, 朱<sup>20)</sup>는 六氣·七情·熱勝血·陰滯·陽滯에 의해 발생된다고 하였고, 宋代 《衛濟寶書》以後 病理的인 側面에서 炎症性疾患이나 腫瘍性腫塊, 즉 癌과 有關하다 認識하였다<sup>21-23)</sup>. 癰疽는 發熱·發赤·堅硬·腫痛·患部の 陷沒·突起 및 化膿 등의 症狀를 나타내는데, 治療를 보면 初期에 祛邪爲主의 內消法(清熱解毒·和營行瘀·行氣·解表·溫通·通裏·利濕)을 使用하고, 中期에는 扶正祛邪의 內托法(補益氣血·排膿托毒)을 使用하며, 後期에는 扶正爲主(生肌·補氣養血)의 治法을 使用한다<sup>24-26)</sup>.

韓醫學에서 疾病의 發生과 進展을 人體의 正氣

와 邪氣의 투쟁과정으로 보았다. 《內經》<sup>2)</sup>에 “邪之所湊，其氣必虛”，“邪氣盛則實，正氣奪則虛”라고 했는데, 이러한 韓醫學의인 正邪論은 癌의 發生과 成長에 있어서 西洋醫學의 免疫反應과 유사성을 가지고 있다<sup>28)</sup>.

免疫은 生體가 自己와 非自己를 감별하는 것이고, 免疫反應은 生體가 非自己를 감별하여 自己의 恒常성을 유지하기 위하여 취하는 일련의 生體反應이다. 만약에 免疫反應이 不足하게 되면 各種 感染性 疾患 내지 惡性腫瘍에 걸리기 쉽고, 반대로 免疫反應이 지나친 경우 각종 알레르기나 自己 免疫疾患을 일으킨다<sup>29)</sup>. 免疫의 種類는 食세포나 보체가 관여하는 先天的 免疫과 T細胞와 B細胞가 관여하는 後天的 免疫으로 나누어지며, 면역반응에 따라 體液性 免疫과 細胞媒介性 免疫으로 分類되는데, 體液性 免疫은 B細胞가 주로 담당하는 것으로 血液 및 기타의 體液속에서 방출된 抗體로 생체에 感染을 일으킨 細菌이나 細菌毒素, virus 등과 직접 결합하여 용균 또는 독소, virus의 중화, 식균현상을 나타내 生體를 感染으로부터 방어하는 것이고, 細胞 媒介性 免疫은 T細胞가 주로 담당하는 것으로 알레르기반응, 접촉성피부염, 동종이식 거부 등을 나타내는 면역의 종류이며, 화학 전달물질들을 분비함으로써 腫瘍細胞나 virus 감염세포에 대해 직접 손상을 준다<sup>30-32)</sup>. 이 중에서 腫瘍에 대한 免疫反應은 특히 細胞 媒介性 免疫에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>.

癌이란 人體內에서 成熟한 또는 發育中인 정상 세포가 여러 가지 요인으로 인하여 과도하게 增殖하거나 이상 분화하여 형성되는 新生物로, 첫째 불규칙하고 빠른 성장을 하며, 둘째 浸潤性 혹은 侵入性 成長을 하여 정상 조직을 파괴하고, 셋째 체내 여러 부위로 擴散 및 轉移를 일으켜 인간의 건강과 생명에 危害를 주는 疾病이다<sup>5)</sup>.

최근 들어 抗癌治療法중 放射線 療法 및 化學療法은 암세포를 抑制하는 효과가 있으나, 정상세포

에도 損傷을 입혀 副作用과 耐性이 증가하는 등의 단점이 있다<sup>34)</sup>.

抗癌劑는 주로 Alkylatin제제, 면역억제제, Antimetabolites 그리고 기타 抗癌劑 등으로 구분<sup>35-36)</sup>되지만 공통적으로 抗癌劑들은 消化器障礙·骨髓調血障礙 및 脫毛症·皮膚異常·肝中毒·腎障礙·心筋症·肺纖維化 등의 부작용들이 초래된다. 특히 vincristine은 急性白血病·淋巴瘤·일부 固形腫瘍(筋肉腫·肺癌) 등에 사용되고는 있지만 말초나 자율신경의 독성과 함께 骨髓抑制·脫毛 등의 부작용을 나타낸다<sup>37)</sup>.

최근 韓藥材를 이용하여 免疫機能을 활성화시키면서 抗癌效果가 있는지를 알아보기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서 썬 등<sup>7)</sup>은 消積保中丸이 腫瘍細胞의 성장, 발생을, 종양 크기의 억제 및 생명연장효과 그리고 NK세포의 활성도를 증가시켰음을, 鄭<sup>8)</sup>은 內托羌活湯이 MCA와 3LL세포 및 S-180세포로 유도된 皮下癌腫 細胞에 대해 특이적 細胞毒性 및 免疫調節作用이 있음을, 趙 등<sup>9)</sup>은 桃紅四物湯이 L1210세포의 증식억제효과와 NO의 양이 증가하여 서로 연관성이 있음을, 高<sup>10)</sup>은 膽癌動物의 생명기간 延長, T cell과 B cell의 증식, 血清抗體價(凝集素價, 溶血素價), NK cell의 활성도를 관찰한 결과 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯이 항암효과가 있을 것으로 추정하는 동시에 그 중에서도 活血化瘀之劑와 補氣之劑를 合方하면 더욱 더 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 癰疽의 內托法에 사용되는 托裏黃芪湯에 대한 연구는 아직까지 접할 수 없었다.

최근 韓藥에 의한 腫瘍의 治療方法은 人體의 正氣를 補養하거나(扶正固本法), 邪氣를 물리치기 위한 방법(祛邪法), 또는 補養과 祛邪를 併用(扶正祛邪法)하는 방법을 사용한다<sup>38)</sup>.

일반적으로 扶正의 方法은 低下된 免疫反應에 대하여 免疫 促進作用을 가진다. 따라서 免疫性 疾患의 治癒, 抗腫瘍의 역할을 한다. 免疫機能이

이상하게 亢進하고, 免疫反應이 지나치게 높아지면 生體에 큰 障礙를 일으키므로 지나치게 높아진 反應을 억제하고 過激한 反應을 정상으로 되돌려 免疫의 平衡狀態를 回復시킬 필요가 있는데 祛邪의 方法이 주로 免疫抑制作用을 가지고 있다. 또한 어떤 경우에는 T細胞를 주로 한 細胞性 免疫의 機能이 低下하고 있으면 동시에 B細胞를 주로 한 體液性 免疫의 反應은 亢進하는데, 이러한 현상을 韓醫學에서 正氣가 虛하고 邪氣가 實하여 虛實이 모두 있는 것으로 보고, 이때는 扶正祛邪의 方法을 사용한다<sup>5)</sup>.

이에 저자는 托裏黃芪湯의 이용하여 抗癌作用과 免疫增強 작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

癌細胞 및 免疫細胞에 미치는 THT의 細胞毒성을 알아본 결과 THT는 고농도를 투여하였을 때 L1210세포주의 경우 Control에 비해 22(%)이상, S-180세포주의 경우는 10(%)이상 세포독성을 나타내었으며, 免疫細胞中 胸腺細胞의 경우는 오히려 저농도에서 20(%)이상 세포증식율을 유의성 ( $P<0.01$ )있게 증가시킨 반면 脾臟細胞의 경우에는 세포증식율을 10(%)까지 감소시켰다. 이는 THT가 細胞 媒介性 免疫機能에 영향을 미치고, 이러한 機能이 腫瘍에서도 효과를 나타낸 것이라 생각된다.

또한 抗癌劑를 투여하면 腫瘍細胞 및 免疫細胞에 세포독성을 나타낼 것으로 생각되어 vincristine과 THT를 병용 투여한 결과 癌腫細胞에 있어서는 vincristine만을 투여한 Control의 세포독성보다 뚜렷한 세포독성효과를 나타내지 못하였고, 비장세포에서도 Control과 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 vincristine 투여로 감소된 胸腺細胞의 증식율은 THT 투여로 16(%)이상 증가되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과들은 THT가 胸腺細胞의 증식율에 관여하고 있다는 것을 다시 한번 확인시켜주는 결과라 생각된다.

한편, *in vivo*상에서 THT를 직접 경구 투여하

여 免疫細胞에 미치는 효과를 관찰한 결과 THT는 脾臟細胞의 증식율에 있어 Control과 유사한 결과를 나타내었지만 胸腺細胞의 증식율은 *in vitro*상과 마찬가지로 500mg/kg을 투여하였을 때 Control에 비해 21(%)이상 유의성( $P<0.05$ )있게 증가시켰고, 암세포가 이식된 마우스의 抗癌效果에서도 대조군에 비해 70(%)정도의 유의성( $P<0.001$ ) 있는 암세포 抑制效果가 나타났다.

NO는 L-arginine에 NO-synthase(NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 NOS는 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS) 2종류가 있으며 cNOS는 vascular endothelium 및 brain에서, iNOS는 활성화된 macrophages 및 여러 세포에서 발견된다<sup>39)</sup>. 이 중 iNOS는 macrophages 및 호중구 등과 같이 탐식작용 등에 관여하는 신체의 여러 종류의 세포에서 분비되는 것인데, 그 중 macrophages가 생산하는 NO는 interleukin  $1\beta$  · IFN- $\gamma$  · Tumor Necrosis Factor(TNF)- $\alpha$  등과 같은 cytokine 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 유도되어 형성된다<sup>40)</sup>. 복강 macrophages에 의해 생산되는 NO가 抗癌作用이 있다고 보고<sup>41)</sup>된 이후 많은 연구자들<sup>42-43)</sup>은 활성화된 macrophages가 정상세포보다는 암세포를 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophages-mediated tumor cytotoxicity로 중요한 의미가 있다고 하였다.

이와 같은 보고들을 볼 때 NO가 生體內에서 癌細胞를 공격하여 傷害시키는 抗癌免疫의 effector로서 그 역할을 하고 있기 때문에 각종의 사이토카인을 생산하는 細胞 媒介性 免疫을 담당하고 있는 T세포의 증식율을 증가시키고 抗癌作用을 나타낸 THT가 NO의 생성능에도 관여할 것으로 생각되었다. 그 결과 암세포를 이식한 마우스의 복강 macrophages에서 생성된 NO양을 측정된 결과 대조군에 비해 NO양이 증가되었다.

이와 같은 결과들을 종합하여 볼 때 托裏黃芪湯은 細胞 媒介性 免疫에 관여하는 T세포의 증식을 촉진시켜 NO를 생성하고, 이로써 抗癌作用을 나타낸 것으로 생각된다. 그러나 托裏黃芪湯의 抗癌作用에 대한 作用機轉이 아직까지 밝혀지지 않았고, 또한 托裏黃芪湯이 臨床적으로 癰疽나 腫瘍에 대한 효능도 연구된 것이 없어 이에 대한 연구는 앞으로 더욱 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

托裏黃芪湯이 免疫細胞의 增強 및 抗癌作用에 미치는 效果를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. THT는 癌細胞에 대한 細胞毒性을 유의성있게 증가시켰다.
2. THT는 胸腺細胞의 증식율을 유의성있게 증가시켰다.
3. THT는 抗癌劑인 vincristine과 併用投與 하였을 때 癌細胞에 뚜렷한 細胞毒性을 나타내지 않았지만, 胸腺細胞의 增殖率은 증가시켰다.
4. THT는 生體內 免疫細胞 增殖率에서 胸腺細胞의 增殖率을 유의성있게 증가시켰다.
5. THT는 癌細胞가 이식된 마우스의 癌細胞 增殖率을 유의성있게 억제시켰다.
6. THT는 복강 macrophage의 NO의 생성을 유의성있게 촉진시켰다.

## 參 考 文 獻

1. 許 俊 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, p. 393, 1992.
2. 楊維傑 : 黃帝內經素問靈樞譯解, 서울, 成輔

社, (素問) pp. 235, 266, 455 (靈樞) p.262, 1980.

3. 蔡炳允 : 韓方外科, 서울, 高文社, pp. 38-39, 1983.
4. 董黎明 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 12-16, 1988.
5. 郁仁在外 : 癌症診治康復350問, 北京, 金循出版社, pp. 98-105, 1980.
6. 東西醫學研究會 : 臨床東西醫學, 서울, 永林社, pp. 546-547, 550, 552-553, 1997.
7. 魯勳政外 : 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.
8. 鄭鉉雨 : 內托羌活湯이 腫瘍 및 免疫調節機能에 미치는 實驗的 研究, 圓光大學校大學院, 1996.
9. 趙鈴林의 : 桃紅四物湯이 L1210세포가 이식된 마우스의 면역계에 미치는 효과, 東醫病理學會誌 13(1): 132-140, 1999.
10. 高光錫 : 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 實驗的 研究, 東醫病理學會誌 9(1): 21-45, 1994.
11. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 65(1-2) : 55-63, 1983.
12. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods 129(1) : 23-30, 1990.
13. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Planning" for lymphocytes ; A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 75(6) : 2844-2848, 1978.
14. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. : Regulation of lymphocyte-activating factor(LAF) production and secretion in P388D1 cells ; identification of high molecular weight precursors of LAF. J.

- Immunol. Methods 122(6) : 2173-2179, 1979.
15. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. : Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immun. 59(9) : 3280-3283, 1991.
  16. 齊德之 : 外科精義 外 三種合本, 서울, 醫聖堂, p. 104-105, 1999.
  17. 陳實功 : 外科正宗, 北京, 人民衛生出版社, p. 44, 1983.
  18. 李聰甫外 : 金元四大醫家 學術思想研究, 서울, 成輔社, pp. 36-37, 1985.
  19. 李東垣 : 東垣十種醫書, 서울, 大成文化社, pp. 532-533, 1994.
  20. 方 廣 : 丹溪心法附與, 臺灣, 五州出版社, (卷十六) p. 10, (卷十八) p. 1, 1963.
  21. 陳無擇 : 三因論, 서울, 翰成社, pp. 525-526, 1977.
  22. 揚醫竝 : 中醫學問答(下), 北京, 人民衛生出版社, pp. 356-57, 369-370, 1985.
  23. 郁仁存 : 中醫腫瘤學, 北京, 北京科學技術出版社, pp. 1-10, 1983.
  24. 宋孝元 : 還魂散이 實驗的으로 誘發한 腫瘍 및 免疫學的 反應에 미치는 影響, 益山, 圓光大學校 大學院, 1996.
  25. 上海中醫學院編 : 中醫外科學, 香港, 商務印書館, pp. 24-30, 1981.
  26. 顧伯華 : 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 79-81, 1985.
  27. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp. 188-189, 194-195, 236-237, 265-266, 280-281, 308, 646- 647, 649-650, 1997.
  28. 백남선 : 癌의 藥物治療, 서울, 臨床藥學 6(1) : 74-82, 1984.
  29. 東西醫學研究會 : 臨床東西醫學, 서울, 永林社, pp. 546-547, 550, 552-553, 1997.
  30. 김상호외 : 一般病理學, 서울, 高文社, pp. 51-54, 348-349, 1995.
  31. 하대유의 : 免疫學, 서울, 高文社, pp. 1-32, 1994.
  32. 김길영 : 免疫不全疾患과 惡性腫瘍, 연세의대논문집 11(1) : 61-64, 1978.
  33. 이중달외 : 그림으로 보는 病理學, 서울, 高麗醫學, pp. 99-124, 1990.
  34. 최승훈 : 東醫腫瘍學, 서울, 杏林出版, p. 142, 1995.
  35. 김경환 : 이우주의 약리학강의(제4판), 서울, 醫學文化社, pp. 633-690, 1997.
  36. 鞠永棕篇 : 고오스 藥理學, 서울, 汎文社, pp. 701-710, 1985.
  37. James, B., Lyoyd, H. : Cecil textbook of medicine, W. B. Saunders Co. pp. 1090-1100, 1985.
  38. 신천호역 : 癌瘤防治研究, 서울, 成輔社, p. 252, 1984.
  39. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J.6(12) : 3051-3064, 1992.
  40. Higuchi, M.M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. : Cytolytic mechanisms of activated macrophages ; Tumor necrosis factor and L-arginine-depenent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, J. Immunol. Methods 144(4) : 1425-1431, 1990.
  41. Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science 235 : 473, 1987.
  42. Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uni, K. and Sasada, M. : Mechanism of leukemic cell lysis by activated human macrophages ; leukemic cells can be

lysed without direct contact. *Int. J. Hematol*  
60(1) : 51-57, 1994.

43. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleand, H.E.Jr.,  
Gilleland, L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. :  
Neutrophil-mediated nitrosamine formation ; role  
of nitric oxide in rats. *Gastroenterology* 103(4) :  
1260-1266, 1992.