

원저

中脘에 施術한 紅花藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 影響

오치석 · 이현 · 임윤경 · 성락기

대전대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Influence on the Anti-cancer and Immune response improvement of Herbal-acupuncture with Carthami Flos infusion solution into Chung-wan(CV12)

Oh Chi-suk, Lee Hyun, Yim Yun-kyoung and Seong Nak-ki

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives : The purpose of this experiment is to study on the anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement effects of Herbal-acupuncture with Carthami Flos infusion solution(CTT-HAS).

Methods : We injected *Carthami Flos* infusion solution into Chung-wan(CV12) of C57BL/6 mouse which is corresponding to human Chung-wan(CV12). We observed its effect on the number of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ cells in mouse PBMCs, the number of the pulmonary colony, and the effect on MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Results Conclusions : 1. The spleen cells proliferation of the sample groups treated with CTT-HAS extract has increased significantly compared with that of the control group.

· 접수 : 2004년 9월 6일 · 수정 : 2004년 9월 18일 · 채택 : 2004년 9월 18일
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 구성동 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 041-560-8783 E-mail : lh2000@hanmir.com

2. The percentage of the CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ cells in C57BL/6 mouse PBMCs of the sample groups treated with CTT herbal-acupuncture has increased compared with that of the control group.

3. The lung colony number of the sample groups CTT Herbal-acupuncture has decreased significantly compared with that of the control group.

4. MST and ILS of the sample groups CTT herbal-acupuncture have increased significantly compared with those of the control group.

Key words : Carthami Flos(CTT), Herbal-Acupuncture, Chung-wan(Cv12), anti-cancer, immune response improvement

I. 緒 論

藥鍼療法(Herbal acupuncture)은 經絡療法과 藥物療法の 原理를 바탕으로 研究된 新鍼治療 中의 하나이다. 疾病과 有關한 部位인 經穴, 阿是穴 등의 陽性 反應點에 精製한 各種 韓藥物을 選擇 注入함으로써 經穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하여 疾病을 豫防하고 治療하는 方法으로¹⁾, 免疫系疾患의 豫防 및 治療등에 有效하다고 報告되고 있다²⁻⁶⁾.

免疫機能이란 非自己 物質을 除去함으로써 그 個體 内部의 恒常性을 維持하는 現象으로 人類의 모든 疾病의 發生機轉과 聯關이 있는데⁷⁾ 腫瘍免疫 反應에서는 細胞性 免疫이 주된 役割을 하고 體液性 免疫은 二次的 役割을 하는 것으로 알려져 있어 T cell이나 Macrophage 등의 免疫細胞의 活性은 癌의 發生과 進行 및 豫後와 密接한 關係가 있다고 報告되어 있다⁸⁻¹⁰⁾.

腫瘍은 自律性을 가진 組織의 過剩한 發育으로 定義¹¹⁾되며, 細胞學的으로 非正常的인 細胞의 過

多增殖으로 인하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織 등에 非正常的인 組織을 形成하는 疾患으로¹²⁻¹³⁾ 韓醫學에서는 腫瘍, 癰疽, 腫毒, 積聚, 癥瘕, 巖, 陰瘡, 癭瘤, 癰, 疥癬, 石癰, 石疽, 疔疽 등¹⁴⁻¹⁸⁾이 腫瘍의 範疇에 該當하는데, 이의 發病機轉으로는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 臟腑失調, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 등이 있다¹⁹⁾.

최근의 韓醫學界의 腫瘍 研究에 대한 動向은 抗癌材料, 處方 및 藥鍼이 癌細胞와 細胞性免疫, 體液性 免疫에 미치는 影響에 관한 研究와 같은 細胞毒性和 免疫反應에 대한 研究가 주로 進行되고 있다²⁰⁾.

이에 著者는 活血通經하고 散瘀止痛하는 效能이 있어 癥瘕痞塊, 瘡瘍腫毒치료에 효과적인 紅花²¹⁻²⁷⁾를 사용하여 物質分割한 藥鍼液을 제조한 후 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 消積하는 中脘(CV12)²⁸⁻³³⁾에 주입하여 PBMC의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 세포수에 미치는 影響, pulmonary colony formation에 미치는 影響, 平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響을 測定하여 抗癌 및 免疫機能 增進에 관한 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

動物은 4~5週齡의 雌性인 C57BL/6 생쥐를 대 한실험센터에서 공급받아 實驗 當日까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 充分히 供給하고, 室溫 22±2℃를 維持하여 2週日 間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 사용된 紅花(*Carthami Flos*, 이하 CTT 로 表現함)는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였다.

2. 方 法

1) 藥針液의 製造

紅花 物質分劃 藥鍼液은 曠 등³⁴⁾의 方法에 따라 Diaion HP-20 수지를 이용하여 調製하였다. 물로 추출한 홍화원액 100g을 수지가 들어있는 흡착 크로마토그래피에 부어 그 폭이 약 25~30 cm될 정도로 방치하였다. 이 후 증류수 1,000ml를 부어 Diaion HP-20 수지를 통과한(pass층) 홍화액을 분리하였다. 계속해서 30% MeOH 500ml, 70% MeOH 500ml, 30% Acetone 500ml, 70% Acetone 500ml를 각각 통과시켜 분리된 분획 중 생쥐의 PBMC에서 싸이토카인 유도에 활성이 있는 분획층을 선정하여 藥鍼液을 제조하였다.

紅花 70% Acetone층 분획을 3회 여별(3M paper)한 후 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 紅花 농축액에 95% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 실온에서 교반한 후 방치하여 생성된 침전

물을 여별하고, 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여 생성된 침전물을 여별하고 다시 여액을 75% ethyl alcohol 30ml를 가한 후 같은 조작을 2회 반복한 다음 여액 중 ethyl alcohol을 감압 제거하여 잔사전량을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH6.8로 조절하여 저온에서 12 시간 방치한 후 미량의 부유액을 여별한 후 멸균하여 10%와 20% 紅花 70% Acetone층 藥鍼液으로 희석하여 사용하였다.

2) 藥針液의 選定

Acetone과 Methanol의 濃度を 달리해서 抽出한 紅花 物質分劃 藥鍼液 중에서 Cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響을 살펴본 結果는 70% Acetone 10µg/ml의 紅花 物質分劃 藥鍼液이 Cytokine 遺傳子(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, β-actin) 發顯에 다른 것들보다 뛰어난 것으로 나타났다.

(1) PBMC 分離 및 藥物處理

① PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) 세포분리

Balb/c 생쥐를 頸椎脫骨法으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고, 摘出した 脾臟을 100mesh(Sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube (Becton dickinson)에 옮겨 약 5分間 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83% NH₄Cl 溶液을 넣고 5分間 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hpaque- 1077(Sigma)로 2,000rpm에서 20分間 원심분리하여 buffy coat부분을 얻어 실험에 사용하였다.

② 세포배양 및 약물처리

PBMC를 24 well plate에 1×10^6 세포로 각 well에 분주하고, 紅花 70% Acetone층 藥鍼液 추출물 (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml) 및 양성대조군 (LPS, 2.5 μ g/ml)을 각각 처리하고 4 시간 동안 배양한 후 D-PBS로 수세하여 total RNA를 분리하였다.

(2) mRNA 遺傳子 分析

① Total RNA의 抽出

培養 終了 後 24-well plate의 上層液을 除去한 後 RNAzol^B(Tel- Test, USA)를 利用하여 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 溶解시켜 精量하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 μ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10分間 denaturation 시킨 後, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 量을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

② cDNA 合成

逆轉寫 反應은 準備된 total RNA 3 μ g에 該當하는 量을 75 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 μ g에 2.5 μ l의 10mM dNTPs, 1 μ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l의 RNasin(20U/ μ l), 1 μ l의 100mM DTT 및 4 μ l의 5 \times RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)를 混合한 後, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 添加한 後 DEPC 處理된 蒸溜水를 더하여 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 後 遠心分離하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95 $^{\circ}$ C에

서 10分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 使用하였다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 利用하여 수행하였다. 反應은 이미 合成된 1 μ l의 first-strand cDNA를 主型으로 使用하였으며, 主型에 대한 β -actin, MMP-9, IL-1 β , TNF- α , IL-18 및 NOS-II에 대한 primer는 아래와 같으며, sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer (20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 滅菌증류수를 가하고 predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 74 $^{\circ}$ C, 5분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycle한 後 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2 % agarose gel에 loading 하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다

3) 脾臟細胞 測定

脾臟免疫細胞를 分離하여 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 첨가하고, 紅花 70% Acetone층 藥鍼液을 농도별로 처리하였고, 陽性對照群으로 Con-A(cocanavalin A, 10 μ g/ml)를 처리한 後 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양 後 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 後 다시 8시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기(Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman)

위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

4) *In vivo*에서 免疫細胞 增進과 活性化 實驗

(1) B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10 (ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 생쥐의皮下에 繼代培養하였고 實驗前에 形成된 腫瘍組織 部位를 分離하여 腫瘍組織 1g에 10ml의 cold D-PBS(Ca²⁺ & Mg²⁺-free, Sigma)가 되게 調節한 後, 100mesh(Sigma)로 腫瘍組織을 粉碎한 後 遠心分離(1,500rpm, 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase (1,700U/mg, Type-XI Sigma)를 B16-F10 0.1g/ml에 處理하여 30分間 water bath(37°C)에서 培養시킨 後 遠心分離(1,300rpm, 5min.)하였다. 上騰液을 除去한 다음 0.85% NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 것을 37°C 培養器에서 5分間 放置하여 赤血球를 破壞시킨 後 遠心分離하여 B16-F10을 分離하였다. 이렇게 얻어진 B16-F10 癌細胞株 (2×10⁵ cells/mouse)의 尾靜脈에 移植한 後 紅花 70% Acetone층 藥鍼液을 中脘에 7일간 藥鍼하였다.

(2) 實驗群의 分類

實驗群은 다음과 같이 分類하였다.

對照群-1(Control-1): B16-F10 癌細胞株를 移植하고 別無處置한 群

對照群-2(Control-2): 7日間 中脘에 1日 1回 刺鍼한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속하여 15일간 中脘에 1日 1回 刺鍼한 群

對照群-3(Control-3): 7日間 생리식염수(0.1ml)를 中脘에 1日 1回 注入한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속하여 15일간 생리식염수 0.1ml를 中脘에 1日 1回 注入한 群

實驗群-1(CTT-HAS 10%): 7日間 中脘에 10% 紅花 藥鍼(70% Acetone층 0.1ml)을 施術한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속하여 15일간 藥鍼 施術한 群

實驗群-2(CTT-HAS 1%): 7日間 中脘에 1% 紅花 藥鍼(70% Acetone층 0.1ml)을 施術한 後, B16-F10 癌細胞株를 移植하고, 계속하여 15일간 藥鍼 施術한 群

(3) 取穴

人體의 中脘에 相應하는 實驗動物의 體表面의 鬚를 除去한 後 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 使用하여 取穴하였다.

(4) 藥鍼

藥鍼注入器로 1ml의 注射器를 使用하여 各各의 實驗群에 따라 中脘에 0.1ml씩, 1日 1回, 總 22日間 藥鍼시술하였다.

(5) CD3e⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD69⁺, NK⁺, B220⁺ 螢光細胞 分析

B16-F10 細胞株를 C57BL/6 생쥐에 移植한지 3일 後 頸相脫骨法으로 致死시킨 後 脾臟을 分離하였다. 脾臟細胞에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-NK, PE-anti-B220을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 後 3회 이상 인산완충생리식염수로 水洗한 後 flow cytometer(Becton Dickinson, USA)의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 細胞를 分析(%)하였다.

(6) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 移植 하고 紅花藥鍼한 후 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15日에 colony assay를 實施하였다. Pulmonary colonization assay는 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡(Nikon, Japan)으로 觀察하였다.

(7) 病理組織檢査

B16-F10 癌細胞株를 移植하고 15日 後에 各群에서 肺조직을 分離하여 10% formaldehyde 溶液에 固定한 後 細切하여 흐르는 물에 8時間동안 水洗한 다음 아래의 過程(scheme 2)을 거쳐 포매했다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 아래 (scheme 3)와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin染色을 하였다.

(8) 生命延長曲線 測定

B16-F10 癌細胞株를 C57BL/6 생쥐에 移植 후, B16-F10 細胞株를 移植한 날부터 시작, 매일 생존여부를 관찰하여 平均生存日數 및 延命率을 다음과 같이 구하였다.

MST(Mean survival time) : 平均生存日數

ILS(Increase in MST over Control-C) : 延命率= $\{(T-C)/C\} \times 100(\%)$

T : 처치군의 MTS

C : 대조군의 MTS

3. 統計處理

統計는 Student's t-test로 하였다.

III. 成績

1. 脾臟細胞 增殖에 미치는 影響

70% acetone 100 μ g/ml의 紅花 物質分割 藥鍼液을 건강한 Balb/c mouse에서 추출한 脾臟細胞에 각각 10, 1, 0.1 %의 농도로 처리하여 脾臟細胞의 增殖에 미치는 영향을 알아본 결과 脾臟細胞는 濃度 依存的으로 有意性있게 증가하였다 (Table 1).

Table 1. Effect of CTT-HAS extract on spleen cells proliferation in Balb/c mice.

Group	Dose	Spleen cells production (cpm)
Media control	0	1267 \pm 146
Con-A (μ g/ml)	0	38760 \pm 5194***
CTT-HAS (%)	10	7953 \pm 1022***
	1	3608 \pm 474***
	0.1	2010 \pm 268*

Mouse B cells from healthy Balb/c mice were treated with CTT-HAS extract (10, 1, 0.1 %). Spleen cells were cultured with Con-A (positive control) and CTT-HAS extract for 48 hrs. After 40hr incubation, treated 3 H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester (Cambridge Tec.U.K.). The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter (LKB, USA) as described in Materials and Methods. Statistically significant value compared with control data by T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2. PBMC의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 細胞數에 미치는 影響

1) PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 細胞 比率

CD25⁺/CD4⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 11.1±2.6%, Control-2에서는 12.2±1.9%, Control-3에서는 12.5±1.6%이었으며, 10%와 1% CTT-HAS에서는 각각 17.0±3.5%와 16.3±2.9%로 증가하였다(Table 2).

2) PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 細胞 比率

CD8⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 5.3 ± 0.5%, Control-2에서는 8.4±1.3%, Control-3에서는 8.9±1.0%이었으며, 10%와 1% CTT-HAS

에서는 13.8±1.2%와 11.2±1.1%로 각각 증가하였다(Table 2).

3) PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 細胞 比率

CD69⁺/B220⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 47.9±3.8%, Control-2에서는 52.2±4.2%, Control-3에서는 51.7±3.7%이었고, 10%와 1% CTT-HAS에서는 57.9±3.7%와 55.3 ± 4.4%로 각각 증가하였다(Table 2).

4) PBMCs의 NK⁺/CD3e⁺ 細胞 比率

NK⁺/CD3e⁺ 세포수의 比率이 Control-1에서는 3.7±0.3%, Control-2에서는 3.5±0.4%, Control-3에서는 4.2±0.8%이었으며, 10%와 1% CTT-HAS에서는 4.8±0.6%와 4.3±0.7%로 각각 증가하였다(Table 2).

Table 2. Effects of CTT-HAS on the percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD3e⁺/CD8⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ in mouse PBMCs.

Group	Dose	CD25 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ /CD3e ⁺ (%)	CD69 ⁺ / B220 ⁺ (%)	NK ⁺ /CD3e ⁺ (%)
Control-1	0	11.1 ± 2.6	5.3 ± 0.5	47.9 ± 3.8	3.7 ± 0.3
Control-2	0	12.2 ± 1.9	8.4 ± 1.3	52.2 ± 4.2	3.5 ± 0.4
Control-3	0	12.5 ± 1.6	8.9 ± 1.0	51.7 ± 3.7	4.2 ± 0.8
CTT-HAS (%)	10	17.0 ± 3.5	13.8 ± 1.2	57.9 ± 3.7	4.8 ± 0.6
	1	16.3 ± 2.9	11.2 ± 1.1	55.3 ± 4.4	4.3 ± 0.7

C57BL/6 mice were treated with CTT-HAS at Chung-wan (CV12) for 10 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2x10⁵cells). C57BL/6 mouse PBMCs (5x10⁶ cell/ml) were isolated on the 10th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two groups treated with CTT-HAS showed increased numbers of CD25⁺/CD4⁺, CD3e⁺/CD8⁺ T cells, CD69⁺/ B220⁺ and natural killer (NK⁺) / CD3e⁺ cells.

Control-1 : B16-F10 melanoma only

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan (CV12)

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of saline

CTT-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of 10% and 1% CTT-HAS.

3. Pulmonary colony formation에 미치는 影響

Control-1에서는 86.3±7.2개이었고, Control-2에

서는 72.3±5.3개였으며, Control-3에서는 63.3 ± 7.8개이었고, 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS 에서는 각각 27.8±8.2개와 55.3±7.6개로 감소하였다(Table 3).

Table 3. Effects of CTT-HAS on lung colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./animal	Pulmonary Lung Colony No.	Decrease (%)
Control-1	0	5	86.3 ± 7.2	
Control-2	0	5	72.3 ± 5.3	
Control-3	0	5	63.3 ± 7.8	
CTT-HAS (%)	10	5	27.8 ± 8.2 **	56.1
	1	5	55.3 ± 7.6	12.6

C57BL/6 mice were treated with CTT-HAS at Chung-wan (CV12) for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2x10³cells). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with CTT-HAS, they were sacrificed and the pulmonary colony was observed.

Control-1 : B16-F10 melanoma only

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12)

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of saline

CTT-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of 10% and 1% CTT-HAS.

Each point represents the mean ± S.E of 5 mice.

Statistically significant value compared with control-3 data by T test

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4. 平均生存日數 및 延命率에 미치는 影響

平均生存日數는 Control-1에서는 16.4 ± 3.5일이었고, Control-2에서는 19.2 ± 2.8일이었으며,

Control-3에서는 19.5 ± 3.3일이었고, 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서는 각각 23.7 ± 2.2일과 20.4 ± 1.8일로 증가하였다. 延命率은 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서 각각 30.8%와 11.8 %로 증가하였다(Table 4).

Table 4. Effects of CTT-HAS on MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma.

Group	Dose	No./animal	M S T (day)	I L S (%)
Control-1	0	12	16.4 ± 3.5	
Control-2	0	12	19.2 ± 2.8	
Control-3	0	12	19.5 ± 3.3	
CTT-HAS	10	12	25.5 ± 4.7	30.8
(%)	1	12	21.8 ± 2.4	11.8

C57BL/6 mice were treated with CTT-HAS at Chung-wan (CV12). On the 7th day of the experiment, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma (2x10⁵cells). 14 days later, the mice were counted once daily to measure MST (Median survival time) and ILS(Increase in MST over control).

ILS = $\{(T-C)/C\} \times 100$ (%)

T : MST of Sample group

C : MST of Control-3

Control-1 : B16-F10 melanoma only

Control-2 : B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at Chung-wan(CV12)

Control-3 : B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of saline

CTT-HAS : B16-F10 melanoma + intradermal injection at Chung-wan (CV12) with 0.1ml of 10% and 1% CTT-HAS.

Each point represents the mean ± S.E of 12 mice.

Statistically significant value compared with control-5 data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

IV. 考 察

紅花(Carthami Flos)는 菊花科에 속한 一年生草本인 잇꽃 (*Carthamus tinctorius* L.)의 花를 乾燥한 것으로, 紅藍花, 刺紅花, 草紅花, 紅蘭의 異名이 있다. 紅花의 性味는 辛溫 無毒하고, 心·肝 二經에 歸經하며, 活血通經, 散瘀止痛의 效能으로 癥瘕痞塊, 瘡瘍腫毒, 經閉, 痛經, 惡露不行, 跌撲損傷에 應用되어 왔다^{21,22,27}.

藥理學的인 研究에 의하면 紅花는 safflower

yellow, carthamin을 含有하고 있고²¹, 子宮興奮效果, 血壓降下 等の 效能이 部分的으로 糾明되었고²⁷, 臨床的으로 腦血栓, 冠心病, 十二指腸潰瘍, 扁平疣, 神經性皮炎 等에도 應用되고 있음이 報告되었다²³.

中腕은 “太倉, 胃腕, 上記, 中管, 胃募, 中胃, 胃中”이라고도 하며²⁸, 任脈에 屬하고, 足陽明胃經의 募穴이며, 八會穴 中 腑會이고, 手太陽, 少陽, 足陽明의 發生하는 곳이며, 小腸經, 三焦經, 胃經, 任脈의 總會地點임과 同時에 肺經의 發源處, 肝經의 終結點으로^{28, 32} 腸癰, 寒癖, 葯麻疹, 心積등에도 活用될 뿐만 아니라, 調理中焦, 健脾化濕, 和胃

降逆, 和胃利濕, 寬中의 作用으로 胃痛, 腹部膨滿, 腹鳴, 嘔吐, 下痢, 赤痢, 消化不良, 黃疸, 胃腸虛弱을 治療하며²⁸⁻³²⁾, 化濕消積의 作用으로 腫瘍治療 穴로도 應用³³⁾되고 있다.

藥鍼療法은 穴位注射療法¹⁾이라고 하며, 一種의 東西의 結合形態인 新鍼法으로 患者의 疾病을 根據로 穴位의 經絡作用과 藥物의 藥理作用을 살핀 다음, 相應하는 俞穴과 藥物이 疾病에 대해 綜合的인 作用을 충분히 發揮하게 하여 疾病을 治療하는 方法으로 疾病에 따라 選擇된 藥物의 藥液을 經絡學說에 의하여 穴位 혹은 壓痛點에 注入하여 鍼과 藥物의 併승된 效果를 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理形態를 變化시켜 鎮痛, 腫瘍誘發抑制등의 治療效果가 있는 것으로, 藥物의 吸收가 빠르고, 經口投與가 不可能한 境遇에 處置할 수 있으며, 患處에 處置할 수 있는 등의 長點이 있다²⁸⁾.

腫瘍은 自律性을 가진 組織의 過剩한 發育³⁵⁾으로, 細胞學의 非正常的인 細胞의 過剩增殖으로 因하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織等に 非正常的인 組織을 形成하는 疾患이다¹²⁻¹³⁾. 이것은 個體에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않고 正常組織에 대하여 破壞的인 것을 일컫는 것으로 臨床 및 病理形態의 所見에 依하여 陽性腫瘍과 惡性腫瘍으로 나눌 수 있는데, 一般的으로 癌이라고 指稱되는 惡性腫瘍은 不規則하고 빠른 成長을 하며, 侵入性 成長을 하여 周圍의 正常組織을 破壞하고 體內 여러 部位로 擴散 轉移시켜 死亡에 이르게 하는 致命的인 疾病이다³⁶⁾.

西洋醫學에서는 癌의 發生因子로 遺傳, 人種, 地理, 年齡, 免疫學的 因子 등의 內的因子와 化學的 發癌物質, 放射線, 腫瘍性 바이러스 등의 外的因子^{35,37)}로 나누고 있으며, 그 治療方法으로 手術療法, 化學療法, 放射線療法, 免疫療法, 遺傳子療法 등이 있지만 手術과 化學療法, 放射線療法에는 各各의 限界나 問題點들이 있고³⁷⁾, 遺傳子療法은 아직 治療方法이 定立되지 못한 實情이나, 患者의

正常組織 특히 免疫系 組織에 被害를 주는 化學療法의 短點을 줄이기 위해 免疫監視機構를 補強함으로써 癌에 對抗하는 免疫療法이 각광을 받고 있다³⁵⁾.

免疫은 初期에는 어떤 傳染性 疾患의 再感染에 對한 防禦反應 즉 特定한 傳染性疾患에 대하여 特異的인 抵抗性이 부여된 宿主의 能力을 意味하여 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機具로서 外部로부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에서 생긴 突然變異產物 등과 特異하게 作用하여 非自己를 除去함으로써 個體의 恒常性을 維持하는 現象이며 非自己를 特異的으로 認識하여 抗體를 形成하거나 細胞性 免疫反應을 보여 非自己를 除去하는 連續的 反應을 免疫反應이라 했지만, 오늘날에 와서는 免疫의 概念이 점차 확대되어 어떤 종류의 傳染性疾患에 대하여 先天的으로 가지고 있는 抵抗性도 포함시켜 이를 先天性 혹은 自然免疫이라 하여 매우 重要視하고 있다.

韓醫學에서 免疫은 正氣와 邪氣의 作用으로 認識하여 <素問·上古天眞論>에서 眞氣從之, 精神內守, 病安從來³⁸⁾라 하여 眞氣를 邪氣에 對稱되는 正氣의 意味로 파악하였다. 正氣는 身體 內에서 一切의 疾病에 抵抗하는 物質로 臟腑經絡 營衛氣血의 正常的인 生理機能을 包含하며, 邪氣는 一切의 疾病을 일으키는 原因 要素를 總稱하고 外界의 六淫之邪를 일컬으며, 또 身體 內 陰陽失調에서 發生된 虛證의 病理變化와 病理的 產物인 瘀血, 痰飲 등의 病邪를 말한다. <素問·刺法論>에 “正氣存內 邪不可干”³⁸⁾, <素問·評熱病論>에 “邪氣所湊 其氣必虛”, “邪之所在 皆爲不足”³⁸⁾이라 하여 疾病 發生의 原因을 주로 正氣虛로 보았다. 이것은 身體의 正氣가 充實하여 防禦力이 있고 外邪의 作用이 除去되면, 身體 內의 陰陽平衡을 갖게 되고, 따라서 正氣는 臟腑組織機關의 機能活動을 正常的으로 維持하게하고 內外部로부터 病邪에 對抗하는 抵抗力으로 길러 正常的인 生理活動을 維持하고 正常的 生理機能이 進行되게 된다.

해서는 세포성 면역이 중요한 역할을 하는데⁸⁻⁹⁾, Tc/s cell은 CD8+Tcell로 MHC 제일항원을 인식하여 직접적인 세포성 면역 작용을 나타내고 Th cell도 Th1과 Th2로 나뉘어 각각 세포성 면역와 체액성 면역을 촉진시키므로 物質分割 藥鍼液이 유의한 세포성 면역을 중심으로 전반적인 면역계를 활성화하여 免疫 및 抗癌 效果를 가질 것으로 사료된다. 또한 각 세포수에서 中脛에 단순 鍼刺하거나 saline만을 주입한 Control-2, 3을 Control-1과 비교하였을 때 CD8+/CD3e+를 제외하고는 유의성 있는 증가가 나타나지 않은 것은 본 실험의 免疫增進 및 抗癌效果는 中脛의 치료 효과보다는 紅花의 活血通經하고 散瘀止痛하는 약성과 관련이 있을 것으로 思料된다.

Pulmonary colonization assay는 B16-F10 癌細胞株 移植後 紅花 物質分割 藥鍼液을 注入한 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 移植 後 15日에 肺臟의 外部에 나타난 黑色의 colony 數를 顯微鏡으로 觀察한 結果 pulmonary colony 수는 Control-1에서는 86.3±7.2개였고, Control-2에서는 72.3±5.3개였으며, Control-3에서는 63.3±7.8개였고, 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서는 각각 27.8±8.2개와 55.3±7.6개로 나타나 pulmonary colony number의 減少率이 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서 각각56.1%, 12.6%로 有意性 있는 結果가 나타났다. 또한 病理組織檢査도 Control-1에서는 肺組織에 전이된 암세포를 많이 볼 수 있었고, Control-2에서는 Control-3보다는 良好했으나 많은 수의 B16-F10 암세포주가 나타났다으며, 10% CTT-HAS에서는 정상적인 폐세포와 유사할 정도로 pulmonary colony 수가 현저하게 減少하였다(Table 3).

平均生存日數는 Control-1에서는 16.4±3.5일이었고, Control-2에서는 19.2±2.8일이었으며, Control-3에서는 19.5±3.3일이었고, 10% CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서는 각각 23.7±2.2일과 20.4±1.8일로 나타나 延命率은 10%

CTT-HAS와 1% CTT-HAS에서 각각 30.8%와 11.8%로 10% CTT-HAS에서 가장 有意性 있었다(Table 4).

면역 세포들의 有意性 있는 증가에 이어 실제 조직 검사 상에서도 pulmonary colony수가 減少하였으며 平均生存日數 및 延命率도 증가하여 藥鍼의 免疫增進 및 抗癌作用이 실제적으로 개체의 생존에 영향을 미쳤음을 확인할 수 있었다. 또한 藥鍼의 농도에 있어서 實驗群으로 10%와 1% 두 가지를 실험하였는데 모든 실험에서 10%에서 더욱 뚜렷한 효과가 있었다.

以上の 實驗結果를 綜合해볼 때 紅花藥鍼은 抗癌과 免疫增進에 有效한 效能이 있다고 판단되며 이를 바탕으로 앞으로 임상에서 腫瘍 및 免疫關聯疾患에 應用될 수 있도록 계속적인 연구가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

中脛(CV₁₂)에 施術한 紅花藥鍼의 抗癌 및 免疫機能을 實驗的으로 究明하고자 C57BL/6 생쥐에 B16-F10 癌株를 移植하고, 紅花藥鍼한 후 PBMC의 流細胞 螢光分析, 그리고 Pulmonary colony formation, 생쥐의 平均生存日數 및 延命率을 구하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 脾臟細胞의 增殖은 實驗群에서 對照群보다 增加하였다.
2. PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK⁺/CD3e⁺ 細胞數의 比率이 全 實驗群에서 對照群에 比하여 增加하였다.
3. 實驗群 肺組織의 Pulmonary colony 수는 減少하였다.
4. 實驗群의 生存日數와 延命率은 增加하였다.

以上の結果로 紅花 藥鍼은 免疫增進 및 抗癌作用에 效果가 있는 것으로 생각되며, 향후 持續的인 研究 및 臨床的인 應用이 必要하리라 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 催容泰 外. 鍼灸學(上·下). 서울: 集文堂. 1991: 32, 42, 45, 56, 214-234, 382-384, 699-701, 730-732, 1457-1467.
2. 金泰潤. 人蔘水鍼 前處置가 發癌豫防에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院 碩士學位論文. 1998.
3. 朴祥鎔. 薏苡仁水鍼이 腫瘍에 미치는 影響. 大田大學校大學院 碩士學位論文. 1994.
4. 催鍾鎬. 枸杞子 및 地骨皮 藥鍼이 腫瘍 및 免疫에 미치는 影響. 大田大學校大學院 博士學位論文. 1996.
5. 金重完 外. 金銀花藥鍼의 抗腫瘍 作用 및 牛體臟器에 대한 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999; 16(1): 255-267.
6. 김대수. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1989; 5(1): 97-105.
7. 國지호길 외. 최신면역학. 서울: 집문당. 1989: 33-35, 204-205.
8. Brunschwig, A., Southam, C.M. and Levin, A.G.. Host resistance to cancer. Ann. Surg.. 1985; 162: 416.
9. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. Pro. Exp. Tumor Res.. 1990; 13: 1.
10. Eiber, F.R. and Morton, D.L.. Impaired immunologic reactivity and recurrence of following cancer surgery. Cancer. 1990; 25: 362.
11. 新太陽社編輯局. 原色最新醫療大百科辭典. 서울: 新太陽社. 1991: 155, 157-160, 163-164, 171.
12. 洪元植. 現代中共의 癌治療. 서울: 英文社. 1984: 81-94, 329-330, 361, 372-375, 378-379, 381-382.
13. 金예희 등. 중앙학. 서울: 인제대학교출판부. 1994: 235-241.
14. 中人浩. 癌腫防治研究. 서울: 成輔社. 1984: 25-29, 31-38.
15. 林紅生. 歷代中醫腫瘤論選粹. 북경: 북경출판사. 1983: 1, 35, 45, 162, 258, 295, 478.
16. 許在淑. 胃癌治驗例. 大韓韓醫學會誌. 1964; 2(8~9合併號): 35-36.
17. 任佐彬. 癌治療에 대한 小考. 大韓韓醫學會誌. 1971; 36: 7-13.
18. 李珩九. 肺癌에 관한 東西醫學의 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1991; 12(2): 52-65.
19. 孟琳升. 中國治癌大成. 北京科學技術出版社. 1995: 18-19.
20. 金현아, 임성우, 이원철. 韓藥을 이용한 抗癌實驗研究의 傾向에 觀한 考察. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1998; 4(1): 211-232.
21. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社. 1998: 424-425.
22. 顏正華. 中藥學. 北京: 人民衛生出版社. 1991: 556-558.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 法人文化社. 2002: 1944.
24. 王好古. 國譯 湯液本草. 서울: 大星文化社. 1996: 129-130.
25. 常敏毅. 抗癌本草. 서울: 一中社. 1992: 148-149.
26. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社. 1982: 966-968.

27. 中藥大辭典編纂委員會編. 新編中藥大辭典. 서울 : 一中社. 1991 : 1308-1310.
28. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學 (上·下). 서울 : 集文堂. 1991 : 730-731, 1457-1467.
29. 李丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 成輔社. 1989 : 397-398.
30. 安營基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 694-695.
31. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 : 83-84, 392-393.
32. 楊繼洲. 鍼灸大成. 서울 : 大星文化社. 1984 : 268.
33. 朴鍾國. 針灸治療學. 서울 : 集文堂. 1983 : 829-830.
34. 곽이성 외. 난소질제 흰쥐의 임상화학지수에 미치는 홍삼조사포닌의 영향. 고려인삼학회지. 2000 ; 24(1) : 46-50.
35. 서울대학교 의과대학. 腫瘍學. 서울 : 서울대학교출판부. 1996 : 1-5, 43-93.
36. 方藥中外. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1986 : 621-636.
37. 서울대학교 의과대학 편. 腫瘍의 發生原因 및 危險要因. 서울 : 서울대학교출판부. 1989 : 31-44.
38. 洪元植 篇. 精校黃帝內經素問. 東洋醫學研究院. 1985 : 11, 124, 285.
39. Seigler HF. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci. USA. 1998 ; 95 : 13141-13146.
40. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25-26, 28, 31-32, 134.