

吳茱萸약침의 항암효과에 대한 실험적 연구

차관배 · 김윤식 · 유호룡 · 조현경 · 오영선¹ · 설인찬*

대전대학교부속한방병원 심계내과학교실, 1:혜화병원

Experiment Report about the Effect on the Anti-cancer of Herbal-acupuncture with *Evodiae Fructus* Infusion Solution

Kwan Bae Cha, Yoon Sik Kim, Ho Ryong Yoo, Hyun Kyung Jo, Young Seon Oh¹, In Chan Seol*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, 1:Hye-hwa Hospital

This study was done to investigate the effect of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement of herbal-acupuncture with *Evodiae Fructus* herbal infusion solution(EF-HAS). To study the effects of anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement of EF-HAS, we injected EF-HAS into Chung-wan(CV12) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma. Then, we have examined the effect on the increasing of spleen cells, the effect on the number of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in mice's PBMCs, the effect on the pulmonary colony number, and the effect on median survival time(MST) and increase of life span(ILS) of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma. The following results were obtained; in the experiment groups treated with EF-HAS, the spleen cell proliferation in C57BL/6 mice, the percentage of CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ cells in C57BL/6 mice's PBMCs, and MST and ILS of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma were significantly increased compared with that of the control group. And in the experiment groups treated with EF-HAS, the pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma was decreased significantly compared with that of the control group. These results support a role for EF-HAS might be usefully applied in treatment of cancer.

Key words : *Evodiae Fructus*(EF), Herbal-acupuncture, Chung-wan(CV12), Anti-cancer, Immune response improvement

서론

종양이란 자율성을 가진 비정상적인 세포의 과잉증식으로 말미암아 실질장기, 유강장기, 골조직 및 피부조직 등에 비정상적인 조직의 생장발육 현상을 야기함으로써 개체와 정상 조직에 대하여 파괴성을 나타내는 악성 질환이다^{1,2)}. 암은 우리나라에서 심·뇌혈관질환을 뛰어넘어 사망원인 1위를 차지하고 있어 암의 예방과 치료는 오늘날 의료계의 큰 과제로 등장하였다^{3,4)}.

한의학에서는 癰疽, 腫毒, 積聚, 癥瘕, 巖, 陰瘡, 癭瘤, 肺癰, 肝癰, 石癰, 石疔, 疔疽 등이 종양의 범주에 해당된다고 볼 수 있으며, 그 발병기전으로 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 臟腑失調, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 등을 들 수 있고, 이러한 종양에 대한 한의학

적 치료법으로 扶正法, 祛邪法 및 扶正祛邪法을 임상에서 활용할 수 있다^{5,7)}.

약침요법은 경락과 한약재의 장점을 결합하여 고안된 신침요법 중의 하나로서, 질병과 상응하는 경혈과 약물을 선택하고 정제된 약침액을 經穴 내에 주입하여 經穴과 약물이 질병에 대해 동시에 작용하도록 함으로써 질병을 예방하고 치료하는 방법이다⁸⁾. 최근 면역계질환의 예방 및 치료 등에 유효하다는 보고가 많이 있으며, 임상에서도 각종 질환에 응용되고 있다^{7,9)}.

항암작용 및 면역증진 효과에 대하여 약침요법을 이용한 실험적 연구로는 靑風藤¹⁰⁾, 木香¹¹⁾, 瓦松¹²⁾, 苦參¹³⁾, 枸杞子¹⁴⁾, 地骨皮¹⁴⁾ 및 豬鬃¹⁵⁾ 등의 약침연구가 있었고, 특히 吳茱萸약침의 항암 및 면역기능에 대한 연구로 박¹⁶⁾의 足三里穴 약침시술을 들 수 있으나, 아직까지 吳茱萸약침의 中腕穴 시술에 대해서는 접할 수 없었다. 이에 저자는 溫中, 止痛, 理氣, 燥濕의 효능이 있는 吳茱萸¹⁷⁾로 약침액을 제조한 후, 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調升降하는

* 교신저자 : 설인찬, 대전시 중구 대흥동 22-5번지 대전대학교부속한방병원

· E-mail : seolinch@dju.ac.kr, · Tel : 042-229-6805

· 접수 : 2006/05/17 · 수정 : 2006/08/25 · 채택 : 2006/09/21

中脘(CV12)¹⁸⁾에 시술하여 항암작용 및 면역력 증진에 미치는 영향 등을 관찰, 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 4~5주령의 암컷 C57BL/6 mouse로서, 대한실험센터에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, calcium 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사 배합 사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux로 유지하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 吳茱萸(Evodiae Fructus; EF)는 대전대학교부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 약침액의 제조

吳茱萸 물질분획 약침액(herbal acupuncture solution; HAS)은 곽¹⁹⁾ 등이 제시한 방법에 따라 diaion HP-20 수지를 이용하여 제조하였다. 물로 추출한 吳茱萸 원액 100g을 diaion HP-20 수지가 들어있는 흡착 chromatography에 부어 그 폭이 약 25~30cm가 될 때까지 방치하였다. 이후 증류수 1,000ml를 붓고 Diaion HP-20 수지를 통과시켜 吳茱萸액을 분리하였는데, 이 액체를 다시 30% MeOH 500ml, 70% MeOH 500ml, 30% acetone 500ml, 70% acetone 500ml에 각각 통과시켜 얻은 분획 중 생쥐의 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)에서 cytokine 유도 활성이 가장 좋은 70% methanol층 분획으로 吳茱萸 약침액을 제조하였다.

70% methanol층 吳茱萸 분획을 3차례 여과하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator로 감압 농축하였다. 농축된 吳茱萸 용액에 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여 실온에서 교반시키고, 이를 방치한 후 얻어진 침전물을 다시 한번 여과하였고, 이 여과액을 다시 rotary vaccum evaporator로 감압 농축한 후 얻어진 침전물을 또 다시 여과하였다. 이렇게 얻어진 여과액에 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반시킨 후 방치하여 생성된 침전물을 다시 한번 여과하였고, 이 여과액에 다시 75% ethyl alcohol 30ml를 가하여 교반시키고 실온에 방치하기를 총 3회 반복한 다음, 이 여과액 안의 ethyl alcohol을 감압 제거하여 잔사건량이 20g이 되도록 하였고, 1N NaOH로 pH6.8로 조절하여 저온에서 12시간 방치한 다음 미량의 부유액을 여과하고 멸균한 후 70% methanol을 가하여 각각 10%와 20%의 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 70% MeOH층 吳茱萸약침액(EF-HAS)에 의한 PBMCs의

mRNA유전자 발현 조절 실험

(1) PBMCs 분리 및 약물처리

① PBMCs의 분리

C57BL/6 mouse를 경추 탈골법으로 치사시킨 후 spleen을 적출하고, 적출한 spleen을 100mesh에 올려놓고 syringe piston 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄하였다. 분쇄한 spleen 조직을 15ml conical tube에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직 덩어리를 침전시킨 후, 상층액을 취해 2차례 세척하고 난 뒤, 0.83% NH4Cl 용액을 넣고 5분간 incubation시켜 적혈구를 용혈시켰다. 그리고 다시 2차례 세척한 후, centrifuge로 2,000rpm에서 20분간 원심분리 한 다음, buffy coat 부분을 얻어 이를 실험에 사용하였다.

② 세포배양 및 약물처리

PBMCs를 24-well plate에 1×10⁶개의 세포로 나누어 각 well에 분주하고, 70% methanol층 EF-HAS(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)와 양성대조군(LPS, 2.5μg/ml)을 각각 처리한 다음, 4시간 동안 배양한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)로 수세하여 total RNA를 분리하였다.

(2) mRNA 유전자 분석

① Total RNA의 추출

PBMCs 배양 종료 후 24-well plate의 상층액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20μl의 증류수에 용해시켜 정량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4μg을 ethidium bromide(EtBr)가 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70℃에서 10분간 denaturation 시킨 후, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading하여 그 양을 확인하였다. 양을 확인한 RNA는 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통하여 분석하였다.

② cDNA의 합성

RNA의 역전사 반응을 확인하기 위해 준비된 total RNA 3μg을 75℃에서 10분간 denaturation시키고, 이를 다시 2.5μl의 10mM deoxynucleotide triphosphates(dNTPs), 1μl의 random sequence hexanucleotides(25pmole/25μl), RNA inhibitor인 1μl의 RNasin(20U/μl), 1μl의 100mM DTT 및 4μl의 5×RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)와 함께 혼합한 후, 1μl의 M-MLV RT(200U/μl)를 첨가한 뒤 diethyl pyrocarbonate(DEPC)가 처리된 증류수를 더하여 최종 부피가 20μl가 되도록 만들었다. 이 20μl의 RNA 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 원심분리하여 37℃의 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 난 뒤, 즉시 deep freezer로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)을 통하여 분석하였다.

③ cDNA의 PCR 증폭

PCR 증폭은 primus 96 legal PCR system(with high pressure lid)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응은 이미 합성된 1μl의 first-strand cDNA를 주 모델로 사용하였는데, first-strand cDNA에 sense primer(20pmole/μl)와 antisense primer(20pmole/

μl)를 혼합하여 1μl를 가하고, 다시 3μl 2.5mM deoxynucleotide triphosphates(dNTPs), 3μl 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 및 0.18μl Taq polymerase(5U/μl)를 첨가한 다음, 최종 부피가 30μl가 되도록 멸균증류수를 가한 후, predenaturation을 95℃에서 5분, denaturation을 74℃에서 5분, annealing을 55℃에서 1분, elongation을 72℃에서 1분 동안 각각 25cycle을 시행한 뒤, 마지막으로 postelongation을 72℃에서 3분 동안 시행하여 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20μl씩 1.2% agarose gel에 loading 하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

PCR에 사용된 oligonucleotide의 primer 배열은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Genomic Sequence of Oligonucleotide for PCR

	Primer	Genomic Sequence
IL-1β	sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTCTGAGCTTGAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3'
	oligonucleotide	
IL-4	sense oligonucleotide	5'-ATGAAGTCTTCTCCACAAGCGC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
	oligonucleotide	
IL-5	sense oligonucleotide	5'-GTGCAAATGCAAGGGATACC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TCCATCTCCAGCACTTCATG-3'
	oligonucleotide	
IL-6	sense oligonucleotide	5'-ATGAAGTCTCTCTGCAAGA-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGTTTGCCGAGTAGATCTCAA-3'
	oligonucleotide	
IL-10	sense oligonucleotide	5'-TCCTTAATGCAGGACTTTAAGGGTACTTG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GACACCTTGGCTTGGAGCTTATTAATAATC-3'
	oligonucleotide	
IL-12	sense oligonucleotide	5'-GCTCCTCAGGAATCTGTTTC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGCTCATGTACTTTCATGAG-3'
	oligonucleotide	
TNF-α	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGTCAGATTGTTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
	oligonucleotide	
β-actin	sense oligonucleotide	5'-TGGAACTCTGTGGTCCATGAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
	oligonucleotide	
IFN-γ	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
	oligonucleotide	

3) Spleen cell의 방사성 동위원소의 양 측정

Spleen의 면역세포를 분리하여 96-well plate의 각 well에 5×10⁵개씩 cell을 넣고, EF-HAS(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)를 농도별로 처리하였다. 양성대조군으로 concanavalin A(Con-A, 10 μg/ml)를 처리한 후, 각 cell을 37℃에서 72시간 동안 배양한 뒤, 50μCi/ml의 methyl-3H-thymidine을 첨가한 다음, 다시 8시간 동안 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사성 동위원소의 양을 측정하기 위하여 cell harvester를 사용하여 세포만을 glass microfiber filter 위에 수집하고, 이를 건조한 뒤 liquid scintillation counter를 이용하여 방사성 동위원소의 양을 측정하였다.

4) In vivo에서의 면역세포 증진과 활성화

(1) B16-F10 암세포주의 이식

B16-F10(ATCC, CRL-6475) 암세포주를 C57BL/6 mouse의 피하에 계대배양하여 얻은 종양 조직 1g에 10ml의 cold Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Ca²⁺ & Mg²⁺ free)

을 가한 후, 100mesh로 조직을 분쇄한 뒤, 다시 1,500rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그리고 1,700U/mg의 collagenase를 원심분리한 B16-F10 암세포주 0.1g/ml에 처리하여 30분간 37℃의 water bath에서 배양시킨 후 다시 1,500rpm으로 5분간 원심분리하였다. 이후 상등액을 제거한 다음 0.85% NH₄Cl을 넣어 잘 섞은 후, 37℃ 배양기에서 5분간 방치하여 적혈구를 파괴시킨 뒤, 다시 동일한 방법으로 원심분리하여 B16-F10 암세포주를 분리하였다. 이렇게 얻어진 B16-F10 암세포주(2×10⁵cells/mouse)를 C57BL/6 mouse의 꼬리 정맥에 이식한 후 70% methanol층 EF-HAS를 C57BL/6 mouse의 中脘(CV12)에 총 21일간 약침시술을 하였다.

(2) 실험군의 분류

실험군은 다음과 같이 분류하였다.

① 대조군-1(Control-1)

실험 7일째 날에만 B16-F10 암세포주를 이식하고, 그 외 기간 동안에는 아무런 처치를 하지 않은 군

② 대조군-2(Control-2)

실험 시작일로부터 6일간 中脘에 1일 1회 syringe 바늘만을 자입하였다가 즉시 제거하는 시술을 한 후, 7일째 되는 날 B16-F10 암세포주를 이식하고, 다시 실험 8일째부터 15일간 中脘에 1일 1회 syringe 바늘만을 자입하였다가 즉시 제거하는 시술을 한 군

③ 대조군-3(Control-3)

실험 시작일로부터 6일간 생리식염수 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 후, 7일째 되는 날 B16-F10 암세포주를 이식하고, 다시 실험 8일째부터 15일간 생리식염수 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 군

④ 실험군-1(10% EF-HAS)

실험 시작일로부터 6일간 10% EF-HAS(70% methanol층) 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 후, 7일째 되는 날 B16-F10 암세포주를 이식하고, 다시 실험 8일째부터 15일간 10% EF-HAS(70% methanol층) 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 군

⑤ 실험군-2(1% EF-HAS)

실험 시작일로부터 6일간 1% EF-HAS(70% methanol층) 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 후, 7일째 되는 날 B16-F10 암세포주를 이식하고, 다시 실험 8일째부터 15일간 1% EF-HAS(70% methanol층) 0.1ml를 中脘에 1일 1회 주입한 군

(3) 취혈

인체의 中脘(CV12)에 상응하는 실험동물의 체표면의 털을 제거한 후, 骨度分寸法에 의거하여 경혈탐지기를 사용하여 취혈하였다.

(4) 약침시술

약침주입기로 1ml syringe를 사용하여 해당 실험동물의 中脘에 0.1ml씩, 1일 1회, 총 21일간 약침시술을 하였다.

(5) CD3e⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD69⁺, NK1.1⁺, B220⁺의 세포형광분석

B16-F10 암세포주를 C57BL/6 mouse에 이식한 후 3일째 되는 날, 경추탈골법으로 실험동물을 치사시킨 후 spleen을 분리 적출하였다. 적출한 spleen cell에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고, 4℃에서 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 실시한 후, 각각의 cell에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-NK1.1, PE-anti-B220을 가하

여 30분간 얼음 속에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest program을 이용하여 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수를 각각의 비율(%)로 분석하였다.

(6) Pulmonary colonization assay

B16-F10 암세포주를 C57BL/6 mouse에 이식한 후 15일째 되는 날 colony assay를 실시하였다. Pulmonary colonization assay는 실험동물의 lung의 외부에 나타난 흑색의 colony 수를 광학현미경으로 관찰하여 파악하였다.

(7) 병리조직학적 관찰

병리조직학적 관찰을 위해 B16-F10 암세포주를 이식한 후 15일째 되는 날, 실험동물을 처사 12시간 전에 식이를 중단시키고 공복 상태에서 ether를 흡입시켜 마취시킨 다음, 각각의 대조군과 실험군에서 lung을 분리 적출하여 식염수로 혈액을 세척하고, 통상적인 방법에 따라 20% formalin 용액에 24시간 동안 고정한 뒤, 적당한 크기로 잘게 썰어 흐르는 물에 8시간 동안 수세하였다. 그리고 수세한 각 조직들을 70% alcohol로 농도를 100%까지 상승시키면서 4차례의 탈수 과정을 거친 후, 다시 xylene 용액으로 30분씩 총 3차례 투명 과정을 거친 다음, 용해된 paraffin에 침투 및 포매 과정을 거쳐 블록으로 제작하였다.

이 블록을 microtome을 이용하여 4μm 두께의 절편으로 잘라 micro slide에 부착하고, 탈paraffin 및 함수 과정을 거친 다음, 일반적인 방법과 동일하게 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)으로 5분간 세척한 후, hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 실시하였다.

(8) 생명연장곡선의 분석

B16-F10 암세포주를 C57BL/6 mouse에 이식한 날로부터 매일 실험동물의 생존여부를 관찰하여 평균생존일수 및 생명연장율을 다음과 같이 구하였다.

Median survival time(MST) : 평균생존일수
 Increase of life span over Control-3(ILS) : 생명연장율
 $ILS = \frac{(T-C)}{C} \times 100(\%)$
 T : 실험군의 MST
 C : 대조군의 MST

3. 통계 처리

각 실험군 결과값은 unpaired student's T-test(Scheffler, 1980) 및 SPSS/PC 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

성 적

1. Spleen cell 증식에 미치는 영향

70% Methanol층 EF-HAS를 건강한 C57BL/6 mouse에서 분리 적출한 spleen cell에 각각 10%, 1%, 0.1%(100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml)의 농도로 처리하여 spleen cell의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과, 70% methanol층 EF-HAS에 농도 의존적으로 유의

성 있는 증가 효과를 보였다(Fig. 1).

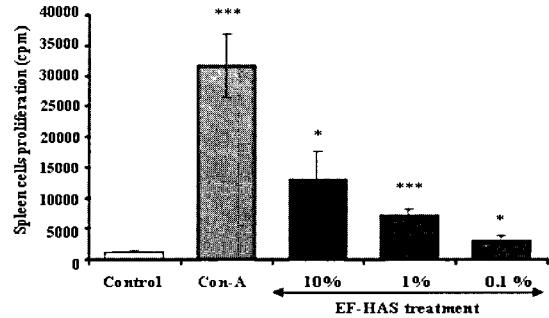


Fig. 1. The effect of EF-HAS on spleen cells proliferation in C57BL/6 mice. Mouse B cells from healthy C57BL/6 mice were treated with EF-HAS extract(10%, 1%, 0.1%). Spleen cells were cultured with Con-A(positive control) and EF-HAS extract for 48hrs. After 40hrs incubation, treated methy-3H-thymidine uptake, the culture supernatants and spleen cells were collected using cell harvester. The cell proliferation were measured to liquid scintillation counter as described in materials and methods. Statistically significant value compared with control data by students T- test(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

2. PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수에 미치는 영향

1) PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 세포수 비율

PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 세포수의 비율이 Control-1의 경우 11.1±2.6%, Control-2의 경우 12.2±1.9%, Control-3의 경우 12.5±1.6%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 17.6±3.5%와 15.2±2.5%로 증가하였다(Fig. 2).

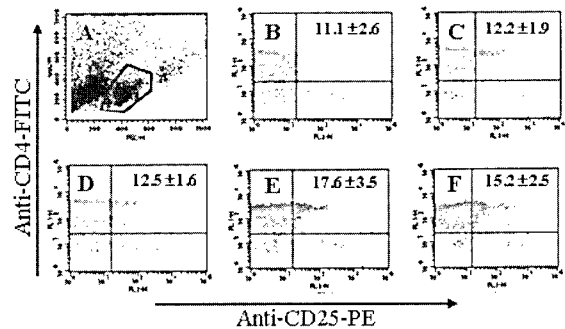


Fig. 2. The effects of EF-HAS at CV12 on the percentage of CD25⁺/CD4⁺ in C57BL/6 mice's PBMCs. C57BL/6 mice were treated with EF-HAS at CV12 for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁶cells/mouse). C57BL/6 mice's PBMCs(1×10⁶cell/ml) were isolated on the 21th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC(A). Two groups treated with EF-HAS showed increased numbers of CD25⁺/CD4⁺ T-cells. Control-1(B): B16-F10 melanoma only. Control-2(C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12. Control-3(D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline. EF-HAS(E, F): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10%(E) and 1%(F) EF-HAS.

2) PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 세포수 비율

PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율이 Control-1의 경우 5.3±0.5%, Control-2의 경우 8.4±1.3%, Control-3의 경우 8.9±1.0%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각

13.2±1.7%와 11.2±2.1%로 증가하였다(Fig. 3).

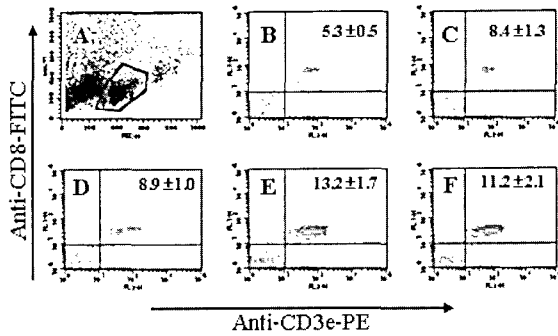


Fig. 3. The effects of EF-HAS at CV12 on the percentage of CD8⁺/CD3e⁺ in C57BL/6 mice's PBMCs. C57BL/6 mice were treated with EF-HAS at CV12 for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁵cells/mouse). C57BL/6 mice's PBMCs(1×10⁶cell/ml) were isolated on the 21th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC(A). Two groups treated with EF-HAS showed increased numbers of CD8⁺/CD3e⁺ T-cells. Control-1(B): B16-F10 melanoma only. Control-2(C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12. Control-3(D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline. EF-HAS(E, F): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10%(E) and 1%(F) EF-HAS.

3) PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 세포수 비율

PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 세포수의 비율이 Control-1의 경우 47.9±3.8%, Control-2의 경우 52.2±4.2%, Control-3의 경우 51.7±3.7%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 59.0±3.7%와 55.2±4.2%로 증가하였다(Fig. 4).

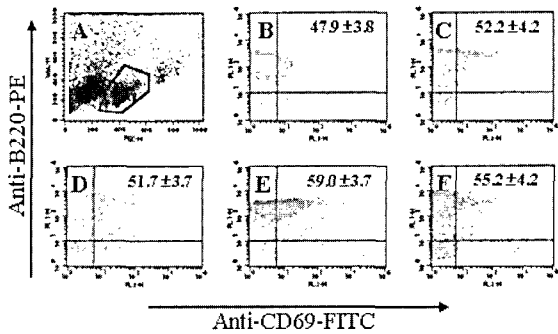


Fig. 4. The effects of EF-HAS at CV12 on the percentage of CD69⁺/B220⁺ in C57BL/6 mice's PBMCs. C57BL/6 mice were treated with EF-HAS at CV12 for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁵cells/mouse). C57BL/6 mice's PBMCs(1×10⁶cell/ml) were isolated on the 21th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC(A). Two groups treated with EF-HAS showed increased numbers of CD69⁺/B220⁺ B-cells. Control-1(B): B16-F10 melanoma only. Control-2(C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12. Control-3(D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline. EF-HAS(E, F): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10%(E) and 1%(F) EF-HAS.

4) PBMCs의 NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수 비율

PBMCs의 NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율이 Control-1의 경우 3.7±0.3%, Control-2의 경우 3.5±0.4%, Control-3의 경우 4.2±0.8%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각

5.7±0.6%와 5.2±0.5%로 증가하였다(Fig. 5).

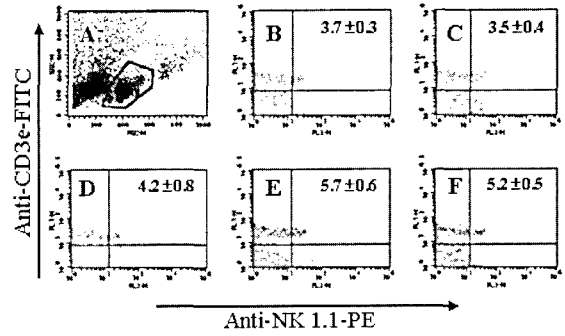


Fig. 5. The effects of EF-HAS at CV12 on the percentage of NK1.1⁺/CD3e⁺ in C57BL/6 mice's PBMCs. C57BL/6 mice were treated with EF-HAS at CV12 for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁵cells/mouse). C57BL/6 mice's PBMCs(1×10⁶cell/ml) were isolated on the 21th day. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel(left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC(A). Two groups treated with EF-HAS showed increased numbers of NK1.1⁺/CD3e⁺ natural killer cells. Control-1(B): B16-F10 melanoma only. Control-2(C): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12. Control-3(D): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline. EF-HAS(E, F): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10%(E) and 1%(F) EF-HAS.

3. Pulmonary colony 수에 미치는 영향

B16-F10 암세포주를 C57BL/6 mouse에 이식한 후 15일째 되는 날 colony assay를 실시한 결과, Control-1의 경우 86.3±7.2개, Control-2의 경우 72.3±5.3개, Control-3의 경우 63.3±7.8개로 나타난 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 38.3±4.7개와 58.2±5.4개로 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였고, 그 감소율은 각각 39.5%와 8.1%로 나타났다. 병리조직학적 관찰에서도 70% methanol층 EF-HAS에 의하여 pulmonary colony 수가 유의성 있게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6-7).

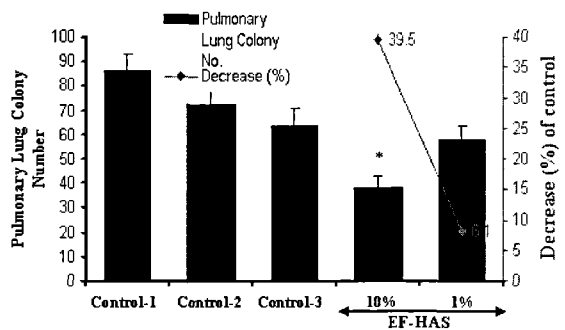


Fig. 6. The effects of EF-HAS at CV12 on the inhibition of melanotic colony formation, and the pulmonary colony number of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma. C57BL/6 mice were treated with EF-HAS at CV12 for 21 days. On the 7th day, the mice were implanted intravenously with B16-F10 melanoma(2×10⁵cells/mouse). 15 days after the B16-F10 melanoma implantation, the next day of the last injection with EF-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 CV12. Control-3: B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1 ml of saline. EF-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10% and 1% EF-HAS. Each point represents the mean± S.E. of 10 mice. Statistically significant value compared with Control-3 data by students T- test(* : p<0.05).

고찰

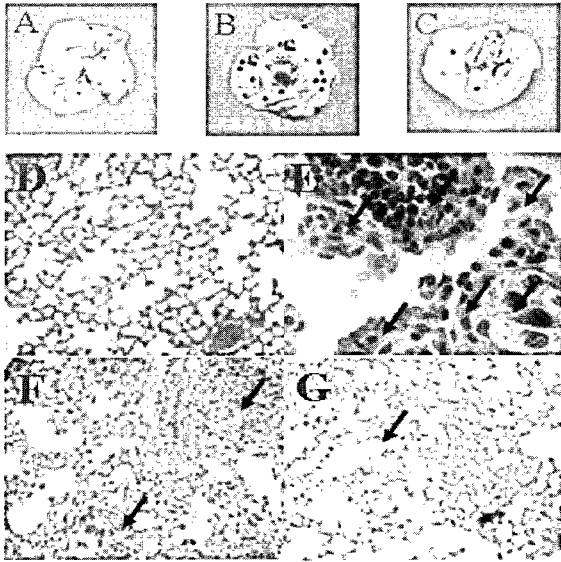


Fig. 7. Representative lungs to show the inhibition of melanotic colony formation, and histological analysis of the pulmonary tissue with B16-F10 melanoma metastasis in C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were i.v. injected with 2.0×10^6 cells of B16-F10 melanoma. 15 days later, tumor pulmonary colonization became palpable, and they were sacrificed, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these tumors (arrow) at light microscope ($\times 100$). Normal group (A, D) Control-2 (E): B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12. Control-3 (B, F): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline. EF-HAS (C, G): B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10% EF-HAS.

4. 평균생존일수 및 생명연장율에 미치는 영향

평균생존일수가 Control-1의 경우 16.4 ± 3.5 일, Control-2의 경우 19.2 ± 2.8 일, Control-3의 경우 19.5 ± 3.3 일로 나타난 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 25.0 ± 4.0 일과 22.4 ± 4.6 일로 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 생명연장율은 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서 각각 28.2%와 12.9%로 역시 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 8).

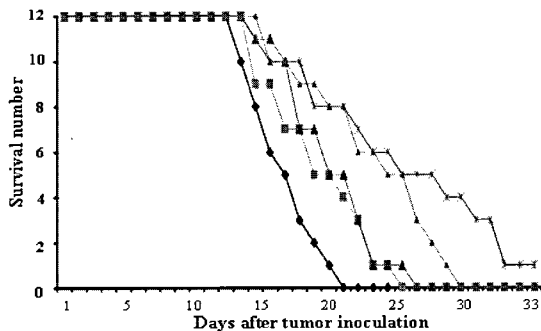


Fig. 8. The effects of EF-HAS at CV12 on survival time of C57BL/6 mice implanted intravenously with B16-F10 melanoma. C57BL/6 mice were i.v. injected with 2.0×10^6 cells of B16-F10 melanoma. 15 days later, the number of alive mice was measured for survival time once daily. Control-1: B16-F10 melanoma only (◆). Control-2: B16-F10 melanoma + single acupuncture stimulation at CV12 (■). Control-3: B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of saline (▲). EF-HAS: B16-F10 melanoma + intradermal injection into CV12 with 0.1ml of 10% EF-HAS (★) and 1% EF-HAS (▲). Each point represents the mean \pm S.E. of 12 mice.

종양이란 자율성을 가진 비정상적인 세포의 과잉증식으로 말미암아 실질장기, 유강장기, 골조직 및 피부조직 등에 비정상적인 조직의 성장발육 현상을 야기함으로써 개체와 정상 조직에 대하여 파괴성을 나타내는 악성 질환이다^{1,2)}. 종양은 임상 및 병리형태학적인 소견에 의하여 양성종양과 악성종양으로 구분할 수 있는데, 일반적으로 암이라고 부르는 악성종양은 불규칙하고도 빠른 침습적 성장을 통해 주변 정상조직을 파괴하고, 체내 여러 부위로 확산, 전이되면서 개체를 결국 사망에 이르게까지 하는 치명적인 질환이다²⁰⁾.

서양의학에서는 암의 발생인자를 유전, 인종, 연령, 면역학적 인자 등의 내적인자와 화학적 발암물질, 방사선, 종양성 바이러스 등의 외적인자로 구분하여 설명하고 있으며, 그 치료방법으로 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 유전자요법 등을 시행하고 있다^{20,21)}. 그러나 이들 치료법의 눈부신 발전에도 불구하고 아직까지 이렇다할만한 치료 성과를 기대하기는 어려운 실정이다. 더욱이 수술요법과 화학요법 및 방사선요법의 경우 항암 효과에 대한 일정한 한계와 여러 문제점들이 보고되고 있는 상황인데다, 근래 대두되고 있는 유전자요법은 아직까지 그 치료방법이 온전히 정립되지 못한 실정이다²⁰⁾. 그리하여 근래에는 환자의 정상조직, 특히 면역계 조직에 막대한 부작용을 야기하는 화학 및 방사선요법의 단점을 줄이기 위하여 면역감시기구를 보강하는 항암면역요법이 각광을 받고 있다²²⁾.

종양의 치료에 있어서 이러한 항암면역요법의 대표적인 방법으로 근간에는 한의학적인 치료가 대두되고 있다. 화학요법이나 방사선요법 시행 후 발생하는 대표적인 부작용으로 眩暈, 乏力 등의 전신증상과 오심구토, 식욕부진, 복통, 설사 등의 위장관 장애, 골수조혈장애, 장기의 중독, 신경염, 폐경, 탈모, 피부의 변화 등을 들 수 있는데, 이들 문제점의 대부분을 한의학에서는 健脾和胃, 滋補肝腎, 補氣養血, 生津潤燥, 清熱解毒하는 治法으로 완화시킬 수 있다²²⁾. 화학요법이나 방사선요법과 같은 양방적인 항암치료와 동시에 이와 같은 한의학적인 扶正去邪 위주의 치료를 병행하는 경우, 체내 면역기능을 증강시키고, 골수의 조혈기능을 개선하며, 내분비 기능을 조절하여 종양에 대한 저항력을 증가시킴으로써 항암작용을 극대화하는 동시에, 항암치료의 부작용을 감소시킴으로써 순조롭게 방사선요법이나 화학요법을 받을 수 있도록 도와주고, 더 나아가 암의 성장 자체를 억제하는 경우가 많다²³⁾. 이와 같이 근래에는 한의학적 항암면역요법이 직접적인 항암효과뿐만 아니라 양방적인 항암치료로 인한 부작용을 경감시킴으로써 종양치료에 있어 삶의 질을 향상시키는 데에 그 유효성이 입증되고 있다²¹⁻²³⁾.

한의학에서 종양에 대한 최초의 인식으로 殷墟의 甲骨文에 '瘤'라는 병명이 나타난 것과, 周禮에 瘍醫라는 표현이 등장한 것을 들 수 있으며, 그 후로 《黃帝內經》에 '伏梁, 癧, 疔, 腸澼, 癰, 積聚' 등으로 표현된 이후, 현대 종양의 개념과 비슷한 범주로 癰疽, 癩瘡, 石瘻, 反胃, 翻胃, 癰疽, 腸覃, 疝氣, 食噎, 癰, 巖, 痞塊, 癰瘰, 失榮, 石疽, 惡核, 癰疽, 癰疔, 舌菌 등을 들 수 있다^{7,24,25)}.

한의학에서 종양의 원인으로 《靈樞·刺節真邪篇》²⁴⁾에서는 ‘虛邪之入於身也深 久留而內著’라 하여 正氣虛를, 《靈樞·五變篇》²⁴⁾에서는 ‘皮膚薄而不澤 肉不堅而掉澤 如此則腸胃惡 惡則邪氣留止 積聚乃傷 脾胃之間 寒溫不次 邪氣稍至 蓄積留止 大聚乃起.....津液血氣 腸胃之所生也 腸胃惡則 邪氣留止而成積聚 內傷腸胃之間 若在飲食之寒溫不次 邪氣稍之則蓄積’이라 하여 飲食內傷과 外感을, 巢²⁶⁾는 ‘積聚者 乃陰陽不和 臟腑虛弱 受于風邪 搏于臟腑之氣少爲也’라 하여 正氣虛와 外感風邪를, 王²⁷⁾과 陳²⁸⁾은 각각 ‘憂鬱傷肝 思慮傷脾 積想在心 所願不得志者 致經絡痞澁 聚結成核 初如豆大 漸者棋子’, ‘乳岩由于憂思鬱結 所願不遂 肝脾氣逆 以致經絡阻塞 結積成核’이라 하여 七情變化를, 최²⁹⁾는 원발성의 원인으로 七情, 六淫, 內傷을, 속발성의 원인으로 痰飲과 瘀血을, 전³⁰⁾은 風寒暑火濕 등의 外邪를 感受하는 外因과 怒憂思悲恐鬱結에 의한 七情內傷의 內因과 辛鹹, 甘苦, 煎炒, 酒濕 등의 飲食失調과 過勞, 房勞過度로 인한 不內外因으로 나누어, 張은 七情不舒, 飲食不節, 過度勞倦, 老年衰老, 氣血虧損 등으로 인한 內因과 外感六淫으로 인한 外因을 각각 주장하였다.

종양에 대한 한의학적 치료법으로 扶正法, 祛邪法 및 扶正祛邪法 세 가지 治法을 들 수 있는데, 張³¹⁾은 養陰生津法을 중시하였고, 王³²⁾ 등은 扶正 위주의 治法에 活血化痰法을 겸하여 활용하여야 한다고 하였으며, 徐³³⁾ 등은 補氣, 補血, 滋陰補腎, 溫腎助陽 등의 扶正培本法을 주로 활용하였다. 이에 관하여 《素問·上古天真論》에 ‘眞氣從之 精神內守 病安終來’, 《素問·刺法論》에 ‘正氣存內 邪不可干’, 《素問·評熱病論》에 ‘邪之所湊 其氣必虛’, 《素問·四氣調神大論》에 ‘不治已病 治未病’이라 하여 체내의 正氣와 체외의 邪氣간의 항쟁이 질병을 일으키는 주요 관건이 된다고 하였으며, 扶正祛邪의 治法이 질병치료의 원칙이 됨을 제시하였다²⁵⁾.

종양에 있어 생명에 가장 큰 위협이 되는 원인은 바로 암세포의 전이능력이다. 전이란 악성종양이 가지는 가장 대표적인 특성으로서 종양이 발생한 부위에서의 국소 침윤능력과 동시에 원격부위의 전이능력이 발휘되어 전신의 각 장기나 조직에 전이소를 만듦에 따라 결국 사망에 이르게 하는 주된 원인이 된다. 그러므로 어떤 부위에 암이 발생하게 되면 전이되기 전까지는 암의 생성부위만 찾으면 외과적 수술에 의하여 제거가 가능하지만, 일단 암세포가 원발부위 이외의 여러 곳에 퍼져 나가기 시작하면 외과적 절제로만은 그 치료의 유효성을 장담할 수가 없게 된다¹⁾.

한의학에서는 이와 같은 종양의 전이에 대하여 《靈樞·百病始生篇》²⁴⁾에 ‘是故虛邪之中人也 始於皮膚 皮膚緩則腠理開 開則邪從毛髮入 入則抵深..... 不可勝論’이라 하여 虛邪에 의하여 피부로부터 시작된 질병이 毛髮, 孫脈, 絡脈, 經脈, 濡脈, 伏衝之脈, 筋筋, 腸胃之募原 등에 傳變이 되어 물러가지 않고 머무르게 되면 積으로 변화하게 된다고 하여 종양의 전이를 언급하였고, 劉³⁴⁾는 종양의 전이와 재발의 기본요소가 되는 잔존 암세포를 伏邪, 餘毒으로 표현하였으며, 김³⁵⁾은 종양의 전이와 재발은 잔존 암세포인 餘毒을 기초로 瘀血, 熱毒, 痰濁, 正不抑邪, 氣滯가 상호 결합되어 발생하게 되는 것이라고 하였다.

면역이란 생체내 self와 nonself를 구별하는 system으로서 외부로부터 침입하는 미생물 또는 동종의 조직이나 체내에서 생

긴 돌연변이산물 등과 작용하여 nonself를 제거함으로써 개체의 항상성을 유지하는 현상을 말한다³⁶⁾. 지금까지는 nonself를 특이적으로 인식하여 항체를 형성하거나 세포성 면역반응을 통해 nonself를 제거하는 연속적 반응만을 면역이라 하였지만, 근래에는 면역의 개념이 점차 확대되어 특정 전염성질환에 대한 선천성 저항력도 포함시켜 이를 선천성면역 혹은 자연면역이라 하여 매우 중요시하고 있다^{36,37)}.

한의학에서 면역의 개념은 《素問·上古天真論》의 ‘眞氣從之 精神內守 病安從來’, 《素問·刺法論》의 ‘正氣存內 邪不可干’, 《素問·熱病論》의 ‘邪氣所湊 其氣必虛’, 《靈樞·口問》의 ‘邪氣所在 皆爲不足’, 《靈樞·百病始生》의 ‘風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人’ 등에서부터 나타나는데, 대부분 질병의 발생 및 진행 과정을 正氣와 邪氣의 항쟁으로 인식하고, 질병발생의 주된 원인을 正氣虛로 보았다^{24,25)}. 여기서 말하는 正氣란 질병에 대항하는 생리적인 방어력을 말하는 것으로서 오늘날의 면역기능과 유사하다고 할 수 있으며, 邪氣란 인체내 질병을 일으키는 원인요소의 총칭을 일컫는 것으로서 外感六淫, 痰飲, 瘀血 등을 말한다. 그러므로 질병을 예방하고 건강한 상태를 유지함에 있어 가장 중요한 것은 正氣를 돕고 기르는 것이라고 하여, 질병에 대한 治法으로 인체의 저항력을 조절하고 안정성을 증강시키는 扶正法과 면역기능을 파괴하는 요소를 제거하는 祛邪法을 중요시하고 있다²⁸⁾.

면역은 세균에 대하여 항체를 생산하는 B세포의 체액성 면역반응과, 바이러스나 결핵균 및 진균 등에 대해 감작세포와 cytokine을 생산하는 T세포의 세포성 면역반응으로 구분할 수 있다³⁷⁾. 이러한 면역반응을 이용한 면역요법에는 암조직의 교환이식, 교환수혈, 수동적 면역요법 등이 있는데, 이들 요법의 가장 큰 장점은 암세포의 종류에 구애받지 않고 모든 암증치료에 사용할 수 있다는 것이다. 그 중에서도 망상내피계세포, 특히 임파구의 활동성을 자극하여 면역감시기구를 보강하는 비특이적 면역요법이 근래에 가장 주목받고 있다. 최근에는 종양역학, 종양면역학, 바이러스 종양학, 세포생물학, 분자생물학 등의 발전에 힘입어 종양에 대한 이해 및 치료에 많은 발전을 이루고 있고, 이와 더불어 동서의학을 병행치료하는 방법들이 시도되고 있다^{37,38)}.

지금까지 연구된 보고에 의하면 T helper 세포 중 TH1세포는 IL-2, IFN- γ , lymphotoxin을 생산하고, TH2세포는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10을 생산하며, IL-3, TNF- α 및 GM-CSF는 TH1세포와 TH2세포 모두에서 생산되는 것으로 알려져 있다. 이들의 기능적 차이를 연구한 결과, TH2세포에서 분비되는 IL-4는 IgE의 생성을 증가시키는 반면 TH1세포에서 분비되는 IL-2 및 IFN- γ 는 IgE의 생성을 억제하고, TH2세포가 생성한 IL-10은 TH1세포의 cytokine 생성을 억제하는 반면 TH1세포에서 분비되는 IFN- γ 는 TH2세포의 cytokine 생성을 억제하는 것으로 보아, 이들 면역세포들은 서로 다른 cytokine을 생성함으로써 상호억제 작용을 하여 면역조절에 관여하는 것으로 생각된다³⁸⁾.

Cluster of differentiation(CD)는 각 표식인자의 특성에 따라 CD1, CD2, CD3 등으로 구분한다. CD4⁺ T세포는 보조 T세포를 말하고 CD8⁺ T세포는 억제 T세포 또는 세포독성 T세포를 말하는 것으로서, T세포는 CD4와 CD8 중 하나만 가지게 된다. CD4

는 MHC 제2항원을 인식하는 데 작용하고, CD8은 MHC 제1항원을 인식하는 데 작용하게 되는데, 이중 CD4⁺ 보조 T세포는 다시 앞에서 언급한 TH1세포와 TH2세포로 구분되어진다³⁹⁾.

이와 같이 CD4와 CD8이 T세포를 세분하는 표식인자로 이용되고 있는 반면, 모든 T세포 표면에 표현되는 표식인자로 CD3이 있다. CD3은 T세포의 결정표지인자로서 T세포의 표면에 분포하고, T세포의 항원 수용체에 항원이 결합되었다는 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 가지고 있는데, 일부 NK T세포에 분포하기도 한다. 이 외에 CD25는 활성화된 T세포와 B세포에 분포하여 IL-2 수용체의 기능을 담당하는 표식인자를 말하고, CD69는 활성화된 T세포와 B세포, 그리고 대식세포 및 NK 세포에 분포하고 있는 표식인자를 말한다. 그리고 본 실험에서 살펴본 B220은 사람에게에는 없지만 mouse의 B세포 표면에 있는 표식인자이다^{38,39)}.

최근 이러한 면역세포와 cytokine의 활성화를 이용한 항암 면역요법은 종양의 치료에 있어 새로운 장을 열고 있다. 항암면역요법이란 in vitro에서 활성화시킨 면역세포를 말초혈액에 주입하여 암세포의 사멸을 도모하거나, in vivo에서 T세포, NK세포, DCs세포 등의 활성화를 도모하여 암세포를 자연적인 apoptosis로 유도하는 새로운 항암치료법이다. 이러한 항암 연구에는 그 이론이 비교적 잘 정립되어 있으면서 면역요법 및 전이에 관한 연구를 하기에 적합한 mouse melanoma 전이 모델이 주로 사용된다⁴⁰⁾.

본 연구에서는 mouse melanoma 전이 모델에 吳茱萸약침을 中脘(CV12)에 시술하여 면역세포 활성화에 의한 NK세포의 cytotoxicity와, CD3⁺ T세포, CD4⁺ T helper 세포, CD8⁺ T suppressor 세포(CD8⁺ Tc/s) 및 NK세포의 표면적인 분자 발현 빈도를 관찰하였다. 정상적이고 일반적인 면역세포의 활성화 상태에서는 CD8⁺ Tc/s 반응과 CD4⁺ TH1세포에서 분비되는 IL-2와 IFN- γ 등에 의한 NK세포의 활성화를 통해 암세포를 소멸시키는 작용이 나타난다. 그러므로 T세포의 활성화는 생체내 면역 체계에서 가장 중요한 기전으로서 CD4⁺ T helper 세포와 CD8⁺ Tc/s의 활성화를 의미한다⁴¹⁾. T세포의 면역력이 증강되면 CD4⁺, CD8⁺, CD3e⁺의 활성세포수의 증가와 더불어 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 등의 발현이 증가하는 특징 외에, T세포의 co-stimulation 인자인 CD28⁺이 증가하는 특징적인 반응이 나타나게 되는데, 이는 임파구의 초기 활성화 표식 표면분자인 CD44⁺, CD25⁺/CD4⁺, CD69⁺/B220⁺ 등의 비율 증가로 알 수 있다⁴²⁾. 그러므로 본 실험에서는 CD8⁺ Tc/s의 활성도를 비교분석하기 위해 CD8⁺/CD3e⁺의 세포수 비율을, NK세포의 cytotoxicity를 알아보기 위해 NK1.1⁺/CD3e⁺의 세포수 비율을, CD28⁺의 증가도를 비교분석하기 위해 CD25⁺/CD4⁺와 CD69⁺/B220⁺의 세포수 비율을 세포형 광분석적 방법을 통하여 각각 도출해 내었다.

약침요법은 한의학적인 침구, 경혈, 본초와 서양의학적인 기술이 결합된 일종의 신침요법으로서 혈위주사요법이라고도 하는데, 이는 환자의 증상에 따른 辨證을 근거로 경혈의 치료작용과 약물의 약리작용을 살핀 다음, 상응하는 혈위와 약물을 선택하고, 그 약액을 해당 혈위 내에 주입하여 경혈과 약물이 질병에 대하여 종합적인 작용을 나타나게 함으로써, 침구학적인 효능과

본초학적인 효능의 장점이 동시에 발휘될 수 있도록 하는 치료법이다^{8,43)}. 약침요법은 체액계통, 면역계통, 신경계통 등의 분야에 효과적인 조절작용을 나타내며, 協調陰陽, 通調經絡, 調和營衛氣血하는 작용이 있어 흐트러진 생체의 기능을 조정하고 병리 형태를 변화시켜 진통 및 종양의 유발억제 등의 치료효과가 탁월한 것으로 밝혀져 있다. 또한 약침요법은 약물의 흡수가 빠르고, 경구투여가 불가능한 경우에 사용이 용이하며, 환부에 직접 처치할 수 있다는 장점이 있다⁴³⁾. 특히 김⁴⁴⁾의 약침치료에서는 膻穴이 다용되고 있는데, 여기에 募穴을 첨가하면 이들은 서로 그 氣血이 相通한다는 원리에 따라, 같이 사용할 때 효과가 더 좋다고 하였다.

中脘(CV12)은 '太倉, 胃脘, 上紀, 中管, 胃募, 中胃, 胃中'라고도 하며, 기경팔맥중 임맥에 속하고, 胃의 募穴이면서 八會穴 中腑會穴이며, 수태양소장경, 족양명위경, 임맥의 交會穴이자 回陽九針穴 중의 하나이다. 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調升降하는 穴性으로 위통, 腹脹, 수종, 만성위염, 장염, 위궤양, 위경련, 鼓脹, 위하수, 소화불량, 토혈, 구토, 吞酸, 腹鳴, 설사, 변비, 疝氣, 황달, 불면, 두통, 정충, 癲狂, 협통, 暑病, 허로, 효천, 자궁탈출, 고혈압, 중풍, 담마진, 비위허약 등의 활용범위가 광범위한 효과를 가지고 있다⁴⁵⁾. 그러므로 본 실험에서는 扶正培本의 의미를 살려 中脘(CV12)을 약침 처치의 치료혈로 선택하였다.

吳茱萸(Evodiae Fructus)는 운향과(Rutaceae)에 속한 낙엽관목 혹은 소교목인 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa*(Juss.) BENTH., 石虎 *Evodia rutaecarpa* BENTH. var. *officinalis* HUNANG, 毛脈 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* BENTH. var. *bodinieri* HUNANG 등의 미성숙과실로서, 정유로는 evoden, ocimene, evodin, evodol 등이 함유되어 있고, alkaloid로는 evodiamine, rutaecarpine, wuchuyine 등이 함유되어 구충, 항균 등의 유효한 약리작용을 가지고 있으며, 고혈압, 소화불량, 습진, 신경성피부염, 黃水瘡, 구강궤양 등에 임상적으로 활용되고 있는 본초다^{17,45)}. 《神農本草經》에 '味辛溫 主溫中下氣 止痛 咳逆寒熱 除濕 血痺 逐風邪 開痰理 根殺三蟲 一名藪 生山谷'이라 기재된 이래, 吳茱萸는 溫中, 止痛, 理氣, 燥濕 등의 효능으로 嘔逆吞酸, 關陰頭痛, 膈寒吐瀉, 腕腹脹痛, 脚氣, 疝氣, 口瘡遺瘍, 齒痛, 濕疹 등의 증상에 응용되고 있다⁴⁶⁾. 이 외에 吳茱萸에 대한 연구로 이⁴⁷⁾는 우울증에 효과가 있다고 하였고, 강⁴⁸⁾은 혈압강하와 혈관이완에 효과가 있다고 보고한 바가 있다.

본 연구에서는 溫中, 止痛, 理氣, 燥濕의 효능이 있는 吳茱萸로 acetone과 methanol에서 각기 농도를 달리하여 약침액을 추출, 제조한 후에 mouse의 PBMCs에서 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 먼저 살펴본 결과, 70% methanol층 吳茱萸약침액(EF-HAS)이 IL-2, IL-10, IFN- γ , β -actin 등의 cytokine 유전자 발현에 다른 것들보다 뛰어난 것으로 나타나, 본 실험에서는 70% methanol층 EF-HAS를 각각 10%, 1%, 0.1%(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)의 농도로 처리한 후 C57BL/6 mouse의 spleen cell의 증식에 미치는 영향, B16-F10 암세포주를 이식한 C57BL/6의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포 수 비율 변화에 미치는 영향, pulmonary colony 수의 변화에 미

치는 영향, 평균생존일수(MST) 및 생명연장율(ILS)에 미치는 영향 등을 각각 관찰 및 비교분석하였다.

먼저 70% methanol층 EF-HAS를 건강한 C57BL/6 mouse에서 분리 적출한 spleen cell에 각각 10%, 1%, 0.1%(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)의 농도로 처리하여 spleen cell의 증식에 미치는 영향을 비교분석한 결과, 대조군의 경우 1,267 \pm 146cpm로 나타난 반면, 양성대조군의 경우 38,760 \pm 5,195cpm, 10% EF-HAS 투여군의 경우 13,119 \pm 4,510cpm, 1% EF-HAS 투여군의 경우 7,231 \pm 1,024cpm, 0.1% EF-HAS 투여군의 경우 3,056 \pm 784cpm으로 각각 나타나, spleen cell의 증식은 70% methanol층 EF-HAS에 농도 의존적으로 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1).

In vivo 실험에서는 PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺ 세포수의 비율이 Control-1의 경우 11.1 \pm 2.6%, Control-2의 경우 12.2 \pm 1.9%, Control-3의 경우 12.5 \pm 1.6%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 17.6 \pm 3.5%와 15.2 \pm 2.5%로 증가하여 T helper 세포의 증진과 활성화에 농도 의존적으로 증가한 것으로 나타났다. 또, PBMCs의 CD8⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율은 Control-1의 경우 5.3 \pm 0.5%, Control-2의 경우 8.4 \pm 1.3%, Control-3의 경우 8.9 \pm 1.0%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 13.2 \pm 1.7%와 11.2 \pm 2.1%로 증가하여 Tc/s 세포의 증진과 활성화에 농도 의존적으로 증가한 것으로 나타났다. 그리고, PBMCs의 CD69⁺/B220⁺ 세포수의 비율은 Control-1의 경우 47.9 \pm 3.8%, Control-2의 경우 52.2 \pm 4.2%, Control-3의 경우 51.7 \pm 3.7%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 59.0 \pm 3.7%와 55.2 \pm 4.2%로 증가하여 B세포의 증진과 활성화에 농도 의존적으로 증가한 것으로 나타났다. 마지막으로, PBMCs의 NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율은 Control-1의 경우 3.7 \pm 0.3%, Control-2의 경우 3.5 \pm 0.4%, Control-3의 경우 4.2 \pm 0.8%인 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 5.7 \pm 0.6%와 5.2 \pm 0.5%로 증가하여 NK세포의 증진과 활성화에 마찬가지로 농도 의존적으로 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2-5).

이상 C57BL/6 mouse에서 70% methanol층 EF-HAS에 대한 spleen cell의 증식 효과, B16-F10 암세포주를 이식한 후 세포형광분석을 통한 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율을 관찰하는 실험을 살펴본 결과, EF-HAS가 전반적으로 농도에 비례하여 면역기능 증진에 유효한 결과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

그리고 B16-F10 암세포주를 C57BL/6 mouse에 이식한 후 15일째 되는 날, lung의 외부에 나타난 흑색의 colony 수를 현미경으로 assay한 결과, Control-1의 경우 86.3 \pm 7.2개, Control-2의 경우 72.3 \pm 5.3개, Control-3의 경우 63.3 \pm 7.8개로 나타난 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 38.3 \pm 4.7개와 58.2 \pm 5.4개로 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였고, 그 감소율은 각각 39.5%와 8.1%로 나타났으며, 병리조직학적 관찰에서도 70% methanol층 EF-HAS에 의하여 pulmonary colony 수가 대조군에 비해 정상 폐조직과 유사할 정도로 유의성 있게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6-7).

마지막으로 각 실험군의 평균생존일수와 생명연장율을 비교분석

한 결과, 평균생존일수는 Control-1의 경우 16.4 \pm 3.5일, Control-2의 경우 19.2 \pm 2.8일, Control-3의 경우 19.5 \pm 3.3일로 나타난 반면, 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서는 각각 25.0 \pm 4.0일과 22.4 \pm 4.6일로 유의성 있게 증가하였다. 생명연장율 또한 10% EF-HAS와 1% EF-HAS 투여군에서 각각 28.2%와 12.9%로 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 8).

이상의 실험결과를 종합해보면 中腕穴에 吳茱萸약침을 시술한 실험군이 약침을 시술하지 않은 대조군에 비하여 유의성 있게 spleen cell을 증식시켰고, PBMCs의 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수를 증가시켰으며, 유의성 있게 pulmonary colony 수를 감소시켰고 동시에, 평균생존일수와 생명연장율을 향상시켰으므로 면역기능의 증진 및 항암효과에 대하여 농도 의존적으로 유의성 있는 결과를 나타내었다. 이는 溫中, 止痛, 理氣, 燥濕 등의 효능을 가진 吳茱萸가 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調升降하는 中腕穴과의 상승작용을 거쳐 항암작용 및 면역기능 향상에 뛰어난 효과를 나타낸 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구 및 임상적 응용이 필요하리라 사료된다.

결론

中腕穴(CV12)에 시술한 吳茱萸 불질분획 약침액이 면역기능 증진을 통한 항암효과에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 C57BL/6 mouse에 B16-F10 암세포주를 이식한 후 吳茱萸약침을 시술하여 PBMCs에서 cytokine 유전자 발현 실험과 면역세포 형광분석을 실시하였고, pulmonary colony assay를 시행하였으며, 평균생존일수 및 생명연장율을 구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

吳茱萸약침은 spleen cell을 농도 의존적으로 유의성 있게 증식시켰다. 吳茱萸약침은 CD25⁺/CD4⁺, CD8⁺/CD3e⁺, CD69⁺/B220⁺, NK1.1⁺/CD3e⁺ 세포수의 비율을 농도 의존적으로 증가시켰다. 吳茱萸약침은 pulmonary colony formation 수를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다. 吳茱萸약침은 평균생존일수 및 생명연장율을 농도 의존적으로 유의성 있게 향상시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 吳茱萸약침은 면역기능 증진을 통한 항암작용에 효과가 있는 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구 및 임상적 응용이 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학. 종양학, 서울, 서울대학교출판부, pp 1-5, 43-93, 1996.
2. 洪元植. 現代中共의 癌治療, 서울, 英文社, pp 81-94, 329-330, 361, 372-375, 378-382, 1984.
3. 통계청. 2003년 사망원인통계연보, 대전, 문전사, pp 25, 29-30, 37, 238-239, 2004.
4. 김준순. 한국인의 암 발생현황과 역학적 특성, 한국역학회지, 10(1):1-29, 1988.

5. 田炳旭. 癌腫의 病因病理에 대한 文獻의 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):83-101, 1995.
6. 田炳旭. 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 대한 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):29-54, 1995.
7. 崔昇勳. 東醫腫瘍學, 杏林書院, pp 13-42, 1995.
8. 大韓藥鍼學會 編纂. 藥針製劑와 臨床應用, 大韓針灸學會, pp 1-5, 1997.
9. 김대수. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향, 경희의학, 5(1):97-105, 1989.
10. 김태한. 백서의 죽삼리에 시술한 청풍등약침이 항암 및 면역증강에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 2004.
11. 김은미. 중완 목향약침이 항암 및 면역증강에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 2004.
12. 이정화. 瓦松藥鍼의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 博士學位論文, 1999.
13. 최인환. 苦參藥鍼이 抗腫瘍 및 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 碩士學位論文, 1999.
14. 최종호. 枸杞子 및 地骨皮藥鍼이 腫瘍과 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 博士學位論文, 1996.
15. 서범석. 猪苓藥鍼이 S-180에 對한 抗腫瘍 效果와 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 博士學位論文, 1995.
16. 박기흥. 오수유약침이 항암 및 면역기능에 미치는 영향, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 2003.
17. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學, 서울, 永林社, pp 337-338, 1998.
18. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上·下), 서울, 集文堂, pp 1457-1467, 1991.
19. 광이성 외. 난소절제 흰쥐의 임상화학지수에 미치는 홍삼조사포닌의 영향, 대전, 고려인삼학회지, 24(1):46-50, 2000.
20. 김예희 외. 중앙학, 인제대학교출판부, pp 235-241, 1994.
21. 박찬열 외. 發癌原因에 대한 考察, 大韓鍼灸學會誌, 16(1):147-159, 1999.
22. 金東熙 外. 抗癌制 및 放射線 副作用에 대한 韓方療法, 東醫病理學會誌, 9:240, 246-249, 1994.
23. 李岩 編. 腫瘍臨證備要, 北京, 人民衛生出版社, pp 1, 3, 6-10, 1983.
24. 河北醫學院. 靈樞經校釋, 人民衛生出版社, 上卷, p 37, 48, 142, 255, 326, 391, 1982.
25. 王洪圖. 黃帝內經素問, 春秋出版社, p 71, 237, 271, 1988.
26. 巢元方. 諸病源候論, 人民衛生出版社, p 576, 644, 1979.
27. 王背堂. 六科證治準繩, 大星文化社, p 164, 1993.
28. 陳實功. 外科精要, 上海科學技術出版社, p 75, 80, 1987.
29. 崔昇勳. 韓醫學의 腫瘍에 대한 認識과 病理論, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):11-28, 1995.
30. 田炳旭 外. 癌腫의 病因病理에 대한 文獻의 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1(1):83-101, 1995.
31. 張毓玲. 養陰生津法在腫瘤病治療中的應用, 浙江中醫學院學報, 14(1):20, 1990.
32. 王濟民, 王俊茹. 中醫藥防治癌症的體會, 浙江中醫雜誌, 12(1):32-33, 1991.
33. 徐龍生, 王珏. 扶正培本法在腫瘤臨床上的應用, 浙江中醫學院學報, 12(3):22-24, 1988.
34. 劉宇龍 外. 癌症復發與轉移的病機及中醫治療探討, 山東中醫雜誌, 14:435-436, 1995.
35. 金鍾昊. 腫瘍의 轉移 및 再發 抑制에 關한 考察, 大韓韓方內科學會誌, 19(2):53-63, 1997.
36. 李鍾訓. 病院微生物學, 高文社, p 133-183, 1973.
37. 정태호. 면역학 강의, 대구, 경북대학교출판부, p 309-317, 1993.
38. Myaska, N., Sato, K., Hashimoto, J., et al. Constitutive production of Interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 from inflammatory synovium, Clin Immunol Immunopath, 52:238-247, 1989.
39. 김세중. 면역학, 고려의학, 서울, p 3, 8, 9, 24-26, 28, 31, 32, 1994.
40. Seigler, H.F. 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, 95:13141-13146, 1998.
41. Sobol, R.E. A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gene-modified autologous melanoma cells, Cancer, 80:401-412, 1997.
42. Gansbacher, B. Immunization with HLA-A2 matched allogenic tumor cells that secrete interleukin-2(NK cells) of patients with metastatic melanoma or metastatic renal cell carcinoma, Proc ASCO, p 441, 1997.
43. 催容泰 外. 鍼灸學(上·下), 集文堂, 서울 pp 214-234, 382-384, 730-732, 1988.
44. 金廷彦. 奇蹟의 藥鍼療法 2, 서울, 金剛出版社, p 23, 1990.
45. 中藥大辭典編纂委員會編. 新編中藥大辭典, 新文豐出版公司, pp 871-874, 1971.
46. 孫星衍. 神農本草經, 文光圖書出版有限公司, p 168, 1979.
47. 이태희. 오수유 분획물의 항우울증 효과에 대한 연구, 대한본초학회지, 13(1):139, 1998.
48. 姜仁仁 外. 오수유가 선천성고혈압흰쥐의 혈압에 미치는 영향, 대한한의학회지, 19(2):50, 1998.