

補陽還五湯 경구투여 후 면역 활성화에 의한 암 전이 억제 효과

경희대학교 한의과대학 부인과교실
김진환, 황덕상, 이진무, 이창훈, 이경섭, 장준복

ABSTRACT

Anti-metastatic Effect on Cancer cell and Immune System Activation by Orally Administered *Boyanghwano-tang*

Jin-Hwan Kim, Deok-Sang Hwang, Jin-Moo Lee
Chang-Hoon Lee, Kyung-Sub Lee, Jun-Bok Jang

Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

Objectives: This study was designed to investigate intestinal immune system activation and anti-metastatic effect on cancer cells by orally administered extracts of *Boyanghwano-tang*.

Methods: To observe immunomodulating effects of *Boyanghwano-tang* on Peyer's patch cells, we measured cytokines GM-CSF, IL-4. In addition to observing effects of *Boyanghwano-tang* on hematopoiesis, we measured proliferation of bone marrow cells mediated by Peyer's patch cells *in vitro*.

IgA induction activated in intestinal content and serum was measured to observe the effect of orally administered *Boyanghwano-tang* on mucosal immune system.

After administering ovalbumin (OVA) with *Boyanghwano-tang*, Proliferation of Peyer's patch cell was measured to investigate gut immunostimulatory effect.

Anti-metastatic experiments were conducted *in vivo* mouse model by using colon 26-M3.1 carcinoma cell.

Results: The amounts of GM-CSF and IL-4 in the culture supernatant of Peyer's patch cells were significantly increased compared to the control group. The proliferation of bone marrow cell was significantly up-regulated with *Boyanghwano-tang*. These results indicate that oral administration of *Boyanghwano-tang* enhances the secretion of hematopoietic growth factors such as GM-CSF and IL-4 from Peyer's patch cells, and these cytokines also act on modulator of bone marrow cell proliferation.

After orally administering OVA with *Boyanghwano-tang*, IgA induction and Proliferation of peyer's patch cell was up-regulated with *Boyanghwano-tang*. These results means orally administered *Boyanghwano-tang* activates intestinal immune system and has an inhibitory effect on tumor metastasis.

In addition, We found that orally administered *Boyanghwano-tang* significantly inhibited tumor metastasis *in vivo*.

Conclusions: Orally administered *Boyanghwano-tang* appears to have considerable activity on the anti-metastasis by activation of immune system.

Key Words: *Boyanghwano-tang*, Cancer, Anti-metastasis, Complementary Therapies, Immune System

I. 서 론

오늘날 산업사회로의 전환에 따른 생활양식과 환경의 변화로 인하여 국민 건강을 저해하는 주요 질환은 각종 난치병이 주종을 이루고 있다¹⁾. 특히, 악성종양이라 일컫는 암은 발생 원인과 기전이 명백히 알려져 있지 않고 생물학적 성상이 복잡하며, 치료에 사용되는 화학약품의 독성작용으로 인한 과민반응과 부작용으로 인해 치료에 한계가 있다. 이에 따라 최근에는 암의 효과적인 치료법 개발을 위하여 신유물질에 막대한 연구비가 투자되고 있으며, 아울러 한약재를 이용한 많은 연구가 행해지고 있다²⁾.

일찍이 殷墟에서 발견된 甲骨文 상에 “瘤”라는 병명이 기재되어 있었고, 기원전 12세기의 《周禮》에는 “貝責治療腫瘍”이라 하여 종양만을 전담하는 腫瘍科가 있었으며 《靈樞》에서는 “營衛不通”, “寒氣客於腸外”, “與衛氣相搏”, “邪氣居其間” 등을 원인으로 보았고 “筋瘤, 昔瘤, 腸瘤, 骨疽, 肉疽” 등으로 분류하기도 하였다³⁾.

韓醫學에서 종양의 치료는 祛邪法과 扶正培本 및 兩者를 兼하는 扶正祛邪法 등을 시행하며⁴⁾, 각 치료법을 활용한 單味劑와 處方의 항암 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다⁵⁻⁸⁾. 특히 惡性腫瘍의 발생 이론 중 하나가 인체 면역 기능의 감소⁹⁾라는 점과 더불어 화학요법의 부작용을 해결하기 위해, 扶正祛邪法과 관련되어 莖莖¹⁰⁾, 하고초¹¹⁾ 및 상백피¹²⁾ 등의 한약물에 대한 항암 효과가 보고된 바 있다.

補陽還五湯은 《醫林改錯》에 최초로 기재된 益氣化痰法의 처방으로¹³⁾, 임상

에서는 허혈성뇌혈전증, 뇌색전증, 뇌동맥경화증, 뇌출혈후유증 등에 사용되고 있으며¹⁴⁾ 고혈압 및 고지혈증¹⁵⁾, 혈압 및 국소 뇌혈류량¹⁶⁾, 자궁내막증¹⁷⁾ 등에 대한 실험적 연구가 있었다. 특히 세포성과 체액성 면역을 증강시키는 것에 착안하여 항암 효과 연구가 있었으나¹⁸⁾ 전신투여와 복강 내 투여 방법이었고 경구투여에 의한 보고는 아직까지 없었다.

이에 저자는 補陽環五湯 추출물의 경구투여 후 면역 활성화에 따른 암 전이 억제 효과를 알아보기 위하여 Peyer's patch cell의 골수세포 증식 활성화, granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) 및 interleukine-4(IL-4)의 분비 활성화 이용한 장관 면역계 활성화 효과, OVA와 함께 경구투여 후 소장과 혈청 내에서 항체 생산 효과 및 종양 전이 억제 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 제

실험에 사용한 補陽環五湯 추출물을 경희대학교 한의과대학 부속병원에서 구입한 후 phosphate buffer saline(PBS)를 첨가하여 20 mg/ml의 stock solution을 제조하여 -20℃에 보관하였으며 1첨 약제의 구성과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The Contents of *Boyanghwano-tang*

Herbs	Pharmaceutical name	Amount (g)
黃 芪	<i>Astragali radix</i>	8
當 歸	<i>Angelicae gigantis radix</i>	5
赤芍藥	<i>Paeoniae radix rubra</i>	5
川 芎	<i>Cnidii rhizoma</i>	3
桃 仁	<i>Percicae semen</i>	3
蚯 蚓	<i>Lumbricus</i>	3
紅 花	<i>Carthami flos</i>	3
Total amounts		30

2) 동 물

생후 6~7주령의 C3H/He, 雌性 BALB/c 마우스를 (주)중앙실험동물(Korea)에서 분양 받아 정수된 물과 사료(Samyang Co. Ltd., Korea)를 자유 공급하였다. 실험실 환경은 온도 22℃, 습도 50% 및 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

3) 시 약

실험에 사용한 Roswell park memorial institute(RPMI)-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), PBS, Hank's balanced salt solution(HBSS), Tween20는 Gibco(Rockville, MD, USA)에서, cell counting kit(EZ-Cytox)는 Daeil Lab(Seoul, Korea)에서 cytokine 분석 kit는 Pharmingen(USA)에서 구입하여 사용하였다. OVA, Lipopoly-saccharide(LPS), Bouin's 용액, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

4) 세포주와 세포배양

Colon26-M3.1 carcinoma cell은 일본 북해도대학 면역과학연구소에서 기증받은 것으로 7.5% FBS가 함유된 EMEM으로 5% CO₂, 95% 습도 및 37℃의 환경에서 배

양하였다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

96-well plate에 colon26-M3.1 carcinoma cell은 5×10³ cells/well, Peyer's patch cell은 5×10⁵ cells/well이 되도록 나누어 분주하고 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml 및 2000 µg/ml 농도의 補陽環五湯 추출물을 첨가한 후 Peyer's patch cell은 LPS의 최종 농도가 5 µg/ml이 되도록 well에 첨가 후 72시간 배양하였다. 그 후 각 well에 EZ-Cytox 용액을 처리하고 2시간 동안 배양한 후 ELx800(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 補陽環五湯 추출물을 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율(%)과 세포 생존을 반으로 억제시키는 농도 Inhibitory concentration(IC)₅₀으로 표시하였다.

2) 장관 면역 활성화 측정

(1) Peyer's patch cell의 회수 방법

6주령 female C3H/He 마우스의 소장 외벽에 존재하는 Peyer's patch를 잘라내어 HBSS를 이용하여 조직을 파괴시켜 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 RPMI 1640-5% FBS를 이용하여 원심분리를 통해 세척 후 사용하였다.

(2) 골수세포 회수 방법

주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 RPMI 1640-5% FBS를 이용하여 원심분리를 통해 세척 후 사용하였다.

(3) 골수세포 증식 활성 측정

2.5×10⁶ cells/ml의 골수세포를 96-well plate에 100 µl씩 분주하고 Peyer's patch cell과 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml

의 補陽環五湯 추출물을 반응시켜 회수한 배양 상등액을 각각 50 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 배양 완료 후 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 4시간 후 ELx800(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 saline을 첨가하였다.

(4) GM-CSF와 IL-4의 측정

Peyer's patch cell을 2×10^6 cells/ml로 조정하여 96-well plate에 각각 180 μ l plating하고 5 μ g/ml, 50 μ g/ml 및 500 μ g/ml 농도의 補陽環五湯 추출물 20 μ l와 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 상등액을 회수하여 GM-CSF와 IL-4를 각 cytokine 분석 kit를 이용하여 조사하였다.

3) 면역 증강 측정

(1) 혈청과 소장 내용물의 회수 방법

OVA의 IgA 항체가 측정을 위한 혈액과 소장 내용물의 채취는 OVA 단독 혹은 OVA에 補陽環五湯 추출물 0.4 mg와 4 mg을 혼합하여 1차와 2차 경구 투여한 후 마우스를 희생시켜 혈액을 얻어 10분 동안 6,000 rpm으로 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 소장 내용물은 소장과 대장의 경계로부터 소장쪽으로 20 cm를 잘라내어 200 μ l의 버퍼로 두 번 세척하여 수거하여 10분 동안 1,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 수집하였다. 수집된 혈청과 소장 내용물은 -20°C에서 항체 분석까지 보관하였다.

(2) IgA 항체 역가 측정

96-well plate에 항원으로 사용한 OVA를 코팅용액(50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 9.6)에 50 μ g/ml로 용해 후 각 well 당 100 μ l씩 첨가하고 4°C에서 16시

간 동안 코팅하였다. 세척용액(PBS+0.05% Tween20)을 이용하여 plate를 세척 한 후, 10% 탈지분유를 이용하여 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. 세척용액으로 plate를 세척 후 혈청과 소장 내용물의 항체 양에 따라 적정농도를 맞추어¹⁹⁾ 혈청의 경우 100배 및 소장 내용물의 경우 2배 희석용액을 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 효소 HRP가 표지된 2차 항체를 첨가하여 반응시켰다. HRP의 기질로는 TMB를 사용하였다. 발색 완료 후 2 M 황산용액 100 μ l 첨가하여 발색을 중지시킨 후 ELx800을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Peyer's patch cell의 OVA 재자극에 의한 활성 측정

OVA 단독 및 OVA와 補陽環五湯 추출물 2 mg을 같이 경구투여하면서 총 2회 면역하고 7일 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell의 농도가 3×10^5 cells/well이 되도록 96-well culture plate에 분주하였다. 각 well에 OVA를 최종농도 2 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 50 μ g/ml이 되도록 조정하여 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양시켰다. Peyer's patch cell 증식 활성은 배양 완료 후 EZ-Cytox 용액을 첨가하고 ELx800을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 경구투여에 의한 종양 전이 억제 측정

군당 각각 5마리의 마우스를 이용하여 종양 접종 10일전부터 매일 1회 補陽環五湯 추출물 0.25 mg, 1 mg 및 4 mg을 경구투여하고 암 전이를 측정하기 위하여 각 마우스에 3×10^4 colon26-M3.1 carcinoma cell를 정맥주사 하였다. 종양 접종 1일부터 2일 간격으로 동량의 시료를 총 7회 경

구투여 하였으며 종양 접종 14일 후 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액으로 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 균집 수를 dissecting microscope(Olympus SZ61, Center Valley, PA, USA)로 측정하였다. 대조군은 종양만 정맥 주사하여 조사하였다.

5) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS (version 17.0)를 이용하였고, 실험군과 대조군의 비교는 One way ANOVA를 시행하였다. 사후검정은 Turkey의 B test를 시행하였으며 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성 평가

Colon26-M3.1 carcinoma cell과 Peyer's patch cell에 補陽環五湯 추출물 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 및 2000 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하여 세포 생존율을 측정 한 결과, colon26-M3.1 carcinoma cell의 IC_{50} 은 1080 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났고(Fig. 1), LPS를 첨가한 Peyer's patch cell의 IC_{50} 은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다(Fig. 2).

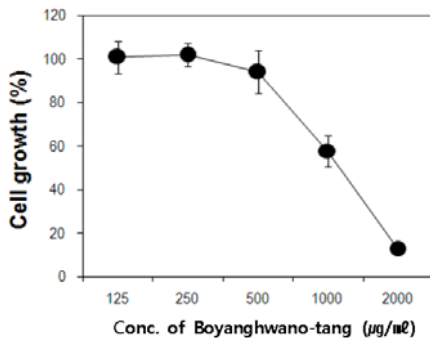


Fig. 1. Cytotoxicity of *Boyanghwano-tang* Extracts on Colon26-M3.1 Carcinoma Cell.

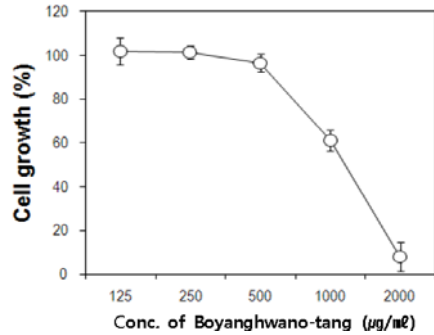


Fig. 2. Cytotoxicity of *Boyanghwano-tang* Extracts on Peyer's Patch Cell with LPS.

2. 장관 면역 활성화 효과

1) 골수세포 증식 활성화 효과

Peyer's patch cell에 補陽環五湯 추출물 0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 얻은 배양 상등액을 골수세포에 첨가하여 활성도를 관찰한 결과, 대조군 0.26 ± 0.01 에 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 0.37 ± 0.02 와 0.30 ± 0.01 로 나타나 통계적으로 유의하게 ($p < 0.0001$) 증가되었다(Fig. 3).

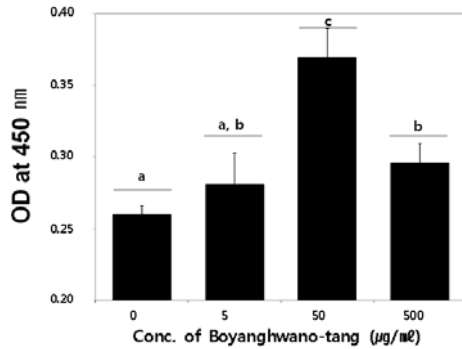


Fig. 3. Effect of *Boyanghwano-tang* on Hematopoiesis.

a, b, c : Statistically Different Groups by Turkey B

2) Peyer's patch cell의 cytokines 분비 효과

(1) GM-CSF

Peyer's patch cell에 補陽還五湯 추출물

0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 를 첨가하여 GM-CSF의 분비를 측정 한 결과, 대조군 17.45±4.03 pg/ml에 비하여 50 µg/ml 농도에서 85.25±6.01 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게(p<0.05) 증가 되었다(Fig. 4).

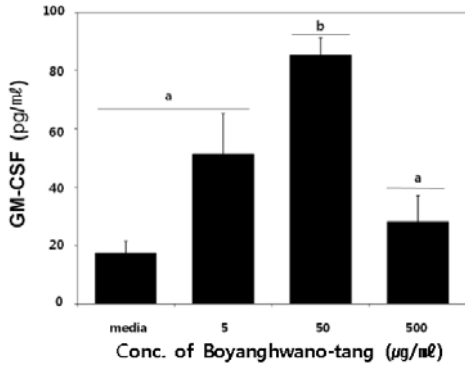


Fig. 4. GM-CSF Induction Activated with *Boyanghwano-tang* Extracts.

a, b : Statistically Different Groups by Turkey B

(2) IL-4

Peyer's patch cell에 補陽還五湯 추출물 0 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 를 첨가하여 IL-4의 분비를 측정 한 결과, 대조군 3.25±0.78 pg/ml에 비하여 50 µg/ml 농도에서 16.80±2.69 pg/ml로 나타나 통계적으로 유의하게(p<0.05) 증가되었다(Fig. 5).

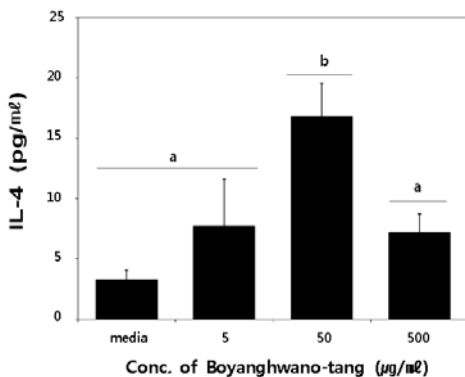


Fig. 5. IL-4 Induction Activated with

Boyanghwano-tang Extracts.

a, b : Statistically Different Groups by Turkey B

3. 면역 증강 효과

1) OVA 특이적 IgA 항체 생성 효과

(1) 소장 내용물에 함유된 IgA 항체 역가

OVA 단독 및 OVA와 補陽還五湯 추출물 0.4 mg와 4 mg을 혼합하여 투여한 후 소장 내용물의 IgA 항체 역가를 조사한 결과, OVA 단독 투여군 0.45±0.07에 비하여 OVA와 補陽環五湯 추출물 4 mg 혼합 투여군에서 0.66±0.06으로 나타나 통계적으로 유의하게(p<0.05) 증가되었다(Fig. 6).

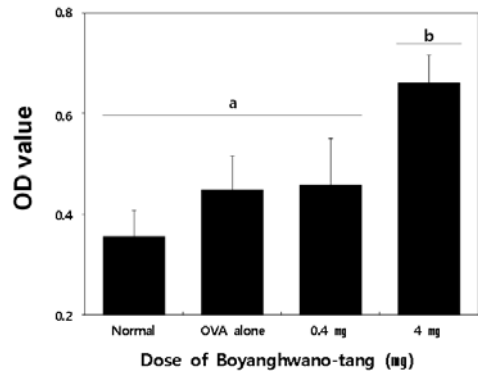


Fig. 6. IgA Induction Activated in Intestinal Content with *Boyanghwano-tang* Extracts.

a, b : Statistically Different Groups by Turkey B

(2) 혈액에 함유된 IgA 항체 역가

OVA 단독 및 OVA와 補陽還五湯 추출물 0.4 mg와 4 mg을 혼합하여 투여한 후 혈액 내 IgA 항체 역가를 조사한 결과, OVA 단독 투여군에 비하여 모두 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Fig. 7).

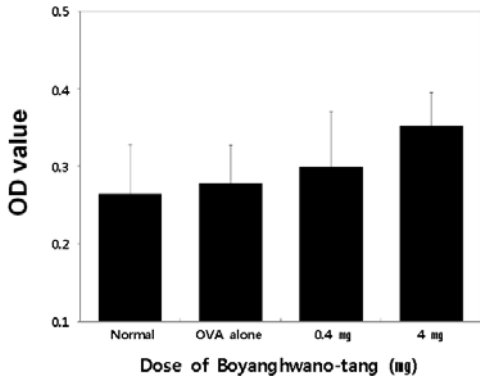


Fig. 7. IgA Induction Activated in Serum with *Boyanghwano-tang* Extracts.
a, b : Statistically Different Groups by Turkey B

2) Peyer's patch cell의 OVA 재자극에 의한 활성화 효과

OVA 단독 및 OVA와 補陽環五湯 추출물 2 mg을 같이 경구투여한 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell에 2 µg/ml, 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA를 재자극하여 활성도를 확인한 결과, OVA 10 µg/ml에서는 補陽環五湯 추출물을 함께 투여한 군에서 0.16±0.02로 나타나 OVA 단독 투여군 0.11±0.01에 비하여 통계학적으로 유의하게(p<0.05) 증가되었고, OVA 50 µg/ml에서는 補陽環五湯 추출물을 함께 투여한 군에서 0.21±0.03으로 나타나 OVA 단독 투여군 0.14±0.01에 비하여 통계학적으로 유의하게(p<0.001) 증가되었다(Fig. 8).

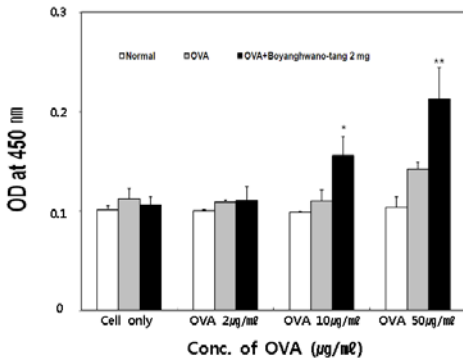


Fig. 8. Proliferation of Peyer's Patch Cell

with *Boyanghwano-tang* Extract.

* : p<0.05, Compared with Indicated Three Groups

** : p<0.001, Compared with Indicated Three Groups

4. 경구투여에 의한 종양 전이 억제 효과

Colon26-M3.1 carcinoma를 접종하기 전 후 補陽還五湯 추출물 0.25 mg, 1 mg 및 4 mg을 경구투여하고 종양의 표적기관인 폐에 나타난 종양 군집 수를 관찰한 결과, 대조군 116±19.60개에 비하여 1 mg과 4 mg 투여군에서 각각 72.60±17.30개와 59.20±14.81개로 나타나 통계적으로 유의하게(p<0.0001) 억제되었다(Fig. 9).

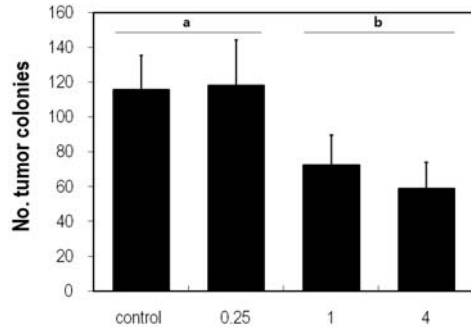


Fig. 9. Effect of *Boyanghwano-tang* Extracts in Metastasis Model.

(Oral Administration)

a, b : Statistically Different Groups by Turkey B

IV. 고 찰

惡性腫瘍이란 신체의 거의 모든 세포에서 발생하여 목적 없이 무질서하게 비가역적으로 증가하며, 정상적인 생화학적 및 물리학적 제약을 받지 않고 스스로 발육하여 정상 조직을 파괴하는 질환이다^{9,20,21}). 그 치료법으로 수술요법, 방사선요법 및 화학요법 등이 활용된다⁹). 하지만 수술요법은 轉移된 腫瘍의 치료가

불가능하다는 한계가 있으며, 방사선요법은 局所的 浸潤性 腫瘍의 치료에는 유효하나 轉移 腫瘍의 경우에는 치료에 제한이 있으며, 정상 조직의 손상과 골수 조혈 기능 장애, 탈모, 피부이상 및 장기손상 등의 부작용이 있다⁹⁾. 화학요법은 全身的 轉移의 경우 사용 가능한 치료법이지만, 화학 항암제들은 腫瘍細胞뿐만 아니라 정상 세포에도 독성을 나타내어 腫瘍細胞를 사멸하는 동시에 骨髓造血機能을 억제하고 소화기관 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하며, 인체의 면역 기능을 저하시키는 문제가 있다^{9,20)}.

韓醫學에서는 腫瘍에 대해 《靈樞》²²⁾에서 腸覃, 石瘕 및 積聚 등으로 인식한 이래 巢²³⁾는 癥瘕, 癭瘤, 石癰, 緩疽 및 石疽 등으로, 李²⁴⁾는 癥積과 瘕聚로, 張²⁵⁾은 積聚 등으로 인식하였다. 腫瘍 발생의 病因病機는 外感六淫, 七情內傷, 飲食不節, 過勞 및 邪毒 등의 유발요인에 의하여 人體의 臟腑機能과 氣血이 실조되어 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒溫結, 正氣虛弱 및 經絡瘀阻 등의 병리변화가 나타나고, 이러한 변화가 單獨 혹은 相好錯雜되면서 氣機가 不通되고 오래되면 發癌하게 된다²⁶⁾.

腫瘍 治療는 清熱解毒, 活血化瘀, 化痰消瘀 및 理氣消腫 등의 祛邪法과 健脾益氣, 養血滋陰, 養陰生津, 補腎溫陽 및 健脾益腎 등의 扶正培本法 및 兩者를 兼하는 扶正祛邪法으로 구분된다⁴⁾. 이 중 祛邪法은 清熱解毒과 活血化瘀로 大別되고, 관련 연구로는 清熱解毒 약제 중 현재 臨床에서 가장 많이 활용되는 白花蛇舌草, 瓦松, 半枝蓮을 이용한 연구²⁷⁾와 活血化瘀 작용이 있는 血府逐瘀湯 등을 이용한 항암 효과에 대한 연구²⁸⁾가 있었으며, 扶正培本法으로 溫中化胃하는 異功散 등을 이용한 항

암 효과 연구²⁹⁾가 있었다.

疾病의 治療를 위하여 邪氣가 重하면 祛邪를 위주로, 精氣가 虛하면 補虛를 위주로 처방하게 되는데 지금까지의 암 相關 연구에 있어서도 扶正祛邪와 活血化瘀 방법이 응용되어 비교적 높은 치료 효과를 보이고 있다. 특히 活血化瘀 藥物은 면역 세포의 기능에 영향을 주어 세포성 면역과 체액성 면역을 증강시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있어³⁰⁻³²⁾, 면역 기능 활성화를 통한 길경¹⁰⁾, 하고초¹¹⁾ 및 상백피¹²⁾ 등의 韓藥材에 대한 抗癌 효과 실험 논문이 보고되고 있다.

補陽還五湯은 清代 王清任의 《醫林改錯》에 처음 수록된 처방¹³⁾으로 大補元氣하는 黃芪를 君藥으로 하고, 當歸, 赤芍藥, 蚯蚓, 川芎, 桃仁, 紅花를 臣藥으로 함으로써 活血祛瘀하고 通調脈絡하여 本虛標實한 氣虛血瘀證을 치료하는데 補氣를 主로 하고 活血을 輔로 하는데, 補氣 효능이 있는 黃芪를 重用하여 氣를 왕성하게 하여 行血시키니 祛瘀하면서 正氣를 傷하지 않도록 하였다³³⁻³⁵⁾.

補陽還五湯에 대한 실험적 연구로는 고혈압 및 고지혈증¹⁵⁾, 혈압 및 국소 뇌혈류량¹⁶⁾, 자궁내막증¹⁷⁾ 등에 관한 연구가 보고되었다. 특히 活血化瘀 藥物이 면역 세포의 기능에 효과가 있는 것³⁰⁻³²⁾에 착안한 抗癌 相關 연구로 비특이적 세포 독성 T 세포의 활성 증가에 관한 연구³⁶⁾와 선천 면역 활성화에 관한 연구¹⁸⁾가 보고된 바 있다.

서양의학에서는 양약의 경구투여를 이용한 항암 효과 연구³⁷⁻³⁹⁾가 활발히 진행되고 있으나, 韓藥材를 이용한 중앙 전이 억제 보고는 복강 내 투여에 의한 방법으로 이루어졌으며, 경구투여 후 효과

를 알아보는 것으로 홍삼산성다당체⁴⁰⁾와 한국산 겨우살이⁴¹⁾를 이용한 연구가 있었다. 홍삼산성다당체 연구의 경우 경구 및 복강투여 시 투여기간, 투여용량에 따른 항종양 효과를 비교하여 경구투여시의 적절한 투여시기와 용량을 밝히는 데 의의가 있었지만, 홍삼산성다당체와 한국산 겨우살이 연구 모두 세포 독성 단계의 항종양 효과를 확인하였으며, 자세한 체액성 면역에 관한 기전은 부족한 한계가 있었다.

이에 저자는 補陽環五湯 추출물의 *in vitro*에서 골수세포 생성 증가와 cytokines 분비 증가를 통하여 장관 면역계 활성화 효과에 대하여 알아보았고, 이후 OVA와 補陽環五湯 추출물을 함께 경구투여한 후 소장 내용물과 혈청에서 IgA 항체 생산 증가, OVA 재자극 시 Peyer's patch cell의 활성화 증가를 통하여 면역 증강 효과를 알아보았다. 그리고 이를 근거로 補陽環五湯 추출물의 경구투여 후 전이암 세포 수를 확인함으로써 종양 전이 억제 효과에 대하여 알아보았다.

補陽環五湯 추출물의 colon26-M3.1 carcinoma cell와 Peyer's patch cell에 대한 독성을 알아보기 위하여 세포 생존율을 *in vitro*에서 조사한 결과 colon26-M3.1 carcinoma cell에서 IC₅₀은 1150 µg/ml이었으며, LPS 첨가 시 Peyer's patch cell에서 IC₅₀은 1000 µg/ml로 나타나 실험에 사용할 補陽環五湯 추출물의 농도를 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml로 정하였다.

면역반응에 관여하는 세포들은 기능의 효과적인 수행을 위해 조직이나 기관을 구성하게 되는데, 이를 림프계라 한다. 림프계는 실질적으로 림프구를 생산하고 분화시키는 1차 림프 조직계와, 림프구와 항

원과의 접촉 또는 림프구간의 상호작용을 돕는 2차 림프 조직계로 분류된다. 2차 림프 조직계 중 생체림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막림프기관은 호흡계 관련 림프조직, 비강 관련 림프조직 및 장관 관련 림프조직으로 구분되며 장관 관련 림프조직은 생체에서 가장 큰 림프조직으로 소화기를 통하여 장관으로 이입되는 외래물질에 대한 점막 면역을 기능을 유도함으로써 외래물질에 대한 방어 기능을 담당하고 있다⁴²⁾. 장관 관련 림프조직을 구성하는 면역 기관 중에서 Peyer's patch는 장관 면역계를 담당하는 가장 중요한 면역 기관이며, 소화계를 통하여 이입된 감염성 물질 대부분이 유입되는 유도 부위로서 항원의 흡수를 담당하는 special M cells, 탐식세포(Phagocytes), B cell 영역 및 T cell 영역으로 구성되어 있다⁴³⁾.

補陽環五湯 추출물에 의한 골수세포 증식 활성을 알아보기 위하여 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 얻은 골수세포에 補陽環五湯 추출액과 Peyer's patch cell의 반응으로부터 회수한 배양 상등액을 첨가하여 관찰한 결과, 대조군에 비해서 50 µg/ml 및 500 µg/ml의 補陽環五湯 추출물에서 증가되었다. 또한 배양 상등액 중에서 골수세포 증식 활성에 영향을 미치는 GM-CSF와 IL-4의 생성능을 측정 한 결과, 50 µg/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 유의하게 GM-CSF와 IL-4 분비가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

감염성 미생물 혹은 면역 반응을 유도하는 물질에 의하여 Peyer's patch를 구성하는 면역 세포가 활성화되면 근처의 2차 림프기관인 mesenteric lymph node(MLN)를 통하여 장관면역계가 활성화 되고, MLN과 연결된 림프관 및 혈액을 통하여 전

신적 면역 기능이 활성화된다⁴⁴⁾. 이를 근거로 補陽還五湯 추출물에 의해 Peyer's patch의 면역세포가 자극되면 골수세포의 증식에 관련되어 있는 GM-CSF와 IL-4 등이 다양하게 생성되고, 이러한 cytokine 류가 전신순환 후 최종적으로 골수세포계에 영향을 미치는 것으로 생각해볼 수 있다.

補陽環五湯의 장관 면역계 활성화 효과 외에, 단백질 항원에 대한 점막 면역계 증가 효과를 확인하고자, OVA와 補陽環五湯 추출물을 동시에 경구투여한 후 소장 내용물 내에 생성된 IgA 항체 역가를 측정된 결과, OVA 단독 투여군에 비하여 OVA와 補陽環五湯 추출물 4 mg/ml 혼합 투여군에서 통계적으로 유의하게 항체 생산이 증가되었다. 이는 경구투여된 補陽環五湯 추출물이 선천면역의 보체로써 사용된 길경과 하교초와 같이 Peyer's patch cell을 자극하고 면역을 증강시키는 보체로 작용하여 장관 면역계를 활성화시킴을 알 수 있다.

현재 점막면역증강제로 가장 널리 사용되는 물질 cholera toxin(CT)에 관한 이전의 보고⁴⁵⁾에서 CT를 항원과 동시에 경구투여한 결과 침, 질 세척액, 비강세척액 등의 여러 점막물질에서 분비형 IgA 항체 생산 뿐 아니라 혈액 내 IgA 생산도 유의하게 증가된 결과를 보여주고 있다. 따라서 補陽還五湯을 항원과 동시에 경구투여 하였을 경우 항원에 대한 점막면역뿐 아니라 전신적인 면역 증강 효과가 유도되는 것을 확인하기 위하여 OVA에 대한 혈액 내 IgA 항체 생성 효과를 측정된 결과, OVA 단독 투여군에 비하여 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

OVA의 재자극 후 Peyer's patch cell의 활성화 여부를 조사한 결과, OVA 10 µg/ml 및 50 µg/ml의 농도에서 OVA 단독 투여군에 비하여 OVA와 補陽環五湯 추출물을 함께 투여한 군에서 Peyer's patch cell이 통계적으로 유의하게 활성화되었다. 이는 補陽還五湯이 점막 면역계를 활성화시키는 면역 증강 효과를 유도하는 기능이 있음을 보여주는 것으로 평가된다.

이상의 실험결과를 통해 補陽環五湯 추출물의 장관 면역계 활성화 효과, 경구투여를 통한 점막 면역계 활성화 효과를 관찰하였고 경구투여 한 후 중앙 표적 기관인 폐를 적출하여 육안으로 중앙 군집수를 조사한 결과, 농도 의존적인 중앙 전이 억제 활성을 확인하였다.

구강을 통하여 섭취된 식품 또는 유효성분이 소장의 Peyer's patch를 자극하게 되면 활성화된 Peyer's patch cell들은 다양한 면역 활성화 물질, 즉 cytokine 등을 다양하게 생산하게 되고 활성화된 세포와 물질이 순환하면서 전신 면역계에 영향을 줄 수 있다. 補陽環五湯 추출물의 경구투여에 의한 중앙 전이 억제 효과는 구강을 통하여 섭취된 추출물의 유효성분이 소장벽의 Peyer's patch cell을 자극함으로써 cytokines 생성 증가와 점막 면역계 활성화를 통한 항체 생산 증가에 의한다고 사료된다.

일반적으로 한약 또는 식품은 생식 또는 일부 가공한 후 구강을 통하여 섭취되기 때문에 생리 활성을 갖는 유효성분의 실험에 있어서도 다른 투여방법보다는 경구투여에 의한 효과의 확인이 중요하다. 또한 한약에 존재하는 활성 성분은 섭취되었을 때 위와 장에서 소화 효소 혹은 장내 세균에 의해 분해될 수 있

고 이러한 경우 체내에서의 면역 활성화에도 영향을 줄 수 있다. 따라서 이번 연구의 의의는 *in vitro* 실험에서 유의적인 장관 면역 활성을 보인 약재에 대하여 *in vivo* 단계의 실험을 거쳐 경구투여 시의 종양 전이 억제 효과를 검증하였다는 것에 있다고 할 수 있다. 하지만 *in vivo* 단계의 Peyer's patch cell 활성화를 직접 관찰하지 못하였으므로, 추후 본 연구의 *in vitro* 실험에서 유의한 결과로 나타난 장관 면역계 활성을 근거로, 확실한 활성을 조사하기 위하여 *in vivo* 유도 Peyer's patch cell의 활성화에 대한 연구가 진행되어야 하겠다.

V. 결 론

補陽環五湯 추출물의 경구투여 후 면역 활성화에 따른 암 전이 억제 효과를 알아보기 위하여 Peyer's patch cell을 이용한 장관 면역계 활성 효과, OVA와 함께 경구투여 후 소장과 혈청 내에서 항체 생산 효과 및 종양 전이 억제 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補陽環五湯 추출물 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml 및 2000 µg/ml 투여군에서 세포 생존율을 측정된 결과, 종양세포에서의 IC₅₀은 1150 µg/ml이었고, 정상세포의 IC₅₀은 LPS에서 1000 µg/ml이었다.
2. Peyer's patch cell을 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 補陽環五湯 추출물로 자극한 배양 상등액의 골수세포 증식 활성도를 조사한 결과, 50 µg/ml 와 500 µg/ml 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되었다.
3. Peyer's patch cell을 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml 농도의 補陽環五湯 추출물로 자극하여 cytokine GM-CSF와 IL-4의 분비를 관찰한 결과, 50 µg/ml 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되었다.
4. OVA 단독 및 OVA와 補陽環五湯 추출물 0.4 mg 및 4 mg을 혼합하여 경구투여 후 소장 내용물에 포함된 IgA 항체 역가를 측정된 결과, OVA와 4 mg 혼합 투여군에서 OVA 단독 투여군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되었다.
5. OVA 단독 및 OVA와 補陽環五湯 추출물 2 mg을 함께 경구투여한 후 마우스로부터 얻은 Peyer's patch cell을 2 µg/ml, 10 µg/ml 및 50 µg/ml 농도의 OVA로 재자극하여 활성도를 확인한 결과, OVA 10 µg/ml와 50 µg/ml 농도 재자극 시 각각 補陽環五湯 추출물과 함께 투여한 군에서 OVA 단독 투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가되었다.
6. Colon26-M3.1 carcinoma 접종 전후 補陽還五湯 추출물 0.25 mg, 1 mg 및 4 mg을 경구투여한 후 종양의 표적기관인 폐에 나타난 종양 군집 수를 관찰한 결과, 1 mg과 4 mg 투여군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 억제되었다.

- 투 고 일 : 2014년 4월 28일
- 심 사 일 : 2014년 4월 28일
- 게재확정일 : 2014년 5월 10일

참고문헌

1. 송계용, 김미경, 지제근. 핵심병리학. 서울:고려의학. 1997:151-60.
2. 전국의과대학교수. 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리. 2000:85-95.
3. 조중관. 한방임상증양학. 서울:주민출판사. 2005:3, 13-8, 66-9.
4. 최승훈. 東醫腫瘍學. 서울:행림출판. 1995:84-92.
5. 조유경 등. 鬱金이 위암세포에 미치는 영향. 대한한방종양학회지. 2003;9(1):15-37.
6. 박미령 등. 活血化癥法の 항종양 및 혈행 전이에 대한 고찰. 대한한방종양학회지. 2003;9(1):105-18.
7. 이진화 등. 數種 補氣補血 한약의 혈관신생 억제 효과. 대한암한의학회지. 2006;11(1):79-92.
8. 윤성우 등. 益氣養陰解毒湯의 항암 및 항전이 효과에 관한 연구. 대한한방종양학회지. 2003;9(1):1-14.
9. 해리슨내과학편찬위원회. 해리슨내과학(II). 서울:정담. 1997:1963, 1972, 1978-90.
10. 이지영 등. 桔梗이 면역 활성화 및 항암에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(4):10-9.
11. 허자경 등. 면역 활성화에 의한 夏枯草의 암 전이 억제 효과. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):41-52.
12. 정재혁 등. 桑白皮의 선천 면역 활성화에 의한 항암 효과. 대한한방부인과학회지. 2009;22(1):31-40.
13. 王淸任. 醫林改錯. 北京:中國中醫藥出版社. 1995:34, 40-1.
14. 문준전, 안규석, 최승훈. 동의병리학(I). 서울:경희대한의대병리학교실. 1988:166-9, 304-6.
15. 정우상 등. 고혈압 및 고지혈증에 대한 補陽環五湯의 실험적 연구. 대한한방내과학회지. 1997;18(2):246-67.
16. 김남용 등. 補陽環五湯이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):682-6.
17. 임성민 등. 補陽還五湯이 실험적으로 유발된 흰쥐의 자궁내막증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(3):56-77.
18. 위호선. 補陽環五湯의 선천 면역 활성화에 의한 암 전이 억제 효과. 경희대학교대학원. 2012.
19. Lavelle EC, et al. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunology. 2000;99(1):30-7.
20. Cecil RL, Wyngaarden JG, Smith LH. Cecil textbook of medicine(I). Philadelphia:WB Saunders Co. 1998:1082-4, 1115-29.
21. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins pathologic basis of disease(6th ed). Philadelphia:WB Saunders Co. 1999:261-8.
22. 河北中醫學院校釋. 靈樞經校釋(下). 北京:人民衛生出版社. 1995:37, 142, 144, 255.
23. 巢元方. 諸病源候論校注(下). 北京:人民衛生出版社. 1994:856-8, 879, 893-911.
24. 李梴. 醫學入門. 서울:一中社. 1991:887-90.
25. 張介賓. 景岳全書. 서울:大成文化社. 1988:475-83.
26. 李岩. 腫瘤臨證備要 第2版. 北京:人民衛生出版社. 1989:19-28.

27. 진가현 등. 清熱解毒複合方の 항종양 작용에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지. 2003;18(1):33-47.
28. 이진화 등. 血府逐瘀湯이 암 전이 억제에 미치는 영향. 대한한방종양학회지. 1999;5(1):61-75.
29. 강창희 등. 異功散의 혈관 신생 및 암 전이 억제 효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2004;18(6):1686-93.
30. 문구 등. 扶正抗癌湯의 항종양 효과에 관한 실험적 연구. 대한동의병리학회지. 1997;11(2):16-26.
31. 신원웅 등. 少腹逐瘀湯과 加味少腹逐瘀湯이 항암 활성화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(2):22-30.
32. 김태영 등. 活血化瘀藥物的 항암 활성화에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2001;15(2):356-60.
33. 윤용갑. 東醫方劑와 處方解說. 서울: 醫聖堂. 2007:690-1.
34. 광진열, 김재원. 醫林改錯評譯. 서울: 成輔社. 1998:166-74.
35. 박성규, 김윤경, 오명숙. 處方劑型學. 서울: 永林社. 2007:297-8.
36. 하종천 등. 補陽環五湯에 의한 비특이적 세포 독성 T 세포 활성화 증강. 생약학회지. 2001;32(3):226-32.
37. 이진욱, 김진복, 김용일. N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine 경구투여에 의하여 발생된 흰쥐의 간엽성 종양에 고나한 병리조직학적 연구. 대한암학회지. 1981;13(1):31-46.
38. 김형준 등. 비 Cisplatin계를 포함하는 외래 항암투여환자에서 Ondansetron의 경구투여 효과. 최신의학. 1994;424(4):71-5.
39. 김소정. HT-29 대장암 세포주에 대한 Baicalein과 Wogonin의 항암기전. 공주대학교대학원. 2011.
40. 광이성 등. 홍삼산성다당체(RGAP)의 경구투여에 의한 항종양 효과. J Ginseng Res. 2005;29(4):176-81.
41. 김진철 등. 한국산 겨우살이 렉틴의 경구투여에 의한 항원 특이적 점막 면역 증진 효과. Korean J Food SCI TECHNOL. 2011;43(1):72-6.
42. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol. 2003;3(4):331-41.
43. Flo J, et al. Reversible effects on B and T cells of the gut-associated lymphoid tissues in rats malnourished during suckling: Impaired induction of the immune response to intra-Peyer patches immunization with cholera toxin. Clin Immunol Immunopathol. 1996;80(2):147-54.
44. Hibi M, et al. Dendritic cells from spleen, mesenteric lymph node, and Peyer's patch can induce the production of both IL-4 and IFN-gamma from primary cultures of naive CD4(+) T cells in a dose-dependent manner. Cytotechnol. 2003;43:49-55.
45. Jan H, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. Immunol Lett. 2005;97:181-8.