

원저

# 巴豆藥鍼의 急性·亞急性 毒性實驗 및 Sarcoma-180 抗癌效果에 關한 實驗的 研究

유창길\* · 권기록\* · 유병길\*\*

\*상지대학교 부속한방병원 침구과 · \*\*상지대학교 한의과대학 병리학교실

## Abstract

### The Study on Acute and Subacute Toxicity and Sarcoma-180 Anti-cancer Effects of *Triglyi Semen* Herbal-acupuncture.

Chang-Kil, Yoo\* · Ki-Rok, Kwon\* · Byeong-Gil, Yu\*\*

\*Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine in Sang-Ji University

\*\*Department of Pathology College of Oriental Medicine in Sang-Ji University

**Objective :** The purpose of this study was to investigate the acute and subacute toxicity and sarcoma-180 anti-cancer effects of Herbal acupuncture with *Triglyi Semen* in mice and rats.

**Method :** Balb/c mice were injected intraperitoneally with *Triglyi semen* Herbal acupuncture for LD<sub>50</sub> and acute toxicity test. Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with *Triglyi semen* Herbal acupuncture for subacute toxicity test. The *Triglyi semen* Herbal acupuncture was injected on *Chung-wan*(CV12) of mice with S-180 cancer cell line.

**Results :** 1. In acute toxicity test, the LD<sub>50</sub> value was  $7.49 \times 10^3$ ml, 0.30ml/kg.

2. The body weights of mice treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture increased during the acute toxicity test.

3. In acute toxicity test of serum biochemical values of mice, total protein was decreased in treatment groups 1, 2 and 3, albumin was decreased in treatment groups 2 and 3 compared to the control group. GOT was increased in treatment group 1 and Alk. Phosphatase was increased in treatment groups 1, 2 and 3 compared to the normal group(P<0.05).

4. In subacute toxicity test, severe tissue injury was found in lung and liver.

5. In subacute toxicity test, the body weight was decreased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group and the weight of liver, lung and kidney were increased in treatment groups 1, 2 and 3 compared to the normal group.(P<0.05)

6. In subacute toxicity test, RBC, HGB and HCT were decreased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group. MCV was increased in treatment group 1 compared to the normal group, MCH was increased in treatment groups 1 and 2 compared to the control group in complete blood count test.(P<0.05)

7. In subacute toxicity test, total protein was decreased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group, BUN was increased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group, creatinine and uric acid were decreased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group, glucose was increased in treatment group 2 compared to the normal group, triglyceride was decreased in treatment groups 1 and 2 compared to the normal group, total cholesterol was increased in treatment groups 1 and 2 compared to the control group, GOT was decreased in treatment group 2 compared to the normal and control group, Alk. Phosphatase was increased in treatment group 1 compared to the normal and control group.(P<0.05)

8. Median survival time was 17days in treatment group 2 for S-180 cancer cell treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture.

9. Natural killer cell activity was insignificant for S-180 cell treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture.(P<0.05)

10. Interleukin-2 productivity was decreased for S-180 cell treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture compared to the normal and control group.(P<0.05)

**Conclusion :** According to the results, we can conclude Herbal-acupuncture with *Triglyi semen* caused toxicity, and caused no effects in S-180 cancer cell.

**Key words :** *Triglyi semen* Herbal acupuncture, Herbal-acupuncture, LD<sub>50</sub>, Acute toxicity, Subacute toxicity, Sarcoma-180 cancer cell, Natural killer cell activity, Interleukin-2 productivity.

## I. 緒 論

巴豆(*Trigllii semen*)는 大戟科에 속한 常綠灌木인 巴豆의 성숙한 種子로 性은 大熱, 大毒하고 味는 辛<sup>1)</sup>하다. 巴豆는 漢代의 神農本草經<sup>2)</sup>에 처음 기재되어 있으며, 破徵癍, 積聚, 痰癖留飲, 逐水退腫, 祛痰利咽, 瀉下冷積, 治水腫病 등<sup>3)</sup>에 사용되고 있다. 약리작용으로는 장점막을 자극하여 유동작용을 촉진시켜 腹痛, 泄瀉, 裏急後重을 일으킨다<sup>4)</sup>. 따라서 巴豆를 사용함에 있어 용법, 용량, 수처에 신중을 기해서 임상에서 사용하고 있다.

藥鍼療法은 질병 치료에 관련된 혈위 및 압통점, 경결점 등에 본초학적 氣味論을 따라 선택한 한약제제를 주입하여 刺鍼과 藥物에 의한 동시 효과를 구현한 요법으로 한의학의 독특한 치료 방법이다<sup>5)</sup>.

현재 임상에서 사용되는 藥鍼療法은 經絡藥鍼, 八綱藥鍼, 蜂藥鍼으로 크게 구별할 수 있으며<sup>6)</sup>, 다양한 한약재들이 약침제제로 사용되고 있다.

최근에 한약재의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 이는 천연산물에서 항암제를 개발하고자 함이며 곧 항암치료의 부작용을 줄이려는데 뜻이 있다고 볼 수 있다.

최근의 巴豆 관련 연구로는 이<sup>7)</sup>, 박<sup>8)</sup>, 왕<sup>9)</sup>, 김<sup>10)</sup> 등에 의해서 보고되었으나, 巴豆藥鍼의 안전성과 독성, 항암 효과에 대한 본격적인 연구는 이루어지지 않았다.

본 연구는 巴豆藥鍼의 안전성에 대한 실험과 항암 효과에 대한 것으로, 巴豆를 藥鍼療法의 製劑로 임상에 적용할 수 있는지의 여부와 巴豆의 독성 및 효능을 이용한 항암 치료의 한의학적 가능성을 알아보고자 하였다.

이에 저자는 巴豆를 이용하여 藥鍼液을 조제한 후, 檢液의 용량에 따른 독성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호<sup>11)</sup>에 준하여 급성 및 아급성 독성을 평가하였고, 또한 면역반응에 대한 연구로 복강 내에 Sarcoma-180 복강암 세포를 이식하여 和胃氣, 利中焦, 調乘降, 寬中하는 中脘(CV12)<sup>12)</sup>에 巴豆藥鍼을 주입한 후, 생존율, NK cell 활성화도 및 Interleukin-2양을 측정하여 면역작용에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한

결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 동물

급성 독성실험과 항암능 측정을 위하여 체중 25±3g 내외의 Balb/c계 웅성 mouse를 사용하였고, 아급성 독성 실험을 위하여 체중 220±30g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였다. 모든 동물은 대한실험동물센터에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 재료

#### 1) 巴豆약침의 조제<sup>9)</sup>

실험에 사용한 藥鍼은 巴豆藥鍼으로서, 약침학회 실험실에서 조제하여 사용하였다.

시중에서 巴豆(*Trigllii semen*)를 구입하여 지저분한 씨앗을 기류시스템에 의해 깨끗한 씨와 불필요한 찌꺼기를 분리하였다. 깨끗한 씨는 박피기에 의해 피층을 제거하고 껍질이 제거된 씨의 알맹이는 분쇄기로 분쇄하여 준비된 알맹이를 스크류 프레스에 넣어 열은 가지 않은 상태에서 압력만 가해 기름성분을 추출하였다. 이때 거친 찌꺼기는 bin에 저장되어 버려지고, 착유된 윤제는 정치탱크에 보관하여 가라앉은 앙금은 제거한 상층액을 취하고 나서, 3일 정도 대한약침학회의 무균실에 보관하였다. 무균실에 보관된 상층액을 먼저 와트만 여과지로 2번 1차 여과를 한 뒤, 0.45µm, 0.2µm 여과막 순으로 3차 여과하였다. 여과된 윤제를 오염되지 않게 멸균된 바이엘에 일정 용량 주입하였고, 산화방지를 위하여 질소가스를 충전한 다음 밀봉하여 랜덤식 샘플링하여 시료를 준비하였다.(Fig. 1)

#### 2) 약침기

26 gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

※ 교신저자 : 유창길, 강원도 원주시 우산동 283  
상지대학교부속한방병원 침구2과  
(Tel. 033-741-9380, E-mail : dongyuibogam@hanmail.net)

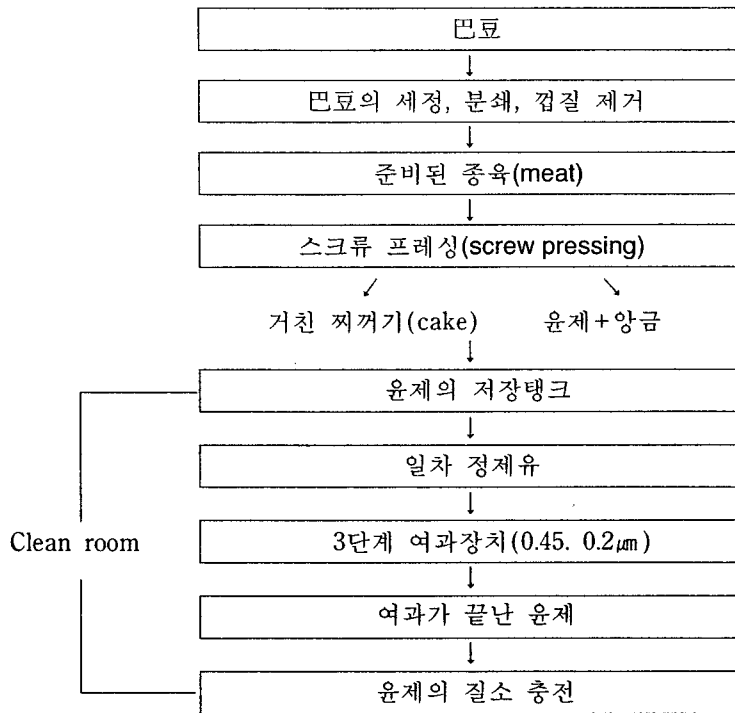


Fig. 1. Manufacturing process of *Triglii semen* Herbal acupuncture.

## 2. 방법

### 1) 암세포의 배양

#### (1) 배지의 구성

##### ① 기본배지의 준비

RPMI 1640(Gibco, U.S.A)에 sodium bicarbonate(Shinyo-pure Chemicals Co., LTD., Japan) 2g과 fungizone(Gibco, U.S.A) 4 ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1 ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A) 1 ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정하고, pH를 7.2로 맞춘 후 0.22µm disposable sterile bottle top filter(Corning, U.S.A)로 여과하여 기본배지로 사용하였다.

##### ② 혼합배지의 준비

FBS(fetal bovine serum, Gibco, U.S.A)를 56°C에서 30분간 inactivation시킨 후 RPMI 1640 기본배지에 10%의 농도가 되도록 조정하여 사용하였으며(이하 혼합배지라 칭함), 이는 암세포의 배양전반에 사용되었다.

#### (2) 암세포의 배양

Balb/c mouse에 복강암을 유발시키기 위한 암 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 동결상태의 Sarcoma-180 세포주를 분양받아 이를 녹인 후, 혼합배지에 부유시켜 5% CO<sub>2</sub> 배양기(준샘, 한국)안에서 배양시킨 후 세포수가 저수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

#### (3) 암세포 유발

생존율 측정의 경우 저수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후, 2.5×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정하여 대조군과 巴豆藥鍼 투여군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다.

NK cell activity와 IL-2의 측정 경우는 저수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 2.5×10<sup>6</sup>cells/ml로 조정한 후, 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하고 14일째 처사시켜 비장세포를 수거하여 사용하였다.

#### 2) 실험군 선정

급성 독성실험은 아무런 처치를 하지 않은 정상군,

normal saline을 주입한 대조군, 巴豆藥鍼을 胡桃藥鍼(JsD)과 1:100의 비율로 희석하여 주입한 실험군 I, 1:200의 비율로 희석하여 주입한 실험군 II로 나누었다.

아급성 독성실험은 아무런 처치를 하지 않은 정상군, normal saline을 주입한 대조군, 巴豆藥鍼을 胡桃藥鍼(JsD)과 1:1000의 비율로 희석하여 주입한 실험군 I, 1:500의 비율로 희석한 실험군 II로 나누어 시행하였다.

항암능 측정실험에서 생존을 측정실험은 아급성 독성실험과 같은 방식으로 나누었고, NK cell 활성도 측정과 Interleukin-II 측정실험은 아무런 처치를 하지 않은 정상군, normal saline을 주입한 대조군, 巴豆藥鍼을 胡桃藥鍼(JsD)과 1:1000의 비율로 희석하여 주입한 실험군으로 나누어 실험을 시행하였다.

### 3) 약침 기술

LD<sub>50</sub> 측정실험과 급성 독성실험의 경우는 巴豆藥鍼 원액을 0.1cc, 0.05cc를 주입한 결과, 巴豆의 강한 독성으로 인하여 24시간 내에 전 개체의 mouse가 사망하는 결과를 나타내므로, 이미 실험을 통하여 독성이 없는 것으로 보고된 胡桃藥鍼(JsD)으로 巴豆藥鍼을 희석하여 주입하였다. 巴豆의 강력한 독성을 고려하여 巴豆藥鍼과 胡桃藥鍼(JsD)을 1:100, 1:200의 비율로 희석시켜 Balb/c mouse의 복강에 1주에 1회씩 0.1cc를 주입하였다.

아급성 독성실험에서도 급성 독성실험과 동일한 방법으로 巴豆藥鍼과 胡桃藥鍼(JsD)을 1:1000, 1:500의 비율로 희석시켜 Sprague-Dawley rat에 매주 2회씩 4주 동안 0.1cc씩 복강에 주입하였고, 대조군의 경우 동량의 생리식염수를 사용하였다.

항암능 측정 실험의 경우는 Sarcoma-180 세포를 Balb/c mouse의 복강에 이식 후, 2일 뒤부터 매주 2회씩 巴豆藥鍼과 胡桃藥鍼(JsD)을 1:1000의 비율로 희석하여 巴豆藥鍼을 0.1cc씩 주입하였고, 대조군의 경우 Sarcoma-180세포 이식 후 2일 뒤부터 매주 2회씩 동량의 생리식염수를 주입하였다.

### 4) 채혈 및 혈청 분리

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle (녹십자의료공업, 한국)에 넣고, 나머지는 vacutainer tube

(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분간 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 생화학 혈청검사에 사용하였다.

### 3. 항목 및 내용

#### 1) 급성 독성

##### (1) LD<sub>50</sub> 측정

巴豆藥鍼을 Balb/c mouse에 0.1cc(1:1-1:200)주입 후 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다.

##### (2) 임상관찰 및 체중변화 측정

巴豆藥鍼을 Balb/c mouse에 0.1cc(1:100, 1:200)주입한 후, 처음 투여일은 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 하였고, 다음 날부터 실험 종료시 까지 1일 1회 1시간씩 관찰하고자 하였다.

체중은 1주일에 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다.

##### (3) 장기의 무게 측정

실험 종료일에 체중을 측정하고, 채혈을 한 뒤 간장, 심장, 비장, 폐장, 신장을 적출하여 저울(EB-200HU, SHIMADZU, Japan)을 이용하여 무게를 측정하였다.

##### (4) 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle(녹십자의료공업, 한국)에 넣고, 나머지는 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000 rpm으로 5분 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

##### (5) 생화학 혈청검사

vacutainer tube에 보존한 혈청을 이용하여 Biochemical Analyser (TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 total protein, Albumin, total bilirubin, glucose, triglyceride, total cholesterol, GOT, GPT, alkaline phosphatase, A/G ratio를 측정하였다.

2) 亞 급 성 독 성

(1) 臨 床 觀 察

巴豆藥鍼을 Sprague-Dawley rat에 0.1cc(1:1000, 1:500) 주입한 실험군과 생리식염수 0.2cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였고, 처음 투여일은 행동, 자세, 반응성, 호흡, 피모 및 안구 등의 임상관찰을 하였고, 다음날부터 실험 종료시까지 1일 1회 1시간씩 관찰하였다.

(2) 체중 측정

급성 독성실험과 동일한 방법으로 측정하였다.

(3) 장기의 무게 측정 및 관찰

급성 독성실험과 동일한 방법으로 무게를 측정하였고, 장기의 관찰은 실험 종료 후 개복하여 각 장기를 적출하여 관찰하였다.

(4) CBC 측정

EDTA bottle에 보존한 혈액을 이용하여 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)를 이용하여 WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet를 측정하였다.

(5) 생화학 혈청검사

vacutainer tube에 보존한 혈청을 이용하여 Biochemical Analyser (TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 total protein, Albumin, total bilirubin, glucose, triglyceride, total cholesterol, GOT, GPT, alkaline phosphatase, A/G ratio를 측정하였다.

3) Sarcoma-180 항암효과

(1) 생존율 측정

지수증식기에 이른 sarcoma-180 세포를 수거하여 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 원심세척한 후 대조군과 巴豆藥鍼 투여군의 생쥐의 복강에  $5 \times 10^6$  cells/0.2 ml씩 주입하여 30일 동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다. 관찰 30일까지 복강암이 유발되지 않은 경우는 생존율 계산에서 제외하였다. Geran 등이 기술한 median survival time을 이용하여 생존증가율(increase of life span)을 산출하였다.

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

$$\text{생존증가율} = \frac{T-C}{C} \times 100$$

- X: 생존수가 전체동물의 1/2이 되는 최초의 시간(일)
- Y: 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(일)
- T: 실험군의 median survival time(일)
- C: 대조군의 median survival time(일)

(2) 비장 세포의 준비

생쥐를 경추탈골로 치사시킨 후 복부를 알콜로 완전히 도포한 후 무균적으로 비장을 적출한 뒤, 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4 기본배지로 2회 세척한 다음 cell dissociation sieve-tissue grinder kit(Sigma, U.S.A)로써 잘게 으갠 후 조직파편을 제거하고 기본배지로 3회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로써 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤  $10 \times \text{HBSS}$ (Gibco, U.S.A)로 2회 세척하고 기본배지로 한번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

(3) NK cell 활성화 측정

(가) 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

(나) 표적세포의 준비

NK 세포의 살해능 측정시의 표적세포는 한국세포주은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1임파종 세포(KCLB 40160)를 사용하였다. 분양받은 후 본 실험실에서 FBS가 10% 첨가된 혼합배지로 계대배양하여 사용하였다.

(다) 세포독성의 측정

① 기본방법

세포독성실험은 Promega사의  $^{51}\text{Cr}$  assay를 대체하는 것으로 알려져 있는 cytotox96™ non-radioactive cytotoxicity assay KIT를 이용하여 실시하였다. 즉, 세포의 용해시에 방출되는 lactate dehydrogenase(이하 LDH라 칭함)가 효소반응의 결과로 나타나는 붉은색의 결정을 ELISA 판독기(Emax, Molecular Devices, U.S.A)를 이용하여 가시광선영역의 파장(490nm)에서 흡광도를 측정함으로써 용해된 세포의 수를 추정하는 것이다.

② 대조 well의 준비

오차를 보정하기 위하여 5종류의 대조 well을 두었다. 표적세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조well 1은 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 표적세포의 LDH 최대방출량을 나타내는 대조 well 2는 최적수의 표적세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 작동세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조well 3은 최적수의 작동세포 100 $\mu$ l와 배지 100 $\mu$ l로 구성하였고, 부피를 보정하기 위한 대조well 4는 용해용액을 첨가하여 발생하는 부피의 변화에 의한 오차를 보정하기 위한 것으로 배지 200 $\mu$ l와 용해용액(10 $\times$ ) 20 $\mu$ l로 구성하였으며 배지의 background로서 배지내 혈청이나 phenol red에 기인한 LDH의 활동능을 보정하기 위한 대조well 5는 배지 200 $\mu$ l로 구성하였다.

③ 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에 2 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 재부유하고, 96 well microtitration plate에 well당 100 $\mu$ l씩 분주한 후, 작동세포와 표적세포의 비가 100:1, 50:1, 10:1이 되도록, FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 각각 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml, 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml, 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ l를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ l/well이 되도록 한후 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분전에 대조 well 2에 100 $\mu$ l 당 10 $\mu$ l의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$ l 옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합기질을 만든 후, 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 $\mu$ l의 정지용액을 각 well에 넣은 후 주사기로 거품을 제거하고, 1시간 이내에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 실험값, 표적세포 LDH 자연방출값, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 뺀고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 뺀다.

즉, 다음의 공식에 의하여 세포독성능을 측정하였다.

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

A: Experimental - culture medium background

B: Effect cell spontaneous LDH release - culture medium

background

C: Target cell spontaneous LDH release - culture medium background

D: Target cell maximum LDH release - volume correction control

(4) Interleukin-2 생산량 측정

Sarcoma-180 세포를 Balb/c계 mouse에 주입하고 21일째에 생쥐를 처사하여 비장을 적출하였다. 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 혼합배지에 5 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml의 농도로 재부유한 후, 여기에 concanavalin-A(Sigma, U.S.A)를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 interleukin-2(이하 IL-2라 칭함)의 생산량을 측정하였다.

생쥐 IL-2의 생산량 측정은 Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit(R&D system, U.S.A)를 이용하였다. Mouse IL-2 Quantikine M ELISA Kit는 고형상 면역효소 측정법을 이용한 mouse Interleukin-2 측정용 kit로서 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2량을 산정할 수 있는 방법이다.

96well plate의 각 well에 50 $\mu$ l의 Assay Diluent solution을 분주하고 준비된 standard, control, 실험군의 비장세포 상층액 50 $\mu$ l 첨가한 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well을 미리 준비된 Wash buffer로 5회 세척한 후 물기를 깨끗이 제거하고 100 $\mu$ l의 Conjugate solution을 각 well에 분주하였다. 그 후 덮개를 씌우고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난후 Wash buffer로 5회 세척한 후 물기를 제거한후 100 $\mu$ l의 Substrate Solution을 각 well에 분주한 후 빛이 차단된 장소에서 실온에서 30분간 배양하였다. 그 후 100 $\mu$ l의 Stop Solution을 각 well에 분주한 후 ELISA 판독기(Emax, Molecular device, U.S.A)로 450nm 파장에서 흡광도를 읽었다. 이 때 흡광도의 교정을 위하여 540nm에서 한번 더 읽었다.

4) 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS(Release 10.0.7)를 이용하였으며, student's T-test<sup>99)</sup>를 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 급성 독성

##### 1) LD<sub>50</sub> 측정

Balb/c mouse를 이용한 LD<sub>50</sub>의 측정에서 회귀분석에 의한 LD<sub>50</sub>은  $7.49 \times 10^{-3}$ ml이며, 체중비율로 환산하여 0.30ml/kg 을 나타내었다.

##### 2) 임상관찰 및 체중변화 측정

LD<sub>50</sub> 측정에서 알 수 있듯이 바豆藥鍼의 독성이 매우 강하여서, 0.1cc와 0.05cc의 바豆藥鍼을 주입 후 임상 관찰한 결과, 전 개체의 mouse는 2-3분 내에 바로 사망하

거나 24시간 내에 모두 사망하였다.(Table 1.) 따라서 바豆藥鍼은 극소량의 주입으로도 강력한 독성을 나타내므로 실험을 진행하기 위해서 바豆藥鍼을胡桃藥鍼(JsD)과 1:100, 1:200의 비율로 희석하여 주입한 후 각 군의 체중을 측정하였다.

巴豆藥鍼을胡桃藥鍼(JsD)으로 1:100, 1:200의 비율로 희석하여 주입한 각 군의 체중 변화에서 실험군 I에서는 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며, 실험군 II에서는 정상군과 대조군에 유의한 비례 증가를 보였다.(Table 2.)

##### 3) 생화학 혈청검사

생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total Protein은 실험군 I, II에서, Albumin은 실험군 II에서 대조군에 비해

Table 1. Mortality of mice treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture.

Group	Hours after treatment								Final Mortality
	1	12	24	48	72	96	120	144	
Normal (10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Control (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Treat I (10)	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
Treat II (10)	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10

\* : number of animals

Normal : Non-treated group

Control : Control group is treated with normal saline

Treat I : treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.05cc)

Treat II : treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.1cc)

Table 2. Body weight of mice treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture in acute toxicity test.

Group	day1	day7
Normal (10)*	25.62 ± 1.14	31.93 ± 1.47
Control (10)	27.10 ± 1.84	33.40 ± 2.09
Treat I (10)	26.83 ± 1.30	35.99 ± 3.19a
Treat II (10)	26.76 ± 1.03	35.41 ± 1.62ab

\* : number of animals

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline(0.1cc)

Treat I : treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:100)

Treat II : treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:200)

Table 3. Serum biochemical values of mice treated intraperitoneally with *Trigllii semen* Herbal acupuncture in acute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
TP (mg/dl)	4.80 ± 0.27	5.22 ± 0.42	4.69 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.76 ± 0.22 <sup>b</sup>
ALB (mg/dl)	2.82 ± 0.16	3.11 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.19	2.74 ± 0.13 <sup>b</sup>
BUN (mg/dl)	30.93 ± 2.76	29.87 ± 5.44	29.53 ± 4.83	33.37 ± 5.58
CRTN (mg/dl)	0.48 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.50 ± 0.03
UA (mg/dl)	5.70 ± 1.66	4.09 ± 1.95	4.10 ± 1.69	3.65 ± 1.54
GLU (mg/dl)	247.17 ± 47.42	221.00 ± 30.70	230.33 ± 32.47	251.50 ± 69.67
TG (mg/dl)	181.00 ± 40.89	209.71 ± 94.08	210.00 ± 81.70	173.83 ± 62.82
T-CHO (mg/dl)	112.33 ± 19.55	130.00 ± 22.84	133.44 ± 21.99 <sup>b</sup>	113.83 ± 15.00
GOT (U/L)	65.00 ± 10.60	74.14 ± 30.57	73.89 ± 28.68 <sup>a</sup>	117.67 ± 45.25
GPT (U/L)	25.50 ± 6.28	26.29 ± 4.61	26.44 ± 4.13	51.00 ± 48.75
ALP (U/L)	300.17 ± 57.87	250.00 ± 50.62	247.89 ± 55.79 <sup>ab</sup>	101.50 ± 32.10 <sup>ab</sup>
A/G	1.45 ± 0.05	1.47 ± 0.11	1.48 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.13
BUN/CR	64.77 ± 9.68	58.23 ± 10.88	58.13 ± 9.78	67.94 ± 16.14

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat I : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:100)

Treat II : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:200)

유의하게 감소하였고, Total cholesterol은 실험군 I에서 대조군에 비해, GOT는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, Alk. Phosphatase는 실험군 I, II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, A/G는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.(Table 3.)

## 2. 아급성 독성

### 1) 체중변화 측정

체중변화 측정에서는 실험개시 후 21일째의 실험군 I을 제외한 모든 측정에서 실험군이 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.(Table 4.)

### 2) 장기의 무게 측정 및 관찰

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성 실험에서 실험 종료 후 회복하여 내부 장기를 관찰한 결과 폐와

간에 심대한 조직 이상이 발견되었다. 특히 실험군 I (1:1000)보다 실험군 II(1:500)에서 폐의 이상이 뚜렷하게 관찰되었다.

실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출, 무게를 측정 한 결과 실험군 I에서는 간과 신장에서 정상군과 대조군에 비해, 폐는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, 실험군 II에서는 간, 폐, 신장의 무게가 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.(Table 5.)

### 3) Complete Blood Count 측정

아급성 독성실험에서 CBC를 측정한 결과, RBC, HGB, HCT에서 실험군 I, II는 정상군과 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 MCV에서 실험군 I은 정상군과 대조군에 비하여, 실험군 II는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. MCH는 실험군 I, II에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, PLT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.(Table 6.)



Table 4. Body weight of rats treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

Group	day7	day14	day21	day28
Normal	218.41 ± 9.01	256.15 ± 11.16	272.20 ± 40.06	323.38 ± 15.46
Control	213.76 ± 7.84	253.98 ± 8.24	273.69 ± 34.15	311.99 ± 10.59
Treat I	183.75 ± 10.87ab	219.08 ± 9.62 <sup>ab</sup>	257.83 ± 11.95	278.06 ± 9.27 <sup>ab</sup>
Treat II	169.74 ± 13.84ab	208.46 ± 13.38 <sup>ab</sup>	246.46 ± 12.20 <sup>ab</sup>	255.60 ± 14.29 <sup>ab</sup>

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b: Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat I : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Treat II : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:500)

Table 5. Absolute and relative organ weights in rats treated intraperitoneally with *Trigllii semen* Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

Group	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
Normal	3.99 ± 0.18	0.37 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.70 ± 0.03
Control	3.92 ± 0.33	0.36 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.69 ± 0.05
Treat I	4.48 ± 0.24ab	0.34 ± 0.02	0.25 ± 0.10	0.53 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.04 <sup>ab</sup>
Treat II	4.48 ± 0.35ab	0.36 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.66 ± 0.23 <sup>ab</sup>	0.82 ± 0.06 <sup>ab</sup>

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat I : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Treat II : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:500)

Table 6. CBC values of treated intraperitoneally with *Trigllii semen* Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
WBC (x10 <sup>9</sup> /ul)	8.85 ± 1.34	7.34 ± 1.76	8.12 ± 1.24	7.93 ± 1.44
RBC (x10 <sup>6</sup> /ul)	7.37 ± 0.21	7.66 ± 0.27 <sup>a</sup>	6.81 ± 0.10 <sup>ab</sup>	6.92 ± 0.312 <sup>ab</sup>
HGB (g/dl)	14.88 ± 0.19	15.08 ± 0.39	13.96 ± 0.26 <sup>ab</sup>	14.13 ± 0.31 <sup>ab</sup>
HCT (%)	46.53 ± 1.17	47.75 ± 1.30	44.48 ± 1.36 <sup>ab</sup>	44.63 ± 1.34 <sup>ab</sup>
MCV (fL)	63.15 ± 1.24	62.39 ± 1.55	65.34 ± 1.56 <sup>ab</sup>	64.58 ± 1.29 <sup>b</sup>
MCH (pg)	20.17 ± 0.44	19.71 ± 0.55	20.50 ± 0.35 <sup>b</sup>	20.44 ± 0.52 <sup>b</sup>
MCHC (g/dl)	31.98 ± 0.59	31.58 ± 0.40	31.40 ± 0.60	31.67 ± 0.32
PLT (x10 <sup>3</sup> /ul)	1012.00 ± 68.84	1040.36 ± 148.35	1067.33 ± 73.39	1182.00 ± 99.79 <sup>a</sup>

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat I : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Treat II : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:500)

4) 생화학 혈청 검사

아급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total protein은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비해, 실험군 II에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈고, Albumin은 실험군 I에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, BUN은 실험군 I에서 대조군에 비해, 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, Creatinine과 Uric acid는 실험군 I, II에서 모두 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈으며, Glucose는 실험군 II에서 정상군, 대조군보다 유의한 증가를 나타냈고, Triglyceride는 실험군 I, II 모두 정상군보다 유의한 감소를 나타냈다. Total cholesterol은 실험군 I, II 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, GOT는 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다. Alk.Phosphatase는 실험군 I에서 정상군, 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Table 7.)

3. Sarcoma-180에 대한 항암효과

1) 생존율 측정

Median survival time은 대조군은 25일, 실험군 I은 실험 23일째 갑자기 군의 반수 이상이 사망하여 구할 수 없었으며 실험군 II는 17일을 나타내었다. 따라서, 생존 증가율은 실험군 II에서 대조군에 비하여 32%의 감소율을 나타내었다.(Fig. 2)

2) NK cell 활성도 측정

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 대조군은 작동세포와 표적세포의 비율이 100:1일 때 46.87±8.35, 50:1일 때 44.38±6.05, 10:1일 때 44.95±10.91을 나타내었다. 실험군의 경우 100:1일 때 44.32±11.64, 50:1일 때 43.38±14.23, 10:1일 때 44.95±10.91를 나타내었다.(Table 8 & Fig. 3)

Table 7. Serum biochemical values of treated intraperitoneally with *Trigllii semen* Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Treat I	Treat II
TP (mg/dl)	6.14 ± 0.19	6.24 ± 0.18	5.92 ± 0.09 <sup>ab</sup>	6.04 ± 0.26 <sup>b</sup>
ALB (mg/dl)	3.67 ± 0.23	3.89 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.78 ± 0.13
BUN (mg/dl)	23.43 ± 1.56	23.19 ± 1.61	25.26 ± 2.31 <sup>b</sup>	27.06 ± 3.04 <sup>ab</sup>
CRTN (mg/dl)	0.62 ± 0.01	0.62 ± 0.04	0.51 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>ab</sup>
UA (mg/dl)	2.47 ± 0.23	2.47 ± 0.36	1.62 ± 0.33 <sup>ab</sup>	1.73 ± 0.35 <sup>ab</sup>
GLU (mg/dl)	190.00 ± 17.19	197.40 ± 28.52	202.00 ± 17.99	241.67 ± 33.32 <sup>ab</sup>
TG (mg/dl)	119.67 ± 21.07	85.73 ± 33.83 <sup>a</sup>	70.00 ± 19.56 <sup>a</sup>	66.78 ± 27.94 <sup>a</sup>
T-CHO (mg/dl)	88.33 ± 6.25	84.53 ± 8.83	94.56 ± 7.60 <sup>b</sup>	99.78 ± 16.20 <sup>b</sup>
GOT (U/L)	139.67 ± 18.81	135.80 ± 18.92	134.11 ± 21.22	112.56 ± 25.29 <sup>ab</sup>
GPT (U/L)	55.33 ± 0.52	54.60 ± 3.83	58.44 ± 6.29	53.22 ± 9.30
ALP (U/L)	530.83 ± 45.04	541.60 ± 72.39	691.00 ± 81.35 <sup>ab</sup>	596.33 ± 110.11
A/G	1.58 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.67 ± 0.08	1.67 ± 0.13
BUN/CR	37.78 ± 1.69	37.29 ± 2.46	49.17 ± 3.47 <sup>ab</sup>	50.03 ± 3.54 <sup>ab</sup>

a : Control and treat groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat I : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Treat II : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:500)

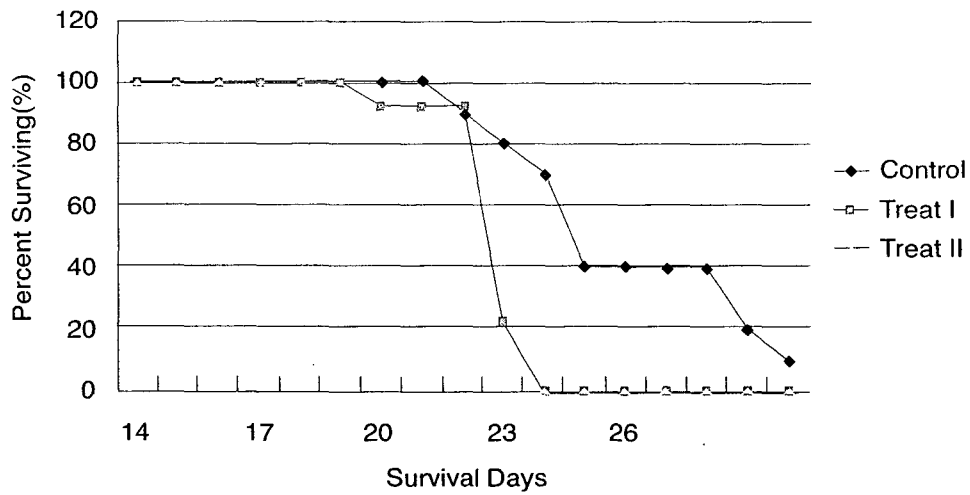


Fig. 2. Median survival time of mice treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture in vivo.

Control : treated with normal saline

Treat I: treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Treat II: treated with *Triglyi semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:500)

Table 8. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearingmicetreated withTriglyisemenHerbal acupuncture according to E/T ratio.

Group	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	44.74 ± 2.73
	50:1	41.89 ± 5.48
	10:1	40.80 ± 6.06
Control	100:1	46.87 ± 8.35
	50:1	44.38 ± 6.05
	10:1	44.95 ± 10.91 <sup>a</sup>
Treat	100:1	44.32 ± 11.64
	50:1	43.38 ± 14.23
	10:1	44.95 ± 10.91 <sup>a</sup>

a : Control and treatment groups were compared to the normal group by students'two-tailed t test. (P<0.05)

b:Treatment group were compared to the control group by students'two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat : treated with Triglyi semen Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

대조군과 실험군은 작동세포와 표적세포의 비가 10:1 일 때 정상군에 비하여 유의성있는 증가를 나타내었다.

감소하였다.(Table 9)

3) Interleukin-2 양 측정

Ⅳ. 考 察

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 21일 후에 대조군 및 실험군의 마우스로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정된 결과를 보면 정상군은  $263.28 \pm 22.52 \text{pg/ml}$ , 대조군은  $226.14 \pm 22.06 \text{pg/ml}$ , 실험군은  $143.65 \pm 4.47 \text{pg/ml}$ 을 나타내었다. 실험군에서 정상군, 대조군에 비하여 유의하게

巴豆는 大戟科에 속한 常綠 喬木인 巴豆의 성숙한 種子로, 種子에는 crotonic acid, tiglic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, crotonic acid 등으로 이루어진 지방유가 34-57% 들어 있으며, 설사를 유발하는 성분인 phorbol-12, 13-diesters, phorbol-12, 13, 20-triester를 함유한다. 性은 熱, 有大毒하며 味는 辛하며 胃, 大腸經으로 歸

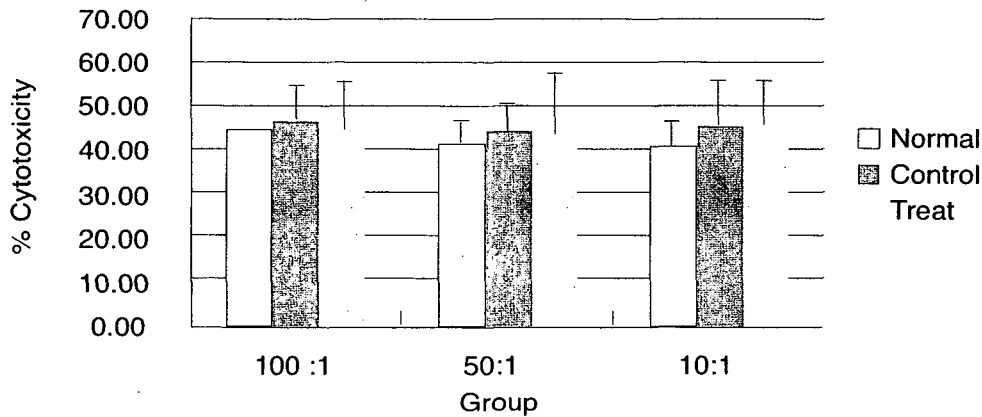


Fig. 3. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing mice treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture according to E/T ratio.

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

Table 9. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 cell bearing mice treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture.

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	$263.28 \pm 22.52$
Control	$226.14 \pm 22.06^a$
Treat	$143.65 \pm 4.47^{ab}$

a: Control and treatment groups were compared to the normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b: Treatment groups were compared to the control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal: Non-treated group

Control: treated with normal saline

Treat : treated with *Trigllii semen* Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JsD 1:1000)

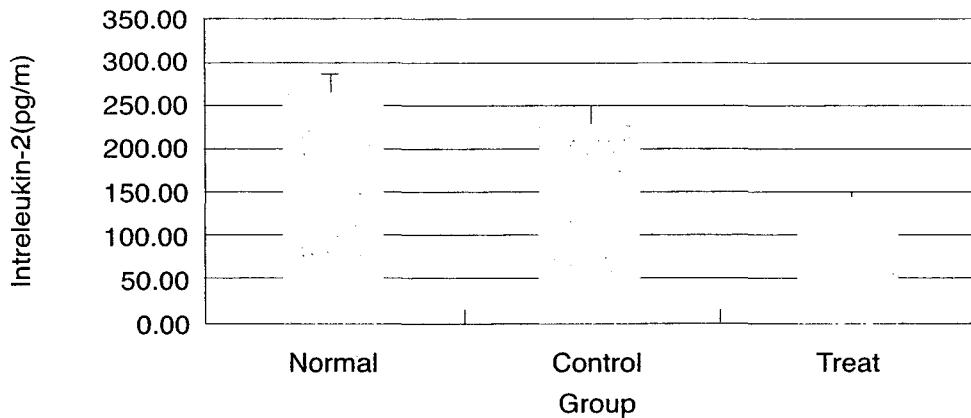


Fig. 4. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 cell bearing mice treated with Trigllii semen Herbal acupuncture.

Normal : Non-treated group

Control : treated with normal saline

Treat : treated with Trigllii semen Herbal acupuncture(0.1cc, mixed with JSD 1:1000)

經한다<sup>1)</sup>. 主治·效能으로는 瀉寒積, 破微癥, 逐水消腫, 逐痰, 殺蟲, 蕩滌五臟六腑, 開通閉塞, 利水穀道, 痰癖留飲, 去痰利咽, 祛惡瘡, 治寒積便秘, 下腹水腫, 消毒, 破膿血 등의 效能이 있다<sup>15)</sup>. 寒積積滯가 없거나 體虛氣虛者 및 孕婦는 禁忌이다<sup>16)</sup>.

藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 의거, 적절한 한약재를 선택하여 유관한 穴位, 壓痛點 및 反應點에 주입하여 刺鍼과 藥物作用을 동시에 구현하여 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法이다<sup>10)</sup>. 최근까지의 藥鍼療法은 크게 經絡藥鍼, 八綱藥鍼 그리고 蜂藥鍼으로 大別할 수 있으며<sup>10)</sup> 현재 다양한 약재들을 이용한 藥鍼療法이 시행되어 유의한 효과를 나타내고 있다<sup>10)</sup>.

巴豆는 독성의 강렬함으로 인하여 임상에서 활용이 많지 않은 약재 중의 하나이다. 그러나 이<sup>17)</sup>는 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 항암효과를, 박<sup>18)</sup>은 巴豆 加大黃의 抗腫瘍效果를, 왕<sup>19)</sup>은 암세포의 증식과 그 세포 크기 변동에 미치는 巴豆 및 大戟추출물의 영향을, 김<sup>20)</sup>은 巴豆추출액의 백서 신장기능에 미치는 영향 등, 巴豆와 관련된 연구는 보고되어진 바 있다. 그러나 巴豆藥鍼에 대한 급성, 아급성 독성실험은 아직 보고된 바 없었다. 이에 '의약품 독성시험 기준'<sup>15)</sup>에 준하여 본 실험을 시행하였다. 독성연구의 주요목적은 신약의 안전성을 평가하여 임상적 사용에 있어서의 안전성 확보를 위한 것<sup>21)</sup>으로, 특히 강력한 독성을 지닌 巴豆를 임상에서 藥鍼으로 사용하기 위해서는 필수적인 절차로

여겨진다. 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아급성 독성실험(1개월 반복투여 독성시험) 그리고 만성독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나누는데, 본 실험에서는 급성과 아급성 독성실험을 시행하였다.

급성 독성실험에서는 LD<sub>50</sub>(반수치사량 측정)과 최대내용량 측정을 위해 巴豆藥鍼을 Balb/c mouse에 주입 후 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하고 임상관찰을 하였다.(Table 1.) 회귀분석에 의하여 LD<sub>50</sub>은 7.49 × 10<sup>3</sup>ml이었고, 체중비율로 환산하여 0.30ml/kg으로 나타났다. LD<sub>50</sub> 수치에서 알 수 있듯이 巴豆藥鍼의 독성이 매우 강하여 극소량의 巴豆藥鍼을 주입 후 임상 관찰한 결과, 전 개체의 mouse는 2-3분 내에 바로 사망하거나 24시간 내에 모두 사망하여 주입 후 7일간의 임상관찰은 시행하기 힘들었다. 이로써, 과두의 독성이 너무나 강하여 극소량의 주입만으로도 mouse에 치명적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 이미 실험을 통하여 아무런 독성이 없는 것으로 보고<sup>17)</sup>된 胡桃藥鍼(JsD)으로 巴豆藥鍼을 희석하여 실험에 임하였다. 巴豆藥鍼을 호도약침(JsD)과 1:100, 1:200의 비율로 희석하여 주입한 각 군의 체중 변화에서 실험군 I에서 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며, 실험군 II에서는 정상군과 대조군에 유의한 비례 증가를 보였다.(Table 2.)

생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total Protein은 실험

군 I, II에서, Albumin은 실험군 II에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, Total cholesterol은 실험군 I에서 대조군에 비해, GOT는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, Alk. Phosphatase는 실험군 I, II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, A/G는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.(Table 3.)

이상과 같은 巴豆藥鍼의 급성 독성실험 결과로 보아, LD50의 수치는 극소량으로 나타나고 임상병리 검사 결과에 많은 변화가 일어나는 것으로 나타나 임상에서 신중히 판단하여 사용해야 할 것으로 사료된다.

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험에서, 체중변화는 실험개시 후 21일째의 실험군 I을 제외한 모든 측정에서 실험군이 정상군, 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.(Table 4.) 실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출, 무게를 측정한 결과 실험군 I에서는 간과 신장에서 정상군과 대조군에 비해, 폐는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, 실험군 II에서는 간, 폐, 신장의 무게가 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.(Table 5.) 실험 종료 후 회복하여 내부 장기를 관찰한 결과 폐와 간에 심대한 조직 이상이 발견되었다. 특히 실험군 I(1:1000)보다 실험군 II(1:500)에서 폐의 이상이 뚜렷히 관찰되었다.

아급성 독성실험에서 CBC를 측정한 결과, RBC, HGB, HCT에서 실험군 I, II는 정상군과 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 MCV에서 실험군 I은 정상군과 대조군에 비하여, 실험군 II는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. MCH는 실험군 I, II에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, PLT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.(Table 6.)

아급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total protein은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비해, 실험군 II에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈고, Albumin은 실험군 I에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, BUN은 실험군 I에서 대조군에 비해, 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, Creatinine과 Uric acid는 실험군 I, II에서 모두 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈으며, Glucose는 실험군 II에서 정상군, 대조군보다 유의한 증가를 나타냈고, Triglyceride는 실험군 I, II 모두 정상군보다 유의한 감소를 나타냈다. Total cholesterol은 실험군 I, II 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으

며, GOT는 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다. Alk. Phosphatase는 실험군 I에서 정상군, 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Table 7.)

이상과 같은 巴豆藥鍼의 아급성 독성실험의 결과로 보아, 체중감소 및 장기 조직손상이 유발되며, 또한 임상병리 검사 결과에 많은 변화가 있는 것으로 나타나 역시 임상에서 신중히 판단하여 사용해야 할 것으로 사료된다.

서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉성장'이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의되어 있다<sup>20)</sup>. 서양의학의 종양에 대한 치료법은 예방적인 면에서 일차예방으로 생활 습관의 개선, 화학 예방이 될 수 있으며 이차예방은 조기 진단을 들 수 있다<sup>21)</sup>. 진단된 암의 치료방법으로는 외과적 수술요법, 방사선요법, 약물 요법, 항화학요법, 면역 요법, 호르몬 요법 및 골수나 조혈모세포의 이식 등의 유전자 치료방법들이 있다.

한의학적으로 殷墟의 甲骨文에 '瘤'라는 病名이 나타나고<sup>22)</sup>, 內經<sup>23)</sup>에서는 石癥, 腸癰, 骨疽, 肉疽, 積聚, 瘤 등으로 표기하였다.

한의학적 腫瘍 治療法으로는 扶正法, 祛邪法, 扶正祛邪의 3종류로 나눌 수 있는데<sup>24)</sup> 巴豆藥鍼을 이용한 항암치료는 이 중 祛邪法에 해당한다 볼 수 있다. 巴豆의 효능이 破積聚, 破微癥, 逐水消腫하므로 巴豆藥鍼이 유발된 종양에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 복강내에 주입한 후 그 결과를 관찰하였다.

NK cell은 주요조직적 복합체(Major histocompatibility complex: MHC)의 제한현상도 없고, 항원 특이성도 없이 일부 암세포와 바이러스 감염세포에 대하여 세포독성을 나타내는 세포로 일반적으로 자연세포독성세포(NK cell : natural killer cell)라고 하고, 이는 일종의 자연면역 기능을 보이는 세포이다<sup>25)</sup>. T세포 성장인자라고도 불리는 IL-2는 T cell의 증식과 기능항진, B cell 분화인자, NK cell의 활성화에 관여하고 있고, AIDS와 같은 면역결핍증이나 腫瘍의 치료에 이용되며, 면역반응의 항진과 저하에 중요한 역할을 하여 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다<sup>26), 27)</sup>.

Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험에서, Median survival time은 대조군은 25일, 실험군 I(1:1000)은 실

험 23일째 갑자기 군의 반수 이상이 사망하여 구할 수 없었으며 실험군 II(1:500)는 17일을 나타내었다. 따라서, 생존 증가율은 실험군 II에서 대조군에 비하여 32%의 감소율을 나타내었다.(Fig. 2)

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 대조군과 실험군 모두 작동세포와 표적세포의 비가 10:1일 때 정상군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였으나 수치가 같으므로 실험군에서 유의성이 있다고 보기는 어려웠다.(Table 8 & Fig. 3)

Interleukin-2의 생산능은 실험 실시 후 21일째에 대조군 및 실험군의 mouse로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정된 결과, 실험군에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.(Table 9 & Fig. 4)

이상과 같은 Sarcoma-180에 대한 항암실험 결과, 巴豆藥鍼의 항암효과는 유의성이 있다고 보기는 어려웠다.

이상의 실험 결과들을 종합하여 볼 때, 巴豆藥鍼이 나타내는 독성은 매우 강하여 임상에 활용하기 위해서는 보다 다양하고 심도 깊은 연구들이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

巴豆藥鍼의 안전성을 규명하기 위하여 mouse와 rat를 이용한 LD<sub>50</sub>, 급성·아급성 독성실험을 하였으며, 巴豆藥鍼의 항암효과를 관찰하기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 주입한 mouse에서 생존율, NK cell 활성도 및 IL-2양을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>을 측정된 결과 7.49 × 10<sup>3</sup>ml, 체중비율로 환산하여 0.30ml/kg로 나타났다.
2. 급성 독성실험에서 실험군의 체중은 증가하는 것으로 나타났다.
3. 급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total Protein은 실험군 I, II에서, Albumin은 실험군 II에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, Total cholesterol은 실험군 I에서 대조군에 비해, GOT는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, Alk. Phosphatase는 실험군 I, II에서 정

상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, A/G는 실험군 I에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.

4. 아급성 독성실험에서 실험 종료 후 회복하여 내부 장기를 관찰한 결과, 폐와 간에 심대한 조직 이상이 발견되었다.
5. 아급성 독성실험에서 체중변화를 측정된 결과, 실험 개시 후 21일째의 실험군 I을 제외한 모든 측정에서 실험군이 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출, 무게를 측정된 결과 실험군 I에서는 간과 신장에서 정상군과 대조군에 비해, 폐는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, 실험군 II에서는 간, 폐, 신장의 무게가 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
6. 아급성 독성실험에서 CBC를 측정된 결과, RBC, HGB, HCT에서 실험군 I, II는 정상군과 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 MCV에서 실험군 I은 정상군과 대조군에 비하여, 실험군 II는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. MCH는 실험군 I, II에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, PLT는 실험군 II에서 정상군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.
7. 아급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total protein은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비해, 실험군 II에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈고, Albumin은 실험군 I에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, BUN은 실험군 I에서 대조군에 비해, 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈고, Creatinine과 Uric acid는 실험군 I, II에서 모두 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈으며, Glucose는 실험군 II에서 정상군, 대조군보다 유의한 증가를 나타냈고, Triglyceride는 실험군 I, II 모두 정상군보다 유의한 감소를 나타냈다. Total cholesterol은 실험군 I, II 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, GOT는 실험군 II에서 정상군, 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다. Alk. Phosphatase는 실험

군 I에서 정상군, 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.

- 8. Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험에서, Median survival time은 실험군 II에서 17일이었다.
- 9. NK cell 활성화 측정 검정결과, 실험군은 유의성을 나타내지 않았다.
- 10. Interleukin-2의 생산능 검액 검사에서 실험군은 정상군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다.

이상과 실험 결과, 巴豆藥鍼은 독성이 매우 강하게 나타나 임상에 활용하기 위해서 보다 다양하고 심도 깊은 연구들이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

### 參 考 文 獻

1. 전국한의과대학 본초학교수 共編著, 본초학, 영림사, p.255, 1981.
2. 李仲梓, 醫宗必讀, 서울, 대방출판사, p. 99, 128, 1978.
3. 李 挺, 編註醫學入門(卷II), 서울, 남산당, p.806, 1974.
4. 神農本草經, 문광도서유한공사, 臺北, 卷III, p.20, 1980.
5. 申佶求, 申氏本草學(各論), 現代人刷文化社, 서울, pp. 416-419, 1973
6. 李時珍, 本草綱目, 人民衛生出版社, 北京, pp. 2052-2058, 1982.
7. 金在佶, 臨床應用漢藥 制學, 藥業新聞社出版局, 서울, pp.335-336, 1992.
8. 曲京峰, 中藥學, 科學出版社, pp.150-151, 1994.
9. 대한약침학회, 약침요법 시술지침서, 대한약침학회, 서울. pp.13-14, 112-118, 140-141, 1999.
10. 강대인 외, KGMP를 대비한 국내약침제제의 조제 현황과 미생물 검사보고. The 1st Journal of International Congress of KIHA. Vol. 4. No. 1 pp.49-62, 2001.

11. 이영찬, 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 抗 癌效果에 대한 연구, 원광대학교 대학원, 1993.
12. 박종욱, 巴豆加大黃의 抗腫瘍效果와 自然殺害細胞의 活性에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1995.
13. 왕홍실, 癌細胞의 增殖과 그 細胞크기 變動에 미치는 巴豆 및 大戟 抽出物의 영향, 고려대학교 대학원, 1982.
14. 김유겸, 巴豆추출액의 백서 신장기능에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1997.
15. 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호.
16. 최용태, 鍼灸學(上, 下), 集文堂, 서울, pp.1457-1467, 1993.
17. 강계성, 胡桃藥鍼의 급성·아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구, 상지대학교 대학원, 2002.
18. R. I. Geran, N. H. Greenberg, M. M. Macdinald, A. M. Schumacher, and B. J Abbot, Protocol for screening chemical Agent and Natural product against Animal Tumors and other Biological system(3rd Edition), Cancer chemotherapy Reports, pp.48-59, 1972.
19. Daniel, W. W, A foundation for analysis in the health sciences, New York, Willey 3rd edition, pp.136-146, 1983.
20. 金昌玟 外, 完譯 中藥大辭典, 圖書出版 鼎談, 서울, pp.4480-4481, 1997.
21. 김양강, 독성학, 동화기술, 서울. 1994. pp. 15-18.
22. 서울대학교 의과대학, 종양학, 서울대학교 출판부, 서울, pp.1-3, 137-143, 225-234, 1992.
23. 전국의과대학교수 역, Current Medical Diagnosis and Treatment, 도서출판 한우리, 서울, pp.69-107. 1999.
24. 崔昇勳, 東醫腫瘍學, 杏林書院, 서울, pp.13-42. 1995.
25. 楊維傑 編, 黃帝內經素問靈樞譯解, 成輔社, 서울, p.41, 45, 97, 168, 243, 407, 447, 469, 473, 577, pp.295-296, 1980.
26. 全炳旭 外, 癌腫의 病因病理에 관한 文獻的 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, Vol. 1. No. 1, pp.83-101, 1995.
27. 김세중, 면역학, 고려의학, 서울, pp.134-136, 1994.