

원저

## 靜脈注入用 山養山蔘 蒸溜藥鍼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

권기록·조아라·이선구

### The Study on Acute and Subacute Toxicity and Anti-cancer Effects of cultivated wild ginseng Herbal acupuncture

Ki-Rok, Kwon\* · A-La, Cho\* · Sun-Gu, Lee\*\*

\*Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

\*\*Department of Pathology, Oriental Medical College, Sangji University

**Objective :** The purpose of this study was to investigate acute and subacute toxicity and sarcoma-180 anti-cancer effects of herbal acupuncture with cultivated wild ginseng (distilled) in mice and rats.

**Method :** Balb/c mice were injected intravenous with cultivated wild ginseng herbal acupuncture for LD<sub>50</sub> and acute toxicity test. Sprague-Dawley rats were injected intravenous with cultivated wild ginseng herbal acupuncture for subacute toxicity test. The cultivated wild ginseng herbal-acupuncture was injected at the tail vein of mice.

**Results :**

1. In acute LD<sub>50</sub> toxicity test, there was no mortality thus unable to attain the value.
2. Examining the toxic response in the acute toxicity test, there was no sign of toxication.
3. In acute toxic test, running biochemical serum test couldn't yield any differences between the control and experiment groups.
4. In subacute toxicity test, there was no sign of toxication in the experimental groups and didn't show any changes in weight compared to the normal group.
5. In subacute toxicity test, biochemical serum test showed significant increase of Total albumin, Albumin, and Glucose in the experimental group I compared with the control group. Significant decrease of GOT, ALP, GPT, and Triglyceride were shown. In experiment group II, only Glucose showed significant increase compared with the control group.
6. Measuring survival rate for anti-cancer effects of Sarcoma-180 cancer cell line, all the experimental groups showed significant increase in survival rate.
7. Measuring NK cell activity rate, no significant difference was shown throughout the groups.
8. Measuring Interleukin-2 productivity rate, all the experimental groups didn't show significant difference.
9. For manifestation of cytokine mRNA, significant decrease of interleukin-10 was witnessed in the experimental group compared to the control group.

**Conclusion :** According to the results, we can conclude cultivated wild ginseng herbal acupuncture caused negligible toxicity, and had anti-tumor effects in mice.

**Key words :** cultivated wild ginseng, herbal acupuncture, intravenous herbal acupuncture, LD<sub>50</sub>, Acute toxicity, Subacute toxicity, Sarcoma-180 cancer cell, Natural killer cell activity, Interleukin-2 productivity, cytokine mRNA.

## I. 緒 論

山蔘은 五加皮科(두릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 人蔘(*panax ginseng* C. A. Mey.)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 일컬으며, 山養山蔘(樟腦蔘)은 山蔘의 씨앗이나 幼蔘을 인위적으로 산에서 재배한 蔘을 말한다<sup>1)</sup>.

예로부터 山蔘은 대표적인 補氣劑<sup>2,3)</sup>, 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 人蔘으로 표현되어 왔다. 최초의 기술은 B.C 50년대이고<sup>4)</sup>, 傷寒論에서 113개의 처방 중 21개의 처방에 人蔘을 사용한 것으로 보아 보편적으로 사용된 약재임을 알 수 있다<sup>5)</sup>.

性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등으로 표현되고 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年의 효능이 있다<sup>6)</sup>.

藥鍼療法은 鍼灸, 經絡이론과 本草이론에 의하여 각종의 한약재를 일정한 방법으로 제조하여 經穴이나 壓痛點에 주입하여 刺鍼과 약물작용을 통하여 疾病을 치료하는 新鍼療法이다<sup>7)</sup>. 藥鍼의 施術部位는 대부분 辨證에 의해 選定된 經穴이 治療에 사용되고 있으며, 국내에서 靜脈注入을 한방치료에 이용하는 경우나 연구보고는 없다. 그러나 중국에서는 다양한 靜脈注射劑가 개발되어 임상에 사용되는 실정이다<sup>8)</sup>.

현재까지 보고된 인삼의 효능은 신경을 조절하고 체액과 신진대사를 촉진하며<sup>9)</sup>, 강심, 항이뇨 및 성기능 증강효과가 있고<sup>10, 11, 12)</sup>, stress에 대한 저항력을 높이며 소화흡수 및 면역항체 생산을 촉진시키는 등 많은 연구결과가 있다<sup>13, 14)</sup>.

人蔘藥鍼과 관련된 연구로는 李 등<sup>15)</sup>이 中脘에 人蔘藥鍼을 주입하였을 때 체중증가와 소화효소분비에 관여한다고 보고하였고, 金 등<sup>16)</sup>은 水蔘, 白蔘, 紅蔘藥鍼을 三陰交에 주입하였을 때 유의한 혈당저하효과가 있음을 보고하였으며, 南은<sup>17)</sup> 紅蔘藥鍼의 독성 실험에서 아무런 독성이 나타나지 않는다고 보고하였다.

이에 저자는 山養山蔘을 蒸溜式으로 추출하여, 멸균정제과정을 거친 후, 檢液의 용량에 따른 독성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제 98-116호(18)에 준하여 급성 및 아급성 독성을 평가하였고, 또한 면역반응에 대한 연구로 생쥐의 복강내에 Sarcoma-180 복강암 세포를 이식하여 산양산삼 증류약침(이하 산삼약침)을

농도별로 주입한 후, 생존율, NK cell 활성화도 및 Interleukin-2, Cytokine mRNA의 발현을 측정하여 면역작용에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의한 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 동물 및 재료

#### (1) 동물

급성독성실험과 항암능 측정을 위하여 4주령된 체중 20±3g 내외의 Balb/c계 음성 mouse를 사용하였고, 아급성 독성실험을 위하여 4주령의 체중 200±30g 내외의 Sprague-Dawley계 음성 rat를 사용하였다. 모든 동물은 대한실험동물센터에서 구입하여 2주 동안 고품사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 정상군, 대조군, 실험군 모두 각 10마리씩으로 실험하였다.

### 2 재 료

#### (1) 산삼약침의 조제<sup>8)</sup>

실험에 사용한 산양산삼(이하 산삼)은 산삼의 종자를 적절한 환경에서 재배한 것으로 數齡은 15-20년으로 추정되며, 무게는 17-26g, 길이는 20-30cm된 것을 사용하였다.(Fig. 1-3) 먼저 산삼을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후 증류수와 배합하여 2시간 가량 전탕한 후 찌꺼기는 따로 분리하고, 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 전탕하여 약침액을 얻었다. 얻어진 약침액을 0.45 μm, 0.2 μm 여과지로 2회 여과한 후, 멸균된 용기에 일정 용량 주입하였고, 밀봉하여 멸균기에 다시 멸균과정을 거친 후 시료를 준비하였다.(Fig. 4)

#### (2) 약침기

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

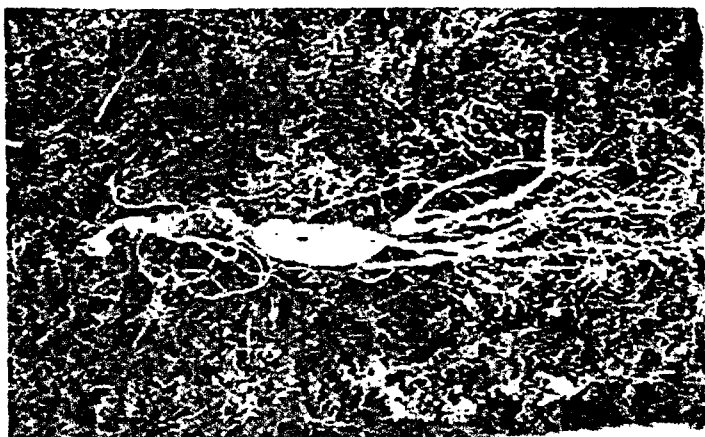


Fig. 1. The shape of cultivated wild ginseng.



Fig. 2. The Size of cultivated wild ginseng.

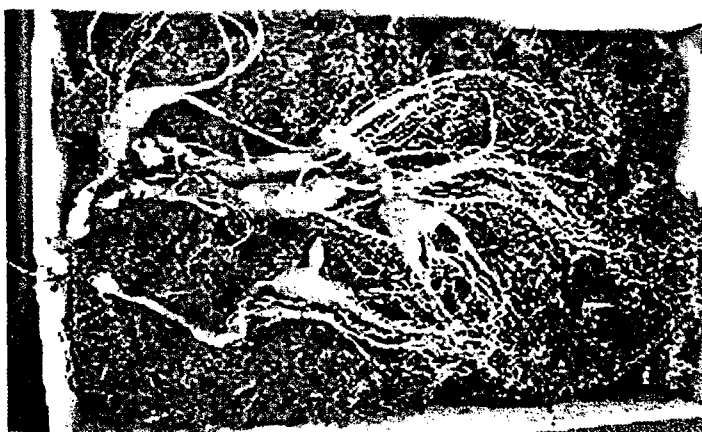


Fig. 3. Various shape of cultivated wild ginseng.

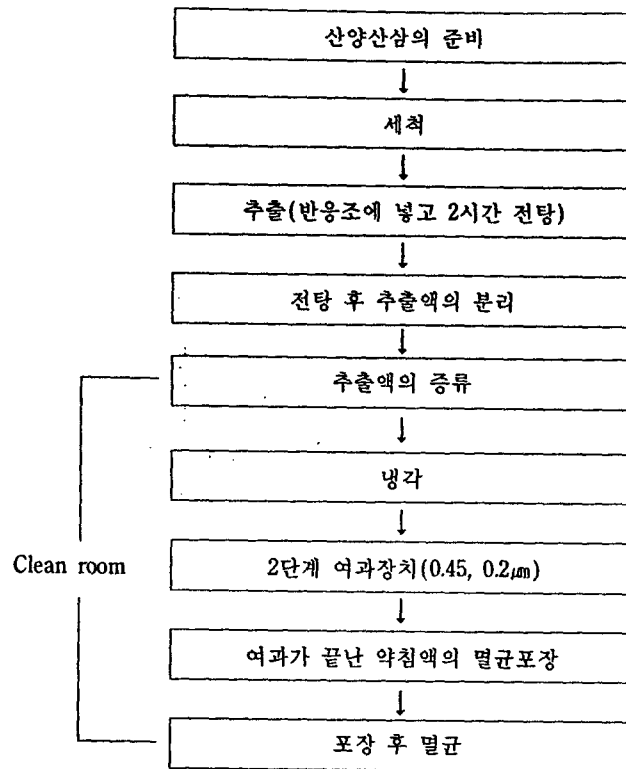


Fig. 4. Manufacturing process of cultivated wild ginseng Herbal acupuncture.

## 2. 방법

### (1) 약침의 시술

#### 1) 급성 독성실험

① LD<sub>50</sub> 측정실험을 위해 실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 Balb/c계 mouse의 미정맥에 산삼약침을 1회/week 주입한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였다.

② 산삼약침의 독성반응 유무를 관찰하기 위해 실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 산삼약침 주입군(실험군 I, 실험군 II)으로 나누어 Balb/c계 mouse의 미정맥에 1회 주입한 후 1주일간 독성반응 상태를 관찰하였고, 대조군은 0.1cc의 생리식염수를 주입한 후, 1주일 동안 경과를 비교 관찰하였다.

#### 2) 아급성 독성실험

실험군을 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어(실험군 I, 실험군 II) Sprague-Dawley rat의 미정맥에 1주일에 2회씩 총 8회 약침 시술을 하였고, 대조군의 경우 0.2cc의 생리식염수를 동일한 방법으로 시행하였다.

#### 3) Sarcoma-180 항암효과 실험

실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 산삼약침 주입군으로 나누어(실험군 I, 실험군 II) Balb/c계 mouse의 미정맥에 Sarcoma-180 복강암 세포를 Balb/c mouse의 복강 내에 이식한 후 2일 뒤부터 매주 2회씩 총 8회 주입하였고, 대조군의 경우 동일한 방법으로 0.1cc의 생리식염수를 주입하였다.

## 2. 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.) 4ml, penicillin G(100,000 units/ml) 1ml, streptomycine(100mg/ml, Sigma, U.S.A.) 1ml을 증류수에 넣고 1,000ml로 조정한 후 pH를 7.2로 맞추고 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/c계 생쥐에 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(존샘, 한국)안에서 배양시킨 후 세포수가 지수증식기에 접어들었을 때 수거하여 실험에 사용하였다.

(3) 암세포 유발

생존을 측정의 경우 지수증식기에 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 산삼약침군의 생쥐의 복강에 0.2ml씩 주입하여 30일 동안 복강암의 유발 유무와 생존여부를 관찰하였다.

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

3. 측정항목

(1) 급성 독성

1) LD<sub>50</sub> 측정

산삼약침을 0.1cc로 주입한 실험군 I, 0.2cc로 주입한 실험군 II로 나누어 Balb/c mouse에 각각 주입한 후, 7일 동안 관찰하면서 사망하는 개체수를 측정하였다.

2) 임상관찰 및 체중측정

산삼약침을 Balb/c mouse에 0.1cc를 주입한 실험군 I 과 0.2cc를 주입한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.1cc를 투여한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 약침 주입 후부터 실험 종료일까지 1일 1회 mouse의 호흡,

운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타 독성반응 등의 상태를 관찰하였다.

체중은 실험 첫째 날과 7일째에 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다.

3) 생화학 혈청검사

실험 종료일에 럼폰(Rompun, BAYER) : 케타민(Ketamine, 유한양행) = 2:3의 비율로 혼합 후, 0.01ml씩 근육 주사하여 마취한 뒤, mouse의 심장을 통하여 1cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 vacutainer tube (vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣어, 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분간 원심분리한 뒤, 혈청을 분리하여 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase, A/G ratio, BUN/CR ratio를 측정하였다.

(2) 아급성 독성

1) 임상관찰 및 체중측정

Sprague-Dawley rat에 산삼약침 0.1cc를 주입한 실험군 I, 0.2cc를 주입한 실험군 II로 나누었고, 생리식염수 0.2cc를 주입한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 약침 주입 후부터 실험 종료일까지 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타 독성반응 등의 상태를 총 4주간 관찰하였다. 체중은 1주일에 1회씩 저울을 이용하여 4주간 측정하였다.

2) 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.

3) 채혈

실험 종료일에 럼폰(Rompun, BAYER): 케타민(Ketamine, 유한양행) = 2:3의 비율로 혼합 후, 0.01ml씩 근육 주사하여 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000 rpm으로 5분 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

4) 생화학 혈청검사

vacutainer tube에 보존한 혈청을 이용하여 Biochemical Analysor (TBA-20R, Toshiba, Japan)를 이용하여 Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, GOT, GPT, Alkaline phosphatase, A/G ratio, BUN/CR ratio를 측정하였다.

(3) Sarcoma-180에 대한 항암효과

1) 생존율 측정

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

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

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

- 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°C 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× HBSS(Gibco, U.S.A.)로 2회 세척하고 기본배지로 한 번 더 세척한 다음 혼합배지에 비장세포를 재부유하였다.

3) NK cell 활성도 측정

가. 작동세포의 준비

각 군에서 생쥐를 치사시켜 실험방법에 의해 준비한 비장세포를 작동세포로 사용하였다.

나. 표적세포의 준비

NK 세포의 살해능 측정시의 표적세포는 한국세포주 은행에서 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 cytotox96<sup>TM</sup> 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 대조 well 1은 최적수의 표적세포 100μl와 배지 100μl로 구성하였고, 표적세포의 LDH 최대방출량을 나타내는 대조 well 2는 최적수의 표적세포 100μl와 배지 100μl로 구성하였고, 작동세포의 LDH 자연방출량을 나타내는 대조 well 3은 최적수의 작동세포 100μl와 배지 100μl로 구성하였고, 부피를 보정하기 위한 대조 well 4는 용해용액을 첨가하여 발생하는 부피의 변화에 의한 오차를 보정하기 위한 것으로 배지 200μl와 용해용액(10×) 20μl로 구성하였으며 배지의 background로서 배지내 혈청이나 phenol red에 기인한 LDH의 활성능을 보정하기 위한 대조 well 5는 배지 200μl로 구성하였다.

③ 측정방법

NK-활성도의 세포독성능 측정은 YAC-1세포를 표적 세포로 이용하여 FBS가 첨가된 혼합배지에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 재부유하고, 96well microtitration

plate에 well당 100 $\mu$ 씩 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>5</sup>cells/ml의 농도로 조정된 비장세포를 well에 100 $\mu$ 를 분주하여 최종부피가 200 $\mu$ /well이 되도록 한 후 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 45분 전에 대조 well 2에 100 $\mu$ 당 10 $\mu$ 의 용해용액(10 $\times$ )을 첨가하고 배양 종료시 250 $\times$ g로 4분간 원심분리한 후 새로운 96 well plate에 상층액을 50 $\mu$  옮긴 후, assay buffer 12ml을 substrate mix에 넣어 재조합 기질을 만든 후 각 well에 50 $\mu$ 씩 넣고 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 $\mu$ 의 정지용액을 각 well에 넣고 주사기로 거품을 제거한 후, 1시간 이내에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 실험값, 표적세포 LDH 자연방출량, 표적세포 LDH 최대방출량, 작동세포 LDH 자연방출량에서 배지의 background값을 뺐고, 표적세포 LDH 최대방출량에서 부피보정값을 뺐다.

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 생쥐에 주입하고 21일째에 생쥐를 치사하여 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.

Mouse의 IL-2 생산량 측정은 Quantikine M ELISA Kit(R&D system, U.S.A.)를 이용하였다. 이 ELISA Kit는 sandwich enzyme immunoassay technique를 이용하는 것으로, microplate에 pre-coated된 정제된 polyclonal antibody에 시료를 처리하여 결합시킨 후 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 Standard sample의 표준곡선으

로부터 시료의 IL-2양을 계산하는 방법으로 모든 과정은 제조회사의 지침을 따랐다. 96 well microtiter plate의 각 well에 50 $\mu$ 의 Assay Diluent를 넣고, 다시 Standard, Control, 시료를 각 well에 50 $\mu$ 씩 분주하고 1분 정도 tapping하고 plate cover로 덮은 후 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100 $\mu$ 의 Conjugate를 넣고, plate cover로 덮은 뒤 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100 $\mu$ 의 Substrate Solution을 넣고 실온에서 30분 동안 빛을 차단하며 반응하였다. 반응 종료 후에 100 $\mu$ 의 Stop solution을 넣고 반응을 중지하였다. 그 후 ELISA reader(Emax, USA)로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) Cytokine mRNA의 발현

##### ① Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 마우스의 비장으로부터 total RNA를 추출하였다.

비장 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응하였다. Chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 후, 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리하였다. Phenol/Chloroform (5:1)(Sigma, USA)을 동부피로 처리하여 원심분리 후 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 동부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한 후 다시 원심분리 하였다. Pellet을 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 washing하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 dry시킨 후 RNase-free water에서 dissolving시켜 얻어진 total RNA를 UV spectrophotometer (260/280nm)로 정량하였다.

##### ② Reverse transcription-polymerase chain reaction

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2 $\mu$ g를 가지고  $\beta$  actin, IFN- $\gamma$ 와 IL-2에 대해서는 oligo-(dT)15 primer (Promega, USA) 1 $\mu$ 를 사용하고, IL-4, IL-10에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1 $\mu$ M를 사용하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 preincubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, reaction buffer (10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25 $^{\circ}$ C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA) 1U/ $\lambda$ , AMV

reverse transcriptase (Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시키고, 95°C에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 inactivation 시켰다. 여기서 얻은 cDNA를 2μ씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20°C에 보관하였다. Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2μ를 dNTP mixture 200μM, gene specific primer 300nM, MgCl2 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25°C], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 상기와 같은 조건으로 PCR을 하였다. RT-PCR product를 2% agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

이때 사용한 싸이토카인과 β-actin의 specific primer는 다음과 같다.(Table 1.)

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS(Release 10.0.7)

를 이용하였으며, student's T-test를 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 結 果

1. 급성 독성

(1) LD50 측정

LD50을 측정하기 위하여 실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누어 Balb/c mouse의 미정맥으로 산삼약 침을 1회 주입한 후 1주일간 사망유무를 관찰하였으나, 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD50은 산출할 수 없었다.(Table 2.)

Table 1. Specific primers for cytokines and β-actin

Name (Product size)		primer
β-actin (349 bp)	sense	5' -TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	anti-sense	5' -TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
IL-2 (168 bp)	sense	5' -TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG-3'
	anti-sense	5' -GAGTCAAATCCAGAACATGCCGCAG-3'
IL-4 (132 bp)	sense	5' -ACGCCATGCACGGAGATGGAT-3'
	anti-sense	5' -CAAGCATGGAGTTTTCC-3'
IL-10 (421 bp)	sense	5' -AGACTTTCTTTCAAACAAAGGACCAGCTGGA-3'
	anti-sense	5' -CCTGGAGTCCAGCAGACTCAATACACACTGC-3'
IFN-γ (247 bp)	sense	5' -AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	anti-sense	5' -GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

Table 2. Mortality of mice treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture by intravenous injection.

Group	Hours after treatment								Final Mortality
	1	12	24	48	72	96	120	168	
Normal (10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Control (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Sample I (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Sample II (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

\* : Number of Animal

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)



2. 임상관찰

급성 독성실험에서 산삼약침을 mouse의 미정맥에 각각 0.1cc, 0.2cc 주입한 후, 7일간 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들은 관찰되지 않았다.(Table 3, 4.)

3. 체중측정

급성 독성실험에서 산삼약침을 0.1cc, 0.2cc를 주입한

실험군들과 생리식염수 0.1cc를 주입한 대조군의 체중 변화는 정상군에 비해 실험군 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 5.)

4. 생화학 혈청검사

급성 독성실험의 생화학 혈청검사를 시행한 결과 BUN과 GOT, 그리고 Glucose는 실험군 모두에서 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 대조군과는

Table 3. Clinical findings in mice treated with cultivated wild ginseng Herbal-acupuncture 0.1cc in acute toxicity test.

Clinical observation		Hours after treatment							
		1	12	24	48	72	96	120	168
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 4. Clinical findings in mice treated with cultivated wild ginseng Herbal-acupuncture 0.2cc in acute toxicity test.

Clinical observation		Hours after treatment							
		1	12	24	48	72	96	120	168
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

유의한 차이를 나타내지 않았다. Total cholesterol은 실험군 I에서 정상군과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나 실험군 II에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 6.)

2 아급성 독성

(1) 임상 관찰

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험에서, 산삼약침을 주입하고 28일간 관찰한 결과 주요 중독증상들은 관찰되지 않았다.(Table 7, 8.)

Table 5. Body weight of mice treated with cultivated wild ginseng Herbal-acupuncture in acute toxicity test.(unit : g)

Group	day1	day7
Normal	30.00±0.91	33.40±1.31
Control	29.78±1.01	33.06±0.91
Sample I	27.86±1.52	31.60±2.08
Sample II	27.24±1.08	31.43±1.71

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

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

Table 6. Serum biochemical values of treated intravenous injection with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture in acute toxicity test.

Group	Normal	Control	Sample I	Sample II
BUN(mg/dl)	31.24±3.36	25.39±2.98 <sup>a</sup>	26.65±3.97 <sup>a</sup>	25.43±3.65 <sup>a</sup>
CRTN(mg/dl)	0.44±0.05	0.41±0.10	0.43±0.05	0.48±0.05
TP(mg/dl)	4.41±0.39	4.61±0.36	4.69±0.42	4.48±0.23
ALB(mg/dl)	2.69±0.22	2.76±0.20	2.85±0.17	2.76±0.13
ALP(U/L)	330.00±90.97	311.80±56.99	286.50±49.44	315.88±73.18
GOT(U/L)	104.00±33.96	70.80±18.26 <sup>a</sup>	66.00±21.47 <sup>a</sup>	68.25±24.69 <sup>a</sup>
GPT(U/L)	44.57±30.08	29.30±16.93	26.00±4.21	32.88±31.85
T-CHO(mg/dl)	116.29±28.06	104.40±9.24	123.50±24.84 <sup>b</sup>	110.75±10.55
TG(mg/dl)	183.43±69.20	175.10±31.75	177.25±32.88	135.63±17.65
GLU(mg/dl)	447.14±168.40	281.60±91.57 <sup>a</sup>	222.13±37.96 <sup>a</sup>	304.88±46.08 <sup>a</sup>

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

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

(2) 체중변화

아급성 독성실험에서 각 군의 체중 변화는 전 구간에 서 정상군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. (Table 9.)

Table 7. Clinical findings rats treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture 0.1cc in subacute toxicity test.

Clinical observation		Days after treatment								
		1	4	7	11	14	18	21	25	28
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 8. Clinical findings rats treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture 0.2cc in subacute toxicity test.

Clinical observation		Days after treatment								
		1	4	7	11	14	18	21	25	28
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

Table 9. Body weight of rats treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

Group	day7	day14	day21	day28
Normal	223.81 ± 9.17	258.01 ± 10.27	280.04 ± 37.97	327.09 ± 13.10
Control	216.23 ± 12.38	255.66 ± 7.60	275.84 ± 31.03	313.32 ± 12.18
Sample- I	215.11 ± 8.02	261.22 ± 9.16	296.09 ± 11.37	315.72 ± 26.48
Sample- II	223.86 ± 10.52	261.75 ± 11.75	292.65 ± 9.86	315.51 ± 13.35

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

(3) 장기의 무게 측정

아급성 독성실험 종료 후 회복하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과 실험군 모두 정상군이나 대조군에 비하여 간, 심장, 비장, 폐, 그리고 신장의 무게에 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 10.)

(4) 생화학 혈청검사

아급성 독성실험의 생화학 혈청검사를 측정한 결과

실험군 I에서 BUN은 정상군과 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었고, Total protein, Albumin, Glucose는 대조군에 비하여 유의한 증가를, GOT는 대조군에 비하여 유의한 감소를, ALP와 GPT, 그리고 Triglyceride는 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.

실험군 II에서 Total protein은 정상군에 비해 유의한 감소를, GPT는 유의한 증가를 나타내었으나 대조군에 비해서는 유의한 차이를 나타내지 않았고, Glucose는 정상군에 비해서는 유의한 감소를, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.(Table 11.)

Table 10. Absolute and relative organ weights in rats treated intravenous with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

Group	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney
Normal	4.02±0.19	0.36±0.03	0.23±0.03	0.46±0.10	0.71±0.03
Control	3.89±0.38	0.36±0.02	0.23±0.02	0.43±0.03	0.70±0.07
Sample- I	3.88±0.40	0.34±0.02	0.25±0.03	0.51±0.13	0.71±0.07
Sample- II	4.17±0.37	0.35±0.03	0.25±0.03	0.53±0.19	0.72±0.04

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

Table 11. Serum biochemical values of treated intravenous with wild ginseng Herbal acupuncture in subacute toxicity test.

CBC	Group			
	Normal	Control	Sample I	Sample II
BUN (mg/B£)	23.68±2.44	21.22±2.42*	26.22±1.50 <sup>ab</sup>	22.34±4.20
CRTN(mg/B£)	0.61±0.03	0.59±0.03	0.60±0.00	0.60±0.00
TP(mg/B£)	5.72±0.14	5.43±0.16*	5.82±0.19b	5.47±0.32*
ALB(mg/B£)	3.77±0.13	3.60±0.09*	3.87±0.09b	3.62±0.20
ALP(U/L)	612.10±64.76	659.80±104.37	397.10±45.70 <sup>ab</sup>	655.70±109.91
GOT(U/L)	105.10±11.99	126.10±14.90*	104.80±16.40*	114.40±10.28
GPT(U/L)	36.70±4.62	44.40±3.92*	31.60±4.79 <sup>ab</sup>	42.40±4.81*
T-CHO(mg/B£)	91.40±9.41	91.40±10.67	96.30±8.21	93.00±8.34
TG(mg/B£)	73.20±27.08	67.50±13.15	36.90±12.84 <sup>a</sup>	80.30±21.03
GLU(mg/B£)	242.40±35.19	174.30±22.96*	227.40±27.34*	207.80±31.83 <sup>ab</sup>

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

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

### 3. Sarcoma-180에 대한 항암효과 실험

#### (1) 생존율 측정

Median survival time은 대조군은 13일, 실험군 I과 실험군 II는 모두 28일을 나타내어 실험군이 대조군에 비하여 115%의 생존증가율을 나타내었다.(Fig. 5)

#### (2) 활동성 관찰

Sarcoma-180 유발 후 매일 mouse의 활동성을 관찰 비

교한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 현저한 활동성의 저하와 외부환경에 대한 노출 거부, 기면상태를 나타내었다.(Fig. 6) 또한, 외형적으로는 털이 많이 빠지면서 부분적으로 갈기가 서 있는 모습이 관찰되었고, 항문이 노출되면서 항문주위의 털이 갈색으로 염색된 듯한 양상을 나타내었다.(Fig. 7) 이에 비하여 실험군은 복부에 팽윤된 종양이 있음에도 불구하고 정상군과 차이를 발견할 수 없을 만큼 활발한 운동성과 윤기 있는 털의 상태를 나타내어 대조군과 현저한 차이를 나타내었다.(Fig. 8, 9)

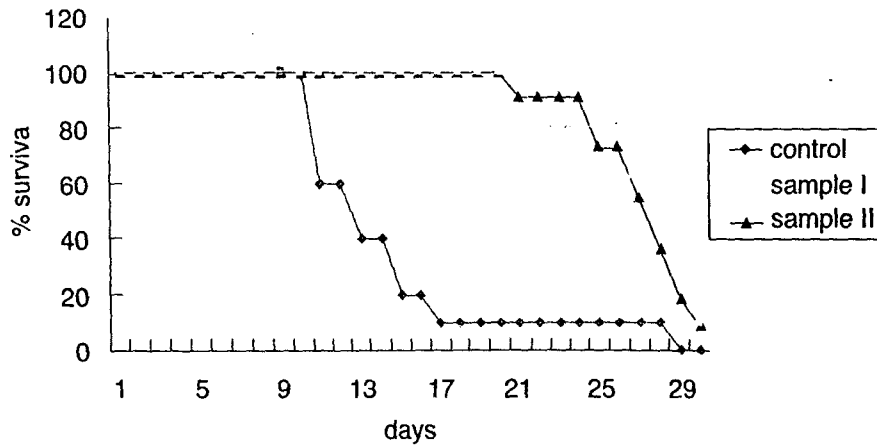


Fig.5. Median survival time of mice treated with wild ginseng Herbal acupuncture in vivo.

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)



Fig. 6, 7. General condition of control group. 14th day of experiment, significantly reduced movement and sustains lethargic status. Erect hair, exposed anus and brownish color around the anus.

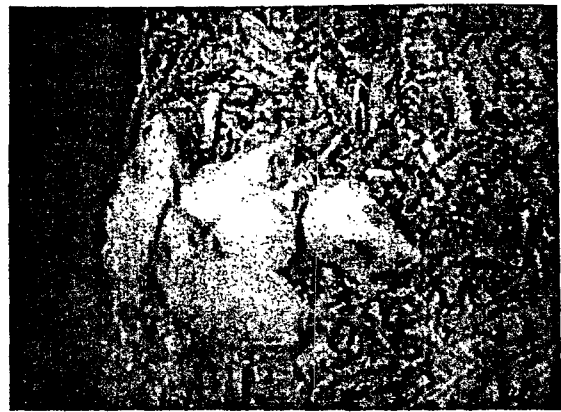


Fig. 8, 9. Condition of experiment group. 14th day of experiment, vibrant movement and healthy, lustrous hair. No swelling of anus nor changes in color as shown in the control group.

(3) NK cell 활성도 측정

NK 세포의 활성도는 세포독성능으로 표지를 삼았다. 검정결과 정상군은 100:1일 때  $4.28 \pm 2.53$ , 50:1일 때  $7.86 \pm 2.44$ , 10:1일 때  $5.85 \pm 2.06$ 를 나타내었다. 대조군의 경우 100:1일 때  $7.37 \pm 3.65$ , 50:1일 때  $6.26 \pm 1.80$ , 10:1

일 때  $6.10 \pm 1.30$ 을 나타내었다. 실험군 I의 경우 100:1일 때  $6.60 \pm 3.88$ , 50:1일 때  $7.20 \pm 2.82$ , 10:1일 때  $5.30 \pm 2.57$ 을 나타내었다. 실험군 II의 경우 100:1일 때  $3.53 \pm 2.93$ , 50:1일 때  $6.73 \pm 1.85$ , 10:1일 때  $5.19 \pm 2.00$ 을 나타내어 대조군과 실험군 모두 정상군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 12, Fig. 10)

Table 12. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture according to E/T ratio.

Group	E/T ratio	% Cytotoxicity
Normal	100:1	$4.28 \pm 2.53$
	50:1	$7.86 \pm 2.44$
	10:1	$5.85 \pm 2.06$
Control	100:1	$7.37 \pm 3.65$
	50:1	$6.26 \pm 1.80$
	10:1	$6.10 \pm 1.30$
Sample- I	100:1	$6.60 \pm 3.88$
	50:1	$7.20 \pm 2.82$
	10:1	$5.30 \pm 2.57$
Sample- II	100:1	$3.53 \pm 2.93$
	50:1	$6.73 \pm 1.85$
	10:1	$5.19 \pm 2.00$

Normal : non-treated group  
 Control : treated with normal saline (0.1cc)  
 Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)  
 Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

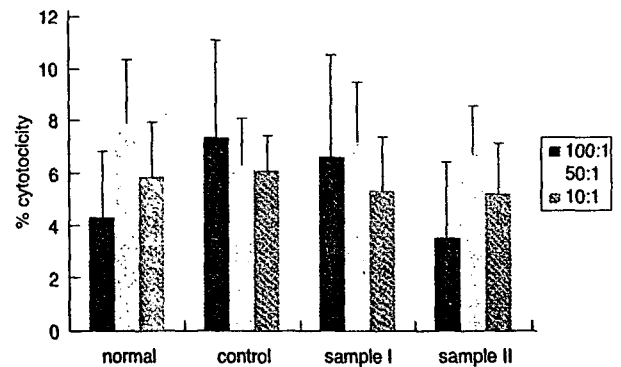


Fig. 10. Natural Killer cell Activity of the sarcoma-180 cell bearing Mice treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture according to E/T ratio.

Normal : non-treated group  
 Control : treated with normal saline (0.1cc)  
 Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)  
 Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

(4) Interleukin-2 양 측정

Interleukin-2의 생산능은 검액 투여 후 15일 후에 대조군 및 실험군의 mouse로부터 수거한 비장세포를 Concanavalin-A로 자극한 후 24시간 배양하여 측정된 결과 정상군은 7799.75±713.13pg/ml, 대조군은 5284.25±328.44pg/ml, 실험군 I은 5096.75±168.97pg/ml, 실험군 II는 6334.25±962.55pg/ml를 나타내어 대조군과 실험군 I은 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 실험군 II는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 실험군 I, II는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 13, Fig. 11)

(5) Cytokine의 mRNA 발현

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 투여한 후 산삼약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, Sarcoma-180만을 투여한 대조군, Sarcoma-180을 미정맥에 주입한 후 0.1cc 주입한 실험군 I, 0.2cc 주입한 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다.

Internal control로 사용한 β-actin과 각각의 cytokine을

비교하였을 때, interferon-γ는 실험군 I에서 약간 감소하는 경향을 보였으나, 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다. 또한 interleukin-2의 경우 전체적으로 mRNA 발현이 미약하였다. 반면 interleukin-10에서는 정상군에 비해 대조군에서 발현이 향상되었음을 보였으며, 실험군 I의 경우 control에 비해 normal과 비슷한 정도로 발현이 저하되었으며, 실험군 II의 경우 normal 보다는 발현이 향상되었으나 control보다는 다소 저하된 발현양상을 보였음을 확인하였다.(Fig. 12)

IV. 考 察

人蔘은 五加皮科에 속한 蔘의 根으로 性은 微寒, 微溫, 溫하고, 味는 甘, 苦하며, 大補元氣, 固脫生津, 安精神, 除邪氣, 등의 效果가 있고 勞傷虛損, 食少倦怠 等に 광범위하게 사용되는 滋補強壯 興奮劑이다.<sup>3,3)</sup>

인삼에 대한 과학적 연구는 1854년 Garriques가 saponin을 분리해 내면서 비롯되었고<sup>12)</sup>, 1957년에는 소련의 Brekhman이 인삼의 adaptogen 활성과 관련지어 인삼 saponin을 유효성분으로 강조한 이래<sup>13)</sup> saponin에 대한 연구가 활발하였으며<sup>20)</sup>, 이 후 이와 관련된 많은 연

Table 13. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture.

Group	Interleukin-2(pg/ml)
Normal	7799.75 ± 713.13
Control	5284.25 ± 328.44*
Sample- I	5096.75 ± 168.97*
Sample- II	6334.25 ± 962.55

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

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

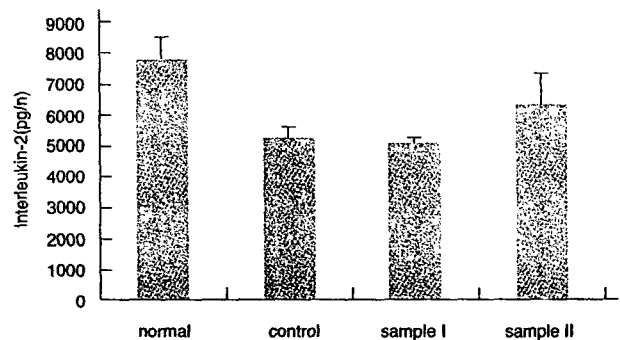


Fig. 11. Interleukin-2 Productivity of the Sarcoma-180 Cell Bearing Mice Treated with wild ginseng Herbal acupuncture.

Normal : non-treated group

Control : treated with normal saline (0.1cc)

Sample I : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)

Sample II : treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

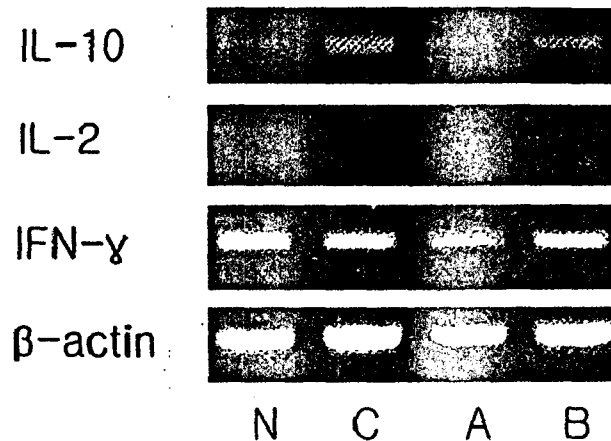


Fig. 12. Expression of cytokine mRNA extracted from spleen by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. After a mouse was inoculated with Sarcoma-180, it was treated with cultivated wild ginseng Herbal acupuncture in variable content.

- N : normal
- C : control (only infected)
- A : treatment of cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.1cc)
- B : treatment of cultivated wild ginseng Herbal acupuncture (0.2cc)

구가 행해지고 있다<sup>8, 9, 14, 21</sup>.

인삼에 대한 효능을 평가한 보고들을 살펴보면 神經調節作用과 體液 및 新陳代謝促進, 強心, 抗利尿, 性機能增強作用, stress 에 대한 抵抗力의 增加, 消化吸收 및 免疫抗體 生産의 增加, 癌治療의 補助的인 作用 등 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13, 14</sup>.

人蔘에 대한 최초의 문헌적 기록은 BC 50년대에 해당하는 중국 前漢의 元帝 시대 때 쓰여진 史遊의《急就章》이며, 이후 前漢末 《春秋緯》와 《禮緯》에 蔘에 관한 기록이 있다<sup>6</sup>.

우리나라의 경우에는 이미 그보다 이전인 BC 57년대 삼국시대 때 민간에서 인삼이 약용으로 이용되면서 널리 알려지기 시작하였고, 『三國史記』와 陶弘景의 《名醫別錄》에 따르면 百濟 武寧王 12년이 되는 513년 12월에 梁나라의 武帝에게 人蔘이 조공으로 보내졌다는 내용이 있다.

처방에 관한 기록으로는 AD 196~220년대 《傷寒論》에서 처음으로 나오며<sup>7</sup>, 113개의 처방 중 21개의 처방에 人蔘이 포함되어 있고, 이후 AD 483~496년대 중국 梁나라 陶弘景의 《神農本草經》에 人蔘에 대한 구체적인 내용이 소개되고 있다. 그 이후에 많은 서적에서 蔘에 관한 내용이 있긴 하나, 거의 모든 책에 山蔘이란 표현 대신 생김새가 사람과 닮았다는 의미에서의 人蔘

이란 표현을 쓰고 있다. 따라서 인삼의 재배가 국가적 차원에서 보급, 장려된 14C 이전의 인삼은 산삼을 지칭하고 있음을 알 수 있다. 14C 이전에 저술된 神農本草經이나<sup>22</sup> 重修政和經史證類備急本草<sup>23</sup>, 湯液本草<sup>24</sup> 등이나 14C 이후에 저술된 本草集要<sup>25</sup>, 本草綱目<sup>26</sup>, 本草備要<sup>27</sup> 등에서 표현하고 있는 인삼의 성미나 효능이 거의 神農本草經을 따르고 있는 것은 인위적으로 밭에서 재배된 인삼과 산에서 자연발아하여 성장한 산삼의 효능이 같을 것이라는 추정에서 이루어졌거나 혹은 효능의 유사성 때문으로 생각된다.

형태적으로 산삼은 인삼에 비해 뇌두가 작고, 몸통은 인삼보다 가늘며 黃蘗(몸체에 수평으로 형성된 흠결)가 형성되어 있고, 잔뿌리도 인삼에 비해 짙고 맛이 달면서도 쓴맛이 강하다<sup>13</sup>.

이러한 차이에도 불구하고 인삼에 비해 산삼의 연구가 거의 전무한 이유는 아마도 구하기가 힘들고 비싼 가격 등으로 인한 여러 가지 문제점 때문으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 먼저 산삼의 씨를 산에 뿌린 후 인위적으로 재배한 수령 15-20년의 산양산삼을 증류 추출 방법으로 약침을 조제한 후 정맥 주입용 약침제로 만들어 본 연구를 시도하였다.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의거하여 한약재를 선택하여 有關한 穴位, 壓痛點 및 陽性反應點에 注入하



여 刺針과 藥物作用을 통하여 生體의 機能을 調整하고 病理狀態를 개선시켜 질병을 치료하는 新鍼療法<sup>9)</sup>이다.

人蔘藥鍼의 기존 研究報告로는 人蔘藥鍼의 製劑別 및 種類別 研究와 鎮痛<sup>20)</sup>, 免疫<sup>28, 30)</sup>, 糖尿<sup>16, 31)</sup>, 血壓降下<sup>22)</sup>, 甲狀腺 障礙<sup>23)</sup>, 抗 Allergy<sup>25)</sup>, 肝 및 胃機能 回復과 血栓 등<sup>15, 30)</sup>에 有意한 效果가 있음이 報告되었고, 製法別 有效成分 分析<sup>32)</sup>이나 毒性, 安全性<sup>17)</sup> 등이 報告되었으나 山蔘이나 山養山蔘에 대해서는 報告된 바가 없다.

또한 中國에서는 藥鍼施術 方法으로 정맥주입법을 사용하는 경우가 빈번하고 개발된 약침제제도 많지만<sup>9)</sup> 국내에서는 아직 시도된 바가 없다. 정맥주입법은 혈관에 직접 이물질이 주입되는 방법이므로 감염의 우려가 매우 크고 엄격한 독성 검사와 철저한 멸균과정이 보장되어야 하는 등의 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 여러 가지 조건을 충족시키기 위해 수증기증류냉각식(이하 증류추출식) 약침조제 방법을 사용하여 충분한 멸균과정을 거친 후 독성과 항암실험에 임하였다.

증류추출식 약침조제법은 약재를 깨끗이 세척하여 煎湯한 후 이를 특수 제작된 조제세트에 넣고 다시 煎湯하면서 수증기를 모으는 방법으로 八綱藥鍼 抽出法이라고도 한다. 이 방법은 韓藥에 존재하는 氣味 중 氣만을 모아서 사용하는 방법으로 매우 한의학적이며 또한 機能性疾患에 유효하다고 평가된 치료법이다<sup>6)</sup>.

정맥주입법은 서양의학에서 개발된 치료방법이지만 장기적으로는 한의학에서도 이에 대한 연구가 시행되어야 한다고 사려된다.

《素問·靈蘭秘典論》에서는 “心者, 君主之官, 神明出焉”이라 하였고<sup>33)</sup>, 《靈樞·邪客篇》에서는 “心者, 五臟六腑之大主, 精神之所舍也.”라 하여<sup>34)</sup> 心과 정신적 활동이 긴밀함을 설명하고 있다. 또한 《素問·六節藏象論》에서는 “心者, 生之本, 神之變, 其華在面, 其充在血脈...”이라 하였고<sup>35)</sup>, 《素問·脈要精微論》에서는 “脈者, 血之府也.”라 하여 君主之官인 心과 血脈은 五臟과 五體의 밀접한 상관성을 형성하고 있음을 알 수 있다. 따라서 精神疾患이나 心臟病, 顔面의 蒼白을 나타내는 貧血 등 血液과 관련된 질환에는 血脈이 중요한 연관성을 지니고 있음을 알 수 있다.

또한 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年, 大補肺中元氣의 효능<sup>36)</sup>을 지니고 있는 산삼의 기운을 증류추출식으로 조제한 후 정맥주입하는 것은 한의학적 이론에도 부합된다고 판단하

여 독성 실험과 항암 실험을 시도하였다.

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다<sup>37)</sup>. 독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로, 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아 급성 독성실험(1개월 반복투여 독성시험), 그리고 만성 독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나누는데, 본 실험에서는 급성 독성실험과 아급성 독성실험을 ‘의약품 독성시험 기준’ 등에 의거하여 시행하였다.

급성 독성실험에서는 LD<sub>50</sub>(반수치사량 측정)과 최대 내용량 측정을 위해 실험군을 각각 0.1cc, 0.2cc 주입군으로 나누었으며, 대조군은 생리식염수 0.1cc를 주입하였다. 이들 각각을 mouse의 미정맥에 주입한 후 초기 6시간동안에는 매시간 관찰하고, 그후 1주일간은 1일 1회 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근 긴장 및 기타증상들을 관찰하였다. 체중은 약침 주입 직전과 1주일 후에 측정하였고, 관찰기간 종료 후 마취하여 치사시킨 후 내부장기를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 그 결과 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD<sub>50</sub>의 측정이 불가능하였으며, (Table 2.) 기타 관찰에서도 급성 독성에 대한 중독 증상은 나타나지 않았다. (Table 3, 4.) 체중의 변화는 대조군과 실험군 모두 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 5.) 생화학 혈청검사를 시행한 결과, Total cholesterol에서만 실험군 I에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. (Table 6.) 이상과 같이 급성 독성 실험에서 임상관찰과 간 조직검사 등에서 독성반응이 나타나지 않았으며, 혈액학적 검사에서도 큰 독성이 없는 것으로 나타났다.

Sprague Dawley rat를 이용한 아급성 독성실험은 매주 2회씩 4주에 걸쳐서 산삼약침 0.1cc를 미정맥에 주입한 실험군 I과 0.2cc를 주입한 실험군 II, 그리고 생리식염수 0.1cc를 주입한 대조군으로 나누었으며, 1일 1회씩 급성 독성실험에서와 마찬가지로 rat를 관찰하였다. 그 결과 중독 증상은 나타나지 않았으며 사망한 개체도 존재하지 않았다. (Table 7, 8.) 체중측정에서도 대조군과 실험군 모두 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 9.) 또한 실험 종료 후 회복 하여 각 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과, 대조군과 실험군 모두 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Table 10.) 생화학 혈청검사를 측정한 결과 실험군 I에서 BUN은 정

상군과 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었고, Total protein, Albumin, Glucose는 대조군에 비하여 유의한 증가를, GOT는 대조군에 비하여 유의한 감소를, ALP와 GPT, 그리고 Triglyceride는 정상군과 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다.(Table 11.)

실험군 II에서 Total protein은 정상군에 비해 유의한 감소를, GPT는 유의한 증가를 나타내었으나 대조군에 비해서는 유의한 차이를 나타내지 않았고, Glucose는 정상군에 비해서는 유의한 감소를, 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과를 고찰해 보면 급성 독성과 마찬가지로 아급성 독성실험에서도 임상관찰과 혈액학적 검사에서 독성은 없는 것으로 관찰되었으나, 소량 주입한 실험군 I이 실험군 II에 비하여 단백질 대사나 당대사를 더욱 촉진시키는 경향을 나타낸 것은 많은 양을 시술하는 것보다 적절한 양을 사용하는 것이 더욱 중요할 수 있다는 의미로 해석되며, 앞으로 정량적 사용을 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 평가되었다.

서양의학에서 말하는 암 혹은 악성종양은 '조직의 자율적인 과잉성장이며, 이것은 개체에 대하여 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것'이라고 정의되어 있다<sup>39)</sup>.

최근에 들어 한의학에서 암을 치료하기 위하여 여러 가지 치료방법이 사용되고 있고 특히 藥鍼液을 이용한 抗癌效果와 免疫에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 국내에서 발표된 藥鍼液 抗癌研究로는 朴 등<sup>39)</sup>이 甘草藥針을, 韓 등<sup>40)</sup>이 當歸藥針을, 權 등<sup>41)</sup>은 蜂毒藥鍼을, 金<sup>42)</sup>은 金銀花藥鍼을, 金<sup>43)</sup>은 全蝎藥鍼液을, 朴<sup>44)</sup>은 益智仁藥鍼을, 李<sup>45)</sup>는 菟絲子藥鍼을, 李<sup>46)</sup>는 魚腥草藥鍼을, 李<sup>46)</sup>는 蟾蜍藥鍼 등 많은 抗癌效果와 免疫作用에 대한 연구보고가 있다. 그러나 山蔘藥鍼의 抗癌效果와 免疫效果는 아직까지 보고된 바 없었다. 이에 산양산삼약침의 항암능과 면역기능계에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 mouse의 미정맥에 주입하여 생존률과 NK 세포의 독성능, IL-2의 생산능, 그리고 Cytokine의 mRNA 발현을 측정하였다.

생존률 측정에서 실험군 모두 대조군에 비하여 115%의 유의한 생존증가율을 나타내어 증류추출식 산양산삼약침의 미정맥 주입이 생존율 증가에 중요한 작용을 하는 것을 알 수 있었다.(Table 12.)

또한 매일 mouse의 활동성을 관찰 비교한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 현저한 활동성의 저하와 외부한

경에 대한 노출 거부, 기면상태를 나타내었고, 외형적으로도 털이 많이 빠지면서 부분적으로 서 있는 모습이 관찰되었고, 항문이 노출되면서 항문주위의 털이 갈색으로 염색된 듯한 양상을 나타내었다. 이에 비하여 실험군은 복부에 팽윤된 증양이 있음에도 불구하고 정상군과 차이를 발견할 수 없을 만큼 활발한 운동성과 윤기 있는 털의 상태를 나타내어 대조군과 현저한 차이를 나타내었다.(Fig. 6-9)

NK cell(NK cell : natural killer cell)은 일반적으로 자연세포 독성세포라고 하는 일종의 자연면역 기능을 보이는 세포이다<sup>47)</sup>. NK cell 활성화 측정 검정결과, 전 구간에서 정상군과 대조군에 비하여 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않아 산양산삼약침의 작용기전이 비특이적 세포면역에 관여하는 것이 아님을 알 수 있었다.(Table 12, Fig. 10)

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 하고, 림프구의 활성화, 증식 및 분화를 촉진하여 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다<sup>48)</sup>.

IL-2의 생산능 검액 검사에서 결과 역시 실험군 I에서 정상군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 대조군과는 차이를 나타내지 않아 산양산삼약침이 림프구의 활성화, 분화, 증식에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다.(Table 13.)

Sarcoma-180 세포를 쥐의 복강에 투여한 후 산양산삼약침의 면역효과를 알아보기 위해 정상군, Sarcoma-180만을 투여한 대조군, Sarcoma-180을 미정맥에 주입한 후 0.1cc 주입한 실험군 I, 0.2cc 주입한 실험군 II로부터 각각 비장을 떼어내어 total RNA를 회수하여 RT-PCR법을 이용하여 cytokine mRNA 발현양상을 확인하였다.

면역반응은 항원에 의해 시작되는데 이 때에 CD4+ T 세포의 도움이 필요하다<sup>49)</sup>.

CD4+ T helper 임파구는 cytokines의 양상에 따라 T helper 1(Th 1)과 T helper 2(Th 2)로 구분된다. 이 두세포는 모두 Th 임파구 전구세포로부터 분화되는데 분화를 결정하는 요인은 환경적 요인과 유전적 요인으로 구분된다<sup>50)</sup>. 환경적 요인으로는 항원의 유입경로, 항원의 물리적 변형, 항원의 양 등이 알려져 있는 반면 유전적 요인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 이러한 환경적 요인이 Th 임파구의 주변 환경에 존재하는 cytokines

를 결정하여 Th 1과 Th 2로 분화를 유도한다. 즉, 분화 초기에 존재하는 cytokines 중 IL-4가 많이 존재하는 경우 Th 2로 분화가 이루어지고, INF- $\gamma$ 나 IL-12가 많이 존재하면 Th 1으로 분화가 촉진된다<sup>20)</sup>. 이처럼 분화된 Th 1 세포는 INF- $\gamma$ , IL-12, tumor necrosis- $\beta$ (TNF- $\beta$ )를 생성하여 세포매개성 면역반응(cell mediated immune response)에 관여를 하고 Th 2임파구는 interleukin 4, 5, 10, 13을 생성하여 알러지 및 체액성 면역반응(humoral immune response)에 관여를 한다. Th 1과 Th 2는 서로 억제작용을 하며 숫자적으로 균형을 유지하게 된다<sup>21)</sup>. Internal control로 사용한  $\beta$ -actin과 각각의 cytokine을 비교하였을 때, interferon- $\gamma$ 는 실험군 I에서 약간 감소하는 경향을 보였으나, 그다지 큰 차이를 보이지는 않았다. 또한 interleukin-2의 경우 전체적으로 mRNA 발현이 미약하였으나, 대조군과 실험군 II에서 약간의 발현이 되었음을 확인하였다. 반면 interleukin-10에서는 정상군에 비해 대조군에서 발현이 향상되었음을 보였으며, 실험군 I의 경우 control에 비해 normal과 비슷한 정도로 발현이 저하되었다. 실험군 II의 경우 normal 보다는 발현이 향상되었으나 control보다는 다소 저하된 발현양상을 보였음을 확인하였다.(Fig. 12)

실험군에서 대조군에 비해 Th 2의 발현이 저하되었다는 것은 항암 기전에 작용하는 세포매개성 면역반응인자인 Th 1의 발현이 증가되었다는 것을 의미하며, Th 1 cell의 작용을 억제하는 interleukin-10이 대조군에서 증가하고 상대적으로 실험군에서 발현이 저하된 것을 종합해 볼 때 실험군에서 생존률 증가를 유도한 기전은 Th 1의 분화증가기전이 작용하지 않았는가 추정된다.

이상의 결과를 고찰해 볼 때 정맥 주입용 산양산삼 증류약침을 mouse의 미정맥에 주입한 0.1cc, 0.2cc등은 인체의 기준으로 환산해 볼 때, 0.1cc는 60kg의 사람에게 약 300cc, 0.2cc는 600cc에 해당되는 양으로, 이와 같은 양으로도 독성반응이 거의 없는 것으로 나타났다.

Sarcoma-180 복강암 세포를 이용한 항암효과에서는 실험군의 생존율이 115%나 유의성있게 증가하였고, mouse의 활동성이나 일반적인 양상이 정상군에 비하여 큰 차이를 나타내지 않는 등 상당히 우수한 결과를 나타내었다. NK cell의 활성화도, IL-2 생산능에서는 유의한 차이를 나타내지 않았으나, cytokine mRNA 발현양상에서 세포매개성 면역반응에 관여하는 Th 1 세포를 활성화하여 항암작용을 유발하지 않았는가 추정된다. 위의 결과를 종합해 볼 때, 산양산삼 증류약침은 비교적 안

전한 약침제제이며, 향후 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로 기대되며 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사려된다.

## V. 結 論

정맥주입용 산양산삼 증류약침의 독성과 안전성을 규명하기 위하여 mouse와 rat를 이용한 LD<sub>50</sub>, 급성·아급성 독성실험을 하였으며, 항암효과를 관찰하기 위해 Sarcoma-180 복강암 세포를 주입한 mouse에서 생존율, NK cell 활성화도, IL-2양 및 cytokine mRNA 발현양상을 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.(p<0.05)

1. 급성 독성실험에서 LD<sub>50</sub>을 측정한 결과 실험군 모두에서 사망한 개체가 발견되지 않아 산출할 수 없었다.
2. 급성 독성실험에서 독성반응 상태를 관찰한 결과, 아무런 중독 증상이 나타나지 않았다.
3. 급성 독성실험에서 생화학 혈청검사를 시행한 결과, 대조군에 비하여 실험군 I에서 Total cholesterol의 유의한 증가를 나타내었다.
4. 아급성 독성실험에서는 실험군 모두 중독증상을 나타내지 않았으며, 정상군에 비해 체중의 변화도 나타내지 않았다.
5. 아급성 독성실험의 생화학 혈청검사서 대조군에 비하여 실험군 I에서 Total protein, Albumin, Glucose는 유의한 증가를, GOT, ALP와 GPT, 그리고 Triglyceride는 유의한 감소를 나타내었다. 실험군 II에서는 Glucose만 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.
6. Sarcoma-180 복강암 항암효과 실험에서 생존율을 측정한 결과, 실험군 모두 115%의 유의한 생존율 증가를 나타내었다.
7. NK cell 활성화도 측정 검정결과 전 구간에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

8. Interleukin-2의 생산능 측정결과 실험군 모두에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

9. cytokine mRNA 발현양상에서는 실험군이 대조군에 비해 interleukin-10의 발현이 저하되었다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 정맥주입용 산양산삼 증류약침은 비교적 안전한 약침제제이며, 향후 암의 치료에도 활용될 수 있을 것으로 기대되고 많은 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사려된다.

### 參考文獻

1. 신순식 외, 산삼 감정 기준의 객관성, 한의학연구 소 등의 한의연 제 5집, pp 107-114. 2001.12.
2. 전국한외과대학 본초학교수공편저, 본초학, 서울, 영림사, p 531, 1994.
3. 중약대사전편찬위원회, 완역중약대사전 권7, 서울, 정담, pp 3473-3479, 1997.
4. 朝鮮總督府專賣局, 人蔘史, 서울, 法人文化社, p 3-4, 5,
5. 張仲景, 仲景全書, 대성문화사, pp 130, 150, 153, 155, 166, 167, 176, 199, 201, 205, 208, 209, 214, 217, 1984.
6. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, pp. 13-14, 112-118, 138-203, 1999.
7. 손인철 외, 약침요법, 일중사, pp 17, 18. 1999.
8. 이상인 외, 한약임상응용, 정보사, pp 345-350, 1982.
9. 하대유, 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구, 대한 면역학회지, Vol. 1, No. 1, pp 45-52, 1979.
10. 山田昌之, 朝鮮人蔘의 研究, 日本藥理學會誌, 51:390, 1955.
11. Brekhman, II, Panax ginseng, Gosudarst Isdat et Med, Lit. Leningard, p. 1 1957.
12. Garriques. S, Panax Quinquifolia, Am Chem Pharm, 90:331, 1954.
13. 최진호, 인삼의 신비, 서울, 교문사, p 13-14, 1984.
14. Takagi, K, Proceedings International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p. 119, 1974.
15. 이산명 외, 인삼, 녹용 및 목향 수침이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬 분비에 미치는 영향, 대한침

- 구학회지, Vol. 5, No. 1, pp 1-5, 1988.
16. 김웅시 외, 수삼, 백삼 및 홍삼수침이 Alloxan 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향, 대한 침구학회지, Vol. 6, No.1, pp 1-5, 1989.
17. 남윤석, 약침용 홍삼추출액의 안전성 연구, 경희대학교 대학원, 1996.
18. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제 98-116호. 1996.
19. R. I. Geran, N. H. Greenberg, M. M. Macdinald, A. M. Schumacher, and B. J. Abbot : Protocol for screening chemical Agents and Natural products against Animal Tumors and other Biological system(3rd Edition), Cancer chemotherapy Reports, pp.48-59, 1972.
20. Shibata, S., tanaka, O., Chem Pharm Bull, 14:595, 1966.
21. 최강주, 원료인삼의 성분과 품질관리, Korean J Ginseng Sci, 15:3, pp. 247-256, 1991.
22. 單書健, 神農本草經校證, 吉林科學技術出版社 p 150, 1988.
23. 唐慎微, 重修政和經史證類備用本草, 南天書局有限公司, p 145, 1988.
24. 王好古, 湯液本草, 本草名著集成 華夏出版社, pp 30-31, 1998.
25. 王綸 撰, 本草集要, 歷代本草精華叢書 三, 上海中醫藥大學出版社, 1998.
26. 李時珍, 本草綱目, 人民衛生出版社 p 699, p 701, 1982.
27. 汪昂, 本草備要, 本草名著集成 華夏出版社, pp 242-243, 1998.
28. 강성길 외, 인삼수침이 진통 및 혈압에 미치는 영향, 동양의학회지, Vol. 11, No. 2, pp. 66-75, 1985.
29. 김태윤 외, 인삼수침전처리가 발암예방에 미치는 영향, 대한한외학회지, Vol. 9, No. 2, pp. 33-44, 1988.
30. 황경애 외, 인삼 및 녹용수침의 시간경과에 따른 면역효과연구, 경희의학, Vol. 4, No. 2, pp. 150-157, 1988.
31. 이혜정 외, 강혈당작용에 의거한 종류별 인삼수침 엑기스 제법연구, 대한한외학회지, Vol. 13, No.1, pp 23-40, 1992.
32. 김용석 외, 인삼수침이 흰쥐의 갑상선 기능저하에 미치는 영향, 경희의학, Vol. 6, No. 2, pp. 202-210, 1990.

33. 임하변 외, 인삼수침이 항 알레르기에 미치는 영향, 경희의학, Vol. 7, No. 1, pp. 63-72, 1991.
34. 김창일 외, 농도별 인삼수침이 hydrocortisone acetate를 투여한 흰쥐의 체내대사에 미치는 영향, 대한한의학회지, Vol. 9, No. 2, pp. 33-44, 1988.
35. 홍원식 편저, 精校 黃帝內經素問, 東洋醫學研究院 出版社, pp. 34, 35. 1985.
36. 楊維傑 編, 黃帝內經靈樞譯解, 성보출판사, p. 489, 1985.
37. 서울대학교 의과대학, 중앙학, 서울대학교 출판부, 서울, pp. 1-3, 137- 143, 225, 1992.
38. 박경미 외, 감초약침액의 항암 및 면역활성에 미치는 영향, 생약학회지, Vol 31. No. 1, pp. 7-15, 2000.
39. 한상훈 외, 당귀약침액의 암예방효과, 약학회지, Vol. 44, No 3. pp. 283-293, 2000.
40. 權奇祿 外, 蜂毒藥鍼刺戟이 3-MCA 誘發 上皮腫에 對한 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 14. No. 2. pp. 151-172, 1997.
41. 김중완, 金銀花 藥鍼液이 抗癌 및 癌豫防 效果에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 16. No. 2, pp. 261-284, 1999.
42. 김소형, 全蝎 藥鍼液의 抗突然變異 및 抗癌 效果, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 17. No. 3, pp. 151-167. 2000.
43. 朴祥鎔, 益智仁藥鍼이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 18. No. 3. pp. 79-93, 2001.
44. 이재복, 兔絲子藥鍼이 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌, Vol. 18. No. 3, pp. 94-104, 2001.
45. 이혜정 외, 魚腥草水鍼의 抗腫瘍效果에 關한 研究, 경희한의대논문집, pp. 467-483, 1989.
46. 이준무 외, 제조약침의 항암작용에 관한 연구, 대한동의병리학회지, Vol. 14, No. 2, pp. 132-143, 2000.
47. 김세종, 면역학, 고려의학, 서울, pp.134-136, 1994.
48. Paul WE, Seder RA, Lymphocyte responses and cytokines, Cell, 76: pp. 241-251, 1994.
49. Constant SL, Bottomly K, Induction Th 1and Th 2 CD4+ T cell response, The alternative approaches. Annu. Rev. Immunol. 115:297-322, 1997.
50. Sell, S, Cell mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hergestown, Maryland, Herpers & Row Pub., pp144-171. 1980.
51. Sher A, Cofferman RL, Regulation of immunity to parasite by T cell-derived cytokines, Annu. Rev Immunol. 46:111-147, 1992.