

## Cyclophosphamide로 Rat에 유도된 악성빈혈에 대한 숙지황의 증(蒸)수에 따른 치료효능에 관한 연구

마진열,\* 하창수,<sup>1</sup> 성현제, 지옥표<sup>2</sup>

한국한의학연구원 연구부, <sup>1</sup>한국화학연구소 안전성연구센터, <sup>2</sup>성균관대학교 약학대학

## Hemopoietic Effects of Rhizoma Rehmanniae Preparata on Cyclophosphamide-Induced Pernicious Anemia in Rats

Jin-Yeul Ma,\* Chang-Su Ha,<sup>1</sup> Hyun Jea Sung and Ok Pyo Zee<sup>2</sup>

Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100,

<sup>1</sup>Toxicology Research Center, Research Institute of Chemical Technology, Taejeon,

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract** – Rhizoma Rehmanniae Preparata is a Chinese herbal tonic. The hemopoietic effects of Rhizoma Rehmanniae Preparata(4-time steamed Jihwang, 4-time steamed double dose Jihwang, 8-time steamed Jihwang, 8-time steamed double dose Jihwang) were examined using *in vitro* rat(SD) model. Cyclophosphamide(150 mg/kg) was injected into experimental groups and control group to induce bone marrow suppression. Oral administration of Rhizoma Rehmanniae Preparata suppressed hormone levels of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub>. Reticulocyte count was increased by the bone marrow suppression.

**Key words** – Rhizoma Rehmanniae Preparata; hemopoietic effects; hormone levels; hematological values; reticulocyte

### 서 론

의학(醫學)의 발달에 의하여 각기 질환(疾患)을 다스리는 방법은 급속도로 발전하였다. 혈액(血液)에 관련된 제반 질환도 진일보된 상태이나 빈혈 및 백혈병 등의 혈액 질환은 완전히 해결되지 못하고 있는 것이 현 실정이다. 특히 빈혈은 적혈구 및 헤모글로빈의 양이 낮거나 양자가 부족한 증복증상을 말하며 빈혈의 발생원인은 출혈성, 용혈성, 영양소(철분, 비타민 B<sub>12</sub>, 엽산) 결핍 및 기타 다른 질환에 의한 적혈구 등의 생산 부족으로 인해 빈혈이 발생된다.<sup>1)</sup> 빈혈의 분류에는 형태학적 분류와 원인적 분류로 구분할 수 있으며 형태학적 분류에는 혈구의 크기 및 혈색소의 농도에 따라 구분되고 원인적 분류는 발생원인에 따라 구분한다. 본태성 재생불량성 빈혈, 약물치료에 의한 빈혈 등은 현재로서는 특별한 치료약이 없으며 보조 약물

로서 생약 등을 사용하여 골수기능의 조속한 회복을 유도하여 질병을 치료한다.<sup>2)</sup>

한방에서 많이 사용되어지는 숙지황(熟地黃)은 혈(血)이 상(上)에 망행(忘行)하면 토혈(吐血), 각혈(各血), 비혈(鼻血)이 되며, 하(下)에 유상(流上)하면 혈변(血便)을 보고 열(熱)이 방광(膀胱)에 축적(蓄積)되면 혈뇨(血尿)가 되며 혈(血)이 내장(內臟)에 울결(鬱結)하면 혈괴(血塊), 혈징(血癥)을 보고 혈(血)이 극도(極度)로 열(熱)하여 비등(沸騰)하게 되면 반진(斑疹)을 발하고 경락(經絡)에 어(瘀)가 체(滯)하는 열(熱)이 결국(結局) 부화(腐化)함에 지(至)하여 응저농혈(凝直膿血) 등(等)의 증(症)이 된다. 숙지황은 한국과 중국, 일본 등의 각지에서 생산되고 있는 생지황을 다증법제(多蒸法製)하여 만든 것으로 미(味)가 감미고(甘微苦)하고 약성(藥性)은 미온(微溫)하여 신수(腎水)를 자양하며, 보혈(補血)하고 수염을 검게 하고 정수(精髓)를 보익(補益)한다. 보혈(補血)을 목적으로 할 때 많이 쓰여지고 있으며 위기(胃氣)가 허약(虛弱)한 사람에게는 소

\*교신저자 : Fax : (02) 3442-0220

화(消化)에 부담을 주어 설사를 유발하기도 한다. 이 약의 형태는 불규칙한 덩어리 모양으로 속과 겉이 고른 칠흑색을 나타내며, 외표면은 주글주글하고 평탄하지 않다. 질(質)은 유연(柔軟)하며 단면(斷面)은 자윤(滋潤)하고 중심부(中心部)에 유지상(油脂狀)의 덩어리가 있기도 하고 점성(粘性)이 많다. 한방에서는 팔미지황환(八味地黃丸), 궁귀교에탕(芎歸膠艾湯), 사물탕(四物湯) 등의 처방에 많이 응용되며<sup>3,5)</sup> 특히 기체담다자(氣滯痰多者)나 완복(脘腹)이 창통(脹痛)하고 식소변당자(食少便溏者)는 복용(服用)을 기(忌)한다

본 논문에서는 골수부전 동물을 유발하여, 생지황을 숙지황으로 만드는 과정에서 4시간씩 4증한 것과 8증한 것의 약성변화 치료효과 및 약리작용의 변화를 보혈작용 중심으로 비교 실험하였다.

## 재료 및 방법

**숙지황의 제조** - 본 연구에 사용된 생지황은 경상북도 의성에서 생산된 것으로 120 kg을 구입하여 흐르는 물에 세척 후, 40 cm 깊이의 water bath내에서 한의학적 분류법에 의한 천·지·인으로 구별하여 시험에 각각 사용하였다. 천황(45.19%), 지황(45.64%), 인황(9.16%)의 생지황 비율은 서로 다르게 나타났으며, 탁주(6°C, 서울탁주연합제조장)를 이용하여 생지황을 17시간 침적한 후, 중탕으로 열을 가하여 수증기로 수치하여 제조하였다.

**실험재료** - 실험에 사용한 한약재는 제조된 숙지황 4증 및 8증을 각각 166 g씩 믹서기(FM-707T, Han il Co., Korea)를 이용하여 2 mm 이하로 잘게 잘라 600 ml의 증류수를 가하여 60분간 침적한 후, 대용 약탕기(DWP-1800T, Dae Woong Co., Korea)를 이용하여 120분간 열탕 추출하고 감압회전 농축기를 이용하여 100 ml로 농축하였다. 투여 전 Mesh 100번 필터

로 여과 후 동물실험에 사용하였다.

**골수부전 유발제** - Cyclophosphamide<sup>6,7)</sup>(cytoxan 200 mg vial, 중외제약)를 13.33 ml의 증류수에 완전히 용해하여 실험동물 Kg당 10 ml를 1회 복강투여(150 mg/kg)하여 골수부전을 유발하였다. Cyclophosphamide는 생체내에서 활성화된 후, 악성종양세포의 핵산대사를 저해한다. 또한 세포의 life cycle에서 분열주기인 G2기에 주로 작용하여 암세포가 분열기로 이행하는 것을 억제함으로써 암세포의 증식을 막는다. 그리고 cyclophosphamide 투여시 백혈구 감소증, 황달, 대장염, 신우내의 출혈, 혈뇨 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 이 증상은 투여 후 7-10일부터 회복이 시작된다.

**실험동물** - 6주령의 수컷 SD계 rat을 삼육실험동물센터로부터 구입하여 한국한의학연구원 동물실험실에서 2주간 순화시켰다. 순화기간 중 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 실험에 사용하였으며, 사육 환경은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%이었으며, 환기횟수는 시간당 12-16회이며, 조명은 12시간 명암 cycle(점등7:00, 소등19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여, 전 실험기간 동안 일정하게 유지하였다. 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)와 물(tap water)은 자유섭취시켰다.

**실험방법** - 8주령의 rat(SD)에 cytoxan(150 mg/kg)을 1회 복강 투여하여 골수부전을 유발시킨 후, 숙지황 조제시 증수에 따른 숙지황의 조절기능 및 약리작용의 변화를 평가하기 위하여 4증과 8증의 것을 용량 1배, 2배로 나누어 실험하였다(Table D). 투여 경로는 경구투여법을 사용하였다.

**임상증상 관찰** - 임상증상은 cytoxan 투여 후 및 숙지황 투여기간에 매일 1회 이상 급성독성 시험법에서의 일반증상관찰법<sup>8)</sup>을 변형하여 임상 관찰하였으며, 실험계의 건강 상태를 확인하였다.

Table I. Experimental groups

Group	Animal No.	AD*(cytoxan) (mg/kg)	Volume (ml/kg)	Dose (g/kg/day)
Control	6	0	10	0
Positive control	6	150	10	0
S(4x Steamed Jihwang)	6	150	10	8.33
SD(4x Steamed double dose Jihwang)	6	150	10	16.66
SS(8x Steamed Jihwang)	6	150	10	8.33
SSD(8x Steamed double dose Jihwang)	6	150	10	16.66

Sacrificed after administration for 3 days, \*AD; administration

**체중 및 각 장기의 중량 측정** - Cytoxan 투여전과 시험물질 투여 1, 3일에 실험동물의 체중변화를 관찰하였으며, 부검시 모든 동물에 대하여 17시간 절식시킨 후 체중을 측정하여 상대적 장기중량비를 비교 분석하였다.

**동물 부검 및 분석 샘플 채취** - 부검 동물을 마취(ether)시킨후, 후대정맥에서 채취하였으며 EDTA-2K로 처리된 CBC bottle에 혈액을 분주하여 Coulter count (JT, Coulter Co., USA)를 이용하여 혈구분석 및 망상적혈구염색(mew methylene blue)에 사용하였다. 혈액을 실온에서 응고시킨 후, 냉장고속원심분리기(Avanti 30, Beckman Co., USA)를 이용하여 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 deep freezer(-70°C)에 보관하여 사용하였다.

**혈액(blood) 및 망상적혈구(reticulocyte)에 의한 조혈 효과 측정** - 혈액학적 검사는 혈구분석기로 WBC, RBC, HGB, HCT, MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV(Mean Corpuscular Volume), PLT를 측정하였다. 망상적혈구(reticulocyte) 수는 capillary tube에 1% new methylene blue를 이용하여 염색한 후, 5분간 실온에 방치하였으며, slide glass에 도말하여 건조시켰다. Reticulocyte count는 1,000개의 적혈구를 계수하는 동안에 나타나는 reticulocyte의 빈도를 백분율로 나타내었다.

**혈액 생화학적 검사** - 혈액 생화학적 검사는 AST (aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), creatinine, ALP(alkaline phosphatase), BUN(blood urea nitrogen) 및 glucose를 생화학 분석기(Airon 200, Crony Instruments, Rome, Italy)를 이용하여 측정하였다.<sup>9-12)</sup>

**혈청내의 호르몬 측정** - 혈청내의 호르몬 분석<sup>13-14)</sup>은 Competitive immunoenzymatic assay (Sanofi-pasteur Diagnostics, Chaska, MN, USA)원리를 이용하였으며, 그 측정 방법은 T<sub>3</sub>의 경우 혈장 110 μl를 anti-T<sub>3</sub> 항체와 반응시킨 다음 goat anti-mouse antibody가 부착된 paramagnetic particle과 T<sub>3</sub>-alkaline phosphatase가 부착된 anti-T<sub>3</sub> 항체와 경쟁적으로 반응시켜 chemiluminescent substrate가 발광하는 정도를 측정하여 T<sub>3</sub>를 정량하였다. T<sub>4</sub>의 측정은 혈장 30 μl을 anti-thyroxine 항체와 thyroxine-alkaline phosphatase 및 goat anti-mouse antibody가 붙어있는 paramagnetic particle이 함유된 시험관에 넣고 반응

시킨 다음 chemiluminescent substrate를 가하여 발광하는 정도를 측정하여 T<sub>4</sub>의 농도를 정량하였다.

**음수 섭취량 및 뇨량 측정** - 시험물질 투여 종료 후 1군당 3마리를 선별하여 17시간 동안의 음수 섭취량 및 뇨량을 대사 케이지를 이용하여 음수량 및 체뇨량을 각각 측정하였다.

**노검사** - 시험물질 투여 종료후 1군당 3마리를 선별하여 17시간 동안의 신선뇨를 대사 케이지를 이용하여 채뇨한 후, 뇨분석기(Clinitek-100, Bayer Co., USA)를 사용하여 glucose, bilirubin, ketone body, specific gravity, pH, protein, urobilinogen, nitrite, occult Blood, WBC 등을 측정하였다.

**조직검사** - 숙지황 투여군의 조혈 장기 변화를 관찰하기 위하여 간장, 비장, 골수의 조직들을 형태학적으로 검정하였으며, 신장의 변화도 관찰하였다. 골수조직 검사 대퇴골을 Bouin,s Solution에 고정하였으며, 간 및 신장과 비장 조직은 10% 중성 포르말린 용액에 고정<sup>15)</sup>하였다.

**통계처리** - 통계 처리는 양성 대조군(positive control)과 대조군(control)을 기준으로 하여 각각 비교 분석하였으며 통계학적 유의차는 t-test에서 이분산 가정 두 집단에 의하여 검정하였고, p<0.05를 실험군간의 유의성있는 차이로 판정하였다.

## 실험 결과

**임상증상 변화** - Cytoxan(150 mg/kg) 복강 투여 3-4일 후부터 적색요루 및 비강 주위에 적색 분비물과 부종이 나타났으며 피모는 거칠고 영양 상태가 좋지 않았다. 그리고 안구와 콧바퀴 주위의 혈색은 창백하였다. 뇨의 색깔은 진한 황색이며, 변의 상태는 매우 연한 설사변이었다. 동물의 일반행동은 활동성이 감소하고 무기력하였으며 체중은 감소하였다. Cytoxan 투여 8-10일 후부터 위의 증상에 대한 회복이 관찰되었다. 시험물질 투여 기간 중 임상증상은 새까만 점액성 설사변이 숙지황 투여군에서 관찰되었으며 다른 임상증상은 관찰되지 않았다.

**체중 및 장기의 중량 변화** - 숙지황 투여 1, 3일 후에 체중을 측정한 결과(Table II), 1일째에는 무처치 대조군을 제외한 모든 군에서 체중이 감소하였다. 무처치 대조군을 제외한 모든 군에서 체중이 감소하였으나 군간에 차이는 있었다. 장기무게는 간장의 경우 PC군에 비해서 무처치 대조군과 숙지황 투여군 모두에서 무게가 유의성있게 감소하였다(Table III). 비장

Table II. Body weight change in rats orally treated with Rehmanniae Radix

Variable	\ Sex	Male					
	\ Group	C	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
	\ No. of animals	6	6	6	6	6	6
Administration (8 days before)		292.37 <sup>a</sup> (18.99) <sup>b</sup>	294.91 (15.47)	292.58 (19.05)	291.30 (20.66)	291.65 (15.63)	289.84 (15.85)
Administration (1 day)		52.59 (11.06)	-22.095 (15.40)	-16.345 (13.35)	-16.29 (11.21)	-21.265 (14.33)	-13.655 (12.52)
Administration (3 days)		62.968 (2.22)	-10.986 (11.39)	-8.828 (10.15)	-8.290 (9.14)	-6.71 (11.08)	-3.117 (11.71)

a; Values were expressed as mean, b;  $\pm$  S.D., Significantly different from Positive control group(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table III. Relative organ weight of rats orally treated with Rehmanniae Radix

Sex	Male					
	C	PC	S	SD	SS	SSD
Group						
Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
Body weight(g)	319.96 <sup>a</sup> (9.47) <sup>b</sup>	257.00(8.93)	255.18(10.44)	249.03(6.40)	253.64(5.89)	245.02(3.45)
Liver	2.94(0.23)*	3.35(0.12)	2.91(0.19)*	2.98(0.04)*	2.95(0.11)*	2.91(0.24)*
Spleen	0.26(0.02)	0.47(0.29)	0.26(0.09)	0.25(0.02)	0.28(0.07)	0.23(0.09)
Kidney left	0.39(0.04)*	0.46(0.03)	0.46(0.07)	0.43(0.04)	0.43(0.03)	0.42(0.02)
Kidney right	0.40(0.02)	0.46(0.05)	0.43(0.04)	0.44(0.03)	0.43(0.03)	0.44(0.007)

Relative organ weight at 3 days after treatment with Rehmanniae Radix,

a; Values were expressed as mean, b;  $\pm$  S.D., Significantly different from Positive control group(\* $p < 0.05$ )

은 SD값에 의해 유의한 변화는 나타나지 않았으나 PC군에서 종대된 것을 알 수 있었다.

**동물 부검 소견** - 부검동물의 임상소견은 무처치 대조군에 비하여 PC군에서 간장의 색조가 암적색을 띄고 변연부가 두꺼워졌으며 6레중 2레의 비장이 종대되었다. 다른 투여군 모두에서는 특이한 변화가 관찰되지 않았다.

**조혈축진 효과** - 혈액검사는 골수부전 유발군에서 숙지황 투여군이 PC군보다 모두 RBC와 HGB, HCT 양이 증가하였으나 통계적인 유의차가 증가한 군은 무처치 대조군(0.01) 및 SD군(0.05)이었다(Table IV). 골수부전 유발군에서 무처치 대조군보다 혈소판의 양이 증가하였으며 숙지황 투여시 혈소판이 PC < SD < S < SSD < SS군 순으로 감소한다는 것을 알았다. 특히 숙지황 투여군에서 PC군 보다 증가폭이 더 향상되었다. SSD군에서 총 백혈구의 수와 granulocyte가 증가하였으며 lymphocyte가 감소하였다. 총 백혈구 수의 증가는 과립구의 증가에 의한 것이라고 추정되나 통계학적인 유의성은 없었다. 그리고 SD군에서도 과

립구의 수가 다소 증가한 경향이 있었다. 그러나 여 기서는 총 백혈구수의 증가는 없었다. 이것 역시 통계학적인 유의차는 없었지만 과립구의 수가 증가한 점에서 SSD군의 경우와 유사하다고 볼 수도 있다. 만일 여기에서 미성숙 백혈구가 증가한 경우라면 SD군의 경우에는 총 백혈구수가 증가하지 않았으므로 조혈작용이 왕성할 때 나타나는 백혈구의 상대적 증가로 볼 수도 있기 때문이다. SSD군을 제외한 골수부전 유발군에서는 혈소판이 증가하였다. 망상적혈구는 일반적으로 실험성 빈혈이나 용혈성 빈혈로 인한 만성적 헤모글로빈 감소가 있을 때, 그 수가 증가된다. Cytoxan(150 mg/kg) 1회 복강 투여 후 골수부전을 유발시킨 rat에서 양성 대조군 및 숙지황 투여군에서는 무처치 대조군에 비해 망상적혈구의 수는 증가하였다(Table V). 이는 골수부전에 의한 조혈기능의 향상에 기인된 것으로 사료된다. 그리고 시험물질인 숙지황 투여군에서는 양성대조군에 비해 망상적혈구의 양은 모두 증가하였으나 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다( $p < 0.05$ ).

**Table IV.** Hematological values of male rats orally treated with Rehmanniae Radix

Tested Unit	WBC x1000	#LYM %	#MO %	#GR %	RBC x10 <sup>6</sup>	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT x1000
Group : C											
Mean	9.78	84.51	7.95	7.53	7.96**	15.93**	46.01**	57.81	20.05	34.66	1178*
SD	2.11	6.69	2.94	3.97	0.38	0.99	1.48	1.87	1.52	2.71	281
Group : PC											
Mean	7.70	-	-	-	6.56	13.26	38.15	58.16	20.25	34.81	1620
SD	2.19	-	-	-	0.44	1.09	2.72	1.89	1.38	2.15	276
Group : S(8.33 g/kg/day)											
Mean	2.75*	72.60	9.75	22.06	6.81	13.58	39.33	57.68	19.91	34.53	1542
SD	0.21	27.57	6.29	16.88	0.39	1.31	3.04	1.64	1.24	2.11	314
Group : SD(16.66 g/kg/day)											
Mean	5.45	71.33	5.00	23.66	7.16*	14.61*	41.50*	57.93	20.43	35.23	1606
SD	0.63	6.36	4.60	5.25	0.37	0.79	2.17	2.10	0.90	0.51	316
Group : SS(8.33 g/kg/day)											
Mean	4.70	54.81	16.60	28.58	6.66	13.82	38.64	58.00	20.74	35.76	1430
SD	1.62	6.34	7.34	13.69	0.15	0.48	2.14	2.31	0.39	0.85	330
Group : SSD(16.66 g/kg/day)											
Mean	6.02	48.45	10.47	41.07	6.73	14.03	39.36	58.45	20.85	35.68	1455
SD	2.63	5.53	5.83	6.51	0.59	1.20	3.58	1.14	0.40	0.61	295

All hematological values were measured at 3days after treatment of Rehmanniae Radix. Statistically Significant from Positive control(\*P0.05, \*\*P0.01)

**Table V.** Reticulocyte count of rats orally treated with Rehmanniae Radix

Parameter	\ Sex	Male					
	\ Group	C	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
	\ No. of animals	6	6	6	6	6	6
Mean(%)		2.01 (0.38)**	2.76 (0.20) <sup>a</sup>	3.26 (0.69)	3.03 (0.72)	3.28 (0.71)	2.93 (0.77)

Reticulocyte count at 3 days after treatment with Rehmanniae Radix, a: ± SD, Statistically Significant from Positive control(\*\*: p<0.01)

**혈액 생화학적 변화** - 혈중 AST는 S<SD<PC<SS<C<SSD군 순으로 증가하였다. PC군에 비해서 C군(p<0.05)과 SS군(p<0.05)에서 통계학적으로 유의한 변화가 있었고, control에 비하여 PC(p<0.05), S(p<0.01), SD(p<0.05)군에서 유의성있게 감소하였다 (Table 6). ALT의 양은 S<PC<SD<SS<SSD<C군 순으로 증가하였다. PC군을 기준으로 하여 통계처리한 결과 대조군(p<0.05)에서 유의한 변화가 관찰되었다. 대조군에 비해서 PC(p<0.05), S(p<0.01), SS(p<0.01), SD(p<0.05)군에서는 감소하기는 하였지만 정상 범위내의 변화이기 때문에 임상적으로 의미가 없다. Creatinine은 골수부전 유발군에서 대조군에 비

해 그 양은 감소하였으나 이는 cytoxan에 의한 활동력 감소에 기인된 것으로 사료되고, 또한 S군에서 통계학적으로 유의성있는 감소는 임상적으로 큰 의의가 없는 것으로 생각된다. 혈중 ALP는 골수부전 유발군에서 무처치 대조군에 비해 그 양은 감소하였으나 이는 cytoxan 독성에 의한 활동력 감소에 기인된 사료 섭취량의 감소로 생각된다. SSD군에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였는데 이는 숙지황의 효능에 의한 것으로 사료되며, BUN은 SSD군에서 그 양은 PC군에 비해 증가(p<0.05)하였으나 이는 정상 범위내에 포함되므로 임상적으로 큰 의의가 없는 것으로 사료된다. 그리고 무처치 대조군과 비교시 골수 유발군에서 통

**Table VI.** Serum biochemical values of rats orally treated with *Rehmanniae Radix*

Variable	\ Sex	Male					
	\ Group	Control	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
	\ No. of animals	6	6	6	6	6	6
AST(u/l)		67.55*	42.60	37.06	39.56	63.39*	75.65
SD		(18.78)	(12.19)	(12.11)	(17.29)	(20.68)	(44.50)
ALT(u/l)		21.14*	11.41	10.59	12.28	14.08	16.68
SD		(4.92)	(3.76)	(2.56)	(3.38)	(3.66)	(6.22)
ALP(u/l)		91.90**	55.11	36.53*	41.44	43.84	71.71
SD		(10.58)	(17.81)	(7.39)	(4.07)	(7.10)	(40.72)
BUN(mg/dl)		12.25	11.33	9.59	10.66	13.11	13.44*
SD		(1.31)	(1.73)	(1.84)	(2.17)	(3.20)	(1.37)
Creatinine(mg/dl)		0.251	0.211	0.121*	0.185	0.208	0.228
SD		(0.04)	(0.07)	(0.02)	(0.03)	(0.06)	(0.06)
Glucose(mg/dl)		77.65	109.01	106.70	94.24	117.70	96.93
SD		(14.44)	(42.73)	(16.83)	(43.90)	(32.49)	(24.15)

Serum biochemical values at 3 days after treatment of *Rehmanniae Radix*,

a; Values were expressed as mean, b;  $\pm$  S.D., Significantly different from Positive control group( $p < 0.05$ )

계학적 변화는 없었다. Glucose는 골수 유발군에서 대조군에 비해 그 양은 증가하였으나, PC군에 비해서 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 무처리 대조군을 중심으로 통계처리시 S군( $p < 0.01$ )과 SS군( $p < 0.05$ )에서 유의한 증가가 발견되었다. 이는 cytoxin에 의한 세포내 에너지 생산에 장애가 발생되어 세포내 항상성 유지를 위하여, 혈장내에 glucose 양이 많이 요구되므로 증가된 것으로 생각할 수 있다.

**혈청내의 호르몬 변화** - 숙지황 투여후 부검한 골수부전 유발 군에서 thyroxine의 변화는 무처리 대조군에 비해 그 양이  $SSD < SS < SD < S < PC$ 군 순으로 증가하였다(Table VII). Triiodothyronine량은 골수부전 유발군에서 positive control 군을 제외하고 무처리 대조군보다 미세한 감소가 관찰되었다. 이는 통계학적 유의성은 관찰되지 않았지만 cytoxin(150 mg/

kg) 1회 복강 투여시 갑상선 호르몬  $T_4$  및  $T_3$ 가 증가하였고, 숙지황 3일 경구 투여시 thyroxine 및 triiodothyronine의 호르몬 양이 증가된 것을 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

**음수 섭취량 및 뇨량의 변화** - 숙지황 투여한 골수부전 유발군에서 음수 섭취량은 대조군에 비하여  $SS < SD < PC$  순으로 감소하였으며 SSD와 S군에서는 증가하였다. 음수량이 감소한 원인은 cytoxin 독성에 의한 활동력 감소에 의해 운동성이 저하된 것으로 생각되며, 실험동물 개체에 의한 음수 섭취량의 변동을 이 심하여 통계학적인 유의성은 관찰 할 수 없었다. 음수섭취량과 뇨량을 상대적으로 비교 분석하여 백분율로 계산하니 대조군 120%, PC 101%, S 78%, SD 93%, SS 147%, SSD 129%로 각각 나타났으며, 이는 Rat(SD)에 있어서 개체 차이에 의한 변화의 폭

**Table VII.** Changes of hormone levels in rats orally treated with *Rehmanniae Radix*

Parameter	\ Sex	Male					
	\ Group	C	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
$T_3$		0.746 <sup>a</sup>	0.956	0.713	0.703	0.646	0.606*
		(0.06) <sup>b</sup>	(0.22)	(0.06)	(0.15)	(0.13)	(0.08)
$T_4$		2.815	9.455	5.185	4.640	4.013	3.526
		(0.53)	(3.85)	(0.20)	(1.32)	(1.10)	(0.51)

Thyroxine hormone values at 3 days after treatment of *Rehmanniae Radix*,

a; Values were expressed as mean, b;  $\pm$  S.D., Significantly different from Positive control group(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

이 상이하여 이뇨작용에 관여한다고는 볼 수 없었다.

**노검사 결과** - 숙지황 투여한 rat의 뇨내에서 bilirubin 양성이 실험동물 3예 중 PC군은 3예, S군 2예, SD군 3예, SS군 1예가 각각 나타났으며, urobilinogen 양성은 3예 중 PC군은 3예, S군 1예, SD군 2예, SS군 1예, SSD군 1예가 각각 관찰되었다. 아질산염(nitrite) 양성은 3예 중 대조군 1예, PC군은 3예, S군 1예, SD군 2예, SS군 1예, SSD군 1예가 각각

관찰되었다. 통상적으로 아질산염은 개체가 세균 감염시 증가하는 것으로 알려져 있다. 여기에서 아질산염 양성율은 대조군 33%, PC군 100%, S군 33%, SD군 66%, SS군 33%, SSD군 33%로 각각 나타났으며 위의 결과로 보아 숙지황 투여군에서 PC군에 비해 상대적으로 양성율이 낮게 관찰되었다. 잠혈반응(occult blood)은 PC군 및 SSD군에서 각각 1예씩 관찰되었으나, 골수부전 유발시 cytoxan 1회 복용 투여에

**Table VIII.** Urinalysis in rats orally treated with Rehmanniae Radix

Parameter	\ Sex	Male					
	\ Group	C	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
	\ No. of animals	3	3	3	3	3	3
Glucose (g/dl)		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
Bilirubin		-	+(1)	+(1)	+(1)	+(1)	-
		-	+(1)	-	+(1)	-	-
		-	+(1)	+(1)	+(1)	-	±
Ketone body (mg/dl)		+(1)	±	+(1)	±	±	±
		±	±	±	±	+(1)	±
		+(1)	+(1)	±	+(1)	±	+(1)
Gravity		≤1.005	1.010	1.010	≤1.005	1.025	1.010
		≤1.005	≤1.005	≤1.005	≤1.005	≤1.005	1.015
		≤1.005	≤1.005	≤1.005	≤1.005	≤1.005	1.020
pH		8.5	8.5	8.5	≥9.0	7.5	7.5
		≥9.0	≥9.0	8.5	≥9.0	≥9.0	8.5
		8.5	8.5	≥9.0	≥9.0	≥9.0	8.0
Protein (mg/dl)		+(2)	+(2)	+(3)	+(2)	+(3)	±
		+(3)	+(3)	+(2)	+(3)	+(3)	+(2)
		+(3)	+(3)	+(2)	+(3)	+(2)	+(3)
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)		0.1	1.0	1.0	0.1	1.0	0.1
		0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	0.1
		0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
Nitrite		-	+(1)	+(1)	-	+(1)	-
		+(1)	+(1)	-	+(1)	-	-
		-	+(1)	-	+(1)	-	+(1)
Occult Blood		-	+(1)	-	-	-	+(2)
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
WBC		-	±	±	+(1)	±	-
		±	±	±	+(1)	±	±
		±	+(2)	±	+(1)	±	±

**Table IX.** Incidence of non-neoplastic microscopic findings in rats orally treated with *Rehmanniae Radix*

Organ	\ Sex	Male					
	\ Group	C	PC	S	SD	SS	SSD
	\ Dose(g/kg/day)	0	0	8.33	16.66	8.33	16.66
	\ No. of animal	3	3	3	3	3	3
<b>Liver</b>							
Extramedullary hemopoiesis		0	3	3	3	3	3
Vacuolation		1	1	0	1	0	0
PMN infiltration/peribiliary		0	0	0	1	0	0
Mononuclear cell infiltration/peribiliary		0	0	0	0	0	0
Microgranuloma		0	0	0	2	0	0
Focal necrosis		0	0	0	0	0	0
<b>Spleen</b>							
Extramedullary hemopoiesis		0	3	3	3	3	2
Megakaryocyte hyperplasia		0	3	3	3	3	2
Atrophy		0	0	0	0	0	1
<b>Bone marrow</b>							
Hematopoietic hyperplasia		0	3	3	3	3	3
<b>Kidney</b>							
Mineralization		0	0	1	0	0	0
Nephropathy		1	0	0	0	0	0
Tubular dilatation		0	0	1	0	0	0
Protein cast		0	0	0	0	0	0
Tubular basophilia		0	0	0	0	0	0

의한 개체의 독성 차이에 기인된 것으로 사료된다. 또한 ketone body,<sup>16)</sup> gravity, pH, protein, WBC의 변화(Table 8)는 실험 물질에 의한 것이라고 생각되지는 않으며 환경 조건에 의한 외부적인 차이라고 생각된다.

**조직의 변화** - 골수는 출생 후 조혈의 주가 되며, stem cell에서 적혈구, 단구, 호염구, 호중구, 호산구, 혈소판, 임파구, 형질구로 각각 분화된다. 무치치 대조군에 비해 골수 유발군 모두에서 hematopoietic hyperplasia가 관찰되었다(Table IX). 간 및 신장, 비장 조직에서는 무치치 대조군에 비해 골수유발군에서 간장 및 비장 조직내에 골수의 조혈 작용을 형태학적으로 관찰한 결과 조혈 작용이 왕성하게 일어났으며(photo. 1-6), 특히 비장 조직내의 megakaryocyte가 현미경 한 시야당 많이 관찰되었다(megakaryocyte hyperplasia).

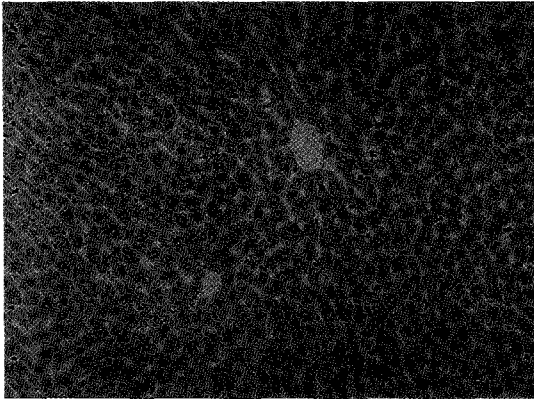
## 고 찰

본 연구에 사용된 숙지황은 『대한약전』에 기록<sup>17)</sup>

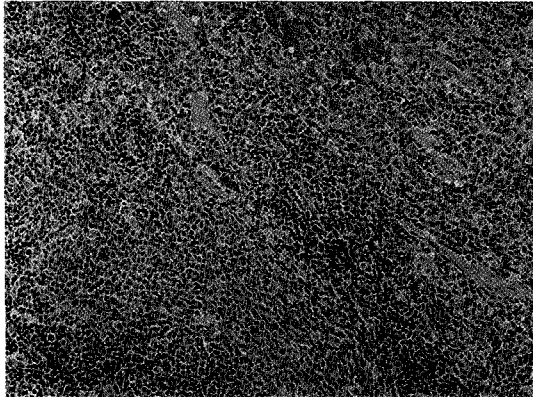
된 생약의 하나로서, 현삼과에 속하는 다년생 초본인 지황의 근경을 썬서 말린 것이다. 표면은 흑갈색~칠흑색의 고르지 않은 덩어리로 질은 연하고 점성이 있으며, 냄새는 없고 단맛이 나면서 약간 쓰다. 한방에서는 자음보혈(滋陰補血)하고 익정진수(益精髓)의 효능이 있어서 간신음허(肝腎陰虛)로 허리와 무릎이 시리고 약하거나 만성적인 발열이 있고 잘 때 식은땀이 나는 경우, 소갈(消渴), 유정(遺精), 얼굴에 혈색이 없고 창백하거나 가슴이 두근거리고 잘 놀라는 경우, 월경(月經)이 불규칙하거나 하혈(下血)이 있을 때, 어지럽고 이명(耳鳴)이 있는 경우에 사용한다. 숙지황의 약리작용(藥理作用)으로 혈당강화작용(血糖強化作用) 및 이뇨작용(利尿作用)과 완하작용(緩下作用) 등이 있으며, 특히 보혈작용(補血作用)이 강하다.

숙지황 제조시 蒸수에 따른 보혈작용을 비교하기 위하여 4중과 8중한 것을 시료로 선정하였으며 4중한 것의 5-HMF 양은 0.021%이고 8중한 것은 0.0422%이었다.

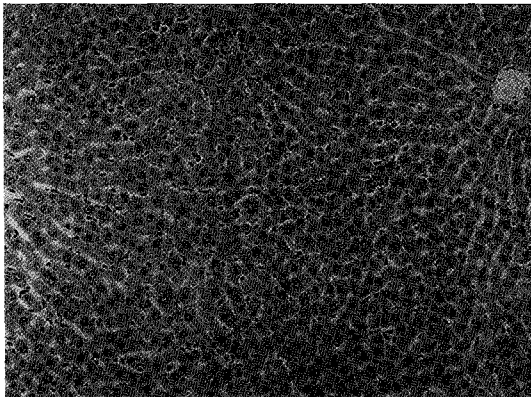




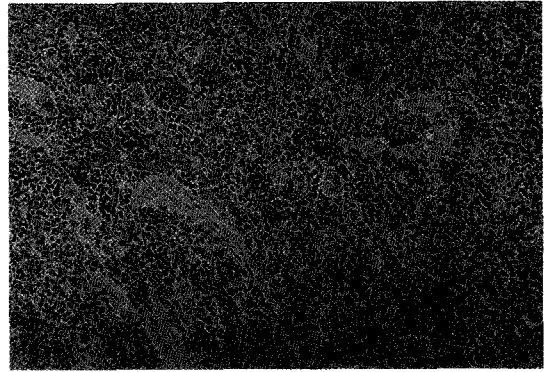
**Photo. 1.** Photomicrograph of control rat liver. Normal arrangement of liver cells around central vein was shown (H & E stain, x100).



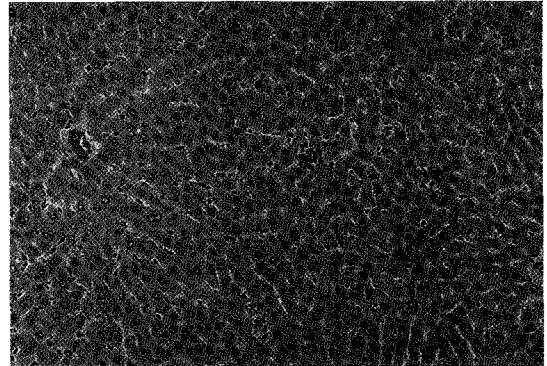
**Photo. 2.** Photomicrograph of the spleen of control rat (H & E stain, x100).



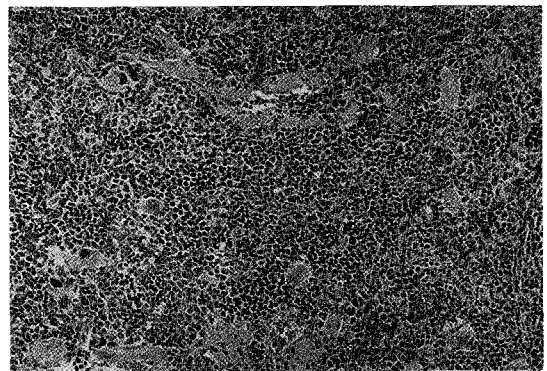
**Photo. 3.** Photomicrograph of Cytoxin(150 mg/kg)-administered and Rehmanniae Radix (4x Steamed double dose, 16.66g/kg)-treated(3 days) rat liver. Megakaryocyte(+2) of liver cells was shown (H & E stain, x100).



**Photo. 4.** Photomicrograph of Cytoxin(150 mg/kg)-administered and Rehmanniae Radix (4x Steamed double dose, 16.66g/kg)-treated(3 days) rat spleen. Megakaryocyte hyperplasia(+3) of spleen cells was shown (H & E stain, x100).



**Photo. 5.** Photomicrograph of Cytoxin(150 mg/kg)-administered and Rehmanniae Radix (8x Steamed, 16.66 g/kg)-treated(3 days) rat liver. Extramedullary hemopoiesis(+2) of liver cells was shown (H & E stain, x100).



**Photo. 6.** Photomicrograph of Cytoxin(150 mg/kg)-administered and Rehmanniae Radix (8x Steamed double dose, 16.66g/kg)-treated(3 days) rat spleen. Extramedullary hemopoiesis(+2) of spleen cells was shown (H & E stain, x100).

Rat(SD)에 cytoxan 150 mg/kg을 투여하여 골수부 전증을 유발시킨 후 숙지황을 3일간 연속 경구투여하여 아래와 같은 실험결과를 얻었다.

1. 시험물질 투여 기간 중 숙지황 투여군에서 새까만 점액성 설사변이 관찰되었다.

2. 체중측정 결과 숙지황 투여군에서 체중 증가폭이 가장 두드러지게 나타났으며 간의 상대적 중량비는 숙지황 투여군에서 대조군과 같이 PC군에 비해 감소하였다.

3. 숙지황을 투여한 부검동물에서 임상소견은 관찰되지 않았으며 PC군 6예에서 간의 변연부가 4예 두터워졌고 비장의 종대가 2예 관찰되었다.

4. 혈액 분석에서 숙지황 투여군에서 RBC와 HGB 및 HCT의 양이 증가하였으나 8중에서만 대조군과 같이 혈소판이 증가하지 않았다. 또한 망상적혈구수는 숙지황 투여군에서 모두 증가하였다.

5. 혈액 생화학적 변화는 숙지황 투여시 8중에서 AST, ALT, ALP, BUN, creatinine이 4중보다 대조군 수치에 비슷하였다.

6. Cytoxan 투여시  $T_3$  및  $T_4$ 의 호르몬 농도가 증가하는 것을 알 수 있었으며 숙지황에 의해 그 양이 감소하는 것을 알았다. 감소의 폭은 8중한 것이 높게 관찰되었다.

7. 숙지황 투여 뇨검사에서 bilirubin 양성은 4중에서 83% 나타났으며 8중에서는 16%만 관찰되었다. 뇨량 및 우수섭취량에서는 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다.

8. 병리조직 검사결과 숙지황 투여군은 cytoxan 투여군에 비해서 골수의 조혈작용의 정도가 다소 낮게 관찰되고 8중한 군이 가장 낮았다.

본 실험에서 Cytoxan 처치후 골수부전을 일으킨 실험동물(SD, rat)에서, 숙지황 연속 3일 경구 투여시 양성 대조군에 비해 혈액, 생화학적 및 체중의 변화를 정상화시키면서 골수의 조혈작용을 다소 억제시키는 것으로 사료된다. 고대 한의서에는 숙지황 상품(上品)은 생지황을 9중 9폭하여 “맛은 옛처럼 달고, 색깔은 옷칠처럼 검고, 윤기나기는 비계처럼 한다”고 하였으며, 위의 실험 결과로 보아 Cytoxan 투여 후, 골수부전이 유발된 SD(rat)에서 숙지황 8중한 것이 4중한 것 보다 대조군에 더 가까운 것으로 판단된다.

## 인용문헌

1. 서덕규, 나중석, 이진섭 등 (1996) Hematology for medical technologists, 175-197. 고문사, 서울.
2. 윤혜숙, 장일무 (1993) Methods in new drugs development from traditional materials, 103-109. 서울대학교 출판부, 서울.
3. 한약연구소위원회 (1986) 한약학, 157-158. 대한약사회, 서울.
4. 한대석 (1997) 생약학, 229-230. 동명사, 서울.
5. 전국한의과대학 본초학교수 (1995) 본초학, 580-581. 영림사, 서울.
6. Buckner, C.D. (1992) High dose cyclophosphamide therapy for malignant disease. *Cancer* 29: 357-365.
7. Chaviano, A.H. (1992) Experimental cytoxan cystitis and prevention by acetylcysteine. *J. Urol.* 134: 598-600.
8. Wallace, H.A. (1982) Principles and Methods of Toxicology, 17-19. New York.
9. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1996) Principles of Biochemistry, 115-343. Worth Publishers, New York.
10. Ziva, J.F. and Pannall, P.R. (1979) Plasma enzymes in diagnosis in clinical chemistry. *In* Diagnosis and Treatment, 15:338-339. Lloyd-Luke, London.
11. Hoyer, S. (1996) Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 165:18-24.
12. Bates, T.E., Almeida, A., Heales, S.J. and Clark, J.B. (1994) Postnatal development of the complexes of the electron transport chain in isolated rat brain mitochondria. *Dev. Neurosci.* 16:321-327.
13. Ekins, R. (1990) Measurement of free hormones in blood. *Endoc. Rev.* 11:5-46.
14. Sterling, K., Hamada, S., Takemura, Y., Brenner, M.A., Newman, E.S. and Inada, M. (1971) Preparation and properties of thyroxine-binding alpha globulin(TBG), *J. Clin. Invest.* 50:1758-1771.
15. 김기홍, 오근영 (1994) Histopathological techniques and staining methods, 35-38. 신광출판사, 서울.
16. Garry, J.D. (1988) New Perspectives in the regulation of ketogenesis. *Diabetes* 28:517-523.
17. 지형준, 이상인 (1998) 대한약전의 한약규격집 주해서, 155-156. 한국메디칼인텍스사, 서울.

(2000년 7월 21일 접수)