대한한방내과학회지 제23권 2호(2002년 6월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2002;23(2):212-221

左歸飮加味方이 조혈작용에 미치는 영향

박신명, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effects of Juakium-derivative on Hematopoietic Effects

Shin-Myoung Park, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objectives : Acording to the fact that Juakium has been frequently used in a lot of prescriptions to tonify bone marrow, We examined the hematopoietic effects of Juakium-derivative on aplastic anemia.

Methods : After C57BL/6 mice were oral administrated with Juakium-derivative and injected with benzene, we counted the number of WBC, RBC, hemoglobin, platelet, nucleated cells and other erythroid parameters and weighed the spleen. Also we measured the expression of $CD34^+$ cell activity and analyzed the bone marrow tissue and spleen tissue histologically.

Results : The results are summerized as follow:

1. The Juakium-derivative plus benzene group showed the improvement in the number of WBC, RBC, hemoglobin, platelet, nucleated cells and other erythroid parameters, compared with the benzene only group.
2. The spleen weight and the percent of $CD34^+$ cell of Juakium-derivative plus benzene group was higher, compared with the benzene only group.
3. The bone marrow tissue and spleen tissue of the Juakium-derivative plus benzene group showed the decrease of the infarcted area compared with the benzene only group.

Conclusions : These results suggest that Juakium-derivative has hematopoietic effects on aplastic anemia induced by benzene through increasing the blood cells and stimulating the activity of $CD34^+$ cells. Therefore it is expected that Juakium-derivative can be used clinically to the patient with hematopoietic system disorder.

Key Words: Juakium-derivative, aplastic anemia, hematopoietic effects

Ⅰ. 緖 論

한의학에서 혈액 생성과정에서 중요한 역할을 하는 장부로는 肝, 脾, 腎이 있다. 腎은 先天之本이고 脾는 後天之本으로서 脾의 氣血化生은 주로 腎에 저장된 精氣의 溫煦 蒸騰작용에 의존하며, 腎에 저장된 精氣는 후천적으로 水穀精微에서 化生된 氣血에 의존한다.[1] 또한 精은 腎에 저장되고 血은 肝에 저장되며, 肝腎同源說에 의하면 腎精과 肝血은 서로 資生轉化한다.[2] 이처럼 脾胃의 血液化生의 기능, 腎의 藏精기능과 肝의 藏血기능이 모두 造血기능에 관여하고 있다.

西醫學에서의 혈액 생성은 임신된 직후 수주 동안은 난황낭에서 造血이 일어난다. 약 6주부터는 난황낭에서의 조혈은 점차 감소되고 肝臟과 脾臟에서 조혈작용이 관찰된다. 임신 6-7개월 이후로는 골수가 조혈작용의 가장 중요한 부위로 자리잡게 되며, 이

· 접수 : 2002년 5월 20일 · 채택 : 2002년 7월 31일
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118, Fax : 02-958-9120, E-mail : hjwoo@khmc.or.kr)

후 소아기, 성인기를 지나면서 골수에서만 조혈작용이 일어나게 된다.[3]

즉 韓醫學的인 血의 개념과 西醫學的인 血의 개념 사이에는 비슷한 점이 있다. 그런데 韓醫學에서는 骨髓에서 血液이 만들어진다고 명확하게 이야기한 곳이 없고 다만 精과 血이 同源이라고 했으며 精은 능히 髓를 생성한다고 했으니, 이로써 보건데 髓와 血 사이에는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.[1]

韓醫學的으로 血의 생성과정에서 精과 血은 同源으로서 精血之間에 相互轉化가 가능하므로 精이 化生하여 血이 될 수 있다고 하였다. 고로 말초혈액의 범혈구감소증과 골수저형성상을 특징으로하는 재생불량성빈혈은 한의학적으로는 腎主骨生髓의 이론에 근거로 腎陰不足과 관련지을 수 있다. 즉 腎精이 虧耗하면 骨髓가 충실하지 못하여 腎陽이 부족하게 되어 타 장기를 溫養하지 못하게 되므로, 心肝脾의 三臟이 俱虛하게 된다.[3] 따라서 혈구생성이 장애를 받게되고 心主血, 肝藏血, 脾統血의 기능이 다 약화되어 貧血, 出血, 血瘀 등의 증후를 발현하게 되는 것으로 보고 있다.

한약물의 조혈작용과 관련된 실험적 연구로 김[4]은 좌귀음가미방이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음을 보고하였고, 이[5]는 수 종 한약재가 마우스의 골수 및 비장세포의 조혈촉진과 방사선방어에 효과가 있음을 보고하였으며, 안[6]은 빈혈, 혈소판감소성자반증, 항암제 또는 방사선 치료로 인한 백혈구 감소증 등 혈액세포 부족으로 인한 질병에 한약물의 유효성이 있음을 보고하였다. 임[7]은 사물탕이 phenylhydrazine으로 유발된 용혈성 빈혈에 대한 항빈혈효과가 있음을 보고하였고, 오[8]와 정[9]은 생약제가 조혈작용에 유의한 효과가 있음을 보고하였다.

이에 저자는 좌귀음가미방의 조혈에 미치는 영향을 연구하기 위해 benzene을 마우스에 주사하여 재생불량성빈혈을 유발한 군과 좌귀음가미방 추출물 투여 8일째부터 benzene을 1주간 3회 투여한 군과의 혈구세포상의 변화를 비교관찰하였다. 또한 조혈모세포의 조혈기능을 판정하기 위해 골수세포의 CD34+ 세포를 산출하고, 골수와 비장의 병리조직을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재 료

1) 시약

Benzene, corn oil, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), formaldehyde, 유세포형광분석에 사용된 PE-anti-CD34는 Pharminogen사(Torreyana, USA)의 제품을 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 동물 및 사육 조건

본 실험을 위하여 사용된 C57BL/6 마우스는 한국화학연구소에서 분양받아 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실

Prescription of Juakium-derivative(JKUD)

약 물	생 약 명	학 명	용량(g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	*Rehmannia glutinosa*	5.3
山藥炒	*Dioscoreae Rhizoma*	*Dioscorea japonica*	2.7
枸杞子	*LycII Fructus*	*Lycium chinense*	2.7
杜 虫	*Eucommiae Cortex*	*Eucommia ulmoides*	2.7
山茱萸	*Corni Fructus*	*Cornus officinalis*	2.5
牛 膝	*Achyranthis Bidentatae Radix*	*Achyranthes japonica*	2.5
菟絲子	*Cuscutae Semen*	*Cuscuta chinensis*	2.5
鹿角膠	*Cervi Cornus Colla*	*Cervus nippon*	2.5
甘草炙	*Glycyrrhizae Radix*	*Glycyrrhiza uralensis*	1.3
Total			24.9

험에 사용하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 左歸飮加味方의 처방구성은 景岳全書[10]에 準하였으며, 사용한 약제는 경희료원 한방병원 약제과에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

4) 좌귀음가미방 추출물 분리

좌귀음가미방은 3첩 분량에 증류수 1300㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입여과하여 이를 감압증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 건조하였으며, 얻어진 건조분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

1) Benzene 조제 및 Aplastic anemia 마우스모델 유발

마우스에 처리하기 위한 benzene은 2ml/kg(20% benzene/corn oil, B20)으로 마우스 등부위에 주사하였다. 주사는 약 50㎕/25g씩 1주 3회(월, 수, 금) 투여하였고, 마지막 투여 48시간 후에 ethyl ether로 마취한 후에 비장, 골수, 혈액 등을 분석하였다.

2) 좌기음가미방 투여

C57BL/6 마우스 30마리를 각각 10마리씩 3군으로 구분한 후 정상군, benzene + corn oil (B20) 대조군, 그리고 14일간 좌기음가미방(612mg/kg) 투여 + benzene + corn oil (B20) 실험군으로 구분하였다. 실험군에서는 좌귀음가미방 투여 8일째부터 benzene을 마우스 등부위에 1주 3회 투여하였다.

3) 비장무게 측정

Benzene(B20) 주사 마지막 투여 48시간 후 비장을 적출하여 electric chemical balance(MC1, Sartolius, Germany)로 0.01g까지 측정하였다.

4) 혈구세포 측정

① 백혈구 수 계산

백혈구 수의 계산은 benzene 처리 48시간 후 심장천자(cardiac puncture)로 채혈한 혈액을 자동혈구측정기(MINOS-Roche, France)로 백혈구 수를 Fonio법[11]에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

② 적혈구 수 및 헤모글로빈 수치 계산

적혈구 수 및 헤모글로빈 수치를 Fonio법[11]에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

③ 혈소판 수 계산

혈소판 수를 Fonio법[11]에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

④ Nucleated 세포수 계산

Nucleated 세포수를 Fonio법[11]에 준하여 Minos-ST로 측정하였다.

⑤ 유세포형광분석기(flow cytometer)를 이용한 $CD34^+$ 세포 분석

Benzene(B20) 마지막 처리 48시간 후 마우스에서 분리한 골수세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고, 세포들을 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN3)로 2회 수세하였다. 4℃에서 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 FITC-anti-CD34를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광분석기(flow cytometer, Becton dickinson, USA)로 면역활성세포를 분석하였다. 골수세포 분석은 CellQuest 프로그램을 이용하여 $CD34^+$ 세포(positive cell)의 비율(gated, %)을 산출하였다.

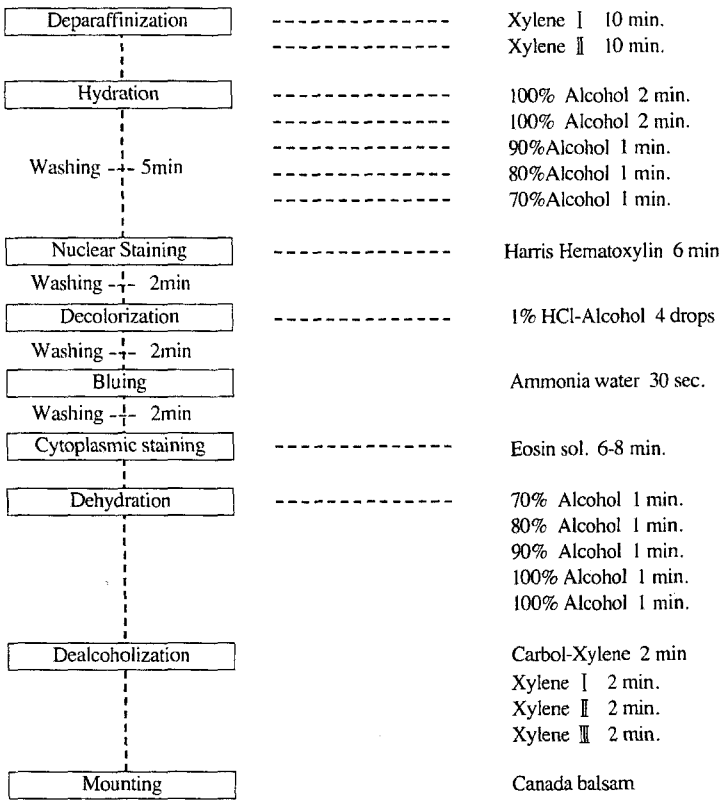
5) 골수 및 비장 병리조직검사

적출한 골수와 비장을 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음,

Scheme 1. Tissue Processing

Fixation	20% formalin 24 hr.
Dehydration	70% Alcohol 30 min.
	80% Alcohol 30 min.
	95% Alcohol 30 min
	100% Alcohol 30 min
	100% Alcohol 30 min.
Dealcoholization	Xylene Ⅰ 30 min.
	Xylene Ⅱ 30 min.
	Xylene Ⅲ 30 min.
Impregnation	Paraffin wax 2 hr
	Paraffin wax 2 hr
Embedding	Paraffin wax
Section cutting	Microtome

Scheme 1. Harris Hematoxylin & Eosin Staining



아래의 scheme 1과 같은 과정을 거쳐 포매한다. 이것을 microtome으로 절편을 만들어 scheme 2와 같은 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin염색을 하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 혈액에 미치는 영향

Benzene 처리 48시간 후에 채혈하여 백혈구, 적혈구, 혈소판, 헤모글로빈의 수치, nucleated cell 수 및 기타 erythroid parameters를 측정하였다.

1) 백혈구 수의 변화

Table 1에서 보는 바와 같이 정상군, benzene을 처리한 군, benzene과 좌귀음가미방 추출물을 병행 처리한 군으로 나누어 실험한 결과 정상군에서는 백혈구 수가 10.8±1.18($\times 10^3$/㎣)이었고, benzene을 처리한 군에서는 4.06±0.08로 감소하였다. 좌귀음가미방 투여군에서는 8.29±0.59로 나타나 benzene을 처리한 군에 비하여 백혈구의 수가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다($P<0.001$).

2) 적혈구 수 및 헤모글로빈 수치의 변화

Table 1에서 보는 바와 같이 정상군에서는 적혈구 수가 8.37±0.22($\times 10^6$/㎣)이었고, benzene을 처리한 군에서는 7.01±0.10으로 감소하였다. 좌귀음가미방 투여군에서는 7.53±0.09로 나타나 benzene을 처리한 군에 비하여 적혈구의 수가 회복되는 것을 관찰

할 수 있었다(P<0.001). 또한 정상군에서는 헤모글로빈 수치가 12.3±0.23(g/dl)이었고, benzene을 처리한 군에서는 10.5±0.11로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군에서는 11.7±0.13으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.001).

3) 혈소판 수의 변화

Table 1에서 보는 바와 같이 정상군에서는 혈소판 수가 7.82±0.28(×10⁵/㎣)이었고, benzene을 처리한 군에서는 5.92±0.44로 감소하였다. 좌귀음가미방 투여군에서는 7.22±0.20으로 나타나 benzene을 처리한 군에 비하여 혈소판의 수가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.05).

4) Nucleated cell에 미치는 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 정상군에서는 neutrophils가 13.1±1.08(%)이었고, benzene을 처리한 군에서는 9.4±1.23(%)으로 감소하였다. 좌귀음가미방 투여군에서는 18.6±1.52(%)로 나타나 대조군에 비하여 neutrophils이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.001). Lymphocytes의 경우 정상군에서는 78.0±0.67(%)이었고, 대조군에서는 70.4±1.50(%)으로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군에서는 76.7±1.20(%)으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.01). Monocytes의 경우 정상군에서는 9.89±0.52(%)이었고, 대조군에서는 12.8±1.08(%)로 증가하였으나, 좌귀음가미방 투여군에서는 9.15±0.42(%)로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.01). Eosinophils의 경우 정상군에서는 0.20±0.05(%)이었고, 대조군에서는 0.48±0.17(%)로 증가하였으며, 좌귀음가미방 투여군에서는 3.09±0.45(%)로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.001).

5) 기타 erythroid parameters에 미치는 영향

Table 3에서 보는 바와 같이 정상 마우스에서는 Hct가 41.0±2.12(%)이었고, benzene을 처리한 군에서는 33.3±1.11(%)로 감소하였다. 좌귀음가미방 투여군에서는 35.7±2.01(%)로 나타나 대조군에 비하여 Hct가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나 통계적 유의성은 없었다. MCH의 경우 정상군에서는 17.2±0.51(pg)이었고, 대조군에서는 13.8±0.25(pg)로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군에서는 15.2±0.41(pg)로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.01). MCHC의 경우 정상군에서는 33.2±0.41(g/dl)이었고, 대조군에서는 32.9±0.34(g/dl)로 감소하였으며, 좌귀음가미방 투여군에서는 33.3±0.25(g/dl)로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나 통계적 유의성은 없었다.

Table 1. Effects of JKUD Extract on the Blood Cells of Mice with Aplastic Anemia Induced by Benzene

Group	Animal No.	Normal	Control	JKUD
WBC(x103/㎣)	10	10.8±1.18	4.06±0.08	8.29±0.59***
RBC(x106/㎣)	10	8.37±0.22	7.01±0.10	7.53±0.09***
PLT(x105/㎣)	10	7.82±0.28	5.92±0.44	7.22±0.20*
Hb(g/dL)	10	12.3±0.23	10.5±0.11	11.7±0.13***

JKUD group was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group took benzene injection only. Analysis was done on hematologic changes as described in materials and methods. Data represent means ± S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*P<0.05, ***P<0.001).

Table 2. Effects of JKUD Extract on the Nucleated Cells of Mice with Aplastic Anemia Induced by Benzene

Group	Animal No.	Normal	Control	JKUD
NE(%)	10	13.1±1.08	9.4±1.23	18.6±1.52***
LY(%)	10	78.0±0.67	70.4±1.50	76.7±1.20**
MO(%)	10	9.89±0.52	12.8±1.08	9.15±0.42**
EO(%)	10	0.20±0.05	0.48±0.17	3.09±0.45***

JKUD group was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group took benzene injection only. Analysis was done on hematologic changes as described in materials and methods. Analysed result was neutrophils (NE), lymphocytes (LY), monocytes (MO), and eosinophils (EO). Data represent means ± S.E (N=10).
Statistically significant value compared with control group data by T test (**P<0.01, ***P<0.001).

Table 3. Effects of JKUD Extract on Other Erythroid Parameters of Mice with Aplastic Anemia Induced by Benzene.

Group	Animal No.	Normal	Control	JKUD
Hct(%)	10	41.0±2.12	33.3±1.11	35.7±2.01
MCH(pg)	10	17.2±0.51	13.8±0.25	15.2±0.41**
MCHC(g/*dl*)	10	33.2±0.41	32.9±0.34	33.3±0.25

JKUD group was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group took benzene injection only. Analysis was done on hematologic changes as described in materials and methods. Analysed result was hematocrit (Hct), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Data represent means ± S.E (N=10).
Statistically significant value compared with control group data by T test (**P<0.01).

Table 4. Effects of JKUD Extract on the Spleen Weight of Mice with Aplastic Anemia Induced by Benzene

Group	Spleen weight change (g)
Normal	0.111 ±0.005
Control(benzene)	0.084 ±0.006
JKUD+benzene (612mg/kg)	0.139 ±0.008***

JKUD group was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group took benzene injection only. Spleen weight was measured as described in materials and methods. The results are expressed as the mean± S.E (N=10).
Statistically significant value compared with control group data by T test (***P<0.001).

Table 5. Representative Flow Cytometric Analyses of the Bone Marrow Cell Population for CD34+ Cells in Mice with Aplastic Anemia Treated with JKUD Extracts

Group	Hematopoietic CD34+ cells (%)
Normal	30.4±0.69
Control(benzene)	5.3±0.16
JKUD+benzene (612mg/kg)	22.8±1.34***

JKUD group was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group took benzene injection only. The bone marrow cells were isolated and incubated with anti-mouse CD34 monoclonal antibody. After twice washings, the cells were incubated with FITC-conjugated anti-rat IgG. The numbers of CD34+ positive cells were analyzed by flow cytometer(FACS) and the other methods for assay were performed as described in materials and methods. The results are expressed as the mean ± S.E (N=10).
Statistically significant value compared with control group data by T test (***P<0.001).

2. 비장무게에 미치는 영향

Table 4 에서 보는 바와 같이 정상 마우스에서는 비장무게는 0.111±0.005(g)이었고, benzene을 처리한 군에서는 0.084±0.006(g)으로 감소하였다. Benzene과 좌귀음가미방을 투여한 군에서는 0.139±0.008(g)로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (P<0.001).

3. 유세포형광분석기를 이용한 골수세포 활성화 분석

좌귀음가미방에 의한 조혈모세포의 활성을 측정하기 위하여 좌귀음가미방을 처리한 후 골수세포를 회수하여 유세포형광분석기를 통하여 각각의 골수활성세포를 분석하였고, 골수세포분석은 CellQuest 프로그램을 이용하여 $CD34^+$ 세포(positive cell)의 비율(gated, %)을 산출하였다(Table 5). 정상군의 $CD34^+$ 세포의 발현율은 30.4±0.69(%)였으며, benzene을 처리한 군에서는 5.3±0.16(%)로 감소하였다. Benzene과 좌귀음가미방 추출물을 병행투여한 군에서는 22.8±1.34(%)로 4배 이상 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(P<0.001).

4. 골수 및 비장의 병리조직상에 미치는 영향

정상군에 비하여 benzene을 투여하여 재생불량성 빈혈을 유발한 마우스군의 골수와 비장의 조직에서

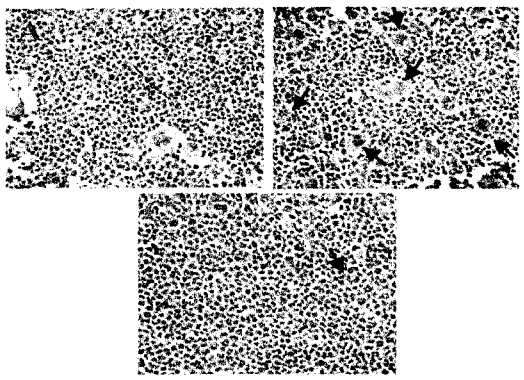


Fig. 1 Histological analysis of bone marrow tissue of mice with aplastic anemia treated with JKUD extracts.
JKUD group (C) was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group (B) took benzene injection only. Normal group (A). The bone marrow tissues were isolated and fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these Infarcted area (arrow) at bright microscope (Nikon, x100).

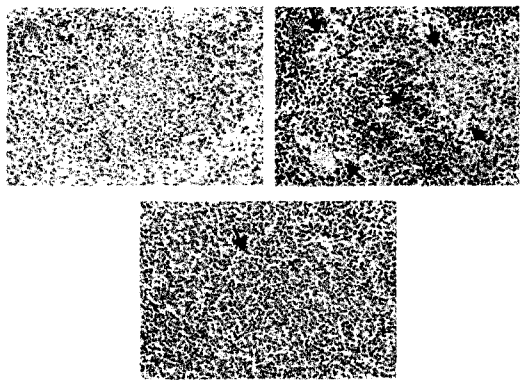


Fig. 2 Histological analysis of spleen tissue of mice with aplastic anemia treated with JKUD extracts.
JKUD group (C) was administered orally with JKUD(612mg/kg) for 14days, and benzene (2ml/kg, s.c injected three times 1, 3, 5day) was injected from the 8th day of JKUD administration. Control group (B) took benzene injection only. Normal group (A). The spleen tissues were obtained and fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin/eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these Infarcted area (arrow) at bright microscope (Nikon, x100).

경색된 부위가 증가하였으나 좌귀음가미방을 투여한 군의 골수 및 비장의 조직을 분석한 결과, 좌귀음가미방 투여군에서 경색된 부위가 유의하게 감소하였다(Fig. 1,2).

Ⅳ. 考 察

재생불량성빈혈은 골수내 조혈모세포의 숫적감소로 인하여 말초혈액의 범혈구감소와 골수내 세포충실도의 감소를 보이는 질환으로[12], 발생빈도는 매년 인구 100만명당 5-10명씩 발생하고 있고[13], 동양권에서 그 빈도가 높은 것으로 알려져 있다.[14] 재생불량성빈혈은 중증의 경우 특별한 치료를 하지 않으면 환자의 과반수가 6개월 이내에 출혈이나 세균감염에 의해 사망하게되나[15] 조혈부전의 기전은 확실히 규명되지 못하고 있다. 조혈모세포 또는 전구세포의 결함이 일차적인 원인으로 지목되고 있고, 이밖에 일부 환자에서는 골수미세환경의 결함이 발견되기도 하고 면역기전에 의한 조혈기능의 억제들이 알려져 있다.[16]

재생불량성빈혈은 선천적 결손 또는 다른 질병과 연관된 화학적 또는 물리적 인자에 노출된 결과로서 또는 미지의 원인에 의한 결과로서 후천적으로 생길 수 있다. 후천적으로 조혈모세포의 직접 손상은 방사선조사, 화학요법, 독소 또는 약제들에 의해 초래될 수 있다.[17] 이중 화학적인 물질로 가장 먼저 의심된 것은 benzene이다. Benzene에 노출된 경우 고용량에서는 혈구감소증을 유발하고 만성적인 접촉에서는 재생불량성빈혈과 백혈병을 유발한다.[3] Benzene에 대한 만성적인 노출로 인체에서의 중성구, 임파구 등 백혈구감소와 급성골수성백혈병, 급성임파성백혈병, 재생불량성빈혈 등 광범위한 혈액질환이 야기됨이 보고되었다.[18,19] 또한 실험동물에서도 benzene을 흡입시키거나 주사해서 benzene이 조혈세포에 유해하다는 점을 여러 가지 방법으로 증명하여 왔다.[20]

재생불량성빈혈은 골수의 조혈장애로 비롯되는 질환으로 그 근원은 腎에 있고 그 관건은 骨髓의 기능에 달려 있다.[3] 素問 · 逆調論에서 腎은 髓이며 骨에서 生하며, 腎이 生하지 못하면 즉 髓도 충만하지 못

한다고 하였으며, 素問 · 痿論에 腎은 一身의 骨髓를 주관한다고 하였다.21 즉 髓는 왕성한 腎氣에 의하여 腎精이 충만하게 되어 化生된 것이다. 결국 한의학 이론상 조혈기능은 肝, 脾, 腎과 밀접한 관련이 있으며, 특히 腎精, 腎陰이 조혈기능의 근간이 됨을 파악할 수 있다. 그러므로 말초혈액의 범혈구감소증과 골수저형성상을 특징으로하는 재생불량성빈혈은 한의학적으로는 腎主骨生髓의 이론에 근거로 腎陰不足과 관련지을 수 있다.

본 연구에서는 재생불량성빈혈을 腎陰虛의 관점에서, 左歸飮을 基本處方으로 左歸飮加味方을 구성하여 실험하였다. 左歸飮은 張[10]이 六味地黃湯에서 凉性의 牡丹皮와 泄腎經之火하는 澤瀉를 去하고 滋補肝腎하는 枸杞子와 益氣健脾하는 炙甘草를 가하여 補而不瀉하고 이외에도 補益腎陰의 효능을 증강시킨 純補壯水之劑로 腎陰虛가 비교적 重한 경우에 사용하는 처방이다.[22]

본 연구에 사용된 左歸飮加味方의 구성약물의 성미와 효능을 살펴보면 熟地黃은 甘 · 微溫 無毒하여 滋陰補血, 益精塡髓하며, 山藥은 甘 · 溫無毒하여 능히 健脾補肺固腎益精하고, 枸杞子는 甘 · 寒無毒하여 滋腎潤肺補肝하며, 炙甘草는 甘 · 平無毒하여 脾胃虛弱症을 다스리며, 山茱萸는 酸澁 · 微溫無毒하여 補益肝腎, 澁精固脫하며, 鹿角膠는 甘鹹 · 溫無毒하고 肝腎으로 歸經하여 補血益精하며, 杜冲은 甘微辛 · 溫無毒하여 補肝腎, 强筋骨하며, 菟絲子는 辛甘 · 溫無毒하여 補肝腎, 益精髓하며, 牛膝은 苦酸 · 平無毒하고 熟用時 補肝腎, 强筋骨한다.[23]

이상의 각 약물의 효능을 종합하여 보면 左歸飮加味方은 左歸飮에 杜冲, 牛膝, 菟絲子, 鹿角膠를 加味하여 補益腎陰과 더불어 補肝腎 및 補血의 효능을 보강한 처방이다.

이에 저자는 左歸飮加味方이 腎陰虛에 활용할 수 있는 점에 착안하여 benzene으로 재생불량성빈혈이 유발된 마우스모델에서 조혈과 면역증강에 어떠한 영향을 주는지 관찰하였다.

본 연구에서는 좌귀음가미방을 14일간 경구투여하고 좌귀음가미방 투여 8일째부터 benzene을 1주일간 3회 주사후 채혈하여 자동혈구측정기로 혈구의 수를 측정하였다. 좌귀음가미방의 백혈구에 대한 영향은 정상군이 10.8±1.18이었고, benzene을 처리한 대조군은 4.06±0.08로 감소하였다. 좌귀음가미방을 투여한 군은 8.28±0.59로 백혈구 수가 유의성 있는 증가를 보였다($P<0.001$). 적혈구는 정상군에서 8.37±0.22이었고, 대조군은 7.01±0.10으로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군은 7.53±0.09로 유의성 있는 증가를 보였다($P<0.001$). 헤모글로빈은 정상군에서 12.3±0.23이었고, 대조군은 10.5±0.11로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군은 11.7±0.13으로 유의성 있는 증가를 보였다($P<0.001$). 혈소판은 정상군에서 7.82±0.28이었고, 대조군은 5.92±0.44으로 감소하였으나, 좌귀음가미방 투여군은 7.22±0.20으로 유의성 있는 증가를 보였다($P<0.05$). 즉 좌귀음가미방은 재생불량성빈혈의 혈구상에 있어서 개선효과가 있음을 확인할 수 있었다.

좌귀음가미방의 nucleated cell에 대한 영향은 neutrophils과 lymphocytes의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 상대적으로 감소되었으며, 좌귀음가미방 투여군에서는 유의성 있게 상대적으로 증가되었다. 또한 좌귀음가미방 투여군에서는 대조군에 비해 Hct와 MCHC가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나 통계적 유의성은 없었으며, MCH의 경우 대조군에 비해 좌귀음가미방 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다($P<0.01$). 이는 재생불량성빈혈로 인하여 면역기능이 저하된 마우스에서 좌귀음가미방 투여시 현저한 면역회복현상이 나타남을 알 수 있었다.

조혈모세포의 조혈 기능을 판정하는 방법으로는 조혈모세포의 표면에 발현하고 있는 표현형인 cluster differenciation 또는 designation(CD) 항원을 이용하는 방법과 집락형성능으로 조혈 기능을 검사하는 방법이 있다.[24-26] 본 연구에서는 마우스에 좌귀음가미방을 투여한 후 골수세포를 회수하여 유세포형광분석기를 통하여 골수활성세포를 분석하였다. 대조군의 $CD34^+$ 세포의 발현율은 5.3±0.16(%)에 비하여 좌귀음가미방 투여군에서는 22.8±1.34로 4배 이상 증가하였다. 이는 좌귀음가미방이 골수세포 및

$CD34^+$ 조상세포를 자극하여 $CD34^+$ 세포의 활성도를 증가시켜 조혈모세포의 조혈활성을 촉진시키는 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

비장은 마우스와 기타 동물에서는 조혈기능의 주요 부위이며, 혈구와 혈소판의 저장기관으로 알려져 있다. 사람에 있어서는 성인의 경우 조혈기능이 대부분 골수에서 일어나지만, 태아기 때나 골수의 비정상적 확장에 의한 질환시에는 비장에서도 조혈작용이 일어난다. 따라서 마우스의 비장은 면역기능과 조혈기능의 실험재료로서 적절하다.[27] 본 연구에서는 benzene 주사 7일 후 비장을 적출하여 무게를 측정한 결과, 정상군은 0.111±0.005(g)이었고, benzene 처리군에서는 0.084±0.006(g)으로 감소하였으며, 좌귀음가미방 투여군에서는 0.139±0.008(g)로 증가되었다 ($P<0.001$). 이는 좌귀음가미방 추출물이 비장에 유의한 영향을 미쳐 면역기능과 조혈기능의 향상을 가져옴을 확인할 수 있었다.

또한 benzene 처리군과 좌귀음가미방 투여군의 골수와 비장의 조직을 분석한 결과, 좌귀음가미방 투여군에서 경색된 부위가 유의하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

이상에서 좌귀음가미방은 골수기저세포와 조혈모세포 등을 자극하여 $CD34^+$ 조상세포를 자극하여 $CD34^+$ 세포의 활성도를 증가시킴으로써 조혈모세포의 조혈활성을 촉진시키는 작용이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 좌귀음가미방의 투여는 재생불량성빈혈에 있어서 혈구생성 및 비장무게를 증량시킴으로써 조혈 및 면역기능의 증진의 효능이 있음을 알 수 있었다.

Ⅴ. 結 論

좌귀음가미방의 조혈에 미치는 영향을 연구하기 위하여, benzene으로 유발된 재생불량성빈혈 마스군과 좌귀음가미방 경구 투여와 benzene 주사를 병행한 마우스군과의 혈구, 비장무게, 골수세포 활성도 및 골수와 비장의 조직적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 좌귀음가미방은 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈 및 혈소판치를 유의하게 증가시켰으며, nucleated cell에서도 neutrophils, lymphocytes, monocytes 및 eosinophils을 각각 유의성 있게 정상화시켰다. 또한 erythroid parameters에 미치는 영향은 MCH를 유의하게 증가시켰으나, Hct 및 MCHC는 증가경향은 있었으나 유의성은 없었다.

2. 좌귀음가미방은 비장무게를 유의하게 증가시키고, 비장조직의 경색을 현저하게 감소시켰다.

3. 좌귀음가미방은 $CD34^+$ cell의 발현률을 유의하게 증가시키고, 골수조직의 경색을 현저하게 감소시켰다.

이상에서 좌귀음가미방은 실험적 재생불량성빈혈에 조혈활성을 뚜렷하게 촉진시키고 면역기능을 증진시키는 효능을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 재생불량성빈혈의 임상적 치료에 활용할 수 있는 최소한의 근거를 제시한 것으로 사료된다.

参考文獻

1. 김완희, 최달영. 장부변증논치. 서울:성보사;1985,57-59,63-65.
2. 박찬국 편석. 장상학. 서울:성보사;1992,28-67,214.
3. 전국한의과대학 간계내과학교수 공저. 간계내과학. 서울:동양의학연구원;2001,441,531-540.
4. Kim Sun-min, Lee Jang-hoon, Woo Hong-jung. The Effect of Juakium-derivative on Aplastic Anemia. Journal of Oriental Medicine 1997;2(1):55-65.
5. 이능기, 최승훈, 안규석. 수 종 한약재가 마우스의 골수 및 비장세포의 조혈촉진과 방사선 방어에 미치는 영향. 경희한의대 논문집 1996;19(2):157-173.
6. 안희덕. 사물탕의 항암제 부작용에 관한 실험적 연구. 동의병리학회지 1995;10:341-359.
7. 임석린. 사물탕과 사물탕 구성약물이 혈구감소증에 미치는 영향에 관한 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집 1999;8(1):837-851.
8. 오덕자, 박명의, 박성섭, 윤종현, 조한인. 생약제의 조

혈촉진작용에 관한 실험적 연구. 대한혈액학회지 1996;31:2.225-234.

9. 정미경, 김옥경, 장일무, 박명희, 김상인. 생약제 9종이 조혈작용에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한혈액학회지 1993;28(2):285-297.
10. 장개빈. 경악전서(하). 서울:대성출판사;1988,416-417쪽.
11. Hoffler U, Oette K. Comparative studies on four thrombocyte counting methods: counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon Auto-Counter. Z Klin Chem Klin Biochem 1974;12(5):198-206.
12. Camitta BM, Storb R, Thomas DE. Aplastic anemia. N Engl J Med 1982;306:645.
13. May JY, Baumelou E, Guiguet M. Epidemiology of aplastic anemia in France: A prospective multicentric study. Blood 1990;75:1646-1653.
14. Young NS, Issaragrasil S, Chieh CW, Takaku F. Aplastic anemia in the orient. Br J Haematol 1986;62:1-6.
15. Gale RP, Champlin RE, Freg SA, Fitchen JH. Aplastic anemia : Biology and treatment. Ann Intern Med 1981;95:477.
16. 조덕연, 김철희, 배광봉, 김현수, 박상준, 김종숙 등. 재생불량성빈혈 환자에서 혈청 Stem Cell Factor(SCF) 치 및 재조합 인 SCF의 조혈집락세포 성장에 대한 영향. 대한혈액학회지 1997;32(2):203-213.
17. 권헌영, 김영주, 노명희, 문홍만, 송재웅, 오현숙 등. 혈액학. 서울:고려의학;1993,245.
18. Cohen HS, Freedman ML, Goldstein BD. The problem of benzene in our environment. Amer J Med Sci 1978;275:124-136.
19. Rinsky RA, Smith AB, Hornung R. Benzene and leukemia: An epidemiologic risk assessment. New Engl J Med 1987;316:1044-1050.
20. 조현찬, 김상인. 벤젠 대사산물이 마우스 골수 간질세포에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한혈액학회지 1988;23(1):1-15.
21. 홍원식. 정교황제내경. 서울:동양의학연구원 출판부;1981,70,88-89쪽.
22. 楊蘊祥. 古今名方. 河南科學技術出版社;1983,132-133.
23. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사;1992,427,537,540,547,556,568,580,596,626.
24. Harrison DE, Jordan CT, Zhang RK, et al.. Primitive hemopoietic stem cells: Direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. Exp Hematol 1993;21:206-219.
25. 전진우, 홍대식, 서원석, 김숙자, 박성규, 원종호 등. 냉동 전 및 후에서 제대혈 CD34 양성 조혈모세포의 조혈기능 비교. 대한조혈모세포이식학회지 1997;2:113-122.
26. 성기웅, 유경하, 고상혁, 윤계진, 장필상, 강형진 등. Limiting dilution assay를 이용한 long-term culture-initiating cells의 정량. 대한조혈모세포이식학회지 1997;2:123-131.
27. 성호경, 이상돈. 생리학 제5판. 서울:도서출판 의학문화사;1991,94-106.