

當歸補血湯과 erythropoietin이 cyclophosphamide로 유도된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향 비교 연구

강순아 · 장문석¹ · 오명숙² · 김도림² · 김지숙² · 박성규^{2*}

건국대학교 응용생물화학과 생명분자정보화센터, 1: 하버드대학교 의과대학 소아병원, 2: 경희대학교 한의과대학

Comparison of Dangguibohyel-tang and Erythropoietin on Cyclophosphamide-induced Anemia in Rats

Soon Ah Kang, Mun Seog Chang¹, Myung Sook Oh², Do Rim Kim², Ji Sook Kim², Seong Kyu Park^{2*}

Department of Applied Biology & Chemistry, Konkuk University,

1: Department of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard Medical School,

2: College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

The aim of this study was to elucidate the mechanism of anemia associated with Dangguibohyel-tang (DBT) in rats. Using cyclophosphamide-induced (30mg/kg BW) anemic rats, changes in weight gain, the levels of red blood cell (RBC), hematocrit (Hct), platelet and hemoglobin (Hgb), serum vitamin B12, ALT(GPT) levels and erythropoietin (EPO) gene expression were monitored, and compared with DBT (1,000mg/kg BW, 14d)-treated and EPO (1,000IU/kg BW, 14d, s.c.)-treated rats. Food efficiency ratio (FER) were 31.6% in normal group, 28.1% in cyclophosphamide-induced control group, 31.7% in DBT-treated group and 25.1% in EPO-treated group after 14 days. The levels of red blood cell (RBC), hematocrit (Hct), platelet and hemoglobin (Hgb) of DBT-treated group were significantly higher than those of control. And DBT extract administered group showed dominant effects on the recovery of Hgb level. Serum vitamin B12 and ALT(GPT) levels were significantly increased at DBT-treated groups. EPO gene expression was decreased 91.9% in control group, 79.6% in DBT-treated group and 53.9% in EPO-treated group, respectively. These results suggest that administration of DBT could prevent human patient from chemotherapy derived anemia by improving hematological value and EPO status.

Key words : cyclophosphamide, Dangguibohyel-tang (DBT), erythropoietin (EPO), anemic condition

서 론

종양에 대한 치료법으로 항암제를 투여하는 화학요법이 가장 많이 사용되고 있는데, cyclophosphamide는 항암범위가 넓어 각종 병용요법의 기본약물로 사용되는 약제로써 투여 후 심한 골수억제로 인한 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 황달, 대장염, 신우내 출혈 등의 부작용을 유발하며 특히 빈혈증상을 악화시킨다¹⁻³. 항암치료의 부작용으로 발생하는 재생불량성 빈혈은 조혈세포의 감소와 체내 erythropoietin의 생성저하로 인해 헤모글로

빈 농도의 저하와 빈혈증상을 유발한다⁴. 이러한 증상에 대해 수혈을 하거나 약물치료로서 erythropoietin을 투여하여 빈혈을 치료하고 있으나 혈구증가나 증세호전의 효과가 일시적이어서 근본적인 질환의 호전은 기대할 수 없다⁵.

빈혈은 적혈구 수 또는 헤모글로빈의 농도가 정상수준 이하로 감소하게 되면 발생한다⁶. 빈혈은 발생 원인에 따라 출혈성, 용혈성, 철분 및 비타민 B12 등의 영양소 결핍, 또는 다른 질환에 의한 적혈구 생산부족, 선천성, 약물치료에 의한 재생불량성 빈혈 등으로 구분한다^{7,8}. 최근까지 빈혈에 대한 실험연구는 한약재를 이용하거나 복합처방을 대상으로 조혈작용에 대한 연구가 보고되었으나, 빈혈의 유발방법에 있어서 동물실험모델로서 출혈을 야기하거나 용혈성 빈혈환자를 대상으로 한 연구에 국한되었다. Cyclophosphamide로 인한 빈혈에 관한 실험은 當歸에 대한

* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : cervus@chol.com, · Tel : 02-961-0330

· 접수 : 2005/09/27 · 수정 : 2005/12/30 · 채택 : 2006/01/27

연구가 보고된 바 있으나^{9,10}, 복합처방에 대한 cyclophosphamide로 인한 항암제 투여 후 발생하는 약물치료에 의한 빈혈에 대한 연구는 아직 수행되지 않았다.

當歸補血湯은 『內外傷辨悉論』에 수록된 이후 補氣生血의 효능으로 血虛로 인한 發熱, 頭痛 등에 주로 활용되어 온 처방이다¹¹). 당귀보혈탕의 구성약물은 黃芪와 當歸 두 가지 약물이며, 구성 비율은 5:1의 중량비율로 배합되어 있는 것이 특징이다.

항암치료 중 발생하는 빈혈 증상의 예방 및 치료에 적합한 한약 치료제를 개발하기 위하여 항암제인 cyclophosphamide로 빈혈을 유발시킨 흰쥐에 當歸補血湯이 빈혈 회복에 미치는 영향을 연구한 바, 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료 및 동물

1) 실험동물

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(샘타코, 한국)를 고형사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경(온도 22±2℃, 습도 55±5%, light/dark 12h)에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재 및 시약

실험 약제인 當歸는 강원도 평창군 진부면에서 구입하였고, 黃芪는 경동한약재 시장에서 구입하였다. Cyclophosphamide는 alkroxan 500mg (Choongwae Pharma Co., Korea)을, recombinant human erythropoietin (rHuEPO)은 recormon inj. PFS 1,000IU (Choongwae Pharma Co., Korea)으로 사용하였다. CLNM Fe (Wako, Japan) 시약, Cobas integra transferrin (Roche, Germany), simul TRAC-SNB radioassay (Icn, U.S.A.)를 사용하였으며, 그 외 실험에 사용한 시약은 Bayer사(Germany) 제품을 사용하였다.

3) 검액의 조제

약재 300 g을 round flask에 넣고 증류수 6,000ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 다음 여과지로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 농축액을 동결건조하여 사용하였다(수율 22.2%).

2. 방법

1) 실험군 및 검액 투여

정상군 (Normal, 8마리), 빈혈유발-정상식이-식염수군 (Control, 8마리), 빈혈유발-정상식이-당귀보혈탕추출물 투여군 (DBT, 8마리), 빈혈유발-정상식이- erythropoietin 투여군(EPO, 8마리)으로 나누었다. 실험군의 빈혈유발은 cyclophosphamide를 30mg/kg BW/day로 3회 복강 투여하였다. 당귀보혈탕 추출물을 1,000mg/kg BW/day로 14일동안 경구 투여하였다. 양성대조 약물로서 erythropoietin 투여군은 1,000IU/kg BW/day로 1주일 동안 3회씩 피하 주사로 14일 동안 투여하였다. 실험시작 14일 후에 희생하여 혈액을 채취하였다.

2) 식이 효율

모든 실험동물의 식이는 자유섭취방법으로 공급하였다. 실험기간 동안 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 2일 간격으로 측정하였다. 식이 효율 (food efficiency ratio: FER)은 실험 시작일 부터 희생일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

$$FER = \text{weigh gain (g/day)} / \text{food intake (g/day)}$$

3. 혈액채취 및 분석

1) 혈액 채취

혈액은 희생시에 heart puncture방법으로 5ml를 채취하였고, 1ml은 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 처리된 blood collection tube (BD vacutainer, USA)에 균등질이 되도록 잘 흔들어 4℃에 보관해 48시간이내에 complete blood count (CBC) 등을 측정하였다. 나머지 혈액은 생화학적 측정을 위하여 EDTA free tube에 담아 tabletop centrifuge vs-5000n (Vision scientific Co, Korea) 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 이 시료는 분석전까지 -70℃에 보관하였다.

2) 혈액 분석

EDTA tube에 담은 전혈 (whole blood)은 적혈구 수 (red blood cell, RBC), 백혈구 수 (white blood cell, WBC), 혈색소 (hemoglobin, Hgb) 농도, 적혈구 용적 (hematocrit, Hct), 평균적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구 혈색소량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판 수 (platelet count)를 ADIVATM 120 hematology system (Bayer co. U.S.A.) 기기를 사용하여 측정하였다.

혈중 AST(GOT) 및 혈중 ALT(GPT) 함량과 혈중 iron 함량 및 혈중 철결합 능력(total iron binding capacity, TIBC)은 ADIVA 1650 (Bayer, Germany) 기기를 사용하여 측정하였다. Transferrin 포화도(TS)는 Cobas integra (Roche, Germany) 기기로 측정하였으며, 혈중 비타민 B12 함량은 gamma counter (Hewlett Packard, U.S.A.) 기기로 측정하였다.

4. RNA isolation and RT-PCR assay

각각의 실험군 신장에서 발현되는 EPO 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR를 시행하였다.

1) Total RNA isolation

Total RNA는 Trizol (Invitrogen U.S.A.)을 사용하여 추출하였다. 조직당 적량의 Trizol을 가하여 vortexing으로 분쇄한 후 실온에 5분간 방치한 후 1/5 분량의 chloroform을 넣고 섞었다. 소형 원심분리기 (Eppendorf, U.S.A.)를 이용하여 4℃, 12,000×g에서 15 분간 원심분리 하여 상층액을 수거하고 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침전시켰다. 얻어진 RNA 침전물을 DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 처리된 멸균수에 녹였다.

2) cDNA synthesis and PCR-amplification

cDNA는 65℃에서 denatured된 total RNA 5 ug, oligo (dT) primer, MMLV reverse transcriptase를 사용하여 42℃에서 1 시

간 반응시켜 합성하였다. 99°C에서 5분간 가열하여 MMLV reverse transcriptase의 활성을 제거하고 얼음에서 급냉시켰다. 위의 과정에서 생성된 단일가닥의 cDNA 5 µl를 주형으로 하여 10×PCR-buffer 2.5 µl, 25 mM MgCl₂ 1 µl, dNTPs 1 µl, Taq DNA polymerase (2.5U) 0.5 µl, 유전자의 고유한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 95°C에서 5분 반응시킨 후 95°C에서 30 초, 54°C에서 1 분, 72°C에서 1 분을 30cycle 실시하였고 마지막에 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR에 사용한 rat EPO gene primer는 forward 5-GTACATCTTGGAGCCAAGG-3 reverse 5-GTATCGGCTGAAGTGTTCG-3이 사용되었다. PCR은 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, U.S.A.)를 사용하여 수행되었다. 365 bp PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인되었다.

5. 통계처리

실험성적은 평균치±표준오차(Mean±SD)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 체중과 식이 효율

실험기간 최종체중은 CYP를 투여한 대조군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았고, CYP 투여 후 당귀보혈탕 투여군은 대조군에 비해 체중이 유의적으로 높았다. 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군은 대조군에 비해 체중이 회복되지 않았다.

식이효율은 정상군과 대조군에서 각각 31.6%와 28.1%로 관찰되었다. 당귀보혈탕 투여군 및 erythropoietin 투여군에서는 각각 31.7% 및 25.1%의 순서로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Weight Gain, Food Intake and Food Efficiency Ratio (FER) of Experimental Animals

| Groups ¹⁾ | Initial weight (g) | Final weight (g) | Weight gain (g/day) | Food Intake (g/day) | FER |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| Normal | 136.1 ± 6.0 ²⁾ | 247.8 ± 11.0 | 7.4 ± 0.4 | 23.4 ± 3.5 | 0.316 |
| Control | 125.7 ± 10.2 [#] | 204.2 ± 11.5 ^{###} | 5.2 ± 0.7 ^{##} | 18.5 ± 2.8 [#] | 0.281 |
| DBT | 125.1 ± 9.1 | 213.8 ± 13.9 | 5.9 ± 0.6 [*] | 18.6 ± 3.2 | 0.317 |
| EPO | 124.9 ± 5.5 | 200.8 ± 8.5 | 5.1 ± 0.5 | 20.3 ± 3.5 | 0.251 |

1) Normal: cyclophosphamide non-treated group. Control: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.). DBT: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Dangguibohyel-tang(DBT) extract (1,000mg/kg BW, 14d). EPO: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and subcutaneous injection of erythropoietin (1,000U/kg BW, 14d). 2) Values are Mean ± S.D. # Significantly different from the normal value (#: p<0.05, ##: p<0.01 and ###: p<0.001). * Significantly different from the control value (*: p<0.05, **: p<0.01 and ***: p<0.001)

2. 혈액 분석

1) 적혈구(red blood cell, RBC) 변화

정상군에 비하여 대조군의 적혈구수는 유의한 감소를 보였고 (6.3±0.2 (×10⁶) vs 5.7±0.3 (×10⁶), p<0.001), 당귀보혈탕 투여군에서는 6.1±0.2 (×10⁶)으로 유의성있는 회복 효과가 관찰되었으며 (p<0.01), 양성대조약물로서 호혈제인 erythropoietin 투여군에서는 6.8±0.3 (×10⁶)으로 유의성있게 회복되었다 (p<0.001)(Fig. 1).

2) 백혈구수 (white blood cell, WBC) 변화

대조군의 백혈구수는 유의한 감소를 보였고 (9.7±1.6 (×10³) vs 4.0±1.3 (×10³), p<0.001), 당귀보혈탕 투여군에서는 5.7±0.4 (×10³)으로 유의성있는 회복 효과가 관찰되었으며 (p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 8.2±1.2 (×10³)으로 유의성있게 회복되었다 (p<0.001)(Fig. 1).

3) 혈색소 (hemoglobin, Hgb) 농도 변화

대조군의 혈색소 농도는 유의한 감소를 보였고 (12.9±0.5 g/dl vs 11.9±0.8 g/dl, p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 12.7±0.3 g/dl으로 유의성있는 회복 효과가 관찰되었으며 (p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 14.0±0.8 g/dl으로 유의성 있게 회복되었다 (p<0.001)(Fig. 1).

4) 적혈구 용적 (hematocrit, Hct) 변화

대조군의 적혈구 용적은 유의한 감소를 보였고 (39.5±1.7 % vs 37.2±0.8 %, p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 38.6±0.9 %로 유의성있는 회복 효과가 관찰되었으며 (p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 45.5±1.6 %로 유의성 있게 회복되었다 (p<0.01)(Fig. 1).

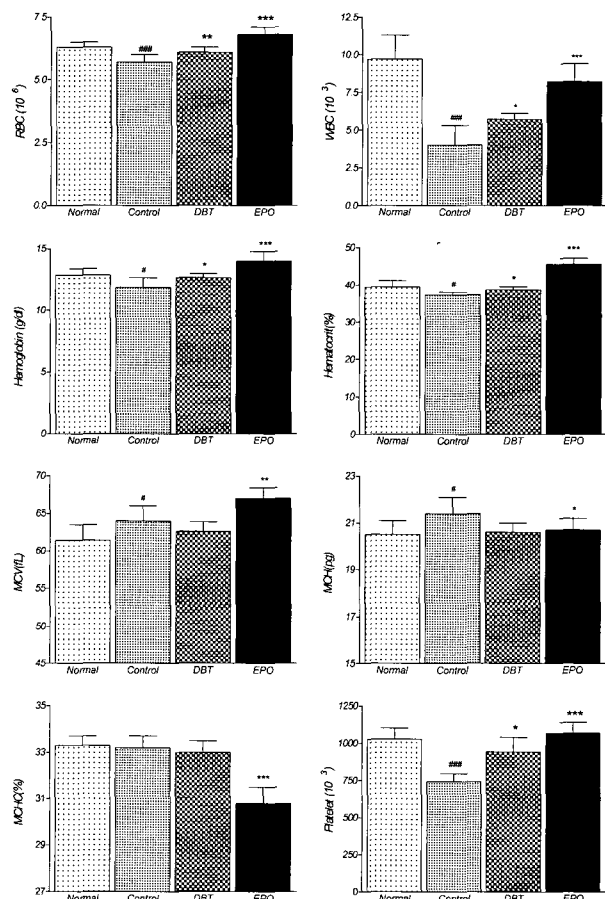


Fig. 1. Effects of administration of DBT extract on RBC, WBC, Hgb, Hct, MCH, MCHC, platelet count levels in cyclophosphamide-induced anemic rats. 1) Normal : cyclophosphamide non-treated group. Control: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.). DBT: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Dangguibohyel-tang(DBT) extract (1,000mg/kg BW, 14d). EPO: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and subcutaneous injection of erythropoietin (1,000U/kg BW, 14d). 2) Values are Mean ± S.D. # Significantly different from the normal value (#: p<0.05, #: p<0.01 and ###: p<0.001). * Significantly different from the control value (*: p<0.05, **: p<0.01 and ***: p<0.001)

5) 평균적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV) 변화
 정상군의 평균적혈구 용적은 61.4±2.1 fL에 비하여 대조군은 64.0±2.0 fL로 유의성있는 증가를 보였고 (p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 62.6±1.3 fL로 감소 효과가 관찰되었으며, erythropoietin 투여군에서는 67.0±1.4 fL로 유의성 있게 증가되었다 (p<0.01)(Fig. 1).

6) 평균적혈구 혈색소량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) 변화

정상군의 평균적혈구 혈색소량 20.5±0.6 pg에 비하여 대조군은 21.4±0.7 pg로 유의성있는 증가를 보였고 (p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 20.6±0.4 pg로 유의성있는 감소 효과가 관찰되었으며 (p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 20.7±0.5 pg로 감소되었다.

7) 평균적혈구 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 변화

정상군의 평균적혈구 혈색소 농도 33.3±0.4 %에 비하여 대조군은 33.2±0.5 %로 감소를 보였고, 당귀보혈탕 투여군에서는 33.0±0.5 %로 감소 효과가 관찰되었으며, erythropoietin 투여군에서는 30.8±0.7 %로 유의성 있게 감소되었다 (p<0.001)(Fig. 1).

8) 혈소판 수 (platelet count) 변화

정상군의 혈소판 수 1027.4±74.4 (×10³)에 비하여 대조군은 741.3±54.5 (×10³)으로 유의성있는 감소를 보였고 (p<0.001), 당귀보혈탕 투여군에서는 941.3±98.8 (×10³)으로 유의성있는 회복 효과가 관찰되었으며 (p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 1066.2±74.3 (×10³)으로 유의성 있게 회복되었다 (p<0.001)(Fig. 1).

3. 혈액 생화학적 분석

1) 혈중 AST(GOT) 함량

정상군의 혈중 AST 함량 100.0±14.6 U/I에 비하여 대조군은 104.7±10.9 U/I으로 나타났으며, 당귀보혈탕 투여군에서는 103.0±7.1 U/I 및 erythropoietin 투여군에서는 100.5±6.2 U/I 으로 유의성을 관찰할 수 없었다.

2) 혈중 ALT(GPT) 함량

정상군의 혈중 ALT 함량 44.7±5.8 U/I에 비하여 대조군은 46.9±4.1 U/I으로 유의한 상승을 보였고 (p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 40.6±4.0 U/I으로 유의한 회복 효과를 관찰할 수 있었고 (p<0.01), erythropoietin 투여군에서는 48.1±5.8 U/I으로 상승되었음을 관찰할 수 있었다.

3) 혈중 철분 (iron) 함량

정상군의 혈중 철분 함량 203.9±25.7 µg/dl에 비하여 대조군은 167.0±34.0 µg/dl로 유의한 감소를 보였으나 (p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에서는 200.6±39.7 µg/dl로 회복 효과를 관찰할 수 있었고, erythropoietin 투여군에서는 233.5±39.3 µg/dl로 유의성있게 상승되었음을 관찰할 수 있었다 (p<0.05).

4) 혈중 철결합능력 (total iron binding capacity, TIBC)

TIBC는 트랜스페린에 있는 free iron binding site의 수와 관련된 것으로 철결합시에 빠르게 증가하게 되는데 정상군의 혈중 TIBC 함량 454.6±27.7 µg/dl에 비하여 대조군은 488.1±29.3 µg/dl로 유의한 상승을 보였고 (p<0.05), 당귀보혈탕 투여군에

서는 473.5±23.8 µg/dl로 회복 효과를 관찰할 수 있었고, erythropoietin 투여군에서는 449.3±14.4 µg/dl로 유의성있게 회복되었음을 관찰할 수 있었다 (p<0.01).

5) 혈중 비타민 B12 함량

정상군의 혈중 비타민 B12 함량 1680.6±161.9 pg/ml에 비하여 대조군은 1427.9±74.7 pg/ml으로 유의한 감소를 보였고 (p<0.01), 당귀보혈탕 투여군에서는 1576.2±157.9 pg/ml으로 유의성있는 우수한 회복 효과를 관찰할 수 있었고(p<0.05), erythropoietin 투여군에서는 1509.2±59.3 pg/ml으로 유의성있는 회복 효과를 관찰할 수 있었다 (p<0.05).

6) 혈중 ferritin 농도

혈중 ferritin 농도에서 정상군의 혈중 ferritin 함량 0.16±0.21 ng/ml에 비하여 대조군은 0.30±0.16 ng/ml로 상승을 보였고, 당귀보혈탕 투여군에서는 0.23±0.18 ng/ml로 회복 효과를 관찰할 수 있었고, erythropoietin 투여군에서는 0.13±0.15 ng/ml로 유의성있게 회복되었음을 관찰할 수 있었다 (p<0.05)(Table 2).

Table 2. Effects of Administration of DBT Extract on Serum AST, ALT, Iron, TIBC and Vitamin B12 Level in Cyclophosphamide-induced Anemic Rats

| Groups ¹⁾ | AST (U/l) | ALT (U/l) | Iron (µg/dl) | TIBC (µg/dl) | Vitamin B12 (pg/ml) |
|----------------------|--------------------------|------------|--------------|--------------|---------------------|
| Normal | 100.0±14.6 ²⁾ | 44.7±5.8 | 203.9±25.7 | 454.6±27.7 | 1680.6±161.9 |
| Control | 104.7±10.9 | 46.9±4.1* | 167.0±34.0* | 488.1±29.3* | 1427.9±74.7** |
| DBT | 103.0±7.1 | 40.6±4.0** | 200.6±39.7 | 473.5±23.8 | 1576.2±157.9* |
| EPO | 100.5±6.2 | 48.1±5.8 | 233.5±39.3* | 449.3±14.4** | 1509.2±59.3* |

1) Normal: cyclophosphamide non-treated group. Control: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.). DBT: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Danggui-bohyeol-tang(DBT) extract (1,000mg/kg BW, 14d). EPO: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and subcutaneous injection of erythropoietin (1,000IU/kg BW, 14d). 2) Values are Mean ± S.D. # Significantly different from the normal value (#: p<0.05 and ##: p<0.01). * Significantly different from the control value (*: p<0.05 and **: p<0.01)

4. EPO 유전자의 발현 변화

정상군에 비하여 대조군은 91.9%로 유의성 있게 EPO 유전자의 발현이 감소하였다 (p<0.01). 당귀보혈탕 투여군은 79.6%로 감소하였으나, erythropoietin 투여군은 53.9%로 대조군에 비하여 EPO 유전자의 발현이 현저하게 감소하였다 (Table 3).

Table 3. RT-PCR Analysis of EPO Gene Expression of DBT Extract in Cyclophosphamide-induced Anemic Rats

| Groups ¹⁾ | Mean(%) | S.D |
|----------------------|---------|-------|
| Normal | 100.00 | 0.00 |
| Control | 91.90 | 4.81 |
| DBT | 79.60 | 3.11 |
| EPO | 53.91 | 15.33 |

1) Normal: cyclophosphamide non-treated group. Control: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.). DBT: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Danggui-bohyeol-tang(DBT) extract (1,000mg/kg BW, 14d). EPO: injection of cyclophosphamide (30mg/kg BW, i.p.) and subcutaneous injection of erythropoietin (1,000IU/kg BW, 14d).

고찰 및 결론

當歸補血湯은 黃芪와 當歸의 용량이 5:1의 비율로 구성된 것이 특징이다¹²⁾. 黃芪는味甘, 性微溫 無毒하여 生用하면 益衛固表하고 利水消腫하며 托壽生肌하는 효능이 있어 自汗, 盜汗, 血

痺, 浮腫, 癰疽 등을 치료하며, 灸用하면 補中益氣의 효능으로 內傷勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 氣虛血脫, 崩帶 및 氣衰血虛의 모든 증상을 치료한다. 當歸는 味甘辛, 性溫하여 補血和血하여 調經止痛 및 潤燥滑腸하는 효능이 있어 月經不順, 無月經으로 인한 腹痛, 子宮出血, 癥瘕結聚, 血虛로 인한 頭痛, 眩暈, 痿痺, 赤痢後重, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍, 打撲傷 등의 증상을 치료한다¹³⁾.

Cyclophosphamide로 골수부전상태를 유발한 후 당귀보혈탕을 일정기간 투여하고 체중과 식이 섭취량, 혈액검사 및 혈액 생화학적 분석을 시행하여 이들의 변화로 당귀보혈탕이 조절작용에 미치는 영향과 골수의 조혈상태를 관찰하였다.

Cyclophosphamide 투여 후 당귀보혈탕 투여군이 대조군에 비해 식이섭취량의 차이가 없었음에도 불구하고 체중에 대한 식이효율이 높았다는 것은 체중이 식이섭취량 때문에 증가된 것이 아니라 당귀보혈탕의 투여로 체중감소를 적게 함으로써 체중증가를 유도한 것이라고 볼 수 있다. 반면 erythropoietin 투여군에서는 식이섭취량이 대조군에 비하여 증가하였으나 체중에 대한 식이효율이 낮게 나타나 cyclophosphamide 투여에 의해 감소된 체중의 회복에 erythropoietin 투여가 영향을 미치지 못한 것으로 사려된다.

당귀보혈탕이 조절작용에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군은 유의한 적혈구 수의 감소가 유발되었으며, 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 정상군과 비교하여 176.8 % 및 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 비교하여 64.6 %의 회복효과를 나타내었다. 조혈제인 erythropoietin은 투여 후 정상군의 적혈구 수보다 지나치게 증가하였으나 당귀보혈탕은 정상군과 비교하여 64.6 %로 우수한 회복 효과가 있음이 증명되었다.

대조군은 유의한 백혈구 수의 감소가 유발되었으며, 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 정상군과 비교하여 73.7 %로 유의성있는 회복 효과를 관찰할 수 있었고, 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 비교하여 30.3 %로 유의성있는 회복 효과를 관찰할 수 있었다.

정상군에 비하여 대조군은 유의한 혈색소 농도의 감소가 유발되었으며, 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 정상군과 비교하여 206.3 %로 유의성있는 강력한 회복 효과를 관찰할 수 있었고, 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 비교하여 81.0 %로 유의성있는 우수한 회복 효과를 관찰할 수 있었다. 혈색소 농도는 적혈구 수와 함께 임상적으로 중요한 빈혈의 지표이다¹⁴⁾. 조혈제인 erythropoietin은 특히 적혈구 수와 혈색소 농도에 있어 정상군에 비하여 약 2배 정도의 강력한 증가 효과가 있음이 확인되었으며, 당귀보혈탕 역시 우수한 적혈구 수의 증가 효과와 함께 80%의 혈색소 농도를 회복시키는 우수한 효과가 관찰되었다. 따라서 당귀보혈탕은 혈액검사 소견에서 우수한 회복효과가 있을 뿐 아니라 체중의 회복을 통한 전신적인 건강 상태의 개선에도 효과가 있는 우수한 빈혈 치료제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

당귀보혈탕 투여군은 MCV 및 MCH 감소와 MCHC 정상외의 소견이 관찰되어 cyclophosphamide에 의해 유발된 재생불량성 빈혈, 용혈성빈혈, 비타민 B12의 결핍 등의 증상 치료에 효과가

있을 것으로 사려되었다. 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 MCV의 과도한 상승을 초래하여 혈액질환의 치료중에 발생하는 망상적혈구의 증가 소견이 관찰되었으며, 이는 erythropoietin이 혈색소의 강력한 회복 작용의 기전에 밀접한 연관이 있음을 알 수 있다. 망상적혈구는 무핵적혈구이지만 아직 세포질내에 핵의 잔해라고 할 수 있는 RNA를 가지고 있으며 계속 혈색소를 생산하고 있다. 그러나 골수로부터 말초혈액에 도달하면 하루만에 RNA가 사라지기 때문에 말초혈액에서 망상적혈구의 수를 측정하는 것은 적혈구 조혈상태를 효과적으로 평가할 수 있는 좋은 방법이다¹⁵⁾.

대조군은 유의한 혈소판 수의 감소가 유발되었으며, 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 정상군과 비교하여 113.6 %로 유의성있는 우수한 회복 효과를 관찰할 수 있었고, 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 비교하여 69.9 %로 유의성있는 우수한 감소 효과를 관찰할 수 있었다.

이상의 cyclophosphamide에 의하여 유발된 빈혈에 대한 혈액검사에서 당귀보혈탕 투여군은 혈색소 농도에 대하여 가장 우수한 회복 효과를 나타내었으며, 혈소판 수, 적혈구 수, 적혈구 용적(hematocrit, Hct) 등의 항목에 대하여 우수한 회복 효과를 나타내었다. 당귀보혈탕 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 회복 효과를 보이는 것으로 보아 조혈세포 수준의 증식이나 분화를 촉진시키는 물질을 함유하였을 가능성을 추정해 볼 수 있다.

혈액 생화학적 분석 지표로서 혈중 ALT(GPT), iron, transferrin 포화도 등의 항목에 대해서도 유의성 있는 회복 효과를 나타내었다. 혈중 ALT(GPT)에 대해 당귀보혈탕 투여군이 유의성 있는 회복효과를 나타낸 것에 비하여 양성대조약물로서 erythropoietin 투여군에서는 상승되었음이 관찰되었다. 따라서 당귀보혈탕의 투여는 cyclophosphamide의 부작용으로 인한 간기능 장애를 개선하는데 유효할 것으로 사려된다.

혈구의 형성과정은 stem cell factor, thrombopoietin, erythropoietin 등의 조혈성장인자에 의해 조절되며, 이들은 골수 세포에 작용하여 특정형질의 혈구세포의 분화와 성장의 상승효과를 가진다. erythropoietin은 골수에서 조혈세포의 증식을 촉진시키는 호르몬으로 erythropoietin 유전자 발현의 증가는 혈청 erythropoietin 수치의 증가를 반영한다. 본 연구에서는 cyclophosphamide에 의해 빈혈이 유도된 대조군은 정상군에 비하여 erythropoietin 유전자의 발현이 감소하였으며, 양성대조약물인 erythropoietin 투여군에서는 erythropoietin 유전자의 발현이 53.9%로서 현저하게 감소하였다. 당귀보혈탕 투여군의 erythropoietin 유전자의 발현은 79.6%로서 대조군에 비하여 정상 수준으로 회복되지 않았으나 erythropoietin 투여군과 비교하여 완만하게 감소하였으며, 이는 당귀보혈탕이 골수에서 조혈세포의 감소를 완화시키는 작용에 관여하는 것으로 기대된다.

이상의 결과를 종합하면 당귀보혈탕은 현재 조혈제로 널리 사용되고 있는 erythropoietin과 비교할 때 혈색소 농도, 적혈구 수의 회복에서 일정한 회복효과가 있음이 증명되었고, 전신적인 건강 상태의 지표인 체중회복에 대해서는 더욱 우수한 회복효과가 있어, 항암제 투여로 인한 빈혈 발생의 부작용 증상에 대하여

기존의 빈혈 치료제를 대체할 수 있는 한약 치료제로의 개발 가능성이 있음이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050401-034-787-188-00-00)의 지원에 의해 이루어진 것임”

참고문헌

1. 한대섭. 약리학. 서울, 녹지사, pp 60-359, 1984.
2. Wilson, J.D. PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 12th edition, McGraw-Hill, Inc. pp 1591-1599, 1991.
3. 이우주 외. 이우주의 약리학 강의. 서울, 의학문화사, pp 745-747, 1993.
4. Ruggiero, A. Riccardi, R. Interventions for anemia in pediatric cancer patients. Med pediater Oncol 39(4):451-454, 2002.
5. Valley, A.W. Overview of cancer-related anemia: focus on the potential role of darbepoetin alfa. Pharmacotherapy 22, 150-159, 2002.
6. 이문호. 내과학. 서울, 금강출판사, pp 339-353, 1979.
7. 대한임상병리학회. 임상병리학. 서울, 고려의학 pp 173-188, 1996.
8. 서울대학교의과대학. Hematology. 서울, 서울대학교출판부, pp 1-3, 1993.
9. 이지은. 한국, 중국, 일본당귀가 cyclophosphamide로 유발된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향차이. 한국식품과학회지 35(6):1204-1208, 2003.
10. Latha, P.G., Panikkar, K.R. Modulatory effects of ixora coccinea flower on cyclophosphamide-induced toxicity in mice. Phytother Res 13(6):517-520, 1999.
11. 彭懷仁. 中醫方劑大辭典. 北京, 人民衛生出版社, 4, 389-392, 1995.
12. 한의과대학방제학교수공저. 방제학. 서울, 영림사, pp 289-290, 1999.
13. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海, 上海科學技術出版社, pp 893-904, 2974-2975, 1999.
14. 이귀녕. 이종순. 임상병리파일. 서울, 의학문화사, pp 735-772, 1993.
15. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과지침서. 서울, 고려의학, pp 544-546, 552-553, 578-584, 1999.