

數種韓藥材가 생쥐의骨髓 및脾臟細胞의 造血促進과放射線防禦에 미치는 영향

Hemopoietic and Radioprotective Effects of Several Herbs on Murine Splenocytes and Bone Marrow Cells

李綾基 · 崔昇勳 · 安圭錫

慶熙大學校 韓醫科大學 病理學教室

ABSTRACT

Astragalus membranaceus Bunge (黃芪), *Atractylodes macrocephala* Loidz (白朮), *Angelica sinensis*(Oliv) Kiels (當歸), *Lycium chinense* Mill (枸杞子), *Ligustrum lucidum* Ait (女貞子) are Herbs that are frequently used in a lot of prescriptions to reduce the side effects of anti-cancer therapies, especially like chemotherapy and radiotherapy. The radioprotective and hemopoietic effects of these Herbs on BALB/c splenocytes and bone marrow cells are measured.

In order to evaluate the Hemopoietic effects, Thymidine uptakes and secretion of colony stimulating factors(CSFs) of splenocytes and myelocytes treated with herbs were measured. Radioprotective effects were accessed by the method of immunocompetence of murine lymphocytes cultured with herbs before irradiation and with LPS, ConA after irradiation. The results are as follows.

1. The orders of Proliferative effects of herbs on splenocytes were *Atractylodes macrocephala* Loidz (白朮), the highest of all, *Astragalus membranaceus* Bunge (黃芪), *Angelica sinensis*(Oliv) Kiels (當歸), *Lycium chinense* Mill (枸杞子) and *Ligustrum lucidum* Ait (女貞子), the lowest of all. At Optimal concentration, the proliferation ratios of herb-treated splenocytes compared to non-treated ones were like these. *Atractylodes macrocephala* Loidz (白朮) 44.3, *Astragalus membranaceus* Bunge (黃芪) 17.7, *Angelica sinensis*(Oliv) Kiels (當歸) 10, *Lycium chinense* Mill (枸杞子) 6.4, *Ligustrum lucidum* Ait (女貞子) 2.0.($p<0.05$)

2. When splenocytes were cultured during different periods, *Atractylodes macrocephala* Loidz (白朮) and *Astragalus membranaceus* Bunge (黃芪) showed the highest proliferation on 3th day, *Angelica sinensis*(Oliv) Kiels (當歸), *Lycium chinense* Mill (枸杞子) on 4th day.($p<0.05$) and *Ligustrum lucidum*

Ait (女貞子) until 5th day but with no significant increase.

3. The orders of Proliferative effects of herbs on Bone Marrow(BM) cells were Atractylodes macrocephala Loidz (白朮), the highest of all, Astragalus membranaceus Bunge (黃芪), Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸), Lycium chinense Mill (枸杞子) and Ligustrum lucidum Ait (女貞子), the lowest of all too. At Optimal concentration, the proliferation ratios of herb-treated BM cells compared to non-treated ones were like these. Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) 21.7, Astragalus membranaceus Bunge (黃芪) 9.9, Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) 4.9, Lycium chinense Mill (枸杞子) 2.3, Ligustrum lucidum Ait (女貞子) 1.4(p<0.05).

4. The secretion ratio of colony stimulating factors(CSFs) of each herb-treated group, compared to control, was Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) 9.4, Astragalus membranaceus Bunge (黃芪) 9.0, Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) 4.4, Lycium chinense Mill (枸杞子) 3.8 (p<0.05) but no significant increase in Ligustrum lucidum Ait (女貞子).

5. The mitogen(ConA, LPS) stimulated-lymphocytes cultured with each herb before irradiation of 1-3 Gy showed more enhanced proliferation than control(p <0.05). When compared to each non-irradiated group of all groups, the orders of percentage increase of irradiated group were Atractylodes macrocephala Loidz (白朮), the highest of all, Astragalus membranaceus Bunge (黃芪), Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸), Ligustrum lucidum Ait (女貞子), Lycium chinense Mill (枸杞子). Each percentage showed significant enhancement compared to control group(p<0.05).

According to the results, Atractylodes macrocephala Loidz (白朮), Astragalus membranaceus Bunge (黃芪) are suggested to be the most effective hemopoietic and radioprotective herbs, and Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸), Lycium chinense Mill (枸杞子) the next, but Ligustrum lucidum Ait (女貞子) showed lower effects than expected.

I. 緒 論

암은 현재 인류의 건강을 위협하는 주요한 질병의 하나로서, 우리나라의 경우 1988년 이래로 전체 사망원인 가운데 1위를 차지하고 있다⁷⁾. 비록 암이 아직 난치병에 속하지만 암을 퇴치하기 위한 부단한 노력으로 인해, 치료에 있어서 많은 진전을 이루어 왔다. 특히 방사선 및 화학요법은 일반적으로 암세포 억제효과가 우수하여 수술요법과 함께 암치료 요법의 首位를 차지하고 있다^{4,7)}. 하지만 이들은 치료효과

와 더불어 인체의 정상조직과 기관에 대한 독성이 강하여 환자에게 소화기 장애, 골수기능 억제, 면역기능 저하, 염증반응, 신체쇠약 등의 이차적인 부작용을 유발하는 단점이 있다^{35,20)}. 따라서, 효과적인 암치료를 위해서는 기존의 항암요법의 부작용에 대한 해결이 필요한 것이다²¹⁾.

서양의학에서는 이미 오래 전부터 방사선 및 화학요법의 부작용을 억제할 수 있는 물질을 개발하여 왔다. 그러나 개발된 약물들 중에는 또 다른 부작용을 유발하는 경우가 많은 까닭

에 최근에도 이들을 대체할 수 있는 보다 효과적인 물질에 대한 연구가 진행되고 있다³⁶⁾.

한의학에서는 약 30여년전 부터 중양치료에 관한 연구가 시작되어 왔으며, 현재는 직접적인 항암효과뿐만 아니라 항암요법의 부작용을 경감시키고 환자의 체력을 강화시키는 방향으로 양호한 효과를 거두고 있다¹⁶⁾. 항암요법 부작용을 치료하기 위한 처방으로는, 四君子湯, 十全大補湯, 六味地黃湯 등과 같은 기존 처방을 비롯하여 扶正增效方, 健脾益腎方 등과 같이 새로 창안된 처방들이 임상적으로 활용된다^{20,21)}. 이러한 처방들은 환자의 상태와 치료목적에 따라 각기 다르게 구성되지만, 한의학 이론과 임상효과에 근거하여 補氣健脾, 滋補肝腎, 및 補血의 효능을 가진 약재를 대개 필수적으로 첨가하는 경향이 있다⁸⁾.

최근들어 점차 이러한 처방들의 사용빈도가 높아지고 있고, 기본 약재들에 대한 효능검증이 필요하게 되었다. 현재 일부 약재에 대한 개별적인 효능은 연구된 바 있으나 아직 약물 상호간의 효능을 비교하며 관찰한 연구는 없었다.

따라서 본 저자는 우선 사용 빈도가 높은 약재들을 선정하여, 항암요법 부작용 경감효능의 정도를 비교 평가해 보고자 하였다.

일반적으로 부작용이 심각한 항암요법에는 방사선과 화학요법이 대표적인데, 본 실험에서는 방사선요법으로 인한 부작용을 실험모델로 선정하였다. 실험에 사용한 한약재는 다수의 임상활용 처방들 중에서 사용빈도가 높은 약재를 효능별로 구분하여, 補氣健脾 효능을 가진 黃芪白朮, 滋補肝腎의 효능을 가진 枸杞子 女貞子, 및 補血의 효능을 가진 當歸를 선별하였다.

약재의 효능평가는 조혈촉진효과에 대해서는 조혈세포에 대한 증식효과와 조혈촉진인자

분비능을 측정하여 평가하였고, 방사선 방어효과에 대해서는 B, T림파구의 면역적격성을 측정하여 평가하였다. 이상과 같은 방법으로 실험을 진행한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 등 물

8-10주령의 BALB/C 생쥐를 원자력 병원 실험동물 관리실에서 사육하여 사용하였다. 사육실의 온도는 22 2℃, 습도는 55-60%로 유지하고, 12시간 단위의 명암주기의 환경에서 고품 사료와 물을 자유로이 공급하여 사육하였다.

2) 약 재

실험에 사용한 약재는 黃芪, 白朮, 當歸, 枸杞子, 女貞子이다. 黃芪는 정선산, 白朮은 영해산, 當歸는 기린산, 枸杞子是 청양산, 女貞子是 중국산(產地 不明)을 시중에서 구입한 후 절편 분쇄하여 사용하였다.

藥材名	生藥名	學 名
黃 芪	Astragali Radix (Astragalus membranaceus Bunge)	
白 朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma (Atractylodes macrocephala Loidz)	
當 歸	Angelicae Gigantis Radix (Angelica sinensis(Oliv) Kiels)	
枸杞子	Lycii Fructus (Lycium chinense Mill)	
女貞子	Ligustri Lucidi Fructus (Ligustrum lucidum Ait)	

2. 방 법

1) 약재의 제조

黃芪, 白朮, 當歸, 枸杞子, 女貞子. 각 150g씩을 증류수 1 l 에 넣어 12시간 실온에서 침출한 후 60분간 전탕하여 얻은 추출액을 5000rpm으로 30분간 원심분리하여 잡질을 가라앉힌 다음, 상등액을 동결건조하여 분말 엑기스로 만들었다. 분말 엑기스를 적정량으로 하여 세포 배양액에 용해시킨 다음, 0.450m 공극의 필터(Milifor)로 여과하여 사용하였다.

2) 배지의 조제

(1) RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island NY, USA)에 Sodium Bicarbonate 2g, 2-mercaptoethanol ($5.5 \times 10^{-2}M$) 1ml, L-Glutamine (200mM) 10ml, Sodium Pyruvate (100mM) 10ml, Non-essential amino acid(10mM) 10ml, Penicillin-Streptomycin solution 5ml(이상 모두 GIBCO)을 첨가하여 3차 증류수 1 l 에 30분간 혼합한 후 여과하고, 5%-10%의 fetal bovine serum (Hyclone, Utah, USA)을 첨가하여 사용하였다.

(2) McCoy's 5A 배지에 Sodium Bicarbonate 2g, L-Glutamine(200mM) 10ml, Sodium Pyruvate (100mM) 10ml, serine 2.1%(이상모두 GIBCO)를 첨가하여 3차 증류수 1 l 에 30분간 혼합하여 여과하고, 10% fetal bovine serum과 5%의 horse serum(Hyclone, Utah, USA)을 첨가하여 사용하였다.

3) 생쥐 비장세포 부유액 제조

BALB/C 생쥐를 CO₂ 가스에서 사망시킨 다음, 75% 에탄올로 멸균하고 무균벤치에서 복부를 절개하여 비장을 적출하였다. 패트리디쉬에 적정량의 HBSS(Hank's balanced salt solution)를 넣고 적출한 비장을 1ml 주사기 뒷부

분으로 세분하여 부유시켰다. 세포 부유액을 6겹의 거즈를 통과시켜 잡질을 제거하고, 50ml 원심분리용 시험관(Falcon, LA, USA)에 옮겨 1400rpm에서 7분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 제외한 나머지 상등액을 버리고, 0.5ml의 FBS(Fetal Bovine Serum)와 4.5ml의 ACK buffer(tris-buffered ammonium chloride)를 가하여 세포를 부유시키고 얼음에 30초간 방치하여 적혈구를 파괴한 후 30ml의 HBSS를 가하여 1400rpm에서 7분간 원심분리하여 세척하였다. 같은 방법으로 2회 더 세척하였다. 침전된 세포를 적당량의 조제한 RPMI 1640 배지를 넣어 재부유시키고, 일정량을 취하여 Trypan Blue로 희석하여 염색한 다음, 현미경에서 Haemocytometer로 세포 수를 세고, 2×10^6 cells/ml이 되도록 배지로 희석하였다.

4) 생쥐 골수세포 부유액 제조

비장세포에서와 같은 방법으로 사망시킨 생쥐의 하지를 절개한 다음 대퇴골과 경골을 각 관절부위에서 절단하였다. 준비된 HBSS를 5ml의 주사기에 담아 주사기 바늘을 절단된 뼈의 내부로 삽입하여 골수내의 세포들을 씻어 내어 얼음에 꽂아 둔 50ml 시험관에 받았다. 하지의 모든 골수세포를 수집한 다음 시험관을 1400rpm에서 7분간 원심분리한 다음, 침전된 세포를 제외한 나머지 상등액을 버리고, 이하 비장세포에서와 같은 방법으로 하여 2×10^6 cells/ml이 되도록 세포 부유액을 준비하였다.

5) 비장세포와 골수세포의 증식능 실험

준비된 비장세포와 골수세포를 각각 96-well flat bottomed microplate(Falcon, Becton, Dickinson, New Jersey, USA)에 100 μ l (2×10^5 cells/well)씩 2배수(duplicate)로 분주하였다. 준비된 약재를 농도별로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂

배양기에서 2-3일간 배양하거나, 최적농도에서 2-5일간 배양하였다. 배양후 $2\mu\text{Ci/ml}$ 의 $^3\text{[H]}$ -Thymidine(NEN, Boston, MA, USA)을 가하여 4시간 더 배양한 다음 cell harvester(Flow lab, NOH1, USA)를 사용하여 glass fiber filter strip에 세포를 수집하였다. 건조시킨 glass fiber filter strip을 counter tube에 담고, scintillation cocktail(Luma Gel, Landgraaf, Netherland)을 3ml씩 넣어 β -counter(Packard, Tri-carb 4530, USA)로 $^3\text{[H]}$ -Thymidine 포함정도를 측정하였다.

6) 방사선 조사

방사선은 ^{60}Co γ -ray를 사용하였다. 적정수의 세포를 배지에 부유시켜 cell culture tube에 일정량을 분주하고, 0.5Cm 높이로 편평하게 유지하여 depth 0.5Cm, 127.7cGy/min으로 1~3Gy의 ^{60}Co -rays를 조사하였다. 조사선량은 Capintec PR-06C farmer type Chamber와 Capintec 192 electrometer(Capintec, USA)로 측정되었다.

7) 비장 세포의 조혈촉진인자 분비능 실험

(1) 비장 세포 배양 상등액 준비

비장세포를 $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로 조정된 다음, 24well-plate(Costar, USA)에 1ml씩 넣고, 적정농도의 한약추출액을 1ml 넣어 37℃, 5%CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다. 배양된 세포와 배양액을 15ml의 원심분리용 시험관에 담아 3000rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액을 다른 시험관으로 옮겨 실험에 사용할 때까지 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) hard agar (under layer)의 준비

1.2g의 agar를 100ml의 3차 증류수와 혼합(1.2%)하고 고온 멸균이 가능한 시험병에 담아 132℃에서 15분간 멸균한 다음, 40℃의 수조에 넣어 온도를 유지시켰다. 2배의 농도로 만든 조제된 McCoy' 5A 배지에 적당량(20% v/v)의 비

장세포 배양 상등액을 혼합하고, 40℃의 수조에 넣어 15분 정도 방치하여 온도를 유지시킨 다음 agar용액과 1 : 1로 혼합하고(0.6%) 24 well-plate에 500 μ l씩 분주하여 실온에 방치하여 굳게 만든 다음 밀봉하여 사용때까지 4℃에 보관하였다.

(3) soft agar (upper layer)의 준비

0.66g의 agar를 100ml의 3차증류수와 혼합(0.66%)하고, hard agar에서와 같이 준비하였다. 조정된 RPMI 1640 배지를 2배 농도로 만든 것을 40℃의 수조에 넣어 온도를 유지시켰다. 배지와 agar를 1 : 1로 혼합하였다(0.33%). 생쥐 골수세포를 위에서 기술한 방법으로 채취한 다음, 적정수의 침전시킨 골수세포를 소량의 배지에 다시 현탁시킨 후 agar배지를 가하여 $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 이 되게 하였다. 이 세포 혼합액을 재빨리 준비된 hard agar배지 위에 200 μ l씩 분주하고($1 \times 10^5 \text{ cells/well}$), 실온에 방치하여 agar가 굳은 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 14일간 배양하였다.

(4) 세포군체의 측정

14일간 배양시킨 골수세포를 현미경 상에서 관찰하여, 50개 이상의 세포로 구성된 colony의 수를 측정하였다.

8) 비장세포의 면역적격성 실험

(1) 비장 세포배양 및 방사선 조사

비장세포를 $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로 24well-plate에 1ml분주하고 적정농도의 한약액 1ml을 첨가하여, 37℃, 5%CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다. 1-3Gy의 방사선을 조사하고 세척한 후 2ml의 배지에 다시 현탁시켜 두었다.

(2) 증식능 측정

비장세포 현탁액을 96well-plate에 100 μ l씩 3배수(triplicate)로 분주하고, Concanavalin A(ConA) 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 와 Lipopolysaccharide(LPS) 20

$\mu\text{g/ml}$ (모두 Sigma, USA)를 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 배양기에서 1-2일간 배양하고, $2\mu\text{Ci/ml}$ 의 $^3\text{[H]}$ -Thymidine을 가하여 4시간 더 배양한 다음 그 포함정도를 측정하였다¹⁾.

9) 통계처리

결과자료들은 Student's t-test에 의하여 통계 처리하였고, $P < 0.05$ 수준인 경우 유의성 있는 것으로 간주하였다.

III. 實驗成績

1. 각 약재의 농도별 비장세포 증식능

각 약재의 비장세포 증식촉진효과를 알아보기 위하여 농도별로 2일간 비장세포를 배양하여 증식능을 측정한 결과 Table 1A, B와 Fig 1에서 보는 바와 같은 자료를 얻었다. 최고의 증식능을 보인 농도(이하 최적농도)는 白朮이 $1000\mu\text{g/ml}$, 女貞子が $125\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 나머지는 모두 $500\mu\text{g/ml}$ 였다. 최적농도에서의 증식정도는 白朮이 대조군보다 44.3배로서 가장 높았고, 黃芪 17.7배, 當歸 10배, 枸杞子 6.4배, 女貞子 2.0배 순이었고, cpm값은 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 증가가 인정되었다($p < 0.05$).

각 약재의 최적농도는 이 후의 조절촉진인자 분비능 실험과 면역적격성 실험의 약재 농도로 채택하였다.

Table 1A. Proliferation of Splenocytes in Response to Samples of Different Concentration

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	$^3\text{[H]}$ -Thymidine uptake(cpm)	Stimulation Index ^{a)}	
Control medium	-	4,866	1.0	
Sample A	7	18,107*	3.7	
	15	22,966*	4.7	
	31	35,801**	7.3	
	62	46,530**	9.5	
	125	55,585*	11.4	
	250	79,488*	16.3	
	500	86,287**	17.7	
	1000	74,376*	15.2	
	Sample B	7	16,728**	3.4
		15	34,360**	7.0
31		38,918**	7.9	
62		72,299*	14.8	
125		142,062**	29.1	
250		160,691**	33.0	
500		185,690**	38.1	
1000		215,712**	44.3	

a) : Stimulation Index = cpm of sample/cpm of control

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

Control : Medium

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黃芪)

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮)

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸)

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子)

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子)

1) 면역적격성 실험에서 분화유도제로 배양하는 기간은 일반적으로 2-3일이다. 본 실험에서는 1일과 2일 배양체제로 하여 각각 2회 이상 실험해 본 결과, 모두 증가율이 유사한 양상을 나타냈으나, 1일체계에서 실험 오차가 가장 적어 이를 결과자료로 채택하였다.

Table 1B. Proliferation of Splenocytes in Response to Samples of Different Concentration

Treatment	Concentration (μg/ml)	³ [H]-Thymidine uptake(cpm)	Stimulation Index ^{a)}
Control medium	-	4,866	1.0
Sample C	7	9,695*	1.9
	15	13,616*	2.7
	31	19,514*	4.1
	62	26,525*	5.4
	125	39,961*	8.2
	250	46,150*	9.4
	500	49,068**	10.0
	1000	45,504*	9.3
Sample D	7	7,807**	1.6
	15	9,823*	2.0
	31	12,394*	2.5
	62	16,836*	3.4
	125	20,613*	4.2
	250	26,658*	5.4
	500	31,510*	6.4
	1000	19,929*	4.0
Sample E	7	5,265	1.1
	15	7,516**	1.5
	31	8,651*	1.7
	62	8,249	1.6
	125	9,967*	2.0
	250	9,393**	1.9
	500	3,815	0.7
	1000	951	0.2

a) : Stimulation Index = cpm of Sample / cpm of Control

* : p < 0.05

** : p < 0.01

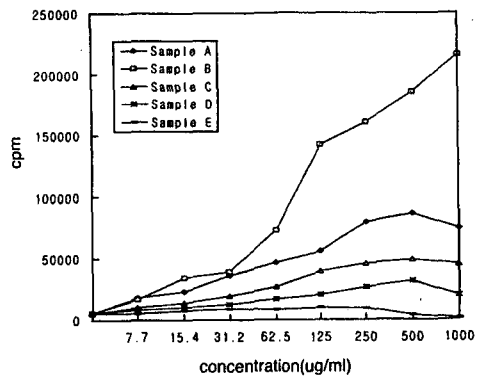


Fig 1. Proliferation of splenocytes in response to samples of different concentration

Control : Medium

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge(黄芪)

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz(白朮)

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸)

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子)

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子)

2. 각 약재의 시간별 비장세포 증식능

배양시간에 따른 증식능의 변화를 관찰하기 위하여, 비장세포를 각 약재의 최적 농도로 1일 부터 5일까지 배양하면서 증식능을 측정하여, Table 2와 Fig 2에서와 같은 결과를 얻었다. 黄芪와 白朮은 2일째부터 급격히 증식능이 증가 하면서 3일에 최고치를 보였는데, 대조군에 비하여 黄芪는 22배, 白朮은 49배의 증가된 증식능(p<0.01)을 보였다가 4일 이후부터는 감소하였다. 이에 비하여 當歸와 枸杞子は 3일째부터 증식능이 증가하여 4일에 최고치를 보였는데, 대조군에 비하여 當歸는 15배, 枸杞子は 8배의 증식능(p<0.05)을 보였다가 5일째는 감소하였

다. 女貞子は 5일째까지 소폭의 증가를 보였지만 대조군과 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

Table 3. Proliferation of Splenocytes in Response to Samples at Different Culture Time

culture time	³ [H]-Thymidine uptake (cpm)			
	Control	Con A	Sample A	Sample B
1 day	875	26,792	2,200*	5,219**
2 day	1,392	215,756*	28,014*	47,532*
3 day	3,306	264,327*	75,262**	163,580**
4 day	5,659	58,062*	68,932**	99,263**
5 day	6,327	-	10,579-	9,596-
	Sample C	Sample D	Sample E	
1 day	2,111**	1,315	615	
2 day	16,639*	7,527*	2,927*	
3 day	46,425**	15,739**	5,226*	
4 day	88,558**	43,763*	5,999	
5 day	28,560-	20,985-	6,205-	

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

- : Not Tested

Control : Medium

ConA : Concanavalin A, 2.5 $\mu\text{g/ml}$

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黃芪) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子) 125 $\mu\text{g/ml}$

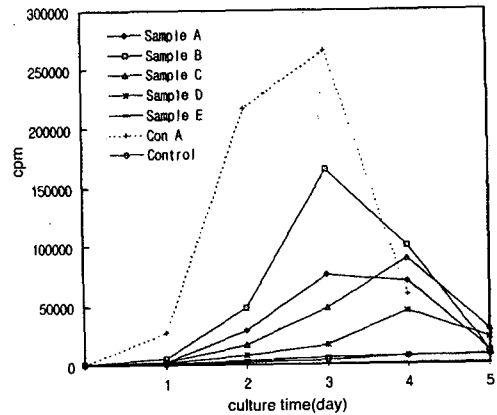


Fig 2. Proliferation of splenocytes in response to samples at different culture time

Control : Medium

ConA : Concanavalin A, 2.5 $\mu\text{g/ml}$

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黃芪) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子) 500 $\mu\text{g/ml}$

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子) 125 $\mu\text{g/ml}$

3. 각 약재의 조혈촉진인자 분비능

각 약재가 비장세포로 하여금 조혈촉진인자의 분비를 유도하는지 여부를 알아보기 위하여 최적 농도의 약재로 비장세포를 2일간 배양한 후 그 상등액을 취하여 조혈촉진인자의 함량을 측정 한 결과 Fig 3과 같은 결과를 얻었다.

각 약재의 조혈촉진인자의 분비능은 비장세포의 증식능과 유사한 양상을 보여 白朮이 가장 높고, 黃芪, 當歸, 枸杞子, 女貞子 순이었다. 白朮은 9.4배, 黃芪는 9배, 當歸는 4.4배, 枸杞子는 3.8배, 女貞子는 1.4배의 증식효과를 보여,

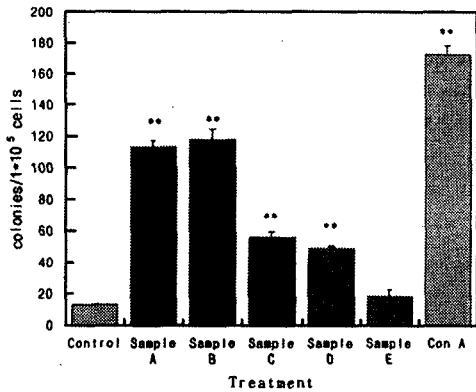


Fig 3. CSF Secretion of Splenocytes in Response to Samples

** : $p < 0.05$

Control : Medium

ConA : Concanavalin A, $2.5\mu\text{g/ml}$

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黄芪) $500\mu\text{g/ml}$

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) $500\mu\text{g/ml}$

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) $500\mu\text{g/ml}$

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子) $500\mu\text{g/ml}$

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子) $125\mu\text{g/ml}$

ConA의 13.7배보다는 낮았으나, 女貞子を 제외한 모든 약제는 대조군에 비하여 유의성 있는 증가가 인정되었다.($P < 0.05$)

4. 방사선 조사후의 면역적격성 실험

방사선을 조사 후 임파구 손상에 대한 각 약제의 방어효과를 알아보기 위하여, 비장세포를 최적 농도로 1일간 배양한 다음, 1~3Gy의

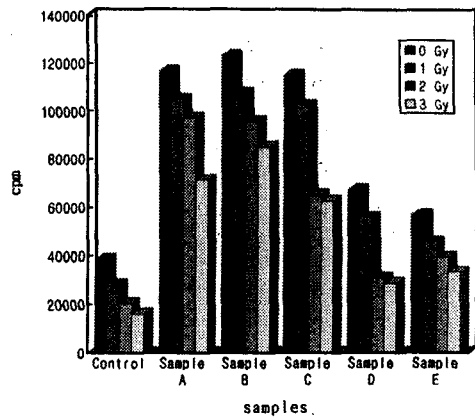


Fig 4. Proliferation of Splenocytes Stimulated by LPS after Incubation with Samples for 24h Prior to Irradiation.

Control : Medium

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黄芪) $500\mu\text{g/ml}$

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) $500\mu\text{g/ml}$

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) $500\mu\text{g/ml}$

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子) $500\mu\text{g/ml}$

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子) $125\mu\text{g/ml}$

⁶⁰Co γ -ray를 조사하고, B임파구 분화유도제인 LPS($20\mu\text{g/ml}$)와 T임파구 분화유도제인 ConA($2.5\mu\text{g/ml}$)로 다시 1일간 배양하여 각 임파구의 증식반응을 관찰하였다(Fig 4, Fig 5)

1) LPS자극후 B 임파구의 증식반응

방사선 조사후 LPS로 자극했을 때, Fig 4에서와 같이 약제군의 cpm은 대조군의 cpm에 비하여 1.5배에서 최고 5.4배까지 증가된 값을 보

2) Percentage Increase = (cpm of irradiation group/ cpm of non-irradiation group of The Sample group) $\times 100$.

3) enhancement ratio = Percentage Increase of Sample / Percentage Increase of Control.

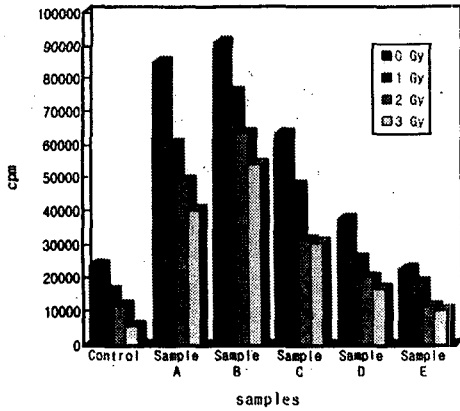


Fig 5. Proliferation of Splenocytes Stimulated by ConA after Incubation with Samples for 24h Prior to Irradiation.

Control : Medium
 Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黄芪) 500 μ g/ml
 Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮) 500 μ g/ml
 Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸) 500 μ g/ml
 Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子) 500 μ g/ml
 Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子) 125 μ g/ml

였다. 조사선량별 증식능은 대조군에 비하여 白朮군이 3Gy에서 5.4배로 가장 높았고, 黄芪군이 2Gy에서 4.8배, 當歸군이 3Gy에서 3.9배, 枸杞子군이 1Gy에서 2.2배, 女貞子군은 3Gy에서 2.1배 순이었으며, 모두 유의성 있는 증가가 인정되었다($p < 0.05$).

각 약재가 방사선 조사로 인한 임파구의 손상을 얼마나 방어하였는가를 알아보기 위하여, Control 및 각 Sample마다 방사선을 조사하지 않은 경우의 cpm에 대한 방사선을 조사한 경우의 cpm 백분율(percentage increase)²⁾을 계산하였다(Table 3). 약재로 미리 배양한 실험군은 약재로 배양하지 않은 대조군에 비하여 대

Table 3. Percentage Increase and Enhancement Ratio in LPS-stimulated Splenocytes after Irradiation Compared to Unirradiated Control

Treatment	Irradiation (Gy)	Percentage Increase(%) ^{a)}	Enhancement Ratio ^{b)}
Control	1	73.7 \pm 5.1	1.0
	2	52.8 \pm 3.2	1.0
	3	41.1 \pm 2.7	1.0
Sample A	1	90.4 \pm 7.0**	1.2
	2	83.4 \pm 3.2**	1.6
	3	61.4 \pm 2.8**	1.5
Sample B	1	87.2 \pm 3.3**	1.2
	2	77.6 \pm 1.5**	1.5
	3	68.9 \pm 3.1**	1.7
Sample C	1	89.5 \pm 4.0**	1.2
	2	56.7 \pm 2.9*	1.1
	3	54.4 \pm 2.1**	1.3
Sample D	1	83.3 \pm 6.7	1.1
	2	45.5 \pm 1.9*	0.9
	3	42.2 \pm 1.0	1.0
Sample E	1	78.9 \pm 2.2	1.1
	2	66.9 \pm 3.1**	1.3
	3	59.5 \pm 3.5**	1.4

a) : (cpm of irradiation / cpm of non-irradiation of The Sample) \times 100

Average \pm Standard Error

b) : Percentage Increase of Sample / Percentage Increase of Control

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

부분 증가된 백분율을 보였으며($p < 0.05$, 枸杞子는 제외), 그 증가비(enhancement ratio)³⁾는 대조군에 비해 白朮군이 3Gy에서 1.7, 黄芪군이 2Gy에서 1.6, 當歸군이 3Gy에서 1.3, 枸杞子군이 1Gy에서 1.1, 女貞子군은 3Gy에서 1.4이었다.

Table 4. Percentage Increase and Enhancement Ratio in ConA-stimulated Splenocytes after Irradiation Compared to Unirradiated Control

Treatment	Irradiation (Gy)	Percentage Increase(% ^a)	Enhancement Ratio ^b)
Control	1	66.4±5.0	1.0
	2	47.8±2.9	1.0
	3	22.7±1.5	1.0
Sample A	1	74.6±4.9*	1.1
	2	58.9±3.7**	1.2
	3	48.4±3.2*	2.1
Sample B	1	83.4±7.7*	1.3
	2	69.7±4.4**	1.5
	3	59.3±4.4**	2.7
Sample C	1	75.2±3.4*	1.1
	2	49.3±2.8	1.0
	3	48.0±2.1**	2.1
Sample D	1	68.5±2.1	1.0
	2	53.5±1.6**	1.1
	3	44.3±1.8**	1.9
22			
Sample E	1	81.4±2.1**	1.2
	2	49.6±1.1	1.0
	3	44.4±1.6**	2.0

a) : (cpm of irradiation / cpm of non-irradiation of The Sample) × 100
Average ± Standard Error
b) : Percentage Increase of Sample / Percentage Increase of Control
* : p < 0.05, ** : p < 0.01

2) ConA 자극후 T 임파구의 증식반응

방사선 조사후 ConA로 자극했을 때는, Fig 5 에서와 같이 약재군의 cpm이 대조군의 cpm에 비하여 0.95배에서 최고 10.3배까지 증가된 값

Table 5A. Proliferation of Bone Marrow Cells in Response to Samples of Different Concentration

Treatment	Concentration (μg/ml)	³ [H]-Thymidine uptake(cpm)	Stimulation Index ^a)
Control	-	3,359	1.0
Sample A	7	5,657*	1.6
	15	5,784*	1.7
	31	7,281*	2.1
	62	8,707**	2.5
	125	11,890*	3.5
Sample B	250	21,531**	6.4
	500	33,510**	9.9
	7	5,268	1.5
	15	5,028**	1.5
	31	6,182**	1.8
Sample C	62	8,200	2.4
	125	14,825*	4.4
	250	38,230*	11.3
	500	72,954*	21.7

a) : Stimulation Index = cpm of sample / cpm of control
* : p < 0.05
** : p < 0.01
Control : Medium
Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黃芪)
Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮)
Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸)
Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子)
Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子)

을 보였다. 조사선량별 증식능은 대조군에 비하여 白朮군이 3Gy에서 10.3배로 가장 높았고, 黃芪군이 3Gy에서 7.6배, 當歸군이 3Gy에서 5.6배, 枸杞子군이 3Gy에서 3.0배, 女貞子군은 3Gy에서 1.8배 순이었으며, 모두 유의성 있는 증가가 인정되었다(p<0.05).

Table 5B. Proliferation of Bone Marrow Cells in Response to Samples of Different Concentration

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	^3H -Thymidine uptake(cpm)	Stimulation Index ^{a)}
Control	3,359	1.0	
Sample C	7	3,752	1.1
	15	6,345*	1.8
	31	7,507	2.2
	62	8,498	2.5
	125	9,073**	2.7
	250	12,022	3.5
	500	16,487*	4.9
Sample D	7	4,155	1.2
	15	4,182	1.2
	31	3,984	1.1
	62	4,927*	1.4
	125	5,742	1.7
	250	6,833*	2.0
	500	8,025*	2.3
Sample E	7	3,401*	1.0
	15	3,898	1.1
	31	4,352	1.2
	62	3,243	0.9
	125	4,777	1.4
	250	4,816**	1.4

a) : Stimulation Index = cpm of sample / cpm of control

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

Control 및 각 Sample마다 방사선을 조사하지 않은 경우의 cpm에 대한 방사선을 조사한 경우의 cpm 백분율(percentage increase)은 Table 4와 같다. 실험군은 대조군에 비하여 대부분 증가된 백분율을 보였으며 ($p < 0.05$), 증가비

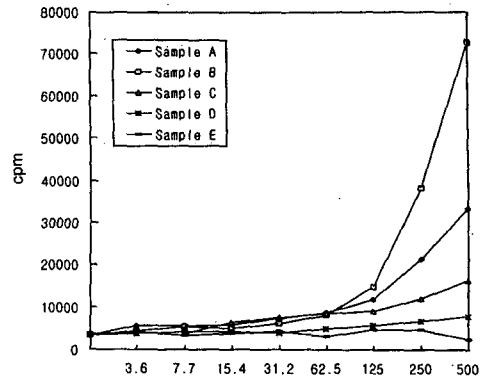


Fig 6. Proliferation of Bone Marrow Cells in Response to Samples of Different Concentration

Control : Medium

Sample A : Astragalus membranaceus Bunge (黄芪)

Sample B : Atractylodes macrocephala Loidz (白朮)

Sample C : Angelica sinensis(Oliv) Kiels (當歸)

Sample D : Lycium chinense Mill (枸杞子)

Sample E : Ligustrum lucidum Ait (女貞子)

(enhancement ratio)는 白朮군이 3Gy에서 2.6, 黄芪군이 3Gy에서 2.1, 當歸군이 3Gy에서 2.1, 枸杞子군이 3Gy에서 1.9, 女貞子군은 3Gy에서 2.0이었다.

5. 각 약재의 농도별 골수세포 증식능

각 약재의 골수세포 증식촉진효과를 알아보기 위하여 농도별로 3일간 골수세포를 배양하여 증식능을 측정된 결과 Table 5A, B.와 Fig 6.에서 보는 바와 같은 결과를 얻었다. 최적농도

는 女貞子가 250 $\mu\text{g/ml}$ 이고 나머지는 모두 500 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 최적농도에서의 증식정도는 白朮이 대조군보다 21.7배로서 가장 높았고, 黃芪9.9배, 當歸 4.9배, 枸杞子 2.3배, 女貞子 1.4배 순이었고, cpm값은 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 증가가 인정되었다($p < 0.05$).

IV. 考 察

방사선 요법은 현재 화학요법, 수술요법과 더불어 항암치료의 주요 수단으로 사용되는 치료 방법이지만, 정상조직에도 다양한 손상을 유발한다³⁵). 인체에서 방사선에 가장 민감한 세포는 임파구, 미성숙 조혈세포 및 소장 상피세포 등으로 알려져 있다³⁰). 일반적으로 이들 세포는 다른 조직세포에 비해 활발한 증식율을 가지고 있어서 방사선에 민감하다고 설명되지만, 예외도 있으므로 구체적인 기전은 아직 명확하지 않다. 방사선으로 조혈조직이 손상되면, 골수와 면역기능이 저하되어 백혈구 감소, 출혈, 빈혈과 감염이 증가하게 된다³⁸). Grande et al.은 성숙한 생쥐의 대퇴골과 비장의 CFU-S(spleen colony forming unit) 및 CFU-GM(colony forming unit for granulocyte/macrophage)를 실험한 결과 방사선피폭 후에 이들의 조혈수입세포들(hemopoietic progenitor cells)의 지속적인 감소와 그에 따른 부작용이 유발됨을 보고하였다²⁷). 또한, 방사선 요법으로 인한 이러한 골수와 임파조혈기관의 급만성 발육부전은, 화학요법과 병행했을 때는 더욱 심해진다^{26,38}). 임상적인 경험에 의하면 성인 조혈세포는 3-4Gy정도의 방사선량에서 50%치사량(LD₅₀)이 형성된다고 추정되며, 4Gy의 방사선을 전신 조사했을 경우 혈구수치는 10주 후에 정상적으로 회복된다²⁵). 임파구는 0.05 Gy

미만의 매우 낮은 방사선량에서는 오히려 증식 반응을 보이지만(adaptive response)⁴¹) 그 이상의 조사량에서는 임파구의 면역기능이 저하된다^{46,10}).

이와 같이 방사선요법으로 인한 조혈과 면역기능의 억제는 암환자에게 여러 가지 이차적인 부작용을 유발하게 되어, 환자의 삶의 질을 저하시키고 심한 경우는 치명적인 결과를 가져오며, 아울러 암치료의 지속적인 시행과 효과적인 용량의 치료를 제한하게 된다. 하지만 조혈기계와 임파기계 억제를 방사선으로부터 효과적으로 방어할 수 있다면, 표준 치료용량으로 야기되는 여러 부작용들을 개선시킬 수 있고, 아울러 좀더 고용량의 치료를 환자에게 시행할 수 있게 된다.²⁹)

현재까지 발견된 방사선방어제(radioprotector)는 일반적으로 화학적 혹은 생물학적 약물로 구분된다³⁶). 화학적 약물은 대개 thiol 복합물로서 이는 방사선 조사로 인해 발생하여 세포에 심각한 손상을 야기하는 遊離基(free radicals)를 제거하여 세포를 보호하는 작용이 있다⁴³). 생물학적 약물은 bacterial LPS, muramyl dipeptide, Mycobacterium bovis계통의 bacillus Calmette-Guerin, glucan 등의 미생물의 화합물 및 cytokine 같은 면역조정성(immunomodulatory) 혹은 염증성(inflammatory) 물질 등이 있으며, 이들은 조혈 및 면역기능을 향상시켜 방사선에 대한 방어효과를 가지는 것으로 알려져 있다³⁶). 이들 중의 몇몇 약물은 임상실험 단계에 있지만, 여러 가지의 바람직하지 못한 부작용들에 의해 많은 약물들은 활용이 제한되고 있다. 그래서 최근에는 많은 연구가 독성이 낮은 새로운 약물을 발견하거나 몇 가지 약물을 저농도로 복합 사용하여 부작용을 경감시키려는 노력에 집중되고 있다^{40,44}).

한편, 한의학에서도 화학 및 방사선 요법으

로 인한 부작용을 개선시키는 효과를 가진 치료방법들이 개발되고 있다. 현재 한약을 사용한 암치료 연구는 한약의 단독요법보다는 서양 의학의 항암요법과 결합하여 그 단점들을 보완 하므로써 치료율을 높이는 방향으로 추진되고 있다. 즉 기존의 항암요법의 부작용을 경감시켜 암치료를 받고 있는 환자의 저하된 삶의 질을 높이고 생존율을 연장시키는 것이다.

한의학에서는 방사선 요법 후에 체내의 熱毒이 성해서 津液이 손실되고, 氣血이 不和하고, 脾胃가 失調하며, 肝腎이 허약해지기 때문에 제반 부작용이 발생한다고 인식하고 있으며, 이를 치료하기 위해서 清熱解毒, 生津潤燥에 치중한 涼補氣血, 健脾和胃, 滋補肝腎 등의 방법을 적용한다²⁰⁾. 치료 처방으로는 기존에 존재하는 처방과 새로 장안한 처방들을 활용하고 있는데, 이에 대한 연구로 崔¹²⁾는 補中益氣湯과 四六湯이 방사선 조사후의 생쥐 비장세포의 증식을 촉진함을, 貝¹⁴⁾는 扶正培本の 藥과 抗癌劑와 配合하였을 때나 放射線療法시 使用하였을 때 白血球와 血小板數가 顯著히 增加하였으며 血漿皮質 hormone作用의 改善이 이루어졌음을, 白⁹⁾과 張¹¹⁾은 抗癌劑의 副作用에 消積白朮散과 麥葶湯을 投與했을 때 cisplatin과 cyclo phosphamide에 依한 副作用이 好轉됨을, 韓¹³⁾은 麥葶白朮散이 cyclo phosphamide로 유발된 말초혈구의 손상을 회복시키는 효과를, Hosokawa는 補中益氣湯 小柴胡湯 十全大補湯의 방사선 방어효과를³¹⁾, Shu, et al은 人參養榮湯과 歸脾湯이 방사선에 조사된 생쥐의 회복을 촉진시키고 면역적격성(immunocompetence)을 증가시킴을 보고하였다^{32,33)}. 7.5Gy 선량의 방사선을 조사한 실험동물에게 養陰合劑를 투약한 경우 여타의 골수세포뿐만 아니라 多能幹細胞(pluripotent stem cell)들의 증식도 증가된다는 결과도 보고되었다¹⁶⁾. 이 외에 扶正庶劑, 扶

正增效方, 健脾益腎庶劑, 升血湯, 固本益氣湯, 扶正生津湯 등 다수의 처방들에 관한 연구가 있다^{19,20)}.

이러한 항암요법 부작용 경감효과를 가진 여러 가지 한의학 처방들에는 사용빈도가 높은 약재들이 있으며, 이들의 효과에 대한 검증이 점차 요구되고 있다. 金⁸⁾ 등은 처방 구성약재의 사용빈도를 연구하여, 방사선 및 화학요법에 공통적으로 사용 빈도가 높은 약재로 黃芪, 人蔘, 白朮, 茯苓, 陳皮, 麥門冬, 當歸, 半夏, 生地黃, 山藥, 女貞子, 白芍藥, 太子蔘, 絲子, 枸杞子 등을 지적하였다. 기존의 단일약재의 항암요법 부작용 경감효과에 대한 연구는 人蔘³⁷⁾, 靈芝²⁴⁾, 當歸, 女貞子, 黃芪, 茯苓, 冬凌草^{21,7,16)} 등의 약재 각각에 관해서 연구된 바 있으나, 한의학적 효능별 약재의 효과를 비교한 연구는 미흡한 편이다. 따라서 본 연구에서는 金⁸⁾ 등의 연구내용을 근거로 하여, 효능별로 약재의 효과를 비교해 보고자 補氣健脾효능이 있는 黃芪와 白朮, 補血효능이 있는 當歸, 滋補肝腎의 효능이 있는 枸杞子, 女貞子로 구분하여 사용하였다.

조혈과 방사선 방어효과를 알아보기 위한 대상으로 생쥐의 비장세포와 골수세포를 사용하였다. 비장은 생쥐와 기타 동물에서는 조혈기능(hematopoiesis)의 주요 부위이며, 혈구와 혈소판의 저장기관으로 알려져 있다. 사람에게 있어서는 성인의 경우 조혈기능이 대부분 골수에서 일어나지만, 胎兒期 때나 골수의 비정상적 확장에 의한 질환 시에는 비장에서도 조혈작용이 일어난다. 따라서 생쥐의 비장은 면역기능과 조혈기능의 실험재료로서 적절하다⁵⁾. 골수에는 原始造血幹細胞, 受任先祖細胞 및 분화되어 성숙된 血球 등이 다양하게 존재하고 있으며, 조혈기능은 造血幹細胞(stem cell)가 여러 조혈촉진인자(hematopoietic growth factors)와

세포간 상호작용(cellular interaction)에 의해 조절되면서 幹細胞(stem cell)에서 受任先祖細胞(committed progenitor stem cell) 혹은 母細胞(progenitor cell)를 거쳐 특정 임파구계열 및 기타 혈구계열의 순서로 분화하여 일어난다고 알려져 있다^{39,23}). 골수조직의 基底細胞(stromal cells)도 조혈의 微小環境(microenvironment)을 형성하는 부분으로서 內皮細胞(endothelial cell), 外膜細胞(adventitial cell), 纖維芽細胞(fibroblast), 大食細胞(macrophage), 脂肪細胞(fat cell) 등의 다양한 異質의 세포들로 구성되어 있으며, 조혈간세포와 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하여 조혈기능을 조절한다⁴⁵).

본 연구에서 이상의 비장세포와 골수세포를 대상으로 하여 각 약제의 증식촉진효과를 관찰한 결과, 약제 중 白朮이 가장 높고, 그 다음이 黃芪, 當歸, 枸杞子, 女貞子 순으로 나타남을 알 수 있었다(Fig.1, 2, 6). 2일 배양에서의 증식효과는 약제 효능별로 평가해 볼 때, 補氣健脾의 白朮, 黃芪가 증식촉진에 있어 가장 뛰어났고, 그 다음이 補血효능을 가진 當歸였으며, 滋補肝腎의 枸杞子 女貞子は 증식효과가 가장 낮았다. 그러나 비장세포의 경우 白朮, 黃芪는 배양 4일째부터는 증식이 감소하였으며, 當歸, 枸杞子は 4일째까지 증식이 지속되었다. 이 결과로 보아 補氣健脾 약제는 비장세포에 대하여 신속한 증식을 유도하고, 補血 및 滋補肝腎 약은 補氣血藥보다는 좀더 지연되는 증식효과를 가지는 것으로 사료된다. 女貞子の 경우는 다른 약제에 비해 낮은 증식능을 보였으며, 높은 농도에서는 독성반응이 나타났다. 女貞子가 항암요법부작용 억제를 목적으로 사용되는 처방에 자주 활용되고, 黃芪와 女貞子를 主藥으로 사용한 貞芪扶正液의 효과에 대한 보고²⁰) 등을 참고했을 때, 본 실험결과와 부합되지 않으므로 이러한 독성과 증식능의 저조에 관해서는 약제

의 품질을 비롯하여 차후의 연구가 필요하다고 사료된다. 白朮은 암세포에 대한 직접적인 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있으므로 차후 연구 가치가 높은 약제라고 사료되며, 항암요법 부작용 경감처방에 활용 빈도가 가장 높은 黃芪는 비장 및 골수세포를 증식시키는 효과에 있어서는 白朮보다 낮았다. 이상의 결과로 보아 補氣健脾효능의 白朮, 黃芪가 비장 및 골수세포의 증식촉진에 있어서는 여타의 효능을 가진 약제들 보다 빠르고 높은 효과가 있음을 알 수 있었다.

조혈촉진인자는 조혈세포의 증식 분화에 필수적인 물질이다. 조혈촉진인자의 기능은 조혈세포의 증식과 분화뿐만 아니라 생존에도 영향을 미치며, 실험적으로는 조혈촉진인자가 없는 상황에서 조혈세포는 사망한다³⁴). 지금까지 알려진 조혈촉진인자(colony stimulating factor)로는 erythropoietin(EPO), interleukin-3(IL-3), granulocyte/macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor(G-CSF), macrophage colony stimulating factor(M-CSF), stem cell factor(SCF)와 IL-1 α 등이 있는데, 이들은 骨髓基底細胞 뿐만 아니라, 腎臟, 內皮細胞, 纖維芽細胞, T임파구, 大食細胞 등의 여러 조직에서도 분비된다²³). 따라서 비장세포를 약제로 배양하여 분비되는 물질들이 골수의 受任先祖細胞의 증식과 분화를 유도한다면, 이는 약제의 조혈촉진효과를 간접적으로 증명하는 것이다. 이를 규명해 보기 위해서 각 약제의 조혈촉진인자의 분비능을 측정하였다. 조혈촉진인자의 분비의 정도는 비장 및 골수세포의 증식능과 유사한 양상을 보여 補氣健脾의 효능이 있는 白朮과 黃芪가 가장 높은 효과를 나타냈다. 하지만 증식능에서보다 白朮의 효과는 낮아, 黃芪와 白朮이 비슷한 수준의 분비능을 보였다. 當歸 枸杞子가 그 다음으로

높은 분비능을 보였고, 女貞子は 증식효과에서 본 바와 같이 대조군과 차이가 없는 낮은 분비능을 보였다(Fig. 3).

본 실험에 앞서, 약재를 직접 hard agar에 첨가하여 골수세포를 배양해 보았는데, 그 경우 血細胞 群體(colony)는 아무것도 넣지 않은 대조군과 전혀 차이를 보이지 않았다(data not shown). 이는 약재 자체에는 조혈촉진인자나 조혈촉진인자를 대체할 만한 물질이 직접 존재하지는 않은 것을 의미한다. 따라서 약재의 조혈촉진효과는 조혈세포에 대한 직접적인 효과가 아니라, 조혈촉진인자의 분비를 유도하므로써 이차적으로 이루어지는 것으로 사료된다.

韓醫學¹⁸⁾에서는 血이 津液과 營氣로 구성된다고 인식한다. <靈樞 決氣篇>에서는 “中焦受氣取汁, 變化而赤, 是謂血”라 하였고, <靈樞 癰疽>에서는 “腸胃受穀,中焦出氣如霧, 上注谿谷, 而滲孫脈, 津液和調, 變化而赤爲血”라 하였는데, 中焦는 脾胃를 지칭하므로 脾胃가 혈액생성과정에서 차지하는 중요성을 알 수 있다. 또 혈액의 주요 구성성분⁴⁾이며 津液을 脈에 주입하여 혈액을 化生하는 기능을 가진⁵⁾營氣도 中焦에서 생성되므로⁶⁾이 역시 脾胃에 해당한다. 이처럼 한의학에서는 脾胃가 혈액의 원료를 생산하고 혈액을 化生하는 중요한 작용을 하므로, 임상에서 血虛의 病證을 치료할 때는 먼저 脾胃의 調攝을 중시한다⁶⁾.

肝과 腎 역시 혈액생성과정에서 중요한 역할을 한다. 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 後天的으로 水穀精微에서 化生된 氣血에

의존한다^{1,2)}. 한편 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한다³⁾. 이처럼 脾胃의 血液化生의 기능, 腎의 藏精기능과 肝의 藏血기능이 모두 조혈기능에 관여하고 있지만, 본 실험 결과는 補氣健脾의 黃芪와 白朮이 조혈촉진 효과가 가장 높은 점으로 미루어 보아, 脾胃가 造血에 미치는 영향이 보다 크다고 사료된다.

조혈촉진효과에 이어 약재의 방사선 방어효과를 알아보기 위하여 비장세포의 免疫適格性(immunocompetence)을 관찰하였다. 면역적격성 즉 체외에서의 분열촉진인자 자극에 의한 반응(mitogen stimulated response)은 특정 임파구를 활성화시키고 증식시키는 반응으로서, 임상적으로 면역저하질환, 암, 자가면역질환을 가지고 있거나 면역요법을 받고 있는 환자의 세포성 면역을 평가하는데 이용된다. 또 사람과 동물의 약물 혹은 방사선에 의한 면역독성효과를 평가하는데도 이용되고 있다²⁸⁾. 분열촉진인자로는 1960년에 Nowell⁴²⁾이 red kidney bean의 추출물을 발견한 이래로 여러 종류의 식물로부터 phytohemagglutinin (PHA : T임파구), concanavalin A(ConA : T임파구), soybean agglutinin(SBA), peanut agglutinin(PNA), pokeweed mitogen(PWM : T,B임파구) 등이 추출되었고, 식물 lectin외에 박테리아 산물 중에서도 이러한 효과를 가진 lipopolysaccharide (LPS : B임파구), purified protein derivative (PPD : B 임파구) 등이 발견되어 활용되고 있다²⁸⁾.

이상의 분열촉진인자들은 특정 B 혹은 T임파구와 결합하고 증식을 촉진시키기 때문에 임

4) <靈樞 邪客> 中焦亦并胃中, 出上焦之後, 此所受氣者, 泌糟粕, 蒸津液, 化其精微, 上注于肺脈, 乃化而爲血, 以奉生身, 莫貴于此 故獨得行于經隧 命曰營氣.

5) <靈樞 邪客>營氣者, 泌其津液, 注之于脈, 化以爲血.

6) <靈樞 營衛生會篇> 營出于中焦.

과구의 결손정도와 기능을 동정하는데 유용하게 활용된다.

본 연구에서는 생쥐의 비장세포를 약재로 미리 배양한 후 0-3Gy의 방사선을 조사하고, T임파구의 분화촉진제인 conA(concanavalin A)와 B임파구 촉진제인 LPS(lipopolysaccharide)를 사용하여 그 임파구의 증식능을 관찰하였다.

방사선 조사전에 약재로 미리 1일간 배양하면, 방사선 조사후 비장세포의 증식능이 약재로 배양하지 않은 대조군에 비하여 높을 뿐 아니라, 정상대조군 보다도 상회하였다(Fig. 4, 5). 이러한 이유는 1일 배양으로 증식된 백혈구가 量的으로 많기 때문에, 방사선 조사후 생존한 백혈구의 수도 상대적으로 많은 까닭이라고 볼 수 있다. 하지만 실험군과 대조군의 cpm을 각각의 방사선을 조사하지 않은 경우의 cpm에 대한 백분율로 계산해 보면, 실험군의 경우가 대조군에 비하여 방사선 조사 후 낮은 감소율(percentage increase)를 가진다(Table 3, 4). 이는 방사선 조사 전에 약재를 투약하므로써 비장세포가 양적인 증가 뿐만 아니라 방사선에 대한 내성도 강화된 때문이라고 볼 수 있다. 그러므로 黃芪 白朮 當歸는 T및 B임파구에 대한 증식 유도과 방사선 방어효과가 뛰어나고, 枸杞子가 그 다음이며, 女貞子는 가장 저조한 효과를 가지는 것으로 사료된다.

면역세포에 대한 방사선 방어효과는 암환자에게 중요한 의미를 가진다. 왜냐하면 항암요법등으로 면역계통이 손상되면 감염의 기회가 증가할 뿐만 아니라, 종양의 성장 및 전이억제에 불리한 영향을 미치게 되며, 면역기능이 강화될수록 종양환자에 있어서 腫瘍의 성장과 전이를 억제하고 치료후를 良好하게 하는데 유리하기 때문이다. 이러한 이유로 항암치료에 있어서 면역기능의 보호와 강화는 서양의학에서도 점차 관심의 대상이 되고 있다. 한약재의

면역기능 강화효과에 대한 연구로 李¹⁷⁾는 健脾益氣藥이 T임파세포 비율 및 임파세포 轉化率을 높이며 黃芪, 人蔘은 골수 조혈세포의 DNA 합성 및 有核細胞 분열을 촉진한다고 임상과 실험에서 보고하고 있으며, 王¹⁵⁾은 人蔘, 黃芪, 白朮, 靈芝 등의 補氣健脾 약재가 망상내피계의 탐식작용을 증강시킴을, 許²²⁾는 氣虛 陰虛型 악성 종양 환자를 정상인과의 면역상태를 비교하여 특히 氣虛군의 평균치가 최저임을 보고하였다. 이러한 연구사례에서 보는 바와 같이 한의학에 있어서 면역기능 활성화에는 補氣 위주의 扶正培本약이 큰 영향을 미치고 있다. 본 연구의 T임파구와 B임파구에 대한 면역적 격성실험 결과, 임파구를 방사선으로부터 방어하여 면역기능을 보호하는 효과도 補氣健脾약재가 높았으므로, 차후 항암요법으로 인한 면역기능억제에 대한 補氣健脾약재의 활용에 관해 집중적인 연구가 필요하리라 사료된다.

이상의 모든 실험결과를 종합해 보면, 補氣健脾의 黃芪와 白朮이 생쥐 비장 및 골수세포의 증식촉진효과, 조혈촉진인자 분비효과, 임파구에 대한 방사선 방어효과에 있어 모두가 장 뛰어난 효과를 나타냈으며, 그 다음이 當歸와 滋補肝腎의 枸杞子이고, 女貞子は 상대적으로 낮은 효과를 보여, 조혈촉진과 방사선에 대한 방어 효과 모두 補氣健脾효능의 약재가 補血 및 滋補肝腎에서 보다 뛰어난 효과가 있음을 알 수 있었다.

그러나, 본 실험은 세포수준에서 한약의 효과를 연구한 것인 만큼 생체에 대한 보다 전체적인 효과규명을 위해서는 체내 실험연구가 필요하며, 조혈촉진인자의 규명과 방사선 방어기전에 관한 연구, 유효성분 분석 및 약재 상호간의 복합효과에 대해서 차후 연구되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

항암요법 부작용 경감을 위한 처방에서 사용 빈도가 높은 黃芪, 白朮, 當歸, 枸杞子, 女貞子 의 조혈촉진 및 방사선방어효과를 알아보기 위하여 생쥐의 비장세포와 골수세포를 체외에서 배양하여, 비장 및 골수세포증식능, 비장세포 의 조혈촉진인자 분비능, 방사선 조사후의 비 장세포 면역적격성을 측정하여 다음과 같은 결 론을 얻었다.

1. 생쥐 비장세포에 대한 증식촉진효과는 白朮, 黃芪, 當歸, 枸杞子, 女貞子 순이었고, 최적 농도에서 2일간 배양한 경우 白朮은 44.3배, 黃芪는 17.7배, 當歸는 10배, 枸杞子是 6.4배, 女貞子 는 2.0배의 증식촉진효과를 가졌다.

2. 비장세포에 대한 시간별 증식능은 白朮과 黃芪는 3일에 최고 증식능을 보였고, 當歸와 枸 杞子是 4일에 최고 증식능을 보였으며, 女貞子 는 5일까지 소폭 증가하는 경향을 보였으나 대 조군과 유의한 차이가 없었다.

3. 생쥐 골수세포에 대한 증식촉진효과도 白朮, 黃芪, 當歸, 枸杞子, 女貞子 순이었으며, 비 장세포에 비하여 전반적으로 낮은 증식능을 보 였다. 白朮은 21.7배, 黃芪는 9.9배, 當歸는 4.9 배, 枸杞子是 2.3배, 女貞子是 1.4배의 유의한 증식촉진효과를 가졌다.

4. 생쥐 비장세포의 조혈촉진인자 분비효과는 白朮과 黃芪가 각각 9.4배, 9.0배로 가장 높 았으며, 當歸는 4.4배, 枸杞子是 3.8배의 유의한 분비효과를 보였으나, 女貞子是 대조군과 유의 한 차이를 보이지 않았다.

5. 비장 임파세포를 1-3 Gy의 방사선 조사후 LPS와 ConA로 자극하여 면역적격성을 실험한 결과, 각 조사량에서 증식능은 대부분의 실험 군이 대조군보다 유의성 있게 높았으며, 백분

율 증가는 白朮, 黃芪, 當歸, 女貞子, 枸杞子 순 으로 나타났고, 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다.

이상의 실험 결과로 보아 白朮과 黃芪는 조 혈기능을 촉진시키고, 방사선 부작용으로부터 면역기능을 보호하며 회복을 촉진시키는 효과 가 우수하고, 當歸, 枸杞子 역시 효과가 있어서 방사선요법의 부작용을 경감시키는 약물로서 활용가치가 높다고 평가할 수 있으나, 女貞子 는 실제 임상에서의 활용도에 비해 저조한 효 과를 보여 추가연구가 필요할 것으로 사료된 다.

參 考 文 獻

1. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp57-59, 63-65, 1985.
2. 杜鎬京編 : 東醫腎系內科學, 서울, 東洋醫學研究所, pp6-9, 1987.
3. 朴贊國 編譯 : 臟象學, 서울, 成輔社, pp28-67, pp 214, 1992.
4. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울대학교 출판부, pp. 1-3, 137-143, 1992.
5. 성호경 이상돈 : 생리학 제5판, 서울, 도서출판 의학문화사, pp 94-106, 1991.
6. 安圭錫 崔昇勳 文潄典 外 : 東醫病理學, 서울, 古文社, 1990.
7. 崔昇勳 : 東醫腫瘍學, 행림출판, 서울, pp.142-165 1995.
8. 김동희, 김성훈 : 항암제 및 방사선 부작용에 대한 한방요법, 병리학회지, 9권 p.239-264, 1994.
9. 白承學 : 消積白朮散이 白鼠의 抗癌障礙에 미치는 影響, 大田大學校 碩士 學位論文, 1991.

10. 윤택구: 방사선에 의한 인체장해연구, 한국에너지연구소 (과기처시행특정연구 개발사업 연구결과문), 대전, 1988.
11. 張中植: 麥茸湯이 S-180에 對한 抗腫育 效果와 cyclophosphamide에 依한 副作用減少에 미치는 影響, 大田大學校 碩士學位論文, 1992.
12. 崔昇勳: 放射線 照射後의 N : GP(S) mouse 脾臟細胞 增殖에 미치는 補中益氣湯과 四六湯의 效果, 제1회 동양의학 국제심포지움 논문집, p 110-239, 1995.
13. 韓承燮: 麥白朮散의 抗癌劑 副作用 抑制에 關한 實驗의 研究, 慶熙大學校 大學院, 博士學位論文, 1995. 8.
14. 貝潤浦: 中醫配合化學藥物治療腫育의 體會, 癌症腫育醫論醫話精選 pp586 - 587, 1989.
15. 王錦雲: 扶正培本法治療惡性腫育積研究, 癌症腫育醫論醫話精選, pp101 - 104, 1989.
16. 郁仁存: 腫瘤研究, 上海科學技術出版社, 上海, p117, 1991.
17. 李爲祿: "扶正培本"與"活血化瘀"治療腫育的原理, 癌症腫育醫論醫話精選, pp83 - 85, 1989.
18. 任應秋 外: 黃帝內經章句索引, 北京, 人民衛生出版社, 1986.
19. 吳廣寧, 余桂清, 朴炳奎, 孫桂芝: 扶正增效合劑對食管癌治療增效的 臨床 和 實驗研究, 中國中醫研究院廣安門醫院腫瘤科論文選集, 1993.
20. 張代釗: 中醫藥防治放化療副反應的新進展, 中西醫結合防治腫瘤, 抗癌中草藥學術會議資料 編, pp14-20, 1987.
21. 張代釗: 中醫藥對腫瘤放化了的增敏減毒作用, 中國中西醫結合雜誌 12(3) : 135-138, 1992.
22. 許延平 外: 體液免疫指標對惡性腫育氣虛, 陰虛型患者測定的臨床 意義, 浙江中醫雜誌 12期, p45, 1987.
23. Clark,S, Kamen,R. : The human colony stimulating factors. Science 236 : 1229-1237, 1987.
24. Chen, W. C.,Hau,D.M.,Lee, S. S. : Effects of Ganoderma Lucidum and Krestin on Cellular Immunocompetence in γ -ray-irradiated Mice. American J. Chinese medicine, Vol.13,No.1 : 71-80,1995.
25. D. W. van Bekkum : Radiation sensitivity of the hemopoietic stem cell, Radiation research,128,s4-s8, 1991
26. Fajardo,L.F. : Morphology of radiation effects on normal tissues. Principles and practice of radiation oncology, 2nd Edn, Philadelphia, Lippincott, PP 114-123
27. Gray,R.,Burlison, Jack, H. Dean, Albert,E.Munson : Methods in immunotoxicology : volume 1,New York, USA, Wiley-Liss, pp 197-210, 1995.
28. Grande, T., S.Gaitan, C.Tejero and J.A.Bueren. : Residual hemopoietic damage in adult and 8-day-old mice exposed to 7Gy of X-rays. Inter.J.Radiat.Biol., 63(1) : 59-67, 1993.
29. Griswold,D.P.,Jr.,Trader, M. W.,Frei,E., III ,Peters, W. P.,Wolper,M.K.,and Laster, W. R.,Jr. : Response of drug sensitive and resistant L1210 Leukemias to high-dose chemotherapy. Cancer Research., 47 : 2323-2327, 1985.
30. Hill RP. : The basic science of oncology, (eds) Tannock IF and Hill EP.New York : Pergamon Press, pp.259-301, 1992.

31. Hosokawa, Y. : Radioprotective effects of Chinese medicinal prescriptions in mice. *J. Medical and Pharmaceutical Society for Wakan-Yaku*, 3 : 164-169, 1986.
32. Hsu,H.Y., Hau,D.M.,Lin,C.C. : Effects of Jen-Sheng-Yang-Yung-Tang on Cellular Immunocompetence of γ -irradiated Mice. *American J. Chinese medicine*, Vol.11,No.3-4 : 269-277,1993.
33. Hsu,H.Y., Hau,D.M.,Lin,C.C. : Effects of Kuei-Pi-Tang on Cellular Immunocompetence of γ -irradiated Mice. *American J. Chinese medicine*, Vol.11,No.2 : 151-158,1993.
34. Jan W.M.Visser, Dries H.Mulder. : Culture of hematopoietic stem cells purified from murin bone marrow, *Seminars in Hematology*, 28(2) : 117-125, 1991.
35. Jurgen Kiefer : *Biological Radiation Effect*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1990.
36. Kalechman,Y., Albeck.M., Oron.M., Sobelman.D., Gurwith.M., Seghal.S.N. and Sedni.B. : Radioprotective Effects of The Immunomodulator A101, *J.Immunol.*, 145 : 1512-1527, 1990.
37. Kim,S.H.,Cho,C.K.,Yoo,S.Y.,Koh, K. H.,Yun,H.G., and Kim, T. H. : In Vitro Radioprotective Activity of Panax Ginseng and Diethyldithiocarbamate, in vivo 7 : 467-470, 1993.
38. Lichtman.M. : The ultrastructure of the hemopoietic environment of the bone marrow : A review. *Exp. Hematol.* 9 : 391-410, 1981.
39. Laver J. : Radiobiological properties of human hematopoietic and stromal marrow cells, *Int. J. Cloning.* 7 : 203, 1989.
40. LiebMann,J.,DeLuca,A.M.,Epstein A., Steinberg, S. M.,Morstyn,G. and Mitchell B. : Protection from Lethal Irradiation by the Combination of Stem cell Factor and Tempol, *Rad. Res.*, 137, 400-404, 1994.
41. Makinodan,T. and James, S. J. : T cell potentiation by low dose ionizing radiation : possible mechanisms. *Health Physics*, 59 : 29-34, 1990.
42. Nowell, P.C. : Phytohemagglutinin : an inhibitor of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20 : 462-466, 1960.
43. Neta R,Vogel,S.N.,Oppenheim, J. J.,Douches, S. D. : Cytokines in radioprotection : comparison of the radioprotective effects of IL-1 toIL-2,GM-CSF and IFN- γ . *Lymphokine Res* 5 : S105,1986(supp11).
44. Olden, K., Breton, P., Grzegorzewski, K., Yasuda,T., Gause,B., Oredipe,O.A., Newton, S. A., White, S. L. : The potential importance of Swanisonine in therapy for cancers and immunology, *Pharmac.Ther.*, 50 : 285-290, 1991.
45. Peter Mauch, H.Joachim Deeg : Hematopoietic stem cell compartment : acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy, *Int.J.Radiation Biol.Phys.*, 31(5) : 1319-1339, 1995.
46. Yarilin,A.A. : Action of ionizing radiation on lymphocytes(inhibition and activation effects).*Immunology*, 5 : 5-11, 1988.