

원 저

생혈단의 골수부전 치료효과에 대한 실험적 연구

이연월, 손창규, 조종관
대전대학교 부속 한방병원 내과

The Effects of *Saenghyuldan*(*shēngxiēdān*) on Bone Marrow Failure

Yeon-Weol Lee, Chang-Kyu Son, Chong-Kwan Cho

Daejeon University Oriental Medical Hospital

Objectives : This experimental study was carried out to prove the effect of *Saenghyuldan*(SHD; *shēngxiēdān*) on bone marrow failure induced by cyclophosphamide(CY) and irradiation in mice.

Methods : The following were performed; immunopathology, histopathological findings of bone marrow and in the smear of myelocyte, hematopoietic cytokine(IL-3, GM-CSF, TPO), hematopoietic stem cell colony assay, humoral immunity(LPS mitogen response), cell-mediated immunity (Con A mitogen response) and nonspecific immunity(macrophage adherence & phagocytosis) in vitro or vivo.

Results : SHD showed a protective effect on bone marrow failure induced by cyclophosphamide(CY) and irradiation in mice. SHD increased lymphoproliferative responses to LPS and Con A, and activated macrophage adherence and phagocytosis to SRBC.

Conclusions : We expect that SHD can be used to treat bone marrow failure and immune suppression induced by the chemotherapy or radiation. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(1):33-45)

Key Words: *Saenghyuldan*(*shēngxiēdān*), bone marrow failure, hematopoiesis, immunity

서론

골수는 각종 혈구를 생산하는 조혈작용 뿐만 아니라, 동양혈관(sinusoid)의 내피세포의 파혈작용 및 골모세포(osteoblast)에 의한 조골기능을 담당하는 장기로서 간세포로부터 적혈구계, 과립구계, 임파구계 및 거대핵 세포계의 다양한 단계의 혈구성분들의 증식 및 분화, 저장, 방출을 조절하는데, 이 기능은 인체의 항상성 및 면역능과 생명을 유지하는데 중요하다¹⁾.

한의학에서는 《素問·脈要精微論》²⁾에서 “骨者 髓之府”라 하여 골격내에 소장되어 있는 것이 골수라는 것을 인식하고 있으며, 《靈樞·海論》³⁾에 “腦爲髓之海”라 하였듯이 골과髓,腦를 상호 밀접히 관련있는 奇恒之府로 정의하였다. 또한, 이러한 골수에서 생성되거나 이들을 영양하는 精과 血의 관계를 결부시켰는데, 《張氏醫通》⁴⁾에서는 “歸精於腎而爲精 精不泄 歸精於肝而化清血”이라 하였고, 《醫宗必讀》⁵⁾에서는 “肝腎同源”, “精血相生”이라 하여 腎과 肝이 이들을 주관하는 것으로 인식하였다. 《素問·金匱真言論》⁶⁾에서는 “藏於精者 春不癘病”이라 하였고, 《靈樞·

· 접수 : 2001년 2월 1일 · 채택 : 2월 16일
· 교신저자 : 이연월, 대전대부속한방병원 내과 3
(Tel. 042-229-6807, E-mail : lyweol@hanmail.net)

師傳篇》⁹⁾에서는 “肝者 主爲將 使之候外”라 하여 서양의학에서의 골수의 면역 기능과의 상관성에 대해 언급하였다.

골수는 인체의 항상성 및 면역능과 생명의 유지를 위해 세포간의 물리적 상호작용과 액체적 요소로 이루어지는 특유의 미세환경(hematopoietic microenvironment)을 조성하고, 이를 통해서 지속적으로 조혈 간세포(hematopoietic stem cells)를 유지하며, 각각의 조혈경로에서 세포들의 수임 방향과 증식 및 분화 정도와 생리적 요구에 따른 정교하게 조절된 활동성을 보장하게 되는데, 이러한 정상적 골수의 기능이 어떤 이유론상 상실하게된 것을 골수부전이라 한다⁶⁾. 골수부전은 면역기능의 저하와 직결되어 이는 암의 전이나 재발, 혹은 치료 중의 2차적 새로운 암의 발생과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀져, 증가일로에 있는 암환자의 발생과 그 치료과정에서 야기되는 골수부전의 예방이나 치료는 매우 절실한 실정이다^{15,6)}. 대전대학교 부속 한방병원에서는 1992년부터 동서암센터를 개설하여 다양한 암환자에 대한 한의학적 암치료 뿐만 아니라 서양의학적 암 치료의 부작용을 감소시킴으로써 암치료의 효율성이나 환자들의 생활의 질을 향상시키기 위한 연구를 지속하여 왔다¹¹⁻¹³⁾. 그러나, 골수부전의 치료에 대한 실험적 연구는 미흡한 실정이다. 이에 저자는 그러한 노력의 일환으로 한의학적 이론과 약물을 이용하여 암 치료 과정에 발생되는 골수부전의 예방이나 치료에 효능이 있으리라 예상되는 생혈단을 구성하여, 그 효과를 검증하고자 대표적인 골수독성이 있는 cyclophosphamide 투여와 방사선 조사로 골수기능을 억제시킨 후, 면역장기와 골수의 조직학적 변화와 혈청 중 IL-3, GM-CSF 농도, 골수세포들의 조혈관련 cytokine인 IL-3, GM-CSF, EPO, TPO, SCF, IL-6의 발현을 관찰하였고, 조혈 간세포에 대한 직접적 작용을 알기 위한 colony-forming assay, 면역학적 효과를 보고자 비장과 흉선 세포를 이용한 lymphoproliferation assay 및 macrophage의 부착능과 탐식능을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재 료

본 실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 구성은 등량으로 다음과 같다.

Prescription of Saenghyuldan(SHD)

韓藥名	學 名	分量(g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
白 朮	<i>Atractylodis Macrocephalare Rhizoma</i>	4
鹿 茸	<i>Cervi Pantotrichum Cornu</i>	4
紫河車	<i>Hominis Placenta</i>	4
阿 膠	<i>Asini Gelatinum</i>	4
總 量		20

생혈단 200g(10첩 분량)에 증류수 2,000ml을 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과한 후, 이를 감압 증류장치로 농축하고, 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 생혈단 추출물(80g)을 냉장 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

방법 및 결과

동물은 한국 화학 연구소에서 4주령의 雌性 C57BL/6 마우스를 구입하여, 7일~14일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였으며, 고형사료와 물을 충분히 공급하였다. 실험 전 중량을 기준으로 모든 그룹의 평균이 균일하게 하여, 다음과 같이 4그룹으로 각각 8마리씩 분류하였고, cyclophosphamide(CY) 투여군과 방사선 조사군은 별도로 분류하였으며, colony-forming assay와 조혈 유전자에 대한 분석을 위한 실험군은 따로 3마리씩 분류하였다.

△ 정상군(normal) : cyclophosphamide(CY)나 방사선으로 골수부전을 유발시키지 않고, 생혈단도 투여하지 않은 군.

△ 대조군(control) : CY(300mg/kg과 100mg/kg)이나

방사선(4cGy)으로 골수부전을 유발시킨 후, 생혈단을 투여하지 않은 군.

△ 실험군 A(저농도 투여군) : CY(300mg/kg과 100 mg/kg)이나 방사선(4cGy)으로 골수부전을 유발시킨 후, 생혈단을 100mg/kg의 농도로 투여한 군.

△ 실험군 B(고농도 투여군) : CY(300mg/kg과 100 mg/kg)이나 방사선(4cGy)으로 골수부전을 유발시킨 후, 생혈단을 500mg/kg의 농도로 투여한 군.

CY 투여에 의한 골수부전 유발 실험에서는 생혈단을 증류수에 희석(100mg/kg과 500mg/kg)하여 15일간 투여하였으며, 실험개시 3일째 되는 날 CY를 멸균 생리식염수에 적당히 희석하여 300mg/kg의 용량으로 복강내 주사하였고, 실험 개시 9일째날에 다시 100mg/kg의 용량으로 복강내 주사하였으며, 방사선 조사의 경우는 생혈단을 투여한 후 3일째 되는 날에 저준위 1만 Ci의 covalt gama선 조사기로 선량을 (dose-rate) 1cGy/nmin 로 마우스에 4분간 조사해 총 4cGy를 조사하였다. 다양한 실험으로 부터 얻은 결과는 Mean±Standard deviation으로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test분석 방법을 이용하여 결정하였다.

1) Cyclophosphamide에 의한 골수부전에 대한 효과

(1) 말초 혈액상의 변화

생혈단을 경구투여 시작한지 3일째 되는 날부터, 3일 간격(3일, 6일, 9일, 12일, 15일)으로 연속적인 말초 혈액상의 변화를 측정하였는데, heparin 처리된 capillary tube(I.D.; 1.1~1.2ml, Chase Scientific Glass Inc., U.S.A.)를 C57BL/6 마우스의 후안와정맥총에 조심스럽게 삽입함으로 채혈을 하여 96well plate에 놓은 후, plate rotator위에 약 30초 정도 올려놓았다가 blood cell counter(HEMA VET, CDC Technologies Inc., U.S.A.)를 이용하여 혈구들을 분석하였다 (Table 1).

(2) 체중의 변화 및 장기 중량 측정

생혈단을 3일간 투여한 후, cyclophosphamide를 300mg/kg의 용량으로 복강내 주사하고, 3일간 생혈단을 더 투여하였다. 실험기간은 15일로 3일마다 체중의 변화를 측정하였고, 실험 종료일에는 경추 탈구로 도살시켜 방혈시킨 다음, 간장과 비장, 흉선의 중량을 측정하였다(Fig. 1, Table 2).

Table 1. The Effect of SHD on CBC Count in CY-induced Myelosuppressed Mice

CBC	Group	3rd day	6th day	9th day	12th day	15th day
WBC($10^3/\mu l$)	Normal	6.71±1.10 ^a	6.62±0.63	7.32±1.64	7.20±1.76	7.97±1.62
	Control	7.02±1.35	0.87±0.20	1.65±1.16	1.83±1.20	3.01±1.84
	SHD 100mg/kg	6.10±1.17	1.71±0.48 [†]	2.97±0.26 [†]	3.06±0.32 [†]	3.44±1.20*
	SHD 500mg/kg	6.80±1.63	3.16±0.85 [‡]	3.77±0.41 [‡]	3.81±0.50 [†]	4.39±0.99*
RBC($10^3/\mu l$)	Normal	11.80±1.04	11.30±0.19	11.03±0.54	10.92±0.50	10.66±0.30
	Control	11.96±0.54	9.72±1.45	8.49±0.99	8.34±0.97	7.50±0.80
	SHD100mg/kg	11.88±0.64	11.00±1.03*	8.54±0.6*	8.39±0.64*	8.44±0.46 [†]
	SHD500mg/kg	11.06±1.58	11.09±0.51 [†]	8.69±0.54*	8.57±0.49*	8.31±0.70 [†]
Hgb(g/dl)	Normal	17.05±0.41	16.10±0.43	16.26±0.20	16.19±0.24	16.30±0.43
	Control	17.03±0.88	14.49±0.68	11.66±1.49	11.50±1.66	10.59±1.07
	SHD100mg/kg	17.34±0.44	15.51±0.96 [†]	12.15±0.89*	12.08±0.89*	11.38±0.62*
	SHD500mg/kg	16.66±0.30	15.88±0.56 [‡]	11.99±0.42*	11.81±0.29*	11.16±0.90*
Ptt($10^3/\mu l$)	Normal	689.5±90.9	731.6±141.0	1009.4±71.3	1013.8±64.6	925.6±183.9
	Control	672.1±66.0	494.3±108.5	719.0±142.8	796.6±160.4	458.6±218.5
	SHD100mg/kg	680.0±68.7	584.8±154.5*	857.4±77.1 [†]	876.6±67.7*	534.4±211.6*
	SHD500mg/kg	663.9±111.8	651.3±104.5 [†]	944.3±126.7 [†]	971.8±133.4 [†]	668.9±103.8 [†]

^a Mean ± Standard Deviation

* : Statistically significant value compared with control by T-test(*: not significant, † :P<0.05, ‡ :P<0.01, §:P<0.001)

(3) 골수의 조직 관찰

마우스의 한쪽 대퇴골을 실험 종료일에 방혈된 상태로 10% 중성 포르말린 용액에 1차 고정하여 통상적인 조직처리 과정을 거쳐, Hematoxylin & Eosin 염색후 병리·조직학적 소견을 관찰하였는데, 1차 고정 후에 buffered formic acid에 담그고, 탈회 과정을 경유후 다음 과정을 진행하였다. 정상군의 골수세포의 치밀도는 완벽하였고, 공포도 발견되지 않았는데, 대조군은 골수세포의 치밀도가 매우 성글며, 다수의 커다란 공포(vacuole)가 발견되었다. 저농도 투여군에서는 대조군에 비해 골수 세포가 치밀하고, 공포의 수가 감소되었으며, 고농도 투여군은 골수세포의 치밀도는 거의 정상에 가깝고, 공포도 발견되지 않아 골수조직이 정상조직에 가깝게 회복된 소견을 관찰할 수 있었다.

(4) 조혈 관련 cytokine에 대한 영향

① 실험 개시 6일째 되는 날 말초 혈액 검사를 위한 채혈시 cytokine 측정을 위해 또 다른 1개의

capillary tube로 채혈하여 혈청 중 IL-3와 GM-CSF, TPO의 농도를 kit를 이용하여 측정하였는데, 제품의 protocol에 따라서 시행하였다(Table 3).

② 골수 간세포를 회수하여 deep freezer에 보관한 후, 골수세포들을 RNazol[®]를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)¹⁴⁾에 사용하였다. PCR은 water bath 방식의 turbo thermalcycler[™]를 이용하여 수행하였다. Internal control로서 β -actin이 사용되었으며, 증폭되는 PCR product size는 각각 β -actin은 548bp, IL-3는 549bp, GM-CSF는 447bp, EPO는 289bp, TPO는 342bp, SCF는 328bp, IL-6는 532bp이다. PCR product의 양은 Windows main program(AAB, U.S.A.)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

골간세포에서의 cytokine 유전자 발현분석을 관찰한 결과, 고농도 투여군에서 IL-3 유전자의 발현이 2.9배, GM-CSF 유전자의 발현이 2.9배, EPO 유전자의 발현이 1.7배, TPO 유전자의 발현이 5.7 배, SCF 유전자의 발현이 7.6배로 증가되었으나, IL-6 유전자의 발현이 0.9배로 감소되어 증가되어 IL-6 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

(6) 골수내 간세포의 colony-forming assay

골수 간세포의 회수 및 분리한 후, gride-type의 culture dish에 3 ml씩 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 7일간 배양하여 형성된 colony수를 계수하였으며, 이때 burst forming unit-erythroid(BFU-E)系와 colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage and megakaryocyte(CFU-GEMM)계로 구

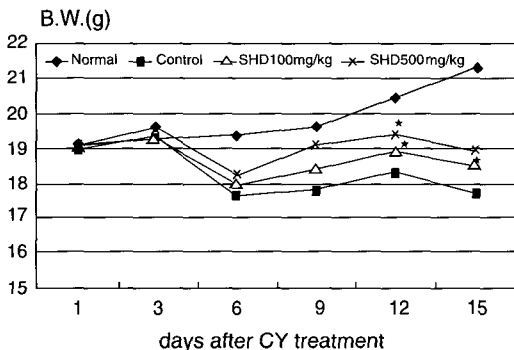


Fig. 1. Body Weight change of CY-induced myelosuppressed mice. Statistically significant value compared with control by T-test(*: not significant, †: P<0.05, ‡: P<0.01)

Table 2. Organ Weight Change of CY-induced Myelosuppressed Mice

Group	Spleen weight(g)	Liver weight(g)	Thymus weight(g)
Normal	0.05 ± 0.01 ^{ns}	0.84 ± 0.12	0.05 ± 0.01
Control	0.10 ± 0.03	0.79 ± 0.09	0.01 ± 0.01
SHD 100mg/kg	0.11 ± 0.03*	0.80 ± 0.08*	0.02 ± 0.01*
SHD 500mg/kg	0.14 ± 0.04 [†]	0.83 ± 0.14*	0.03 ± 0.01 [†]

^{ns} Mean ± Standard Deviation

Statistically significant value compared with control by T-test(*:not significant, †: P<0.05)

Table 3. Effect of SHD on Hematopoietic Cytokine of Mice Induced by CY

Group	IL-3(pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)	TPO(pg/ml)
Normal	2.91 ± 0.29 ^a	14.96 ± 0.71	392.6 ± 19.06
Control	0.78 ± 0.12	3.32 ± 0.32	312.5 ± 20.54
SHD 100mg/kg	5.13 ± 0.70 ^b	6.13 ± 0.29 ^b	511.9 ± 15.29 ^b
SHD 500mg/kg	6.40 ± 0.36 ^b	6.56 ± 0.53 ^b	496.5 ± 22.83 ^b

^a Mean ± Standard Deviation

Statistically significant value compared with control by T-test(§:P<0.001)

Oligonucleotide sequences of primers

Gene	Primer	Sequence	Product(bp)
β -actin	hAct-S	5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	548
	hAct-AS	5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'	
IL-3	Sense Antisense	5' -GAAGTGGATCCTGAGGACAGATACG-3'	549
		5' -GACCCATGGGCCATGAGGAACATTC-3'	
GM-CSF	Sense Antisense	5' -GGATCCTCAGAGAGAAAGGCTAAG-3'	447
		5' -GGATCCTGGGCTTCCTCATTTTT-3'	
EPO	Sense Antisense	5' -TAGAAGTTTGGCGAGGCTG-3'	289
		5' -CGTGTACZGCTTCAGTTTC-3'	
TPO	Sense Antisense	5' -CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'	342
		5' -AGCCATGAGTTCCATTAC-3'	
SCF	Sense Antisense	5' -TAACCCTCAACTATGTCGCC-3'	328
		5' -CGTGTACAGCCTTCAGTTTCC-3'	
IL-6	Sense Antisense	5' -ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'	532
		5' -GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	

분하여 계수하였다(Table 4).

2) 방사선 조사에 의한 골수부전에 대한 효과

(1) 말초 혈액상의 변화

생혈단을 투여하기 시작한지 3일째 되는 날부터 8일, 10일, 13일, 16일, 20일로 연속적인 말초 혈액상의 변화를 측정하였는데, heparin 처리된 capillary tube heparin 처리된 capillary tube(I.D.; 1.1~1.2ml, Chase Scientific Glass Inc., U.S.A.)를 C57BL/6 마우스의 후안와정맥총에 삽입함으로 채혈을 하여 blood cell counter(HEMA VET, CDC Technologies Inc., U.S.A.)를 이용하여 혈구들을 분석하였다(Table 5).

(2) 체중의 변화 및 장기 중량 측정

실험 기간은 20일로, 8일, 10일, 13일, 16일, 20일에 체중의 변화를 측정하였고, 실험 종료일에 마우스를

경추 탈구로 도살시켜 방혈을 시킨 후, 간장과 비장, 흉선의 중량을 측정하였다(Fig. 2, Table 6).

(3) 골수 조직 관찰과 골수 세포의 도말을 통한 혈구의 관찰

C57BL/6 마우스를 그룹별로 3마리씩 정한 다음, 생혈단을 투여한 후, 3일째에 방사선을 4cGy씩 조사하고, 3일간 더 생혈단을 투여한 후, 실험 개시 6일째 되는 날, 마우스를 마취 방혈시켜서 희생시킨 후, 에틸 알콜로 충분히 양쪽 대퇴골을 적시고, 근육들이 붙지 않도록 분리하였다.

① 한쪽 대퇴골은 10% 중성 포르말린 용액에 1차 고정된 후에 buffered formic acid에 담그어 탈회 과정을 경유하고, 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin 염색후, 병리·조직학적 소견을 관찰하였다. 대퇴골의 골수조직을 현미경으로 관찰한 결

Table 4. Hematopoietic Stem Cells Colony Assay in CY-induced Myelosuppressed Mice

	BFU-E	CFU-GEMM
Normal	47.3 ± 2.6 ^{a)}	110.0 ± 6.0
Control	27.0 ± 2.6	63.0 ± 6.0
SHD 100mg/kg	53.1 ± 2.6 [†]	123.9 ± 6.1 [‡]
SHD 500mg/kg	70.3 ± 4.6 [‡]	164.0 ± 10.7 [‡]

^{a)} Mean ± Standard Deviation

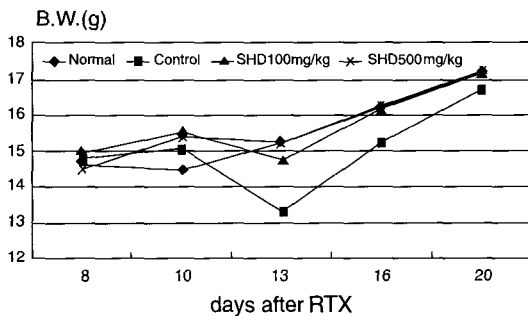
Statistically significant value compared with control by T-test(‡: P<0.001)

Table 5. The Effect of SHD on CBC Count in RTX-induced Myelosuppressed Mice

CBC	Group	8th day	10th day	13th day	16th day	20th day
WBC(10 ³ /μl)	Normal	10.42 ± 2.00 ^{a)}	10.30 ± 1.38	10.43 ± 1.64	10.61 ± 1.74	11.11 ± 1.28
	Control	9.15 ± 1.73	4.32 ± 1.45	3.38 ± 1.63	1.75 ± 0.33	3.96 ± 0.56
	SHD100mg/kg	10.58 ± 2.34	6.27 ± 2.30*	4.06 ± 1.08*	2.55 ± 0.76 [†]	5.03 ± 1.06 [†]
	SHD500mg/kg	9.62 ± 1.90	4.91 ± 1.67*	4.48 ± 1.22*	4.25 ± 1.85 [†]	6.32 ± 1.09 [‡]
RBC(10 ³ /μl)	Normal	10.23 ± 0.48	9.98 ± 0.54	9.67 ± 0.62	9.21 ± 0.31	8.46 ± 0.62
	Control	10.20 ± 0.47	9.71 ± 0.65	8.23 ± 0.64	7.60 ± 0.20	7.67 ± 0.16
	SHD100mg/kg	10.16 ± 0.31	9.79 ± 0.34*	8.58 ± 0.79*	7.84 ± 0.38*	8.07 ± 0.41 [†]
	SHD500mg/kg	10.06 ± 0.45	9.23 ± 0.50*	8.55 ± 0.25*	7.87 ± 0.30*	8.32 ± 1.09 [†]
Hgb(g/dl)	Normal	13.95 ± 0.33	13.74 ± 0.25	13.30 ± 0.57	12.01 ± 0.61	11.34 ± 0.58
	Control	13.99 ± 0.53	14.20 ± 0.65	11.83 ± 0.84	11.68 ± 0.29	10.89 ± 0.22
	SHD100mg/kg	13.75 ± 0.46	14.44 ± 0.32*	12.43 ± 0.83*	11.74 ± 0.34*	11.16 ± 0.38*
	SHD500mg/kg	13.83 ± 0.26	13.45 ± 0.48 [†]	12.20 ± 0.39*	11.89 ± 0.38*	11.35 ± 0.34 [†]
Plt(10 ³ /μl)	Normal	470.0 ± 94.2	562.3 ± 76.8	699.8 ± 59.6	741.4 ± 141.3	801.6 ± 170.6
	Control	549.4 ± 52.6	458.1 ± 146.2	407.9 ± 230.3	243.0 ± 46.8	434.9 ± 90.9
	SHD100mg/kg	544.5 ± 95.2	575.9 ± 122.5*	572.6 ± 130.0*	332.1 ± 66.6 [†]	570.6 ± 102.6 [†]
	SHD500mg/kg	509.4 ± 139.4	542.9 ± 243.7*	564.5 ± 55.6*	419.6 ± 135.3 [†]	640.6 ± 76.0 [‡]

^{a)} Mean ± Standard Deviation

: Statistically significant value compared with control by T-test(: not significant, †: P<0.05, ‡: P<0.01, §: P<0.001)

**Fig. 2. Body weight change of RTX-induced myelosuppressed mice.**

Statistically significant value compared with control by T-test(†: P<0.05, ‡: P<0.01, §: P<0.001)

Table 6. Organ Weight Change of RTX-induced Myelosuppressed Mice

Group	Spleen weight(g)	Liver weight(g)	Thymus weight(g)
Normal	0.05 ± 0.01 ^{a)}	0.84 ± 0.05	0.05 ± 0.01
Control	0.08 ± 0.02	0.80 ± 0.03	0.02 ± 0.01
SHD 100mg/kg	0.08 ± 0.01*	0.90 ± 0.13*	0.04 ± 0.01 [†]
SHD 500mg/kg	0.10 ± 0.02 [†]	0.89 ± 0.06 [†]	0.04 ± 0.01 [†]

^{a)} Mean ± Standard Deviation.

Statistically significant value compared with control by T-test(*: not significant, †: P<0.05, ‡: P<0.01)

Table 7. Histological Finding on Hematocyte of Bone Marrow Cell in RTX-induced Myelosuppressed Mice

	Rate of leucocyte to erythrocyte(%)	Impuberal erythrocyte in the erythrocyte(1×10^3)
Normal	43.8 ± 2.0 ^a	20.3 ± 2.5
Control	2.9 ± 0.2	66.7 ± 7.6
SHD 100mg/kg	5.4 ± 0.3 [§]	126.3 ± 15.5 [†]
SHD 500mg/kg	6.6 ± 0.4 [†]	170.3 ± 12.7 [§]

^a Mean ± Standard Deviation

Statistically significant value compared with control by T-test(*:not significant, †:P<0.05, §:P<0.001)

Table 8. Effect of SHD on the Hematopoietic Cytokine in RTX-induced Myelosuppressed Mice

Group	IL-3(pg/ml)	IL-3(pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)
	14th day	20th day	14th day	20th day
Normal	3.25 ± 0.38 ^a	3.48 ± 0.54	14.86 ± 1.53	15.21 ± 1.15
Control	0.85 ± 0.28	1.30 ± 0.48	2.69 ± 0.46	5.81 ± 0.94
SHD 100mg/kg	2.81 ± 0.46 [§]	3.18 ± 0.45 [§]	5.49 ± 0.45 [§]	7.85 ± 1.05 [†]
SHD 500mg/kg	2.80 ± 0.39 [§]	3.25 ± 0.23 [§]	5.59 ± 0.94 [§]	8.10 ± 1.60 [†]

^a Mean ± Standard Deviation

Statistically significant value compared with control by T-test(† :P<0.05, §:P<0.001)

과 정상군의 골수조직은 백혈구 계열 및 적혈구 계열의 모든 세포들이 정상적으로 충만해 있었다. 그러나, 대조군의 골수조직은 백혈구 계열 및 적혈구 계열의 세포들의 손상으로 인하여 그 밀도는 극히 낮았으며, 지방조직들로 점유되어 있었다. 저농도 투여군에서는 대조군에 비하여 백혈구 계열 및 적혈구 계열의 세포들이 현저하게 증가하였고, 고농도 투여군에서는 적혈구 계열의 조절상이 관찰되었으며, 지방조직의 점유율도 현저하게 줄었다.

② 골수내 세포의 혈구 관찰

한쪽 대퇴골은 분리해서 양측 말단을 자른 후, 골수 내에 D-PBS를 주입하여 골수를 회수하여 도말하여 건조후 Wright & Giemsa 염색을 실시하고, computer image analyzer를 이용하여 적혈구계와 백혈구계 사이의 비율을 구하고, 백혈구의 분포 양상을 측정하였으며, Immersion oil을 떨어뜨리고, 광학 현미경에서 미분화 적혈구들의 형태상을 관찰하여 1,000개의 적혈구 중에 미성숙 적혈구들이 차지하는 비율을 계수하였다(Table 7).

(4) Cytokine(IL-3, GM-CSF) 측정

실험 개시 6일째 되는 날에 1개의 capillary tube로 채혈을 하였으며, 최종일에는 복대동맥에서 전혈을 회수하여 혈청 중 IL-3와 GM-CSF의 농도를 실험 개

시 후 14일과 20일에 kit를 이용하여 측정하였다 (Table 8).

(5) 골수내 간세포의 colony-forming assay

생혈단의 골수 세포에 대한 직접 효과를 알아보기 위한 *in vitro* 실험을 실시하였다. 방사선을 조사한 마우스 3마리를 에테르로 마취시키고, 방혈을 통해 도살시킨 후, 70% 에틸 알콜로 충분히 적시어, 각각 한쪽의 대퇴골을 분리하여 얼음 위에 미리 준비해 두었던 10ml의 D-PBS가 담겨져 있는 conical tube에 1 ml의 주사기를 이용하여 골수 세포를 회수하였다. MethoCult M3134 40ml에 Isecovo's MDM 50ml와 10 ml의 FBS를 섞은 후, conical tube에 10ml씩 나누어 준비하고, 0.25 ml의 Isecovo's MDM에 희석한 IL-3(최종 농도 100U/ml)와 EPO(최종 농도 3U/ml) 및 희석한 골수 세포 0.25ml(3×10^4 cell), 생혈단을 그룹 별로(최종 농도가 0µg/ml, 5µg/ml, 50µg/ml, 500µg/ml) 0.5ml씩 각 tube에 투여해서 잘 섞고, 선으로 표시된 petri dish에 3ml씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에 7일간 배양하여, 형성된 colony수를 계수하였는데, 이때 burst forming unit-erythroid(BFU-E)계와 colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage and megakaryocyte(CFU-GEMM)계로 구분하여 계수하였다(Fig. 3).

3) 면역 조절 효과

(1) Lymphoproliferation assay

① 비장과 흉선 세포의 분리 및 배양

C57BL/6 마우스 1마리를 에테르로 마취시키고, 방혈한 후, 비장과 흉선을 각각 떼어내 차가운 D-PBS가 담겨진 35mm petridish에 넣고, 5ml의 p-lunger로 가볍게 눌러서 세포들이 흩어지게 한후, conical tube에 옮겨 5분간 방치한 다음, 상청액만을 따로 취해서 1,200rpm으로 5분간 원심분리하고, NH₄Cl을 넣어 적혈구를 용혈시킨 후, D-PBS로 2번 씻고, RPMI-1640(10% FBS, 100unit/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin)으로 1 \times 10⁶cell/ml가 되도록 조정하였다. 96well plate에 100 μ l의 비장 세포와 흉선 세포들(그룹별 6well)을 넣고 생혈단(5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml)을 50 μ l씩 첨가하고, 대조군에는 같은 양의 배지를

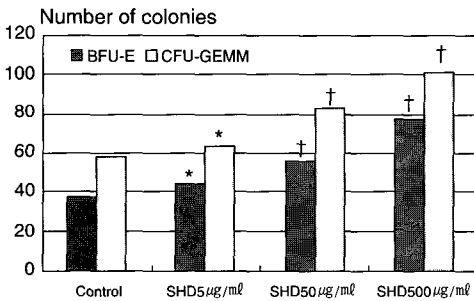


Fig. 3. Hematopoietic stem cell colony assay in RTX-induced myelosuppressed mice. Statistically significant value compared with control by T-test(*:not significant, †:P<0.05)

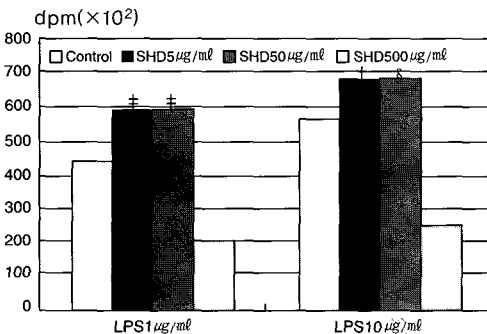


Fig. 4. Effect of SHD on lymphoproliferative response to LPS.

를 넣었으며, 또한 비장 세포에는 lipopolysaccharide(LPS)가 최종 농도 1 μ g/ml와 10 μ g/ml이 되도록 50 μ l씩 첨가했고, 흉선 세포에는 concanavaline A(Con A)의 최종 농도가 1 μ g/ml와 5 μ g/ml이 되도록 50 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48 시간 배양 후 배지에 1 μ Ci/50 μ l의 농도로 희석한 [³H]-thymidine을 각각의 well에 50 μ l씩 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양한 후, cell harvester를 이용하여 glass fiber filter에 부착시키고, 3차 증류수로 세척한 다음 건조시킨 다음, 여과지를 scintillating 바이알에 넣은 후, 각테일 용액을 2ml씩 가하여 β -counter로 그 방사능을 측정하였으며, 각각의 disintegrations per minutes(dpm)값의 평균을 구하였다(Fig. 4,5).

(2) 복강 macrophage의 부착능과 탐식능

C57BL/6 마우스 3마리를 에테르 마취한 후 방혈시키고, 차가운 D-PBS 5ml을 넣어 1분간 잘 마사지한 후, 복강 세포를 회수하여 1,200rpm의 속도로 10분간 원심분리하고 D-PBS로 2회 씻었다. 얼음에 꽂혀 있던 4개의 conical tube에 14.5ml씩 나누어 넣고, 최종 농도가 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml이 되도록 멸균된 생혈단을 0.5ml을 첨가하였고, 대조군은 배지를 가하여 30분간 얼음에 꽂아 놓았다. 이후 60mm petridish에 5ml씩 분주한 후, 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 배양하고, 37 $^{\circ}$ C의 D-PBS로 2회 씻어서 부착되지 않은 복강 세포를 버렸다. 최종적으로

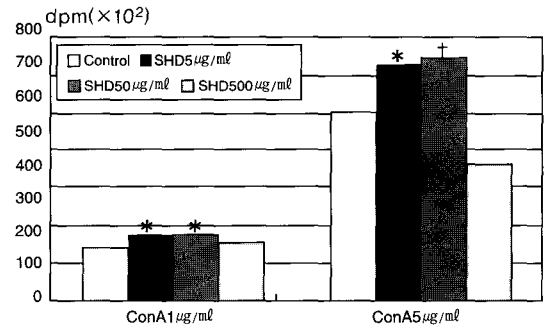


Fig. 5. Effect of SHD on lymphoproliferative response to Con A.

D-PBS가 넣어서 있는 dish를 inverted microscope(400배)로 정중앙을 지나도록 조정하여 부착된 macrophage를 3차 계수하여, 그 평균을 구하였다. 이 세포들을 이용하여 IgG의 매개성 탐식능을 측정하였는데, 부착능을 계수하고난 dish들은 37℃, 5% CO₂ incubator에 보관을 해놓고, SRBC에 rabbit anti-SRBC IgG를 coating시켜서 macrophage의 탐식능을 알아 보았는데, 25분간 반응시키고, 다시 37℃의 D-PBS로 2회 씻어서 부착되지 않은 적혈구들을 제거 하였다. 부착능의 경우와 같은 방법으로 부착되어 있는 300개의 macrophage 중에서 적혈구를 3개 이상 탐식하거나 탐식 중인 세포를 계수하여 그 백분율을 구하였다(Fig. 6,7).

고찰 및 결론

골수는 체내의 가장 큰 임파구 조혈 장기로서 전신의 골수강내에 존재하며, 중량은 성인에게는 체중의 3.4~5.9% 정도를 차지한다¹²⁾. 골수의 약 절반이 활동성(적골수)으로 조혈에 참여하고 있을 뿐만 아니라, 임파구 보충의 근원지는 골수의 간세포 구역이다^{2,4,6)}. 골수와 흉선에서의 임파구 생성은 항원의 자극과 임파계의 다른 부위에서 생긴 결과에 의존한다. 이 두 기관은 항원에 의해 자극을 받았을 때 면역적

기능의 소임을 할 수 있는 임파구를 말초적, 즉 2차 임파계로 공급하는 일을 한다. 정상적 골수의 기능이 어떤 이유로든 상실하게 된 것을 골수부전(bone marrow failure)이라 하는데, 골수부전은 백혈병, 골수 이형성증, 재생불량성 빈혈과 같은 일차적인 골수부전과 항암 화학 요법이나 방사선 치료법 등에 의해서 유발되는 이차적 골수부전으로 대별된다³⁾.

한의학에서는 《素問·脈要精微論》⁷⁾에서 “骨者 髓之府”라 하여 골격 내에 소장되어 있는 것이 골수라 하였으며, 《靈樞·經脈》⁸⁾에서 “始生, 先成精, 精成而腦髓生, 骨爲幹”, 《靈樞·本神》⁹⁾에서 “腎藏精, 精舍志, 腎氣虛則厥”, 《素問·五臟生成篇》¹⁰⁾에 “腎之合骨也”, 《素問·逆調論》¹¹⁾에 “腎者水也 而生於骨 腎不生則髓不能滿”이라 하여 腎과 精, 骨髓와의 관계를 일찌기 인식하고 있었다. 《素問·五運行大論》¹²⁾의 “寒生水 水生鹹 鹹生腎 腎生骨髓 髓生肝”과 《靈樞·本神篇》에서의 “肝藏血 血舍魂”, “血歸於肝”은 內經에서 이미 골수에서 생성되거나 이들을 유양하는 精과 血의 관계를 결부시켜 인식하기 시작하였으며, 腎과 肝이 이들을 주관하는 것으로 인식하였음을 알 수 있다. 精은 腎에 貯藏되고, 血은 肝에 저장되며, 肝腎同源說에 의하면 腎精과 肝血은 서로 資生轉化한다¹³⁾. 또한, 《素問·上古天真論》¹⁴⁾ “腎者主水 受五臟六府之精而藏之 故五臟盛 乃能瀉”, 《素問·金匱真言論》¹⁵⁾의 “藏於精

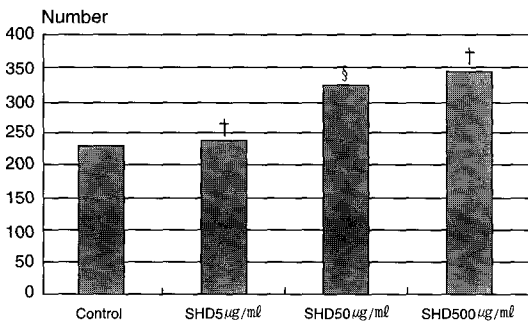


Fig. 6. The effects on the adherence of peritoneal macrophage. A statistically significant value compared with control by T-test(† :P<0.05, §:P<0.001).

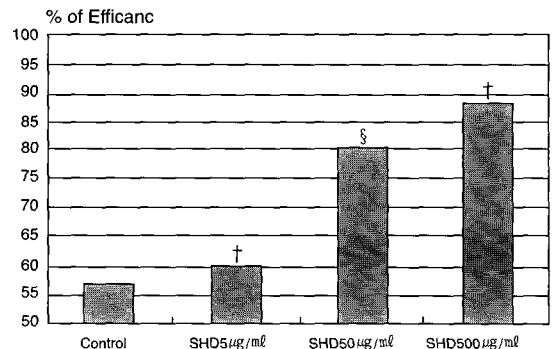


Fig. 7. Phagocytosis effect of peritoneal macrophage. A statistically significant value compared with control by T-test(† :P<0.05, §:P<0.001)

者 春不瘰癧病”, 《靈樞·師傳篇》⁶⁾의 “肝者 主爲將 使之候外”는 서양의학에서의 골수의 면역 기능과 연관되어 있다. 골수 조혈 장애의 증상으로는 백혈구 감소, 혈소판 감소, 적혈구 감소, 골수 억제, 재생 불량성 빈혈, 출혈 등과 같은 증상이 나타나는데, 이는 腎의 藏精機能과 肝의 造血機能이 감소되거나 상실되었을 때, 혈중 백혈구, 적혈구, 혈소판의 감소가 나타나고, 여러 감염 및 출혈, 탈모 등이 동반된다. 肝과 腎의 관계는 肝藏血, 腎藏精하여 腎이 充足하면 血도 왕성해져 肝藏血의 기능이 충실해지게 되어 인체 생리를 유지하는 것이다⁶⁾.

암은 현재 인류의 건강을 위협하는 주요한 질병의 하나로 전염성 질환이 기본적으로 해결된 국가에서는 심, 뇌혈관 질환과 더불어 사망원인 제 1, 2위를 차지하고 있으며^{17,18)}, 서양의학적인 암 치료 방법으로는 수술, 방사선치료, 화학요법, 면역요법 등이 있다^{5,18)}. 이미 부분적으로 종양에 의해서 면역타협(immunocompromise)이 일어난 환자에게 항암치료(항암제, 혹은 방사선치료)로 면역타협(immunocompromise)을 더욱 악화시킬 수 있으며, 세포독성 약물로 치료된 환자의 경우 2차 암의 발병율이 높다고 보고되어지고 있다^{6,18)}. 또한, 항암제는 백혈병 등의 혈액 암을 유발하는 경우가 많은 반면, 방사선 치료를 받은 환자의 경우는 고형암을 유발하는 경우가 많다⁶⁾. 항암제의 부작용은 항암제가 암 세포뿐만 아니라 정상 세포까지도 독성을 나타내어 종양 세포를 살해하는 동시에 골수 조혈 기능을 억제하고, 소화 기능 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하여 인체의 면역 기능을 저하시키는 문제점이 노출되고 있는데, 항암제의 부작용의 95%에서 골수 조혈 기능과 90%에서 면역계통에 독성을 나타낸다고 보고되고 있다⁹⁾. 방사선으로 조혈 조직이 손상되면 골수와 면역 기능이 저하되어 백혈구 감소, 출혈, 빈혈과 감염이 증가하게 된다²⁰⁾. 방사선 조사시 조혈 기관은 인체 내에서 가장 민감한 장기 중의 하나로 알려져 있으며 방사선 조사로 인한 말초 혈액내 임파구 감소는 면역 억제를 야기시킬 수 있다. 또한 면역 결손은 암 환자에 있어 치료 반응과 예후에 영향을 미치는 것으로 알려져

있다^{21,22)}. 임파구는 0.05Gy 미만의 매우 낮은 방사선량에서는 오히려 증식 반응을 보이지만, 그 이상의 조사량에서는 임파구의 면역 기능이 저하된다²¹⁻²³⁾.

암의 한의학적인 치료법은 크게 2가지, 즉 扶正培本法과 祛邪抗癌法으로 大別되는데^{24,25)}, 《素問·刺法論》⁷⁾의 “正氣存內 邪不可干”에 근거하여 羅²⁶⁾는 “養正則積自除”라 하여 扶正培本을 강조하였다. 또한 《素問·至眞要大論》⁷⁾의 “堅者削之”, “結者散之”, “留者攻之”처럼 攻邪를 더하여 扶正培本과 攻補兼施를 치료의 원칙으로 삼았다. 현대 한의학계에서는 한약으로부터 항암성이 인정되는 처방을 중심으로 단미약을 가미하여 항암 및 항전이 효과를 증대시키는 처방개발^{27,28)} 및 서양의학에서 주로 사용하는 화학요법 부작용 감소^{19,29)}와 방사선요법 부작용감소^{16,30-32)}를 위한 방법을 연구함으로써 암환자가 동서의학적 병용 치료를 받을 수 있는 근거를 제시하고자 노력하고 있다. 史³³⁾는 正氣 虛弱 程度를 면역반응 저하 정도에 비교하고 비특이적 면역을 선천지기에 특이적 면역을 후천지기에 해당한다 하여, 면역이나 이와 관련된 항암효과에 대한 연구^{11,12,34)}가 활발하게 이루어지고 있다.

생혈단의 항암 및 방사선 치료 부작용 감소 효과 및 조혈기능 촉진과 면역기능 증진효과를 검증하기 위하여 본 실험을 시도하였다. 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하므로 골수의 생성에 肝과 腎이 이들을 주관하는 것에 착안하여 생혈단을 사용하였다. 益氣補血, 滋補肝腎하는 처방인 생혈단은 人蔘, 鹿茸, 白朮, 紫河車, 阿膠로 구성되었는데, 각각의 약물의 효능은 다음과 같다.

人蔘은 五加(Araliaceae)科에 속하는 蔘의 根으로 正氣가 虛하여 외부로부터 들어오는 邪氣의 침해를 받아 질병이 발생한 경우나 질병후 正氣가 虛한 상태에 正氣를 補하는 補養藥으로 사용되고 있다^{35,36)}. 高³⁷⁾는 人蔘이 세포성 면역 반응과 체액성 면역반응을 증강시키는 효과가 있다고 하였다. 鹿茸은 사슴의 未骨化된 茄子樣의 袋角을 말하는 것으로, 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨등의 공효가 있어 虛勞羸瘦, 腰

膝痿軟, 일반 허손증 후유증에 널리 활용되고 있다^{35,36,38}. 鹿茸에 대한 실험적 연구로 金³⁹은 간손상 회복과 methotrexate cyclophosphamide 사용시 야기되는 정상세포 손상과 면역 억제 작용을 막아주고, prednisolone에 의한 면역 억제 작용을 감소시킴을 보고하였고, 高⁴⁰가 세포성 면역과 체액성 면역을 증가시키고, carbon clearance 및 NK cell activity를 증가시킴을 입증한 바 있다. 白朮은 菊花科에 속한 多年生草인 삼주의 根莖으로 溫苦甘하여 脾胃經에 入하므로 健脾益胃, 益氣肺腎, 補脾 化中 燥濕하여 脾虛症(肢體浮腫, 脾胃虛寒, 脾虛自汗, 風濕關節痛)을 치료하고^{35,36,38}, 암 치료에 있어서는 암세포의 증식율과 암조직의 침윤성을 저하시키며, 항암력과 암세포에 대한 세포 독성을 증가시킨다. 약리작용으로는 세포면역을 촉진하는 작용과 정유에는 중추 억제, 장관 운동 억제, 말초혈관 억제 등의 작용이 있다³⁵. 紫河車는 초생아의 태반을 말하는 것으로, 甘鹹溫하여 心肺腎經에 入하며, 大補氣血하여 일체의 虛勞損極, 疲勞虛弱, 貧血, 肺結核 등을 치료한다^{35,36}. 阿膠는 烏驢의 皮를 阿井水로 煮하여 製한 膠質로 甘平하여 肺肝腎經에 入하고, 止血, 清肺養肝, 滋腎益氣, 和血滋陰, 潤燥하여 陰虛出血, 心血虛, 肺燥咳, 肌肉痙攣 등을 치료한다^{35,36}.

Cyclophosphamide 투여와 방사선 조사로 인한 골수부전 및 생혈단의 약효를 관찰하기 위해 말초 혈액상의 변화를 관찰하였다. 본 실험에서는 CY투여 후 및 방사선 조사에서 모두 대조군에 비해서 실험군에서 유의성 있는 백혈구 감소 억제효과가 관찰되었고, 회복에 있어서도 고농도 투여군, 저농도 투여군 모두에서 유의성 있게 증가되었다(Table 1, Table 5). 적혈구와 Hemoglobin의 변화는 실험군에서는 대조군에 비해서 CY투여 후의 적혈구 감소 억제 및 회복 증가 소견이 있었으나, 유의성은 검증되지 않았고, 방사선 조사에서는 저농도 투여군에서만 유의성 있는 증가 소견을 보였다(Table 1, Table 5). 혈소판수는 실험군에서는 대조군에 비해서 유의성 있는 혈소판 감소 억제 효과 및 회복 촉진 소견이 관찰되어(Table 1, Table 5), 항암제 및 방사선 조사의 조혈 기능 억제의

부작용 감소 및 저하된 조혈 기능의 회복에 효과가 있는 것을 알 수 있다.

체중 변화에 있어서도 체중이 대조군에 비해서 실험군에서 체중 증가 소견이 관찰되었는데, 방사선 조사군에서의 증가만 유의성 있는 소견을 나타내었다(Fig. 1,2). 이는 방사선 조사군의 경우와는 달리 CY 투여군의 경우는 실험이 종료되어 이미 골수부전이 회복된 상태에서 관찰되었기 때문인 것으로 사료된다. 면역 관련 장기의 중량 측정에 있어서도 대조군에 비해서 실험군에서 체중 증가 소견이 유의성 있게 관찰되었다(Table 2, Table 6).

대퇴골의 골수 조직을 현미경으로 관찰한 결과, 대조군에 비해서 생혈단 투여군에서 방사선 조사군과 CY 투여군에서 백혈구 계열과 적혈구 계열 세포들의 증가가 관찰되었으며, 지방조직의 점유율도 현저하게 줄었고, 골수 조직도 치밀해지는 소견이 관찰되었다. 방사선 조사후 골수 세포의 도말을 통한 혈구의 관찰에서도, 백혈구 및 적혈구의 증가 소견이 관찰되었다(Table 7).

혈청 cytokine치의 측정에 있어서 IL-3는 고농도 투여군에서는 $6.40 \pm 0.36(\text{pg/ml})$ ($P < 0.001$), 저농도 투여군에서는 $5.13 \pm 0.70(\text{pg/ml})$ 로 유의성($P < 0.001$) 있는 증가가 관찰되었다, GM-CSF의 변화는 고농도 투여군에서는 $6.56 \pm 0.53(\text{pg/ml})$, 저농도 투여군에서는 $6.13 \pm 0.29(\text{pg/ml})$ 로 각각 유의성($P < 0.001$) 있는 증가가 관찰되었다. TPO의 변화는 고농도 투여군에서는 $496.5 \pm 22.83(\text{pg/ml})$, 저농도 투여군에서는 $511.9 \pm 15.29(\text{pg/ml})$ 로 각각 유의성($P < 0.001$) 있는 증가가 관찰되었는데, 저농도 투여군에서 더 증가되었다(Table 3).

골간세포에서의 cytokine 유전자 발현 분석을 관찰한 결과, 고농도 투여군에서 IL-3, GM-CSF, EPO, TPO, SCF의 유전자 발현이 증가되었으나, IL-6 유전자의 발현이 0.9배로 감소되어 증가되어 IL-6 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

골수 조혈 간세포의 colony 형성능은 대조군에 비해서 생혈단의 고농도 투여군에서 유의성있는 증가

를 보였는데, 이를 통해 생혈단이 골수 독성을 억제함으로써 조혈 장애 및 면역 기능을 조절하고, 항암제와 방사선에 가장 문제가 되고 있는 골수 독성의 부작용 감소에 대한 치료 효과가 있음이 시사되었다 (Table 4, Fig. 3).

LPS에 의한 비장 B 임파구 활성화 반응에서는 LPS 1 μ g/ml에서는 대조군에 비해서 생혈단 5 μ g/ml, 50 μ g/ml 첨가군에서 각각 유의성(P<0.01) 있는 증가가 인정되었고, LPS 10 μ g/ml에서는 대조군에 비해서 생혈단 5 μ g/ml 첨가군과 50 μ g/ml 첨가군에서는 유의성 있는 증가가 인정되었으나, 500 μ g/ml 첨가군에서는 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 4). Con A에 의한 흉선 T 임파구 활성화 반응에서는 Con A 1 μ g/ml에서는 생혈단 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml 첨가군 모두에서 유의성 있는 소견이 관찰되지는 않았고, Con A 5 μ g/ml에서는 대조군에서 비해서 생혈단 50 μ g/ml 첨가군에서만 유의성(P<0.05) 있는 증가가 관찰되었다(Fig. 5).

복강 macrophage의 부착능에 있어서 생혈단 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml 첨가군에서 부착능의 유의성 있는 증가가 관찰되었는데, 농도에 따라 부착능이 증가되는 소견이 관찰되었다(Fig. 6). Macrophage의 면역 반응의 최종 단계인 탐식능에 있어서 생혈단 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml 첨가군에서 농도에 따라 유의성있게 증가된 소견이 관찰되었다(Fig. 7). 이를 통해 볼때 생혈단은 Macrophage의 부착능과 탐식능을 향상시킴으로 면역 촉진 효과가 있음이 시사되었다.

이상의 결과로 보아 생혈단은 항암 및 방사선 치료 부작용 감소 효과 및 면역 기능 증진 효과 및 조혈 기능 촉진 효과가 있는 것으로 사료되며, 향후 임상에서 항암 및 방사선 치료시 유발되는 속발성 골수부전 및 원발성 골수부전 치료목적으로 활용을 위해 지속적인 실험 연구 및 임상을 통한 치료 효과 검증이 필요할 것으로 사려된다. 생혈단은 원발성 혹은 속발성 골수부전의 예방 및 치료제로서의 유용성이 기대되며 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김병운, 우홍정, 김덕호, 강병기, 임재훈, 강운호, 조종관, 최서형, 장문석. 간계내과학. 서울:동양의학연구원출판부. 1989:26-27,326-339.
2. 권현영, 김영주, 노명희, 문홍만, 송재웅, 오현숙, 정소웅, 조경진. 혈액학. 서울:고려의학. 1993:79-227.
3. Roit I, Brostoff J, Male D. Immunology. London. Mosby International Ltd. 1998:20-169.
4. 서울대학교의과대학. 면역학, 서울:서울대학교출판부. 1997:89.
5. 해리슨 번역 편찬위원회. Harrison's 내과학. 서울:도서출판 정담. 1997:1892-1896.
6. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. New jersey. S-imon & Schuster Company. 1997:9-167.
7. 王琦. 素問金釋. 貴州:貴州人民出版社, 1979:1-2,59-61,85-87,117-119,432-433.
8. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋, 北京:人民衛生出版社, 1982:173-184,219-280,510-515.
9. 張璐. 張氏醫通. 上海:上海科學技術出版社. 1990:209.
10. 李中宰. 醫宗必讀. 臺南:綜合出版社. 1976:14-15.
11. 趙昌涉. 消積白朮散의 에탄올 抽出分劃이 Macrophage의 活性에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 1995.
12. 孫彰奎. 抗癌扶正湯이 Silica 및 5-FU에 의해 誘發된 免疫抑制에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 1997.
13. 金鍾兪. 扶正生津湯의 抗癌 및 放射線照射 副作用에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 1999.
14. Nannmark U, Johansson BR, Bryant JL, Unger ML, Hokland ME, Goldfarb RH, Basse PH. Microvessel origin and distribution in pulmonary metastasis of B16 melanoma: implication for adaptive immunotherapy. Cancer Research. 1995;55:4627.
15. 박찬국. 장상학. 서울:성보사. 1992:28-67,214.
16. 김완희, 최달영. 강부변증논치. 서울:성보사. 1985:140,281-283,314.
17. 최승훈. 동의종양학. 서울:杏林出版. 1995:13.
18. 서울대학교 의과대학. 증양학. 서울:서울대학교출판부. 1989:1-3,214-217,225-234.

19. 許繼平. 六味地黃口服液抗腫瘤化療藥物副作用的研究. 北京: 中國中西醫結合雜誌. 1992;12(12):736.
20. Lichtman M. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the bone marrow. A review. *Exp. Hematology*. 1981;9:391-410.
21. Makinodan T, James SJ. T cell potentiation by low dose ionizing radiation. *Health Physics*. 1990;59:29-34.
22. Yarin AA. Action of ionizing radiation on lymphocytes(inhibition and activation effects). *Immunology*. 1988;5:5-11.
23. 윤택구. 방사선에 의한 인체장해연구, 한국에너지연구소(과기처시행특정 연구 개발사업 연구결과문). 대전. 1988.
24. 儲水鑫. 惡性腫瘤中醫調理四法. 上海中醫藥雜誌. 1992;7:33-34.
25. 陳炳旗. 扶正法在腫瘤治療中的臨床運用. 浙江中醫學院學報. 1993;17(4):20-21.
26. 羅天益. 衛生寶鑑. 서울:金剛出版社. 1981:220.
27. 宋昊哲. 加味地黃湯의 抗癌活性에 관한 研究. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1998.
28. 金賢洙. 葦莖湯, 加味葦莖湯의 B16-F10에 對한 抗腫瘍 效果와 組織變化. 大韓醫師協會誌. 1995;16(2):365-387.
29. 李竣溶. 抗癌生血湯이 Methotrexate로 誘發된 副作用과 免疫機能 低下에 미치는 影響. 第19回 全國 韓醫學 學術大會 發表論文集. 1997:153.
30. 孫桂芝. 扶正抗癌口服液合病化療治療中晚期胃腸癌(術後)減毒增效用 中國中醫研究院廣安門醫院腫瘤科. 論文選集. 1993:12-22.
31. 張代釗. 癌症放化療副反應的中醫藥防治研究. 中醫雜誌. 1994;35(8):498-500.
32. 金東熙. 加味地黃湯, 加味四君子湯 및 加味君子地黃湯의 抗腫瘍活性과 放射線 副作用 減少效果. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 1998.
33. 李綾基. 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. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1996;2(1):91-100.
34. 李承鎬. 白仙抗癌湯의 抗轉移 및 免疫增進에 관한 研究. 大田大學校 大學院 博士學位論文. 2000.
35. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1975:51-54, 56-58, 66-67, 99-100, 144-145.
36. 張 機. 景岳全書. 上海:上海科學出版社. 1984:909-968.
37. 高炳熙. 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK 細胞活性度에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1986;9:193-216.
38. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1988:486-496, 720.
39. 金光湖. 數種韓藥材가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生產 抑制作用에 미치는 影響. 趙永植博士華甲記念論文集, 1981:1041-1050.
40. 高炳熙. 四種鹿茸의 免疫學的 效能에 관한 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1991;12(1):187-202.