

補中益氣湯加味方이 cyclophosphamide 투여로 인한 골수손상의 억제 및 회복에 미치는 영향

김동우* · 고 흥

세명대학교 한의과대학 내과학교실

Inhibiting and Repairing Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang on Cyclophosphamide induced Bone Marrow Injuries in Rats

Dong Woo Kim*, Heung Ko

Department of Internal Medicine, Collage of Oriental Medicine, Semyung university

This study was carried out to investigate the inhibiting and repairing effects of *Bojung-ikki-tang Gamibang*(BI-G) on the bone marrow injuries in rats. Bone marrow injury was induced by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide(CP)(150mg/kg). In experiment I, designed for inhibiting effect, extract of BI-G(80mg) was administrated from pre-5 days to post-5 days of CP injection. In experiment II, designed for repairing effect, extract of BI-G(80mg) was administrated after 5 days to 12 days of CP injection. Hematological and histopathological examinations were performed at 5 days after CP injection in experiment I, and at 12 days after CP injection in experiment II. In experiment I, the results were as follows ; RBC($\times 10^6/\mu\ell$) of BI-G treated group(8.39 ± 0.84) was increased significantly compared with control group(7.52 ± 0.67). Hemoglobin(g/dl) of BI-G treated group(13.76 ± 1.20) was increased significantly compared with control group(12.24 ± 1.11). WBC($\times 10^3/\mu\ell$) of BI-G treated group(1.75 ± 0.41) was increased significantly compared with control group(0.55 ± 0.17). Necrotic changes of myeloid cells of BI-G treated group were less severe than those of control group. Histopathologically, distention of sinus and edematous changes of bone marrow of BI-G treated group were alleviated compared with those of control group. In experiment II, the results were as follows ; WBC($\times 10^3/\mu\ell$) of BI-G treated group(4.27 ± 0.94) was increased significantly compared with control group(3.02 ± 0.79). Hemoglobin(g/dl) of BI-G treated group(12.61 ± 0.85) was increased significantly compared with control group(11.49 ± 0.74). Platelets($\times 10^3/\mu\ell$) of BI-G treated group(1885 ± 133) was increased significantly compared with control group(1616 ± 251). These results indicated that *Bojung-ikki-tang Gamibang* has the inhibiting and repairing effects on the cyclophosphamide-induced bone marrow injuries in rats.

Key words : *Bojung-ikki-tang Gamibang*(BI-G), hematopoiesis, bone marrow, cyclophosphamide, WBC

서 론

암을 치료하는데 사용되는 항암제의 주요한 부작용 중 하나가 골수기능 억제에 따른 조혈기능장애와 면역기능저하라 할 수 있다^{1,2}. 최근 혈구의 분화 및 증식을 조절하는 특수한 조절인자가 규명되고 유전자 재조합기술의 발전으로 이러한 조절인자를 대량 생산할 수 있는 길이 열림으로써, 항암화학요법으로 인해

면역기능이 저하된 환자에게 면역기능 회복 및 감염 예방을 위한 다양한 종류의 조혈 cytokine이 사용되고 있다³. 하지만 임상적으로 항암화학요법 시행 전·후에 부작용을 억제시키고 회복을 촉진할 수 있는 보조적인 치료방법의 개발이 필요한 실정이며 이에 대한 한의학적인 연구의 필요성이 대두된다.

한의학에서도 조혈모세포의 활성화와 조혈 cytokine의 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 시작되어 김⁴은 左歸飲加味方이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효한 효과가 있음을 보고하였고, 전⁵은 22가지의 한약물을 이용하여 구성한 처방(KH1, KH2, KH3, KH4)이 SCF, TPO, GM-CSF, IL-3 등 조혈 cytokine

* 교신저자 : 김동우, 서울시 강남구 신사동 635번지 자생한방병원
· E-mail : porsche-t@hanmail.net · Tel : 02-3218-2000
· 접수 : 2005/03/28 · 수정 : 2005/04/29 · 채택 : 2005/06/02

의 유전자 발현을 촉진시키고 조혈모세포의 활성화와 집락형성능력을 촉진시키는 효과가 있음을 보고 하였다. Masahiro⁶⁾는 補中益氣湯이 cyclophosphamide로 유도된 백혈구감소증에 CFU-S, GM-CSF, IL-3, IFN- γ 등 조혈과 면역관련 인자의 유전자 발현을 촉진시키는 효과가 있음을 보고하였고, 이⁷⁾는 화학요법 또는 방사선요법의 부작용에 益氣補血과 滋補肝腎의 치료법으로 구성된 生血丹이 유의한 효과가 있었다고 하였다.

항암제나 화학요법에 따른 조혈기능장애에 대한 治法으로 曠⁸⁾은 益氣健脾和胃法을, 金⁹⁾은 益氣健脾法을 사용하여 益氣, 健脾을 중심으로 補血, 滋陰, 補腎, 補精의 치료법을 사용한다고 하였다. 補中益氣湯은 李東垣이 창방한 것으로 升陽益氣, 調補脾胃하여 營衛氣血을 生化하고 陽生陰長하여 精血의 生長을 돕는 대표적인 처방이다^{10,11)}. 다만 환자에 따라 사용되는 약물의 용량이나 가감되는 약물이 있으며, 약물의 구성과 약물의 구성비율에 따른 효과는 다르다. 따라서 본인은 Masahiro⁶⁾와 李¹²⁾가 임상에서 항암제 부작용으로 인한 골수손상환자에 사용하여 유효한 것으로 보고한 補中益氣湯에 補中氣, 養血, 安心導痰하는 한약을 가미한 補中益氣湯加味方이 cyclophosphamide로 유발된 골수기능 억제와 회복에 대한 영향을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 35g 내외의 수컷 ICR mouse(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 항온항습사육장치(대종기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다.

2. 처방 및 검액의 제조

실험에 사용한 補中益氣湯加味方의 처방내용은 자생한방병원(서울, 한국)처방집에 의거하였으며, 약재는 세명대학교 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. 처방의 내용과 분량은 Table 1과 같다. 補中益氣湯加味方 4첩 분량(324g)을 2000ml의 증류수에 1시간 동안 침지시킨 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심하여 침전된 성분을 제거한 후 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)로 농축시키고 동결건조기(LABCONCO Co., USA)로 냉동 건조시켜 분말 48g을 회수하였다. 냉동건조분말을 증류수에 용해한 액(800mg/ml) 0.1ml를 마리 당 1일 투여량으로 하였다.

3. Cyclophosphamide에 의한 골수손상의 유발

Cyclophosphamide(Sigma, USA)를 생리식염수로 용해하여 150mg/kg의 농도로 복강 내 1회 주사하여 골수손상을 유발하였다.

4. 실험의 설계 및 실험군의 분류

補中益氣湯加味方이 cyclophosphamide에 의한 골수손상 억제 효과 및 회복효과를 관찰하기 위하여 다음과 같이 실험군을 편성하였다.

실험 I : 골수손상 억제효과에 관한 실험

정상군(n=8)은 생리식염수를 복강 내 주사하였으며, 주사 전·후 각 5일간 증류수 0.1ml를 경구 투여하였다. 대조군(n=8)은 cyclophosphamide를 복강 내 주사하였으며, 주사 전·후 각 5일간 증류수 0.1ml를 경구 투여하였다. 처치군(n=8)은 cyclophosphamide를 복강 내 주사하였으며, 주사 전·후 각 5일간 補中益氣湯加味方 검액 0.1ml를 경구 투여하여 골수손상 억제효과를 관찰하였다. 생리식염수 또는 cyclophosphamide 주사후 5일째 희생하여 검사에 이용하였다.

실험 II : 골수손상 회복효과에 관한 실험

정상군(n=8)은 생리식염수를 복강 내 주사하였으며, 주사 후 5일째부터 7일간 증류수 0.1ml를 경구 투여하였다. 대조군(n=8)은 cyclophosphamide를 복강 내 주사하였으며, 주사 후 5일째부터 7일간 증류수 0.1ml를 경구 투여하다. 처치군(n=8)은 cyclophosphamide를 복강 내 주사하였으며, 주사 후 5일째부터 7일간 補中益氣湯加味方 검액 0.1ml를 경구 투여하여 골수손상 회복효과를 관찰하였다. 생리식염수 또는 cyclophosphamide 주사 후 12일째 희생하여 검사에 이용하였다.

Table 1. Prescription of Bojung-ikki-tang Gamibang

| 韓藥名 | 生藥名 | 重量(g) |
|-------|---|-------|
| 黃芪 | <i>Astragali Radix</i> | 10 |
| 大棗 | <i>Zizyphi inermis Fructus</i> | 10 |
| 白朮 | <i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i> | 6 |
| 白茯苓 | <i>Poria</i> | 6 |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 4 |
| 人蔘 | <i>Ginseng Radix</i> | 4 |
| 當歸 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 4 |
| 生薑 | <i>Zingiberis Rhizoma Recens</i> | 4 |
| 乾地黃 | <i>Rehmanniae Radix</i> | 4 |
| 芍藥 | <i>Paeoniae Radix Lactiflorae</i> | 4 |
| 半夏 | <i>Pinelliae Rhizoma</i> | 4 |
| 陳皮 | <i>Citri Pericarpium</i> | 4 |
| 白茯苓 | <i>Hoelen</i> | 4 |
| 柴胡 | <i>Bupleuri Radix</i> | 4 |
| 升麻 | <i>Cimicifugae Rhizoma</i> | 4 |
| 麥門冬 | <i>Linopis Tuber</i> | 2 |
| 遠志 | <i>Polygalae Radix</i> | 1.5 |
| 甘草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 1.5 |
| Total | | 81 |

5. 말초혈액검사

생리식염수 또는 cyclophosphamide를 주입한 후 5일째 및 12일째 희생시켜 심장 채혈한 혈액을 EDTA가 담긴 채혈병에 담아 잘 섞은 후, 자동혈구계산기(Advia 120, Leverkusen, Germany)를 이용하여 백혈구, 적혈구, 혈색소, 적혈구 용적률, 혈소판을 측정하였다. 망상적혈구수는 new methylene blue 염색을 하여 계수하였으며 적혈구 1000개당 망상적혈구 수를 %로 산출하였다.

6. 골수도말 검사

생리식염수 또는 cyclophosphamide를 주입한 후 5일째 및 12일째 희생시켜 적출한 우측 대퇴골의 골수를 노출시키고

Hank's balanced salt 용액(Sigma, USA)을 분한 붓으로 골수를 채취하여 슬라이드에 인장 도말표본을 작성하였다. 상온에서 표본을 건조시킨 후 Gimesa 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 병리조직학적 검사

생리식염수 또는 cyclophosphamide를 주입한 후 5일째 및 12일째 희생시켜 적절한 좌측 대퇴골을 10% neutral buffered formalin에 2일간 고정하였다. 0.5M EDTA 용액에서 1주일 간 탈회시킨 후 통상적인 처리과정을 거쳐 파라핀 포맷하고 5 μ m 두께의 박절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 병리조직학적 소견을 관찰하였다. 골수세포의 충실도는 염색된 대퇴골체 중심의 골수조직에서 조직처리과정상에서 발생한 균열부위가 없는 세 부위를 선택해서 200배의 시야에서 영상을 촬영하고 칼라 영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 측정하였다. 염색된 부위의 총면적을 측정해서 평균한 후 전체 면적 중 염색된 면적의 비율을 계산하였고 충실도는 정상군에서 측정된 평균 비율을 100으로 삼고 대조군과 처치군의 비율을 환산하여 표시하였다.

8. 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 9.0 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다.

결 과

1. 실험 I 골수손상 억제효과에 관한 실험

1) 말초혈액 RBC Index의 변화

Cyclophosphamide 투여 전·후 각 5일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 적혈구 및 혈색소 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의하게 감소되었으며, 처치군에서는 대조군에 비해서 유의하게 증가되었다. 적혈구 용적률은 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의하게 감소되어 있었으며, 처치군은 대조군에 비해서 증가되어 나타났으나 유의성은 없었다. 세망적혈구 비율은 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 감소되어 있었으며, 처치군은 대조군에 비해서 증가되어 있었으나 유의성은 없었다(Table 2).

Table 2. Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang Treatment on the RBC Index at 5 Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | RBC (x10 ⁹ / μ l) | Hemoglobin (g/dl) | Hematocrit (%) | Reticulocytes (%) |
|---------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal (n=8) | 8.65±0.51 ^{a)} | 14.08±0.82 | 54.8±3.7 | 1.15±0.68 |
| Control (n=8) | 7.52±0.67 ^{**} | 12.24±1.11 ^{**} | 45.9±5.26 ^{**} | 0.16±0.09 ^{**} |
| Treated (n=8) | 8.39±0.84 [#] | 13.76±1.20 [#] | 48.63±6.69 [*] | 0.23±0.18 ^{**} |

a) : (Mean±SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamid(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamid(150mg/kg) administrated and treated with Bojung-ikki-tang Gamibang from pre-5days to post-5days of cyclophosphamide administration. * : Statistically significant compared with normal group# p < 0.05. ** p < 0.01) # : Statistically significant compared with control group# p < 0.05)

2) 말초혈액 WBC 및 Platelets의 변화

Cyclophosphamide 투여 전·후 각 5일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 백혈구는 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 현저하게 감소되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 혈소판은 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 현저하게 감소되었으나 처치군과 대조군간의 유의성 있는 변화는 없었다(Table 3).

Table 3. Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang on the WBC and Platelets Counts at 5 Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | WBC (x10 ³ / μ l) | Platelets (x10 ³ / μ l) |
|---------------|--|--|
| Normal (n=8) | 4.74±2.07 ^{a)} | 1165±363 |
| Control (n=8) | 0.55±0.17 ^{***} | 721±212 [*] |
| Treated (n=8) | 1.75±0.41 ^{**} , ^{###} | 712±306 [*] |

a) : (Mean±SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamid(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamid(150mg/kg) administrated and treated with Bojung-ikki-tang Gamibang from pre-5days to post-5days of cyclophosphamide administration. * : Statistically significant compared with normal group# p < 0.05. ** p < 0.01. *** p < 0.001) # : Statistically significant compared with control group(### p < 0.001)

3) 골수 도말소견

정상군에서는 다양한 성숙단계의 골수계 세포 및 적혈구계 세포들이 관찰되었으며 골수계 세포와 적혈구계 세포의 비율이 약 4:1 정도로 관찰되었다(Fig. 1).

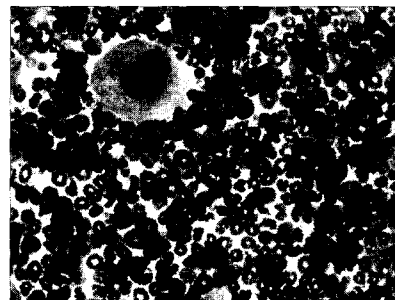


Fig. 1. Bone marrow imprint of normal group. Various developmental stages of red blood cells and white blood cells are shown. m : megakaryocyte. Giemsa's stain, bar = 10 μ m.

대조군에서는 성숙된 골수아세포들은 거의 관찰되지 않았으며, 성숙된 적혈구 아세포는 정상군에 비해서 드물게 관찰되었다. 미성숙한 골수아세포들의 세포질의 변성 및 핵 이형성 소견이 자주 관찰되었다(Fig. 2).

처치군에서는 골수아세포 핵의 이형성 소견이 대조군에 비해서 드물게 관찰되었으며 성숙된 골수아세포 및 적혈구 아세포가 대조군에 비해서 빈번하게 관찰되었다(Fig. 3).

4) 병리조직학적 소견

정상군에서는 골수계 세포와 적혈구아세포의 군락이 잘 발달되어 골수강에 세포가 치밀하게 채워져 있었으며, 많은 수의 거핵세포들이 발달되어 있어 골수의 증식이 활발한 정상적인 구조를 취하고 있었다(Fig. 4).

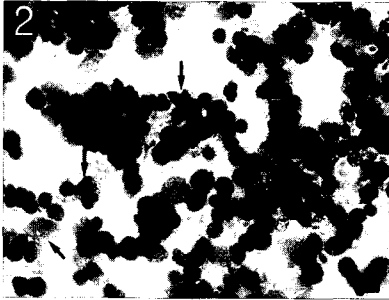


Fig. 2. Bone marrow imprint of control group at 5days after cyclophosphamide injection. Matured myeloid cells disappeared. Necrotic changes of myeloid cells (arrows) is the main lesions of this group. Giemsa's stain, bar = 10 μ m.

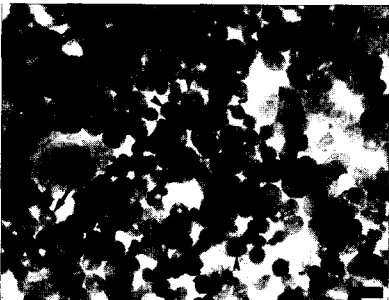


Fig. 3. Bone marrow imprint of treated group at 5days after cyclophosphamide injection. Necrotic changes of myeloid cells are less severe than those of the control group. And matured myeloid cells(arrows) and erythroblasts(arrow heads) are more frequently appeared. Giemsa's stain, bar = 10 μ m.

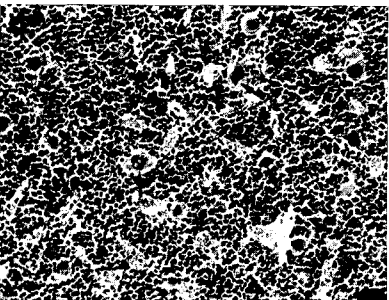


Fig. 4. Bone marrow biopsy of normal group. Note high cellularity of myeloid tissue cells and well developed megakaryocytes(arrows). H&E stain, bar = 20 μ m.

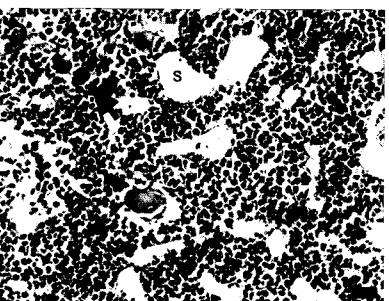


Fig. 5. Bone marrow biopsy of control group at 5days after cyclophosphamide injection. Note edematous intercellular space, pyknotic myeloid tissue cells, necrotic megakaryocytes (arrow) and dilation of sinusoids(s). H&E stain, bar = 20 μ m.

대조군에서는 세포와 세포사이의 간격이 벌어져 있으며, 많

은 수의 세포들이 과사되어 핵이 농축되어 있었으며 불분명한 세포질 한계를 나타내고 있었다. 또한 많은 부위에서 동(Sinus)의 확장이 두드러지게 관찰되었다(Fig. 5).

처치군에서는 대조군과 유사한 정도로 세포간격이 벌어져 있었으나, 대조군에 비해서 골수세포의 윤곽이 명확했으며 동의 확장도 다소 감소되어 관찰되었다(Fig. 6).

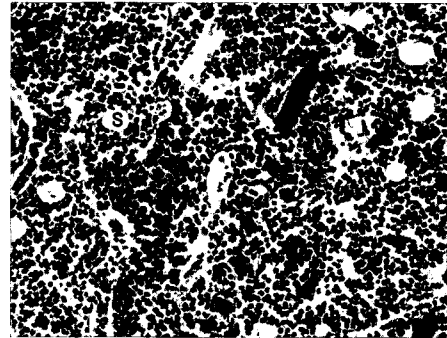


Fig. 6. Bone marrow biopsy of treated group at 5days after cyclophosphamide injection. The lesions of edematous intercellular space, pyknotic myeloid tissue cells, and dilation of sinusoids(s) are less severe than those of the control group. H&E stain, bar = 20 μ m.

5) 골수조직의 세포 충실도 변화

Cyclophosphamide 투여 전·후 각 5일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 골수조직의 세포 충실도는 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의하게 감소되어 있었다. 처치군은 대조군에 비해서 증가되어 있었으나 유의성은 없었다(Table 4).

Table 4. Effects of *Bojung-ikki-tang Gamibang* on the Cellularity of Bone Marrow at 5 Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | Cellularity(%) |
|---------------|---------------------------|
| Normal (n=8) | 100 \pm 4 ^{a)} |
| Control (n=8) | 83 \pm 12** |
| Treated (n=8) | 91 \pm 9* |

a) : (Mean \pm SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with *Bojung-ikki-tang Gamibang* from pre- 5days to post- 5days of cyclophosphamide administration * : Statistically significant compared with normal group(* p < 0.05, ** p < 0.01)

2. 실험 II 골수손상 회복효과에 관한 실험

1) 말초혈액 RBC Index의 변화

Cyclophosphamide 투여 후 5일째부터 7일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 적혈구는 모든 군 간에서 유사한 정도로 나타났다. 혈색소 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소되어 있었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 적혈구 용적률은 대조군이 정상군에 비해서 유의하게 감소되어 있었으며, 처치군은 대조군에 비해서 다소 증가되었으나 두 군 간의 유의성은 없었다. 세망적혈구 비율은 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군

이 대조군에 비해서 다소 감소되었으나 두 군 간의 유의성은 없었다(Table 5).

Table 5. Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang Treatment on the RBC Index at 12Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | RBC ($\times 10^9/\mu\text{l}$) | Hemoglobin (g/dl) | Hematocrit (%) | Reticulocytes (%) |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------|
| Normal (n=8) | 7.96 \pm 0.69 ^a | 12.94 \pm 1.26 | 48.6 \pm 4.26 | 0.71 \pm 0.25 |
| Control (n=8) | 7.49 \pm 0.50 | 11.49 \pm 0.74* | 44.94 \pm 2.08* | 7.62 \pm 2.49*** |
| Treated (n=8) | 7.94 \pm 0.52 | 12.61 \pm 0.85 [#] | 46.91 \pm 3.04 | 5.76 \pm 1.26*** |

a) : (Mean \pm SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with Bojung-ikki-tang Gamibang after 5 days to 12 days of cyclophosphamide administration * : Statistically significant compared with normal group(** p < 0.05, *** p < 0.001) # : Statistically significant compared with control group(# p < 0.05)

2) 말초혈액 WBC 및 Platelets의 변화

Cyclophosphamide 투여 후 5일째부터 7일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 백혈구 및 혈소판의 경우, 대조군은 정상군에 비해서 유의성 있게 감소되었으나, 처치군은 정상군과 같은 정도의 수준으로 증가되었고 대조군에 비해서도 유의성 있게 증가되었다. 혈소판은 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 현저히 증가되어 있었으며, 처치군은 대조군에 비해서도 유의성 있게 증가되었다(Table 6).

Table 6. Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang on the WBC and Platelets Counts at 12 Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | Platelets ($\times 10^3/\mu\text{l}$) |
|------------------|--------------------------------------|--|
| Normal (n=8) | 4.13 \pm 0.65 ^a | 964 \pm 120 |
| Control (n=8) | 3.02 \pm 0.79** | 1616 \pm 251*** |
| Treated (n=8) | 4.27 \pm 0.94 [#] | 1885 \pm 133***, # |

a) : (Mean \pm SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with Bojung-ikki-tang Gamibang after 5 days to 12 days of cyclophosphamide administration * : Statistically significant compared with normal group(** p < 0.01, *** p < 0.001) # : Statistically significant compared with control group(# p < 0.05)

3) 골수도말소견

대조군에서는 드물게 괴사된 골수 세포들이 관찰되기는 하였으나, 다양한 단계의 성숙된 골수계 세포의 증식이 관찰되었다. 그러나 적혈구계 세포들은 여전히 드물게 관찰되어 골수계 세포와 적혈구계 세포의 비율이 약 10:1 정도로 관찰되었다(Fig. 7). 처치군에서는 대조군과 유사한 정도로 관찰되었다.

4) 병리조직학적 소견

대조군에서는 골수계 세포 특히, 호중구 세포의 증식이 두드러져 세포의 총실도가 증가되어 있었으며 괴사된 세포 및 동(Sinus)의 확장은 관찰되지 않았다(Fig. 8). 처치군에서는 대조군

과 유사한 정도로 관찰되었다.

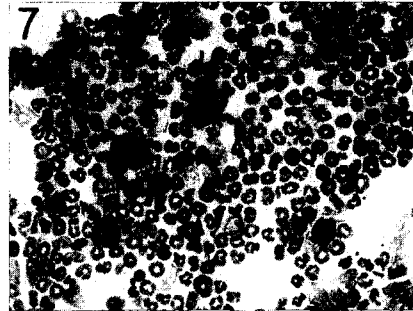


Fig. 7. Bone marrow imprint of control group at 12days after cyclophosphamide injection. Various developmental stage of myeloid cells, especially neutrophilic myelocytes(large arrows) and acidophilic myelocytes(small arrow) are shown. Some necrotic cells(large arrow head) remain. Note a few erythroblasts(small arrow head). Giemsa's stain, bar = 10 μm

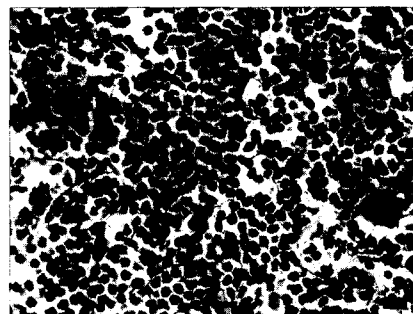


Fig. 8. Bone marrow biopsy of control group at 12days after cyclophosphamide injection. Note high cellularity of bone marrow tissue cells and proliferation of neutrophilic myelocytes. H&E stain, bar = 10 μm

5) 골수조직의 세포 총실도 변화

Cyclophosphamide 투여 후 5일째부터 7일간 補中益氣湯加味方을 처치하여 측정된 골수조직의 세포 총실도는 대조군과 처치군 모두 정상군에 비해서 다소 증가되어 있었으나, 모든 군 간에 유의성 있는 변화는 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of Bojung-ikki-tang Gamibang on the Cellularity of Bone Marrow at 12 Days after Cyclophosphamide Administration in Rat

| Group | Cellularity(%) |
|------------------|--------------------------|
| Normal (n=8) | 100 \pm 3 ^a |
| Control (n=8) | 104 \pm 4 |
| Treated (n=8) | 105 \pm 5 |

a) : (Mean \pm SD) Normal : saline administrated and treated with distilled water Control : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with distilled water Treated : cyclophosphamide(150mg/kg) administrated and treated with Bojung-ikki-tang Gamibang after 5 days to 12 days of cyclophosphamide administration

고찰

항암제로 사용되는 알킬화제, 대사길항제, 알칼로이드제, 항생제 및 내분비계 약제들은 비특이성으로 종양세포뿐만 아니라

정상세포에도 작용하게 되며, 조혈기능장애와 면역기능저하가 큰 부작용으로 알려져 있다^{1,2,13}). 따라서 조혈기능장애와 면역기능 저하를 개선하기 위해 조혈모세포이식이나, 조혈 또는 면역증강을 매개할 수 있는 cytokine 등이 임상에서 활용되고 있지만 부작용을 감소시킬 수 있는 보조적 약물의 개발이 필요하다.

현재 항암제로 인해 유발되는 약물독성, 조혈장애, 면역력저하를 개선시킬 수 있는 방면으로 단일 한약과 한약처방에 대한 검증이 이루어지고 있다. 약물독성과 관련하여 趙¹⁴)는 消積白朮散이 신장독성과 면역기능저하를 억제하며, 張¹⁵)은 蓼茸湯이 cyclophosphamide로 유발된 AST, ALT, BUN, creatinine의 수치 증가를 억제한 결과가 있다고 보고하였다. 조혈기능장애와 관련하여서는 Masahiro⁶)는 補中益氣湯이 cyclophosphamide로 유도된 백혈구감소증에 CFU-S, GM-CSF, IL-3, IFN-γ 등 조혈과 면역관련인자의 유전자 발현을 촉진시킨다고 하였으며, 김¹⁶)과 유¹⁷)는 각각 少陰人 補中益氣湯과 丹蔘四物湯이 cyclophosphamide로 유발되는 골수손상을 억제하며 조혈기능 회복을 증강시키고, 홍¹⁸)은 消癥去痰益氣湯은 cyclophosphamide에 의한 간, 신, 비장독성과 조혈기능장애를 억제한다고 보고하였다.

이외에도 한약물중 조혈모세포 활성화와 cytokine의 발현에 미치는 영향에 대한 연구도 진행되어, 김⁴)은 左歸飲加味方이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음을 보고하였고, 전⁹)은 총22가지의 한약재를 이용하여 구성된 처방(KH1, KH2, KH3, KH4)이 SCF, TPO, GM-CSF, IL-3 등 조혈 cytokine의 유전자 발현을 촉진시키고, 조혈모세포의 활성화와 집락형성능력을 촉진시키는 효과가 있음을 보고 하였다.

항암제로 유발된 부작용에 대한 치료에서 金⁸)은 益氣健脾法을 치료원칙으로 하여 滋養肝腎, 健脾養胃, 生津潤燥, 清熱解毒을 병증에 따라 적용하여야 한다고 하였고, 곽⁹)는 益氣健脾和胃法을 주장 하였으며, 이⁷)는 益氣補血, 滋補肝腎이 유효하다고 보고하였다. 항암제의 부작용과 관련하여 사용된 처방의 빈도는 益氣, 健脾를 중심으로 補血, 滋陰, 補腎, 補精이 사용되고 있으며¹⁹), 한약물로는 黃芪, 人蔘, 白朮, 白茯苓, 陳皮로 益氣健脾藥이 많이 사용되고 있다¹⁹).

補中益氣湯은 “脾胃之氣既傷 而元氣不能出 而諸病之所由也”¹¹)에 근거하여 AD. 1232년 李東垣¹¹)이 창방한 것으로, 만성 위장염, 만성기관지염, 만성간염, 안검하수, 위하수, 자궁하수, 기능성 자궁출혈, 중증근부력증 등의 만성질환과 각종 허약성 질환에서 효과가 있는 것으로 보고 되었다²⁰⁻²⁴). 본 실험에 사용된 補中益氣湯加味方은 補中益氣湯^{10,11})에 中氣를 강화하는 大棗, 生薑과 養血하는 川芎, 乾地黃, 白芍藥 그리고 安心導痰하는 半夏, 茯苓, 麥門冬, 遠志, 白茯苓을 첨가 하였다.

본 실험에서는 골수손상을 유발시키는 물질의 처치 전과 후에 약물을 투여하여 골수손상 억제 효과를 살펴보고, 골수손상을 유발시킨 후 회복되는 기간에 약물을 투여하여 회복 촉진 효과를 살펴보고자 하였다. 골수손상 유발물질로는 현재 혈액암에서 주로 사용되는 cyclophosphamide를 사용하였다. Cyclophosphamide는 간에서 microsomal enzyme에 의해 활성형 중간대사로 전화되는 항암제로 골수종에 가장 효과적인 약제

이며, 급성 림프구성 백혈병에서 완전관해를 유도하고 유지하는 유일한 알킬화제로 알려져 있다^{25,26}). Cyclophosphamide의 부작용으로는 골수억제와 간장 및 신장 독성 그리고 조혈기능이상과 범혈구감소, 면역기능저하, 체중저하 등이 있다²⁵⁻²⁷).

골수손상 억제실험은 cyclophosphamide 투여 전·후 5일간에 補中益氣湯加味方을 투여한 군을 처치군으로 하여 정상군과 대조군을 비교하였으며, 골수손상 회복실험은 cyclophosphamide를 투여하고 5일째부터 7일간 補中益氣湯加味方을 투여한 군을 처치군으로 하여 정상군과 대조군을 비교하였다.

골수손상 억제실험에서, 처치군은 적혈구, 혈색소, 백혈구가 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 특히 백혈구는 대조군에 비하여 처치군이 3배 이상 증가되는 것으로 나타났다. 반면에 적혈구 용적률과 세망적혈구는 처치군이 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다. 골수도말검사에서 처치군은 육안적으로 골수아세포 핵의 이형성 소견이 대조군에 비해서 드물게 관찰되었으며, 성숙된 골수아세포 및 적혈구 아세포가 대조군에 비해서 빈번하게 관찰되었다. 병리조직학적 소견에서는 골수 도말검사와 마찬가지로 처치군이 대조군에 비해서 골수부종 및 동(Sinus)의 확장 정도가 미약하게 관찰되었다.

골수손상 회복실험에서, 처치군은 백혈구, 혈색소, 혈소판이 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 반면에 적혈구는 처치군과 대조군 모두 정상군과 유사한 정도로 나타났으며, 적혈구 용적률은 처치군이 대조군에 비해서 다소 증가되었으나 유의성은 없었고, 세망적혈구는 대조군 및 처치군 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으나 양자간의 유의성 있는 차이는 없었다. 골수 도말검사 소견 및 병리조직학적 소견은 처치군과 대조군 모두 정상군과 유사한 골수세포 증식이 관찰되었으며 상호간의 유의한 차이는 없었다.

補中益氣湯加味方은 cyclophosphamide로 유발시킨 골수손상에서 백혈구, 적혈구, 혈색소 감소를 유의하게 억제하였고, 회복기에서는 백혈구, 혈색소와 혈소판을 유의하게 증가시켰다. 골수검사와 병리조직학적 검사에서 골수손상 억제실험에서는 처치군이 대조군에 비하여 성숙된 골수아세포 및 적혈구아세포가 빈번하게 관찰되고 골수세포의 윤곽과 동의 확장이 감소한 소견이 나타났고, 회복기에 투여한 경우에는 대조군과 처치군의 소견이 유사하게 나타났다.

골수손상 억제실험에서 적혈구, 혈색소, 백혈구의 감소억제는 Masahiro⁶)가 補中益氣湯은 총혈구, 단핵구, 림프구, 호중구가 증가시킨다고 한 것과, 유²¹)가 丹蔘四物湯은 백혈구, 적혈구, 혈색소, 혈소판, 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구가 증가한다고 한 것과 일치되는 결과이다. 다만 養血하는 약물 위주로 구성된 丹蔘補血湯은 혈소판 감소가 억제된다고 하였으나, 補中益氣湯加味方의 경우는 혈소판 감소를 유의하게 억제하지 못하였고 회복기에 투여한 경우에서 혈소판 증가가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. 補中益氣湯加味方을 구성하는 처방 약물 중 人蔘은 골수손상을 억제하며 當歸와 川芎은 SCF, TPO, GM-CSF, IL-3 등의 조혈 cytokine의 유전자 발현을 촉진시키고 조혈모세포의 활성화와 집락형성능력을 촉진시키는 효과가 있지

만, 白芍藥은 골수독성을 나타내 항암제의 부작용을 악화시키는 보고되었다²⁸⁾. 따라서 복합적인 한약물로 구성된 처방은 각 약물 간의 효능이 증강 또는 상쇄 될 수 있으며, 단일 약물과는 다른 특성을 나타내는 것으로 사료된다. 향후 단일 한약물과 처방간의 상호비교를 통하여 가장 유효성이 있는 약물의 구성을 모색하는 것이 필요하다.

이상의 말초혈액 검사와 골수도말검사 그리고 병리조직학적 소견을 종합한 결과 補中益氣湯加味方은 cyclophosphamide로 유발되는 골수 손상을 억제하고 골수손상의 회복을 촉진하는데 유효한 것으로 사료된다.

결 론

補中益氣湯加味方의 cyclophosphamide투여로 인한 골수손상의 억제 및 회복효과에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

골수손상억제실험에서 補中益氣湯加味方 처치군은 적혈구, 혈색소, 백혈구가 대조군에 비해서 유의성 있게 감소가 억제되었으며, 특히 백혈구의 감소억제가 높게 나타났다. 골수 도말검사 소견에서는 처치군이 대조군에 비해서 골수세포의 과사가 미약하게 관찰되었고, 병리조직학적 소견에서는 처치군이 대조군에 비해서 골수부종 및 동(Sinus)의 확장 정도가 미약하게 관찰되었다. 골수손상 회복촉진 실험에서는 처치군의 백혈구, 혈색소, 혈소판은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 백혈구의 경우 정상군과 유사한 정도로 증가하였다. 이상의 결과를 종합해 보면 補中益氣湯加味方은 흰쥐에서 cyclophosphamide투여로 유발되는 골수 손상을 억제하고 회복을 촉진시키는 효과가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학, 종양학, p 1-3, 137-43, 193-205, 225-34, 서울대학교 출판부, 서울, 1996.
2. 김현아. 한약을 이용한 항암실험연구의 경향에 관한 고찰, 대한한방중앙학회지, 4(1):221-32, 1998.
3. 최정현, 유진홍, 박성규, 김동욱, 이종욱, 한지화, 민우성, 신완식, 김춘주, 김동집. 조혈모세포 질환에서 동종골수이식후 유전자 재조합형 인과립구-대식세포계 집락성장인자의 효과, 대한조혈모세포이식학회지, 1, 133-140, 1996.
4. 김선민. 左歸飲加味方이 재생불량성빈혈에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 서울, 1997.
5. 전재현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 수종의 한약제제가 조혈작용에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 서울, 2001.
6. Masahiro, K., Kenji, K., Takuya, K., Tkao, N., Hiroaki, T., Kikuo, N. Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a japanese ethical herbal drug Hochu-ekki-to, Immunopharmacology, 44(3):223-231, 1999.
7. 이연월, 손창규, 조종관. 生血丹의 골수부전 치료효과에 대한 실험적 연구, 대한한의학회지, 22(1):33-45, 2001.
8. 광계호, 임낙철, 김성훈. 腫瘍의 化學療法과 放射線療法의 부작용에 대한 韓方藥物療法, 동의병리학회지, 10, 45-87, 1995.
9. 金東熙, 金聖勳. 抗癌劑 및 放射線 부작용에 대한 韓方 治療, 동의병리학회지, 9, 239-263, 1994.
10. 鄭光油, 東垣學說論文集, 人民衛生出版社, 北京, p 13-24, 1983.
11. 李東垣, 東垣十種醫書, p 467, 大星文化社, 서울, 1983.
12. 李宇彬, 補中益氣湯對環磷鮮丹抗癌活動性和毒性的影響, 中國中藥雜誌, 3, p 50, 1989.
13. James, B.L.H. Cecil textbook of medicine, W.B. Saunders co., Philadelphia, p 1090-1100, 1985.
14. 趙成基. 消積白朮散의 抗癌, 免疫增強 效果 및 cisplatin의 腎臟毒性에 抑制에 대한 影響에 관한 研究, 대전대학교 대학원, 대전, 1993.
15. 張中植, 金聖勳, 宋孝貞, 蔘茸湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用減少에 대한 影響. 대전대학교 대학원, 대전, 1991.
16. 김수진, 補中益氣湯 및 少陰人 補中益氣湯이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 대전대학교 대학원, 대전, 1993.
17. 유재현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 丹蔘四物湯이 cyclophosphamide로 유발된 생쥐의 혈구감소증에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 23(4):560-568, 2002.
18. 홍종희, 류기원, 류봉하, 윤상협, 김진성. 消癥祛痰益氣湯의 cyclophosphamide부작용 형성 억제효과, 대한한방내과학회지, 23(1):123-132, 2002.
19. 선승호, 고승규, 정용수, 부송아, 박경훈. 암환자의 방사선 요법 및 화학요법 치료 후 발생된 백혈구감소증의 치료에 관한 중의학 임상논문의 문헌적 고찰, 대한한방내과학회지, 23(1):117-122, 2002.
20. 劉正才, 尤煥文. 中醫免疫, 重慶出版社, 四川, p 9-11, 1983.
21. 申載用. 方藥合編解說, 成輔社, 서울, p 33-35, 1988.
22. 朴鎬湜. 韓方消化器內科學, 圓光大學校出版局, 이리, p 70, 107, 123, 168, 169, 171, 1984.
23. 閔勇泰. 補中益氣湯의 투여가 적외선조사로 저하된 마우스의 면역기능의 수복에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 이리, p 3-7, 1990.
24. 南京中醫學院, 中醫方劑學. 上海科學技術出版社, 上海, p 157,158, 1982.
25. 李文錦. 內科學, 박애출판사, 서울, p 2446-2450, 2466-2475, 1976.
26. 韓國藥學大學協議會 藥典分科學編, 大韓藥典, 文聖社, 서울, p 298, 1988.
27. 전국 의과대학 교수역, 오늘의 진단과 치료,한우리, 서울, p 78-95, 1999.
28. 정미경, 김옥경, 장일무, 박명희, 김상인. 생약제 9종이 조혈작용에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 대한혈액학회지, 28(2):285-297, 1993.