

녹혈이 빈혈유발 Mouse에 미치는 영향

김상미 · 하혜경 · 홍순복 · 김정숙*
한국한의학회지, * 교신저자

Abstract

Effect of Deer Blood on Aplastic Anemia Induced Mouse

Kim Sangmi, Ha Hyekyung, Hong Soonbok, Kim Chungsook*

Korea Institute of Oriental Medicine

* Corresponding Author

Hematopoietic stem cells in bone marrow form all kinds of blood cells. In traditional medicine, functions of bone marrow cells are very similar to those of Essence(精) which is a fundamental factor of physical development and reproduction. Our experiment examined the effect of deer blood on aplastic anemia induced mouse using cyclophosphamide 150 mg/kg i.p injection before experiment and then another cyclophosphamide 120 mg/kg i.p injection on day 10. Then we administrated dried deer blood in distilled water for 5 days, 9 days and 10 days. We examined blood and marrow samples. In results, deer blood showed a trend of effectiveness on recovery of red blood cells and erythropoietin although they were not statistical significant. And deer blood did not show changes in CD34.

Key words : Deer blood, CD34, bone marrow, aplastic anemia, red blood cells, erythropoietin

I. 서론

혈구세포들은 생체의 모든 세포들의 항상성 유지와 면역보호를 책임지므로 어느 조직보다 재생능력이 뛰어나다. 이는 성인의 경우 골수에 있는 조혈모세포가 하루에 수십억 개의 새로운 혈세포를 만들기 때문에 가능한 것이다. 조혈모세포는 형태만으로는 백혈구 및 기타 골수 세포들과 구별이 어렵고 골수 세포 10,000~15,000개중 1개로 매우 소수여서 직접적인 감별이 불가능해 ‘표식자’를 이용한다¹⁾. 세포 표면을 덮고 있으면서 다른 ‘signaling’ 분자와 선택적으로 결합하는 능력이 있는 특화된 단백질을 수용체라고 하는데 이것이 ‘표식자’가 되는 것으로 여기에 발색물질을 붙여서 검색하며 조혈모세포의 표식자는 ‘CD34’이다.¹⁾ 골수세포 중 75%는 백혈구 계열이고 25%는 적혈구 계열인데 조혈모세포로부터 적혈구가 생성하려면 IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF와 erythropoietin(EPO) 등의 조혈인자의 작용이 필요하고 골수에서 전구체인 myeloid progenitor cell 단계를, 그리고 말초혈액에서 late normoblast, reticulocyte 단계를 거친다.²⁾ EPO는 성인의 경우 85%는 신장에서 15%는 간에서 만들어지는 호르몬으로 EPO의 분비는 보통 저산소증에 의해 자극되어 적혈구생성을 되먹임 조절한다. EPO는 골수에서 EPO에 감수성 있는 적혈구 전구체들의 수를 늘리는 작용을 하며 EPO의 농도가 낮을 때는 적혈구계열 줄기세포의 DNA가 끊어지면서 세포자멸사 하게 된다²⁾.

『황제내경소문』에 ‘腎脈.....其稟而散者當病少血至今不復也’라 하고 張志聰이 腎은 五臟의 精을 받아서 갈무리하며 腎의 精液이 위로 心에 들어가 血이 되는데 精이 부족하여 血을 만들 수 없다고 풀었다. 또한 ‘骨者, 髓之府’라 하고 張志聰은 수(髓), 정(精), 근(筋), 골(骨) 역시 오장의 精으로부터 자양 받는 것이고 사람이 생길 때 精부터 형성되고 이어서 腦髓가 생기며 골은 큰 줄기가 되며.....사람의 氣血聲色筋骨肌肉은 모두 先天之精에서 비롯되어 後天之精을 자양 받아 생겨나고 작용

하며 髓는 골에 갈무리 되므로 骨은 髓의 집이라고 풀었다.³⁾ 또한 ‘大骨枯槁, 大肉陷下.....死’라 했고 이에 대해 張志聰이 氣血은 腎에서 발원하고 腎이 주관하는 骨이 마른 것은 골수가 부족한 것이고 이는 心腎이 상하여 精血이 쇠진한데다 脾에 병이 들어 津液을 운행하지 못하여 骨을 적시지 못하고 腦髓를 補益하지 못하기 때문이라고 했다.³⁾ 또한 『동의보감』 「內景篇」의 身形藏府圖⁴⁾를 보면 脊柱와 腦는 한 길로 연결되어 있으며 腎은 脊柱와 密接해 있다. 또 같은 편에 ‘背後有三關 腦後曰玉枕關 夾脊曰轆轤關 水火之際曰尾閭關 皆精氣升降往來之道路也’⁴⁾라고 하였는데 미려관은 腎이 주관하는 下焦에서 척주로, 녹로관은 척추들 간, 옥침관은 척주에서 腦로 이행하는 곳이다. 한편 腎은 오장의 精을 藏하고, 척주는 身形을 지탱하는 큰 줄기로 골수를 지니고 腦는 髓之海이니 精에서 髓가 생겨날 뿐 아니라 髓는 精의 한 저장형태로 精과 유사한 기능이 있음을 추측할 수 있다.

위의 의서들로부터 腎의 기능에 이상이 있으면 빈혈이 될 수 있고, 血은 腎이 갈무리 하고 있는 精으로부터 만들어지며 골수와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 또한 골수가 병들면 고치기 어려운 심각한 상태이며 이는 精의 문제일 수 있음을 알 수 있다. 따라서 과다출혈이 아닌 생성이상으로 인한 빈혈과 골수가 부족한 증상은 한의학의 관점에서 精을 補할 수 있는 음식이나 약을 섭취하는 것도 하나의 치료방법이 될 수 있다고 가정할 수 있다.

녹혈의 主治는 『本草綱目』에 ‘虛損을 크게 보양하며 精血을 보충하고 痘毒, 藥毒을 없앤다’라고 있는 것을 비롯 本草書에 ‘生血하고 코피, 골절, 성교불능증, 요통, 肺痿로 인한 토혈 및 자궁출혈과 대하증을 치료하고, 보허, 補陰, 益營氣한다.’고 되어 있다.⁵⁾

박 등⁶⁾은 녹혈이 화학항암제 cyclophosphamide(CTX)에 의해 유발된 악성빈혈에서 조혈기능과 대사기능을 촉진한다고 보고했고, 김 등⁷⁾은 녹혈이 화학항암제 fluorouracil과 cisplatin의 부작용인 조혈독성과 신장독

성을 억제한다고 보고했다.

우리는 조혈모세포의 증식 또는 활성화에 補益精血하는 효능이 있는 것으로 의서에 기재된 녹혈이 효과가 있을 것이라 기대하고 mouse에 항암제로 재생성빈혈을 유발하여 녹혈 투여 후 효과를 관찰하였다. 이를 위해 chloramphenicol⁸⁾과 CTX^{6), 9)}를 투여하여 10일 이상 적혈구저하 상태가 지속되는 빈혈모델을 정하기 위한 예비실험을 행하여 그 결과 CTX로 빈혈을 유발한 후 녹혈을 투여하여 적혈구, EPO와 조혈모세포의 표식자인 CD34를 정량하여 빈혈의 회복과정에 작용하는 녹혈의 효과를 검색하였다.

대한바이오링크, 충북 음성군)를 102마리 사용했다. 빈혈을 유발하기 위해 항암제인 cyclophosphamide (Sigma chemical Co. MO. U.S.A)를 사용했으며 주사액으로 만들기 위한 용매로 대한 멸균생리식염수 (대한약품공업주식회사, 경기도 안산시)를 사용했다. 녹혈은 2000년 2월 2일에 한국산 꽃사슴 (Cervus nippon var. mantchuricus, 청평녹야원)의 뿔을 절각 할 때 모은 전혈을 동결 건조하여 냉장보관 한 것을 사용하였다. 동결건조한 녹혈은 3차 증류수에 용해시켜 사용했다. 실험동물은 빈혈유발처리를 하지 않고 증류수만 5 g/kg/day씩 구강 투여한 Normal군, 0일에 CTX 150 mg/kg을 복강주사 후 10일에 다시 CTX 120 mg/kg을 복강주사 하여 빈혈유발 후 8일부터 17일까지 증류수를 5 g/kg/day씩 구강 투여한 CTX군, 같은 방법으로 빈혈유발 후 증류수에 녹인 녹혈을 5 g/kg/day씩 구강 투여한 CTX+NH군으로 나누어 0일, 8일, 13일, 17일, 20일에 부검을 실시했다(Table 1).

II. 재료 및 방법

1. 동물실험

실험동물은 8주령의 숫컷 B6D2F1 mouse*¹⁰⁾ ((주)

Table. 1. Constitution of each group

group day [§]	Normal [*]	CTX [†]	CTX +NH [‡]
0 day	10	-	-
8 day	5	7	-
13 day	7	8	8
17 day	10	10	10
20 day	7	8	12

*: Mice were not i.p injected and only administered distilled water 5 g/kg/day

† : Mice were i.p injected with CTX 150 mg/kg at 0 day and then another CTX 120 mg/kg at 10 day. And they were administered distilled water 5 g/kg/day from 8 day to 17 day.

‡ : Mice were i.p injected with CTX 150 mg/kg at 0 day and then another CTX 120 mg/kg at 10 day. And we administered dried deer blood 5 g/kg/day in distilled water from 8 day to 17 day.

§: The day when the mice were sacrificed.

* 유럽약전 4th ed.에 erythropoietin을 정량하는 실험에 8주령의 B6D2F1 mice가 적합하다고 적시되어 있음.

2. 혈액실험

1) RBC 측정

Ethyl Ether로 마취 후 개복하고 후대정맥에서 헤파린(중외제약) 처리한 주사기로 채혈하여 Coulter(Coulter Co.)로 전혈구를 계측하였으며 4℃에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리하여 냉동보관하였다가 EPO 정량실험에 사용하였다.

2) EPO 정량

DiaSorin사(U.S.A)의 EPO-Trac™ 125I RIA Kit를 사용하여 각 tube에 Standard 및 plasma 200μL, EPO primary goat antibody 100μL씩 넣고 2시간 동안 상온에서 배양한 후 Total count tube 및 Nonspecific binding tube를 포함한 모든 tube에 EPO tracer를 각각 100μL씩 넣고 4℃에서 18시간 동안 배양했다. 배양 후 EPO-Trac Precipitating Complex인 DAG-PPT(donkey anti-goat serum, secondary antibody)를 Total count tube를 제외한 모든 tube에 각각 500μL씩 분주했다. 30분간 상온에서 배양 후 같은 온도에서 20분간 1000×g로 원심분리 했다. 상청액을 버리고 침전물만 1분간 γ-counter (Wallac 1470 WIZARD, WALLAC Co., Finland)로 계측했다.

3. CD34 측정

양측 대퇴골과 경골을 분리하여 양끝을 자르고 FACS Media (0.1% BSA와 0.1% NaN₃를 포함하는 pH7.4의 phosphate buffered saline)로 씻어내려 골수 조직 및 세포를 분리하였다. 분리한 골수를 부유한 후 원심분리 (4℃, 400×g, 15 min)하였다. 적혈구를 용혈시키기 위해 골수를 erythrolyse red blood cell (Serotec Co., Oxford UK)에 부유시켜 상온에서 10분간 배양하

고 cell strainer (70μm)를 통과시켜 세포만 수집하였다. 원심분리 후 상청액은 버리고 FACS Media로 행군 다음 CD34 antibody-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Serotec Co., Oxford UK)를 넣은 후 30분간 배양하고 원심분리 (4℃, 400×g, 15min)하여 FACS Media로 2회 행군고 수집된 세포는 FACS Media에 부유시킨 후 얼음에 채운 상태를 유지하여 2시간 이내에 flowcytometer (Becton Dickinson Co., FACS Calibur)로 측정하였다. Acquiring data program은 Becton Dickinson사 제품에 사용되는 'Cell Quest'를 사용하였고 analysing data program은 'winmdi2.8'을 사용했다¹⁾.

4. 통계분석

실험결과는 Systat®10 Statistics I program (SPSS Inc., U.S.A)을 이용했다. Bonferroni multiple comparison analysis법을 이용하여 P < 0.05 인 경우 차이가 의미 있다고 판단했다.

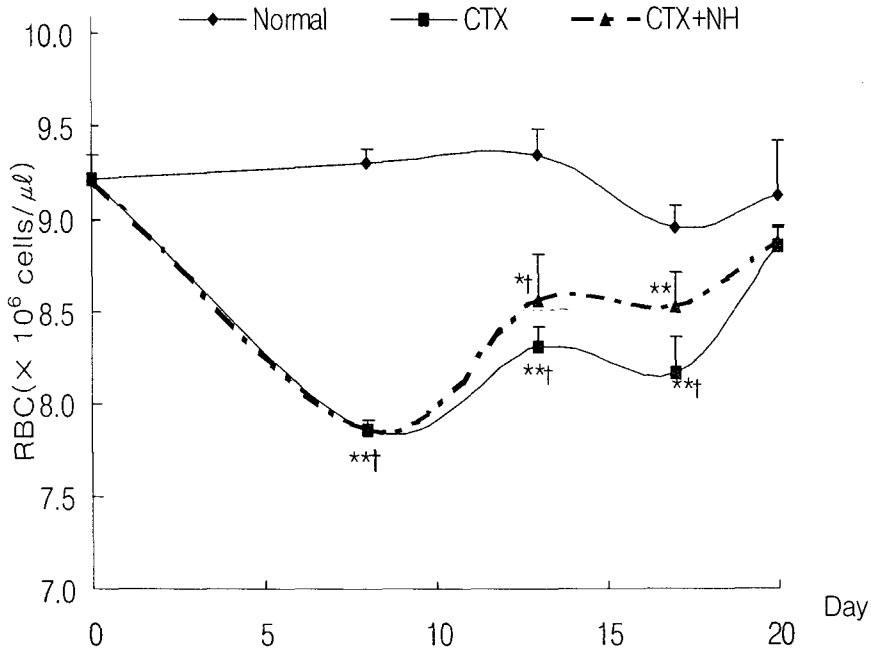
III. 결과

1. 혈액실험

1) RBC 측정

CTX, CTX+NH 모두 0일에 비해 8일부터 17일까지 의미 있게 RBC 값이 저하되었다. 같은 기간에 CTX, CTX+NH 두 군 간의 차이는 없었고, 17일에 CTX군은 Normal군에 비해 저하되었으나 (P<0.01) CTX+NH군은 Normal군의 수준으로 회복되었다(Fig. 1).

Fig. 1. RBC counts in peripheral blood from CTX injection day to 20 day through the duration of administering deer blood(8 day-17 day).



Both CTX and CTX+NH groups' RBC values were depleted in comparison to both 0 day and Normal groups. But there wasn't significant difference between CTX and CTX+NH groups. Comparison to 0 day group *, P<0.05, **, P<0.01, Comparison to Normal group, †; P<0.05, ††; P<0.01 by Bonferroni multiple comparison test.

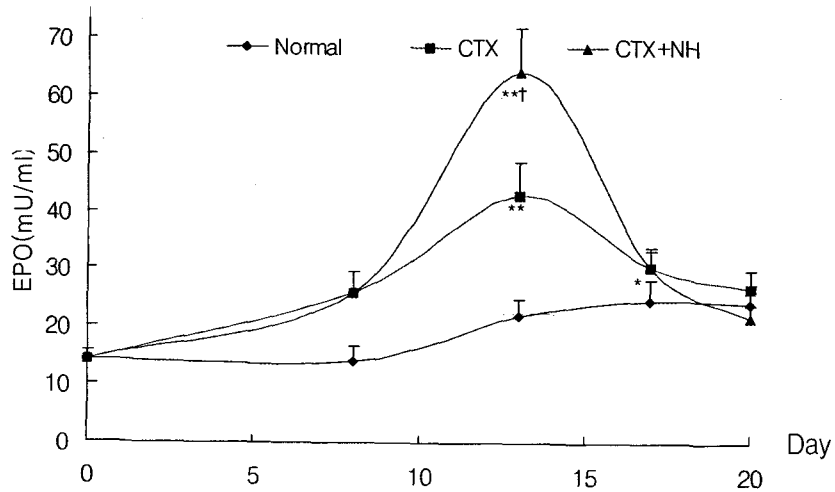
2) EPO의 정량

CTX, CTX+NH군 모두 0일에 비해 13일 까지 증가한 후 20일에는 거의 0일의 값과 같아진다. 13일에 CTX+NH군이 CTX군보다 더 증가하는 경향성을 보였다(Bonferroni: P=0.052, ANOVA: P<0.05). 13일에 CTX+NH군은 Normal군보다 높은 농도를 보였으나 (P<0.01) CTX군은 Normal군과 차이가 없었다(Fig. 2).

2. CD34 측정

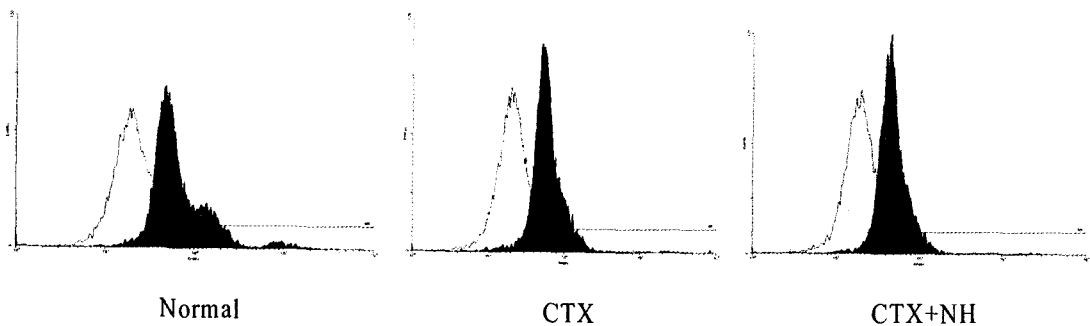
CD34는 CTX군과 CTX+NH군이 서로 비슷한 변화 경향을 보였는데 8일에 감소, 13일에 증가, 17일에 감소하여 20일에도 회복되지 않았다. 두 군의 차이는 없었다(Fig. 3, Fig. 4).

Fig. 2. The counts of EPO in peripheral blood from CTX injection day to 20 day through the duration of administering deer blood(8 day-17 day).



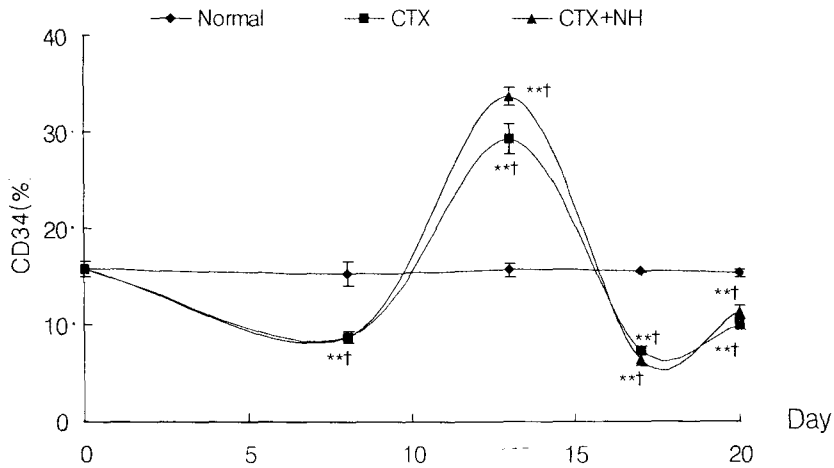
Both CTX and CTX+NH groups' EPO values increased significantly in comparison to 0 day. But only CTX+NH group increased significantly comparison to Normal group. Comparison to 0 day group *, P<0.05, **, P<0.01, Comparison to Normal group, † ; P<0.05, † † ; P<0.01 by Bonferroni multiple comparison test.

Fig. 3. A representative flow cytometry histograms of Normal, CTX and CTX +NH groups.



Vacant histograms are those of negative control and darken histograms are those of CD34FITC-stained samples. Horizontal lines(M1) are the zones CD34FITC expressed. CD34 was calculated as M1 of a CD34FITC substrated by M1 of a negative control.

Fig. 4. The percentage of CD34 antigen expression in RBC excluded bone marrow cells from CTX injection day to 20 day through the duration of administering deer blood(8 day-17 day).



Both CTX and CTX+NH groups' CD34 values decreased significantly at 17 day in comparison to 0 day. Comparison to 0 day group *, P<0.05, **, P<0.01, Comparison to Normal group, † ; P<0.05, † † ; P<0.01 by Bonferroni multiple comparison test.

IV. 고찰 및 결론

본 실험에 사용된 CTX 투여 빈혈 동물모형은 Ren 등⁹⁾에 의해 개발된 모형을 예비실험을 통해 변형하여 사용하였다. CTX군은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 CTX 투여 후 8일에서 17일까지 0일에 비해 유의성 있게 RBC가 감소하였다(p<0.01). CTX+NH군은 같은 기간 동안 CTX군의 RBC의 감소와 유사한 형태를 나타내었고 각 군 사이에 통계적인 차이가 없었다. 또한 CTX+NH군의 RBC의 감소를 정상군과 비교할 때 17일은 통계적인 차이가 없었으므로 CTX 투여에 기인한 RBC의 감소가 녹혈투여로 인해 RBC가 정상군의 상태로 회복된 것을 알 수 있었다.

CTX군은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 CTX 투여로

인해 13일에 EPO의 증가를 나타내었다. 이는 Fig. 1에서 8일에 CTX 투여로 RBC의 감소가 가장 심하였고 이로 인한 일시적인 생리적 현상으로 EPO의 증가가 나타난 것으로 추정된다. CTX+NH군의 EPO의 증가는 CTX군보다 더 강하였고 RBC의 변화와 비교할 때 생리적인 회복현상 즉 EPO의 활성증가가 녹혈투여로 인해 더 강하게 나타난 것으로 사료된다. 이 EPO의 증가는 17일에 정상군과 동일한 농도로 회복되었다.

Fig. 3에서 CTX군과 CTX+NH군의 CD34의 변화는 비슷한 유형을 나타내었다. 이는 조혈모세포의 표식자인 CD34만의 측정으로 CTX투여에 기인한 RBC의 변화를 설명하기는 어려운 듯하고 EPO와 비교할 때 다른 여러 가지 요인이 동시에 작용하여 전체적인 CTX에 기인한 RBC의 변화를 나타내는 것으로 추정된다.

EPO와 RBC는 CTX군보다 CTX+NH군에서 더 증가하였다. 이는 녹혈이 EPO활성의 증가에 주로 작용하여 RBC를 증가시키는 것으로 추정할 수 있으나 조혈모세포의 생성에는 영향을 미치지 못함을 시사한다고 하겠다. 잘 알려진 바와 같이 CD34의 antibody에 있는 L-selectin이 CD34와 배위결합 하는데 L-selectin과 결합하는 배위자는 CD34뿐 아니라 GlyCAM-1, MadCAM-1 등의 황결합 당아미노글리칸이어서 골수 세포 중 전구체, 백혈구 계열 미성숙 혈구세포들도 CD34의 antibody와 결합하는 것으로 알려졌다.^{1),12)} 현재까지 CD34는 조혈모세포의 활성을 분석할 수 있는 좋은 방법으로 알려져 있으나 nonspecific binding에 기인한 실험오차가 크므로 여러 가지 antibody를 동시에 결합시켜 동시분석을 수행하여야 좀 더 명확한 조혈모세포의 변화를 측정할 수 있다고 사료된다.

그러므로 본 실험 결과, 녹혈이 조혈과정을 활성화시키는 작용은 일반인들이 믿는 것보다 미약하여 RBC, EPO 및 CD34에 미치는 영향이 크지 않았다. 추후에 여러 가지 항체를 이용하여 조혈모세포의 변화를 동시에 분석하는 등 좀 더 깊은 기전연구가 필요하다고 사료된다.

한편 한의학적 관점에서 腎의 精液이 心으로 올라가서 血이 되어 精이 허하면 血이 만들어지지 않는다고

하였으니⁵⁾ 조혈모세포가 한의학적으로 精의 범주에 들어갈 수 있으며 빈혈의 치료에 精을 보하는 것이 보다 근본이 될 수 있다. 녹혈은 한의학에서 肝腎經에 귀경하여 기혈과 精髓를 보익하는 약으로 쓰였으며,⁵⁾ 김 등¹³⁾은 정상생쥐에 녹혈을 투여하였을 때는 EPO와 RBC의 변화가 없었으나 노화촉진 생쥐에 녹혈을 투여했을 때 RBC와 EPO의 증가가 일주일 이내에 나타났고 상승된 RBC와 EPO의 상태가 유지되는 것을 확인하였다. 그러나 녹혈은 녹용보다 RBC와 EPO의 증가를 활성화시키지 않았다. 한의학에서 노화는 天癸가 다하여 精이 적어지는 현상으로 볼 수 있으므로³⁾ 노화에 저항하여 RBC와 EPO의 증가를 이끌어 낸 녹용은 보혈보정작용이 있는 것으로 볼 수 있고, 빈혈에 RBC와 EPO의 뚜렷한 증가를 보이지 못한 녹혈은 보혈보정작용이 녹용만큼 강하지는 않을 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

검색어 : 녹혈, 골수, 재생불량성빈혈, 적혈구

감사의 말씀

본 연구를 직접적으로 도와주신 이호영님, 양하루님께 깊이 감사드립니다.

참고 문헌

1. (June 2001). "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions". p.43-46, p.E1-E5, Department of Health and Human Services. <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport>> (2004.6.30)
2. William F. Ganong. 『Review of Medical Physiology』. International ed. 21st ed. New York:Lange Medical Books/McGraw-Hill. 2003:463-464, 517-519, 534.
3. 陳夢雷 原編著, 한국한의학연구원 교감. 『Digital 醫部集成』. 서울:한국한의학연구원. 2002:古今圖書集成醫部彙考 - 黃帝素問 - 上古天眞論篇第一, 脈要精微論篇第十七, 玉機眞藏論篇第十九
4. 허준 원저, 『대역동의보감』, 서울:법민문화사. 1999:115, 120
5. 江蘇新醫學院 편, 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 편찬, 『완역중약대사전』, 서울:정담출판사. 1997:1036-1043, 1056-1057
6. 박갑주, 홍순복, 김은혜, 마진열, 은영아, 김한섭. 「녹혈이 cyclophosphamide로 유도된 악성빈혈의 조혈기능촉진에 미치는 영향」. 『Kor. J. Pharmacogn.』 1998;29(4): 283-292.

7. 김한섭, 홍순복, 성현제, 문근아, 윤유식. 「녹혈의 화학요법 항암제 부작용 억제 효능」. 『Kor. J. Pharmacogn』 . 2003;34(2):145-149
8. 이문한, 윤동호. 「잔류 Chloramphenicol 검사용 효소면역측정법의 개발에 관한 연구-1. Chloramphenicol에 대한 단클론항체의 생산 및 특성조사-」. 『한국식품위생안전성학회지』 . 1993;8(4):205-214
9. Ren LS, Zhang H, Tang Y. 「Effects of qianjia yangshen capsule on rate of polychromatic erythrocytic micronucleus formation and peripheral blood picture in mice treated by cyclophosphamide」. 『Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi』 . 2001 Jun;21(6):445-7.
10. 『European pharmacopoeia』 . 4th ed. Strasbourg:Council of Europe. 2001:1128
11. Keren DF, Hanson CA, Hurtubise P. 『Flow Cytometry and clinical Diagnosis』 . U.S.A:ASCP. 1994:92-109
12. Abbas, AK, Lichtman AH, Pober JS. 원저, 강재성의 29명 역. 『세포분자면역학』 . 4판. 서울:범문사. 2002:120
13. 김연태, 김정숙. 「노화촉진생쥐에서 녹용의 조혈작용에 관한 연구」 『생약학회지』 . 1996;27(4):371-377.