

원 저

## 수 종의 한약제제가 조혈작용에 미치는 영향

전재현, 김영철, 이장훈, 우홍정  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Effects of Korean Traditional Medicine on Murine Hematopoiesis (Regulation of Hematopoietic Cytokine & CD34<sup>+</sup> cell Expression)

Jae-Hyun Jun, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objectives :** To evaluate the diverse actions of stimulation on the hematopoietic system, 4 formulas (KH 1, KH 2, KH 3, KH 4) were studied.

**Method and Result :** RT-PCR was performed to measure the gene expression of hematopoietic cytokines (TPO, GM-CSF, SCF, IL-3). When bone marrow cells were treated with KH 1, 2, 3, 4, the gene expressions of TPO, SCF, IL-3, and GM-CSF were increased. Flow cytometric analysis was performed to measure the expression of CD34<sup>+</sup> cell activity. After 72 hrs culture supplemented with KH 1, 2, 3, 4, the percent of CD34<sup>+</sup> cell of KH 2, 3, 4 were increased. To measure the expression of colony forming units - granulocyte erythrocytes, macrophages, megakaryocytes (CFU-GEMM) and burst forming unit-erythroid (BFU-E), semisolid clonogenic assay was performed. After 14 days of culture the number of CFU-GEMM and BFU-E of KH 1, 2, 3, 4 were significantly increased compared to those of EPO groups (KH 1 P<0.01, KH 2 P<0.05, KH 3 P<0.001, KH 4 P<0.01). To determine the intracellular TPO expression by KH 3, KH 4 in bone marrow cells, intracellular staining and flow cytometric analysis were performed. After 24 hrs cultures, the TPO expression of the KH 3 and KH 4 treated groups were increased over those of the controlled groups (control: 50%, KH 3: 87%, KH 4: 78%).

**Conclusion :** These results suggest that KH 1, KH 2, KH 3, KH 4 have hematopoietic effects through increasing the production of hematopoietic cytokines and stimulating the activity of CD34<sup>+</sup> cells. This study also shows that KH 3 has a more effective hematopoietic effect than KH 1, 2, 4. These results suggest that the formulas (KH 1, 2, 3, 4) can be applied to the patients with inappropriate hematopoietic system, and that KH 3 can be the most effective formula among these 4 in treating bone marrow disease in clinics. (*J Korean Oriental Med 2001;22(3):156-168*)

**Key Words:** Korean traditional medicine, hematopoiesis, TPO, SCF, IL-3, GM-CSF

## 서론

한의학에서는 생명현상의 발현요소를 가운데 血을 매우 중요시하였다. 內經에서는 “血은 脾胃運化에서 來源한 水穀精氣가 營氣와 肺의 작용을 통하여 赤色

· 접수 : 2001년 7월 1일 · 채택 : 7월 30일  
· 교신저자 : 우홍정, 경희의료원 한방병원 1내과, 서울시 동대문구 회기동 1번지  
(Tel. 02-958-9118, Fax. 02-958-9120, E-mail: hjwoo@khmc.or.kr)

의 血로 변환 것"이라고 하였고 이렇게 형성된 血은 맥관 속에서 전신을 순행하면서 인체를 자양하는 역할을 수행하고 생명활동을 영위하게 된다<sup>2)</sup>.

혈액세포는 골수(bone marrow)에 존재하는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)의 분화 및 증식을 통해 생성되고, 조혈모세포는 자기재생과 분화를 거치면서 다양한 단계의 혈액세포로 분화한다<sup>3)</sup>. 혈구의 형성은 세포와 세포간 직접접촉이나 여러 가지 성장인자에 의해 조절되며<sup>4)</sup>, 조혈모세포는 조혈 cytokine의 자극에 의하여 적혈구와 백혈구 및 혈소판으로 분화된다<sup>5)</sup>. 조혈모세포와 골수의 미세환경과의 관계는 아직 명백하지 않지만 골수 미세환경을 이루는 기저세포(stromal cell)가 조혈 cytokine의 주요 공급원이 된다<sup>6,7)</sup>.

골수내 미세환경(microenvironment)에서는 골수세포(bone marrow cell)들의 분화와 증식을 유도하는 조혈성 cytokine들이 있다. 이러한 조혈 cytokine에는 erythropoietin(EPO), thrombopoietin(TPO), stem cell factor(SCF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF), granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF), macrophage-colony stimulating factor(M-CSF) 등의 colony stimulating factors(CSFs)와 각종 interleukin 등이 있다. 이들은 골수세포에 작용하여 특정 형질의 혈구세포로의 분화와 성장에 상승효과를 가지는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>. 대부분의 조혈 cytokine은 단구(monocyte), 섬유아세포(fibroblast), 내피세포(endothelial cell) 등에서 기인하며 그 작용은 복합적이며 적절한 조혈 작용을 일으키기 위해서는 적당한 시기에 적절한 조혈 cytokine의 조합이 필요한 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>.

최근 혈구의 분화 및 증식을 조절하는 특수한 조절인자가 구명되고 유전자 재조합기술의 발전에 따른 이들 조절인자의 대량생산으로 면역기능이 저하된 환자에서 면역기능 회복 및 감염 예방에 효과가 입증되었으며<sup>11)</sup>, 이미 다양한 종류의 조혈 cytokine이 합성되어 항암치료에 따른 호중구 감소, 면역기능 저하, 재생불량성빈혈 등에 사용되고 있다<sup>12)</sup>.

한약물의 조혈작용과 관련된 실험적 연구로 김<sup>13)</sup>

은 左歸飲加味方이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음을 보고하였고, 이 밖에 빈혈, 혈소판감소성자반증, 항암제 또는 방사선 치료로 인한 백혈구감소증 등 혈액세포 부족으로 인한 질병에 한약물의 유효성이 보고되기도 했지만<sup>14)</sup>, 그 약리기전에 대한 연구는 거의 없었다. 최근에는 조혈에 관여하는 cytokine 유전자 발현에 대한 검증이 시작되어 한약이 조혈모세포의 활성화와 조혈 cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있다<sup>15)</sup>.

이에 저자는 補氣, 止血, 補血 및 補陰의 관점에서 각각 KH 1, KH 2, KH 3 및 KH 4의 처방을 구성하여 조혈 cytokine 유전자 발현과 조혈모세포 활성화에 미치는 영향 및 각각의 약리적인 차이를 관찰하였다. 조혈 cytokine 중 TPO, SCF, interleukin-3(IL-3) 및 GM-CSF 유전자 발현을 측정하였고, 또한 유세포형광분석기(flow cytometer)를 이용하여 골수활성세포와 TPO 발현량을 측정하였으며, 골수세포에 EPO와 한약제제를 처리하여 colony 수를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### (1) 시약

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase : M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(USA) 제품을, RNAzol<sup>®</sup>는 Tel-Test사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사(USA)제품 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품 등을 사용하였고, 유세포형광분석에 사용된 fluorescein isothiocyanate(FITC)-anti-CD34는

Pharmingen사(USA)의 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 약재

본 실험에서 사용한 한약재는 다음과 같다.

상기 한약재는 경희의료원 한방병원에서 구입하여 정선하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

처방명	처방 내용
KH 1	人蔘 白朮 乾薑炮 16g 甘草 8g
KH 2	茜草根 地榆炒黑 16g 荆芥炒黑 側柏 三七根 白芨 8g
KH 3	丹參 32g 日當歸 熟地黃 24g 白芍藥 16g 川芎 8g
KH 4	熟地黃 16g 山藥炒 枸杞子 杜冲 8g 山茱萸 牛膝 菟絲子 鹿角膠 7.5g 甘草炙 4g

(3) 검액의 조제

4 종류의 복합처방을 각각 3000cc 원형 플라스크에 넣고 증류수 2000cc와 함께 환류추출기에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 거즈를 통해 걸러낸 후 농축기(RE111, Rotavapo, BuCHI, Switzerland)에 걸고 water bath에 넣은 후 농축시켰다. 농축된 용액을 냉각기(CA-1500, Rottery Cooler, EYELA, Japan)를 이용하여 -25℃로 만든 후 동결건조기(FD800, Freezer

Dryer, EYELA, Japan)를 이용하여 건조한 후 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

(4) 동물

실험동물은 한국화학연구소에서 구입한 C57BL/6 4주령 수컷 생쥐를 분양받아 실험에 앞서 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1%, 조지방 8.0%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼륨 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2. 실험

(1) Cyclophosphamide(CTX) 처리 및 세포분리

C57BL/6 생쥐에 CTX(100mg/kg)를 복강 주사하고 4일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow)를 채취하여 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 골수세포를 회수하였다. 여기에 적혈구용혈액 2ml를 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 즉시 10ml의 D-

약물	생약명	학명
人蔘	GINSENG RADIX	<i>Panax ginseng</i>
白朮	ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE RHIZOMA	<i>Atractylodes macrocephala</i>
乾薑	ZINGIBERIS RHIZOMA	<i>Zingiberis officinale</i>
甘草	GLYCYRRHIZAE RADIX	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
茜草根	RUBIAE RADIX	<i>Rubia akane</i>
地榆	SANGUISORBAE RADIX	<i>Sanguisorba officinalis</i>
荆芥	SCHIZONEPETAE HERBA	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>
側柏	BIOTAE CACUMEN	<i>Biota orientalis</i>
三七根	NOTOGINSENG RADIX	<i>Panax notoginseng</i>
白芨	BLETILLAE RHIZOMA	<i>Bletilla striata</i>
丹參	SALVIAE MILTIORRHIZAE RADIX	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
日當歸	ANGELICAE RADIX	<i>Angelica acutiloba</i>
熟地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT	<i>Rehmannia glutinosa</i>
白芍藥	PAEONIAE RADIX ALBA	<i>Paeoniae lactiflora</i>
川芎	CNIDII RHIZOMA	<i>Cnidium officinale</i>
山藥	DIOSCOREAE RHIZOMA	<i>Dioscorea japonica</i>
枸杞子	LYCII FRUCTUS	<i>Lycium chinense</i>
杜冲	EUCOMMIAE CORTEX	<i>Eucommia ulmoides</i>
山茱萸	CORNI FRUCTUS	<i>Cornus officinalis</i>
牛膝	ACHYRANTHIS BIDENTATAE RADIX	<i>Achyranthes japonica</i>
菟絲子	CUSCUTAE SEMEN	<i>Cuscuta chinensis</i>
鹿角膠	CERVI CORNUS COLLA	<i>Cervus nippon</i>

PBS를 첨가하여 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다.

## (2) 골수세포에서 조혈 유전자 분석(RT-PCR)

### 1) RNA 추출

골수세포를 우태아혈청결핍 RPMI-1640 배양액에서 1시간 동안 배양한 후 4 종류의 한약추출물을 각각 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 농도로 처리하고 3시간 동안 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 배양한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol<sup>®</sup>를 이용하여 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

### 2) cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 $\mu$ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturator)시키고, 이에 2.5 $\mu$ l 10mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 $\mu$ l), 1 $\mu$ l RNase inhibitor(20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC처리된 증류수를 가하여 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

### 3) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Turbo Thermalcycler<sup>™</sup> (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer로  $\beta$ -actin, interleukin-3(IL-3), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF), stem cell factor(SCF), 그리고 thrombopoietin(TPO)을 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmol/ $\mu$ l)와 antisense primer(20 pmol/ $\mu$ l)를 각각 1 $\mu$ l를 가하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10

$\times$ PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu$ l Taq polymerase(5 U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu$ l가 되도록 멸균 증류수를 가하고 predenaturation : 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation : 95 $^{\circ}$ C, 1분, annealing : 55 $^{\circ}$ C, 1분, elongation : 72 $^{\circ}$ C, 1분을 25 cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Nucleotide sequences
TPO	sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	antisense	5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3'
SCF	sense	5'-TAACCCCTCAACTATGTGCGCC-3'
	antisense	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
IL-3	sense	5'-GAAGTGGATCCTGAGGACAGATACG-3'
	antisense	5'-GACCCATGGGCCATGAGGAACATTC-3'
GM-CSF	sense	5'-TAGAAGTTTGGCAAGGCTG-3'
	antisense	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
$\beta$ -actin	sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5'-TAAACCCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

### (3) 유세포형광분석기(flow cytometer)를 이용한 골수세포 활성화 분석

생쥐에서 분리한 골수세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 24 well plate를 이용 각 well에 5 $\times$ 10<sup>5</sup>개의 세포를 분주하고 각각 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 농도로 한약추출물을 가하여 72시간 배양하였다. 배양 후 세포들을 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN<sub>3</sub>)로 2회 수세하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 FITC-anti-CD34를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 골수활성세포를 분석하였

다. 골수세포분석은 CellQuest 프로그램(Becton Dickinson, USA)을 이용하여 CD34<sup>+</sup>세포(positive cell)의 비율(gated, %)을 산출하였다.

#### (4) Semisolid clonogenic assay

C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 Histopaque-gradient를 이용하여 CD34<sup>+</sup>세포들을 분리하였고 이들 10<sup>4</sup>수의 골수세포와 Iscove's modified Dulbecco's semisolid matrix culture medium (1.0% methylcellulose, 30% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin, 2.0 mM L-glutamine, 5% PHA-LCM, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), 3 units/ml erythropoietin(EPO, R&D system, USA)을 혼합한 후 한약추출물(100 $\mu$ g/ml)을 각각 처리하여 35-mm Petri dish(Nunc, USA)에서 14일간 배양하였다. 배양 후 colony 수는 도립현미경(inverted microscope, Nikon, Japan)으로 계수하였는데, colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte (CFU-GEMM)와 burst forming unit-erythroid(BFU-E) colony는 3개 이상의 cluster가 모인 경우로 정의하였다.

#### (5) Intracellular staining for TPO

한약추출물을 골수세포에 24시간 처리하고 Brefeldin A (2.5 $\mu$ g/ml)를 6시간 처리하였다. 배양종료 후 골수세포를 ice-cold FACS 완충용액(0.05% BSA, 0.02% sodium azide in PBS)으로 3회 수세하고, FACS 완충용액 250 $\mu$ l와 동량의 인산완충용액(2% paraformaldehyde)을 넣고 혼합한 후 얼음에서 15분간 고정하였다. 고정 후 세포는 ice-cold FACS 완충용액으로 수세하고, permeabilization 완충용액(0.1% saponin, 0.05% sodium azide)으로 얼음에서 15분간 방치한 후 anti-TPO 항체를 30분간 얼음에서 반응시켰다. 그 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 FIFC-conjugated anti-rat IgG를 30분간 얼음에서 반응시켰다. 그 후 permeabilization 완충용액으로 3회 수세하고 골수세포(약 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells)를 FACS 완충용액으로 섞은 후 유세포형광분석기로 세포내 발현된 TPO의 발현량을 CellQuest 프로그램(Becton Dickinson, USA)으로 분석하였다(sample 당 30,000

and 60,000 events).

#### (6) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였으며, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

## 성적

### 1. TPO, SCF, IL-3, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향

한약제제가 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하는 조혈 cytokine 중 TPO, SCF, IL-3, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향을 밝히기 위해 C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 4종류의 한약제제(KH 1, KH 2, KH 3, KH 4)를 각각 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 세 종류의 농도로 3시간 동안 배양한 후 각각의 유전자의 발현량을 RT-PCR로 측정하였다(Table 1).

### 2. 유세포형광분석기(flow cytometer)를 이용한 골수세포 활성화 분석

한약제제에 의한 조혈모세포의 활성을 측정하기 위하여 골수세포에 4 종류의 한약제제를 처리한 후 72시간 동안 배양하여 유세포형광분석기를 통해서 골수활성세포를 분석하였고, 골수세포분석은 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD34<sup>+</sup>세포(positive cell)의 비율(gated, %)을 산출하였다(Table 2).

### 3. Semisolid clonogenic assay

C57BL/6 생쥐에 CTX(100mg/kg)를 복강 주사하고 4일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow)를 분리하여 methylcellulose를 이용한 semisolid 배지에 EPO 단독 및 EPO와 한약제제 추출물을 함께 배양하여 형성된 CFU-GEMM과 BFU-E의 분화단계에 따른 colony 형태를 관찰하였다(Fig. 1). 골수세포에 EPO를 단독처리하거나 EPO와 한약제제를 병행처리하여 14일간 배양한 후 colony 수를 관찰하였다(Table 3).

**Table 1.** Effects of KH1, 2, 3, 4 Extracts on Hematopoietic Cytokines mRNA Expression Level in Bone Marrow Cells of Mice with Leukopenia and Thrombocytopenia.

Groups		Cytokines mRNA expression(Ht)			
		TPO	SCF	IL-3	GM-CSF
RPMI 1640 Media control		44	79	12	49
KH 1	100	55	69	16	104
	10	75	121	28	100
	1	71	115	22	72
KH 2	100	64	120	32	78
	10	85	67	22	117
	1	72	89	18	84
KH 3	100	124	133	33	97
	10	62	121	25	101
	1	38	110	34	71
KH 4	100	98	147	38	64
	10	65	128	35	130
	1	74	79	31	33

Cyclophosphamide(100mg/kg) was injected(i.p.) 4 days ahead of isolation of bone marrow cells in mice. Various concentraion of KH 1, 2, 3, 4 extracts were treated on bone marrow cells of mice for 3hrs. and then mRNA of each cytokines were isolated and RT-PCR was performed. Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was done by using Windows 1D main program(AAB, USA). Other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The gene expressions were observed on TPO, SCF, IL-3, GM-CSF mRNA expression.

**Table 2.** Representative Flow Cytometric Analysis of the Bone Marrow Cell Population for CD34<sup>+</sup> Expression in Serum-Free Cultures Supplemented with KH 1, 2, 3, 4

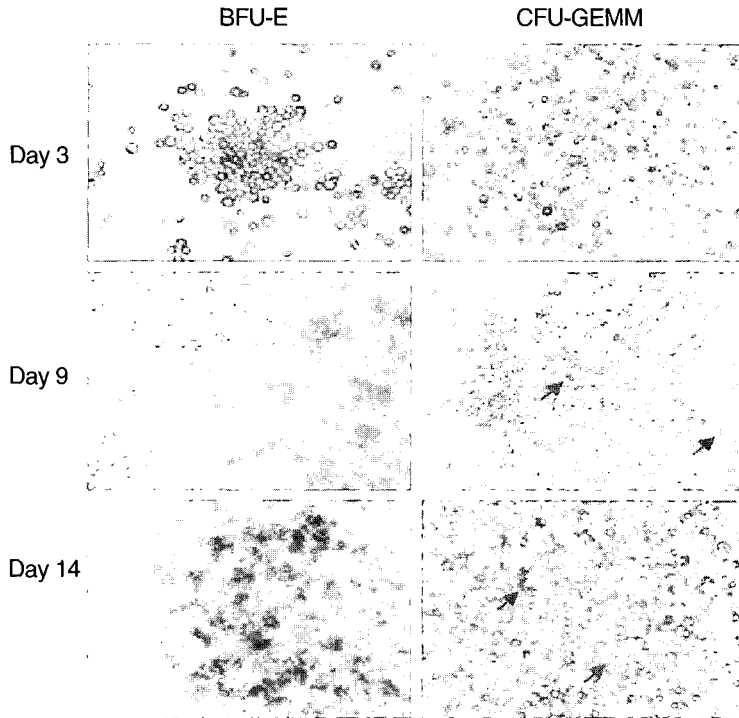
Group	Dose	CD34 <sup>+</sup>	Adherent cells activation
	( $\mu\text{g/ml}$ )	(%)	
Control	0	69.9	*
	100	73.2	
	10	68.4	**
KH 1	1	68.3	
	100	85.0	
	10	74.9	**
KH 2	1	82.7	
	100	86.6	
	10	82.1	****
KH 3	1	74.2	
	100	69.7	
	10	84.3	***
KH 4	1	78.1	

Cyclophosphamide(100mg/kg) was injected(i.p.) 4 days ahead of isolation of bone marrow cells in mice. Various concentraion of KH 1, 2, 3, 4 extracts were treated on bone marrow cells of mice for 72hrs. After 72hrs culture flow cytometric analysis was performed, to measure the expression of CD34<sup>+</sup> cell activity. and the analysis was done by using CellQuest program(Becton Dickinson, USA). Other methods for assay were described in Materials and Methods.

#### 4. Intracellular staining for TPO

골수세포에 KH 3(100 $\mu\text{g/ml}$ )과 KH 4(100 $\mu\text{g/ml}$ )의 한약제제를 처리하여 세포내의 TPO 생산량을 FIFC-anti-TPO를 이용하여 유세포형광분석기로 측정 한 결과, 대조군(50%)에 비해 KH 3 한약제제 처리군의

TPO 발현량이 87%로 37% 증가하였고, KH 4 한약제제 처리군은 TPO 발현량이 78%로 28% 증가되었다 (Fig. 2).



**Fig. 1.** Defining the pattern of differentiation of CFU-GEMM or BFU-E from primary hematopoietic cell by KH 3 extract treatment and photomicrographed at indicated time points.

**Table 3.** Effects of KH 1, 2, 3, 4 on BFU-E and CFU-GEMM Colony Number in the Presence of MethoCult™H4533 and EPO(3U/ml) for 14 Days.

Group					Total Colony No.
BMC					13.0±0.58 <sup>a</sup>
BMC	+	EPO			42.7±2.33
BMC	+	EPO	+	KH 1	57.3±2.03 <sup>**</sup>
BMC	+	EPO	+	KH 2	49.3±1.76 <sup>*</sup>
BMC	+	EPO	+	KH 3	74.7±2.02 <sup>***</sup>
BMC	+	EPO	+	KH 4	72.0±4.51 <sup>**</sup>

Data represent the mean ± SEM of triplicate culture contains mouse marrow 1 × 10<sup>4</sup> cells/dish. All cultures contained MethoCult™H4533 and 3U/ml EPO.

a) Total colony number : BFU-E plus CFU-GEMM.

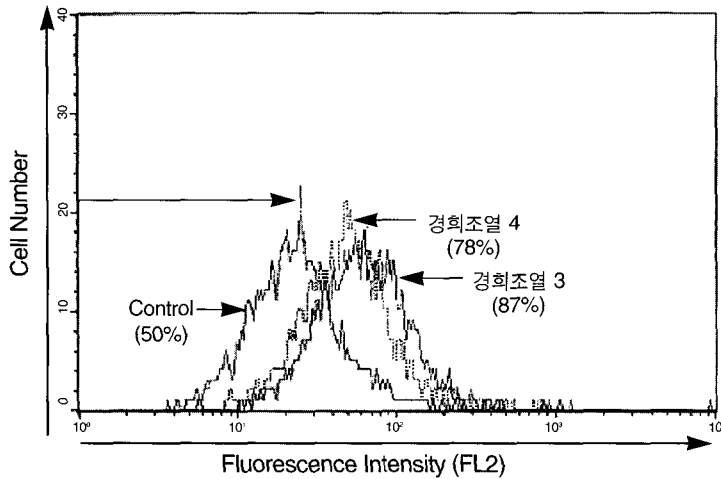
\*) Statistically significant value compared with EPO group data by T test(\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

### 고찰 및 결론

혈액세포들은 골수에 존재하는 조혈모세포의 분화 및 증식과정을 통해 각각의 혈구세포로 성숙된다. 그리고 이러한 혈액 세포들이 만들어지는 과정에는 여러 가지 조혈 cytokine들이 관여하고 있으며, 골수의 미세환경에서 여러 구성 세포들이 분비하는 조혈

cytokine들의 유전자 발현 조절로 특정 혈액세포의 형성이 촉진된다는 것으로 알려져 있다<sup>8,9,16,17</sup>). 이러한 조혈모세포의 분화와 증식에 관여하는 cytokine들로는 IL-3, IL-6, IL-11, SCF, GM-CSF, EPO, G-CSF, M-CSF와 TPO 등이 있다<sup>18</sup>).

이러한 조혈 cytokine 들은 조혈과정에서 각각 특정 시기에 특정한 혈구세포 분화에 영향을 미치며,



**Fig. 2.** Intracellular TPO expression by KH 3, 4 in bone marrow cells.

Bone marrow cells were cultured in the presence of KH 3, 4 extracts for 24hrs. Brefeldin A was added at 2.5 $\mu$ g/ml using a stock of 10 $\mu$ g/ml for 6hrs. The cells were fixed in 2% paraformaldehyde, and washed with ice-cold FACS buffer. After permeabilization, the cells were incubated with anti-mouse TPO monoclonal antibody. After twice washings, cells were incubated with FITC-conjugated anti-rat IgG permeabilization buffer. The amount of intracellular TPO were analyzed by flow cytometer. RPMI1640-free medium(Control), KH 3(100 $\mu$ g/ml) and KH 4(100 $\mu$ g/ml). Histograms were then generated by gated on BM positive cells.

GM-CSF와 같은 특이 조혈 cytokine 과 IL-3과 같이 비특이 조혈 cytokine 등으로 분류하는 경우도 있으나 각각의 cytokine의 작용에는 서로 상승작용이 있어 그 작용시기와 영향을 미치는 혈구세포를 한정하기는 어렵다. TPO를 예로 들면 TPO의 기능은 거핵 집락형성과 분화 및 배수성의 증가에 관여한다고 알려져 있으나, 최근 Grossmann 등<sup>19)</sup>은 골수기능이 저하된 동물에서 TPO의 투여로 혈소판 수의 회복기간 단축과 적혈구 및 호중구세포의 회복기간 단축에도 기여한다고 보고하였다. 이 외에도 TPO는 체내 및 체외에서 거핵구계, 적혈구계 및 골수구계의 전구세포 수를 증가시키는 원시적인 조혈세포에 작용한다는 보고들이 있다<sup>20)</sup>.

그러므로 이러한 조혈 cytokine들은 그 작용이 중복되며 적절한 시기에 적절한 조혈 촉진 인자의 조합에 의해 골수세포가 특정 형질의 혈구세포로 분화 성장하는데 상승효과를 가지는 것으로 파악될 수 있다. 다만 cytokine과 세포와의 반응과정에서 좀 더 성숙된 조혈전구세포인 경우는 단독 cytokine에 의해

증식이 잘되며, 초기 미성숙 조혈전구세포는 한가지 cytokine보다는 두가지 이상의 cytokine에 더욱 반응한다고 보고되고 있다<sup>21)</sup>. 그 외의 조혈 촉진 cytokine 으로 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interferons (INFs), transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), IL-3, IL-6, IL-11 외 다른 interleukin들 역시 미성숙세포의 성장과 분화 및 성숙세포의 기능적 성장을 위해 필요하다<sup>22)</sup>.

조혈성 cytokine은 크게 세 종류의 군으로 분류한다. 첫째는 multilineage군으로 여기에는 초기 간세포(stem cell)인 CFU-GEMM(colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte)과 BFU-E(burst forming unit-erythroid)에 작용하는 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 그리고 IL-3이다. 둘째는, unilineage군으로 후기의 조혈 조상세포(CFU-E, CFU-Meg 및 BFU-E)에 작용하는 EPO, TPO, IL-5, granulocyte colony stimulating factor(G-CSF), 그리고 macrophage colony stimulating factor(M-CSF)이다. 셋째는 potentiating군



으로 다른 조혈성 cytokine의 활성화에 상승작용을 하는 것으로 알려진 IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor(LIF), fibroblast growth factor(FGF), SCF와 fms-like tyrosine kinase-3(FL)로 구성된다<sup>25</sup>.

혈소판 형성을 유도하는 TPO는 거핵세포 전구체(precursor)의 증식과 분화를 자극하여 순환하는 혈소판 수를 증가시키는 기능을 갖는다. Williams와 Jackson 등<sup>23</sup>은 정상 흰쥐에 혈소판이 제거된 혈청을 주사하였을 때, 순환하는 혈액에서 혈소판수가 증가하는 반응을 나타내어 이에 관여하는 어떠한 요소가 존재함을 증명하였고, 또한 Vigon 등<sup>24</sup>은 TPO 수용체인 c-Mpl ligand를 cloning하게 되었다. Bruno 등<sup>25</sup>은 c-Mpl 유전자의 발현이 lineage-committed 세포주와 성숙세포들 중 다기능적 조혈모세포(CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>)인 megakaryocyte 계통의 세포들의 역전사증합반응(RT-PCR)에서만 관찰되었다고 보고하였다. Souyri 등<sup>26</sup>은 TPO 단백질의 153 아미노산의 아미노-말단 부위(N-terminal domain)와 6 potential N-linked glycosylation 부위를 포함한 179 아미노산의 카르복실 말단 부위(C-terminal domain)로 구분하며, in vitro에서 N-말단 부위는 거핵세포형성과정(megakaryopoiesis)을 자극한다고 보고하였다. 거핵세포형성과정은 골수에서 TPO의 자극에 의해 분화가 유도되고, 혈소판형성을 자극하는 thrombopoietic cytokine 들은 분화초기에 SCF와 IL-3가, 분화중기에 IL-6와 IL-11이 관여하여 혈소판 형성을 촉진하게 된다. TPO는 다른 cytokine들과 같이 조혈모세포의 분화와 증식작용에 상승효과를 나타낸다. 이때 TPO는 거핵세포형성과정 중에서 후기단계에 주로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>.

조혈성 cytokine인 SCF는 조혈기세포와 비만세포의 분화 및 성장인자로 c-kit 수용체에 결합하여 생물학적 기능을 갖는 것으로 보고되었다<sup>28</sup>. 골수에서 미분화된 비만세포 전구체가 각 조직으로 이동하여 조직의 특성에 따라 증식과 분화를 통하여 비만세포로 유도되고, 비만세포는 다양한 면역조절작용을 하는 물질들을 분비하여 염증반응세포들을 자극하는 것으로 알려져 있다<sup>29</sup>. 비만세포에서 분비되는 cyto-

kine들은 항체 IgE가 수용체에 결합함으로써 활성화되어 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6와 GM-CSF를 포함한 여러 종류의 면역 조절물질들의 생성을 조절한다<sup>30</sup>.

골수에서 SCF 유전자 발현은 섬유아세포, 간세포, 내피세포, 신경세포 그리고 대식세포 등에서 나타나므로 알려져 있고 이들 발현은 혈구형성과정과 생식세포형성과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>31</sup>. SCF는 조혈모세포가 포함된 골수세포에 직접 작용하여 성장과 분화를 촉진하고, in vitro에서 IL-3와 혼합한 후 골수세포에 처리하여 관찰한 결과 BFU-E, CFU-GM 그리고 CFU-GEMM의 수가 약 200배 증가함을 관찰하여 cytokine들이 이들 작용에 상승효과가 나타나는 것을 밝혔다. 이러한 상승효과는 조혈세포형성과정에서 SCF, IL-3 그리고 TPO가 함께 작용할 때 거핵구 조상세포(megakaryocytic progenitor cell)의 증식효과가 더 크게 나타나는 것으로 알려져 있다.

혈구형성과정 중 분화초기에 관여하여 다양한 colony형성을 자극하는 IL-3는 다기능적 조혈모세포(pluripotent hematopoietic stem cells)의 분화를 유도하여 대식세포, 과립세포, 거핵세포, 적혈구, 호산구와 비만세포 등의 다양한 형태의 혈구세포를 생성하게 하는 중요한 조혈성 cytokine이다<sup>32</sup>. IL-3가 G-CSF나 EPO와 함께 존재하게 되면, 각각의 호중구들이나 erythroid bursts의 형성을 증대시킨다 하였고<sup>33</sup>, Broudy 등<sup>34</sup>은 IL-3가 FL 그리고 SCF와 결합하여 다기능적 조혈모세포를 증식시키고 TPO와 결합하여 거핵세포의 형성을 촉진시킨다고 하였다.

GM-CSF는 초기 조혈형성 과정에서 다른 조혈 cytokine들과 거핵구조상세포를 자극하여 증식과 분화를 조절하는 성장인자이다.

최근 항암화학요법의 발전으로 투여되는 항암제의 용량을 증가시켜 그 치료성적을 향상시키려는 용량-증강 화학요법(dose-intensified chemotherapy)이 많이 사용되면서 항암 효과의 증진은 있었으나 골수 억제 작용으로 인한 여러 부작용이 증가하는 단점이 있었다<sup>35</sup>. 이런 혈액학적 단점을 극복하기 위해 조혈모세포의 분화와 증식을 촉진하고, 그 기능을 증가시키는

조혈 cytokine이 개발되어 그 유효성이 입증되고 있다<sup>36,37)</sup>.

최근에는 전통적으로 조혈작용을 목표로 사용된 한약이 조혈모세포의 활성화와 조혈 cytokine의 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 시작되어 사물탕, 보혈탕 그리고 당귀, 천궁, 계혈등, 단삼 등의 한약추출물이 SCF, TPO, GM-CSF, IL-3 등 조혈 cytokine의 유전자 발현을 촉진시키고, 조혈모세포의 활성화와 집락형성 능력을 촉진시키는 효과가 있음이 밝혀졌고, 또 左歸飲加味方이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음이 보고되었다<sup>13)</sup>.

본 연구에서는 4 종류의 한약제제(KH 1, 2, 3, 4)를 처리하여 조혈 cytokine 중 TPO, SCF, IL-3, GM-CSF 유전자 발현량을 RT-PCR로 측정하여, 4 종류의 한약제제 처리군이 대조군에 비해 대부분의 경우 TPO, SCF, IL-3, GM-CSF 유전자 발현량이 1~2배(Ht값) 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. KH 3, 4 한약제제의 경우에는 IL-3 유전자 발현량을 2배 이상 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. IL-3 유전자 발현은 조혈 과정 중 미분화된 초기 조혈모세포에서 주로 일어난다고 알려져 있는데<sup>38)</sup>, KH 3, 4 한약제제 처리군에서 IL-3 유전자 발현량이 2배 이상 증가한 결과를 통해서 KH 3, 4 한약제제는 조혈과정 중 초기 조혈모세포에 강한 조혈증진작용이 있는 것으로 추측된다.

Gehling 등<sup>39)</sup>은 다양한 cytokine들을 조합한 후 골수세포에 처리하여 CD34<sup>+</sup> 조상세포 수가 증가함을 보고하였다. 본 실험에서는 조혈모세포 자체의 증식을 측정하기 위해서 조혈모세포의 표면에 발현하고 있는 표면형으로 cluster differentiation 또는 designation(CD) 항원을 이용하여 CD34<sup>+</sup>세포의 활성화도 골수세포의 활성화도를 측정하는 방법을 채용하였다. 골수세포에 4 종류의 한약제제를 처리한 후 72시간 동안 배양하여 유세포형광분석기를 통해서 골수활성세포를 분석하여(Table 2), Control 군의 CD34<sup>+</sup>세포의 발현율(69.9%)에 비하여 KH 1 한약제제 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서 3.3% 증가하였으며, KH 2 한약제제 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 CD34<sup>+</sup>세포의 비율이 각각 15.1%, 5.0%, 12.8% 증가

하였고, KH 3 한약제제 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 CD34<sup>+</sup>세포의 비율이 각각 16.7%, 7.9%, 4.3%로 증가하였고, KH 4 한약제제 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 CD34<sup>+</sup>세포의 비율이 각각 14.4% 8.2% 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 KH 2, 3, 4 한약제제의 경우 CD34<sup>+</sup>세포의 활성도를 증가시켜 조혈모세포에 조혈 촉진 작용이 있음을 확인 할 수 있었다. 그리고 부착세포의 활성화도는 KH 3 한약제제 처리군에서 가장 높게 나타났다(Table 2).

조혈모세포의 표면 항원으로 알려진 CD34는 임상적 표지로 매우 유용하게 이용되기는 하나 실제로는 조혈모세포가 아닌 내피세포 등에도 발현될 수가 있으므로, 본 실험에서는 조혈모세포의 활성을 측정하기 위해 집락형성능을 측정하는 실험을 병행하여 실시하였다<sup>40)</sup>. 생쥐에 CTX를 처리한 후 대퇴골에서 골수를 분리하여 methylcellulose를 이용한 semisolid 배지에 EPO만 처리한 군과, EPO와 한약제제 추출물을 병행처리한 군으로 나누어 14일간 배양한 후 BFU-E와 CFU-GEMM의 colony 수를 관찰한 결과(Table 3, Fig. 1), EPO만 처리한 경우와 비교해서 EPO와 한약제제를 병행 처리한 경우의 colony 수가 4 가지 한약제제에서 모두 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다(P<0.05). 특히 KH 1, 4 한약제제 처리군의 경우에는 매우 유의한 증가를 나타내었으며(P<0.01), KH 3 한약제제 처리군에서 가장 현저한 증가를 나타내었다(P<0.001).

이를 통해서 4 종류 한약제제는 조혈 cytokine인 TPO, SCF, IL-3, GM-CSF의 유전자 발현량을 증가시키는 작용이 있으며, 골수세포 및 CD34<sup>+</sup> 조상세포를 자극하여 CD34<sup>+</sup>세포의 활성도를 증가시켜 조혈모세포의 조혈 활성을 촉진시키는 작용이 있다고 사료된다. 특히 KH 3, 4 한약제제의 경우에서 조혈모세포의 집락형성능을 매우 유의하게 촉진하는 결과를 확인할 수 있었으며, 그 중 KH 3 한약제제의 조혈모세포에 대한 집락형성능을 촉진하는 작용이 가장 강한 것을 확인할 수 있었다.

또 TPO 유전자 발현량의 증가가 TPO 단백질 생산량과의 관련성을 확인하기 위하여 세포내 TPO 생산

량을 FIFC-anti-TPO를 이용하여 유세포형광분석기로 측정하였다. KH 3 한약제제 처리군은 대조군(50%)에 비해 37% 증가한 TPO 생산량을 확인할 수 있었고, KH 4 한약제제 처리군은 대조군에 비해 28% 증가한 TPO 생산량을 확인할 수 있었다. 그러므로 본 실험에서는 4 종류의 한약제제가 TPO, SCF, IL-3, GM-CSF의 유전자 발현량을 증가시키며 이 중 KH 3, 4 한약제제의 경우에서 증가된 유전자 발현량이 TPO 생산량과 연결됨을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 사용된 4 종류의 한약제제 중 KH 3, 4 한약제제에서 CD34<sup>+</sup>세포의 비율이 높게 나타나고, CTX 처리된 골수세포의 배양에서 BFU-E, CFU-GEMM colony 형성이 가장 촉진된 것으로 나타났으며, 특히 KH 3 한약제제의 경우 BFU-E, CFU-GEMM colony 형성에 고도로 유의한 촉진 작용이 있는 것으로 나타났(P<0.001).

이상에서 KH 1, 2, 3, 4 모두 골수 기저세포와 조혈 모세포 등을 자극하여 조혈성 cytokine 유전자 발현을 증가시켜 조혈 촉진 작용이 있음을 알 수 있었다. 특히 補血과 補陰의 관점에서 선택된 KH 3, 4 한약제제가 補氣와 止血의 관점에서 사용된 KH 1, 2 한약제제보다 조혈촉진작용이 강함을 알 수 있었고, 그 중에서 補血의 관점에서 사용된 KH 3번 한약제제가 가장 조혈촉진작용이 우수함을 알 수 있었다.

최근 임상에서 조혈 cytokine들이 합성되어 합암치료에 따른 호중구감소증, 면역기능 저하 및 재생불량성 빈혈에 사용되어 좋은 성과를 얻고 있는데, 본 연구에 사용된 4종류의 한약제제(KH 1, 2, 3, 4) 모두 조혈 cytokine을 병행 처리했을 때 조혈 촉진작용이 뚜렷하게 나타났다. 따라서 KH 1, 2, 3, 4 한약제제는 임상에서 조혈이상질환에 조혈 촉진 및 면역증강의 목적으로 다양하게 활용할 수 있을 것으로 사료되며, 특히 KH 3, 4 한약제제의 경우 임상에 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 서울:동양의학연구원출

판부. 1985:116,120.

2. 김병운 외. 肝系內科學. 서울:동양의학연구원. 1995:326.

3. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells : biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 2000;28(8):875-884.

4. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 1977;91(3):335-344.

5. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interactions with fibronectin. *J. Exp. Med.* 1991;174(3):693-703.

6. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.* 1984;12(7):517-521.

7. Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. *Exp. Hematol.* 1990;18(7):837-842.

8. Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang XM, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2001;10(1):125-140.

9. Gabilove JL. Colony stimulating factors : clinical status. *Important Adv. Oncol.* 1991:215-237.

10. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34<sup>+</sup> progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-3, interferon- $\gamma$ , and erythropoietin. *Blood.* 1993;81(10):2579-2584.

11. Remick SC, Sedransk N, Haase RF, Blanchard CG, Ramnes CR, Nazeer T, Mastroianni DM, Dezube BJ. Oral combination chemotherapy in conjunction with filgrastim(G-CSF) in the treatment of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma : evaluation of the role of G-CSF : quality-of-life analysis and long-term follow-up. *Am. J. Hematol.* 2001;66(3):178-188.

12. 최정현, 유진홍, 박성규, 김동욱, 이종욱, 한치화, 민우성, 신완식, 김춘추, 김동집. 조혈모세포 질환에서 동중골수이식후 유전자 재조합형 인과립구-대식세포

- 계 집락성장인자의 효과. 대한조혈모세포이식학회지. 1996;1:133-140.
13. 김선민. 左歸飲加味方이 재생불량성빈혈에 미치는 영향. 서울. 경희대학교 대학원. 1997.
  14. 안희덕. 사물탕의 항암제 부작용에 관한 실험적 연구. 서울. 경희대학교 대학원. 1995.
  15. 김승형, 임종순. Effects of Korean traditional medicine on Murine Hematopoiesis. Korean J. Immunol. 1999;21(2):165-174.
  16. Guerriero A, Worford L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow cells. Blood. 1997;90(9):3444-3455.
  17. Banu N, Wang JF, Deng B, Groopman JE, Avraham H. Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin ; the c-Mpl ligand. Blood. 1995;86(4): 1331-1338.
  18. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S. et al. Multi-level effects of fit3 ligand on human hematopoiesis : expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocyte progenitors/monocytic precursors. Blood. 1995;86(5): 1661-1670.
  19. Grossmann A, Lenox J, Deisher TA, Ren HP, Humes JM, Kausansky K, Spruse KH. Synergistic effects of thrombopoietin and granulocytes colony-stimulating factor on neutrophil recovery in myelosuppressed mice. Blood. 1996;88(9):3363-3370.
  20. Kaushansky K, Lin N, Grossmann A, Humes J, Sprugel KH, Broudy VC. Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. Exp. Hematol. 1996;24(4):265-269.
  21. Broxmeyer HE, Cooper S, Lu L, Hangoc G, Anderson D, Cosman D, Lyman SD, Williams DE. Effects of murine mast cell growth factor(c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. Blood. 1991;77(10): 2142-2149.
  22. Nicola NA. Guidebook to cytokines and their receptors. Cary NC. Oxford University Press. 1994;38.
  23. Williams N, Jackson H. Kinetic analysis of megakaryocyte numbers and ploidy levels developing colonies from mouse bone marrow cells. Cell Tissue Kinet. 1982;15(5):483-494.
  24. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene : identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992;89(12): 5640-5644.
  25. Bruno E, Miller ME, Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. Blood. 1989;73(3):671-677.
  26. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. Cell. 1990;63(6):1137-1147.
  27. Kaushansky K, Broudy VC, Grossmann A, Humes J, Lin N, Ren HP, Bailey MC. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. J. Clin. Invest. 1995;96(3):1683-1687.
  28. Metcalf D. Hematopoietic regulators : redundancy or subtlety? Blood. 1993;82(12):3515-3523.
  29. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. Annu. Rev. Immunol. 1989;7:59-76.
  30. Wineman JP, Nishikawa S, Muller-Sieburg CE. Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro : effects of stromal cells and c-kit. Blood. 1993;81(2):365-372.
  31. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. Blood. 1997;90(4):1345-1364.
  32. Koike K, Ogawa M, Ilhe JN, Miyake T, Shimizu T, Miyajima A, Yokota T, Arai K. Recombinant murine granulocyte- macrophage(GM) colony-stimulating factor supports formation of GM and multipotential blast cell colonies in culture : comparison with the effects of interleukin-3. J. Cell. Physiol. 1987;131(3): 458-464.
  33. Muller-Sieburg CE, Townsend K, Weissmann IL, Rennick D. Proliferation and differentiation of highly enriched mouse hematopoietic stem cells and progenitor cells in response to defined growth factors. J. Exp. Med. 1988;167(6):1825-1840.

34. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*. 1995;85(7): 1719-1726.
35. Lindemann A, Hermann F, Oster W, Haffner G, Meyenburg W, Souza LM, Mertelsmann R. Hematologic effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with malignancy. *Blood*. 1989;74:2644-2651.
36. Morstyn G, Campbell L, Lieschke G, Layton JE, Maher D, O'Conner M, Green M, Sheridan W, Vincent M, Alton K, et al. Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J. Clin. Oncol*. 1989;7(10):1554-1562.
37. 이경희, 라선영, 노재경, 이종인, 이혜란, 박준오, 조재용, 정현철, 김주향, 한지숙, 고윤웅, 김병수, 임호영, 최진혁. 항암화학요법에 의하여 골수억제가 수반된 진행암 환자에서 Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony stimulating factor(rhGM-CSF, LBD-005)의 제 3상 임상연구 : rhGM-CSF의 백혈구 감소증에 대한 효과. 대한암학회지. 1995;27:804-815.
38. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive(CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) human hematopoietic cells : novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J. Exp. Med*. 1996;183(6): 2551-2558.
39. Gehling UM, Ryder JW, Hogan CJ, Hami L, McNiece I, Franklin W, Williams S, Helm K, King J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors : effect of various growth factor combinations on the CD34<sup>+</sup> progenitor cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood. *Exp. Hematol*. 1997; 25(11):1125-1139.
40. Harrison DE, Jordan CT, Zhong RK, et al. Primitive hemopoietic stem cells : direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp. Hematol*. 1993;21(2):206-219.