

원 저

## 左歸飲加味方이 실험적 재생불량성빈혈에 미치는 영향

박신명, 김영철, 이장훈, 우홍정  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Effects of *Juakium*-derivative on Experimental Aplastic Anemia

Shin-Myoung Park, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

**Objectives:** Korean traditional medicinal herbs have been used to improve the function of the hematopoietic system. The purpose of this study is to examine the hematopoietic effects of *Juakium*-derivative on aplastic anemia.

**Methods:** *In vitro*, after bone marrow cells of mice with aplastic anemia induced by benzene were cultured with *Juakium*-derivative, we measured the gene expressions of hematopoietic cytokines, the intracellular TPO and SCF expression and the colony number of CFU-GEMM and BFU-E.

**Results:** The results are summarized as follows:

1. The gene expressions of hematopoietic cytokines (TPO, c-mpl, SCF, c-kit, IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF) and the TPO and SCF expression of the group treated with *Juakium*-derivative increased significantly more than those of the control group.
2. The colony number of CFU-GEMM and BFU-E in the rEPO plus rIL-3 plus *Juakium*-derivative group increased significantly compared with the only rEPO plus rIL-3 group.

**Conclusion:** It was acknowledged that *Juakium*-derivative has hemato-potentiating effects on aplastic anemia induced by benzene and it is expected that *Juakium*-derivative can be used clinically for the patient with hematopoietic system disorder. This study could also be used further as important research data for Korean oriental medicine about hemato-potentiating. The exact mechanism explaining our study would need to be studied further. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(1):133-144)

**Key Words:** *Juakium*-derivative, aplastic anemia, hematopoietic effects, hematopoietic cytokines

## 서 론

재생불량성빈혈은 골수부전에 의한 골수의 저형성과 범혈구감소를 특징으로 하는 질환으로<sup>1)</sup>, 발생빈도는 매년 인구 100만명당 5-10명씩 발생하고 있고<sup>2)</sup>,

동양권에서 그 빈도가 높은 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

재생불량성빈혈에서의 조혈부전의 기전은 확실히 규명되지 못하고 있으나, 조혈모세포 또는 전구세포의 결함이 일차적인 원인으로 지목되고 있고, 이밖에 일부 환자에서는 골수미세환경의 결함이 발견되기도 하고 면역기전에 의한 조혈기능의 억제들이 알려져 있다<sup>4)</sup>.

한의학적으로 이 질환은 腎陰不足과 관련되는데, 腎主骨生髓의 장애로 조혈부전을 일으켜 발생한다.

· 접수 : 2001년 10월 25일 · 채택 : 2002년 2월 1일  
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
(Tel. 02-958-9118, FAX. 02-958-9120, E-mail: hjwoo@khmc.or.kr)

즉 腎精이 虧耗하면 骨髓가 충실하지 못하여 腎陽이 부족하게 되어 타 장기를 溫養하지 못하게 되므로, 心肝脾의 三臟이 俱虛하게 된다<sup>9)</sup>. 따라서 혈구생성이 장애되고 心主血, 肝藏血, 脾統血의 기능이 다 약화되어 貧血, 出血, 血瘀 등의 증후를 발현하게 되는 것으로 보고있다.

한약물의 조혈작용과 관련된 실험적 연구로 김<sup>6)</sup>은 좌귀음가미방이 5-FU로 유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음을 보고하였고, 이<sup>7)</sup>는 수 중 한약재가 마우스의 골수 및 비장세포의 조혈촉진과 방사선방어에 효과가 있음을 보고하였으며, 안<sup>8)</sup>은 빈혈, 혈소판감소성자반증, 항암제 또는 방사선 치료로 인한 백혈구감소증 등 혈액세포 부족으로 인한 질병에 한약물의 유효성이 있음을 보고하였고, 임<sup>9)</sup>은 사물탕과 사물탕 구성약물이 용혈성 빈혈에 대한 유의한 항빈혈효과가 있다고 보고하였다.

최근 골수내 혈구들이 혈구형성과정에서 조절되며 또한 골수미세환경에서 조혈성 cytokine 유전자 발현의 증가로 혈구형성이 촉진되고<sup>10)</sup>, 혈구의 분화 및 증식을 조절하는 특수한 조절인자가 확인되었으며, 유전자 재조합기술의 발전에 따른 이들 조절인자의 대량생산으로 면역기능이 저하된 환자에서 면역기능 회복 및 감염 예방에 효과가 입증되었다<sup>11)</sup>. 근자에는 한약이 조혈모세포의 활성화와 조혈성 cytokine의 유전자 발현에 유의한 효과가 있음이 보고되고 있다<sup>12,13)</sup>.

이에 저자는 좌귀음가미방의 조혈에 미치는 영향을 연구하기 위해 腎陰虛의 관점에서, 景岳全書<sup>14)</sup>에 수록된 좌귀음에 기초한 처방을 구성하여 재생불량성빈혈에 미치는 영향을 관찰하였다. Benzene을 마우스에 주사하여 재생불량성빈혈을 유발한 후, 좌귀음가미방 추출물을 투여하여 조혈성 cytokine 유전자 발현과 조혈성 cytokine 생산량을 관찰하였다. 또한 조혈모세포의 조혈기능을 판정하기 위해 BFU-E와 CFU-GEMM의 집락형성능을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 시약

Benzene, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), corn oil, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide(EtBr), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa(Japan)사 제품을, 역전사효소(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, USA) 제품을, RNazolB는 Tel-Test사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 제품, 그리고 Agarose는 FMC사(USA) 제품 등을 사용하였고, 유세포형광분석에 사용된 PE-anti-CD34는 Pharmingen사(Torreyana, USA)의 제품을 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 2) 동물 및 사육 조건

본 실험을 위하여 사용된 C57BL/6 마우스는 한국 화학연구소에서 분양받아 실험당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 약제

본 실험에 사용한 左歸飲加味方의 처방구성은 景岳全書<sup>14)</sup>에 準하였으며, 사용한 약제는 경희료원 한방병원 약제과에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of *Juakium*-derivative(JKUD)

약 물	생 약 명	학 명	용량(g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	<i>Rehmannia glutinosa</i>	5.3
山藥炒	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	<i>Dioscorea japonica</i>	2.7
枸杞子	<i>LycII Fructus</i>	<i>Lycium chinense</i>	2.7
杜 冲	<i>Eucommiae Cortex</i>	<i>Eucommia ulmoides</i>	2.7
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	<i>Cornus officinalis</i>	2.5
牛 膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	<i>Achyranthes japonica</i>	2.5
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	<i>Cuscuta chinensis</i>	2.5
鹿角膠	<i>Cervi Cornus Colla</i>	<i>Cervus nippon</i>	2.5
甘草炙	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	1.3
Total			24.9

4) 좌귀음가미방 추출물 분리

좌귀음가미방은 3첩 분량에 증류수 1300ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입여과하여 이를 감압증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 건조하였으며, 얻어진 건조분말을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) Aplastic anemia 유발

C57BL/6 마우스 10마리에 benzene을 2ml/kg(20% benzene/corn oil, B20)으로 마우스 등부위에 주사하였다. 주사는 약 50µl/25g씩 1주 3회(월, 수, 금) 투여하여 aplastic anemia를 유발시켰다.

2) 골수세포 분리 및 약물처리

Benzene 주사 7일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow, BM)를 채취하여 2000rpm에서 5분간 원심분리한 후 골수세포(bone marrow cells)를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 2ml을 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 골수세포를 우태아혈청결핍 RPMI1640 배양액에서 1시간 동안 배양한 후 좌귀음가미방추출물(100, 50, 10, 1 µg/ml)을 처리하고, 3시간동안 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>, Lapco, USA)에 배양하였다.

3) 골수세포에서 조혈조절 유전자 분석

(1) RNA 추출

3시간 배양한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500µl를 넣고 lysis 될 때 까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform(CHCl<sub>3</sub>) 50µl를 첨가한 후 15초간 혼합(vortex)하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200µl와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20µl의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3µg을 75℃에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5µl 10mM dNTPs mix, 1µl random sequence hexanucleotides(25pmole/25µl), RNase inhibitor (20U/µl), 1µl 100mM DTT, 4.5µl 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1µl의 M-MLV RT(200U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20µl가 되도록 하였다. 이 20µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온

수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성 한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3μl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, interleukin-3(IL-3), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF), stem cell factor(SCF), thrombopoietin(TPO), c-kit, 그리고 c-mpl을 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmole/μl)와 antisense primer(20pmole/μl)를 혼합하여 1μl를 가하고, 다시 3μl 2.5mM dNTPs, 3μl 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 μl Taq polymerase(5U/μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30μl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation; 95℃, 5분, denaturation; 95℃, 1분, annealing; 55℃, 1분, elongation; 72℃, 1분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20μl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

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

4) ELISA에 의한 조혈조절 단백질측정

골수세포를 12well plate에 2x10<sup>6</sup> 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청결핍 RPMI1640 배양액으로 배양하고, 좌귀음가미방추출물 (100μg/ml, 10μg/ml, 그리고 1μg/ml)을 처리하고, 72시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 조직배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, TPO 그리고 SCF enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D system)으로 생산량을 측정하였다.

5) Semisolid clonogenic assay

Benzene을 2ml/kg(20% benzene/corn oil, B20)으로 마우스 등부위에 1주 3회(월, 수, 금) 투여한, C57BL/6 마우스의 대퇴부에서 골수세포를 분리하였다. 골수세포(1x10<sup>4</sup>cells)와 Iscove's modified Dulbecco's semisolid matrix culture medium(0.8% methylcellulose, 30% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin, 2.0mM L-glutamine, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), 3units/ml erythropoietin (EPO, R&D system), 20ng/ml interleukin-3(IL-3, R&D system)를 혼합한 후 좌귀음가미방추출물 (100μg/ml, 10μg/ml, 그리고 1μg/ml)을 각각 처리하여 35-mm Petri dish(grid, Nunc)에서 14일간 배양하였다. 배양 후 colony 수는 도립현미경(inverted microscope, Nikon, Japan)으로 계수하였는데, CFU-GEMM colony는 한 colony에 과립계 및 적혈구계가 포함된 경우로 정의하였고 BFU-E colony는 적색의 색소가 포함된 3개 이상의 cluster가 모인 경우로 정의하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Gene	Primer	Oligonucleotide
TPO	sence	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAG-3'
	antisence	5'-AGCCCATGAGTTCATTTCAC-3'
c-mpl	sence	5'-TAGAAGTTTGGCAAGGCTC-3'
	antisence	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
IL-3	sence	5'-GAAGTGGATCCTGAGGACAGATACG-3'
	antisence	5'-GACCCATGGCCATGAGGAACATTTC-3'
GM-CSF	sence	5'-TAGAAGTTTGGCAAGGCTC-3'
	antisence	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
SCF	sence	5'-TAACCCTCAACTATGTCGCA-3'
	antisence	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
c-kit	sence	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAC-3'
	antisence	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGA-3'
EPO	sence	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	antisence	5'-AGCCCATGAGTTCATTTCAC-3'
EpoR	sence	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'
	antisence	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
β-actin	sence	5'-TGGAACTCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisence	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

## 성 적

### 1. TPO, c-mpl, SCF, c-kit, IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향

좌귀음가미방이 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하는 TPO, c-mpl, SCF, c-kit, IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향을 밝히기 위하여 C57BL/6 마우스의 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 좌귀음가미방 추출물을 각각 100, 10, 5, 1 $\mu$ g/ml의 네 종류의 농도로 3시간 동안 배양한 후 각각의 유전자

**Table 1.** Effects of JKUD Extracts on Hematopoietic Cytokines mRNA Expression Level in Bone Marrow Cells of Mice with Aplastic Anemia

Group	Cytokines m-RNA expression (Ht)				
	TPO	c-mpl	SCF	c-kit	
Media control	19	50	132	203	
100	107	63	156	235	
JKUD	10	74	116	40	241
( $\mu$ g/ml)	5	55	83	164	218
1	22	79	153	209	

Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice pretreated with benzene (2ml/kg, s.c. in the dorsal region three times a week). These cells were cultured with JKUD extract for 3hrs and then the mRNAs were isolated for RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and 1D-density program was used for the analysis. The other methods for assay were performed as described in materials and methods. The gene expression were observed on TPO, c-mpl, SCF, c-kit mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin).

**Table 2.** Effects of JKUD Extracts on Hematopoietic Cytokines mRNA Expression Level in Bone Marrow Cells of Mice with Aplastic Anemia

Group	Cytokines m-RNA expression (Ht)				
	IL-3	EPO	EpoR	GM-CSF	
Media control	25	12	48	14	
100	24	55	163	13	
JKUD	10	91	40	138	37
( $\mu$ g/ml)	5	73	13	63	62
1	52	12	47	13	

Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice pretreated with benzene (2ml/kg, s.c. in the dorsal region three times a week). These cells were cultured with JKUD extract for 3hrs and then the mRNAs were isolated for RT-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed in 1.2% agarose gel, and 1D-density program was used for the analysis. The other methods for assay were performed as described in materials and methods. The gene expression were observed on IL-3, Epo, EpoR, and GM-CSF mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin).

의 발현량을 RT-PCR로 측정하였다(Table 1,2).

### 1) TPO, c-mpl, SCF, c-kit 유전자 발현에 미치는 영향

Table 1에서 보는 바와 같이 네 종류 농도의 좌귀음가미방 처리군에서 골수세포의 TPO, c-mpl, SCF, c-kit 유전자 발현량은 모든 경우 대조군에 비하여 높게 나타났다.

TPO 유전자 발현량의 경우, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 5.63배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 3.89배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.89배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.16배로 높게 나타났다. 특히 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서 TPO 유전자 발현량이 대조군에 비해 5배 이상 높게 나타났다.

c-mpl 유전자 발현량의 경우, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.26배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.32배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.66배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.58배로 높게 나타났다. 특히 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서 c-mpl 유전자 발현량이 대조군에 비해 2배 이상 높게 나타났다.

SCF 유전자 발현량의 경우, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.18배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.06배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.24배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.16배로 높게 나타났다.

c-kit 유전자 발현량의 경우, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.16배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.19배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.07배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.03배로 높게 나타났다.

### 2) IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 네 종류 농도의 좌귀음가미방 처리군에서 골수세포의 IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현량은 대부분의 경우 대조군에 비하여 높게 나타났다.

IL-3 유전자 발현량의 경우 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 3.64배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.92배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.08배로 높게 나타났으나, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 0.96배로 낮게 나타났다. 100 $\mu$ g/ml 농도

처리군을 제외하고는 모든 처리군에서 대조군에 비해 IL-3 유전자 발현량이 2배 이상 높게 나타났다.

EPO 유전자 발현량의 경우, 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 4.58배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 3.33배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.08배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.0배로 높거나 같게 나타났다. 특히 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 EPO 유전자 발현량이 대조군에 비해 3배 이상 높게 나타났다.

EpoR 유전자 발현량의 경우 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 3.40배, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.88배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 1.31배로 높게 나타났으나, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 0.98배로 별 변화가 없었다. 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군을 제외하고는 모든 처리군에서 대조군에 비해 EpoR 유전자 발현량이 높게 나타났으며, 특히 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 3배 이상 높게 나타났다.

GM-CSF 유전자 발현량의 경우 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 2.64배, 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군이 4.43배로 높게 나타났으나, 100 $\mu$ g/ml와 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 모두 0.92배로 낮게 나타났다. 특히 10 $\mu$ g/ml와 5 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 GM-CSF 유전자 발현량이 대조군에 비해 2배 이상 높게 나타났다.

## 2. TPO, SCF의 생산량에 미치는 영향

골수세포에서 좌귀음가미방에 의한 TPO, SCF의 생산량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 골수세포에 좌귀음가미방 추출물을 각각 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 세 종류의 농도로 처리하고 72시간 배양후 상등액을 얻어 ELISA로 측정하였다(Table 3).

### 1) TPO production

Table 3에서 보는 바와 같이 좌귀음가미방 추출물에 의한 TPO 생산량은 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군(104 $\pm$ 6.9)을 제외하고는 대조군에 비하여 모두 높게 나타났다. 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군(180 $\pm$ 14.7)에서는 대조군(125 $\pm$ 9.8)에 비하여 1.44배 높은 것으로 나타났고 (P<0.01), 특히 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군(272 $\pm$ 11.3)에서는 대조군에 비하여 2.18배 높은 것으로 나타났다

(P<0.001).

### 2) SCF production

Table 3에서 보는 바와 같이 좌귀음가미방 추출물에 의한 SCF 생산량은 대조군에 비하여 모두 높게 나타났다. 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군(914 $\pm$ 68.7)에서는 대조군(665 $\pm$ 38.7)에 비하여 1.37배 높은 것으로 나타났다(P<0.01). 또한 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군(753 $\pm$ 23.5)에서는 대조군에 비해 1.13배, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군(784 $\pm$ 45.1)에서는 1.18배 높은 것으로 나타났다 (P<0.05).

**Table 3.** Effects of JKUD Extracts on Hematopoietic Cytokines Production Level in Bone Marrow Cells Culture Supernatants of Mice with Aplastic Anemia

Group	Cytokines Production Level (pg/ml)	
	TPO	SCF
Media control	125 $\pm$ 9.8	665 $\pm$ 38.7
JKUD 100 ( $\mu$ g/ml)	180 $\pm$ 14.7**	914 $\pm$ 68.7**
JKUD 10 ( $\mu$ g/ml)	272 $\pm$ 11.3***	753 $\pm$ 23.5*
JKUD 1 ( $\mu$ g/ml)	104 $\pm$ 6.9	784 $\pm$ 5.1*

Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice pretreated with benzene (2ml/kg, s.c. in the dorsal region three times a week). These cells were cultured with JKUD extract for 72hrs. The supernatants were collected after 72hrs of culture, and TPO, SCF concentrations in the culture supernatants were evaluated by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in materials and methods. The results are expressed as the mean $\pm$  S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

**Table 4.** Effects of JKUD on BFU-E and CFU-GEMM Colony Number in the Presence of MethoCult™ H4533 and rEPO plus rIL-3 for 14 Days in BMCs of Mice with Aplastic Anemia

Group	Bone Marrow Cells Colony Number	
	BFU-E	CFU-GEMM
Media control	0	7 $\pm$ 0.51
rEPO + rIL-3	25 $\pm$ 1.8	29 $\pm$ 2.2
rEPO+rIL-3 100 ( $\mu$ g/ml)	47 $\pm$ 3.0***	52 $\pm$ 4.2***
+JKUD 10 ( $\mu$ g/ml)	45 $\pm$ 2.8***	60 $\pm$ 5.4***
+JKUD 1 ( $\mu$ g/ml)	34 $\pm$ 2.7**	36 $\pm$ 2.3*

Data represent the mean  $\pm$  SEM of triplicate cultures containing mouse bone marrow 1x10<sup>6</sup> cells/dish. All cultures contained MethoCult™ H4533 and 3U/ml rEPO plus 20ng/ml rIL-3. Statistically significant value compared with rEPO plus rIL-3 group data by T test (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

3. CFU-GEMM 및 BFU-E colony 수에 미치는 영향

C57BL/6 마우스에 benzene(2ml/kg)을 등부위에 약 50 $\mu$ l/25g 씩 1주 3회 투여후 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 실험에 사용하였다. 골수세포를 semisolid 배지에 EPO, IL-3와 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml로 농도 처리된 좌귀음가미방 추출물을 함께 배양하여 14일째에는 CFU-GEMM와 BFU-E colony 수를 관찰하였고(Table 4), 3일째, 9일째, 14일째에는 형성된 CFU-GEMM와 BFU-E colony 형태를 관찰하였다(Fig. 1).

1) BFU-E colony 수에 미치는 영향

BFU-E colony의 경우 아무것도 처리하지 않은 골수세포에서는 colony 수는 0개였고, EPO와 IL-3만을 혼합하여 처리한 경우의 colony 수는 25 $\pm$ 1.8개였다. EPO와 IL-3 그리고 좌귀음가미방 추출물을 병행 처리한 경우의 colony 수는 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 47 $\pm$ 3.0개(P<0.001)였고, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는

45 $\pm$ 2.8개(P<0.001)였으며, 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 34 $\pm$ 2.7개(P<0.01)로 EPO와 IL-3만을 처리한 대조군에 비하여 모두 유의한 증식작용이 관찰되었다.

2) CFU-GEMM colony 수에 미치는 영향

CFU-GEMM colony의 경우 아무것도 처리하지 않은 골수세포에서는 colony 수는 7 $\pm$ 0.51개였고, EPO와 IL-3만을 혼합하여 처리한 경우의 colony 수는 29 $\pm$ 2.2개였다. EPO와 IL-3 그리고 좌귀음가미방 추출물을 병행 처리한 경우의 colony 수는 100 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 52 $\pm$ 4.2개(P<0.001)였고, 10 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 60 $\pm$ 5.4개(P<0.001)였으며 1 $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 36 $\pm$ 2.3개(P<0.05)로 EPO와 IL-3만을 처리한 대조군에 비하여 모두 유의한 증식작용이 관찰되었다.

고찰

재생불량성빈혈은 말초혈액상 범혈구감소증과 골수의 저형성을 보이는 증후군으로 골수에 섬유화 또는 종양세포의 침윤 등이 없는 경우이다<sup>15)</sup>. 재생불량성빈혈은 선천적 결손 또는 다른 질병과 연관된 화학적 또는 물리적 인자에 노출된 결과로서 또는 미지의 원인에 의한 결과로서 후천적으로 생길 수 있다. 후천적으로 조혈모세포의 직접 손상은 방사선조사, 화학요법, 독소 또는 약제들에 의해 초래될 수 있다<sup>16)</sup>. 이중 화학적인 물질로 가장 먼저 의심된 것은 benzene이다. Benzene에 노출된 경우 고용량에서는 혈구감소증을 유발하고 만성적인 접촉에서는 재생불량성빈혈과 백혈병을 유발한다<sup>9)</sup>. 또한 실험동물에서도 benzene을 흡입시키거나 주사해서 benzene이 조혈세포에 유해하다는 점을 여러 가지 방법으로 증명하여 왔다<sup>17)</sup>.

한의학에서 재생불량성빈혈은 虛勞나 血證의 범주에 속한다고 할 수 있다<sup>9)</sup>. 肝, 脾, 腎은 혈액 생성과정에서 중요한 역할을 한다. 腎은 先天之本이고 脾는 後天之本으로서 脾의 氣血化生은 주로 腎에 저장된 精氣의 溫煦 蒸騰작용에 의존하며, 腎에 저장된 精氣

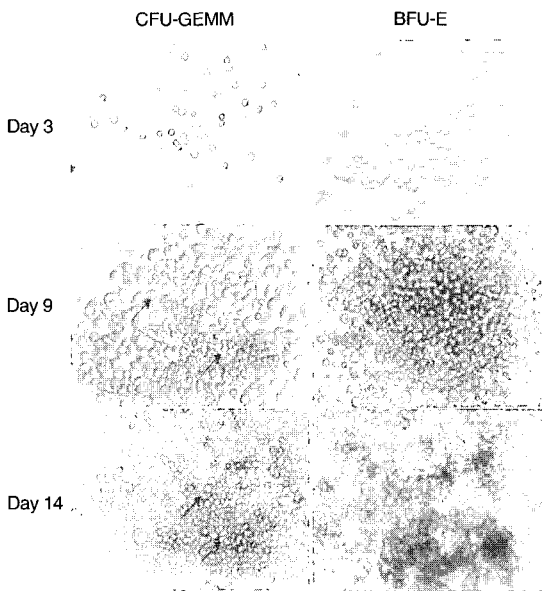


Fig. 1. The pattern of differentiation of CFU-GEMM or BFU-E from primary hematopoietic cell by JKUD extract treatment and photomicrographed at indicated time points.

는 후천적으로 水穀精微에서 化生된 氣血에 의존한다<sup>18)</sup>. 또한 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한다<sup>19)</sup>. 이처럼 脾胃의 血液化生의 기능, 腎의 藏精기능과 肝의 藏血기능이 모두 造血기능에 관여하고 있다. 이와같이 재생불량성빈혈은 골수의 조혈장애로 비롯되는 질환으로 그 근원은 腎에 있고 그 관건은 骨髓의 기능에 달려 있다<sup>9)</sup>. 素問·逆調論에서 腎은 髓이며 骨에서 生하며, 腎이 生하지 못하면 즉 髓도 충만하지 못한다고 하였으며, 素問·痿論에 腎은 一身의 骨髓를 주관한다고 하였다<sup>20)</sup>. 즉 髓는 왕성한 腎氣에 의하여 腎精이 충만하게 되어 化生된 것이다. 결국 한의학 이론상 조혈기능은 肝, 脾, 腎과 밀접한 관련이 있으며, 특히 腎精, 腎陰이 조혈기능의 근간이 됨을 파악할 수 있다.

기존의 한약물의 조혈작용과 관련된 실험적 연구에서는 補血之劑의 약물을 이용한 면역증진과 질병 치료 효과 등은 입증되었으나, 그 약리기전과 면역증진에 관여하는 cytokine에 있어서의 검증이 아직 미미한 실정이다. 이와 관련된 연구로 김<sup>12)</sup>은 사물탕, 보혈탕, 당귀, 천궁, 숙지황, 백작약, 단삼, 그리고 계혈 등의 한약추출물이 조혈 cytokine의 유전자발현을 촉진시키고, 조혈모세포의 활성을 촉진시키는 효과가 있다 하였고, 전<sup>13)</sup>은 補氣, 止血, 補血 및 補陰의 관점에서 구성된 KH 1, 2, 3, 4 제제를 통한 실험에서 특히 補血과 補陰제제인 KH 3, 4에서 조혈성 cytokine 유전자 발현을 증가시켜 조혈 촉진 효과가 뚜렷하였다고 보고하였다.

골수는 혈액에서 발견되는 모든 세포를 만들어내는 곳으로 이중에는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등이 있다. 이러한 혈구들은 골수에서 혈구형성과정으로 조절되고, 골수 미세환경에서 성장인자(IL-3, EPO, TPO, SCF, GM-CSF 등)의 유전자 발현의 증가로 혈구형성이 촉진되어 혈액상의 적혈구, 백혈구, 혈소판등을 증가시킨다<sup>10)</sup>.

골수는 조혈모세포의 성장과 자기재생 그리고 분화 등을 조절하기 위한 일종의 미세환경이며 내피세

포, 섬유아세포, 혈관외망막세포, 지방세포 그리고 대식세포 등으로 구성되어 있다. 혈구의 형성은 세포와 세포간 직접접촉이나 여러 가지 성장인자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 초기 혈구형성과정에서 임파성 기저세포는 T와 B 조상임파구로 분화하며, 골수성 기저세포들은 단핵구, 적혈구, 비만세포, 혈소판, 호중구, 호산구 그리고 호염구로 분화하는데, 이들 두 종류의 조상세포들은 각기 특이적 성장인자들에 대한 반응에 따라 그들의 세포분화가 결정되는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 여러 가지의 조혈성 cytokine은 골수세포에 작용하여 특정형질의 혈구세포로의 분화와 성장의 상승효과를 가지는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.

조혈성 cytokine은 크게 세가지군으로 분류한다. 첫째는 다계통군으로 여기에는 초기 간세포인 colony forming unite-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte(CFU-GEMM)과 burst forming unite- erythroid(BFU-E)에 작용하는 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 그리고 IL-3이다. 둘째로, 단일계통군으로 후기의 조혈 조상세포(CFU-E, CFU-Megakaryocyte, 그리고 BFU-E)에 작용하는 EPO, TPO, IL-5, macrophage, granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), 그리고 megakaryocyte colony-stimulating factor(M-CSF)이다. 셋째는 potentiating군으로 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>24)</sup>.

혈구형성과정중 분화초기에 관여하여 다양한 colony형성을 자극하는 IL-3는 다기능적 조혈모세포의 분화를 유도하여 대식세포, 과립세포, 거핵세포, 적혈구, 호산구와 비만세포 등의 다양한 형태의 혈구세포를 생성하게 하는 중요한 조혈성 cytokine이다<sup>25)</sup>.

사람과 마우스의 IL-3 유전자는 각각 GM-CSF 유전자와 밀접하게 연관된 구조로 5번과 11번 염색체에 위치하고 있는 것으로 밝혀져 있다<sup>25)</sup>. 또한 IL-3가



G-CSF나 EPO와 함께 존재하게 되면, 각각의 호중구들이나 erythroid bursts의 형성을 증대시킨다 하였으며<sup>26)</sup>, IL-3가 FL 그리고 SCF와 결합하여 다기능적 조혈모세포를 증식시키고 TPO와 결합하여 거핵세포의 형성을 촉진시킨다고 하였다<sup>27)</sup>.

혈소판 형성을 유도하는 TPO는 거핵세포 전구체의 증식과 분화를 자극하여 순환하는 혈소판수를 증가시키는 기능을 갖는다. TPO는 proto-oncogene인 c-mpl에 의해 암호화된 특이적인 세포표면의 수용체와 결합할 때 나타나는 생물학적 기능이 보고되었다<sup>28)</sup>. 그리고 Bruno 등<sup>29)</sup>은 c-mpl 유전자의 발현이 lineage-committed 세포주와 성숙세포들중 다기능적 조혈모세포(CD34+/CD38-)인 megakaryocytic 계통의 세포들에서만 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR, reverse transcriptase - polymerase chain reaction)에서 관찰되었다고 보고하였다. 거핵세포형성과정은 골수에서 TPO의 자극에 의해 분화가 유도되고, 혈소판형성을 자극하는 thrombopoietic cytokine들은 분화초기에 SCF와 IL-3이, 분화중기에 IL-6와 IL-11이 관여하여 혈소판 형성을 촉진하게 된다. TPO는 다른 cytokine들과 같이 조혈모세포의 분화와 증식작용에 상승작용 효과를 나타낸다. 이때 TPO는 거핵세포형성과정중에서 후기단계에 주로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>.

조혈성 cytokine인 SCF는 조혈기저세포와 비만세포의 분화 및 성장인자로 c-kit 수용체에 결합하여 생물학적 기능을 갖는 것으로 보고되었다<sup>31)</sup>. 골수에서 미분화된 비만세포 전구체가 각 조직으로 이동하여 조직의 특성에 따라 증식과 분화를 통하여 비만세포로 유도되고<sup>32)</sup>, 비만세포에서 분비되는 cytokine들은 항체 IgE가 수용체에 결합함으로써 활성화되어 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6와 GM-CSF를 포함한 여러 종류의 면역조절물질들의 생성을 조절한다<sup>33)</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 200배로 증가함을 관찰하여 cytokine들이 이들 작용에 상승효과가 나타나는 것을

밝혔다<sup>23)</sup>.

EPO는 30-39 KD의 당단백질로 태아의 간과 성인의 신장이 주 생성장소이고 그 생성은 조직에 저산소증을 초래하는 여러 인자들에 의하여 영향을 받으며 주로 적혈구계 전구세포 표면의 수용체와 결합하여 이들의 분화와 성장에 관여하는 조혈 cytokine으로 알려져 왔다. 또한 생후 1-2개월경에 발생하는 생리적 빈혈의 중요한 원인인자로 알려져 있어서 미숙아 빈혈의 치료 또는 예방에 유전자 재조합형 인성 EPO를 사용한 많은 연구들이 보고된 바 있다<sup>34)</sup>. In vitro에서 EPO는 거핵세포 DNA합성과정과 세포질형성과정을 유도하여 혈소판형성과정에 중요한 역할을 하고, 또한 GM-CSF, IL-3, SCF와 작용하여 적혈구형성과정에 주 역할을 한다고 알려져 있다<sup>25)</sup>.

GM-CSF는 127개의 아미노산으로 구성된 당단백질로 분자량은 18-32KD이고 유전자는 5번 염색체의 q23-31부위에 위치한다. GM-CSF는 T 림프구, 단구, 섬유모세포, 내피세포 등에서 생산되며 실험적으로는 세균의 내독소에 의해 생산이 증가되는 것으로 보고되고 있다. GM-CSF의 기능은 조혈모세포의 분화단계에 있어서 골수계열의 CFU-GEMM 이하에 있는 모든 조혈모세포를 중성구, 단구, 호산구, 호염기구와 혈소판으로 분화 및 증식시킨다<sup>35)</sup>.

본 연구에서는 재생불량성빈혈을 腎陰虛의 관점에서, 左歸飲을 基本處方으로 左歸飲加味方을 구성하여 실험하였다. 左歸飲은 張<sup>14)</sup>이 六味地黃湯에서 涼性の 牡丹皮와 泄腎經之火하는 澤瀉를 去하고 滋補肝腎하는 枸杞子和 益氣健脾하는 炙甘草를 가하여 補而不瀉하고 이외에도 補益腎陰의 효능을 증강시킨 純補壯水之劑로 腎陰虛가 비교적 重한 경우에 사용하는 처방이다<sup>36)</sup>.

본 연구에 사용된 左歸飲加味方의 구성약물의 성미와 효능을 살펴보면 熟地黃은 甘·微溫 無毒하여 滋陰補血, 益精填髓하며, 山藥은 甘·溫無毒하여 능히 健脾補肺固腎益精하고, 枸杞子是 甘·寒無毒하여 滋腎潤肺補肝하며, 炙甘草는 甘·平無毒하여 脾胃虛弱症을 다스리며, 山茱萸는 酸澁·微溫無毒하여 補益肝腎, 澁精固脫하며, 鹿角膠는 甘鹹·溫無毒하고

肝腎으로 歸經하여 補血益精하며, 杜冲은 甘微辛·溫無毒하여 補肝腎, 强筋骨하며, 兔絲子는 辛甘·溫無毒하여 補肝腎, 益精髓하며, 牛膝은 苦酸·平無毒하고 熟用時 補肝腎, 强筋骨한다<sup>37)</sup>.

이상의 각 약물의 효능을 종합하여 보면 左歸飲加味方은 左歸飲에 杜冲, 牛膝, 兔絲子, 鹿角膠를 加味하여 補益腎陰과 더불어 補肝腎 및 補血의 효능을 보강한 처방이다.

이에 저자는 左歸飲加味方이 腎陰虛에 활용할 수 있는 점에 착안하여 benzene으로 재생불량성빈혈이 유발된 마우스모델에서 조혈에 어떠한 영향을 주는 지 관찰하였다.

본 연구에서는 좌귀음가미방 추출물을 각각 네 종류의 농도로 처리하여 조혈 cytokine중 TPO, c-mpl, SCF, c-kit, IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현량을 RT-PCR로 측정하여 관찰하였다. 모든 농도의 좌귀음가미방 추출물 처리군에서 대조군에 비해 TPO, c-mpl, SCF, c-kit 유전자 발현량이 모두 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 TPO 유전자 발현량은 100ug/ml 농도 처리군에서 대조군에 비해 5배(Ht값) 이상 높게 나타났다. 또한 IL-3, EPO, EpoR, GM-CSF 유전자 발현량은 대부분의 경우 대조군에 비하여 높게 나타났다.

또한 cytokine 유전자 발현량의 증가로 인하여 실제적으로 cytokine의 생산량이 증가하는 지를 관찰하기 위하여, 좌귀음가미방 추출물(100ug/ml, 10ug/ml, 1ug/ml)을 처리하여 TPO, SCF의 생산량을 ELISA로 측정하였다. 세 농도의 좌귀음가미방 처리군에서 대조군에 비하여 TPO, SCF의 생산량이 1-2배 높게 나타났다. 이는 좌귀음가미방이 cytokine 유전자 발현을 증가시킨 것과 상호 연관됨을 확인할 수 있었다.

조혈모세포의 조혈 기능을 판정하는 방법으로는 조혈모세포의 표면에 발현하고 있는 표현형인 cluster differentiation 또는 designation(CD) 항원을 이용하는 방법과 집락형성능으로 조혈 기능을 검사하는 방법이 있다<sup>38)</sup>. 그러나 CD34+는 임상적 표지로 매우 유용하게 이용되기는 하나 실제로는 조혈모세

포가 아닌 내피세포 등에도 발현될 수가 있다. 그리고, IL-3가 성숙단계의 말기과정에 있는 세포에서보다 발생의 초기단계에 있는 소수의 미분화된 혈구세포 형성의 stem cell과 다기능적 progenitors에 작용하며, G-SCF나 EPO와 같이 존재하게 되면, 각각의 neutrophil colonies나 erythroid bursts의 형성을 증대시킨다<sup>39)</sup>. 따라서 본 연구에서는 골수세포에 EPO, IL-3, 좌귀음가미방 추출물을 병행처리하여 14일간 배양한 후 CFU-GEMM, BFU-E colony의 형태 및 수를 관찰하였다. EPO와 IL-3만을 병행 처리한 경우에 비하여 EPO, IL-3와 좌귀음가미방 추출물을 병행 처리한 경우 모든 농도에서 더 많은 colony를 발견할 수 있었다. 특히 10ug/ml의 농도에서는 총 colony 수가 EPO와 IL-3만을 병행 처리한 경우에 비하여 2배 정도 높게 나타났다.

이상에서 좌귀음가미방은 골수기저세포와 조혈모세포 등을 자극하여 조혈성 cytokine 유전자 발현을 증가시키며, CFU-GEMM, BFU-E colony를 증가시킴으로써 조혈모세포의 조혈활성을 촉진시키는 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

## 결론

좌귀음가미방의 조혈에 미치는 영향을 연구하기 위하여, benzene으로 유발된 재생불량성빈혈 마우스의 골수세포에 좌귀음가미방을 처리한 후 조혈성 cytokine의 유전자발현량 및 TPO, SCF의 생산량과 CFU-GEMM 및 BFU-E colony 수를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 좌귀음가미방은 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하는 TPO, c-mpl, SCF, c-kit, EPO, EpoR 및 GM-CSF 유전자 발현량을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
2. 좌귀음가미방은 TPO 및 SCF 생산량을 유의하게 증가시켰다.

3. 좌귀음가미방은 CFU-GEMM 및 BFU-E colony 수를 유의하게 증식시켰다.

이상에서 좌귀음가미방은 실험적 재생불량성빈혈에 조혈활성을 뚜렷하게 촉진시키는 효능을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 재생불량성빈혈의 임상적 치료에 활용할 수 있는 최소한의 근거를 제시한 것으로 사료된다. 향후 다양한 補陰之劑의 검토와 함께 補血之劑의 비교연구가 필요하리라 생각된다.

### 참고문헌

1. Camitta BM, Storb R, Thomas DE. Aplastic anemia. N Engl J Med. 1982;306:645.
2. May JY, Baumelou E, Guiguet M. Epidemiology of aplastic anemia in France: A prospective multicentric study. Blood. 1990;75:1646-1653.
3. Young NS, Issaragrasil S, Chieh CW, Takaku F. Aplastic anemia in the orient. Br J Haematol. 1986;62:1-6.
4. 조덕연, 김철희, 배광봉, 김현수, 박상준, 김중숙, 최지영, 윤환중, 김삼용. 재생불량성빈혈 환자에서 혈청 Stem Cell Factor(SCF)치 및 재조합 인 SCF의 조혈 집락세포 성장에 대한 영향. 대한혈액학회지. 1997; 32(2):203-213.
5. 전국한의과대학 간계내과학교수 공저. 간계내과학. 서울:동양의학연구원. 2001:531-540.
6. Kim Sun-min, Lee Jang-hoon, Woo Hong-jung. The Effect of Juakium-derivative on Aplastic Anemia. Journal of Oriental Medicine. 1997;2(1):55-65.
7. 이능기, 최승훈, 안규석. 수 중 한약제가 마우스의 골수 및 비장세포의 조혈촉진과 방사선 방어에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. 1996;19(2):157-173.
8. 안희덕. 사물탕의 항암제 부작용에 관한 실험적 연구. 동의병리학회지. 1995;10:341-359.
9. 임석린. 사물탕과 사물탕 구성약물이 혈구감소증에 미치는 영향에 관한 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1):837-851.
10. Guerriero A, Worford L, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow cells. Blood. 1997;90:3444-3455.
11. Remick SC, Sedransk N, Haase RF, Blanchard CG, Ramnes CR, Nazeer T, Mastrianni 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. 김승형, 임종순. Effects of Korean traditional medicine on Murine Hematopoiesis. Korean J. Immunol. 1999;21(2):165-174.
13. 전재현. 수 중의 한약제제가 조혈작용에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(3):156-168.
14. 장개빈. 경약전서(하). 서울:대성출판사. 1988:416-417.
15. 서울대학교 의과대학. 혈액학. 서울:서울대학교 출판부. 1993:117-120.
16. 권현영, 김영주, 노명희, 문홍만, 송재용, 오현숙, 정소용, 조경진. 혈액학. 서울:고려의학. 1993:245.
17. 조현찬, 김상인. 벤젠 대사산물이 마우스 골수 간질 세포에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한혈액학회지. 1988;23(1):1-15.
18. 김완희, 최달영. 장부변증논치. 서울:정보사. 1985:57-59,63-65.
19. 박찬국 편역. 장상학. 서울:정보사. 1992:28-67,214.
20. 홍원식. 정교황제내경. 서울:동양의학연구원 출판부. 1981:70.88-89.
21. Dexter TM, E Spooncer. Growth and differentiation in the hemopoietic system. Annu Rev. Cell Biol. 1987;3:423-441.
22. Moore MA, JT Owen. Stem cell migration in developing myeloid and lymphoid stems. Lancet. 1967:196-197.
23. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells

- factor by stem cell factor, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-3, interferon- $\gamma$  and erythropoietin. *Blood*. 1993;81:2579-2584.
24. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, Peschle C. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocyte progenitors/monocytic precursors. *Blood*. 1995;86:1661-1670.
25. 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;131:458-464.
26. Muller-Sieburg CE, Townsend K, Weissmann IL, Rennick D. Proliferation and differentiation of highly enriched mouse hematopoietic stem cells progenitor cells in response to defined growth factors. *J. Exp. Med*. 1988;167(6):1825-1840.
27. 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.
28. 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.
29. Bruno E, Miller ME, Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1989;73(3):671-677.
30. 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.
31. Metcalf D. Hematopoietic regulators : redundancy or subtlety?. *Blood*. 1993;82(12):3515-3523.
32. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu. Rev. Immunol*. 1989;7:59-76.
33. 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.
34. 이영아, 김기수, 박영서, 문형남, 홍창의. 미숙아 빈혈에서 recombinant human erythropoietin의 효과. *소아과학회지*. 1996;39:631-640.
35. 최정현, 유진홍, 박성규, 김동욱, 이종욱, 한치화, 민우성, 신완식, 김춘추, 김동집. 조혈모세포 질환에서 동종골수이식후 유전자 재조합형인 과립구-대식세포계 집락성장인자의 효과. *대한조혈모세포이식학회지*. 1996;1:133-140.
36. 楊蘊祥. 古今名方. 河南科學技術出版社. 1983:132-133.
37. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1992:427,537,540,547,556,568,580,596,626.
38. 전진우, 홍대식, 서원석, 김숙자, 박성규, 원종호, 백승호, 이권해, 박희숙, 신상만. 냉동 전 및 후에서 제대혈 CD34 양성 조혈모세포의 조혈기능 비교, 대한조혈모세포이식학회지. 1997;2:113-122.
39. Mathey-Prevot B, Andrews NC, Murphy HS, Kreissman SG, Nathan SG. Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:5046-5050.