대한한의학회지 제23권 제1호(2002년 3월)
J Korean Oriental Med 2002;23(1):145-155

원 저

丹蔘四物湯이 조혈작용에 미치는 영향

유재연, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effect of *DanSamSaMul-Tang* on Hematopoiesis

Jae-Yeon Yoo, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objectives: Korean traditional medicinal herbs and some formulas have been used to improve the function of the hematopoietic system. The present research is to examine the effect of *DanSamSaMul-Tang*(DSSMT) as a biological response modifier related to hemato-potentiating function using bone marrow cell as a testing system.

Methods: Mice with leukopenia and thrombocytopenia induced by CTX were treated with DSSMT Extracts. Then we observed cytokines mRNA expression level, the number of CFU-GEMM and BFU-E, and the expression of TPO and SCF in bone marrow cells of mice.

Results: In the DSSMT group, the gene expressions of hematopoietic cytokines were increased significantly and the number of CFU-GEMM and BFU-E of this group was significantly increased compared to the group treated only with EPO and IL-3. The expressions of TPO and SCF in the group treated with DSSMT were higher than those of the control group.

Conclusions: We showed that DSSMT has a good effect on the hematopoietic system. This could also be used as important research data for Korean oriental medicine about hemato-potentiating. *(J Korean Oriental Med 2002;23(1):145-155)*

Key Words: *DanSamSaMul-Tang*(DSSMT), hematopoiesis, hematopoietic cytokines

서 론

인체의 조혈과정은 골수에서 조혈모세포가 성장, 분화하는 혈구형성 과정으로 설명되어 진다[1]. 골수는 조혈모세포의 성장과 자기재생, 그리고 분화 등을 조절하기 위한 일종의 미세환경이다. 조혈모세포와 골수의 미세환경과의 관계는 명백하지 않지만 골수 미세환경을 이루는 기저세포에서 주로 조혈 cytokine이 공급되며[2], 혈구의 형성 과정은 세포와 세포간 직접 접촉이나 이러한 조혈 cytokine에 의해 조절된다[3]. 조혈 cytokine은 골수세포에 작용하여 특정 형질의 혈구세포로의 분화와 성장에 상승효과를 가지고[4], 복합적이며 적절한 조혈 작용을 일으키기 위해서는 적당한 시기에 적절한 조혈 cytokine의 조합이 필요한 것으로 알려져 있다[5].

한약제에는 각종 혈액세포 부족으로 인한 질병에 조혈증진효과가 있는 것으로 알려져 있다[6]. 이와 관련한 실험적 연구로 김[7]은 左歸飮加味方이 5-FU로

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

유도된 재생불량성빈혈에 유효성이 있음을 보고하였고, 안[8]은 항암제 부작용으로 인한 혈구세포의 감소에 사물탕이 유의성 있게 작용함을 보고하였으며, 그 밖에도 김, 윤[9,10]등의 보고가 있다.

그러나 그 약리기전에 대한 연구는 거의 없다가 최근에는 조혈에 관여하는 cytokine 유전자 발현에 대한 검증이 시작되어 한약이 조혈모세포의 활성과 조혈 cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있고, 이에 관한 실험적 연구로 김[11], 전[12] 등의 보고가 있었다.

이에 저자는 한약처방 중 사물탕에 단삼을 합방한 처방을 구성하여 nitrogen mustard 계열의 항암제인 cyclophosphamide(CTX)로 처리한 실험동물에 있어서의 조혈 cytokine 유전자 발현과 조혈모세포 활성에 미치는 영향을 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, polyacrylamide, magnesium chloride($MgCl_2$)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloey 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, 그리고 Agarose(FMC, USA) 등을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 동물 및 사육 조건

본 실험을 위하여 사용된 C57BL/6 생쥐는 한국화학연구소에서 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) 약재

본 실험에 사용한 단삼사물탕의 처방구성은 丹蔘, 日當歸, 熟地黃, 白芍藥, 川芎이며, 사용한 약제는 경희의료원 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

4) 단삼사물탕 추출물 분리

단삼사물탕은 2첩분량에 증류수 1,300㎖을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압증류장치(Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 건조하였으며, 얻어진 건조 분말(38g)을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

1) Leukopenia 및 thrombocytopenia 유발

C57BL/6 생쥐 10마리에 각각 cyclophosphamide(CTX, 100mg/kg)를 복강에 주사하여 leukopenia(백혈구감소증) 및 thrombocytopenia(혈소판감소증)를 유발시켰다.

Prescription of *DanSamSaMul-Tang*(DSSMT)

韓藥名	生藥名	學名	용량(g)
丹 蔘	*SALVIAE MILTIORRHIZAE RADIX*	*Salvia miltiorrhzia*	16
日當歸	*ANGELICAE RADIX*	*Angelica acutiloba*	12
熟地黃	*REHMANNIAE RADIX PREPARAT*	*Rehmannia glutinosa*	12
白芍藥	*PAEONIAE RADIX ALBA*	*Paeoniae lactiflora*	8
川 芎	*CNIDII RHIZOMA*	*Cnidium officinale*	4
Total amount			52

2) 골수세포 분리 및 약물처리

CTX 주사 4일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow, BM)를 채취하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 골수세포(bone marrow cells)를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 2㎖을 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10㎖의 D-PBS를 첨가하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 골수세포를 우태아혈청결핍 RPMI1640 배양액에서 1시간 동안 배양한 후 단삼사물탕추출물(100, 50, 10, 5, 1㎍/㎖)을 처리하고, 3시간동안 배양기(37℃, 5%CO_2, Lapco, USA)에 배양하였다.

3) 골수세포에서 조혈조절 유전자 분석

(1) RNA 추출 (total RNA)

3시간 배양한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzolB 500㎕를 넣고 lysis 될 때까지 혼합하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform($CHCl_3$) 50㎕를 첨가한 후 15초간 혼합(voltex)하였다. 얼음에 15분간 방치한 후 13,000rpm에서 원심분리한 후 약 200㎕의 상층액을 회수하여 2-propanol 200㎕와 동량혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 다시 13,000rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vaccum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20㎕의 증류수에 녹여 heating block 75℃에서 불활성화시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3㎍을 75℃에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5㎕ 10mM dNTPs mix, 1㎕ random sequence hexanucleotides(25pmole/25㎕), 1㎕ RNase inhibitor(20U/㎕), 1㎕ 100 mM DTT, 4.5㎕ 5×RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$)를 가한 후, 1㎕의 M-MLV RT(200U/㎕)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이 20㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 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 항온수조 방식의 Turbo Thermalcycler TM(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3㎕의 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(20pmole/㎕)와 antisense primer(20pmole/㎕)를 혼합하여 1㎕를 가하고, 다시 3㎕ 2.5mM dNTPs, 3㎕ 10×PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$), 그리고 0.18㎕ Taq polymerase(5U/㎕)를 첨가한 다음 최종 부피가 30㎕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 20㎕씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

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

4) ELISA에 의한 조혈조절 단백질측정

골수세포를 12 well plate에 $2x10^6$ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 배양하고, 단삼사물탕추출물(100, 10, 1㎍/㎖)을 처리하고, 72시간 동안 5% CO_2 조직배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, TPO 그리고 SCF를 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA) kit (R&D system)으로 생산량을 측정하였다.

Gene	Primer	Nucleotide sequences
TPO	sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	antisense	5'-AGCCCATGAGTTCCATTCAC-3'
c-mpl	sense	5'-TAGAAGTTTGGCAAGGCTC-3'
	antisense	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
SCF	sense	5'-TAACCCTCAACTATGTCGCC-3'
	antisense	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
c-kit	sense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAC-3'
	antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGA-3'
IL-3	sense	5'-GAAGTGGATCCTGAGGACAGATACG-3'
	antisense	5'-GACCCATGGGCCATGAGGAACATTC-3'
GM-CSF	sense	5'-TAGAAGTTTGGCAAGGCTG-3'
	antisense	5'-CGTGTACAGCTTCAGTTTCC-3'
GATA-1	sense	5'-GCTGATTCCCTTATCTATGCC-3'
	antisense	5'-GCTGATTCCCTGGCTTATGCCT-3'
EKLF	sense	5' -CCTGGAAGAAGCTCTGTTCCTCC-3'
	antisense	5' -CATTGGTCTGCAGGCTCGTC-3'
β-actin	sense	5' -TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense	5' -TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

5) Semisolid clonogenic assay

CTX(100mg/kg)를 처리한 C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 분리하였다. 골수세포(1x10^{4}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, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), 3units/ml erythropoietin(EPO, R&D system), 20ng/ml interleukin-3(IL-3, R&D system)를 혼합한 후 단삼사물탕추출물(100, 10, 1㎍/㎖)을 각각 처리하여 35-mm Petri dish(grid, Nunc)에서 14일간 배양하였다. 배양 후 colony 수는 도립현미경(inverted microscope, Nikon, Japan)로 계수하였는데, CFU-GEMM colony는 한 colony에 과립계 및 적혈구계가 포함된 경우로 정의하였고 BFU-E colony는 적색의 색소가 포함된 3개 이상의 cluster가 모인 경우로 정의하였다.

6) 통계처리

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

성 적

1. TPO, *c-mpl*, SCF, *c-kit* 유전자 발현에 미치는 영향

한약제제가 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하는 조혈 cytokine 중 TPO, *c-mpl*, SCF, *c-kit* 유전자 발현에 미치는 영향을 밝히기 위해 C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 단삼사물탕(DSSMT)추출물을 각각 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 5㎍/㎖, 1㎍/㎖의 다섯 종류의 농도로 처리해 3시간 동안 배양한 후 각각의 유전자의 발현량을 RT-PCR로 측정하였다(Table 1).

실험결과 DSSMT처리군에서 골수세포의 TPO 유전자 발현량은 대부분의 경우 대조군에 비하여 높게 나타났다. 100㎍/㎖ 농도 처리군이 4.88배로 가장 높았으며, 1㎍/㎖농도 처리군은 0.97배로 다소 낮게 나왔다.

c-mpl의 경우는 DSSMT처리군이 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔다.

SCF의 경우도 DSSMT처리군이 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔는데, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 가장 높게 나왔다.

c-kit의 경우도 DSSMT처리군이 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔으며, 1㎍/㎖농도 처리군이 2.04배로 가장 높게 나왔다.

DSSMT처리군 중 10㎍/㎖, 1㎍/㎖농도 처리군에 있어서만 TPO 유전자 발현량이 낮게 나왔고, 이를

Table 1. Effects of *DanSamSaMul-Tang* Extracts on Hematopoietic Cytokines mRNA Expression Level in Bone Marrow Cells of Mice with Leukopenia and Thrombocytopenia Induced by CTX

Group		Cytokines m-RNA expression(Ht)			
		TPO	c-mpl	SCF	c-kit
Media control		35	43	54	87
DanSamSaMul -Tang (㎍/㎖)	100	171	186	92	121
	50	130	183	114	154
	10	26	181	136	168
	5	72	176	112	172
	1	34	52	80	178

제외한 모든 처리군에서 대조군에 비해 TPO, c-mpl, SCF, c-kit 유전자 발현량이 모두 높게 나왔다.

2. IL-3, GATA-1, EKLF, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향

한약제제가 조혈모세포의 증식과 분화를 유도하는 조혈 cytokine 중 IL-3, GATA-1, EKLF, GM-CSF 유전자 발현에 미치는 영향을 밝히기 위해 CTX를 처리한 C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 DSSMT추출물을 각각 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 10㎍/㎖, 5㎍/㎖, 1㎍/㎖의 다섯 종류의 농도로 처리해 3시간 동안 배양한 후 각각의 유전자의 발현량을 RT-PCR로 측정하였다(Table 2).

실험결과 골수세포의 IL-3 유전자 발현량은 DSSMT처리군에서 모두 대조군에 비하여 높게 나타났다.

GATA-1의 경우는 DSSMT처리군이 100㎍/㎖ 농도 처리군이 0.49배로 100㎍/㎖ 농도 처리군을 제외한 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔다.

EKLF의 경우도 DSSMT처리군 중 100㎍/㎖ 농도 처리군을 제외한 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔으며, GM-CSF의 경우는 DSSMT처리군이 모든 농도에서 대조군보다 유전자 발현량이 높게 나왔다.

DSSMT처리군 중 100㎍/㎖농도 처리군에 있어서 GATA-1 및 EKLF유전자 발현량이 낮게 나왔고, 그것을 제외한 모든 처리군에서 대조군에 비해 IL-3, GATA-1, EKLF, GM-CSF 유전자 발현량이 높게 나왔다.

3. 골수세포의 조혈조절 단백질 생산에 미치는 영향

DSSMT의 골수세포의 조혈조절 단백질 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 C57BL/6 생쥐의 대퇴부에서 골수세포를 분리하여 DSSMT추출물을 각각 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖의 세 종류의 농도로 처리해 72시간 동안 CO_2조직배양기에서 배양한 후 TPO 및 SCF를 ELISA kit로 생산량을 측정하였다(Table 3).

실험결과 골수세포의 TPO생산량이 모든 농도의 DSSMT처리군에서 대조군보다 높게 나타났는데, 대조군은 102±7.4pg/ml이고, DSSMT 100㎍/㎖ 농도 처리군이 356±18.7 pg/ml($p<0.001$), 10㎍/㎖ 농도 처리군이 240±12.7pg/ml($p<0.001$), 1㎍/㎖농도 처리군은 137±11.3pg/ml($p<0.05$)로 높게 나왔다. 골수세포의 SCF 생산량도 모든 농도의 DSSMT처리군에서 대조군보다 높게 나타났는데, 대조군은 950±69.2pg/ml이고, DSSMT 100㎍/㎖ 농도 처리군이 1241±88.4pg/ml($p<0.05$), 10㎍/㎖ 농도 처리군이 1011±57.5pg/ml, 1㎍/㎖농도 처리군은 971±70.1pg/ml로 높게 나왔다.

4. Semisolid clonogenic assay

C57BL/6 생쥐에 CTX(100mg/kg)를 복강 주사하고 4일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow)를 분리하여 methylcellulose를 이용한 semisolid 배지에 EPO와

Table 2. Effects of *DanSamSaMul-Tang* Extracts on Hematopoietic Cytokines mRNA Expression Level in Bone Marrow Cells of Mice with Leukopenia and Thrombocytopenia Induced by CTX

Group		Cytokines m-RNA expression(Ht)			
		IL-3	GATA-1	EKLF	GM-CSF
Media control		39	61	75	12
DanSamSaMul -Tang (㎍/㎖)	100	101	30	51	24
	50	135	91	88	58
	10	42	95	99	30
	5	56	108	107	35
	1	41	114	93	28

Table 3. Effects of *DanSamSaMul-Tang* Extracts on Hematopoietic Cytokines Production Level in Bone Marrow Cells Culture Supernatants of Mice with Leukopenia and Thrombocytopenia Induced by CTX

Group		Cytokines Production Level (pg/ml)	
		TPO	SCF
Media control	1	102±7.4	950±69.2
DanSamSaMul -Tang (㎍/㎖)	100	356±18.7***	1241±88.4*
	10	240±12.7***	1011±57.5
	1	137±11.3*	971±70.1

The results are expressed as the mean±S.E(N=10).
Statistically significant value compared with control group data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

IL-3 만 처리한 것과 EPO, IL-3 및 DSSMT 추출물을 100㎍/㎖, 10㎍/㎖, 1㎍/㎖ 농도로 각각 처리한 것을 배양한 후 형성된 CFU-GEMM과 BFU-E의 colony 수를 관찰하였다(Table 4).

BFU-E의 경우 아무것도 처리하지 않은 골수세포의 colony 수는 0개이었고, EPO와 IL-3만 처리한 경우는 15±0.8개의 colony 형성이 관찰되었다. EPO, IL-3 및 DSSMT 추출물을 함께 처리한 경우의 colony 수는 DSSMT 100㎍/㎖ 농도 처리군이 33±2.6개($p<0.001$)로 가장 많이 관찰되었고, 10㎍/㎖ 농도 처리군은 24±1.9개($p<0.001$), 1㎍/㎖농도 처리군은 12±1.1개로 모든 농도에서 대조군 및 EPO와 IL-3 단독 처리군보다는 많은 colony수를 나타내었으나, DSSMT 1㎍/㎖ 농도 처리군에서만 EPO와 IL-3 단독 처리군보다 colony수가 적었다.

CFU-GEMM의 경우는 아무것도 처리하지 않은 골수세포의 colony 수는 15±1.4개이었고, EPO와 IL-3만 처리한 경우는 35±2.4개의 colony 형성이 관찰되었다. EPO, IL-3 및 DSSMT 추출물을 함께 처리한 경우의 colony 수는 DSSMT 100㎍/㎖ 농도 처리군이 52±4.1개($p<0.01$)였고, 10㎍/㎖ 농도 처리군이 58±3.7개($p<0.001$)로 가장 많이 관찰되었고, 1㎍/㎖농도 처리군은 43±3.5개($p<0.05$)로 모든 농도에서 대조군 및 EPO와 IL-3 단독 처리군보다 많은 colony수를 나타내었다.

Table 4. Effects of *DanSamSaMul-Tang* 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 Leukopenia and Thrombocytopenia Induced by CTX

Group		Bone Marrow Cells Colony Number	
		BFU-E	CFU-GEMM
Media control		0	15±1.4
rEPO+rIL-3		15±0.8	35±2.4
rEPO+rIL-3	100	33±2.6***	52±4.1**
+*DanSamSaMul-Tang*	10	24±1.9***	58±3.7***
(㎍/㎖)	1	12±1.1	43±3.5*

Statistically significant value compared with rEPO plus rIL-3group data by T test (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$).

고 찰

골수는 혈액에서 발견되는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 혈구 세포를 만들어 낸다. 이러한 혈구들은 혈구형성과정에서 골수에 존재하는 조혈모세포의 분화 및 증식과정을 통해 각각의 혈구세포로 성숙되며, 골수의 미세환경에서 여러 구성 세포들이 분비하는 조혈 cytokine들의 유전자 발현 조절로 특정 혈액세포의 형성이 촉진된다는 것으로 알려져 있다[4]. 이러한 조혈 cytokine들로는 IL-3, IL-6, IL-11, SCF, GM-CSF, EPO, G-CSF, M-CSF와 GATA-1, TPO 등이 있다[13].

조혈성 cytokine은 크게 세 종류의 군으로 분류한다. 첫째는 multilineage군으로 여기에는 초기 간세포(stem cell)인 colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte(CFU-GEMM)과 burst forming unit-erythroid(BFU-E)에 작용하는 GM-CSF 그리고 IL-3이다. 둘째는, unilineage군으로 후기의 조혈 조상세포(CFU-E, CFU-Meg 및 BFU-E)에 작용하는 erythropoietin(EPO), TPO, IL-5, granulocyte colony stimulating factor(G-SCF), 그리고 macrophage 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[13].

이러한 조혈 cytokine 들은 조혈과정에서 각각 특정 시기에 특정한 혈구세포 분화에 영향을 미치며, 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. 예로 들면 TPO의 기능은 거핵집락형성과 분화 및 배수성의 증가에 관여한다고 알려져 있으나, 최근 Grossmann 등[14]은 골수기능이 저하된 동물에서 TPO의 투여로 혈소판 수의 회복기간 단축과 적혈구 및 호중구세포의 회복기간 단축에도 기여한

다고 보고하였다. 이 외에도 TPO는 체내 및 체외에서 거핵구계, 적혈구계 및 골수구계의 전구세포 수를 증가시키는 원시적인 조혈세포에 작용한다는 보고들이 있다[15].

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 좀더 성숙된 조혈전구세포인 경우는 단독 cytokine에 의해 증식이 잘되며, 초기 미성숙 조혈전구세포는 한가지 cytokine보다는 두가지 이상의 cytokine에 더욱 반응한다고 보고되고 있다[16]. 그 외의 조혈 촉진 cytokine으로 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interferons-(INFs), transforming growth factor-β(TGF-β), IL-3, IL-6, IL-11 외 다른 interleukin들 역시 미성숙세포의 성장과 분화 및 성숙세포의 기능적 성장을 위해 필요하다[17].

혈소판 형성을 유도하는 TPO는 거핵세포 전구체(precursor)의 증식과 분화를 자극하여 혈소판 수를 증가시키는 기능을 갖는다. Williams와 Jackson 등[18]은 혈소판의 분화 및 증식에 관여하는 어떠한 요소가 존재함을 증명하였고, 또한 Vigon 등[19]은 TPO 수용체인 *c-mpl* ligand를 cloning하게 되었다. Bruno 등[20]은 *c-mpl* 유전자의 발현이 lineage-committed 세포주와 성숙세포들 중 다기능적 조혈모세포(CD34+/CD38-)인 megakaryocyte 계통의 세포들의 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)에서만 관찰되었다고 보고하였다. Souyri 등[21]은 TPO 단백질을 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 구분하였으며, in vitro에서 N-말단 부위는 거핵세포 형성과정(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 거핵세포 형성과정 중에서 후기단계에 주로 작용하는 것으로 알려져 있다[22].

조혈성 cytokine인 SCF는 조혈기저세포와 비만세포의 분화 및 성장인자로 c-kit 수용체에 결합하여 생물학적 기능을 갖는 것으로 보고되었다[23]. 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[24]. 비만세포에서 분비되는 cytokine들은 항체 IgE가 수용체에 결합함으로써 활성화되어 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6와 GM-CSF를 포함한 여러 종류의 면역 조절물질들의 생성을 조절한다[25].

골수에서 SCF 유전자 발현은 섬유아세포, 간세포, 내피세포, 신경세포 그리고 대식세포 등에서 나타나는 것으로 알려져 있고, 이들 발현은 혈구형성과정과 생식세포형성과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다[26]. SCF는 조혈모세포가 포함된 골수세포에 직접 작용하여 성장과 분화를 촉진하고, *in vitro*에서 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. IL-3가 G-CSF나 EPO와 함께 존재하게 되면, 각각의 호중구들이나 erythroid bursts의 형성을 증대시킨다 하였고[27], Broudy 등[28]은 IL-3가 FL 그리고 SCF와 결합하여 다

기능적 조혈모세포를 증식시키고 TPO와 결합하여 거핵세포의 형성을 촉진시킨다고 하였다.

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

GATA-1과 EKLF(erythroid kruppel-like factor)는 혈구형성과정 중 중요하게 작용하는 전사인자로 알려져 있다. GATA-1은 골수의 erythroid 세포, megakaryocytes, 그리고 비반세포등에서 높은 유전자 발현이 이루어져 interleukin-3등과 함께 초기 조혈형성과정에 중요하게 작용한다고 하였으며[29] 최근연구에서 splenomegaly, anemia, 그리고 thrombocytopenia 등의 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[30].

EKLF는 c-terminal half에 2개의 zinc finger modifs와 N-terminal에 proline-rich transactivation domain을 가지는 단백질로 발생과정동안 erythoid에 존재하여 적혈구형성과정 중 β-hemoglobin의 유전자 발현을 조절하는 중요한 유전자로 알려져 있다[31].

최근 항암화학요법의 골수 억제 작용으로 인한 혈액학적 부작용을 극복하기 위해 조혈모세포의 분화와 증식을 촉진하고, 그 기능을 증가시키는 조혈 cytokine이 개발되어 그 유효성이 입증되고 있다[32].

또한 전통적으로 조혈작용을 목표로 사용된 한약이 조혈모세포의 활성과 조혈 cytokine의 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 시작되어 김, 전[11,12]등은 실험한 한약추출물이 SCF, TPO, GM-CSF, IL-3 등 조혈 cytokine의 유전자 발현을 촉진시키고, 조혈모세포의 활성과 집락형성능력을 촉진시키는 효과가 있음을 보고 하였다.

이에 본 연구에서는 四物湯에 丹蔘을 합방한 처방을 구성하여 항암제인 CTX로 처리한 실험동물에 있어서의 조혈 cytokine 유전자 발현과 조혈모세포 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

四物湯은《太平惠民和劑局方》[33]에 최초로 수록된 방제로 처방은 當歸, 川芎, 熟地黃, 白芍藥으로 구성되어 있으며, 이후 歷代醫書에 계속 인용되어 있다. 구성약물 중 當歸는 溫無毒하고, 甘辛微苦하여 養血, 補血, 行血, 活血하는 補血養陰藥이고, 熟地黃은 溫無毒하고, 甘微苦하며 補腎壯水하는 補血養陰藥이며, 川芎은 溫無毒하고 苦辛하며 上行頭目하고 下行血海順氣行血하는 血中氣藥이며, 芍藥은 微寒無毒하고 酸苦하며 瀉肝安神 緩中去水하는 補血養陰藥이다[34]. 四物湯의 현대적 약리작용은 혈액과 심장에 작용하여 항혈전, 혈전용해작용, 뇌혈류개선 등 혈류개선 효과와 결합조직과 지질의 대사를 촉진하며, 면역기능을 높이고, 소염, 항균, 진통, 진정작용 및 항암요법의 피해를 보호하는 작용이 있음으로 알려졌고 四物湯의 이러한 효능 및 조혈기능에 관해 이미 실험하여 보고한 바 있다[8,9].

丹蔘은 脣形科에 속한 다년생초본인 丹蔘의 根으로 苦微寒無毒하고, 活血祛瘀, 凉血, 安神寧心, 排膿, 止痛하는 대표적인 活血化瘀劑이며 여러 실험연구를 통해 丹蔘에 活血化瘀 작용과 조혈기능이 있음을 보고하였다[35].

본 실험의 결과, DSSMT을 100$\mu g/ml$, 50$\mu g/ml$, 10$\mu g/ml$, 5$\mu g/ml$, 1$\mu g/ml$의 다섯 종류의 농도로 처리하여 조혈 cytokine 중 TPO, *c-mpl*, SCF, *c-kit*, IL-3, GATA-1, EKLF, GM-CSF 유전자 발현량을 RT-PCR로 측정한 결과 DSSMT처리군이 대조군에 비해 대부분의 경우 cytokine 유전자 발현량을 최고 1.5~5배(Ht값) 증가시키는 것을 관찰할 수 있었으나, 유전자 발현량과 DSSMT농도 사이에 비례관계는 성립하지 않았다 (Table 1, Table 2). TPO, *c-mpl*, IL-3, GM-CSF의 경우엔 100$\mu g/ml$, 50$\mu g/ml$농도에서 가장 높은 Ht값을 나타낸 반면, GATA-1, EKLF, SCF, *c-kit*은 10$\mu g/ml$농도 이하에서 가장 높은 Ht값을 나타내었다. 특히 TPO, *c-mpl*, IL-3을 약4~5배로 가장 많이 발현시켰는데, TPO는 거핵세포 전구체(precursor)의 증식과 분화를 자극하여 혈소판 수를 증가시키는 기능을 갖고, IL-3 유전자 발현은 조혈 과정 중 미분화된 초기 조혈모세포에서 주로 일어난다고 알려져 있어[36], 혈소판 형성 및 조혈과정 중 초기 조혈모세포에 강한 조혈증진작용이 있는 것으로 추측된다.

cytokine 유전자 발현량의 증가와 실제 cytokine 생산량과의 관련성을 확인하기 위하여 TPO 및 SCF를 ELISA kit로 생산량 측정한 결과, 모든 농도의 DSSMT처리군에서 대조군보다 cytokine 생산량이 증가하였으며, 특히 DSSMT의 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있었고, 증가된 유전자 발현량이 cytokine 생산량과 연관됨을 확인할 수 있었다(Table 3).

DSSMT을 cytokine과 함께 처리하여 투여할 경우 조혈모세포의 집락형성능을 증가시킬 수 있는가를 확인한 실험에서도 EPO와 IL-3만 처리한 군보다 DSSMT을 함께 처리한 군에서 colony수가 증가하여, DSSMT이 조혈모세포에 대한 집락형성능을 촉진하는 작용이 강한 것을 확인할 수 있었고, 그 작용이 10 *㎍/ml* 이상의 비교적 고농도에서 더 강하게 나타났으며, 특히 BFU-E의 경우엔 colony수가 농도에 비례하였다(Table 4).

최근 임상에서 조혈 cytokine들이 합성되어 함암치료에 따른 호중구감소증, 면역기능 저하 및 재생불량성 빈혈에 사용되어 좋은 성과를 얻고 있는데, 본 연구에서는 DSSMT이 조혈 cytokine의 유전자 발현과 조혈모세포 활성을 증진시키는 작용 등을 통해 항암제로 유발된 백혈구 및 혈소판생성감소증을 회복시킬 수 있음을 *in vitro* 상에서 확인하였고, 이는 임상에서 조혈질환에 다양하게 활용할 수 있는 기본자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

단삼사물탕이 조혈작용에 미치는 영향을 연구하기 위해 CTX로 처리한 생쥐를 대상으로 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 단삼사물탕은 조혈 cytokine 중 TPO, c-mpl, SCF, c-kit, IL-3, GATA-1, EKLF, GM-CSF의 유전자 발현량을 대조군에 비해 증가시켰다.

2. 단삼사물탕은 TPO 및 SCF 생산량을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.

3. 단삼사물탕은 CFU-GEMM 및 BFU-E colony 수를 대조군에 비해 유의하게 증식시켰다.

이상에서 단삼사물탕은 조혈 cytokine유전자 발현을 증가시키고 조혈모세포의 활성을 증가시켜 임상에서 조혈 촉진의 목적으로 다양하게 활용할 수 있으며, 그것이 작용하는 약리 기전을 밝혀 한약의 조혈작용의 기초연구를 위한 기본자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells:biology and potential clinical uses. Exp. Hematol. 2000;28(8):875-884.
2. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. Exp. Hematol. 1984;12(7):517-521.
3. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. J. Cell. Physiol. 1997;91:335-344.
4. 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.
5. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34$^+$ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1β(IL-1β), IL-6, IL-3, interferon-γ, and erythropoietin. Blood. 1993;81(10) : 2579-2584.
6. Huang K.C. Chinese Herbs. USA: CRC Press. 1993:81,84,247.
7. 김선민. 左歸飮加味方이 재생불량성빈혈에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 1997.
8. 안희덕. 사물탕의 항암제 부작용에 관한 실험적 연구. 서울:경희대학교 대학원. 1995.
9. 김상우. 사물탕 구성약물이 빈혈 및 기아에 미치는

영향. 서울:경희대학교 대학원. 1998.

10. 윤홍노. 수종항암제와 한약병용효과에 관한 실험적 연구. 서울:경희대학교 대학원. 1998.
11. 김승형, 임종순. Effects of Korean traditional medicine on Murine Hematopoioesis. Korean J. Immunol. 1999;21(2):165-174.
12. 전재현. 수종의 한약제제가 조혈작용에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 2001.
13. Gabbianeli 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Nicola NA. Guidebook to cytokines and their receptors. Cary NC: Oxford University Press. 1994:38.
18. 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.
19. 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. Acd. Sci. USA. 1992;89(12):5640-5644.
20. Bruno E, Miller ME, Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. Blood. 1989;73(3):671-677.
21. 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.
22. 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.
23. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety. Blood. 1993;82(12):3515-3523.
24. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. Annu. Rev. Immunol. 1989;7:59-76.
25. 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.
26. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. Blood. 1997;90(4):1345-1364.
27. 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.
28. 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.

29. Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. EKLF, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. Mol Cell Biol. 1999;19(5):3571-3579.
30. Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. Nature. 1998 Dec 10;396(6711):594-598.
31. Anderson KP, Crable SC, Lingrel JB. The GATA-E box-GATA motif in the EKLF promoter is required for in vivo expression. Blood. 2000 Mar 1;95(5):1652-1655.
32. 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.
33. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旅風出版社. 1975:242.
34. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981:101,103,106, 108,109,123,221,407.
35. 지형준, 이상인. 대한약전외 한약(생약)규격집 주해서. 서울: 한국메디칼인덱스사. 1989:109-110.
36. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive($CD34^+CD38^-$) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. J. Exp. Med. 1996;183(6): 2551-2558.