

Cyclophosphamide로 유도된 빈혈 흰쥐에서 참당귀 열수추출물이 혈액학적 빈혈지표에 미치는 영향*

한진아¹⁾ · 장기효¹⁾ · 강순아^{1)§} · 조여원^{2)§}

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과,¹⁾ 임상영양연구소²⁾

Hematological Effect of Water Extracts of Cham-Dang-Gui on Cyclophosphamide Induced Anemic Rat*

Han, Jin A¹⁾ · Jang, Ki-Hyo¹⁾ · Kang, Soon Ah^{1)§} · Choue, Ryowon^{2)§}

Department of Medical Nutrition,¹⁾ Graduate School of East-West Medical Science,
Research Institute of Clinical Nutrition,²⁾ Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Anemia, the condition of the diminished concentration of hemoglobin per erythrocyte is common in patients with cancer and is a frequent complication of myelosuppressive chemotherapy. Cham-Dang-Gui (*Angelicae Gigantis Radix*) has been used in traditional Korean medicine to treat hematologic deficiencies. In this study, Cyclophosphamide (CYP), an alkylating agent that has a broad spectrum of anti-cancer activities, was intraperitoneally injected into the experimental animals to suppress the bone marrow thereafter, causing anemia. The hemopoietic effects of Cham-Dang-Gui were examined using anemic rat model. Rats were divided into five groups: CON (control group), ANS (CYP-injected + normal diet), AND (CYP-injected + normal diet + Cham-Dang-Gui), ALS (CYP-injected + low iron diet), and ALD (CYP-injected + low iron diet + Cham-Dang-Gui) groups. CYP (30 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats for 3 days to induce anemic condition. Saline or Cham-Dang-Gui was administrated orally during the entire experimental period. CYP injection decreased body weight gain and food consumption in comparison with CON group. Oral administration of Cham-Dang-Gui extract with normal iron diet significantly prevented the lower body weight gain. The blood level of hemoglobin, iron status (serum iron, transferrin, ferritin and TIBC) and blood level of vitamin B-12 in Cham-Dang-Gui treated groups were significantly higher than those of Cham-Dang-Gui untreated groups regardless of amount of iron in the diet. Taken together, it could be concluded that the Cham-Dang-Gui extract could improve anemic condition induced by CYP injection by improving hematological value, iron status and vitamin B12 status in rats. (*Korean J Nutrition* 36(10): 1013~1021, 2003)

KEY WORDS : cyclophosphamide, anemia, Cham-Dang-Gui, hematological effect.

서론

빈혈은 적혈구 수와 용적, 헤모글로빈의 농도가 정상수준 이하로 감소되었을 때를 말하며, 이로 인하여 신체 발육 부진, 활동능력 감소, 면역기능의 저하 등 생리적 현상을 나타낸다. 빈혈은 형태학적으로 혈구의 크기 및 혈색소의 농도에 따라 구분하고,¹⁻³⁾ 원인적으로는 발생원인에 따라 출혈성, 용혈성, 철분 및 비타민 B₁₂의 결핍에 의한 혈액 생산

부족, 다른 질환에 의한 적혈구 생산 부족, 선천성, 악물치료에 의한 재생불량성 빈혈 등으로 구분한다.⁴⁾ 특히 항암치료의 부작용으로 골수 장애가 발생하여 유발되는 재생불량성 빈혈은 조혈세포의 감소와 체내 erythropoietin의 생성저하로 인해 헤모글로빈 저하와 빈혈의 임상적 증상을 나타낸다.

동물모델에서 빈혈을 유도할 수 있는 방법은 저철분식이, 비타민 B-12 및 엽산의 결핍과 같은 식이성 요인에 의하여 유도할 수 있으나 이는 빈혈 유도기간이 장기간 소요되므로 일반적으로 항암제로 사용되는 Cyclophosphamide (CYP)를 이용하여 빈혈을 유도하고 있다.⁵⁻⁷⁾ CYP는 골수 부전을 일으켜서 혈소판이 감소하는 증세를 유발하여 빈혈 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} CYP를 투여한

접수일 : 2003년 10월 23일

채택일 : 2003년 12월 22일

*This work was supported by the Brain Korea 21 project in 2001.

§To whom correspondence should be addressed.

흰쥐는 투여 후 3일 경과부터 체중이 급격히 감소하여 10일 이후에는 9.4%정도 감소하고 헤모글로빈농도도 16 g/dl에서 8 g/dl까지 계속 저하하는 것으로 보고된 바 있다.⁷⁾

일반적으로 빈혈의 치료는 수혈 또는 합성된 recombinant human erythropoietin (rHuEPO)이 사용되고 있으나¹⁰⁻¹²⁾ 약물의 투여로 혈구증가 및 증세 호전의 효과는 기대할 수 있으나, 그 효과가 일시적이어서 근본적인 질환의 호전은 기대할 수 없다.^{13,14)} 한편 한방에서는 동의보감을 비롯한 한 의학서와 보고들에서 혈액질환에 대한 생약제의 효과에 대하여 서술되어 있으며, 숙지황, 백작약 등의 생약제의 조혈 촉진 효과를 보고하였고,¹⁵⁾ 전통적으로 중국에서 사용해오던 인삼영양탕 (人蔘養營湯, ren-shen-yang-rong-tang, 인삼, 당귀, 백출, 백봉통, 감초, 백작약, 숙지황, 황기, 육계, 오미자, 원지, 진피)도 조혈효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 우리나라의 십전대보탕 (十全大補湯, juseun-taiho-toh)은 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황, 인삼, 백복령, 백출, 감초, 육계, 황기가 포함되어 있으며, 일반인들이 즐겨 마실 뿐만 아니라 빈혈을 치료하기 위하여 처방되고 있으며, 조혈 촉진 작용을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다.^{16,17)} 또한 중국당귀 (*Angelica sinensis* DIELS)와 백작약을 환자에게 차로 끓여 마시도록 했을 때 환자의 헤모글로빈의 수치가 향상되었다고 보고하였다. 이에 많은 연구들이 자연계에 존재하는 천연물질을 사용한 생약 및 식품에 관심을 가지게 되었다.^{18,19)}

참당귀 (*Angelica Gigas* Nakai)는 한의학 임상에서 가장 많이 처방하고 있는 생약재로서 보혈강장, 진통작용을 목적으로 부인과 질환 (냉증, 빈혈, 혈행장애)에 쓰이며, 주로 혈허부족 (血虛不足), 행혈 (行血), 활혈 (活血), 산전산후 (産前産後), 두통 (頭痛) 등에 이용되고 있다. 또한 복합처방인 사물탕 (四物湯: 당귀 (當歸), 숙지황 (熟地黃), 백작약 (白芍藥), 천궁 (川芎))의 군약 (君藥)으로 조혈 (造血) 및 혈류개선 (血流改善) 등에 사용되고 있다.²⁰⁾ 최근 참당귀에서 혈관신생작용과 혈관이완효과에 대한 연구가 보고되어 관심을 끌고 있다.²¹⁾

이에, 본 연구에서는 CYP를 흰쥐에게 투여하여 빈혈을 유발시킨 후 참당귀 열수추출물 투여에 의하여 혈액학적 빈혈지표와 erythropoietin 발현에 미치는 영향을 알아봄으로써 참당귀의 효능을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료구입 및 추출방법

참당귀 (*Angelica Gigas* Nakai)는 강원도 평창군 진부면

산을 강원 약초 영농조합법인 생산약초공장에서 구입하였다. 참당귀 약재를 절편하여 100 g을 round flask에 넣고 증류수를 20배를 가한 후 2시간 동안 진탕기로 열수 추출하여 감압여과 하고 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)를 사용하여 감압 농축한 후, 농축액을 동결건조 하였다. 열수추출 후 수득율은 28~32%였다.

2. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 샘타코에서 구입하여, 1주 동안 일반 고형사료 (삼양배합사료)와 물을 충분히 공급하면서 이상적인 항온항습 환경 (온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 5%)으로 유지하고 12시간씩 밤과 낮을 자동 조절하여 적응시켰다. 실험군의 빈혈유발은 cyclophosphamide (알카록산 500 mg, 중외제약)를 30 mg/kg BW/day로 3회 복강 투여하였다. 빈혈유발군은 정상식이군 (Ferric Citrate, 6 g/kg BW)와 철분결핍 식이군 (Ferric Citrate, 2 g/kg BW)으로 분류하여 식이를 제공하였으며 (Table 1), 참당귀 열수추출물을 1 g/kg BW/day로 14일 동안 경구 투여하였다. 실험시작 14일 후에 희생하여 혈액을 채취하고, 조직을 분리하여 -70°C 냉동 보관하였다.

실험동물은 대조군 (control group, CON), 빈혈유발-정상식이-식염수군 (anemia-normal diet-salin group,

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredient	Normal diet ¹⁾	Low iron diet
Casein	200	200
DL-methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	500
Cellulose	50	50
Corn oil	50	50
Salt mixture	35 ²⁾	35 ³⁾
Vitamin mixture	10	10
Choline biftartrate	2	2

1) Diet: AIN-76A diet # 100000 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)

2) Control mineral mix composition: AIN-76A mineral mix # 200000 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA): iron 6 g/kg, Calcium Phosphate Dibasic 500 g/kg, Sodium Chloride 74 g/kg, Potassium Citrate H₂O 220 g/kg, Potassium Sulfate 52 g/kg, Magnesium Oxide 24 g/kg, Manganous Carbonate 3.5 g/kg, Ferric Citrate U.S.P. 6 g/kg, Zinc Carbonate 1.6 g/kg, Cupric Carbonate 0.3 g/kg, Potassium Iodate 0.01 g/kg, Sodium Selenite 0.01 g/kg, Chromium Potassium 0.55 g/kg, Sulfate 12H₂O Sucrose 118.03 g/kg

3) Low iron mineral mix: modified of AIN-76 mineral mix # 215001 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA): iron 2 g/kg, Calcium Phosphate Dibasic 500 g/kg, Sodium Chloride 74 g/kg, Potassium Citrate H₂O 220 g/kg, Potassium Sulfate 52 g/kg, Magnesium Oxide 24 g/kg, Manganous Carbonate 3.5 g/kg, Ferric Citrate U.S.P. 2 g/kg, Zinc Carbonate 1.6 g/kg, Cupric Carbonate 0.3 g/kg, Potassium Iodate 0.01 g/kg, Sodium Selenite 0.01 g/kg, Chromium Potassium 0.55 g/kg, Sulfate 12H₂O Sucrose 118.03 g/kg

ANS), 빈혈유발-정상식이-참당귀 추출물 투여군 (anemia-normal diet-참당귀 열수추출물 group, AND), 빈혈유발-저철분식이-식염수군 (anemia-low iron diet-saline group, ALS), 빈혈유발-저철분식이-참당귀 추출물 투여군 (anemia-low iron diet-참당귀 열수추출물 group, ALD) 으로 각각 8마리씩 무작위 분류법에 의하여 분류하였다.

3. 식이효율

모든 실험 동물의 식이와 물의 공급은 자유 섭취방법으로 하였다. 실험 기간 동안 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 2일 간격으로 측정하였다. 식이 효율 (food efficiency ratio, FER)은 실험 시작일부터 희생일까지를 총 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다. [FER = weight gain/food intake]

4. 혈액채취 및 분석

1) 혈액 채취

실험동물을 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취하여 복부 대동맥에서 채혈하고 EDTA를 처리한 혈액과 EDTA 비치러 혈액을 분리하여 채취하였다. EDTA 처리 혈액은 micro-hematocrit법으로 적혈구 용적률을 측정하였다. EDTA 비치러 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 분석 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다가 혈청 철분 농도 및 혈청 총 철분 결합능 (total iron binding capacity, TIBC) 등을 측정하는데 사용하였다.

2) 혈액 분석

EDTA tube에 담은 전혈 (whole blood)은 적혈구 (red blood cell, RBC) 수, 혈색소 (hemoglobin, Hgb), 적혈구 용적 (hematocrit, Hct), 평균적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 적혈구 분포계수 (red cell distribution width, RDW) 등을 automatic blood cell counter (Sysmex NE 8000, Toa Medical Electronics Co., Japan)를 사용하여 측정하였다.²²⁾

혈청 철분농도는 Nitro-PSAP 법에 의하여 SCIDIA Fe-760 reagent (영연화학, Korea)를 이용하여 측정하였고, TIBC는 TIBC (RM 176-K) kit를 이용하여 자동생화학분석기 (Hitachi 7150, Hitachi Co., JAPAN)로 측정하였다. 혈청 ferritin농도는 chemiluminescence immuno assay (CLIA)²³⁾를 이용하여 ADVIA centaur (Bayer corporation, USA)로 측정하였다. Transferrin 포화도 (TS)는 Nephelometer (Behring Nephelometer, Behring,

West Germany)로 측정하였으며, 비타민 B₁₂는 Vitamin B-12 시약 (Bayer Corporation, USA)을 이용하여 ADVIA centaur (Bayer Corporation, USA)로 측정하였다.

5. Erythropoietin m-RNA 발현측정

1) Reverse transcriptase (RT)

실험 동물에서 분리한 신장조직에서 Trizol reagent (Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 분리된 총 RNA로부터 cDNA 합성을 위해 total RNA 3 μ l를 70°C에서 10분간 가열 한 후, 4°C에서 10분 동안 방치하고 여기에 1 μ l oligo (dT)₁₅ primer (0.5 μ g/ μ l), 1 μ l M-MLV RT (10 unit/ μ l; promega, USA), 1 μ l RNase inhibitor (20~40 unit/ μ l; promega, USA), 10 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM mgCl₂), 5 μ l 2.5 mMol/L dNTPs mixture를 첨가한 후, DEPC (diethyl pyrocarbonate) 증류수를 혼합하여 넣고 42°C water bath에서 1시간 동안 가열하여 cDNA를 합성하였다.

2) Polymerase chain reaction (PCR)

PCR은 3 μ l cDNA, primer는 EPO, GAPDH를 사용하였고, sense primer (10 pmole/ μ l), antisense primer (10 pmole/ μ l)을 각각 1 μ l를 가하고, 다시 1 μ l 2.5 mMol/L dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM mgCl₂), 6 μ l 5 \times Qual-upTM 용액 및 0.3 μ l Tag polymerase (5 unit/ μ l; Nerurotics Inc)를 첨가한 다음 최종 volume이 30 μ l가 되도록 증류수를 첨가하고, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 62°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분 동안 35 cycle로 진행하였다.

실험에 사용한 rat EPO와 GAPDH primer는 rat EPO sense, 5'-CGC TCC CCC ACG CCT CAT T-3'; antisense, 5'-TCC CCC GTG TAC AGC TTC AGT TTC-3'; GAPDH sense, 5'-GAT ATC ATC TCC GCC CCT TC-3'; antisense, 5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CA-3'. EPO와 GAPDH의 DNA fragment size는 477 bp, 189 bp이었다. PCR 생성물은 2.0% agarose gel에서 전기영동을 하였고, gel은 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 PCR 생성물의 양을 imaging densitometer (model GS-700, BIO-RAD, USA)를 사용하여 측정하였다.

6. 통계분석

모든 실험결과는 Statistic Analysis System (SAS, Ver

8.0) program을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균 (mean) \pm 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 평균간의 유의성은 general linear model (GLM)의 Duncan's multiple range test에 의해 비교하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 참당귀 추출물에 의한 효과와 식이에 의한 효과는 students' t-test를 이용하여 검증하였으며, CYP 투여에 의한 효과는 one-way ANOVA를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중, 식이 섭취량 및 식이효율

실험 후 최종체중과 체중 증가량은 CYP를 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 저철분식이군과는 달리 정상철분식이군에서는 참당귀 추출물을 투여한 AND군에서 참당귀 추출물을 투여하지 않은 ANS군에 비해 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$) (Table 2).

식이 섭취량은 CYP를 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 정상철분식이를 섭취한 군과 저철분식이를 섭취한 군 중 참당귀 추출물을 섭취하지 않은 ALS군에서 식이 섭취량이 유의적으로 낮았다. 식이효율은 정상철분식이군 중 참당귀 추출물을 섭취한 AND군에서 가장 높았다 ($p < 0.05$).

CYP 투여 후 정상철분식이를 섭취한 군에서 참당귀 추출물을 투여한 AND군이 추출물을 투여하지 않은 ANS군에 비해 식이섭취량의 차이가 없었음에도 불구하고 식이효율이 높았다는 것은 식이섭취량이 체중증가에 미치는 영향보다 참당귀 추출물의 투여로 체중감소 효과가 적게 나타난 결과라고 사료된다. 또한 CYP 투여 후 저철분식이와 참당귀 추출물을 섭취한 ALD군에서 식이섭취량은 CYP를 투여한 다른 군에 비해 유의적으로 높았으나 식이효율은 낮

게 나타나 저철분식이군에서는 CYP 투여에 의해 감소된 체중의 회복에는 참당귀 추출물의 투여가 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다.

화학요법으로 인한 체중감소는 식욕부진과 함께 영양상태도 악화시키는 것으로 보고되고 있어²⁴⁾ 체중감소 완화에 대한 중요성이 강조되고 있다. 이에, CYP를 투여한 후 참당귀 추출물을 투여한 군에서 참당귀 추출물을 투여하지 않은 군에서보다 체중감소가 적게 나타난 본 연구결과는 참당귀 추출물의 복용이 화학요법으로 인한 체중감소를 완화시킬 수 있는 의미있는 결과라고 볼 수 있다. 그러나 CYP를 투여한 후 저철분식이를 섭취한 군에서 참당귀 추출물의 투여가 체중증가에 영향을 미치지 못함은 철분결핍이 빈혈 이외에도 발육부진을 유발할 수 있다는 보고²⁵⁾와 유사하게 CYP 투여로 체중감소가 일어난 상태에서 저철분식이 섭취로 인해 발육부진이 심해졌기 때문에 참당귀 추출물이 체중증가에 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다.

2. 혈액학적 분석

혈액분석 결과 적혈구 수는 대조군에서 $6.7 \pm 0.3 (\times 10^6 \text{ mm}^3)$ 이었고, CYP 투여 후 정상철분식이와 저철분식이를 섭취한 군인 ANS군과 ALS군은 각각 5.8 ± 0.4 와 $6.1 \pm 0.3 (\times 10^6 \text{ mm}^3)$ 으로 대조군에 비해 유의적으로 낮았으나 ($p < 0.05$) 참당귀 추출물의 투여에 의하여 감소된 수치가 유의하게 증가하지 못하였다 (Table 3).

헤모글로빈 농도는 참당귀 추출물 투여군 (AND: $13.6 \pm 1.7 \text{ g/dl}$, ALD: $13.1 \pm 0.5 \text{ g/dl}$)은 추출물을 투여하지 않은 군 (ANS군: $11.8 \pm 0.9 \text{ g/dl}$, ALS군: $11.6 \pm 1.0 \text{ g/dl}$)보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 또한 헤마토크릿 수치는 저철분식이와 참당귀 추출물을 섭취한 ALD군에서 $45.4 \pm 3.7\%$ 로 추출물을 섭취하지 않은 ALS ($38.9 \pm 3.6\%$)군보다 유의적으로 높았다. 이는 참당귀의 공급이 저철분식이에 의한 빈혈수치 감소를 억제시키는 요인이라고

Table 2. Weight gain, food intake and food efficiency ratio of experimental animals

	CON ¹⁾	ANS	AND	ALS	ALD	p value		
						CYP ³⁾	DIET ⁴⁾	Dang Gui ⁵⁾
Final weight (g)	206.8 \pm 20.5 ^a	170.0 \pm 12.2 ^c	188.0 \pm 10.8 ^b	175.3 \pm 6.3 ^{bc}	174.0 \pm 15.0 ^{bc}	0.0002	NS	NS
Weight gain (g/day)	6.1 \pm 0.9 ^{ab}	2.8 \pm 0.6 ^c	4.1 \pm 0.5 ^b	3.4 \pm 0.4 ^{bc}	3.6 \pm 0.7 ^{bc}	0.00001	NS	0.01
Food Intake (g/day)	21.2 \pm 0.5 ^a	9.3 \pm 0.07 ^c	9.2 \pm 0.75 ^c	9.0 \pm 0.77 ^c	11.3 \pm 0.21 ^b	0.00001	0.05	0.006
FER	0.31 \pm 0.05 ^{bc}	0.31 \pm 0.11 ^{bc}	0.44 \pm 0.05 ^a	0.38 \pm 0.05 ^{ab}	0.32 \pm 0.06 ^{bc}	NS	NS	NS

1) CON: control group, ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.), AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW), ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet, ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet

2) Values are Mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Duncan's Multiple Range test. Values within the same row with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ levels

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. (CON group versus CYP-injected groups)

4) Normal iron diet versus low iron diet by Student's t-test

5) Saline treated groups versus Cham-Dang-Gui treated groups by Student's t-test

Table 3. Hematological effect of water extracts of Cham-Dang-Gui in CYP-induced anemic rat

Variables	CON ¹⁾	ANS	AND	ALS	ALD	p value		
						CYP	DIET	Dang Gui
RBC ($\times 10^6$ mm ³) ²⁾	6.7 \pm 0.3 ^{ab}	5.8 \pm 0.4 ^b	6.4 \pm 0.8 ^{ab}	6.1 \pm 0.3 ^b	6.2 \pm 0.2 ^{ab}	0.001 ⁴⁾	NS ⁵⁾	NS ⁶⁾
Hgb (g/dl)	14.1 \pm 0.5 ^a	11.8 \pm 0.9 ^b	13.6 \pm 1.7 ^a	11.6 \pm 1.0 ^b	13.1 \pm 0.5 ^a	0.00004	NS	0.0005
Hct (%)	45.8 \pm 2.5 ^a	41.5 \pm 2.4 ^{bc}	43.0 \pm 2.2 ^{ab}	38.9 \pm 3.6 ^c	45.4 \pm 3.7 ^a	0.003	NS	0.002
MCH (pg)	21.9 \pm 0.6 ^a	20.8 \pm 1.9 ^a	21.0 \pm 0.9 ^a	19.0 \pm 2.0 ^b	21.4 \pm 1.1 ^a	NS	NS	0.04
MCV (fl)	68.1 \pm 2.2 ^{ab}	71.1 \pm 1.9 ^a	71.2 \pm 2.1 ^a	63.2 \pm 7.0 ^b	72.9 \pm 4.1 ^a	NS	NS	0.03
MCHC (g/dl)	31.8 \pm 0.7	29.1 \pm 2.2	29.9 \pm 0.2	30.1 \pm 4.0	29.6 \pm 1.8	NS	NS	NS
RDW	13.6 \pm 0.5 ^b	17.7 \pm 1.5 ^a	17.7 \pm 0.9 ^a	17.2 \pm 0.6 ^a	17.2 \pm 1.0 ^a	0.0001	0.05	NS

1) CON: control group, ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.), AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW), ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet, ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet

2) RBC: red blood cell, Hgb: hemoglobin, Hct: hematocrit, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width

3) Values are Mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Duncan's Multiple Range test. Values within the same row with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ levels

4) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (CON group versus CYP-injected groups)

5) Normal iron diet versus low iron diet by Student's t-test.

6) Saline treated groups versus Cham-Dang-Gui treated groups by Student's t-test

볼 수 있다.

평균 혈구혈색소 (MCH)는 군간에 유의적인 차이가 없었으나 CYP를 투여한 후 저철분식이 섭취와 참당귀 추출물을 투여한 ALD군에서 21.4 \pm 1.1 (fl)로 저철분식이만을 섭취한 ALS군 (19.0 \pm 2.0 fl)에 비해 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 철결핍성빈혈에 있어서 매우 민감한 지표로 인식되는 적혈구 세포크기의 분포도 (RDW)는 평균 혈구 부피 (MCV)나 혈청 철분이 감소하기 전에 증가하는 수치인데,²⁵⁾ 본 연구에서는 CYP를 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 유의적으로 높았으나 참당귀 추출물 투여에 의해서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. CYP를 투여한 저철분식이군에서 참당귀 추출물의 투여는 MCV (ALS: 63.2 \pm 7.0 pg, ALD: 72.9 \pm 4.1 pg)와 MCH (ALS: 19.0 \pm 2.0 pg, ALD: 21.4 \pm 1.1 pg)를 유의적으로 향상시켰다 ($p < 0.05$). 이것은 약물치료 환자 중 빈혈인 경우, 혈청 철분농도가 감소하게 되는데, 이 때 철분섭취가 부족하게 되면 혈청의 철분상태는 더욱 나빠질 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 화학요법 치료 시 독성이 강한 치료를 받은 환자들의 MCV 수치가 증가한다는^{26,27)} 연구도 있다.

3. 혈청 철분영양상태 및 비타민 B₁₂ 분석

혈청 철분농도는 대조군에서 145.4 \pm 7.2 μ g/dl이었고 CYP를 투여한 후 정상철분식이와 저철분식을 섭취한 ANS군, ALS군은 각각 106.3 \pm 14.3와 92.3 \pm 10.3 μ g/dl, 참당귀 추출물을 투여한 AND군과 ALD군에서는 각각 143.0 \pm 19.5, 125.6 \pm 7.7 μ g/dl로 나타났다. CYP 투여는 혈청 철분농도를 유의성 있게 감소시켰고, 철분식에 의한

차이는 관찰되지 않았으며, 참당귀 추출물 투여는 혈청 철분농도를 유의성 있게 증가시켰다 (Table 4). 저철분식은 CYP로 유도된 빈혈지표의 저하 정도를 더욱 크게 유도하였고, CYP를 투여한 군에서 혈청 철분농도가 낮은 것은 암이나 만성질환으로 인한 빈혈에서 혈청 철분이 감소한다는 연구결과^{28,29)}와 같은 양상을 보였다.

총철결합능력은 트랜스페린에 있는 free iron binding site의 수와 관련된 것으로 철분 결핍 시 빠르게 증가하는데, CYP를 투여한 군들은 대조군에 비해 차이가 없었으나, 정상철분식이군에서 참당귀 추출물을 투여한 AND군은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 ($p < 0.05$) 결과는 철분 지표의 개선 효과를 가져왔다고 볼 수 있다.

혈액 내 트랜스페린의 수치는 CYP를 투여한 정상철분식이군과 저철분식이군인 ANS군 (11.1 \pm 1.3 mg/dl)과 ALS군 (10.8 \pm 0.7 mg/dl)에서 대조군 (8.0 \pm 0.4 mg/dl)에 비해 유의적으로 높았으며, 참당귀 추출물을 투여한 AND군 (9.6 \pm 1.0 mg/dl)과 ALD군 (9.7 \pm 0.6 mg/dl)에서는 추출물을 투여하지 않은 군에 비하여 유의적으로 낮은 수준 ($p < 0.05$)을 나타냈으나 대조군에 비하여는 유의적으로 높았다. 이것은 CYP 투여로 인해 헤모글로빈의 농도가 감소하고 혈청 철분함량이 부족하여 체내에 저장된 철분이 혈액으로 이동하기 때문에 증가된 것으로 사료된다.

화학요법의 부작용으로 빈혈증세를 나타내는 빈혈 환자에게 빈혈치료를 통해 헤모글로빈 농도를 증가시키면 환자의 에너지 수준과 활동성 및 삶의 질이 개선되는 것으로 보고하고 있어³⁰⁾ 본 연구에서 참당귀 추출물 투여로 인해 혈액수치가 향상된 결과는 빈혈이 유발된 환자의 빈혈치료에

Table 4. Serum iron, TIBC, transferrin, ferritin, Vit. B₁₂ levels after treatment of Cham-Dang-Gui extracts in CYP-induced anemia rat

Variables	CON ¹⁾	ANS	AND	ALS	ALD	p value		
						CYP	DIET	Dang Gui
Iron (μ g/dl)	145.4 \pm 7.2 ^a	106.3 \pm 14.3 ^c	143.0 \pm 19.5 ^a	92.3 \pm 10.3 ^c	125.6 \pm 7.7 ^b	0.0001 ³⁾	NS ⁴⁾	0.00001 ⁵⁾
TIBC ⁶⁾ (μ g/dl)	587.6 \pm 29.0 ^a	593.1 \pm 40.2 ^a	549.4 \pm 20.4 ^b	611.7 \pm 27.7 ^a	590.4 \pm 39.8 ^a	NS	0.05	0.03
Transferrin (mg/dl)	8.0 \pm 0.4 ^c	11.1 \pm 1.3 ^a	9.6 \pm 1.0 ^b	10.8 \pm 0.7 ^a	9.7 \pm 0.6 ^b	0.0001	NS	0.0004
Ferritin (ng/ml)	202.0 \pm 19.4 ^a	108.8 \pm 10.1 ^c	133.2 \pm 14.6 ^b	87.3 \pm 8.9 ^d	106.3 \pm 13.3 ^c	0.0001	0.0006	0.002
Vit. B ₁₂ (pg/ml)	1299.5 \pm 62.9 ^a	842.6 \pm 48.0 ^d	1025.9 \pm 51.7 ^b	915.0 \pm 61.0 ^c	1000.0 \pm 26.1 ^b	0.0001	NS	0.00001

1) CON: normal group, ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.), AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW), ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet, ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet.

2) Values are Mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using Duncan's Multiple Range test. abc: Values within the same row with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ levels.

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (CON group versus CYP-injected groups),

4) Normal diet versus low iron diet by Student's t-test.

5) Saline treated groups versus Cham-Dang-Gui treated groups by Student's t-test

6) TIBC: Total iron binding capacity

긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

혈청 페리틴 농도는 CYP를 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았으나 참당귀 추출물을 투여한 AND군과 ALD군은 133.2 ± 14.6 와 106.3 ± 13.3 ng/ml로 추출물을 투여하지 않은 ANS (108.8 ± 10.1 ng/ml)군과 ALS (87.3 ± 8.9 ng/ml)군에 비해 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 혈청 페리틴은 보통 철 저장량을 판단하는 지표로 사용되며, 철분결핍이 심한 경우에 감소하는데³¹⁾ 본 연구에서도 CYP 투여로 빈혈이 유도된 후 저철분식이에 의하여 혈청 페리틴 농도가 유의적으로 감소함을 보였으며, 참당귀 추출물은 저철분식이에 의한 감소를 완화시켰다. 이상과 같이 참당귀 추출물에 의하여 혈중 철분농도, 페리틴의 수치가 유의적으로 높아짐으로서 참당귀 추출물이 철분의 영양상태 개선에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 사료된다.

혈청 비타민 B₁₂ 농도는 CYP를 투여한 후 정상철분식이와 저철분식이를 섭취한 ANS군과 ALS군에서는 842.6 ± 48.0 , 915.0 ± 61.0 pg/ml로 대조군 (1299.5 ± 62.9 pg/ml)에 비해 유의적으로 낮았으며 ($p < 0.05$), 참당귀 추출물을 투여한 AND군과 ALD군은 각각 1025.9 ± 51.7 , 1000.0 ± 26.1 pg/ml로 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$) (Table 4).

비타민 B₁₂는 엽산의 대사에 조효소 활성화에 관여하며, 정상적인 혈액생산과 신경작용에 필수적인 영양소로 결핍 시에는 악성빈혈을 유발한다. 비타민 B₁₂가 부족하면 엽산부족증과 마찬가지로 DNA합성이 정상적으로 이루어지지 않아 거대적아구성 빈혈이 발생되며,^{32,33)} 비타민 B₁₂가 부족한 환자에게 비타민 B₁₂를 투여해도 혈액학적 증세는 정상으로 복구되지만 결핍기간이 장기인 경우는 신경장애는 완전히 회복하지 못할 수도 있어 중요한 영양소로 알려져 있다.³⁴⁾

본 연구결과에서 CYP를 투여한 후 혈청 비타민 B₁₂ 농도는 대조군에 비해 유의적으로 낮았고, 참당귀 추출물을 투여하였을 경우, 비타민 B₁₂가 유의적으로 높았다. 이는 참당귀가 비타민 B₁₂를 증가시킨다는 보고와 일치하고 있고³⁵⁾ 비타민 B₁₂가 부족한 빈혈환자에서도 정상적인 혈액 생산 작용에 도움을 줄 것으로 여겨진다.

4. Erythropoietin mRNA 발현

EPO 발현을 측정된 결과를 Fig. 1과 Table 5에 나타내었다. 대조군에서의 EPO 유전자 발현은 $74.6 \pm 3.3\%$ 이었고, CYP를 투여한 후 정상철분식이와 저철분식이를 섭취한 ANS군, ALS군은 각각 86.9 ± 6.5 , $133.9 \pm 9.0\%$, 참당귀 추출물을 투여한 AND군과 ALD군에서는 각각 99.9 ± 7.8 , $139.6 \pm 6.4\%$ 로 나타났다. CYP 투여는 EPO 발현을 유의성 있게 증가시켰고 저철분식이 또한 유의성 있게 증가시켰으나, 참당귀 추출물 투여에 의한 EPO 발현의 차이는 관찰되지 않았다.

혈구의 형성과정은 세포와 세포간의 직접 접촉이나 여러 가지 성장인자에 의해 조절되며,³⁶⁾ 조혈성장인자에는 stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), erythropoietin (EPO) 등이 있다. 이 인자들은 골수세포에 작용하여 특정형질의 혈구세포의 분화와 성장을 상승시키는 효과를 가지고 있다.³⁷⁻³⁹⁾ 조혈성장인자 중 EPO는 골수에서 조혈세포의 증식을 촉진시키는 호르몬으로 재생불량성 빈혈의 경우, 다른 빈혈에 비해 혈청 EPO 수치가 더욱 증가하지만,⁴⁰⁻⁴²⁾ 정확한 조절기전이 알려져 있지 않고 단지, 세포내에서 반응하는 산소의 농도에 의해 조절된다는 기전이 제안되고 있다.⁴³⁾ EPO 유전자 발현은 저산소증에서 증가하며⁴⁴⁾ 혈청 EPO 수치도 저산소증에서 증가하는 것으로 보고되고 있어⁴⁵⁾ EPO 유전자 발현 증가는 혈청 EPO 수치의 증가로

Table 5. Densitometer analysis of EPO mRNA expression

Variables	CON ¹⁾	ANS	AND	ALS	ALD	p value		
						CYP	DIET	Dang Gui
EPO ⁶⁾ /GAPDH ⁷⁾ (%)	74.6 ± 3.3 ^{c2)}	86.9 ± 6.5 ^b	99.9 ± 7.8 ^b	133.9 ± 9.0 ^a	139.6 ± 6.4 ^a	0.02 ³⁾	0.0001 ⁴⁾	NS ⁵⁾

1) CON: normal group, ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.), AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW), ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet, ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet

2) Values are Mean ± S.D. Statistical analysis was performed using Duncan's Multiple Range test. abc: Values within the same row with different alphabets are significantly different at p < 0.05 levels

3) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. (CON group versus CYP-injected groups)

4) Normal diet versus low iron diet by Student's t-test

5) Saline treated groups versus Cham-Dang-Gui treated groups by Student's t-test.

6) EPO: Erythropoietin

7) GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

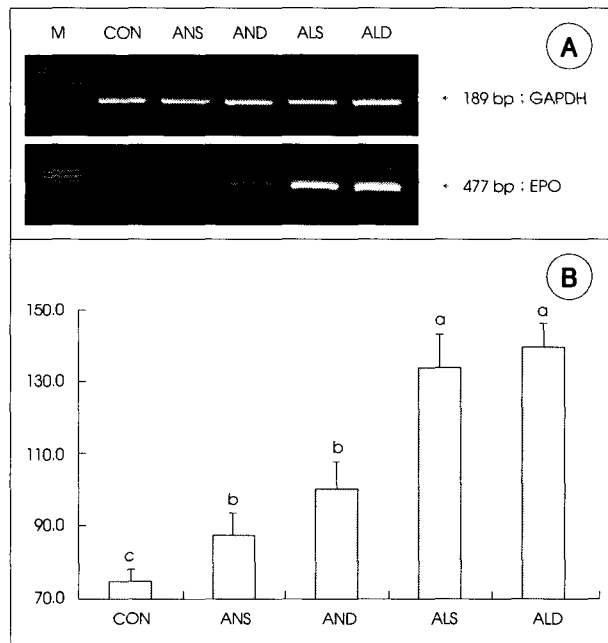


Fig. 1. Comparisons of EPO mRNA expression among the experimental groups. CON: control group, ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.), AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW), ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet, ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet.

A: RT-PCR. GAPDH: house keeping gene. B: Densitometer analysis: the signal intensity from a representative experiment (A) was quantified and the integrated areas were percentized to the signal observed in control group (100%).

반영됨을 알 수 있다.

본 연구에서 저철분식을 섭취한 결과 EPO 유전자 발현이 정상철분식이군에 비해 유의적으로 높았다. 이는 Huang 등⁴⁶⁾의 연구에서 철분결핍 배양액에서 배양한 세포가 정상철분배양액에서 배양한 세포에 비해 EPO 유전자의 발현이 높았다는 보고와 일치하고 있다. 또한 김 등⁴⁷⁾은 CYP를 투여한 흰쥐의 골수세포에서 TPO 유전자 발현을 조사한 결과 대조군에 비해 당귀, 천궁, 보혈탕을 처리한 군에서

조혈인자인 TPO 유전자 발현이 증가하였음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 참당귀 추출물의 투여에 의해 EPO 발현에 유의적인 차이를 보이지 않아 혈액학적 빈혈수치를 향상시킨 요인이 EPO 발현보다는 다른 요인에 의한 효과인 것으로 사료되어 향후 연구의 필요성이 강조된다.

요약 및 결론

본 연구 결과를 요약하여 보면, CYP를 투여한 후 실험동물의 체중감소가 유발되었고, 참당귀 추출물의 섭취는 체중 감소를 완화시켰다. 또한 CYP 투여는 혈액학적 빈혈수치를 대조군에 비해 유의적으로 낮추었으나, 참당귀 추출물의 섭취는 철분영양상태 및 비타민 B₁₂ 농도에도 긍정적인 효과를 나타내었다. 한편, 저철분식은 혈중 철분농도, TIBC, 트랜스페린, 페리틴 그리고 비타민 B₁₂ 농도에 영향을 미치면서 혈중 빈혈지표의 감소를 초래하였고 참당귀 추출물 투여에 의하여 혈청 철분, 페리틴, 트랜스페린, 비타민 B-12 농도의 유의적인 변화가 관찰되었다. 또한, 조혈성장인자인 EPO의 mRNA 발현은 CYP 투여와 저철분식에 의해 증가하였으나 참당귀 추출물의 투여에 의해서는 변화가 나타나지 않았다.

결론적으로 참당귀 추출물은 CYP 투여로 저하된 빈혈 지표를 향상시키고, 철분 영양상태와 혈중 비타민 B-12의 농도를 개선하면서 혈액생산 작용에 도움을 줄 것으로 사료되며, 빈혈 치료제로서 개발 가능성을 시사하였다.

Literature cited

- 1) Seo DG, Na JS, Lee GS. Hematology for medical technologists, pp.175-197, Go-Mun Pub Co., Seoul, 1996
- 2) Dallman PR. Manifestations of iron deficiency. *Semin Hematol* 19(1) : 19-30, 1982
- 3) Bruner AB, Joffe E, Duggan AK, Casella JF, Brandt J. Ran-

- domized study of cognitive effects of iron supplementation in non-anemic iron deficient adolescent girls. *Lancet* 348(9033): 992-996, 1996
- 4) Medical collage of Seoul University. Hematology. Seoul National Univ Pub. Seoul, 1993
 - 5) Ma JY, Ha CS, Sung HJ, Zee OP. Hemopoietic effects of *Rhizoma Rehmanniae Preparata* on Cyclophosphamide-induced pernicious anemia in rats. *Kor J Pharmacol* 31(3): 325-334, 2000
 - 6) Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, Bulutlar G, Camlica H, Aydinler A, Topuz E. Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. *Am J Clin Oncol* 25(4): 371-379, 2002
 - 7) Latha PG, Panikkar KR. Modulatory effects of *ixora coccinea* flower on cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Phytother Res* 13(6): 517-520, 1999
 - 8) Mo SM, Lee YS, Gu JO, Son SM. Remedy of diet, pp.346-364, Gyo-Mun Pub. Co. Seoul, 1999
 - 9) Ruggiero A, Riccardi R. Interventions for anemia in pediatric cancer patients. *Med Pediatr Oncol* 39(4): 451-454, 2002
 - 10) Ju GZ. Erythropoietin. *Kor J Hematol* 28: 1-5, 1993
 - 11) Feusner J, Hastings C. Recombinant human erythropoietin in pediatric oncology: a review. *Med Pediatr Oncol* 39(4): 463-468, 2002
 - 12) Valley AW. Overview of cancer-related anemia: focus on the potential role of darbepoetin alfa. *Pharmacotherapy* 22: 150S-159S, 2002
 - 13) Kim DU, Jin JL, Lee JU, Han CH, Min SS, Kim HG, Park JW, Kim CC, Kim DI. Remedy of mixed immune in aplastic anemia patient. *Kor J Hematol* 27: 233-237, 1992
 - 14) Cha BH, Oh SH, Yu CJ, Yang CY, Kim GY. Recombinant human granulocyte colony stimulation factor treatment of apriority agranulocytosis: 2 Case Report. *Kor J Hematol* 27: 325-329, 1992
 - 15) Lee SI, Ahn DG, Shin MG, No SH, Lee YJ, Kim KH. Clinical applied of herb, pp.266-384, Seung-Bo Pub Co., 1982
 - 16) Miura S, Kawamura I, Yamada A, Kawakita T, Kumazawa Y, Himeno K, Nomoto K. Effects of traditional Chinese herbal medicine, Ren-shen-yang- rong-tang on hematopoietic stem cells in mice. *Int J Immunopharmacol* 11(7): 771-780, 1989
 - 17) Liu X L. 12 Cases of aplastic anemia treated mainly by remedy Chinese drugs. *Cung/TSA China* 25: 759-760, 1984
 - 18) Onishi Y, Yasumizu R, Fan HX, Liu J, Takao-Liu F, Komatsu Y, Hosoya E, Good RA, Ikehara S. Effects of Zuzen-taiho-toh (Tj-48), a traditional oriental medicine, on hemopoietic recovery from radiation injury in mice. *Exp Hematol* 18(1): 18-22, 1990
 - 19) Bradley RR, Cunniff PJ, Pereira BJ, Jaber BL. Hematopoietic effect of *Radix angelicae sinensis* in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 34(2): 349-354, 1999
 - 20) Kim HS, Heu IH, Lee SJ, Ahn HS. Immunologic characteristic on extract of Old anter. *Kor J Pharmacol* 38: 806-813, 1989
 - 21) Oh HS. Haematopoiesis effects of Dang-Gui. Kyung Hee University, pp.34-35, 2001
 - 22) Walters MC, Abelson HT. Interpretation of the complete blood count. *Pediatr Clin North Am* 43(3): 599-622, 1996
 - 23) Park KJ, Hong SB, Kim EH, Ma JY, Eun YA, Kim HS. Hemopoietic effects of Deer blood on cyclophosphamide induced pernicious anemia. *Kor J Pharmacol* 29(4): 283-292, 1998
 - 24) Yhang YH, Lee DS. The relationship of anorexia, nausea, vomiting and oral intake and identify the influence these side effects on the nutritional status in patients receiving chemotherapy. *Kor J Nursing* 30(3): 720-730, 2000
 - 25) Han DS. *Herbology*, pp.201-202, Dong-Myoung Pub Co. Seoul, 1988
 - 26) De Gramont A, Rioux E, Drolet Y, Delage JM. Erythrocyte mean corpuscular volume during cytotoxic therapy and the risk of secondary leukemia. *Cancer* 55(3): 493-495, 1985
 - 27) De Gramont A, Rioux E, Drolet Y, Barry A, Delage JM. [Changes in the mean corpuscular volume during the cytotoxic treatment of cancer and risk of secondary leukemia. Preliminary results]. *Sem Hop* 60(14): 961-966, 1984
 - 28) Means RT Jr, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 80(7): 1639-1647, 1992
 - 29) Cartwright GE. The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol* 3(4): 351-375, 1966
 - 30) Tchekmedyan NS. Anemia in cancer patients: significance, epidemiology, and current therapy. *Oncology* 16(9): 17s-24s, 2002
 - 31) Beutler E, Lichtman MA, Coller BS. Hematology. 6th ed., pp.295-304, NY: McGraw-Hill Book Co., New York, 2001
 - 32) Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamine deficiency. *Medicine* 70(4): 229-245, 1991
 - 33) Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen TH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 96(3): 239-246, 1994
 - 34) Recommended Dietary Allowance for Korean. 7th Ed. *Korean Nutrition Society*, 2000
 - 35) Kim HC. Pharmacology of Korean Herbs. pp 464-467, Jib-Mun-Dang Pub Co., 2001
 - 36) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91(3): 335-344, 1977
 - 37) Guerriero A, Worford L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* 90(9): 3444-3455, 1997
 - 38) Banu N, Wang JF, Deng B, Groopman JE, Avraham H. Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. *Blood* 86(4): 1331-1338, 1995
 - 39) 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-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, interferon- γ , and erythropoietin. *Blood* 81(10): 2579-2584, 1993
 - 40) De Klerk G, Rosengarten PCJ, Vet RJWM, Goudsmit R. Serum erythropoietin (ESF) titers in anemia. *Blood* 58(6): 1164-1170, 1981
 - 41) Jelkmann W, Widemann G. Serum erythropoietin level: Relationship to blood haemoglobin concentration and erythrocytic activity of the bone marrow. *Klinische Wochenschrift* 68: 403-07, 1990
 - 42) Grace RJ, Kendall RG, Chapman C, Hartley AE, Barnard DL &

- Norfolk DR. Changes in serum erythropoietin levels during allogeneic bone marrow transplantation. *European J Haematology* 47: 81-85, 1991
- 43) Daghman NA, McHale CM, Savage GM, Price S, Winter PC, Maxwell AP, Lappin TR. Regulation of erythropoietin gene expression depends on two different oxygen-sensing mechanisms. *Mol Genet Metab* 67 (2) : 113-117, 1999
- 44) Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(6) : E1242-1248, 2000
- 45) Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 15: 94(6) : 1864-1877, 1999
- 46) Huang LE, Ho V, Arany Z, Krainc D, Galson D, Tendler D, Livingston DM, Bunn HF. Erythropoietin gene regulation depends on heme dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int* 51 (2) : 548-552, 1997
- 47) Kim SH, Lim JS. Effect of korean traditional medicine on murine hematopoiesis (I)-Regulation of hematopoietic cytokine expression. *Kor J Immunol* 21 (2) : 165-174, 1999