

녹용의 품종에 따른 조혈작용 비교연구

김성훈* · 이효정 · 박정란 · 김하나 · 안규석¹ · 조덕연² · 최돈웅³

경기도 용인시 기흥읍 서천리 1번지 경희대학교 동서의학대학원 동서중앙학과,

*서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학, ¹대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교 의과대학,

²서울특별시 은평구 진흥로 231번지 식품의약 안전청

Effect of Deer Antler Extracts from Various Origins and Parts on the Hemopoietic Activity

Sung-Hoon Kim*, Hyo-Jeong Lee, Jeong-Ran Park, Hana Kim, Kyoo-Seok Ahn¹,
Deok-Yeon Cho², and Don-Woong Choi³

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University 1 Seochun-ri, Kihung-eup, Yongin-si, Kyungki-do 449-701, Korea, ¹Oriental Medical College, Kyunghee Univeresity, 1, Heogi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea, ²Medical College, Chungnam University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea, ³Food & Drug Administration, 231, Jinheung-ro, Eunpyung-gu, Seoul, Korea

Abstract – This study was performed to evaluate the hemopoietic effects of 6 species of deer antlers from origins and parts *in vitro*. CD34 positive cells were isolated and confirmed the its population by FACS analysis. In a week liquid culture, there was any statistical significance between extracts of three parts of six species of deer antlers in the experiments as colony forming assay, proliferation assay, differentiation assay and observation of morphology. However, after 2 weeks- culture with extracts of three parts of six species of deer antlers, colonies were counted. six species of deer antlers, such as middle part of Korean nippon deer, upper part of Chinese nippon deer, upper part of Newzealand horse deer, middle part of Korea horse deer and middle part of Newzealand red deer, significantly increased the CFU-GM (colony forming unit granulocyte-macrophage) of CD34 positive cells related to production of leucocytes such as eosinophil, basophil and neutrophil, while only middle part of Korea horse deer significantly increased the BFU-E (burst forming unit-erythroid) at 1 mg/ml seggesting progenting red blood cells (RBC). In the molecular study with CD34+ cells pretreated with cyclophosphamide, antagonist of hemopoietic activity, upper part of Korean nippon deer and upper part of Chinese nippon deer effectively increased TPO involved in a late pathway of hematopoiesis just like in ELISA assay of IL-3, TPO and GM-CSF. Taken together, these results indicate extracts of deer antler had some hemopoietic activity still proposing more clinical study and more basic mechanism research.

Key words : CD34+, Cyclophosphamide, Deer, Hemopoetic effect

서 론

녹용은 사슴의 골화되지 않은 어린 뿔을 잘라 건조한 것을 말하는데 녹용의 종류는 梅花鹿(Cervus nippon T; Sika deer)이 동북아, 화북, 화동, 서남지구에서 양식하고, 馬鹿(Cervus elaphus L.)은 동북대몽고, 서북 서남지구 등에서 사육하고 있으며, 赤鹿은 뉴질랜드에서, 大鹿은 북미와 캐나

다에서, 馴鹿은 소련 및 알래스카 등에서 서식 또는 양육하고 있다.^{2,6)}

한의학에서 녹용이 “壯溫陽 補氣血 益精髓 強筋骨”하는 본초효능이 있어 “虛勞羸瘦, 精神倦乏, 眩暈, 耳鳴, 目暗, 腰膝酸痛, 陽痿, 滑精, 子宮虛冷, 崩漏帶下” 등을 치료한다고 기술되어 있어 주로 보약으로 활용되고 있다.⁷⁾ 그러나 대부분의 녹용은 수입에 의존하고 있으며, 외국산 녹용이 국산 녹용보다 효과가 우수하여 값도 비싸다고 인식되어 있다. 또한 녹용은 골수조혈작용에 유효한 보약으로 인식되고 있는데 이에 대해 외국산 녹용과 국산 녹용 간의 효능과 부위

*교신저자(E-mail) : sungkim7@khu.ac.kr
(FAX) : 031-204-2730

별(상대, 중대, 하대) 효능을 과학적으로 비교할 필요성이 제기되고 있다.

조혈간세포는 자기갱신, 증식 및 분화의 잠재력을 가져, 1일 필요로 하는 4×10^{11} 개의 혈세포를 0.25-0.3배가로 생성하는 것으로 추정된다.⁴⁾ 이러한 잠재력이 생체 외에서도 발현될 수 있음이 확인되면서 체외에서의 조혈간세포증폭에 대한 다각적인 연구가 수행되어 이의 임상적용이 가시화되고 있다. 체외에 증폭된 조혈간세포의 응용으로 골수이식, 말초혈액 조혈간세포이식 등 조혈간 세포이식시 조혈세포의 채취를 최소화할 수 있으며,^{8,9)} 중앙세포의 오염을 회피 또는 최소화할 수 있을 것으로 기대되고 있다.¹⁰⁾ 본 연구는 이러한 조혈세포의 활성화를 유도할 수 있는 한국산 녹용의 활성을 조사하는 것으로서 한방에서 녹용의 약리활성을 다음과 같이 정리할 수 있다.

한방에서 연구된 녹용의 효과는 첫 번째로 심혈관계(心血管系)에 대한 효능으로 대동맥과 관상동맥에서의 동맥경화 정도를 경감시킨다. 그리고 혈압을 단계적으로 하강시키는 경향을 보인다. 두 번째로 간장계(肝腸系)에 대한 효능으로 콜레스테롤의 양을 감소시키며 간기능을 보호한다. 세 번째로 당대사(糖代謝)에 대한 효능으로 당뇨병 치료에 이용되면 인슐린 함량을 조절한다. 네 번째로 조혈(造血)에 대한 효능으로 빈혈상태의 회복기간을 단시킨다.⁵⁾ 다섯 번째로 면역계(免疫系)에 대한 효능으로 항원에 대한 항체 생산을 촉진시키며 체내에서 항원, 항체 복합체를 형성함으로써 빠르게 항원을 중화시켜 생체를 보호하는 효능이 있다. 여섯 번째로 스트레스에 대한 효능으로 교통사고나 기타 여러 가지 외상으로 인한 대사의 이상을 정상화시킨다. 스트레스로 인한 생리적인 장애 혹은 손상에 대해서도 회복효과를 나타낸다. 일곱 번째로 내분비 및 성장발육에 대한 효능으로 기아로 인한 갑상선의 구조적인 결함을 빨리 정상화시키면 내부 장기의 성장 및 발육정도가 매우 양호하다. 포피선·전립선 및 정낭의 성장을 현저히 촉진시킬 뿐만 아니라 자궁의 발달을 촉진시켜 성(性) 기능을 향상시킨다.³⁾ 여덟 번째로 노화에 대한 효능으로 항 노화 활성을 보이며 학습기능 저하 개선 및 기억력 증진에 기여한다. 최근 치매와 관련된 지어 활발한 연구가 수행되고 있다.

아홉 번째로 녹각(鹿角) 중의 다당류는 위궤양에 현저한 개선효과가 있다. 뇌·간·신장 등에서 조직호흡을 증가시키는 작용이 있다.^{5,7)}

이러한 활성중 면역작용에 대해 Suh¹⁾ 등이 녹용의 대식세포 탐식작용을 보고하였으며, 조혈작용연구로는 Kim⁵⁾ 등이 국산녹용의 조혈작용을 보고한 외에 국산녹용과 외국산 녹용간의 조혈효능과 상대, 중대, 하대간의 차이를 비교한 연구는 아직 없다.

그리하여 중국산 매화록, 국산 매화록, 뉴질랜드 적록, 국산 적록, 뉴질랜드 대록, 국산 대록 등을 산지별 및 부위별(상대, 중대, 하대)로 조혈작용을 비교하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 실험동물은 대한 실험동물 센터에서 구입한 C57BL/6 6주령 수컷 생쥐를 분양 받아 실험에 앞서 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1%, 조지방 8.0%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

시료 - 국산 대록(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대록(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1)의 상중하대를 회분검사를 통해 구분하여 실험에 사용하였다.

회분검사 - 따로 규정이 없는 검체 3g을 도가니에 넣고 550°C 에서 검은 탄소가 없어질 때까지 회하시켜 데시케이터에서 식힌 후 무게를 달아 회분의 양을 구하였다.³⁾

Leukopenia 및 thrombocytopenia 유발 - C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX, 100 mg/kg)를 복강 주사 4일 후 대퇴골에서 골수(bone marrow, BM)를 채취하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 골수세포(bone marrow cells)를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 2ml을 넣고 37°C 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다.

생쥐 조혈모세포(CD34⁺) 분리^{11-12,21-22)} - 분리한 골수세포중 조혈모세포(CD34⁺)를 분리하기 위하여 primary anti-mouse CD34 (RAM34, 49E8¹⁾을 처리하여 ICE에서 1시간 배양하였다. 배양 후 MACS MS+/RS+ separation columns에 서서히 통과시킨 후 0.5% BSA와 2 mM EDTA를 포함한 PBS (Phosphate buffered saline)로 10분간 washing한 후 CellactionTM Pan Mouse IgG MicroBeads kit (DynaMPC, USA)에 부착한 CD34⁺을 분리하였다. 분리된 CD34⁺ 세포의 함량을 알아보기 위하여 4°C 에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, CD34⁺ 세포에 FITC-anti-CD34를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)로 CD34⁺ 세포를 분석하였다.

유식 세포 분석 - 5×10^4 - 2×10^5 세포를 100 μl 의 0.2% sodium azide(Sigma, St Louis, MO, USA), 및 1% bovine serum albumin(BSA; GIBCO)를 포함하는 PBS에 부유시키

고 형광이 부착된 단세포군 항체 20 μ l를 첨가한 후 4°C 차광 상태에서 30분간 반응시켰다. 2회 원침 세척하고 Coulter Elite flow cytometer(Coulter Electronics Ltd., Hialeah, Florida, USA)를 사용하여 분석하였다. 음성 대조군으로는 각각의 단세포군 항체에 대한 isotype antibody를 사용하였다.

조혈모세포 (CD34⁺)에서 조혈조절 유전자 분석

RNA 추출 - 조혈모세포(CD34⁺)를 우태아혈청결핍 RPMI-1640 배양액에서 1시간 동안 배양한 후 녹용추출물(100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 처리하고 3시간 동안 배양기(37°C, CO₂, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNazol^B를 이용하여 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.²⁸⁾

역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) - 역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

cDNA PCR - PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-3 (IL-3), granulocyte macrophage-colony stimulated factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF), 그리고 thrombopoietin (TPO)을 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μ l)와 antisense primer (20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.2 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25 cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조

Table I. Primer sequence

Primer name	Sequence (5'-3')
β -actin	sense TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
	antisense TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
IL-3	sense GAAGTGGATCCTGAGGACAGATACA
	antisense GACCCATGGGCCATGAGGAACATTC
GMCSF	sense TAGAAGTTTGGCAAGGCTC
	antisense CGTGTACAGCTTCAGTTTCC
SCF	sense TAACCTCAACTATGTGCGCA
	antisense CGTGTACAGCTTCAGTTTCC
TPO	sense CCTCTTCTTGAGCTTGCAAG
	antisense AGCCCATGAGTTCATTAC

건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.¹⁸⁾

Oligonucleotide의 염기배열은 Table 1과 같다.

ELISA에 의한 조혈조절 단백질측정 - 조혈모세포 (CD34⁺)를 12 well plate에 2 \times 10⁶ 세포를 각 well에 분주한 후 우태아혈청 결핍 RPMI1640 배양액으로 overnight 시킨다. 녹용추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml)을 처리하고, 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 66시간 동안 CO₂ 조적배양기에서 배양하였다. 배양 종료후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, TPO, IL-3, GM-CSF enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) kit (R&D system)으로 생산량을 측정하였다.^{26,26,27)}

제대혈의 획득 및 단핵세포의 획득 - 제왕 절개시 heparin 처리하여 채취한 제대혈을 Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM, GIBCO, Grand island, USA)으로 2-4배 희석하고 Ficoll-paque(specific gravity, 1.077 g/mL; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA)에 중첩시켜 실온에서 400 g로 30분간 원침하였다. Ficoll-paque와 혈장 사이의 세포층을 채취하여 10% 우태 혈청(fetal bovine serum, FBS; GIBCO)을 함유한 IMDM으로 3회 세척하였다.^{23,24,30)}

집락 형성 분석 - 1.2% methylcellulose(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA), 30% FBS, 2 mM L-glutamin(GIBCO), 0.5 mM Hemin(Sigma Chemical Co.) 및 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol(Sigma Chemical Co.)을 함유하는 IMDM을 배지로 하여 35 mm Petri dish(Nunc)에 1 ml의 양으로 3중복 배양하였다. 이때 dish당 1 \times 10³ 세포를 넣어 5% 37°C, CO₂,

완전 습윤 상태의 배양기에서 14일간 배양한 후 도립현미경 하에서 일반적인 기준에 따라 colony-forming unit granulocyte, macrophage(CFU-GM) 및 burst-forming unit-erythroid(BFU-E)를 계수하였다. 실험 목적에 맞게 녹용 추출물 및 조혈 성장인자를 첨가하였으며 표준적 분석을 하는 경우엔 kit-ligand(KL; R&D system), interleukin-3(IL-3; R&D system) 및 erythropoietin(EPO; Amgen)을 각각 20 ng/ml, 50 ng/ml 및 6 U/ml의 농도로 첨가하였다.¹⁴⁾

제대혈 CD34 양성 세포의 단기 액상 배양과 분화유도 - 20% FBS를 함유하는 IMDM을 배지로 하여 2×10^5 CD34양성 세포를 24혈 배양판에 각 1 ml의 양으로 3중복 배양하였다. 각각의 녹용 추출물을 10 µg/ml 및 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 추출물이 CD34 양성세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 대조군에는 추출물을 첨가하지 않았다. 5% 37°C, CO₂, 완전 습윤 상태의 배양기에서 7일간 배양한후 세포를 수확하여 분석하였다. 세포수를 측정하였고, 유식 세포분석을 통해 CD34 양성세포 분획 및 최근 조혈세포의 골수 귀소(bone marrow homing)을 매개하는 것으로 확인된 세포 표면 분자인 CXCR4 발현 정도를 동시에 측정하였다. 한편으로 집락 형성 분석을 시행하여 집락 형성 세포의 증감 유무를 확인하였다. 수확된 세포의 일부는 cytospin을 시행하고 Quick Staining Kit (Leukostat; Fisher Scientific)를 이용하여 염색한 후 광학 현미경하에서 세포의 형태를 관찰하였다.^{16,30,31,33)}

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

결과 및 고찰

회분검사 - 회분양의 검사에서는 상대는 30% 미만이었으나 중대와 하대는 모두 30% 이상이었고 대체로 상대부터 하대까지 회분함양이 증가하는 경향이었지만 국산 매화록만 중대보다 하대가 회분함양이 적었는데 이는 중대와 하대간에 큰 편차가 없음을 의미한다. 그러나 국산 중대와 하대의 회분비율이 같은 것에 대해 검체의 제조는 해당하는 부위의 녹용검체를 모두 갈아 가루로 하고 균질하게 혼합하여 그 중 일정량을 취하여 실험에 사용하였고, 각 검체에 대한 회분시험은 각각 3회 실시하였는데 그 결과가 Table 2와 같다.

녹용 추출물이 조혈 및 분화에 미치는 영향 - 녹용 추출물을 적정 수준 이하의 농도로 조혈 성장인자와 함께 첨가한 경우 Colony forming cell assays는 여러 특성적 progenitor세포를 변별하는데 사용되고 있다. 다양성 골수세

Table II. 녹용부위별 회분량

녹용의 종류 및 부위	회분 양 (%)
국산 적록 상대	23.7
국산 적록 중대	28.93
국산 적록 하대	38.97
뉴질랜드 적록 상대	26.5
뉴질랜드 적록 중대	28.9
뉴질랜드 적록 하대	36.7
국산 대록 상대	27.43
국산 대록 중대	35.3
국산 대록 하대	35.33
뉴질랜드 대록 상대	25.7
뉴질랜드 대록 중대	30.6
뉴질랜드 대록 하대	37.5
국산 매화록 상대	26
국산 매화록 중대	34.3
국산 매화록 하대	33.83
중국산 매화록 상대	28.87
중국산 매화록 중대	37.57
중국산 매화록 하대	40.03

녹용부위 회분량	1회	2회	3회	Mean
중(%)	34.8	35.4	35.7	35.3
하(%)	35.7	36.0	34.3	35.3

포에 대해서는 mixed-CFC assay가 사용되지만, 6종류 상중하대 녹용 추출물을 가하고 2주간 배양하고 초보적이며 성숙 erythroid progenitor세포 변별과 유관한 BFU-E(burst forming unit erythroid)와 eosinophil, neutrophil, basophil의 생성과 관련된 과립구(Granulocyte)와 대식세포(macrophage) 등이 백혈구 생성과 관련된 CFU-GM(colony forming unit granulocyte and macrophage)⁵⁾을 계수하였다.

녹용 추출물이 조혈 성장 인자와의 상호 작용을 통해 집락 형성을 촉진하는지를 확인하기 위해 표준적인 집락 형성 분석에 사용되는 농도보다 낮은 농도의 조혈 성장 인자와 녹용 추출물을 동시에 첨가하여 집락 형성 분석을 시행하였다. 즉 KL, IL-3 및 EPO를 각각 10 ng/ml, 10 ng/ml 및 1 U/ml의 농도로 첨가하여 분석하였다.

추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 1×10^3 CD34양성 세포에 조혈 성장인자를 가미하여 배양한 후 BFU-E를 계수하였다. 백혈구 생성과 관여하는 CFU-GM는 대조군에 이 15.3 ± 0.6 개 이었지만, 6종류 상중하대를 녹용 추출물을 1 mg/ml의 농도와 CFU-GM를 함께 처리한 경우는 대조군

에 비해 KM-2, CM-1, ND-1, KD-2, NR-2 처리군에서 유의성 있게 증가되었고, 적혈구의 progenitor와 관계되는 BFU-E의 계수²⁰⁾에서는 대조군이 40.0±1.0개인데 비해 단지 KD-2만이 유의성 있는 증가를 보였다.

그러나 녹용 추출물 10 mg/ml의 고농도에서는 CFU-GM의 계수에서는 대조군 15.3±0.6개에 비해 KM-3, KD-3, NR-2 등에서 증가하는 경향을 보여 반드시 상대만이 유효하다고 볼 수 없었고, BFU-E계수에서는 대조군 40.0±1.0개에 비해 NR-1만이 증가하였다. 그러나 녹용의 고농도는 density때문에 자체 세포독성 때문에 집락 형성이 되지 않은 군이 다수 있었다. 이 결과는 김⁵⁾ 등이 중국산 녹용이 조혈모세포를 약간 증가시키는 경향을 보였지만 CFU-GM의 수를 상승시키는 효과가 있었다는 내용과 유사한 결과로 보인다.

CD34 양성 세포의 단기 액상 배양

녹용 추출물이 CD34 양성 세포의 증식에 미치는 영향
- 먼저 제대혈(cord blood) CD34 세포에 대해 추출물을 넣지 않은 경우 7일 배양 후 전체 세포수에는 변화 없이 유지되었다. 녹용추출물을 각각 10 µg/ml 농도에서는 ND-1만이 대조군에 비해 적었으나 타 녹용은 모두 증가하는 경향을 보였고, 100 µg/ml의 농도에서도 KM-1, NR-1, KD-1, ND-1이 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였지만 각군과 부위

Table III. Effects of upper part extracts of six species of deer antlers on the proliferation of cord blood CD34⁺ cells in 7-days liquid culture

Species of Deer Horns	No. of cells (×10 ⁵)	
	10 µg/ml	100 µg/ml
KM-1*	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.2
NR-1	2.5 ± 0.3	2.4 ± 0.3
KR-1	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.3
CM-1	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.3
KD-1	2.9 ± 0.4	2.6 ± 0.2
ND-1	1.5 ± 0.3	2.6 ± 0.3
Without extract	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4

CFU-GM and BFU-E colonies were counted following 2 weeks-culture of six species of deer horn extracts with hematopoietic growth factors (10 ng/ml, KL; 10 ng/ml IL-3; 1 U/ml EPO). Data are expressed in the mean±SD of the numbers of colony-forming cells from triplicate culture from twice experiments.

국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙 (ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1); 1;상대, 2;중대, 3;하대* It means the significant difference between control and samples by student t-test. * P<0.05, **P<0.01,*** P<0.001

별로 유의적 변화를 인정할 수 없었다. 또한 대조군인 추출물의 첨가 없이 7일간 배양한 경우 CD34 양성 세포의 분획은 배양전에 비해 약 50% 감소하였으며, 기타 결과는 CD34 양성세포 비율과도 유사하다(Table 3, Table 4).

말초혈액(peripheral blood) CD34 세포에 대해서는 대조군

Table IV. Effects of upper part extracts of six species of deer antlers on the percentages of cord blood CD34⁺ cells after 7-days liquid culture of cord blood CD34⁺ cells in the presence or absence or various deer horn extracts

Species of Deer Horns	% CD34 ⁺ cells	
	10 µg/ml	100 µg/ml
KM-1*	53.2	54.3
NR-1	51.2	57.7
KR-1	51.4	51.1
CM-1	49.7	52.2
KD-1	50.6	54.4
ND-1	52.4	54.9
Without extract	53.6	53.6
Before culture	93.4	93.4

2×10⁵ cord blood CD34⁺ cells were cultured for 7 days with or without various deer horn extracts in the concentrations of 10 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. Data are the mean±SD of the numbers of total cells from triplicate culture.

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1)

Table V. Effects of upper part extracts of six species of deer antlers on fold-expansion of colony-forming cells in the presence or absence of deer horn extracts after 7-days liquid culture

Species of Deer Horns	Fold-expansion of colony-forming cells			
	10 µg/ml		100 µg/ml	
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E
KM-1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1
NR-1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
KR-1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
CM-1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
KD-1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2
ND-1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Without extract	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2

Cord blood CD34⁺ cells were cultured for 7 days with or without deer horn extracts in the concentrations of 10 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. Data are the percentages of CD34⁺ cells analyzed by flow cytometry.

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙 (ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1)

이 cord blood 세포보다 적어 1.9 ± 0.4 이었지만 6종류 녹용 상중하대를 첨가한 경우에는 대조군에 비해 KM-1, NR-1, KR-3, CM-3, KD-1 등이 대조군에 비해 20% 이상 세포 증식을 초래하였지만 각 군간에 편차를 인정하기 어려웠다 (Table 7).

녹용 추출물이 집락 형성 세포 증폭에 미치는 영향 - 녹용 추출물의 첨가 없이 제대혈 CD34 양성 세포를 7일간 배양하고 CFU-GM 및 BFU-E를 계수한 경우, 녹용 추출물을 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 과 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 배양한 경우에도 대조군과 유사하였으며 추출물 간의 유의한 차이도 관찰되

Table VI. Effects of various deer horn extracts on the expression of CXCR4 on cord blood CD34⁺ cells in 7-days liquid culture

Species of Deer Horns	CXCR4 expression on CD34 ⁺ cells (%)	
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
KM-1*	69.2	68.1
NR-1	65.2	71.1
KR-1	70.8	66.7
CM-1	70.2	70.5
KD-1	68.6	69.9
ND-1	71.6	70.3
Without extract	68.1	68.1
Before culture	96.5	96.5

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1)

Table VII. Effects of three parts extracts from six species of deer antlers on the proliferation of peripheral CD34⁺ cells in 7-day liquid culture

Species	No. of cells	% control	Species	No. of cells	% control
KM-1	2.5 ± 0.1	131	CM-1	1.9 ± 0.1	100
KM-2	1.9 ± 0.3	100	CM-2	1.6 ± 0.0	84
KM-3	1.6 ± 0.4	84	CM-3	2.3 ± 0.3	121
NR-1	2.3 ± 0.2	121	KD-1	2.3 ± 0.2	121
NR-2	1.7 ± 0.1	89	KD-2	1.8 ± 0.2	95
NR-3	2.1 ± 0.1	110	KD-3	2.0 ± 0.3	105
KR-1	1.8 ± 0.3	95	ND-1	1.7 ± 0.1	89
KR-2	1.8 ± 0.2	95	ND-2	1.6 ± 0.3	84
KR-3	2.3 ± 0.2	121	ND-3	2.1 ± 0.1	110
Without extract	1.9 ± 0.4		Without extract	1.9 ± 0.4	

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1)

Table VIII. Effects of three parts extracts from six species of deer antlers on the expansion of peripheral CD34⁺ cells after 7-days liquid culture

Species	Fold-expansion of CD34 ⁺ cells	Species	Fold-expansion of CD34 ⁺ cells
KM-1	0.7 ± 0.2	CM-1	0.6 ± 0.1
KM-2	0.6 ± 0.1	CM-2	0.5 ± 0.1
KM-3	0.5 ± 0.2	CM-3	0.6 ± 0.2
NR-1	0.6 ± 0.1	KD-1	0.6 ± 0.2
NR-2	0.6 ± 0.1	KD-2	0.6 ± 0.1
NR-3	0.6 ± 0.2	KD-3	0.6 ± 0.2
KR-1	0.6 ± 0.1	ND-1	0.5 ± 0.1
KR-2	0.6 ± 0.1	ND-2	0.5 ± 0.2
KR-3	0.7 ± 0.2	ND-3	0.6 ± 0.1
Without extract	0.6 ± 0.1	Without extract	0.6 ± 0.1

2×10^5 mobilized peripheral blood CD34⁺ cells were cultured for 7 days with or without various deer horn extracts in the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data are the mean \pm SD of the fold-expansion of CFU-GM and BFU-E, respectively. 1×10^3 input CD34⁺ cells gave rise to 70 ± 6 CFU-GM and 60 ± 7 BFU-E, respectively.

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1) 1;상대, 2;중대, 3;하대

Table IX. Effects of three parts extracts from six species of deer antlers on the expansion of colony-forming cells after 7-days liquid culture

Species	Fold-expansion of CFC		Species	Fold-expansion of CFC	
	CFU-GM	BFU-E		CFU-GM	BFU-E
KM-1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	CM-1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2
KM-2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	CM-2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
KM-3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	CM-3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
NR-1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	KD-1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1
NR-2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	KD-2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
NR-3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	KD-3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
KR-1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	ND-1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
KR-2	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	ND-2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
KR-3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	ND-3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Without extract	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	Without extract	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2

2×10^5 mobilized peripheral blood CD34⁺ cells were cultured for 7 days with or without various deer horn extracts in the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data are the mean \pm SD of the numbers of total cells.

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1) 1;상대, 2;중대, 3;하대

지 않았다(Table 5). 말초혈액을 이용한 연구에서도 6종류 상중하대 추출물 100 µg/ml 농도가 조혈인자를 첨가하지 않은 경우 대조군 0.6 ± 0.1, 조혈인자를 첨가한 경우 대조군 0.5 ± 0.1에 비해 CD34 양성세포의 증폭에는 영향이 거의 없는 것으로 보여 각군과 부위별 차이를 인정할 수 없었다(Table 8, Table 9).

녹용 추출물이 CXCR4 발현의 변동에 미치는 영향 - 일반적으로 progenitor cell이나 stem cell을 배양하면 CXCR expression이 감소되는데 이를 보호하는 효과가 있는지를 평가하였다. 배양전 제대혈 CD34 양성 세포의 96.5%가 CXCR4를 발현한 반면, 추출물 첨가 없이 7일간 배양후 68.1%로 감소하였다. 녹용 추출물을 각각 10 µg/ml 및 100 µg/ml로 첨가하여 배양한 경우에도 대조군과 유의한 차이가 없었으며 추출물 상호간에도 차이가 없었다(Table 6). 또한 말초혈액 CD34 양성세포에 대해서도 대조군이 배양전 62.1%에 비해 배양후에 47.1%로 감소하였는데 6종류 상중하대 녹용추출물을 첨가하여도 대조군에 비해 유의성 있는 편차가 없었다(Table 10).

이상의 결과로 보아 일부 녹용 추출물의 조혈작용을 확인할 수 있으며, 상대만이 유효하다는 설에 대해 중대도 상대보다 낮거나 버금가는 효과가 있을 수 있음을 실험적으로 제시하고 있으며, 향후 이에 대한 임상연구와 지속적 기초

Table X. Effects of three parts extracts of six species of deer horn on CXCR4 expression on peripheral CD34⁺ cells after 7-days liquid culture with or without various deer horn extracts

Species	CXCR4 expression on CD34 ⁺ cells (%)	Species	CXCR4 expression on CD34 ⁺ cells (%)
KM-1	44.5	CM-1	44.8
KM-2	45.6	CM-2	46.6
KM-3	45.4	CM-3	50.1
NR-1	49.8	KD-1	48.4
NR-2	50.1	KD-2	49.3
NR-3	46.8	KD-3	48.5
KR-1	45.3	ND-1	44.8
KR-2	48.1	ND-2	49.3
KR-3	49.7	ND-3	47.5
Without extract	47.1	Without extract	47.1
Before culture	62.1	Before culture	62.1

*국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1) 1;상대, 2;중대, 3;하대

Table XI. Effect of upper part extracts of six species of deer antlers on cytokines production level in CD34⁺ hemopoietic stem cells in mice with leucopenia and thrombocytopenia by ELISA analysis

Group	Cytokines Production Level (pg/ml)		
	IL-3	TPO	GM-CSF
CD34 ⁺ cells	35.2	103.6	22.1
ConA + rIL-3	47.9	157.8	68.8
ND-1 (µg/ml)	100	51.2	115.2
10	50.3	188.5	28.4
NR-1 (µg/ml)	100	63.5	128.4
10	53.2	132.1	29.1
KD-1 (µg/ml)	100	43.2	118.8
10	45.5	132.3	25.6
KR-1 (µg/ml)	100	58.9	190.3
10	62.3	127.5	44.2
CM-1 (µg/ml)	100	62.2	337.6
10	55.3	307.3	34.5
KM-1 (µg/ml)	100	63.2	482.3
10	58.6	398.2	64.2

국산 대륙(KD-1), 국산 적록(KR-1), 국산 매화록(KM-1), 중국산 매화록(CM-1), 뉴질랜드 대륙(ND-1), 뉴질랜드 적록(NR-1) 1;상대

연구가 필요하다고 사료된다.

녹용 추출물이 조혈 유전자에 미치는 영향 - 다양한 종류의 녹용추출물이 CTX(cyclophosphamide:100 mg/kg)로 유발된 leucopenia와 thrombocytopenia 생쥐의 CD34⁺ 조혈 모세포에서 조혈성 사이토카인들의 발현유도를 관찰하였다(Table 11). 그 결과 IL-3 mRNA 유전자 발현은 모든 녹용 추출물에서, 혈소판 형성을 유도하는 TPO mRNA는 녹용 ND-1과 국산대륙의 1 µg/ml 농도에서, 중국매화록은 100 µg/ml와 10 µg/ml의 농도에서, 국산 매화록은 10 µg/ml의 농도에서 현저한 발현증가를 나타내었고, SCF - mRNA 유전자는 뉴질랜드 대륙, 뉴질랜드 적록, 국산 적록, 중국산 매화록, 국산 매화록에서 현저한 발현증가를 나타냈으며, GM-CSF mRNA 유전자 발현은 모든 군에서 일정한 유전자 발현을 보였으나, 특히 국산 적록, 중국산 매화록, 국산 매화록에서 큰 유전자 발현 증가를 나타냄을 알수 있었다(Fig.1, Table 12). 이상의 결과로 보아 생리적 혈액에 대한 조혈 모세포(CD34⁺)에 대한 2주간 시행된 colony assay는 의미있는 결과가 있었지만 1주간의 분화, 증식 등은 각군과 부위별로 큰 유의적 편차가 없었는데, 다른조건, 즉 cyclophosphamide에 의한 병리적 혈액에 대해 조혈유전자 생성에

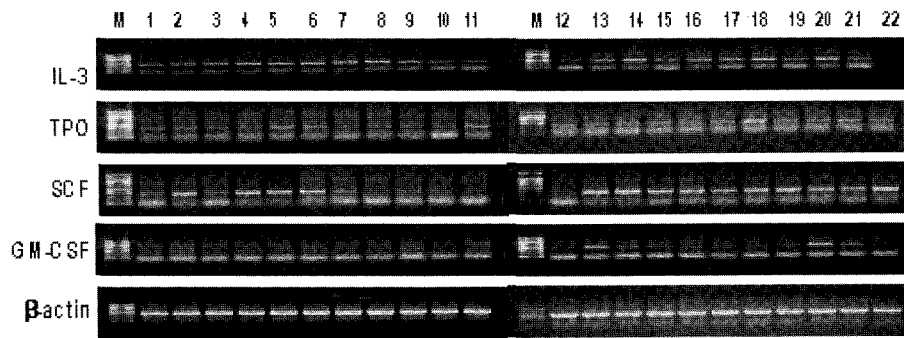


Fig. 1. Effect of upper part of six species of deer antlers on IL-3, TPO, SCF, GM-CSF, and β -actin mRNA expression (M : marker, 1,12: CD34⁺ Hematopoietic cells, 2,13:ConA + rIL3, 3:ND-1(100 μ g/ml), 4:ND-1(10 μ g/ml), 5: ND-1(1 μ g/ml), 6: NR-1(100 μ g/ml), 7:NR-1(10 μ g/ml), 8: NR-1(1 μ g/ml), 9:KD-1(100 μ g/ml), 10: KD-1(10 μ g/ml), 11:KD-1(1 μ g/ml), 14:KR-1(100 μ g/ml), 15:KR-1(10 μ g/ml), 16:KR-1(1 μ g/ml), 17:CM-1(100 μ g/ml), 18:CM-1(10 μ g/ml),19:CM-1(1 μ g/ml), 20:KM-1(100 μ g/ml), 21:CM-1(10 μ g/ml), 22:CM-1(1 μ g/ml)).

Table XII. Effect of upper part extract of six deer horns on the cytokine mRNA expression level in CD34⁺ hematopoietic stem cells in mice with leucopenia and thrombocytopenia induced by cyclophosphamide

Group	Cytokines mRNA expression (Ht)			
	IL-3	TPO	SCF	GM-CSF
CD34+Cells	102	127	86	61
ConA + rIL3	190	124	200	191
ND-1 (μ g/ml)	100	178	103	55
	10	197	103	53
	1	183	174	1
NR-1 (μ g/ml)	100	201	139	60
	10	196	109	53
	1	187	103	60
KD-1 (μ g/ml)	100	136	99	71
	10	112	108	52
	1	90	173	70
KR-1 (μ g/ml)	100	204	132	122
	10	133	133	98
	1	200	127	61
CM-1 (μ g/ml)	100	179	157	108
	10	206	187	61
	1	133	123	66
KM-1 (μ g/ml)	100	201	129	206
	10	110	154	125
	1	0	134	55

서 유의한 효과를 나타내었는데 이는 feed back mechanism 에 의한 것이라는 추측과 정상보다는 조혈장애를 당한 혈

액에 대해 녹용의 조혈효과가 더 있지 않은가 사려 되지만 이에 대한 명확한 기전은 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

정상 사람혈액에 대해 녹용의 조혈작용을 *in vitro*에서 평가하고, *in vivo*에서 cyclophosphamide로 유도된 조혈장애 생쥐 혈액에 대한 조혈관여 유전자인 IL-3, GM-CSF, TPO, c-mpl, SCF, c-kit 유전자 발현을 평가하였던 바 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 조혈집락형성 분석에서 골수성 백혈구 생성에 대해 국산 매화록 중대, 중국산 매화록 상대, 뉴질랜드 대륙 상대, 국산 대륙 중대 및 뉴질랜드 적록 중대가 대조군에 비해 유의한 증가를 보였지만, 적혈구 생성에 대해서는 국산 대륙 중대만이 유의적인 증가를 나타냈다.

2. 단기액상 배양을 통해 CD34⁺ 세포의 증식, 증폭, CXCR4 발현변동 및 형태학적 변화 관찰에서는 6종류의 녹용 상중하대간에 통계학적으로 유의성 있는 편차를 인정할 수 없었다.

3. 조혈유전자에 대한 효과에서 6종류 녹용 상대중에서 중국산 매화록 상대와 국산 매화록 상대는 TPO생성을 유효하게 촉진하였으며, 분자생물학적으로도 TPO, c-mpl, c-kit 등에서 비슷한 양상으로 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 일부 녹용 추출물의 조혈작용을 확인할 수 있었으며, 상대만이 유효하다는 설에 대해 중대도 상대보다 낮거나 버금가는 효과가 있을 수 있음을 실험적으로 제시하고 있으나, 여전히 향후 정상과 병리적 환자를 대상으로 한 임상연구와 지속적 기초 기전연구가 필요하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 식품안전청 2001년 연구비의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

인용문헌

- Suh, J.S. and Eun J.S. (1999) Phagocytic activity of ethyl alcohol fraction of deer antler in murin peritoneal macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **22(9)**: 932-935.
- Won, D.H. (1994) The review of the specification and the compositions of velvets, *Proc. Int. Symp. Cervi Parvum Cornu*, 12-25.
- 식품가공협회(2000) 식품첨가물공전. 식품가공협회, 1052.
- Testa N.G. and Molineux. G. (1993) Hemopoiesis, 37-38, Oxford University Press.
- Kim, S. H. and Kim. M. J. (1993) Biological effects of deer antler extracts on hematopoietic system, *Korean J of BRM.* **3(1)**: 23-30.
- Bae, D. S. (1975) Effects of velvet of different levels on weight gain, feed efficiency and development of organs of chickens. *Korean J of Anim. Sci.* **17**: 571-576.
- 王浴生(1983) 중약약리여응용. 인민위생출판사. 1090-1994.
- Vaziri, H., Schater, F., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D., and Harley, C.B. (1993) Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**: 661-667.
- Vaziri, H., Dranowska W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., and Lansdorp. P.M. (1994). Evidenced for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells : loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9857-9860.
- Shpall, E.J. and Jones, R.B. (1994). Release of tumor cells from bone marrow. *Blood*, **83**: 623-625.
- Flasshove, M., Banerjee, Debabraate, D., Mineishi, S., Li, M.A., Bertino, R., and Moore, M.A.S. (1995). Ex vivo expansion and selection of human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *blood.* **85**: 566-574.
- Schain, L., Hall, M., Jain, S., Okarma, T.B., and Lebkowski, J. (1995). Animal serum free culture of purified CD34⁺ cells yields expansions of multiple lineage progenitors for transfusion support (Abstract). 235. 2nd international meeting of ISHAGE.
- Bradley, T.R. and Metcal, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells *in vitro* Aust. *J. Exp. Biol. Med. Sci.* **44**: 287.
- Burgess, A.W., CAmakaris, J., and Metcalf, D. (1977). Purification and properties of 7-3. colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.*, **252**: 1998.
- Wong, G.G., Witek, J.S., and Temple, P.A. (1985). Human GM-CSF : molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, **228**: 810-815.
- Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Phys.* **91**: 335.
- Gartner, S. and Kaplan, H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 4756-4759.
- Moore, M.A.S. (1991). Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood*, **78**: 1.
- Moore, M.A.S. (1991). The future of cytokine combination therapy. *Cancer*, **67**: 2718-2716.
- Sheridan, W.P., Gegley, C.G., and Jutter, C. (1992). Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet.* **339**: 640-644.
- Shapall, E.J., Jones, R.B., and Bearman, S.I. (1994). Transplantation of enriched CD34 positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy : influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J. Clin. Oncol.*, **12**: 28-36.
- Brugger, W., Henschler, R., Heinfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsman, R., and Kanz, L.(1994) : Positively selected autologous blood CD34⁺ cells unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP-16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood*, **84**: 1421-1426.
- Srouf, E.F., Brandt, J.E., Briddell, R.A., Grigsby, S., Leemhuis, T., and Hoffman, R. (1993). Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells *in vitro*. *Blood.* **81**: 661-669.
- Koller, M.R., Emerson, S.G., and Palsson, B.O.(1993) Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood.* **82**: 378-384.
- Haylock, D.N., To, L.b., Dowse, T.L., Juttner, C.A., and Simmons, P.J. (1992). Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34⁺ cells into the myeloid lineage. *Blood*, **80**: 1405-1412.
- Henschler, R., Brugger, W., Luft, T., Frey, T., Mertelsmann, R., and Kanz, L. (1994) Maintenance of transplanatation potential in ex vivo expanded CD34⁺-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood.* **84**: 2898-2903.
- Sato, N., Sawada, K., Tarumi, T., Leko, M., Yasukouchi, T., Yamaguchi, M., Takahashi, T.A., Sikiyuchi, S., and Koike, T. (1993). *In vitro* expansion of human peripheral blood CD34⁺

- cells. *Blood*. **82**: 3600-3609.
28. Brugger, W., Mocklin, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsman, R., and Kanz, L. (1993). Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-3, interferon- γ , and erythropoietin. *Blood*. **81**: 2579-1584.
29. Shapiro, F., Yao, T.J., Raptis, G., Reich, L., Norton, L., and Moore, M.A.S. (1994). Optimization of conditions for ex vivo expansion of CD34⁺ cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood*. **84**: 3567-3574.
30. Hami, L., Greer, G., Greenfield, D., Steele, A., and Shapall, E. (1995) The ex-vivo expansion of CD34 purified cord blood progenitor cells (Abstract). 2nd International Meeting of ISHAGE, Proceeding, 235.
31. Brandt, J., Briddell, R.A., Srour, E.F., Leemhuis, T.B., and Hoffman, R. (1992). Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. **79**: 634-641.
32. Brugger, W., Heimfeld, S., Berenson, R., Mertelsmann, R., and Kanz, L. (1995) Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N. Engl. J. Med.* **333**: 283-287.
33. Miltenyi, S., Mueller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, **11**: 231-238.
34. Itoh K., et al. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol*, **17**: 145.
35. Issad C., et al. (1993). A murine stroma cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood*. **81**: 2916.
36. Sutherland H.J., et al. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood*. **74**: 1563.

(2003년 8월 9일 접수)