

刀豆의 조혈증진 작용에 관한 연구

김승형^{1#†}, 김근희^{2#†}, 지경엽², 조인식², 김한영², 이영철^{3*}

1 : 대전대학교 동서생명과학연구원

2 : 애경중앙연구소

3 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실

Enhancing effect of *Canavalia gladiata* DC semen on the hematopoietic expansion and function of stem cells

Seung-Hyung Kim^{1#}, Kunhoae Kim^{2#}, Gyeong-Yup Chi², In-Sik Cho², Han-Young Kim²
and Young-Cheol Lee^{3*}

1 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

2 : Central Research Laboratories of Aekyung industrial Co.,Ltd., Daejeon, Korea

3 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju 220-702, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : *Canavalia gladiata* DC semen (CGS) have been used to improve hematopoietic activity. In the current study, we investigated whether CGS regulate hemato-potentiating function using hematopoietic stem cells (HSCs) as a testing system.

Methods : HSCs isolated from femur in mice with leukopenia and thrombocytopenia induced induced by CTX. Then, Real-time PCR was performed to measure the mRNA expression and hematopoietic related gene (EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF), the phoaphorylation of GATA-1 and STAT-5a/b were observed by ELISA method, and the number of granulocyte erythrocyte monocyte macrophage colony-forming units (CFU-GEMM) and erythroid burst forming units (BFU-E), semisolid clonogenic assay was performed.

Result : When HSCs were treated with CGS, the expression of hematopoietic related genes (EPO, IL-3, SCF, c-kit, and GM-CSF) were significantly increased at the levels of mRNA as well as production in HSCs. Additionally, CGS enhanced phosphorylation of STAT-1 and signal transducer and activator of transcription-5a/b (STAT-5a/b) in HSCs. Furthermore, CGS significantly enhanced the growth rate of granulocyte erythrocyte monocyte macrophage colony-forming units (CFU-GEMM) and erythroid burst forming units (BFU-E) *in vitro*.

Conclusion : These result suggest that CGS has hematopoietic enhancement via hematopoietic cytokine-mediated GATA-1/STAT-5a/b pathway.

Key words : Hematopoietic, *Canavalia gladiata* DC semen, Cyclophosphamide, GATA-1, STAT-5a/b

서론

항암치료시 항암제는 골수의 조혈기능을 억제하여 골수 손상에 의한 백혈구 감소, 혈소판 감소, 빈혈 등이 일어나기 쉽

기 때문에 조혈기능을 강화하는 일도 중요하다¹⁾. 조혈작용(hematopoiesis)이란 골수에서의 세포증식 및 분화와 관련된 경로, 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell, HSC) 성장에 대한 필수적인 미세환경, 자가 재생 및 분화를 거쳐 HSC

*교신저자 : 이영철, 강원도 원주시 상지대길 83(우산동) 상지대학교 한의과대학 본초학교실 · Tel : 033-730-0672 · E-mail : lyc072@sangji.ac.kr

#제1저자 : 김승형, 대전광역시 동구 대학로 62 대전대학교 동서생명과학연구원 · Tel : 042-280-2642 · E-mail : sksh518@dju.kr

#제1저자 : 김근희, 대전광역시 유성구 신성동 217-2 애경중앙연구소 · Tel : 042-879-0190 · E-mail : kkh@aekyung.kr

†Contributed equally

· 접수 : 2012년 6월 19일 · 수정 : 2012년 6월 27일 · 채택 : 2012년 6월 28일

로부터 유래된 다양한 유형의 성숙한 기능성 혈액세포의 형성 작용으로 인체면역계의 항상성을 유지하는데 중요하다²⁻³⁾. 그래서 질병을 치료하기 위해 화학치료 및 방사선치료를 사용하고 있으나, 이는 조혈 줄기세포의 수를 감소시키기 때문에 암 환자의 질병을 오히려 더 진행시키는 부작용이 있다. 따라서, 이러한 부작용을 예방하거나 치료할 수 있는 조혈증진 천연 생약제제의 개발이 시급한 실정이다⁴⁻⁵⁾. HSC의 분화를 유도하는 조혈사이토카인은 stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), erythropoietin (EPO), granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), and interleukins (IL)-1, -3, -6, -7, 그리고 -11을 분비하는 공급원으로 기저세포(stromal cells)가 알려져 있고⁶⁾, 기저세포의 세포표면 분자와 조혈 줄기세포의 표면분자와의 상호작용으로 혈구형성이 조절된다고 보고하였다⁷⁻⁸⁾. 최근 연구에서 조혈 줄기세포의 분화에 GATA 단백질이 혈액 세포 발달에 필수적으로 조혈사이토카인의 유전자 활성이 제대로 조절되는데, GATA-1과 GATA-2라는 두 가지 신호전달단백질이 관여한다⁹⁻¹⁰⁾. 또한 Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)같은 전사인자가 신호전달통로를 활성화하는데, 이는 사이토카인 수용체-매개 세포간 신호전달(cytokine receptor-mediated intracellular signaling) 및 조혈 줄기세포의 성장 및 분화에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다¹¹⁻¹²⁾.

본초강목에 작두콩(*Canavalia gladiata* DC.)의 종자 (semen, 이것을 CGS라 칭한다)를 꼬투리가 작두날 모양 이어서 도두(刀豆)¹³⁾라고 하여 암¹⁴⁾, 모든 종기, 만성신장염, 그리고 빈혈 예방에 효과적이라 보고되었다¹⁵⁾. 그러나 CGS의 조혈증진에 관한 구체적인 작용기전 연구가 전무한 상태로 항산화 작용¹⁶⁾, 항균작용¹⁷⁻¹⁸⁾, 항당뇨¹⁹⁾ 등의 효능이 보고되었다.

본 연구에서는 CGS의 조혈 줄기세포 분화와 성장에 관련된 조혈증진 기전을 *in vitro*에서 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 도두추출물 분리

실험에 사용한 시약 및 기기는 재조합 IL-3 (rIL-3), SCF (rSCF), EPO (rEPO) 단백질과 ELISA kits 은 R&D Systems(Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Anti-GATA-1와 anti-STAT-5a/b은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Anti-phosphotyrosine (PY20) antibody는 EMD Chemicals (Gibbstown, NJ)에서, anti-Sca-1 MicroBead Kit는 Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Germany)에서, trichloroacetic acid, PBS는Sigma(USA)에서, 96 well plate (SPL, KOREA), BSA (amersco, USA), FBS (GIBCO, USA), USA), ELISA reader (Mediators PhL, Diagnostics systems, USA), CO₂ incubator (SANYO, Japan)등을 사용하였다.

또한 실험에 사용한 CGS는 대전대학교 부속한방병원에서

정선하여 구입한 후, 상지대학교 본초학교실 이영철 교수가 최종 검정하였다. 검정된 CGS (100g)를 열탕추출기에서 3시간 추출하여 얻은 추출액을 Kimtex wipers (유한김벌리, Korea)로 여과한 후 이를 감압증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japen)를 이용하여 완전 건조한 CGS추출물 (17.1g)을 대전대학교 한의과대학 중앙공동의학실 초저온냉동고 (-84℃)에 보관 (표본시료: CGS)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Leucopenia, thrombocytopenia 유발 및 조혈줄기세포 분리

C57BL/6 생쥐 (중앙실험동물, 한국)에 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. 분리된 골수세포를 제조사의 지시에 따라 Anti-Sca-1⁺ isolation MicroBead kit (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany)으로 조혈줄기세포를 분리하였다.

2. 방법

1) 세포독성

세포독성방법은 EZ-Cytox assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. 사람의 정상섬유아세포 (human fibroblast cells, hFCs)는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 CGS 추출물 (최종 농도 500, 250, 100, 50, 25, 10, 1 μg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 μl씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양한다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, U.S.A)에서 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

2) 조혈줄기세포 (Sca-1⁺)에서 조혈조절 유전자 분석

(1) RNA 추출

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1⁺ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 CGS (100 μg/ml, 10 μg/ml 및 1 μg/ml 농도) 추출물을 3시간동안 배양기 (37℃, 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 μl의 증류수에 녹여 real-time-PCR에 사용하였다.

(2) cDNA 합성

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg을 75℃에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl 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 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(3) Real-time RT-PCR은 Taqman probe PCR master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용한 총 RNA준비와 Real-time RT-PCR이 제조사 지시에 따라 시행되었다. 사용된 probe는 Table 1에 기술되어있다. 각각의 유전자에 관계된 mRNA 발현은 negative controlized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA의 레벨에 기준을 맞추었다. 실험은 3개 1조로 각각 독립하여 2회 시행하였으며, 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

Table 1. The Probes Used in Real-Time PCR

Mouse gene	Taqman probe sequence	Dye
GAPDH	5'-TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	VIC
EPO	5'-AGAAAAATGTCACGATGGGTGTGCA-3'	FAM
IL-3	5'-CCCTCTCTGAGGAATAAGAGCTTTC-3'	FAM
SCF	5'-CATTACAAAACCTGGTGGCAAATCTT-3'	FAM
c-kit	5'-TAGGGGCACTGCACCAGATCATCAC-3'	FAM
GM-CSF	5'-GCCCCCAACTCCGAAACGGACTG-3'	FAM

3) 조혈줄기세포 (Sca-1⁺)에서 조혈조절 단백질의 효소결합면역흡착 검사 (enzyme-linked immunosorbent assay)

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 CGS (100 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 1 μ g/ml 농도) 추출물 처리하고, 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 66 시간 동안 CO₂ 조직배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수, IL-3, SCF, 그리고 GM-CSF의 생산량을 R&D Systems에서 구입한 ELISA kits를 사용하여 제조사 지시에 따라 측정하였다.

4) CGS추출물에 의한 단백질 인산화 (protein phosphorylation)

(1) 세포배양 및 CGS추출물 처리

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 CGS (10 μ g/ml, 100 μ g/ml농도) 추출물을 20분 동안 동시 배양하였다.

(2) immunoblotting 및 면역침강 (immunoprecipitation)
CGS추출물을 처리한 세포의 cell lysates (\approx 20 μ g)에 각각 anti-phosphotyrosine, anti-GATA-1, anti-STAT-5a/b (10 μ g/ml)와 proteinA-sepharose를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시킨 후 3회 D-PBS로 세척하고, 면역복합체를 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane에 전이시켜 anti-phosphotyrosine-HRP (1: 4000)와 반응시켜 immunoblotting분석하였다.

5) 반고체 집락형성 분석(semisolid clonogenic assay)으로 조혈줄기세포 분화 효과 측정

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1+HSCs를 순수분리하여 35mm 플레이트중 rEPO 및 rIL-3이 포함된 돌베코 반고체 매트릭스 배양 배지 (Methocult H4100, StemCell Technologies)에 실시하였다. CGS (100 μ g/ml, 10 μ g/ml)를 처리한 지 14일 후에 콜로니 수를 inverted 현미경 (NIKON)으로 관찰하고 1 \times 10⁴ HSCs 당 콜로니 수를 계산하였다. 8개의 과립구 및 erythrocytes 또는 3개 이상의 erythroid cluster를 포함하는 콜로니를 CFU-GEMM 또는 BFU-E (Erythroid-committed Stem Cells)로 콜로니 형성상에서의 CGS의 상승 효과를 측정하였다.

6) 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 통계비교는 p<0.05의 unpaired two-tailed Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 최소한 2회 이상 시행되었다.

성적

1. 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 정상 사람 섬유아세포 (human fibroblast cells)에서 EZ-Cytox assay 분석한 결과, CGS 처리군은 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.

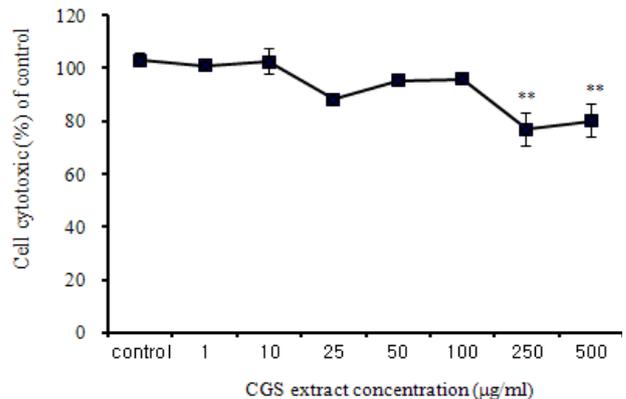


Fig.1. Cytotoxicity effects of CGS extract on human fibroblast cells(hFCs). Human fibroblast cells (hFCs) were pretreated with various concentration CGS extract. The results are expressed the mean \pm S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (***)p<0.001, (**p<0.01).

2. 조혈줄기세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석

HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA를 분석한 결과, 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF이 IL-3, SCF, GM-CSF, EPO 및 c-kit의 유전자 발현이 통계학적 유의성 있게 크게 증가하였다. 그리고 음성대조군에 비하여 CGS는 농도 의존적으로 EPO (Fig. 2A), IL-3 (Fig. 2B), SCF (Fig. 2C), GM-CSF (Fig. 2E), 및 c-kit (Fig. 2D)의 mRNA 발현을 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있다.

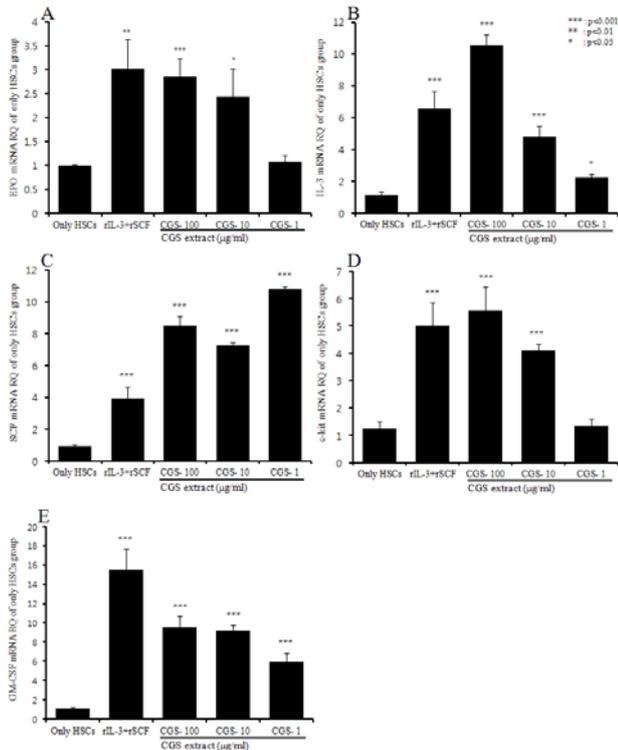


Fig.2. Effects of CGS extract on hematopoietic-related gene mRNA expression in hematopoietic stem cells.

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGS extract (100, 10, 1 μg/ml). HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGS extract for 4hrs. EPO (A), IL-3 (B), SCF (C), c-kit (D), and GM-CSF (E) mRNA express were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

3. 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석

HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 IL-3, SCF, GM-CSF의 생산량을 측정된 결과, 음성대조군에 비하여 양성대조군인

rIL-3+rSCF이 IL-3 (Fig. 3A), SCF (Fig. 3B), 그리고 GM-CSF (Fig. 3C)의 생산량이 통계학적 유의성 있게 현저히 증가하였다 (p<0.001). 그리고 음성대조군에 비하여 CGS는 100 μg/ml과 10 μg/ml농도에서 IL-3 (Fig. 3A), SCF (Fig. 3B), 그리고 GM-CSF (Fig. 3C)에서 통계학적 유의성 있게 생산량을 증가시키는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 CGS가 HSCs에서 조혈성사이토카인의 생산을 조절한다는 것을 알 수 있다.

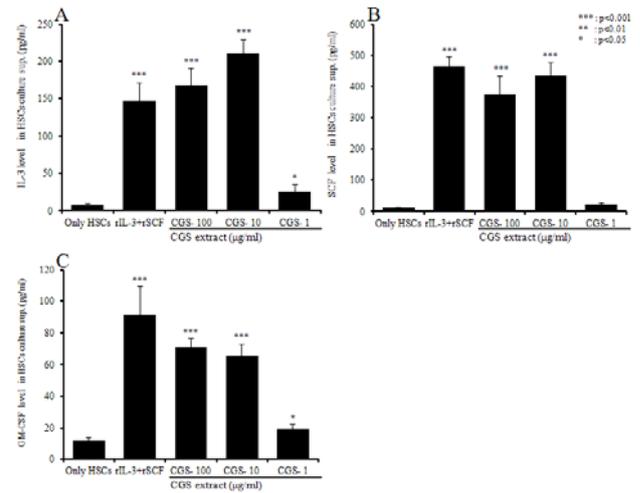


Fig. 3. Effects of CGS extract on hematopoietic-related gene expression production in hematopoietic stem cells.

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGS extract (100, 10, 1 μg/ml). HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGS extract for 72hrs. The production of IL-3 (A), SCF (B), GM-CSF (C) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4. 조혈줄기세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT-5의 인산화 활성 분석

HSCs에서 GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화를 분석한 결과, 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF이 GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화 (Fig. 4)가 증가되었다. 그리고 음성대조군에 비하여 CGS이 각각 농도 의존적으로 10 μg/ml, 100 μg/ml 농도에서 GATA-1/STAT-5a/b 경로를 활성 인산화 (Fig. 4)가 증가되었다.

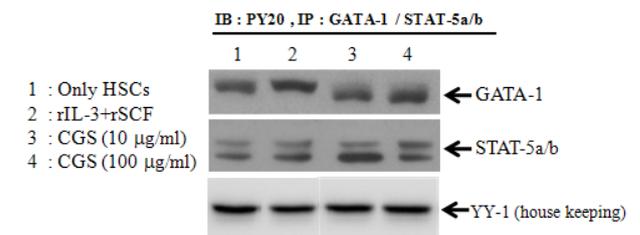


Fig.4. CGS extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 and STAT-5a/b in Sca-1⁺hematopoietic stem cells.

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGS extract (1, 10, 100 µg/ml). Sca-1⁺HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with CGS extract for 20 min. After 20min, then subjected to immunoprecipitation with α-GATA-1 (1:5000), α-STAT-5a/b (1:5000) and anti-phosphotyrosine-HRP (1:4000).

5. 반고체 집락형성 분석법으로 조혈줄기세포 분화 효과 측정

Sca-1⁺HSCs에서 CFU-GEMM과 BFU-E로의 분화 상승 효과를 분석한 결과, Fig. 5에서 보듯이 음성대조군에 비하여 대조군인 rIL-3+rEPO처리군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수는 12배 이상 증가 하였고, rIL-3+rEPO와 CGS 추출물을 100 µg/ml과 10 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군인 rIL-3+rEPO에 비하여 2.1배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다 (p<0.001). 그리고 BFU-E의 군락 수는 대조군에 비하여 100 µg/ml과 10 µg/ml농도인 CGS 추출물 처리군의 군락 수는 각각 3.7배와 2.6배로 이상 현저하게 유의성 있는 증가를 나타내었다 (p<0.001). 그러므로 CGS 추출물이 특히 BFU-E 을 증가시켜 적혈구계열 조혈전구세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.

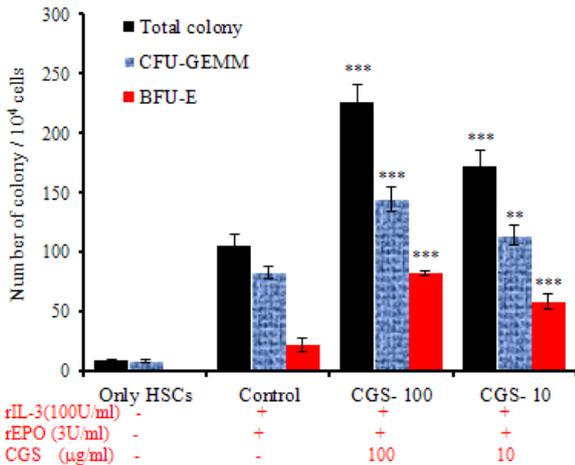


Fig.5. Effects of CGS extract of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine and CGS extract Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rEPO (3 U/ml) or treated with CGS extract (100, 10 µg/ml). Number and composition of hematopoietic colonies per 1x10⁴ Sca-1⁺HSCs after 14 days of culture in semi-solid medium.

고찰

항암화학요법에서 나타나는 부작용은 오심과 구토, 구내염, 설사, 변비등으로 암환자의 주된 고통들이다. 특히, 골수의 조혈세포를 억제하여 백혈구 감소증과 혈소판 감소증, 그리고 적혈구 감소에 의한 빈혈이 나타나, 이러한 증상을 치료 및 예방하기 위한 연구로 조혈유도인자를 조절하는 생약제들이

보고되었다²⁰⁻²⁴. 항암제는 골수의 조혈기능을 저하시키므로 약물 투여 후 일정기간 동안 혈액 세포의 생산이 감소하게 되고, 혈액세포의 수치가 낮아짐에 따라 각각의 혈액 세포의 기능도 저하되어 이로 인한 부작용이 발생할 수 있다²⁵. 그래서 조혈기능을 촉진하여 항암제에 의한 골수부전을 치료 및 예방하기 위한 연구를 수행하여 刀豆의 조혈증진기전을 연구하게 되었다. 대부분의 혈구 형성은 골수에서 일어나고 있는 혈구 형성 (hematopoiesis)과정중 다분화능 (pluripotent)이 있는 조혈모세포 (hematopoietic stem cell) 및 기질조직에서 형성된다²⁶. 골수에서 기질조직은 조혈세포의 증식, 분화 및 이동을 조절하는 주요한 역할을 한다²⁷⁻²⁸. 조혈과정에 영향을 미치는 골수조직은 조혈세포, 기질세포 및 세포외기질로 이루어져 있으며, 세포외기질은 조혈세포가 아닌 기질세포 (stroma cell)가 분비한다²⁹⁻³⁰. 세포외기질은 glycoproteins, proteoglycans 및 교원질 등으로 구성되어 있고 조혈줄기세포들 (hematopoietic progenitor cells)의 세포접착(cell adhesion)과 성숙조혈세포등을 조절하는데 직접적으로 관련되어 있다고 하였다³¹⁻³². 혈구들은 혈구형성과정에서 조절되며 또한 골수 미세환경에서 조혈성 사이토카인 (IL-3, EPO, TPO, SCF, GM-CSF등) 유전자 발현의 증가로 혈구형성이 촉진되는 것으로 알려져 있다³³⁻³⁴. 혈구형성과정중 골수세포들의 분화 조절은 다양한 단계에서 특이성을 나타내는 조혈성 사이토카인들과의 복합적인 작용들에 의하여 이루어진다³⁵. Kalechman등 (1995)은 골수세포에 AS101를 농도별로 처리하여 SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6의 유전자 발현이 증가됨을 확인하였다³⁶. 우리의 연구에서 CTX로 골수부전을 유발한 후 골수에서 Sca-1+ 조혈줄기세포를 순수분리하여 刀豆 추출물과 동시배양하여 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA 유전자 발현과 IL-3, SCF, GM-CSF 생산량을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과는 刀豆가 조혈줄기세포에서 조혈성 사이토카인의 생산 및 조혈 사이토카인의 신호전달기전을 조절한다는 것을 알 수 있었다. 조혈계 기원세포 (Commitment hematopoietic progenitor cell)는 조혈줄기세포로부터 분화되며, 단계별로 여러 계열의 세포로 분화가 가능한 세포(CFU-GEMM, CFU-GM 등), 단일계열 세포로만 분화가 가능한 세포(CFU-G, CFU-E, BFU-E, CFU-MK 등)로 나눌 수 있다³⁷. 조혈모세포나 초기 다기능 분화 원기세포에서는 특이한 전사인자의 활성화가 초래 (GATA-1, PU.1)되며 이러한 인자의 발현 및 기능의 활성화로 특이한 성장인자 수용체의 발현이 증가되며 더 이상의 분화는 전사인자에 의해 조절되는 다른 분화 유전자의 up-regulation 혹은 down-regulation을 초래된다³⁸. 조혈성 사이토카인들은 신호전달에 의해 유전자발현이 유도되는데, 대표적으로 JAK-STAT 경로를 거치게 된다³⁹. 세포신호전달 중 JAK-STAT 경로는 ligand와 수용체의 결합으로 활성화된 protein tyrosine kinase인 JAK (Janus kinase) family kinase와 유전자 전사조절 단백질인 STAT (signal transducer and activator of transcription)에 의해 이루어지는데, STAT family는 6개로 구성되는데 STAT1 (p91/p84), STAT2 (p113), STAT3 (p92), STAT4 (p89), STAT5 (p91), 그리고 STAT6 (p94)로 밝혀졌다⁴⁰. JAK-STAT의 대표적인 경로는 interferon-α (IFN-α)와 interferon-γ (IFN-γ)에 의해 활성화된 JAK kinase에 의

해 STAT이 다시 활성화되어 핵내로 translocation이 일어나 각기 다른 DNA 전사조절부위에 결합한다⁴¹⁾.

최근 연구에서 적혈구계 발달에 있어서 GATA-1이 활성화되어 (PU.1은 억제됨) erythropoietin 수용체를 포함한 여러 표적 유전자를 자극함으로써 BFU-E의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴²⁻⁴³⁾.

우리 연구에서는 刀豆가 조혈줄기세포에서 GATA-1과 SATA-5a/b 활성 인산화율을 증가시키고, semisolid clonogenic assay에서 상대적으로 CFU-GEMM 보다는 적혈구계 발달로 분화되는 BFU-E 비율이 증가되어 적혈구계의 성장 촉진 유도가 증명되었다. 계속된 연구로 조혈작용을 증진하는 刀豆의 생체반응조절물질 (biological response modifiers)로 작용하는활성성분을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

암환자에 있어서 항암치료에 의한 골수부전으로 혈구감소 증등의 부작용을 줄여줄 조혈 촉진 천연물인 刀豆에 관한 조혈증진 시험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. CTX로 골수부전이 유도된 생쥐의 골수에서 Sca-1+조혈줄기세포를 분리한 후 刀豆에 대한 조혈증진 효과를 관찰하여 刀豆 추출물과 동시배양하여 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA 유전자 발현과 IL-3, SCF, GM-CSF 생산량을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과는 刀豆가 조혈줄기세포에서 조혈성 사이토카인의 생산 및 조혈 사이토카인의 신호전달기전을 조절한다는 것을 알 수 있었다. 또한 刀豆가 조혈줄기세포에서 GATA-1과 SATA-5a/b 활성 인산화를 증가시키고, 조혈줄기세포 분화에서 상대적으로 CFU-GEMM 보다는 적혈구계 발달로 분화되는 BFU-E로의 적혈구계의 성장 촉진 유도됨을 증명하였다. 향후 연구로 조혈작용을 증진하는 刀豆의 활성성분을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발 [과제번호 F1801]에 의해 수행되었는 바 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hornung RL, Longo DL. Hematopoietic Stem Cell Depletion by Restorative Growth Factor Regimens During Repeated High-Dose Cyclophosphamide Therapy. *Blood*. 1992 ; 80(1) : 77-83.
- Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 1984 ; 12 : 517-21.
- 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 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993 ; 81 : 2579-84.
- Gardner RV, McKinnon E, Poretta C, Leiva L. Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J Immunol*. 2003 ; 171 : 1202-6.
- Slovak ML, Bedell V, Lew D, Albain KS, Ellis GK, Livingston RB, Martino S, Perez EA, Hortobagyi GN, Sher D, Stock W. Screening for clonal hematopoiesis as a predictive marker for development of therapy-related myeloid neoplasia (t-MN) following neoadjuvant therapy for breast cancer: a Southwest Oncology Group study (S0012). *Breast Cancer Res Treat*. 2010 ; 119 : 391-8.
- 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 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993 ; 81 : 2579-84.
- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. *Exp. Hematol*. 1990 ; 18(7) : 837-842.
- Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 1984 ; 12(7) : 517-21.
- Halsey C, Tunstall O, Gibson B, Roberts I, Graham G.. Role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1. *Blood*. 2010 ; 115(16) : 3415-6.
- Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *PNAS* . 2003 ; 100 : 8811-6.
- Nosaka T, Kitamura T. Janus kinases (JAKs) and signal transducers and activators of transcription (STATs) in hematopoietic cells. *Int J Hematol*. 2000 ; 71 : 309-319.
- Watson CJ, Burdon TG. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev Reprod*. 1996 ; 1 : 1-5.
- Li Shizhen, *Compendium of Materia Medica*. Vol. 24 : 874.
- Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from *Canavalia gladiata*, a dietary legume. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ; 330(4) : 1268-74.

15. Ekanayake S, Skog K, Asp NG. Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food Chem Toxicol*. 2007 ; 45 : 797-803.
16. Kim KA. Screening of Antioxidants from *Canavalia gladiata* DC. Master program in Department of food Engineering Graduate School Of KonKuk University. 2000 ; 22 : 7-13.
17. Park JH. Separation and purification of the antifungal antibiotic from *Canavalia gladiata*. Graduate school of Kangwon National University. Department of Bioengineering and Technology. 2005.
18. Pugalenthi M, Doss A, Rajendrakumaran D, Vadivel V. Antibacterial activity of *Canavalia ensiformis* L,DC seeds due to solvent extract and fraction method. *Indian Journal of Science and Technology*. 2010 ; 3(1) : 94-5.
19. Nimenibo-Uadia R. Effect of aqueous extract of *Canavalia ensiformis* seeds on hyperlipidaemia and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biokemistri*. 2003 ; 15(1) : 7-15.
20. Kim SH, Lim JS. Effects of Korean Traditional Medicine on Murine Hematopoiesis (I) Regulation of Hematopoietic Cytokine Expression. *Immunenetwork*. 1999 ; 21(2) : 165-74.
21. Kim SH, Lee HJ, Park JL, Kim HN, An GS, Jo DY, Choi DW. Effect of Deer Antler Extracts from Various Origins and Parts on the Hemopoietic Actiivity. *Kor. J. Pharmacogn*. 2004 ; 35(1) : 6-15.
22. Yoo JY, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The Effect of DanSamSaMul-Tang on Hematopoiesis. *J Kor Ori Med*. 2002 ; 23(1) : 145-155.
23. Seo YB, Lee YK, Lee YC, Lee TW. Experimental Studies on the Hematopoietic Effects of the *Pseudostellariae Radix*. *Kor J Herbol*. 2002 ; 17 : 113-29.
24. Jun JH, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. Effects of Korean Traditional Medicine on Murine Hematopiesis (Regulation of Hematopoietic Cytokine & CD34⁺ cell Expression). *J Kor Ori Med*. 2001 ; 22(3) : 156-68.
25. Shalit I, Kletter Y, Halperin D, Waldman D, Vasserman E, Nagler A, Fabian I. Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamideinduced leukopenia. *Eur J Haematol* 2001 ; 66 : 287-96.
26. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1977 ; 91(3) : 335-44.
27. Dexter TM, Coutinho LH, Spooncer E, Heyworth CM, Daniel CP, Schiro R, Chang J, Allen TD. Stromal cells in haemopoiesis. *Ciba Found Symp*. 1990 ; 148 : 76-95.
28. Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 1995 ; 770 : 70-78.
29. Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R, McCarthy JB. Role of bone marrow matrix in negative control and abnegative control hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994 ; 16 : 201-24.
30. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*. 1995 ; 51 : 914-26.
31. Fernandez M, Minguell JJ. Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996 ; 212 : 313-23.
32. Whitton AD, Spooncer E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 ; 10 : 721-6.
33. Guerriero A, Worford L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow cells. *Blood*. 1997 ; 90 : 3444-55.
34. Banu N, Wang JF, Deng B, Groopman JE, Avraham H. Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: The c-Mpl ligand. *Blood*. 1995 ; 86 : 1331-8.
35. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 1997 ; 90 : 1345-1364.
36. Kalechman Y, Albeck M, Oron M, Sobelman D, Gurwith M, Horwith G, Kirsch T, Maida B, Sehgal SN, Sredni B. Protective and restorative role of AS101 in combination with chemotherapy. *Cancer Res*. 1991 ; 51: 1499-503.
37. Abkowitz JL, Catlin SN, Gutterop P. Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nat Med*. 1996 ; 2 : 190-7.
38. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005 ; 25 : 1215-27.
39. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in negative control and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000 ; 95(1) : 19-29.
40. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 ; 13(2) : 211-7.
41. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004 ; 117 : 1281-3.
42. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and Erythropoietin Cooperate to Promote Erythroid Cell Survival by Regulating bcl-xL Expression. *Blood*. 1999 ; 94 : 87-96.

43. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*, 2006 ; 107(3) : 907-15.