

Sca-1⁺골수조혈세포에서 JAK2/STAT5/GATA-1 신호전달 경로를 통한 다채, 도두 그리고 두 조합물에 의한 조혈증진 조절에 관한 연구

김근희^{1#}, 김승형², 조인식¹, 김한영¹, 김동선³, 이영철^{4*}

1 : 애경중앙연구소, 2 : 대전대학교 동서생명과학연구원,
3 : 한국한의학연구원, 4 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실

Studies on the regulation of Hematopoietic enhancement of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription via Jak2/STAT5/GATA1 Pathway in Sca-1⁺ hematopoietic stem cells

Kunhoae Kim^{1#}, Seung-Hyung Kim², In-Sik Cho¹, Han-Young Kim¹, Dong-Seon Kim³,
Young-Cheol Lee^{4*}

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

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

3 : Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

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

ABSTRACT

Objectives : *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD) and their combinational prescription (BCN+CGD) have been use to demonstrate to regulate hematopoiesis. In the current study, we investigated whether *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription is related to hemato-potentiating function using Sca-1⁺ hematopoietic stem cells (Sca-1⁺HSCs) as a testing system.

Methods : Sca-1⁺HSCs isolated from femur in C57bl/6 mice with leukopenia and thrombocytopenia induced by cyclophosphamide (CTX). Then, Real-time PCR was performed to measure the mRNA expression, ELISA and haematopoiesis-related gene (EPO, TPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF), the phosphorylation of JAK2, GATA-1 and STAT-5a/b were observed by western blot, and the numbers of CD117⁺/Sca-1⁺ cell 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 Sca-1⁺HSCs were treated with *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription with rIL-3/rSCF, the expression of haematopoiesis-related (EPO, TPO, IL-3, SCF, c-kit, and GM-CSF) were significantly increased at the levels of mRNA as well as production in Sca-1⁺HSCs. Additionally, CGS enhanced phosphorylation of JAK2, GATA-1, and signal transducer and activator of transcription-5a/b (STAT-5a/b) in Sca-1⁺HSCs. Furthermore, their combinational prescription (BCN+CGD) 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 *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN) and *Canavalia gladiata* DC have hematopoietic enhancement via hematopoietic cytokine-mediated JAK2/GATA-1/ STAT-5a/b pathway, and their

*교신저자 : 이영철, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 033-730-0672 · E-mail : lyc072@sangji.ac.kr

#제1저자 : 김근희, 대전광역시 유성구 신성동 217-2 애경중앙연구소

· Tel : 042-879-0190 · E-mail : kkh@aekyung.kr

· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 19일 · 채택 : 2013년 7월 20일

combinational prescription (BCN+CGD) has superior hematopoietic enhancement to those of individual extracts,

Key words : Hematopoietic, *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, Cyclophosphamide, JAK2, GATA-1, STAT-5a/b

서론

대부분의 항암제는 골수에 작용하여 혈구를 만들어 내는 능력을 감소시키고, 따라서 골수에서 생성되는 백혈구, 혈소판, 그리고 적혈구를 비롯하여 머리카락세포, 위장관의 상피세포, 정자 난자를 만들어내는 생식세포 등이 손상된다. 이에 따라 백혈구 감소로 침입하는 균을 죽이지 못하므로 감염이 잘되어 병에 대한 면역력이 약해지고, 입안이 헐고, 구토, 설사, 머리카락 빠짐, 생식기능 장애 등의 부작용이 생긴다¹⁾. 조혈작용(hematopoiesis)은 골수 내에 있는 조혈모세포(hematopoietic stem cells, HSCs)가 분화되어 성숙한 혈액세포(mature blood cells)가 되는 과정이며, 이는 조혈모세포의 성장과, 자기복제(self-renewal), 분화(differentiation)에 의해 조절되는 미소서식 환경으로, 조혈작용은 인체의 항상성을 유지하는데 매우 중요하다. 그러므로 화학요법 또는 방사선 요법중 이러한 조혈작용의 손상을 최소화하고, 회복하는 것은 반드시 필요하다. 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 실정이다²⁾. 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 보고하였다³⁻⁴⁾.

최근 연구에서 조혈 줄기세포의 분화에 GATA 단백질이 혈액 세포 발달에 필수적으로 조혈사이토카인의 유전자 활성이 제대로 조절되는데, GATA-1과 GATA-2라는 두 가지 신호전달단백질이 관여한다⁵⁻⁶⁾. GATA 단백질은 혈액 세포 발달에 필수적인 물질이다. 이 단백질이 있어야만 혈액 세포 발달에 관여하는 유전자 활성이 제대로 조절될 수 있다. 조혈 줄기세포의 분화에는 GATA-1과 GATA-2라는 두 가지 세포가 관여한다. GATA-2 단백질은 조혈 줄기세포가 전구세포로 분화하는 데 필요하다. 이와 달리 GATA-1이란 단백질은 전구세포로부터 특정 혈액세포가 형성되는 데 필요하다. 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 보고되었다⁷⁾.

다채 (*Brassica campestris* var *narinosa*, BCN, Tatsoi)는 십자화과에 속하는 녹황색 채소이다. 비타민 성분이 많이 함유되어, 비타민 또는 비타민채라고도 한다. 본래는 포기를 크게 키우는 것이지만, 우리나라에서는 주로 싹기름채소(새

싹채소)로 이용된다. 비타민A의 전구체인 카로틴의 함량이 시금치의 2배나 되며, 대채 100g에 성인 하루 비타민 필요량의 80%를 함유하고 있어, 조혈 작용을 돕고 혈액 순환을 좋게 하여, 빈혈을 예방한다고 보고하고 있다⁸⁾.

작두콩(*Canavalia gladiata* DC, CGD)의 종자(semen)를 꼬투리가 작두날 모양 이어서 도두(도두)⁹⁾라고 하여 암¹⁰⁾, 모든 종기, 만성신장염, 그리고 빈혈 예방에 효과적이라 보고되었다¹¹⁾. 또한 이소플라본(isoflavone) 중에서 제니스틴(genistin)이 항암효과와 폐경기여성의 증상 완화가 보고되어 있다¹²⁾. 그러나 다채와 도두의 조혈증진에 관한 구체적인 작용기전 연구가 전무한 상태로 항산화 작용¹³⁾, 항균작용¹⁴⁾, 항당뇨¹⁵⁾ 등의 효능이 보고되었다.

본 연구에서는 다채, 도두 그리고 두 조합물의 조혈 줄기세포 분화와 성장에 관련된 조혈증진 기전을 in vitro에서 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 다채, 도두추출물 분리

실험에 사용한 시약 및 기기는 재조합 IL-3 (rIL-3), SCF (rSCF), EPO (rEPO) 단백질과 ELISA kits은 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, PBS는 Sigma(USA)에서, 96 well plate (SPL, KOREA), BSA (ameresco, USA), FBS (GIBCO, USA), ELISA reader (Mediators PhL, Diagnostics systems, USA), CO2 incubator (SANYO, Japan)등을 사용하였다. 또한 실험에 사용한 다채와 도두는 대전대학교 부속한방병원에서 정선하여 구입한 후, 상지대학교 본초학교실 이영철 교수가 최종 검정하였다. 검정된 다채 (200g)와 도두 (200g)를 분쇄하여 ASE300 ACCELERATEDSOLVENT EXTRACCOR (DIONEX Co, UNSA)에서 30%에탄올 (1.5L)에 3일간 침지한 후 50℃에서 20분간 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 건조하여 얻어진 추출여액을 Freezing dryer (Biotrn Co., USA)에서 cold trap -70℃와 chamber 온도 40℃에서 24시간 동안 동결 건조하여 다채 추출물 (26.5g)과 도두 추출물 (24.2g)을 대전대학교 한의과대학 중앙공동의학실 초저온냉동고 (-84℃)에 보관 (표본시료: BCN-30EtOH) & CGS-30EtOH)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 그리고 두 조합물(BCN+CGS)은 다채 추출물과 도두 추출물을 1:1로 혼합하여 제조하였다.

2) Leucopenia, thrombocytopenia 유발 및 조혈줄기 세포 분리

C57BL/6 생쥐 (대한바이오링크, 한국)에 cyclophosphamide (CTX, 100 mg/kg)를 복강 주사 4일 후 대퇴골에서 골수 (bone marrow, BM)를 채취하여 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 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) HPLC 분리 및 지표성분 연구

다채와 도두 추출물 분석을 위한 HPLC (Waters 2695 system, Waters Co, USA)는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Germany), degasser(Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25 °C, 분석과장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column (250mm x 4.6 mm; particle size 5 μm, Phenomenex, USA)를 사용하였다. A용매로 0.1% trifluoroacetic acid 함유 3차 증류수 및 B용매로 아세트니트릴을 사용하였으며, 용매 구배 조건은 다음과 같다 (Table 1). 다채와 도두의 조합물의 지표성분으로 Genistin을 표준시료로 하여 함량분석을 하였다.

Table 1. Solvent gradient condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A ^a	B ^b
0	1.0	90	10
10	1.0	90	10
40	1.0	60	40
41	1.0	0	100
48	1.0	100	0
50	1.0	90	10
60	1.0	90	10

^aWater with 0.1% trifluoroacetic acid

^bAcetonitrile

2) 세포독성

세포독성방법은 EZ-Cytox assay법¹⁶⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. 사람의 정상섬유아세포 (human fibroblast cells, hFCs)는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 다채, 도두 그리고 두 조합 추출물 (최종 농도 500, 250, 100, 50, 25, 10, 1 μg/ml)을 48 시간 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 5 분간 shaking하고 ELISA reader (molecular devices, U.S.A)에서 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

3) 조혈줄기세포 (Sca-1⁺)에서 조혈조절 유전자 분석

(1) RNA 추출

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4 일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여

Sca-1⁺HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채 (50 μg/ml, 10 μg/ml 농도), 도두 (50 μg/ml, 10 μg/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 μg/ml, 20 μg/ml 농도) 추출물을 3시간 동안 배양기 (37°C, CO₂, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNazolB를 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°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl의 M-MLV RT (200 U/μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 이 20 μl의 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 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 ± 표준오차로 나타내었다.

Table 2. The Probes Used in Real-Time PCR

Mouse gene	Taqman probe sequence	Dye
GAPDH	5'-TGCATCTGCACCACTGCTTAG-3'	VIC
EPO	5'-AGAAAATGTCACGATGGGTGTGCA-3'	FAM
TPO	5'-TAGGGGCACTGCACAGATCATCAC-3'	FAM
IL-3	5'-CCCTCTCTGAGGAATAAGAGCTTTC-3'	FAM
SCF	5'-CATTACAAAACCTGGTGGCAAATCTT-3'	FAM
c-kit	5'-TAGGGGCACTGCACAGATCATCAC-3'	FAM
GM-CSF	5'-GCCCCCAACTCCGAAACGGACTG-3'	FAM

4) 조혈줄기세포 (Sca-1⁺)에서 조혈조절 단백질의 효소 결합면역흡착 검사 (enzyme-linked immunosorbent assay)

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4 일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1+HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는

rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채 (50 μ g/ml 농도), 도두 (50 μ g/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 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.

5) 조혈줄기세포 (Sca-1⁺)에서 형광 유세포 분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1⁺ isolation kit를 이용하여 Sca-1⁺HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채 (50 μ g/ml 농도), 도두 (50 μ g/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 μ g/ml 농도) 추출물 처리하고, 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 24 시간 동안 CO₂ 조직배양기에서 배양하였다. 배양한 후 상등액을 제거한 다음 Sca-1⁺HSCs세포를 5 × 10⁵ Cells/ml 세포로 조정된 후 4°C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였으며, 각각에 anti-CD117-FITC와 anti-Sca-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD117⁺Sca-1⁺ 활성세포수를 백분율(%)로 분석 산출하였다.

6) 다채, 도두 그리고 두 조합물에 의한 단백질 인산화 (protein phosphorylation)

(1) 세포배양 및 다채, 도두 그리고 두 조합물 처리

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1⁺ isolation kit를 이용하여 Sca-1⁺HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채 (50 μ g/ml 농도), 도두 (50 μ g/ml 농도) 그리고 두 조합물 (100 μ g/ml 농도) 추출물을 20분 동안 동시 배양하였다.

(2) immunoblotting 및 면역침강 (immunoprecipitation)

다채, 도두 그리고 두 조합물을 처리한 세포의 cell lysates (\approx 20 μ g)에 각각 anti-phosphotyrosine, anti-GATA-1, anti-STAT-5a/b (10 μ g/ml)와 protein A-sepharose를 첨가하여 4°C에서 4시간 반응시킨 후 3회 D-PBS로 세척하고, 면역복합체를 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane에 전이시켜 anti-phosphotyrosine-HRP (1: 4000)와 반응시켜 immunoblotting 분석하였다.

7) 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 플레이트즈 rEPO 및 rIL-3이 포함된 돌베코 반고체 매트릭스 배양 배지 (Methocult

H4100, StemCell Technologies)에 실시하였다. 다채 (50 μ g/ml 농도), 도두 (50 μ g/ml 농도) 그리고 두 조합물 (100 μ g/ml 농도)를 처리한지 14일 후에 콜로니 수를 inverted 현미경 (NIKON)으로 관찰하고 1x10⁴ 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 각각의 다채와 도두 보다는 두 조합물의 상승 효과를 측정하였다.

8) 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.

결 과

1. 지표성분 분석

본 실험에 사용한 다채와 도두는 대전대학교 부속한방병원에서 정선하여 구입한 후 추출물을 분리하였다. HPLC-DAD 분석을 통하여 도두 (CGD) 추출물 성분에 함유된 지표성분을 동정하였다. 지표성분으로 확인된 genistin 표준품의 UV spectrum과 머무름 시간이 일치하는 도두 (CGD) 추출물의 genistin (Fig. 1A)의 패턴을 확인하여 지표성분을 동정하였고, 마찬가지로 다채 (BCN)와 도두 (CGD)의 조합물 (Fig. 1B)에서도 지표성분을 확인하였다. 함량을 분석한 결과 (Table 3) 도두 (CGD) 추출물의 genistin 함량은 0.063 (mg/g)이었고, 다채 (BCN)와 도두 (CGD)의 조합물의 genistin 함량은 0.035 (mg/g)로 나타났다. Genistin은 최근에 면역반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 효능이 보고되어 다채 (BCN)와 도두 (CGD)의 조합물의 지표성분과 활성성분이 일치하였다.

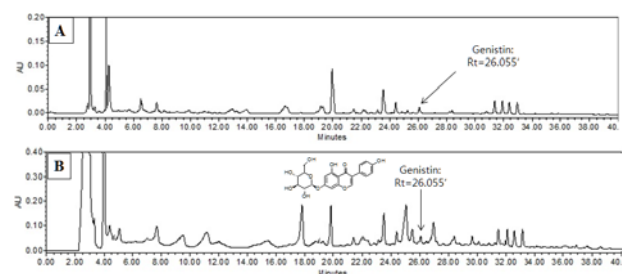


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard mixture and extract of the *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription. Chromatograms of *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, A) and *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN) and *Canavalia gladiata* DC semen 1:1 mixed (B) are recorded at 259 nm. Peaks of Genistin are shown. The HPLC analysis was carried out on Waters 2695 system (Waters Co. Milford, MA, USA), consisting of a solvent delivery unit, an online degasser, an autosampler, and a photodiode array detector. A Luna C18 column (250mm x 4.6 mm; particle size 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used for analysis, and the mobile phase 0.1% trifluoroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B). The gradient flow was as follows: (A)/(B) = 10/90 (0 min; hold for 10 min) \rightarrow (A)/(B) = 60/40 (40 min) \rightarrow (A)/(B) = 0/100 (41 min; hold for 7 min) \rightarrow (A)/(B) = 10/90 (50 min; hold for 10 min). The flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 20 μ L.

Table 3. Index Components in Quality of the *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract.

Component	Concentration (mg/ml)	Rt (min)	Area	Genistin content (%)	Genistin content (mg/g)
Genistin	0.1	26.048	31,588	100	
CGD	20	26.055	98,845	0.0063	0.063
BCN+CGD (1:1 mixed)	20	26.055	54,914	0.0035	0.035

2. 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 정상 사람 섬유아세포 (human fibroblast cells)에서 EZ-Cytox assay 분석한 결과, 다채추출물 (BCN)은 250 µg/ml 이상에서부터 세포독성이 나타났고, 도두 (CGD)와 두 조합물 (BCN+CGD) 처리군은 500 µg/ml 이상에서부터 세포독성이 나타났다.(Fig.2) 그래서 in vitro에서 Sca-1⁺HSCs에서 조혈증진관련 실험은 세포독성이 나타나지 않은 100 µg/ml 이내에서 수행하였다.

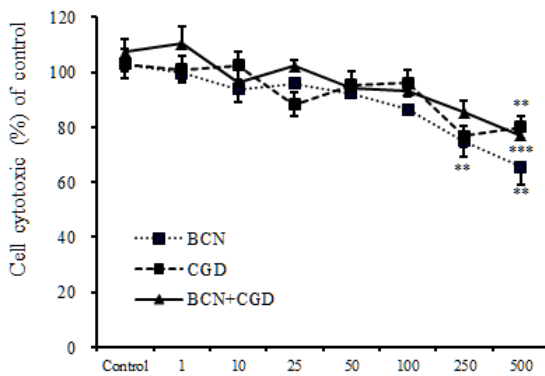


Fig.2. Cytotoxicity effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on human fibroblast cells (hFCs). Human fibroblast cells (hFCs) were pretreated with various concentration *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (***p<0.001, **p<0.01).

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

Sca-1⁺HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 EPO, TPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA를 분석한 결과, 무처리 군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군이 EPO, TPO, IL-3, SCF, GM-CSF 및 c-kit의 mRNA 유전자 발현이 2배 이상 증가하였다. 대조군 (control)에 비하여 다채 (BCN) 추출물은 EPO (Fig. 3A)(p<0.05), TPO (Fig. 3B)(p<0.01), 그리고 SCF (Fig.3E) (p<0.01)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그리고 대조군 (control)에 비하여 도두 (CGD) 추출물은 EPO (Fig. 3A)(p<0.01), TPO (Fig. 3B)(p<0.001), IL-3 (Fig. 3C)(p<0.01), SCF (Fig. 3E)(p<0.001), 그리고

c-kit (Fig.3F) (p<0.05)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 또한 다채와 도두의 조합물은 대조군 (control)에 비하여 EPO (Fig. 3A)(p<0.001), TPO (Fig. 3B)(p<0.001), IL-3 (Fig. 3C) (p<0.001), GM-CSF (Fig. 3D)(p<0.001), SCF (Fig. 3E)(p<0.01), 그리고 c-kit (Fig.3F) (p<0.01)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 볼 때 두 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 조혈증진관련 유전자 발현에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다.

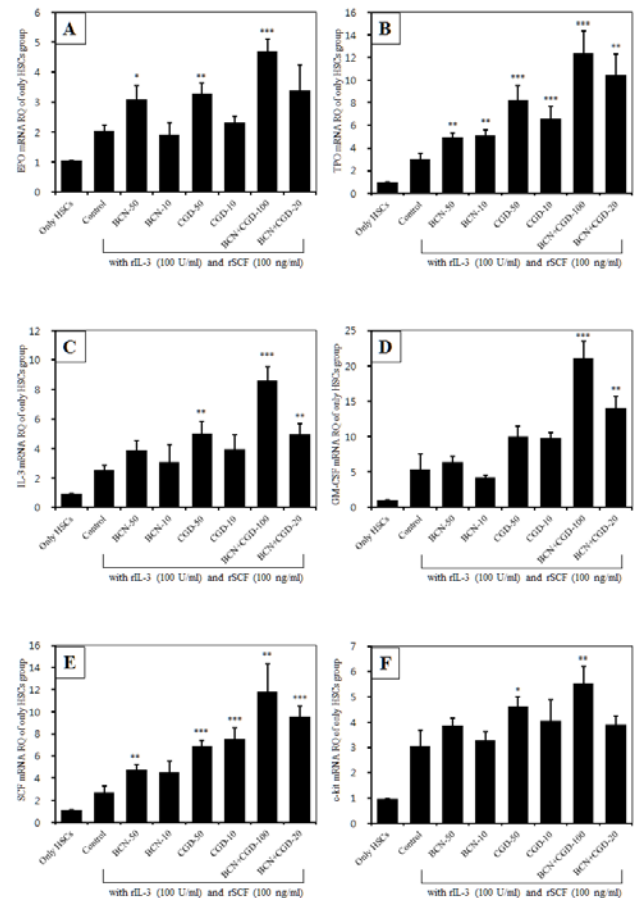


Fig.3. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on hematopoietic-related gene mRNA expression in Sca-1⁺hematopoietic stem cells.

Isolated Sca-1⁺hematopoietic stem cells (Sca-1⁺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 *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract (100, 20 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1⁺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 *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100, 20 µg/ml) for 4hrs. EPO (A), TPO (B), IL-3 (C), GM-CSF (D), SCF (E), and c-kit (F) mRNA express were measured real-time PCR. Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only Sca-1⁺HSCs group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

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

Sca-1⁺HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 TPO, IL-3, SCF의 생산량을 측정된 결과, 대조군 (control)에 비하여 다채 (BCN) 추출물은 SCF (Fig. 4C) (p<0.05)와 도두 (CGD) 추출물은 TPO (Fig. 4A) (p<0.001)와 SCF (Fig. 3C) (p<0.01)의 단백질 생산량이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 또한 다채와 도두의 조합물 (BCN+CGD)은 대조군 (control)에 비하여 TPO (Fig.4A) (p<0.001), IL-3 (Fig.4B) (p<0.01), 그리고 SCF (Fig.4C) (p<0.001)의 단백질 생산량이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 조혈성사이토카인의 생산을 조절한다는 것을 알 수 있다.

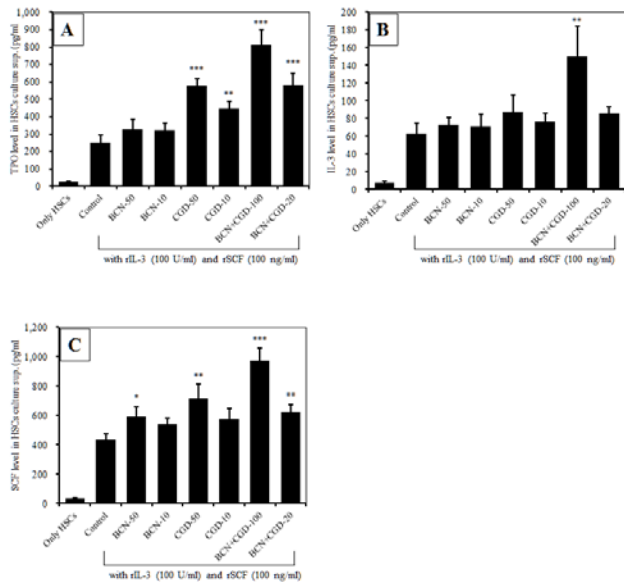


Fig.4. Effects of *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on hematopoietic-related gene expression production in Sca-1⁺hematopoietic stem cells.

Isolated Sca-1⁺hematopoietic stem cells (Sca-1⁺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 extract. Sca-1⁺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 *Brassica campestris var narinosa* (BCN, 50, 10 μg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 μg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract with rIL-3/rSCF for 72hrs. The production of TPO (A), IL-3 (B), SCF (C) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only Sca-1⁺HSCs group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석

c-kit은 CD117로 HSCs의 세포표면에 존재하는 수용체 (receptor) c-kit ligand (SCF)가 binding하여 hematopoietic progenitor 세포의 기능과 성장 그리고 생존하는데 중요한 수용체이다. Sca-1⁺HSCs를 C57bl/6 생쥐의 대퇴골에서

Sca-1⁺ isolation kit를 이용하여 순수분리하여 HSD-B 추출물과 48시간 동안 동시 배양한 후 CD117⁺/Sca-1⁺로 염색하여 FACS로 분석하였다. 그 결과, Fig.5A에서 보듯이 FACS로 분석한 dot-plot으로 CD117⁺/Sca-1⁺를 염색한 것으로 only HSCs에 비하여 rIL-3/rSCF 대조군의 CD117⁺/Sca-1⁺ 활성세포가 20.1%로 현저하게 증가하였고, 도두 (CGD) 추출물과 다채와 도두의 조합물 (BCN+CGD) 추출물 처리군은 각각 35.4%와 41.1%로 대조군에 비하여 현저하게 CD117⁺/Sca-1⁺ 활성세포가 증가를 나타내었다. Fig.5B는 CD117⁺/Sca-1⁺ 활성세포 수를 나타낸 것으로 대조군(control)에 비하여 도두 (CGD) 추출물 (p<0.05)과 다채와 도두의 조합물 (BCN+CGD) 추출물 (p<0.001) 처리군에 통계학적 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001).

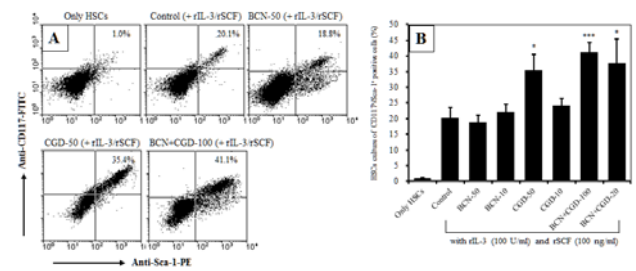


Fig.5. Effects of *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on CD117⁺/Sca-1⁺positive cells in Sca-1⁺hematopoietic stem cells. Isolated Sca-1⁺ hematopoietic stem cells (Sca-1⁺HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with extract. Sca-1⁺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 *Brassica campestris var narinosa* (BCN, 50, 10 μg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 μg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100, 20 μg/ml) extract with rIL-3/rSCF for 72hrs. The production of TPO (A), IL-3 (B), SCF (C) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only Sca-1⁺HSCs group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6. 조혈줄기세포(Sca-1⁺HSCs)에서

JAK2/GATA-1/STAT-5의 인산화 활성 분석

Sca-1⁺HSCs에서 JAK2/GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화를 분석한 결과, 무처리군인 only HSCs군 (Fig.6, lane 1)에 비하여 rIL-3+rSCF를 처리한 대조군 (lane 2)이 JAK2/GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화가 증가되었다. 그리고 도두 (CGD) 추출물 (lane 4)은 대조군 (lane 2)에 비하여 GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화가 증가되었다. 다채와 도두의 조합물 (BCN+CGD) 추출물 처리군 (lane 5)은 100 μg/ml 농도에서 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 경로를 활성 인산화가 대조군 (lane 2)에 비하여 현저하게 증가가 이루어진 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는

JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이 토크인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다.

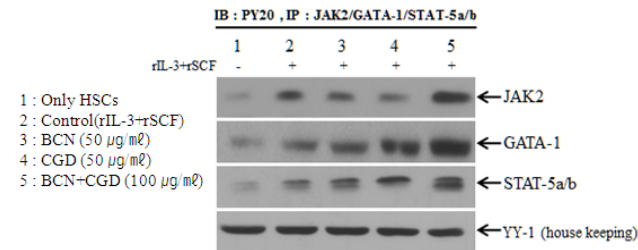


Fig.6. *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 and STAT-5a/b in Sca-1⁺hematopoietic stem cells. Isolated Sca-1⁺hematopoietic stem cells (Sca-1⁺HSCs) from 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 *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1⁺HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract with rIL-3/rSCF for 20 min. After 20 min, then subjected to immunoprecipitation with α -Jak2 (1:5,000), α -GATA-1 (1:5000), α -STAT-5a/b (1:5000) and anti-phosphotyrosine-HRP (1:4000).

7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈줄기세포 분화 효과 측정

Sca-1⁺HSCs에서 CFU-GEMM과 BFU-E로의 분화 상승 효과를 분석한 결과, Fig. 7에서 보듯이 무처리군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF를 처리한 대조군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수는 8배 이상 증가하였고, rIL-3+rEPO와 다채 (BCN) 추출물 50 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군 (control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 1.7배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$). 그리고 rIL-3+rEPO와 도두 (CGD) 추출물 50 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군 (control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 3.0배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$). 또한 rIL-3+rEPO와 두 조합물 (BCN+CGD) 추출물 100 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군 (control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 3.8배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$).

이러한 결과로 CFU-GEMM의 군락 수는 대조군 (control)에 비하여 도두 (CGS)와 두 조합물 (BCN+CGD) 추출물 처리군의 군락 수는 각각 2.9배와 4.2배로 이상 현저하게 유의성 있는 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$). 그러므로 두 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 CFU-GEMM 분화에 대하여 상승효과와 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락을 형성할 수 있는 조혈줄기세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.

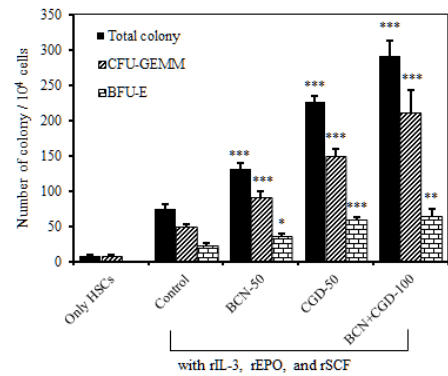


Fig.7. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine. Isolated Sca-1⁺hematopoietic stem cells (Sca-1⁺HSCs) 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 *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Number and composition of hematopoietic colonies per 1×10^4 Sca-1⁺HSCs after 14 days of culture in semi-solid medium.

고찰

현재 인류 건강을 위협하는 주요 질병의 하나인 암은 예방 및 치료기술이 확보된 국가에서는(선진국에서는) 심, 뇌혈관 질환과 더불어 사망원인 1, 2위를 차지하고 있으며, 대표적인 치료법으로는 수술, 방사선치료, 화학요법, 면역요법 등이 있다. 최근 암환자의 치료수단인 화학요법에 의한 항암제투여에 의한 부작용으로 백혈구감소증 (leucopenia) 및 혈소판감소증 (thrombocytopenia)이 환자의 암선고 이상으로 큰 고통을 주고 있고, 또한 환경악화와 유전적 요인으로 빈혈 (anemia) 및 재생불량성 (aplastic) 빈혈이 증가추세에 있지만 기존의 치료제는 근본적인 치료보다는 보조역할과 약물의 부작용을 동반하여 근본적인 조혈증진에 관여하는 생체조절물질의 개발이 무엇보다 시급한 상태이다¹⁷⁾. 이러한 혈구세포들은 골수의 조혈모세포가 분화하여 만들어진다. 골수는 조혈모세포의 성장과 자기재생(self-renewal) 그리고 분화 (differentiation) 등을 조절하기 위한 일종의 미세환경 (microenvironment)이며 내피세포 (endothelial cell), 섬유아세포 (fibroblast), 혈관외망막세포 (adventitial reticular cell), 지방세포 (adipocyte) 그리고 대식세포등으로 구성되어 있다¹⁸⁾. 혈구의 형성은 세포와 세포간 직접접촉이나 여러 가지 성장인자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 또한 조혈모세포는 싸이토크인의 자극에 의하여 적혈구와 백혈구로 분화된다고 하였다²⁰⁾. 그러나 아직 조혈모세포와 골수의 미세환경과의 상호관계는 명백히 밝혀져 있지 않은 상태이지만 골수 미세환경을 이루는 기저세포 (stromal cell)가 싸이토크인의 주요 공급원이 되며, 기저세포의 세포표면분자와 임파구 표면분자와의 상호작용으로 혈구의 형성이 조절된다고 하는 보고가 있다²¹⁾. 현재로서는 골수내에 있는 기저조상세포들의 각기 서로 다른 기능적 특성만을 밝혀 이들의 서로 다른 분화경로만을 밝히고 있다²²⁾. 이러

한 기능적 특성은 골수세포들의 분화와 증식을 유도하는 조혈성 사이토카인 (stem cell factor, SCF; thrombopoietin, TPO; erythropoietin, EPO; colony stimulate factor, CSF; interleukin-1, IL-1; interleukin-3, IL-3; interleukin-5, IL-5; interleukin-6, IL-6; interleukin-7, IL-7; interleukin-11, IL-11; 그리고 interleukin-13, IL-13)들의 작용에 의하여 각종 면역관련 세포들이 서로 구분된다. 여러 가지의 조혈성 사이토카인은 골수세포에 작용하여 특정형질의 혈구세포로의 분화와 성장의 상승효과를 가지는 것으로 알려져 있다²³⁾. 조혈성사이토카인은 크게 세가지 군으로 분류한다. 첫째는 다계통 (multilineage)군으로 여기에는 초기 간세포 (stem cell)인 CFU-GEMM (colony forming unite-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte) 과 BFU-E (burst forming unite-erythroid)에 작용하는 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 그리고 IL-3이다. 둘째로, 단일계통 (unilineage)군으로 후기의 조혈 조상세포 (CFU-E, CFU-Megakaryocyte, 그리고 BFU-E)에 작용하는 EPO, TPO, IL-5, macrophage, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 그리고 colony-stimulating factor (M-CSF)이다. 셋째는 “potentiating” 군으로 다른 조혈성 사이토카인의 활성화에 상승작용을 하는 것으로 알려진 IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), FGF (fibroblast growth factor), SCF와 *fms*-like tyrosine kinase-3 (FL)로 구성된다²⁴⁾.

우리의 연구에서 골수부전 유도를 위하여 CTX를 주사한 생쥐의 골수에서 Sca-1⁺조혈줄기세포를 분리한 후 다채 (BCN)와 도두 (CGD), 그리고 두 조합물 (BCN+CGD)에 대한 조혈증진 효과를 관찰하여 EPO, TPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA 유전자 발현과 IL-3, SCF, TPO 단백질 생산량이 증가되는 것을 확인하였고, Sca-1⁺HSCs에서 CD117⁺ (c-kit) 활성세포 수도 같은 결과를 나타내었다. 또한 다채 (BCN)와 도두 (CGD)를 각각 단독으로 처리했을 때보다 두 조합물 (BCN+CGD)을 처리했을 때가 조혈성사이토카인의 현저한 증가를 나타내어 조혈증진 상승효과가 있음을 알 수 있었다. 대부분의 조혈성 사이토카인들은 신호전달에 의해 유전자발현이 유도되는데, 대표적으로 JAK-STAT 경로를 거치게 된다. 세포신호전달 중 JAK-STAT 경로는 리간드와 수용체의 결합으로 활성화된 protein tyrosine kinase인 JAK (Janus kinase) family kinase와 유전자 전사조절 단백질인 STAT (signal transducer and activator of transcription)에 의해 이루어지는데, JAK family는 JAK1, JAK2, JAK3, 와 TYK2로 구성된다. 이들은 tyrosine kinase 활성을 가지는 kinase domain (JH1)과 tyrosine kinase 활성이 없는 kinase-like domain (JH2)의 두 domain으로 구성된다. STAT family는 6개로 구성되는데 STAT1 (p91/p84), STAT2 (p113), STAT3 (p92), STAT4 (p89), STAT5 (p91), 그리고 STAT6 (p94)로 밝혀졌다²⁵⁾. GATA 단백질은 혈액 세포 발달에 필수적인 물질로 이 단백질이 있어야만 혈액 세포 발달에 관여하는 유전자 활성이 제대로 조절될 수 있다. 조혈 줄기세포의 분화에는 GATA-1과 GATA-2라는 두 가지 세포가 관여한다. GATA-2 단백질은 조혈 줄기세포가 전구세포로 분화하는 데 필요한데 반하여 GATA-1이란 단백질은 전구세포로부터 특정 혈액세포가 형

성되는 데 필요하다. GATA-2 유전자가 불활성 상태일 경우에는 GATA-1 단백질이 같은 부분에 결합한다. 이 결합 차이를 통해 GATA-1 단백질이 증가하면 GATA-2 유전자로부터 GATA-2 단백질이 생성되는 과정이 유도된다²⁶⁾. 그래서 최근 연구에서 적혈구계 발달에 있어서 GATA-1이 활성화되어 (PU.1은 억제됨) erythropoietin 수용체를 포함한 여러 표적 유전자를 자극함으로써 BFU-E의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁷⁻²⁸⁾.

우리의 연구결과에서 두 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가가 현저하게 나타나서 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 통한 조혈성사이토카인 발현이 조절되는 중요한 기전연구라 생각된다. 이러한 결과로 다채 (BCN)와 도두 (CGD), 그리고 두 조합물 (BCN+CGD)이 조혈줄기세포에서 JAK2, GATA-1과 SATA-5a/b 활성 인산화를 증가시키고, 반고체 집락형성 (semisolid clonogenic assay)에서 상대적으로 BFU-E 보다는 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락 발달로 분화되는 CFU-GEMM 비율이 증가되어 조혈줄기세포의 성장 촉진 유도가 증명되었다.

결론

항암제의 부작용은 항암제가 암 세포뿐만 아니라 정상 세포까지도 독성을 나타내어 중앙 세포를 사멸하는 동시에 골수 조혈 기능을 억제하고, 소화 기능 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하여 인체의 면역기능을 저하시키는 문제점이 노출되고 있는데, 항암제의 부작용의 95%에서 골수 조혈 기능과 90%에서 면역계통에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 암환자에 있어서 항암치료에 의한 골수부전으로 혈구감소증 등의 부작용을 감소시키는 조혈증진 천연물인 다채와 도두, 그리고 두 조합물에 관한 조혈증진 시험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 두 조합물의 지표성분설정을 위하여 HPLC분석으로 Genistin이 0.035 mg/g이 함유된 것으로 확인하였고, CTX로 골수부전이 유도된 생쥐의 골수에서 Sca-1⁺조혈줄기세포를 분리한 후 다채 (BCN)와 도두 (CGD), 그리고 두 조합물 (BCN+CGD)에 대한 조혈증진 효과를 관찰하여 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA 유전자 발현과 IL-3, SCF, TPO 생산량을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과에서 두 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두 (CGD) 투여군에 비하여 조혈증진관련 유전자 발현 및 조혈 사이토카인의 신호전달기전을 조절에 대하여 상승효과를 나타내었다. 또한 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두추출물 (CGD) 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이토카인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다. 조혈줄기세포 분화에서 상대적으로 두 조합물 (BCN+CGD)이 각각의 다채 (BCN)와 도두 (CGD) 투여군에 비하여 CFU-GEMM 분화에 대하여 상승효과와 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락을 형성할 수 있는 조혈줄기세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 생각된다. 향후 연구로 조혈작용을 증진하는 다채 (BCN)와 도두 (CGD)의

활성성분을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발 [과제번호 F1801]에 의해 수행되었는 바 이에 감사드립니다.

Reference

- Torino F, Barnabei A, Paragliola RM, Baldelli R, Appetecchia M, Corsello SM. Thyroid as unintended side effect of anticancer drugs. *Thyroid*. 2013 ; 1 : 1-5.
- Slovak ML, Bedell V, Lew D et al. 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.
- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. *Exp Hemtol*. 1990 ; 18(7) : 837-42.
- 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 ; 22(115) : 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 ; 22 : 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 : 309-19.
- Tani A, Kiyota M, Aiga I. Trace gases generated in closed plant cultivation systems and their effects on plant growth. *Biol Sci Space*. 1995 ; 9(4) : 314-26.
- Li S. *Compendium of Materia Medica*. Beijing : Foreign Languages Press, 2003 ; 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 ; 20(4) : 1268-74.
- 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.
- Yoshida H, Yoshida N, Kuriyama I, Tomiyama-Sakamoto Y, Mizushima Y. Profiles of lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in Jack beans (*Canavalia gladiata* DC.). *Food Chem*. 2013 ; 136(2) : 807-12.
- 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.
- Pugalenthi M, Doss A, Rajendrakumaran D, Vadivel V. Antibacterial activity of *Canavalia ensiformis* L,DC seeds due to solvent extract and fraction method. *Indian J Sci Technol*. 2010 ; 3(1) : 94-5.
- 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.
- Wen LY, Bae SM, Chun HJ, Park KS, Ahn WS. Therapeutic effects of systemic photodynamic therapy in a leukemia animal model using A20 cells. *Lasers Med Sci*. 2012 ; 27(2) : 445-52.
- Guest I, Uetrecht J. Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low-molecular-weight compounds. *Exp Hematol*. 2001 ; 29(2) : 123-37.
- Isern J, Martín-Antonio B, Ghazanfari R, Martín AM, López JA, Del Toro R, Sánchez-Aguilera A, Arranz L, Martín-Pérez D, Suárez-Lledó M, Marín P, Van Pel M, Fibbe WE, Vázquez J, Scheduling S, Urbano-Ispizúa A, Méndez-Ferrer S. Self-renewing human bone marrow mesospheres promote hematopoietic stem cell expansion. *Cell Rep*. 2013 ; 3(5) : 1714-24.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1977 ; 91 : 335-44.
- Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J Exp Med*. 1991 ; 174(3) : 693-703.
- Hardy CL, Tavassoli M. Homing of hemopoietic stem cells to hemopoietic stroma. *Adv Exp Med Biol*. 1988 ; 241 : 129-33.
- Thalmeier K, Meisner P, Reisbach G, Hültner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RA, Dörmer P. Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Exp Hematol*. 1996 ; 24(1) : 1-10.
- Brugger W, Möcklin 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*, 1993 ; 81(10) : 2579-84.
24. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, Peschle C. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocyte progenitors/monocytic precursors. *Blood*, 1995 ; 86(5) : 1661-70.
25. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994 ; 264(5164) : 1415-21.
26. Pal S, Cantor AB, Johnson KD, Moran TB, Boyer ME, Orkin SH, Bresnick EH. Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *PNAS*, 2004 ; 101(4) : 980-5.
27. 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(1) : 87-96.
28. 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.