

생체 외 제대혈 배양에서 거대핵세포 조혈에 대한 Interleukin-11 (IL-11)의 효과

순천향대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²임상분자생물학연구소

이국경¹ · 김찬규^{1,2} · 이남수^{1,2} · 김숙자² · 정희정² · 이규택^{1,2}
박성규^{1,2} · 백승호^{1,2} · 원종호^{1,2} · 홍대식^{1,2} · 박희숙^{1,2}

In Vitro Effect of Interleukin-11 (IL-11) on Megakaryopoiesis from Umbilical Cord Blood Cells

Kuk-Kyung Lee¹, Chan-Kyu Kim^{1,2}, Nam-Su Lee^{1,2}, Sook-Ja Kim², Hee-Jeong Cheong², Kyu-Tack Lee^{1,2}, Sung-Kyu Park^{1,2}, Seung-Ho Baik^{1,2}, Jong-Ho Won^{1,2}, Dae-Sik Hong^{1,2} and Hee-Sook Park^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, ²Institute for Clinical Biology Research, SoonChunHyang University College of Medicine, Korea

ABSTRACT

Background: The megakaryopoiesis and platelet production is regulated by several hematopoietic factors such as thrombopoietin (TPO), interleukin-11 (IL-11) and interleukin-3 (IL-3). IL-11 is a potent stimulator of megakaryopoiesis in vivo, and acts primarily as a megakaryocyte maturation factor in vitro and it can act synergistically with IL-3 and TPO. We performed this study to investigate the effects of recombinant human IL-11 (rhIL-11) with other hematopoietic factors on megakaryocyte colony formation in vitro. **Methods:** CD34+ cells were separated from umbilical cord blood and megakaryocyte colonies using MegaCult Assay Kit were cultured with rhIL-11, recombinant human IL-3 (rhIL-3), and recombinant human TPO (rhTPO) for 7 and 14 days. The number and percentage of CD34+ and CD41a+ cells were determined by flowcytometry. **Results:** The number of CD41a+ cells were $0.54 \pm 0.05 \times 10^4$ (rhIL-11 100 ng/ml), $5.32 \pm 0.23 \times 10^4$ (rhIL-3 100 ng/ml), and $8.76 \pm 0.15 \times 10^4$ (rhTPO 50 ng/ml) of total expanded cells during the culture of the purified CD34+ cells in liquid phase for 7 days. The number of CD41a+ cells were increased to $7.47 \pm 0.69 \times 10^4$ (rhIL-3+ rhIL-11), $11.92 \pm 0.19 \times 10^4$ (rhTPO+rhIL-11) of total expanded cells, respectively, during the culture of the purified CD34+ cells in liquid phase for 7 days in the presence of rhIL-11 (100 ng/ml). When the purified CD34+ cells were cultured in semisolid media including various concentration of rhIL-11, the megakaryocyte colonies were not formed. When the purified CD34+ cells were cultured with rhIL-11 and rhTPO or with rhIL-11 and rhIL-3, the number of megakaryocyte colonies were increased compared with rhTPO or rhIL-3 alone. **Conclusion:** These results indicate that IL-11 exerts a potent proliferative activity to colony forming unit-megakaryocyte from human umbilical cord blood, and it acts with other hematopoietic factors synergistically. (*Immune Network* 2003;3(1):47-52)

Key Words: Megakaryopoiesis, thrombopoietin, interleukin-11, interleukin-3

서 론

Interleukin-11 (IL-11)은 interleukin-6 (IL-6), leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotropic factor (CNTF), cardiotrophin-1 등과 함께 공통된 signal transducer인 gp130을 공유한다(1,2). 이 cytokine들은 골

책임저자 : 홍대식, 순천향대학교 의과대학 내과학교실 중앙혈액내과
☎ 420-853, 경기도 부천시 원미구 중동 1174
Tel: 032-621-5184, Fax: 032-621-5016, 5018
E-mail: dshong@schbc.ac.kr

수 내의 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage)와 내피세포(endothelial cell)로부터 분비되며, 아미노산 서열, 3차원적 구조 등 구조적 유사성을 가지고, 각각 표적세포(조혈모세포, 배아줄기세포, 골세포)에 대한 유사한 영향을 미친다(1,2). 그중 IL-11은 거대핵세포에 다방면으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1,2). IL-11은 생체 내에서 강력히 혈소판 조혈에 작용하는 cytokine으로 생체 내 투여 시 골수에서 거대핵세포 집락의 형성과 분화를 관찰할 수 있다(1-7).

이런 작용은 여러 실험에서 밝혀졌는데 최근 Saitoh 등은 mitomycin C에 의해 골수가 억제된 쥐에서 인형 유전자 재조합 IL-11 (recombinant human IL-11; rhIL-11)을 투여하였을 때 20일 만에 거대핵세포의 전구세포와 거대핵세포 자체의 수가 증가되는 것을 관찰하였다(2). 또한 Turner 등은 쥐에 carboplatin을 투여하여 골수 억제상태로 만든 후 rhIL-11 (125µg/kg/day)을 투여하여 혈소판의 증가를 관찰하였는데, 대조군보다 혈소판 회복기간이 월등히 단축되었다(4). 여러 연구들의 결과를 보면 rhIL-11의 체내 주입 시 혈소판 회복에 도움이 되는 것을 알 수 있다.

구조상 거대핵세포에서는 IL-11 수용체가 관찰되나 혈소판에는 IL-11의 수용체가 없으며 c-mpl의 발현으로 thrombopoietin (TPO) 수용체만 발견되기에, 본 연구에서는 제대혈 CD34 양성세포에서 rhIL-11이 거대핵세포 집락형성에 어떠한 영향을 주는지, 또한 CD34 양성세포가 거대핵세포로 증식 및 분화되는 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며, 향후 거대핵세포 증식을 포함한 이식 후 혈소판 회복 촉진을 위한 여러 가지 임상실험의 기초자료로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

제대혈의 채취 및 단핵세포 분리. 분만 후 제대를 감자로 잡은 후 제대정맥을 천자하여 50 ml의 제대혈을 방부제가 없는 헤파린 10 U/ml로 처리하여, 비중 1.077의 Ficoll-Hypaque (10.77 g/cm³, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 위에 중첩시킨 후 400 G로 25분간 원심 분리시켜 단핵세포를 분리한 후 인산완충 식염수(phosphate buffer saline: PBS; Life Technologies, Grand Island, NY, USA)로 2회 세척하였다.

CD34 양성세포의 분리. 분리된 단핵구를 2 mM EDTA/PBS이 포함된 0.5% 우혈청알부민(bovine serum albumin: BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 세척하였다. 이 중 1×10^8 세포를 분리하여 2 mM EDTA/PBS이 포함된 0.5% BSA 300µl에 부유시키고, Fc 수용체를 가진 세포가 항CD34 단클론 항체와 비특이적으로 결합하는 것을 방지하기 위해 Fc 수용체 차단 면역글로블린 100µl을 첨가한 후, hapten이 부착된 항CD34

단클론항체(Clone: QBEND/10, Isotype: mouse IgG1, Minitenyi Biotec, Auburn, Germany) 100µl을 첨가하여 4°C에서 15분간 방치하였다. 여기에 hapten 항체를 부착시킨 immunomagnetic bead를 100µl 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시킨 후 MACS high magnetic separation column (Minitenyi Biotec)에 통과시켜 CD34 양성세포를 분리하였다.

거대핵세포 집락배양. MegaCult[®] assay kit (HCC-4960, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada)를 이용하여 거대핵세포 집락배양을 시행하였다. rhIL-11 (10 ng/ml, 또는 100 ng/ml, Wyeth-Korea Pharm. Inc., Korea), rhIL-3 (100 ng/ml, R&D systems, Minneapolis, MN, USA), TPO (50 ng/ml, Jeil-Kirin Pharm. Inc., Korea)를 단독 또는 병합 투여한 2 ml의 배양액에 1.2 ml의 collagen과 분리된 CD34 양성세포(2×10^3 /slide)를 넣고 잘 섞은 다음 이 혼합액을 chamber slide의 2개 well에 0.75 ml씩 분주하였다. 이를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 14일간 배양하였다.

거대핵세포 집락의 고정 및 면역조직학적 염색. 집락이 배양된 chamber slide를 꺼내어 조심스럽게 plastic wall과 rubber seal을 제거한 다음 chamber slide 위에 polypropylene separator를 올려놓고 그 위에 두꺼운 필터종이를 올려놓아 수분을 완전히 제거하였다. 이를 methanol : acetone = 1 : 3의 용액으로 20분간 실온에서 고정시킨 다음 15분간 공기 중에 자연 건조시켜 4°C에서 보관하였다. 면역조직학적 염색을 위하여 slide를 0.05 M Tris/NaCl 용액(pH 7.6)에 넣어 실온에서 20분간 방치한 다음 5% 인혈청을 포함한 Tris/NaCl 용액에 옮겨서 20분간 방치하였다. 이를 Tris/NaCl 용액에 3회 세척하고 1차 항체인 mouse anti-human GPIIb/IIIa (IgG2a, Stem Cell Technologies Inc.)를 10µg/ml의 농도로 실온에서 60분간 반응시킨 다음 3회 세척하고 2차 항체인 10µg/ml의 biotin conjugated goat anti-mouse IgG와 30분간 반응시켰다. 다시 3회 세척한 다음 avidin-alkaline phosphatase conjugate 용액과 30분간 반응시키고 alkaline phosphatase substrate 용액에서 15분간 반응시킨 다음 3회 세척하고 Evans blue로 대조 염색하여 관찰하였다. 집락의 판독은 순수 거대핵세포 집락(pure megakaryocyte colony; pure CFU-MK)은 3개 이상의 거대핵세포를 가진 집락으로 정의하였고 혼합 거대핵세포 집락(mixed megakaryocyte colony; mixed CFU-MK)은 거대핵세포와 다른 세포가 포함된 집락으로 정의하였다.

액상배지에서 CD34 양성세포의 증폭. 분리된 CD34 양성세포를 무혈청배지에 부유시켜 10×10^4 세포를 24-Well plates (Costar, Cambridge, MA)에 넣고 rhIL-11 (100 ng/ml 단독 또는 rhIL-3 (100 ng/ml), TPO (50 ng/ml)와 혼합하여 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양하였다. 이를 세포수의 증가와 거대핵세포 집락 형성능

을 비교 관찰하였다.

유세포 분석기(flow cytometry)를 이용한 CD34 양성 세포와 CD41a 양성세포의 측정. 액상 배지에서 rhIL-11 단독 혹은 다른 cytokine (rhIL-3, rhTPO)들과 혼합하여 증폭 배양된 세포를 0.1% sodium azide (Sigma)가 포함된 PBS로 2회 세척하고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 얼음 위에서 15분 동안 1 mg/ml의 γ -globulin를 포함하는 buffer와 반응시켰다. 이를 PBS로 2회 원심 세척한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 부착된 항CD41a 단클론항체(Pharmingen, San Diego, CA, USA) 20 ul와 phycoerythrin (PE)가 부착된 항CD34 단클론항체(anti-HPCA-2, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) 20 ul를 첨가한 후 30분 동안 4°C에서 차광하여 반응시켰다. 이를 세척액으로 2회 원심 세척 후 0.5 ml 1% PFA (paraformaldehyde/PBS)용액에 부유시켜 FACScan (Becton-Dickinson)을 이용하여 측정하였다. 이때 음성 대조군은 goat anti-mouse IgG₁ FITC와 rat anti-mouse IgG₁ PE를 동

일한 조건으로 반응시킨 부유액을 사용하였다.

결 과

면역조직학적 염색에 의한 거대핵세포 집락. 순수 거대핵세포 집락과 혼합 거대핵세포 집락을 확인하기 위하여 GPIIa/IIIb항체로 면역조직화학적 염색을 하였다. 붉은 색으로만 염색된 집락은 순수 거대핵세포 집락으로(Fig. 1A), 붉은 색과 푸른 색이 혼합되어 있는 경우는 혼합 거대핵세포 집락으로(Fig. 1B) 확인하였다.

제대혈 CD34 양성세포에 대한 rhIL-11의 거대핵세포 조절 효과. 정제된 CD34 양성세포에 rhIL-11 100 ng/ml의 농도와 rhTPO 50 ng/ml, 혹은 rhIL-3 100 ng/ml를 첨가하여 액상배지에서 7일간 배양했을 때 CD41a 양성세포 수는 $0.54 \pm 0.05 \times 10^4$ (rhIL-11), $5.32 \pm 0.23 \times 10^4$ (rhIL-3), $8.76 \pm 0.15 \times 10^4$ (rhTPO), $7.47 \pm 0.69 \times 10^4$ (rhIL-11+rhIL-3), $11.92 \pm 0.19 \times 10^4$ (rhTPO+rhIL-11)로 각 경우에서 rhIL-11을 첨가하였을 때 1.4배 가량의 세포 증가가 관찰되었다

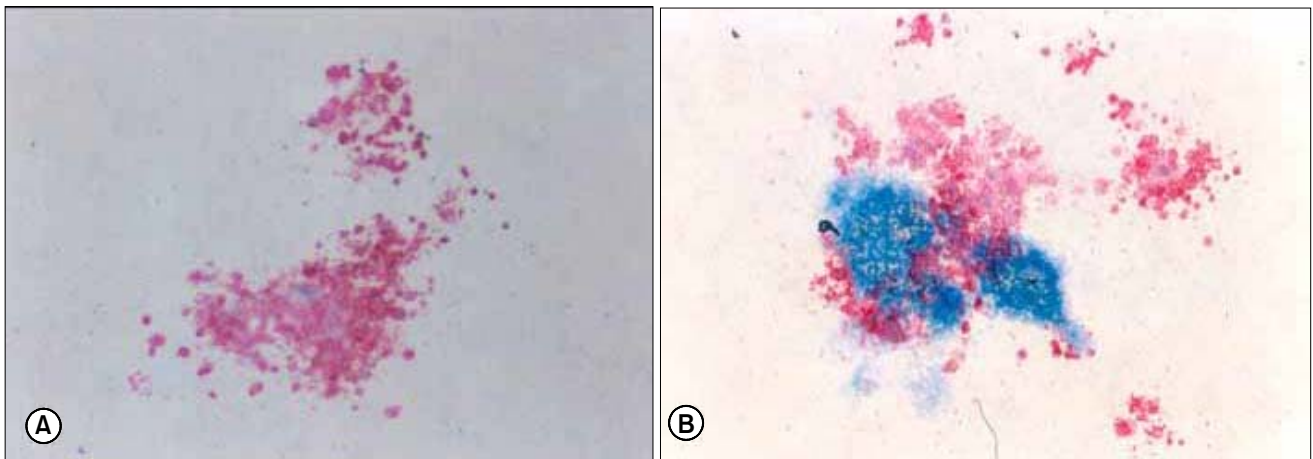


Figure 1. Microphotographs of a representative colony grown in the presence of various cytokines (Immunohistochemical stain, $\times 200$). A. pure CFU-MK, B. mixed CFU-MK.

Table I. Effect of IL-11 on the generation of CD34+ cells into CD41a+ cells

	Initial	Cells at day 7				
		IL-11	IL-3	IL-3+IL-11	TPO	TPO+IL-11
Cell count ($\times 10^4$)	10	5.75 ± 1.06	47.0 ± 18.38	66.0 ± 42.43	20.0 ± 14.14	26.0 ± 19.80
CD34+ cell (%)	85.39 ± 12.16	47.49 ± 12.5	25.44 ± 10.86	24.60 ± 6.66	41.59 ± 9.28	42.42 ± 11.98
CD41a+ cell (%)	1.87 ± 0.61	9.46 ± 5.25	11.31 ± 2.26	11.32 ± 0.69	43.81 ± 15.39	45.83 ± 19.15
CD41a+ cell No. ($\times 10^4$)	0.19 ± 0.06	0.54 ± 0.05	5.32 ± 0.23	7.47 ± 0.69	8.76 ± 0.15	11.92 ± 0.19

Data are presented as mean \pm SD. At day 0, 10×10^4 purified CD34+ cells were cultured in the presence of rhIL-11 (100 ng/ml) alone or with rhIL-3 (100 ng/ml) or rhTPO (50 ng/ml) for 7 days. rhIL: recombinant human interleukin, rhTPO: recombinant human thrombopoietin.

(Fig. 2, Table I).

제대혈 단핵세포 배양 시 cytokine에 따른 거대핵세포 집락의 변화. 제대혈의 단핵세포(5×10^4 세포)를 대상으로 rhIL-11 단독 투여하여 배양한 경우 용량(10 ng/ml, 100 ng/ml)과 관련 없이 거대핵세포 집락이 형성되지 않

았다. 단핵세포를 대상으로 rhIL-3 (100 ng/ml)을 단독 투여하여 배양한 경우 48.5 ± 4.0 의 거대핵세포 집락 형성이 확인되었으며, rhIL-3와 함께 rhIL-11 10 ng/ml를 병합 투여한 경우 47.5 ± 4.0 , rhIL-11 100 ng/ml를 병합 투여한 경우는 43.5 ± 1.4 의 집락이 형성되었다. rhTPO 50 ng/ml

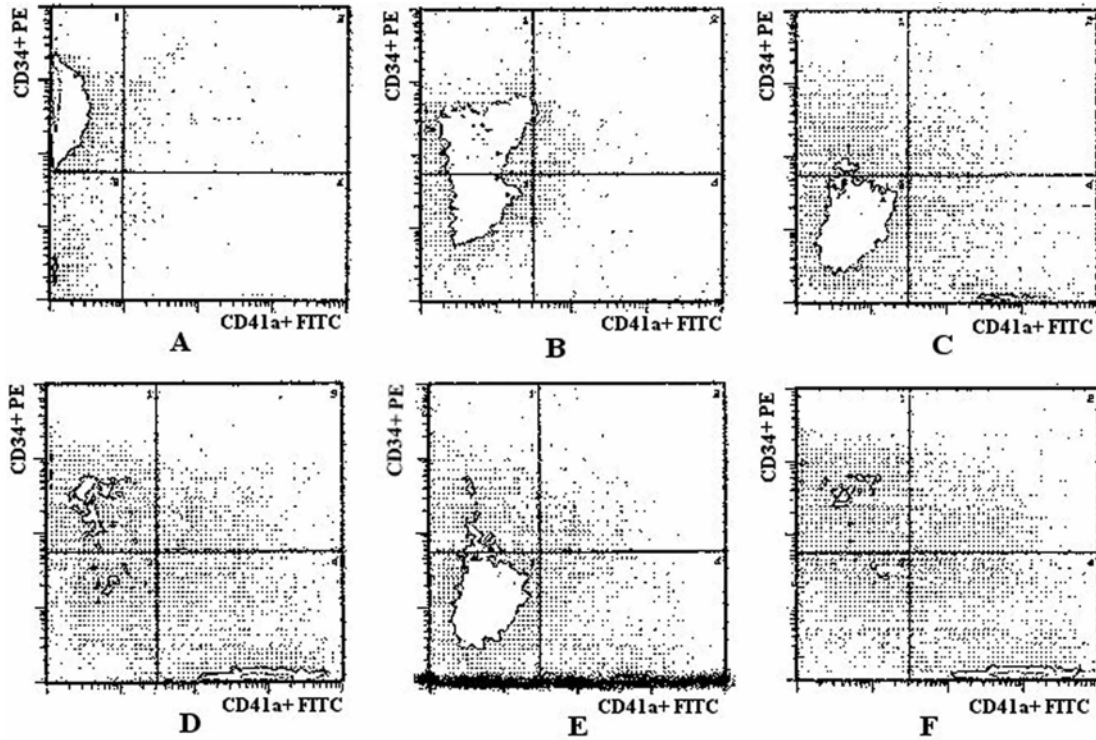


Figure 2. Proliferation and differentiation of enriched CD34+ human cord blood cells cultured in the presence of rhIL-11 alone or in combination with rhIL-3 or rhTPO. Panel A, Initial cells that had been enriched for CD34+; B-F: Expression of CD41a+ after liquid culture in the presence of rhIL-11 (B), rhIL-3 (C), rhIL-3 plus rhIL-11 (D), rhTPO (E), or rhTPO plus rhIL-11 (F).

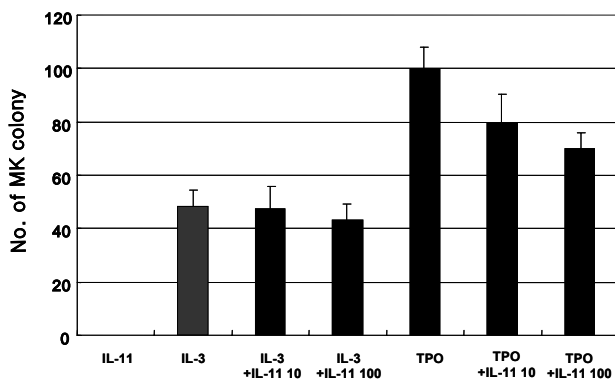


Figure 3. Effects of rhIL-11 in combination with rhIL-3 or rhTPO on growth of CFU-MK colonies from umbilical cord mononuclear cells. Cord blood mononuclear cells (2×10^4) were cultured in the semisolid media in the presence of various cytokines. Each column represent the mean of the number of CFU-MK colonies from seven experiments. IL-11 10; IL-11 100; IL-11 100 ng/ml.

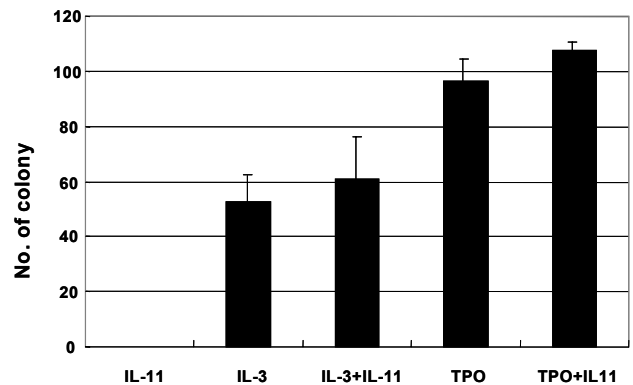


Figure 4. Effects of rhIL-11 in combination with rhIL-3 or rhTPO on growth on CFU-MK colonies from umbilical cord CD34+ cells. Cord blood CD34+ cells (2×10^3) were cultured in the semisolid media in the presence of various cytokines. Each column represent the mean of the number of CFU-MK colonies from seven experiments.

를 단독 투여하였을 경우 100 ± 11.3 의 거대핵세포 집락이 확인되었으며 rhIL-11 10 ng/ml를 병합 투여한 경우 80 ± 5.6 , rhIL-11 100 ng/ml를 병합 투여한 경우는 70 ± 2.82 의 집락이 형성되었다(Fig. 3).

CD34 양성세포 배양 시 cytokine에 따른 거대핵세포 집락의 변화. 체대혈의 CD34 양성세포(2×10^3 세포)를 대상으로 여러 농도의 rhIL-11 (10 ng/ml, 100 ng/ml)을 단독 첨가하여 무혈장 배지에 14일간 배양하였을 때 거대핵세포 집락은 형성되지 않았다. CD34 양성세포에 rhIL-3 (100 ng/ml)를 단독 투여한 경우 52.5 ± 2.1 의 거대핵세포의 집락이 형성되었고 rhTPO (50 ng/ml)를 단독 투여한 경우 96.5 ± 12.0 의 집락 형성을 보였다. rhIL-3 (100 ng/ml)와 rhIL-11 (100 ng/ml)을 병합 투여 시 61 ± 1.4 의 집락 형성을 보였고 rhTPO (50 ng/ml)와 rhIL-11 (100 ng/ml)을 병합 투여하였을 경우 107.5 ± 2.1 의 집락을 형성하였다(Fig. 4).

고찰 및 결론

고용량의 항암요법과 조혈모세포이식을 시행하면서 백혈구 및 혈소판의 감소가 큰 문제로 대두되고 있는데 이 문제를 해결하기 위해 많은 cytokine들이 연구되어 왔다(4,8-10). 거대핵세포 조혈과정에 많은 megakaryocyte-stimulating factor들이 관여하는 바, TPO, stem cell factor, IL-3, IL-6, IL-11 및 GM-CSF (Granulocyte/ monocyte colony stimulating factor) 등이 있다. 이들을 2종류로 나누자면 거대핵세포 전구세포 수를 증가시키는 것에는 IL-3, IL-6, IL-11 등이 있고, 이들 전구세포를 거대핵세포로 분화시키는 데는 TPO가 주된 역할을 한다(5,11-13).

TPO는 거대핵세포 조혈과정에서 체내, 체외에서 모두 거대핵세포의 분화와 성숙에 가장 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 이 과정에서 다른 cytokine과 상승효과가 있음이 밝혀졌다(5,8,9,14-17). TPO와 상승작용이 알려진 cytokine 중 IL-11은 원시적인 골수세포의 간질세포에서 발견되었고 여러 단계의 조혈작용에 관여하고 거대핵세포의 성장에 작용을 하는 것으로 알려져 있다(1,4,6,7,16,17). IL-11은 정상적으로는 말초혈액에서 검출되지 않는 농도로 존재하나 골수이식기간 중 혈소판 감소시기나 특발성 혈소판 감소증에서 IL-11의 혈중 농도가 증가되어 혈액학적 손상 시 증가되는 cytokine으로 주목받게 되었다(4,7,18,19). 여러 동물실험에서 이러한 사실을 증명되었고(2,3), 근래에는 동물 실험뿐 아니라 고용량 항암요법에 의해 골수기능이 억제된 환자에서 rhIL-11 투여로 혈소판 감소 기간이나 혈소판 수혈에 따른 부작용을 극복하려는 노력이 있어 왔고 최근 항암치료를 받은 환자에서 rhIL-11의 투여 시 혈소판 회복이 빠르고 혈소판 수혈 횟수가 감소되는 결과를 얻었다(2,7,18,19).

우선 체대혈에서 분리한 CD34 양성세포를 rhIL-11, rhIL-3, TPO와 액상배양하였을 때 CD41a 양성세포의 수($\times 10^4$)는 rhIL-11 단독 투여 시 0.54 ± 0.05 였으며 rhIL-3, TPO를 투여한 경우는 5.32 ± 0.23 , 8.76 ± 0.15 로 증가되어 CD41a 양성세포로의 분화가 증가되었음을 알 수 있었다. rhIL-3와 TPO에 rhIL-11을 첨가하여 배양하였을 때 CD41a 양성세포 수($\times 10^4$)는 7.47 ± 0.69 , 11.92 ± 0.19 로 1.4배 가량의 세포 수 증가가 관찰되었다.

다음으로 rhIL-11의 체외에서의 거대핵세포의 조혈작용에 대해 알아보기 위해 각기 농도를 달리하여 체대혈에서 채취한 단핵세포와 CD34 양성세포를 배양하여 보았다. 배양 후 거대핵세포 집락이 관찰되지 않아 체외에서 IL-11 단독으로는 거대핵세포 조혈 기능이 없음을 증명하였다. 다음 단계로 다른 cytokine (rhIL-3, rhTPO)과 같이 rhIL-11을 투여하여 배양하였을 경우 거대핵세포의 집락 형성이 관찰되었다. 이것은 IL-11의 거대핵세포 조혈작용에 주된 역할은 세포수의 증가이고, TPO가 다른 cytokine과 병합투여 시 전체세포수의 증가와 함께 CD41a 양성세포의 증가, 즉 거대핵세포의 분화에 주된 역할을 한다는 다른 연구들과 일치되는 소견이다(4,8).

이러한 CD34 양성, CD41a 양성세포는 전체 CD34 양성세포의 1~5%를 차지하며 이식 후 혈소판 생성에 관여하며 이식편대의 CD34 양성, CD41a 양성세포의 총량이 이식 후 혈소판 회복 시기와도 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 혈소판 감소 시 IL-11의 혈중농도가 증가되는 것으로 보아 IL-11의 관련성을 간접적으로 시사한다(4,8,20).

IL-11은 조혈모세포이식 후에 혈소판형성과 거대핵세포 조혈에 주요 역할을 하며 임상적으로 rhIL-11의 투여가 항암제나 조혈모세포이식 후 혈소판이 감소된 환자에게 투여하여 혈소판 감소 기간을 줄이는 등 환자 치료에도 적용될 수 있을 것으로 생각된다(7,18,19).

이상의 결과로 IL-11은 체외에서 체대혈 배양 시 단독으로는 거대핵세포 집락 형성에 영향을 미치지 못하나 다른 cytokine (IL-3, TPO)과 같이 투여하여 체대혈 배양을 할 경우 IL-3나 TPO 단독보다 거대핵세포 집락에 대해 증식효과를 증가시키는 결과를 얻었다. 그러므로 IL-11은 단독보다는 다른 cytokine과 병합 투여 시 거대핵세포의 조혈에 영향을 미치는 것을 알 수 있으며 향후 본 연구를 토대로 하여 거대핵세포 조혈 촉진을 위해 임상에 응용할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. Heymann D, Rousselle AV: Gp130 cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12;1455-1468, 2000
2. Saitoh M, Taguchi K, Momose K, Suga K, Ogawa Y, Yasuda S, Miyata K: Kinetic analysis of megakaryopoiesis induced by recombinant human interleukin 11 in myelosuppressed mice.

- Cytokine 13;287-294, 2001
3. Fujita T, Yamada T, Hashiguchi A, Fukushima S, Kondoh K, Fujimoto J, Hata J: Augmentation of megakaryocytopoiesis within the hematopoietic microenvironment of human granulocyte colony-stimulating factor transgenic mice. *Exp Hematol* 29;1010-1018, 2001
 4. Turner KJ, Neben S, Weich N, Schaub RG, Goldman SJ: The role of recombinant interleukin 11 in megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 14;53-61, 1996
 5. Cardier JE, Foster DC, Lok S, Jacobsen SE, Murphy MJ Jr: Megakaryocytopoiesis in vitro: from the stem cells' perspective. *Stem Cells* 14;163-172, 1996
 6. Gordon MS, Hoffman R: Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* 80;302-307, 1992
 7. Du XX, Williams DA: Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood* 83;2023-2030, 1994
 8. 조상덕, 이국경, 배상병, 김숙자, 정희정, 이규택, 박성규, 원종호, 백승호, 서원석, 홍대식, 박희숙: 생체 외 배양에서 거핵세포 조혈에 대한 thrombopoietin의 효과. *한국BRM학회지* 9;161-174, 1999
 9. 김신애, 홍대식, 김숙자, 박성규, 원종호, 서원석, 백승호, 박희숙: 말초혈액, 골수 및 제대혈에서 CD34 양성세포의 체외증폭과 표현형에 관한 연구. *대한조혈모세포이식 학회지* 2;101-111, 1997
 10. Moore MA, Schneider JG, Shapiro F, Bengala C: Ex vivo cytokine expansion of CD34-positive hematopoietic progenitors. *Prog Clin Biol Res* 389;217-228, 1994
 11. Hoffman R: Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 74; 1196-1212, 1989
 12. Long MW: Population heterogeneity among cells on the megakaryocyte lineage. *Stem Cells* 11;33-40, 1993
 13. Kaushansky K: Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 86;419-431, 1995
 14. Hagiwara T, Kodama I, Horie K, Kato T, Miyazaki H: Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp Hematol* 26;228-235, 1998
 15. Tanimukai S, Kimura T, Sakabe H, Ohmizono Y, Kato T, Miyazaki H, Yamagishi H, Sonoda Y: Recombinant human c-mpl ligand (thrombopoietin) not only acts on megakaryocyte progenitors, but also on erythroid and multipotential progenitors in vitro. *Exp Hematol* 25;1025-1033, 1997
 16. 김영민, 박성규, 서원석, 홍대식, 박희숙: 말초혈액 조혈모세포 이식을 받은 환자에서 혈청 내 thrombopoietin, interleukin-3, interleukin-11의 의미. *한국BRM학회지* 9;227-235, 1999
 17. Won JH, Cho SD, Park SK, Lee GT, Baick SH, Suh WS, Hong DS, Park HS: Thrombopoietin is synergistic with other cytokines for expansion of cord blood progenitor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 9;465-473, 2000
 18. Mangan KF, Mullaney MT, Barrientos TD, Kernan NA: Serum interleukin-3 levels following autologous or allogeneic bone marrow transplantation: effects of T-cell depletion, blood stem cell infusion, and hematopoietic growth factor treatment. *Blood* 81;1915-1922, 1993
 19. Bruno E, Briddell RA, Cooper RJ, Hoffman R: Effects of recombinant interleukin 11 on human megakaryocyte progenitor cells. *Exp Hematol* 19;378-381, 1991
 20. Dercksen MW, Weimar IS, Richel DJ, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Slaper-Cortenbach IC, Pinedo HM, von dem Borne AE, Gerritsen WR, van der Schoot CE: The value of flow cytometric analysis of platelet glycoprotein expression on CD34+ cells measured under conditions that prevent P-selectin-mediated binding of platelets. *Blood* 86;3771-3782, 1995
-