

골수 단핵세포의 거핵구 집락 배양에 대한 조혈성장인자의 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실

장용석 · 권기영

Effect of Hematopoietic Growth Factors on the Generation of Megakaryocyte Colony Forming Units (CFU-MK)

Yong Seok Chang, M.D., Ki Young Kwon, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : *In vitro* colony assay procedures for expansion of human erythroid and granulocyte-macrophage progenitors have been used for many years. However, the development of reproducible assay method for human megakaryocyte (MK) progenitors considerably lagged behind. Cytokines such as stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), IL-6 and IL-11 have been demonstrated to have effects on the production of colony forming units (CFU)-MK. This study was undertaken to investigate the *ex vivo* expansion of megakaryocyte progenitors, derived from mononuclear cells of normal bone marrow. Bone marrow mononuclear cells were incubated in serum-free medium (MegaCult™, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) and supplemented with SCF, granulocyte-colonystimulating factor (G-CSF), TPO, IL-11, combinations of SCF + G-CSF + TPO and SCF + G-CSF + TPO + IL-11. The effect of hematopoietic growth factors on *ex vivo* expansion of megakaryocyte progenitor cells was evaluated. These cytokines were able to generate of CFU-MK in the media and to increase megakaryocyte colony formation: Numbers of pure MK colonies increased in the media supplemented with SCF, IL-11 and combination of cytokines. Mixed MK colonies also increased in the media supplemented with SCF, G-CSF and combination groups.

Key Words : Megakaryocyte, Hematopoietic growth factor, Thrombopoietin, IL-6, IL-11, Stem cell factor

서 론

혈소판은 인체의 지혈 과정에 관여하며 골수내의 다기능 조혈모세포로부터 분화된 거핵구에서 생산된다. 이러한 혈소판의 생성과 거핵구 형성에는 간질세포와의 접촉 등 여러 인자가 관여하고 있다[1]. 여기에 관계되는 대표적인 시토카인으로 thrombopoietin(TPO)을 들 수 있는데, TPO는 조혈 모세포의 증식 및 분화에 관여하며 다른 조혈 성장인자와 상호작용하여 상승효과가 있음이 밝혀져 있다[2,3]. 또한 IL-3, IL-6, IL-11 및 stem cell factor(SCF) 등도 영향을 미치는 인자로 알려져 있다[1,2]. 그러나 근래에 와서 조혈모세포 이식이나 고용량의 항암 화학요법 후 일어나는 빈혈이나 백혈구감소증에 조혈 성장인자를 사용하여 적혈구와 과립백혈구의 생체내 증식에 널리 이용되고 있는 것과 달리, 혈소판감소증에는 혈소판 수혈 이외에는 거핵구 전구세포의 증식에 대한 치료적 응용은 아직도 더딘 상태이다. 이는 거핵구의 집락 배양이 다른 집락과 달리 적절한 체외 증폭방법의 표준화가 되어 있지 않으며, 배양 후에도 거핵구 집락임을 확인할 수 있는 적절한 염색법이 알려져 있지 않았기 때문이나, 최근에는 거핵구 집락을 고정하여 식별할 수 있는 방법이 개발되어[4,5] 거핵구의 생체외 증식에 관한 연구가 계속되고 있다.

저자들은 이 실험을 통해 생체외 거핵구 집락 배양의 효율적인 방법에 대한 검증을 시행하였으며, 거핵구 집락에 대한 성장인자의 효과 및 상승작용을 평가하고, 적절한 성장인자의 병합첨가 조합을 확인하고자 하였다. 또한, 혈소판 감소의 조기 회복을 촉진시키는 방법으로 생체외에서 증폭한 거핵구 및 혈소판을 임상에서 사용하기 위한 여러 가지 실험의 기초적인 자료로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

정상적인 조혈기능을 지닌 성인 5명을 조사대

상으로 선정하여 이들의 장골능에서 10 mL의 골수 혈액을 천자하였다. 성별은 남자 2명과 여자 3명이었고, 평균 연령은 50(31-68)세였다. 대상군의 말초 혈액 혈소판 평균수치는 $318.4 (325.0-378.0) \times 10^9/L$ 이었다.

2. 단핵세포의 분리

수집된 10 mL의 골수 혈액을 Ficoll-Hypaque 용액 위에 중첩시킨 후 원심분리하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 인산완충식염수로 2회 세척한 후 Isocove's modified Dulbecco's medium(이하 IMDM, Gibco Life Technologies, Paisley, UK) 용액에 혼합하였다.

3. 거핵구 집락 배양

MegaCult™(Stem Cell Technology Inc., Vancouver, Canada)를 이용하여 거핵구의 집락 배양을 시행하였다. 1%의 bovine serum albumin(Sigma, St Louis, USA), 200 $\mu g/mL$ 의 human transferrin(approximately 98% pure, Sigma, St Louis, USA), TPO 50 ng/mL, IL-6 10 ng/mL가 포함되어 있는 2 mL의 배양액에 분리한 단핵세포 2.2×10^5 개를 IMDM에 희석하여 혼합하였다. 37°C 상태로 유지된 agar를 1.2 mL 넣고 이 혼합액을 chamber slide의 2개 well에 각각 나누어 접종하였다. 4°C에서 20분간 둔 후 37°C, 5% CO_2 상태를 유지하도록 맞추어진 배양기에서 배양하였다.

4. 조혈성장인자의 첨가

조혈 성장인자를 첨가하지 않은 대조군과 성장인자를 각각 또는 혼합하여 첨가한 후에 배양한 군을 비교하였다. MegaCult™ 배지에 SCF(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) 10 ng/mL, granulocyte colony stimulating factor(G-CSF, Neutrogen®, 중외제약) 100

ng/mL, TPO (R&D Systems, Minneapolis, USA) 100 ng/mL, IL-11 (Genzyme Corp., Cambridge, USA) 100 ng/mL를 각각 단독적으로 첨가한 군과 같은 농도의 SCF + G-CSF + TPO를 병합 첨가한 군, 그리고 SCF + G-CSF + TPO + IL-11을 병합하여 첨가한 군의 6개 군으로 나누어 12일간 배양하였다.

5. 거핵구 집락의 고정 및 면역조직학적 염색

집락이 포함된 chamber slide를 100 mL의 methanol:acetone 1:3 용액으로 20분간 고정하였다. 고정한 chamber slide를 실온에서 30분간 건조시킨 후 면역조직학적 염색 전까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 면역조직학적 염색을 위하여 500 μ L의 0.1 M Tris/NaCl과 500 μ L의 5% 혈청 알부민으로 20분간 3차례 세척 후 1차 항체인 항 GP II b/IIIa 단클론항체 (PharMingen, SanDiego, USA)와 60분간 반응하도록 하였다. 다시 2차 항체인 biotinylated anti-mouse 항체 (PharMingen, SanDiego, USA)와 30분간 반응 후 alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase complex (Dako, Glostrup, Denmark)에 15분간 반응을 일으킨 다음, Evans blue로 염색한 후 도립현미경 하에서 집락을 관찰하였다.

집락 배양의 판독은 순수 거핵구 집락(pure

MK colony)은 3개 이상의 거핵구의 집락이 포함되는 경우로 정의하였고, 혼합 거핵구 집락(mixed MK colony)은 거핵구와 다른 세포가 포함된 경우로 하였다.

6. 통계 처리

Mann-Whitney test에 의한 비 모수 검정으로 통계분석을 시행하였고, p 값은 0.05 미만을 유의한 것으로 판정하였다.

성 적

1. 거핵구 집락의 면역조직학적 염색

거핵구 집락의 확인을 위하여 거핵구 표면에 존재하는 GP II b/IIIa 항원에 대한 항 GP II b/IIIa 단클론항체로 면역조직학적 염색을 시행하였다. 항 GP II b/IIIa 단클론항체에 양성으로 염색된 세포들은 붉은색, 음성인 다른 세포들은 푸른색으로 나타났다. 20개 이하의 거핵구로 구성되어 있는 집락을 small CFU-MK, 21개에서 50개 사이의 거핵구로 구성되어 있는 집락을 medium CFU-MK, 50개 이상의 거핵구로 구성되어 있는 경우를 large CFU-MK로 정의하였다. Fig. 1은 small CFU-MK로 구성된 순수 거핵구 집락이며, Fig. 2는 CFU-MK와

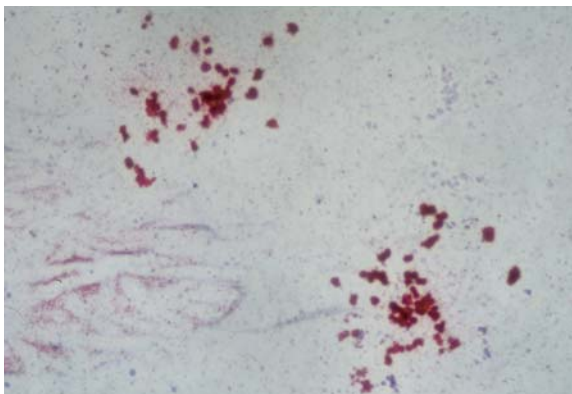


Fig. 1. Microphotograph of pure CFU-MK (Evans blue stain, x 40).

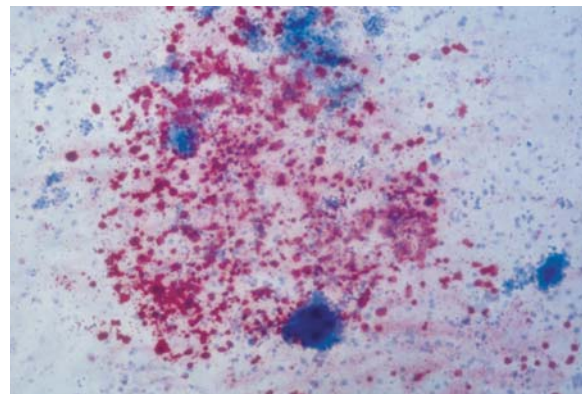


Fig. 2. Microphotograph of mixed CFU-MK (Evans blue stain, x 40).

다른 세포가 포함된 혼합 거핵구 집락이다.

2. 거핵구 집락 형성에 대한 단일 조혈 성장인자의 효과

(1) SCF의 효과

정상인에서 조혈 성장인자를 첨가하지 않은 경우 순수 거핵구 집락 수는 44.5 ± 37.7 개였으며, 혼합 거핵구 집락 수는 9.4 ± 9.3 개, 총 거핵구 집락 수는 53.9 ± 46.1 개였다.

단독적인 조혈 성장인자의 첨가로 SCF에 대한 순수 거핵구 집락 형성 반응은 58.6 ± 52.2 개, 혼합 거핵구 집락 형성 반응은 20.4 ± 12.8 개였다. 총 거핵구 집락 형성 반응은 SCF 첨가 시 79.0 ± 54.8 개로 SCF 단일 첨가시 순수 및 혼합 거핵구 집락 형성이 증가함을 보였으며, 다른 조혈 성장인자를 단일 첨가한 경우에 비하여 뚜렷한 증가를 보였다. 혼합 거핵구 집락의 경우에는 SCF의 첨가로 인한 증가가 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, ($p < 0.05$), 순수 거핵구 집락 및 총 거핵구 집락의 형성의 증가에서는 통계적인 의미를 보이지는 않았다(Fig. 3).

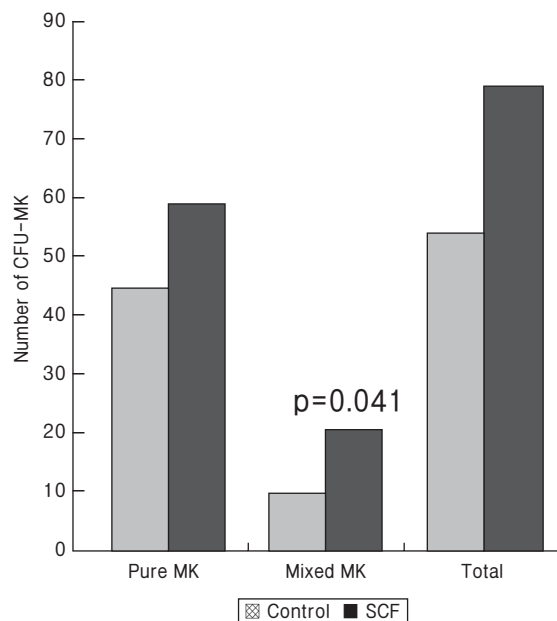


Fig. 3. Effect of stem cell factor (SCF) on CFU-MK.

(2) G-CSF의 효과

G-CSF의 첨가에 대한 순수 거핵구 집락 형성 반응은 43.4 ± 25.6 개, 혼합 거핵구 집락 형성 반응은 22.0 ± 11.6 개, 총 거핵구 집락 형성 반응은 65.4 ± 34.4 개였다. G-CSF만 첨가한 경우 대조군에 비해 순수 거핵구의 집락은 증가하지 않았으나, 혼합 거핵구는 SCF를 단일 첨가한 군과 함께 단일 첨가군 중에서는 가장 많이 증가하였으며, 이로 인해 총 거핵구 집락도 증가하는 양상을 나타내었다. 그러나, G-CSF의 단일 첨가로 인한 혼합 거핵구 집락의 증가가 통계적인 의미를 보이지는 않았다(Fig. 4).

(3) TPO의 효과

MegaCult™ 배지에 포함된 TPO 외에 추가적인 TPO의 첨가에 대한 순수 거핵구의 집락 형성 반응은 43.2 ± 42.0 개, 혼합 거핵구 집락 형성 반응은 11.6 ± 8.9 개 그리고 총 거핵구 집락 형성 반응은 54.8 ± 46.2 개로 나타났다. TPO의 추가 첨가시 혼합 거핵구의 집락에서는 일부 증가하는 결과를 보였으나, 전반적으로 뚜렷한 증가를 보이지는 않았다(Fig. 5).

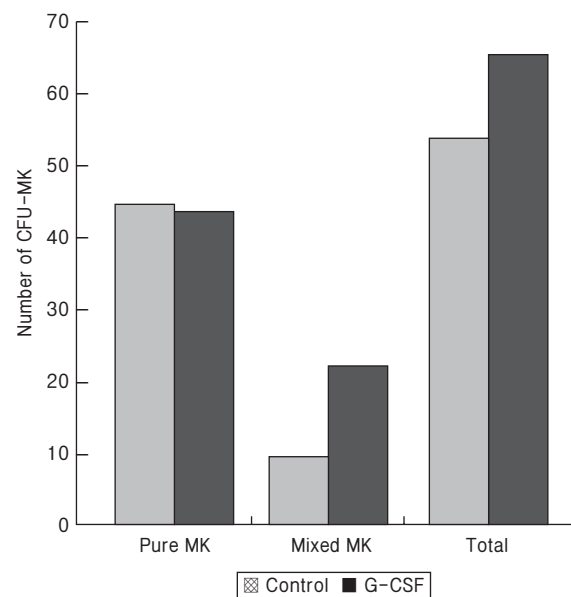


Fig. 4. Effect of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on CFU-MK.

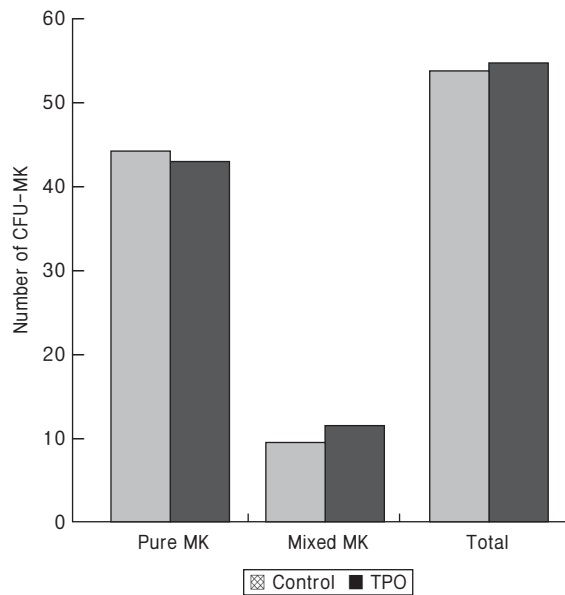


Fig. 5. Effect of thrombopoietin (TPO) on CFU-MK.

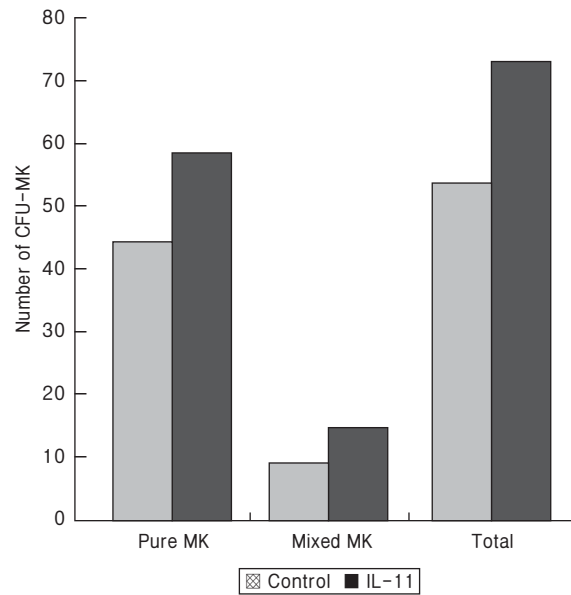


Fig. 6. Effect of IL-11 on CFU-MK.

(4) IL-11의 효과

IL-11의 첨가에 대한 순수 거핵구의 집락 형성 반응은 58.7 ± 47.6 개, 혼합 거핵구의 집락 형성 반응은 14.9 ± 16.5 개, 총 거핵구 집락 형성은 73.6 ± 59.7 개였다. 순수 거핵구 집락 형성은 SCF를 단일 첨가한 군과 함께 가장 큰 증가를 보였으며, 혼합 거핵구 집락의 경우에는 순수 거핵구 집락만큼 뚜렷하지는 않았으나 집락수가 증가하였다. 순수 거핵구 집락 및 혼합 거핵구 집락 수의 증가에 통계적인 의의는 나타나지 않았다(Fig. 6).

3. 거핵구 집락 형성에 대한 조혈성장인자의 병합 첨가 효과

(1) SCF, G-CSF, TPO의 병합 첨가 효과

SCF + G-CSF + TPO의 조혈 성장인자 병합 첨가로 순수 거핵구의 집락 수는 59.7 ± 36.8 개, 혼합 거핵구 집락 수는 26.1 ± 30.4 개, 총 거핵구 집락 수는 85.8 ± 65.9 개로 전체적으로 뚜렷한 증가를 보였다. 순수 거핵구 집락 형성은 SCF와 IL-11의 단일 첨가군의 경우와 큰 차이를 보이지는 못했으나, 혼합 거핵구 집락 형성은 단일 첨가

군에 비교해 현저한 증가를 보여주었다. 그러나 SCF, G-CSF, TPO의 병합 첨가로 인한 순수 거핵구 집락 및 혼합 거핵구 집락 형성의 증가가 통계적인 의의를 나타내지는 않았다(Fig. 7).

(2) SCF, G-CSF, TPO, IL-11의 병합첨가 효과

SCF + G-CSF + TPO + IL-11의 조혈 성장인자 병합 첨가로 순수 거핵구 집락 형성 수는 51.1 ± 41.6 개, 혼합 거핵구 집락 수는 23.4 ± 19.9 개, 총 거핵구 집락 수는 74.5 ± 60.8 개로 대조군에 비해 증가를 보였다. 순수 거핵구 집락 형성은 SCF 및 IL-11을 단일 첨가한 군의 경우와 SCF + G-CSF + IL-11의 병합 첨가군에 비해 오히려 감소한 결과를 보였으며, 혼합 거핵구의 집락 형성에서도 단일 첨가군에 비해서는 증가를 보였으나 SCF + G-CSF + TPO 병합 첨가군의 결과에는 미치지 못하는 결과를 보였다. 따라서 조혈 성장인자를 병합 첨가한 경우에 있어서 IL-11의 추가로 더 나은 결과는 나타나지 않았다. SCF + G-CSF + TPO + IL-11의 병합 첨가로 인한 순수 거핵구 집락 및 혼합 거핵구 집락 수의 증가 역시 통계적인 의의가 나타나지는 않았다(Fig. 8).

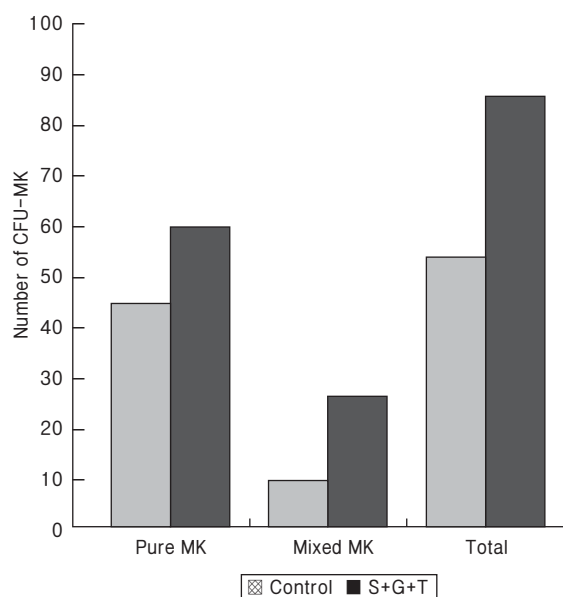


Fig. 7. Effect of combined treatment with stem cell factor, granulocyte colony stimulating factor and thrombopoietin on CFU-MK.

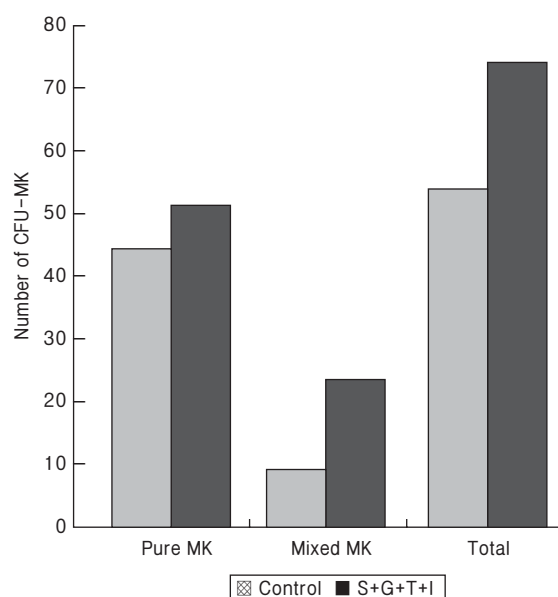


Fig. 8. Effect of combined treatment with stem cell factor, granulocyte colony stimulating factor, thrombopoietin and IL-11 on CFU-MK.

고 찰

여러 가지의 고형암과 혈액 질환의 치료로 고용량의 항암 화학요법과 조혈모세포 이식이 최근에 널리 시행되면서[6,7] 장기간의 백혈구, 혈소판의 감소로 인한 감염과 출혈 등의 합병증이 문제가 되고 있다. 특히 혈소판 감소에 대한 해결책은 미비한 실정인데, 혈소판 수혈이 유일한 치료 방법이지만 수혈 자체로 인한 부작용과 혈소판 수혈에 따르는 불응성의 출혈 등이 일어날 수 있으므로 출혈로 인한 사망은 크게 줄지 않고 있다[8]. 따라서 최근에는 TPO 등의 시토카인을 사용하려는 시도[2] 외에도 체외에서 거핵구를 증폭시켜 이를 임상에 이용하려는 방법이 다양하게 연구되고 있다[5,9,10].

이 연구에서는 골수 혈액의 단핵세포를 이용하여 거핵구 집락의 배양을 시행하였으며 IL-6와 TPO가 포함되어 있는 MegaCult™을 이용하였다. 또한 조혈성장인자는 SCF, G-CSF, TPO, IL-11을 각각 첨가한 군과 이들 시토카인을 병합 첨가한 군으로 나누어 배양하였다. 배양된 집락 중 거핵구

를 확인하기 위해서 항 GP IIb/IIIa 단클론항체를 이용한 면역 조직학적 염색을 하였는데 GP IIb(CD41)와 GPIIIa(CD61)는 거핵구임을 확인하기 위해서 주로 사용되는 초기의 세포 항원이다[6]. 이러한 방법으로 거핵구 집락을 배양할 수 있었으며, 형성된 집락 수를 측정하여 비교할 수 있었다.

순수 거핵구 집락 배양에서는 단일 성장인자 첨가군의 경우 SCF 첨가군과 IL-11 첨가군에서 가장 많은 집락 수의 증가를 보였으며, TPO와 G-CSF를 단일 첨가한 경우에는 대조군에 비해 집락 수가 증가하지 않았다. 혼합 거핵구 집락 배양에서는 모든 단일 첨가군에서 집락 수의 증가를 보였으며 SCF와 G-CSF를 단일 첨가한 경우 가장 뚜렷한 집락 증가를 보였다. 따라서 단일 첨가군의 거핵구 집락 배양시 SCF 첨가군에서 총 거핵구 집락이 가장 많이 증가하였으며, IL-11과 G-CSF 단일 첨가의 순으로 총 거핵구 집락 수가 증가하였다. SCF는 직접적으로 작용하여 거핵구의 집락 형성을 자극하지는 않으나 거핵구 집락 형성을 자극하는 다른 시토카인의 효과를 증가시키며[11],

IL-11은 거핵구의 성숙에 자극을 일으키고[12], GM-CSF는 거핵구의 증식과 분화를 조장하는 것으로 알려져 있다[13]. 이외에도 여러 가지의 시토카인들이 거핵구의 형성 과정에서 비특이적이지만 여러 단계의 분화과정에 영향을 미치게 되는데, IL-3는 TPO보다 초기 단계에 작용하여 거핵구의 증식과 분화를 조장하는 것으로 알려져 있으며[2], erythropoietin은 거핵구의 증식과 성숙도를 향상시킨다고 보고되어 있다[14].

이 연구 결과 중에서 TPO를 추가적으로 첨가한 군의 경우에는 그 상승효과가 크지 않았는데, 이는 MegaCult™ 배지에 기본적으로 이미 TPO가 함유되어 있기 때문으로 생각된다. TPO는 거핵구 형성 과정에 가장 중요한 시토카인의 하나로 미분화된 조혈모세포에서 거핵구 집락으로의 분화 및 증식에 관여하며[15], erythropoietin, SCF, IL-11 등의 다른 조혈 성장인자와의 병합 사용에서 상승효과가 있다고 알려져 있다[2]. 또한, 다른 연구에 따르면 제대 혈액을 이용하여 거핵구를 체외 증식하였을 때, TPO가 1 ng/mL 이상일 경우 그 농도에 비례하여 집락의 형성이 증가한다고 보고되어 있으나[16], 이 실험에서는 TPO의 추가로 인해 더 많은 집락을 형성하지 못하였는데, 결국 기본적으로 배지에 포함된 양보다 많은 TPO의 사용이 더 이상의 집락 형성 증가를 유발하지는 못할 수도 있다는 결과를 보였다. 이는 좀 더 많은 증례를 통한 검토가 필요할 것으로 생각되며, 골수 혈액과 제대 혈액의 차이로 인해 TPO의 반응에 차이가 일어났을 가능성도 고려할 수 있다.

병합 첨가군의 거핵구 집락 배양에서는 SCF + G-CSF + TPO의 병합 첨가군에서 가장 많은 수의 순수 거핵구 및 혼합 거핵구의 집락이 관찰되어 병합첨가의 의의를 보여주었으나, 병합 첨가시에 단일 첨가군과 비교한 증가가 통계적인 의의를 보이지는 않았다. IL-11을 추가로 첨가한 SCF + G-CSF + TPO + IL-11의 병합 첨가군에서는 IL-11을 포함하지 않은 병합 첨가군에 미치지 못한 결과를 보여, IL-11이 생체외 증폭의 경우 상승 작용이 뚜렷하지 않을 가능성도 염두에 두고 추후 더 확인이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 조혈

성장인자의 병합 첨가시 거핵구 집락 수의 변화는 순수 거핵구 집락 보다 혼합 거핵구의 집락 형성에서 더 뚜렷한 증가를 보였다. 다른 연구에서도 정상인의 골수를 이용하여 거핵구의 체외 증식을 시행하였을 때 TPO와 IL-3, GM-CSF, SCF 중의 하나와 병합하는 경우 거핵구 집락형성이 상승되었으나, 이들을 병합 사용한 경우에 반드시 거핵구 집락 형성의 상승효과를 가져오지는 않았다고 보고된 바 있다[17].

SCF 단독 첨가군에서 혼합 거핵구 배양의 증가는 통계적으로 유의한 결과를 보였으나, 다른 단일 첨가군과 병합 첨가군의 경우에는 거핵구 배양의 증가에 있어 통계학적인 의의는 보이지 않았는데, 이는 실험 대상의 수가 충분치 못했다는 점이 원인으로 작용하였을 수도 있다고 생각되며, 보다 더 객관적인 결과를 얻기 위해서는 각 첨가군 내에서도 서로 다른 조건을 주어 상호 비교를 한 실험도 필요할 것으로 생각된다. 이상의 결과로 거핵구의 증식에 다양한 성장인자가 복합적으로 영향을 나타내게 됨을 알 수 있었다. 가장 적합한 성장인자의 농도나 조합을 찾으려는 노력은 계속되어 왔으며, 이 연구에서 순수 거핵구 집락의 경우 SCF와 IL-11, 혼합 거핵구 집락은 G-CSF 및 SCF의 첨가 시에 거핵구 집락 형성이 증가되었고, SCF + G-CSF + TPO의 병합 첨가가 가장 좋은 결과를 보여주었으므로 이를 바탕으로 생체외 거핵구 집락 배양에 대한 앞으로의 연구가 더 필요하며, 또한 향후 거핵구 집락의 배양에서 문제점으로 지적되고 있는 거핵구 자체에 의한 성장 촉진 또는 억제인자들의 분비에 의한 영향을 최소화할 수 있는 배양 방법의 개발과 거핵구의 체외 증식에 대한 추후의 연구가 있어야 할 것이다.

요 약

이 연구는 정상인의 골수 혈액에 각각의 시토카인을 첨가하여 거핵구 집락의 형성능을 비교하였으며, 이를 생체외 거핵구 증폭에 있어 가장 적절한 조건을 찾기 위한 기초적인 자료로 사용하고자

하였다.

정상적인 골수기능을 가진 성인의 골수 혈액을 채취하여 단핵세포를 분리 수집하였으며 이를 MegaCult™ 배지에 넣어 거핵구 집락을 배양하고, 항 GP IIb/IIIa 단클론항체를 이용하여 거핵구 집락을 확인하였으며 도립현미경 하에서 집락 수를 관찰하였다. 또한, SCF, G-CSF, TPO, IL-11 등 4가지의 시토카인을 단독 또는 병합하여 첨가한 군들의 집락 수를 비교하였다.

명확한 거핵구 집락이 형성됨을 확인할 수 있었으며, 순수 거핵구 및 혼합 거핵구 집락은 조혈 성장인자를 첨가하지 않은 대조군보다 성장인자를 첨가한 군에서 집락의 증가가 나타났고, 그 중 단독 첨가군의 경우 순수 거핵구 집락 형성은 IL-11 및 SCF 첨가군에서, 혼합 거핵구 집락 형성은 SCF 및 G-CSF 단독 첨가군에서 집락의 증가가 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 병합 첨가군의 경우 단일 첨가군에 비해 혼합 거핵구의 집락 형성이 증가하였다.

참 고 문 헌

1. Rabinowe SN, Nemunaitis J, Armitage J, Nadler LM. The impact of myeloid growth factors on engraftment following autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma. *Semin Hematol* 1991;**28**:6-16.
2. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood* 1995;**85**:1719-26.
3. Anchaisuksiri P, Carlson PL, Dessypris EN. Effects of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte colony formation and megakaryocyte ploidy by human CD34+ cells in a serum free system. *Brit J Haematol* 1996;**93**:13-7.
4. Sawai N, Koike K, Ito S, Okumura N, Kamijo T, Shiohara M, *et al*. Aberrant growth of granulocyte-macrophage progenitors in juvenile chronic myelogenous leukemia in serum-free culture. *Exp Hematol* 1996;**24**:116-22.
5. Bertolini F, Battaglia M, Pedrazzoli P, Da prada GA, Lanza A, Soligo D, *et al*. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 1997;**89**:2679-88.
6. Kersey JH, Weisdorf D, Nesbit ME, LeBien TW, Woods WG, McGlave PB, *et al*. Comparison of autologous and allogenic bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1987;**317**:461-7.
7. Huan SD, Hester J, Spitzer G, You JC, Dunphy FR, Wallerstein RO, *et al*. Influence of mobilized peripheral blood cells on the hematopoietic recovery by autologous marrow and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after high-dose cyclophosphamide, etoposide, and cisplatin. *Blood* 1992;**79**:3388-93.
8. Minchinton RM, Waters AH, Malpas JS, Kendra JR, Barrett AJ, Starke I. Autoimmune thrombocytopenia after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1982;**2**:391-6.
9. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, *et al*. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;**369**:568-71.
10. Schneider JG, Crown J, Shapiro F. *Ex vivo* cytokine expansion of CD34-positive hematopoietic progenitors in bone marrow (BM), placental cord blood (CB), and cyclophosphamide and G-CSF mobilized peripheral blood (PB). *Blood* 1992;**80**(suppl):268a.
11. Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffman R. Effect of c-kit ligand on in vitro human

- megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991;**78**:2854-9.
12. Burstein SA, Mei RL, Henthorn J, Friese P, Turner K. Leukemia inhibitory factors and interleukin 11 promote maturation of murine and human megakaryocytes in vitro. *J Cell Physiol* 1992;**153**:305-12.
13. Bruno E, Cooper RJ, Briddell RA, Hoffman R. Further examination of the effects of recombinant cytokines on the proliferation of human megakaryocyte progenitor cells. *Blood* 1991;**77**:2339-46.
14. An E, Ogata K, Kuriya S, Nomura T. Interleukin-6 and erythropoietin act as direct potentiators and inducers of in vitro cytoplasmic process formation on purified mouse megakaryocytes. *Exp Hematol* 1994;**22**:149-56.
15. Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W. The Mpl ligand or thrombopoietin megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 1995;**86**:2516-25.
16. Won JH, Cho SD, Park SK, Lee GT, Baick SH, Suh WS. Thrombopoietin is synergistic with other cytokines for expansion of cord blood progenitor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;**9**:465-73.
17. Blair A, Baker CL, Pamphilon DH, Judson PA. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells from normal bone marrow and peripheral blood and from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2002;**116**:912-9.