

골수 단핵구 배양에 대한 조혈성장인자의 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실 및 의과학연구소
도영록 · 권기영

The Effect of Hematopoietic Growth Factors on CFU-GM and CD 34+ Cells of Bone Marrow Mononuclear Cells

Young Rok Do, M.D. and Ki Young Kwon, M.D.

*Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine &
Institute for Medical Science, Taegu, Korea*

-Abstract-

Now a days, hematopoietic stem cell transplatation can be used as an effective treatment modality for bone marrow failure syndromes such as aplastic anemia, malignancies, and certain metabolic disease. Hematopoietic stem cells are the population of cells capable both of self renewal and differentiation into a variety of hematopoietic lineages. It is suggested that clinical practice in the areas of bone marrow transplantation and gene therapy might rely on the *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. The enumeration of cell expression of CD34 and granulocyte macrophage colony forming unit (CFU-GM) are used for assessing the efficacy of human hematopoietic stem cell enrichment technique. The colony stimulating factors (CSF) stimulate the proliferation and differentiation of progenitor cells. We pursued a series of experiments to define the proper conditions for the expansion of hematopoietic stem cells in the short term liquid suspension culture of bone marrow cells and to define optimal combination of colony stimulating factors (CSFs).

Liquid cultures were initiated with 1×10^6 bone marrow mononuclear cells (BM MNCs), and innoculated with 1×10^5 CD34 cells, which were isolated from BM MNCs by flow cytometry, in 3 well petri dishes with the various hematopoietic growth factors (HGF). The recombinant human HGFs used are 100 ng/mL of stem cell factor (SCF), 100 ng/mL of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 100 ng/mL of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 100 ng/mL of interleukin-3 (IL-3) and combination of SCF 100ng/mL, GM-CSF 100ng/mL, IL-3 100ng/mL. At the end of the culture, colony forming cells were evaluated by semisolid clonogenic assay(CFU-GM) and CD34⁺ cells were enumerated with flow cytometry.

On the third day of the culture, CD34⁺ cells were expanded 14.98 fold with the addition of SCF, 7.82 fold with G-CSF, 11.12 fold with GM-CSF, 15.53 fold with IL-3 and 18.32 fold with SCF, GM-CSF and IL-3. On the seventh day of the culture, CD34⁺ cells were expanded 5.82 fold with SCF, 5.91 fold with G-CSF, 13.94 fold with GM-CSF, 6.43 fold with IL-3 and 9.45 fold with SCF, GM-CSF and

IL-3.

In CFU-GM assay of the three day culture, CFU-GM counts were 37.5 with SCF, 74.1 with G-CSF, 90.5 with GM-CSF, 126.7 with IL-3, and 125.8 with SCF, GM-CSF and IL-3. The CFU-GM counts of the seven day culture are 31.4 with SCF, 44.6 with G-CSF, 42.3 with GM-CSF, 55.2 with IL-3, and 90.2 with SCF, GM-CSF and IL-3. The three day culture of BM MNCs was more effective than the seven day culture of CD34⁺ cell expansion and CFU-GM expansion.

The results of this study suggest that short term culture of bone marrow cells could expand hematopoietic progenitor cells with the addition of HGFs. Especially, three day culture of BM MNCs with the addition of SCF, GM-CSF and IL-3 might be the most efficient in this system.

Key Words : Hematopoietic growth Factors. Bone marrow mononuclear cell

서 론

근래 골수나 말초혈액, 제대혈 등의 이식으로 여러 질병의 치료가 가능해짐에 따라 조혈모세포에 대한 관심이 높아지게 되었다. 이를 조혈모세포는 다른 일반적인 세포와는 달리 자신을 복제할 수 있을 뿐 아니라, 모든 종류의 혈구세포와 Kupffer cell이나 폐포대식세포 등의 면역세포로까지 분화가 일어난다는 사실이 알려져 있다 (Abramson *et al*, 1977). 이를 세포는 형태적으로 구별이 거의 불가능하며 세포표면에 계열표지자를 나타내지 않고 Rhodamine 123에 염색이 잘 되지 않으며 Thy 1항원을 낫게 표현하고 CD34항원을 지니고 있다 (Huang & Terstappen, 1992). 또한 조혈모세포의 분화에 수십 종의 조혈성장인자가 상호보완적으로 작용하여 조절을 하고 있으며 이들을 복합적으로 사용하였을 때 효과가 상승된다고 알려져 있다 (McNiece *et al*, 1989; McNiece *et al*, 1991). 지금은 이를 세포를 체외에서 배양할 수 있는 방법이 고안되어 세포의 특성이나 약물의 효과판정 등의 연구에 널리 이용되며, 배양에는 RPMI 등의 액체 배양액이나 반고형 배지인 methylcellulose 등이 사용되고 있다. 그리고 조혈기능을 판정하는 방법으로는 methylcellulose 배지에 나타난 granulocyte macrophage colony forming unit (CFU-GM)를 확인하거나 (Pike & Robinson 1970) stem cell과 early committed progenitor cell에 분포하는 CD34 양성세포를 측정하는 것이 일반적으로 되어 있다 (Bensinger *et al*, 1992).

이에 연구자는 골수의 단핵구를 분리하여 자가

혈청을 첨가한 액체 배양액에 조혈성장인자를 첨가하여 조혈모세포의 증식 및 조혈기능에 미치는 영향을 평가함으로써 어떠한 조합의 성장인자가 가장 효과적인지를 판정하고 향후 소량의 조혈모세포를 체외배양하는데 대한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

골수세포의 채취 및 단핵구 분리

정상 골수기능을 지닌 성인 5명을 대상으로 후상장골극을 국소마취 후 천자하여 15~20 mL의 골수혈액을 채취하고 보존제가 함유되지 않은 heparin 50 U/mL을 넣고 섞은 후 원심하여 혈장을 분리하였다. 수집된 혈구에 0.1% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 phosphate buffered saline (PBS)을 첨가하여 희석시킨 다음 Ficoll-Hypaque를 서서히 첨가한 후 1,000g로 30분간 원심분리하여 단핵구를 수집하였으며, Isocove's modified Dulbecco's medium (IMDM)을 첨가하여 2회 세척한 후 trypan blue로 염색하여 생존해 있는 단핵구 수를 측정하였다.

액상 배지 배양 및 조혈 성장인자 투여

액상 배지인 RPMI 1640을 기본으로 10% 농도가 되도록 자가혈청을 넣고 L-glutamine 1%, mercaptoethanol 0.01% 및 penicillin과 streptomycin이 1%가 되도록 조성하여 18 mL의 혼합 액상배지를 만들었다. 배지를 3 mL씩 6개로 나누어 성장인

자를 넣지 않은 대조군과 granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, Neutrogen[®], 중외제약), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Leukogen[®], LG화학), stem cell factor (SCF, Kirin, Japan), interleukin-3 (IL-3, Kirin, Japan)를 각각 100 ng/mL 씩 넣은 군 및 SCF, GM-CSF, IL-3의 3가지 성장인자를 모두 넣은 군으로 분리한 후 각 군에 생존해 있는 1×10^6 개의 단핵구를 넣어 37°C 5% CO₂ 배양기에 서 배양하였다.

CD34 양성 세포 측정

CO₂ 배양기에서 배양 1일, 3일, 7일째 되는 날 액상 배지에 배양중인 골수 단핵구 세포 중 1×10^4 개 이상을 채취하여 flow cytometry(Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 CD34 양성 세포수를 측정하였다.

Methylcellulose 반고형배지 배양

30mL fetal calf serum, 10mL의 10% bovine serum albumin, 2-mercaptoethanol 1mL과 40mL 의 2.3% Isocove's methylcellulose (HCC-4230, Terry Fox, B.C., Canada)에 phytohemagglutinin-leukocyte conditioned media (PHA-LCM, Terry Fox, B.C., Canada) 5mL와 L-glutamine 1mL, 13mL의 IMDM을 넣어 0.9%의 methylcellulose 배지를 만들어 4mL씩 분리하여 냉동보관하였다. 6개군으로 나누어 액상 배지에 배양중인 단핵구를 2.2mL의 methylcellulose에 접종하여 배양 3일과 7일에 각각 1×10^5 개씩 넣어 세포와 IMDM으로 3mL가 되도록 한 후 잘 혼합한 다음 petri dish 2개에 각각 1mL씩 blunt needle로 접종하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

Granulocyte-Macrophage colony forming unit (CFU-GM) 측정

도립위상차 현미경을 사용하여 Methylcellulose 배지에서 50개 이상의 세포가 집락을 이룬 Granulocyte colony forming unit (CFU-G), Macrophage

colony forming unit (CFU-M) 및 Granulocyte-Macrophage colony forming unit (CFU-GM) 수를 관찰하였다.

성 적

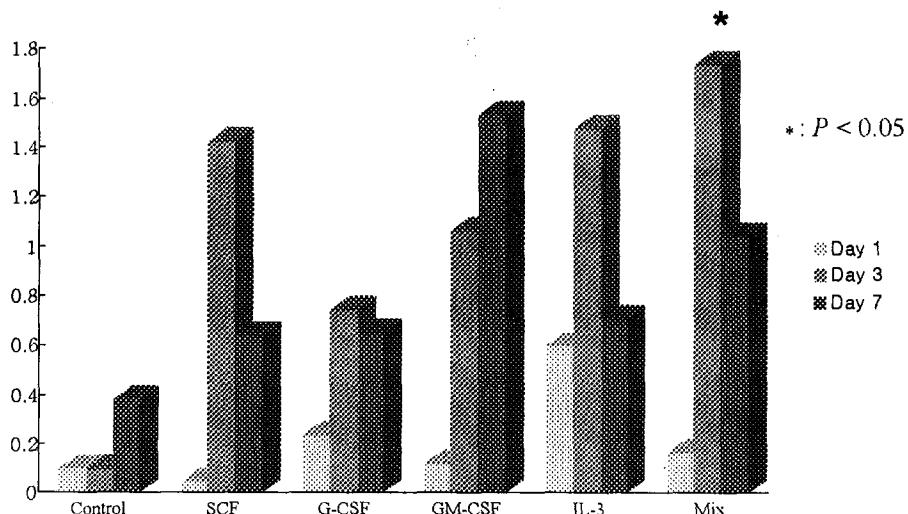
CD34 양성세포의 증폭

1일간 배양시 대조군에 비해 SCF 단독첨가시 CD34 양성세포는 0.45배로 감소되었으나, G-CSF, GM-CSF, IL-3 단독첨가시 각각 2.35배, 1.2 배, 6배 증가되었으며, IL-3, SCF, GM-CSF 복합투여시 1.65배 증가하여, 1일간 배양시에는 IL-3 단독첨가의 경우가 가장 효과적이었다.

3일간 배양한 경우 대조군에 비해 SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-3 단독 첨가시 CD34 양성 세포가 각각 14.98배, 7.82배, 11.12배, 15.53배로 증가되었으며 3가지 인자의 복합 첨가시 18.32배로 조혈인자를 단독투여한 군보다 더 많은 증가가 관찰되었다 (Fig. 1).

7일간 배양시에는 대조군에 비해 SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-3를 단독으로 첨가하였을 때 CD34 양성세포가 각각 5.82배, 5.91배, 13.94배, 6.43배로 증가되었고 조혈인자를 복합적으로 첨가한 군은 9.45배의 증가를 보였다 (Table 1).

배양기간에 따른 CD34 양성세포의 증가율을 비교해 볼 때, 대조군에 비해 조혈인자 첨가시 1일간 배양에서 평균 2.33배, 3일간 배양에서 평균 13.55배, 7일간 배양시 평균 8.31배로 3일간 배양한 군에서 7일간 배양한 군보다 CD34 양성 세포가 더 많았다. CD34 양성세포의 증가율을 비교하였을 때, 각 인자를 단독첨가한 경우 3일 배양에서 각각 SCF 33.3배, G-CSF 3.33배, GM-CSF 9.33 배, IL-3 2.59배였고 복합투여시에는 11.05배로 증가되었다 (Fig. 2). 7일간 배양한 군은 1일간 배양한 군보다 각 인자의 단독 첨가시 각각 SCF 12.91 배, G-CSF 2.51배, GM-CSF 11.62배, IL-3 1.07 배의 증가를 보였고 복합투여시 5.73배의 증가가 관찰되었다. 3일간 배양시 CD 34 양성세포의 평균 증가율 11.92배에 비해, 7일간 배양시 6.77배로 3일간 배양한 군에서 CD 34 양성세포가 더 많아짐을 보여주었다 (Table 2).

Fig. 1. Influence of hematopoietic growth factors on CD 34⁺ cellsTable 1. Influence of hematopoietic growth factors on CD 34⁺ cells

| | Day 1 (%) | F. I. | Day 3 (%) | F. I. | Day 7. (%) | F. I. |
|---------|--------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|
| Control | 0.1 | 1 | 0.095 | 1 | 0.11 | 1 |
| SCF | 0.045 | 0.45 | 1.423 | 14.98 | 0.64 | 5.82 |
| G-CSF | 0.235 | 2.35 | 0.743 | 7.82 | 0.65 | 5.91 |
| GM-CSF | 0.12 | 1.2 | 1.063 | 11.12 | 1.533 | 13.94 |
| IL-3 | 0.6 | 6 | 1.475 | 15.53 | 0.707 | 6.43 |
| Mix | 0.165 | 1.65 | 1.74 | 18.32 | 1.04 | 9.45 |
| Mean | | 2.33 | | 13.55 | | 8.31 |

F. I. : Fold Increase, * : p < 0.05

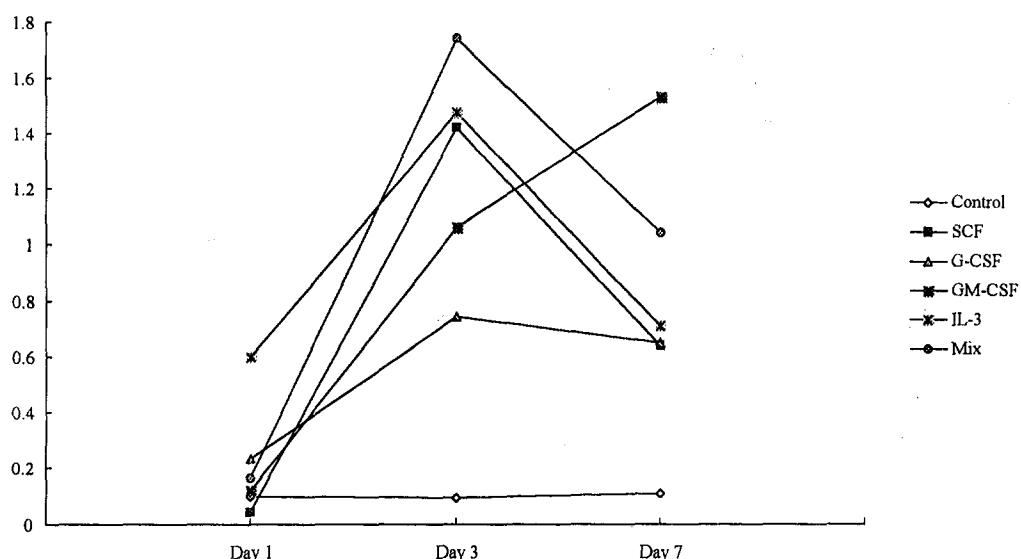
Fig. 2. Measurement of CD 34⁺ cells to the duration of exposure with hematopoietic growth factors.

Table 2. Measurement of CD 34⁺ cells according to the duration of exposure to hematopoietic growth factors

| | Day 1 & 3 | F. I. | Day 1 & 7 | F. I. | Day 3 & 7 | F. I. |
|---------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| Control | 0.95 | 1 | 1.1 | 1 | 1.16 | 1 |
| SCF | 31.6 | 33.3 | 14.2 | 12.91 | 0.45 | 0.39 |
| G-CSF | 3.16 | 3.33 | 2.76 | 2.51 | 0.87 | 0.75 |
| GM-CSF | 8.86 | 9.33 | 12.78 | 11.62 | 1.44 | 1.24 |
| IL-3 | 2.46 | 2.59 | 1.18 | 1.07 | 0.48 | 0.41 |
| Mix | 10.5 | 11.05 | 6.3 | 5.73 | 0.59 | 0.51 |
| Mean | | 11.92 | | 6.77 | | 0.66 |

F. I. : Fold Increase

CFU-GM 증폭

3일간 액상배지에서 배양후 methylcellulose 반고형배지에 옮겨 배양시킨 경우 CFU-GM 수는 대조군에서 49.4개였으며, 각 성장인자의 단독 투여시 CFU-GM 수는 각각 G-CSF 74.1개, GM-CSF 90.5개, IL-3 126.7개로 증가되었으며 (Table 3), 증가율로 보면 각각 1.5배, 1.83배, 2.56배였고, 복합 투여군에서 CFU-GM 수 및 증가율은 125.8 개로 2.55배이었다 (Table 4).

7일간 배양후 반고형 배지에 옮겨 배양시 CFU-GM 수는 대조군에서 27.9개, SCF, G-CSF,

GM-CSF, IL-3를 단독투여시 petri dish당 31.4개, 44.6개, 42.3개, 55.2개이었고 (Table 3) 증가율은 각각 1.12배, 1.60배, 1.52배, 1.98배이었으며 (Table 4), 복합투여군에서는 CFU-GM 90.2개였으며 증가율 3.23배로 단독투여군보다 복합투여군에서 더 효과적으로 CFU-GM을 증가시켰다 (Fig. 3).

배양기간에 따른 CFU-GM 수의 변화는 3일간 배양시 CFU-GM 수가 7일간 배양시의 CFU-GM 수 보다 많았으나 평균 증가율로 비교해 볼 때 3일간 배양시 증가율 1.84배, 7일간 배양시 1.89배로 별 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4).

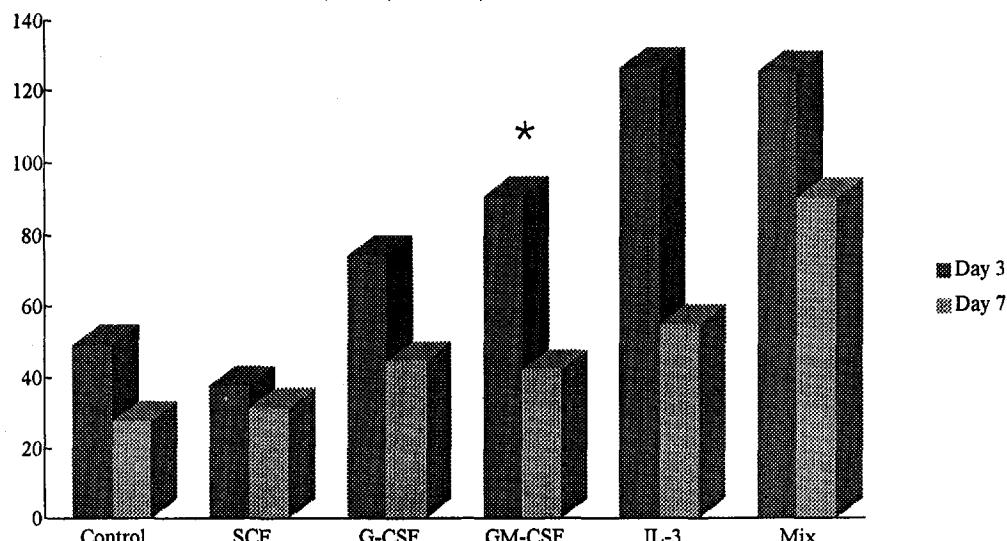


Fig. 3. Influence of hematopoietic growth factors on the formation of granulocyte-macrophage colony forming unit.

* : p < 0.05

Table 3. Influence of hematopoietic growth factors on the formation of granulocyte-macrophage colony forming unit

| Day 3 | Control | SCF | G-CSF | GM-CSF | IL-3 | Mix |
|-----------|---------|------|-------|--------|-------|-------|
| G-colony | 9.5 | 8.2 | 13.9 | 31.2 | 40.6 | 41.2 |
| M-colony | 35.2 | 25 | 48.1 | 45.5 | 62.7 | 57.9 |
| GM-colony | 4.7 | 4.3 | 12.1 | 13.8 | 23.4 | 26.7 |
| Total | 49.4 | 37.5 | 74.1 | 90.5* | 126.7 | 125.8 |

| Day 3 | Control | SCF | G-CSF | GM-CSF | IL-3 | Mix |
|-----------|---------|------|-------|--------|------|------|
| G-colony | 3.7 | 5.3 | 16.3 | 14.5 | 11.7 | 41.6 |
| M-colony | 20 | 19.8 | 22.4 | 18.9 | 36 | 34.4 |
| GM-colony | 4.2 | 6.3 | 5.9 | 8.9 | 7.5 | 14.2 |
| Total | 27.9 | 31.4 | 44.6 | 42.3 | 55.2 | 90.2 |

* : p < 0.05

Table 4. Measurement of granulocyte-macrophage colony forming unit growth according to the duration of exposure with hematiopoietic growth factors

| | Day 3 | F. I. | Day 7 | F. I. |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| Control | 49.4 | 2 | 27.9 | 1 |
| SCF | 37.5 | 0.76 | 31.4 | 1.12 |
| G-CSF | 74.1 | 1.5 | 44.6 | 1.60 |
| GM-CSF | 90.5 | 1.83 | 42.3 | 1.52 |
| IL-3 | 126.7 | 2.56 | 55.2 | 1.98 |
| Mix | 125.8 | 2.55 | 90.2 | 3.23 |
| Mean | | 1.84 | | 1.89 |

F. I. : Fold Increase

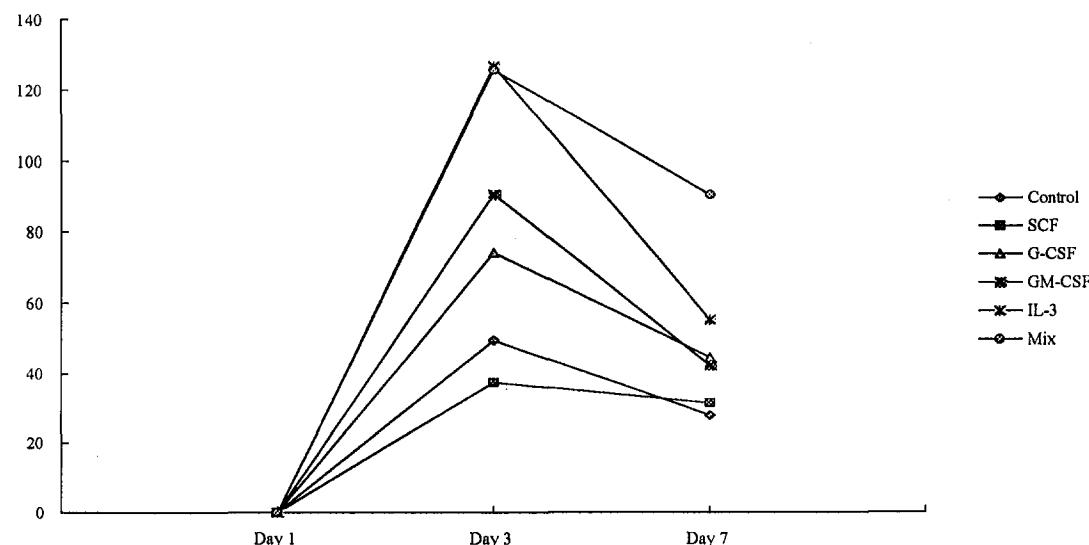


Fig. 4. Measurement of granulocyte-macrophage colony forming unit growth according to the duration of exposure with hematiopoietic growth factors

고 칠

조혈모세포 또는 전구세포는 골수 외에도 말초혈액 (Castagane *et al*, 1986) 및 제대혈(Gluckman *et al*, 1989)로 부터 얻을 수 있으며, 최근 고용량 항암요법 후 G-CSF나 GM-CSF 등의 조혈성장인자 투여시 조혈모세포 또는 전구세포가 골수로부터 말초혈액내로 이동되어 말초혈액에서도 조혈모세포가 나타난다는 것이 알려져 항암제에 대해 반응이 좋은 여러 종류의 암치료에 자가 말초혈액 조혈모세포 이식이 널리 이용되고 있다 (Goldman, 1995). 자가 말초혈액 조혈모세포 이식은 고형암에서 고용량 항암요법 후 나타나는 심한 골수기능 부전을 극복하기 위한 보조적 수단으로 주로 시행되어 왔으며, 자가 골수이식에 비해 과립구 및 혈소판의 회복이 빠르다는 장점이 확인되었다 (Haylock *et al*, 1992). 또한 제대혈에도 충분한 양의 조혈모세포가 존재하고 이를 이용한 조혈모세포 이식이 활발히 연구되고 있는 실정이며 근래에는 동종 말초혈액 조혈모세포 이식에 대한 보고도 증가하고 있다 (김종완과 이경수, 1993).

암환자에서 항암요법후 골수기능 회복의 수단으로 자가 골수이식을 시행하는 것이 비교적 간단하다고 하나, 골수기능의 회복에 필요한 세포가 다량 요구되므로 암세포의 오염으로 인한 재발의 위험이 존재하게 되어 이를 극복하기 위한 골수 정화요법의 필요성이 제기되고 또 골수 단핵세포를 체외배양하여 수적으로 증가시키는 방법을 시도하고 있으나 배양시에 많은 양의 조혈성장인자가 필요하므로 비용상의 문제점도 무시할 수 없는 실정이다. 그러므로 조혈모세포에 근접하는 세포를 선별하여 증폭시키려는 노력이 이루어지고 있는데 (Shpall *et al*, 1994), 세포 표면항원을 이용한 면역학적인 방법으로 CD 34⁺, CD 33⁻, CD 38⁻, Lin⁻, HLA-DR⁺인 세포가 조혈모세포의 특성에 가장 근접한 세포군으로 거론되고 있다 (Huang & Terstappen, 1992). 조혈모세포의 체외증폭을 가장 활발히 이용할 수 있는 분야로는 골수 황폐화의 극복 및 고용량 화학요법시 조혈 전구세포의 투여를 통해 골수기능억제로 인한 부작용을 최소화하고자 하는 경우 등에 사용될 수 있다고 생각된다. 그리고 이를 세포를 분리하는 방법으로는

CD34 양성세포만 선택적으로 분리하여 증폭에 이용하는 것이 임상응용에 있어 가장 적절한 방법일 것이라고 제시되어 있다 (Krause *et al*, 1994). 조혈모세포의 증식과 분화에는 여러 종류의 조혈성장인자간에 상호작용이 필요하며 그 중 IL-3, GM-CSF 및 SCF는 특정 세포계열보다 여러 계열의 조혈세포에 영향을 미치며 G-CSF, GM-CSF, IL-3간에는 상승작용이 뚜렷하고 (McNiece *et al*, 1989), SCF를 같이 사용하는 경우 효과가 증가된다고 보고되어 있다 (McNiece *et al*, 1991). SCF는 조혈모세포 또는 초기 전구세포에 주로 작용하나 (Wineman *et al*, 1993) 좀 더 분화가 진행된 후기 전구세포 단계에서는 여러 조혈성장인자와 상승적인 효과를 나타내어 erythropoietin (EPO)과 함께 적혈구 집락의 형성을 유도하고 (Dai *et al*, 1991), 또한 IL-3, GM-CSF, G-CSF 등과 함께 비적혈구계 집락의 형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Broxmeyer *et al*, 1991). 또한 SCF가 독자적으로는 거핵구 집락형성에 큰 영향을 미치지 않으나 IL-3나 GM-CSF와 함께 작용하여 거핵구 집락형성에 상승작용을 나타낸다고 보고되어 있다 (Bridgell *et al*, 1991). 그리고 G-CSF는 후기 골수구계 전구세포에 작용하여 과립구 생성에 직접적인 역할을 담당하는 것 외에도 조혈모세포 수준에서 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Demetri & Griffin, 1991).

조혈세포 배양에 첨가하는 혈청이나 혈장으로는 우태아 혈청을 가장 많이 사용하여 왔으나 혈청의 조건에 따라 조혈세포 집락형성에 차이를 초래할 수 있는 단점이 있어 Messner 등 (1982)은 신선한 인혈장의 사용을 권장하면서 다음과 같은 장점이 있다고 주장하였다. 가장 두드러진 장점들로는 거핵구계 집락형성을 현저히 촉진시키고 다능간세포의 (multilineage) 집락 배양에 대한 활성의 정도가 일정하다는 것 외에도 정상혈장은 거의 항상 자가골수나 말초혈액의 조혈세포 집락성장을 유지시킬 수 있다는 점 등이 제시되며 methylcellulose를 이용한 배양에서 혈장의 용고 현상에 의해 배양액의 점도를 적절히 증가시키는 부수적인 효과도 있다고 기술하였다(Messner *et al*, 1982).

본 연구의 결과로 볼 때, CD34 양성세포수의 측정을 통한 조혈성장인자의 골수 단핵구 증식에 대

한 효과의 판정에서 1일간 배양시 G-CSF, GM-CSF, IL-3 및 GM-CSF, SCF, IL-3의 복합투여군에서 1.2-6배의 증가를 보였으나 SCF 투여시에는 0.45배로 감소하는 결과를 나타내었고, 3일간 배양한 경우 CD34 양성세포가 각 조혈성장인자 투여로 7.8-15.53배, 복합투여시 18.32배로 증가되었으며, 7일간 배양시 각 투여군에서 5.82-13.94배, 복합투여시 9.45배의 증가를 나타내었다. 이는 조덕연 등 (1996)의 연구와 비교해 볼 때 SCF 단독사용시 CD34 양성세포의 증가에 큰 차이를 보여주고 있는데 조덕연 등 (1996)의 경우 SCF 단독사용시 CD34 양성세포가 4.6배 증가한 반면 본 연구에서는 1일간 배양에 있어 SCF의 단독사용시 오히려 0.45배 감소하였으며, 3일 및 7일 배양시 SCF사용으로 각각 14.98배, 5.82배로 증가되었다. 1일간 배양시 SCF의 투여로 CD34 양성세포가 감소한 이유로는 실험에 사용한 SCF의 역가가 변화되었거나 SCF가 조기에 소모되거나 변성되었을 가능성을 생각해 볼 수 있으며 차후의 확인이 필요할 것으로 보인다. 배양기간에 따른 CD34 양성세포의 증폭에 있어서 3일간 배양시 평균 13.55배, 7일간 배양시 평균 8.31배 증가되어 3일간 배양이 7일간 배양보다 더 효과적일 수 있음을 보여주고 있는 반면 조덕연 등 (1996)은 5일, 7일, 10일간 배양시 7일간 배양에서 효과적인 결과를 얻었다고 보고하였다. 3일간 배양이 더 효과적으로 나타난 원인으로는 배양기간이 연장됨에 따라 조혈인자의 역가가 감소되었을 가능성을 생각해 볼 수 있겠고 또한 배지에 침가한 혈청내에 존재하는 조혈인자가 시간이 지남에 따라 소모됨으로써 농도가 감소되었을 가능성과 배지성상의 차이점도 고려되어야 할 것으로 보여진다.

CFU-GM assay의 결과를 보면, 3일간 배양시 SCF투여에 있어 0.76배로 감소를 보이는 것외에는 단독투여 및 복합투여시 1.5-2.56배로 집락세포의 증가를 보였고 7일간 배양에 있어 단독 및 복합투여시 1.12-3.23배의 집락세포의 증가를 보였다. 3일간 배양시 SCF투여군에서 집락세포가 감소한 원인은 CD34 양성세포 측정에서와 마찬가지의 결과로 보여지며, 3일간 및 7일간 배양시 집락세포의 평균 증가율은 1.84배와 1.89배로 큰 차이가 없었다. 조덕연 등 (1996)의 연구에서는 7

일간 배양시 조혈인자의 투여시 2.8-8.8배의 증가를 보여 집락세포형성이 증가됨을 보여주었는데, 이러한 차이의 원인으로는 역시 조혈인자의 종류와 복합투여군의 수 및 배양에 사용한 배지의 성상이 다르기 때문일 것으로 보여진다. 7일간 배양에 있어 집락세포수는 SCF 단독투여시 1.12배 증가되었고, SCF에 GM-CSF와 IL-3를 첨가하였을 때 3.23배 증가되는 것을 볼 수 있는데, Haylock 등 (1992)은 말초혈액 조혈모세포의 증폭에 IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF 및 SCF를 복합투여하는 경우 가장 많은 집락세포의 증가가 나타난다고 보고하였다. 또한 조덕연 등 (1996)의 연구에서는 SCF의 첨가시 CFU-GM은 3.4-6배, SCF와 G-CSF의 복합적인 첨가로 13.6배까지 증가됨을 보여줌으로써 두가지 인자의 병용시 효과가 증폭됨을 보여 주고 있는 바, G-CSF가 과립구의 생성뿐 아니라 조혈전구세포에도 작용함을 간접적으로 보여주는 결과라고 할 수도 있을 것이다. 반면, Brugger 등 (1993)은 CD34양성 말초혈액 세포에 SCF, EPO, IL-1, IL-3, IL-6를 병용투여한 경우와 여기에 G-CSF 또는 GM-CSF를 병용한 경우를 비교한 실험에서 후자의 경우 집락 형성세포의 증가율이 감소된다는 것을 확인하고 G-CSF 또는 GM-CSF가 집락 형성세포를 생성하기보다는 조혈세포의 분화를 촉진시킨다는 의견을 제시하기도 하였다. 본 연구 및 조덕연 등 (1996)의 연구와 Brugger 등 (1993)과 Haylock 등 (1992)의 연구 결과에서 이러한 차이가 발생하는 가장 큰 원인은 CD34 양성세포가 아닌 골수 단핵세포를 사용한 점을 지적할 수 있다고 생각되며 배지의 성분 중 혈청을 사용한 것도 원인으로 생각되어진다. 조혈세포의 증폭에 효과가 입증된 사용가능한 여러 종류의 조혈성장인자를 조혈세포의 체외증폭에 이용하는 것이 이상적이기는 하나 가장 경제적이면서도 효율적인 집락세포 증폭을 위한 각 조혈인자의 농도 및 조합에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

조혈세포의 체외배양에는 아직도 여러 문제가 산적해 있으나 우선 진정한 의미의 조혈모세포를 세포표면항원을 이용한 면역학적인 방법으로 특이적으로 선별하려는 노력이 필요하겠으며, 선별된 조혈세포가 체외에서 장기간의 조혈기능을 지

속할 수 있는지에 대한 확인과 더불어 체외 배양된 조혈세포의 지속적인 조혈기능 수행여부를 입증하기 위한 유전자 표지 등의 연구도 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

조혈모세포의 이식으로 여러 질병의 치료가 가능해짐에 따라 조혈모세포 증폭의 임상적인 응용을 위한 기초자료를 얻고자 조혈모세포가 비교적 많이 포함되어 있고 쉽게 얻을 수 있는 골수단핵구를 대상으로 하였다. 이에 골수의 단핵구를 분리하여 체외배양하면서 액체 배양액에 조혈 성장인자를 첨가하여 어떠한 조합의 성장인자가 가장 효과적이며 또 가장 적합한 배양기간에 대한 자료를 얻고자 연구하였다. 그리하여 정상 골수 기능을 지닌 성인 5명으로부터 골수혈액을 채취하여 단핵구를 분리하고 액상 배지 및 반 고형배지에 골수 단핵구를 접종하여 배양하며, 성장인자를 넣지 않은 대조군과 G-CSF, GM-CSF, SCF 및 IL-3를 각각 100ng/mL 넣은 군 및 동일량의 SCF, GM-CSF, IL-3의 3가지 인자를 모두 넣은 6개군으로 나누어 3일간 및 7일간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 CD84양성 세포수의 변화를 측정하고 methylcellulose 배지에 나타난 granulocyte-macrophage colony forming unit (CFU-GM) 수를 측정하였다.

CD34 양성세포수는 3일간 배양시 SCF는 14.98 배, G-CSF는 7.82배, GM-CSF는 11.12배, IL-3는 15.53배, 복합투여시에는 18.32배로 증가되었으며, 7일간 배양시 대조군에 비해 SCF는 5.82배, G-CSF는 5.91배, GM-CSF는 13.94배, IL-3는 6.43배, 복합투여시에는 9.45배로 증가되었고, 3일간 및 7일간 배양시 평균 증가률은 각각 13.55배와 8.31배였다. CFU-GM 수는 3일간 배양시 대조군에서 49.4개, SCF는 37.5개, G-CSF는 74.1개, GM-CSF는 90.5개, IL-3는 126.7개, 복합투여시 125.8개였고 7일간 배양시 대조군은 27.9개, SCF는 31.4개, G-CSF는 44.6개, GM-CSF는 42.3개, IL-3는 55.2개이고 복합투여시 90.2개였다.

본 연구에 사용한 조혈성장인자의 농도, 세포농도 및 배양조건 하에서는 SCF, GM-CSF, IL-3를

첨가하여 3일간 배양하는 것이 골수의 조혈모세포 증폭에 가장 효과적인 것으로 관찰되었다. 그러나 체외배양을 통해 조혈모세포의 증폭이 장기간 지속적으로 유도되는지는 추후 규명되어야 할 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

- 김종완, 이경수 : 조혈간세포 이식의 공급원으로서 제대혈액의 이용가능성. 카톨릭 대학 의학 부논문집 1993 ; 46 : 647-655.
- 조덕연, 김현수, 박상준, 김종수, 최지영, 윤환중, 김삼용 : 골수세포의 단기배양을 통한 조혈 전구세포의 증폭. 대한혈액학회지 1996 ; 31 : 259-274.
- Abramson S, Miller RG, Phillips RA : The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 1977 ; 145 : 1567-1579.
- Bensinger W, Andrews R, Berenson R, Buckner CD, Bernstein I, Hansen J : Engraftment kinetics after transplantation of CD 34 enriched marrow cells. *Bone marrow Transplant* 1992; 10(suppl. 2) : 3.
- Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffman R : Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991 ; 78 : 2854-2859.
- Broxmeyer HE, Cooper S, Lu L, et al : Effect of murine mast cell growth factor (c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1991 ; 77 : 2142-2149.
- Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L : Ex vivo expansion of enriched peripheral CD 34⁺ progenitor cells by Stem cell factor, IL-1 β , IL-3, IL-6, Interferon- γ , and erythropoietin. *Blood* 1993 ; 81 : 2579-2584.
- Castagine S, Calvo F, Douay L, et al : Successful hematopoietic reconstitution using

- autologous peripheral blood mononucleated cells in a patient with acute promyelocytic leukemia. *Br J Hematol* 1986 ; 63 : 209-211.
- Dai CU, Krantz SB, Zsebo KM : Human burst-forming unit-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 1991 ; 78 : 2493-2497.
- Demetri GD, Griffin JD : Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991 ; 78 : 2791-2808.
- Goldman J : Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood* 1995 ; 85 : 1413-1415.
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al : Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA- identical sibling. *N Eng J Med* 1989 ; 321 : 1174-1178.
- Haylock D, To LB, Dowse T, Juttner C, Simmons PJ : Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD 34⁺ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992 ; 80 : 1405-1412.
- Huang S, Terstappen L : Formation of hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992 ; 360 : 745-749.
- Krause D, Ito T, Fackler M, et al : Characterization of murine CD 34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994 ; 84 : 691-701.
- McNiece IK, Andrews R, Stewart M, Clark S, Boone T, Quesenberry P : Action of interleukin-3, G-CSF and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells : Synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF. *Blood* 1989 ; 74 : 110-114.
- McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM : Recombinant human stem cell factor synergizes with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of myeloid and erythroid lineage. *Exp Hematol* 1991 ; 19 : 226-231.
- Messner HA, Jamal N, Izaguirre C : The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow. *J Cell Physiol Suppl* 1982 ; 1 : 45-51.
- Pike BL, Rabinson WA : Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J cell physiol* 1970 ; 76 : 77-84.
- Shpall EJ, Jones RB, Bearman S, et al : Transplantation of enriched CD 34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high dose chemotherapy : Influence of CD 34-positive peripheral blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994 ; 12 : 28-36.
- Wineman J, Nishikawa S, Muller-Sieburg CE : Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro : Effect of stromal cells and c-kit. *Blood* 1993 ; 81 : 365-372.