

혈소판 감소를 동반하는 질병별 혈중 Thrombopoietin과 골수단핵구세포의 거핵구집락형성

계명대학교 의과대학 소아과학교실

조진선 · 최병규 · 조윤정 · 김홍식 · 강진무

Thrombopoietin Level and Bone Marrow Megakaryocyte Colony Formation in Various Diseases with Thrombocytopenia

Jin Sun Cho, M.D., Byung Kyu Choe, M.D., Yoon Jung Cho, M.D.
Heung Sik Kim, M.D. and Chin Moo Kang, M.D.

Department of Pediatrics, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Purpose: Thrombocytopenia is a serious life threatening consequence in patients with bone marrow failure syndrome. Thrombopoietin (TPO), recently cloned by several groups has been shown to be a key regulation of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Recent studies have demonstrated a positive or negative relationship between TPO levels and platelet counts due to underlying disease states. To clarify the role of TPO in thrombocytopenic condition we determined plasma TPO levels and megakaryocyte colony assay.

Methods: TPO levels were measured in thrombocytopenic patient with aplastic anemia, chemotherapy induced bone marrow failure, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and in newborn by ELISA (QuantikineTM, R&D System, USA). Controls were short statured normal children with normal platelet counts. Plasma was preserved in -20°C until test. CFU-mega was determined by MegaCultTM (Stem Cell Tech. Inc., Canada). Ficoll separated mononuclear cells were cultured for 10~12 days with TPO or stem cell factor (SCF) in 37°C 5% CO₂ atmosphere, colonies were fixed, stained and examined with inverted microscope. Results were analysed by Student-t test. **Results:** TPO levels were markedly increased in aplastic anemia and chemotherapy induced thrombocytopenia compared to those of normal controls. Patients with ITP had decreased level of plasma TPO. There was inverse relationship between platelet count and TPO levels for patients with aplastic anemia and chemotherapy induced thrombocytopenia. There was no definite relationship between platelet counts and TPO levels but inverse relationship between platelet counts and PDW levels in neonates was noted. The levels of TPO were increased after improvement of platelet in thrombocytopenic neonate. Megakaryocyte colonies were increased in the mononuclear cells of the patients with ITP and chemotherapy induced

책임저자: 김홍식, 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 소아과학교실, 700-712

Tel: 053-250-7516, Fax: 053-250-7783

thrombocytopenia. There was little colony formation in aplastic anemia. TPO had no definite effect in megakaryocyte colony formation but SCF increased colony formation. **Conclusion:** TPO levels were increased in aplastic anemia and chemotherapy induced thrombocytopenia but decreased in ITP. There was inverse relationship between platelet count and TPO levels in aplastic anemia and chemotherapy induced thrombocytopenia. Thus TPO could be useful for differentiate the etiology of thrombocytopenia. Megakaryocyte colony was increased in ITP and chemotherapy induced thrombocytopenia, but decreased in aplastic anemia. SCF was effective in megakaryocyte colony formation. TPO and SCF will be helpful to increase platelet in thrombocytopenic patients. However, further study will be needed. (*Korean J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 7: 203~211)

Key Words: Thrombocytopenia, Thrombopoietin, CFU-Mega

서 론

백혈병 또는 고형 종양 치료에서 고용량 화학요법의 결과로 치료 성적은 많이 향상되었으나 골수 기능 저하로 인한 빈혈, 백혈구 감소증 및 혈소판 감소증이 초래되어 이로 인한 이환율과 사망률도 증가되고 있다. 근래 조혈세포 성장인자의 개발로 빈혈에는 erythropoietin을 사용하고 있고 백혈구 감소증에는 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), 또는 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)를 사용하게 됨으로써 수혈횟수와 감염률을 줄일 수 있게 되었다. 그러나 종양환자에서 감염과 더불어 주 사망원인이 되는 혈소판 감소증으로 인한 출혈성 합병증에 대하여는 혈소판 수혈에만 의존하고 있는 것이 현실이다. 최근 거핵구 성장 발달 인자 (megakaryocyte growth and development factor, MGDF), 또는 혈소판 조혈인자(thrombopoietin, TPO)가 개발되어 임상 시험 중이다^{1,2)}.

혈소판 감소증을 초래하는 여러 질환들 즉 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우, 특발성 혈소판 감소성 자반증 등과 대조군을 비교하여 TPO치를 측정하여 보면 TPO치는 거핵구 형성부전으로 오는 이차적인 혈소판 형성 감소상태에서는 전형적으로 높은 수치를 보였고

거핵구가 정상이거나 증가되면서 혈소판이 감소된 상태에서는 큰 변화가 없었다고 한다^{3,4)}. 거핵구의 성장발달을 실험실 내에서 관찰해보기 위하여는 거핵구집락형성(megakaryocyte colony)을 측정해보면 거핵구 형성과 혈소판 형성에 대한 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다⁵⁾.

적혈구계와 골수구계의 전구세포 집락형성은 배양기술이 일찍부터 개발되어 수 년간 여러 분야에서 이용되고 있으나 거핵구집락의 배양법은 비교적 최근에 개발되었고, 국내에서는 이에 대한 연구가 드물게 보고⁶⁾되어 있다. 거핵구집락의 형성은 재생 불량성 빈혈이나 항암요법 후에는 감소될 것이고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 증가될 것으로 예상된다. 이러한 결과는 혈소판 감소증의 병인과 치료 특히 TPO투여에 대한 이해에 도움이 될 것으로 생각된다. 신생아에서 TPO치는 보고가 흔하지 않다. 최근 만삭아와 미숙아에서 TPO치를 조사한 보고를 보면 어린이나 어른에서와 같은 기전으로 혈소판과 TPO치가 조절된다는 보고⁷⁾가 있으나 이에 대한 국내보고는 없다.

또한 거핵구집락형성을 비교해 보고 혈소판 감소가 말초 혈소판의 파괴와 격절(sequestration) 증가로 올 때와 거핵구 생성의 감소로 올 때의 차이를 감별할 수 있을 것이며 TPO 또는 stem cell factor (SCF) 같은 성장인자 유무에 따른 집락형성 결과를 비교해 보면 향후 환자의 치료 및 예후 판

정에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

혈소판 용적분포(platelet distribution width, PDW)가 평균 혈소판 용적과 함께 특발성 혈소판 감소성 자반증에서 혈소판의 형성에 대한 정보를 제공한다는 보고²⁾가 있다. 이에 연구자는 여러 가지 원인에 의한 혈소판 감소증 환자와 신생아에서 TPO치의 변화를 살펴보고 PDW를 측정하여 혈소판 수와 상관관계를 보았다. 또한 이 환자들의 골수단핵구세포에서 성장인자 유무에 따른 거핵구집락 형성을 관찰하여 향후 혈소판 감소증 환자의 병인 감별과 치료에 대한 기초 자료를 마련하고자 이 연구를 계획하였다.

대상 및 방법

소아에서 혈소판 감소증이 초래되는 질병 즉 재생 불량성 빈혈 8례, 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우 11례, 패혈증 11례, 특발성 혈소판 감소성 자반증 환아 11례에서 혈장 TPO치를 ELISA 방법으로 측정하여 혈소판 수치에 따른 TPO치를 관찰하고 정상 대조군과 비교하였다. 신생아에서 재태기간별 혈소판 감소 유무에 따라 혈청 TPO치를 측정하고 PDW는 자동혈액분석기(Advia 120, Bayer Co. USA)를 이용하여 측정하였다. 대조군은 성장호르몬 측정을 위하여 내원한 혈소판 감소증이 없는 소아 27례로 하였다. 말초혈액 3 cc를 EDTA 튜브에 채취하여 원심한 후 혈장을 -20°C에 냉동보관하였다가 ELISA kit (QuantikineTM Human TPO Immunoassay, R&D Systems, USA)를 이용하여 측정하였다.

TPO를 측정하기 위한 단클론 항체가 처리된 96 well microplate의 각 well마다 Assay Diluent RD1-20을 50 μL씩 첨가하였다. 표준용액을 만들기 위해 TPO standard에 calibrator diluent RD6P를 1 mL 첨가해 섞은 후 시액 농도가 2,000 pg/mL이 되게 한 후 각 polypropylene 튜브에 calibrator diluent를 500 μL씩 넣고 standard를 1/2씩 희석하여 농도가 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 0 pg/mL이 되게 만들었다.

섞어둔 standard 또는 시료를 96 well plate의 각 well마다 200 μL씩 첨가하여 랩(adhesive strip)을 덮은 후 4°C 냉장고에서 3시간 방치하여 TPO가 항체와 결합하게 하였다.

자동세척기를 이용하여 각 well마다 wash buffer 400 μL씩으로 세척하는 것을 4번 반복하여 결합하지 않은 부분을 제거하였다.

각 well마다 TPO conjugate 200 μL를 첨가한 후 새 랩을 덮은 후 4°C에서 1시간 방치하여 항체와 효소가 결합되게 하고 위에서와 같이 자동세척기를 이용해 4번 세척하여 unbound antibody-enzyme reagent를 제거하였다.

각 well마다 color reagent A와 color reagent B를 동량으로 섞은 기질용액을 200 μL씩 첨가하여 실온에서 30분 방치한 후 정지용액을 각 well마다 50 μL씩 첨가하여 TPO에 결합된 양에 따라 색깔이 다르게 나타난 plate를 30분 내로 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 광학적 밀도를 측정하였다.

거핵구집락검사는 MegaCultTM kit (Stem Cell Tech. Inc., Canada)의 배지를 이용하였다. 질환별 골수를 해파린이 처리된 tube에 수집하여 Ficoll-Paque (Pharmacia, Sweden)으로 단핵구세포를 분리하여 collagen solution과 함께 혈청이 제거된 배지(collagen, bovine serum albumin, bovine pancreatic insulin, human transferrin, L-glutamine, 2-mercaptoethanol, thrombopoietin, IL-6, IL-3, Iscove's modified Dulbeco's medium)가 함유된 tube에 옮겨 섞었다. 섞은 배지를 각각 1.5 mL씩 double chamber culture 슬라이드의 2개 well에 각각 0.75 mL씩 나누어 넣고 여기에 TPO, SCF 등 성장 인자를 투여하고 100 mm petri dish에 슬라이드와 3~4 mL의 증류수를 담은 35 mm dish를 넣고 5% CO₂ 배양기에 옮겨 10~12일 동안 배양한 후 탈수, 고정, 염색 후 집락을 관찰하였다. 즉 슬라이드에서 plastic wall과 rubber seal을 제거하고 chamber 슬라이드위에 spacer를 놓고 그 위에 thick white filter card를 놓아 액체성분이 card로 스며들게 하고 white filter card를 제거한 후 200

mL의 고정액에 슬라이드를 20분간 두었다가 슬라이드를 꺼내어 15분 동안 공기 건조시킨 후 염색하여 도립 현미경 하에서 거핵구의 집락을 관찰하였다. 통계처리는 Student-t test를 이용하였다.

결 과

TPO치는 대조군에서 205 ± 127 pg/mL이었고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 116 ± 113 pg/mL로 낮았으며 재생 불량성 빈혈에서는 1087 ± 652 pg/mL로 증가되어 있었고, 항암요법 후 혈소

판 감소가 있는 경우는 1155 ± 754 pg/mL로 증가되어 있었으며 혈소판 감소가 있는 신생아 패혈증에서도 703 ± 294 pg/mL로 증가되어 있었다 (Table 1, Fig. 1).

즉, TPO치는 특발성 혈소판 감소성 자반증에서 가장 낮았고 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에서 높았다.

TPO치와 혈소판 수와는 역 상관관계가 있었고 (Fig. 2) 이 변화는 대조군에서는 별 차이를 볼 수 없었으나 (Fig. 2) 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 정 상관관계와 유사한 양상을 보였고 (Fig. 2) 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에는 역 상관관계가 뚜렸하였다 (Fig. 2).

Table 1. Levels of TPO in Various Conditions

	TPO (pg/mL)	Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PDW (%)
Control (n=27)	205 ± 127	296 ± 119	48.5 ± 7.3
ITP (n=11)	116 ± 113	37 ± 26	50.0 ± 21.8
AA (n=8)	1087 ± 652	38 ± 31	59.0 ± 14.5
ChemoTx (n=11)	1155 ± 754	45 ± 28	55.4 ± 26.0
Sepsis (NB) (n=18)	703 ± 294	71 ± 35	73.7 ± 7.8

TPO: thrombopoietin, PDW: platelet distribution width, ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura, AA: aplastic anemia, ChemoTx: chemotherapy, NB: newborn

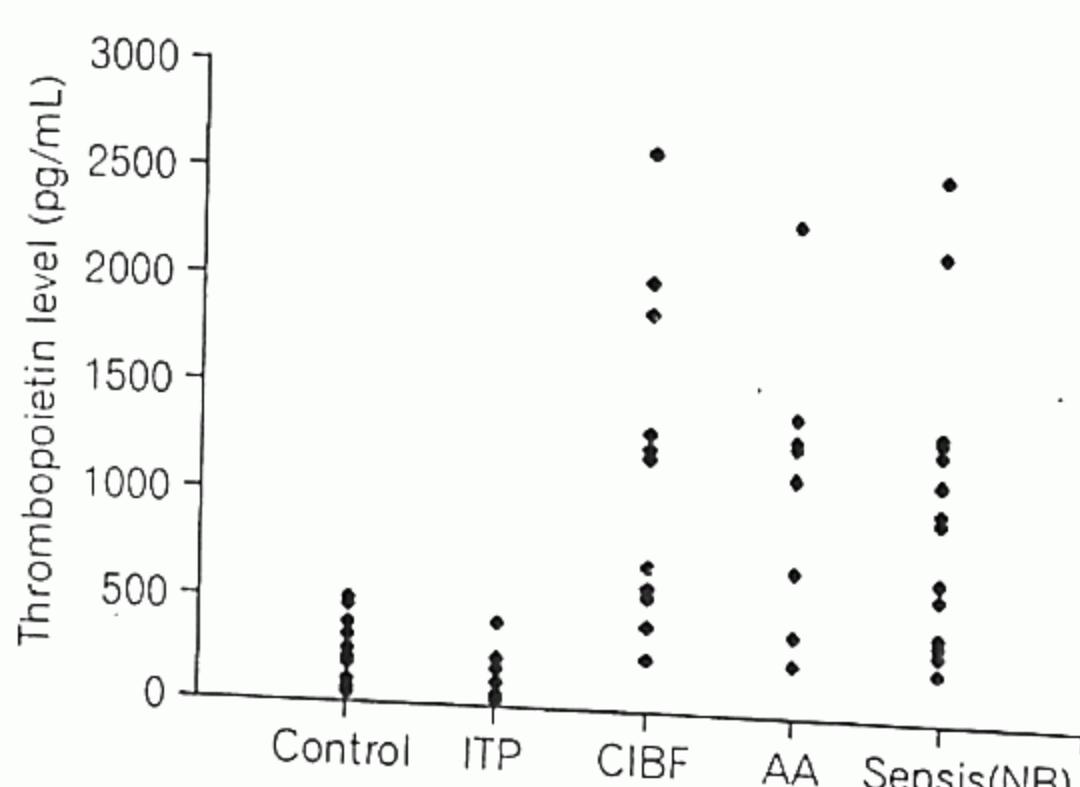


Fig. 1. Thrombopoietin levels in various conditions.
ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura, CIBF: chemotherapy-induced bone marrow failure, AA: aplastic anemia, NB: newborn

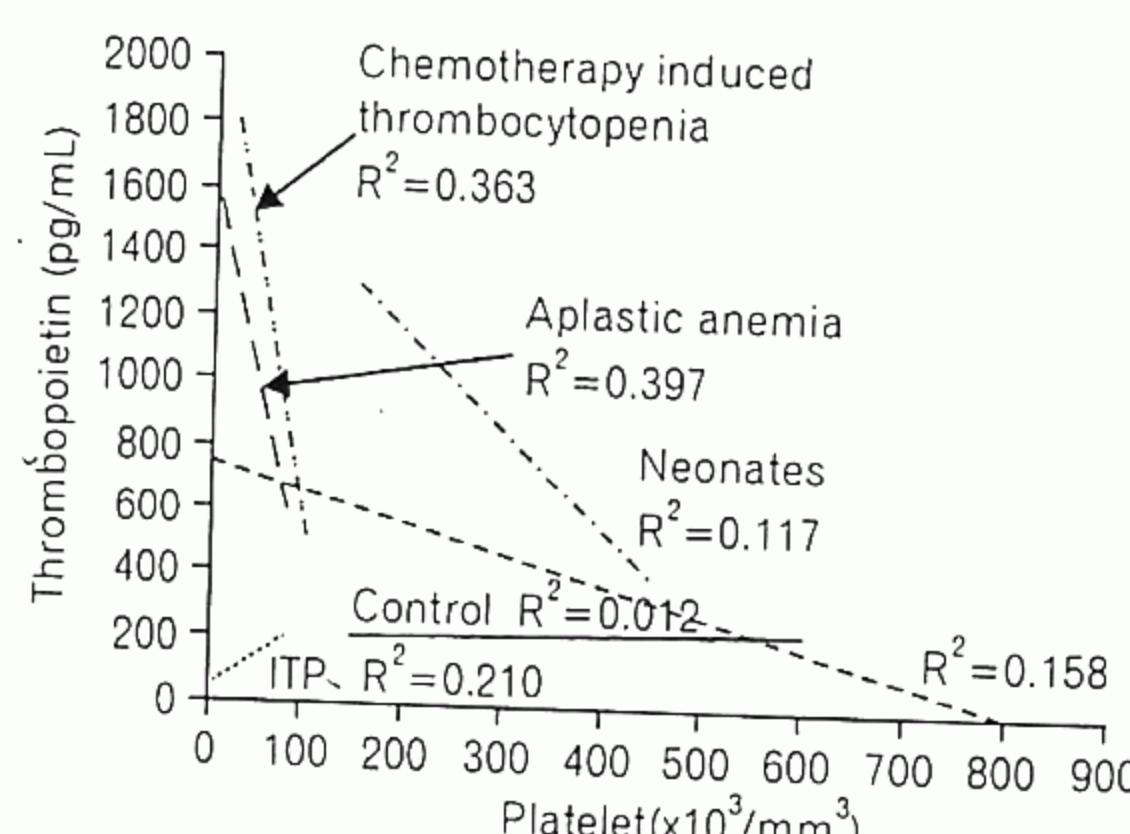


Fig. 2. Relationship between thrombopoietin levels and platelet counts in various conditions.

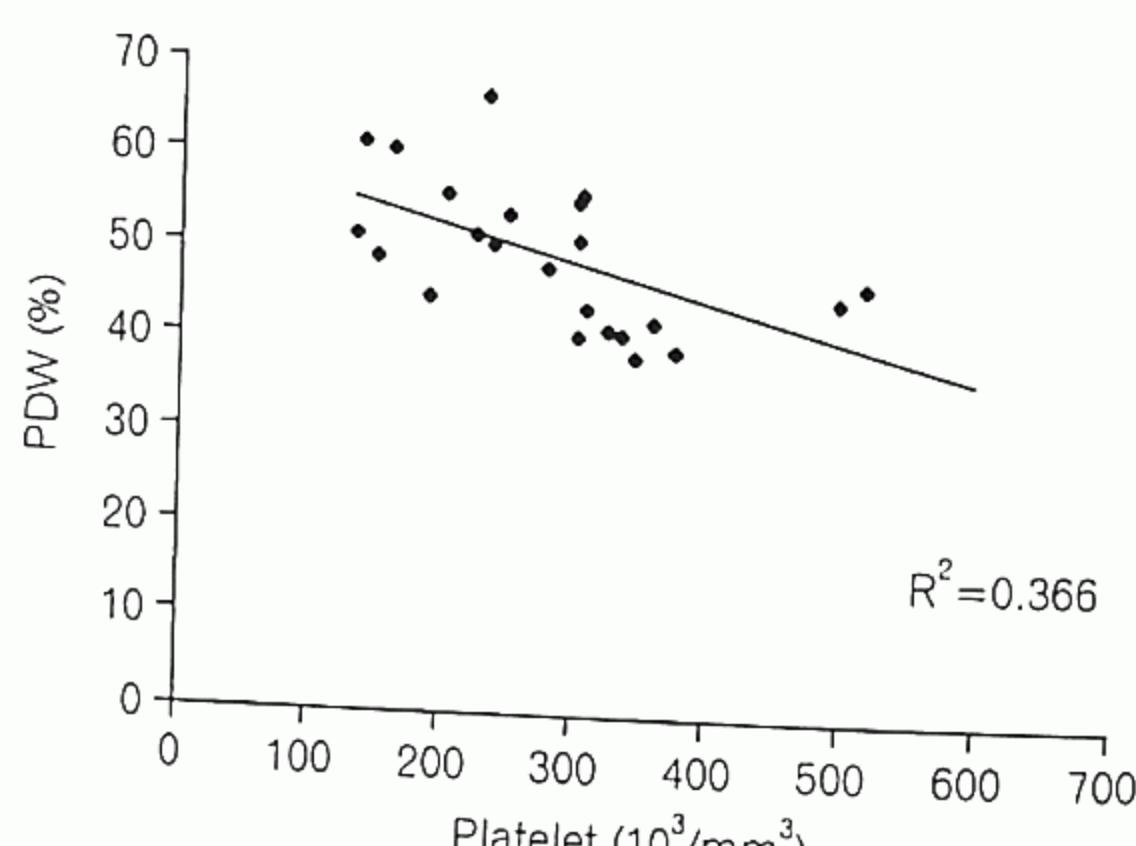


Fig. 3. Relationship between platelet counts and PDW levels in neonates.

Table 2. Levels of TPO in Neonates

	TPO (pg/mL)	Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PDW (%)
Fullterm			
without thrombocytopenia (n=9)	717 \pm 417	262 \pm 52	61.6 \pm 8.8
with thrombocytopenia (n=4)	642 \pm 448	39 \pm 19	78.9 \pm 5.5
Preterm			
without thrombocytopenia (n=22)	685 \pm 358	268 \pm 52	61.6 \pm 5.5
with thrombocytopenia (n=14)	763 \pm 325	80 \pm 40	72.2 \pm 8.5

TPO: thrombopoietin, PDW: platelet distribution width

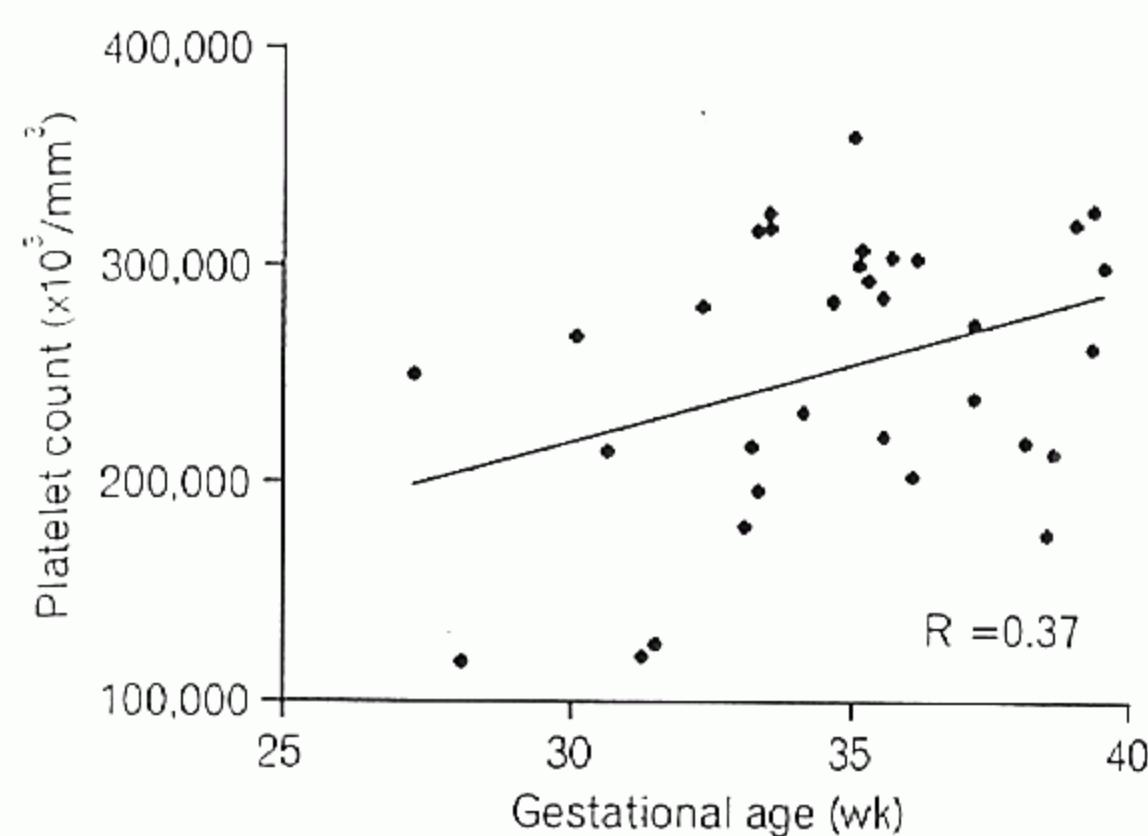


Fig. 4. Platelet counts according to the gestational age.

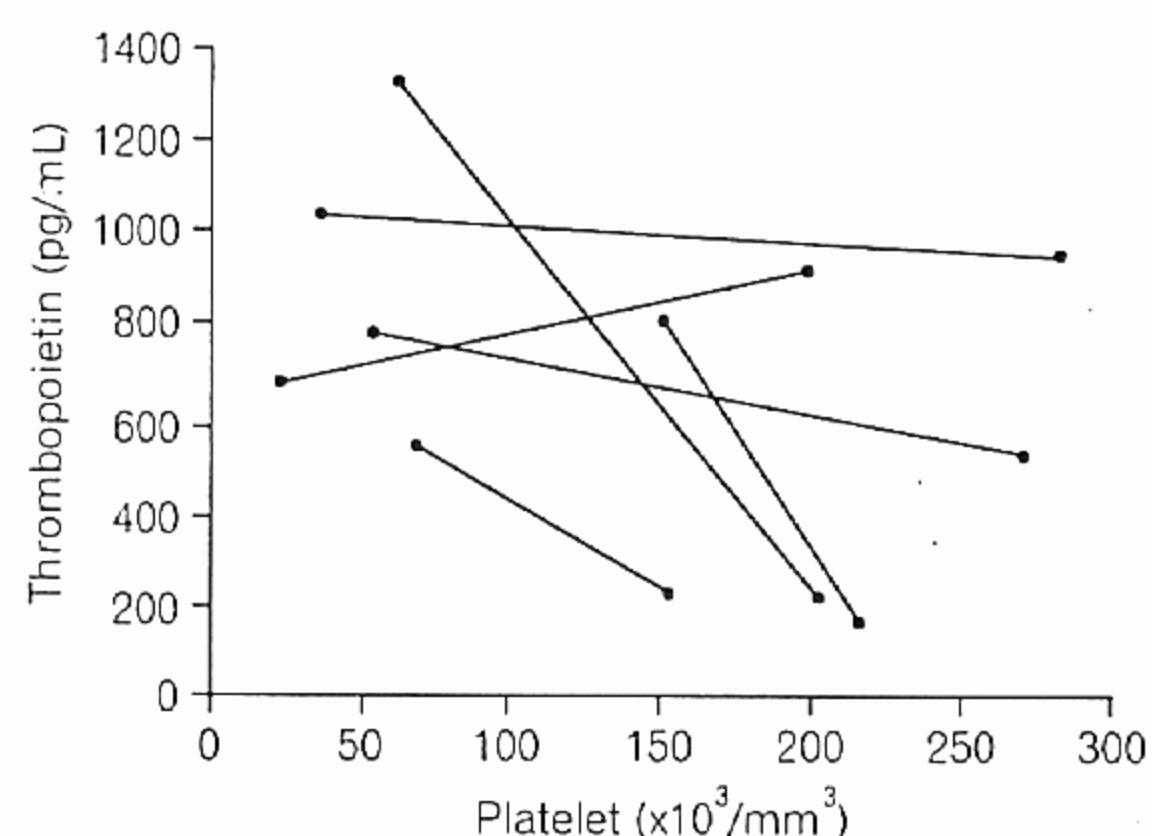


Fig. 5. Changes of thrombopoietin according to the platelet counts in neonates with thrombocytopenia.

신생아에서 만삭아로서 혈소판 감소증이 없는 경우 TPO치는 717 ± 417 pg/mL, PDW는 $61.6 \pm 8.8\%$ 이었고 혈소판 감소증이 있는 경우는 각각 642 ± 448 pg/mL, $78.9 \pm 5.5\%$ 이었고, 미숙아로서 혈소판 감소증이 없는 경우는 685 ± 358 pg/mL, $61.6 \pm 5.5\%$, 혈소판 감소증이 있는 경우는 763 ± 325 pg/mL, $72.2 \pm 8.5\%$ 로 나타나(Table 2) 혈소판과 TPO치는 상관관계가 관찰되지 않았으나(Fig. 2), 혈소판과 PDW와는 역 상관관계가 있었다(Fig. 3). 재태기간과 혈소판 수와는 정 상관관계가 있었고(Fig. 4) 재태기간과 TPO치와는 상관관계가 없었다. TPO치와 PDW는 상관관계가 없었고, 혈소판 감소증이 있는 신생아에서 TPO치와 혈소판 치와도 상관관계가 없었다. 그러나, 동일한 신생아에서 혈소판 수치가 증가함에 따라 TPO치가 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5).

질환별로 거핵구의 집락은 특발성 혈소판 감소성 자반증과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에는 대조군보다 증가되는 것을 볼 수 있었고 재생 불량성 빈혈의 경우 집락형성이 되지 않았다(Table 3).

TPO를 5 ng과 10 ng 첨가한 경우 집락형성에 특별한 영향을 미치지 않았으나 SCF를 첨가하였을 때 대조군, 혈소판 감소성 자반증, 재생 불량성 빈혈에서 거핵구집락형성이 증가하였다.

고 찰

거핵구는 태아때부터 난황낭, 간, 비장, 골수에서 발견되고 성장을 하면 모든 장기에서 발견되지만 거핵구 조혈은 골수에서 이루어진다²⁾. 혈소판은 거핵구로부터 만들어지고 지혈 혈전, 혈액

Table 3. CFU-Mk (7.5×10^3) in Various Conditions

	-	+	TPO (5 ng)	TPO (10 ng)	SCF
Control (n=3)	0	1.33 ± 1.15	0	1.33 ± 1.52	2.63 ± 1.48
ITP (n=4)	0	3.45 ± 3.41	0	3.37 ± 2.47	6.63 ± 4.72
AA (n=2)	0	0	-	0	2.50 ± 0.70
ChemoTx (n=1)	0	4	2	4	-

CFU-Mk: colony forming unit-megakaryocyte, ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura, AA: aplastic anemia, chemoTx: chemotherapy, SCF: stem cell factor, TPO: thrombopoietin

응고에 관여하며 그 수는 평균 $250,000/\mu\text{L}$ ($140,000\sim440,000$) 정도이며^{8,9)}, 혈소판 형성은 순환 혈소판 양에 의해서 조절된다¹⁰⁾. 면역학적으로 파괴되거나 혈소판 분반술 후에 야기되는 심한 혈소판 감소증 때는 골수내의 거핵구의 크기가 커지고 핵의 수와 성장률이 증가되어 혈소판 생성이 증가되지만¹¹⁾, 반대로 혈소판을 과량 수혈하면 거핵구의 핵 수와 크기가 감소한다¹²⁾.

혈소판 생성에 관여하는 인자로 thrombosis stimulating activity 즉 MGDF 또는 TPO가 알려져서 정제되고 유전자가 밝혀져 재조합형이 생산되고 있다¹³⁾. TPO는 erythropoietin과 비슷하고 유전인자는 3번 염색체의 q26-28에 존재하며^{14,15)}, TPO치는 혈소판 수에 반비례한다¹⁶⁾. 혈소판이 정상 또는 증가되어 있으면 TPO는 혈소판과 결합하여 골수의 TPO 작용을 억제하고 혈소판이 적으면 결합하지 않은 TPO가 혈중에 증가하게 되므로 거핵구 전구세포에 결합한다. 거핵구 전구세포의 부족으로 혈소판 감소증이 초래되는 경우 TPO치는 증가되고 혈소판이 말초에서 파괴되어 감소되면 혈중 TPO 수용체가 존재하므로 TPO치는 역설적으로 낮게 된다고 한다^{17,18)}.

이 실험에서 TPO치는 재생 불량성 빈혈과 항암화학요법 후 초래된 혈소판 감소에서는 증가되어 있었고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 대조군보다 낮은 수치를 보여 다른 연구와 비슷한 결과를 나타내었다.

Ichikawa 등³⁾은 성인 재생 불량성 빈혈과 특발성 혈소판 감소성 자반증 환자에서 TPO치를 측정

한 결과 재생 불량성 빈혈에서는 대조군보다 매우 증가되었고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서도 대조군보다는 약간 증가되어 있었다고 하였다. 이들은 혈소판 수치 외에도 거핵구에 의해서도 혈중 TPO치가 조절된다고 하였다. 즉 재생 불량성 빈혈에서는 혈소판과 거핵구 양이 모두 감소되어 TPO치가 많이 증가되었고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 혈소판수치는 감소되었으나 거핵구 양이 약간 증가되어 있으므로 혈중 TPO치가 약간 증가된다고 하였다. 이러한 차이를 이용하면 혈중 TPO치를 측정하는 것은 만성 혈소판 감소증의 원인을 규명하는데 유용할 것이라고 하였다.

Hou 등⁴⁾은 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하 된 경우에서 TPO치가 높고 특발성 혈소판 감소성 자반증과 골수이형성 증후군에서는 정상보다 약간 증가되어 있어 혈소판 감소증 환자에서 혈중 TPO치가 증가되어 있다는 것은 거핵구 수가 감소되어 있다는 것을 의미하지만 TPO치를 보고 특발성 혈소판 감소성 자반증과 골수이형성 증후군 같은 거핵구 형성 이상이 있는 경우를 구별할 수는 없다고 하였다.

Kuefer 등¹⁹⁾도 소아에서 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후에 높은 TPO치를 보고하였다. TPO치는 거핵구 수에 의해 조절되지만 항암요법 후 골수기능이 회복되어 혈소판이 회복될 때는 TPO치는 감소하는 역 상관관계를 보여 혈소판에 의해서도 영향을 받는다고 하였다.

Emmons 등¹⁸⁾은 재생 불량성 빈혈에서는 TPO치

가 높지만 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 낮은 결과를 보여 연구자의 결과와 비슷하였다. 특발성 혈소판 감소성 자반증 때의 TPO치에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

신생아에서 TPO치는 혈소판 감소증이 없는 경우 만삭아보다 미숙아에서 높았고 혈소판 감소증이 있는 경우는 만삭아와 미숙아에서 TPO가 증가되어 있었다고 하여 TPO계는 신생아에서도 잘 작동되고 있으며 혈소판 감소가 회복되면서 TPO치가 감소되었다는 보고⁷⁾가 있다.

연구자의 결과에서도 대조군보다 신생아에서 TPO치가 증가되어 있었고 이 수치는 다른 결과들보다 월등하게 높았다. 이는 아마도 이 연구의 경우 신생아에서는 혈장이 아닌 혈청을 이용하였기 때문이라고 생각된다.

Folman 등²⁰⁾에 의하면 혈청을 이용할 경우 TPO치가 혈장보다 3~4배 높게 나타난다고 한다. 혈소판 수치가 증가함에 따라 TPO치가 증가된 것은 Albert 등⁷⁾의 보고와 비슷하였다. TPO는 거핵구 전구세포의 증식을 계열 특이하게 증가시킨다. TPO는 거핵구의 증식 뿐 아니고 거핵구의 분화도 자극한다고 알려져 있다. 골수의 단핵세포를 반고형 배지나 액상 배지에서 배양하면 거핵구 집락이 형성된다²¹⁾. 거핵구 배양은 과거에는 혈장응고 배지를 이용하였고 혈청에는 거핵구집락형성을 방해하는 인자가 들어있어 어려움이 있었으나 무 혈청의 methyl cellulose를 이용한 배양법이 개발되었고 이때 TPO가 거핵구집락형성을 증가시켰다는 보고²²⁾가 있다.

BFU-MK (BFU-mega)는 덜 성숙된 거핵구집락으로 배양 21일에 수백개의 세포로 구성되어 있는 것을 볼 수 있다. CFU-MK는 좀 더 성숙된 거핵구집락으로 배양 10~12일에 작은 수의 세포로 구성되어 있고 이는 BFU보다 DNA 함량은 높다^{23,24)}.

연구자는 각 질환별 골수 단핵세포에서 거핵구 집락을 측정한 결과 특발성 혈소판 감소성 자반증과 항암화학요법 후 골수 단핵세포에서는 집락 형성이 대조군보다 증가되었고 이때는 거핵구 조

혈모세포가 정상적이기 때문으로 생각되고 재생 불량성 빈혈에서는 집락형성이 되지 않아서 모세포수가 적거나 기능에 이상이 있을 것으로 생각되었다. TPO는 집락형성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 SCF 투여 후에는 집락수가 증가되는 것을 볼 수 있었다. 특히 재생 불량성 빈혈 환자의 골수단핵구 배양에서 SCF 투여 후 거핵구집락이 증가되는 것으로 보아 SCF가 재생 불량성 빈혈 환자 치료에 이용될 가능성도 있음을 시사해 주었다.

이는 조 등²⁵⁾의 결과에서 재생 불량성 빈혈 환자의 골수 상청액에 SCF를 투여하였을 때 제대혈 단핵세포로부터 형성된 BFU-E의 수와 크기가 매우 증가되어 SCF의 부족이 재생 불량성 빈혈 발생기전의 일부분으로 작용할 가능성도 예측되어 향후 치료에 도움이 될 것으로 보고한 결과와 일치한다.

이 실험에서 TPO 첨가에 의하여 거핵구집락형성에 별 영향이 없었던 것은 아마 용량이 낮았기 때문일 가능성도 있으므로 향후 용량을 증가시켜서 실험을 실시하므로서 TPO의 효과 유무를 좀 더 정확하게 관찰할 필요도 있을 것이다.

집락의 수가 전체적으로 적게 나타난 것을 보면 차후에는 단핵세포의 수를 증가시켜 실험을 해 볼 필요성도 있을 것으로 생각된다.

TPO치는 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 대조군보다 낮았고 재생 불량성 빈혈, 항암요법 후 골수부전에서는 높게 측정되었다. 신생아의 출생당시의 TPO치는 대조군에 비해 유의하게 높았다. 신생아에서 재태연령에 따라 혈소판 수치가 증가하였으나 TPO치와는 상관관계가 없었다. 항암 화학요법 후 환아 골수 단핵구에서는 TPO와 CFU-MK 모두 증가되어 있고 TPO 농도에 따른 CFU-MK의 증가는 없었고 SCF는 거핵구집락형성을 증가시켰다. 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 거핵구집락형성이 증가되어 있었고 재생 불량성 빈혈 단핵구에서는 거핵구집락이 형성되지 않았다. TPO와 SCF가 혈소판 감소증 치료에 도움이 되리라 예측되나 향후 더 많은 예에서 연구가

필요하리라 생각된다.

요 약

목 적: 백혈병 또는 고형 종양 치료에서 고용량 화학요법의 결과로 치료성적은 많이 향상되었으나 감염과 더불어 주 사망원인이 되는 혈소판 감소증으로 인한 출혈성 합병증에 대하여는 혈소판 수혈에만 의존하고 있는 것이 현실이다. 최근 거핵구 성장 발달 인자(megakaryocyte growth and development factor, MGDF) 또는 혈소판 조혈인자(thrombopoietin, TPO)가 개발되어 임상시험중이다. 이에 연구자는 여러 가지 원인에 의한 혈소판 감소증 환자에서 TPO치의 변화를 살펴보고 골수 단핵구에서 성장인자 유무에 따른 거핵구집락형성을 관찰하여 향후 혈소판 감소증 환자의 치료에 이용가능할 수 있을지를 보고자 하였다.

방 법: 소아에서 혈소판 감소증이 초래되는 질병 즉 재생 불량성 빈혈, 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우, 패혈증, 특발성 혈소판 감소성 자반증 환아에서 혈중 TPO치를 ELISA방법으로 측정하여 혈소판 수치에 따른 TPO치를 관찰하고 정상 대조군과 비교하였다. 신생아에서는 재태기간별 혈소판 감소유무에 따라 혈청 TPO치를 측정하고 PDW는 자동혈액분석기로 측정하였다. 대조군은 성장호르몬 측정을 위하여 내원한 혈소판 감소증이 없는 소아로 하였다. 말초혈액 3 cc를 EDTA tube에 채취하여 원심한 후 혈장을 -20°C에 냉동 보관하였다가 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

거핵구집락은 MegaCult™ kit의 배지를 이용하였다. 질환별 골수를 헤파린이 처리된 튜브에 수집하여 Ficoll Paque으로 단핵세포를 분리하여 collagen solution과 함께 혈청이 제거된 배지에 섞어 double chamber 슬라이드에 넣고 TPO, SCF 등 성장인자 투여유무에 따라 5% CO₂ 배양기에 10~12일간 배양한 후 탈수, 고정, 염색 후 도립 현미경하에서 집락을 관찰하였다. 통계처리는 Student-t test를 이용하였다.

결 과: 여러 조건에서의 TPO치는 대조군에서는

205±127 pg/mL이었고 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 낮았으며 재생 불량성 빈혈에서는 증가되어 있었고, 항암요법 후 혈소판 감소가 있는 경우는 증가되어 있었으며 혈소판 감소가 있는 패혈증에서도 증가되어 있었다. 즉, TPO치는 특발성 혈소판 감소성 자반증에서 가장 낮았고 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에서 높았다. TPO치와 혈소판수와는 역상관관계가 있었고 이 변화는 대조군에서는 별 차이를 볼 수 없었으나 특발성 혈소판 감소성 자반증에서는 정 상관관계와 유사한 양상을 보였고 재생 불량성 빈혈과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에는 역 상관관계가 뚜렷하였다.

신생아에서 TPO치는 대조군보다 높았다. 혈소판과 TPO치는 별로 상관관계가 없었고, 혈소판과 PDW와는 역 상관관계가 있었다.

재태기간과 혈소판 수와는 정 상관관계가 있고 재태기간과 TPO치와는 상관관계가 없었다. TPO치와 PDW는 상관관계가 없었고 혈소판 감소증이 있는 신생아에서 TPO치와 혈소판치와도 상관관계가 없었다 그러나, 동일한 신생아에서 혈소판 수치가 증가함에 따라 TPO치가 감소하는 것을 볼수 있었다. 질환별로 거핵구의 집락은 특발성 혈소판 감소성 자반증과 항암요법 후 골수기능이 저하된 경우에는 대조군보다 증가되는 것을 볼 수 있고 재생 불량성 빈혈의 경우 집락형성이 되지 않았다. TPO는 5 ng과 10 ng에서 집락형성에 특별한 영향을 미치지 않았으나 SCF는 거핵구 집락을 증가시켰다.

결 론: 혈소판 감소증의 원인에 따라 TPO치의 거핵구집락형성에 차이를 보였고 TPO와 SCF가 혈소판 감소증 치료에 도움이 되리라 예측되나 향후 더 많은 예에서 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl A, Sherican WP, Ohashi H, Kato T, et al. Megakaryocyte growth and

- development factor. Analysis of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1995;95:2973-8
2. Paula ES, Ronald JH. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foester J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (editors). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1999:615-60
 3. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, Tahara T, Kato K, Kitano K. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996;76:156-60
 4. Hou MP, Stockelberg D, Mellqvist UH, Ridell B, Wadenvik H. Plasma thrombopoietin levels in thrombocytopenic states: implication for a regulatory role of bone marrow megakaryocytes. *Br J Haematol* 1998; 101:420-4
 5. Angchaisuksiri 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. *Br J Haematol* 1996;93:13-7
 6. 조성범, 김홍식, 강진무. 조혈 모세포의 종류에 따른 거핵구 집락 형성. *대한소아혈액종양학회지* 1998;5:138-47
 7. Albert TS, Meng YG, Simms P, Cohen RL, Phibbs RH. Thrombopoietin in the thrombocytopenic term and preterm newborn. *Pediatrics* 2000;105:1286-91
 8. Fogel BJ, Arias D, Kung F. Platelet counts in healthy premature infants. *J Pediatr* 1968;18:205-12
 9. Aballi AJ, Puapondh Y, Desposito F. Platelet counts in thriving premature infants. *Pediatrics* 1968;42:685-9
 10. Hawiger J, Handin RI. Structure and function of platelets. In: Nathan DG, Oski FA (Eds): *Hematology of infancy and childhood*. 4th Ed. Philadelphia, Saunders, 1993:1512-33
 11. Odell TT, Jackson CW, Friday TJ, Charsha DE. Effects of thrombocytopenia on megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol* 1969;17:91-101
 12. Harker LA. Kinetics of thrombopoiesis. *J Clin Invest* 1968;47:458-65
 13. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor mpl. *Cell* 1994; 77:1117-24
 14. Hill R, Levin J. Partial purification of thrombopoietin using lectin chromatography. *Exp Hematol* 1986;14: 752-9
 15. Chang MS, McNinch J, Basu R, Shutter J, Hsu R, Perkins C, et al. Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene. *J Biol Chem* 1995;270:511-4
 16. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 1994;265:1445-7
 17. Methia N, Louache F, Vainchenker W, Wendling F. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993;82:1395-401
 18. Emmons RVB, Rein DM, Cohen RL, Meng G, Young NS, Dunbar CE, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996;87:4068-71
 19. Kuefer MU, Wang WC, Head DR, Williams JA, Furman WL, Liu Q, et al. Thrombopoietin level in young patients is related to megakaryocyte frequency and platelet count. *J Pediatr Hematol Oncol* 1988;20:36-43
 20. Folman CC, von dem Borne AE, Rensink IH, Gerrisen W, van der Schott CE, de Haas M, et al. Sensitive measurement of thrombopoietin by a monoclonal antibody based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb Haemast* 1997;78:1262-7
 21. Choi ES, Hokom M, Bartley T, Li YS, Ohashi H, Kato T, et al. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells (Dayt)* 1995;13:317-22
 22. Ratajczak J, Machalinski B, Samuel A, Pertusini E, Majka M, Czajka R, et al. A novel serum free system for cloning human megakaryocyte progenitors (CFU-Meg). The role of thrombopoietin and other cytokines on bone marrow and cord blood CFU-Meg growth under serum free conditions. *Folia Histochem Cytophiol* 1998;36:61-6
 23. Metcalf D, MacDonald HR, Odartchenko N, Sordat B. Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:1744-8
 24. Vainchenker W, Bouquet J, Guichard J, Breton-Gorius J. Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. *Blood* 1979;54:940-5
 25. 조진선, 김홍식, 강진무. 조혈세포 집락형성에 대한 재생 불량성 빈혈환아 골수 상청액의 효과. *대한소아혈액종양학회지* 1996;3:29-36