

만성 신부전증 환자의 혈장이 생쥐 골수세포 CFU-GM 증식능에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 병리학교실

박 창 수 · 유 주 용

서 론

골수세포의 생체의 배양은 조혈과정의 연구나 각종 혈액질환의 진단 및 예후의 판정을 위하여 자주 이용되고 있는 검사방법으로서^{1,2)} Pike등³⁾이 개개의 골수세포가 분열하고 분화하는 과정의 관찰이 가능한 반고형 배지법을 개발한 이후 근래에는 조혈세포 배양이 여러목적으로 활발히 진행되고 있다.

국내에서도 조 등⁴⁾이 조혈세포의 생체의 배양을 처음 보고한 이후 각종 혈액질환에 있어서 과립구 단구계, 전구세포 (Colony forming Unit: granulocyte and monocyte; CFU-GM)의 증식능에 관한 연구가 이루어지고 있다⁵⁻⁸⁾.

CFU-GM 배양은 다른 골수 전구세포의 배양에 비해 비교적 용이하게 이루어지고 있는데 각종 질환의 혈장에서는 골수세포의 증식을 촉진 또는 억제하는 인자를 보유하는 경우가 있다하여 주로 생쥐 골수세포를 대상으로 세포의 CFU-GM 증식능에 미치는 영향을 추구하고 있다⁹⁻¹¹⁾.

이러한 각종 인체질환 중 만성 신부전증 환자의 주된 사망원인은 감염증으로서 빈번한 감염의 원인규명을 위한 연구보고들이 있다.

Jacobs등¹²⁾은 요독증 환자에서 과립구와 림프구가 기능 결함을 초래하여 감염이 자주 유발된다고 하였고 Vincent등³⁾은 요독증 환자의 혈장내에 조혈세포의 증식을 억제하는 인자가 있다고 주장한 반면 Foster등¹⁰⁾은 이와는 반대로 실험적으로 급성 신부전을 유발한 생쥐의 요독 혈청에는 골수세포 집락자극인자(colony stimulat-

ing factor: C.S.F.)가 증가된다고 하였다.

따라서 저자들은 만성 신부전증 환자에서 빈번히 유발되는 감염증의 원인규명의 일환으로 만성신부전증 환자의 혈장을 혈액 투석 전후로 구분하여 정상 생쥐 골수세포를 첨가시켜 배양한 후 CFU-GM 증식능에 미치는 영향과 배양된 골수세포의 형태학적인 변화를 추구할 목적으로 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

요독 혈장은 전남의대 부속병원 인공신장실에서 정기적으로 혈액 투석을 받고 있는 만성 신부전증 환자 15명에서 채취하였고 정상인의 혈장 및 요독혈장의 첨가에 따라 실험군을 다음과 같이 구분하였다.

제 1 군 : 건강한 성인의 혈장을 첨가한 군

제 2 군 : 혈액투석 전 혈장을 첨가한 군

제 3 군 : 혈액투석 후 혈장을 첨가한 군

요독증 환자의 혈장은 혈액 투석 전후로 구분하였고 정상 대조군에 이용한 혈장은 감염성질환이 없는 건강한 성인 3명을 대상으로 하여 무균적으로 채취하였고 이를 1 ml씩 분주하여 -20°C에 냉동 보관한후 실험에 이용하였다.

혈액 투석 전의 혈장을 이용하여 채혈 당일에 BUN과 creatinine 검사를 시행하였다.

1. 골수세포집락 자극인자

골수세포집락 자극인자로서 본 실험에서는 생쥐 복막 대식세포를 이용하기 위하여 정상 생쥐의 복막강 내로 10% Peptone broth 2ml를 주사하고 72시간이 경과된 뒤에 도살하여 복막강 내로 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution) 10 ml를 주입한 후 18 G needle을 이용하여

*본 논문의 요지는 1986년 추계 병리학회에서 발표하였음.

복막강 내의 저류액을 채취하였다. 채취된 복막액은 HBSS로 3번 원심세척한 후 35 mm 배양접시에 2 ml씩 분주하여 37°C 7.5%, CO₂ 92.5% air 완전습윤 상태하에 1시간동안 부란시켰다. 부란이 끝난 후 배양접시를 2회 수세한 후 내면에 선택적으로 부착되어 있는 대식세포의 농도를 2×10⁵ cell/ml되게 PRMI 1640 medium에 부유시켜 37°C 7.5%, CO₂ 92.5% air 완전습윤 상태하에 1시간 동안 부란시켰다. 부란이 끝난 후 배양접시를 2회 수세한 후 내면에 선택적으로 부착되어 있는 대식세포들을 rubber policeman을 이용 수집하고 대식세포의 농도를 2×10⁵ cell/ml되게 PRMI 1640 medium에 부유시켜 37°C 7.5% CO₂ 완전 습윤상태에서 6시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액만을 분리한 후 2 ml씩 분주하여 -20°C에 냉동 보관하였다.

2. 골수세포의 생체외 배양

일정한 조건하에서 사육한 생후 8주 이내의 생쥐를 도살한 후 무균적으로 대퇴골과 경골을 박리하고 양측 골단을 통해 McCoy's 5A medium을 주입하여 골수세포 부유액을 만들었다.

골수세포 부유액은 gauze로 여과하여 골편 및 조직편을 제거한 후 HBSS로 원심 세척하였다. 골수세포 부유액은 세포의 농도가 2×10⁵ cell/ml되게 McCoy's 5A medium으로 조절하였다.

세포의 배양은 35 mm 배양접시에 골수세포 부유액은 500 μl와 세포집락자극인자 200 μl 그리고 fetal bovine serum (Gibco) 200 μl와 혈장 10 μl를 잘 섞은 후 3% bacto agar 100 μl를 분주하여 실온에서 고형이 된 후 Forma CO₂ 부란기를 이용하여 37°C, 7.5% 완전습윤상태 하에서 5일간 배양하였다. 한편, 배양 당시 발생할 수 있는 오차를 줄이기 위해 검체물을 3개씩 배양하였다.

3. CFU-GM 증식능 및 골수세포의 형태학적인 관찰

5일간 배양한 후 도립현미경 (Inverted Microscope)을 이용하여 배양접시에 형성된 CFU-GM 세포집락 (colony; 40개 이상의 세포)과 세포대군 (macrocluster; 20~40개의 세포) 및 세포소군 (microcluster; 20개 미만의 세포) 수를 산정하여 CFU-GM 증식능에 대한 관찰을 하였다.

계산이 끝난 배양접시는 aceto-orcein 염색을 하여 광

학현미경 하에서 세포집락과 세포군 구성세포들을 검색하였고 aceto-orcein 염색을 하지 않은 배양접시는 Franklin등(1974)의 방법에 따라 배양접시에 0.6 ml의 3% Cacodylate buffered glutaraldehyde를 첨가하고 37°C 7.5% CO₂ 완전 습윤하에서 48시간 동안 전 고정 한 후 통상의 방법에 따라 전 agar층을 Epon block을 만들었다. 전 agar층의 Epon block을 현미경 하에서 세포집락과 세포군을 확인한 후 관찰할 부분을 절제하여 작은 Epon block을 만들어 Porter-Blum MT-5000 초박 절편기로 1 μm 두께로 박절하고 toluidine blue 염색을 시행하였으며 동 부위를 80 nm 두께의 박편으로 만들어 Reynolds¹⁴⁾ 법으로 염색한 후 Hitachi 600 전자현미경으로 가속전압 80 kv 하에서 관찰하였다.

각 실험군에서 관찰한 세포집락과 세포대군 및 세포소군 수의 변화는 Norusis¹⁵⁾의 Paired t-test을 이용하여 유의성을 검정하였다.

실 험 성 적

본 연구에서 대상으로 한 만성 신부전증 환자의 발병 기간과 BUN, creatinine치는 표 1에서와 같고 발병기간과 질소혈증 (azotemia) 간에 상관성은 관찰할 수 없었다.

Table 1. The BUN and creatinine levels and duration of illness in patients with chronic renal failure

Cases	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Duration (years)
1	68.6	7.6	7
2	78.2	10.8	5
3	102.4	12.2	3
4	95.2	11.8	5
5	99.7	10.5	6
6	63.9	10.1	1
7	134.1	9.8	6
8	95.6	9.1	2
9	68.4	10.3	4
10	82.6	10.8	1
11	101.6	13.2	1
12	89.5	11.7	4
13	95.8	12.3	1
14	85.9	11.5	2
15	67.0	6.5	2

Table 2. The numbers of colony, macrocluster and microcluster in each group

Cases group	Colony			Macrocluster			Microcluster		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	17.0	8.0	12.0	28.0	25.0	29.0	315.0	172.5	147.0
2	13.0	12.0	7.0	60.0	24.0	25.0	345.0	348.0	414.0
3	33.4	18.6	16.9	46.7	29.3	18.3	312.0	303.7	387.3
4	29.3	22.7	30.3	61.4	64.6	65.6	310.7	228.7	244.0
5	12.0	14.0	6.4	44.0	56.0	46.6	179.3	183.0	234.0
6	38.0	19.0	30.0	86.0	23.0	47.0	280.0	206.0	314.0
7	55.0	17.0	18.6	81.0	23.0	17.4	264.0	200.0	201.3
8	15.0	15.0	9.0	54.0	102.0	60.0	403.3	245.0	382.0
9	39.0	33.0	32.0	63.0	66.0	118.0	137.0	132.0	295.5
10	25.4	15.0	33.0	67.4	22.0	112.0	126.0	144.5	244.0
11	14.5	15.7	14.0	43.0	32.0	45.0	119.0	78.7	92.0
12	34.0	25.4	14.0	180.0	164.0	132.6	344.0	414.0	34.0
13	60.0	69.0	74.6	108.0	91.0	26.0	424.0	568.0	309.0
14	32.0	19.4	18.6	22.0	30.6	34.0	101.0	256.0	302.0
15	47.0	51.4	24.0	65.0	73.4	36.0	303.0	352.0	204.0

* Group I : cultured with normal plasma
 Group II : cultured with predialytic uremic plasma
 Group III : cultured with postdialytic uremic plasma

Table 3. The mean number (mean \pm SD) of colonies, macroclusters, microclusters, macrocluster/colony ratio and microcluster/macrocluster ratio in each group

Group	I	II	III
Item			
Colony	30.9 \pm 15.2	23.7 \pm 16.3	22.7 \pm 16.9
Macrocluster	67.3 \pm 38.1	56.5 \pm 39.4	54.2 \pm 37.4
Microcluster	264.2 \pm 105.8	255.5 \pm 125.4	253.6 \pm 107.7
Macrocluster/colony ratio	2.4 \pm 1.3	2.7 \pm 1.8	3.3 \pm 2.6
Microcluster/macrocluster ratio	4.6 \pm 2.5	5.8 \pm 3.5	7.3 \pm 5.8

* Group I : cultured with normal plasma
 Group II : cultured with predialytic uremic plasma
 Group III : cultured with postdialytic uremic plasma

각 실험군에 따라 세포집락과 세포대군 및 세포소군의 수 및 평균치는 표 2 및 표 3에서와 같다. 정상혈장을 첨가한 대조군은 세포집락 수의 평균치가 30.9인데 비하여 혈액투석 전 요독혈장 첨가군은 23.7, 혈액투석 후 혈장 첨가군이 22.7로서 요독혈장 첨가군은 정상혈장 첨가군에 비하여 세포집락의 수가 유의한 감소를 보여 주었으며 ($P < 0.05$, 표 4), 혈액투석 전후의 혈장사이에서는 유의한 차이가 없었다 ($P = 0.721$, 표 4).

따라서 세포집락의 형성능은 요독혈장이 첨가된 경우 정상혈장을 첨가한 대조군에 비하여 억제되었고 혈액투석 후에도 혈액투석 전의 혈장을 첨가한 군에서 나타나는 세포집락의 억제능이 변화되지 않았다 (Fig. A). 세포대군의 각 실험군에 따른 형성능은 대조군인 정상혈장 첨가군이 67.3, 혈액투석 전 혈장 첨가군은 56.5, 혈액투석 후 혈장 첨가군 54.2로서 혈액투석 전후의 차가 없는 점 ($P = 0.810$)은 세포집락의 형성능과 같은 경향이있

으나 정상혈장을 첨가한 군과 요독혈장을 첨가한 군과의 차이는 유의성을 인정할 수 없었다(P=0.145, 표 4, Fig. B).

세포소군 수의 평균치는 정상혈장 첨가군 264.2, 혈액투석 전 혈장 첨가군 255.5, 혈액투석 후 혈장첨가군이 253.6으로서 세포집락이나 대세포군 형성능의 변화와 같이 혈액투석 전후의 유의한 차이는 관찰되지 않았으며(P=0.963)요독혈장 첨가군이 정상혈장 첨가군에 따른 소세포군 형성의 억제는 대세포군에서와 같이 유의하지 않았다(P=0.714, Table 4, Fig. C).

동일한 배양접시내에서 세포집락과 세포대군 그리고 세포소군과 세포대군의 구성비율을 관찰하기 위한 macrocluster/Colony ratio(ma/Co ratio)와 microcluster/macrocluster ratio(mi/ma ratio)의 성적은

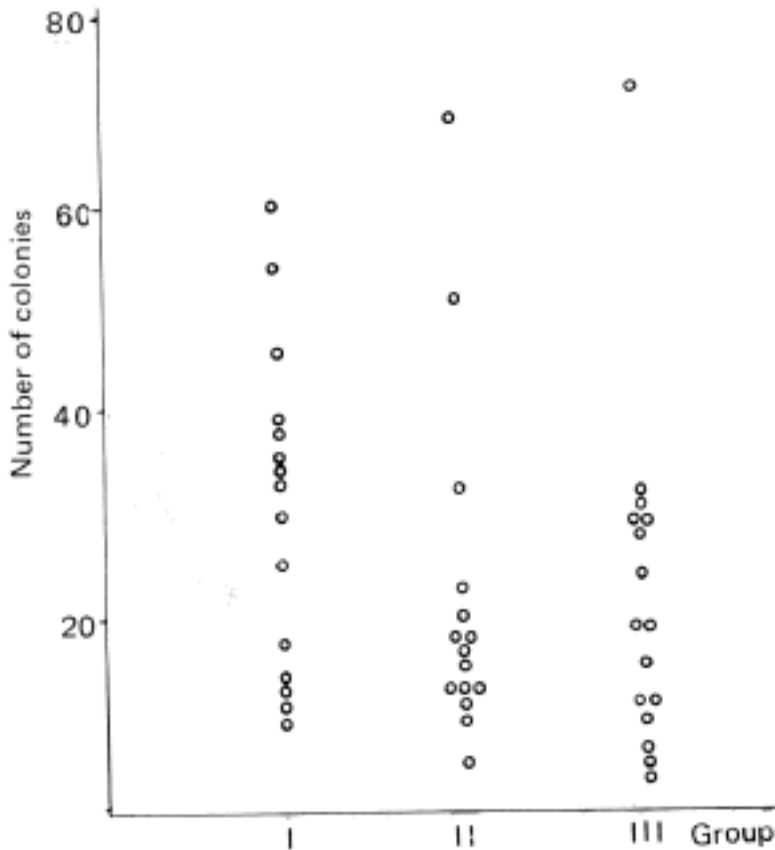


Fig. A. Granulocyte-monocyte colony in each group.

(표 3)에서와 같이 각 실험군에 따라 비율이 불규칙하였다. 혈액투석 후 혈장을 첨가하여 배양한 군의 ma/Co ratio가 3.28, mi/ma ratio는 7.31로서 다른 군에 비해 높은 비율이었으나 유의성은 인정되지 않았다.

질소혈증의 정도와 세포집락 형성능의 감소율과의 상관성을 알아보기 위해 creatinine치와 정상대조군에 비하여 혈액투석 전의 혈장 투여군의 세포집락 수의 감소율을 plot하여 본 결과 상관성은 인정할 수 없었다(Fig. D).

세포집락과 세포군의 형태학적 관찰은 aceto-orcein 염색표본과 Epon block을 박절한 toluidine blue 염색 표본을 이용하여 광학현미경으로 검경하였고 구성세포의

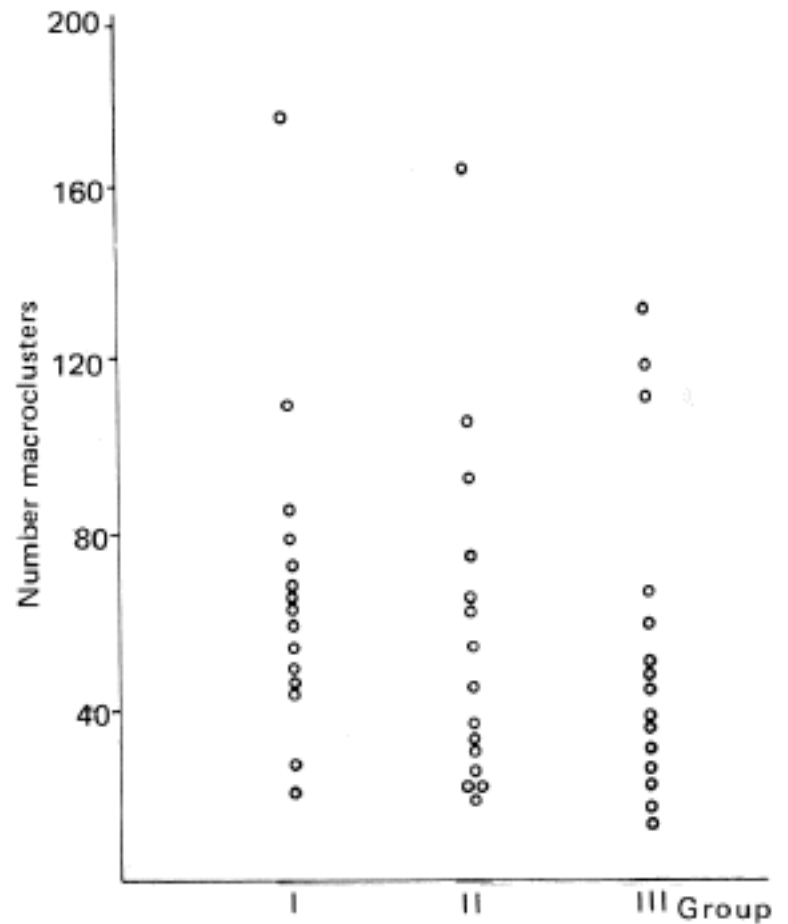


Fig. B. Granulocyte-monocyte macrocluster in each group.

Table 4. Statistical significances (P-value) in number of colonies in each group

Group	Colony			Macrocluster			Microcluster		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
I			0.023			0.200			0.815
II	0.027			0.145			0.714		
III		0.721			0.200			0.963	

* Group I : cultured with normal plasma
 Group II : cultured with predialytic uremic plasma
 Group III : cultured with postdialytic uremic plasma

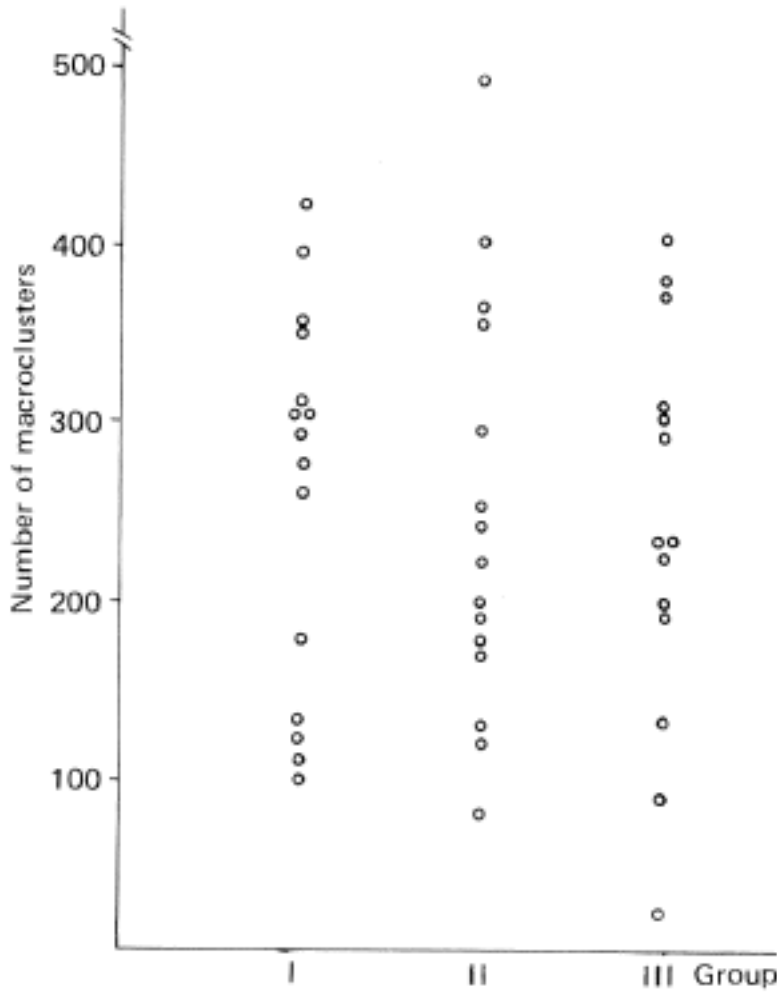


Fig. C. Granulocyte-monocyte microcluster in each group.

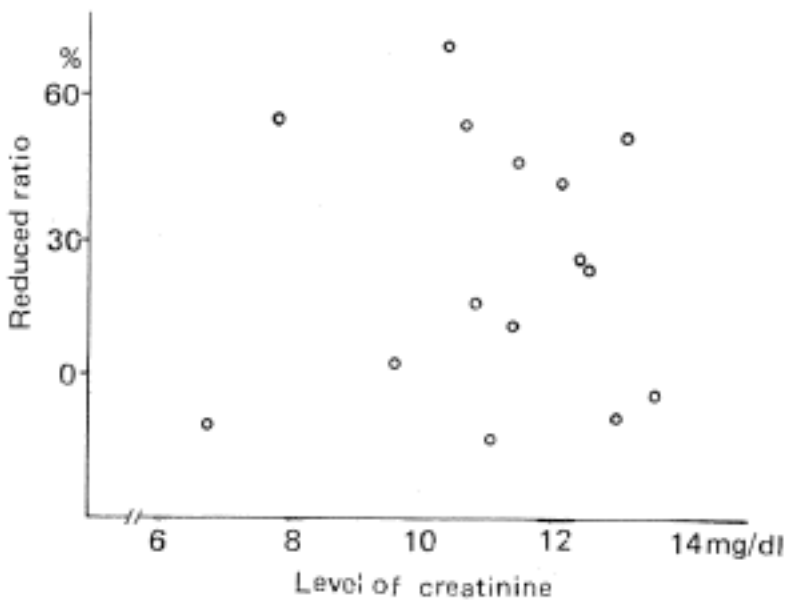


Fig. D. Plot of reduced ratio of colonies with level of creatinine.

미세구조를 전자현미경으로 관찰하였다. 배양 5일째의 세포집락은 aceto-orcein 염색상 세포질내에서 많은 과립이 존재하는 과립구성 세포집락과 (Fig. 1), 세포질내에 과립이 관찰되지 않은 단핵구성 세포집락 (Fig. 2)이 혼재되어 있었으며 실험도중 드물게 섬유아세포의 증식을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 배양된 세포집락의 형태

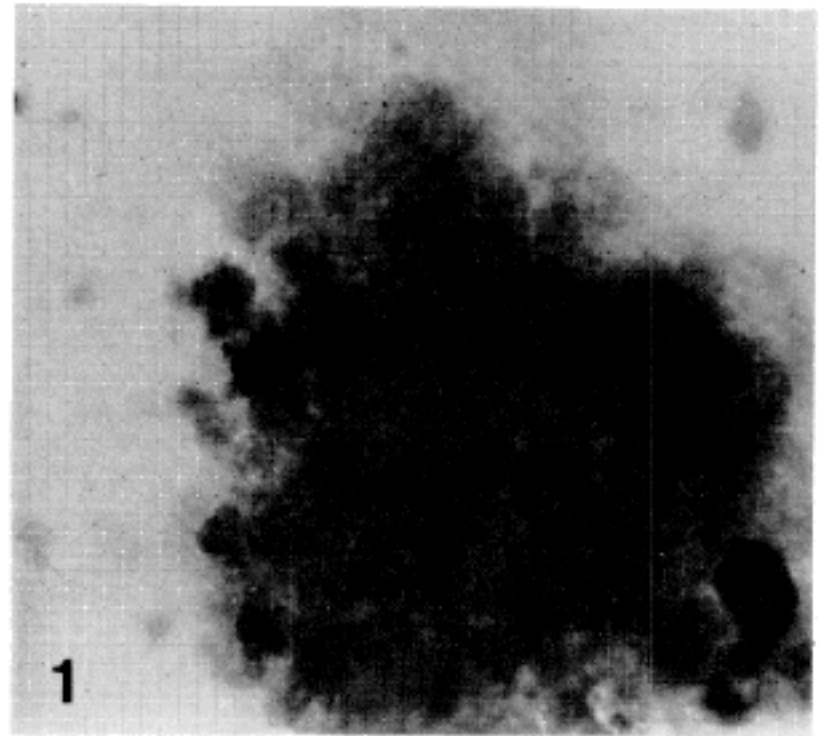


Fig. 1. Granulocyte colony is shown in 5 day-culture. Aceto-orcein stain (x1,000)

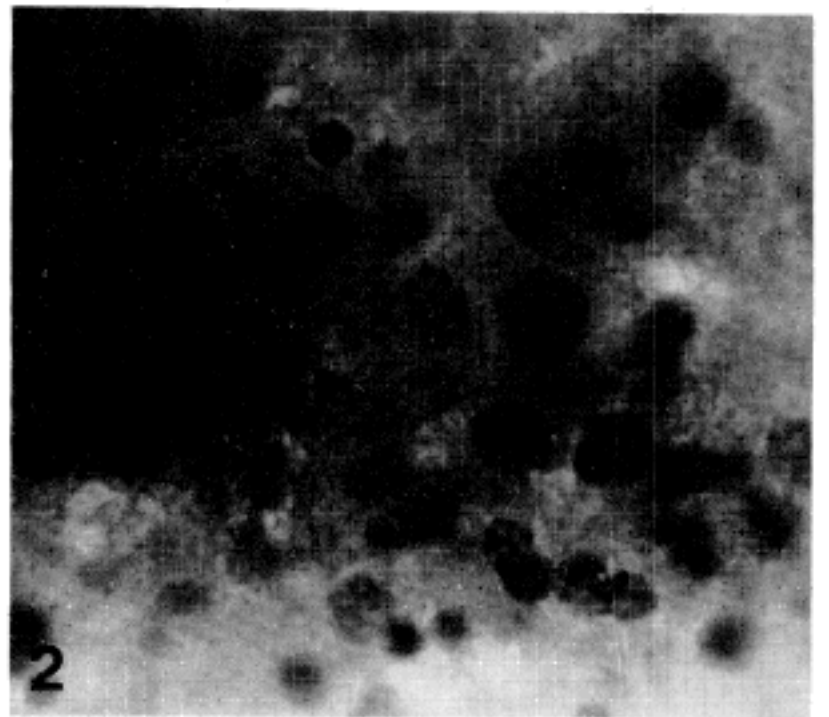


Fig. 2. Monocyte colony is shown at 5 day-culture. Aceto-orcein stain (x1,000)

는 5일째에 변성되어 가는 과정에 있는 세포집락 (Fig. 4) 과 세포의 증식 및 성숙이 이루어지고 있는 세포집락들이 혼재되어 있었고, 세포집락의 구성세포는 중심부에 비하여 주변부의 세포가 더 성숙되어 있음을 보여 주었으며 세포집락과 세포군의 구성세포는 toluidine blue 염색상 대부분이 단일계 골수세포들로서 구성되어 있었으며 (Fig. 5) 세포질내에 많은 과립을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 전자현미경 소견상 과립구는 세포질내에 내부농도가 높은 호아주르성 과립과 내부농도가 낮은 특이성 과립이

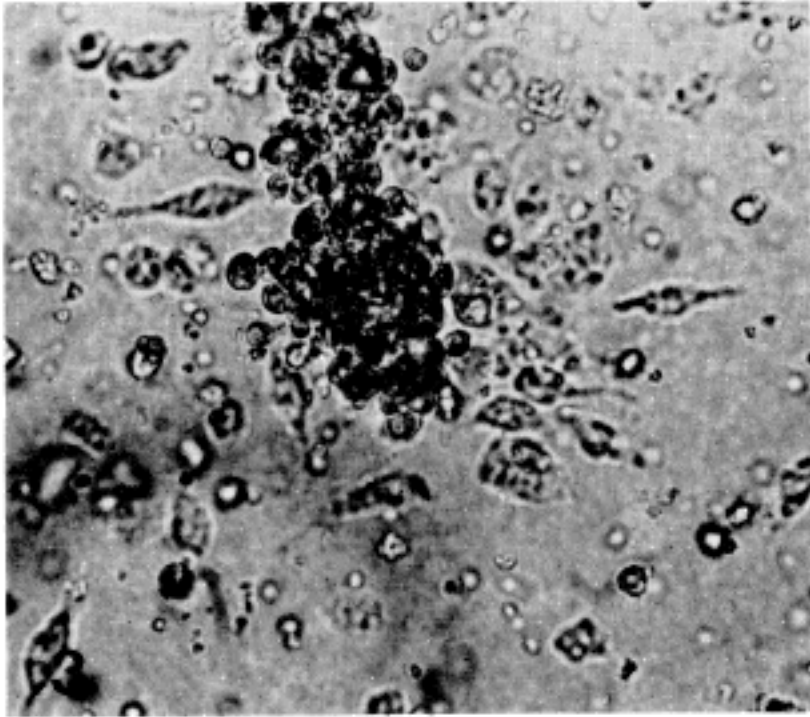


Fig. 3. Fibroblasts are appeared around the CFU-GM colony at the 5 day of culture. Wet-prepared, inverted micrograph (x400)

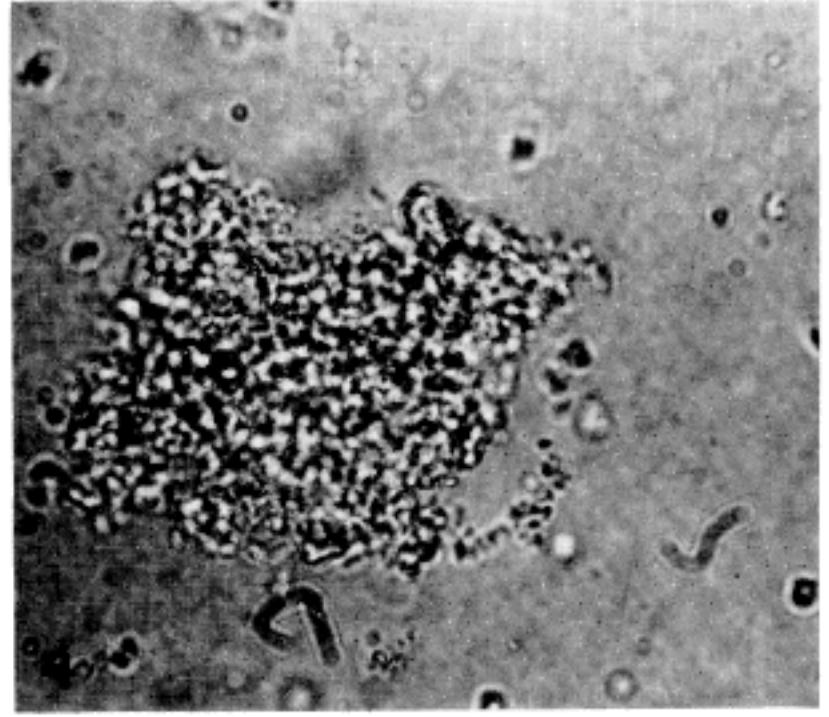


Fig. 4. Sometimes degenerated colony is shown at 5 day of culture. Wet-prepared, inverted micrograph (x400)

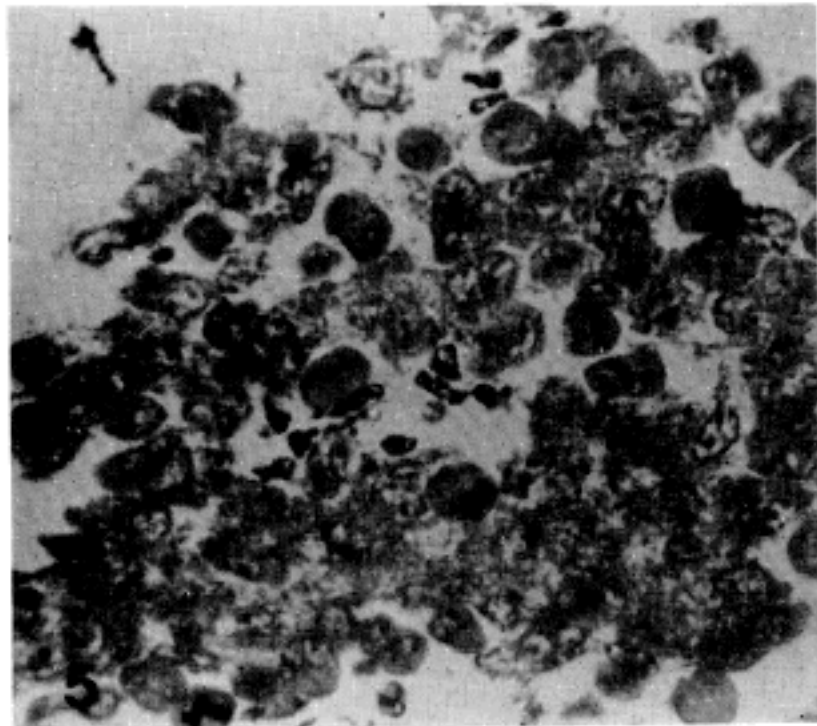


Fig. 5. Granulocyte colony consists of monomorphic granulocytic cell series. Toluidine blue stain (x1,000)

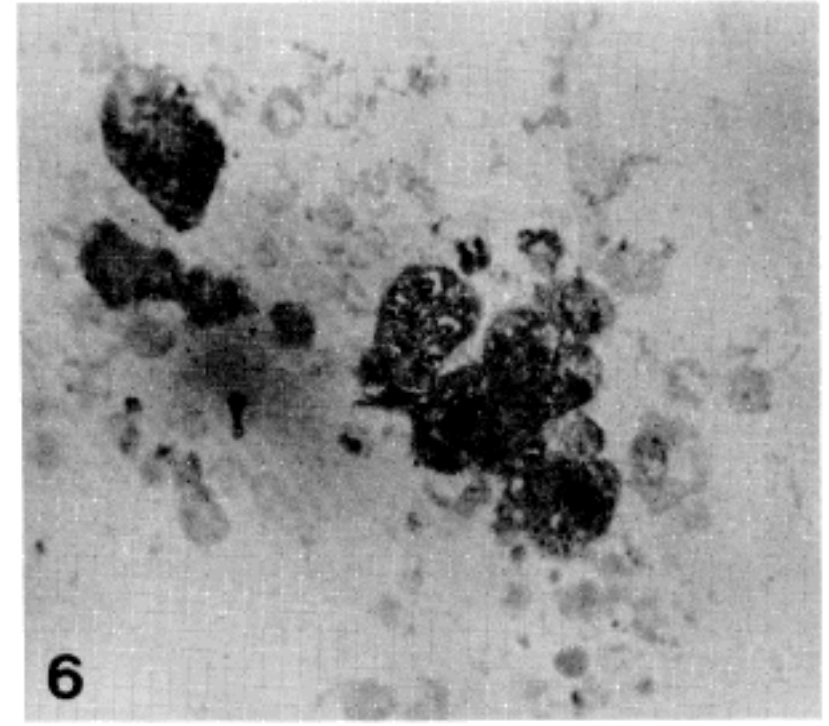


Fig. 6. Microcluster consists of granulocytes which have granules in the cytoplasm. Toluidine blue stain (x1,000)

출현하였고 (Fig. 7) 세포막 돌기가 관찰되었다. 단핵구는 세포질내에 많은 공포와 소포들이 있었으며 호아주르성 과립이나 특이성 과립은 과립구에 비하여 그 수가 적고 세포막 돌기가 관찰되었다 (Fig. 8).

고 찰

골수세포의 생체의 배양은 배양방법이나 골수세포집락

자극인자 및 우태아 혈청 (fetal calf serum)의 비동화여부와 농도 그리고 혈청의 종류나 제조회사 등에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다^{1,3,14,16,17}.

골수세포집락 자극인자 중 CFU-GM 배양에 관여하는 인자는 neuramic acid를 함유하는 당단백으로서 Stanley 등¹⁸⁾은 단백 분해효소에 쉽게 분해되지 않는다고 하였으며 Chervenik 등¹⁹⁾은 열처리나 냉동보관시 변화하지 않고 투석 (dialysis)되지 않는 물질이라고 하였

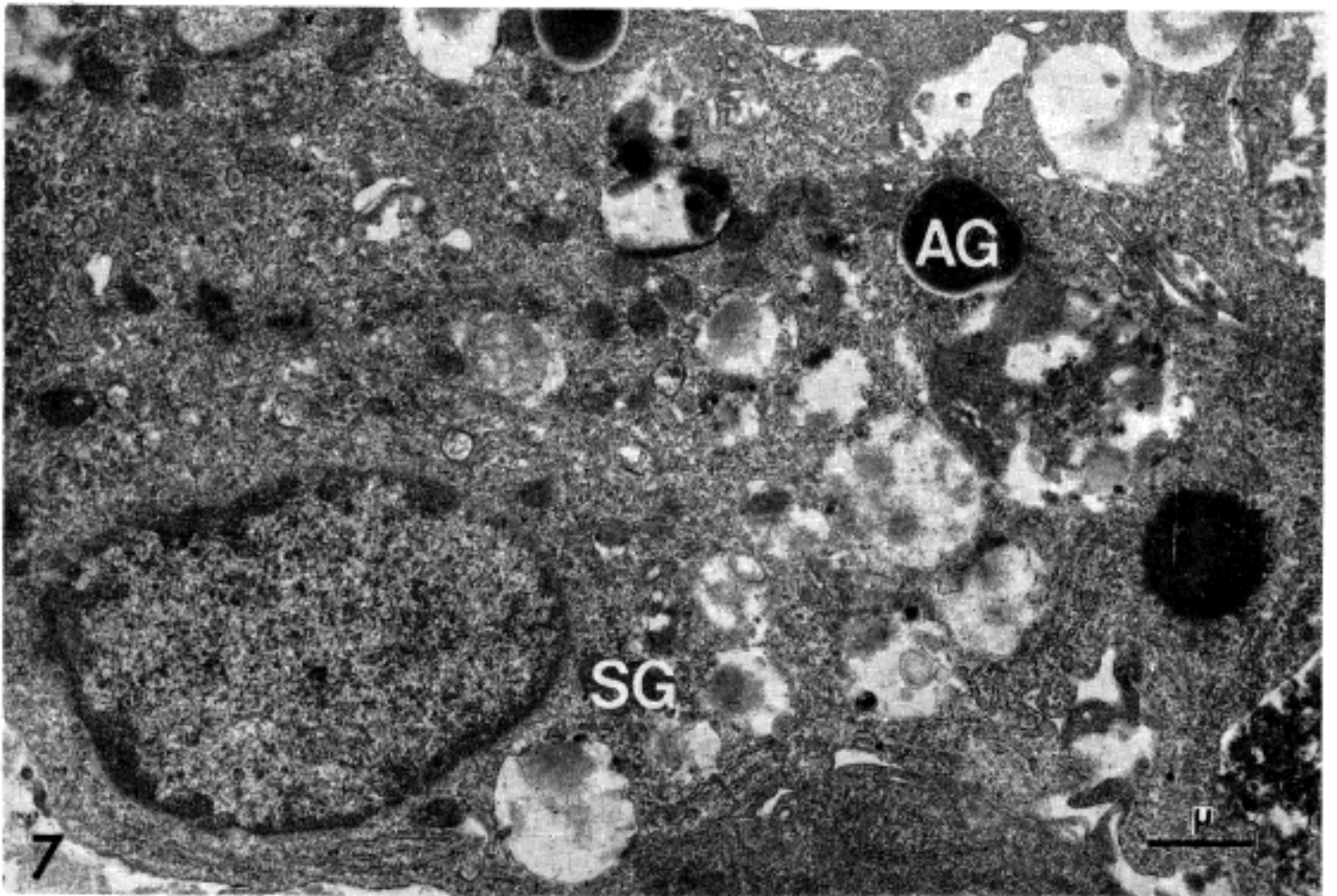


Fig. 7. Electron dense azurophilic granules (AG) and electro-lucent specific granules (SG) are noted in the cytoplasm of the granulocyte, Uranyl acetate and lead citrate (x10,200)

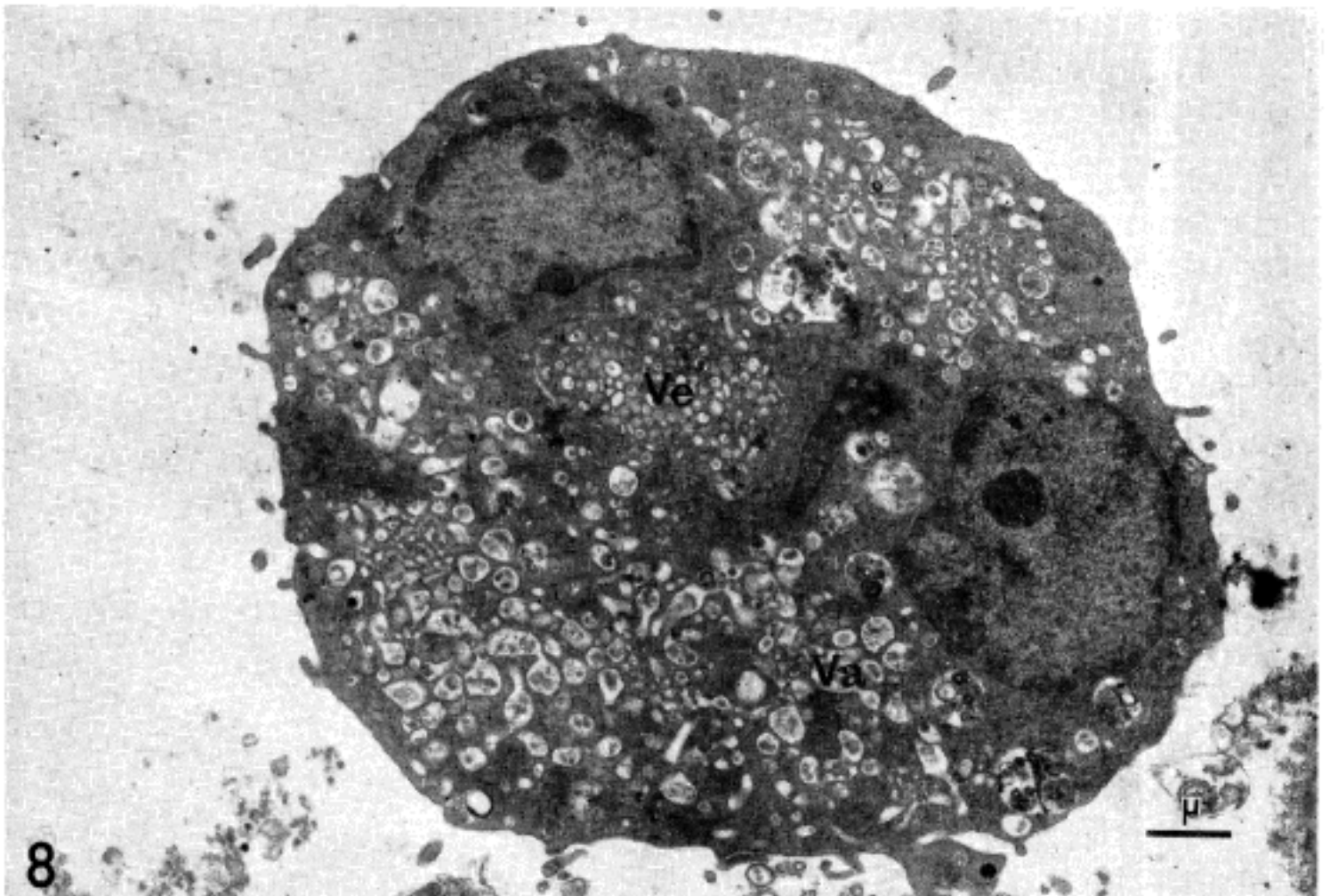


Fig. 8. A monocyte had numerous vesicles (Ve) and vacuoles (Va) in the cytoplasm with finger like projection. Uranyl acetate and lead citrate (x12,000)

다. 이러한 골수세포집락 자극인자는 인체나 동물의 여러 장기나 조직에서 분비된다고 한다. 즉 폐, 신장, 말초 백혈구 그리고 T-림프종이나 육종의 종양세포등에서^{20~23)} 분비되며 Quesenberry 등²⁴⁾은 내독소에서도 분비된다고 하였다. 또한 Golde 등²⁵⁾은 대식세포에서 골수세포집락 자극인자가 분비된다고 하였으며 Moore 등²⁶⁾은 각 장기나 조직에 존재하는 대식세포중 폐포에 존재하는 대식세포가 가장 좋은 세포집락 자극인자라고 하였다.

그러나 이러한 자극인자는 장기나 세포의 종류 그리고 그들의 조작과정에 따라 차이가 있다고 한다^{21,23,27)}.

본 실험에서 사용한 골수세포집락 자극인자는 대식세포 조건배지로 하였는데 이 배지는 표준화가 비교적 용이하였다. 즉 지금까지 주로 실험에 사용해 오고 있는 인태반 조건배지는 제조과정에 있어서 각 배양용기마다 세절한 조직편 수만을 일정하게 맞추어 배양하므로 각 용기마다 분비된 골수세포집락 자극인자의 양은 차이가 있을 것으로 추측되었다. 이러한 점에 비해 대식세포 조건배지는 세포농도를 일정하게 맞추어 동일한 조건하에서 제조하였기 때문에 조건배지에 분비되는 자극인자의 양은 배양 용기에 따라 오차가 적을 것으로 생각되었다. 또한 생쥐의 복강내의 유주 대식세포 (free macrophage)의 수집을 위하여 사용한 peptone broth는 mineral oil이나 casein 등 다른 자극인자에 비하여 대식세포의 손상을 주지 않는 자극물질로서 증식된 대식세포 세포질의 변형을 초래하지 않는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

Eliason 등¹⁶⁾은 우태아 혈청의 농도에 따라 골수세포의 증식에 차이가 있으며 20%의 농도에서 세포의 증식이 가장 잘 된다고 하였다. 본 실험 역시 fetal bovine serum (Gibco)을 20% 농도로 첨가하여 골수세포의 증식을 위한 적정조건을 맞추었다.

본 연구에서 요독혈장을 첨가한 군은 대조군인 정상혈장을 첨가한 군에 비해 세포집락의 형성이 억제됨을 보여 요독혈장에 의해 CFU-GM 증식능이 억제됨을 나타내 주었는데 이는 만성 신부전증 환자의 혈장내에서 골수세포의 증식을 억제하는 물질이 있음을 암시해 주는 소견으로서 Vincent 등¹³⁾의 요독혈장내에 억제인자가 존재한다는 보고와 부합되었다.

Vincent 등¹³⁾은 요독혈장의 첨가농도를 1%에서 10%까지 구분하여 관찰한 결과 1% 첨가에서는 억제효과가 거의 없었으나 첨가농도를 10%까지 증가시킬수록 억제

효과는 비례하여 크게 나타났던 점으로 미루어 요독혈장의 농도와 골수세포 증식능의 억제는 비례한다고 하였으며 이들의 실험성적은 대부분 10% 첨가농도하에서 이루어졌다.

그러나 본 연구에서는 요독혈장 첨가농도를 1%로 하였는데도 억제효과는 나타났으며, 이는 Vincent 등¹³⁾의 보고와 차이가 있었다. 본 연구에서 혈장첨가 농도를 1%로 하여 관찰한 이유는 Forster 등¹⁰⁾이 사람혈청은 생쥐 골수세포의 증식을 촉진시킨다는 주장과 혈장 첨가 농도를 10%로 하였을때 배지액의 회석등에 의한 오차를 초래할 가능성이 있기 때문이었다.

혈액투석 전과 후의 혈액첨가군에 있어서 세포집락이나 세포대군 그리고 세포소군의 수는 유의한 차이를 관찰하기 어려웠는데 이러한 사실은 요독혈장내에 존재하는 골수세포집락 억제인자가 혈액투석을 시행한 후에도 계속 잔존해 있음을 암시하고 이러한 억제인자는 50,000 dalton 이상을 투석할 수 있는 인공신장기 (Toray사)의 여과막을 통과하는 물질임을 알 수 있었다. Vincent 등¹³⁾이 요독혈장을 25,000 dalton 이상을 투석할 수 있는 Visking tube를 이용하여 3회 투석한 뒤에 골수 배양을 한 결과 여전히 골수세포집락형성 억제효과가 관찰되어 요독혈장내 억제인자의 분자량은 25,000, dalton 이하의 물질이라고 주장한 점은 저자의 연구 성적에서 억제인자가 50,000 dalton 이하라는 사실을 확인하여 주는 성적이었다.

억제인자의 작용점에 대해 Vincent 등¹³⁾은 말초혈액 백혈구를 이용한 중층 배양에서는 세포집락의 형성이 억제되었지만 인태반 조건배지를 사용한 단층 배양에서는 세포집락의 형성이 억제되지 않았던 사실로 미루어 억제인자는 인태반 조건배지와 같이 이미 형성된 자극인자는 억제하지 않고 중층 배양시 하층의 말초혈액 백혈구에서 형성되는 골수세포집락 자극인자의 새로운 형성을 억제함으로써 골수세포의 증식능이 억제된다고 주장하였다.

본 연구에서는 대식세포 조건배지를 이용한 단층배양법을 이용하였는데도 억제효과가 관찰되어 이들의 주장과는 상반되었으며 이러한 성적은 요독혈장내의 억제인자가 골수세포집락 자극인자의 형성을 억제하였다기 보다는 골수세포에 직접 작용하여 세포의 증식을 억제시켰을 것이라는 가능성을 제시하고 있다. Sevitt 등²⁹⁾은 만성 신부전증 환자의 말초혈액에 나타나는 호중구는 핵의 형태가 비정형의 핵을 갖는다고 하였으며 이러한 비정형

세포의 출현은 혈청내에 존재하는 억제인자가 과립구계 전구세포에 작용하여 성숙과정에 손상을 초래하여 유발된 것으로 추측하였는데 이러한 보고 역시 억제인자가 골수세포집락 자극인자의 형성 억제보다는 골수전구세포에 직접 작용할 것이라는 가정을 뒷받침 해주는 사실이라 할 수 있겠다. 질소혈증(azotemia)과 세포집락의 형성율의 감소비율과의 상관성을 관찰하기 위해 혈청 Creatinine 검사치와 억제를 비교하여 보았으나 세포집락 형성이 감소되는 감소율과의 연관성은 인정하기 어려웠는데 Vincent등¹³⁾의 Creatinine치와 세포집락형성의 감소율과는 상관성이 있었다는 보고와는 상반되었다. 이러한 차이점은 본 연구에서 대상으로 한 대부분의 환자가 발병 기간이 1년부터 7년까지 오랜기간이었기 때문에 Creatinine치가 대부분 높은 수치를 정하였기 때문으로 생각된다.

ma/Co ratio와 mi/ma ratio는 증식된 세포집락과 세포군의 구성비율을 나타내는 것으로 각 실험군에 따라 그 구성비의 차이를 알아볼 목적으로 산정하였는데 유의한 차이는 없었고 혈액투석 후의 혈장을 첨가한 실험군이 다른 군에 비하여 높게 나타났으나 특별한 의미를 부여하기는 어려웠다.

한편, Chan등⁹⁾은 사람의 혈장을 생쥐 골수세포에 첨가시켜 배양하는 경우에 혈장의 침전물을 제거하지 않으면 골수세포의 증식을 억제한다고 주장하였다^{2,9)}.

본 실험에서는 혈청내에 존재하고 있는 여러가지 성분들을 변화시키지 않고 관찰하기 위해 혈장을 다시 원심시키지 않고 한번 분리된 혈장을 그대로 사용하였는데 이러한 조작은 Chan등⁹⁾의 보고와 같이 혈장 침전물에 대한 골수세포의 증식이 억제되었다 하더라도 정상 대조군과 동일한 조건으로 시행하였기 때문에 혈장의 침전물이 실험에 미치는 영향을 배제되었다고 생각된다.

골수세포의 생체의 배양에서 형성된 세포집락의 종류는 사람과 생쥐 골수세포와는 차이가 있게 보고되고 있다. Metcalf²⁷⁾는 생쥐 골수세포의 증식은 사람에 비하여 증식속도가 빠르기 때문에 세포집락 수의 산정일은 5일째가 알맞다고 하였으며, Dipersio등³⁰⁾은 생쥐 골수세포의 CFU-GM 배양에서 나타난 세포집락은 대부분이 대식세포라고 하였고 Chervenik등¹⁹⁾은 생쥐는 인체 골수세포의 배양과는 다르게 배양 2~3일째에는 과립구계 세포집락이 7일째는 대부분이 단핵구계 세포집락이었다고 보고하였다. 또한 조등⁸⁾은 정상 골수세포를 이용하

여 CFU-GM 배양을 실시한 결과 배양 7일에는 대부분이 과립구계 세포집락이라고 하였다.

그러나 본 실험성적에서 배양 5일째에 형성되어 있는 세포집락은 과립구계 세포집락과 단핵구계 세포집락이 혼재되었는데 이는 대상세포가 생쥐 골수세포였음을 고려할 때 다른 학자들의 보고와는 차이가 있었으며 이러한 차이점은 몇 가지 가능성을 추측할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 배양방법은 대식세포 조건배지를 골수세포집락 자극인자로한 단층배양으로서 말초혈액 백혈구를 골수세포집락 자극인자로한 중층배양과는 차이가 있었고 배양 당시 첨가한 사람혈장 역시 학자들의 방법과는 다른 점이였다. 이러한 점을 고려한다면 배양 방법의 차이나 사람혈장의 첨가로 인하여 골수세포의 조혈과정이 다소 완만하게 나타나 학자들의 성적과는 다소 차이가 있었을 것으로 생각되었다.

한편 세포집락의 구성세포들을 확인하는 방법을 종래에는 세포집락을 채취하여 도말한 후 Wright 염색을 실시하였으나 한 배양접시 내에 있는 모든 세포집락이나 세포군의 구성세포를 검색하기는 어려웠기 때문에 근래에는 배양접시내의 agar층을 한번에 aceto-orcein 염색을 시행하여 세포집락과 세포군의 구성세포들을 관찰하고 있다. Phillips등³¹⁾은 전 agar층을 α -naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase, Luxol fast blue의 3가지 종류의 효소 염색을 동일한 배양접시 내에서 실시하여 단핵구나 호중구 및 호산구를 선택적으로 확인할 수 있다고 하였는데, 이러한 방법은 현미경 검경시 agar층의 두께에 따른 빛의 투과성 저하 및 골수세포 뿐만 아니라 agar 자체가 염색되어 배경이 깨끗하지 못한 점등으로 본 실험에서 Phillips등³¹⁾의 방법은 이용하기 어려웠다. 이러한 방법에 비하여 Franklin등³²⁾의 방법에 의한 전 agar층을 Epon block을 만들어 제작한 toluidine blue 염색표본은 전 agar층을 Wright 염색이나 효소염색법을 시행할 경우에 나타나는 어려운 문제점들을 다소 해결해 줄 수 있었다. 본 연구에서 배양 5일째에 과립구계 세포집락과 단핵구계 세포집락이 혼재되어 있었던 점은 구성세포를 확인하는 방법에 의한 오류를 생각할 수 있었으나 aceto-orcein 염색과 toluidine blue염색 소견을 종합하고 이를 전자현미경을 이용하여 관찰한 성적이기 때문에 구성세포들을 잘못 판단할 수 있는 오류는 최소화 시킬 수 있었다.

정상혈장 첨가군과 요독혈장 첨가군의 세포집락 및 세

포군 구성세포의 aceto-orcein 및 toluidine blue 염색 소견상 세포군의 구성세포는 대부분이 단일계 골수세포로 구성되어 있으며 중심부 보다는 주변부의 세포들이 더 성숙되었는데 이는 중앙부에 위치하는 집락형성세포에서 분열 증식하면서 주변부로 성숙되어 감을 나타내 주는 소견이라 하겠다. 본 성적에서 전자현미경적 소견상 과립구는 세포질 내에 내부 농도가 높은 호아주르성 과립과 내부농도가 낮은 특이성 과립이 출현하였으며 단핵구는 많은 공포와 소포 및 세포막 돌기를 관찰할 수 있었는데 이러한 소견은 Bainton³³⁾과 Furth³⁴⁾의 성적과 부합되었다. 성숙된 과립구의 세포질 내에는 내형질 세망이 잔존하였고 골수구에 비하여 골지체는 퇴화되었는데 이러한 성적은 Bainton³³⁾이 골수세포는 성숙될수록 세포내 소기관이 점차 퇴화된다는 사실을 참조한다면 일치되는 소견이었다.

골수세포 생체의 배양은 각종 약물이나 인체내에 존재하는 조혈세포의 억제인자들의 연구에 활발히 이용될 수 있으며 Franklin³²⁾의 방법에 따라 전 agar 층을 Epon block으로 만들어 관찰한 세포집락이나 세포군의 toluidine blue 염색소견 또는 이들의 미세구조 소견에 세포집락과 세포군의 구성세포 및 전구세포들 간의 세포반응과 세포집락이나 세포군의 주위 세포간의 관계등을 연구하는데 도움이 될 것으로 사료되었다.

결 론

요독혈장이 골수세포의 CFU-GM 증식능에 미치는 영향을 연구할 목적으로 정상 생쥐 골수세포에 정상혈장과 요독혈장을 각기 첨가시켜 배양한 후 세포집락과 세포대군 및 세포소군 수의 산정과 이들의 구성세포들을 형태학적으로 관찰한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- 1) 요독증 환자 혈장을 첨가한 군은 정상혈장 첨가군에 비해 세포집락의 수가 감소하였다.
- 2) 혈액 투석 전과 후의 혈장 첨가군에서 세포집락과 세포대군 및 세포소군 수의 차이는 관찰되지 않았다.
- 3) 배양 5일째 세포집락은 과립구성 세포집락과 단핵구성 세포집락이 혼재되어 있었다. 전자현미경 소견상 과립구는 세포질내에 내부농도가 높은 호아주르성 과립과 내부농도가 낮은 특이성 과립이 출현하였고 단핵구는 많은 공포와 소포 및 세포막 돌기가 관찰되었다.
- 4) 요독혈장 내에 존재하는 억제인자는 50,000 dalton

이하의 저분자 물질일 것으로 추측되었다.

참 고 문 헌

- 1) Bradley TR, Metcalf D: *The growth of bone marrow cells in vitro.* Aust J Exp Biol Med Sci 44:287, 1966
- 2) Metcalf D: *Hemopoietic colonies in recent results in cancer research.* 61 Springer Verlag New York 1977
- 3) Pike BL, Robinson WA: *Human bone marrow colony growth in agar-gel.* J Cell Physiol 76:77, 1970
- 4) 조현찬, 차영주, 박명희, 김상인 : 조혈세포의 생체의 배양에 관한 연구. 대한혈액학회지 17:101, 1982
- 5) 김상인, 조현찬, 박명희, 조한익, 김의종 : 백혈병 세포 생체의 배양에 관한 연구. 대한의학협회지 25:706, 1982
- 6) 조경삼, 윤취중 : 조혈세포 생체의 배양. 대한혈액학회지 20:81, 1985
- 7) 조현찬, 김상인 : 급성 백혈병 감별 진단을 위한 조혈세포(GM-CFU)의 생체의 배양. 대한의학협회지 27:640, 1984
- 8) 조현찬, 김춘추, 김동집 : 골수세포 배양을 이용한 정상과립구 단구계 전구세포(CFU-GM) 증식능에 관한 연구. 대한혈액학회지 21:23, 1986
- 9) Chan SH, Metcalf D, Stanley ER: *Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation in vitro by bone marrow cells.* Br J Hematol 20:329, 1971
- 10) Foster RD, Metcalf D, Robinson WA, Bradley TR: *Bone Marrow colony stimulating factor by human macrophages.* Lancet 30:1397, 1972
- 11) Metcalf D, Wahren B: *Bone marrow colony stimulating activity of sera in infectious mononucleosis.* Br Med J 3:99, 1968
- 12) Jacobs C, Brunner SP, Chandler C, et al: *Combined report on regular dialysis and transplantation in Europe.* Proc Eur Dial Transpl Ass 14:3, 1977
- 13) Vincent PC, Sutherland R, Morris TCM, Chapman GV: *Inhibitor of in vitro granulopoiesis in plasma of patients with renal failure.* Lancet 21:864, 1978
- 14) Reynolds ES: *The use of lead citrate at high pH as an electron opaques stain in electron microscopy.* J Cell Biol 17:208, 1963
- 15) Norusis MJ: *Statistical package for socialences.* SPSS Inc. III, B 116, 1986

- 16) **Eliason JF:** *Studies on the role of serum in long-term bone marrow cell cultures. Exp. Hematol.*, 11: 98, 1983
- 17) **Honn KV, Singley JA, Chavin W:** *Fetal bovine serum; A multiple standard. Proc Soc Exp Biol Med* 149:344, 1975
- 18) **Stanley ER, Metcalf D:** *Partial purification and some properties of the factor in normal and leukemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci* 47:467, 1969
- 19) **Chervenick PA, Boggs DR:** *Bone marrow colonies. Stimulation in vitro by supernatant from incubated human blood cells. Science* 169:691, 1980
- 20) **Abdou NI, Verdirame JD, Amare M, Abdou NL:** *Heterogeneity of pathogenetic mechanisms in aplastic anemia: Efficacy of therapy based on in vitro. Ann Intern Med* 95:43, 1981
- 21) **Bagby GC, Lawrence HJ, Herrhout RC:** *T-lymphocyte mediated granulopoietic failure; in vitro identification of prednisolone-responsive patients. N Engl J Med* 309:1973, 1983
- 22) **Bacigalupo A, Podesta M, Van Lint MT, Vimercati R, Cerri R, et al:** *Severe aplastic anemia; Correlation of in vitro tests with clinical response to immunosuppression in 20 patients. Br J Hematol* 49:423, 1981
- 23) **Buregess AW, Metcalf D:** *The nature and actions of granulocyte and macrophage colony stimulating factors. Blood* 56:947, 1980
- 24) **Quesenberry P, et al:** *Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony stimulating factor. N Engl J Med* 286:227, 1972
- 25) **Golds DW, Cline MJ, Finley TN:** *Production of colony-stimulating factor by human macrophages Lancet* 30:1397, 1972
- 26) **Moore RT, Hoffeld JT, Farrar JJ, Mergenhagen SE, Dppenheim JJ, Shadduck RK:** *Role of colony stimulating factors as primary regulators of macrophage function. Lymphokine Academic Press* 119, 1981
- 27) **Metcalf D:** *Detection and analysis of human granulocyte, monocyte precursors using semisolid cultures. Clin Hematol* 8:263, 1979
- 28) **Stuart AE, Habeshaw JA, Davidson AE:** *Phagocytes in vitro: Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific* 31:1, 1971
- 29) **Sevitt LH, Hoffbrand AW:** *Serum folate and vitamin B₁₂ levels in acute and chronic renal disease; Effect of peritoneal dialysis. Br Med J* 2:18, 1969
- 30) **Dipersio JF, Brennan JK, Lichtman, Speiser BL:** *Human cell lines that elaborate colony-stimulating activity of the marrow cells of man and other species. Blood* 51:507, 1978
- 31) **Phillips PG, Chikkappa G, Brinson PS:** *A triple stain technique to evaluate monocyte, neutrophil and eosinophil proliferation in soft agar cultures. Exp Hematol* 11:10, 1983
- 32) **Franklin DZ, Grusky G:** *Ultrastructural analysis of hematopoietic colonies derived from human peripheral blood. J Cell Biol* 63:855, 1974
- 33) **Bainton DF, Farguhar MG:** *Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. J Cell Biol* 28:277, 1966
- 34) **Von Furth RV, Hirsch JG, Fedorto, ME:** *Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophages. J Exp Med* 132:794, 1970

— Abstract —

The Effect of Uremic Plasma on the Proliferative Activity of CFU-GM in in-vitro Culture of Mouse Bone Marrow

Chang-Soo Park, M.D. and Joo-Yong Yoo, M.D.

*Department of Pathology, College of Medicine
Chonnam University*

The increased susceptibility in patients of chronic renal failure to infection has been reported to be attributed to defects in granulocyte and lymphocyte function and proliferative activity of hematopoietic cells. The definite cause of the frequent infection in uremic patients, however, is still controversial. The effect of uremic plasma on the aspect of the hematopoietic cells has been scarcely been studied.

In the present study, mouse bone marrow was cultured with uremic plasma, to evaluate the effect of uremic plasma on the proliferative activity and morphological features of CFU-GM.

The results obtained were as follows.

- 1) The number of colonies in group co-cultured with uremic plasma was more reduced than that of normal plasma group.
- 2) There was no difference between the group cul-

tured with predialytic uremic plasma and that of post-dialytic plasma in number of colonies, macroclusters and microclusters.

3) The forms of colony were granulocytic and monocytic forms at 5 day of culture. Electron microscopically, granulocytes disclosed electron dense azurophilic granules and electrolucent specific granules in the cytoplasm, and monocyte showed numerous vesicles and vacuoles in the cytoplasm which had finger-like projec-

tions.

4) The molecular weight of inhibitory factor in the uremic plasma was supposed to be less than 50,000 daltons.

Key Words: CFU-GM (colony forming unit-granulocyte and monocyte), granulocyte, monocyte, uremic plasma