

Cyclophosphamide가 흰쥐 골수의 기질세포에서 Laminin-1의 발현에 미치는 영향

이창훈, 정호삼*, 백두진, 황세진, 김원규, 윤지희, 김종관¹
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ¹성균관대학교 의과대학 정형외과학교실

Laminin-1 Expression in Bone Marrow Stromal Cells of Cyclophosphamide-treated Rat

Chang-Hun Lee, Ho-Sam Chung*, Doo Jin Paik, Se Jin Hwang,
Won Kyu Kim, Jeehee Youn and Chong-Kwan Kim¹

Department of Anatomy & Cell Biology, Hanyang University,

¹Department Orthopedic surgery, College of Medicine Sungkyunkwan University

(Received November 28, 2002; Accepted December 10, 2002)

ABSTRACT

The purpose of the present study is to investigate whether stromal cells supporting specific microenvironment for hematopoiesis of bone marrow are affected by toxicants and therapeutic drugs such as antibiotics and anticancer drugs and whether laminin 1 is associated with such effects. SD rats were intraperitoneally injected with 75 mg/kg of cyclophosphamide which is widely used to treat infant's solid tumor, leukemia and myeloma and sacrificed after 3 days, 1 week, 3 weeks or 5 weeks of injection. The bone marrow extracted and paraffin sectioned was analyzed using immunohistochemical staining. A part of tissues was subjected to electron microscopy following reaction with rabbit anti laminin antibody, biotinylated goat anti rabbit IgG conjugated with 12 nm gold particles, and staining with uranyl acetate.

1. The bone marrow tissue at day 3 post injection with cyclophosphamide displayed dilated venous sinus, partial necrotic death, and decreased number of hematopoietic cells. Laminin 1 was intensively stained in the reticular and adipose tissues.

2. Up to 5 weeks post injection, laminin 1 was stained at a low level in the stromal tissue of bone marrow and the number of hematopoietic cell was increased.

3. Deposition of the gold particle which represents laminin 1 expression was observed at the highest level in the stromal cells of bone marrow obtained 3 days after injection, and decreased after 1 to 5 weeks.

These results suggest that stromal cells which play a role in supporting microenvironment for bone marrow hematopoiesis augment induction of laminin 1 expression and activation upon administration of cyclophosphamide.

Key words : Bone marrow, Cyclophosphamide, Immunogold, Laminin

* Correspondence should be addressed to Dr. Ho-Sam Chung, Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, 17 Haendang-Dong, Sungdong-Ku, Seoul, 133-791 Korea. Ph.: 02-2290-8196, FAX: 02-2281-7841, E-mail: Junghs@hanyang.ac.kr
Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

골수에서 기질조직은 조혈세포의 증식, 분화 및 이동을 조절하는 주요한 역할을 한다 (Dexter et al., 1990; Dorshkind et al., 1990; Clark et al., 1995). 조혈과정에 영향을 미치는 골수조직은 조혈세포, 기질세포 및 세포외기질로 이루어져 있으며, 세포외기질은 조혈세포가 아닌 기질세포 (stroma cell)가 분비한다 (Verfaillie et al., 1994; Klein 1995). 세포외기질은 glycoproteins, proteoglycans 및 교원질 등으로 구성되어 있고 조혈모세포들 (hematopoietic progenitor cells)의 세포접착 (cell adhesion)과 성숙조혈세포 등을 조절하는데 직접적으로 관련되어 있다고 하였다 (Klein et al., 1995; Fernandez et al., 1996; Klein et al., 1997; Whitton et al., 1998; Seiffert et al., 1998).

Zuckerman et al. (1983)은 murine 골수배양실험에서 골수의 미세환경에서 혈구형성세포의 분화는 기질세포의 laminins 형성과 관계가 있다고 하였다. Gu et al. (1999)은 최근의 연구에서 생쥐와 흰쥐의 골수에서 laminin 동형체는 laminin-2, laminin-8, laminin-10 등이고 laminin-1은 아니라고 하였다. Vogel et al. (1999)은 사람의 골수에서 흰쥐에서 발견되지 않는 $\beta 2$ chain을 추적해 냈으나, laminin의 정체는 아직 추적하지 못하고 있다. Laminin-1은 조혈세포의 접착과 관계가 없다는 보고가 있으며 (Giancotti et al., 1986; Koenigsmann et al., 1992; Uchiyama 1992), laminin-10/11이 mouse 및 사람의 혈구형성세포에서 강력한 접착을 일으킨다고 하였다 (Gu et al., 1999; Kibler et al., 1998).

Siler et al. (2000)은 사람의 골수조직내 ECM에서 조혈세포의 증식과 접착에 관련이 있는 11종의 laminin을 추적하였다고 하였고, Northern blot, immunoblot 등의 방법으로 사람 골수의 기질세포에서 laminin-8/9 및 laminin-10/11이 형성된다고 했으며, laminin-1과 laminin-2/4는 조혈세포군에서 접착작용이 없거나 아주 약하다고 하였다.

많은 학자들은 생체외실험을 통하여 수종의 혈구세포들이 laminins와 상호작용을 한다고 주장한 바

있다. 성숙과립백혈구, 림프구, 단핵식세포, 활성큰포식세포, 호산성백혈구 등은 모두 laminins와 접촉된다고 발표된 바 있다 (Kuwabara, 1996; Helmer & Lobb, 1995; Bavois et al., 1996; Shaw et al., 1990; Georas et al., 1993). Tourkin et al. (1993)은 laminin이 호산성백혈구의 성숙과 생존에 영향을 미치며, Shaw et al. (1990)은 큰포식세포의 증식에도 laminin이 관여하고, Schimizu et al. (1990)은 CD3-mediated T-cell의 증식을 laminin이 촉진시킨다고 하였다. 그러나 Verfaillie et al. (1992)은 laminin-1은 골수전구체세포의 접착에 관여되지 않는다고 하였고, 만성골수성 백혈병에서 악성전구체세포가 laminin-1에 의해 접착되어 있다고 하였다. Becker et al. (1996)은 laminins이 all-trans retinoic acid와 함께 promyelocytic leukemia cell의 분화를 촉진시킨다고 보고하였다. 따라서 골수에서 laminin isoforms의 일부 종류는 혈구형성세포들의 접착작용에 관련이 있을 것으로 학자들은 예측하였다. Gu et al. (1999)은 laminin은 여러 종류의 세포의 기능과 형태를 나타내는데 영향을 주는 세포외기질의 당단백질이라고 하였고, in vitro에서 laminin들은 성숙혈구(말초혈구)와 악성혈구형성세포와 상호작용을 한다고 하였으나, laminin-1에 관한 많은 연구에도 불구하고 골수에서의 발현은 분명하지 못하다고 하였다.

최근에는 골수의 조혈작용과 밀접한 관련이 있는 기질세포의 역할에 대한 연구가 진행되고 있다. 기질세포는 골수의 미세환경 (bone marrow microenvironment)과 혈구형성 줄기세포 (hematopoietic stem cell) 사이에 세포외기질을 조성하여 세포접착, 다양한 cytokine의 유지 및 결합, 세포의 성장조정 등을 한다고 하였으며 (Klein, 1995; Wilkins & Jones, 1995; Gronthos et al., 2001), 특히 Gronthos et al. (2001)은 최근 사람의 골수 연구에서 골수기질세포와 세포외기질 사이에 확실한 상호작용이 있으나 기질세포의 발생은 확실하지 않다고 하였다.

저자는 흰쥐에 cyclophosphamide를 투여하였을 때 골수조직내 혈구형성의 미세환경조성에 중요한 요소인 laminin-1 분포 양상을 관찰하고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

본 실험에서는 250-300 g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험동물로 사용하였다. 실험군은 cyclophosphamide (Sigma, USA)를 체중 kg당 75 mg되게 증류수에 녹여 복강내로 1회 주사하였고, 주사후 3일, 1주, 3주 및 5주 경과후 흰쥐를 희생시켜 넵다리뼈를 절취하여 골수를 얻었다. Cyclophosphamide의 주사 후 경과한 시간에 따라 3일군, 1주군, 3주군, 5주군으로 나누고 각군에 5마리의 흰쥐를 배정하였다. 대조군은 증류수만을 복강내 주사하여 3일 경과후 희생시켜 넵다리뼈에서 골수를 얻었다.

2) 실험방법

(1) Immunohistochemistry

흰쥐의 골수내 laminin의 분포, 합성 및 분비정도를 관찰하기 위하여 각군의 골수조직을 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 고정시킨 후 6 μ m의 파라핀 절편을 제작하고 면역반응염색을 시행하였다. 탈파라핀 및 함수 과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS)용액에 세척하고 2-3% H₂O₂ methanol 용액에 5분간 반응시킨 다음 PBS로 세척 후 proteinase K (DAKO Co., USA)액에 37°C에서 15분간 적용하였다. 일차항체는 rabbit anti-laminin (Sigma Co., USA)을 1:30으로 희석하여 37°C에서 90분간 반응시켰으며, PBS로 세척하고 이차항체 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector lab. USA)로 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 이어서 ABC kit (avidin-biotin complex, Vector Lab. USA)로 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 발색은 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)를 이용하였으며, 1% methyl green으로 대조염색 후 탈수, 청명 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. 면역조직반응이 확실한지 여부를 확인하기 위해 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다.

(2) Immunogold Method in Electron Microscopy

면역도금법을 이용하여 골수내 세포 및 세포외기

질에서 laminin-1과 결합반응한 금과립을 전자현미경적 검색을 위하여 절취한 조직을 caccodylate buffer를 사용하여 제조한 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde-3% sucrose 혼합액 (pH 7.4)에 상온에서 3시간 가량 고정 시킨 후 수세, 탈수 과정을 거쳐 경도 (hard) 굳기의 LR white (London Resin White Co., UK)에 포매하고 열중합과정을 거쳐 초박절편기로 약 800 Å 두께의 절편을 제작하고 염색하였다. 1% bovine serum albumin이 들어있는 Tris-buffer로 특이 반응을 억제하였으며, 일차항체는 면역조직화학적 검색에서 사용한 rabbit anti-laminin antibody를 20배 희석하여 사용하였고 2차 항체는 직경 12 nm의 금과립자 (gold particle)가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc. USA)를 20배 희석하여 사용하였다. 2% uranyl acetate로 15분간 대조염색을 한 후 Hitach 600 (Japan) 투과전자현미경으로 가속전압 800 Kv에서 관찰하였다. 면역도금법의 특이성을 검증하기 위해 일부 조직은 일차항체 없이 이차항체만을 사용하여 반응시키고 동일한 염색을 시행하여 관찰하였다.

결 과

1. 면역조직화학염색조건

Cyclophosphamide를 투여하지 않은 정상대조군의 골수조직은 laminin-1에 대한 반응이 미약하게 관찰되었다. 특히 지방조직주변의 세포외기질과 혈구형성세포 사이에서 발현을 인지할 수 있었다 (Figs. 1, 2).

Cyclophosphamide 투여 3일군의 흰쥐 골수조직은 위축되고 파손되었으며, 위축된 망상조직, 정맥동 (venous sinus) 주위 및 지방조직 주위 등에 laminin-1의 면역반응이 강하게 나타났으며 혈구형성세포도 현저하게 감소되었고 피사된 조직의 잔여체가 곳곳에 관찰되었다 (Fig. 3). Cyclophosphamide 투여후 1주일 경과군 (1주군)의 골수조직에서 혈구형성세포의 수는 회복되었고 세포외기질과 지방조직사이에 중등도의 laminin-1 면역반응이 관찰되었다 (Fig. 4). Cyclophosphamide 투여후 3주 및 5주 경과군 (3주군 및 5주군)의 골수조직은 점차 정상적인 구조로 환원되었

으며, 세포외기질에 약한 laminin-1 면역반응이 관찰되었다(Figs. 5, 6).

2. 면역금과립 전자현미경 소견

대조군 흰쥐의 골수조직내 망상세포의 세포질돌기(Re)와 섬유모세포(Fa)에 소량의 금과립이 관찰되었다(Figs. 7, 8). Cyclophosphamide 투여 3일군의 흰쥐 골수내 망상세포의 세포질돌기(Re)에 다량의 금과립이 관찰되었고, 섬유모세포(Fa)에서도 금과립이 증가되었다(Figs. 9, 10). Cyclophosphamide 투여후 1주 경과군의 흰쥐 골수조직내 망상세포(Re)와 혈관주위세포(Rou)내 금과립의 함량은 3일군의 것에 비해 감소되어 나타났다(Fig. 11). 3주군의 흰쥐 골수조직내 망상세포(Re)에서는 소량의 금과립이 관찰되었다(Fig. 12). Cyclophosphamide 투여후 5주 경과군(5주군)에서 골수의 섬유모세포(Fa)와 혈관주위세포(Rou)에서 금과립은 소량 관찰되었다(Figs. 13, 14).

고 찰

Compbell & Wicha(1988)는 정상적인 혈구형성은 혈구줄기세포와 주위의 미세환경에 의해서 좌우된다고 주장하였고, 그 미세환경은 growth factor, 기질세포와 세포외기질이라고 하였다. 미세환경은 줄기세포의 증식과 분화에 깊이 관여한다고 Wolf(1979)와 Dexter(1982)도 주장한 바 있다. Dexter et al.(1973)과 Dexter et al.(1977)은 혈구형성의 미세환경요소로 기질세포의 역할을 강조한 바 있는데 골수내 기질세포는 큰포식세포, 세망세포, 지방세포, 내피세포 및 섬유모세포 등이라고 주장한 바 있다. Allen & Dexter(1983)은 in vitro 골수배양에서 큰포식세포가 발생중인 적혈구모세포와 접촉되어 있다고 했고, Weiss(1976)와 Ben-Iskay & Yoffey(1972)는 흰쥐의 골수에서 적혈구형성에 큰포식세포가 역할을 한다고 주장한 바 있다. Westen & Bainton(1979)은 망상세포가 골수조직의 혈관 외막(adventitia) 주변에 세포질돌기를 뻗어 발생중인 과립구(developing granulocytic cells)와 접촉되어 혈구발생에 영향을 미친다고 주장하였다. 기질세포외에도 지방세포(Dexter et al., 1984),

내피세포(Zuckerman & Wicha, 1983) 등도 혈구발생에 주요한 역할을 한다는 보고가 있다. 많은 학자들은 골수내 혈구형성의 주요 미세환경요소는 세포외기질이라고 주장하였다. 세포외기질은 아교, 거대분자인 proteoglycans 및 당단백질이라 했으며, Yoon et al.(1987)은 혈관의 내피하조직에 분포되어 있는 laminin이 중성백혈구의 표면과 68-kDa cell-surface receptor를 통해 접착되며 과립백혈구가 활성화되면 떨어져 나간다고 했으며 과립백혈구와 세포외기질 사이의 접착상호작용은 골수의 미세환경 안에서 과립구형성에 주요한 역할이 될 것으로 생각한다고 보고한 바 있다. Owen(1988)은 기질줄기세포(stromal stem cells)가 골수와 뼈기질표면에 분포되어 여러 방향의 세포성장줄기세포(cell lines)로 형성되어 섬유모세포, 망상세포, 지방세포 및 뼈세포로 분산되어 기질세포가 된다고 보고한 바 있다. Vituri et al.(1999)은 단백질결핍 먹이로 사육한 mouse에서 골수 세포외기질의 당단백에 미치는 영향을 연구한 결과 대조군과 비교하여 골수의 세포외기질내 fibronectin이 1.6배, laminin은 4.8배 추출할 수 있었다고 하였으며, 이러한 결과는 영양부족 mouse에서 조혈과 조혈미세환경 세포외기질의 변화와 관련이 있다고 주장하였다. Montuori et al.(1999)은 골수내 백혈병세포의 증식, 이동 및 정지 등은 골수의 세포외 물질인 fibronectin과 laminin이 이들세포에 접착함으로써 시작된다고 하였다. 67-kDa laminin receptor는 laminin에 친화성이 높은 integrin이 아닌 단백질로 기저막을 통한 암세포의 침습과 전이에 주요한 역할을 한다고 하였다. 그러나 정상 골수조직의 혈구세포에서는 추적하지 못했다고 하였다.

Gu et al.(1999)은 laminin은 성숙혈구와 약성혈구형성세포와 상호작용을 하며, 혈구의 기능과 형태에 영향을 미치는 세포외기질의 당단백이라고 주장했고, 많은 학자들은 골수조직에서 laminin-1의 추적을 계속해 왔으나 그 발현이 분명치 않다고 하였다. 이들은 대부분의 laminin isoform과 반응하는 antiserum을 사용하여 mouse 골수내 laminin을 추적한 결과 laminin $\alpha 1$ chain을 발견하지 못하였고, laminin $\alpha 2$, $\alpha 4$ 및 $\alpha 5$ polypeptides chain의 발현을 관찰하였다고 주장하였다. 그러나 laminin-2 ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$), laminin-8 ($\alpha 4$,

$\beta 1$, $\gamma 1$) 및 laminin-10 ($\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$)은 골수에서 발현을 발견하였다고 하였다. Long-term bone marrow 배양에서 laminin $\alpha 1$ 발현을 northern blot analysis로 추적했으나 혈구형성세포를 강력하게 접착시키는 laminin chain을 laminin $\alpha 5$ chain을 포함한 laminin-10, laminin-11이라고 보고하였다.

Nilsson et al. (1998)은 혈구줄기세포가 골수내로 유입되는 기작은 골수의 미세환경내 이질세포를 인지하고 조정하는 미세분자의 상호작용과 관계가 있다고 하였고 세포외기질내의 fibronectin 등과 laminin의 분포 등을 분석하였다. Laminin은 골수의 혈관과 골외막등에 분포되어 있었으며 아교질 등과 같이 존재한다고 하였다. Chichester et al. (1993)은 murine의 골수에서 혈구전구체세포와 기질세포의 상호작용은 기질세포가 분비하는 세포외기질에 의해서 조정된다고 하였다. 세포외기질 구성성분의 생성과 관련된 단백질의 유전자의 발현을 연구한 결과 fibronectin과 laminin도 collagen I, III, IV, V 및 VI와 동일하게 관여한다고 주장하였으나 mRNA transcripts는 골수내 섬유모세포 보다 높게 측정되었다고 하였다. Becker et al. (1996)은 all-trans retinoic acid를 주사하면 laminin은 promyelocytic leukemia cell line의 분화를 증가시킨다고 하였으며 integrin $\alpha 3$ 와 $\alpha 6$ 의 subunit에 의해서 malignant plasma cell lines의 주화성을 증진시킨다고 주장하였다. Guest & Uetrecht (2000)는 조혈세포가 증식이 활발할 때는 독성물질에 매우 약하다고 하였다. 골수세포의 병인과 병리는 잘 알려져 있지 않았으나, 지금까지 약제에 의한 골수의 독성은 기질세포와 세포외기질의 특수한 부분에 대한 손상이라고 하였고, 골수의 기질세포에 직접적으로 독성을 야기시키는 물질은 benzene이 있으며, BCNU, cyclophosphamide, doxorubicin 및 methotrexate 등이 골수의 기질에 영향을 미친다고 하였다. 조혈작용에서 기질층(stromal layer)의 역할에 대한 연구는 1990년대 초기부터 계속 연구되어 오고 있으나 약물투여에 대한 병리적 현상은 아직 확실히 밝히지 못하고 있으며, 조혈세포와 실질세포의 상호작용은 정상적인 세포 분화의 핵심이라고 하였다. Hoagland (1992)는 대부분의 항암제가 골수독성을 유발하고 골수의 기능억제를 일으키는데에 약의 종류에 따라 차이가 있

며, 항암제에 의한 myelosuppression 기간은 수일에서 수주에 이르고, 회복은 수주 및 수개월에 걸쳐 일어난다고 했으나 그 기작에 대한 연구는 거의 없다고 하였다.

이상의 여러 연구자들은 골수내에서 laminin-1과 골수의 기질세포가 분비하는 세포외기질이 혈구형성에 관여하는지 여부에 대한 확실한 결론을 내리지는 못했으나 laminin이 조혈과 관련 있고, isoform 중 laminin-10, 11이 가장 밀접한 관련이 있다고 보여주고 있다. 세포외기질과 실질세포와의 상호관계에 laminin-1이 조혈작용에 보조 역할을 하고 있는 것 같다.

본 연구에서 cyclophosphamide를 흰쥐에 투여한 후 골수내 기질세포인 망상세포, 섬유모세포, 혈관주위세포의 laminin-1 면역반응이 높아지는 것은 이들 세포가 세포외기질을 분비한다는 것을 감안하면 laminin-1이 골수내 조혈과정 영향을 주는 것으로 생각할 수 있었다.

Sharkis et al. (1980)은 cyclophosphamide와 활동작용이 같은 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC)는 소아의 충실성종양, lymphoma 및 leukemia의 치료에 사용되는 alkylating agents로 골수를 파괴 및 감소시키고 원시전구체세포를 괴사시킨다고 하였다. Fried et al. (1977)은 mouse에 cyclophosphamide를 5 mg/kg를 1회 투여할 경우 24시간 후 골수의 기질 기능이 50% 이상 저하되고 6주가 지나도 쉽게 회복되지 않았다고 했으며 5 mg/week (3 doses)을 투여하면 골수 기질의 기능은 정상 수준의 10~20%로 저하된다고 하였다.

Xu et al. (1986)은 mouse에 cyclophosphamide 225 mg/kg를 21일내 네번 투여한 결과, 골수의 기질세포 전구체, CFU-F (colonyforming unit-fibroblast)가 67%로 감소하며, Kalechman et al. (1993)은 mouse의 장기골수배양에서 cyclophosphamide를 1회 250 mg/kg를 투여한 결과 CFU-F와 CSF (colony stimulating factor)의 생성이 뚜렷이 억제되었다고 하였다.

이상과 같이 cyclophosphamide의 골수 독성에 대한 연구는 골수의 기질세포에 대해서 초점을 맞추고 있으며 기질세포와 혈구형성세포의 상호작용에 영향을 미칠 것으로 예상되는 세포외기질에 대한 cyclo-

phosphamide 독성에 대한 연구는 거의 없었다.

Hoyt & Lazo (1990)는 mouse에 bleomycin (100 mg/kg)을 피하주사한 결과 C57B1/6N mouse에서 폐섬유화가 일어났으나 BALB/cN mouse에서는 발생되지 않았고, cyclophosphamide는 BACB/cN mouse에서 폐섬유화를 일으켰으나 C57 B1/6N mouse에는 폐섬유화를 일으키지 않았다고 하였다. Cyclophosphamide는 기저막의 주요요소인 laminin, type IV collagen의 mRNA 발현을 mouse 폐에서 유도한다고 보고하였으며, bleomycin은 폐내 laminin A, B1, B2의 증가없이 $\alpha 2$ IV procollagen mRNA/poly(AT) RNA를 증가시키고, cyclophosphamide는 $\alpha 1$ IV와 $\alpha 2$ IV procollagen mRNA와 poly(A+) RNA를 BALB/cN mouse에서 두 배 증가시킨다고 하였다. Di Leo et al. (1995)은 난소암환자에게 cis-platinum을 투여하여 laminin receptor 발현여부를 측정한 결과 cis-platinum의 치료효과가 높은 환자에서 77% 발현이 있었고 치료효과가 낮은 환자에서는 39%였다고 하였다.

이상과 같이 학자들은 cyclophosphamide가 항암제로 사용될 경우 laminin 또는 laminin receptor의 활성을 증진시키는 등 laminin의 접착 활동을 증가시킨다고 암시하고 있다.

저자는 본 연구에서 흰쥐에 cyclophosphamide를 투여했을 경우 골수내 기질세포중에 망상세포, 섬유모세포 및 혈관주위세포에서 laminin-1의 반응을 나타내는 금과립의 증가는 기질세포들의 독성물질에 대한 방어작용을 나타내는 것이라고 생각되었다.

참 고 문 헌

Allen TD, Dexter TM : Long term bone marrow cultures: an ultrastructural review. In: Johari O, ed. Scanning electron microscopy, vol IV. Chicago: SEM Inc., 1851, 1983.

Bavois B, VanWeyenbergh J, Rouillard D, Wietzerbin J : TGF $\beta 1$ stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN γ : Dependence of $\alpha 5\beta 1$ and $\beta 2$ integrins. *Exp Cell Res* 222 : 209, 1996.

Becker PS, Li Z, Potselueva T, Madri JA, Newburger PE, Berliner N: Laminin promotes differentiation of NB4

promyelocytic leukemia cells with all trans retinoic acid. *Blood* 88 : 261, 1996.

Ben Iskay Z, Yoffey JM: Ultrastructural studies of erythroblastic islands of rat bone marrow. II. The resumption of erythropoiesis in erythropoietically depressed rebound marrow. *Lab Invest* 26 : 637-647, 1972.

Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ: Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1(2) : 93-99, 1993.

Clark BR, Keating A: Biology of bone marrow stroma. *Ann NY Acad Sci* 770 : 70-78, 1995.

Compbell AD, Wicha MS: Extracellular matrix and the hematopoietic microenvironment. *J Lab Clin Med* 112 : 140-146, 1988.

Dexter TM, Allen D, Lajtha LG, Schofield R, Lord SI: Stimulation of differentiation and proliferation of hematopoietic cells in vitro. *J Cell Physiol* 83 : 461-474, 1973.

Dexter TM, Coutinho LH, Spooncer E, et al.: Stromal cells in haemopoiesis. *Ciba Found Symp*. 148 : 76-95, 1990.

Dexter TM, Moore MAS, Sheridan APC: Maintenance of hematopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J Exp Med* 145 : 1612-1616, 1977.

Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, allen TD: Long term marrow culture: an overview of techniques and experience. In: Wright DG, Greenberger JS, eds. Long term bone marrow culture. New York: Alan R. Liss Publishers, 57-96, 1984.

Dexter TM: Stromal cell associated hemopoiesis. *J Cell Physiol* 1 : 87-94, 1982.

Di Leo A, Bajetta E, Biganzoli L, Bohm S, Mariani L, Menard S, Pilotti S, Fabbiani M, Gebbia V, Oriana S, et al.: An I.T.M.O. group study on second line treatment in advanced epithelial ovarian cancer: an attempt to identify clinical and biological factors determining prognosis. *Eur J Cancer* 31A : 2248-2254, 1995.

Dorshkind K: Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8 : 111-137, 1990.

Fernandez M, Minguell JJ: Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* 212 : 313-323, 1996.

- Fried W, Kedo A, Barone J: Effects of cyclophosphamide and of busulfan on spleen colony forming units and on hematopoietic stroma. *Cancer Res* 37:1205-1209, 1977.
- Georas SN, McIntyre BW, Ebisawa M, Bednarczyk JL, Sterbinsky SA, Schleimer RP, bochner BS: Expression of a functional laminin receptor ($\alpha 6 \beta 1$, very late activation antigen 6) on human eosinophils. *Blood* 82:2872, 1993.
- Giancotti FG, Comoglio PM, Tarone G: Fibronectin plasma membrane interaction in the adhesion of hemopoietic cells. *J Cell Biol* 103:429-437, 1986.
- Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG: Integrin mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181, 2001.
- Gu Y, Sorokin L, Durbeek J, Hjalte T, Jonsson JI, Ekblom M: Characterization of bone marrow laminins and identification of $\alpha 5$ containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP Mix cells. *Blood* 15:93(8):2533-2542, 1999.
- Guest I, Uetrecht J: Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells. *Immunopharmacology* 46(2):103-112, 2000.
- Hemler ME, Lobb RR: The leukocyte beta 1 integrins. *Curr Opin Hematol* 2:61, 1995.
- Hoagland HC: Hematologic complications of cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 9:95-102, 1992.
- Hoyt DG, Lazo JS: Bleomycin and cyclophosphamide increase pulmonary type IV procollagen mRNA in mice. *Am J Physiol* 259:L47-52, 1990.
- Kalechman Y, Sotnik Barkai L, Albeck M, Sredni B: Protection of bone marrow stromal cells from toxic effects of cyclophosphamide in vivo and of ASTA 27557 and etoposide in vitro by ammonium trichloro (dioxethylene $\alpha \alpha$) tellurate (AS101). *Cancer Res* 53:1838-1844, 1993.
- Kibler C, Schermtzki F, Waller HD, Timpl R, Muller CA, Klein G: Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules. *Cell Arches commun.* 5:307-323, 1998.
- Klein G: The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 29:914-926, 1995.
- Klein G, Kibler C, Schermtzki F, Brown J, Muller CA, Timpl R: Cell binding properties of collagen type XIV for hematopoietic cells. *Matrix Biol* 16:307-317, 1997.
- Klein G, Muller CA, Tillet E, Chu ML, Timpl R: Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* 86:1740-1748, 1995.
- Koenigsmann M, Griffin JD, DiCarlo J, Cannistra SA: Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood* 79:657-665, 1992.
- Kuwabara I, Liu FT: Galectin 3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 156:3939, 1996.
- Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, Rotoli B, Rossi G: Expression of the 67 kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res* 5(6):1465-1472, 1999.
- Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS: Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem* 46(3):371-377, 1998.
- Owen M: Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:63-76, 1988.
- Schimizu Y, Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S: Costimulation of proliferative responses of resting CD41 T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol* 145:59, 1990.
- Seiffert M, Beck SC, Schermtzki F, Muller CA, Erickson HP, Klein G: Mitogenic and adhesive effects of tenascin C on human hematopoietic cells are mediated by various functional domains. *Matrix Biol* 17:47-63, 1998.
- Sharkis SJ, Santos GW, Colvin M: Elimination of acute myelogenous leukemic cells from marrow and tumor suspensions in the rat with 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Blood* 55:521-523, 1980.
- Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM: The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. *J Cell Biol* 110:2167, 1990.
- Siler U, Seiffert M, Puch S, Richards A, Tork Storb B, Muller CA, Sorokin L, Klein G: Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* 15:96(13):4194-4203, 2000.
- Tourkin A, Anderson T, LeRoy CE, Hoffman S: Eosinophil adhesion and maturation is modulated by laminin. *Cell Adhes Commun* 1:161, 1993.
- Uchiyama H, Barut BA, Chauhan D, Cannistra SA, Anderson

- KC: Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* 80 : 2306-2314, 1992.
- Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R, McCarthy JB: Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 16 : 201-224, 1994.
- Vituri CL, Alvarez Silva M, Trentin AG, Borelli P : Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res* 33(8) : 889-895, 2000.
- Vogel W, Kanz L, Brugger W, Berndt A, Kosmehl H: Expression of laminin beta2 chain in normal human bone marrow. *Blood* 1 : 94(3) : 1143-1145, 1999.
- Weiss L : The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 186 : 161-184, 1976.
- Westen H, Bainton DF: Association of alkaline phosphatase positive reticular cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J Exp Med* 150 : 919-937, 1979.
- Whitton AD, Spooner E: Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 10 : 721-726, 1998.
- Wilkins BS, Jones DE: Vascular networks within the stroma of human long term bone marrow cultures. *J Pathol* 177 : 295-301, 1995.
- Wolf N: The hematopoietic microenvironment. *Clinics in Hematology* 8 : 469-500, 1979.
- Xu CX, Molineux G, Testa NG, Hendry JH: Longterm damage to haemopoietic cell subpopulations in mice after repeated treatment with BCNU or cyclophosphamide. *Br J Cancer* 53 : 174-176, 1986.
- Yoon PS, Boxer LA, Mayo LA, Yang AY, Wicha MS: Human neutrophil laminin receptors : activation dependent receptor expression. *J Immunol* 138 : 259-265, 1987.
- Zuckerman KS, Wicha M: Extracellular matrix production by the adherent cells of long term murine bone marrow cultures. *Blood* 61 : 540, 1983.

< 국문초록 >

골수내 정상적인 혈구형성은 줄기세포와 주위의 미세환경 사이에 일어나는 상호작용에 의해서 좌우된다고

알려져 있다. 이에 미세환경은 성장요소, 기질세포 및 기질세포가 분비한 세포외기질의 복잡한 망상구조로 이루어져 있다. 골수의 세포외기질은 거대분자로 구성되어 있으며 이중 구성요소의 일부인 당단백이 혈구형성의 조절에 주요한 요소가 된다고 많은 학자들이 주장해 왔다.

골수의 기질을 이루고 있는 망상세포, 지방세포, 섬유모세포, 혈관내피세포 및 혈관주위세포 등이 분비하는 세포외기질에 여러종류의 laminin 동형체가 함유되어 있으며 여러 종류의 혈구형성에 주요한 역할을 한다는 연구보고가 있다.

저자는 골수내 종양을 치료하기 위해 빈번히 사용되는 cyclophosphamide가 골수에 미치는 영향을 규명하고자 실험동물의 혈구형성에 영향을 미치는 laminin 1의 발현의 변화를 골수의 기질세포에서 추적하고자 하였다.

건강한 SD계 흰쥐를 실험동물로 사용하여 cyclophosphamide를 체중 kg당 75 mg을 복강내로 1회 투여하고 3일, 1주, 3주 및 5주 후 희생하여 골수조직을 채취하여 면역조직염색법으로 염색하여 laminin 1의 골수내 분포의 변화를 관찰하였고, 일부 조직은 전자현미경표본을 제작하여 1차 항체 (rabbit anti laminin)로 반응시킨 후 직경 12 nm의 금과립이 섞인 제2차 항체 (biotinylated goat anti rabbit IgG)로 다시 반응시키고 uranyl acetate로 단일염색 후 전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Cyclophosphamide 투여 후 3일 경과군의 흰쥐 골수조직은 정맥동이 확장되었고, 일부 조직이 괴사되었으며, 혈구형성세포가 감소되었다. 망상조직과 지방세포사이의 조직에서 laminin 1의 면역반응이 강하게 나타났다.

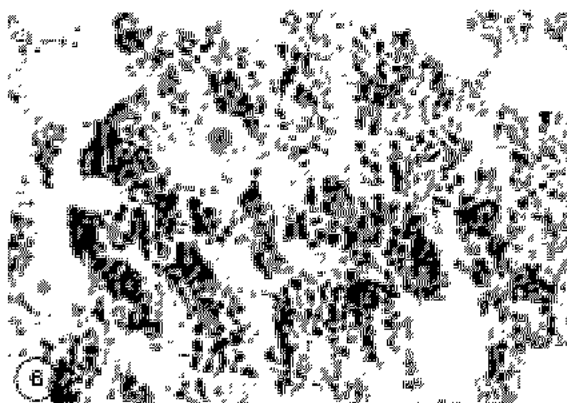
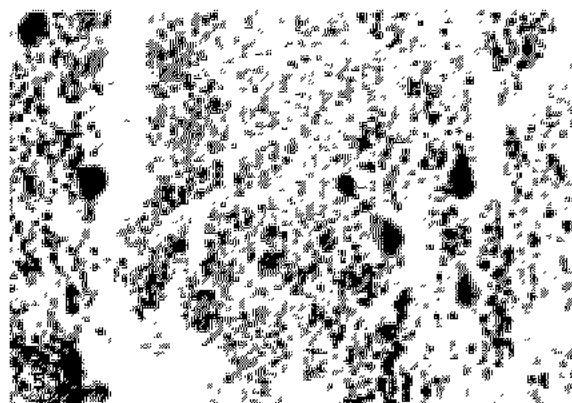
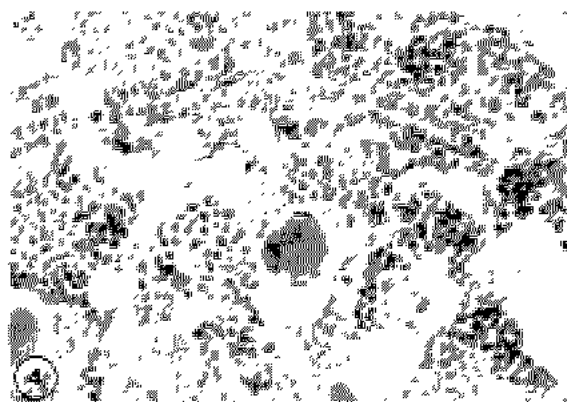
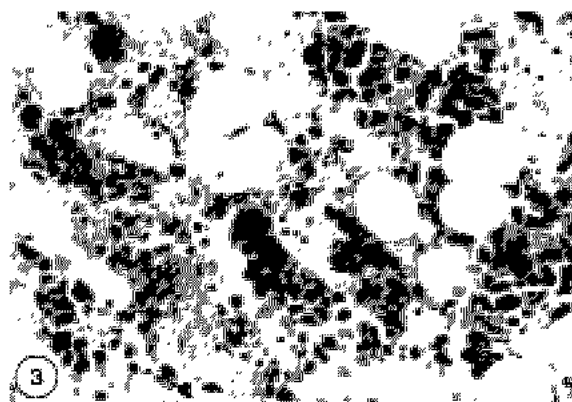
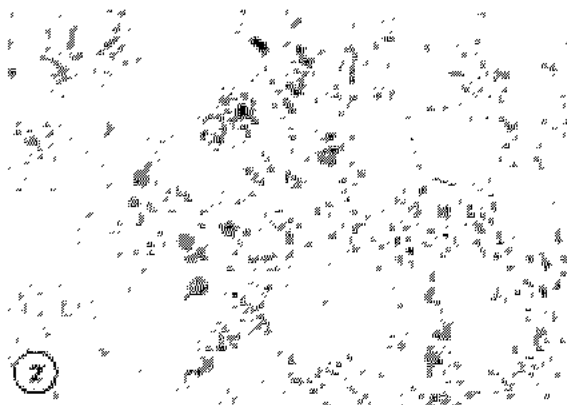
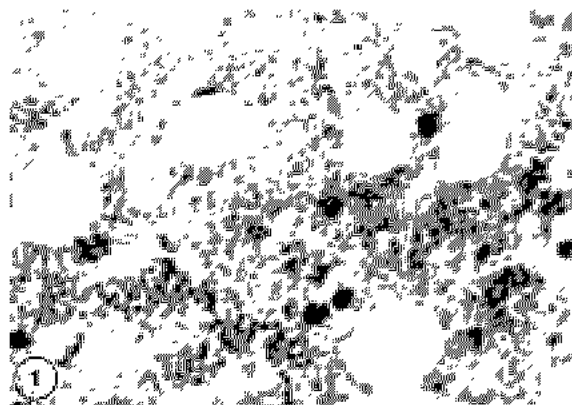
2. Cyclophosphamide 투여 후 1주, 2주 및 5주 투여군의 골수에서 laminin 1의 약한 면역반응이 기질조직에 계속되었고 혈구형성세포의 수는 증가되었다.

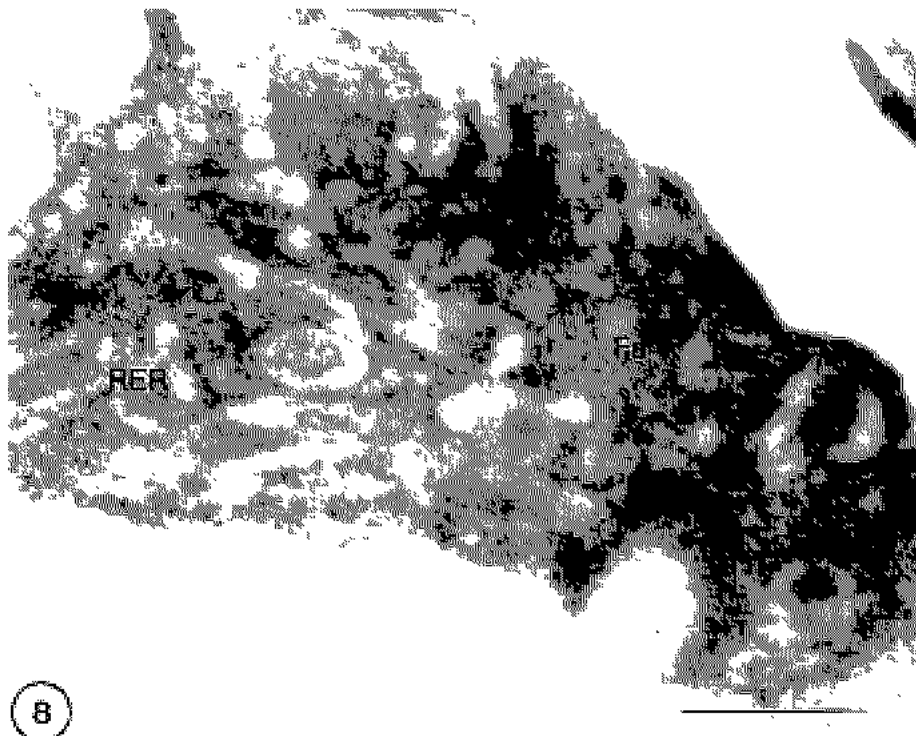
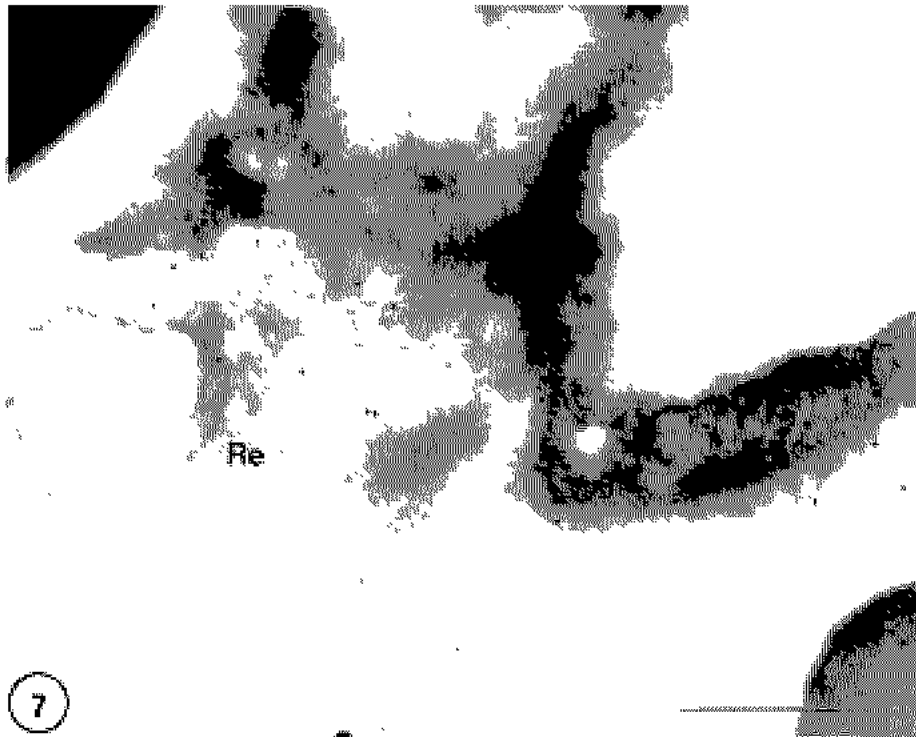
3. Laminin 1의 면역반응을 나타내는 금과립은 cyclophosphamide 투여 3일군의 골수 기질세포에서 가장 많은 수가 관찰되었고, 투여 1주, 3주 및 5주군에서는 금과립의 수량이 감소되었다.

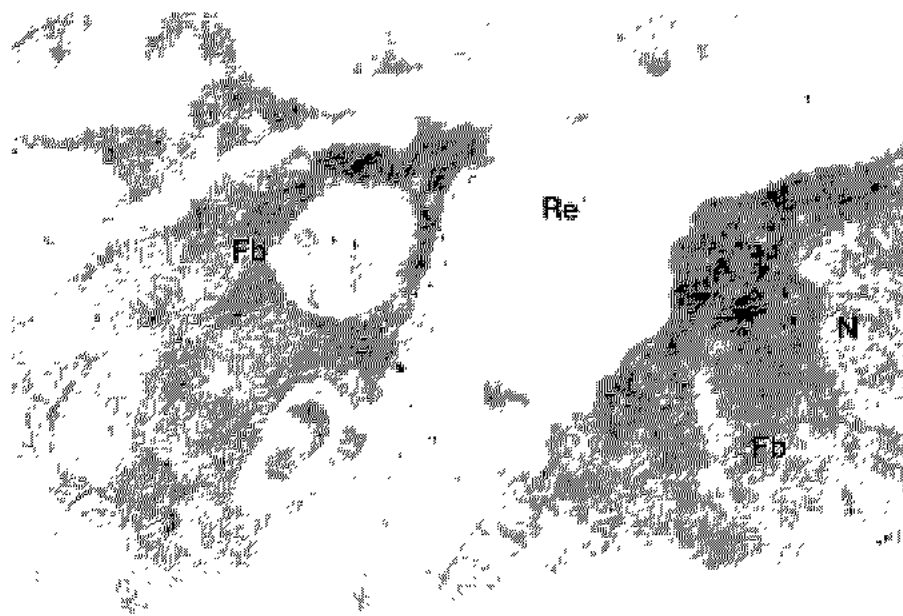
이상과 같은 실험결과는 cyclophosphamide가 흰쥐에 투여되었을 때 골수의 혈구형성의 미세환경을 유지하는 기질세포의 laminin 1의 발현을 증가시키는 것으로 생각되었다.

FIGURE LEGENDS

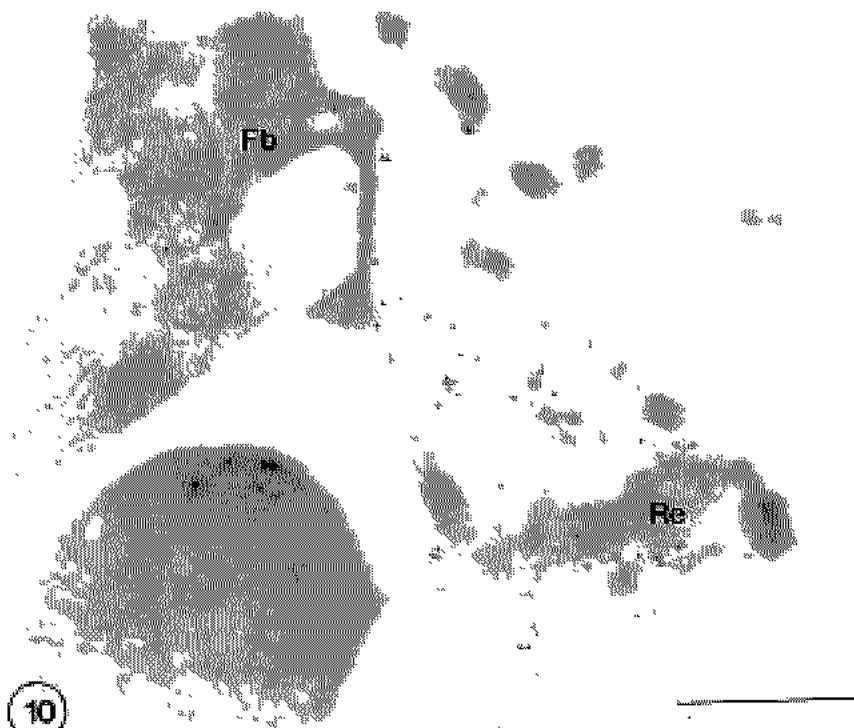
- Figs. 1, 2.** Light microscopic distribution of immunoreaction for Laminin-1 in the bone marrows of normal rat. Few immunoreactions are observed in intercellular connective tissue of the bone marrow. DAB method, $\times 400$
- Fig. 3.** Light microscopic immunoreaction for laminin-1 in the bone marrow of the rat 3 day after cyclophosphamide administration. Strong immunoreactions for laminin-1 was observed at the reticular tissue and periphery of fat tissue in the bone marrow. Decrease of the hemopoietic cells and necrotic cells were seen. DAB method, $\times 400$.
- Figs. 4-6.** Light microscopic immunoreaction for laminin-1 in bone marrows of the rat 1, 3 and 5 weeks after cyclophosphamide administrations. A few immunoreactions for laminin-1 are seen in the bone marrow tissues. Hemopoietic cells and other cells are increased. DAB method, $\times 400$.
- Fig. 7.** An electron photomicrograph of the bone marrow of a normal rat. A reticular cell (Re) with a few gold particles is observed. Uranyl acetate stain, $\times 30,000$
- Fig. 8.** An electron photomicrograph of the bone marrow of a normal rat. Few gold particles are seen in a fibroblast (Fa) with abundant rough endoplasmic reticulum (RER). Uranyl acetate stain, $\times 30,000$
- Figs. 9, 10.** Electron photomicrographs of the bone marrows of rats 3 day after cyclophosphamide administration. Numerous gold particles are seen in the cytoplasm of reticular cells (Re) and a few in the fibroblasts (Fa). Uranyl acetate stain, $\times 30,000$
- Fig. 11.** An electron photomicrograph of the bone marrow of a rat 1 week after cyclophosphamide administration. A cytoplasmic process of reticular cells (Re) contains numerous gold particles and few in rouget cell (Rou). Uranyl acetate stain, $\times 30,000$.
- Fig. 12.** An electron photomicrograph of the bone marrow of a rat 3 weeks after cyclophosphamide administration. A reticular cells (Re) contained few gold particles. Uranyl acetate stain, $\times 30,000$
- Figs. 13, 14.** Electron photomicrographs of the bone marrows of the rats 5 weeks after cyclophosphamide administration. A fibroblast (Fa) contained few gold particles on the cytoplasm, and few gold particles are seen on the cytoplasm of a rouget cell (Rou). N=nucleus. Uranyl acetate stain, $\times 30,000$







9



10

