

## 放射線照射에 의한 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 自然殺害細胞 活性度の 變化

金 成 昊

韓國에너지研究所 原子力病院 癌病理學研究室

(1987.7.24 接受)

### Relationships between Radiation-induced Prostaglandin E<sub>2</sub> and Natural Killer Cell Activity in Mice

Sung-ho Kim

Laboratory of Cancer Pathology, Korea Cancer Center Hospital, Korea Advanced Energy Research Institute

(Received July 24th, 1987)

**Abstract:** The number of splenic lymphocyte, serum prostaglandin E<sub>2</sub> level and natural killer cell activity were assayed after single whole body irradiation of a sublethal dose of <sup>60</sup>Co-γ ray to C57BL/6J mice. With a view to knowing the relationships between radiation induced prostaglandin E<sub>2</sub> level and the normal natural killer cell activity after natural killer cell-target cell conjugation, The change of normal natural killer cell activity were measured by administration of prostaglandin E<sub>2</sub> containing serum from irradiated mice.

The results were summarized as follows;

1. The total number of splenic lymphocyte was significantly decreased by irradiation and the number was not affected by indometacin, prostaglandin synthesis inhibitor, treatment.
2. Serum prostaglandin E<sub>2</sub> level was increased in irradiated mice, but indometacin treated mice group showed low level of prostaglandin E<sub>2</sub>.
3. In the case of irradiated mice, natural killer cell activity was not shown any difference between irradiated group and indometacin combined group. But when natural killer cell-target cell conjugations were exposed to the serum of each group during cytotoxic activity assay, whereas the normal natural killer cell activity was significantly decreased by treatment of serum from irradiated mice, the activity was not changed by treatment of indometacin pretreated mice serum. This result indicated that the prostaglandin E<sub>2</sub> induced by the radiation inhibited the post-target binding cytolytic process of natural killer activity.

### 緒 論

방사선 조사에 의하여 특정 기관, 조직 또는 세포로부터 각종 생체장해 효과를 나타내는 생화학적 물질들이 방출될 수 있으며 이들 물질 중 prostaglandin(PG)은 방사선 조사시 체내 농도가 급격히 증가하는 것으

로 알려져 있다(Donlon 등, 1985; Eisen과 Walker, 1976).

Eisen과 Walker(1976)는 Balb/C마우스에 200~700 rads의 X-ray를 조사한 결과 폐장 및 비장에서 PGE의 농도가 높다고 보고 하였고, Donlon 등(1985)은 9.0Gy의 <sup>60</sup>Co-γ ray를 조사한 후 랫트의 뇨 중 PGE 및

PGF<sub>2α</sub>의 농도를 측정된 결과, PGF<sub>2α</sub>는 일시적으로 경미하게 증가되나 PGE의 농도는 방사선을 조사하지 않은 군에 비하여 평균 약 20배의 증가를 나타낸다고 하였다. 또한 방사선이 조사된 토끼의 복부동맥에서 PGI<sub>2</sub>의 농도 증가도 알려지고 있다(Sinzinger 등, 1982).

한편, PGE<sub>2</sub>는 T 림파구에 의한 interleukin 2를 비롯한 각종 lymphokine의 산생(Walker 등, 1983), T 림파구의 세포독성효과(Young과 Dizer, 1983; Goodwin과 Ceuppens, 1983; Ting과 Hargrove, 1982) 및 자연살해세포(natural killer(NK) cell)의 활성도를 저하시키며(Ting과 Hargrove, 1983; Brunda 등, 1980) 또한 대식세포의 세포독성효과(Taffet와 Russell, 1981; Schultz 등, 1978)를 감소시킴으로써 생체내의 면역 방어 능력을 급격히 약화시키는 것으로 알려져 있다.

저자는 지금까지 알려진 방사선에 의한 NK세포 활성도의 변화와 방사선에 의한 PGE<sub>2</sub>의 체내농도 변화 사이의 상관관계를 파악함으로써 방사선에 의한 면역기능의 변화를 관찰하고자 본 연구를 수행하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

## 材料 및 方法

**실험동물 및 방사선 조사:** 방사선 조사를 위한 실험동물은 미국 국립보건원에서 분양받아 본 연구실에서 사육 번식 중인 생후 6~7주된 C57BL/6J 자성 마우스를 사용하여 방사선 조사군은 실험군 당 10마리, 비조사 대조군은 실험군 당 5마리로 하였으며 방사선은 700 rads의 <sup>60</sup>Co-γ ray(Teratron-780)를 280rad/minute의 선량율로 1회 전신 조사하였다. prostaglandin synthesis inhibitor인 indometacin(Sigma Chemical Co.)은 방사선 조사전 4일, 8일, 12일째부터 음수 1ml 내 20 μg의 용량으로 용해시켜 투여하였으며 방사선 조사 후 4일째 대조군 및 조사군에서 NK 활성도 및 혈청내 PGE<sub>2</sub> 농도를 측정하였다. 각 실험동물은 NIH-7-open formula에 의해 제조된 사료를 공급하였으며 자유로이 급수·급식 시켰다.

**NK 활성도 측정:** 방사선 조사군은 10마리, 대조군은 5마리의 마우스로부터 채취된 비장을 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 세척한 후 10 ml의 HBSS가 담긴 petri-dish에서 세분 절편하여 세포를 부유시켰다. 부유시킨 세포를 Ficoll-hypaque용액 위에 중첩하여 400g에서 30분간 원심분리하였다. 얻어진 림파구는 HBSS로 3회 세척한 뒤 10% fetal bovine serum(FBS), 100unit penicillin, 10μg streptomycin, 2mM L-glutamine이 첨가된 RPMI 1640 배지에 재부유시켜 작동세포(effector cell)로 하였다. 표적세포(target ce-

ll)로는 YAC-1세포를 200μCi Na<sub>2</sub> <sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>을 37°C에서 1시간 동안 표지하여 사용하였다.

NK세포 활성도는 다음과 같이 microculture assay로 측정하였다. <sup>51</sup>Cr이 표지된 표적세포(1×10<sup>6</sup>cells/ml)와 작동세포(작동세포: 표적세포의 비율은 12.5:1, 25:1, 50:1, 100:1)를 각각 0.1 ml씩 multi-well plate(Linbo)에 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 4시간 배양하였다. 배양 후 상층액 0.1 ml를 취하여 γ-counter로 방사선량을 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며 cytotoxicity(%)는 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{ER} - \text{SR}}{\text{MR} - \text{SR}} \times 100$$

여기서 experimental release(ER)은 실험군으로부터 유리된 상층액의 방사선량(cpm), spontaneous release(SR)은 작동세포가 들어있지 않은 대조군에서 유리된 상층액의 방사선량(cpm)이고 maximal release(MR)은 표적세포(1×10<sup>6</sup>cells/0.1ml)에 표지된 방사능의 90% 이상으로 하였고, Triton X-100 1% 용액을 가하여 얻었다. Lytic unit(LU)는 dose reponse curve로부터 얻었으며 linear regression analysis방법으로 1×10<sup>7</sup> 비장세포 당 LU수를 계산하였다. 1LU<sub>10</sub>은 표적세포의 10%를 lysis시키는데 필요한 작동세포의 수로 정의하였다.

한편, 방사선 조사시 상승되는 체내 PG가 표적세포와 작동세포의 결합 후 반응에 미치는 영향을 보기 위하여 정상 마우스 비장림파구를 작동세포로 하여 작동세포 대 표적세포의 비율을 50:1로 고정하고 각 assay plate에 10, 5, 2.5μl의 실험군 마우스 혈청을 혼합 배양하였다. 이때 사용된 혈청은 indometacin 투여군의 경우, 방사선 조사전 8일째부터 투여한 군을 사용하였다.

**혈청내 PGE<sub>2</sub>의 농도측정:** 각 실험군 마우스의 안부에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였으며 혈청내 PGE<sub>2</sub>의 양은 radioimmunoassay kit(New England Nuclear Corp., Boston)를 사용하여 측정하였다. 즉, 0.1 ml의 anti-PGE<sub>2</sub>를 [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> 0.1 ml와 혼합하고 또한 표준 PGE<sub>2</sub> 또는 혈청 0.1 ml에 섞어서 24시간 반응시킨 후 dextran-coated charcoal powder solution 1 ml를 첨가하고 원심분리하여 상층액내 radioactivity를 liquid scintillation counter(Packard Co.)로 측정하였다.

## 結 果

**비장림파구 수의 변화:** 마우스 마리 당 비장림파구의

수는 방사선 조사군에서 급격히 감소하며 indometacin 투여에 따른 변화는 경미하였다(Table 1 및 Fig. 1).

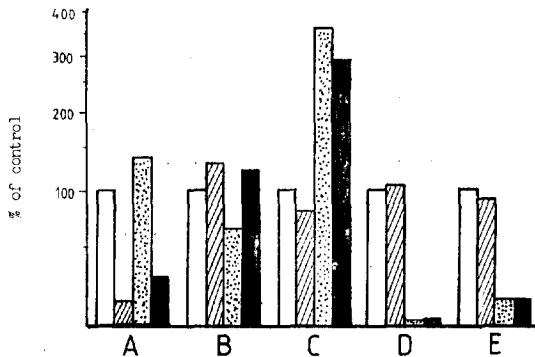
**혈청내 PGE<sub>2</sub>의 농도변화**: 대조군에서 혈청 1 ml 내 276.6pg이었으며 indometacin투여시 87% 감소하고 방사선 조사후 4일째 33.5% 증가되었으며 indometacin 투여군에 방사선 조사시 75.7% 감소하였다. indometacin투여기간 연장에 따라 PGE<sub>2</sub>의 농도는 조금씩 감소하였다(Table 2).

**NK세포 활성도의 변화**: 방사선 조사 후 4일된 마우

**Table 1.** Total Number of Lymphocytes in Spleen after <sup>60</sup>Co-Irradiation (10<sup>5</sup> cells/head)\*

Experimental group	Days after administration of indometacin		
	8	12	16
Normal	219.5	236.5	309.0
Normal+ indometacin	278.0	246.3	274.0
Radiation	6.5	6.3	5.7
Radiation+ indometacin	8.5	7.7	4.5

\* The mice were irradiated on day 4 before last administration of indometacin.



**Fig. 1.** Changes of serum prostaglandin E<sub>2</sub> levels and NK cell activity in mice after exposure to 700 rads of <sup>60</sup>Co-irradiation. Indometacin was administered to mice for 12days.

- A : Serum prostaglandin E<sub>2</sub> levels (pg/ml of serum)  
 B : % Cytotoxicity of serum treatment group(2.5% serum concentration)(E : T ratio=50 : 1)  
 C : Specific cytotoxicity of splenic lymphocytes(LU<sub>10</sub>/10<sup>7</sup> Cells)  
 D : Total number of splenic lymphocytes per mouse(10<sup>5</sup> Cells/head)  
 E : Relative cytotoxicity of total splenic lymphocytes per mouse  
 □ : Normal mice   ▨ : Indometacin treated normal mice  
 ● : Irradiated mice   ■ : Indometacin treated mice with irradiation

스의 10<sup>7</sup>비장임파구 당 YAC-1세포에 대한 자연살해세포 활성도는 대조군에 비하여 200% 이상 증가하였으며 indometacin투여에 의한 변화는 거의 관찰되지 않았다(Table 3 및 Fig. 1).

한편, NK세포와 표적세포의 결합 후 반응에 미치는 PGE<sub>2</sub>의 영향을 관찰하기 위하여 각 실험군 마우스의 혈청을 정상마우스의 비장세포와 YAC-1세포 혼합시 첨가하여 배양한 결과 indometacin투여군의 혈청 첨가시 대조군 및 방사선 조사군의 혈청을 첨가한 경우 나타나는 NK세포 활성도의 감소가 관찰되지 않았다(Table 4 및 Fig. 1).

### 考 察

방사선 조사시 체내 임파구가 기타의 체세포에 비하여 가장 민감하게 파괴 소실되며 마우스의 경우 혈중 임파구의 수는 방사선 조사 초기에 급격히 감소하며 조사 후 약 30일경에 정상 수준으로 환원된다(Jo 등, 1986). 한편, 임파구 중 종양의 성장(Hanna와 Fidler,

**Table 2.** Prostaglandin E<sub>2</sub> Levels in Serum of <sup>60</sup>Co-Irradiated Mice(pg/ml of serum)\*

Experimental group	Days after administration of indometacin		
	8	12	16
Normal	281.01	274.86	273.90
Normal+ indometacin	41.74	37.24	29.0
Radiation	389.75	361.94	355.9
Radiation+ indometacin	77.6	69.12	55.2

\* The mice were irradiated on day 4 before last administration of indometacin.

**Table 3.** Specific Cytotoxicity of Splenic Lymphocytes after <sup>60</sup>Co-Irradiation(LU<sub>10</sub>/10<sup>7</sup> Cells)\*

Experimental group	Days after administration of indometacin		
	8	12	16
Normal	51.8	23.1	18.3
Normal+ indometacin	65.0	17.6	20.7
Radiation	133.0	83.0	42.1
Radiation+ indometacin	102.7	67.5	39.6

\* The mice were irradiated on day 4 before last administration of indometacin.

**Table 4.** Effect of Serum Treatment on Natural Killer Activity of Normal Mouse Spleen Cell\*

Experimental group	% Cytotoxicity (E : T ratio=50 : 1) % of serum administration**			
	0	1.25	2.5	5
Normal	27.2	22.5	20.1	19.5
Normal+ indometacin***	27.1	27.0	24.9	23.7
Radiation	25.4	22.5	12.8	14.1
Radiation+ indometacin	25.5	26.4	24.5	22.9

\* Mouse spleen cells were obtained from normal mice 7 weeks old.

\*\* The serum was obtained from the mice which were irradiated on day 4 before last administration of indometacin.

\*\*\* Indometacin was administered to mice for 12days.

1980; Talmadge 등, 1980; Haller 등, 1971) 및 전이 (Hanna와 Burton, 1981; Hanna, 1980) 그리고 조혈 세포 이식편의 성장에 대한 숙주의 저항력과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 NK세포의 활성도는 고선량의 방사선 조사 시에도 초기에 감소하지 않는다(Hochman과 Cudkowicz, 1977). 이는 NK세포가 기타의 lympho-myeloid계통의 세포보다 방사선 장애 효과에 대한 민감도가 낮음으로서 상대적 숫자의 증가에 기인한 것으로 설명되고 있다(Jo 등, 1986). 이와 같은 해석을 근거로 각 실험군 마우스에서 총 비장세포 당 NK세포 활성도를 산출하여 본 바 대조군에 비하여 방사선 조사시 90% 이상 감소하였다.

방사선 조사군 마우스의 비장임파구를 *in vitro* 상태에서 NK세포 활성도를 측정된 결과 방사선 조사군에 indometacin 투여시에도 NK세포 활성도가 크게 변화하지 않았으며 한편 방사선 조사군 마우스 유래의 혈청을 정상마우스의 비장임파구의 NK세포 활성도 측정시 첨가한 결과 활성도가 감소하였고, indometacin 투여 후 방사선을 조사한 마우스의 혈청 첨가시 활성도의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과로 방사선 조사에 의하여 유도된 PGE<sub>2</sub>의 농도 증가가 단일 NK세포에 미치는 직접적인 영향은 경미함을 알 수 있었으며 NK세포가 표적세포와 결합한 후 세포 살해작용 과정에 PGE<sub>2</sub>가 관여하여 NK세포의 표적세포 살해능력을 감소시킬 수 있었다. 이러한 결과는 Kendall과 Targan(1980)의 가설과 일치하였다.

## 結 論

C57BL/6J 마우스에 700rads의 <sup>60</sup>Co-γ ray를 조사한 후 비장임파구의 수, 혈청내 PGE<sub>2</sub> 농도 및 자연살해 세포 활성도의 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 방사선 조사군의 비장임파구 수는 대조군에 비하여 급격히 감소하였으며 indometacin 투여에 의한 변화는 경미하였다.

2. 방사선 조사에 의하여 혈청내 prostaglandin E<sub>2</sub>의 농도는 증가하였으며 indometacin을 투여한 마우스의 경우, 방사선 조사군에서도 PGE<sub>2</sub>의 농도는 낮게 유지되었다.

3. 방사선에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 농도증가가 자연살해세포와 표적세포 결합 후 세포살해 과정에 작용하여 자연살해세포의 활성도를 감소시키는 것을 알 수 있었으며 방사선에 의한 PGE<sub>2</sub>의 체내 농도 증가를 억제할 수 있는 indometacin의 투여가 결국 자연살해세포의 활성도 저하를 막을 수 있었다.

## 參 考 文 獻

- Brunda, M. J., Herberman, R. B. and Holden, H. T. (1980) Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J. Immunol.*, 124: 2682~2687.
- Donlon, M., Steel, L., Helgeson, E. A., Wolfe, W. W. and Catravas, G. N. (1985) WR-2721 inhibition of radiation-induced prostaglandin excretion in rats. *Int. Radiat. J. Biol.*, 47: 205~212.
- Eisen, V. and Walker, D. I. (1976) Effect of ionizing radiation on prostaglandin-like activity in tissues. *Br. J. Pharmacol.*, 57:527~532.
- Goodwin, J. S. and Ceuppens, J. (1983) Regulation of the immune response by prostaglandins. *J. Clin. Immunol.*, 3:295~315.
- Haller, O., Hansson, M., Kiessling, R. and Wigzell, H. (1971) Role of nonconventional killer cells in resistance against syngenic tumor cells in vivo. *Nature*, 270:601~611.
- Hanna, N. (1980) Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, 26:675~680.
- Hanna, N. and Burton, R. C. (1981) Definitive evi-

- dence that natural killer(NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.*, 127:1754~1758.
- Hanna, N. and Fidler, I.J. (1980) Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J. Natl. Cancer Inst.*, 65:801~809.
- Hochman, P.S. and Cudkowicz, G. (1977) Different sensitivities to hydrocortisone of natural killer cell activity and hybrid resistance to parental marrow grafts. *J. Immunol.*, 119:2013~2015.
- Jo, S.K., Moon, H.S., Yun, Y.S., Oh, Y.R., Kim, S.H. and Yun, T.K. (1986) Sustained defect of natural killer activity after sublethal-irradiation. *Korean J. Immunol.*, 8:161~165.
- Kendall, R.A. and Targan, S. (1980) The dual effect of prostaglandin(PGE<sub>2</sub>) and ethanol on the natural killer cytolytic process: Effector activation and NK-cell-target cell conjugate lytic inhibition. *J. Immunol.*, 125:2770~2777.
- Schultz, R.M., Pavlidis, N.A., Stylos, W.A. and Chirigos, M.A. (1978) Regulation of macrophage tumoricidal function: A role for prostaglandins of the E series. *Science*, 202:320~321.
- Sinzinger, H., Firbas, W. and Cromwell, M. (1982) Radiation induced alterations in rabbit aortic prostacyclin formation. *Prostaglandins*, 24:323~329.
- Taffet, S.M. and Russell, S.W. (1981) Macrophage-mediated tumor cell killing: Regulation of expression of cytolytic activity by prostaglandin E. *J. Immunol.*, 126:424~427.
- Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J. and Starkey, J.R. (1980) Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature*, 284:622~624.
- Ting, C.C. and Hargrove, M.E. (1983) Activation of natural killer-derived cytotoxic T lymphocytes. I. Regulation by macrophage and prostaglandins. *J. Immunol.*, 131:1734~1741.
- Ting, C.C. and Hargrove, M.E. (1982) Tumor cell-triggered macrophage-mediated suppression of the T-cell cytotoxic response to tumor-associated antigens. II. Mechanisms for induction of suppression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 69:873~878.
- Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F. and Deweck, A.L. (1983) Lymphokine regulation of activated(G<sub>1</sub>) lymphocytes. I. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.*, 130:1770~1773.
- Young, M.R. and Dizer, M. (1983) Enhancement of immune function and tumor growth inhibition by antibodies against prostaglandin E<sub>2</sub>. *Immunol. Commun.*, 12:11~23.