

수지상세포의 방사선 저항성에 대한 연구

방사선보건연구원¹, 전남대학교병원 핵의학과², 내과³

김은실¹, 김종순¹, 이명호², 범희승², 민정준², 정환정², 김성민², 허영준², 송호천², 이제중³

Radioresistance of Dendritic Cells

Eun-Sil Kim, M.D.,¹ Chong-Soon Kim, M.D.,¹ Ming-Hao Li, M.D.,² Hee-Seung Bom, M.D.,² Jung-Joon Min, M.D.,² Hwan Jeong Jeong, M.D.,² Seong Min Kim, M.D.,² Ho-Chun Song, M.D.,² Je-Joong Lee, M.D.³

Radiation Health Research Institute¹, Seoul, Korea ; Departments of Nuclear Medicine² and Internal Medicine³, Chonnam National University Hospital, Gwangju, Korea

Abstract

Purpose : To evaluate radiation sensitivity of dendritic cells in comparison with lymphocytes. **Materials and methods :** T lymphocytes captured from peripheral blood were irradiated by 0 Gy, 10 Gy, 30 Gy. Apoptosis was measured by flowcytometry for staining of Annexin V 4 hours after irradiation. Immature and mature dendritic cells processed from blood hematopoietic stem cell were irradiated by 0 Gy, 10 Gy, 30 Gy, 100 Gy respectively and apoptosis was measured by flowcytometry with time difference as 4h, 24h and 48h after irradiation. Morphometric analysis by percent nucleus was measured in three cell groups, also. **Results :** Lymphocytes showed radiation sensitivity by increasing apoptotic fraction according to radiation dose. However, both mature and immature dendritic cells showed consistent fraction of apoptosis in spite of increasing radiation dose. Percent nucleus ratio is significantly higher in lymphocytes than that of mature or immature dendritic cells. Stimulation of T-cell by dendritic cells was not changed after irradiation. **Conclusion :** Dendritic cells showed radioresistance which was associated with small size of nucleus in comparison with lymphocytes and this result would be used as a basal data of radio-labelling for the cellular trafficking studies in nuclear medicine fields.

Key Words : Radiation, Sensitivity, Hematopoietic seteam cell, Differentiatio, Dendritic cell, Lymphocyte. of arthritis.

서 론

면역계는 면역기능에 관여하는 세포나 조직이 모여서 이루어진 것으로서 주로 림프구와 보조세포, 그리고 이들이 모여서 만들어진 림프조직들로 이루어져 있다. 면역반응에서 가장 중요한 역할을 하는

세포는 림프구들이나 실제로 면역반응은 림프구에 의해서만 나타나는 것이 아니라, 보조세포라고 부르는 다른 여러 가지 백혈구들과의 상호작용 결과로 나타난다. 이들 보조세포들은 항원을 림프구에 제시하여 면역반응을 일으키고 진행시키기도 하며, 항원을 제거하는 데에도 중요 역할을 담당한다.¹⁻³⁾

수지상 세포는 독특한 성상(stellate)의 형태 때문에 붙여진 이름으로서 생체 내에서 가장 강력한 항원제시세포로 알려져 있는 희귀한 백혈구이다.¹⁾ 대표적인 보조세포로서 수지상 세포는 항원 특이 T 세포에게 항원을 제시할 뿐만 아니라 휴지기의 T

Received March. 25, 2003; accepted May. 2, 2003
Corresponding author: Hee-Seung Bom, M.D., Ph.D.
Department of Nuclear Medicine,
Chonnam National University Hospital,
Tel: 062-220-5641, Fax: 062-232-0232
E-mail:hsbom@jnu.ac.kr

세포를 세포주기에 들어가게 해서 증식하고 분화시켜서 면역효과 세포들의 수를 증가시키는데 필요한 강력한 상호자극신호를 보낸다. 수지상 세포는 골수 조직과 림프조직 중 어디에서 유래하느냐에 따라 기능에 차이가 있으며^{2,3)} 각자의 위치에서 항원을 수집하여 림프조직으로 가서 비활성 T세포를 활성화 시킨다. 또한 수지상세포가 직접 자연 살세포 (natural killer cell; NK cell)의 기능을 유도한다는 보고⁴⁾에 따르면 선천성 면역과 후천성 면역의 상호 관계를 조절하는 기능도 있는 것으로 생각된다. 이러한 특성에 비추어 볼 때 수지상세포는 특정한 종양 백신을 생산하는데 필요한 보조세포로 주목 받고 있다.

방사선에 조사된 인체의 생물학적 지표로서 혈구 세포가 많이 이용되는데, 특히 림프구는 표적이 되는 세포핵이 크기 때문에 방사선에 대한 감수성이 커서 방사선피폭 후 급격히 그 수가 감소되었다가 서서히 회복된다.⁵⁾ 방사선피폭 후 급격히 감소되는 림프구 수와 속도를 관찰하여 조사선량을 추정하고 치료방침을 결정하는 것은 방사선사고 환자에 대한 치료영역에서 중요한 지침으로 활용되고 있으며, 특히 림프구의 염색체 이상을 계수하여 거시적 세포수준에서 방사선량을 계측하는 방법은 물리적 선량평가법을 보완하는 자료로써 그 정확성이 입증 되었다.⁶⁾

이와 같이 림프구의 방사선 민감성을 이용한 염색체이상 및 세포고사 빈도 분석 등의 연구는 방사선생물학 영역에서 활발하게 이루어진 반면, 같은 면역계에서 작용하는 수지상세포에 대한 방사선민감성 연구는 지금까지 시도된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 면역계를 대표하는 림프구의 방사선민감성에 대응하는 수지상세포의 방사선 민감성여부를 비교 관찰하고자 본 연구를 수행하였다.

대상 및 방법

1. 세포고사의 관찰

가. 세포배양과 획득

1) 림프구의 획득

건강한 사람의 말초혈액을 헤파린 처리된 주사기

로 50 ml 정도 채혈하여 Ficoll-Hypaque를 이용하여 단핵구를 분리한 후, Vario Magnetic Cell Sorting (MACS) 분리법 (Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD3+T 림프구를 분리하였다.

2) 수지상세포의 배양과 획득

임상에서 사용되고 조혈모세포수집 백에 남아있는 조혈모세포를 PBS로 씻어서 실험용 조혈모세포를 얻었다. 수집한 조혈모세포를 원심분리(1500 rpm, 10 min)한 후, Vario MACS 분리법 (Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD14+ 세포를 분리하였다.

분리한 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 이 첨가된 RPMI-1640 배양액 1 ml 당 1×10^6 세포 농도가 되도록 심고, GM-CSF 50 ng/ml와 IL-4 50 ng/ml를 첨가하여 배양을 시작 하였다. 2일 간격으로 배양액 교환과 함께 GM-CSF 50 ng/ml 및 IL-4 50 ng/ml를 추가하여 배양을 계속하여, 배양 6일째에 미성숙 수지상세포를 얻고, 6일째에 TNF- α 50 ng/ml를 첨가하여, 8-9일에 성숙 수지상세포를 얻었다.

나. 방사선 조사

방사선 조사는 Cs-137 세포조사기(Gamma cell 3000 Elan, Ontario, Canada)를 이용하여 중심에서 선량률이 654 Gy/h가 되도록 감마선을 조사하였다. 림프구에는 대조군을 제외하고 두 가지 군에 10 Gy와 30 Gy를 조사하였고, 성숙 및 미성숙 수지상세포에는 대조군 외에 각각 세 가지 군에 10 Gy, 30 Gy, 100 Gy를 조사하였다.

다. 유세포분석기를 이용한 세포고사의 관찰

방사선에 대한 민감도의 지표로써 세포고사를 관찰하기 위해 각각 선량별로 방사선 조사된 세포 ($10^5 \sim 10^6$ cell/ml)를 추출하여 2 ml의 시험관에 옮기고 여기에 인산원충염수(PBS, Sigma, St. Louis, USA)로 세척(washing)한 후, Annexin V-FITC kit (Trevigen, Gaithersburg, USA)를 사용하여 형광염색 하였다. 즉, media binding buffer ($1 \times$ binding buffer) 100 μ l, 각각 선량별로 방사선 조사된 세포(1×10^5 cells), Annexin V-FITC 와 Propidium Iodide (PI)를 각각 5 μ l씩 첨가한 후, 차광상태의 실온(25°C)에서 15분간 배양한 다음 binding buffer 400 μ l 를 첨가하고 1시간 이내에 유세포분석기로 측정하였다. 림

프구는 방사선 조사 후 4시간에, 미성숙 및 성숙 수지상세포는 4시간, 24시간, 48시간에 각각의 시간대별로 대조군과 함께 관찰하였고, 아래와 같이 Annexin V에만 염색된 세포를 고사세포로 간주하였으며 각각의 실험은 3회 이상 반복하였다.

1	2
3	4

- 1: Annexin V (-) PI (+)
- 2: Annexin V (+) PI (+) = dead cell
- 3: Annexin V (-) PI (-)
- 4: Annexin V (+) PI (-) = apoptosis

라. 동종 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction: MLR)

정상인으로부터 말초혈액을 채혈한 후, Ficoll-Hypaque density gradient 원심분리법을 이용하여 단핵구를 분리하였고, Mini-MACS(Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD3+ 세포를 분리하였다.

배양 후 수확한 DC에 방사선을 조사(0, 10, 30, 100 Gy) 한 후, 여러 용량($10^2 - 2 \times 10^4$)으로 동종 CD3+ 세포 (2×10^4 /well)와 96-well U bottomed culture plate에서 배양하였다. 배양 5일째에 1 μ Ci [3H]-methylthymidine을 넣고 16시간 동안 pulse한 후, 수확하여 liquid scintillation counter를 이용하여 데이터를 분석하였고, 그 결과는 triplicate well의 평균 cpm \pm 표준편차로 표기하였다.

2. 세포에 대한 세포핵의 면적 비 관찰

사이토스핀(cytospin) 슬라이드에 림프구와 미성숙 및 성숙 수지상세포를 3×10^4 개 씩 분주하고 400 rpm에서 원심분리한 후 May Grunwald-Giemsa 염색하고, 광학 현미경 하에서 각각의 세포군 당 100개의 세포에서 세포 면적당 핵의 면적 비를 측정하였다.

3. 통계분석

실험 자료는 통계패키지 SAS ver. 8.1을 이용하여 분석되었으며, 모든 통계적 검정의 유의성은 유의수준 5%에서 평가하였다. 통계분석법으로 림프구와 미성숙 및 성숙 수지상세포에서 조사선량에 따른 세포고사 분획의 발현경향을 알아보기 위해 회귀분석(Regression Analysis)을 이용하였고, 방사선 조사 후 관측시간을 변화시켜가며 실험이 수행된 미성숙 및 성숙 수지상세포에서 조사선량과 관측시간에 따른 세포고사 빈도의 차이를 알아보기 위해 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 이용하였으며, 두 가지 수지상세포 간 세포고사 분획의 발현경향은 t-test를 이용하여 비교하였다.

결 과

1. 방사선 조사 후 유세포분석기로 분석한 림프구의 세포고사

림프구에 10, 30 Gy의 방사선을 조사하고 4시간 후 대조군과 함께 유세포분석한 결과, 0, 10, 30 Gy 선량별로 Annexin V에 염색된 세포고사 분획은 7.84 ± 1.59 , 15.65 ± 0.98 , $25.88 \pm 0.28\%$ 였다(Table 1). 위의 결과를 단순선형 회귀분석을 하였을 때, 방사선 조사선량이 증가함에 따라 세포고사 분획은 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1. $Y=9.83921+0.661524X$, $R^2=0.922$, $P=0.000$).

2. 방사선 조사 후 유세포분석기로 분석한 미성숙 수지상 세포의 세포고사

미성숙 수지상 세포에서 10, 30, 100 Gy의 방사선 조사하고 4시간 후에 관찰한 결과, 대조군(0 Gy) 및 10, 30, 100 Gy 선량별로 Annexin V 염색된 세포고사 분획은 12.39 ± 3.06 , 11.59 ± 3.78 , 11.12 ± 3.07 , $12.23 \pm 3.20\%$ 로 방사선 조사선량 증가에 따른 세포고사 빈도변화는 없었다(Fig. 2).

같은 방사선량을 조사 후 24시간이 경과된 후 관찰한 Annexin V 염색된 세포고사 분획은 대조군 및 각각의 선량에서 11.24±2.37, 10.85±3.46, 11.22±3.23, 11.45±2.63%였고, 48시간이 경과된 후에는 10.23±2.96, 11.12±3.44, 11.02±2.6, 11.97±2.92%였다. 따라서, 미성숙 수지상 세포에서 방사선조사 후 유발된 세포고사 분획은 조사선량 증가에 따라 유의한

차이를 없었고(Table 1), 세포고사 빈도를 방사선 조사 선량(P=0.937) 및 관찰시간(P=0.794)에 따른 분/산분석에서도 유의한 차이가 없었다.

3. 방사선 조사 후 유세포분석기로 분석한 성숙 수지상 세포의 세포고사

성숙 수지상 세포에서도 같은(10, 30, 100 Gy) 방사선량을 조사하고 4시간 후 유세포분석한 결과, 대조군(0 Gy) 및 10, 30, 100 Gy 선량별로 Annexin V에 염색된 분획은 8.54±1.07, 8.15±2.25, 7.99±0.87, 8.99±1.11로 방사선조사 선량에 따른 차이가 없었다(Fig. 3). 같은 선량을 조사하고 24시간 후에 관찰한 Annexin V 염색분획은 각각의 선량에서 8.49±0.8, 7.31±1.2, 7.8±1.45, 7.96±0.72이었고, 48시간에 관찰한 Annexin V 염색분획은 7.54±0.61, 7.02±0.02, 7.3±0.17, 7.09±0.02로, 세포고사 분획은(Table 1) 조사선량증가에 따라 유의한 차이는 없었다. 그러나 세포고사 빈도를 방사선조사 선량과 관찰 시간에 따라 분산분석한 결과, 시간에 따른 유의한 차이가 보였고(P=0.02), Tukey 방법에 의한 대증비교 결과, 4시간과 48시간에서 유의한 차이가 나타났다. 또한 두 가지 수지상세포에서 방사선조사 후 발현된 세포고사 분획을 t-test로 비교한 결과, 미성숙 수지상 세포의 세포고사 분획이 성숙 수지상세포의 분획보다 전체적으로 높았다(P<0.001).

Table 1. Percent Apoptotic Fraction of Three Cell Groups according to Radiation Doses and Observed Time After Radiation Exposure

Radiation Dose Cell Groups	0 Gy	10 Gy	30 Gy	100 Gy
Lymph 4h	7.84±1.59	15.65±0.98	25.88±0.27	-
DC-im 4h	12.39±3.06	11.59±3.78	11.12±3.23	12.23±3.2
24h	11.24±2.37	10.85±3.46	11.22±3.23	11.45±2.63
48h	10.43±2.96	11.12±3.44	11.02±2.6	11.97±2.92
DC-m 4h	8.54±1.07	8.15±2.25	7.99±0.87	8.99±1.11
24h	8.49±0.8	7.31±1.2	7.8±1.45	7.96±0.72
48h	7.54±0.61	7.02±0.02	7.3±0.17	7.09±0.02

Apoptotic fractions were analysed by flowcytometry. Lymphocytes (Lymph) were evaluated at 4h after irradiation, but both immature and mature dendritic cells (DC-im & DC-m) were analysed at different times (4h, 24h, 48h) after radiation exposure.

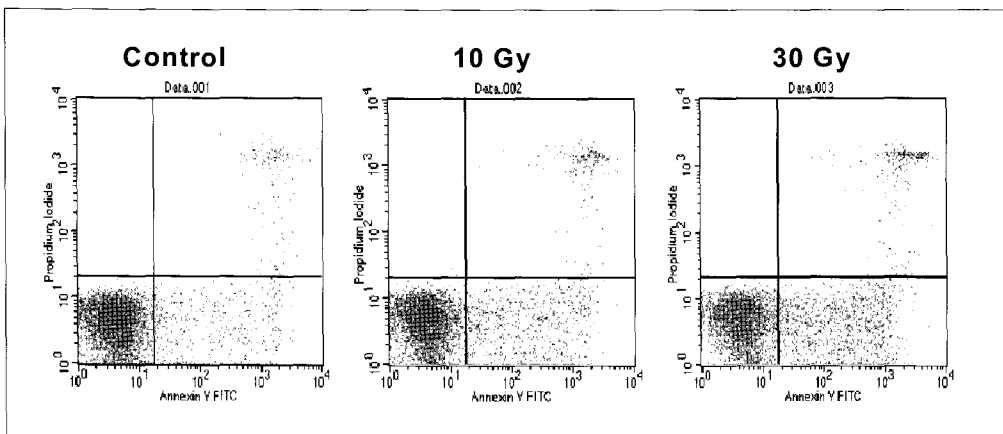


Fig. 1. Frequency of cell death in lymphocytes with 4 hr after irradiation. Dots in the right lower quadrant which indicates apoptotic fraction increase significantly according to radiation doses.

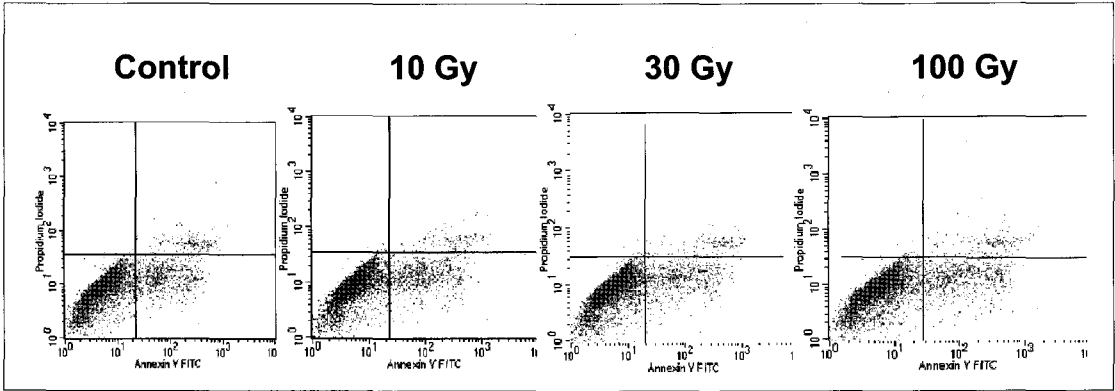


Fig. 2. Frequency of cell death in immature dendritic cells with 4 hr after irradiation. Dots in the right lower quadrant which indicates apoptotic fraction do not increase significantly according to radiation doses.

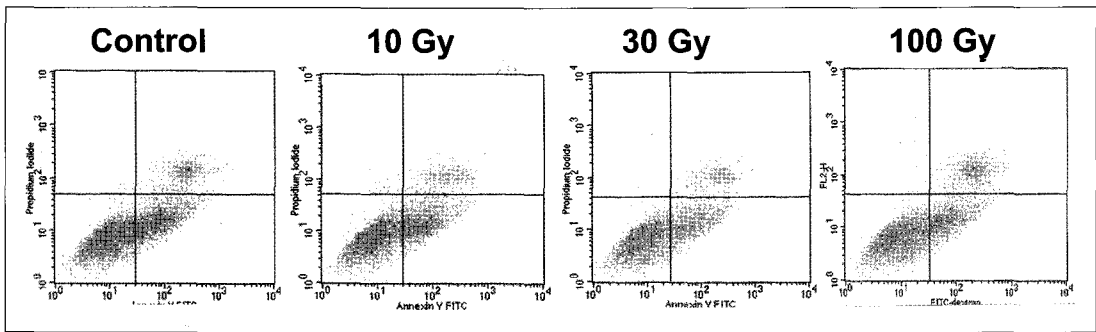


Fig. 3. Frequency of cell death in mature dendritic cells with 4 hr after irradiation. Dots in the right lower quadrant which indicates apoptotic fraction do not increase significantly according to radiation doses.

4. 세포에 대한 세포핵의 면적 비 관찰

림프구의 세포에 대한 핵의 면적 비는 $93.6 \pm 2.1\%$ 였고, 미성숙 및 성숙 수지상세포의 세포에 대한 핵의 면적 비는 각각 $47.6 \pm 8.5\%$, $42.9 \pm 9.8\%$ 였으며, 림프구와 수지상 세포 간에는 유의한 차이가 있었으나 ($P < 0.001$), 미성숙 및 성숙 수지상세포 간에는 유의한 차이가 없었다 ($P = 0.251$, Fig. 4).

5. 동종혼합 림프구 반응

정상인으로부터 얻은 수지상세포를 0, 10, 30, 100 Gy의 방사선을 조사한 후 T-세포 자극능을 평가하기 위하여 정상인으로부터 얻은 CD3+ T 세포를 수지상세포로 자극하였더니 수지상세포는 방사

선선량과 관계없이 용량에 의존적으로 강력한 T-세포 자극능을 보였다(Fig. 5).

고 찰

본 논문의 의의는 수지상세포의 방사선에 대한 저항성을 처음으로 T림프구와 비교하여 연구하였다는 점이라고 할 수 있다. 림프구와 수지상세포에 대한 방사선 조사 후 세포고사 빈도로 방사선 민감성을 비교한 결과, 림프구는 방사선량에 따른 세포고사의 빈도가 유의하게 증가하는 반면, 수지상세포는 방사선량에 관계없이 저항성을 나타내었다. 따라서 면역계에서 서로 상승작용을 하는 림프구와 수지상세포는 방사선 민감성에 있어서 서로 대

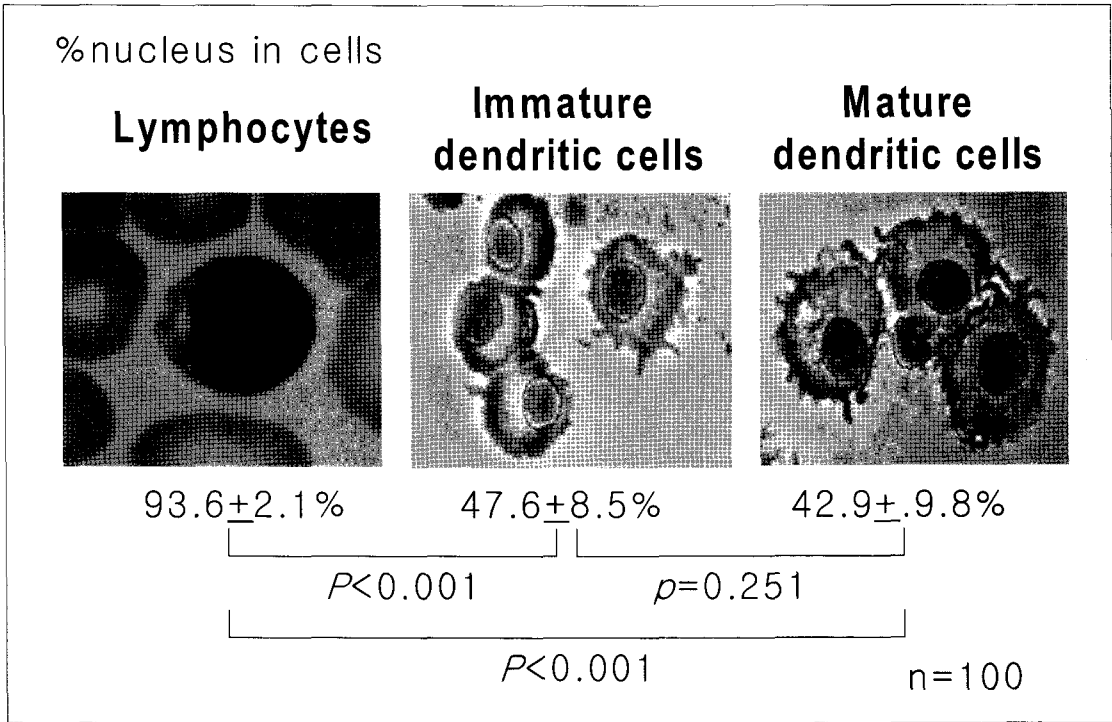


Fig. 4. Morphometric analysis of three cell groups. Percent nucleus ratio of lymphocytes is significantly higher than that of mature or immature dendritic cells.

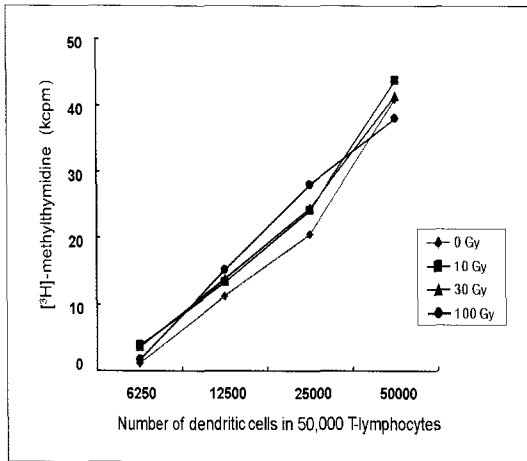


Fig. 5. Comparison of allogenic mixed lymphocyte reaction in dendritic cells with increasing radiation dose.

지되고, 이것은 세포핵의 크기와 관련이 있을 것으로 생각되었다.

면역계에서 림프구는 기능에 따라 일반적으로 B 림프구, T 림프구, 자연 살상 세포의 세 가지 집단으로 나뉘며, B 림프구는 항체를 생산하기 때문에 체액성 면역반응에 중요한 기능을 나타내고, T 림프구는 면역 반응을 조절하는 기능을 가지고 있으며 일부의 T 림프구들은 직접 세포를 파괴하는 작용을 나타내기 때문에, 세포매개성 면역반응에서도 중요하다. B 림프구 및 T 림프구가 면역작용을 나타내기 위해서는 보조세포로 수지상세포의 조절이 필요하다. 보조세포들은 항원을 림프구에 제시하기도 하고, 면역반응을 진행시키기도 하며, 항원을 제거하는 데에도 중요한 역할을 한다. 그러므로 면역조직은 이들 다양한 세포들이 상호작용을 용이하게 할 수 있도록 구성되어 있으며, 결과적으로 이들 조직에는 면역세포들이 많이 존재한다.¹⁻³⁾

골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재하며 말초혈액의 단핵구 중 1% 미만에 해당한다.⁶⁾ 수지상세포의

계통은 그들이 상주하는 해부학적인 구획에 따라 4 가지 단계로 구분할 수 있다. 전구세포는 골수와 혈액에, 미성숙 수지상세포는 말초의 림프조직이 아닌 곳에, 성숙단계 과정의 이동중인 수지상세포는 유입성 림프액과 혈액에, 그리고 성숙한 수지상세포는 2 차 림프조직에 존재한다.⁷⁾

미성숙 수지상세포는 소화관을 포함한 많은 기관의 상피와 간질조직에 존재한다.^{1,8)} 이들 미성숙 수지상세포는 항원의 포획과 처리, 대조적적합성복합체의 생산, 그리고 대조적적합성복합체-외부 펩타이드의 생성능력이 있으나, CD40, CD54, CD86 등의 부신호(accessory signals) 전달에 필요한 집락결정인자(cluster determinant, CD)가 표현되지 않아서 T 림프구를 활성화시키지는 못한다. 따라서 미성숙 수지상세포는 면역 반응을 유발하기 위해 꼭 필요한 항원을 포획해야 하므로 첫째, 탐식작용을 할 수 있고,^{9,10)} 둘째, 대세포흡수작용(macropinocytosis)을 할 수 있으며, 셋째, C형 렉틴(lectin) 수용체와 유사한 대식세포 만노스(mannose) 수용체,⁸⁾ DEC-205, Fcγ Fcε 수용체 등¹²⁾의 흡착성 세포내이입(adsorptive endocytosis)을 매개하는 수용체들이 세포막에 잘 발현되어 있어서 다른 항원제시세포들이 마이크로몰(micromolarity) 농도의 항원에 반응하는데 비하여 이들 미성숙 수지상세포들은 나노몰(nanomolarity) 또는 피코몰(picomolarity) 농도의 항원에 대하여 반응할 수 있다.¹¹⁾ 성숙단계에서 수지상세포는 IFN-α와 IL-12를 생성하고 다른 대식세포염증단백(macrophage inflammatory protein, MIP)-1γ, IL-1, IL-6, IL-15들과 함께 일차적인 면역반응을 유발한다.¹³⁾ 이러한 성숙 수지상세포는 T 림프구를 활성화시키는 능력을 갖는 대신 항원을 포획해서 처리하는 능력을 상실한다.

한편, 수지상세포를 사용한 면역 치료에 있어서 종양세포를 근절하기 위한 장기간에 걸친 집중적인 항암화학요법과 방사선 치료의 가장 치명적인 부작용은 골수의 파괴에 의한 조혈기능의 억제 또는 손상과 환자의 급격한 체력의 저하 및 전신상태의 악화이다. 방사선 치료는 물리적 형태의 치료 수단으로서 주로 X선과 감마선이 사용되며 직접 또는 세포 내부의 물로부터 자유 라디칼(free radicals)을 발

생시키는 간접적인 방법으로 종양세포의 DNA를 파괴하고 세포막 단백질 세포소기관에 손상을 준다. 결과적으로 고선량 방사선은 면역억제제로 작용하여 조혈조직이나 위장관의 상피세포를 손상시켜 세균에 대한 저항력을 떨어뜨린다. 고선량 방사선은 특히 림프구를 빠르게 손상시키므로 방사선에 조사된 개체에서 감소하는 림프구 수와 감소속도를 분석하고, 변이된 염색체를 계수하여 방사선량을 측정하는 방법은 방사선생물학 분야에서 활용되고 있다. 또한 방사선에 의한 림프구 DNA 손상 후 복구과정에서 P53 단백질이 활성화 되고,¹⁴⁻¹⁶⁾ 손상이 심한 세포가 사망에 이르는 과정의 유전자 발현과 신호전달체계를 연구하는 미시적 수준의 세포고사 연구도 활발히 진행되고 있다. 본 실험에서도 T 림프구에 대한 체외 방사선 조사 후 측정된 세포고사 빈도는 대조군에 비해, 조사선량이 증가함에 따라 유의하게 증가 하였으므로 방사선에 의한 림프구 DNA 손상을 예민하게 반영하였다.

그러나 면역계에서 림프구에 대한 상승작용을 주도하며 림프구의 활성화에 중요역할을 할 뿐 아니라 최근의 면역치료에 필수적인 수지상세포 자체에 대한 방사선 민감성 연구는 아직까지 시도된 바가 없어 연구자들은 본 연구를 시도하게 되었다. 방사선 조사 후 세포고사 빈도를 관찰한 결과 수지상세포는 방사선에 저항성을 나타내었다. 즉, 혈액 내 조혈 줄기 세포에서 분화되는 과정 중에 있는 미성숙 수지상세포와 분화가 다된 성숙 수지상세포에 선량을 증가시키면서 방사선을 조사하고 세포고사 분획을 관찰하였을 때, 대조군과 방사선조사 군 간에 유의한 차이가 없었다. 또한 방사선 조사선량과 조사 후 관찰시간에 따른 방사선 저항성의 발현경향을 보았을 때, 미성숙 수지상세포에서는 선량 및 관찰시간에 따른 차이가 없었고, 성숙 수지상세포에서는 방사선조사 후 4시간 및 48시간에 관찰한 세포고사 분획간의 차이가 있었으나, 미성숙 수지상세포의 세포고사 분획이 성숙 수지상세포의 것보다 전체 실험 군에서 높았으므로 분화가 덜된 세포가 방사선에 더 민감함을 알 수 있었다.

세포의 방사선 민감성과 관련하여 1906년에 제시된 Bergonie-Tribondeau (이하 B-T) 법칙에 의하면

세포의 방사선 감수성은 미분화 세포에서 높고 분화된 세포에서 낮으므로 유사분열률이 높아서 정상 조건하에 유사분열을 거듭하는 세포, 분열과정이 긴 세포, 형태적, 기능적 분화정도가 낮은 세포 그리고 어리고 약한 세포일수록 방사선 감수성이 높다. 따라서 같은 개체라도 세포의 종류에 따라 다르다. 또한 B-T 이후로 계속된 연구에서 Casarret 등⁵⁾은 병리학적으로 세포를 관찰하여 인체에서 방사선에 가장 민감한 세포군은 성숙한 백혈구(림프구), 적혈구 아세포, 정원세포 등이고, 가장 저항성을 지니는 세포군은 신경세포, 근세포, 섬유아세포 등으로 구분하였다.

본 실험의 결과로 보았을 때 수지상세포는 성숙형에서 방사선에 대한 저항성이 더욱 증가하였으므로 B-T 법칙으로 해석이 가능한 방사선 민감도를 나타내었다. 그러나 림프구는 분화도가 높음에도 불구하고 적혈구 등 다른 혈구세포에 비해서 방사선에 민감한 것으로 알려져 있고, 실제로 방사선량 평가의 지표로서 많이 이용 되었으며, 본 실험에서도 유의한 민감성을 보였다.

림프구가 방사선에 민감한 이유는 과거의 연구를 통해 방사선에 표적이 되는 핵의 크기가 커서 쉽게 파괴되는 것으로 유추할 수 있는데, 실제로 Sontag 등¹⁷⁾은 포유류 세포주에서 DNA에 대한 유세포분석을 통하여 방사선 민감성은 세포핵과 같은 표적의 면적에 의존한다고 보고하였다. 따라서 혈액세포에서 보이는 방사선 민감도를 분석해보면 다핵 백혈구가 상대적으로 방사선에 저항성을 보이는 것은 분화도가 높기 때문이고, 방사선에 표적이 되는 세포핵이 없는 적혈구가 림프구에 비해서 방사선 저항성을 보이는 것도 당연한 것이며, 림프구에 비해서 세포핵의 크기가 작은 수지상세포의 방사선 저항성도 유추할 수 있다. 또한 사람의 생식세포에서 보이는 방사선 민감성의 예를 보면, 과거 연구 및 사고사례를 통해 알려져 있듯이 남성에서 영구 불임을 일으키는 문턱선량이 5 Gy인 반면 여성의 영구불임을 일으키는 문턱선량은 6 Gy인 것으로 알려져 있다. 그와 같은 선량의 차이도 정자가 난자에 비해서 세포전체에서 핵이 차지하는 비율이 크기 때문인 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 수지상세포는 분화가 끝난 성숙형에 미성숙형에 비해서 더욱 저항성을 나타내었으므로 B-T 법칙에 부합하는 반면, 림프구에 비하여 표적 핵의 크기가 작은 수지상세포가 방사선에 대해 저항성을 보이는 것은 B-T 법칙에 의한 분열정도보다는 형태적인 차이에 따른 방사선 표적의 크기가 주 요인으로 작용하는 것으로 생각 할 수 있다.

본 실험으로 알게 된 수지상세포의 방사선 저항성은 분자 핵의학 분야에서 중요한 의의를 갖는다. 그 이유는 항암화학요법이나 방사선 치료에 저항성을 보이는 암 환자에서 수지상세포를 이용한 면역 치료 시, 투입된 수지상세포의 분포와 작용을 보고자 하는 것이 관심의 대상이기 때문이다. 따라서 수지상세포의 체내 분포를 영상화 하기위한 방사능을 표지하고자 할 때, 세포가 안정되게 표지되어 체내 분포를 나타내야 한다는 전제조건이 필요하므로, 방사능표지에 앞서서 세포 자체에 대한 방사선 민감도를 측정본 실험 결과는 수지상세포가 안정적으로 방사능동위원소에 표지될 수 있는 가능성을 입증하였다.

향후 연구에서 수지상세포의 방사선 저항성에 대한 정량적 지표로 T 림프구와 혼합반응을 통한 기능적 연구가 수행되고, 방사능표지 후 세포의 체내 분포를 영상화 한다면 면역치료에 관계되는 세포의 작용부위와 기전연구 분야에서 획기적인 진보를 거둘 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

목적 : 림프구와 비교되는 수지상 세포의 방사선 민감성을 보기 위하여 본 연구를 시행하였다. **대상 및 방법** : 말초혈액에서 분리한 T 림프구에 0 Gy, 10 Gy, 30 Gy의 방사선을 조사하고 4시간 후에 유세포 분석기를 이용하여 선량별 세포고사 빈도를 관찰하였다. 또한 조혈모세포에서 미성숙 및 성숙 수지상 세포를 단계적으로 분리 배양하여 각각 0 Gy, 10 Gy, 30 Gy, 100 Gy의 방사선을 조사하고 4시간, 24시간 그리고 48시간 후에 선량별 세포고사 빈도를 관찰하였다. 사이토스핀(cytospin) 슬라이드에 림프구와 미성숙 및 성숙 수지상세포를 3×10^4

개 색 분주하고 May Grunwald-Giemsa 염색한 후, 광학 현미경 하에서 각각의 세포군 당 100개의 세포에서 세포 면적당 핵의 면적 비를 측정하였다. **결과:** 림프구에서는 방사선조사 선량별로 세포고사 빈도가 유의하게 증가하였으나, 수지상 세포에서는 그 분화정도나 방사선조사 선량에 따른 세포고사의 빈도 차이가 없었다. 또한 수지상세포는 방사선선량과 관계없이 용량에 의존적으로 강력한 T-세포 자극능을 보였다. 림프구의 세포에 대한 핵의 면적 비는 미성숙 및 성숙 수지상세포의 세포에 대한 핵의 면적 비보다 현저히 큰 반면, 두 가지 수지상세포간에 유의한 차이는 없었다. **결론:** 수지상세포는 그 분화도와 상관없이 림프구에 비하여 방사선 저항성을 나타내었고, 이는 세포의 형태적 차이에 따른 표적의 크기와 관련이 있을 것으로 생각되며, 향후 분자생물학적인 연구의 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
2. Tarte K, Klein B. Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999;13:653-63.
3. Avigan D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood reviews* 1999;13:51-64.
4. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Paola RC, Bellet D, Suter M, et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5:405-11.
5. KIM JY. Radiation effects on cellular systems. In: Basic Radiobiology. Seoul: *Ryo Moon Gak*; 1987. p. 65-85.
6. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNI. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;93:728-36.
7. Austyn JM. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1996;183:1287-92.

8. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: Their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 1996;183:1865-78.
9. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic Cell progenitors phagocytose particulates, including Bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993;178:479-88.
10. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC I and MHC II presentation to T cells. *J Immunol* 1997;158:4229-36.
11. Sallusto F, Cella M, Danieli C and Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400.
12. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulation factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
13. Lotze MT. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann Surg* 1997;226:1-5.
14. Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. P53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995;81:1013-20.
15. Jayaraman L, Prives C. Activation of P53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the P53 C-terminus. *Cell* 1995;81:1021-9.
16. McCarthy SA, Symonds HS, Dyke TV. Regulation of apoptosis in transgenic mice by simian virus 40 T antigen-mediated inactivation of P53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3979-83.
17. Sontag W, Knedlitschek G, Weibezahn KF, Dertinger H. The DNA content of some mammalian cells measured by flow cytometry and its influence on radiation sensitivity. *Int J Radiat Biol* 1990;57:1183-93.