

Serine protease 억제제인 4-(2-aminoethyl) benzensulfonylfluoride (AEBSF)에 의한 호중구의 자연 세포사멸의 지연과 수지상 세포로의 전이분화 연구

박해영 · 광종영*

동아대학교 암분자치료연구센터, 의과대학 생화학교실

Received May 28, 2007 / Accepted June 18, 2007

Effects of AEBSF on the Delay of Spontaneous Apoptosis and the Trans-Differentiation of Human Neutrophils into Dendritic Cells. Hae Young Park and Jong Young Kwak*. *Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, Department of Biochemistry, School of Medicine, Dong-A University, Busan 602-714, Korea* – Neutrophils play a key role as a first line of defense and are known to acquire the characteristics of dendritic cells (DCs) under the appropriate conditions. The spontaneous apoptosis of neutrophils was delayed by treatment with 4-(2-aminoethyl) benzensulfonylfluoride (AEBSF), a serine protease inhibitor. AEBSF inhibited both caspase-3 and serine protease activities, whereas zVAD-fmk, a pancaspase inhibitor, inhibited only caspase-3 activity. The life span of neutrophils was prolonged up to 5 days by AEBSF in the presence or absence of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). DC surface markers, such as CD80, CD83, and MHC class II were not expressed on neutrophils treated with AEBSF alone. GM-CSF failed to prolong the survival time of neutrophils up to 3 days but increased the expression levels of DC markers on neutrophils in the presence of AEBSF. Expression levels of DC markers were the highest on neutrophils treated with GM-CSF and AEBSF for 3 days. AEBSF and GM-CSF-treated neutrophils stimulated proliferation of T cells in the presence of a superantigen, *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB) but produced interferon- γ (IFN γ) in the absence of SEB. These results suggest that the inhibition of serine protease activity prolonged the life span of human neutrophils and combined treatment of neutrophils with GM-CSF and serine protease inhibitor induced differentiation of neutrophils into DC-like cells.

Key words – Trans-differentiation, Apoptosis, Dendritic cells, Neutrophils, Serine protease, AEBSF

서 론

호중구는 체내로 침입하는 미생물을 탐식하고 사멸시키는 역할을 가지는 세포로서 생체방어 작용을 하는데 우선적으로 동원된다[6]. 그러나 활성 산소종 등의 생성물에 의해 조직 손상을 동반하기도 하므로 활성화된 기능을 억제하는 것과 함께 호중구의 세포사멸의 조절은 염증 반응의 종결을 위하여 필수적이며 중요하다고 알려져 있다[7,20]. 정상 호중구는 자가 조절에 의해 세포사멸로 들어가거나 염증세포들에서 분비되는 Fas 리간드(FasL)에 의해 세포사멸이 진행되어 대식세포에 탐식된다[10]. 말초 혈액이나 조직에서 호중구의 생존기간은 여러 자극제들에 의하여 세포사멸이 지연되거나 촉진됨으로써 다양하게 나타난다.

수지상 세포(Dendritic cell)는 항원 제시 기능을 통해 T-세포를 증식시키고 활성화시킴으로써 면역 반응 조절에 중요한 역할을 하는 면역세포이다[19]. 수지상 세포는 혈액 중에 매우 적은 양으로 존재하고 골수 줄기세포로부터 분화된다. 시험관 내에서 단핵구로부터 분화시켜 얻은 수지상 세포를

면역세포치료에 활용하거나 수지상 세포의 연구에 많이 이용하고 있다[11]. 최근 단핵구 뿐만 아니라 호중구도 적합한 조건의 배양 상태에서 수지상 세포로 전이분화(trans-differentiation) 된다는 보고들이 있다[11]. 대표적으로 granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 또는 interferon- γ (IFN γ)와 함께 일정 기간 동안 배양한 호중구는 형태적으로나 기능적으로 수지상 세포로 분화된다고 보고되었다 [4,5,11,16].

배양된 호중구는 24시간 후 60~70%가 세포사멸되는 짧은 수명을 가진 세포로서 호중구가 수지상 세포로의 전이분화되는 과정에서 세포사멸의 지연은 필수적인 요건이다. 호중구의 세포사멸은 caspase-의존성과 비의존성으로 일어난다고 알려져 있다[8]. Caspase-비의존성 세포사멸에서는 serine protease가 관여할 것이라는 것이 제안되고 있다 [12]. 따라서 본 연구에서 caspase 억제제인 zVAD-fmk와 비교하여 serine protease 억제제인 4-(2-aminoethyl) benzensulfonylfluoride (AEBSF)[12,13]가 호중구의 세포사멸에 어떠한 영향을 주는가를 조사하였고 caspase 및 serine protease 억제제들이 수지상 세포로의 전이분화에도 영향이 있는가를 조사하였다. 본 연구에서 AEBSF가 단독으로는 호중구에서 수지

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2706, Fax : +82-51-241-6940

E-mail : jykwak@dau.ac.kr

상 세포로의 전이분화에 영향을 주지 않았으나 GM-CSF에 의한 전이분화 능력을 증가시킨다는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 AEBSF를 분화제로 널리 사용되는 사이토카인 중의 하나인 GM-CSF와 함께 처리하여 분화제가 작용할 수 있는 시간을 연장시킴으로써 기존의 분화 시스템이 가진 한계를 보완할 수 있는 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

시약

Giemsa 시약은 Fluka사(Bushes, Switzerland) 제품을 사용하였으며, 텍스트란은 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다. 세포 표면 마커 발현 측정 실험에 사용한 fluorescein isothiocyanate (FITC)와 phycoerythrin (PE) 형광이 표지된 CD80, CD83, MHC class II, 대조군 항체들(IgG1형)과 apoptosis detection kit은 BD Pharmingen사(Flanklin Lakes, NJ), T-세포 분리에 사용한 CD3 MACS magnetic bead는 Miltenyi biotec사(Auburn, CA) 로 부터 구입하였다. AEBSF는 Roche Diagnostics사(Indianapolis, IN), zVal-Ala-Asp-fluoromethylketone (zVAD-fmk)은 Calbiochem사(La Jolla, CA) 로 부터 구입하였고 사람 재조합 GM-CSF는 R&D Systems 사(Minneapolis, MN) 로 부터 구입하여 사용하였다. RPMI-1640 배양액은 Gibco-BRL 사(Rockville, MD, USA) 로 부터 구입하였으며 *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB), Histopaque와 다른 기초 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA) 로 부터 구입하였다.

호중구의 분리 및 배양

말초 혈액으로부터 호중구의 분리는 Son 등[22]과 같은 방법을 사용하였다. 혈액(100 ml)은 0.1 M EDTA, pH 7.4와 0.9% NaCl이 들어있는 수혈용 팩에 채혈한 후 이 혈액에 텍스트란을 넣고 조심스럽게 섞은 다음 플라스틱 실린더에 1시간 동안 침전시켰다. 호중구를 포함하는 혈장 성분 층을 분리하여 4°C에서 850×g로 15분 동안 원심분리하고 침전된 세포를 20 ml의 완충액 A(8.0 mM Na₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.6 mM CaCl₂, pH 7.4)에 부유시킨 다음 증류수를 넣어 흔들어 적혈구를 제거하였다. 임파구 분리 용액을 세포층 아래쪽에 조심스럽게 넣고 850×g에서 30분간 원심분리하여 중간 층에 존재하는 임파구는 버리고 침전된 과립구 층은 11 mM 글루코오스와 1 mg/ml 소 혈청 알부민을 첨가한 완충액 B(25 mM Hepes pH 7.4, 125 mM NaCl, 0.7 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA)에 부유시켜 사용하였다.

세포사멸의 형태적 관찰

호중구는 여러 가지 형태의 핵을 가진 세포로서 세포사멸

이 일어날 경우 핵 모양의 변화가 일어난 세포의 수로서 그 정도를 측정하였다[14]. Cytospin에서 500×rpm으로 1분간 원심 분리한 다음 메탄올로 고정시키고 May-Grunwald Giemsa 염색액으로 염색하였다. 호중구의 세포사멸 정도는 400배 현미경 시야에서 최소한 300개의 세포 중에서 특이적인 변화가 나타난 세포를 확인하여 %로 표시하였다.

Flow cytometry 측정

세포사멸의 양적 측정은 phosphatidylserine의 세포막으로의 노출과 propidium iodide (PI) 염색 정도를 apoptosis detection kit을 사용하여 annexin V-FITC 형광 결합 정도로 측정하였다. 세포사멸의 정도는 %값으로 나타내었다. 수지상 세포 표면 마커 발현의 양적 측정은 FITC와 PE 형광이 부착된 항체를 사용하여 형광 결합 정도를 측정하였고 실험에 사용한 항체들과 같은 면역글로블린을 가진 항체(isotype)를 이용하여 mean fluorescence intensity (MFI) 값을 보정하여 표시하였다. 간단히 실험 방법을 나타내면, 호중구(1×10^6)를 채취하여 인산완충액으로 1회 세척한 후, annexin V-FITC와 PI 그리고 항체 부착 수지상 세포 표면 마커를 각 15분 및 30분간 4°C에서 반응시켰다. 반응시킨 세포의 일부(1×10^4)를 flow cytometry를 이용하여 측정하였다[14].

Protease 활성 측정

Protease의 활성은 tripeptide thiobenzyl ester (Boc-Als-Pro-Nva-SbzI)가 가수 분해되는 정도를 측정하여 나타냈다. 세포 용해물(100 µg/ml)을 완충액(6.5 mM Boc-Ala-Pro-Nva-SBzl, 16 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, 100 mM HEPES, pH 7.2, 0.5 mM NaCl)과 1시간 동안 반응시킨 후, 흡광도 정량법을 이용하여 405 nm에서 효소 활성을 측정하였다[12].

Caspase-3 활성 측정

1×10^7 개의 세포를 50 µl의 용해 완충액(10 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin)에 넣고 적당히 섞어준 후, 세포 용해물을 50 µM의 caspase-3의 기질인 Ac-DEVD-pNa를 포함하고 있는 200 µl의 반응 완충액(25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT)에 나누어 담았다. 그리고 실온에서 90분간 반응 후, 흡광도 정량법을 이용하여 405 nm에서 효소 활성을 측정한다. 활성도는 pmol/sec.mg 단백질 단위로 표기하였다[12].

T-세포 증식 실험

AEBSF와 사이토카인을 처리한 호중구를 Park 등[13]과 같은 방법으로 T-세포 증식능을 측정하였다. 건강한 공여자의 혈액으로부터 CD3 항체가 결합된 MACS magnetic beads

를 이용하여 T-세포를 분리하였다. 분리한 T-세포의 순도는 FITC가 결합된 CD3 항체를 이용하여 확인하였으며 분리된 T-세포의 순도는 95% 이상이었다. 혈액은 공여자과 동아대학교의 윤리위원회(Institutional Review Board)의 승낙을 얻어 사용하였다. AEBSF와 함께 20시간 배양한 호중구를 수집하여 배양배지로 세척한 후, 1×10^5 개의 T-세포와 함께 96-well 배양 플레이트에 함께 5일간 배양하였다. 호중구와 T-세포를 SEB를 처리하거나 또는 처리하지 않은 상태에서 함께 4일 동안 배양 후 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]thymidine을 처리하고 액체섬광계수기를 이용하여 방사성 동위 원소 결합력을 측정하였다. T-세포만을 단독 배양하여 대조군으로 이용하였다.

사이토카인 측정

T-세포 증식 실험과 같은 방법으로 호중구와 T-세포를 2일 동안 함께 배양한 후, 상층 액을 수집하고 ELISA kit(R&D system사)을 이용하여 생성된 IFN γ 의 양을 측정하였다. 이 실험을 R&D사에서 제공한 사용자 지침서를 참고로 하여 실험하였다[13].

통계처리

세포사멸 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다. 통계학적 유사성은 자료들의 분포를 확인하고 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 P 값이 0.05 이하이면 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

호중구의 자연 세포사멸에 대한 AEBSF의 영향

호중구의 세포사멸을 관찰할 수 있는 방법은 여러 가지가 있으나 가장 특징적이고 간단하게 확인할 수 있는 방법은 Giemsa 염색을 통한 형태학적 관찰 방법이다. 이 방법은 세포사멸이 일어나는 동안 핵이 농축되고 그 후 분획되며 세포질에 액포가 나타나는 것이 다른 세포와 비교해 확연히 나타나는 호중구의 특징을 이용한 것이다[22]. 호중구를 분리하여 배양 상태에서 20시간이 지나면 60~70%의 세포는 핵의 응축 등 세포사멸의 형태를 보이나 800 μM 의 AEBSF를 처리하였을 때 형태적으로 80%의 세포가 대부분 정상으로 유지되었다(Fig 1A). Fig. 1B에서와 같이 이러한 세포사멸의 정도를 annexin V와 PI 염색으로 관찰하였을 때도 AEBSF를 처리한 경우에는 처리하지 않은 대조군에 비교하여 세포사멸의 정도가 현저히 감소하는 것으로 나타났다($78.0 \pm 0.5\%$ vs. $4.0 \pm 0.5\%$, $P < 0.005$). 이러한 결과는 호중구의 자연 세포사멸이 AEBSF에 의하여 억제된다는 것을 제시한다.

AEBSF에 의한 호중구의 자연 세포사멸 유도에서 caspase와 serine protease 활성의 변화

호중구의 자연 세포사멸 동안에는 caspase와 serine protease

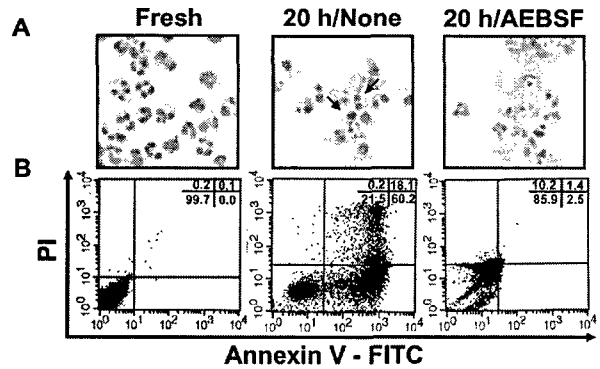


Fig. 1. Delay of spontaneous apoptosis of human neutrophils by AEBSF. (A) Cytopsin preparations of neutrophils after incubation *in vitro* for 20 hr in the presence or absence of 800 μM AEBSF were stained with Giemsa solution. Solid arrows indicate apoptotic cells. (B) Neutrophils (2×10^5) were cultured with or without AEBSF for 20 hr and cell death was assessed by annexin V-FITC and PI staining. Results are representatives of three independent experiments. The numbers represent percentages of total cells counted.

활성이 증가한다[12]. 따라서 pancaspase 억제제인 zVAD-fmk와 serine protease 억제제인 AEBSF를 각 100 μM 과 800 μM 의 농도로 처리하고 20시간 배양한 후, Giemsa 염색을 통한 세포 수, protease의 활성과 caspase-3의 활성을 비교하였다. zVAD-fmk와 AEBSF를 처리하고 함께 배양하였을 때 사멸된 세포는 모두 $10.0 \pm 0.5\%$ 로 현저하게 감소함으로써 두 억제제는 20시간 배양한 세포에서 거의 같은 정도의 세포사멸 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2A). 말초 혈액으로부터 분리한 신선한 호중구는 caspase-3와 protease의 활성을 거의 나타내지 않았지만 20시간 배양 후에는 두 가지 활성 모두 증가하였다. 이들 배양 세포들에서 나타나는 caspase-3의 활성은 zVAD-fmk와 AEBSF에 의하여 모두 억제되는 것과 비교하여 protease의 활성은 AEBSF에 의해서만 효과적으로 억제되었다(Fig. 2B).

GM-CSF와 AEBSF에 의해 세포사멸이 지연된 호중구에서 수지상 세포 표면 마커의 발현

세포사멸을 지연시킬 뿐만 아니라 수지상 세포로의 분화제로 가장 많이 사용되어 지고 있는 GM-CSF[1,7,11]와 AEBSF의 세포사멸과 수지상 세포의 표면 마커의 발현 정도에 대한 영향을 비교하여 측정하였다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 GM-CSF나 zVAD-fmk를 단독 처리하였을 때 배양 후 1일에는 세포사멸이 30% 정도로 억제되었으나 배양 3일 후 부터는 대부분의 세포는 세포사멸이 일어나 형태적으로 관찰되어지는 정상 세포는 극히 적었다. 그러나 AEBSF 단독 처리만으로도 배양 3일과 5일에도 호중구의 세포사멸은 20-30%로 억제되었다. AEBSF와 zVAD-fmk를 처리한 배양 조건에

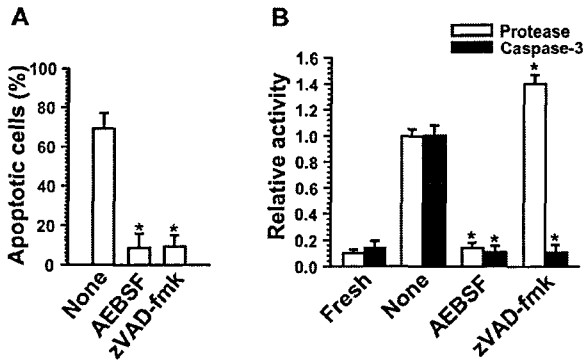


Fig. 2. Effects of caspase and serine protease inhibitors on the spontaneous apoptosis of neutrophils. (A) Neutrophils were incubated with or without 800 μ M AEBSF or 100 μ M zVAD-fmk for 20 hr and the apoptotic cells were identified as in Fig. 1A. Results represent means \pm SD of three independent experiments. (B) Neutrophils were treated as in panel A. The activities of caspase-3 and protease were measured as described in "Materials and Methods". Data was calculated and represented as relative activity. Results are representatives of three independent experiments. * P < 0.01 compared with None.

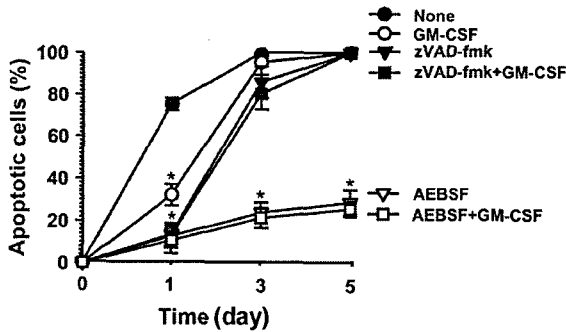


Fig. 3. Prolonged anti-apoptotic effects of AEBSF in neutrophils. Neutrophils (2×10^7) were incubated with or without AEBSF or zVAD-fmk in the presence or absence of GM-CSF (10 ng/ml) for indicated times and the apoptotic cells were identified by their morphology as in Fig. 1A. Results are representatives of three independent experiments. * P < 0.01 compared with None.

서 GM-CSF를 함께 처리한 세포에서 세포사멸 정도를 비교하여 보았을 때 AEBSF와 zVAD-fmk에 의한 세포사멸의 정도는 GM-CSF에 의하여 큰 영향을 받지 못하였다. 따라서 serine protease를 사용한 억제 조건이 호중구의 세포사멸을 지속적으로 억제한다는 것을 알 수 있다.

다음으로 AEBSF와 GM-CSF에 의해 세포사멸이 효과적으로 억제되는 1일 그리고 비교적 세포사멸 억제능이 감소하지만 여전히 80% 이상 살아 있는 호중구가 존재하는 3일째와 5일째 배양한 세포에서 수지상 세포 표면 마커의 발현 정도를 측정하였다. 배양 1일과 3일째 모두에서 CD80, CD83, 및

MHC class II의 발현이 모두 증가하였는데 이들 중 MHC class II의 증가는 CD80과 CD83에 비교하여 낮은 정도의 발현 증가를 보였다. 그러나 배양 후 5일에는 배양 후 3일째와 비교하여 이들의 발현은 모두 감소하였다. 수지상 세포 표면 마커가 가장 많이 발현되는 3일째에 AEBSF의 단독 처리와 GM-CSF와 AEBSF의 병용 처리하였을 때 마커의 발현 정도를 비교하였다. AEBSF 단독 처리한 세포들에서 수지상 세포 표면 마커의 발현은 신선한 호중구와 비교하여 그다지 높지 않았으나 AEBSF와 GM-CSF를 함께 처리한 세포에서는 모두 높게 발현되었다(Fig 4B). AEBSF와 GM-CSF를 처리한 세포에 추가적으로 IL-4, IFN γ , 및 TNF- α [25]를 함께 처리하였을 때 발현의 정도는 AEBSF와 GM-CSF를 처리했을 때와 거의 유사하였다(결과 미제시).

GM-CSF와 AEBSF를 처리한 호중구의 T-세포 활성화

AEBSF와 GM-CSF를 처리하여 3일 동안 배양한 호중구가 T-세포의 증식을 자극할 수 있는지를 혼합 임파구 배양 실험

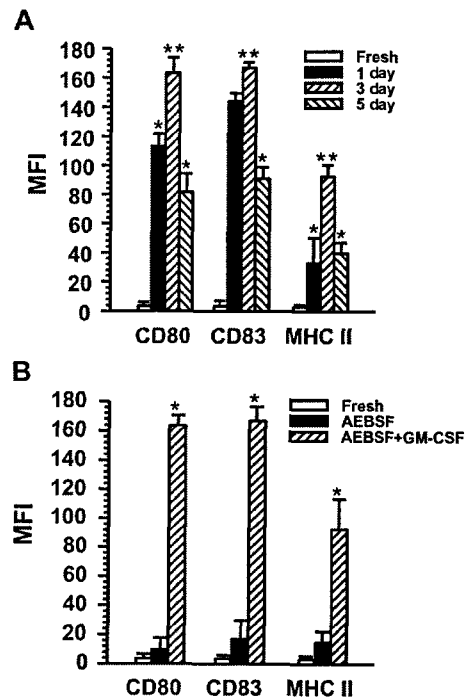


Fig. 4. Expression levels of DC markers on AEBSF and GM-CSF-treated neutrophils. (A) Neutrophils were incubated with AEBSF and GM-CSF for indicated times. (B) Neutrophils were incubated with AEBSF and/or GM-CSF for 3 day. The expression levels of CD80, CD83 and MHC class II were then analyzed by flow cytometry using FITC- or PE-conjugated antibodies. Data was expressed as percentages of stained cell on total cells (10^4 cells). Results are means \pm SD of three separate experiments. * P < 0.01 and ** P < 0.005 compared with Fresh.

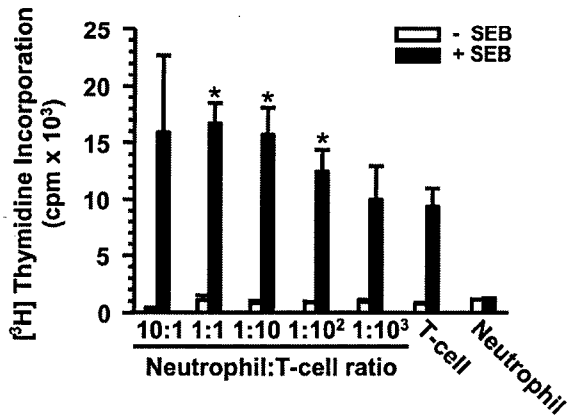


Fig. 5. Effects of AEBSF and GM-CSF-treated neutrophils on T-cell proliferation. Neutrophils (2×10^5) were incubated with AEBSF and GM-CSF for 3 day, harvested with AEBSF and GM-CSF for 3 day, washed two times with PBS, and mixed with T cells (1×10^5) in the indicated ratios. T-cells alone, fresh neutrophils alone, and the cell mixtures were cultured for 5 day in the presence or absence of SEB ($1 \mu\text{g/ml}$) and then further cultured for 16 h after adding $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]thymidine. The incorporation of [^3H]thymidine was determined using a scintillation counter. Results are presented as the means \pm SD of triplicate cultures. * $P < 0.01$ compared with T-cell alone.

을 이용하여 측정하였다[13]. AEBSF와 GM-CSF를 처리하여 3일간 배양한 호중구를 T-세포와 함께 배양하고 5일 후 T-세포의 증식 정도를 측정하였을 때 T-세포의 증식은 일어나지 않았다(Fig. 5). 그러나 SEB와 함께 5일 동안 같이 배양하였을 때 T-세포의 증식은 호중구:T-세포의 혼합비율이 1:1 과 1:100 사이에서 증가하였다. 또한 T-세포의 증식을 자극하는 것으로 알려진 IFN γ 의 생성을 측정하였을 때 1:100 혼합 비율에서 IFN γ 의 생성이 증가하였다(Fig. 6). T-세포를 자극하는 SEB를 같이 처리하여 배양한 경우에는 호중구와 T-세포의 혼합 비율에 관계없이 T-세포에 SEB를 처리한 것과 비슷한 정도의 IFN γ 를 생성하였다. 이와 같은 결과는 AEBSF와 GM-CSF를 처리한 호중구는 그 정도는 약하지만 T-세포의 증식능력을 가지고 있다는 것을 제시한다.

고 찰

호중구는 식균 작용과 세포 독소 화합물의 생성을 통해 일차 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하지만 항원 제시나 특정 T-세포 자극을 통한 면역 반응에는 관여하지 못한다. 또한 체내에 침입한 미생물을 제거하는 역할을 하므로 염증이 발생한 조직에서 많이 발견된다. 하지만 이 과정에서 생성된 활성 산소종과 여러 가지 반응 생성물에 의해 조직 손상 등의 부작용을 초래할 수 있으므로 세포사멸이 엄격하게 자가 조절된다[7,20]. 본 연구에서는 호중구의 세포사멸이 지

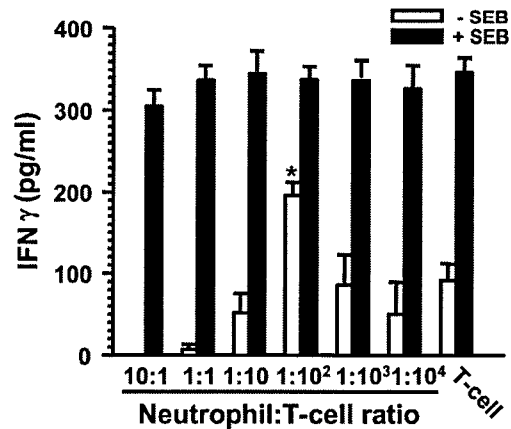


Fig. 6. Production of IFN γ in mixtures of AEBSF and GM-CSF-treated neutrophils and T cells. Neutrophils were treated as in Fig. 5 and mixed with T-cells (1×10^6) in the indicated ratios and cultured for 2 day in the presence or absence of SEB. Cultured fluid was withdrawn and concentration of IFN γ were measured using ELISA kit. Results are presented as the means \pm SD of triplicate assay from two separate cultures. * $P < 0.01$ compared with T-cell alone.

연되고 GM-CSF와 같은 사이토카인의 영향에 의하여 호중구도 항원 제시 세포와 같은 기능을 가지는 세포로 전이분화될 수 있다는 점을 제시하고 있다.

항원 제시 세포 중 수지상 세포는 가장 강력한 항원 제시 세포로서 일차 면역 반응을 시작하게 하는 중요한 역할을 수행하는데[23], 이들은 분화 기원과 정도에 따라 여러 가지 아 집단 세포형태로 나눌 수 있으며 그 기능에도 차이가 있다[11]. 수지상 세포로의 분화는 골수와 제대혈로부터 분리한 CD34⁺ 세포로부터 GM-CSF와 TNF- α 에 의하여 일어나거나 [1] 말초 혈액으로부터 분리한 단핵구로부터 GM-CSF, IL-4, 또는 IL-13을 처리한 경우에 일어난다는 것으로 보고되었다[15,17,18] 또한 호중구의 전세포에 GM-CSF, TNF- α , 및 IL-4를 처리하여 7일 간 배양한 후 CD40 리간드와 GM-CSF를 처리하여 2일간 더 배양한 경우에 성숙한 수지상 세포가 된다는 보고도 있다[11]. 그러나 그동안 말초혈액으로부터 분리한 호중구를 분화제로 널리 사용되고 있는 GM-CSF와 여러 가지 사이토카인 혼합액을 처리해서 얻은 세포에서 기능이 완전한 수지상 세포로 되는 세포 수는 극히 적었다. 이러한 결과는 호중구의 짧은 수명 때문에 분화제로 사용한 사이토카인들과 배양 시스템이 제대로 역할을 하지 못한 것이라 생각되며 특히 사이토카인들만으로는 호중구의 수명을 2일 이상 연장시키기에는 어려움이 있으며 수명이 연장된 세포 수 또한 현저히 감소하였다. 따라서 본 연구에서와 같이 분화제들에 의해 호중구가 분화될 수 있는 충분한 시간을 제공하기 위해서는 호중구의 자가 세포사멸을 억제해야 하며 이는 세포사멸을 조절하는 정밀한 신호전달 과정의 조절을

통해 가능할 것이라 추측된다.

호중구의 세포사멸은 세포사멸을 지연시키거나 유도시키는 자극제들에 의해 세포사멸 정도가 조절될 수 있으며[14, 23] 세포사멸의 신호전달 과정은 CD95(Fas/Apo-1), TNF 수용체 등과 같은 세포막 수용체, p53과 같은 세포주기 조절인자 그리고 calpain, caspase와 같은 단백질 분해 효소들에 의해 조절된다[3]. 특히 호중구의 경우 caspase라고 불리는 cysteine protease family (caspase-3, -8, 및 -9)가 세포사멸에 큰 영향을 끼치지만, caspase 비의존적인 세포사멸 신호전달 기작도 존재한다[7]. Caspase 비의존적인 세포사멸 과정의 일부는 calpain과 같은 protease에 의해 조절되기도 한다. 본 연구에서는 serine protease의 억제제인 AEBSF가 호중구의 세포사멸을 강력히 억제하였는데 호중구의 serine protease에는 proteinase-3 (PR-3)[24], elastase, 및 cathepsin G가 있으며 이 중 PR-3가 AEBSF에 의한 세포사멸에 관여할 것이라는 것을 본 연구진이 보고한 바 있다[12]. 호중구는 자연적인 세포사멸 과정이 진행되면서 caspase-3와 protease의 활성도가 증가하는데 일반적으로 pancaspase 억제제인 zVAD-fmk와 PR-3와 같은 호중구의 serine protease 억제제인 AEBSF에 의해 세포사멸을 억제할 수 있다. 형태학적인 관찰을 통해 유사한 세포사멸 억제 능력을 가진 두 가지 억제제를 비교해 보면 zVAD-fmk가 caspase-3의 활성만을 감소시키는 것에 반해 AEBSF는 caspase-3와 protease의 활성 모두를 감소시키는 차이를 보이는 것으로 보아 호중구의 세포사멸의 조절에서는 serine protease의 역할이 매우 중요한 것으로 보인다[12]. 본 연구에서와 유사하게 세포사멸 유도제로 널리 이용되는 단백질 키나아제 억제제인 staurosporine에 의해 상피세포인 Mv1Lu의 세포사멸이 진행되는 동안 zVAD-fmk는 caspase-3의 활성은 억제시키지 못하였지만 AEBSF는 caspase-3와 TGF- β 의 활성 모두를 억제하여 세포사멸을 효과적으로 억제한다고 하였다[21]. 또한 all-trans-retinoic acid에 저항성을 가진 NB4 세포와 급성 전골수성 백혈병의 배아 세포에서 CD44와 A3D8 단일클론 항체와의 결합에 의해 유도되어지는 세포사멸은 일반적으로 사용되는 caspase 억제제에 의해 감소되지만 TNF 수용체 신호전달에 비의존적인 세포사멸의 경우는 AEBSF에 의해서만 억제될 수 있다고 보고되고 있다[9]. 이와 같은 연구 결과들로 보아 세포사멸에서 serine protease의 역할은 caspase와는 다른 경로를 통하여 이루어질 것으로 추측된다.

AEBSF를 처리하여 배양한 호중구는 세포사멸이 3~5일 까지 지연되었으며 GM-CSF를 같이 처리하였을 때는 AEBSF 단독 처리 때와는 달리 배양 3일 째에 수지상 세포에서 나타나는 세포 표면 마커의 발현이 증가하였다. 또한 이들과 T-세포를 같이 배양한 혼합 입파구 배양 실험을 통해 T-세포의 증식 정도를 측정해 본 결과 이들은 T-세포를 자극하여 증식

력을 증가시켰으며 선천면역과 세포매개 특이 면역에서 중요한 역할을 하고 보조 T-세포와 Th1 아집단의 특정 사이토카인으로 알려진 IFN γ 도 생성하였다. 수지상 세포에 caspase 억제제를 처리하여 세포사멸을 억제하였을 경우 T-세포의 자발적인 세포사멸을 유도한다는 보고가 있으나[2] 본 실험에서는 호중구에 AEBSF를 처리하여 배양한 후 세척과정을 통해 남아 있는 AEBSF를 완전히 제거하였으며 또한 AEBSF를 직접 T-세포에 처리해 본 결과 T-세포의 증식 능력과 세포사멸에는 영향을 주지 않음을 확인하였다(결과 미제시). 이러한 결과는 AEBSF와 GM-CSF에 의해 호중구는 수명이 연장되고 수지상 세포가 가지는 일부의 기능을 가지기는 하지만 이들은 완전한 성숙 단계의 수지상 세포라기보다는 수지상 세포의 기능을 일부 가지는 수지상 세포-유사 세포이거나 미성숙한 단계의 수지상 세포라고 생각된다.

본 연구에서 호중구를 이용하여 기능적으로 완전한 수지상 세포를 만들지는 못하였지만 백혈구 세포 중 가장 많은 비율을 차지하는 호중구가 세포사멸이 지연되는 환경에서 수지상 세포와 같은 역할을 할 가능성을 제시하였다. 또한 이러한 배양 기술을 발전시켜 이용한다면 상대적으로 많은 수의 수지상 세포를 얻을 수 있는 분화기술 개발을 통해 보다 쉽게 세포 치료제로서 수지상 세포를 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 이미 알려진 분화제와 분화 시스템을 이용한 실험이 아니라 세포사멸 신호전달 과정의 조절을 통해 분화를 시도하는 방법을 통해 분화 과정과 세포 내부의 신호전달 과정의 관계에 대한 이해를 통해 수지상 세포 분화 연구에 있어서 또 다른 가능성을 보여주고 있다.

요 약

생체 면역반응에 중요한 역할을 하는 호중구의 세포사멸은 자연적으로 일어나거나 여러 외부자극에 의한 신호의 전달에 의해 증가하거나 지연된다. 또한 사이토카인과 같은 분화제에 의해 세포사멸이 지연되고 항원 제시 기능을 가진 수지상 세포로 분화되기도 한다. 본 연구에서는 세포사멸 억제제와 사이토카인을 이용한 시스템에서 호중구가 수지상 세포로 분화되는가를 조사하였다. Pancaspase와 serine protease의 억제제인 zVAD-fmk와 AEBSF를 처리하였을 때 호중구의 세포사멸은 현저히 감소되며 AEBSF는 caspase-3와 serine protease 활성을 모두 억제하였다. 호중구의 세포사멸을 효과적으로 억제하는 AEBSF와 함께 분화제로 널리 쓰이는 GM-CSF를 같이 처리하여 3일 동안 배양하면 수지상 세포에서 높이 발현되는 CD80, CD83 및 MHC class II의 세포 표면 마커의 발현이 증가하였다. AEBSF와 GM-CSF를 처리한 호중구를 T-세포와 함께 배양하였을 때 SEB가 존재할 경우 T-세포가 증식되었으며 SEB가 없어도 IFN γ 는 생성되었다. 이들 결과들로부터 serine protease 억제제인 AEBSF를

호중구에 처리하여 세포사멸을 효과적으로 억제하는 것과는 수지상 세포로의 분화를 촉진하는 사이토카인인 GM-CSF의 작용을 나타내게 하는 조건과는 서로 상호적으로 연관되어 작용할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 동아대학교 학술 연구조성비에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau. 1996. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF- α . *J. Exp. Med.* **184**, 695-706.
- Chen, M., L. Huang, Z. Shabier and J. Wang. 2007. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol. Immunol.* **44**, 2558-2565.
- Choi, E. J. 2001. Apoptosis signaling pathways. *Exp. Mol. Med.* **33**, 85-95.
- Iking-Konert, C., C. Wagner, B. Deneffe, H. F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2002. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN) : divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.* **130**, 501-508.
- Iking-Konert, C., C. Cseko, C. Wanger, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2001. Transdifferentiation polymorphonuclear neutrophils : acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J. Mol. Med.* **79**, 464-474.
- Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo and S. J. Klebanoff. 1996. Differential expression of Fas(CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* **184**, 429-440.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, T. W. Kuijpers and D. Roos. 2004. Apoptosis of neutrophils. *Acta. Haematol.* **111**, 56-66.
- Maianski, N., A. D. Roos and T. W. Kuijpers. 2003. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* **101**, 1987-1995.
- Maquarre, E., C. Artus, Z. Gadhoun, C. Jasmin, F. Smadja-Joffe and J. Robert-Lezenes. 2005. CD44 ligation induces apoptosis via caspase- and serine protease-dependent pathways in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* **19**, 2296-2303.
- Murray, J., J. A. J. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. V. Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett and E. R. Chilvers. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α : Requirement of TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* **90**, 2772-2783.
- Oehler, L., O. Majdic, W. F. Pickl, J. Stockl, E. Riedl, J. Drach, K. Rappersberger, K. Geissler, and W. Knapp. 1998. Neutrophil Granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* **187**, 1019-1028.
- Park, H. Y., M. G. Song, J. S. Lee, J. W. Kim, J. O. Jin, J. I. Park, Y. C. Chang and J. Y. Kwak. 2007. Apoptosis of human neutrophils induced by protein phosphatase 1/2A inhibition is caspase-independent and serine protease-dependent. *J. Cell Physiol.* **212**, 450-462.
- Park, H.Y., J. Y. Park, J. W. Kim, M. J. Lee, M. J. Jang, S. Y. Lee, D. W. Baek, Y. M. Park, S. W. Lee, S. Yoon, Y. S. Bae and J. Y. Kwak. 2004. Differential expression of dendritic cell marker by all-trans retinoic acid on human acute promyelocytic leukemic cell line. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 1587-1601.
- Park, M. A., M. J. Lee, S. H. Lee, D. K. Jung and J. Y. Kwak. 2002. Anti-apoptotic role of phospholipase D in spontaneous and delayed apoptosis of human neutrophils. *FEBS Lett.* **519**, 45-49.
- Piemonti, L., S. Bernasconi, W. Luini, Z. Trobonjaca, A. Minty, P. Allavena and A. Mantovani. 1995. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 245-252.
- Radsak, M., C. Iking-Konert, S. Stegmaier, K. Andrassy and G. M. Hansch. 2000. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation : major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* **101**, 521-530.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180**, 83-93.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118.
- Shortman, K. and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* **2**, 151-161.
- Simon, H. U. 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* **193**, 101-110.
- Solovyan, V. T. and J. Keski-Oja. 2006. Proteolytic activation of latent TGF-beta precedes caspase-3 activation and enhances apoptotic death of lung epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **207**, 445-453.
- Son, D. H., S. Y. Lee, M. J. Lee, J. I. Park, Y. S. Hong, Y. H. Lee, Y. C. Chang and J. Y. Kwak. 2005. Induction of spontaneous neutrophil apoptosis by 4-O-Methyl-Ascochlorin, A Prenyl Phenol compound. *J. Life Sci.* **15**,

- 30-36.
23. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.
 24. Wu, C. H., J. Gordon, M. Rastegar, B. Ogretmen and A. R. Safa. 2002. Proteinase-3, a serine protease which mediates doxorubicin-induced apoptosis in the HL-60 leukemia cell line, is downregulated in its doxorubicin-resistant variant. *Oncogen.* 21, 5160-5174.
 25. Yamashiro, S., J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, H. Kamohara, and T. Yoshimura. 2000. Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* 96, 3958-3963.