

감마선 조사시 마우스 비장의 면역세포 변화에 관한 연구

박혜진 · 김미형

제주대학교 수의학과 수의약리학실험실

The Differential Effects of Gamma Radiation on Mouse Spleen : B Lymphocytes are Sensitive, but Dendritic Cells are Apoptotic

Hye-Jin Park and Mi-Hyoung Kim

*Department of Veterinary Medicine, Cheju
National University,
Ara 1 dong, Jeju city, Jeju 690-756, Korea*

Abstract

It has been well known that gamma radiation suppresses systemic immunity. However, there are few available information about differential effects of gamma radiation on a variety of splenic cells, especially dendritic cells. In this study, we thus investigated the spleen of irradiated mice. The doses of gamma radiation were 1.25, 2.5, 5 Gy, since the spleens of irradiated mice with 10 Gy were almost disappeared in preliminary studies. To determine which splenic immune cells are sensitive to gamma radiation, we measured the proportion of CD4+, CD8+ (T lymphocyte marker), CD19+ (a B lymphocyte markers), CD11c+ (a dendritic cell markers) cells in

spleen cells of irradiated mice using FACS analysis. Although gamma irradiation decreased the total cell number of spleen cells of irradiated mice, the proportion of CD4+ cells was gradually increased whereas CD19+ cells was decreased. This result suggests that CD4+ cells in spleen may be resistant to gamma radiation compared to other cell types, especially CD19+ cells. Interestingly, we found in apoptosis analysis that half of splenic CD11c+ cells of irradiated mice were annexin V-positive, a representative apoptotic marker whereas small number of CD4+, CD8+, CD19+ cells were positive. Taken together, this study shows the differential effects of gamma radiation on mouse spleen cells and indicates that splenic B cells are more sensitive to gamma radiation and higher percentage of splenic dendritic cells are in apoptotic process than other cell types in spleen.

Key words : irradiation, dendritic cells, immune, FACS analysis

시 론

최근에는 인의 뿐 아니라 수의에서도 방사선에 의한 진단과 그 생물작용을 이용한 암치료 및 방사선 동위원소에 의한 진단과 치료가 활용되고 있다. 하지만 방사선 조사는 암세포 뿐 만 아니라 정상조직에도 영향을 미쳐 전신면역을 저하시키는 부작용이 있다. 동물에서의 방사선 조사는 림프구와 조혈기계에 용량 의존적인 손상을 일으키며 이는 면역저하로 인한 패혈증과 폐사의 원인이 된다[3].

면역계는 면역기능에 관여하는 세포가 모여서 형성되며 주로 림프구와 면역보조세포, 그리고 이들이 모여서 만들어진 림프조직들로 이루어져 있다.

면역반응에서 effector cell의 역할을 하는 세포는 림프구들이나 그 기능을 발휘하기 위해서는

면역보조세포라고 부르는 다른 여러 백혈구들과의 상호작용이 필요하다. 이들 보조세포들은 항원을 탐식하고 소화시켜 림프구에 제시함으로써 면역반응을 유도하며 항원을 제거하는 역할도 담당한다. 면역계의 effector cell에는 B림프구, T림프구, 자연살해세포 (NK cells) 등이 있으며 각각 항체생산, 세포파괴, 자연면역유도 등의 주 기능을 담당하고 있다.

면역보조세포에는 수지상세포, 대식세포 등이 있어 항원을 탐식, 소화, antigenic peptide의 공여 기능을 담당한다. 결과적으로 면역계는 서로 다른 기능을 수행하는 다양한 세포군으로 구성되어 있어 방사선과 같은 외부 자극에 감수성의 정도에 따른 차별화된 반응을 보이게 된다[7].

수지상세포 (Dendritic cells; DCs)는 대부분의 말초기관에 미성숙 상태로 존재한다. 외부에서 항원이 들어오면 탐식 후 일련의 성숙과정을 거쳐 주위에 있는 림프절로 이동한다. 세포내에서 소화된 항원성 펩타이드는 수지상세포의 표면에 발현된 major histocompatibility complex (MHC) class II 분자를 통해 naive T림프구에 자극을 전달한다. 이는 면역반응 중 매우 기초적인 부분으로 수지상세포는 가장 강력하고 유일한 항원공여 기능을 담당하는 antigen presenting cells이라고 인정된다.

본 실험은 방사선 조사에 의한 면역저하의 기전을 알기 위한 실험으로서 방사선 조사 시 백혈구의 변화 양상과 림프구의 변화를 FACS 분석 등을 통해 알아보았다.

재료 및 방법

1. Preparation of mice

실험동물 관리시설에서 사육한 6 주령의 암컷 Balb/c 또는 C57BL/6 마우스를 실험에 사용하였다. 이 마우스를 방사선 조사한 지 4, 8일째에 안락사후 비장을 적출하여 실험하였다.

2. Irradiation

마우스를 환기가 잘 되는 보정물(container)에 보정한 후 ^{60}Co gamma radiator를 이용하여 전신

에 방사선을 조사하였다. 방사선 선량은 예비실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 저선량 1.25 Gy, 2.5 Gy, 중선량 5.0 Gy로 조사하였다. 10 Gy의 고선량으로 조사하여 생존율을 측정했다.

3. Complete blood count (CBC) & differential count

Complete blood count를 하기 위해 방사선 조사 1일, 4일, 8일 째 되는 날에 마우스 꼬리에서 말초혈액을 채취하여 ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer에 넣어 적혈구를 용혈시킨 후 DW에 20배 희석한 Giemsa staining solution (Sigma-aldrich)을 1:1로 희석하여 백혈구를 염색하고 현미경으로 관찰하였다.

Differential count를 위해 CBC와 동일한 날자에 마우스 꼬리에서 말초혈액을 채취하여 슬라이드에 도말을 한 후 methanol로 고정을 하였다. 20배 Giemsa staining solution을 40분 가량 염색하여 현미경에 immersion oil을 떨어뜨려 1000배로 관찰하였다.

4. Splenocytes preparation & fluorescence - activated cell sorter(FACS) analysis

방사선 조사 4일, 8일째 되는 날에 안락사 시켜 적출한 비장을 phosphate-buffered saline (PBS)에 넣어 기계적으로 으갠 후 원심분리하여 세포를 모은다. ACK lysis buffer를 넣어 적혈구를 용혈시킨 뒤 원심분리한 후 cell strainer에 통과시켰다. 걸러진 비장 세포의 수를 세어 1×10^6 cell/ml이 되도록 세포를 취한 후, 5% fetal bovine serum (FBS)과 0.1% sodium azide가 첨가된 PBS를 wash buffer로 사용하여 총 100 μl 가 되도록 조정하였다. 각 샘플 당 1차 항체로 biotin-conjugated rat anti-mouse CD4, CD8a, CD19 (BD Pharmingen)를 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 30분 동안 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 washing buffer를 사용하여 세포를 2회 세척하였다. 각각 2차 항체로 streptavidin-FITC (fluorescein-5-isothiocyanate)를 30분 동안 4°C에서 반응시켰다. 세척 후 반응시킨 비장 세포 100 μl 에 1% paraformaldehyde가 첨가된 staining buffer 300 μl 를 넣어 냉장보관해 두었다가 FACSCaliber flow cytometer (Becton

Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하여 분석하였다.

5. Apoptosis analysis using Annexin V-FITC

방사선 조사 4일, 8일째 되는 날에 안락사 시켜 적출한 비장을 Hank's balanced saline solution (HBSS)에 넣어 잘게 자른 후 collagenase, DNase, hyaluronidase를 각각 200 U/ml씩 넣어 30분간 37°C shaking incubator에서 enzyme digest하였다. 그 후 10분 동안 ACK lysis buffer를 반응시킨 후 cell strainer에 통과시켰다. 걸러진 비장 세포의 수를 세어 샘플 당 1×10^6 cell로 염색하였다. 5% fetal bovine serum (FBS)와 0.1% sodium azide가 첨가된 HBSS를 staining buffer로 사용하였다. 수지상세포 표면 염색시 비특이 반응을 최소화하기 위해 Fc receptor 차단용, purified anti-mouse CD16/CD32 mAb (BD Pharmingen)를 $1 \mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시켰다. Biotin-conjugated rat anti-mouse CD4, CD8a, CD19, CD11c mAb (BD Pharmingen)를 $0.5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 30분 동안 4°C에서 반응시켰다.

이후 streptavidin-phycoerythrin (PE)을 같은 방법으로 염색하였다. 그 후 annexin V-FITC로 double staining하였다. 염색 후 FACSCaliber flow cytometer를 사용하여 분석하였다[2].

6. Measure of spleen/body weight ratio

방사선 조사 4일, 8일째 되는 날 적출한 비장 무게를 측정하여 체중대비 비장의 비율을 계산하였다.

결 과

1. Gross inspection

10 Gy로 방사선 조사시 전반적으로 조사 2~3일 후부터 피모불량과 운동성저하를 보였다. 조사 6일 후부터 foot pad와 귀, 꼬리 등에서 눈에 띄는 빈혈 증상을 보였다. 또한 설사로 인한 항문주위 털이 지저분해진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1)



A) 빈혈 B) 장벽의 비박화

Figure 1. 10 Gy로 조사 시 마우스의 증상

2. Change of body weights

정상 마우스는 성장할 수록 체중이 증가하나, 방사선에 조사된 마우스의 체중은 조사 후 2일까지는 저 (1.25 Gy, 2.5 Gy), 중 (5.0 Gy), 고 (10 Gy) 선량 조사군 모두에서 체중감소가 있음을 알 수 있었다. 또한, 선량이 증가할수록 체중의 변화 정도가 커졌다. 방사선 초기 (조사 2일째 까지)에 모든 선량 조사군에서 방사선에 민감하여 체중감소를 보였으며, 10 Gy를 제외한 1.25 Gy, 2.5 Gy, 5.0 Gy는 조사 후 6일쯤 부터 체중이 증가하여 회복되는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2)

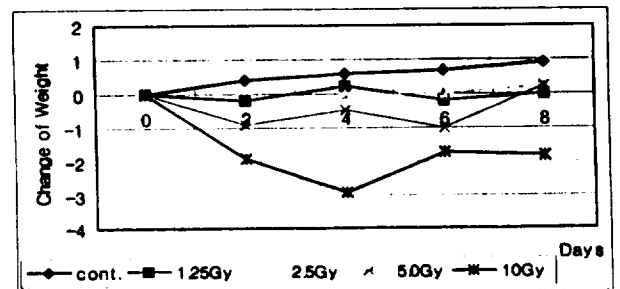


Figure 2. 감마선 조사에 따른 마우스의 체중 변화 그래프.

3. 10 Gy Irradiation - survival rate

1.25 Gy, 2.5 Gy, 5.0 Gy 조사군에서는 폐사율이 낮았으나, 10 Gy 조사군은 10일 전후로 대부분이 폐사하였다. 10 Gy 조사군은 Balb/c male 6마리로 시행하였다. 조사 후 6일까지는 6마리 모두 생존 하였으나, 8일에 1마리, 10일에 2마리, 12일에 1마리, 14일에 1마리, 17일에 나머지 1마리까지 모두 폐사하여 100% 폐사율을 나타냈다 (Fig. 3)

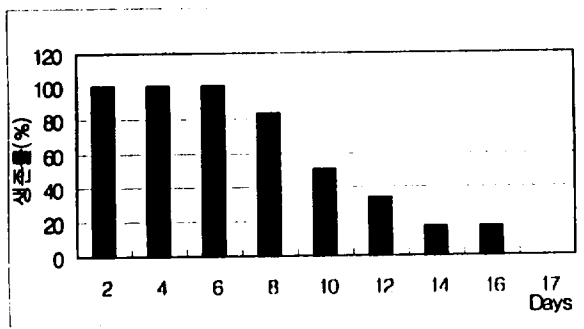


Figure 3. 10 Gy 감마선 조사 시의 생존율

4. Spleen/body weight ratio

체중대비 비장의 비율은 조사 후 4일째에 대조군에서는 0.465%였으나, 1.25 Gy 조사군에서는 0.313%, 2.5 Gy 조사군에서는 0.218%, 5.0 Gy 조사군에서는 0.152%로 선량이 증가할수록 비장이 위축되어 체중대비 비장의 비율이 감소함을 알 수 있었다. 조사 후 8일째에도 같은 결과를 보였다 (Table 1). 이전의 10 Gy 조사 실험에서는 비장의 위축이 심하여 복강을 열었을 때 비장을 찾기가 힘들었다. 주요 면역 장기인 비장의 위축은 방사선 조사 시 발생하는 면역저하 원인 중 하나임을 추측케 한다.

Table 1. 방사선 선량에 따른 체중과 비장무게, 그리고 비장의 비율

	조사량	체중	비장무게	비율
대조군		19.3	0.0897	0.465
4일	1.25 Gy	20.0	0.0625	0.313
	2.5 Gy	18.8	0.0410	0.218
	5.0 Gy	18.6	0.0282	0.152
8일	1.25 Gy	18.1	0.0578	0.320
	2.5 Gy	18.6	0.0536	0.289
	5.0 Gy	17.6	0.0182	0.103
단위		gram	gram	%

5. Complete blood count (CBC) & differential count

방사선 조사 시 총 백혈구 수치가 감소하였다. 선량이 높을수록 백혈구 수치는 더 감소하였고,

조사 후 급격히 감소함을 알 수 있었다. 1.25 Gy에서는 조사 후 4일에 크게 감소하였다가 8일에는 다소 회복되었고, 2.5 Gy와 5.0 Gy에서는 시간이 지날수록 백혈구수가 계속 감소함을 알 수 있었다. 림프구는 선량이 높을수록 급속히 감소하였고, 호중구는 5 Gy에서 조사 후 초반에 증가함을 보였다가 점점 감소함을 보였다. 정상범위의 백혈구 수는 5000-11000개/mm³이고, 림프구는 55-75%, 호중구는 10-40%이다.

Table 2. 방사선 조사 시 말초 혈액의 상태 변화

		총 백혈구	림프구수	호중구수
1.25Gy	1일	3250	65	35
	4일	1750	75	25
	8일	2250	67	33
2.5Gy	1일	1250	55	45
	4일	1000	58	42
	8일	1000	52	48
5.0Gy	1일	1000	16	84
	4일	750	30	70
	8일	500	46	54
단위		개/mm ³	%	%

6. Flow cytometry

방사선 조사에 따른 T림프구와 B림프구, 수지상세포의 수치변화와 apoptosis와의 연관성을 알아보기 위해 FACS analysis를 시행하였다. CD4+cell, CD8+cell은 T림프구의 marker이고, CD19+cell은 B림프구의 marker이다.

CD11c+cell은 수지상세포의 marker이다. Table 3을 보면 조사 시 CD4+cell의 비율은 증가하였고 선량이 높을수록 그 비율은 더 증가하였다. 즉, T림프구는 방사선 조사 시 증가함을 의미한다. 반대로, CD19+cell의 비율은 감소하였고 선량이 높을수록 감소하였다. 즉, B림프구는 방사선 조사에 민감하여 그 수가 감소하였음을 알 수 있다 (Table 3). Figure 4를 보면 CD4+cell은 apoptotic 세포의 수가 적었고, CD19+cell은 apoptotic 세포의 수가 많았다. 또한, CD11c+cell은 Annexin V +/-의 수가 비슷함을 보였고, 이는 약 40~60%의 비장 내 수지상세포가 apoptosis가 일어나는 것으로

로 추측된다 (Fig. 4)

Table 3. Splenic lymphocyte preparation & FACS analysis (단위는 %)

		대조군	1.25Gy	2.5Gy	5.0Gy
4일	CD4+cells	27	38	56	74
	CD8+cells	16	13	15	20
	CD19+cells	45	35	23	21
8일	CD4+cells	27	31	43	63
	CD8+cells	16	23	23	15
	CD19+cells	53	38	38	31

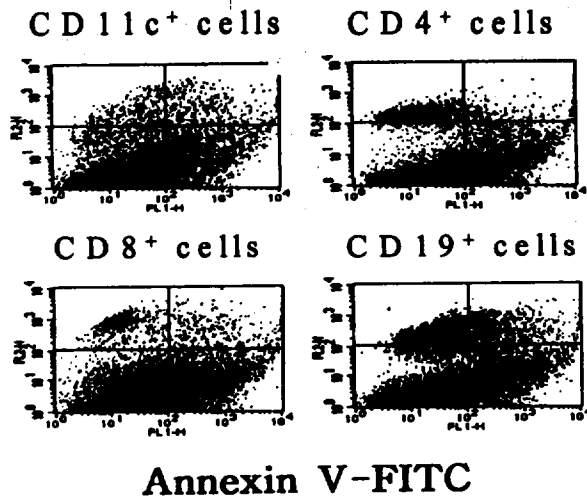


Figure 4. Apoptosis analysis using Annexin V-FITC staining

고찰

방사선 조사시 마우스의 증상은 심한 설사와 피모 불량, 빈혈, 식욕부진 등이었고, 조사선량이 증가할수록 체중감소가 심한 이유로 설사와 식욕부진 등을 이유로 들 수 있다. 방사선 조사로 인해 폐사하는 원인으로는 조혈기계 파괴, 장 점막 상피 파괴로 인한 세균침입과 독혈증[1], 설사로 인한 탈수 등에 기인된다고 한다.

방사선 조사에 의한 마우스의 백혈구 수 감소는 이미 보고된 바 있다[5]. 본 실험에서도 방사선 조사시 총 백혈구 수치가 감소함을 보여 방

사선 조사에 의한 면역기능저하의 기전 중 하나로 생각된다. 림프구의 수가 감소되었는데 비장에서 세포사멸과 연관이 있을 듯하다. 호중구는 초반에는 증가하다가 점점 감소되는 양상을 보이는데, 호중구의 초기 증가 원인은 림프구 파괴로 인한 림프구액의 탐식작용과 부신피질 호르몬 증가에 기인한다고 한다[6]. 이후 호중구의 감소는 방사선에 의한 골수억압으로 인한 생성저하에 기인하는 것 같다. 또한 마우스 혈액상을 알아보기 위한 본 실험에 적합한 프로토콜을 작성하기 까지 많은 시행착오, 적정 조건 선정에 위한 노력이 필요하였다. 사건의 연구에서 10 Gy 고선량에서는 백혈구의 파괴가 심하여 혈액상을 관찰하기가 힘들었다.

FACS분석 결과에 대해 설명을 하면, Figure 4에서 4분할된 사각형 (quadrant)의 upper right 부분은 각각의 특정세포 (CD4+, CD8+ T 림프구, CD19+ B 림프구, CD11c+ 수지상세포)에서 Annexin V가 양성인 세포를 뜻한다. 따라서 그 결과를 해석 해 보면, B림프구가 T림프구에 비해 방사선에 더 민감하여 그 수가 급속히 감소하였고, apoptosis가 그 원인으로 추정됨을 알 수 있다. 또한 대량의 비장 내 수지상 세포가 apoptosis 되어 방사선 조사시 면역 저하의 주요 원인 중 하나로 생각되어진다. 앞선 연구에 의하면 T 림프구보다 B림프구가 방사선에 더 민감하다는 것을 볼 수 있었는데[4], 본 실험에서도 비슷한 결과를 확인할 있었다. 향후 실험에서는 비장조직을 동결처리를 한 후 apoptosis 분석을 위한 TUNEL 염색과 특정세포마커를 이용한 면역조직염색을 통해 비장의 변화를 관찰하면 본 실험에서 얻은 결과를 재차 확인시켜 줄 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험을 통해 각종 면역세포가 감수성 차이로 인해 방사선 조사에 서로 다르게 반응한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 사실은 방사선 조사 후 살아남는 면역세포의 종류에 따라 향후 면역 기전의 반응이 결정될 수 있음을 의미하며, 생명 유지에 필수적인 면역세포의 방사선조사에 대한 apoptosis 방지기술 연구에 필수정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

This research was performed under the program of Basic Atomic Energy Research Institute (BAERI) which is a part of the Nuclear R&D Programs funded by the Ministry of Science & Technology (MOST) of Korea.

References

1. Eisele, G.R. and West, J.L. Bacteriological evaluation of swine exposed to lethal levels of gamma radiation. 1973. *J. Anim. Sci.* 37: 27-32
2. Jae-Yeon Jun and Hong-Gu Joo. CD40 activation protects dendritic cells from anticancer drug-induced apoptosis. 2003. *Korean J Physiol Pharmacol.* 7: 255-259
3. Jie-Young Song, Seon-Kyu Han, Kang-Gyu Bae, Dae-Seog Lim, Soo-Jung Son, In-Sung Jung, Seh-Yoon Yi and Yeon-Sook Yun. Radioprotective effects of ginsan, an immunomodulator. 2003. *Radiation Research.* 159: 768-774
4. Lipin V.A., Kusurova Z.G., and Pak V.V. Effect of whole-body X-irradiation of sheep on clinical and hematological findings and on T- and B-lymphocytes. 1984. In *problemy Veterinarnoi Biologii.* 11-15
5. Rugh, R. and Pardo, G. Age and hematological recovery from acute whole body X-irradiation. 1963. *Rad. Res.* 20: 399-422
6. 김동혁, 박용휘. X-선 조사에 의한 중성백혈구 증가기전. 1983. 가톨릭대학 의학부 논문집. 36: 499-513
7. 김은실, 김종순, 이명호, 범희승, 민정준, 정환정, 김성민, 허영준, 송호천, 이재중. 수지상세포의 방사선 저항성에 대한 연구. 2003. 대한핵의학회지. 37(3): 190-198