

TNF- α 가 혈장 제거에 의한
수지상세포의 죽음과 활성산소 생성에
미치는 영향

지도 이 민 결 교수

이 논문을 박사학위논문으로 제출함

2001년12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
이용재

이용재의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 이 민 강 인

심사위원 김 씨 종 인

심사위원 김 수 권 인

심사위원 엄 동 덕 인

심사위원 김 체 영 인

감사의 글

제가 박사학위를 받을 수 있도록 도와주신 모든 분들께 감사드립니다. 학문의 깊고 넓은을 일깨워 주신 존경하는 이민걸 지도 교수님과 학위 논문에 자문을 주신 김세종 교수님, 김수찬 교수님, 엄홍덕 교수님 그리고 김혜영 교수님께 감사드립니다. 석사학위때 저를 지도해 주신 이정복 선생님께도 진심의 감사를 드립니다.

저의 부모님께 무한한 감사를 드립니다. 또한 저의 든든한 버팀돌인 아내 김은선, 그리고 사랑하는 두 딸 이정민, 이정원과 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

저자 씀

목차

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 배양액 및 싸이토카인	6
2. 항체	7
3. 수지상세포의 배양	7
가. 말초혈액 단핵세포의 분리	7
나. 혈장의 준비	8
다. 세포유착법을 통한 단구의 분리	8
라. 단구의 배양	8
(1) 미성숙수지상세포의 배양	8
(2) 성숙수지상세포의 배양	9
4. 유세포계측기를 이용한 수지상세포의 특성 연구	9
5. 수지상세포의 생존율 및 활성산소양의 변화분석	9
가. 생존율 분석	9
6. 활성산소분석	10
III. 결과	10
1. 유세포계측기를 이용한 수지상세포의 배양확인	10
2. PI로 염색후 유세포 계측을 이용한 성숙 수지상세포의 생존율	10
3. 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성	12
4. 항산화제가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향	13
5. TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향	14
6. 항산화제가 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소에 미치는 영향	14
IV. 고찰	16
V. 결론	21

참고문헌	23
영문요약	28

그림목차

그림 1. PI로 염색후 유세포 계측을 이용한 성숙 수지상세포의 세포생존율 -----	11
그림 2. 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성--	12
그림 3. 혈장을 제거한 후 시간의 변화에 따른 성숙 수지상세포에서 활성산소의 생성 -----	13
그림 4. Catalase, TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향 -----	14
그림 5. Catalase 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향 -----	15
그림 6. N-acetylcysteine이 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향 -----	16

TNF- α 가 혈장 제거에 의한 수지상세포의 죽음과 활성산소 생성에 미치는 영향

정상인의 말초혈액을 채취하여 얻은 말초혈액 단핵세포에서 단구를 분리하여 GM-CSF와 IL-4로 미성숙 수지상세포를 배양하고, 배양 7일째에 TNF- α 가 포함된 싸이토카인 콕테일(GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , PGE2)로 성숙 수지상세포를 얻었다. 배양 9일째의 성숙수지상세포의 생존율은 약 60%정도인데 이를 2% 자가혈장을 포함한 X-VIVO 15용액에 계속 배양하면 생존율이 서서히 감소되어 배양 12일에는 생존율이 40%정도였다. 배양 9일째의 수지상세포를 혈장없이 배양하여 배양 12일째가 되면, 생존율이 20%정도로 자가혈장과 함께 배양하였을 때의 생존율 40%보다 현저히 감소하였다. 혈장없이 TNF- α 와 함께 배양한 배양 12일째의 성숙 수지상세포의 생존율은 40-50%로 혈장을 넣고 배양하였을 때의 생존율인 40% 이상으로 유지됨을 관찰하여, TNF- α 가 성숙 수지상세포의 생존인자로 작용함을 알 수 있었다. TNF- α 의 이러한 보호 효과는 다른 여러 싸이토카인 (GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6, PGE2)에서는 찾아 볼 수 없었다.

혈장없이 성숙 수지상세포를 배양하면 배양 15분 후 세포내의 활성산소 양이 급격히 증가되는 것을 관찰하였다. 이러한 현상은 성숙 수지상세포를 혈장없이 항산화제(catalase, N-acetylcysteine, glutathione)와 함께 배양하였을 때, 그리고 혈장없이 TNF- α 와 함께 배양하였을 때, 현저히 억제됨을 관찰하여, 항산화제와 TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 양을 억제함을 알 수 있었다. 그러나 혈장없이 배양한 성숙수지상세포의 죽음을 억제한 TNF- α 와는 달리 항산화제는 혈장없이 배양한 성숙수지상세포의 죽음을 억제하지 못하였다.

이상의 결과로 TNF- α 는 혈장없이 배양하여 야기된 성숙 수지상 세포의 죽음에서 생존인자로 작용하였고, 혈장없이 배양할 때 생성되는 활성산소의 양을 감소시켰다. 그러나 항산화제에 의한 활성산소억제가 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하는 결과로 보아 TNF- α 가 수지상세포에서 생존인자로 작용하는 기전에 관한 연구는 더 계속되어야 한다.

핵심되는 말 : 수지상세포, 활성산소, 항산화제, catalase,
N-acetylcysteine, glutathione, TNF- α

TNF- α 가 혈장 제거에 의한 수지상세포의 죽음과 활성산소 생성에 미치는 영향

지도 이 민 결 교수

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 용 재

I. 서 론

피부는 외부의 자극으로부터 우리 몸을 단순히 물리적으로만 보호하는 기관이 아니라 면역기관중의 하나(skin associated lymphoid tissue)이다. 피부가 면역기관으로 작용하기 위하여는 먼저 외부로부터 들어온 항원을 인식하여 주위 T 림프구에 항원을 제공하는 항원 전달세포가 필요하다. 피부의 항원 전달세포에는 표피의 랑게르한스 세포와 진피의 수지상세포가 있으며 표피의 랑게르한스 세포도 수지상세포 계통이다.

1973년 Steinman과 Cohn은 쥐의 비장에서 새로운 강력한 항원 전달세포를 발견하고 이 세포가 높은 운동성을 보이며 수 개의 돌기를 갖고 있는데 착안하여, '수지상세포(dendritic cell)'라고 명명하였다.¹ 이후 수지상세포는 다른 여러 림프기관(림프절, 흉선)에서 관찰되었고, MHC 제2항원분자(MHC-II)를 가지나 대식세포와는 구별되고 naive T 림프구를 자극하여 일차면역반응을 유발하는 기능이 있음이 알려졌다. 그러나 이러한 실험적인 결과에도 불구하고 이 수지상세포에 대한 개념은 면역학자들 사이에 쉽게 받아들여지지 않았다. 그 이유로는 첫째, 림프기관 세포들중 1%이하인 이 세포에 대

해 그 당시 연구하는 사람들이 적었으며, 둘째, 대부분의 면역학자들은 전문적인 식세포 기능을 갖고 있는 대식세포가 가장 중요한 항원전달세포라는 과거의 생각을 고수하였고, 셋째, 비장, 림프절 등에서 존재하는 매우 적은 수의 수지상세포가 신체말단에 소량 부착하는 항원을 인지하여 체내의 면역반응을 시작한다는 것을 이해할 수 없었기 때문이다.

1985년 Schuler 와 Steinman은 쥐의 표피에 존재하는 항원 전달 세포인 랑게르한스세포를 배양하면, 이차림프기관에서 관찰되는 면역유발기능이 강한 수지상세포로 성숙함을 관찰하여, 항원에 의하여 자극 받지 않는 표피의 랑게르한스 세포가 림프절 내에 존재하는 수지상세포의 미성숙 세포임을 알게 되었고, 수지상세포의 성숙개념을 제시하였다.² 즉, 피부의 랑게르한스세포는 미성숙 수지상세포로서 항원 처리 능력이 특화되어 있으며(antigen processing mode), 수지상세포로 성숙한 후에는 항원 처리 능력은 약화되고 T 세포 감작기능이 발달한다(T-cell stimulatory mode).^{3,4} 1990년 Kripke 등은 피부를 이식한 누드마우스의 이식한 부위에 합텐으로 접촉반응을 일으킨 후, 주위 배수 림프절에서 이식한 피부에서 유래된 랑게르한스 세포를 발견하였다.⁵ 이를 통하여 랑게르한스 세포가 표피에서 미성숙 수지상세포로 있다가 항원의 자극을 받은후 배수 림프절로 이동하여 성숙한 수지상세포가 됨을 확인하였다. 피부가 합텐등 외부의 항원에 노출되면 표피의 각질 형성세포와 부착되어 있던 랑게르한스 세포는 표피의 기저막을 뚫고 진피로 내려가 주위의 림프관을 통하여 배수 림프절로 이동한다. 랑게르한스 세포의 표피로부터 진피로의 이동에는 여러 가지 세포유착인자들이 관여한다. 그리고 랑게르한스 세포가 진피로 이동하는데 관여하는 사이토카인으로는 TNF- α 와 IL-1 β 가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

이와같이 수지상세포의 역할에 관하여 많은 연구가 되고 있으나, 수지상세포나 랑게르한스세포는 각 장기에 존재하는 수가 워낙 적어 이 분야의 연구에 제약이 많았다. 그러다가 1992년 CD34 양성세포에 GM-CSF와 TNF- α 를 첨가함으로써 수지상세포의 대량 배양이 가능함이 보고되면서⁶⁻⁸ 수지상세포의 연구가 활성화되기 시작하였

고, 그후 말초혈액에서 적은 양만 존재하는 CD34 양성 세포에서뿐 아니라, 말초혈액에서 약 5-10%정도인 CD14양성 세포에서도 GM-CSF 와 IL-4를 첨가함으로써 수지상세포의 배양이 가능함이 보고되면서⁹⁻¹¹ 수지상세포에 관한 연구가 더욱 활기를 띠게 되었다.

TNF- α 는 CD34양성 세포에서뿐 아니라 CD14양성 세포에서 수지상세포를 배양할 때도 모두 사용되는, 수지상세포의 배양에 중요한 사이토카인이며, 표피에 있던 랑게르한스 세포가 배수 림프절로 이동할 때 관여하는 사이토카인중의 하나이다. TNF- α 는 지다당으로 처리한 동물의 혈청에서 중앙괴사를 유발시키는 물질로 처음 발견되었다. TNF- α 는 활성화된 대식세포에서 주로 생성되며 그 이외에도 활성화된 T세포, NK세포, 비만세포, 각질형성세포등 여러 세포들에서 생성된다. TNF- α 는 IL-1과 마찬가지로 다양한 생물학적 작용을 가지는데, 농도에 따라 저농도에선 식세포의 세포 살해작용을 항진시키고, 혈관내피 세포에 백혈구 부착 능력을 항진시키며, MHC 제 1항원 분자(MHC-I) 발현 항진, 단핵식세포 자극으로 IL-1, IL-6, IL-8 생산 항진, 간장세포 자극으로 혈청 아밀로이드 A 합성 항진등을 나타내며, 고농도에선 혈관내 혈전 형성 촉진, 심근 수축력 감소, 혈압저하 및 혈관 평활근 긴장 감소, 패혈성 속등을 일으키며, 장기간 투여하면 림프구 감소와 면역 결핍증 등을 일으킬 수 있다.¹²

TNF- α 가 어떻게 이러한 기능을 하는지에 대한 기전은 아직 확실히 알려져 있지 않은 부분들도 많지만, TNF- α 가 여러 세포에서 활성산소(reactive oxygen intermediates)의 합성을 증가시키고,¹³⁻¹⁷ 항산화제는 TNF- α 에 의한 세포의 죽음을 억제함이 잘 알려져 있다.^{15,17} 이러한 결과로 활성산소가 TNF- α 에 의한 세포의 죽음에 관여함을 알 수 있다. 일반적으로 TNF- α 가 세포의 죽음에 관여하는 것과는 달리, 수지상세포에서는 오히려 생존인자로 작용함이 알려져 있다. 최근 TNF- α 가 수지상세포의 자연세포고사(spontaneous apoptosis)를 억제한다는 보고가 있었으며,¹⁸ TNF군에 속하는 CD40-ligand가 anti-Fas에 의한 수지상세포의 죽음을 억제할 수 있음이 보고되었다.¹⁹ 그리고 역시 TNF군에 속하는

TRANCE가 수지상세포의 생존인자로 작용함이 보고 되었다.²⁰

혈장은 세포의 성장에 매우 중요하며, 세포배양에서 혈장을 빼면 죽는 세포들이 많다.²¹⁻²⁴ 이 때, 일부 세포들에서는 세포내의 활성산소가 증가하면서 이 세포들을 죽음에 이르게 한다.²³⁻²⁴ 그래서 본 연구자는 혈장없이 배양하여 야기된 수지상세포의 죽음에도 TNF- α 가 생존인자로 작용할 수 있을지를 알아보려고 하였다. 그리고 혈장없이 배양한 수지상세포가 활성산소를 합성할 수 있을지를 알아보고 합성한다면 TNF- α 가 이 활성산소의 합성에 어떠한 영향을 주는지를 관찰하고자 하였다.

이를 위하여 정상인의 말초혈액을 채취하여 얻은 말초혈액단핵세포에서 단구를 분리하여 GM-CSF와 IL-4로 미성숙 수지상세포를 배양하고, 배양 7일째에 TNF- α 가 포함된 싸이토카인 콕테일(IL-1 β , IL-4, IL-6, GM-CSF, TNF- α , prostaglandin E2)로 성숙 수지상세포를 얻었다.¹¹ 유세포 계측기로 수지상세포 표면의 CD83, B7-1, B7-2, HLA-DR 발현 정도를 검사하여 성숙된 수지상세포가 만들어 졌는지를 확인하였다.

확인된 배양 9일 짜의 성숙 수지상세포에 혈장없이 배지만으로 배양한 군, 배지에 TNF- α 만 첨가한 군, 그리고 혈장을 첨가한 배지로 배양한 군으로 나누어 3일까지 배양하여 각 군에서 수지상세포의 생존율을 확인하고, 이때 활성산소의 합성여부를 관찰하였다. 그래서 본 연구자는 혈장없이 배양하여 야기된 수지상세포의 죽음에도 TNF- α 가 생존인자로 작용할 수 있을지를 알아보고, 혈장없이 배양된 수지상세포가 활성산소를 생성한다면 TNF- α 가 이 활성산소의 생성에 어떠한 영향을 미칠지를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배양액 및 싸이토카인

본실험에서 배양액은 X-VIVO 15 (BioWhittaker, Walkersville,

Maryland, USA) 용액에 penicillin(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 100IU/ml, streptomycin(Gibco) 100 μ g/ml, 2-mercaptoethanol(Merk, Munchen, Germany) 5×10^{-5} M, glutamine(Gibco) 2mM 및 2% 자가혈장을 첨가하여 사용하였다.

사용된 모든 싸이토카인은 재조합된 인형 단백질로서 수지상세포의 성장을 위해 안정적인 농도를 사용하였다. 최종적인 농도는 아래와 같다; GM-CSF(Novartis, Frimly, UK)) 800U/ml, IL-4(PBH, Hannover, Germany) 1000U/ml, IL-6(PBH) 1000U/ml, IL-1 β (PBH) 10ng/ml, TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) 10ng/ml, PGE2(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1 μ g/ml.

2. 항체

유세포 계측을 위하여 사용할 일차 항체의 종류는 CD1a(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), CD14(Ancell Co., Bayport, MN, USA), CD80(Becton Dickinson), CD83(Serotec Ltd., Kidlington, England), CD86(Ancell), HLA-DR(Becton Dickinson) 이였으며, 이차 항체는 FITC나 PE-cojugated anti-mouse or anti-rat Igs (Amersham International, Amersham, UK)을 이용하였다.

3. 수지상세포의 배양

가. 말초혈액 단핵세포의 분리

5 U/ml 헤파린이 포함된 정상인의 혈액 10 ml를 20ml phosphate buffered saline(PBS)용액과 혼합한 후 50ml의 cornical tube 에 넣어둔 15ml Ficol/Hypaque (Amersham Phamacia, Uppsala, Sweden; density:1.0777g/ml) 용액위에 혼합액을 조심스럽게 부은 후 상온에서 20분 동안 200g로 원심침전을 시행하였다. 원심 침전

후 상층의 혈장 20-25ml를 조심스럽게 분리하여 보관한 다음, 다시 20분 동안 상온에서 400g로 원심 침전을 계속하였다. 경계면에 있는 세포를 모은 후 차가운 5mM EDTA(Sigma)가 함유된 PBS 용액으로 5차례에 걸쳐 2500rpm으로 10분간 세척하여 말초혈액 단핵세포를 얻었다.

나. 혈장의 준비

정상인 혈액에서 말초혈액 단핵세포를 분리할 때 얻은 혈장을 56°C에서 30분동안 정치시켜 열불활성화(heat-inactivation)한 후 혈소판을 제거하기 위해 10분동안 1000g로 원심 침전을 시행하였다. 이때 혈소판을 제거한 상층액을 자가혈장으로 이용하였다.

다. 세포유착법을 통한 단구의 분리

분리된 말초혈액 단핵세포를 X-VIVO15 용액에 다시 부유시킨 후, 6-well plate에 각 well당 1×10^7 /3ml을 37°C에서 5% CO₂가 포함된 세포 배양기에서 40분 동안 정치시켰다. 40분후 유착되지 않은 부유상태의 세포는 가볍게 3회 세척하여 제거하고 well 바닥에 유착되어 있는 세포를 세포배양에 이용하였다.

라. 단구의 배양

(1) 미성숙 수지상세포 배양

6-well plate의 각 well당 3×10^6 정도의 단구를 3ml의 배양액에 넣었다. 여기에 1000U/ml rh-GM-CSF(Novartis)와 1000 U/ml-rhIL-4(PBH)을 넣고 배양하였다.

배양 2, 4, 6일째, 각각의 well의 배양액 상층을 1ml씩 제거한 후 2000 U/ml GM-CSF와 1000 U/ml IL-4가 포함된 배양액을 1 ml 첨가하였다.

배양 7일째, 상기의 wells에서 비유착 세포들을 수집하여 세포의 수, 형태 및 표면항원의 특성을 관찰하였다.

(2) 성숙 수지상세포의 배양

상기 각 실험군의 비유착세포들을 모아 두 번 세척한 후 새로운 6-well plate에 각 well당 1×10^6 /ml 세포를 넣고 GM-CSF 1000U/ml, IL-4 500U/ml, IL-1 β 10ng/ml, TNF- α 10ng/ml, IL-6 1000U/ml, PGE₂ 1 μ g/ml의 싸이토카인 콕테일을 첨가하여 배양하였다.

배양 9일째, 배양된 well의 비유착세포를 수집하여 세포의 형태 및 표면항원의 특성을 관찰하고 TNF- α 가 활성산소 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위한 실험에 이용하였다.

4. 유세포계측기를 이용한 수지상세포의 특성 연구

세포를 PBS 용액으로 두 번 세척한 후 일차항체를 첨가한 후 30분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 2% FCS가 첨가된 PBS로 세척후 FITC나 PE-cojugated anti-mouse or anti-rat Igs을 이차항체로 사용하여 첨가한 후 30분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양한후 3번 세척하고 유세포 계측(FACScan CellQuest software, Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 시행하였다.

5. 수지상세포의 생존을 및 활성산소 양의 변화 분석

배양 9일째의 성숙 수지상세포를 혈장없이 배지만으로 배양한 군, 혈장없이 TNF- α 만 첨가한 군, 혈장없이 항산화제(catalase, N-acetylcysteine, glutathione)를 첨가한 군, 그리고 혈장을 첨가한 배지로 배양한 군으로 나누어 3일까지 배양하여 수지상세포의 생존을 다음의 방법으로 비교 관찰하였다.

가. 생존을 분석

Propidium iodide(PI; Sigma) 는 DNA에 결합하는 형광 염색물질로써 온전한 세포막을 투과하지 못한다. 따라서 괴사되거나 혹은 후기 세포고사 상태에 있는 죽은 세포 즉 세포막이 파괴된 핵에만 염색된다. 실험적으로 처리된 수지상세포를 원심분리하여 세포를 가라앉힌 후 PBS로 2회 세척하고 $40\mu\text{g/ml}$ 의 PI를 넣고 차광상태로 실온에서 10분간 방치한 후 유세포 계측기로 PI 염색세포의 비율을 유세포 계측기의 forward light scattering(FSC)과 FL-2로 구하였다.

6. 활성산소 분석

실험적으로 처리된 수지상세포에 $50\mu\text{M}$ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA;Molecular probe, Eugene, OR, USA)을 가하고 37°C 에서 5분 배양시킨 후 유세포 계측을 시행하여 활성산소 양의 변화를 FL-1 channel에서 분석하였다.²⁵

III. 결과

1. 유세포계측기를 이용한 수지상세포의 배양 확인

단구에서 수지상세포를 배양한 후 시행한 유세포 계측기 검사에서, 배양 3-4일째부터 CD14는 소실되었고, MHC-II, B7-2는 배양 7일까지 계속 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 배양 7일째에 성숙 수지상세포를 만들기 위해 싸이토카인 콕테일(GM-CSF, IL- 1β , IL-4, IL-6, TNF- α , PGE2)을 첨가한 후, 배양 8-9일째에 CD83이 증가하면서, B7-1이 함께 증가하는 양상을 보여 성숙 수지상세포가 형성되었음을 확인하였다.

2. PI로 염색후 유세포 계측을 이용한 성숙 수지상세포의 생존율

수지상세포를 배양하는데 필요한 여러 가지 사이토카인들이 배양 9일 째의 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈장을 준 군과 혈장없이 IL-1, IL-4, TNF- α , IL-6, GM-CSF, PGE2를 각각 넣어 3일간 배양하면서 배양 1일, 2일, 3일째의 수지상세포의 생존율을 관찰하였다. 음성 대조군으로는 혈장이나 사이토카인없이 배지만 넣은 군을 이용하였다.

배양후 64시간에 혈장을 준 성숙 수지상세포의 생존율은 45.5%이었고, 배지만 준 군의 생존율은 23.2%이었으며, IL-1 (27.0%), IL-4 (27.0%), TNF- α (47.8%), IL-6 (16.7%), GM-CSF (20.7%), PGE2 (22.3%)로 TNF- α (47.8%)가 혈장을 준 군(45.5%) 이상으로 성숙 수지상세포를 살리는 역할을 함을 알 수 있었다(그림1).

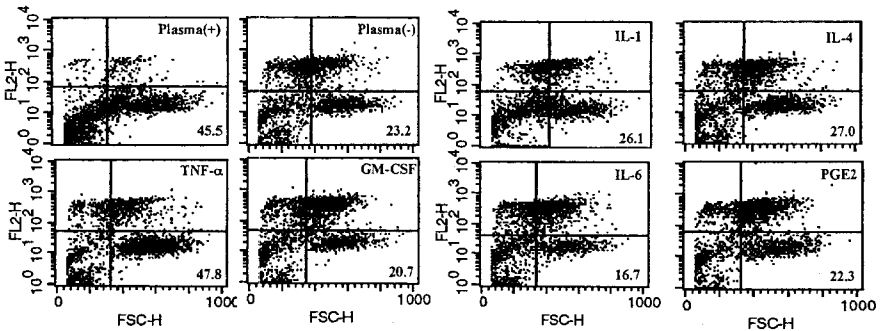


그림 1. PI로 염색후 유세포 계측을 이용한 성숙수지상세포의 생존율. 2% 자가혈장을 포함한 X-VIVO 15 용액으로 성숙수지상세포를 64시간 배양하였을 때, 성숙수지상세포 생존율은 45.5%이었다. 혈장을 빼고 64시간 배양하면 생존율이 23.3%로 성숙수지상세포의 죽음이 증가하였다. 혈장을 빼고 배양한 성숙 수지상세포에 TNF- α 를 넣고 배양하면 생존율이 47.8%로, 자가혈장과 함께 배양하였을 때의 생존율(45.5%) 이상으로 회복되었다. TNF- α 의 이러한 보호 효과는 다른 여러 사이토카인(GM-CSF; 20.7%, IL-1 β ; 26.1%, IL-4; 27.0%, IL-6; 16.7%, PGE2; 22.3%)들에서는 찾아 볼 수 없었다.

같은 실험을 반복적으로 시행하여도 동일한 결과를 관찰할 수 있었

고, $TNF-\alpha$ 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 사망률을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

3. 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성

혈장없이 배양한 성숙 수지상세포에 50 μ M DCFH-DA를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 5분 배양시킨 후 유세포 계측을 시행하여 발생된 활성산소를 관찰하였다. 혈장을 제거한 후 15분경에, 혈장을 넣고 배양한 수지상세포에 비하여 활성산소의 양이 약 40배정도 증가하였으며(그림2), 이 활성산소의 생성은 혈장을 제거한 45분까지 지속되다가, 혈장을 제거한 2시간후에는 활성산소 생성이 거의 정상 범위로 감소하였다(그림3).

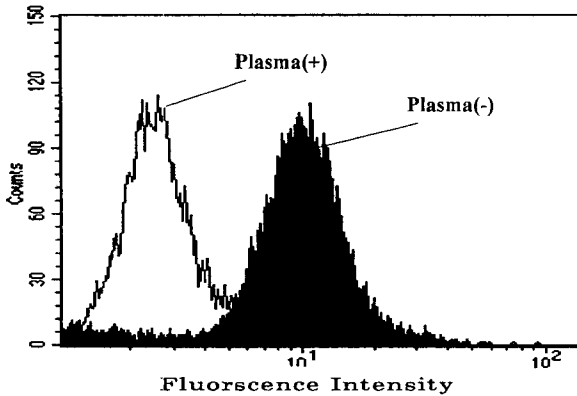


그림 2. 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성. 자가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포가 배양 15분후 활성산소를 생성하였으며, 생성된 활성산소의 양은 혈장을 넣고 배양한 성숙 수지상세포에 비하여 약 40배 증가하였다.

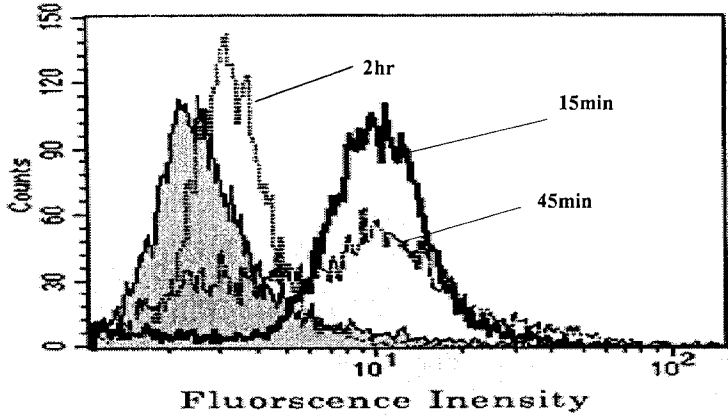


그림 3. 혈장을 제거한 후 시간의 변화에 따른 성숙 수지상세포에서 활성산소의 생성. 성숙 수지상세포에서 혈장을 제거한 후 15분에는 활성산소 생성이 급격히 증가하여 최대가 되고 45분까지는 활성산소의 생성이 유지되다가 2시간 후에는 많이 감소하였다.

4. 항산화제가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향

성숙 수지상세포에 혈장없이 항산화제인 catalase(Sigma), 1,000U/ml를 함께 배양하였을 때, 배양 15분후 혈장없이 배양한 수지상세포에서 생성되는 활성산소의 양은 현저히 감소하였다.(그림4) 그리고 catalase의 농도가 1,000U/ml, 2,000U/ml, 4,000U/ml농도로 증가할수록 생성된 활성산소의 양은 더 많이 감소하였으며, catalase이외의 다른 항산화제인 N-acetylcysteine(Sigma), glutathione(Sigma)도 혈장없이 배양하였을 때 발생하는 활성산소의 생성을 억제하였다.

5. TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향

배양한 성숙 수지상세포에 혈장없이 TNF- α (20ng/ml)를 함께 배양하였을 때, 배양 15분후 혈장없이 배양한 수지상세포에서 생성되는 활성산소의 양은 현저히 감소하였다. TNF- α 는 혈장없이 배양한 수지상세포에서 생성되는 활성산소를 항산화제인 catalase가 억제하는 정도와 비슷하게 억제하였다.(그림4).

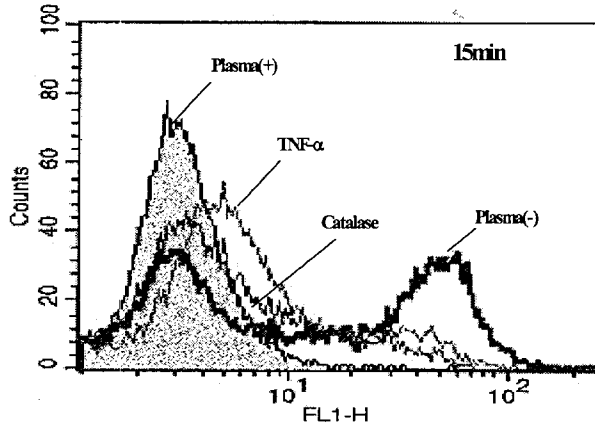


그림 4. Catalase, TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소의 생성에 미치는 영향. Catalase, TNF- α 가 혈장 없이 배양한 성숙 수지상세포에서 배양 15분 후 활성산소의 생성을 현격히 억제하였다.

6. 항산화제가 배양한 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향

다양한 농도 (250U/ml, 500U/ml, 1,000U/ml)의 catalase를 성숙 수지상세포에 혈장없이 함께 배양하였을 때 수지상세포의 생존율은 catalase농도 250U/ml이었을 때 19.1%, catalase농도 500U/ml이었을

때 13.3%, catalase농도 1,000U/ml이었을 때 5.8%로, 혈장없이 배지만 넣었을 때 16.3% (혈장없이 TNF- α 만 넣었을 때 41.3%)에 비하여 큰 차이가 없어 catalase가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하였고, 높은 농도(1000U/ml)에서는 생존율이 감소하여 오히려 독성 작용이 있음을 알 수 있었다(그림5). 다양한 농도(5uM, 10uM, 20uM)의 N-acetylcysteine을 성숙 수지상세포에 혈장없이 함께 배양하였을 때 수지상세포의 생존율은 N-acetylcystein농도 5uM이었을 때 18.3%, N-acetylcystein농도 10uM이었을 때 18.8%, N-acetylcystein농도 20uM이었을 때 15.7%로, 혈장없이 배지만 넣었을 때 12.8% (혈장없이 TNF- α 만 넣었

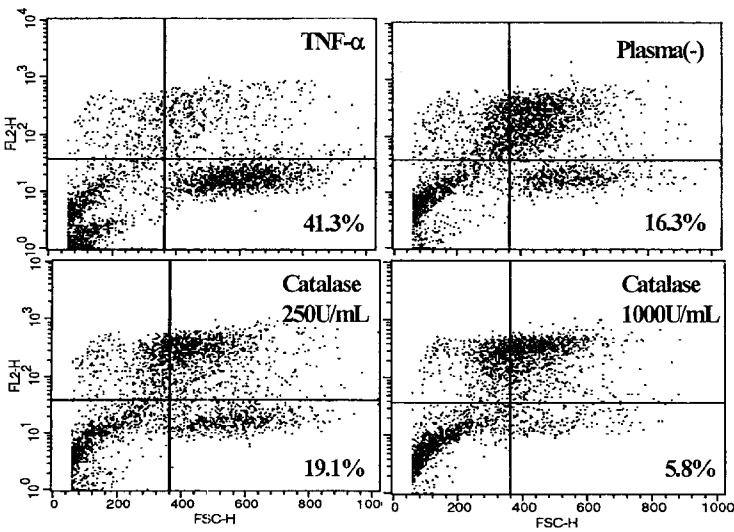


그림 5. Catalase 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향. 항산화제인 catalase를 다양한 농도로 처리하였을 때 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율을 증가시키지 못하고 catalase농도를 올리던 오히려 성숙 수지상세포의 생존율을 감소시키는 것을 볼 수 있었다.

을 때 45.6%)에 비하여 큰 차이가 없어 N-acetylcysteine이 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하였다(그림 6). 그리

고 glutathione도 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하였다.

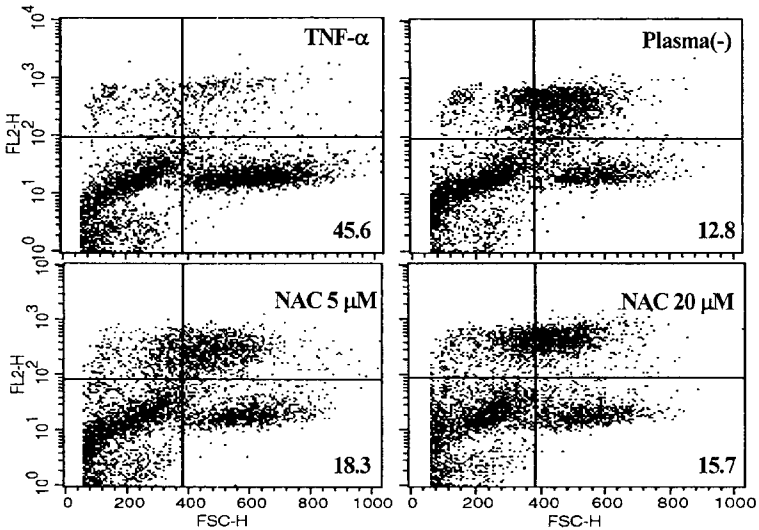


그림 6. N-acetylcysteine이 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율에 미치는 영향. 항산화제인 N-acetylcysteine를 다양한 농도로 처리하였을 때 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 생존율을 증가시키지 못하고 N-acetylcysteine 농도를 올리면 오히려 성숙 수지상세포의 생존율을 감소시키는 것을 볼 수 있었다.

IV. 고찰

혈장은 세포의 성장에 매우 중요하며, 세포배양에서 혈장을 빼면 죽는 세포들이 많다.²¹⁻²⁴ 인체 제대혈관 내피세포에서 혈청없이 배양하였을 때, 세포고사를 야기시킨 보고가 있고,²³ 신경세포(neuronal cell)에서 혈장을 빼고 배양하였을 때, 세포의 죽음을 야기시킨 보고가 있다.²⁴ 본 연구자도 수지상세포를 배양할 때 혈장을 빼고 배양한

결과, 배양 2-3일 후에 혈장과 함께 배양한 성숙 수지상세포의 생존율은 40-60%인데 비하여, 혈장없이 배지만 준 군의 생존율은 20-30%로 혈장없이 배양한 수지상세포의 생존율은 혈장을 준 성숙 수지상세포에 비하여 거의 50%이상 감소함을 관찰하고, 다른 여러 세포들과 같이 수지상세포도 세포의 성장에 혈장에 포함된 외부인자가 필요함을 알 수 있었다.

TNF- α 가 세포의 자연세포고사¹⁸와 FasL에 의한 수지상세포의 죽음¹⁹에서 세포 생존인자로 작용한 것과 같이, 혈장없이 수지상세포를 배양하여 야기된 수지상세포의 죽음에서도 생존인자로 작용하는지 여부를 알기 위하여, 혈장없이 TNF- α 만 첨가하여 배양한 수지상세포의 생존율을 혈장을 넣은 군과 혈장을 넣지 않은 군과 비교하였다. 이 때, TNF- α 뿐 아니라 수지상세포를 배양할 때 필요한 다른 사이토카인들(IL-1 β , IL-4, IL-6, GM-CSF, prostaglandin E2)도 혈장없이 배양한 수지상세포의 생존율에 어떤 영향이 있는지를 함께 관찰하였다. 혈장없이 각각의 사이토카인들만 넣고 배양하였을 때 수지상세포의 생존율은 TNF- α (47.8%), IL-1 (27.7%), IL-4 (27.0%), IL-6 (16.7%), GM-CSF (20.7%), PGE2 (22.3%)이었다. 이를 혈장을 넣어 배양한 성숙 수지상세포 (45.5%)와 혈장없이 배지만으로 배양한 군 (23.2%)과 비교하여 볼 때, 여러 사이토카인들 중 TNF- α 만이 혈장을 준 군 이상으로 성숙수지상세포를 살리는 역할을 함을 관찰하였다. 이를 통하여 다른 혈장인자가 없는 상태에서도 TNF- α 가 독자적으로 수지상세포의 생존을 유지시킬 수 있음을 확인하였다. 그리고 TNF- α 가 자연 세포고사, Fas L에 의한 수지상세포의 죽음을 억제할 뿐 아니라, 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 죽음도 감소시키는 것으로 보아 수지상세포를 죽게하는 여러 다른 인자들에 대해, 생존인자로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

TNF- α 는 표피에 있던 랑게르한스 세포가 배수 림프절로 이동할 때 관여하는 사이토카인중의 하나로, CD34양성 세포와 CD14양성 세포에서 수지상세포를 배양할 때 모두 필요한 수지상세포의 배양에도 중요한 사이토카인이다. TNF- α 는 다양한 기능을 가지고 있으며 세포의 죽음에도 다양하게 관여한다. 세포고사 측면에서는 TNF- α 는 세포고사를 일으키는 세포고사인자로 작용하거나, 오히려 세포고사를 억제하는 생존인자, 양쪽으로 모두 작용할 수 있다.²⁶ TNF- α 가 세포고사를 야기시키는 보고들은 많으며^{13, 15, 16, 25} 최근에는 TNF- α 가 호중구의 세포고사에 관여한다는 보고도 있었다.²⁷ 그러나 TNF- α 가 생존인자로 작용하는 보고들은 많지 않지만 수지상세포에서 TNF군이 생존인자로 작용한다는 보고이외에도,¹⁸⁻²⁰ 호산구에서 p38 MAP kinase를 활성화 시킴으로서 TNF- α 가 호산구를 살리는 역할을 한다는 보고가 있으며,²⁸ 골수종 세포주를 살리는 역할을 한다는 보고도 있다.²⁹ 그리고 악성흑색종에 의해 수지상세포의 세포고사가 일어나는 것을 TNF- α 가 bcl-2를 증가시키고, 시토크롬 c를 배출시킴으로 수지상세포의 세포고사를 억제하면서 생존인자로 작용함이 보고 되었다.³⁰

혈장없이 세포를 배양할 때, 세포내의 활성산소를 증가시킴으로서 세포의 죽음을 야기시킨 보고들이 있다.²³⁻²⁴ 그래서 본 연구자는 혈장없이 배양한 수지상세포에서 활성산소의 생성 여부를 관찰하였다. 혈장없이 배양한 성숙한 수지상세포에서는 15분후에 활성산소 생성은 최대였으며, 이는 배양 45분까지 유지되다가, 2시간후에는 활성산소의 생성이 거의 정상 범위로 감소하였다. 이 때 생성되는 활성산소의 양은 항산화제인 catalase, N-acetylcysteine, glutathione으로 현저히 억제되었다. 다음 단계로 혈장없이 배양한 수지상세포의 죽음을 감소시키면서, 생존인자로 작용하는 TNF- α 는 수지상세포내의 활성산소 생성에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였다. 혈

장없이 배양하였을 때 성숙 수지상세포에서 생성되었던 활성산소의 양이 혈장없이 TNF- α 를 넣고 배양하였을 때, 항산화제를 넣었을 때 활성산소의 양이 현저히 감소한 것 같이, 감소됨을 관찰 하였다. 그래서 혈장없이 배양하였을 때, 배양 초기(배양후 2시간이내)에 생성된 활성산소가 배양 2-3일후에 야기되는 세포의 죽음에 관여하는 신호일 가능성을 생각하였다.

TNF- α 가 활성산소 생성에 미치는 영향을 관찰해 보면 활성산소 생성을 증가시키는 경우가 많다. 섬유모세포 L929에서 TNF- α 와 함께 배양 3시간 후 활성산소가 생성됨을 관찰하였으며,¹³ 사람의 구강암 세포주인 SCC-25에서도 활성산소의 생성을 증가시키면서, 망간 과산화디스무타아제(manganese superoxide dismutase) 유전자의 발현을 증가시킴을 보고하였다.¹⁴ 그리고 TNF- α 가 세포질내 포스포리파아제 A2-관련 연속단계를 통하여 활성산소의 생성을 증가시킨다는 보고도 있었다.³¹ 이외에도 TNF- α 가 활성산소의 생성을 증가시키는 보고가 많다.¹³⁻¹⁷ 그리고 TNF- α 가 활성산소의 생성을 증가시킴으로 세포고사를 일으킨다는 보고^{13, 15, 16}도 있고, 세포괴사를 일으킨다는 보고도 있다.¹⁷

그러나 TNF- α 가 활성산소 생성을 억제시키는 보고는 적다. TNF- α 가 미토콘드리아의 망간 과산화디스무타아제를 통하여 활성산소를 억제시킴으로 방사선조사나 doxorubicin등의 약제에 대해 동물을 보호하는 역할을 한다는 보고가 있으며,³² TNF- α 가 호중구를 세포고사 시킬 때, caspase가 관여하면서 이 때 활성산소의 생성이 억제된다는 보고가 있다.³³ 본 연구에서 TNF- α 가 혈장없이 배양한 수지상세포에서 생성되는 활성산소를 억제하는 역할을 하였다.

혈장을 빼고 배양한 수지상세포에서 생성된 활성산소가 세포의 죽음에 관여하는 신호로 생각 하였으나, 혈장을 빼고 배양한 수지상 세포에 항산화제인 catalase, N-acetylcysteine, glutathione를 넣고 배

양 하였을 때, 활성산소의 양은 현저히 감소하였지만, 수지상세포의 죽음은 억제시키지 못하였다. 그러므로 혈장없이 배양한 수지상세포에서 배양후 2시간 이내에 생성된 활성산소는 세포의 죽음에 관여하는 신호가 아님을 알게 되었다.

활성산소는 다양한 역할을 하는데, 일반적으로 세포에 손상을 주어 염증반응을 일으키는 경우가 많다. 이외에도 세포의 죽음인 세포고사^{13, 15-16}와 세포괴사¹⁷를 야기시키는데 관여한다. 최근에는 활성산소가 신호전달에서 이차 전령물질의 역할을 한다는 보고들이 많다.³⁴⁻³⁶ 그리고 활성산소는 면역계에서 독성 물질로 작용하면서, 선천 및 적응면역에서도 중요한 역할을 함이 최근에 많이 밝혀지고 있다.³⁷ 그리고 표피세포에 자외선 A를 조사하였을 때 활성산소에 의해 면역 억제 반응이 나타나는 보고가 있다.³⁸ 이와같이 활성산소는 다양한 역할을 하고 있다. 본 실험에서도 혈장을 빼고 배양한 수지상세포에서 배양 초기에 생성된 활성산소가 이 세포의 죽음에 관여하는 것이 아니라 면역반응등 다른 작용에 관여하리라 생각한다.

Rutault등은 단구로부터 배양한 수지상세포에 과산화수소를 넣고 배양한 후, 과산화수소가 이 수지상세포의 MHC-II와 상호작용분자인 CD40과 CD86을 증가시켰으며, T림프구를 자극하는 능력도 더 효과적으로 증가되었음을 관찰하고, 조직의 염증 반응에서 생성되는 활성산소가 수지상세포를 자극시켜 면역반응을 시작하는 역할을 할 수 있음을 확인하였다.³⁹ Verhasselt도 과산화수소가 단구로부터 배양한 수지상세포를 자극하여 수지상세포의 표면항원을 변화시키고 IL-8과 TNF- α 의 합성을 증가시켰음을 관찰하였다.⁴⁰ 그래서 본 연구자는 혈장없이 배양한 수지상세포에서 생성된 활성산소가 수지상세포의 죽음에 관여하는 것이 아니라, 수지상세포 표면항원의 변화를 야기시켰을 가능성을 생각하고, 단구로부터 배양한 성숙 수지상

세포에 과산화수소를 함께 배양하여 수지상세포 표면항원의 변화를 관찰하였다. 수지상세포에서 HLA-DR의 발현은 약하게 증가하였으며, CD40은 크게 변화하지 않았다. 반복적인 실험을 시행하였지만, 과산화수소가 성숙 수지상세포의 HLA-DR을 제외한 다른 표면항원에 미치는 뚜렷하고 분명한 변화는 관찰하기가 어려웠다. Rutault K등과 Verhasselt V등의 보고에서 과산화수소가 수지상세포의 표면항원에 미치는 영향중 HLA-DR은 서로 증가하는 것으로 기술되어 있으나, CD40의 발현 변화는 서로 상반되게 기술되어 있으며, 증가하는 표면항원의 변화도 매우 약한 것으로 보아 과산화수소에 의한 수지상세포의 자극은 표면항원을 일정하게 변화시키기에 약한 자극이 아닌가 생각된다. 본 연구자는 과산화수소의 농도를 다양하게 변화시키면서, 단구로부터 배양한 수지상세포 표면항원의 변화를 관찰하였지만, 과산화수소의 농도가 높으면 세포피사가 일어나고 세포피사가 일어나지 않는 정도의 농도에서는 표면항원의 발현 변화가 약하여 과산화수소가 수지상세포에 미치는 뚜렷한 영향을 관찰하기는 어려웠지만, 반복적인 실험에서 HLA-DR의 발현은 대조군에 비하여 미약하지만 증가하는 양상을 보이고, 과산화수소가 수지상세포의 표면항원과 T림프구 자극 능력을 변화시킨다는 다른 보고들로³⁹⁻⁴⁰ 보아, 혈장없이 배양한 수지상세포가 생성하는 활성산소는 수지상세포의 면역학적 변화를 일으키는데 관여하지 않을까 생각된다.

V. 결론

정상인의 말초혈액을 채취하여 얻은 말초혈액 단핵세포에서 단구를 분리하여 GM-CSF와 IL-4로 미성숙 수지상세포를 배양하고,

배양 7일째에 TNF- α 가 포함된 싸이토카인 콕테일(IL-1 β , IL-4, IL-6, GM-CSF, TNF- α , prostaglandin E2)로 성숙 수지상세포를 얻었다. 확인된 배양 9일 째의 성숙 수지상세포에 혈장없이 배지만으로 배양한 군, 배지에 TNF- α 만 첨가한 군, 그리고 혈장을 첨가한 배지로 배양한 군으로 나누어 3일까지 배양하여 각 군에서 수지상세포의 생존율을 확인하고, 이때 활성산소의 생성여부를 관찰하였다. 그래서 혈장없이 배양하여 야기된 수지상세포의 죽음에도 TNF- α 가 생존인자로 작용할 수 있는지를 알아보고, 혈장없이 배양한 수지상세포가 활성산소를 생성한다면 TNF- α 가 이 활성산소의 생성에 어떠한 영향을 주는 지를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TNF- α 가 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 사망율을 감소시켰다.
2. 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포는 활성산소를 생성하였다.
3. 항산화제인 catalase, N-acetylcysteine, glutathione은 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성을 억제하였다.
4. TNF- α 도 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 활성산소 생성을 억제하였다.
5. 항산화제는 혈장없이 배양한 성숙 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하였다.

이상의 결과로 TNF- α 는 혈장없이 배양하여 야기된 성숙 수지상세포의 죽음에서 생존인자로 작용하였고, 혈장없이 배양할 때 생성되는 활성산소의 양을 감소시켰다. 그러나 항산화제에 의한 활성산소억제가 수지상세포의 죽음을 억제하지 못하는 결과로 보아 TNF- α 가 수지상세포에서 생존인자로 작용하는 기전에 관한 연구는 더 계속되어야 한다.

VI. 참고 문헌

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-62
2. Schuler G, Steinman GM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985;161:526-46
3. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmerpack M, Livingstone AM, Fathman CG, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: Intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989;169:1169-78
4. Kaempgen E, Koch N, Koch F, Stoeger P, Heufler C, Schuler G, et al. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: Synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3014-8
5. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang J-M, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact hypersensitivity. *J Immunol* 1990;145:2833-8
6. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360:258-61.
7. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992;175:1157-67
8. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kroemer E, Elbe A, et al. Generation of human dendritic cells Langerhans cells from circulation CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:1292-302

9. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996;196:121-35
10. Kasinrerk W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Immunol* 1993;150:579-84
11. Choi KS, Kang JM, Lee MG: Analysis of methods for the generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes. *Yonsei Med J* 2000;41: 642-50
12. 김세중. 면역학. 싸이토카인 :고려의학 ;1994. p.158-159
13. Ko S, Kwok TT, Fung KP, Choy YM, Lee CY, Kong SK. Slow rise of Ca^{2+} and slow release of reactive oxygen species are two cross-talked events important in tumour necrosis factor- α mediated apoptosis. *Free Radic Res* 2000;33:295-304
14. Liu R, Buettner GR, Oberley LW. Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF- α . *Free Radic Biol Med* 2000;28:1197-205
15. Bohler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, Hambach P, et al. TNF- α and IL-1 α induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine* 2000;12:986-91
16. Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, Vayssiere JL. TNF- α activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* 1998;17:1639-51
17. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor

- necrosis factor. *J Exp Med* 1998;187:1477-85
18. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck R, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cell is efficiently inhibited by TRAP(CD40-ligand) and TNF- α , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995; 25:1943-50
 19. Koppi TA, Tough-Bement T, Lewinsohn DH, Lynch DH, Alderson MR. CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27:3161-5
 20. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186:2075-80
 21. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1996;12:471-80
 22. Hogg N, Browning J, Howard T, Winterford C, Fitzpatrick D, Gobe G. Apoptosis in vascular endothelial cells caused by serum deprivation, oxidative stress and transforming growth factor-beta. *Endothelium* 1999;7:35-49
 23. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1997;1:282-93
 24. Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H. Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res* 1996;733:9-14
 25. Bass DA, Parce W, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometry studies of oxidative product formation

- by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130:1910-7
26. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 1999;19:350-64
27. Salamone G, Giordano M, Trevani AS, Gamberale R, Vermeulen M, Schettinni J, Geffner. Promotion of neutrophil apoptosis by TNF- α . *J Immunol* 2001;166:3476-83
28. Tsukahara K, Nakao A, Hiraguri M, Miike S, Mamura M, Saito Y, et al. Tumor necrosis factor- α mediates antiapoptotic signals partially via p38 MAP kinase activation in human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120 Suppl 1:54-9
29. Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, Brochier J, Rossi JF, Klein B. Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. *Eur Cytokine Network*. 1999;10:65-70
30. Esche C, Shurin GV, Kirkwood JM, Wang GQ, Rabinowich H, Pirtskhalaishvili G, et al. Tumor necrosis factor- α -promoted expression of Bcl-2 and inhibition of mitochondrial cytochrome c release mediate resistance of mature dendritic cells to melanoma-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001;7(3 Suppl):974s-9s
31. Woo CH, Yoo MH, You HJ, Han HJ, Song WK, Yoo YJ, et al. Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J Biol Chemistry*. 2000 ;275:32357-62
32. Wong GH, Kaspar RL, Vehar G. Tumor necrosis factor and lymphotoxin: protection against oxidative stress through induction of MnSOD. *EXS*. 1996;77:321-33
33. Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW Jr, Kaufmann SH, et al. Caspases mediate tumor necrosis

- factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood*. 1999;93:674-85
34. Schulze-Osthoff K, Bauer MK, Vogt M, Wesselborg S. Oxidative stress and signal transduction *Int J Vita Nutri Res* 1997;67:336-42
 35. Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 1993;9:1564-71
 36. Gius D, Botero A, Shah S, Curry HA. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicology Letters*. 1999;106:93-106
 37. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64-76
 38. Iwai I, Hatao M, Naganuma M, Kumano Y, Ichihashi M. UVA-induced immune suppression through an oxidative pathway. *J Invest Dermatol* 1999;112:19-24
 39. Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26:232-8
 40. Verhasselt V, Goldman M, Willems F. Oxidative stress upregulates IL-8 and TNF- α synthesis by human dendritic cell. *Eur J Immunol* 1998;28:3886-90

Abstract

TNF- α suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal

Yung Jae Lee

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Min-Geol Lee)

Mature dendritic cells (DCs) were generated by culturing human peripheral blood monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4 for 7 days, followed by subsequent treatment with a cytokine cocktail (GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , and PGE2) for 2 days. The viability of the mature DCs was approximately 60%, which gradually declined when re-cultured in X-VIVO 15 media containing 2% human plasma (40% viability 3 days after re-culture). The process of DCs death became rapid upon withdrawal of plasma from the culture (20% viability after 3 days). The addition of TNF- α to the medium completely restored DCs viability(40-50%) in the absence of plasma. Such a protective effect was not observed by using other cytokines such as GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6 and PGE2 . These data indicated that TNF- α is specifically required for the viability of mature DCs. Withdrawal of plasma rapidly (within 15 min) elevated

cellular levels of reactive oxygen intermediates (ROIs), which has been proposed to regulate the ability of DCs to control inflammatory reactions. The possibility that ROIs act as a mediator of DCs death was eliminated by the finding that scavengers of ROIs, catalase, N-acetylcysteine, glutathione, failed to prolong DCs life-span in the absence of plasma. Interestingly, TNF- α was found to almost completely abolish the production of ROIs induced by plasma withdrawal.

From the results, it can be suggested that TNF- α acts as a survival factor in mature DCs death induced by plasma withdrawal and it abolished the production of ROIs induced by plasma withdrawal. However, since the inhibition of ROIs by antioxidants can not suppress the DCs death, further investigation on the mechanism of TNF- α as a survival factor for DCs is necessary.

Key words: Dendritic cell, reactive oxygen intermediates, antioxidants, catalase, N-acetylcystein, glutathione, TNF- α