

수혈 후 동종 세포에 의한 면역 조절 효과

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, ¹미생물학교실, ²내과학교실

김정진 · 유효주 · 권영주 · 정낙균 · 조 빈 · 김태규¹ · 김학기 · 한치화² · 정대철

Immunomodulation Effect of the Allogeneic Cellular Components after Transfusion

Jung Jin Kim, M.D., Hyo Joo Yoo, M.D., Young Joo Kwon, M.D., Nak Gyun Chung, M.D., Bin Cho, M.D., Tae Kyu Kim, M.D.¹, Hack Ki Kim, M.D., Chi Wha Han, M.D.² and Dae Chul Jeong, M.D.

Departments of Pediatrics, ¹Microbiology and ²Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: Blood transfusion is important for life saving treatment in many patients with tolerable adverse effects. Some data suggest that transfusions might cause an increased risk for post-operative infections and a higher relapse or mortality rate in cancer patients. We investigated whether immune dysfunction might result after transfusions from the cellular components.

Methods: We studied 5-week-old mice BALB/c (H-2^d, donor), C3H/He (H-2^k, recipient), and C57/BL (H-2^b, third party). We obtained irradiated spleen cells (SP) from the BALB/c or C57/BL, and injected them into the C3H/He with intraperitoneal IL-2 administration. After 24 hours, we obtained bone marrow (BM), thymus and SP. We identified mixed lymphocyte proliferation (MLR) by the BrdU method and we used irradiated BALB/c SP, as a stimulator for that trial. For the analysis of immune cells, we analyzed the cell surface markers from each organ. For cytokines, we identified TNF- α , IFN- γ , TGF- β , and IL-10 by ELISA from the supernatant of the MLR.

Results: The cell proliferation decreased according to specific H-2 complexes. There were increased CD4+CD25+ cells in the thymus. For the paracrine effects, the B-C3H SP showed ratio-dependent inhibitory effects, although the C-C3H SP inhibited some cell proliferation. There was no difference in the IFN- γ , TNF- α and TGF- β between the control and experimental groups. However, IL-10 was higher in the 1 : 10 ratio mixture in the control and transfused SP compared to the other groups.

Conclusion: The results of this study suggested that the cellular components in transfusions might contribute to the immune regulatory effects by CD4+CD25+ cells after 24 hours. (*Korean J Hematol* 2007;42:375-381.)

Key Words: Transfusion, Immunomodulation, IL-10, CD4+CD25+ cells

서 론

수혈은 다양한 내과적, 외과적 문제를 해결하는 중요

접수 : 2007년 7월 11일, 수정 : 2007년 10월 4일

승인 : 2007년 10월 15일

교신저자 : 정대철, 인천시 부평구 부평 6동 665

☎ 403-720, 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 소아과

Tel: 032-510-5687, Fax: 032-503-9724

E-mail: dcjeong@catholic.ac.kr

본 연구의 일부는 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 임상학연구실 지원에 의하여 이루어진 것임.

한 보조적 치료방법이다. 수혈을 통하여 많은 환자의 생명을 구할 수 있으나 여러 가지 부작용이나 합병증이 발생한다.¹⁾ 수혈 후에는 인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA)에 대한 동종항체(alloantibo-

Correspondence to : Dae Chul Jeong, M.D.

Department of Pediatrics, Our Lady of Mercy Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea

665, Bupyeong 6-dong, Bupyeong-gu, Incheon 403-720, Korea

Tel: +82-32-510-5687, Fax: +82-32-503-9724

E-mail: dcjeong@catholic.ac.kr

dies) 유도에 의한 동종면역(alloimmunization)이나 T 세포 활성화에 의한 면역 관용(immune tolerance)과 같이 두 가지의 서로 다른 면역반응이 일어날 수 있다.¹⁻³⁾

동종수혈(allogeneic transfusion) 후에는 발열성비용혈수혈반응(febrile nonhemolytic transfusion reaction), 수혈로 인한 이식편대숙주병(transfusion associated graft versus host disease), 감염원(infectious agents)의 전달 등의 부작용이 있으며, 또한 면역억제도 흔하게 올 수 있다.²⁻⁵⁾ 임상적으로 수술 과정에 수혈을 받은 경우 수술 후 감염의 빈도가 높고, 중양 환자들이 수혈을 받았을 경우 중양의 재발과 사망률이 높다.⁶⁻⁸⁾ 이와 반면에 장기 이식에 있어 이식 전에 공혈자 특이 수혈(donor specific transfusion)을 시행했을 때 이식된 장기가 장기간 생존하는 임상 결과는 수혈로 인하여 면역관용이 이루어지는 사실을 뒷받침한다.⁹⁻¹¹⁾ ‘수혈 효과(transfusion effect)’라고 불리는 이러한 현상은 수혈 후 여러 기전에 의해 유도되는 면역 억제 효과에 의한 것으로 이 과정에는 백혈구와 다양한 수용성 물질이 작용하는 것으로 알려져 있다.^{1,2,5)}

이와 같은 생체 내에서의 동종 항원에 대한 면역관용(immune tolerance)은 혈액제제 내에 존재하는 다양한 체액 성분 및 세포 성분에 의해 아포토시스(apoptosis), 아너지(anergy), 자연살해 세포(NK cell) 기능 억제, Th2 세포의 분극(polarization), 미세키메리즘(microchimerism) 등의 기전을 통하여 이루어진다.⁹⁾ 그 기전은 저장되었던 혈액에서 많은 양의 죽은 세포와 혈장 성분으로 인하여 IL-4, IL-5, IL-10과 같은 시토카인이 활성화되어 세포성 면역보다는 체액성 면역으로 면역 억제 현상이 일어난다.^{5,12)} 또한 공혈자와 수혈자가 인간백혈구항원인 HLA-DR이 동일한 경우 면역억제 T 세포가 활성화되어 면역 관용이 유도된다.^{2,12)} 그러나 수혈과 면역 억제에 대한 정확한 기전이나 자료에 대하여는 알려진 것이 없다.

이에 저자는 구조적적합항원이 불일치하는 마우스를 이용하여 혈장 성분을 제거한 면역세포를 수혈하여 발생하는 면역조절을 관찰하였다. 수혈로 인하여 공혈자 특이 항원에 대한 면역 반응이 일어나는지를 확인하고, 수혈 후 발생한 면역반응에 관여하는 수혈자 면역세포의 변화와 이에 관련된 시토카인의 변화를 알아 보았다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

5주된 수컷 BALB/c (H-2^d, 공혈자) 마우스와 암컷 C3H/He (H-2^k, 수혈자) 마우스, C57/BL (H-2^b, third party) 마우스를 이용하였다. 모든 마우스는 Jackson Laboratory (Ann Harbor, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 특정 병원체가 없는 마우스를 무균 사육기에서 멸균된 사료와 물을 사용하여 실험에 들어가기 전 1주의 적응기간을 거쳐 실험에 이용하였다.

2. 수혈 처치와 비장세포의 분리

경추 탈골시켜 즉사시킨 BALB/c 마우스의 비장세포(spleen cell, SP)를 얻어 2,500cGy 방사선을 조사한 후 이를 C3H/He 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주입하면서 5,000IU의 Interleukin-2 (IL-2, R&D system, Minneapolis, MN)를 복강 내 주사하였고(B-C3H), 같은 방법으로 C57/BL 마우스의 비장세포를 얻어 방사선 조사 후 C3H/He 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주사하면서 동일한 방법으로 IL-2를 복강 내 주사하였다(C-C3H). 대조군은 수혈처치를 받지 않은 C3H/He 마우스를 이용하였다. B-C3H, C-C3H, 대조군인 C3H/He 마우스 모두에서 세포 주입 후 24시간이 경과한 다음 경추 탈골로 즉사시켜 비장세포(SP)를 얻었다.

3. 혼합 림프구 반응

BALB/c SP에 2,500cGy의 방사선을 조사하여 자극 세포(stimulator)로 사용하였고, C3H/He SP, B-C3H SP, C-C3H SP를 각각 반응세포(responder)로 이용하였다. 반응 세포를 자극세포와 함께 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10로 혼합한 후 triplicate 상태에서 72시간, 37°C로 CO₂ 배양기에서 배양하였고, 72시간 후 Bromo-deoxy-uridine을 첨가하여 12~18시간 배양하였다. 혼합 림프구 반응은 Roche사의 BrdU 방법(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 이용하여 ELISA 흡광도에 따른 세포증식정도를 확인하였다. 세포증식은 다음과 같은 공식을 이용하여 세포자극지수(stimulation index)를 확인하였다.

(실험군의 흡광도 -
대조군의 흡광도)

세포 자극 지수(%) = $\frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$

또한, 수혈처치를 받은 마우스 SP의 C3H/He SP에 대한 세포자극 정도를 확인하기 위해 수혈처치를 받은 마우스의 SP와 C3H/He 마우스의 SP를 1 : 1, 1 : 10의 비율로 혼합하여 자극세포에 대하여 72시간 배양한 다음 BrdU 방법으로 세포증식을 확인하였다.

4. 유세포 분석

수혈처치를 받은 수혈자 마우스의 면역세포를 분석하기 위해서 수혈 후 24시간에 수혈자 마우스로부터 골수, 흉선, 비장을 제거하여 각각에 분포하는 T 세포(CD3, CD4, CD8), B 세포(B220), 대식세포(Mac-3), 자연살해세포(NK1.1)를 Fluorescein isothiocyanate (FITC)와 Phycoerythrin (PE)로 염색하여 분석하였으며, 각 장기에서의 CD3+CD4+CD25+ 세포의 분포를 확인하였다. 모든 항체는 각각에 해당되는 isotype control antibody를 이용하였고 BD Pharmingen (Becton Dickinson, Mountain View, CA)으로부터 구입하여 사용하였다. 5×10^5 세포를 각 항체에 염색한 후 4°C에서 암실에서 30분간 반응시킨 후 0.1% bovine serum albumin과 0.02% sodium azide가 함유된 PBS로 2차례 세척하고 분석할 때까지 500 μ L의 1% paraformaldehyde을 혼합하여 고정시켜 4°C에서 보관하였다. 유세포분석은 EPIC-XII (Beckman Coulter Co., Miami, FL)를 이용하여 분석하였다.

5. 시토카인 측정

72시간 배양한 혼합 림프구 반응 실험에서 얻은 상청액을 -80°C에 보관하였다. 면역반응을 증진시키는 TNF- α , IFN- γ , 강력한 면역억제작용을 보이는 TGF- β , 면역조절작용을 나타내는 IL-10을 ELISA 방법으로 triplicate하여 시토카인의 양을 측정하였으며 각각의 최저값 한계는 TNF- α 가 5.1pg/mL, IFN- γ 이 2pg/mL, TGF- β 이 1.7pg/mL, IL-10이 4pg/mL이었다. 모든 시토카인 ELISA kit는 R&D system에서 구입하였다.

6. 통계 분석

세포증식도는 모든 실험을 3배수로 시행한 평균값에 대하여 one-way ANOVA (analysis of variance)으로 통계 분석하였고, 각각의 비율에 따른 차이는 Student's t test로 분석하였다. 또한, CD4+CD25+세포와 시토카인도 one-way ANOVA로 통계 처리하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우 통계적 유의성으로 인정하였다.

결 과

1. IL-2와 공혈자 마우스의 비장 세포를 수혈 처치한 후 혼합 림프구 반응

동종 수혈 시 세포 성분에 의해 림프구 증식이 억제되는지를 알아보기 위해 2,500cGy의 방사선을 조사한 BALB/c SP를 자극 세포(stimulator)로 C3H/He SP (대조군), B-C3H SP, C-C3H SP의 세포증식 정도를 확인하였다. 수혈 후 24시간 뒤에 대조군에 비하여 세포 증식이 유의하게 억제되었고 억제 효과는 자극세포와 반응세포 비율이 1 : 1일 때 가장 현저하게 나타났다(자극세포에 대한 반응세포의 비율 1 : 1, $-26.7 \pm 9.7\%$; 5 : 1, $-19.3 \pm 6.7\%$; 10 : 1, $-9.3 \pm 6.2\%$, $P < 0.01$).

C-C3H에서도 일부 증식억제가 있었으나(자극세포에 대한 반응세포의 비율 1 : 1, $-3.1 \pm 2.2\%$; 5 : 1, $-2.5 \pm 10.6\%$; 10 : 1, $-8.5 \pm 5.9\%$) 자극세포와 반응세포의 비율에 따라 차이가 없었다. 그러나 세포증식이 B-C3H에서 더욱 현저하게 감소되어($P < 0.01$), H-2 complex에 대해 더 특이적이었고 세포 증식 억제는 공혈자 항원에 대해 특이성이 있었다(Fig. 1).

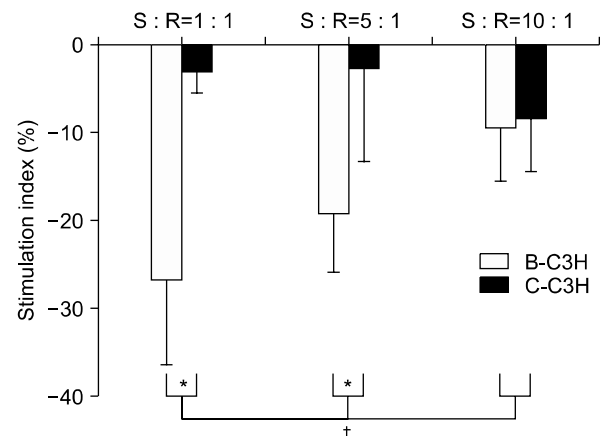


Fig. 1. The comparison of stimulation index between B-C3H and C-C3H against control (n=6). The cell proliferation was shown markedly decreased state in B-C3H among other groups when stimulator (S) versus responder (R) ratio was 1 : 1 ($*P < 0.01$). There are shown more diminished proliferation of B-C3H than that of C-C3H ($^{\dagger}P < 0.01$). Control means cell proliferation in unirradiated C3H spleen (SP) and irradiated BALB/c SP. B-C3H, C3H/He SP received with irradiated BLAB/c SP; C-C3H, C3H/He SP received with irradiated C57/BL SP.

2. 동종 수혈 후 면역세포의 변화

수혈 받은 수혈자 마우스의 면역세포를 분석하기 위해서 수혈 후 24시간에 수혈자 마우스에서 골수, 흉선, 비장을 제거하여 각 장기에 분포하는 T 세포(CD3, CD4, CD8), B 세포(B220), 대식세포(Mac-3), 자연 살해세포(NK1.1)를 FITC와 PE로 염색하여 분석한 결과 골수, 흉선, 비장 모두에서 면역 세포인 T세포, B세포, 대식세포 및 자연 살해 세포의 분포는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 각 장기에서 CD3+CD4+CD25+ T 세포는 대조군과 B-C3H, C-C3H의 골수나 비장에서 차이가 없었으나, 흉선에서 B-C3H의 CD3+CD4+CD25+ 세포가 대조군과 C-C3H에 비하여 현저하게 증가하였다($33.8 \pm 16.4\%$ vs. $17.5 \pm 11.0\%$, $17.7 \pm 2.2\%$, $P < 0.05$) (Table 1).

3. 수혈 처치한 비장세포와 대조군 비장세포의 혼합을 통한 세포증식 정도의 비교

수혈 처치한 비장세포가 가지고 있는 주변 분비효과(paracrine effect)에 따른 대조군 비장세포의 세포증식의 효과를 알아보았다. B-C3H SP나 C-C3H SP와 함께 대조군 SP를 혼합하였을 경우 모두 세포증식은 억제되었다. 그러나 대조군 SP와 B-C3H SP를 1 : 1로 혼합하

Table 1. The percentage of CD3+CD4+CD25+ cells in each organ (n=6)

	Bone marrow	Spleen	Thymus
Control	9.0 ± 5.2	16.0 ± 9.8	17.5 ± 11.0
B-C3H	9.9 ± 3.3	15.8 ± 9.6	$33.8 \pm 16.4^*$
C-C3H	8.4 ± 4.1	11.0 ± 9.0	17.7 ± 2.2

* $P < 0.05$. Control, C3H/He; B-C3H, C3H/He received with irradiated BALB/c spleen cells (SP); C-C3H, C3H/He received with irradiated C57/BL SP.

Table 2. The level of cytokines in supernatant of cell proliferation

	IL-10 (pg/mL)	TGF- β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
Control	10.6 ± 0.5	994.8 ± 43.9	11.5 ± 1.2	6.3 ± 0.6
B-C3H	11.0 ± 1.0	981.3 ± 36.2	11.6 ± 1.3	6.2 ± 0.4
C-C3H	10.1 ± 1.2	965.6 ± 41.2	12.3 ± 0.8	6.6 ± 0.3
Mix (1 : 1)	10.8 ± 0.2	$1,146.3 \pm 59.8$	10.4 ± 0.5	7.3 ± 0.9
Mix (1 : 10)	$31.0 \pm 2.9^*$	$1,152.6 \pm 70.9$	10.4 ± 1.4	6.6 ± 1.0

* $P = 0.013$. B-C3H, C3H/He spleen (SP) received with irradiated BALB/c SP; C-C3H, C3H/He SP received with irradiated C57/BL SP; Mix, control SP plus B-C3H SP. The parenthesis of mix means the ratio of control SP and B-C3H SP.

였을 경우 혼합하지 않은 경우보다 세포증식이 억제되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 C-C3H SP를 대조군 SP와 혼합한 경우보다 유의하게 감소되어($P < 0.05$), B-C3H SP에서 C-C3H SP보다 유의하게 세포증식이 억제되었다. 또한, 수혈처치를 받은 SP와 대조군 SP를 같이 혼합한 경우 모든 군에서 혼합하지 않은 경우에 비하여 혼합 비율에 관계없이 유의하게 세포증식이 억제되었다($P < 0.05$) (Fig. 2).

4. 시토카인 분석

IL-10의 측정값에서 대조군과 B-C3H SP의 혼합 배양액 중에서 1 : 10의 비율인 경우(31.0 ± 2.9 pg/mL)가 대조군(10.6 ± 0.5 pg/mL), B-C3H (11.0 ± 1.0 pg/mL), C-

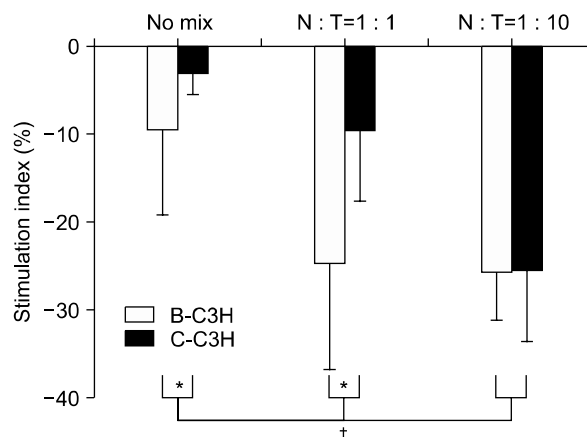


Fig. 2. The comparison with stimulation index for mixture of untransfused spleen cells (SP) and transfused SP (n=5) according to ratio. There were shown more profound inhibition in mixture (control SP+transfused SP) than no mixture. Also, the inhibition was partially dependent on H-2 complex, but not different in high ratio (*, $^{\dagger}P < 0.05$). B-C3H, C3H/He received with irradiated BALB/c SP; C-C3H, C3H/He received with irradiated C57/BL SP; N, control SP; T, transfused SP.

C3H (10.1 ± 1.2 pg/mL)에 비하여 유의하게 증가되었고, 1 : 1 비율로 대조군과 B-C3H SP가 혼합된 경우 (10.8 ± 0.2 pg/mL)와 비교하여도 IL-10의 측정값이 높았다($P=0.013$). TGF- β , TNF- α , IFN- γ 는 모든 군에서 차이가 없었다(Table 2).

고 찰

동종 수혈 요법은 지금까지 빈혈과 실혈 및 수술 시 불가피한 출혈에 대한 보존적 치료 방법으로 인식하고 있다. 그러나 동종 혈액(allogenic blood) 제제는 수혈자를 세포성 또는 체액성 동종항원(alloantigens)들에 노출시킴으로써 동종면역반응(alloimmunization)이나 수혈연관성면역조절(transfusion associated immunomodulation, TRIM)이라고 알려진 면역관용 등의 다양한 면역반응을 유발한다.^{5,12,13} 본 연구에서는 수혈 시 체액 성분을 제거한 세포성분만을 투여함으로써 일어날 수 있는 면역반응을 확인하였다. 임상에서 수혈을 위해 보관된 혈액제제는 수일간 보관하면서 백혈구가 대부분 아포토시스되기 때문에 실제로 아포토시스된 백혈구가 수혈자에게 수혈된다.¹⁴

IL-2는 면역반응에서 흔히 림프구증식에 관여하지만 면역억제 또는 조절세포의 증식에도 관여한다. 마우스 동종조혈모세포이식에서 IL-2 단독으로 미리 수혈자에게 단기간 투여하면 오히려 면역반응이 감소되어 이식편대숙주반응이 감소하지만,¹⁵ 수혈과 같은 조작이 있을 경우에는 면역반응이 증가한다. 본 연구에서 IL-2와 함께 방사선을 조사한 비장세포의 수혈은 면역억제기능이 확인되었다. 주입되는 세포에 투여된 방사선 조사량이 늘어남에 따라 면역억제가 현저히 나타나는데¹⁶ 이는 주입되는 세포가 아포토시스된 결과라고 할 수 있다. 또한 아포토시스된 세포를 주입하면 주입된 세포의 항원성을 가진 항CD4+세포의 생성과 함께 지속적인 미성숙 상태의 수지상세포로 유지되어 면역억제효과가 나타난다.¹⁷

방사선조사를 받은 SP를 IL-2와 함께 투여한 후 골수, 비장 및 흉선에서 면역세포의 변화 중 가장 뚜렷한 것은 CD4+CD25+ T세포의 현저한 증가였으며, 특히, 흉선에서 가장 많이 증가되었다. 장기 이식 전에 공혈자특이수혈(donor specific transfusion)로써 CD4+CD25+ T세포가 유도되고 이런 세포들이 흉선에서 많이 분포한다는 결과와 같다.^{10,11} 또한, IL-2의 투여에 대하여 CD4+CD25+ T세포의 증식이 IL-2에 의해 더욱 현저하게 나타날 수 있기 때문에 이전의 논문들과 동일한 결

과라고 할 수 있다.¹⁸ 그리고 IL-2가 CD4+CD25+ T세포의 기능을 조절하는 FoxP3의 활성화에 중요한 역할을 하기 때문에 중요한 시토카인이라고 할 수 있으며¹⁹ 임상에서 수혈을 받는 상황에서 많은 경우가 수술이나 감염 등, 인체의 면역반응을 일으키는 경우가 많으므로 IL-2를 동시 투여함으로써 임상과 유사한 환경을 만들고자 하였다. 한편, 공혈자림프구수혈(donor lymphocyte transfusion)을 시행하면 이중 음성 조절 세포(double negative regulatory cell)가 유도된다.^{4,20} 본 연구에서 double negative T세포가 확인되지 않았는데 Margenthaler 등⁴)이나 Young 등²⁰)은 세포를 주입한 다음 1주일 이후에 나타나는 결과를 보고하였기 때문에 이번 결과와 실험 방법적인 차이에 의한 것으로 생각한다.

조절 T세포의 주변분비효과(paracrine effect)를 알아보기 위해 수혈처치 받지 않은 세포와 처치 받은 세포를 혼합하여 자극세포(BALB/c, H-2^d)에 대한 세포증식지수를 확인하였다. C3H/He의 SP와 B-C3H SP나 C-C3H SP 모두에서 혼합하였을 경우보다 유의하게 세포증식이 억제되었는데 이러한 결과는 항원에 자극받은 세포(B-C3H 혹은 C-C3H)에서 C3H/He SP에 대한 면역억제와 관계된 현상을 유도하였다고 할 수 있다. 특히 C3H/He SP와 처치 받은 SP의 비율이 동등한 비율로 혼합되었을 경우에는 B-C3H가 C-C3H보다 유의하게 세포증식이 억제된 결과로서 H-2에 특이적으로 작용하였다고 할 수 있다. 이는 수혈을 통하여 항원 특이성을 보이는 다른 보고들과 일치하는 결과라고 할 수 있다.^{4,10} 그렇지만 C-C3H SP에서도 어느 정도 세포증식이 억제되었는데 이러한 결과는 Wallgren 등²¹)의 보고와 유사하다고 할 수 있고, 그 기전은 C-C3H SP에서 비특이적으로 분비되는 시토카인에 의해서 면역억제반응이 나타날 수 있다고 생각한다.²²

수혈처치를 받은 세포들이 C3H/He 세포에 대하여 주변분비효과를 나타낼 수 있는 현상을 설명하기 위해서 강력한 면역억제효과를 보이는 TGF- β 와 세포손상에 관여하는 TNF- α , Th1의 대표적인 시토카인인 IFN- γ 및 면역조절에 흔히 관여하는 IL-10을 세포증식을 위해 배양하였던 배양액에서 각각의 분비 정도를 확인하였다. IFN- γ 는 모든 실험군에서 차이가 없어 세포매개성 면역반응(cell-mediated immune response)이 수혈 이후 관여하지 않는다는 것을 시사하고 있다. 또한, TNF- α , TGF- β 가 모든 실험군과 대조군에서도 유의한 차이는 없었다. 특히 TGF- β 는 수혈 시 아포토시스된 세포가 주입되면서 대식세포에서 섭취되어 분비하

게 되고 이러한 이유로 면역억제가 나타난다고 하였으나²³⁾ 본 연구와 차이가 있었다. 그러나 대조군과 수혈 처치 받은 SP와 혼합하여 세포증식을 확인하였던 경우에서 처치 받은 SP가 1 : 10으로 많은 경우에 현저하게 IL-10의 분비가 증가된 것을 알 수 있었다. IL-10은 가장 대표적인 면역조절 시토카인으로서 수혈 처치 후에 증가된 CD4+CD25+세포에서 분비되었다고 생각한다. 다른 혼합에 비하여 처치 받은 세포가 많았을 경우 현저하게 증가되었기 때문에 다량의 CD4+CD25+세포가 작용하였다고 생각한다. CD4+CD25+ T세포는 IL-10의 분비와 CTLA-4를 통한 세포-세포의 접촉으로 면역억제기능을 나타낸다.²⁴⁾ 따라서 수혈 처치 받은 세포들이 다량으로 존재할 경우 IL-10을 통하여 CD4+CD25+세포가 면역억제기능을 갖는다고 생각한다.²⁵⁾ 모든 수혈 처치 받은 비장이나 흉선에서 대조군에 비하여 현저하게 CD4+CD25+ T세포가 증가하였기 때문에 다른 혼합이나 B-C3H 혹은 C-C3H에서는 IL-10이 증가되지 않았다는 결과로서 세포의 접촉을 이용한 면역억제 기전이 작용하였다고 생각하며 앞으로의 연구에서 수혈처치 받은 비장세포나 흉선 세포에서의 CTLA-4의 발현을 검증하여야 할 것으로 생각한다.

결론적으로 수혈할 때 주입되는 아포토시스 된 세포들은 수혈 이후에 수혈자의 CD4+CD25+ T세포가 증식되어 면역 억제 반응이 나타나며 면역억제는 IL-10에 의해서 주변분비효과(paracrine effect)를 통하여 더욱 현저하게 나타날 수 있다. 따라서 수혈 혈액 내에 존재하는 백혈구를 제거함으로써 수혈 후 발생하는 면역억제능력을 조절할 필요가 있다. 세포성분을 수혈함으로써 발생하는 CD4+CD25+ T세포의 다른 면역억제 기전에 대하여는 계속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

배경: 수혈은 많은 사람의 생명을 구하는 보조적 치료 방법이나 다양한 부작용이 나타날 수 있다. 수혈로 인해 수술 후 감염 발생률이 증가하고 중양 환자의 재발률이나 사망률이 증가한다는 보고가 있으나 수혈 후 면역 억제에 대한 정확한 기전이나 자료에 대하여는 알려져 있지 않다. 이에 저자는 수혈 후 세포 성분에 의해 면역 억제가 유도되는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 5주된 BALB/c (H-2^d, donor), C3H/He (H-2^k, recipient), and C57/BL (H-2^b, third party) 마우스를 실험

함에 사용하였다. BALB/c 마우스(H-2^d, 공혈자)와 C57/BL (H-2^b, third party) 마우스의 비장세포(spleen cell, SP)를 얻어 2,500cGy 방사선을 조사한 후 이를 C3H/He (H-2^k, 수혈자)마우스의 꼬리 정맥을 통해 주입하면서 Interleukin-2 (IL-2, R&D system, Minneapolis, MN)를 함께 복강 내 주사하였다. 24시간 뒤에 골수, 흉선, 비장(SP)에서 세포를 얻었다. 방사선 조사를 한 BALB/c SP를 자극 세포(stimulator)로 사용하여 BrdU 방법으로 혼합 림프구 반응을 시행하였다. 면역세포를 분석하기 위해서 각 장기에서 얻은 세포의 표면 표식자(surface marker)를 분석하였다. 면역반응에 관여하는 시토카인을 확인하기 위해 혼합 림프구 반응 실험에서 얻어진 상청액에서 ELISA 방법으로 TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10을 측정하였다.

결과: 수혈 후 24시간 뒤에 세포 증식의 현저한 감소를 보였으며 이는 H-2 complex에서 더 현저하였다. 24시간 뒤에 흉선에서 CD3+CD4+CD25+세포의 현저한 증가가 있었다. 주변 분비 효과를 알아보고자 하는 실험에서는, C-C3H SP는 다소의 세포증식 억제효과를 보여주었으나 B-C3H SP는 혼합물에 의존적인 세포 증식 억제 효과를 보였다. 시토카인 IFN- γ , TNF- α , TGF- β 는 실험군과 대조군에서 차이가 없었으나, IL-10이 대조군과 처치 받은 비장을 1 : 10으로 혼합한 경우에서 유의하게 증가되었다.

결론: 수혈 후 24시간 뒤에 혈액 내 세포 성분, 특히 CD4+CD25+세포에 의해 면역 조절 반응이 유도됨을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Raghavan M, Marik PE. Anemia, allogeneic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill. *Chest* 2005;127:295-307.
- 2) Claas FH, Roelen DL, van Rood JJ, Brand A. Modulation of the alloimmune response by blood transfusions. *Transfus Clin Biol* 2001;8:315-7.
- 3) Vamvakas EC, Blajchman MA. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood* 2001;97:1180-95.
- 4) Margenthaler JA, Kataoka M, Flye MW. Donor-specific antigen transfusion-mediated skin graft tolerance results from the peripheral deletion of donor-reactive CD8+ T cells. *Transplantation* 2003;75:2119-27.
- 5) Roelen DL, van Rood JJ, Brand A, Claas FH. Immunomodulation by blood transfusions. *Vox Sang*

- 2000;78(2 Suppl):273-5.
- 6) Jensen LS, Kissmeyer-Nielsen P, Wolff B, Qvist N. Randomised comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. *Lancet* 1996;348:841-5.
- 7) Taniguchi Y, Okura M. Prognostic significance of perioperative blood transfusion in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2003;25:931-6.
- 8) Bordin JO, Bardossy L, Blajchman MA. Growth enhancement of established tumors by allogeneic blood transfusion in experimental animals and its amelioration by leukodepletion: the importance of the timing of the leukodepletion. *Blood* 1994;84:344-8.
- 9) Marti HP, Henschkowski J, Laux G, et al. Effect of donor-specific transfusions on the outcome of renal allografts in the cyclosporine era. *Transpl Int* 2006; 19:19-26.
- 10) Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003;76:449-55.
- 11) Cavinato RA, Casiraghi F, Azzollini N, et al. Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cell. *Transplantation* 2005;79: 1034-9.
- 12) Ortolano GA, Russell R, Capetandes A, Wenz B. Transfusion-associated immunosuppression-Heuristic model or clinical concern. *Mod Asp Immunobiol* 2002;2:159-65.
- 13) Blajchman MA. Transfusion immunomodulation or TRIM: what does it mean clinically? *Hematology* 2005;10(1 Suppl):208-14.
- 14) Frabetti F, Musiani D, Marini M, et al. White cell apoptosis in packed red cells. *Transfusion* 1998;38: 1082-9.
- 15) Sykes M, Pearson DA, Szot GL. IL-2-induced GVHD protection is not inhibited by cyclosporine and is maximal when IL-2 is given over a 25 h period beginning on the day following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:395-9.
- 16) Fast LD. The effect of exposing murine splenocytes to UVB light, psoralen plus UVA light, or γ -irradiation on in vitro and in vivo immune responses. *Transfusion* 2003;43:576-83.
- 17) Wang Z, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. *Am J Transplant* 2006;6:1297-311.
- 18) Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, et al. In vitro-expanded human CD4+CD25+ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 2004;104:453-61.
- 19) Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108:1571-9.
- 20) Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 2002;100: 3408-14.
- 21) Wallgren AC, Alder J, Andersson B, Karlsson-Parra A, Backer AE. The direct pathway of human T-cell allorecognition is not tolerized by stimulation with allogeneic peripheral blood mononuclear cells irradiated with high-dose ultraviolet B. *Scand J Immunol* 2006;63:90-6.
- 22) Dzik S, Mincheff M, Puppo F. Apoptosis, transforming growth factor- β , and the immunosuppressive effect of transfusion. *Transfusion* 2002;42:1221-3.
- 23) Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-8.
- 24) Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+Regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4-and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002;168: 1080-6.
- 25) Santin AD, Bellone S, Palmieri M, et al. Effect of blood transfusion during radiotherapy on the immune function of patient with cancer of the uterine cervix: role of interleukin-10. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54: 1345-55.