대한병리학회지 1992; 26: 253~269

# 유핵세포에서 세포막 공격 보체 복합체에 의한 세포 살해기전 연구†

가톨릭대학 의학부 병리학교실, 내과학교실* 및 해부학교실**

김 상 호·박 성 학*·천 명 훈**

# The Study of Cell Killing Mechanism by Membrane Attack Complexes of Complement in the Nucleated Cells

**Sang Ho Kim** M.D., **Sung Hak Park**, M.D.* and **Myung Hoon Chun**, M.D.**

*Department of Pathology, Internal Medicine* and Anatomy***
*Catholic University Medical College, Seoul, Korea*

The mechanism of cytolysis by complement attack of nucleated cells(NC) is of special interest in comparison to that of red blood cells. It is known that NC death by membrane attack complex, C5b-9, is caused by many factors, i.e., efficiency of complex assembly, activation of intrinsic metabolic pathway by signal transduction, cytotoxic effect of the channel itself and natural repair ability. These factors suggest that colloid osmotic lysis, known in red blood cells, does not fully explain the complement-mediated cell death of NC.

In this study, the authors investigated correlation between biochemical and morphological changes to prove "$Ca^{2+}$-mediated metabolic death"[8~13] representing a mechanism of NC death caused by C5b-9 attack.

The L1210 cells, mouse leukemic cell line carrying small complement channel($TAC5b\text{-}9_1$) were used in the experiments. The amounts of intracellular adenine nucleotides to extracellular $Ca^{2+}$, ouabain, KCl and dextran were analyzed by bioluminescence method using luminometer. Cell viability was checked by 0.4% trypan blue dye and LDH release. Morphological observation of $TAC5b\text{-}9_1$ was done by immunocytochemical staining and electron microscope.

The results were as follows:

1) The release of ATP, ADP and AMP followed by cell death was rapid and progressive along the incubation time at 37°C and it was accelerated in 1.5 mM of $[Ca^{2+}]_b$.

2) There was no evidence of ATP repairment in the $TAC5b\text{-}9_1$.

3) Extracellular KCl(150 mM), dextran(0.66 mM) and ATP supplement(0.2 $\mu$M) could not effectively inhibit ATP depletion and cell death. Ouabain(27 and 100 $\mu$M) enhanced cell death and could not completely prevent ATP loss.

4) Most of the mitochondria showed swelling, loss of cristae and $Ca^{2+}$ deposit in matrix in the

접 수: 1992년 3월 9일, 게재승인: 1992년 5월 15일
주 소: 서울특별시 서초구 반포동 505, 우편번호 137-701
가톨릭의대 병리학교실, 김상호
†이 연구는 1990년도 한국 과학재단 연구비(목적기초) 지원에 의한 결과임(과제번호:90-05-00-12).

## 서 론

보체 매개성 세포사는 고전경로 또는 대체경로를 통

electron microscopic observation.

Rapid, sustained and irreversible depletion of adenine nucleotides was due to $Ca^{2+}$ deposit with destruction of mitochondria and also the leakage through transmembrane channels. Moreover this energy depletion was accelerated by high extracellular $Ca^{2+}$ concentration. These results indicate that $Ca^{2+}$-mediated, energy exhaustion is one of the mechanisms of the metabolic cell death by C5b-9 attack of NC. **(Korean J Pathol 1992; 26: 253~269)**

**Key Words:** C5b-9, ATP, Metabolic cell death, Calcium, Ouabain

하여 활성화된 보체계에서 말단 보체 분자들이 표적세포인 유핵세포 세포막에 삽입되어 세포막 공격 보체 복합체인 C5b-9 통로가 조립, 형성되며 이 구멍을 통하여 $K^+$, $Na^+$ 이온의 유, 출입이 일어나고 물이 세포내로 유입되며 또한 거대분자 유출을 동반하여서 세포팽창에 이어 세포파열이 초래된다. 이와같은 교질 삼투성 세포용해[1,2]가 보체에 의한 세포사 기전으로 믿어져 왔다. 그러나 1983년 이후 이와같은 교질 삼투압 조절상실 기전 이외에 여러 학설이 제시되어 왔다. 즉 대장균(E. coli)같은 세균이나, 기생충 또는 종양세포와 같은 유핵세포에서는 세포막 표면이 복잡하고 대사활성이 활발하여 보체 공격에 대항하여 파괴된 세포막의 수복 능력이 있다고 알려졌고[3~5], C5b-9 통로의 수명[6], 보체통로의 수[7]와 크기[8], $Ca^{2+}$의 신호전달 역할[9,10] 및 교질삼투압 보호실험[11]등의 결과 여러 세포내외적 요인들이 간여함이 알려졌고, C5b-9 단백질들은 원형질막의 투과성질을 조절할 기능이 있어서 자극-반응 결합후 세포기능에 변화를 주게된다[9]. 따라서 보체 공격후 유핵 세포의 사망기전은 대사성 세포사의 개념이 제시되었다[8,12,13].

저산소증에 빠진 세포에서는 액성매질내 유리 $Ca^{2+}$의 증가로 사립체에 $Ca^{2+}$ 과부하가 일어나 세포손상이 올 수 있음은 이미 잘 알려져 있다[14,15]. 따라서 보체공격의 경우에도 표적세포의 세포막 손상뿐 아니라 에너지 대사를 전담하는 사립체가 다수의 세포막 보체통로를 통한 $Ca^{2+}$의 대량 유입으로 손상받기 쉬워서 세포 생존에 필요한 에너지의 영구 결핍이 초래될 수 있을 것이다[13]. 또한 준치사량의 C5b-9 공격시 사립체에서 cardiolipin 합성이 증가되어 세포막의 지방이중층 구성요소인 인지질의 재생이 일어남이 관찰된 바 있다[5].

따라서 본 연구는 대사성 세포 사망 개념을 구체적으로 증명하고자 보체공격 후 유핵세포의 사망 과정에서 ① 세포내 에너지 원인 ATP, ADP 및 AMP를 정량하여 사립체 기능의 영구손상 여부를 알아보고, ② 사립체와 C5b-9 구멍을 전자현미경 및 면역세포화학적 방법으로 관찰하며, ③ 세포외 $Ca^{2+}$($[Ca^{2+}]_0$) 농도 변화 및 교질 삼투압 보호제 투여에 따른 세포내 adenine nucleotide의 정량과 동시에 사립체의 형태변화를 관찰하여 사립체의 기능적 및 형태학적 상관관계를 알아봄으로써 유핵세포에 대한 보체의 세포 살해 기전을 분명히 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

**1) 완충액**: $DGVB^{2+}$(pH 7.4)로써 5 mM sodium barbital, 72.5 mM NaCl, 2.5% dextrose, 0.1% gelatin, 0.15 mM $CaCl_2$ 및 1 mM $MgCl_2$가 포함되었다.

**2) 표적세포**: DBA/2 마우스에서 얻어진 림프구계 백혈병 세포인 L1210 세포(ATCC, CLL 219)를 사용하였고, 이 세포는 보체를 불활성화시킨 10%(v/v) 우태아혈청과 25 mM의 Hepes 및 50 unit/ml의 penicillin과 50 μg/ml의 streptomycin을 첨가한 RPMI-1640(Gibco, Grand Island, USA) 배지(pH 7.2)에 부유시켜 37°C에서 95% 공기와 5% $CO_2$의 배양기내에서 유지하였다.

**3) 세포막 항체**: Kim등[8]의 방법을 변형하여 L1210 세포의 세포막에서 대한 항체를 얻었다. 요약하면 초음파 처리와 Dounce를 통하여 L1210 세포를 파괴후 초원침하여 세포막 분획을 얻었다. 이를 토끼(체중 2 kg 내외)에 매주 1회씩 총 5회 주입하여 항혈청을 형성시켰다. 이 항 혈청을 33% 황산암모늄 투여로 글로불린을 분리한 후 sephadex G-200 column(완충액은 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl,

pH 7.5)을 통과시켜 순수한 IgG 분획을 얻었으며, 그 농도는 50 mg/ml로 하였다.

**4) 보체**: 사람 C8(역가 20,000 U/mg/ml), 사람 C9(역가 850,000 U/mg/ml), C8 결핍 사람혈청(C8D-HS, 1 mg/ml)은 모두 Quidel 회사(San Diego, USA) 제품을 사용하였다.

**5) 세포외 calcium($[Ca^{2+}]_o$) 농도**: DGVB 완충액에 $Ca^{2+}$의 최종농도가 0.015, 0.15 및 1.5 mM이 되도록 하여 1 mM $Mg^{2+}$의 존재하에서 세포를 부유시켜 실험에 사용하였다.

**6) Dextran, KCl, ouabain, ATP 첨가**: 교질삼투압 보호제는 최종농도 0.66 mM의 dextran(분자량 72,600 dalton, Sigma, St. Louis, USA)을 사용하였고, ouabain(Sigma, St. Louis, USA)은 최종농도가 27 μM 및 100 μM을, KCl은 0.15 M을, ATP (BioOrbit, Turku, Finland)는 최종농도가 1~0.05 μM이 되도록 연속 희석한 후 완충액에 첨가하여 사용하였다.

## 2. 방 법

**1) TA, TAC5b-7, TAC5b-8 및 TAC5b-$9_1$ 제조**: Kim등[8]의 방법을 사용하였다. 요약하면, $5\times10^6$개/ml 농도의 L1210세포(T)에 L1210 세포의 세포막 항체(A)를 부착시켜 TA를 형성후 여러농도의 C8D-HS를 37°C에서 15분간 반응시켜 TAC5b-7을 형성시켰다. 이 세포에 0°C~4°C 에서 여러농도의 C8을 반응시켜 C5b-8 통로를 형성시켰다. 최종 C8 한 분자당 C9 두 분자 이내가 부착된 C5b-$9_1$ 통로를 형성시켜서(TAC5-$9_1$) 이 세포로부터 37°C에서 동력학적 연구로 세포사망율, adenine nucleotide 정량 및 LDH(lactic dehydrogenase) 유리율을 측정하였다.

**2) Adenine nucleotide 정량**: ATP, ADP 및 AMP 모두 luminometer(LKB, Bio-Orbit, Model L1250, Wallac Oy, Turku, Finland)를 사용하여 생물발광법으로 측정하였다.

**(1) ATP;** 37°C에서 시간별로 TAC5b-$9_1$($2.5\times10^4$개 세포)내에 함유한 ATP 양은 ATP monitoring kit(LKB, Bio-Orbit, Turku, Finland)로 측정하였다. 사용한 완충액은 0.1 M Tris acetate-2 mM EDTA(pH 7.75)이었다. 농도계산은 10 μM의 ATP ($10^{-5}$ M 저장액, LKB, Bio-Orbit, Turku, Finland)표준액 2.5 μl를 투여하여 광도(mv)로부터 환산하였다.

**(2) ADP;** Hampp[16]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 $2.5\times10^4$개 TAC5b-$9_1$ 세포에 1.66 M의 perchloric acid를 투여하여 고정한 후 원침하여 얻은 일정량의 상청액(pH 7.6~8.0)에 ADP test mix [desalted pyruvate kinase(2,000 KU/L, 10 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, West Germany), 1.4 mM phosphoenolpyruvate, 25 mM Hepes/KOH, 10 mM $MgSO_4$ 혼합액]를 실온에서 가하여 15분 방치한 다음 ATP monitoring reagent를 투여하여 15분 방치 후 광도(mv)를 측정하였다. 정량은 ADP 표준액(1 μM, Sigma, St. Louis, USA)을 일정량 투여하여 농도를 술식에 따라 환산하였다.

**(3) AMP;** ADP 측정법과 동일하였고 다만 ADP test mix 대신 탈염 pyruvic kinase와 탈염 myokinase(9,000 KU/L, 5 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, West Germany)를 포함한 AMP test mix를 투여하여 측정하였으며, AMP 표준액(1 μM, Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 농도를 환산하였다.

**3) 전자 면역세포 화학법**: 포매전 염색법으로 표본제작을 하였다. 즉 $2.5\times10^6$개/ml의 TAC5b-$9_1$을 2% glutaraldehyde-$DVB^{2+}$ 완충액(pH 7.3)으로 실온에서 20분간 전고정한후 원침하여 얻은 세포 pellet을 45°C~47°C에서 1% 한천에 포매하였다. 이어서 C7, C8, C9 및 SC5b-9 항원의 분포위치를 알기 위하여 단클론항체를 사용하여 ABC 과산화 효소법으로 염색하였다. 요약하면 마혈청으로 비특이 결합소를 차단시킨 후 1차항체로 0.1% 우혈청 알부민을 함유한 1/100 희석의 마우스 항 사람C7(1 mg/ml, Quidel, San Diego, USA), 항 사람C8(1 mg/ml, Quidel, San Diego, USA), 항 사람C9(1 mg/ml, Quidel, San Diego, USA) 및 항 사람SC5b-9(1 mg/ml, Quidel, San Diego, USA)을 사용하였으며 ABC staining kit(Vectastain®, avidin and biotinylated horseradish peroxidase H, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA)로 2차항체는 biotin처리 말 항 마우스 IgG를 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2) 완충액으로 희석하여 사용하였고 발색 기질은

0.02% 과산화수소와 0.1% DAB의 동량 혼합액으로 실온에서 7분간 발색시켰다. 증류수로 씻은후 1% osmic acid-0.2 M sucrose-0.1 M cacodylate 완충액(pH 7.4)으로 후고정하였고, 0.5% uranyl acetate로 30분간 단염색한 후 탈수과정을 거쳐 epon 812에 포매하였다.

**4) 투과 전자현미경**: TAC5b-$9_1$($5\times10^5$개)을 0.66 mM dextran이나 0.015, 0.15 및 1.5 mM $Ca^{2+}$을 함유한 완충액에 각각 부유시켜 37°C에서 동력학적 연구를 한후 4°C에서 원침하여 1% 한천에 세포 pellet을 포매시켰다. 이 세포를 2% glutaraldehyde-$DVB^{2+}$ 완충액(pH 7.2) 또는 세포내 $Ca^{2+}$ 분포위치를 보기 위하여 3% glutaraldehyde-90 mM $KH_2PO_4$ 완충액(pH 7.6)으로 실온에서 30분간 전고정하였다. $DVB^{2+}$ 또는 $KH_2PO_4$ 완충액으로 세척후 1% osmic acid-0.2 M sucrose-0.1 M cacodylate 완충액(pH 7.4) 또는 1% osmic acid-2.5% potassium pyroantimonate 완충액(pH 7.6)으로 4°C에서 12시간 후고정하였다. 이어 알코올로 단계적 탈수과정을 거쳐 한천을 제거후 epon 812에 포매하였다. Ultrotome®(LKB, Sweden)으로 두께 60~70 nm의 초박절편을 만들어 nickel grid에서 Reynolds의 방법[17]에 따라 4% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 한뒤 JEOL type 1200 EX(Japan)로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

**5) 주사 전자현미경**: 세포막 표면에서 C5b-$9_1$의 구멍을 관찰하기 위하여 TAC5b-$9_1$($2.5\times10^6$개 세포/ml)을 1% glutaraldehyde-phosphate 완충 식염수 완충액(pH 7.6)으로 4°C에서 12시간 전고정한 후 PBS로 세척하고 이어 1% 오스민산으로 4°C에서 2시간 후고정 하였다. 그후 알코올로 단계적 탈수과정을 거친 후 $CO_2$ critical point dryer(Bio-Rad, Polaron, model E3000, Watford, England)로 완전건조 후 도금은 Sputter coater(model E5150, FTM controlled, Bio-Rad, Watford, England)로 10 mA에서 3분간 진공에서 실시하였다. 관찰은 JSEM(type 35 C, JEOL, Japan)으로 하였다.

**6) 세포 생존율**: 0.4% trypan blue 색소 배제검사를 실시하였고, 또한 Koski등[7]의 방법을 변형하여 LDH 유리율을 측정한 바 요약하면 TAC5b-$9_1$($5\times10^5$개 세포) 상청액에 $\beta$-NADH, 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.5) 및 6 mM의 sodium pyruvate를 첨가한 후 분광계(Hewlett-Packard, model 8050, with graphic plotter, HP 7225A, San Diego, USA)로 파장 340 nm에서 흡광도 변동을 시간별로 측정하였다. 이때 100% 유리는 최종 농도 0.07%의 Triton X-100 용액을 사용하였다.

## 결 과

### 1. C5b-$9_1$ 형성 후 세포사에 따른 세포내 ATP 함량

TAC5b-8 세포에 4°C에서 C9을 부착시켜 TAC5b-$9_1$을 만든 후 37°에서 0시간부터 30분까지 각 시간별로 세포내의 ATP 양과 세포 사망속도를 동시에 측정하였다. 그 결과 배양 1분째 세포사에 선행하여 20%의 매우 빠른 ATP 소실을 보였으며 그후 배양시간에 따라 세포사에 비례하여 지속적으로 세포내 ATP 함량이 감소되었다(Fig. 1) ATP 양은 $2.5\times10^4$개 세포당 0.26 nmole(t=0)에서 배양 1분째에는 29%의 소모를 보였고 배양 10분째에는 t=0에 비하여 64%의 소실을 보였다(Fig. 2).

### 2. ATP 첨가 실험

$DGVB^{2+}$ 완충액에 ATP를 최종 농도가 0.2 $\mu$M이 되도록 첨가하여 37°C에서 TAC5b-$9_1$을 시간별로

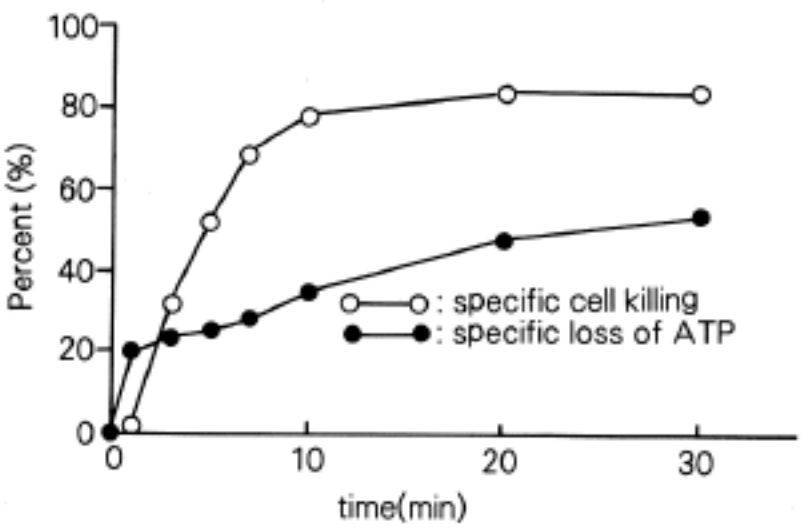



**Fig. 1.** The loss of ATP and death rate of L1210 cells carrying C5b-$9_1$ channels after varying periods of incubation at 37°C. The percentage of ATP loss increased progressively in proportion to the incubation time.

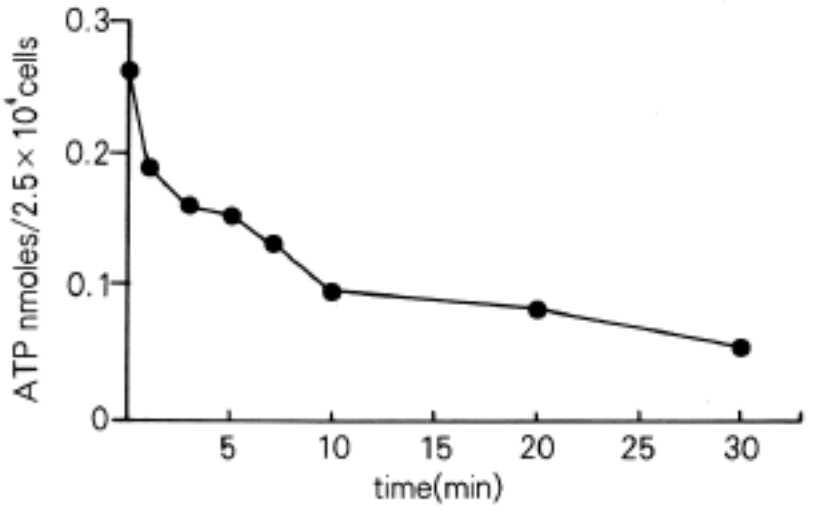



**Fig. 2.** The amount of intracellular ATP in cells carrrying TAC5b-$9_1$ channels. The ATP loss was 29% and 64% at 1 min and 10 min of incubation, respectively, in comparison with the zero time. ATP concentration was 0.26 nmols per $2.5\times10^4$ cells at the zero time.

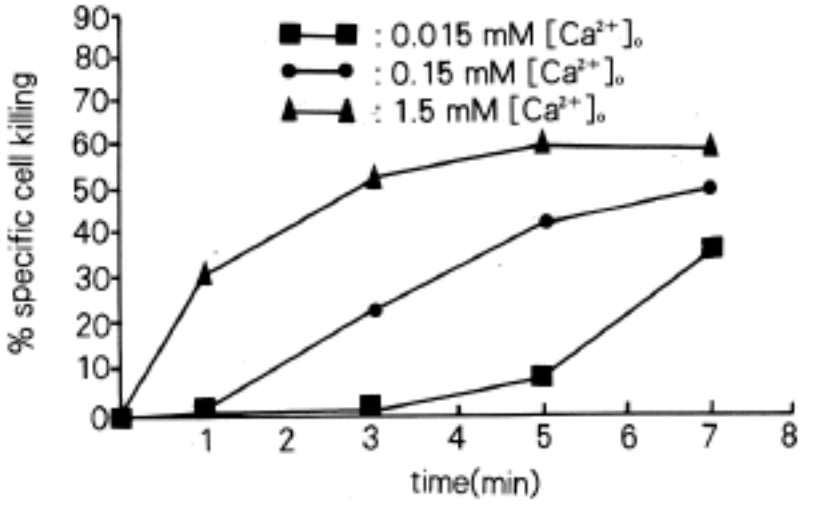



**Fig. 4-1.** Effects of varying concentrations of extracellular $Ca^{2+}$ on the lytic process of cells carrying a low dose of C5b-$9_1$ channels. The killing rate was higher and increased faster at 1.5mM $Ca^{2+}$ than 0.15 and 0.015 mM $Ca^{2+}$.

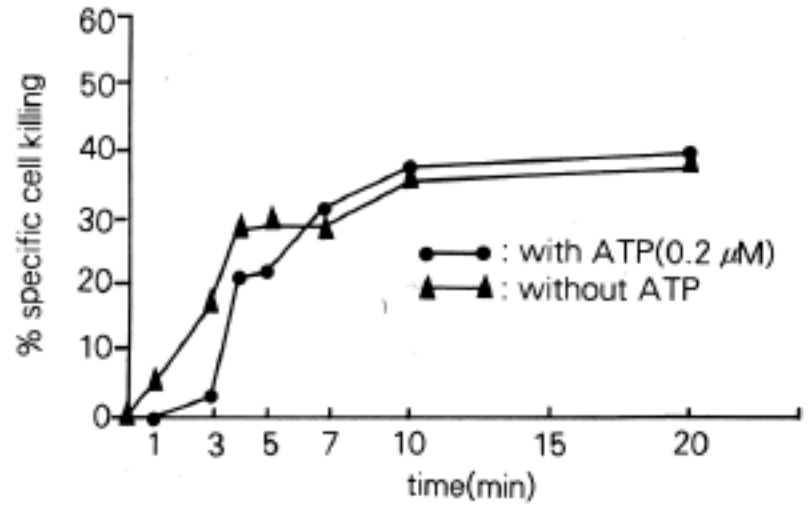



**Fig. 3.** Effect of extracellular ATP on the death of TAC5b-$9_1$. The killing rate of C5b-$9_1$ was lower in the presence of 0.2 $\mu$M ATP than in the absence of ATP especially at 3 min when the inhibition rate was about 14%, but there was no significant difference after 7 min of incubation.

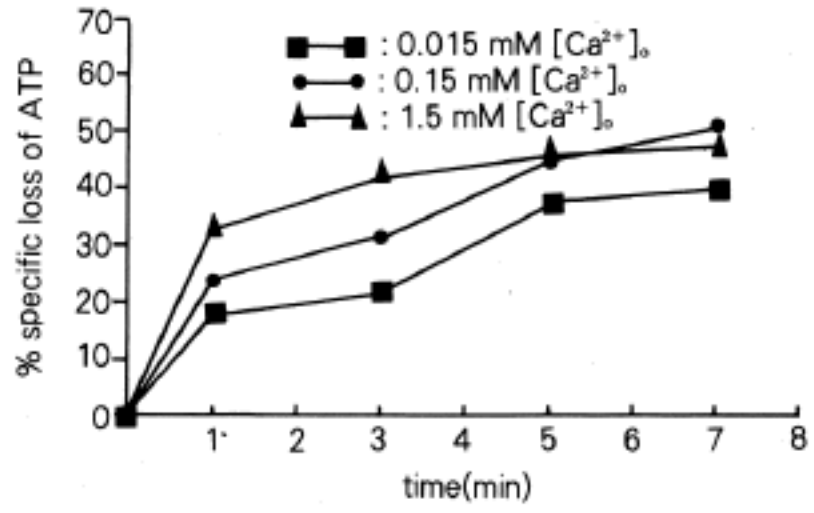



**Fig. 4-2.** Effects of varying concentrations of extracellular $Ca^{2+}$ on the loss of intracellular ATP from TAC5b-$9_1$(the same cell as in Fig. 4-1). When the C5b-$9_1$ was about 50% of cytolytic dose at the kinetic end point, the rate of ATP loss was higher at 1.5 mM $Ca^{2+}$ than 0.15 and 0.015 mM $Ca^{2+}$ until 3 min of incubation.

배양하여 세포 사망율을 측정하였다. 그 결과 배양 20분에 40%의 세포사를 보이는 C5b-9 조건하에서 배양 3분째에서는 ATP를 첨가하지 않은 세포에 비하여 14% 낮은 세포사를 보였고 그 이후는 ATP 첨가에 의한 세포사 억제 현상이 소실되었다(Fig. 3).

### 3. 세포외 $Ca^{2+}$ 농도변화에 따른 ATP 함량

TAC5b-$9_1$을 최종농도가 0.015, 0.15 및 1.5 mM의 $Ca^{2+}$과 1 mM의 $Mg^{2+}$이 첨가된 완충액에 부유시켜 37°C에서 시간별로 세포사망율과 세포내 ATP 소실 속도를 측정하였다. 그 결과 배양 1분부터 5분까지 모두 1.5 mM $[Ca^{2+}]_0$이 가장 높은 사망율을 나타내

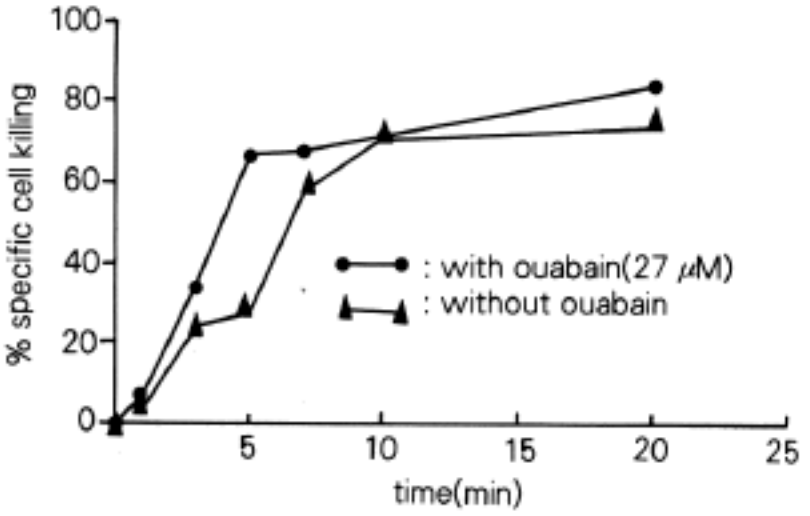



**Fig. 5-1.** Effect of extracellular ouabain(27 $\mu$M) on the lytic process of TAC5b-9$_i$. The killing rate was faster in the presence of ouabain than in the absence of it until 5 min of incubation.

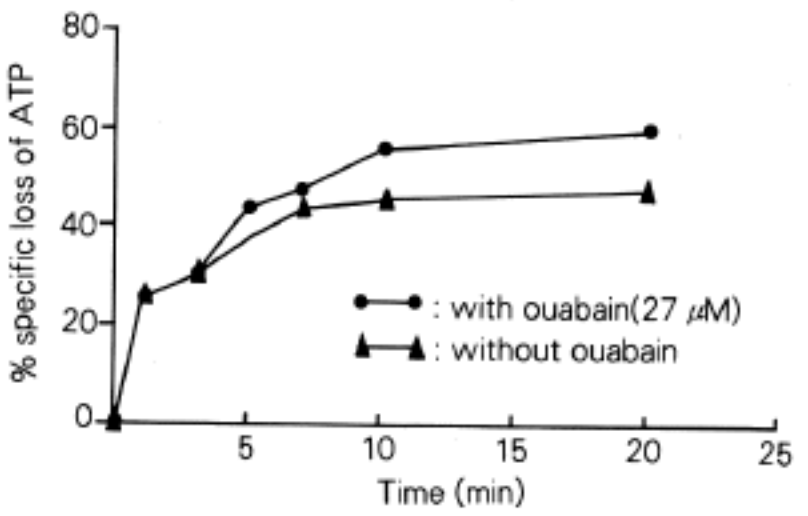



**Fig. 5-2.** Effect of extracellular ouabain(27 $\mu$M) on the loss of ATP from TAC5b-9$_i$(the same cells as in Fig. 5-1). ATP loss was delayed until 7 min of incubation.

었고 0.015 mM $[Ca^{2+}]_0$이 가장 낮았다. 배양 7분 째에는 0.15 mM $[Ca^{2+}]_0$에 비하여 0.015 및 1.5 mM $Ca^{2+}$ 모두 10% 내외의 세포사망율의 차이를 보일 정도이었다(Fig. 4-1). 또한 ATP 소실 속도는 세포사망율에 비례하여 1.5 mM $[Ca^{2+}]_0$에서는 배양 3분째에 0.015 mM $[Ca^{2+}]_0$에 비하여 20% 이상 높았고 배양 5분 이후부터는 $[Ca^{2+}]_0$의 차이에 따른 ATP 소실율의 차이가 적었다(Fig. 4-2).

### 4. Ouabain 투여 후 ATP 함량

$Na^+$-$K^+$ ATPase 억제제인 ouabain을 최종농도 27 $\mu$M 및 100 $\mu$M이 되도록 $DGVB^{2+}$ 완충액에 첨가한 후 TAC5b-9$_i$을 37°C에서 시간별로 배양하여 세포 사망율과 세포내 ATP 소실 속도를 측정한 바, ouabain 27 $\mu$M의 경우 특히 배양 5분째에 대조군(ouabain 비첨가)에 비하여 40% 이상 세포사의 증가를 보였으나 그 이후 배양 20분까지 ouabain 첨가 없는 완충액에서와 세포사망율이 비슷하였다(Fig. 5-1). ATP 소실 속도는 ouabain 27 $\mu$M의 경우 배양 7분까지는 대조군과 차이가 없었으며 배양 10분 이후에도 10% 이내의 차이를 보였다(Fig. 5-2). Ouabain 100 $\mu$M의 경우 교질 삼투압 보호제인 dextran(최종농도 0.66 mM) 및 $DGVB^{2+}$와 비교해 볼때 ATP 소실속도에는 큰 차이가 없었다(Fig. 6). 즉 ouabain 27과 100 $\mu$M 모두 C5b-9$_i$ 통로를 가진 표적세포의 사망속도를 가속화 시켰고 세포내 ATP 소실을 효과적으로 억제시키지 못하였다. dextran 역시 세포사망율을 저하시키지 못하였고 ATP 소실도 억제시키지 못하였다.

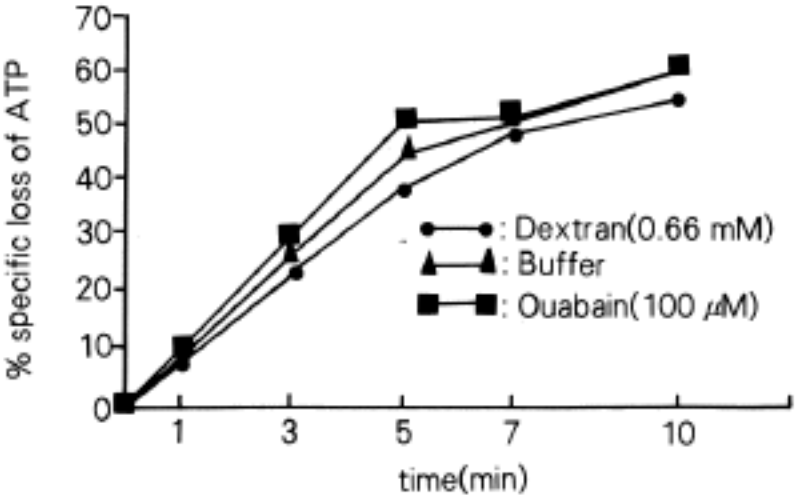



**Fig. 6.** Effects of dextran(0.66 mM) and ouabain(100 $\mu$M) on the loss of ATP from TAC5b-9$_i$. There was no remarkable difference in ATP contents between dextran-treated, ouabain-treated and non-treated cells.

### 5. KCl 첨가 후 세포사망율

150 mM의 KCl을 $DGVB^{2+}$에 첨가하거나 또는 KCl과 0.66 mM의 dextran을 $DGVB^{2+}$에 첨가한 후 TAC5b-9$_i$을 37°C에서 10분간 배양하면서 시간별로 세포사망율을 검사한 바 KCl 및 KCl과 dextran 모두 보체공격에 따른 세포사를 억제시키지 못하였다(Fig. 7).

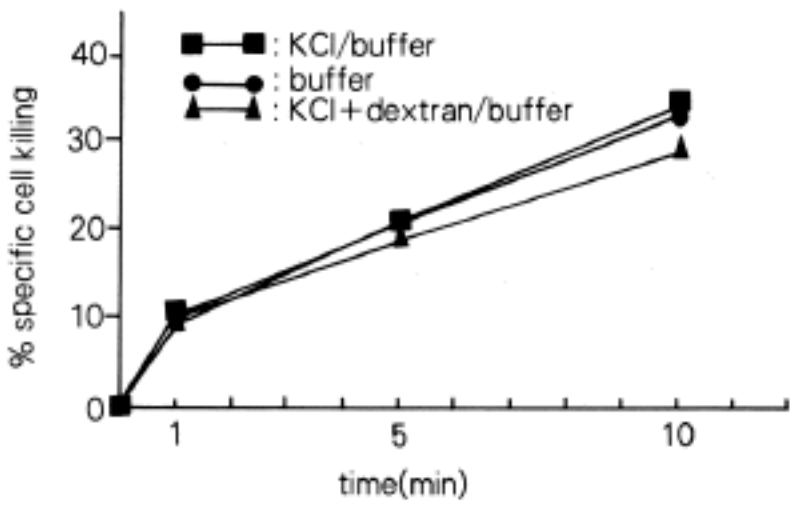



**Fig. 7.** Effects of extracellular KCl(150 mM) or KCl plus dextran(0.66 mM) on the early lytic process of cells carrying C5b-$9_1$ channels. Neither KCl nor KCl plus dextran showed any protective effects on the cytolysis.

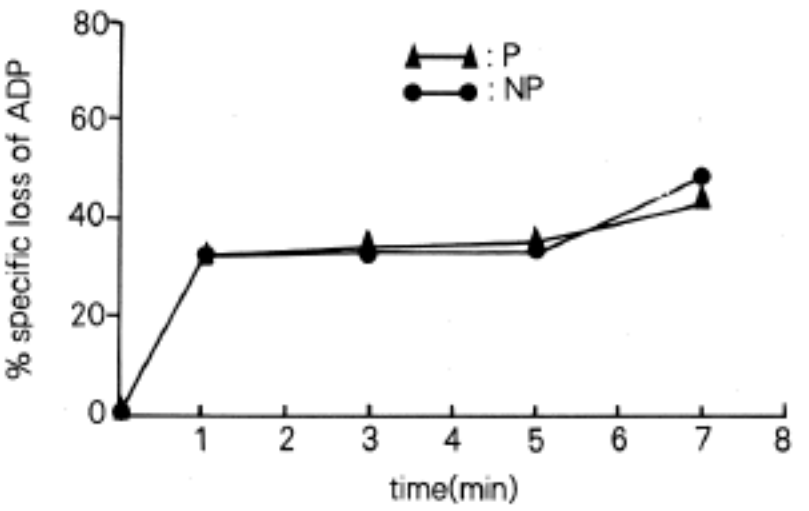



**Fig. 9.** Effect of dextran(0.66 mM) on the loss of ADP from TAC5b-$9_1$. Dextran(P, protected) had no protective effect on the ADP loss in comparison with non-protected(NP) cells.

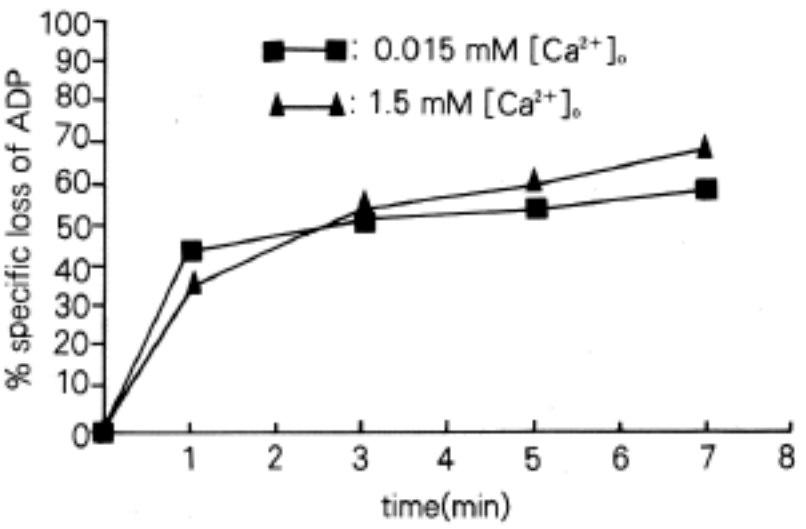



**Fig. 8.** Effects of extracellular $Ca^{2+}$(0.015 and 1.5 mM) on the loss of intracellular ADP. 1.5 mM $Ca^{2+}$ elicited slightly fast loss of ADP after 5 min of incubation.

### 6. C5b-$9_1$ 형성 후 세포외 $Ca^{2+}$ 농도변화에 따른 세포내 ADP 함량

ATP를 정량한 동일한 세포인 $2.5\times10^4$개 TAC5b-$9_1$에서 0.015 mM 및 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$의 농도변화에서 세포내 ADP 함유량을 측정하였다. 배양시간에 따라 0.015 및 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ 모두 지속적으로 ADP 양은 감소하였고, 배양 1분에는 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$에서는 35%, 0.015 mM $[Ca^{2+}]_o$에서는 44% 감소하여 0.015 mM $[Ca^{2+}]_o$에서 소모가 약간 빨랐으나, 배양 5 및 7분은 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$에서 소모 속도가 다소 빨랐다(Fig. 8). 이때 세포사망율은 배양 7분에는 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$에서는 46%, 0.015 mM $[Ca^{2+}]_o$에서는 50%이었다.

### 7. 교질 삼투압 보호제 투여 후 세포내 ADP 함량

0.66 mM dextran 존재하(P군)에서 TAC5b-$9_1$의 세포내 ADP 소실율은 교질 삼투압 비보호군(NP군)과 차이가 없었으며 두군 모두 그 감소속도는 1분에 33%로 빨랐다(Fig. 9).

### 8. C5b-$9_1$ 형성 후 세포외 $Ca^{2+}$ 농도변화에 따른 세포내 AMP 함량

ADP 측정에서와 동일한 조건의 TAC5b-$9_1$ 세포를 0.015 mM 및 1.5 mM $Ca^{2+}$이 포함된 완충액에 부유시키고 37°C에서 시간별로 $2.5\times10^4$개 세포내에 함유된 AMP를 측정한 결과 0.015 및 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ 모두 배양 1분에 32%의 소실을 보였고 그 소실속도는 두군 모두 비슷하였다(Fig. 10).

### 9. 교질 삼투압 보호제 투여 후 세포내 AMP 함량

0.66 mM dextran을 첨가한 P군과 완충액군(NP군)에서 AMP 소실율이 배양 1분에 20%(P군)와 16%(NP군)로 비슷하였고 배양 3분과 5분에서 그 차이

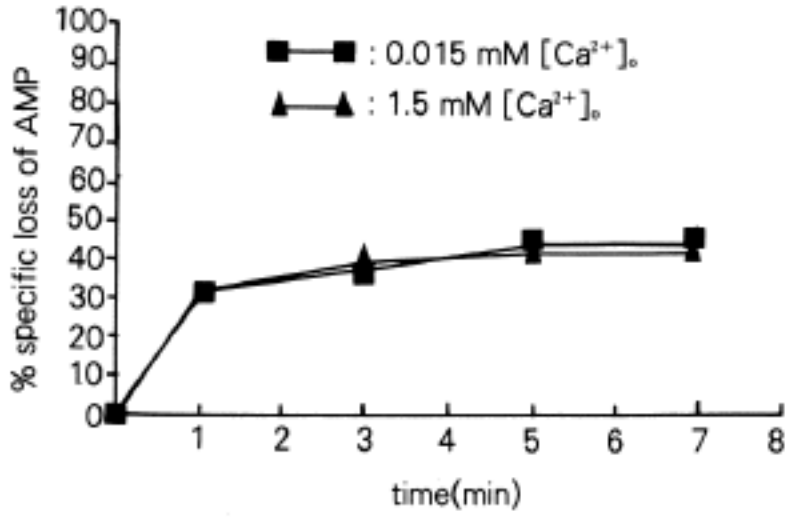



**Fig. 10.** Effects of extracellular $Ca^{2+}$(0.015 and 1.5 mM) on the loss of AMP from TAC5b-$9_1$. Both concentrations of $Ca^{2+}$ had no difference in the loss of intracellular AMP.

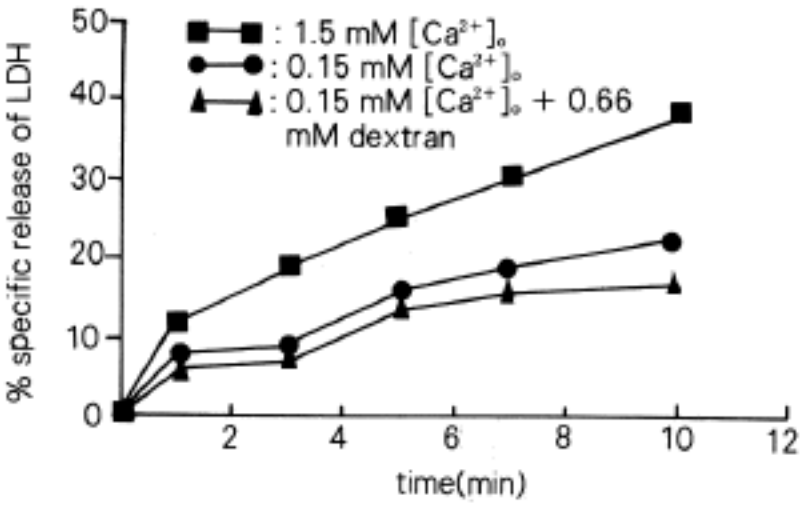



**Fig. 12.** Effects of varying concentrations of extracellular $Ca^{2+}$ on the release of LDH from TAC5b-$9_1$ in the lytic process. 1.5 mM $Ca^{2+}$ induced higher and caused a faster rate of LDH release than other concentrations of $Ca^{2+}$. Dextran(0.66 mM) had no significant effect on the release of LDH.

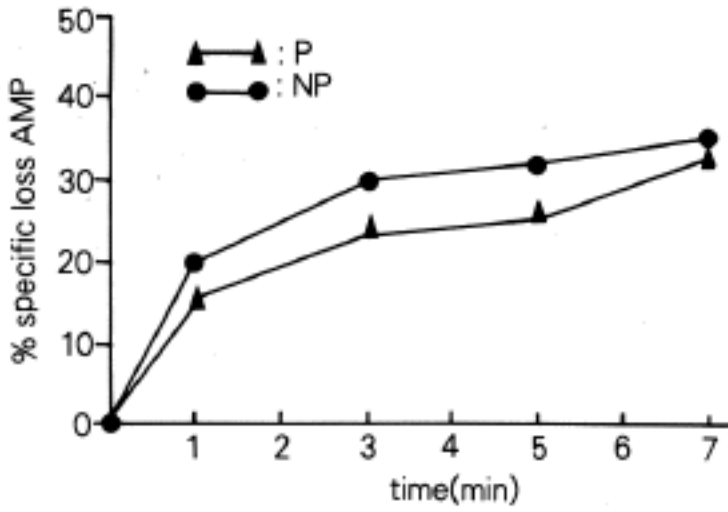



**Fig. 11.** Effect of extracellular dextran(0.66 mM) on the loss of AMP from TAC5b-$9_1$. AMP loss was not significantly affected by the dextran(P, protected).
NP; non-protected

는 5% 이내이였다(Fig. 11).

### 10. C5b-$9_1$ 형성 후 세포외 $Ca^{2+}$ 농도 변화에 따른 LDH 유리양 변동

1.5 mM $Ca^{2+}$ 또는 0.66 mM dextran을 완충액 $DGVB^{2+}$에 첨가한 후 TAC5b-$9_1$을 시간별로 37°C에서 배양하면서 세포밖으로 유리되는 LDH 양을 측정한 바 1.5 mM $[Ca^{2+}]_0$에서 0.15 mM $[Ca^{2+}]_0$이나 dextran 투여군에 비하여 높고 빨랐으며, dextran은 LDH 유리율에 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 12).

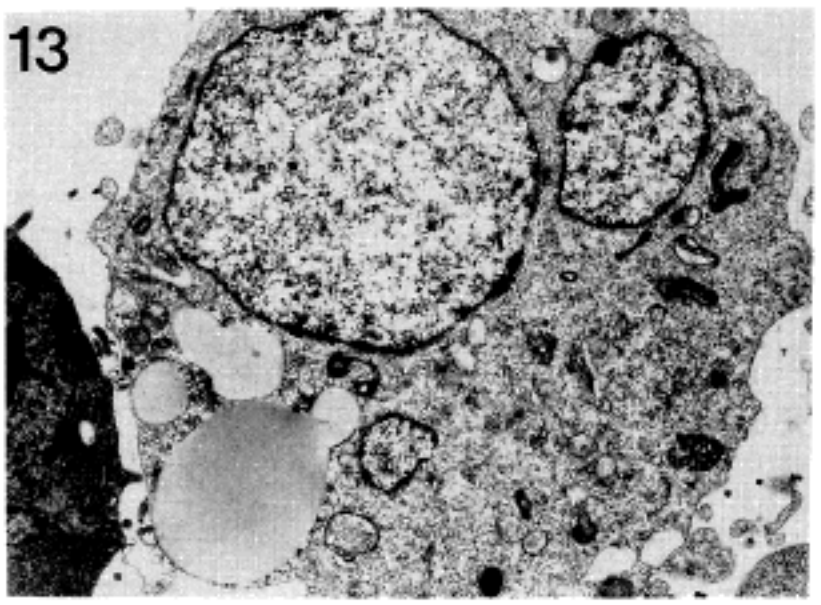
### 11. 전자현미경 소견

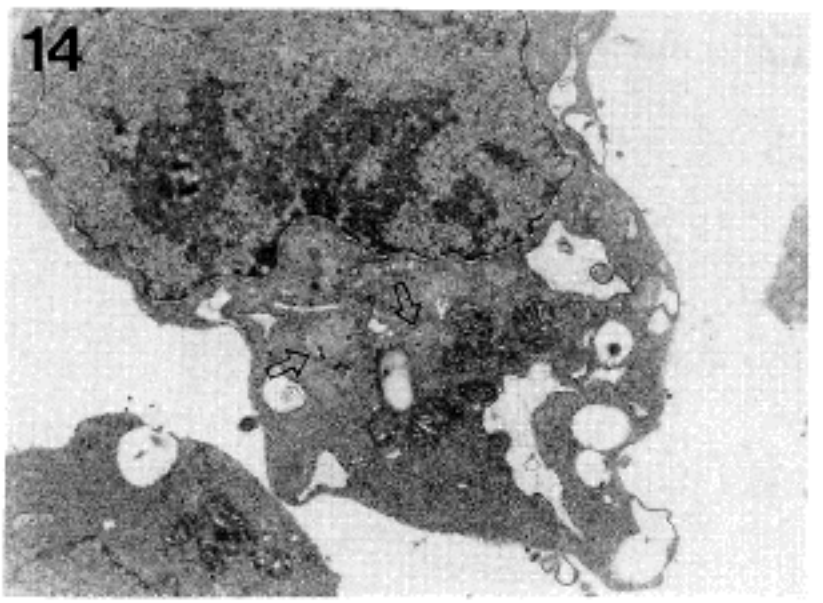
**1) 투과 전자현미경 소견:** TAC5b-$9_1$ 세포들을 37°C에서 여러 조건하에서 시간별로 배양한 다음 전자현미경으로 관찰한 결과, 조건과 시간에 따른 세포의 미세구조적 변화를 명확히 관찰할 수 있었다.

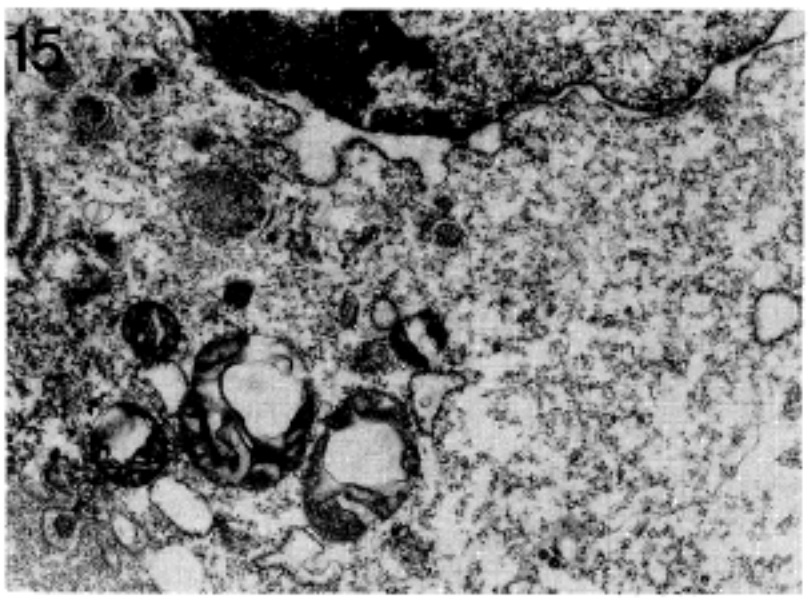
배양 3분(Fig. 13)에서 세포는 대부분 팽창되어 심하게 커져 있었고, 세포질에는 전자밀도가 낮으면서 균일한 물질로 채워져 있는 공포가 다수 출현하였고, 과립형질내세망의 수조가 다소 확장되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 대부분의 사립체들이 팽창되었으며, 세포질의 전반적인 모습은 유리 라이보솜사이의 거리가 멀어짐으로써 전자밀도가 낮았다. 그러나 핵에서는 뚜렷한 퇴행성 변화를 볼 수 없었다.

배양 5분째의 세포는 3분째의 것에 비하여 더욱 커졌으며, 세포질내에 공포가 수가 더욱 증가하였고, 과립형질내세망의 수조가 심하게 확장되어 전체 cytocavitary network이 확장된 양상을 보였다(Fig. 14). 사립체는 배양 5분째의 것부터 심한 퇴행성 변화 내지 파괴소견을 보여 거대한 크기로 팽창되었고 사립체의 능선은 파괴되거나 소실되었고(Fig. 15, 16), 사립체 기질에 작고 원형인 전자밀도가 높은 물질이 축적되기 시작하였다(Fig. 14, 18, 19).

또한 표적세포들이 심하게 팽창된 후 세포막 파열로



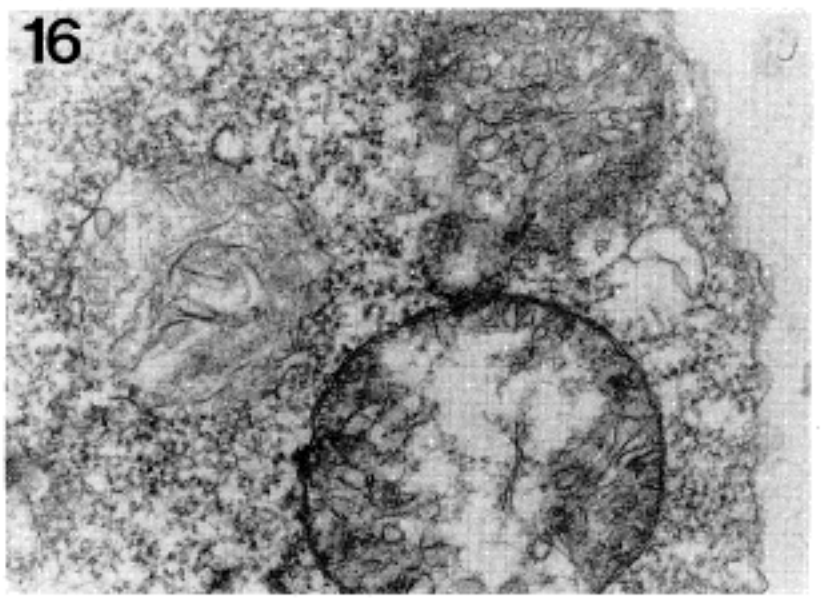




**Fig. 13.** An electron micrograph of L1210 cells carrying C5b-$9_1$ channels. The cells were incubated at 37°C for 3 min. They were enlarged and cytoplasm had many vacuoles filled with homogenous, electron-lucent materials. Rough endoplasmic reticulums were enlarged with cisternal dilatation. ×10,000

**Fig. 14.** The cells carrying C5b-$9_1$ channels were incubated at 37°C for 5 min. Note markedly dilated cytocavitary network, increased number of vasicles and a few electron-dense dots in the mitochondria.(arrows) ×12,000

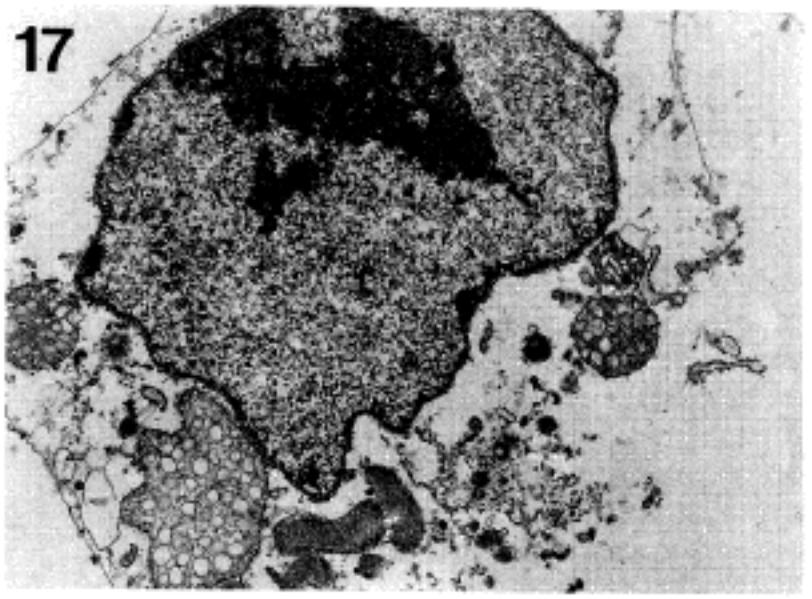
**Fig. 15.** The cell carrying C5b-$9_1$ channels was incubated at 37°C for 5 min. Many mitochondria showed degenerated, enlarged changes with loss of cristae. Cytosolic density decreased with wide ribosomal dispersion due to water influx. ×20,000

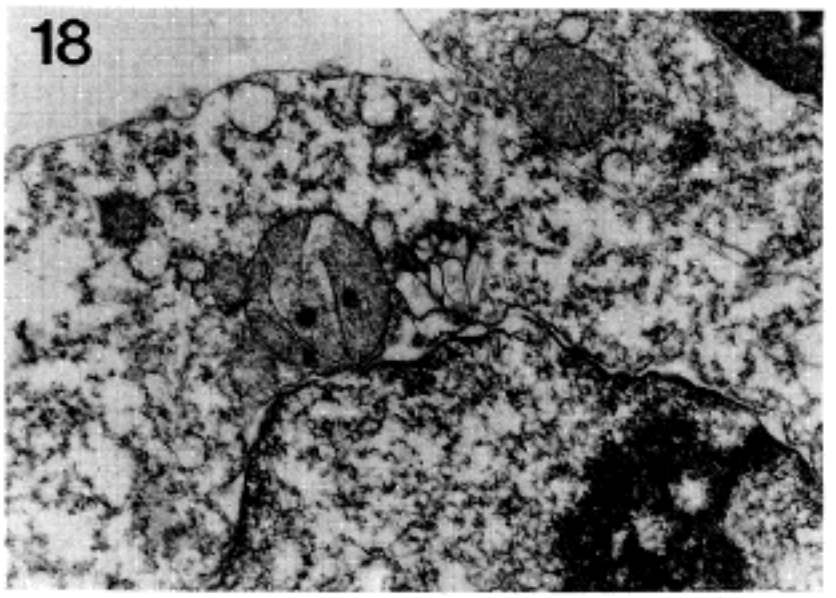
**Fig. 16.** The cell carrying C5b-$9_1$ channels was incubated at 37°C for 7 min. Three mitochondria showed swollen, degenerated changes and most cristae disappeared. ×50,000

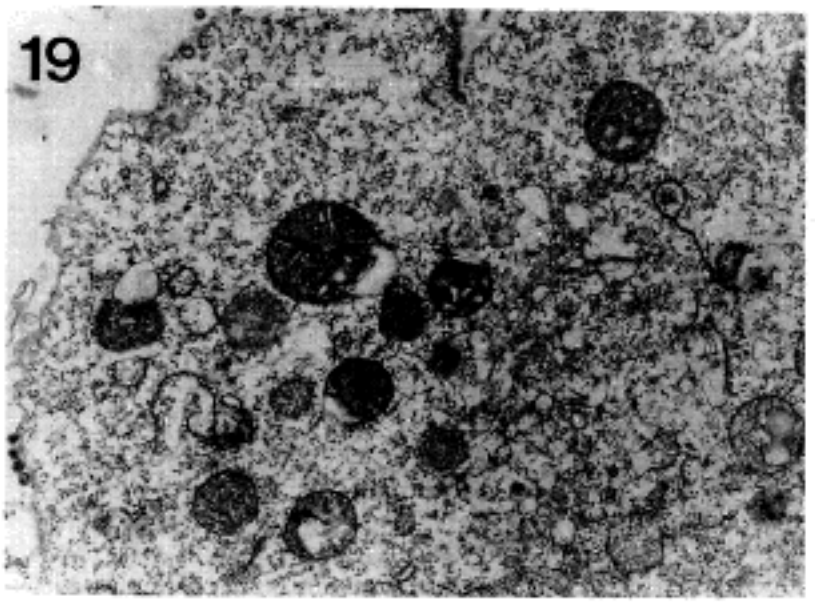
세포질내 유리 라이보솜을 비롯한 대부분의 소기관들이 소실되어 소수의 사립체와 핵만이 남아 있는 세포(Fig. 17)와 이러한 파괴변화가 더 진행되어 핵을 포함한 모든 세포내 구조물이 소실되어 세포막만 남은 유령형태의 세포도 볼 수 있었다.

사립체내 $Ca^{2+}$ 축적을 확인하기 위하여 1.5 mM $[Ca^{2+}]_e$에 부유된 TAC5b-$9_1$ 세포를 $KH_2PO_4$ 완충액 존재하에서 potassium pyroantimonate와 반응시킨 결과, 그 반응물질인 $Ca^{2+}$ 염은 전자밀도가 높으면서 균일한 원형의 형태로 사립체의 기질이나 능선에서 관찰되었다(Fig. 20).

한편, 교질 삼투압 보호제인 dextran 존재하에서 배양된 TAC5b-$9_1$의 경우 세포의 팽창은 현저하게 억제되었고 액성매질의 전자밀도도 낮지 않았다(Fig. 21). 그러나 세포질에서 능선이 파괴되면서 심하게 팽창된 다수의 사립체들과 소수의 공포가 관찰되었다



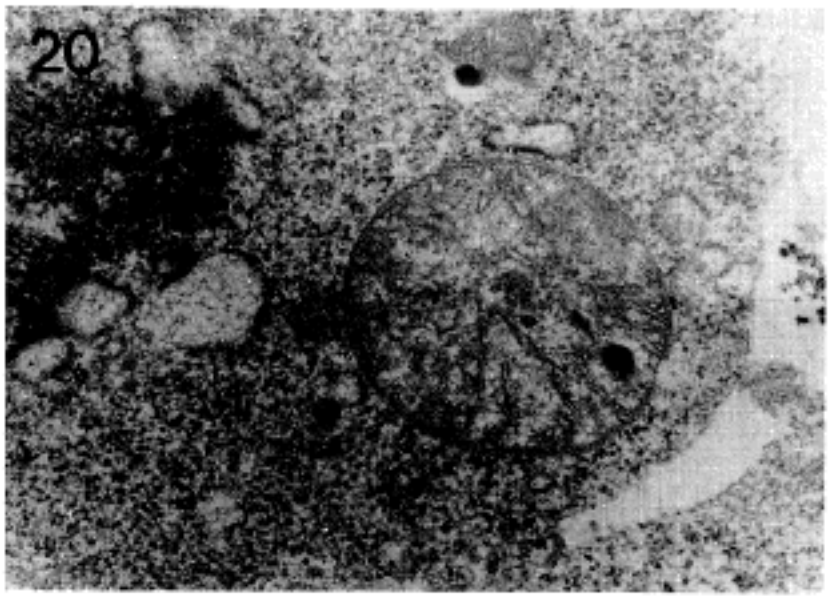




**Fig. 17.** A dying cell carrying C5b-$9_1$, which was incubated at 37°C for 7 min. Ruptured plasma membrane with release of microorganelles, huge mitochondria and a few $Ca^{2+}$ dots in mitochondrial matrix were seen. The nucleus was relatively intact. ×12,000

**Fig. 18.** The cells carrying C5b-$9_1$ channels were incubated at 37°C for 7 min. Electron-dense $Ca^{2+}$ deposit was seen as two dots in the mitochondrion. ×20,000

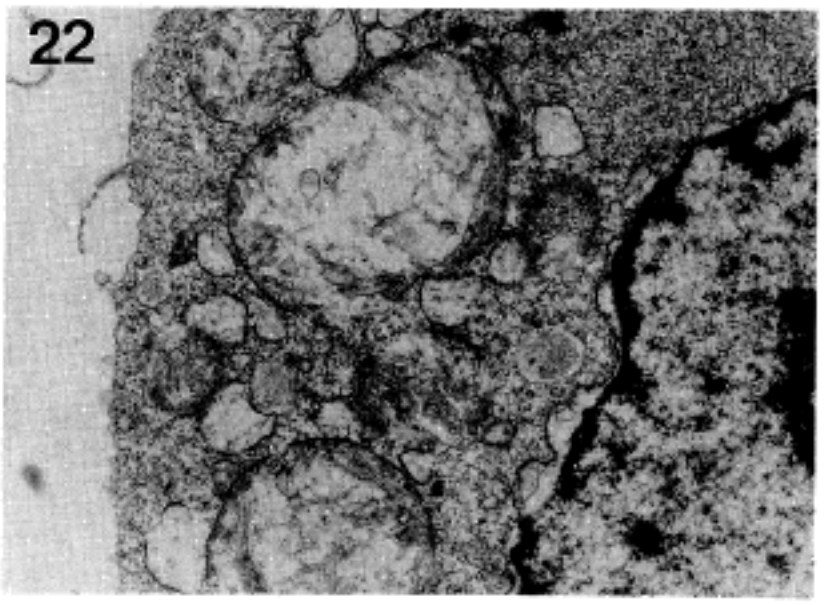
**Fig. 19.** A number of mitochondria showed small round $Ca^{2+}$ deposits in the matrix. ×20,000

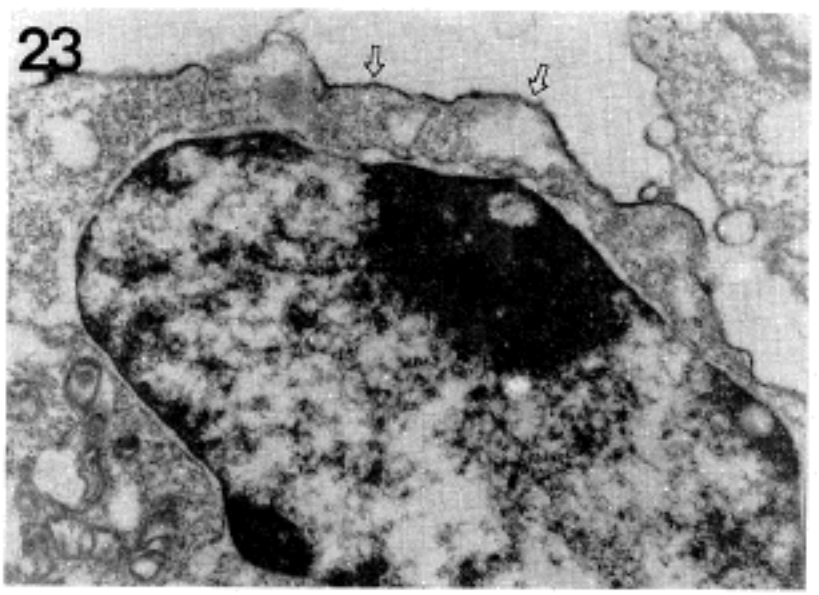
**Fig. 20.** An electron-dense $Ca^{2+}$ dot was seen in the mitochondrial matrix. The cell carrying C5b-$9_1$ channel was incubated at 37°C for 5 min in the presence of 1.5 mM $Ca^{2+}$. Post-fixation of cells was done with 1% osmium tetroxide-2.5% potassium pyroantimonate(pH 7.6). ×50,000

(Fig. 22).

**2) 면역세포화학 염색소견:** TAC5b-$9_1$ 세포에서 사람 C7, C8, C9 및 SC5b-9에 대한 마우스 단클론 항체를 1차 항체로 각각 반응시킨 후 포매전 염색법으로 표본을 제작하여 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 그 면역반응 산물은 미세하거나 거친 과립형태로서 전자밀도가 높았으며, C7(Fig. 23), C8(Fig. 24) 및 C9 (Fig. 25) 항체에 대한 각각의 면역반응 산물들이 세포막에 위치하였다. 또한 SC5b-9 항체에 대한 면역반응 산물은 세포막 표면의 일부에서 관찰되었다(Fig. 26).

**3) 주사 전자현미경 소견:** TAC5b-$9_1$ 세포를 고정 후 세포막 표면에 분포된 C5b-$9_1$ 통로의 형태 및 크기를 관찰하기 위하여 세포 표면을 금입자로 도금한 후 관찰한 결과 세포막의 미세돌기 사이에서 분화구와 같은 모양으로 주위와 뚜렷한 경계를 보이는 원형의 pore 들을 다수 관찰하였고 그 크기는 평균 직경 30 ±10 nm이었다(Fig. 27, 28). 통로의 수는 세포마다 매우 불규칙하였으나, 100,500배 확대 사진에서 단위 면적 10×7 $cm^2$당 평균 25개 정도로 관찰되었다.



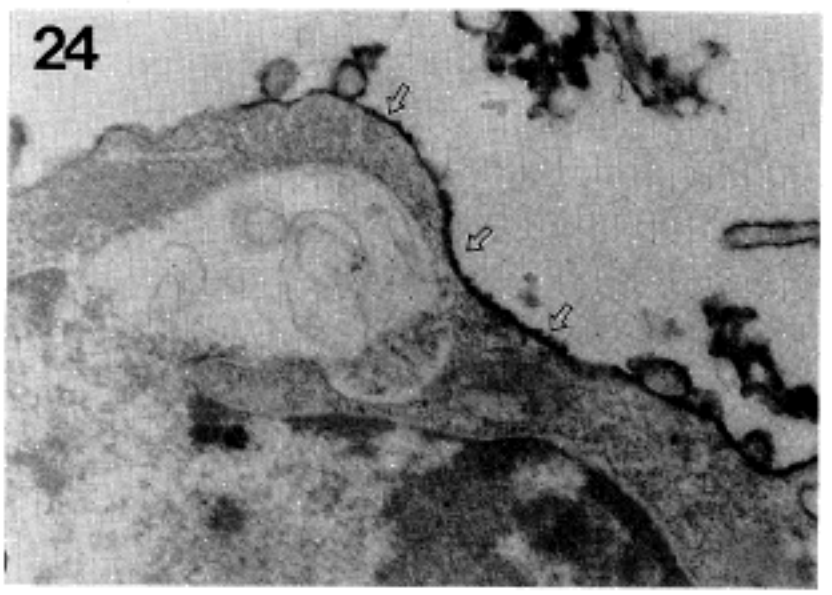




**Fig. 21.** An electron micrograph of cells carrying C5b-9$_1$ channels which were suspended in the buffer containing 0.66 mM dextran. The cell(upper left) was protected from swelling degenerative change but cells(upper right and lower left) showed slightly enlarged size containing a few degenerative mitochondria. ×16,000

**Fig. 22.** Mitochondria of the protected cell(the same cell as in Fig. 21) showed destruction of cristae and enlarged size. A few vesicles were also seen in the cytoplasm. ×20,000

**Fig. 23.** An electron micrograph of cell carrying C5b-9$_1$. C7 molecules were positively stained along the plasma membrane(arrows). Monoclonal antibody against human C7 and peroxidase-labelled ABC complex were employed. ×24,000

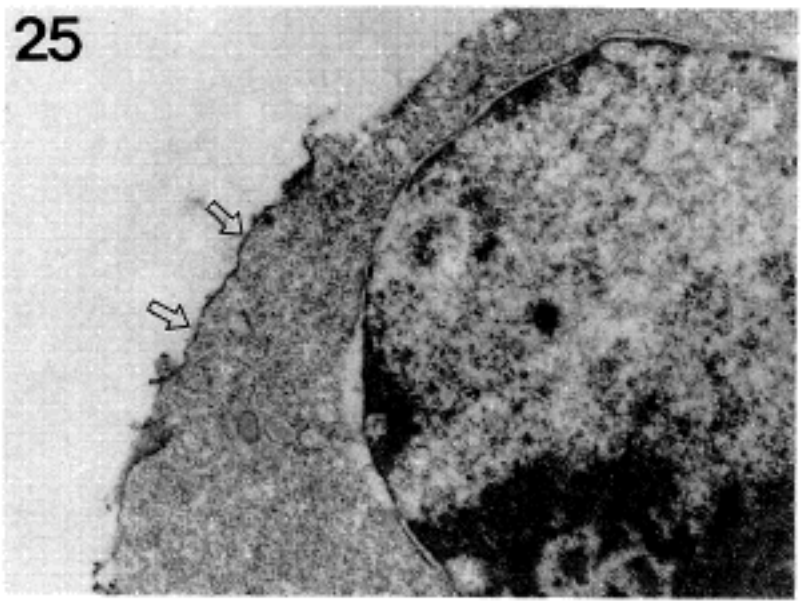
**Fig. 24.** C8 molecules were positively stained along the plasma membrane of the cell(arrows). Monoclonal antibody against human C8 and peroxidase-labelled ABC complex were employed. ×30,000

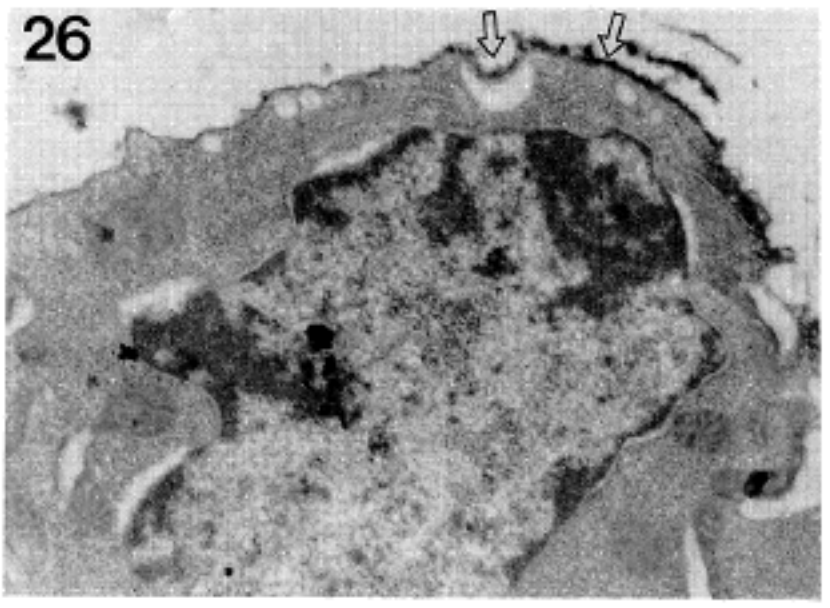
## 고 찰

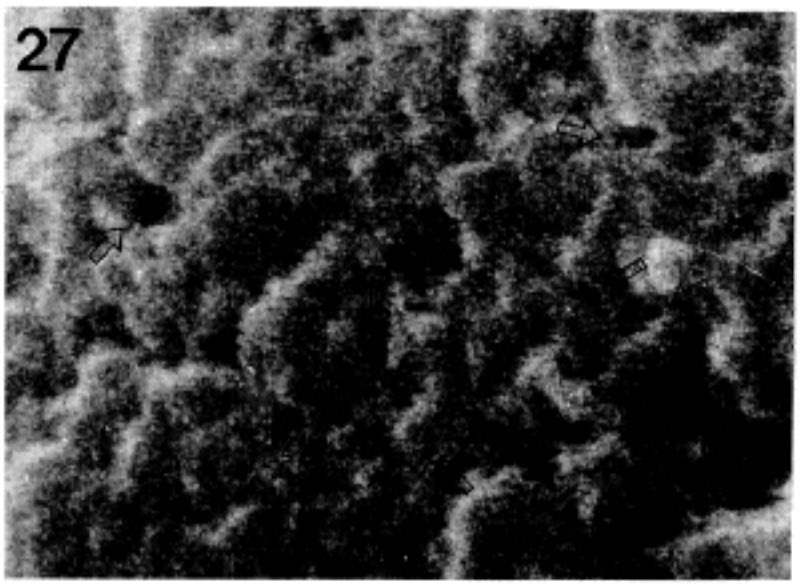
세포막 공격 보체 복합체 C5b-9에 의한 유핵세포에서의 면역성 세포용해의 기전은 교질 삼투압 조절능의 상실에 의한 현상만으로는 설명이 충분치 않다.

즉 교질 삼투압 보호제 하에서도 표적세포는 죽으며[11], 보체 통로를 통한 $Ca^{2+}$의 유입에 따라 2차 신호전달로 $Ca^{2+}$ 의존 대사과정의 활성화가 일어나며[10], 유핵세포는 적혈구에서의 single hit[18]와 달리 세포손상에 대한 방어능력이 있어서 파괴된 세포막의 인지질, cardioloipin의 재생[5,19]이나 세포막에 조립된 통로 중간체들의 제거[3,4]가 일어난다.

따라서 보체공격 후 유핵세포의 운명은 ① 세포막에 있는 CR1[20], C8bp[21], DAF[22] 분자들 또는 fluid phase의 S 단백[23,24]과 같은 세포 내외의 고유 방어



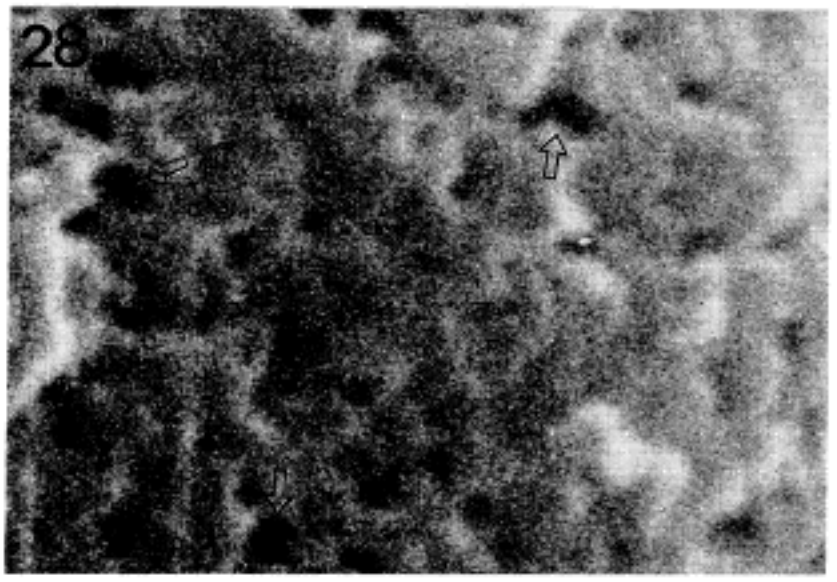




**Fig. 25.** C9 molecules were positively stained along the plasma membrane of the cell. It showed irregular patchy granular distributions(arrows). Monoclonal antibody against human C9 and peroxidase-labelled ABC complex were employed. ×20,000

**Fig. 26.** Neoantigen molecules of SC5b-9 were stained on the plasma membrane of the cell. It showed irregular focal granular distributions(arrows). Monoclonal antibody against human SC5b-9 and peroxidase-labelled ABC complex were employed. ×24,000

**Fig. 27.** A scanning electron micrograph of cell carrying C5b-$9_1$ channels. Many round to ovoid, isolated pores were seen on the surface of the target cell(arrows). ×100,500

**Fig. 28.** Pores same as in Fig. 27 showed an irregular distribution and isolated well-delimited pattern. A few fused pores were also seen(arrows). ×100,500

능과 재생능, ② 세포막 통로 형성에 따른 세포내 현상 즉 보체통로를 통한 이온 이동에 따라 1, 2차 신호 전달에 의한 대사활로 자극 및 ③ C5b-9 통로 자체의 세포독성에 의하여 좌우될 수 있다.

본 연구에서 소형 통로(C5b-$9_1$)를 사용한 이유는 0~4°C에서 C8 한분자당 2개 이하의 C9분자가 부착됨으로 기능적으로 폐쇄된 구멍을 가진 C5b-$9_1$을 형성시켜서 이를 37°C로 배양함으로 소형 통로가 열리면서 천천히 세포사가 일어나도록 하기 위함이었다. 대형 통로(C5b-9m)의 경우는 매우 빨리 세포사가 일어나 세포내 현상을 관찰하기 힘들기 때문이다. 면역세포학적 전자현미경 관찰에서 C5b-$9_1$ 통로 구성은 C7, C8 및 C9 분자들로 이루어짐을 확인할 수 있고(Fig. 23~25) 통로 조립과정에서 활성화된 C9 신생항원을 확인할 수 있었다(Fig. 26).

Adenine nucleotide인 ATP, ADP 및 AMP는

완충액, 세포형 및 세포용적에 따라 그 정량은 차이가 많이나고, 정량 방법도 HPLC, FPLC, 형광측정계, 자외선 분광계 및 luminometer 등을 이용하여 분리 정량한다. 본 실험에서 자외선 분광계로는 극미량의 adenine nucleotide를 정량하기 어려워서 luminometer를 사용하였다.

세포내 에너지 양은 AMP, ADP 및 ATP의 구성비에 의존하며, 과립구나 적혈구에서 에너지 charge가 변하면 ATP는 무산소성 당분해가 시작되며 이로부터 유지된다. 대사조절 지표인 adenylate energy charge(AEC)가 0.5이하에서는 세포사가 일어난다고 알려져 있다[25].

본 실험의 성적에서 보듯이 보체공격 후 세포사에 비례하여 ATP, ADP 및 AMP의 소모가 빠르게 지속적으로 일어났으며(Fig. 1, 2, 8, 9, 11), 특히 세포사에 선행하여 ATP 소실을 볼 수 있으며(Fig. 1), 이때 ATP를 완충액에 보충시 세포사가 배양 초기에 다소 억제됨(Fig. 3)을 보아 ATP를 포함한 adenine nucleotide의 세포내 유지가 세포생존에 필수임을 확인하였다.

ATP는 용질의 능동 수송에 필요한 고 에너지 복합체로서 세포내 ATP 풀을 유지하기 위하여는 기질로써 $\beta$-hydroxybutyrate, glutamine, lactate, glucose 등이 필요하다[26]. 이 ATP(분자량 507.2 dalton)는 보체 통로를 통하여 ADP(분자량 427.2)와 AMP(분자량 347.2)와 같이 쉽게 빠져나갈 수 있을 것이다. 이들 nucleotide들의 재생 흔적은 볼 수 없었다.

사람 과립구와 림프구에서 HPLC로 세포용적당 세포내 adenine nucleotide 양은 정상 과립구의 경우 $3402 \pm 1436\ \mu M/L$ cell volume이며, 신선 림프구는 $7536 \pm 1382$(ATP), $3243 \pm 1154$(ADP), $208 \pm 95$(AMP) $\mu M/L$ cell volume으로 알려져 있다[27]. 본 실험에서 t=0의 세포내 ATP 함량은 0.26 nmole/$2.5 \times 10^4$개 세포로써 Papamitriou등[28]의 Ehrlich 복수암 세포에서와 성적이 비슷하였다.

C5b-$9_1$ 통로를 통한 $Ca^{2+}$의 유입으로 $[Ca^{2+}]_i$의 항상성이 상실됨으로 세포는 죽을 것이다[13]. 일반적으로 세포밖의 ATP는 원형질막의 수용체에 결합하여 원형질막의 투과성을 증가시키고 $Na^+$, $Cl^-$ 및 $Ca^{2+}$ 통로를 열어주어 $[Ca^{2+}]_i$의 농도를 변화시키며[29,30] 0.4~25 $\mu M$의 ATP는 액성매질내 $Ca^{2+}$의 증가를 일으키고[31], 1~5 mM의 경우는 $[Ca^{2+}]_i$의 빠른 증가후 DNA 분쇄를 일으켜 세포 소멸(apoptosis)에 빠진다[32]. 보체공격의 경우에서도 김과 김[13]의 실험에서 0.12 $\mu M$ ATP 및 본 실험에서의 0.2 $\mu M$ ATP는 배양 초기에만 일시적으로 세포사가 억제되었다. 그 이유는 정상적으로는 ATP가 세포내로 유입될 수 없으나 보체 통로가 형성될 경우 다수의 보체 통로를 통한 확산현상에 의하여 다량의 ATP 유입이 일어나서 에너지 보충은 이루어질 것이지만 배양시간이 길어짐에 따라 $[Ca^{2+}]_i$의 증가를 동반함으로 C5b-9 통로 자체가 지닌 세포 독성현상과 함께 세포사가 억제될 수 없었을 것으로 여겨진다. $[Ca^{2+}]_o$ 농도 변화에 따라 TAC5b-$9_1$ 통로로 5,000~10,000배 농도 구배(gradient)가 없어질 때까지 대량의 $Ca^{2+}$ 유입이 일어나서 $[Ca^{2+}]_i$가 변화됨으로 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$은 살해량의 C5b-9 투여시 매우 빨리 세포사가 일어나고 0.015 mM $[Ca^{2+}]_o$은 늦었으며(Fig. 4-1), $[Ca^{2+}]_o$ 농도 및 세포사와 비례하여 세포내 ATP의 유출이 일어났다(Fig. 4-2). ATP 전구물질인 ADP의 경우 세포외 $Ca^{2+}$ 농도 변화에 따른 세포내에서의 소실 속도에는 별 차이가 없었다(Fig. 8). 또한 교질 삼투압 보호제는 ATP 실험에서와 동일하게 세포의 ADP 유출을 효과적으로 억제하지 못하였다(Fig. 9). AMP의 경우에서도 ADP에서와 동일하게 세포외 $Ca^{2+}$ 농도 변화가 세포내에서의 유출 속도에 차이를 주지 못하였다(Fig. 10). 교질 삼투압 보호제는 AMP 소실율에서 10% 이내의 적은 차이를 보일 정도였다(Fig. 11).

세포외 $Ca^{2+}$ 농도 변화에 따라 표적세포에서 C5b-9 공격시 LDH 유리율은 trypan blue 색소 배제검사(Fig. 4-1)에서와 비슷한 결과를 얻었다(Fig. 12). dextran은 LDH 유리를 억제시키지 못하였고, 이는 Kim등[11]의 성적과 일치한다. 따라서 $[Ca^{2+}]_o$의 변화는 세포 사망율에 직접 영향을 미치고 통로의 수 및 양에 의해 영향을 받고, adenine nucleotide중 ATP가 $[Ca^{2+}]_o$ 농도 변화에 일치한 소실율을 보였고, ADP 및 AMP에서는 그 차이가 별로 없었다.

Papamitriou등[28]은 C5b-9m의 형성으로 세포사 전단계에서 adenine nucleotide의 유출에 이어 $[Ca^{2+}]_i$의 증가 및 사립체의 막전위 소실이 보체공격후 빠른 급성 세포사의 기전이라고 해석하였다.

전자현미경 관찰에서 사립체기질내에 솜모양의 전자밀도를 보이면 비가역적인 세포손상을 의미한다[33,34]. 본 실험에서 L1210 세포들은 보체공격후 3~10분의 매우 빠른 시간내에 세포팽창과 사립체의 팽창 및 파괴(Fig. 13, 15, 16)가 일어나며 형질막 파열(Fig. 17)로 세포사가 일어남을 알 수 있었다. 1.5 mM이나 0.015 mM $[Ca^{2+}]_0$ 조건에서의 세포사 형태는 0.15 mM $[Ca^{2+}]^0$에서와 동일하였다. 사립체내 $Ca^{2+}$ 축적과 기질의 심한 팽창후 능선이 파열되면(S phase, Fig. 14, 18~20) 이는 심한 세포손상을 의미한다. 따라서 이와같은 사립체의 형태학적 변화는 ATP, ADP 및 AMP의 지속적이고 비가역적인 소실의 원인을 설명해 준다고 생각된다. 그러나 핵의 형태로 보아 DNA 분쇄는 볼 수 없었고 이점은 김과 김[13] 성적을 전자현미경으로 확인하였다. dextran은 물의 유입을 차단시켰으나 세포질의 사립체 파괴로 미루어(Fig. 22) $Ca^{2+}$ 이온을 포함한 이온 유출입을 막아주지는 못할 것이다. 사립체가 액성매질내 $Ca^{2+}$을 완충, 제거시킨다는 근거로 저산소증(허혈) 실험 모델에서 재관류시 $Ca^{2+}$의 격리가 사립체에 의해 일어나며 이때 전자현미경으로 사립체 팽창과 송이 모양의 $Ca^{2+}$ 축적을 관찰하였다[35].

주사 전자현미경 관찰에서 C5b-$9_1$에 의한 구멍 형태(Fig. 27, 28)는 Bhakdi 및 Tranum-Jensen[36]과 Tranum-Jensen등[37]의 음염색에 의한 TEM 소견과 비슷하였고 구멍 크기는 C5b-9m과는 달리 본 실험에서는 직경 20~40 nm의 소형 통로 크기에 해당되었다.

$Na^+$-$K^+$ ATPase는 세포내 50% 이상의 ATP 에너지 소모 장치이며[38], 1.5 mM ouabain은 신세뇨관 세포에서 $NH_4Cl$, KCl 포함 배지에서 ATP 함량을 회복시킨다[39]. 본 실험에서 ouabain(27 $\mu$M 농도)은 $Na^+$-$K^+$ 펌프를 억제시켜 C5b-9 공격시 특히 배양 초기에 세포사를 촉진시켰고(Fig. 5-1) 그 이유는 C5b-9 통로를 통해 유입된 $Na^+$ 이온을 배출할 수 없음으로 세포사가 가속화 되었을 것이다. 이때 표적세포내 ATP 소모율은 배양 10분 이후에는 오히려 증가되기 시작하였는데(Fig. 5-2), 이것은 ouabain의 역할이 보체공격을 받은 유핵세포에서는 배양 10분 이후부터는 그 기능이 소실됨을 의미한다. 또한 C5b-9 공격시 ouabain(100 $\mu$M)의 존재하에서 교질 삼투압 보호제는 세포사 과정의 초기에 일시적으로 다소 ATP 유출을 막아줄 정도이었다(Fig. 6). 보체공격시 유핵세포의 원형질막에 있는 Na/K ATPase가 활성화되면 $Na^+$ 유입을 보상하여 교질 삼투성 세포용해를 막아줄 수 있을 것이다. 그러나 100 $\mu$M ouabain은 $K^+$의 유사체인 $^{86}Rb$ 유입을 90% 차단시키지만 C5b-9 통로수에는 영향을 주지 못하고 또한 보체 매개 세포사를 촉진시키지도 못하며 따라서 유핵세포가 생존하기 위하여는 이온 유출입을 매개하는 보체 통로의 수가 적어야 한다[40]. 보체 통로수는 혈소판의 경우 1,000개 이상의 C5b-9 복합체가 세포표면에 축적되거나 또는 sodium 펌프가 차단될때는 세포사가 온다[41].

C5b-9 공격으로 Donnan 효과에 의하여 구멍을 통한 이온 이동이 일어나서 세포가 죽는다면 세포내외에서 동일한 KCl농도를 유지시켜 보체 구멍을 통한 $K^+$ 이온의 세포밖으로 이동을 막아주어도 세포는 죽었으며(Fig. 7) 세포밖의 $K^+$ 이온(150 mM)은 교질 삼투압 보호제 존재하에서도 세포내 ATP의 소실율에 큰 영향을 주지 않았다(data 생략함). 이 점 역시 보체의 유핵세포 살해기전이 교질 삼투압 조절 기능의 상실 때문만은 아니라는 근거가 된다.

$[Ca^{2+}]_i$는 세포내 이입(endocytosis)을 포함하여 $Ca^{2+}$ 의존 대사활성을 조절하는 세포내 매개자로써 세포기능 및 세포반응에 직접 관련된다. 보체 통로를 통하여 액성매질내 $Ca^{2+}$이 증가되면 protein kinase C(PKC) 기질이나 myosin light chain kinase의 인산화가 일어난다[41].

C5b-9의 수명은 $Ca^{2+}$에 의존하여 37°C에서는 1분[6] 내지 3.5분[42]이다. 또한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 분비성 세포외유출(secretory exocytosis), 수용체 매개성 세포내이입, 세포막에 부착된 효소의 활성화 및 탐식작용에 관여한다[43]. $Ca^{2+}$ 신호에 의한 PKC 활성화는 유핵세포에서 방어능을 유발시켜 C5b-9 제거를 촉진하며[10], C5b-9 구멍을 통한 $Ca^{2+}$ 유입으로 형질막 표면의 소포형성이 촉진된다.

따라서 본 실험성적을 종합하여 볼때 유핵세포는 교질 삼투압 보호제와 상관없이 C5b-$9_1$ 통로를 통하여 $Ca^{2+}$의 유입 및 adenine nucleotide의 빠른, 진행성 유출을 일으켜 세포사에 이르며 nucleotide 재생이 불가능할 정도의 이 기능 상실은 형태학적으로는 사립체의 구조변화 즉 변성과 $Ca^{2+}$ 축적 및 파괴변화

로 설명될 수 있다.

## 결 론

마우스 림프구 백혈병 세포주 L1210에 보체 복합체 C5b-9i 공격으로 세포사 과정에서 세포외 $Ca^{2+}$ 농도($[Ca^{2+}]_o$)변화, $K^+$ 이온, 교질 삼투압 보호제, $Na^+$-$K^+$ ATPase 억제제 및 ATP 투여에 따른 세포 사망율과 세포내 adenine nucleotide 함량을 시간별로 측정하였고, 동시에 전자현미경으로 보체 통로 및 사립체 변화를 형태학적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 세포내 ATP, ADP 및 AMP의 소실은 지속적으로 빠르게 일어났고, 이에 따라 세포사가 일어났다. nucleotide의 소실은 1.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ 농도에서 가속화되었다.

2) ATP의 재생은 볼 수 없었다.

3) 세포밖의 KCl(150 mM), dextran(0.66 mM)은 ATP 소실에 따른 세포사를 억제하지 못하였고, 세포밖의 ATP 보충(0.2 $\mu$M) 역시 세포사를 효과적으로 막아줄 수 없었다. 또한 ouabain(27 $\mu$M 및 100 $\mu$M)은 보체공격에 따른 세포사를 촉진시켰고 ATP 소실을 억제하지 못하였다.

4) 전자현미경 관찰에서 원형질막 표면에 원형의 구멍 형성과 대부분의 사립체는 파괴 및 $Ca^{2+}$ 축적을 확인하였다.

따라서 보체 공격에 따라 adenine nucleotide의 빠르고 지속적인 비가역적 소실은 사립체내 $Ca^{2+}$ 축적 및 세포막 통로를 통한 유출에 의하였으며 더우기 이 에너지 결핍은 고$[Ca^{2+}]_o$ 농도에서 가속화되었다. 이 결과는 $Ca^{2+}$ 매개 에너지 고갈은 보체 C5b-9 공격에 의한 대사성 세포사망의 한 기전임을 제시한다.

(저자들은 본 연구를 위하여 많은 도움을 주신 메릴랜드 대학 병리학교실 Dr. Moon L. Shin께 깊은 감사를 드립니다.)

## 참 고 문 헌


1) Green MD, Fleischer RA, Barrow P, Goldberg B. *The cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on Krebs ascites tumor cells. J Exp Med 1959; 109: 511-21.*

2) Burakoff SJ, Martz E, Benacerraf B. *Is the primary complement lesion insufficient for lysis? Failure of cell damaged under osmotic protection to lyse in EDTA or at low temperature after removal of osmotic protection. Clin Immunol Immunopathol 1975; 4: 108-26.*

3) Carney DF, Koski CL, Shin ML. *Elimination of terminal complement intermediates from the plasma membrane of nucleated cells: the rate of disappearance differs for cells carrying C5b-7 or C5b-8 or a mixture of C5b-8 with a limited number of C5b-9. J Immunol 1985; 134: 1804-9.*

4) Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. *Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. J Immunol 1986; 138: 246-53.*

5) 김상호. 준치사량의 종말 보체 복합체를 가진 유핵세포에서의 *cardiolipin* 합성. 대한혈액학회지 *1990; 25: 141-50.*

6) Ramm LE, Whitlow MB, Koski CL, Shin ML, Mayer MM. *Elimination of complement channels from the plasma membranes of U937, a nucleated mammalian cell line: temperature dependence of the elimination rate. J Immunol 1983; 313, 1411-5.*

7) Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, Mayer MM, Shin ML. *Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 3816-20.*

8) Kim SH, Carney DF, Hammer CH, Shin ML. *Nucleated cell killing by complement: effects of C5b-9 channel size and extracellular $Ca^{2+}$ on the lytic process. J Immunol 1987; 138: 1530-6.*

9) Shin ML, Carney DF. *Cytotoxic action and other metabolic consequences of terminal complement proteins. Prog Allergy 1988; 40: 44-81.*

10) Carney DF, Lang TJ, Shin ML. *Multiple signal messengers generated by terminal complement complexes and their role in terminal complement complex elimination. J Immunol 1990; 145: 623-9.*

11) Kim SH, Carney DF, Papadimitriou JC, Shin ML. *Effect of osmotic protection on nucleated cell killing by C5b-9: cell death is not affected by the prevention of cell swelling. Mol Immunol 1989; 26: 323-31.*

12) 이해천, 김상호. *C5b-9* 복합체가 결합된 유핵세포의

살해에 미치는 세포외 칼슘의 효과. 가톨릭대학 의학부 논문집 *1991; 44: 647-58.*

13) 김학승, 김상호. 유핵세포에서 말단 보체 복합체의 세포 살해기전 연구. 가톨릭대학 의학부 논문집 *1992; 45: 31-41.*

14) Laiho KU, Trump BF. *The relationship between cell viability and changes in mitochondrial ultrastructure, cellular ATP, ion and water content following injury of Ehrlich ascites tumor cells. Virchow Arch Abt B Zellpathol 1974; 15: 267-77.*

15) Cheung JY, Thompson IG, Bonventre JV. *Effects of extracellular calcium removal and anoxia on isolated rat myocytes. Am J Pathol 1982; 243: C184-90.*

16) Hampp R. *Luminometric Method. In: Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1985: 370-9.*

17) Reynolds ES. *The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-12.*

18) Mayer MM. *Mechanism of cytolysis by complement. Proc Natl Acad Sci 1972; 69: 2954-8.*

19) Ohanian SH, Schlager SI. *Humoral immune killing of nucleated cells: mechanisms of complement-mediated attack and target cell defense. CRC Crit Rev in Immunol 1981; 1: 165-209.*

20) Fearon DT. *Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B-lymphocyte and monocyte. J Exp Med 1980; 152: 20-30.*

21) Schonermark S, Rauterberg EW, Shin ML, Lake S, Roelcke D, Hänsch GM. *Homologous species restriction in lysis of human erythrocytes: a membrane derived protein with C8-binding capacity function as an inhibitor. J Immunol 1986; 136: 1772-6.*

22) Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen AF. *Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay accelerating activity for C3 convertases of the complement system. J Immunol 1982; 129: 184-9.*

23) Podack ER, Müller-Eberhard HJ. *Binding of desoxycholate, phosphatidyl choline vesicles, lipoprotein and of the S-protein to complexes of terminal complement components. J Immunol 1978; 121: 1025-30.*

24) Bhakdi S, Roth M. *Fluid phase SC5b-8 complex of human complement: generation and isolation from serum. J Immunol 1981; 127: 576-80.*

25) Atkinson DE. *Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 1968; 7: 4030-4.*

26) Uchida S, Endou H. *Substrate specificity to maintain cellular ATP along the mouse nephron. Am J Physiol 1988; 255: F977-83.*

27) Harkness RA, Coade SB, Mansell M, Simmonds RJ. *Nucleotide concentrations in leukocytes and their use in controlling the quality of cell preparations. Adv Exp Med Biol 1982; 141: 583-90.*

28) Papadimitriou JC, Ramm LE, Drachenberg CB, Trump BF, Shin ML. *Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9. J Immunol 1991; 147: 212-7.*

29) Steinberg TH, Silverstein SC. *Extracellular ATP4- promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. J Biol Chem 1987; 262: 3118-22.*

30) Virgilio FD, Bronte V, Collavo D, Zanovello P. *Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate(ATP). J Immunol 1989; 143: 1955-60.*

31) Dubyak GR, Young MBD. *Intracellular $Ca^{2+}$ mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells. J Biol Chem 1985; 260: 10653-61.*

32) Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JDE. *Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. J Cell Biol 1991; 112: 279-88.*

33) Shen AC, Jennings RB. *Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. Am J Pathol 1972; 67: 417-40.*

34) Jennings RB, Ganote CE. *Structural changes in myocardium during acute ischemia. Cir Res 1974; 34: 156-72.*

35) Borgers M, Shu LG, Xhonneux R, Thone F, Overloop PV. *Changes in ultrastructure and $Ca^{2+}$ distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia. Am J Pathol 1987; 126: 92-102.*

36) Bhakdi S, Tranum-Jensen J. *Molecular nature of the complement lesion. Immunology 1978; 75: 5655-9.*

37) Tranum-Jensen J, Bhakdi S, Bhakdi-Lehnen B, Bjerrum OJ, Speth V. *Complement lysis: the ultrastructure and orientation of the C5b-9 complex on*

*target sheep erythrocyte membranes. Scand J Immunol 1978; 7: 45-56.*

38) Amman H, Noel J, Boulanger Y. *Relationship between intracellular ATP and the sodium pump activity in dog renal tubules. Can J Physiol Pharmacol 1990; 68: 57-67.*

39) Endou H, Jung KY, Komatsu Y, Lee KH. *Role of ammonium ion in adenosine triphosphate consumption of the rat medullary thick ascending limb. Molecular aspects of ammoniagenesis. Contr Nephrol 1991; 92: 149-59.*

40) Ramm LE, Whitlow MB, Mayer MM. *Complement lysis of nucleated cells: effect of temperature and puromycin on the number of channels required by cytolysis. Mol Immunol 1984; 21: 1015-21.*

41) Sims PJ, Wiedmer T. *The response of human platelets to activated components of the complement system. Immunology Today 1991; 12: 338-42.*

42) Morgan BP, Campbell AK, Luizo JP, Hallett MB. *Recovery of polymorphonuclear leukocytes from complement attack. Biochem Soc Trans 1984; 12: 779-80.*

43) Picello E, Pizzo P, Virgilio FD. *Chelation of cytoplasmic $Ca^{2+}$ increases plasma membrane permeability in murine macrophages. J Biol Chem 1990; 265: 5635-9.*