



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

=국문 요약=

## Cytokine이 혈소판 활성화에 미치는 영향

**목적** : 백혈구로부터 분비되는 저장 혈소판의 cytokine은 발열성 수혈부작용을 일으킨다고 보고되어 있으나, cytokine이 수혈 후 혈소판 생존과 관련이 있는 혈소판의 활성화에 미치는 영향에 관한 연구는 미미하다.

**방법** : 건강한 공혈자로부터 얻어진 혈소판을 interleukin-8 (IL-8) 0.5 ng/mL, 3 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 1000 ng/mL 및 interleukin-6 (IL-6) 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL이 되도록 반응시키고 혈소판 활성화 표지자인 PAC-1 및 CD62 단클론 항체로 염색한 후 유세포분석기로 분석하였다.

**결과** : IL-8로 활성화시킨 경우의 PAC-1 평균 양성율은 61.1~71.4%, CD62 9.0~12.5%였으며, IL-6으로 활성화시킨 경우 PAC-1 69.0~73.4%, CD62 13.0~13.9%로써 두 표지자 모두 각 IL 농도별에 따른 양성율의 차이는 없었으며, PAC-1 표지자는 CD62 표지자에 비하여 IL으로 활성화 시킨 혈소판과 더 많이 반응하였다. 0.5 ng/mL의 동일 농도의 IL으로 활성화시킨 경우 CD62 표지자의 평균 양성율은 IL-6이 13.8%로써 IL-8의 9.0%보다 활성화 효과가 더 컸다.

**결론** : 혈소판이 저장 기간 중 백혈구로부터 분비될 수 있는 농도의 IL-6, IL-8에서 혈소판이 활성화되므로 저장기간 중 cytokine 분비를 최소화하는 방법이 수혈 후 혈소판 생존율을 증가시키는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

---

핵심되는말 : Interleukin-8, Interleukin-6, PAC-1, CD62, 혈소판 활성화

## 차 례

국문 요약	1
차례	2
그림 차례	3
표 차례	4
I. 서론	5
II. 연구 대상 및 방법	6
A. 연구대상	6
B. 연구방법	6
1. PRP와 cytokine의 반응	6
2. 염색 방법	7
3. 유세포 분석기 분석	7
4. 통계처리	9
III. 결과	10
IV. 고찰	15
V. 결론	18
참고문헌	20
영문요약	22

## 그림 차례

Fig. 1. Examples of stained platelets with PAC-1 monoclonal antibody after Interleukin-6 incubation in light scatter dot plots and histogram.

A. Gating of platelets in light scatter dot plots

B. Histogram for gated platelet. The percentage of activated platelets is 73.1%(M1).

Fig. 2. Percentage of activated platelets after Interleukin-8 incubation

Fig. 3. Percentage of activated platelets after Interleukin-6 incubation

Table 1, Comparison of the mean percentage of platelet activation-----14  
according to the concentrations of interleukins(IL)

## I. 서론

항암요법이나 장기이식 등의 관혈성 시술이 증가하면서 혈소판수혈은 급격히 증가하여 과거에 비하여 장기 보존될 수 있는 혈소판의 사용 또한 증가하게 되었다. 그러나 저장기간중 혈소판제제내 혼입된 헌혈자의 백혈구로부터 cytokine이 분비되는데, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) & tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) 등의 cytokine은 각종 염증반응을 매개하여 발열성 수혈 부작용과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다<sup>1-b</sup>. 이중 IL-8과 IL-6은 저장 혈소판제제에서 증가하는 대표적인 cytokine인데, T 림프구, 단구 및 대식세포에서 분비되는 IL-6은 proinflammatory cytokine으로써 발열 작용을 일으키는 급성반응의 강력한 유도체이자 중요한 매개체이며, 1,000 ng/mL의 고용량 사용시 혈소판 활성화를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>b</sup>. IL-8은 대식세포와 내피세포에서 분비되며 호중구를 자극시키고, 호중구를 매개로 혈소판을 활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>f</sup>.

혈소판은 제조뿐 만이 아니라 보관 방법에 따라서도 활성화될 수 있는데, 분리속도, pH, 교반등의 여러 요인이 관여한다<sup>bb</sup>. 이렇게 활성화된 혈소판은 체내에 수혈되었을 때 활성화되지 않은 혈소판에 비하여 체내에서 빨리 제거되는 것으로 알려져 있으므로<sup>1111</sup>, 혈소판의 제조 및 보관시에는 되도록 혈소판이 활성화되지 않도록 주의하여야 한다.

1996년 Lumadue등은 저장기간중 분비될 수 있는 농도의 IL-8과 IL-6이 직접 혈소판을 활성화 시킬 수 있음을 처음으로 보고하였다<sup>12</sup>. 그러나 IL-8은 3,000 pg/mL, 6,000 pg/mL, IL-6은 100 pg/mL, 125 pg/mL의 두가지씩의 농도로만 활성화 시켰기 때문에 저장기간중 분비될 수 있는 다양한 농도의 IL과의 반응을 예측하기에는 무리가 있으며, 이 이후에 cytokine과 혈소판 활성화에 대한 연구는 거의 없었다.

이에 저자는 Lumadue등이<sup>12</sup> 사용하였던 CD62이외에도 PAC-1의 혈소판 활성화 표지자를 새로 첨가하였고, 저장기간중 분비될 수 있는 다양한 농도의 IL-6

과 IL-8을 혈소판과 체외에서 반응시켜 이들이 혈소판 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

## II. 연구 대상 및 방법

### A. 연구대상

혈소판은 25세부터 41세의 특정 질환이 없는 건강한 검사실 직원인 성인 10명(남 5명, 여 5명)으로부터 채취하였고, 이들의 평균 연령은 30세(남 35.4세, 여 27.6세)였다. 이들로부터 3 mL CTAD (Sodium citrate, Theophylline, Adenosine and Dipyridamole, Becton-Dickinson, USA) 시험관을 2개씩 채취하였다. 이를 실온에서 200g, 15분동안 원심분리 한 후 상층의 혈소판 풍부혈장 (platelet rich plasma, PRP) 500  $\mu$ L를 채취하여 혈소판 수치를 ADVIA 120 (Bayer, USA)으로 확인하였다. 혈소판 농도가  $200\sim 400\times 10^3/\mu$ L가 되도록 0.35% bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 phosphate buffered saline (GIBCO BRL Life Technologies, N.Y, PBS)으로 희석하였다.

### B. 연구방법

#### 1. PRP 와 cytokine의 반응

Cytokine은 혈소판 제제의 저장기간 중 주로 증가하는 것으로 알려진 IL-6와 IL-8을 선택하였고, 이들이 저장 중 분비될 수 있는 농도에<sup>1-3,5,12</sup> 따라 희석한 후 준비된 PRP와 polystyrene 시험관 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 반응시켰다. 즉, PRP 90  $\mu$ L와 IL 희석액 10  $\mu$ L씩 넣어서 최종농도가 IL-8 (BD Biosciences, San Diego, CA)은 0.5 ng/mL, 3 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 1000 ng/mL가 되고, IL-6 (Endogen, Boston, MA)은 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL가 되도록 하였다. IL 대신 음성대조로는 PBS 10  $\mu$ L, 양성대조로는 100  $\mu$ M TRAP (Thrombin-receptor agonist peptide, Sigma, ST Louis) 10  $\mu$ L를 첨가하였다. 이들을 실온의 혈소판 보존기(Helmer Labs, Inc.,

Noblesville, Indiana)에서 진탕(agitation)하면서 1시간 반응시켰는데, 양성대조로 사용된 TRAP는 반응완료 10분전에 PRP에 첨가하였다.

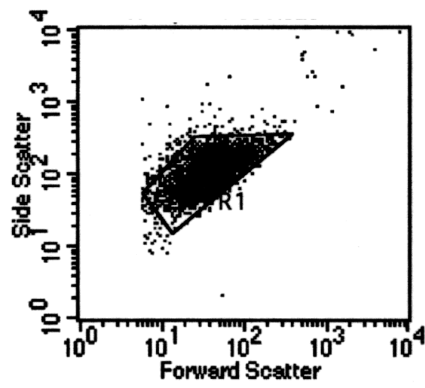
## 2. 염색 방법

IL과의 반응이 끝나면 200  $\mu$ L의 1% paraformaldehyde (Sigma Co., St. Louis, PFA)를 혼합하면서 첨가하여 10분간 방치한 후 중화를 위하여 400  $\mu$ L의 PBS with 0.35% BSA를 첨가하였다. 고정된 혈소판 50  $\mu$ L에 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-PAC-1 (activated fibrinogen receptor, Becton Dickinson, San Jose, CA)과 Phycoerythrin (PE)-CD62 (p-selectin, Becton Dickinson, San Jose, CA) 단클론 항체를 10  $\mu$ L씩 취하여 잘 섞은 후 실온의 암실에서 30분간 염색하였다. 이때 FITC-PAC-1의 음성대조로는 FITC-PAC-1과 ARG-GLY-ASP-SER (Sigma, USA, RGDS)를 각각 10  $\mu$ L씩 첨가하였고, PE-CD62의 음성대조로는 대신 PE isotype (IgG1-PE)을 첨가하였다. 반응이 끝난 후 500  $\mu$ L의 PBS를 첨가한 후 유세포 분석기(FACSscan, Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 30분 이내 분석하였다.

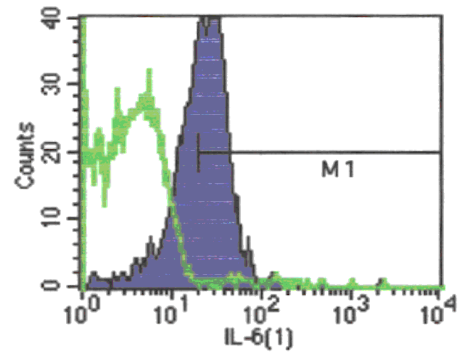
## 3. 유세포분석기 분석

FACS CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA) 프로그램을 사용하여 forward light scatter (FSC)와 side light scatter (SSC)는 log amplification하고 FSC threshold를 200으로 맞춘 후, 최소 5,000개 이상의 혈소판을 acquisition 하였다. FSC & SSC 화면에서 혈소판 위치에 해당하는 부위를 gating하여 분석하였다. 활성화시킨 혈소판은 FITC-PAC-1 염색은 FL1, PE-CD62는 FL2에서 각각 이들의 음성대조에 맞추어 set-marker를 설정한 후 양성율을 구하였는데, set-marker 설정시는 음성대조 세포의 99% 이상이 음성에 포함되도록 하였다 (Fig.1).





A.



B.

Fig. 1. Examples of stained platelets with fluorescein isothiocyanate conjugated PAC-1 monoclonal antibody after incubation with interleukin-6 (1 ng/mL) in light scatter dot plots and histogram

A. Gating of platelets in light scatter dot plots

B. Histogram for gated platelets. The percentage of activated platelets is 73.1%(M1).

#### 4 통계처리

통계처리는 프로그램 SPSS 10.0 for Windows를 사용하였다. 각 IL의 농도별 간의 활성화 차이 분석시 one way ANOVA test, PAC-1과 CD62 염색간의 혈소판 활성화 비교 및 동일 농도의 IL-6와 IL-8의 혈소판 활성화 효과 비교시에는 paired t test로 분석하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우에만 의의가 있는 것으로 간주하였다.

### III. 결과

#### A. IL-8의 농도에 따른 혈소판 활성화 표지자의 양성율 (Fig. 2)

5가지 IL-8 농도에 따른 PAC-1 양성율의 평균±표준편차 (범위)는 0.5 ng/mL 61.1±22.3 (28.9~95.5)%, 3 ng/mL 62.5±24.0 (37.8~96.9)%, 5 ng/mL 66.1±20.0 (29.8~90.7)%, 10 ng/mL 71.4±20.1 (30.8~95.3)%, 1000 ng/mL 67.5±19.9 (38.0~96.7)%이었다. 1000 ng/mL 농도를 제외하고는 IL-8의 농도가 증가할수록 양성율이 점차 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다.

5가지 IL-8 농도에 따른 CD62 양성율은 0.5 ng/mL 9.0±6.3 (2.8~22.8)%, 3 ng/mL 9.3±7.3 (2.5~23.8)%, 5 ng/mL 10.3±6.1 (2.8~20.7)%, 10 ng/mL 12.5±5.3 (6.1~22.1)%, 1000 ng/mL 12.2±3.8 (7.8~19.0) % 였다. 오히려 10 ng/mL 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였으나 농도별간의 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

IL-8으로 활성화시킨 혈소판의 PAC-1 염색시 양성율은 65.7±20.8%이었고, CD62는 10.7±5.8%로써, 각 농도마다의 PAC-1과 CD62의 양성율 비교시 5가지 모든 농도에서 PAC-1의 양성율이 CD62의 양성율보다 유의하게 높았다 (각각  $P<0.001$ ).

#### B. IL-6의 농도에 따른 혈소판 활성화 표지자의 양성율 (Fig. 3)

4가지 IL-6 농도에 따른 PAC-1 양성율의 평균±표준편차 (범위)는 0.1 ng/mL 73.4±13.5 (58.0~95.7)%, 0.5 ng/mL 71.9±16.1 (48.4~96.7)%, 1 ng/mL 69.1±15.6 (47.5~90.3)%, 5 ng/mL 69.0±14.9 (53.3~88.8)%였다. IL-6의 농도가 증가할수록 양성율이 점차 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

4가지 IL-6 농도에 따른 CD62 양성율은 0.1 ng/mL 13.9±5.3 (7.0~22.4)%, 0.5 ng/mL 13.8±5.8 (5.8~24.6)%, 1 ng/mL 13.0±5.8 (7.3~23.7)%, 5 ng/mL 13.4±5.7 (5.8~21.7)%였으며 역시 각 농도간의 양성율은 통계학적으로 차이가 없었다.

IL-6으로 활성화시킨 혈소판의 PAC-1 염색시 양성율은  $70.8 \pm 14.6\%$ 이었고, CD62는  $13.5 \pm 5.4\%$ 로써, 각 농도마다의 PAC-1과 CD62의 양성율 비교시 4가지 모든 농도에서 PAC-1의 양성율이 CD62의 양성율보다 역시 유의하게 높았다 (각각  $P < 0.001$ ).

### C. IL-6와 IL-8의 활성화 효과 비교를 위한 혈소판 표지자의 양성율 비교 (Table 1)

IL-6와 IL-8의 활성화 효과 비교를 위하여 동일 농도의 IL-8와 IL-6으로 활성화시켰을 경우의 각 표지자의 양성율을 비교한 결과, PAC-1 양성율의 평균  $\pm$  표준편차는 0.5 ng/mL IL-8로 활성화시킨 경우  $61.1 \pm 22.3\%$ , 동일 농도의 IL-6 시는  $71.9 \pm 16.1\%$ 로써 유의한 차이는 없었다. 그러나 CD62 양성율은 IL-8  $9.0 \pm 6.3\%$ , IL-6  $13.8 \pm 5.8\%$ 로써 IL-6으로 활성화시킨 경우 유의하게 높았다 ( $P < 0.05$ ). 또한 5 ng/mL의 IL으로 활성화시킨 경우의 PAC-1 양성율은 IL-8  $66.1 \pm 20.0\%$ , IL-6  $69.0 \pm 14.9\%$ 이었으며, CD62 양성율은 IL-8  $10.3 \pm 6.1\%$ , IL-6  $13.4 \pm 5.7\%$ 로써 IL-6으로 활성화시킨 경우가 IL-8에 비하여 양성율이 높은 경향을 보였으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

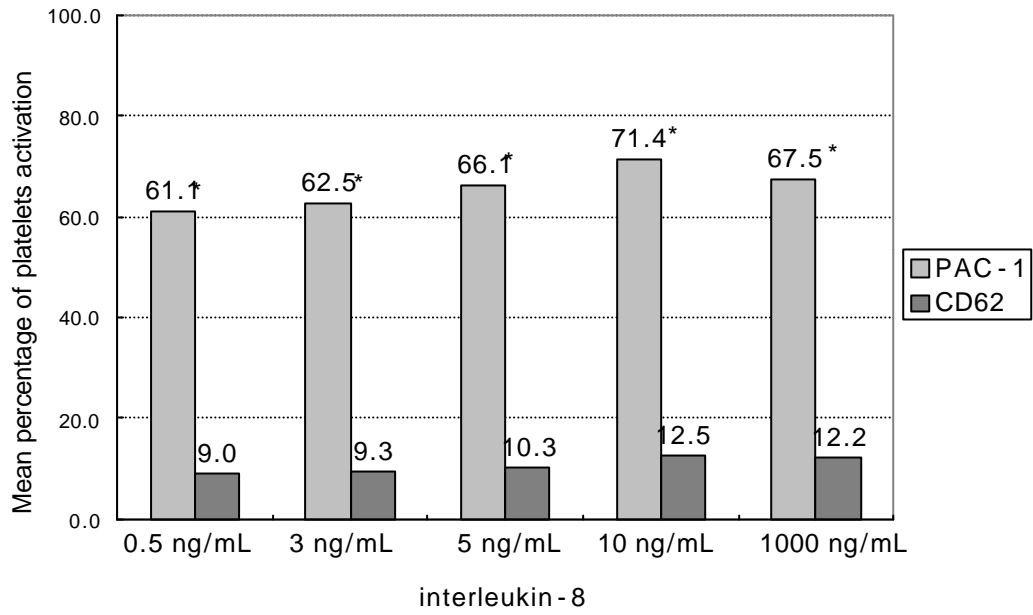


Fig. 2 The mean percentage of platelets activation according to the incubations with various concentrations of interleukin-8

\* :  $P < 0.001$  versus CD62

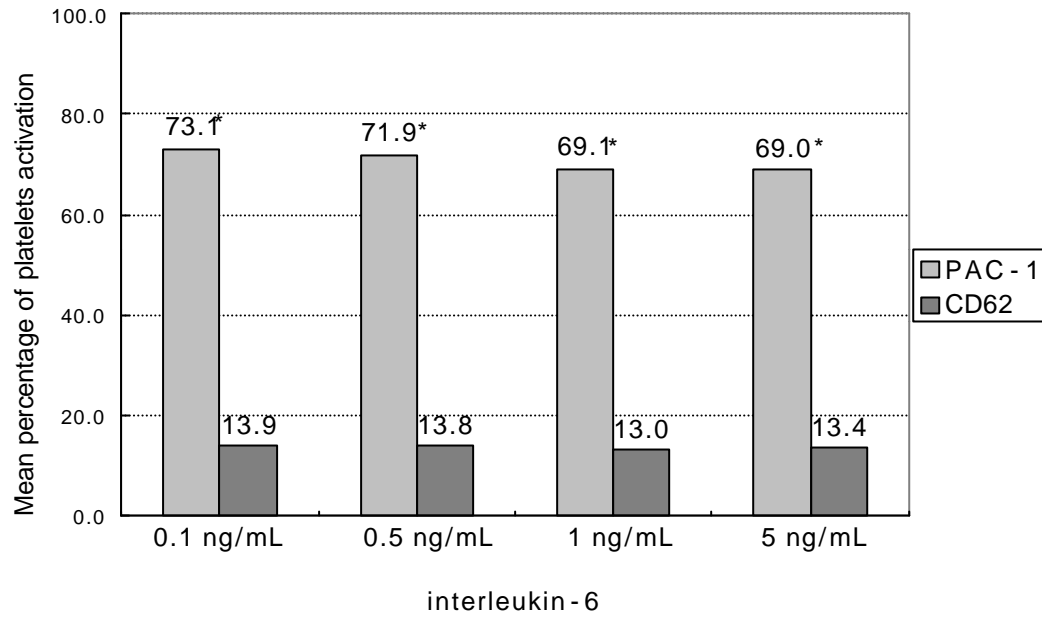


Fig 3. The mean percentage of platelets activation according to the incubations with various concentrations of interleukin-6

\* :  $P < 0.001$  versus CD62

Table 1, Comparisons of the mean  $\pm$  standard deviation of percentage of activated platelets according to the incubation with interleukins (IL) and the markers for activated platelets

Concentrations	Number	Markers	IL-8	IL-6
0,5 ng/mL	10	PAC-1(%)	61,1 $\pm$ 22,3	71,9 $\pm$ 16,1
	10	CD62(%)	9,0 $\pm$ 6,3	13,8 $\pm$ 5,8*
5 ng/mL	10	PAC-1(%)	66,1 $\pm$ 20,0	69,0 $\pm$ 14,9
	10	CD62(%)	10,3 $\pm$ 6,1	13,4 $\pm$ 5,7

\* :  $P < 0,05$  versus IL-8

## VI. 고찰

Cytokine은 주로 백혈구에서 분비되는 저분자량의 단백질이나 당단백으로 구성되어 있으며 염증반응에 있어서 세포와 세포사이의 상호작용을 담당한다. 수혈시 백혈구 제거 필터를 사용한 혈액을 수혈한 경우에도 이미 분비된 IL-8과 IL-6은 수혈후 발열 및 염증반응을 일으키는 원인으로 알려져 있다<sup>2-4</sup>. 따라서 최근에는 보관전 백혈구 제거 필터를 사용하는 것이 백혈구로 인한 동종면역뿐 만이 아니라 이러한 수혈부작용을 예방하는 방법으로도 제시되고 있다<sup>1</sup>. 그러나 혈소판 보관중 분비될 수 있는 농도의 IL-8과 IL-6이 직접 혈소판을 활성화시킨다는 사실이 1996년 Lumadue 등에<sup>12</sup> 의하여 처음 제시되고 본 연구에 의하여 재확인됨으로써, 활성화된 혈소판이 수혈후 생존율이 낮다는 사실을 감안한다면 보관전에 백혈구를 제거하여야 하는 또 다른 중요한 이유라 할 수 있다.

저장기간중 생성될 수 있는 IL 농도를 결정하기 위하여 Lumadue 등은<sup>12</sup> 직접 혈소판제제 보관중 분비된 IL 농도를 측정하여 산정하였으나, 본 연구에서는 이미 저장기간중 분비되는 IL-6와 IL-8의 평균 농도에 관하여 보고한 문헌들을 참고하였다. 즉, IL-8의 농도는 저장 1일째 1~116 pg/mL, 2일째 1,300 pg/mL, 3일째 20~3,610 pg/mL, 4일째 2,170~6,259 pg/mL, 5일째 145~32,438 pg/mL로써 보고마다 매우 다양함을 알 수 있었다<sup>1,4,5,12</sup>. 또한 IL-6 역시 저장 1일째 2.8~140 pg/mL, 2일째 7.7~310 pg/mL, 3일째 71.5~1,293 pg/mL, 4일째 134 pg/mL, 5일째 96~4,883 pg/mL로써 다양하였다<sup>1-3,5,12</sup>. 이는 혈액 제조 및 보관법이 각 기관마다 차이가 있기 때문인 것으로 여겨지며, 따라서 저장 기간중 분비될 수 있는 IL-6와 IL-8의 농도를 더 다양하게 반응시킬 필요가 있다고 여겨졌다.

Lumadue 등은<sup>12</sup> 저장 3~4일째에 나타났던 최소 농도로써 IL-8 3000 pg/mL 과 IL-6 100 pg/mL을 설정하여 저장 기간이 3일 이상 보관된 혈소판들의 활성화 가능성을 제시하였다. 그러나 앞에서 열거하였듯이 IL-8은 보관 2일째에도 0.5 ng/mL이상, IL-6 역시 보관 1일째도 0.1 ng/mL 이상이 분비될 수 있으며, 이러한 농도는 본 연구에서 혈소판을 활성화시켰으므로, 저장 1일째부터도 혈소판이 활성화될 수 있음을 보여준다고 할 수 있다.



Lumadue 등은<sup>12</sup> 자신의 실험에서 얻어진 결과를 토대로 저장 3~4일째에 나타났던 농도로써 IL-6 100 pg/mL, 125 pg/mL, IL-8은 3000 pg/mL, 6000 pg/mL에서 각각 반응시켰고 IL-6와 IL-8를 동시에 첨가하여 측정하기도 하였다. 비록 통계학적인 처리는 하지 않았지만 IL-6와 IL-8 모두 각각 두가지 농도중 높은 농도에서의 반응이 낮은 농도때보다 CD62 양성율이 더 높은 경향을 보여 주었다. 실지로 본 연구에서도 IL의 농도와 혈소판 활성화 사이에 관련이 있는지를 알아보려고 하였다. IL-8의 경우 0.5 ng/mL, 3 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL 농도까지는 농도가 증가할수록 CD62와 PAC-1 모두 양성율이 증가하는 경향을 보였고, 1000 ng/mL의 농도에서는 CD62와 PAC-1 모두 양성율이 10 ng/mL 농도때의 반응보다는 낮았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 또한 IL-6의 경우 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL의 농도가 증가할수록 PAC-1의 양성율은 오히려 감소하는 경향을 보였고, CD62 역시 5 ng/mL를 제외하고는 점차 감소하는 경향을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다. 그러나 IL-6의 이러한 현상과 10 ng/mL 농도의 IL-8에서 반응이 오히려 낮았던 현상은, IL-6 125 pg/mL과 동시에 IL-8 6000 pg/mL과 반응시킨 혈소판의 CD62 양성율이 IL-6 100 pg/mL과 동시에 IL-8 3000 pg/mL과의 양성율보다 낮게 측정된 Lumadue 등의 연구에서도<sup>12</sup> 지적되었듯이, 높은 농도의 cytokine은 오히려 혈소판을 비활성화시킬 가능성도 있다는 것과 전혀 무관하지 않는 것으로 여겨졌으며, 이에 대한 연구가 향후 필요할 것으로 사료되었다.

IL-8은 저장 기간중 시간이 지날수록 IL-6보다 더 두드러지게 증가하기<sup>1,4b</sup> 때문에 같은 저장기간이더라도 IL-6보다는 IL-8이 더 많이 분비될 가능성이 높다. 그러나 동일 농도의 IL-6과 IL-8의 혈소판 활성화 효과를 비교한 결과 IL-6으로 활성화 시킨 혈소판이 IL-8으로 활성화 시킨 혈소판에서의 PAC-1과 CD62 표지자의 양성율보다 더 높은 경향을 보였으며, 실지로 0.5 ng/mL에서는 IL-6으로 활성화 시킨 CD62 표지자의 양성율이 IL-8보다 의의있게 높았다. 이러한 결과는 IL-6 125 pg/mL으로 활성화 시킨 혈소판의 평균 양성율 42%가 이와는 많은 농도 차이를 보인 IL-8 3000 pg/mL과 반응시켰을 때의 양성율 41%와 유사하였던

Lumadue 등의<sup>12</sup> 연구결과와도 상통하는 것으로 여겨졌다. 따라서 IL-6는 저장기간중 분비되는 농도는 IL-8보다 낮더라도 혈소판 활성화 효과는 농도만큼 낮지 않음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 IL과 혈소판을 1시간 반응시켰으나, 고용량의 IL-6를 혈소판과 반응시켰던 보고에서는 1시간보다는 3시간 반응시켰을 경우 혈소판의 CD62 양성이 더 높았다<sup>6</sup>. 이는 저장 혈소판은 보관 기간이 길어질수록 분비된 cytokine과 반응하는 시간도 길어지기 때문에 저장 혈소판에서의 활성화 정도는 단순히 IL의 농도 뿐 만이 아니라 저장기간의 영향도 고려하여야 할 것으로 사료되었다.

IL-6와 IL-8의 농도 결정이외에도 본 연구는 Lumadue 등의 연구와<sup>12</sup> 방법상에서 몇가지 다른 점이 있는데, 우선 정상 혈소판을 채취하기 위하여 EDTA 시험관대신 본 연구에서는 채혈과 보관에 따른 시험관내 혈소판 활성도를 최소화하기 위해서 CTAD 시험관을 사용하였다. 이는 두가지 시험관을 이용하여 혈소판의 활성화를 비교한 연구 결과에 의한 것으로 혈소판의 CD62 양성이 EDTA 시험관 사용시  $38.3 \pm 12.4\%$ 인데 반하여 CTAD는  $1.9 \pm 1.7\%$ 로써 현저히 낮아, 혈소판 활성화 측정시에 자연적인 혈소판 활성화를 방지하려면 CTAD 튜브 사용이 더 적합하다고 판단하였기 때문이다<sup>13</sup>. 또한 Lumadue 등의 연구에서는<sup>12</sup> PRP 분리시에 실온에서 1~2시간 전혈을 가라앉히는 방법을 사용하였으나 본 연구에서는 원심분리기를 사용하여 혈소판제제를 제조하듯이 200g, 15분으로 분리하여, IL과 반응하는 혈소판을 수혈용 혈소판 제제와 유사한 조건으로 만들고자 하였다. 그리고 혈소판 활성화 표지자로써 CD62이외에도 본 연구에서는 PAC-1 단일 항체를 추가하였다는 점이다. 이 연구에서 PAC-1 표지자는 CD62보다 IL-6와 IL-8의 혈소판 활성화 효과에 더 민감하게 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

PAC-1은 혈소판 섬유소원 수용체 근처에 위치하는 당단백 IIb-IIIa의 에피토프를 인지하는 IgM으로써, 혈소판이 활성화될 경우 혈소판 응집에 중요한 역할을 담당하는 당단백 IIb-IIIa이 구조적으로 변성하여 섬유소원 부착 부위를 노출시키므로 활성화된 혈소판하고만 반응한다<sup>14</sup>. 본 연구에서는 IL-8과 IL-6 모두

직접 혈소판의 당단백 IIb-IIIa의 구조적 변성을 유도함을 증명할 수 있었는데, 이는 저장 혈소판이 활성화되어 과립 분비뿐만이 아니라 당단백 IIb-IIIa의 구조적 변성도 유도하였다는 보고와도<sup>15</sup> 상통하는 것을 알 수 있었다. 반면 CD62는 p-selectin, 즉 혈소판의 granule membran protein 140 (GMP-140)의 항원에 대한 단클론 항체이며, p-selectin은  $\alpha$ -과립의 분비후에만 표현되는 막단백으로 비활성화된 혈소판에서는 표현되지 않고 혈소판이 활성화될 때 세포막 표면으로 이동하는 단백질이다<sup>16</sup>. 또한 단구와 호중구에 활성화된 혈소판이 부착되도록 매개해 주므로 이의 표현율이 높은 혈소판은 수혈후 세망내피계의 단구와 대식세포 등에 인지되어 제거될 가능성이 있으므로<sup>16</sup>, p-selectin의 표현 정도는 수혈효과와 직결된다고 알려져 있다<sup>10,11</sup>. 비록 PAC-1은 혈소판이 활성화될 때 수반되는 막변화에 민감하게 반응하기는 하나 혈소판 분비 작용과는 독립적이므로, PAC-1 양성인 혈소판이 음성인 혈소판에 비하여 혈중내에서 빨리 제거되는지에 대한 여부는 분명하지 않다.

저장 혈소판 수혈시의 발열성 수혈부작용과 관련있는 cytokine은 혈액내 혼입된 헌혈자의 백혈구로부터 분비되므로 증가된 cytokine은 백혈구의 오염도에 비례한다고 볼 수 있다. 따라서 보관 혈액내 cytokine 분비를 최소화 하는 방법들, 예를 들면 혈소판 제조시 백혈구의 혼입을 최소화하거나 보관전 백혈구를 미리 제거하는 방법, cytokine 분비를 억제하는 물질등의 첨가 등은 모두 수혈후 혈소판 생존율을 증가시키는 방법이 될 수 있을 것으로 여겨진다.

이러한 연구결과는 또한 생체내에서의 cytokine이 증가된 환자들에서도 혈소판이 활성화되어 혈소판 수명이 더 짧아질 가능성도 고려해볼 수 있으므로 이러한 환자들에 대한 혈소판 활성화 연구의 시행에도 동기를 부여할 수 있다는 점에서도 본 연구의 의의가 있다고 여겨진다.

## V. 결론

본 연구를 통하여 혈소판제제의 저장중 생성될 수 있는 농도의 IL-6와 IL-8 모두 혈소판을 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이렇게 활성화된 혈소판이

체내에 들어가 빨리 제거된다는 것은 이미 여러 보고로 알려진 사실이다. 따라서 cytokine에 의한 혈소판 활성화를 최소화하기 위해서는 보관전에 미리 이의 제공자인 백혈구를 제거하는 방법이 보관 중 혈소판 활성화를 방지하여 수혈 후 혈소판 생존율을 증가시키는데 도움이 될 것으로 여겨졌다.

## 참고 문헌

1. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A and Hashemi S : Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 35:117-124, 1995
2. Wadhwa M, Lubenko A, Seghatchian MJ, Contreas M, Dilger P and Thorpe R : Cytokines in platelet concentrates. *Transfus Sci* 16(2):179-181, 1995
3. Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R and Peetermans ME : Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 33:195-199, 1993
4. Wadhwa M, Seghatchian J and Thorpe R : Are cytokines in platelet concentrates responsible for febrile transfusion reactions? *Transfus Sci* 18:367-371, 1997
5. Stack G and Snyder EL : Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 34:20-25, 1994
6. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Isaacs R, Dutcher JP and Puszkin E : Morphologic and ultrastructural evidence of interleukin-6 induced platelet activation. *Am J Hematol* 48:92-99, 1995
7. Si Tahar M, Henesto P, Balloy V and Chignard M : Synergism between interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha for neutrophil-mediated platelet activation. *Eur Cytokine Netw* 5:455-460, 1994
8. 권석운, 이선화, 김대원, 김현옥, 한규섭 : 농축 혈소판의 질 향상을 위한 주요 변수 분석. *대한수혈학회지* 9:273-282, 1998

9. Snyder EL, Hezzey A, Katz AJ and Bock J : Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates, *Vox Sang* 41:172-177, 1981
10. Triulzi DJ, Kickler TS and Braine HG : Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis, *Transfusion* 32:529-533, 1992
11. Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, and Hillman RS : Progressive platelet activation with storage evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion, *Transfusion* 31:409-414, 1991
12. Lumadue JA, Lanzkron SM, Kennedy SD , Kuhl DT and Kickler TS : Cytokine induction of platelet activation, *Am J Clin Pathol* 106:795-798, 1996
13. 김현경, 송경순, 임종백, 안미숙: 유세포분석적 혈소판 활성화도 검사에 미치는 항응고제 영향, *한국혈전지혈학회지*, 7(2):127-132, 2000
14. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M and Brass LF : Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation, *J Biol Chem* 260:11107-11114, 1985
15. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouweland WH, Nieuwenhuis HK, Roos D and de Korte D : Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry, Changes during platelet storage, *Transfusion* 30:20-25, 1990
16. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R and Wagner DD : PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes, *Cell* 59:305-312, 1989

-ABSTRACT-

Effects of Cytokine on Platelet Activation

Shin Won Kim

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Yong Ae Lim)

**Purpose** : It has been reported that the cytokine released from the white blood cells (WBC) in the stored platelet concentrates may induce the febrile transfusion reactions. However, few studies have examined the effect of cytokine on platelet activation.

**Method** : The platelets from healthy donors were incubated with interleukin (IL) at the final concentration of IL-8 0.5 ng/mL, 3 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 1000 ng/mL, and IL-6 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL. The activated platelets were stained with monoclonal antibodies of PAC-1 and CD62, and were analyzed by flow cytometry.

**Results** : The ranges of mean percent of PAC-1 and CD62 expressed platelets were 61.1~71.4% and 9.0~12.5% by incubating with IL-8, and 69.0~73.4% and 13.0~13.9% by incubating with IL-6. There were no significant percent differences of PAC-1 and CD62 expressed platelets between the various concentrations of IL-8 nor IL-6. The marker of PAC-1 was more reactive with the activated platelets by IL than that of CD62. In 0.5 ng/mL concentration, the mean percentage of CD62 expressed platelets of incubating with IL-6 (13.8%) were greater than that of incubating with IL-8 (9.0%).

**Conclusion** : During the period of the storage of platelet concentrates, the IL-6 and IL-8 secreted by the WBC can activate platelets and thus the suppression of the cytokine secretion is important for increasing

post-transfusional survival of platelets.

---

Key words : Interleukin-8, Interleukin-6, PAC-1, CD62, platelet activation







