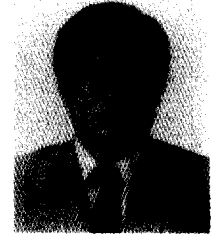


유식세포분석분리기의 원리 및 면역생물학에서의 역할



원광대학교 의과대학 면역학교실 정 현 택

Flow Cytometer(유식세포분석분리기; FCM)는 부유되어 있는 세포의 여러 특성을 측정할 수 있도록 고안되었기 때문에 동물의 체내에 있는 세포중 자연적으로 부유되어 있는 혈구세포를 분석하기가 가장 용이하다. 면역계에서 가장 중추적인 역할을 담당하며 면역반응에 특이성과 기억능력 등을 부여하는 림프구와 탐색작용을 가장 왕성히 나타내는 과립구나 단구 등이 혈액내에 존재하기 때문에 FCM을 이용하여 개체의 방어기능을 맡고 있는 면역세포를 분석하는 일이 가장 먼저 활발히 이루어졌음은 당연하였다. 또한 1970년대 면역학이 큰 발전에 이룩한 단크론항체가 Miller와 Köhler에 의하여 개발되었기 때문에 면역세포의 분화항원에 대한 여러 종류의 단크론항체는 FCM의 이용으로 면역세포를 여러 아형으로 분석하고 분리가 가능하게 하였다. 마지막으로 FCM이 최근에 개발된 것에 맞추어 세포성 면역학이 30년전부터 급속도로 연구되었으므로 면역학적 연구가 FCM의 이용으로 더욱 활성화되었음은 주지의 사실이다. 이런 시점에서 저자는 FCM의 원리와 면역생물학에서의 FCM의 역할에 대하여 간단히 소개하려고 한다.

1. 유식세포분석분리기 (Flow Cytometry : FCM)의 탄생경위

FCM의 기본원리는 약 30년전의 전기적인 방법으로 세포의 부피를 재려는 시도에서 시작하였으나 그 후 세포분석기기의 발달, 컴퓨터 과학의 눈부신 발전, 단크론항체의 생산 및 형광물질의 개발에 힘입어 현재는 세포생물학의 기초연구에 있어서도 중요한 위치를 차지할 뿐 아니라 병의 진단에도 이용되기 시작하여 임상적 응용이 활발해지고 있는

실정이다(1). Coons 등(2,3)에 의하여 개발된 1940년대의 anthracene 및 1950년대의 fluorescein isothiocyanate를 이용한 형광항체기술과 Crosland-Taylor(4)에 의하여 개발된 혈구세포를 측정하기 위한 유식(flow system)기기의 결합이 Bonner 등(5)에 의하여 1970년대 초에 이루어져 드디어 임상적으로 이용가능한 FCM이 만들어졌고 그 이름은 fluorescence activated cell sorter(FACS)라고 지어졌다. 그러나 현재 이용되고 있는 FCM은 형광물질만 측정하게 되어 있지 않고 세포의 다른 성질까지도 측정가능하게 되어 있다. 또한 세포의 분리기능 못지 않게 FCM을 이용하여 세포의 여러 성상을 동시에 분석하는 것이 가능하므로 FCM은 세포차원의 분석기기 중에서 가장 중요한 기기가 되었다. FCM을 포함한 자동세포분석기기의 발전사에 대하여 더 자세한 것은 Shapiro(6)에 의해 쓰여진 책을 참고하기 바란다.

2. FCM의 구성요소

전형적인 FCM은 네 가지로 구성되어 있는 바 첫째는 흔히 laser(light amplification by stimulated emission of radiation)인 광원, 둘째는 시료 chamber 및 집광계, 세째는 light impulse를 digital signal로 바꿔주는 전자기기, 넷째는 기계의 조작을 조절하고 자료를 모으고 분석하여 그래프를 그리는 컴퓨터 등이다(그림 1 참조). 가장 널리 이용되고 있는 FCM의 광원은 laser로 그 power는 50 mW에서 5와트(watt)의 범위에 속한다. 레이저는 광원으로 여러 잇점이 있는 바 그 beam이 coherent하고 단일파장의 빛이며 에너지가 크다는 것이다. 그러나 레이저는 설치비가 비싸며 plasma tube를 깨끗한

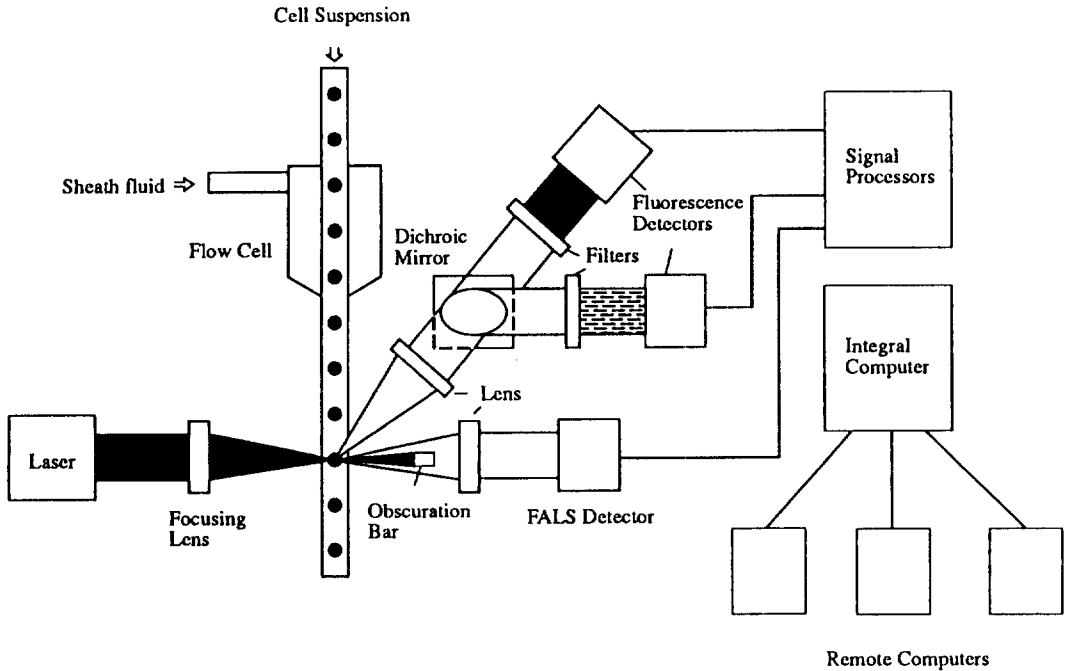


그림 1. 전형적인 유식세포분석 분리기는 광원, 시료 Chamber와 집광계, 전자기기 및 컴퓨터로 이루어졌다.

물로 냉각시켜야 하기 때문에 유지비도 상당히 투입되어야 한다. 어떤 FCM은 광원으로 레이저 대신 mercury arc lamp를 이용하기도 하는 바 이럴 경우에는 설치비나 유지비는 싸더라도 광원으로서 레이저가 가지고 있는 장점이 없다. 세포를 분리하는 기능까지를 FCM에서 필요할 시는 레이저 power를 큰 것으로 하여야 하나 분석기능만을 원할 시는 그 power가 작은 것을 이용하여도 무방하며 최근에는 레이저 power가 작은 기계는 수냉식대신 공냉식방법이 도입되어 설치에도 편리하고 유지비도 적게 들게 개발되었다(예로, Becton-Dickinson and Co. 제품의 FACSCAN).

FCM을 이용하여 측정하려는 시료는 반드시 단세포부유액(single cell suspension)으로 되어 있어야만 분석 혹은 분리가 가능하다. 초기 FCM이 면역학 혹은 혈액학에서 주로 이용되었던 이유도 혈구세포는 본래 세포들이 떨어져 있기 때문이었다. 그러나 고휘조직인 암세포피 등도 효소를 이용하는 방법이나 물리적인 방법으로 단세포 부유액으로 만들어질 수 있으며, 최근에는 파라핀에 매몰된 조직괴에서 단세포부유액을 얻는데 성공하여 어느 조직의 세포이든 FCM으로 분석이 가능하게 되었다.

어떻게 분석코자 하는 단세포부유액을 감싸고 양압이 가해져서 세계 흐르는 sheath fluid는 V자형 노즐 하단의 50-95 μm 구멍을 초속 10m로 빠져 흐르게 노즐이 제작되었으며 특히 중요한 것은 노즐 구멍을 빠져 흐르는 물줄기는 laminar flow를 이루어야 sample fluid와 sheath fluid가 섞이지 않고 고르게 흐를 것이다. 하여튼 노즐내에서 sheath flow는 hydrodynamic focusing effect를 나타내어 물줄기속에 시료의 단세포부유액이 흐르게 하고 sheath fluid가 단세포부유액을 감싸게 해야 한다. Sample fluid속의 세포는 노즐밑에 위치하는 광원의 작은 빛을 하나 하나씩 통과해야 한다. 그러므로 sheath fluid속의 sample fluid의 정확한 위치는 FCM의 효율적인 운용을 위해서 필수적인 것이다.

3. FCM의 기능

1) 분석기능

세포표면 혹은 세포질 혹은 핵내에 형광물질을 포함하는 세포가 세포물줄기 속에서 흐르다 레이저 beam과 만나게 되면 두 가지 중요한 현상이 일어난다.

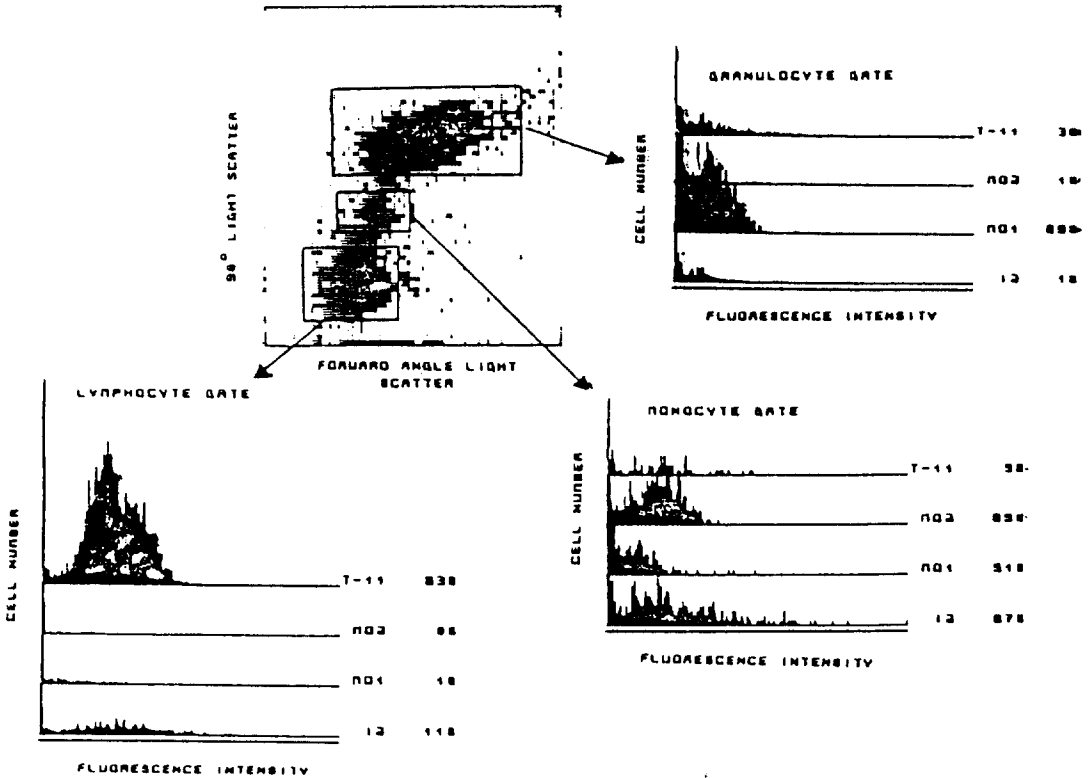


그림 2. 말초혈액 백혈구의 여러 세포집단이 보이는 FALS와 90°LS의 두 파라미터값으로 그려진 contour plot에서 세포집단을 따로따로 구분하는 gating을 한 다음 각 세포집단을 특이하게 인식하는 형광물질이 결합된 단클론항체를 이용하여 단일 파라미터의 분석을 하였다. 각 세포집단에 대한 단일 파라미터의 형광 그림표는 화살표로 표시되어 있다.

첫째로 광원에서 온 레이저 빛이 세포에 의하여 산란이 일어날 것이며, 둘째로 형광물질이 레이저 빛의 에너지를 흡수하였다가 비쳐진 레이저 빛보다 파장이 더 긴 형광을 발하게 될 것이다.

(1) 레이저 광선의 산란으로 얻는 정보(표 1 참조).

① 앞에서 잡은 레이저 빛의 산란(forward angle light scatter ; FALS) 세포물줄기속의 세포에 의하여 산란된 레이저 빛은 사방으로 뿔겠지만 레이저 beam과 같은 축으로 산란되는 빛의 양은 세포의 크기에 비례한다. FALS의 기준으로 사람의 백혈구를 구별할 경우 림프구는 FALS값이 작고 과립구는 FALS값이 크며 단핵구는 그 중간치에 속한다.

② 옆에서 잡은 레이저 빛의 산란(90° light scatter ; 90° LS) 세포에 의하여 산란된 레이저 빛 중 레이저 beam과 수직으로 산란되는 빛은 세포의 과립상태를 반영한다. 즉, 90° LS는 세포의 내부구조

물에 의하여 반사되는 빛으로 밝혀졌다. 그러므로 림프구는 작은 90° LS를, 과립구는 큰 90° LS를, 그리고 단핵구는 그 중간치의 90° LS 값을 가진다. FALS와 90° LS를 결합하여 결과를 분석하면 어느 한 기준을 이용하는 것보다 훨씬 나은 구별력을 보이게 된다(그림 2 참조).

(2) 형광항체기술 도입후의 형광감지로 얻는 정보 : FCM의 발달 경위에서 언급했듯이 Coons 등(2, 3)에 의하여 형광현미경적 관찰을 위하여 개발된 형광항체기술(fluorescent antibody technique ; FAT)이 FCM의 이용가치를 매우 드높여 놓았다. 그 위에 덧붙여서 Milstein과 Köhler 등(7)에 의하여 생산되기 시작한 단클론항체의 이용은 세포내부 혹은 표면에 존재하는 여러 항원이라도 그에 특이하게 반응하는 항체에 직접 형광물질이 붙어 있거나(직접방법) 혹은 세포에 존재하는 항원에 결합한 항체에 대하여 특이하게 반응하는 형광물질이

표 1. FALS와 90°LS로 얻을 수 있는 세포에 관한 정보들

FALS	90°LS
Cell size	Cytoplasmic granularity
Cell shape	Pigment content
Live-dead cell discrimination	
Gating of subpopulation	

부착된 항체(간접방법)를 사용하여 세포의 어떤 항원이라도 그 존재유무를 빠르고 정확히 분석할 수 있게 되었다. FCM의 분리기능 및 그 응용을 기술하기에 앞서 FCM에 관련된 두 가지 중요개념을 소개할까 한다. 그 하나는 FCM을 이용하면 “여러 파라미터의 동시분석(multiparameter analysis)”이 가능하다는 것이다. 즉, 분석코자 하는 세포가 세포물줄기를 타고 내려오다가 레이저 beam과 맞부딪치면 본래의 광원으로부터 나온 레이저 빛이 산란된 것이고 만약 그 세포가 형광물질을 가지고 있었다면 그 형광을 발할 것인데 그 세포에 의한 레이저 빛의 산란이나 형광은 모두 빛을 예민하게 감지하는 검색계(detector system)을 거쳐 각각의 파라미터가 컴퓨터에 의하여 수용된다. 예로, 세포의 크기(FALS), 파립정도(90° LS) 및 여러 파장의 형광의 발산 등 6개의 파라미터가 동시에 측정되어질 수 있다. 그러므로 FCM을 이용하여 세말초혈액의 백혈구와 같은 이질적 구성을 보이는 세포집단을 각각 분리하지 아니하고 분석할 수 있는데 림프구에서만 발하는 형광의 양을 측정하여 CD₄ 양성 혹은 CD₈ 양성세포인 협조T세포와 억제T세포의 분포를 측정할 수 있다. 이를 FCM의 여러 파라미터의 동시분석이라고 하는데 이 기능은 FCM의 가장 중요한 특성이 되고 있다. 또 하나 FCM의 중요개념은 FCM의 여러 파라미터 동시분석이 충분히 쓰이게 하는 “게이팅(gating)”이다. 만약 이용자가 어느 특정 파라미터에 “gate on”하면 그가 흥미있는 곳의 둘레에 전기적인 창문을 만드는 것과 같은데 예를 들어 혈구세포 중에서 림프구의 분석에 관심이 있다면 FALS와 90° LS의 값들로 성립된 이차원적인 histogram을 그리고 그가 관심있는 림프구가 존재하는 곳에 게이팅하면 된다. 그 뒤에는 컴퓨터가 빛의 산란으로 얻어지는 그래프에서 어떤 특정세포의 게이트안에 포함되는 세포군에서만 예를 들면

형광과 같은 자료를 모으고 분석하는 것이다. 앞에서 언급한 바와 같이 말초혈액에서 협조T세포와 억제T세포의 분포를 구하는 과정에서 림프구 세포군에만 게이팅이 필요하고 그 다음 림프구에서 CD₄ 및 CD₈ 분자에 특이하게 결합하여 각각 다른 형광을 발하는 것을 분석한 것은 그림 3을 참고하기 바란다.

2) 분리기능

많은 사람은 FCM을 단순히 세포분리기(cell sorter)라고 부르는 것으로 보아서 세포분리기능이야말로 여러 사람들에게 FCM의 가장 친근한 기능이라고 여겨진다. 게이팅을 이용하여 구별되어진 세포들의 어느 집단이든 여러 파라미터 동시분석으로 측정되면서 분리가 가능하다. FCM을 이용하여 세포집단에서 어느 특정 세포만을 분리하려면 전기적 pulse가 주어질 수 있도록 노즐이 piezoelectric crystal로 되어 있어야만 노즐이 진동할 수 있게 된다. 이러한 진동은 세포 물줄기가 레이저 beam과 만난 다음 세포 한 두 개를 포함하는 작은 세포 물방울을 만들 수 있게 한다. 만약 분리될 세포가 결정되면 분석게이팅과 비슷한 분리게이트(sort gate)가 명령논리를 구성한다. 분리논리(sort logic)를 만족시키는 세포가 컴퓨터에 의하여 감지되면 컴퓨터는 세포를 포함하는 세포물줄기에 전기적 charge를 부하하는데 이 때 그 charge의 극성은 분리논리에 따른다. 만약 분리할 세포가 세포물줄기에서 떨어져 나와 세포물방울로 되면 곧 바로 세포물줄기의 charge를 없애고 다음 세포의 분석 및 분리를 가능케 한다. Charge된 소물방울이 내려 떨어지면서 양극성이 부하된 두 전기판을 지나게 되는데 지나면서 세포물방울들이 가진 전기적 성질과 반대되는 전기판으로 끌리면서 시험관이나 미세 시험관판에 떨어지게 되어 집단분리 혹은 세포 각각의 분리가 이루어지는 것이다. 아주 순수한 세포집단의 분리가 초당 5000개의 세포가 얻어질 수 있는 빠른 속도로 이루어질 수 있다. 그러면 FCM의 임상적 응용에 앞서 FCM의 장단점을 간략히 소개하고자 한다.

4. FCM의 장점과 단점

FCM의 여러 속성은 FCM이 임상학 특히 진단병리학분야에서 매우 유용한 기계임을 분명히 하여 준다. 세포의 분석에 있어서 FCM을 이용할 시 초당

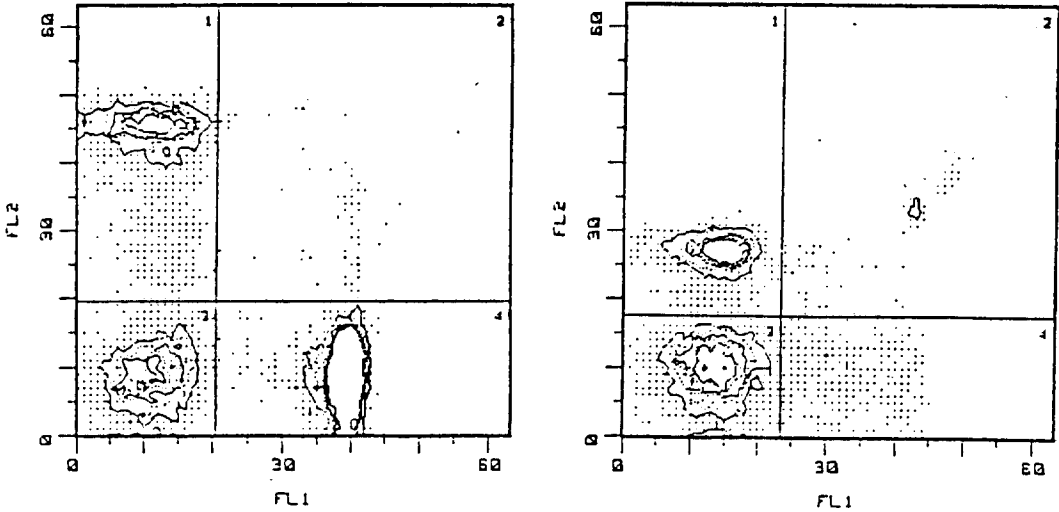


그림 3. 협조 T세포와 억제 T세포를 각각 상이한 형광물질이 결합된 특이한 단클론항체로 염색하여 여러 파라미터로 동시 분석한 결과를 나타내는 contour map. 말초혈액 백혈구를 FALS와 90°LS로 분석한 contour plot에서 림프구만을 gating한 다음 fluorescein isothiocyanate가 결합된 anti-CD₄ 단클론항체와 phycoerythrin이 결합된 anti-CD₈ 단클론항체를 이용하여 여러 파라미터 동시분석한 contour map으로 횡축은 협조 T세포를 종축은 억제 T세포를 나타낸다. 왼쪽 그림은 정상인의 림프구를 오른쪽 그림은 AIDS 환자의 림프구를 각각 분석한 것으로 정상인의 경우 CD₄ 양성 림프구와 CD₈ 양성 림프구의 비율이 1~2 사이인데 비하여 AIDS 환자는 CD₄의 선택적인 감소를 보이므로 비율이 1 이하이다.

10,000개의 세포를 매우 빠르게 처리할 수 있어 말초혈액세포군의 여러 파라미터의 동시 분석을 10~15초 사이에 마칠 수 있다. 짧은 시간에 많은 세포를 정량적으로 분석할 수 있는 기능은 통계적인 의의를 크게 부여할 수 있다. 또한 FCM은 매우 예민하여 형광물질의 분자가 세포당 2,000개 정도만 존재해도 감지가 가능하고 지수적인 증폭은 미약한 형광도 측정간에 하여 구별력을 증가시키고 있다. 여러 파라미터의 동시 분석은 이질적인 분석은 이질적인 세포집단을 이용하여도 세포의 분석이 가능케하고 있으며 임상가검물의 작은 양도 FCM을 이용한 분석이 가능하다. 반면 FCM을 이용한 분석에 가장 큰 장애가 되는 것은 분석코자하는 세포가 반드시 균일한 단일세포 부유액상태로 되어 있어야 하는 점이다. 고형조직의 세포를 FCM으로 분석하고자 하면 우선 조직의 구조가 파괴되어야 하므로 정량적인 FCM과 정성적인 면역조직화학적 방법이 결합되면 가장 이상적인 분석방법이 될 것이다. 또 다른 결점으로는 FCM의 설치비나 운영비가 비싸다는 것인데 덧붙여 중요한 점은 세포생물학의 어느 정도 지식을 갖춘 사람이 FCM을 이용하여야 기계의 제 기능을 발휘시킬 수 있기 때문에 운영에 고급

인력이 필요하다는 것 또한 단점이 될 것이다.

5. FCM의 중요 이용분야

FCM은 외부시약의 처리없이도 여러 세포의 파라미터를 측정할 수 있게 고안되었다. 이런 세포자체의 파라미터는 세포자체 성질이라 불리우며 정량적인 FALS(세포크기) 및 90°LS(세포질내 과립 정도) 등이 그 예이다. 그러나 FCM의 이용으로 측정되는 대부분의 파라미터는 단클론항체 및 형광물질이 주종을 이루는 시약의 이용으로 가능한데 이러한 것들은 외부적 파라미터라 불리운다(표 2, 3 참조). 총체적으로 보면 FCM을 이용하여 세포의 구조적 특성 뿐만 아니라 세포의 기능적 특성까지도 측정이 가능하다. FCM의 이용으로 측정할 수 있는 파라미터는 시간이 갈수록 많아지고 있으나 임상적 응용에 있어서는 두개의 세포자체 성질인 세포크기와 과립상태를 이용하여 이질적인 세포집단인 임상가검물을 분석할 때 게이팅하며 두개의 외부적 파라미터인 세포표면 항원의 분석과 핵산의 정량이 가장 많이 쓰이고 있다. 세포표면 항원의 분석은 혈액학에서 여러 혈구암의 분류에는 필수불가결한 방

표 2. 유식세포 분석분리기를 이용하여 측정가능한 세포의 여러 파라미터들

	Structural	Functional
Intrinsic	Cell size	Redox state
	Cell shape	
	Cytoplasmic granularity	
	Pigment content (e.g. hemoglobin, photosynthetic pigments, lipofuscins)	
	Protein fluorescence (tryptophan, etc.)	
Extrinsic	DNA content	Membrane integrity
	DNA base ratio	Membrane permeability
	Chromatin structure	Enzyme activity
	RNA content (single and double-stranded)	Endocytosis
	Total protein	Intracellular receptors
	Basic protein	DNA synthesis
	Sulfhydryl groups	Membrane fluidity or microviscosity
	Antigens	"Structuredness of cytoplasmic matrix"
	Surface sugars (lectin binding sites)	Surface receptors
	Cytoskeletal organization	Cytoplasmic/mitochondrial membrane
		"Membrane-bound"
		[Ca ²⁺]
		Cytoplasmic[Ca ²⁺]
	Intracellular pH	

법이며 면역질화에 있어서도 면역계의 상태를 정확히 알아내는데는 가장 정확한 방법으로 밝혀졌다. 핵산의 정량적인 분석은 다음 장에서 논하기로 한다.

6. 면역학에서의 FCM의 역할

개체는 생물학적으로 다음과 같은 네 가지 위협을 항상 받고 있다고 하겠다. 첫째는 개체간에 융합인데 개체간의 융합이 되어 버리면 어떤 개체던 그 개체성이 상실되고 말 것이기 때문에 어떤 특정 개체는 그 존재성을 상실하게 된다. 이러한 개체성의 상실에 대한 적절한 예는 아프리카의 밀림을 연상하면 쉽게

이해가 될 것이다. 뾰뾰이 들어 찬 온갖 종류의 나무들이 삼림을 이루고 있지만 하나 하나의 개체성을 유지하고 있는 것을 보고 우리는 경의를 금할 수가 없게 된다. 만약 그 수많은 종류의 나무들이 융합되어 버리면 하나의 나무 떡이 될 것이고 그것은 연상한다는 것 자체가 끔찍스러운 일이다.

둘째는 분열을 빨리하여 하루가 지나면 조건만 좋다면 수억마리로 증식해 버리는 미생물이, 번식하는데 수년 내지 수십년이 걸리는 고등동물의 체내로 기어들어와 번식하면 그 개체는 감염병에 걸려 죽게 될 것이다. 이러한 예는 중세기에 유럽인구의 상당수를 사망시킨 페스트나 일차대전시 죽은 사람의 수보다 더 많은 사람을 죽게 한 1918년의 인플루엔자의 만연 등에서 볼 수 있다.

셋째는 어떤 개체든 생존하면서 항상 부딪치기 마련인 손상이다. 손상이 심하면 그 개체는 그 손상으로 인하여 죽게 마련이다. 개체가 살면서 외부 환경으로부터 받은 손상을 작게는 눈에 보이지도 않는 가시같은 것에 찔리기도 할 것이며, 크게는 교통사고 때와 같이 큰 손상으로 즉사할 수도 있다.

마지막으로 개체성을 위협하는 것은 개체내부에서 생긴 돌연변이 세포가 생장을 다른 세포보다 빨리 하므로써 초래되는 종양의 발생이다. 암세포는 개체내부 세포 중의 어떤 것이 변이를 일으켜 개체의 전체적인 통솔을 받지 아니하고 자기 혼자 멋대로 커버린 결과 결국에는 개체 전체를 말살시키고 말게 된다.

이러한 개체성을 상실시키려는 생물학적 위협들로부터 개체를 보호해야 만이 개체의 생존이 가능한 바 그 생존을 가능하게 하여 개체성을 유지시켜 주는 개체 내부의 장치가 바로 면역계이다. 면역계는 위와 같은 개체성의 위협요소로부터 개체를 보호하는 방어기능을 담당하고 있다. 면역계는 크게 두 종류의 세포가 맡고 있다. 그 중 하나는 특이적으로 외부로부터 침입하였거나 내부에서 발생한 이물질을 제거하는 림프구체통의 세포이고 다른 하나는 비특이적으로 표면에 와닿는 이물질을 탐식해 버리는 단핵탐식세포체통의 세포들이다. 이러한 두 종류의 면역세포는 독립적으로 그들의 역할을 하는 게 아니라 상호 긴밀한 협력하에서 개체의 방어기능을 수행하고 있다. 예로 개체에 세균이 침입하였다고 가정하면 침입한 부위의 대식세포가 그 세균을 탐

표 3. 유식세포 분석분리기의 사용시 흔히 이용되는 반응물질 및 형광 파장들

Stain	Reaction target	Excitation wavelength (nm)
Propidium iodide	DNA	488
Ethidium bromide	DNA	488
Acridine orange	DNA/RNA	488
Mithramycin	DNA	450
DAPI	DNA	361
Hoescht 33258	DNA	361
Hoescht 33342	DNA	361
Pyronin Y	RNA Mitochondria	545
Fluorescein isothiocyanate	Protein/antibody labelling	488
Fluorescein diacetate	Cleaved to fluorescein in cell to form cytoplasmic solution	488
Phycoerythrin	Antibody labelling	488
Rhodamine isothiocyanate	Protein/antibody labeling	568
Rhodamine 123	Mitochondria	488
Fluorescamine	Plasma membrane	390
4 methylumbelliferyl derivatives	Enzyme activities	361
Nitroheterocycle compounds	Hypoxic cells	488

식한 다음 여러 과정을 거쳐 림프구가 항원으로 인식하게 한다. 또한 림프구는 탐식세포 등의 탐식능률을 높이고 탐식된 이물질이 탐식세포들 속에서 죽을 수밖에 없게 탐식세포의 기능을 항진시킨다.

이렇듯이 면역계는 여러 세포들로 구성되었을 뿐만 아니라 림프구의 경우 면역반응을 전체적으로 조절하여야 하기 때문에 많은 종류의 아형세포들로 이루어져 있다. 이러한 아형세포들은 림프구가 분화할 시 보이는 항원을 소유하게 되는 바 이러한 항원에 대한 단클론항체를 이용하여 개체의 면역계의 구성을 측정할 수 있다(표 4 참조).

FCM은 혈액속에 존재하는 면역세포의 동정과 아형분석에 이용될 뿐 아니라 면역세포가 적절한 자극을 받아 세포 내부에 신호가 전달될 때 세포 내부의 칼슘이 증가하는데 이러한 칼슘의 변화도 측정이 가능하다. 즉 자유칼슘과 결합되어야 형광을 발하는 Indo-1이나 fluo-3와 같은 형광물질도 림프구를 stain한 다음 그 림프구를 자극하면 칼슘양에 따른 형광을 FCM을 이용하여 측정하는 것이다.

또한, 림프구가 자극되어 발현하는 IL-2 수용체나 자극된 세포만이 보이는 transferrin 수용체 등에

대한 단클론항체로 염색한 다음 FCM을 이용하면 림프구가 mitogen이나 특이항원으로 자극되는 양상을 정확히 알 수도 있다.

그러므로 FCM을 이용한 면역학적 연구는 연구자가 무엇을 하려고 의도하는가에 달렸겠지만 그가 측정하려고 하는 것에 대한 단클론항체가 있다든가 자극 전후에 형광이 변할 경우에는 무엇이든지 측정가능하다고 하겠다.

7. 암생물학에 있어서 FCM의 역할

암을 정복코자 하는 모든 과학자들의 염원 중의 하나는 우선 암세포를 정상세포로부터 구별하여 정상조직 중에서 암세포의 유무를 판별할 수 있는 방법의 정립일 것이다. 특히 진단세포병리학의 첫째 임무는 암세포의 검색에 있다. 점막에서 유리하던가 채액내에 있던가 혹은 암괴에서 직접 얻어지는 암세포는 형태적으로 정상세포와 틀린 특징을 가지고 있음은 오래 전부터 알려졌다. 특히 암세포 핵의 형태적 변화야 말로 암세포가 정상세포와 다른 가장 두드러진 것이므로 암의 세포학적 진단에 가장 많이 쓰였다. 핵의 비대화, 다양화 및 hyperchromaticity

표 4. 림프구, 단구 및 자연치사 세포의 아형을 결정하는 사람 백혈구의 분화항원.

Phenotypes	Antibodies	Associated subpopulations or functions
T-lymphocyte related		
CD2+	T11+	Total T cells and a subset of NK cells
CD2+Ta1+	T11+Ta1+	Activated T cells
CD2+CD11b+	T11+MO1+	Subset of cytolytic T cells, NKH1-1, and/or CD8+
Helper/inducer T-lymphocyte related		
CD4+	T4+	Total helper/inducer T cells
CD4+CD29+	T4+4B4+	Induces mitogen stimulated B cell immunoglobulin synthesis and proliferation
CD4+CD45RA+	T4+2H4-	Similar to CD4+CD29+ population
CD4+CD45RA+	T4+2H4+	Induces CD8+suppressor cell functions
CD4+CD29-	T4+4B4-	Similar to CD4+CD45RA+ population
CD4+HLA-DR+	T4+I2+	Hepler T cells, with HLA-DR expression
Cytotoxic/suppressor T-lymphocyte related		
CD8+	T8+	Total cytotoxic/suppressor T cells and a subset of NK cells
CD8+HLA-DR+	T8+I2+	Predominant suppressor function
CD8+HLA-DR+	T8+I2-	Predominant cytotoxic function
Killer/natural killer cell related		
CD2+CD56+	T11+NKH-1+	Subset of large granular lymphocytes, with lymphokine activated killer function
CD2-CD56+	T11-NKH-1+	Subset of large granular lymphocytes, with most effective NK activity
CD8+CD56+	T8+NKH-1+	Large granular lymphocytes
CD8+CD56-	T8-NKH1-	Natural killer cytolytic cells
B-lymphocyte related		
CD20+	B1+	Total B cells
CD20+CD21+	B1+B2+	B cells of intermediate differentiation or resting B cells
CD20+CD21-	B1+B2-	Differentiated B lymphocytes with plasmacytic features or pre-B cells
Monocyte related		
CD11b+	MO1+	Monocytes, granulocytes, null cells, some T cells
CD14+	MO2+	Monocytes and macrophages
CD14+I2+	MO2+I2+	Most normal circulating monocytes

등이 암세포 핵 변화의 중요한 양상이다.

핵의 비대화는 세포질과 핵의 상대적인 부피(핵 대 세포질의 비율)에 변화를 초래하는 요인이다. 그러나 위에 언급한 변화가 악성종양의 진단에 결정적인 역할을 못하는데 그 이유는 정상세포 중의 반응세포는 암세포와 비슷한 모습을 보이기 때문이며 정상반응세포와 암세포를 구별하는 일은 아주 잘

교육된 전문가에게도 고민을 안겨주고 있다.

암세포진단을 주로 다루는 세포병리학의 분야에서 FCM이 쓰인 것은 최근의 일이다(8). FCM의 이용으로 가장 많이 측정된 두 파라미터는 세포내 DNA양의 측정과 세포주기의 검색이다(9). 인체암의 많은 경우에서 비정상적인 배수성(anueploidy)을 보이고 배수성 이상의 정도는 예후에 중요한 정보를

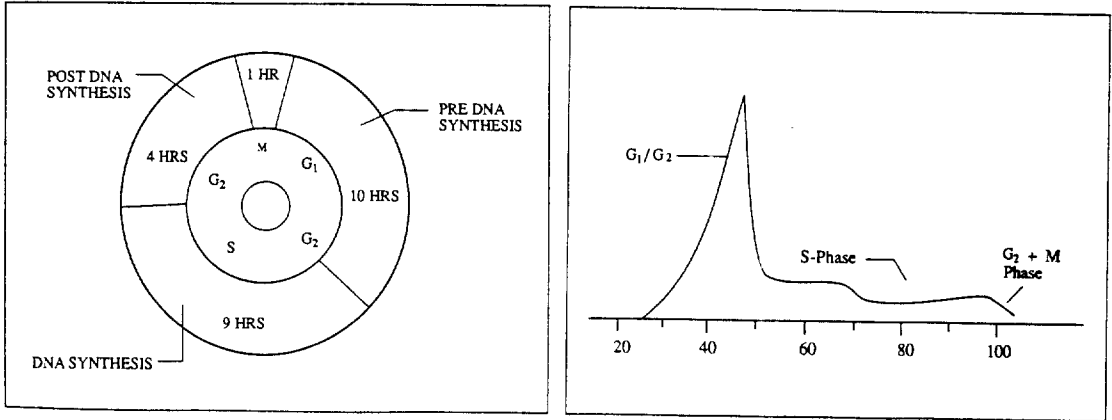


그림 4. 24시간을 기준으로 본 세포주기(왼쪽)와 각 Phase에 놓여있는 세포가 소유하는 DNA양(오른쪽).

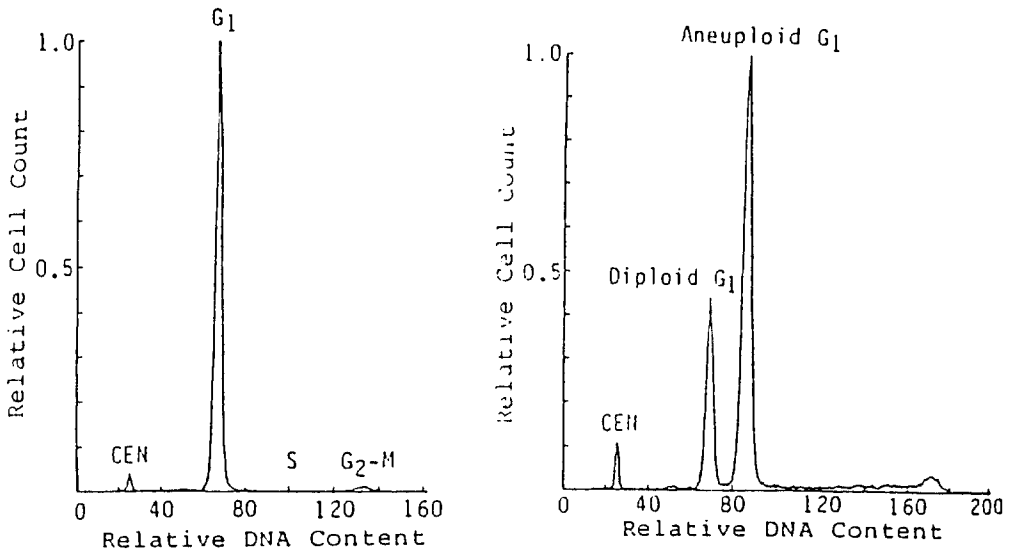


그림 5. 정상조직(왼쪽)과 종양조직(오른쪽)에서 구한 세포내 핵산량의 분포. 정상 근육세포와 뇌종양(meningioma) 세포로 이루어진 단세포 부유액을 만든 다음 propidium iodide로 핵산만을 염색하였다. 닭의 적혈구(CEN)를 내부 기준으로 잡아 각 peak의 상대적인 위치를 정하였다. 세포내 핵산량을 반영하는 형광의 세기는 횡축에 표시(channel number)하였으며 종축에는 상대적인 세포수를 표시하였다. 정상조직 핵산의 분포도에서 가장 큰 peak는 G_0 혹은 G_1 에 위치한 세포의 핵산량(2C)을 나타내며 G_2 혹은 M에 위치한 세포의 핵산량(4C)은 G_0 혹은 G_1 세포 핵산량의 두배이며 S에 놓인 세포의 핵산량은 G_0 - G_1 과 G_2 -M에 위치한 세포의 핵산량의 중간(2C-4C)이다. 종양조직이 보이는 큰 peak는 둘인 바 하나는 종양괴 속에 있던 정상세포가 보이는 것(diploid)이고 다른 하나는 종양세포가 보이는 것(aneuploidy)이다.

제공한다(10). 물론 FCM의 이용으로 암세포의 배수성 이상과 주기분석의에도 빛의 산란, 세포크기, 세포질내 RNA양, 세포표면항원 동정 및 핵의 크기와 모양 등을 측정할 수 있다(11-14). 최근에는 형태적으로는 정상같이 보이는 암세포를 여러 파라미터의 동시 측정으로 암세포를 검출하는데 더욱 정확성을 기할 수 있게 되었다(15-19).

FCM을 이용한 세포내 DNA의 검색에는 다음의 사실에 근거를 두고 있다. 첫째 세포주기의 각 단계마다 각각 상이한 예측할 수 있는 양의 DNA를 소유한다는 사실과(그림 4 참조) 둘째로 DNA에 정량적으로 결합할 수 있는(stoichiometric) 많은 형광물질(표 3 참조)이 이용가능하다는 사실과 셋째로 정상세포는 진배수(enploidy)이며 악성종양세

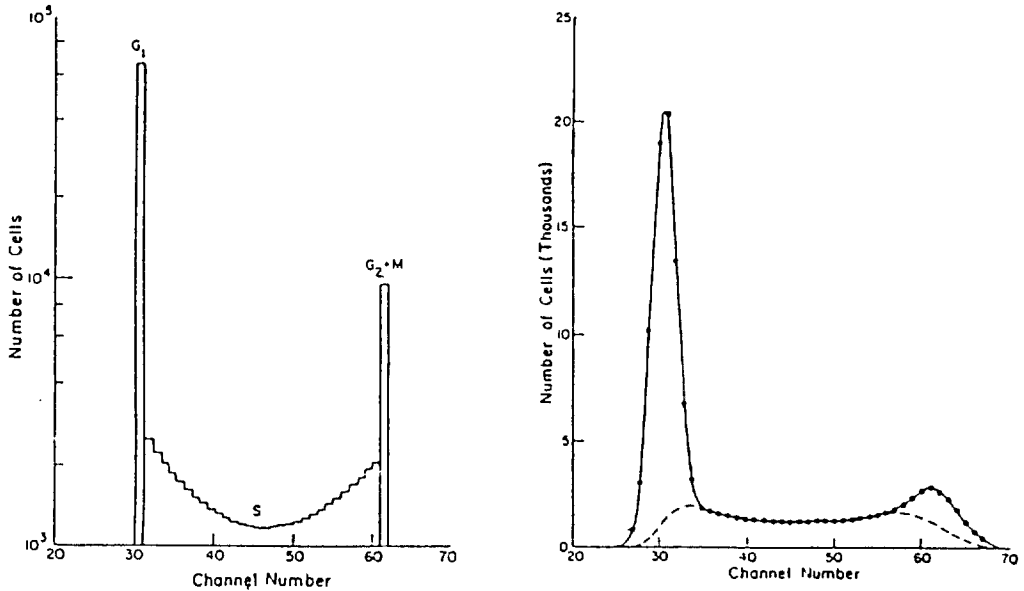


그림 6. 매우 잘 자라는 CHO세포의 핵산량을 나타낸 그림으로 왼쪽은 가상적인 것을 오른쪽은 실험적으로 측정된 값에 근거하였다. 굵은 점들은 측정값이고 실선은 컴퓨터로 구한 값이고 점선은 가상적인 S phase에 있는 세포의 집단을 표시하는 값이다.

포는 흔히 비배수성(aneploid)을 보인다는 사실이다(그림 5 참조). 또한 tritiated thymidine을 이용한 autoradiography의 이용을 밝혀진 포유동물의 세포 주기(20)에 대하여 요약하면 DNA 합성시기(sphase)에 있는 세포는 모든 염색체가 복사되어야 하므로 DNA양이 증가하기 시작한다. S phase 후에는 세포가 잠시 쉬는 gap phase로 들어가는 바 흔히 G₂ phase로 불리우는데 이 시기에는 세포가 염색체를 두 벌로 가지게 되므로 정상 DNA양의 2배의 DNA(4C)를 소유한다. G₂ phase는 유사분열(M phase)이 시작되면서 끝나고 유사분열은 두개의 자세포를 만들며 새로 만들어진 세포는 다시 gap phase(G₁ phase)로 들어가는데 이 세포들은 정상적인 양의 DNA(2C)를 소유한다. 이외에 세포주기에 들어가지 아니하는 비활동적 시기(G₀ phase)에 있는 세포들의 DNA양도 2C이다. 각 세포주기에 따른 DNA양의 정량적인 변화와 그에 따른 FCM의 DNA양의 측정을 그림으로 표시하면 Fig. 4와 같다. Acriflavine Feulgen법에 의한 DNA 염색약은 ehtidium bromide와 propidium iodide이다. 그러나 두 염색약 모두 DNA외에 RNA까지 염색하여 버리므로 DNA에 특이한 염색을 하려면 RNase를 이용하여 세포질내 RNA를 제거해 주어야 한다. 그리하여

DNA양에 근거한 단일파라미터 분석으로 특정 세포주기에 위치하는 세포들은 세 가지 구분이 가능 한데 2C DNA를 소유하는 G₀/G₁ 세포들과 4C DNA를 소유하는 G₂ 및 M세포들 및 2C와 4C 사이의 DNA양을 소유하는 S phase의 세포들이다(그림 6 참조). 1983년 Hedley 등(22)은 파라핀에 매 물된 조직편의 파라핀을 xylene이나 histoclear 등으로 제거하고 알코올 용액으로 수분을 가하여 단일 세포핵 부유액을 만든 다음 propidium iodide로 염색하여 DNA양을 측정하는 방법을 고안하였는데 이로써 옛날 조직편에서 DNA양을 쟈 수 있기 때문에 인간의 여러 악성종양에서 DNA양의 측정과 세포주기의 검사가 임상적으로 얼마나 중요한가가 밝혀지고 있다(23).

위에서 언급한 두 가지 DNA 염색약외에도 많은 염색약이 DNA의 염색에 쓰이고 있으므로 표 3을 참조하기를 바란다. 단일 파라미터로 측정된 분열하고 있는 세포와 분열을 멈춘 세포의 DNA histogram의 해석은 직접 슬라이드를 보면서 설명하겠다.

1982년 Braylan 등(24)은 인간의 임파계 세포를 가검물로 삼고 단일 레이저를 이용하여 표면항원과 핵내의 DNA 양을 동시에 측정하는 여러 파라미터 동시분석법을 개발하였다. 여러 연구자들은 종양이

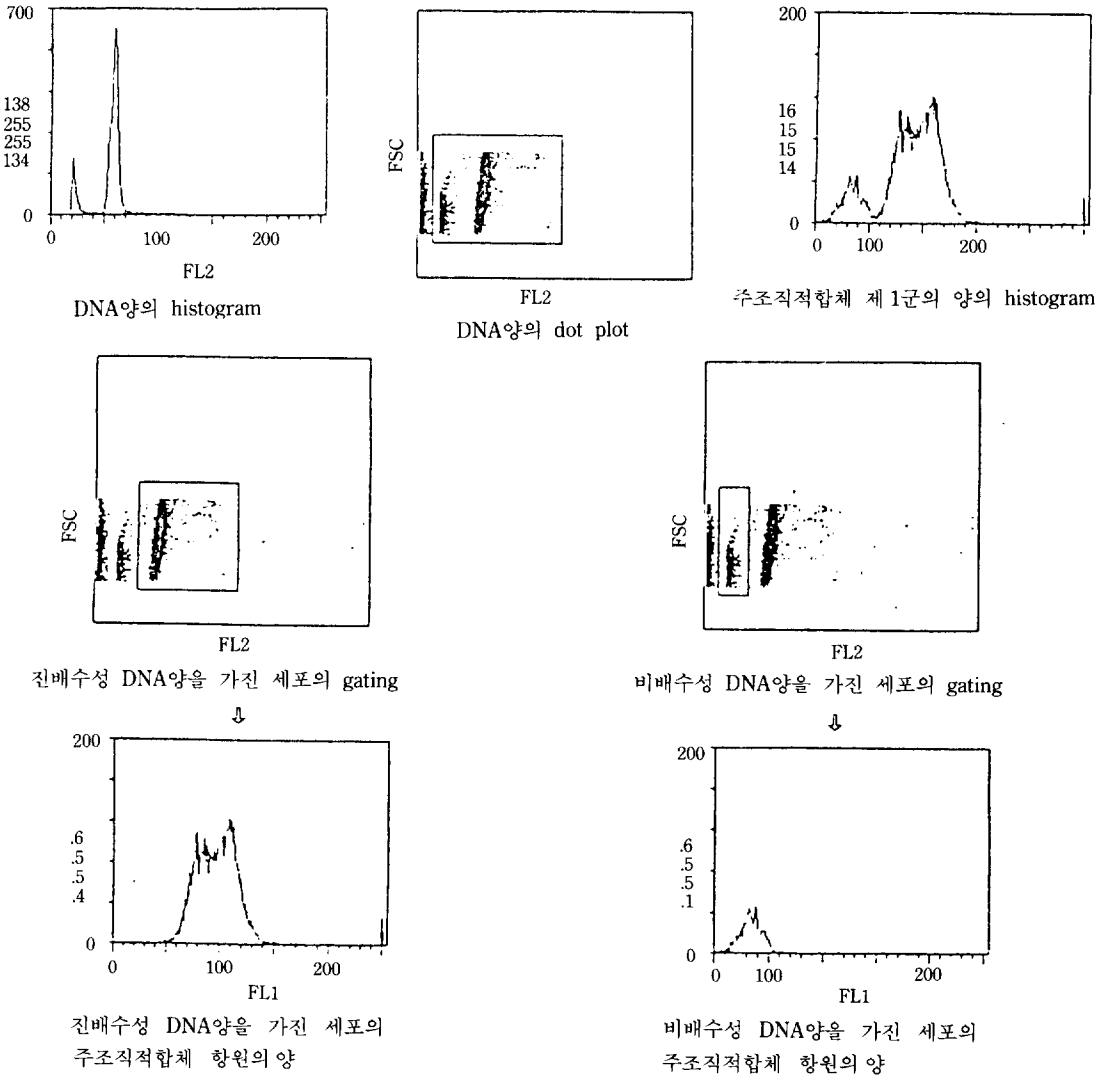


그림 7. 백혈병환자의 말초혈액 세포에서 구한 세포내 핵산량의 분포 및 각 세포군이 보이는 조직적합항원의 양. 백혈구 중 진배수성과 비배수성을 보이는 세포집단을 각각 다르게 gating하여 세포 표면의 주조직적합항원의 양을 β_2 microglobulin에 특이적으로 결합하는 형광물질이 결합된 단클론항체를 이용하여 측정하였다.

커가기 위해서는 숙주의 면역계를 속이는 방편으로 종양세포 표면의 주조직적합항원의 소실내지는 감소를 관찰하였다. 저자는 DNA양과 주조직적합항원 제 1군과의 관계를 FCM을 이용하여 파라미터 동시 분석법으로 조사하였던 바 흥미있는 결과를 얻었다 (그림 7 참조).

1911년 Rous(25)가 육종을 일으키는 바이러스 암유전자를 발견한 후 70여년이 지난 1979년에서야 Shih 등(26)에 의해 인간의 유전자속에 암을 유발

하는 유전자가 존재하며 이는 바이러스암유전자와 매우 비슷함을 알아내어 인체의 암발생에 암유전자의 중요성이 강조되었다. 그 후 성장인자 혹은 성장인자수용체 등을 만들어 세포의 성장과 밀접한 관계를 갖는 암유전자가 40개 이상이 보고되기에 이르렀다(27). 1985년에 Watson 등(28)은 암유전자에 의해 만들어진 oncoprotein과 DNA 분석을 동시에 해냈다. 암생물학의 연구에 있어서 DNA의 정량적 측정이나 세포주기분석과 같은 단일파라미터

표 5. 한국인 암환자의 암세포가 보이는 비배수성빈도

Dignosis	No. of Patients	% aneuploid
Brain tumor	97	37
Breast cancer	97	45
Cervical cancer	76	43
colon cancer	60	50
Gastric cancer	21	16.7
H-mole	101	60
Hepatoma	11	60
Total	463	49.9(%)

분석보다는 oncoprotein과 같이 세포질이나 세포막에 존재하는 여러 항원과 핵산을 동시에 세포의 성장 연구에 더욱 도움이 될 것은 자명하다 하겠다.

마지막으로 한국인의 유방암, 자궁암, 대장암 등 여러 악성종양의 DNA 배수성 검사와 세포주기의 측정값을 소개할까 한다(표 5 참조).

본 종설을 쓰는데 있어서 원고정리를 도와준 명노희 선생과 도표를 컴퓨터로 그려준 박정호군에게 감사를 드립니다.

참고문헌

- Shapiro, H.M.: Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry* 3: 277 (1983).
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exptl. Med.* 47: 200 (1941).
- Coons, A.H., Kaplan, M.H.: Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91: 1 (1950).
- Crosland-Taylor, P.J.: A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. *Nature* 171: 37 (1953).
- Bonme, W.A., Hullett, H.R. Sweet, R.G., Herzenberg, L.A.: Fluorescence activated cell sorting. *Rev. Sci. Inst* 43: 404 (1972).
- Shapiro, H.M.: Practical flow cytometry. Alan R Liss, Inc, 1988.
- Kohler, G., Milstein, C.: Continuous cultures

of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 212: 604 (1975).

- Kamentsky, L.A., Melamed, M.R., Derman, H.: Spectrophotometer: new instrument for ultrapid cell analysis. *Science* 150: 630 (1965).
- Lovette, E.J., Schnizer, B., Keren, D.F., Flint, A., Hudson, J.L., McClatchey, K.D.: Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab. Invest* 50: 115 (1984).
- Wolley, R.C., Schreiber, K., Kose, L.G., Karas, M., Sherman, A.: DNA distribution in human colonic carcinomas and its relation to clinical behavior. *J. Natl. Cancer. Inst* 69: 15 (1982).
- Collste, L.G., Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T.K., Sogani, P., Grabstald, H., Whittmore, W.F., Melamed, M.R.: Flow cytometry in bladder cancer detection and evaluation using acridine orange metachromatic nucleic acid staining of irrigation cytology specimens. *J. Urol.* 123: 478 (1980).
- Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T., Melamed, M.R.: Simultaneous staining of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytometric system. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 46 (1977).
- Valet, G., Ormerod, M.G., Warnecke, H.H., Benker, G., Rubenstroth Bauer, G.: Sensitive three parameter flow-cytometric detection of abnormal cells in human cervical cancers: a pilot study. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol* 102: 177 (1981).
- Wheless, L.L., Patten, S.F.: Slit-scan cytofluorometry. *Acta. Cytol.* 17: 333 (1973).
- Watson, J.V.: Oncogenes, cancer and analytical cytology. *Cytometry* 7: 400 (1986).
- Benson, M.C., McDougal, D.C., Coffey, D.S.: The application of perpendicular and forward light scatter to assess nuclear and cellular morphology. *Cytometry* 5: 515 (1984).
- Baner, B.F., Chacho, M.S., Roseman, D.L., Coon, J.S.: Multiparameter flow cytometric analysis of colon polyps. *Am. J. Clin. Pathol.* 87, 313 (1987).
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Melamed, M. R.: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry*. 1:

- 98 (1980).
19. Pollack, A., Moulis, H., Prudhomme, D.L., Block, N.L., Irvin, G.L., III: Quantitation of cell kinetic responses using simultaneous flow cytometric measurements of DNA and nuclear protein. *Cytometry* **5**: 473 (1984).
 20. Hudson, J.L.: *In vitro* assessment in methods in immunotoxicology. In proceedings of the Fourth FDA office of Science Symposium Washington, D.C., United States Government Printing Office, 1980.
 21. Feulgen, R., Rossenbeck, H.: Mikroskopeschemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure and aufdie darauf beruhende elektive Farbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **135**: 203 (1924).
 22. Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A., Musgrove, E.A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 1333 (1983).
 23. Hedley, D.W., Rugg, C.A., Gelber, R.D.: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* **47**: 4729 (1987).
 24. Braylan, R.C., Benson, N.A., Nourse, V., Kruth, H.S.: Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells, *Cytometry* **2**: 337 (1982).
 25. Rous, P.: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**: 397 (1911).
 26. Shih, C., Shilo, B.Z., Goldfarb, M.P., Dannenberg, A., Weinberg, R.A.: Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5714 (1979).
 27. Weber, J., McCure, M.: Oncogenes and cancer. *Br. Med. J.* **294**: 1246 (1987).
 28. Watson, J.V., Sikora, K., Evan, G.I.: Simultaneous flow cytometric assay for c-myc oncoprotein and DNA in nuclei from paraffin embedded material. *J. Immunol. Method.* **83**: 179 (1985).