

Phytomitogen에 의한 기니피그 림파구의 Blast Transformation: I. 유사분열에 미치는 배지, 유사분열촉진물질 및 세포농도의 효과

김 중 수 · 박 응 복*

경상대학교 농과대학 수의학과 · 서울대학교 수의과대학*

(1986. 7. 21 接受)

Phytomitogen Induced Blast Transformation of Guinea Pig: I. Effect of Medium, Phytomitogen and Cell Concentration on the Uptake of ³H-Thymidine

Jong-shu Kim and Ung-bok Bak*

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongsang National University

College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received July 21th, 1986)

Abstract: The present study has been carried out to investigate the optimal condition on the blastogenesis of guinea pig lymphocytes. A microculture system in conjunction with a semiautomatic multiple sample harvester(SAMSH) was used to study the *in vitro* optimal condition of guinea pig lymphocytes.

Data were presented to show many variables that are involved in studying the responses of guinea pig lymphocyte in a microculture system to the stimulation of Concanavalin A(Con A) and lipopolysaccharide(LPS).

Analysis indicated that the conditions for optimal Con A as measured by incorporation of ³H-TdR include:

- (1) use of RPMI-1640 as culture medium,
- (2) use of 6 μ g of Con A, per culture,
- (3) use of 1 \times 10⁶ cells per culture.

Conditions for optimal stimulation with LPS mitogen were similar to those used for Con A.

緒 論

Nowell(1968)이 phytohemagglutinin(PHA)이 시험관내에서 사람혈액의 blast transformation을 유발시킨다고 보고한 이래로 세포성 면역반응과 시험관내에서 plant mitogen에 의한 lymphocyte transformation과의 상호관계에 대한 연구가 광범위하게 수행 되어졌다(Fitzgerald, 1972).

Pokeweed(PWM), Concanavalin A(Con A)와 lipopolysaccharide(LPS)도 림파구반응에 대하여 PHA와 비슷한 효과가 있다고 보고되었다(Janossy와 Greaves, 1971). 이와같은 시험관내에서의 mitogen에 의한 림파구반응 시험은 임상적으로 사람의 immunologic competence를 monitoring하는데 사용되어져 왔다(Cooper 등, 1973; Oppenheim 등, 1965). PHA와 Con A는 T cell mitogens임이 닭의 림파구에 대한 연구에서 밝혀졌

다(Byrd 등, 1973; Toivanen과 Toivanen 1973; Alm, 1970). PWM은 T와 B cell mitogens임이 밝혀졌고 (Shortman 등, 1973; Weber, 1973), LPS는 B cell mitogen임이 밝혀졌다(Weber, 1973). 또한 endotoxin도 B cell mitogen 이라고 보고되었다(Weber, 1973). 동물이 어떤 바이러스 감염이나 다른 면역기능에 이상이 있을 때 이러한 mitogen에 의한 임파구의 반응은 현저히 감소한다고 한다(Muscoplat 등, 1974a, b; Johnson과 Muscoplat, 1973).

시험관내에서 임파구반응은 스트레스, 호르몬변화, 나이, 질병, 약물치료와 이런 실험을 하는데 있어서 기술상의 문제 등 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다(Fernandez 등, 1976; Johnson과 Muscoplat, 1973; Outteridge와 Dufty, 1973; Zeman 등, 1972).

이와 같이 시험관내에서 임파구반응에 영향을 미치는 요소들을 개선하고, 정상과 비정상 임파구반응을 표준화하려고 많은 연구가 수행되어졌다(Carter 등, 1975; Muscoplat 등, 1974a, b).

따라서 T와 B cell mitogen을 사용함으로써 세포성, 체액성 면역체계의 competency을 monitor할 수 있게 되었고 또한 임파구 DNA합성 측정을 위한 microculture와 배양된 임파구들을 harvest하기 위한 semiautomatic multiple sample harvester(SAMSH) 기술의 발달은 여러 동물의 임파구 반응을 연구하는데 커다란 도움이 되었다(Robbins, 1972).

따라서 저자는 mitogen에 의한 guinea pig 임파구반응의 최적조건을 찾고자 microculture system과 semiautomatic multiple sample harvester를 사용하여 본 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

材料 및 方法

실험동물 : 400~500g되는 14개월령 Hartley 계통의 수컷 기니픽 25마리를 사용하였다.

임파구 분리 및 배양 : 임파구 분리 및 배양은 Burrells와 Wells(1977), 그리고 Rouse와 Babiuk(1974)의 방법에 따랐다. 혈액(10ml)을 600×g 원심분리하여 buffy coat cells을 얻었다. 이 세포들을 FicolI(Sigma) 위에 첨가하고 400×g 30분 원심분리, 분리된 임파구를 counting하고 회석하였다. 회석된 임파구를 RPMI-1640, M-199, EMEM 배지 등에 넣고 Con A와 LPS를 농도에 따라 첨가하고, CO₂인큐베이터에서 배양하였다. 배양완료 18시간전에 methyl-(³H)-thymidine(³H-TdR, Amersham제)을 1μci씩 각 시험관에 첨가 배양을 완료하였다. 배양된 임파구를 harvesting하여 각테일 첨가 β-counting 하였다

結 果

Medium 효과 : RPMI-1640, M-199, EMEM 배지에서 임파구 DNA합성을 측정한 결과 RPMI-1640 배지에서 임파구 DNA합성이 가장 뛰어났다(Fig. 1).

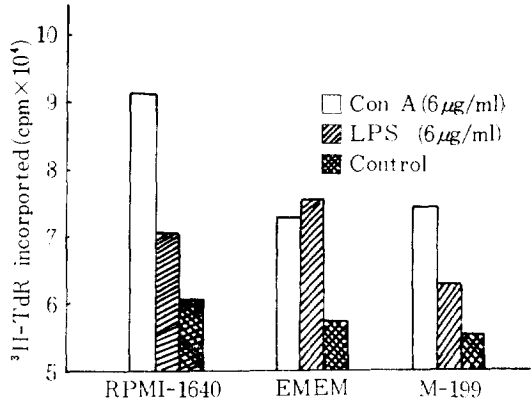


Fig 1. Effect of various cell culture mediums on the uptake of ³H-TdR. One million cells suspended in 1ml of respective medium containing 10% fetal bovine serum were incubated for 48 hours.

Mitogen 농도효과 : Con A와 LPS 농도를 달리하여 임파구의 DNA 합성능력을 측정한 결과 최적농도는 각각 6μg 이었다(Table 1, 2).

세포회석 농도의 효과 : RPMI-1640 배지에 임파구를 4×10⁵에서 4×10⁶까지 회석하여 임파구의 DNA 합성능력을 측정한 결과 1×10⁶이 ³H-TdR을 가장 많이 incorporation하였다(Table 3, 4).

Table 1. Effect of Con A Concentration on the Uptake of ³H-TdR by 1×10⁶ Lymphocytes in RPMI 1640 Medium Incubated for 48 Hours

Concentration (mg/culture)	No. of lymphocyte donor guinea pigs	Counts/minute (mean±SE)	Stimulation index (mean±SE)
2	5	31, 128±6, 214	19.7±11.5
4	5	60, 014±2, 012	37.9± 8.9
6	5	81, 054±3, 241	51.3± 2.7
8	5	56, 813±4, 372	35.9± 7.6
10	5	14, 246±7, 239	9.0±11.2

SE: Standard error.

Table 2. Effect of Lipopolysaccharide Concentration on the Uptake of $^3\text{H-TdR}$ by 1×10^6 Lymphocytes in RPMI-1640 Medium Incubated for 48 Hours

Concentration (mg/culture)	No. of lymphocyte donor guinea pigs	Counts/minute (mean \pm SE)	Stimulation index (mean \pm SE)
2	5	32,516 \pm 7,342	21.4 \pm 13.6
4	5	65,328 \pm 4,215	43.0 \pm 4.1
6	5	73,219 \pm 2,142	48.2 \pm 3.9
8	5	60,317 \pm 3,267	39.7 \pm 6.7
10	5	39,214 \pm 8,116	25.8 \pm 10.4

SE; Standard error.

Table 3. Effect of Cell Concentration on the Incorporation of $^3\text{H-TdR}$ by Guinea Pig Lymphocytes in RPMI-1640 Medium Stimulated with $6\mu\text{g}$ of Con A for 48 Hours

Cell concentration (lymphocytes/culture)	No. of lymphocyte donor guinea pigs	Counts/minute (mean \pm SE)	Stimulation index (mean \pm SE)
4×10^5	5	42,373 \pm 3,476	61.3 \pm 3.4
1×10^6	5	83,261 \pm 8,214	120.5 \pm 42.3
2×10^6	5	76,924 \pm 2,361	111.3 \pm 32.7
4×10^6	5	51,425 \pm 1,981	74.4 \pm 8.4

SE; Standard error.

Table 4. Effect of Cell Concentration on the Incorporation of $^3\text{H-TdR}$ by Guinea Pig Lymphocytes in RPMI-1640 Medium Stimulated with $6\mu\text{g}$ of LPS for 48 Hours

Cell concentration (lymphocytes/culture)	No. of lymphocyte donor guinea pigs	Counts/minute (mean \pm SE)	Stimulation index (mean \pm SE)
4×10^5	5	40,113 \pm 4,014	58.7 \pm 2.6
1×10^6	5	78,248 \pm 6,127	114.6 \pm 34.1
2×10^6	5	62,329 \pm 3,218	91.2 \pm 21.4
4×10^6	5	31,218 \pm 917	45.7 \pm 2.7

SE; Standard error.

考 察

Plant mitogen인 PHA, PWM, Con A, LPS 등은 시험관 내에서 lymphocyte blastogenesis를 자극시킨다 (Fitzerald, 1972; Parkhouse 등, 1972; Janossy와 Greaves, 1971; Nowell, 1968). 시험관내에서 mitogen에 의한 임파구 반응의 형태학적, 생화학적 특징은 생체내에서 항원에 의한 면역반응과 아주 비슷하다는 것을 알 수 있다 (Janossy와 Greaves, 1971). 본 실험에서 mitogen에 의한 기니피그 임파구 반응의 최적조건을 규명한 결과 배지는 RPMI-1640, mitogen 농도는 Con A와 LPS에서 각각 $6\mu\text{g}$, 세포희석 농도는 1×10^6 으로 나타났다. 본 실험에서 배지에 따른 임파구의 반응은 다른 배지보다 RPMI-1640에서 가장 우수하였다.

이와 같은 성적은 소(Soper 등, 1978; Muscopolat 등, 1974a), 면양(Friend 등, 1983; Larsen, 1979), 토끼(Mansfield와 Wallace, 1973), 칠면조(Maheswaran 등, 1975), 닭(Maheswaran와 Thies, 1975), 생쥐(Heiniger 등, 1973)에서도 보고되어져 있다. 이러한 결과로 볼 때 mitogen에 의한 임파구반응 시험용 배지는 RPMI-1640이 가장 좋은 배지라 생각되어진다.

본 실험에서 lymphocyte blastogenesis에 최적인 mitogen 농도는 $6\mu\text{g}$ 으로 나타났다. 이와같은 성적은 소(Muscopolat 등, 1974 a, b)의 경우 PHA를, 면양(Friend 등, 1983; Larsen, 1979)의 경우 PWM을 사용하였다는 점에서 본 실험에서 사용한 Con A 및 LPS mitogen을 고려해 볼 때 결코 같은 성적이라고 볼 수는 없겠다. 그의 칠면조(Maheswaran 등, 1975), 닭(Mahes-

waran과 Thies, 1975)에서는 0.4 μ g, 토끼(Mansfield와 Wallace, 1973)에서는 5 μ g, 생쥐(Heiniger 등, 1973)에서는 250 μ g 농도에서 lymphocyte blastogenesis가 현저하게 증가한다고 하였다. 이와같이 각 연구자들간의 보고가 권부 상이한 것은 동물의 종류, 연령, mitogen 종류 및 첨가한 농도 등 여러가지 요인이 있기 때문이라고 사료된다.

본 실험에서 입파구 최적 희석 농도는 1×10^6 으로 나타났다. 이와 유사한 성적은 면양(Friend 등, 1983; Larsen, 1979), 소(Soper 등, 1978; Muscoplat 등, 1974b)에서 보고되어졌다. 고양이(Cockerell 등, 1975), 토끼(Mansfield와 Wallace, 1973), 칠면조, 닭(Maheswaran과 Thies, 1975; Maheswaran 등, 1975)에서는 1×10^5 에서부터 2×10^6 등으로 다양하게 보고 되어졌다. 이러한 상이한 결과도 동물의 종류, 사용된 배지 조성차이, mitogen 등 다양한 요인에 기인한 결과라고 풀이된다. 기니픽 입파구의 $^3\text{H-TdR}$ incorporation을 측정하여 나타난 최적조건 성적을 요약하면, (1) RPMI-1640 medium. (2) 6 μ g/ml Con A, LPS, (3) 1×10^6 PBL/culture이다. 이상의 성적과 다른 많은 보고자들의 성적을 요약해 볼 때 lymphocyte blastogenesis 효과가 가장 큰 최적조건은 세포희석농도, mitogen 종류 및 농도, medium 종류 등 많은 요인이 있는 것으로 생각되어진다. 기니픽 입파구가 Con A와 LPS에 다 같이 반응한 것으로 볼 때 Con A와 LPS에 반응한 세포는 각각 T와 B cell인 것으로 추정된다.

結 論

Mitogen에 의한 lymphocyte blastogenesis을 일으킬 수 있는 최적조건을 찾기 위해서 microculture system과 semiautomatic multiple sample harvester를 사용하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. RPMI-1640 culture medium에서 lymphocyte blastogenesis가 가장 현저하게 나타났다.
2. Lymphocyte blastogenesis를 가장 증가시킨 mitogen 농도는 배양시험관당 6 μ g이었다.
3. Blastogenesis가 가장 현저한 lymphocyte 농도는 1×10^6 /ml였다.

參 考 文 獻

Alm, G.V. (1970) *In vitro* studies of chicken lymphoid cells. I. Phytohemagglutinin induced DNA, RNA and protein synthesis in spleen cells from control-irradiated and bursectomized irradiated chickens. Acta. Pathol. Microbiol.

Scand(B), 78:632~640.

Burrells, C. and Wells, P.W. (1977) *In vitro* stimulation of ovine lymphocytes by various mitogens. Res. Vet. Sci., 23:844~866.

Byrd, W.J., Von Boehmer, H. and Rose, B.T. (1973) The role of the thymus in maturational development of phytohemagglutinin and pokeweed mitogen responsiveness. Cell Immunol., 6:12~24.

Carter, J.B., Barr, G.D. and Levin, A.S. (1975) Standardization of tissue culture conditions for spontaneous thymidine-2-c incorporation by unstimulated normal human peripheral lymphocytes: Circadian rhythm of DNA synthesis. J. Allergy Clin. Immunol., 56:191~205.

Cockerell, G.L., Hoover, E.A., Lobuglio, A.F. and Yohn, D.S. (1975) Phytomitogen and antigen-induced blast transformation of feline lymphocytes. Am. J. Vet. Res., 36:1489~1494.

Cooper, M.D., Peterson, R.D.A. and Good, R.A. (1973) Meeting report of the second international workshop on primary immunodeficiency diseases in man. Clin. Immunol. Immunopathol., 2:416~445.

Fernandez, L.A., Macsween, J.M. and Langley, G.R. (1976) Lymphocyte responses to phytohemagglutinin; Age-related effects. Immunology, 31:583~587.

Fitzgerald, G.M. (1972) A satisfactory quantitative test of lymphocyte response to phytohemagglutinin for the definition of normal control values and recognition of immunological defects. J. Clin. Pathol., 25:163~168.

Friend, S.O.P., Hancock, D.S., Schiefer, H.B. and Babiuk, L.A. (1983) Experimental T-2 toxicosis in sheep. Can. J. Comp. Med., 47:291~297.

Heiniger, H.J., Wolf, J.M., Chen, H.W. and Meier, H. (1973) A micromethod for lymphoblastic transformation of mouse lymphocytes from peripheral blood. Proc. Soc. Exp. Biol Med., 43:6~11.

Janossy, G. and Greaves, M.F. (1971) Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. Clin. Exptl. Immunol., 9:483~498.

- Johnson, D.W. and Muscoplat, C.C. (1973) Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.*, 34:1139~1141.
- Larsen, H.J. (1979) A whole blood method for measuring mitogen induced transformation of sheep lymphocytes. *Res. Vet. Sci.*, 27:334~338.
- Maheswaran, S.K. and Thies, E.S. (1975) Development of a micro-culture system for stimulation of chicken peripheral blood lymphocytes with Concanavalin A. *Am. J. Vet. Res.*, 36:1053~1055.
- Maheswaran, S.K., Thies, E.S. and Greimann, C. (1975) A micromethod for evaluation turkey lymphocyte responses to phytomitogens. *Am. J. Vet. Res.*, 36:1397~1400.
- Mansfield, J.M. and Wallace, J.H. (1973) Incorporation of H-thymidine into PHA-stimulated rabbit peripheral blood lymphocytes. Kinetics of the response. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143:408~413.
- Muscoplat, C.C., Alhaji, I. and Johnson, D.W. (1974a) Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: Comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. *Am. J. Vet. Res.*, 35:1053~1055.
- Muscoplat, C.C., Chen, A.W., Johnson, D.W. and Alhaji, I. (1974b) *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. *Am. J. Vet. Res.*, 35:1557~1561.
- Nowell, P.C. (1968) Phytohemagglutinin: An Indicator of mitosis in cultures of human leukocytes. *Cancer Res.*, 20:462~466.
- Oppenheim, J.J., Whang, J. and Frei, E. (1965) Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphatic leukemic cells. *Blood*, 26:121.
- Outteridge, P.M. and Dufty, L.H. (1973) The immune response of cattle during pregnancy and early lactation. *Res. Vet. Sci.*, 14:389~391.
- Parkhouse, R.M.E., Janossy, G. and Greaves, M. F. (1972) Selective stimulation of IgM synthesis in mouse B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Nature New Biol.*, 235:21~22.
- Robbins, J.H. (1972) Measurement of DNA synthesis in leukocyte microcultures. *J. Clin. Invest.*, 25:1075~1078.
- Rouse, B.T. and Babiuk, L.A. (1974) Host defence mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus: *In vitro* stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. *Infect. Immun.*, 10:681~687.
- Shortman, K., Byrd, W.J., Cerottini, J.C. and Brunner, K.T. (1973) Characterization and separation of mouse lymphocyte subpopulations responding to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. *Cell Immunol.*, 6:25~40.
- Soper, F.F., Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. (1978) *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 39:1039~1042.
- Toivanen, P. and Toivanen, A. (1973) Selective activation of chicken T lymphocytes by Concanavalin A. *J. Immunol.*, 111:1602~1603.
- Weber, W.T. (1973) Direct evidence for the response of B and T cells to pokeweed mitogen. *Cell Immunol.*, 9:482~487.
- Zeman, G.D., Cohen, G. and Budrys, M. (1972) The effect of plasma cortisol levels on the lymphocyte transformation test. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 49:10~15.