

Phytomitogen에 의한 토끼 임파구의 blast transformation

I. 유사분열에 미치는 배지, 유사분열촉진물질 및 배양시간의 효과

김 종 수 · 김 충 회
경상대학교 수의과대학
(1990. 10. 5 접수)

Phytomitogen induced blast transformation of rabbit

I. Effect of medium, phytomitogen and culture hours on the uptake of ³H-thymidine

Jong-shu Kim, Chung-hui Kim

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Oct 5, 1990)

Abstract: The present study has been carried out to investigate the optimal condition on lymphocyte blastogenesis of rabbit lymphocytes, whole blood culture and microculture system in conjunction with a semiautomatic multiple sample harvester(SAMSH) was used to study the *in vitro* optimal condition of rabbit lymphocytes.

Data were presented to show many variables that are involved in studying the phytohemagglutinin(PHA) and lipopolysaccharide(LPS) response of rabbit lymphocyte in a microculture system.

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

- (1) use of RPMI-1640 as culture medium.
- (2) use of 6 μ g of PHA, per culture.
- (3) 48-hours culture period.

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

Keywords: lymphocyte, ³H-thymidine, blast transformation.

서 론

Lymphocyte blastoformation 시험은 최근들어 사람과 동물에 있어서 세포면역반응의 지표로서 광범위하게 이용되어지고 있고¹, 또한 세포매개 면역반응과 시험관내에서 phytomitogen 유도 lymphocyte transformation간의 상호관계에 대해서 연구가 이루어지고

있다.² 이러한 phytomitogen 촉진 임파구 반응시험은 Nowell³이 phytohemagglutinin(PHA)이 시험관내에서 사람혈액의 blast transformation을 유발시킨다고 보고한 이래 이에 대한 연구가 많이 수행되어 졌는데, Faquet⁴, Yamamura⁵은 phytohemagglutinin(PHA), Concanavalin A(Con A), Pokeweed(PWM)와 같은 비특이성 mitogens을 정상임파구와 같이 배양하던

blastogenesis가 유발된다고 보고하였다. 또한 Janossy와 Greaves⁶은 PWM, Con A와 Lipopolysaccharide (LPS)도 임파구 반응에 대하여 PHA와 비슷한 효과가 있다고 보고하였다. 이러한 blastogenesis 측정은 임파구 DNA 합성에 ³H-thymidine(³H-TdR)이 얼마만큼 이용되어지는지를 측정하므로써 알 수 있다고 알려져 있는데, 이러한 방법을 이용하여 Byrd et al⁷, Tavanen⁸, Alm⁹은 닭에서 연구한 결과 PHA와 Con A는 흉선유래 임파구(T-cell) mitogen이라고 밝혔으며, Shortman et al¹⁰, Weber¹¹은 생쥐에서 PWM은 T와 B cell mitogen이라고 밝혔다. 또한 LPS와 endotoxin은 B cell mitogen이라고 한다.^{11,12} 이러한 임파구 감각 mitogen을 이용하여 사람을^{1,13} 비롯하여 생쥐⁶, 소¹⁴, 돼지^{15,16}, 말^{17,18}, 고양이¹⁹, 양^{20,21} 등 여러 종류의 동물로부터 순수한 임파구 분리를 위하여 많은 종류의 미세방법(micro-techniques)들이 발달되었으나, 시험관내에서 임파구의 반응은 스트레스, 호르몬변화, 나이 질병, 약물치료 및 이와 같은 실험을 하는데 있어서 기술상의 문제 및 면역반응에 영향을 미칠수 있는 비 임파양 세포들을 분리하는 데는 다소의 결함이 있고, 순수 임파구 분리에 많은 시간의 소요와 많은 양의 sample을 단번에 처리하는데 어려움이 있는 등 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다고 하였다.^{1,22-25} 이와 같이 시험관내에서 임파구 반응에 영향을 미치는 요소들을 개선 할려고 많은 연구가 수행되어져^{14,26,27}, microculture와 semiautomatic multiple sample harvest (SAMSA) 기술의 발달은 여러 동물의 임파구 반응을 연구하는데 커다란 도움이 되었다.²⁸ 이러한 실험을 수행하려면 많은 양의 혈액으로부터 임파구를 분리하여야 하고, 오랜 기간동안 배양하여야 하기 때문에 이런 실험을 지속적으로 특히 한번에 대량의 혈액을 얻기 힘든 실험동물과 같은 소동물에서 수행하는 데서는 불편함이 따르고 T cell 기능을 정확하고 신속하게 평가하는데 어려움이 있기 때문에 Park과 Good²⁹는 임파구 배양방법으로 whole blood culture method를 개발하였다. 따라서 저자는 mitogen에 대한 토끼 임파구 반응의 최적조건을 찾되 whole blood culture 방법을 이용하여 본 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

실험동물 : 1.5~2kg되는 2개월령 Jinjira계통의 토끼 35마리를 사용하였다.

임파구 분리 및 배양 : 임파구 분리 및 배양은 Park과 Good²⁹의 방법에 따랐다. 혈액 0.5ml를 polystyrene

tube(12×75mm, Costar)에 취한 후 5 units heparin을 더하고 잘 혼합하였다. 이 중 50 μ l를 polystyrene tube에 넣고 세포배양매지 RPMI-1640(Sigma), M-199(Difco), Dulbecco's Modified Eagle's medium(Sigma)를 각각 50 μ l 첨가한 후 대조군을 제외하고 plant mitogen인 phytohemagglutinin(PHA)(Sigma), lipopolysaccharide(Difco)를 각각 5, 10, 25, 50, 100 μ g씩 첨가하였다. fetal bovine serum, autologous serum을 각각 5, 10, 15, 20% 첨가하고, 배양 tube를 37°C, humidity 75% CO₂ 인큐베이터에서 24, 48, 72시간에 methyl-[³H]-thymidine (³H-TdR); New England Nuclear, Boston)을 0.5 μ ci씩 첨가하여서 배양을 완료하였다. 배양완료후 증류수를 첨가하여 적현구를 용해시켰다. 임파구를 semiautomatic multiple sample harvester로 수거하고 냉생리적 식염수와 5% trichloroacetic acid 4ml로 세척하였다. 세척후 여과지를 standard vial(15×45mm, Kimbel)에 넣어 건조시킨후 여과지를 완전용해 시키고 sintillation counting solution을 첨가, β -counting(LKB)하였다.

결 과

Medium 효과 : RPMI-1640, M-199, DMEM 배지에서 임파구 DNA 합성을 측정할 결과 RPMI-1640 배지에서 임파구 DNA 합성이 가장 뛰어났다(Fig 1).

Mitogen 농도 효과 : PHM과 LPS 농도를 달리하여 임파구의 DNA 합성능력을 측정할 결과 최적 농도는 각각 10 μ g이었다(Table 1, 2).

배양시간의 영향 : 임파구를 24, 48, 72시간 동안 배양한 결과 48시간 배양에서 임파구 DNA 합성이 가장 뛰어났다(Table 3, 4).

고 찰

비록 세포성면역(cell-mediated immunity)을 측정하기 위하여 여러가지 시험관 내에서의 방법이 이용되고 있지만, 세포성 면역 측정을 위해서는 시험관 내에서 lymphocyte transformation 측정방법이 가장 간단하고, 빠르고 또한 가장 널리 쓰이고 있다.¹⁵ 또한 시험관 내에서 phytomitogen에 대한 B와 T cell 임파구의 증식반응은 실험적 또는 임상적으로 면역결핍상태에 있는 사람과 여러 동물에서 이들의 임파구 기능 역할을 체크해 보는데도 널리 쓰이고 있다.³⁰ 이와 같이 시험관 내에서 PHA, PWM, Con A, LPS과 같은 plant mitogen으로 lymphocyte transformation을 측정할 수 있다는 보고가 있는 후, 시험관 내에서 mitogen에 의한 임파구 반응의 형태학적 특징이나 생화학적 특징이,

생체내에서 항원에 의한 임파구 반응과 아주 유사하다는 것이 밝혀졌다.⁶ 이런 유사한 점을 이용하여 시험관 내에서의 mitogen에 의한 임파구 반응 시험은 임상적으로 여러가지 세균 혹은 바이러스 질병에 이환되어 있는 사람 및 동물의 면역상태를 관찰하는데 이용되어 지 왔다.³⁰⁻³³ 본 실험에서 mitogen에 의한 토끼 임파구 반응의 최적 조건을 규명한 결과 배지는 RPMI-1640, mitogen 농도는 PHA와 LPS에서 각각 10 μ g, 임파구 배양시간은 mitogen 종류에 관계없이 48시간으로 나타났다. 본 실험에서 배지에 따른 임파구의 반응은 다른 배지보다 RPMI-1640에서 가장 우수하였다. 이와 같은 성적은 소^{14,21,23,27}, 면양^{20,34}, 칠면조³⁰, 닭^{8,9,31}, 생쥐^{10,35}, 토끼³⁶에서도 보고되어 지 있다. 이러한 결과로 보아서 mitogen에 의한 임파구 반응 시험용 배지는 RPMI-1640이 가장 좋은 배지라 생각되어진다. 본 실험에서 임파구 반응에 미치는 최적인 mitogen 농도는 PHA, LPS 각 10 μ g으로 나타났다. 이와 같은 성적은 토끼³⁶, 면양^{20,34}에서 나타나서 본 성적과 일치 하였으나, 사람²⁹, 생쥐^{10,35}에서는 500 μ g, 고양이¹⁹에서는 100 μ g, 칠면조³⁰와 닭^{8,9,31}에서는 0.4 μ g에서 각각 ³H-TdR의 incorporation이 최고로 나타난다고 보고되어 있다. 또한 소^{14,23,27,31}에서는 연구자에 따라 각각 10, 6, 5 μ g에서 ³H-TdR의 incorporation이 최고로 나타났다고 한다. 이와 같이 각 연구자들간의 보고가 전부 상이한 것은 동물의 종류, 배양방법, 사용된 mitogen의 종류 및 농도 등 제반요인이 개재되어 있는 것이라고 생각되어 지지만 정확한 원인은 알 수 없다. 그러나 이러한 현상은 임파구 세포막에 결합되어 있는 mitogen에 대한 수용체들의 감수성이 동물의 종류에 따라 다르다는 이론에 근거를 두어야 하겠다.³² 본 실험에서 배양시간에 따른 ³H-TdR incorporation의 최고치는 배양 48시간에서 나타났다. 이와 같은 성적은 소²¹, 토끼³⁶, 칠면조³⁰, 닭³¹에서 보고되어 있다. 사람²⁹, 면양^{20,34}, 고양이¹⁹, 생쥐^{10,35}, 소^{14,27}에서는 20시간에서부터 36, 66, 72, 96시간 등으로 다양하게 보고되어 있다. 이와 같은 상이한 결과도 동물의 연령, 종류, 배양조건 등 다양한 요인이 기인한 결과라고 풀이된다. 토끼 임파구의 ³H-TdR incorporation을 측정하여 나타난 최적조건 성적을 요약하면

- (1) RPMI-1640 MEDIUM
- (2) 10 μ g/50ml PHA, LPS
- (3) 48-hour culture period이다.

결 론

Mitogen에 의한 lymphocyte blastogenesis을 일으

키는 최적 조건을 찾기 위해서 whole blood culture 방법, 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 10 μ g이었다.
3. ³H-TdR incorporation이 최고로 나타난 시간은 배양 48시간에서 나타났다.

참 고 문 헌

1. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet Immunol Immunopathol* 1982;3: 203~277.
2. Fitzgerald MG. A satisfactory quantitative test of lymphocyte response to phytohemagglutinin for the definition of normal control values and recognition of immunological defects. *J Clin Path* 1972;25:163~168.
3. Nowell PC. Phytohemagglutinin: An indicator of mitosis in cultures of human leukocytes. *Cancer Res* 1968;20:462~466.
4. Faquet GB. Lymphocyte responsiveness to phytohemagglutinin(PHA): Quantitative aspects and reproducibility. *J Reticuloendothel Sci* 1974;16: 114~121.
5. Yamamura M. Standardization of lymphocyte transformation to phytohemagglutinin. *Clin Exp Immunol* 1973;14:457~467.
6. Janossy G, Greaves MF. Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. *Clin Exptl Immunol* 1971;9:483~498.
7. Byrd WJ, Boehmer H, Rose BT. The role of the thymus in maturational development of phytohemagglutinin and pokeweed mitogen responsiveness. *Cell Immunol* 1973;6:12~24.
8. Toivanen P, Toivanen A. Selective activation of chicken T lymphocytes by concanavalin A. *J Immunol* 1973;111:1602~1603.
9. Alm GV. *In vitro* studies of chicken lymphoid cell. I. Phytohemagglutinin induced DNA, RNA and protein synthesis in spleen cells from control-irradiated and bursectomized irradiated chickens. *Acta pathol Microbiol Scand* 1970;78:

10. Shortman K, Byrd WJ, Cejottini JC et al. Characterization and separation of mouse lymphocyte subpopulations responding to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. *Cell Immunol* 1973;6:25~40.
11. Weber WT. Direct evidence for the response of B and T cells to pokeweed mitogen. *Cell Immunol* 1973;9:482~487.
12. Weber WT. The *in vitro* response of chicken B cell population to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1973;11:1277~1280.
13. Junge U, Hoekstra I, Wolf L et al. Microtechnique for quantitative evaluation of *in vitro* lymphocyte transformation. *Clin Exp Immunol* 1970;7:431~437.
14. Muscoplat CC, Chen AW, Johnson DW et al. *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. *Am J Vet Res* 1974;35:1557~1561.
15. Hussain A, Tripathy RN, Mohanty SB, et al. Blastogenic response of swine lymphocytes in whole blood, purified blood, spleen cell and lymph node cellcultures with concanavalin A and phytohemagglutinin. *Am J Vet Res* 1981; 42:873~875.
16. Vaden SL, Riviere JE. Pharmacokinetics, inhibition of lymphoblast transformation and toxicity of cyclosporine in clinically normal pigs. *Am J Vet Res* 1990;51:399~403.
17. Lazary S, Weck D, Gerber H, et al. Characteristics of the *in vitro* stimulation of horse leucocytes by phytohemagglutinin and antigen. *Z Immun Forsch* 1973;145:364~375.
18. Sanada Y, Noda H, Nagahata H. Changes in lymphocyte blastogenic response of mares during the perinatal period. *Jpn J Vet Sci* 1990;52: 455~460.
19. Cockerill GL, Hoover EA, Lobuglio AF, et al. Phytomitogen and antigen induced blast transformation of feline lymphocytes. *Am J Vet Res* 1975;36:1489~1494.
20. Larsen HJ. A whole blood method for measuring mitogen-induced transformation of sheep lymphocytes. *Res Vet Sci* 1979;27:334~338.
21. Soper FF, Muscoplat CC, Johnson DW. *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle. *Am J Vet Res* 1978;39:1039~1042.
22. Fernandez LA, Macsween JM, Langley GR. Lymphocyte response to phytohemagglutinin; Age-related effects. *Immunology* 1976;31:583~587.
23. Johnson DW, Muscoplat CC. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res* 1973;34:1139~1141.
24. Outteridge PM, Dufty LH. The immuno response of cattle during pregnancy and early lactation. *Res Vet Sci* 1973;14:389~391.
25. Zeman, GD, Cohen G, Budrys M. The effect of plasma cortisol levels on the lymphocyte transformation test. *J Allergy Clin Immunol* 1972; 49:10~15.
26. Carter JB, Barr GD, Levin AS. 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* 1975;56:191~205.
27. Muscoplat CC, Alhaji I, Johnson DW. Characteristics of lymphocytes responses to phytomitogens: comparison of response of lymphocytes from normal and lymphocytic cows. *Am J Vet Res* 1974;35:1053~1055.
28. Robbins JH. Measurement of DNA synthesis in leukocyte microcultures. *J Clin Invest* 1972;25: 1075~1078.
29. Park BH, Good RH. A new micromethod for evaluating lymphocyte response to phytohemagglutinin: Quantitative analysis of the function of thymus-dependent cells. *Proc Nat Acad Sci* 1972;69:371~373.
30. Maheswaran SK, Thies ES, Greimann C. A micromethod for evaluating turkey lymphocyte responses to phytomitogens. *Am J Vet Res* 1975; 36:1397~1400.
31. Maheswaran SK, Thies ES. Development of a microculture system for stimulation of chicken peripheral blood lymphocytes with concanavalin

- A. *Am J Vet Res* 1975;36:1053~1055.
32. Tajima M, Fujinaga, Koike T, et al. Assay for equine peripheral blood lymphocytes blastogenic response using ethidium bromide. *Jpn J Vet Sci* 1987;49:567~570.
33. Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. Meeting report of the second international workshop on primary immunodeficiency disease in man. *Clin Immunol Immunopathol* 1973;2:416~445.
34. Burrells C, Wells PW. *In vitro* stimulation of ovine lymphocytes by various mitogens. *Res Vet Sci* 1977;23:844~866.
35. Heiniger HJ, Wolf JM, Chen HW et al. A micromethod for lymphoblastic transformation of mouse lymphocytes from peripheral blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;43:6~11.
36. Mansfield JM, Wallace JH. Incorporation of ³H-thymidine into PHA-Stimulated rabbit peripheral blood lymphocytes. Kinetics of the response. *Pro Soc Exp Biol Med* 1973;143:408~413.