

# Mitogen 투여에 대한 잉어 순환혈액 림프구의 반응

조 미 영 · 박 수 일\*

국립수산진흥원 남해어촌지도소  
\*부산수산대학교 수산과학대학 어병학과

잉어의 순환혈액 림프구의 기능적 분화 유무를 조사하기 위해 포유류를 기준으로한 T 림프구 또는 B 림프구 mitogen인 Con A, PHA 및 LPS와 비특이적 면역 증강제로 *Mycobacterium bovis*의 약독 균주인 BCG를 각각 잉어, *Cyprinus carpio*의 복강 내로 주사한 후 시간 경과별 순환혈액 림프구의 수적인 변화와 DNA량의 변화를 조사하고 로젯형성 반응을 실시하였다. mitogen 투여 결과 림프구수와 DNA량 모두 대조구에 비해 증가하였다. mitogen 투여 후 1주와 2주째 최고치에 도달하였으며 BCG와 Con A 투여구가 PHA나 LPS 투여구에 비해 자극 효과가 장기간 지속되었다. 또, 동일한 mitogen의 반복 투여에 비해 T cell과 B cell mitogen을 교차 투여한 실험구의 림프구 자극 효과가 높게 나타났으며, 로젯형성 반응 결과 BCG와 PHA 반복 투여구의 로젯형성 세포수가 가장 높게 나타난 것으로 보아 잉어의 순환혈액내에 기능적으로 분화된 서로 다른 림프구가 존재한다고 사료된다.

Key words : Lymphocytes, Mitogens, BCG, Blastogenic response, Rosette formation

식량자원으로서 양식어류가 차지하는 비중이 증가되면서 어류질병에 능동적으로 대처하기 위하여 효과적인 치료약제, 백신 및 면역증강제 등의 개발과 병행하여 면역기능에 관한 개체, 계통발생학적 연구 또한 지속적으로 이루어져 왔다.

특히, 어류의 림프구에 대한 연구가 진행되면서 항원을 이용한 면역 반응의 결과로 면역글로불린과 항체(Marchalonis, 1969; Taylor, 1971; Ellis, 1976; Cuchen and Clem, 1977)의 존재가 확인됨에 따라 B 림프구에 의한 체액성 면역을 중점으로 백신 개발이 추진되어 왔다. 그러나, 한편으로는 백신 투여 후 어체내 항체가 변화와 병원균에 대한 방어력의 증강 정도가 서로 무관한 경우도 자주 관찰되므로 어체의 면역 정도를 판정하는데에는 B 림프구에 의한 체액성 면역 이외의 다른 요인을 지표로 삼

아야할 필요성이 강하게 제시되고 있는 실정이다. 즉, T 림프구를 중심으로한 세포성 면역기구에 대한 연구의 필요성인데 이에 대해서는 이미 hapten-carrier effect(Stolen and Makela, 1975; Yocum, Cuchens and Clem, 1975), 동종이식면역(Hildemann, 1970; Hogarth, 1973) 등 여러 연구 결과에도 불구하고 어류의 T 림프구의 존재에 대해서는 서로 상충되는 의견들이 제시되고 있다(Turpen *et al.*, 1973, 1975; Mckinney *et al.*, 1976; Blaxhall and Hood, 1985).

현재까지 어류의 T 림프구에 대한 연구를 위해 포유류에서 이용되는 여러 가지 면역학적 방법들을 적용해오고 있지만 그 중에서도 mitogen에 대한 림프구의 아구화 반응(芽球化, blastogenesis)과 로젯형성 반응이 가장 확실한 방법으로 알려져 있다.

차널메기(Sizemore *et al.*, 1984), 잉어(Rosenberg-Wiser and Avtalion, 1982), 무지개송어(Etlinger *et al.*, 1976; Warr and Simon, 1983; Thuvander, 1987; Tillitt *et al.*, 1988), Atlantic salmon(Smith and Braun-Nesje, 1982), chinook salmon 및 coho salmon(Yui and Kaattari, 1987)의 림프구에 대한 mitogen 투여 실험 결과 이들의 림프구가 포유동물의 T cell 과 B cell mitogen 에 대해 반응을 나타내는 것으로 보고되었다.

로켓형성 시험법은 T 림프구가 면양 적혈구에 대하여 특이적인 리셉터를 가지고 있는 점을 이용하여 T 림프구를 구분하는데 널리 이용되고 있다. 이 방법을 어류 림프구에 처음 적용시킨 연구는 Chiller *et al.* (1969)이 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 비장과 신장에 분포하는 항체산생세포를 대상으로 한 것이 있으며, 이후 Yoshida 와 Kitao (1990)가 잉어의 순환 혈액내 림프구의 로켓형성에 대해 보고하였다.

본 연구에서는 포유류를 기준으로 한 이들 두 가지 분류 형질을 적용하여 잉어의 순환 혈액내에 포유동물의 T 세포와 B 세포에 상응하는 림프구가 존재하는지를 조사함으로써 어류의 특이적 면역 반응의 특성을 밝혀 백신 개발에 필요한 기초 자료를 제공하고자 하였다. 이를 위하여 포유류에서 T cell 또는 B cell mitogen 으로 알려진 Con A, PHA 및 LPS 와 T 림프구에 대한 면역 자극제로 알려진 BCG를 어체에 투여한 후 이들 mitogen에 대한 림프구의 반응 특성을 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

경상남도 소재 양식장에서 분양 받은 평균 어체중 100 g 정도의 잉어(*Cyprinus carpio*)를 반순환 여과 장치를 한 수조에서 한 달간 순치시킨 후 40 ℓ 사육 수조로 옮겨 실험에 사용하였다.

실험 기간 동안 사육 관리 수온은 20~24℃ 로 유지하였으며 시판용 배합 사료를 1일 2회 공급하였다.

### 2. 림프구 자극

포유동물에서 T 림프구와 B 림프구를 자극하는 것으로 알려진 mitogen에 대한 잉어 림프구의 반응을 조사하기 위해 Phytohemagglutinin-P(PHA, Sigma사 제품), Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* Serotype 0111:B4 Sigma사 제품), Concanavalin A(Con A, Sigma사 제품) 및 BCG(*Mycobacterium bovis*의 약독 균주, bacille Calmette-Gueria)를 50 µg/fish 농도로 복강 주사하였다.

### 3. 시간 경과별 순환 혈액내 림프구수의 변화

각 mitogen과 BCG 자극 후 림프구수의 변화를 조사하기 위해 주사 후 6, 12, 24, 72 시간과 1, 2, 3, 4 주째 실험어를 아미노산식향산 에칠(25~30 ppm)로 마취시킨 후 헤파린 처리된 주사기로 미부 정맥에서 채혈하여 도말 표본을 제작하였다. 이것을 May-Giemsa 염색법으로 염색하여 적혈구 5,000 세포 당 림프구수를 계수하였다.

### 4. 림프구 분리

림프구는 'Ficoll' density gradient centrifugation을 이용하여 분리하였다. 혈액 1 ml를 분리용액인 10% - 3% Ficoll-metrizoate가 들어있는 시험관의 상층부에 조심스럽게 층층 시킨 후 270×g, 20분간 원심 분리하였다. 각 층별 세포를 따로 모아 HBSS (Hank's balanced salt solution)로 120×g, 10분간 원심분리하여 3회 세척한 후 MEM(L-glutamine, 100 IU penicillin/ml, 100 IU streptomycin/ml, 10% foetal calf serum)에 현탁하였다. 이 중 림프구 현탁액은 Trypan blue exclusion법으로 생사판정 후 microculture well에서 20℃, 2시간 배양하여 부착 세포를 제거한 후 모든 실험에 사용하였다. 분리된

림프구층의 적혈구 혼합률은 <1.0% 였으며, >95%의 생존률을 나타냈다. 각 세포 현탁액을 슬라이드글라스에 도말한 후 May-Giemsa 염색법으로 염색하여 광학현미경으로 검경하여 판정하였다.

### 5. DNA 함량 측정

Mitogen 자극에 대한 림프구의 변화를 양적으로 조사하기 위하여 Labarca와 Paigen (1980)의 방법에 따라 전혈과 림프구의 DNA 함량을 측정하였다. 또, 림프구를 분리한 후 상층액을 조심스럽게 제거하고 남아있는 적혈구 층의 DNA 함량도 비교 측정하였다. 각 실험구의 3 개체로부터 얻어진 각각의 시료를 ACD 용액(citric acid 0.48 g; trisodium citrate 1.32 g; glucose 1.47 g; distilled water 100ml)으로 10배 희석시킨 후 다시 완충용액(phosphate-saline buffer; 0.05 M NaPO<sub>4</sub>, 2.0 M NaCl, pH 7.4 containing 2×10<sup>-3</sup> M EDTA)과 혼합하여 2 분간 초음파로 분쇄한 후 Hoechst 33258(1 µg/ml)로 10배 희석하였다. 이 희석액을 형광 분광 광도계(과장: 356 nm와 492nm)로 흡광도를 측정하여 DNA의 함량을 구하였다. 이때 표준 DNA는 연어 정자 DNA type 3 (Sigma사 제품)를 사용하였다.

### 6. 로젯 형성

림프구 현탁액(1.0×10<sup>7</sup> cells/ml)을 동일 부피의 SRBCs(1.0×10<sup>8</sup> cells/ml)와 섞은 후 200×g, 5 분간 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 15°C, 3시간 배양한 다음 RFCs(rossette-forming cells)을 함유하고 있는 시험관을 부드럽게 흔든 후 1% brilliant cresyl blue로 염색하여 검경하였다. 결과는 Ownby와 McCullough(1983)에 따라 최소 림프구 200 cells 중 4개 이상의 SRBC 가 부착된 림프구 수를 계수하여 순환 혈액 림프구 1.0×10<sup>7</sup> cells 당 로젯형성 세포수로 표현하였다.

### 7. 공격 실험

각 mitogen에 의한 림프구의 증식, 분화와 방어력과의 관계를 조사하기 위해 *E. tarda* FSW-91 0410 균주로 공격 실험을 하였다. -40°C 에 동결 보존시킨 균주를 TSA 배지에서 26°C, 24 시간 배양한 다음 LD<sub>50</sub>(96hrs)을 측정하였다. mitogen 주사 후 4주째에 어체내 투여 농도가 LD<sub>50</sub>의 두 배의 농도(2.0×10<sup>7</sup> cells/ml)가 되도록 생리 식염수에 현탁하여 각 실험구별로 16 개체에 어체당 0.1 ml씩 복강 주사하였다.

공격 실험의 결과는 상대 생존율 (RPS)로 나타내었다.

$$RPS = \left[ 1 - \frac{\% \text{Mortality in mitogen-treated}}{\% \text{Mortality in control}} \right] \times 100$$

### 8. Mitogen의 반복 투여

각 mitogen을 반복 투여하여 boost 효과를 측정하고 또, T cell과 B cell mitogen을 교차 반복 투여하여 림프구 반응의 변화를 조사하였다. 실험 어는 어체중 180~200 g의 잉어로서 사육 수온은 18±1~2°C로 유지하였으며 그 외의 사육 관리 조건은 앞 실험과 동일하였다. 1차 투여시, mitogen 1회 투여 실험에서의 동일한 농도와 방법으로 각 mitogen을 투여하였으며 7일 후 동일한 농도로 반복 투여하였다. 이와 함께 T cell과 B cell mitogen에 대한 상승효과를 확인하기 위하여 Con A와 PHA 투여구에는 LPS를, LPS 투여구에는 PHA를 주사하였다.

반복 투여 직전과 반복 투여 후 6, 12, 24시간째와 1, 2, 3, 4, 5, 6주째 채혈하여 각 실험구의 도말 표본을 제작하여 림프구수의 변화를 조사하고, 로젯형성 반응을 실시하여 시간 경과별 로젯형성 세포수의 변화를 조사하였다.

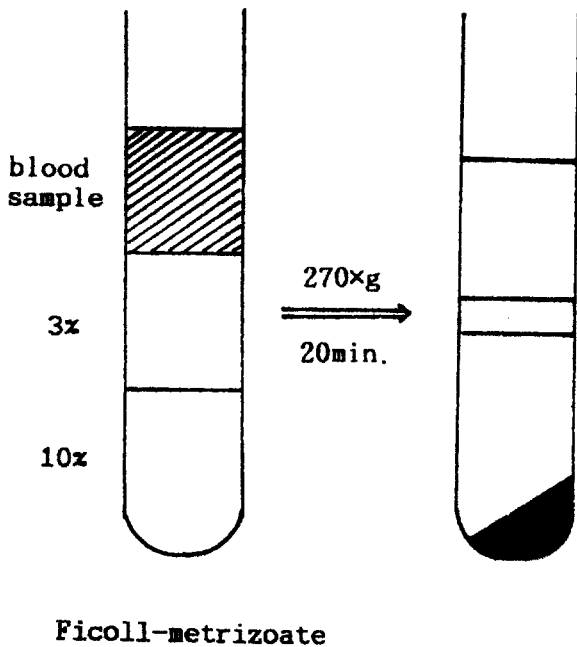


Fig. 1. Separation of blood cells by the discontinuous density gradient Ficoll-Metrizoate solution and light microscopies of the separated cells stained with May-Giemsa. I, lymphocytes; II, thrombocytes and neutrophils; III, red blood cells.

9. 통계학적 분석

대조구와 각 실험구 사이의 림프구 반응의 통계학적 유의성은 student's t test로 비교하여 p값이 0.05미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 림프구 분리

잉어의 혈액을 불연속 Ficoll-Metrizoate 용액에서 원심분리한 결과 혈액 세포가 3층으로 분리되었다

(Fig. 1). 이들 각 층의 세포를 May-Giemsa 염색법으로 염색하여 검경한 결과 각 층별로 림프구, 전구와 호중구, 적혈구가 주를 이루고 있었다.

2. 각 실험구의 시간 경과별 순환 혈액내 림프구 수의 변화

각 mitogen과 BCG 투여 후 시간 경과별 순환 혈액내 림프구 수의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 면역 자극제 투여구의 림프구 수가 대조구에 비해 유의성있게 증가한 것으로 나타났다. BCG 투여구의 경우 72시간째  $99.6 \pm 17.1$  cells로 대조구에 비해 증가하였으며 1주째 약  $108 \pm 3.4$  cells로 최고치를 나타냈다. Con A와 PHA 투여구의 경우도 72시간째 각각  $106.0 \pm 10.5$  cells과  $120 \pm 6.3$  cells로 증가하여 3주째까지 유의성 있게 증가하였다. LPS 투여구는 1주째에  $133 \pm 3.9$  cells로 최고치를 나타냈으며 이후에는  $90 \pm 14.9$  cells 정도를 유지하였다.

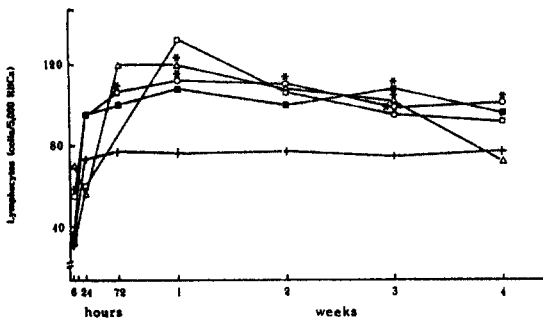


Fig. 2. Changes of the number of lymphocytes in blood of carp injected intraperitoneally with physiological saline(control), BCG, PHA, Con A and LPS. \*, significant difference between control and experimental groups;  $P < 0.05$ . Control; +, BCG; ■, PHA; △, Con A; ○, LPS; □.

3. 각 실험구의 시간 경과별 전혈의 DNA량 변화

각 mitogen과 BCG 자극에 의한 면역 세포의 변화를 시간 경과별 DNA량의 변화로 알아보았다.

Fig. 3 는 각 실험구별 전혈의 DNA량의 변화를 나타낸 것이다.

대조구가 실험 기간 전반에 걸쳐 별다른 증감을 보이지 않은 것에 비해 BCG와 Con A 투여구의 경우 72시간째에 각각 2,445와 2,147로 최고치를 나타내어 1주째까지 비슷한 수준이 유지되었으며 LPS 투여구는 1주째부터 대조구에 비해 약간 증가하였으나 별다른 차이는 없었다.

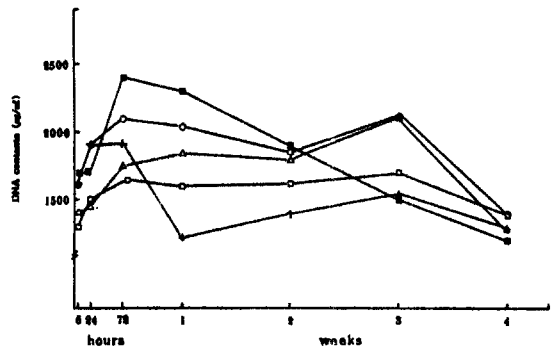


Fig. 3. Changes of the DNA content in whole blood cells after stimulation with saline, BCG, PHA, Con A and LPS. Control; +, BCG; ■, PHA; △, Con A; ○, LPS; □.

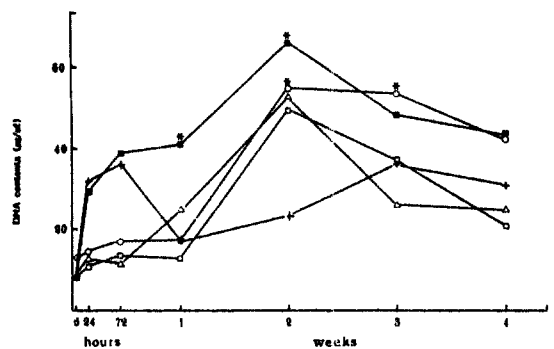


Fig. 4. Changes of the DNA content in isolated lymphocytes after stimulation with saline, BCG, PHA, Con A and LPS. \*, significant difference between control and experimental groups;  $P < 0.05$ . Control; +, BCG; ■, PHA; △, Con A; ○, LPS; □.

4. 각 실험구의 시간 경과별 림프구의 DNA량 변화

각 실험구에서 전혈의 DNA량의 변화가 실제로 림프구의 증가에 의한 것인지를 알아보기 위해 Ficoll-Metrizoate를 사용해 분리한 림프구의 DNA량을 측정하여 시간 경과별 변화를 Fig. 4에 나타내었다.

mitogen 투여구의 경우 24시간째까지 대조구보다 낮은 수치를 유지하였으나 1주째부터 급격히 증가하여 2주째에 대조구가 23.73으로 낮은 반면 mitogen과 BCG 투여구 모두 최고 수치를 나타냈다가 각각 감소하였다. 실험 전반에 걸쳐 BCG와 Con A 투여구만이 유의성있는 증가를 나타내었다.

5. 각 실험구의 시간 경과별 적혈구 층(pelleted RBCs)의 DNA량 변화

각 실험구의 림프구를 분리한 후 남아있는 적혈구 층의 DNA량을 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. 모든 실험구에서 실험 기간 동안 300~600 정도로 대조구와 별다른 차이가 없었다. mitogen과 BCG 투여구의 경우 1주째까지 대조구보다 낮은 수치를 나타냈으며 2주째부터 약간씩 증가하여 실험 종료시 PHA, Con A 및 LPS 투여구의 경우 약 500 정도였다.

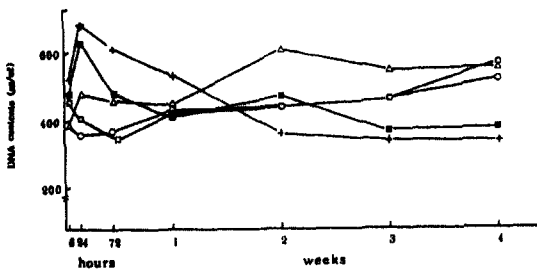


Fig. 5. Changes in the DNA content of pelleted RBCs after stimulation with saline, BCG, PHA, Con A and LPS. \*, significant difference between control and experimental groups; P<0.05. Control; +, BCG; ■, PHA; △, Con A; ○, LPS; □.

6. 로젯

RFCs를 May-Giemsa 염색법으로 염색하여 형태학적으로 관찰한 결과 이들 세포가 림프구임을 알 수 있었다. RFCs는 둥글고 세포질이 거의 없었으며 세포질은 짙은 청색, 또는 밝은 청색으로 염색되었다. 면양 적혈구가 부착된 림프구의 크기는 4~5 μm, 6~8 μm와 8 μm 이상으로 다양하였으며(Fig. 6), 로젯을 형성하는 능력에서도 차이가 있는 것으로 나타났다.

7. 공격 실험

Mitogen과 BCG 주사 후 4주째 2.0×10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 공격 실험한 결과를 누적폐사율과 상대생존율로 나타내었다(Table 1). BCG 투여구가 76%의 생존율로 가장 높았으며 mitogen 투여구의 경우 PHA, Con A와 LPS 실험구가 각각 93%, 68%와 62%의 높은 폐사율로 모두 매우 낮은 생존율을 나타내었다.

Table 1. Cumulative mortality and RPS after 4 days of intraperitoneal challenge with 2.0×10<sup>7</sup> cells/ml of *E. tarda* FSW 910410 following stimulation with mitogens and BCG for 4 weeks.

	BCG	PHA	Con A	LPS	Control
Cumulative mortality(%)	18	93	68	62	72
RPS	76	-	10	18	0

8. Mitogen의 반복 투여 효과

각 mitogen의 반복 투여에 의한 boost 효과와 교차 투여에 대한 림프구의 반응 결과를 Fig. 7 (A & B)에 나타내었다. 1차 투여후 1주째에 각각 동일한 mitogen과 BCG를 반복 투여한 결과, 2차 투여 후 12시간째부터는 유의성있게 증가하기 시작하여 1주째 최고치를 나타냈다(Fig. 10, A). 대조구가

Fig. 6. Spontaneous RFCs with SRBCs in brilliant cresyl blue staining. The RFCs(→) appeared with different sizes in a, b and c.( $\times 1,000$ ). a;  $4-5 \mu\text{m}$  b;  $6-8 \mu\text{m}$  c;  $9 \mu\text{m} \leq$  d; The lymphocytes of RFCs with different sizes.

실험 종료때까지  $39.2 \pm 2.2 \sim 43.1 \pm 11.7$  cells 범위를 유지한 반면 BCG 투여구의 경우 12시간째 최고치 ( $83.0 \pm 9.6$  cells)로 증가하였으며 2주째까지 유의성있는 증가를 나타내었다. mitogen 투여구의 경우 모두 2차 투여 후 1주 이내에 최고치에 도달하여 6주째까지 1차 투여 후 1주째와 비슷하거나 높은 수치를 유지하고 있었다. mitogen의 1차 투여 후 1주째에 T cell과 B cell mitogen을 교차 투여한 경우 2차 투여 후 1주째에 모두 최고치를 나타냈으며 동일한 mitogen을 반복 투여한 실험구에 비해 림프구 자극 효과가 높게 나타났다(Fig. 10, B). PHA 투여 후 LPS를 투여한 실험구 (P→L)에서 2차

투여 후 24시간째부터 실험 종료 때까지 대조구에 비해 유의성있는 증가를 나타내었으며 1~2주에 걸쳐 최고 수치 ( $99.3 \pm 10.5 \sim 96.3 \pm 20.2$  cells)를 나타낸 반면, LPS 투여 후 PHA(L→P)를 투여한 경우 1주째의 최고치 ( $91.0 \pm 9.5$  cells)는 P→L 실험구에 비해 낮으나 2차 투여 후 12시간 후부터 유의성있는 증가가 관찰되었으며 24시간째부터는 1차 투여 후 1주째의 림프구 수의 2배를 나타냈으며 2주째까지 유지되는 경향을 나타내고 있다. Con A 투여 후 LPS를 투여한 실험구에서는 P→L 투여구와 L→P 투여구에 비해 림프구의 증가가 늦게 나타났으며 림프구의 자극 효과도 앞의 두 실험구에

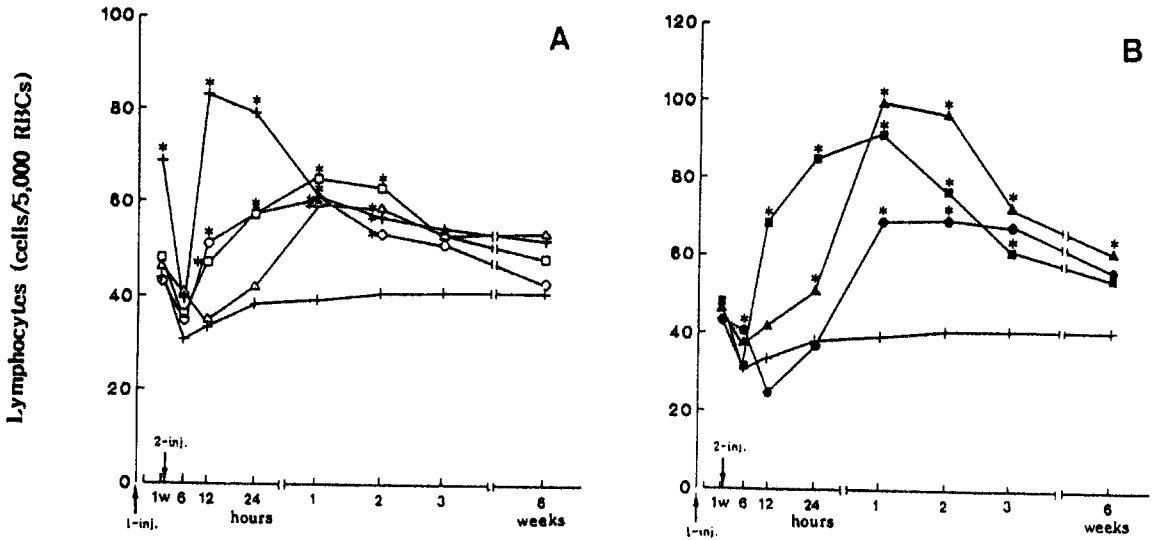


Fig. 7. Effects of consecutive stimulation to carp with different mitogens. Each group was re-injected with the same(A) or different(B) mitogens 1 week after the first injection with mitogens. \*, significant difference between control and experimental groups;  $P < 0.05$ . Control; +, BCG→BCG; +, PHA→PHA;  $\Delta$ , Con A→Con A;  $\circ$ , LPS→LPS;  $\square$ , PHA→LPS;  $\blacktriangle$ , Con A→LPS;  $\bullet$ , LPS→PHA;  $\blacksquare$ .

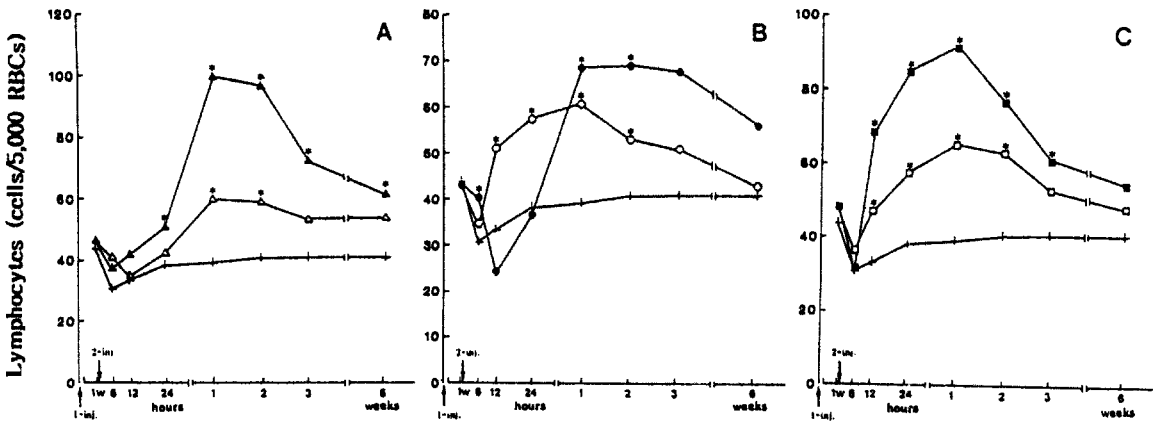


Fig. 8. Effects of consecutive stimulation to carp with different mitogens. PHA(A), Con A(B) and LPS(C)-injected carps were re-injected with either LPS or PHA 1 week after the first injection with mitogens. \*, significant difference between control and experimental groups;  $P < 0.05$ . Control; +, PHA→PHA;  $\Delta$ , PHA→LPS;  $\blacktriangle$ , Con A→Con A;  $\circ$ , Con A→LPS;  $\bullet$ , LPS→LPS;  $\square$ , LPS→PHA;  $\blacksquare$ .

비해 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 8, A, B and C).

동일 mitogen을 반복 투여한 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 주째까지 로켓형성 세포수의 변화를 조사한 결과

(Fig. 9) Con A 투여구에 비해 BCG와 PHA를 반복 투여한 실험구에서 2차 투여 후 로켓형성 세포수가 높게 나타났으며 4주째까지 유의성있는 수치가 유지되었다. LPS 투여구의 경우 실험 전반에 걸쳐



7~8 cells 정도로 낮은 수치를 나타냈다.

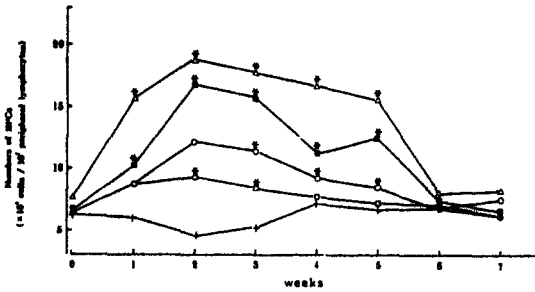


Fig. 9. Changes of the number of rosette forming cells in peripheral lymphocytes of carps. The carps were reinjected with the same mitogen 1 week after the first injection with mitogens. \*, significant difference between control and experimental groups;  $P < 0.05$ . Control; +, BCG → BCG; ●, PHA → PHA; △, Con A → Con A; ○, LPS → LPS; □.

### 고찰

어류 림프구의 기능적 분화 유무에 대한 연구는 세포 면역학적인 측면에서 뿐만 아니라 실제 양식 현장에서 질병 발생시 능동적인 치료와 해마다 반복적으로 발생해 많은 피해를 유발시키는 질병에 대해 면역 유발등의 근본적인 대책을 마련하기 위한 기반으로서 그 역할이 매우 중요하다.

현재까지 어류 림프구에 대한 연구는 포유동물들 기준으로서 면역학적 방법들이 광범위하게 적용되어 왔으나 고등 척추동물의 림프구에서 나타난 명확한 구분과는 달리 그 반응이 다양하게 나타나고 있다. Lopez *et al.* (1974)은 불연속 농도구배를 둔 Percoll을 사용하여 향어의 림프구를 밀도차에 따라 두개의 군으로 분리하였으며 그중 density 1.056 g/ml층에서 분리된 세포군은 PHA에 대한 반응성과 형태학적인 측면에서 T 림프구와 유사하다고 보고하였다. 그러나 밀도구배에서 나타난 이러한 결과는

Gutierrez *et al.* (1979)이 보고한 포유류의 면역계와는 상반되는 것이며, Blaxhall과 Hood (1985)의 보고에서도 1.07 g/ml와 1.056 g/ml층의 세포군 모두 T 세포에 특이적으로 반응하는 acid esterase와 acid phosphatase에 대해 동일한 enzyme activity를 나타냄으로써 동일한 세포군에서 분화 단계의 차이에 의해 분리된 것으로 추정되기도 한다. 또한, McKinney *et al.* (1976)도 어류에는 한 종류의 림프구만이 존재하며 이들이 다양한 면역학적 기능을 수행하는 것으로 보았다.

mitogen 자극에 대한 하등 척추동물의 림프구의 반응 또한 포유동물의 림프구와는 달리 그 반응성이 매우 다양하다. Pacific hagfish의 혈액 세포는 PHA의 자극에 대해 DNA의 합성이 증가하고 증식 분화하였으나 포유동물의 배양 조건과 비교했을때 상대적으로 배양 기간이 길었으며 고농도의 PHA가 사용되었다(Tam *et al.*, 1977). 또, nerse shark의 순환 혈액 림프구는 Con A에 대해서는 반응하나 PHA의 자극에 대해서는 반응을 나타내지 않았다(Lopez *et al.*, 1974). 경골어류 중 무지개송어의 림프구가 PHA, Con A 및 LPS를 체내로 주사하였을 때 이들 mitogen에 대해 아세포를 형성하였을 뿐만 아니라(Bogner and Ellis, 1977), *in vitro* 배양 실험에서도 PHA, Con A, LPS 및 PPD로 자극했을때 반응을 나타내었다(Etlinger *et al.*, 1975, 1976a; Chilmonczyk, 1978a). 또한 Etlinger *et al.* (1976b)은 림프구를 T cell mitogen으로 알려져 있는 Con A와 함께 배양한 경우 형질세포가 생성되었으며 이 세포의 형태가 LPS나 PPD 배양에서 생성된 세포와 유사하다고 보고하였다.

림프구 자극에 필요한 mitogen의 최적 농도에 대한 연구는 주로 *in vitro*에서 행해지고 있으며 그 결과가 다양하게 나타나고 있다. 즉, Chilmonczyk (1978)는 무지개송어의 순환 혈액에 대한 실험에서 PHA, Con A와 LPS를 1 µg/ml에서 50 µg/ml까지 단계적으로 희석하여 자극했을때 Con A가 1~10 µg/ml에서 최적의 효과를 나타낸 것에 비해 PHA는

보다 넓은 농도 범위에 걸쳐 림프구 자극 효과를 나타냈으며 이와는 달리 LPS는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서만 효과를 나타냈다. LPS에 대한 이러한 결과는 Reitan과 Thuvander(1991)의 보고와는 상반되는 것으로 PHA가 5~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최적의 효과를 나타낸 반면 LPS의 경우 50~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에 걸쳐서 PHA보다 뛰어난 자극 효과를 나타냈다. 또한 Etlinger *et al.* (1976)은 무지개송어의 림프구에 대한 실험에서 Con A와 LPS가 각각 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 림프구 자극 효과가 가장 뛰어났다고 보고하였다. 본 실험에서는 mitogen에 의한 비특이적 면역 증강 효과를 조사하기 위해 각 mitogen을 잉어의 복강에 주사한 후 그 효과를 비교, 검토하였다. 림프구 자극에 필요한 최적 농도를 결정하기 위한 예비실험에서 mitogen을 다양한 농도로 복강 주사하여 림프구 자극 효과를 조사한 결과 150, 250  $\mu\text{g}/\text{fish}$ 일때 보다 상대적으로 저농도인 50  $\mu\text{g}/\text{fish}$ 의 농도에서 최대효과가 나타났다. 그러므로 최상의 자극 효과를 나타내는 mitogen의 농도는 어종, 실험 조건, 또는 mitogen의 유래나 준비 과정에 따라 일치하지 않는 경우가 많은 것으로 생각된다.

mitogen에 대한 림프구의 芽球化는 보통 두가지 방법에 의해 측정할 수 있다. 즉 현미경 하에서 blast cell의 형태, 수 등을 조사하는 방법(Sakai, 1981)과 thymidine등의 형광 물질로 표지하여 핵산 합성을 측정하는 방법(Faulmann *et al.*, 1988)이다. 본 실험에서는 두가지 방법을 모두 사용하였는데 mitogen 투여구가 대조구에 비해 DNA량과 세포수가 유의성있게 증가하였으며 그 중 LPS와 PHA에 비해 Con A와 BCG의 자극 효과가 장기간 지속되었다. 먼저 핵산 합성의 변화를 알아보기 위하여 Labarca와 Paigen(1980)의 방법에 따라 DNA에 특이적으로 결합하는 Hoechst 33258을 이용해 DNA의 양을 측정하였다. 전혈의 DNA량 측정 결과 3가지 mitogen에 비해 BCG의 자극 효과가 뛰어난 것으로 나타났으며 Fig. 4에 나타난 림프구의 결과도 같은 경향을 나타내었다. 실험 기간 동안 RBC 층의

DNA량에서는 큰 변화가 관찰되지 않았으며 각 실험구별 증가나 감소에 있어서도 일정한 경향을 찾을 수 없었으나 림프구의 경우 BCG 투여구는 12시간째부터 빠르게 증가하기 시작하여 2주째 최고치를 나타냈으며, Con A와 LPS 투여구는 12시간째부터 서서히 증가하기 시작하다가 1주째부터는 모든 실험구가 급격히 증가해 2주째에 최고치를 나타내었는데 이러한 결과로 보아 전혈의 DNA량에서 나타난 증가가 실제로 림프구의 증가에 의한 것임을 알 수 있다. 즉, 어체내의 림프구는 mitogen이나 백신과 같은 자극인자의 투여에 의해 단 시간내에 세포의 분화가 시작되어 일정기간 지속되는 것으로 생각된다.

광학현미경 하에서 림프구의 수적 변화를 관찰한 결과 림프구 수는 주사 후 초기에는 낮은 수치를 나타내다가 72시간째부터 대조구 보다 높은 수치로 증가한 후 3주째까지 유의성있게 유지되었다. Ellis (1981)에 의하면 일반적으로 투여한 corticosteroid의 농도가 정상적으로 어체내에서 증가할 수 있는 범위내의 농도라 하더라도 투여 후 4~6시간 사이에 림프구 감소증이 나타났다가 24시간 후에 정상치로 돌아간다고 하므로 본 실험에서 나타난 초기의 낮은 림프구 수치는 주사로 인한 스트레스에 의한 것으로 생각된다.

각 mitogen이 서로 다른 림프구를 자극하였는지의 여부를 조사하기 위해 mitogen을 반복, 교차 투여하여 림프구의 반응을 조사한 결과 동일한 mitogen을 반복 투여한 경우에 비해 2차 투여시 T cell mitogen과 B cell mitogen을 서로 교차하여 투여한 실험구에서 림프구 자극 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 동일한 mitogen의 반복 투여 후 림프구 수의 증가가 미미한 것으로 보아 1차 투여시 반응하지 않은 세포들이 이들 mitogen에 대해 반응성이 없음을 확인할 수 있었다. 반대로 이들 미반응 세포들이 다른 mitogen 투여에 대해 유의성있게 증가하였으므로 PHA와 LPS에 대해 다른 반응성을 가진 세포군이 잉어의 순환 혈액내에 존재하는 것을

알 수 있다. 이러한 결과들은 Chilmoczyk(1978)의 무지개송어의 순환 혈액 림프구에 대한 *in vitro* 연구 결과와도 일치하는 것으로 LPS로 먼저 자극한 후 LPS 또는 PHA와 배양한 결과, LPS를 연속적으로 자극했을 때 처음에 비해 림프구 자극 효과가 감소한 반면 PHA를 첨가한 실험구에서는 유의성있는 증가가 관찰되었다. 본 실험에서 LPS 투여 후 PHA를 투여한 실험구 보다 PHA 투여 후 LPS를 투여한 실험구의 림프구 자극 효과가 다소 높은 것으로 보아 체내에서 T 세포와 B 세포 사이에 일어난 어떠한 상호 작용의 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. mitogen의 반복 투여 실험 결과에서 1차 투여 후 1주째 나타난 림프구의 수치가 mitogen 을 1회만 투여한 실험에 비해 매우 적게 나타났는데 이는 낮은 수온으로 인한 면역 억제 때문으로 보인다. Avtalion(1981)과 Clem *et al.*(1991)은 비록 생리적인 범위내라 하더라도 낮은 수온 상대가 경골어류나 양서류 등의 변온동물에서 면역 반응을 억제시킨다고 보고하였다. 면역학적 기능이 손상받지 않는 수온의 한계는 어종에 따라 매우 다양하지만 잉어의 경우 14°C 이하에서는 면역 반응이 억제되는 것으로 알려져 있다(Avtalion, 1969). 낮은 수온으로 인해 면역 반응이 억제되는 기전에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 Miller와 Clem(1984b)은 이러한 면역 억제가 memory T cell 보다는 virgin T cell의 증식과 활성이 억제되기 때문이라고 보고하였으며, 이에 대해서 후에 Bly와 Clem(1992)이 T cell의 활성화와 증식 단계 중 특히 초기 단계 즉, pre-protein kinase C activation 이전의 단계 중 저온에 대한 감수성이 높은 한 단계 또는 둘 이상의 단계가 영향을 받음으로써 T 세포의 반응이 저하된다고 보고하였다.

mitogen 투여에 앞서 잉어 순환 혈액 림프구의 로젯형성 능력을 조사하기 위해 온도와 배양 시간을 달리하여 로젯형성 반응을 조사하였다. 로젯형성 작용 온도를 4°C, 15°C, 20°C로 조정하여 작용시킨 결과 15°C가 가장 효과적인 것으로 나타났는데 이

러한 결과는 Yoshida와 Kitao(1990)가 잉어의 로젯형성이 온도의 영향을 받지 않는다고 보고한 것과는 차이가 났다. 그러나 그들의 실험 결과에서도 유의성있는 차이는 없었으나 15°C가 가장 효과적으로 나타났으며 배양시간을 달리한 실험에서 1시간 또는 2시간 배양했을 때 보다 3시간 배양했을 경우 로젯형성에 가장 효과적이었다는 점에서는 본 실험의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. RFCs의 형태학적인 관찰에서 로젯을 형성한 임파구의 크기가 다양하게 관찰되었는데 이러한 결과는 Chiller *et al.*(1969)이 무지개송어의 로젯형성 세포를 5가지 - 대림프구, 소림프구, 단구, 형질세포, 대식세포 - 로 구분한 것과 유사하다.

mitogen의 반복 투여 후 시간 경과별 림프구의 로젯형성 세포수를 조사한 결과 1회 투여에서와 마찬가지로 반복 투여 실험에서도 BCG와 PHA 투여구의 로젯형성 능력이 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 보아 LPS 투여구에서 증가한 세포군이 로젯형성에 관여하지 않았으며, PHA와 BCG 투여후 증가한 세포군이 T-like cell로서 로젯을 형성한 것으로 추정된다. 림프구의 수적인 변화와 DNA량의 변화에서 나타난 결과와는 달리 Con A 투여구의 로젯형성 능력이 BCG나 PHA 투여구에 비해 떨어지는 것으로 보아 Sigel *et al.*(1978)이 Con A가 PHA-responsive cell을 억제한다고 보고한 것과 연관이 있을 것으로 보인다. 따라서 nurse shark가 suppressor cell을 가지고 있을 것이라는 견해와 Good *et al.*(1985)이 Con A가 mice의 suppressor cell을 자극한다는 보고를 근거로 한다면 본 실험에서도 Con A가 PHA와는 다른 성격의 림프구를 자극한 것으로 판단되나 이에 대해서는 앞으로 *in vitro*에서와 마찬가지로 Con A와 PHA를 동시에 어체내로 투여하여 그에 따른 반응을 조사해 볼 필요가 있을 것이다.

각 mitogen 투여구에서 나타난 높은 림프구 자극 효과와는 달리 공격 실험 결과 mitogen 투여에 의한 *E. tarda*에 대한 항병 효과는 매우 미미한 것으로

보이며 BCG 투여구 만이 대조구에 비해 낮은 폐사율을 나타냈다. BCG 투여구의 경우 25  $\mu\text{g}/\text{fish}$ 의 농도로 주사한 경우에도 37%의 폐사율로 mitogen 투여구에 비해 낮은 폐사율을 나타내었는데 이러한 결과는 Salati *et al.*(1983)이 *E. tarda* FKC 백신의 면역 실험 결과 높은 항체가에도 불구하고 방어력이 낮았다고 보고한 것과는 대조적인 현상으로 T-like lymphocyte가 *E. tarda*에 대한 방어 반응에 관여할 가능성을 시사하는 것으로 생각된다. 또한, 각 mitogen 투여구에서 나타난 낮은 생존율로 보아 Reitan과 Thuvander(1991)의 보고와 마찬가지로 blast transformation의 측정으로 림프구가 activation signal에 반응하는 능력은 알 수 있으나 면역반응을 수행하는 세포(effector cell)로 분화하는 과정에는 보다 다양한 단계가 요구되는 것으로 보인다.

결론적으로, 여러가지 mitogen 투여에 대한 림프구의 芽球化 반응과 로켓형성 반응을 근거로 잉어의 순환 혈액내에 T-like 그리고 B-like cells이 존재함을 알 수 있었으나, 이들 림프구가 활성화되고 질병에 대한 방어에 관여하는 데는 스트레스, 수온, 자극체의 종류 등 여러 가지 요인이 관련되므로 이에 대해 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Avtalion, R. R. : Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*C. carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunol.*, 17 : 927-931, 1969.
- Avtalion, R. R. : Environmental control of the immune response in fish. *CRC, Critical Review of Environmental Control*, 11 : 163-188, 1981.
- Blažhall, P. C. and Hood, K. : Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. *J. Fish Biol.*, 27 : 749-755, 1985.
- Bly, J. E. and Clem, L. W. : Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunol.*, 2 : 159-171, 1992.
- Bogner, K. H. and Ellis, A. E. : Properties and functions of lymphocytes and lymphoid tissues in teleost fish. *In Contributions to the histopathology of fishes*, pp.59-72, H. H. Reichenbach-Klinke, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1977.
- Cannon, M. S., Mollenhauer, H. H., Eurell, T. E., Lewis, D. H., Cannon, A. M. and Tompkins, C. : An ultrastructural study of the leukocytes of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Morphol.*, 164 : 1-23, 1980.
- Chiller, J. M., Hodgins, H. O., Chambers, V. C. and Weiser, R. S. : Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Immuno-competent cells in the spleen and anterior kidney. *J. Immunol.*, 102 : 1193-1201, 1969.
- Chilmonczyk, S. : *In vitro* stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ann. Immunol.*, 129 : 3-12, 1978.
- Clem, L. W., Miller, N. W. and Bly, J. E. : Evolution of lymphocyte subpopulation ; their interactions and temperature sensitivity. *In The phylogenesis of Immune Functions*, pp.1912-213, Cohen, N. and Warr, G., Boca Raton, FL : CRC Press, 1991.
- Cuchens, M. A. and Clem, L. W. ; Phylogeny of lymphocyte heterogeneity II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.*, 34 : 219, 1977.
- Ellis, A. E. : Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 8 : 143-156, 1976.
- Ellis, A. E. : The leucocytes of fish ; a review. *J. Fish Biol.*, 11 : 453-491, 1977.

- Ellis, A. E. : Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. *In* Stress and Fish, pp. 147-169, A. D. Pickering, Academic Press, London & New York, 1981.
- Etlinger, H. M., Hodgins, H. O. and Chiller, J. M. : Evolution of the lymphoid system I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.*, 116 : 1547-1553, 1976.
- Faulmann, E., Cuchens, M. A., Lobb, C. J., Miller, N. W. and Ciem, L. W. : An effective culture system for studying *in vitro* mitogenic response of channel catfish lymphocytes. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112 : 673-679, 1988.
- Good, M. F., Halliday, J. W. and Powell, L. W. : A method for analysing the clonal precursor cells. *J. Immunol. Methods*, 80 : 163-175, 1985.
- Gutierrez, C. : Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of Percoll. *J. Immunol. Methods*, 29 : 57-63, 1979.
- Hightower, J. A., McCumber, L. J., Welsh, M. G., Whatley, D. S., Hartvigsen, R. E. and Sigel, M. M. : Blood cells of *Fundulus heteroclitus* (L.). *J. Fish Biol.*, 24 : 587-598, 1984.
- Hildemann, W. H. : Transplantation immunity in fishes : *Agnatha*, *Chondrichthyes* and *Osteichthyes*. *Transplant. Proc.*, 2 : 253-259, 1970.
- Hogarth, P. J. : Immune relations between mother and foetus in the viviparous poeciliid fish, *Xiphophorus helleri* Haeckel. III. Survival of embryos after ectopic transplantation. *J. Fish Biol.*, 5 : 109-113, 1973.
- Labaca, C. and Paigen, K. : A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry*, 102 : 344-352, 1980.
- Lopez, D. M., Sigel, M. M. and Lee, J. C. : Phylogenetic studies on T cells-I. Lymphocytes of the shark with differential response to PHA and Con A. *Cellular Immunol.*, 10 : 287-293, 1974.
- Marchalonis, J. J. : Isolation and characterization of immunoglobulin-like proteins of the Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*). *Aus. J. Exp. Med. Sci.*, 47 : 405-419, 1969.
- Mckinney, E. C., Ortiz, A., Lee, J. C., Sigel, M. M., Lopez, D. M., Epstein, D. M., and McLeod, T. F. : Lymphocytes of fish : Multipotential or specialized ? *In* Phylogeny of Thymus and Bone Marrow-Bursa cells, pp. 73-82, Wright, R. K. and Cooper, E. L., Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1976.
- Miller, N. W. and Clem, L. W. : Temperature-mediated processes in teleost immunity ; differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody response to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.*, 133 : 2356-2359, 1984b.
- Ownby, D. R. and McCullough, J. : An improved technique for separating rosetted from non-rosetted lymphocytes. *J. Immunol. methods*, 56 : 281-284, 1983.
- Reitan, L. J. and Thuvander, A. : *In vitro* stimulation of salmonid leucocytes with mitogens and with *A. salmonicida*. *Fish & shellfish Immunol.*, 1 : 297-307, 1991.
- Rosenberg-Wiser, S. and Avtalion, R. R. : The cells involved in immune response of fish. III. Culture requirements of PHA-stimulated carp (*C. carpio*) lymphocytes. *Dev. & Com. Immunol.*, 6 : 693-702, 1982.
- Sakai, D. K. : Blastogenic response of peripheral lymphocytes separated from rainbow trout to phytohemagglutinin, concanavalin A and poke-

- weed mitogen. Bull. Jap. Soc. of Sci. Fisheries, 47(12) : 1545-1550, 1984.
- Salati, F., Kawai K. and Kusuda, R. : Immune response of eel against *E. tarda* antigens. Fish Pathol., 18(3) : 135-141, 1983.
- Sigel, M. M., Lee, J. C., McKinney, E. C. and Lopez, D. M. : Cellular immunity in fish as measured by lymphocyte stimulation. Mar. Fish. Rev., 40 : 6-11, 1978.
- Sizemore, R. C., Miller, N. W., Cuchens, M. A., Lobb, C. J. and Clem, L. W. : Phylogeny of lymphocytes heterogeneity ; the cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes. J. Immunol., 133 : 2920-2924, 1984.
- Smith, P. D. and Braun-Nesje, R. : Cell mediated immunity in the salmon ; lymphocyte and macrophage stimulation, lymphocyte / macrophage interactions and the production of lymphokine-like factors by stimulated lymphocytes. Dev. & Com. Immunol., (Suppl.) 2 : 223-238, 1982.
- Stolen, J. C. and Makela, O. : Carrier preimmunisation in the antihapten response of a marine fish. Nature, 254 : 719-719.
- Tam, M. R., Reddy, A. L., Karp, R. P. and Hildebrand, W. H. : Phylogeny of cellular immunity among vertebrates, *In Comparative Immunology*, pp. 98-119, J. J. Marchalonis, Blackwell Scient. Publ., Oxford, 1976.
- Taylor, R. B., Duffus, P. H., Raff, M. C. and De Petris, S. : Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. Nature New Biol., 233 : 225-229, 1971.
- Thuvander, A., Norrgren, L. and Fossum, C. : Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. J. Fish Biol., 31 : 197-208, 1987.
- Tillitt, D. E., Giesy, J. P. and Fromm, P. O. : *In vitro* mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Com. Biochem. and Physiol., 89(A) : 25-35, 1988.
- Turpen, J. B., Volpe, E. P. and Cohen, N. : Ontogeny and peripheralization of thymic lymphocytes. Science, 182 : 931-933, 1973.
- Turpen, J. B., Volpe, E. P. and Cohen, N. : On the origin of thymic lymphocytes. Amer. Zool., 15 : 51-61, 1975.
- Warr, G. W. and Simon, R. C. : The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). re-examined. Dev. & Com. Immunol., 7 : 379-384, 1983.
- Yoshida, T. and Kitao, T. : Spontaneous rosette formation of carp peripheral leucocytes with mammalian red blood cells. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(10) : 1579-1585, 1990.
- Yocum, D., Cuchens, M. and Clem, L. W. : The hapten-carrier effect in teleost fish. J. Immunol., 114 : 925-927, 1975.
- Yui, M. A. and Kaattari, S. L. : *V. anguillarum* antigen stimulates mitogenesis and polyclonal activation of salmonid lymphocytes. Dev. & Com. Immunol., 11 : 539-549, 1987.

# The response of peripheral blood lymphocytes against *in vivo* stimulation with mitogen in carp, *Cyprinus carpio*

Mi-Young Cho and Soo-Il Park\*

*Nam Hae Fisheries Education Service Station, National Fisheries Research & Development Agency*

*\*Department of Fish Pathology, College of Fisheries Science, National Fisheries*

*University of Pusan, Pusan 608-737, Korea*

This work was carried out to investigate the functional heterogeneity of peripheral blood lymphocytes (PBLs) in carp, *Cyprinus carpio*. PHA, Con A, LPS and BCG were injected intraperitoneally into carp to determine the blastogenic response and rosette formation activity. In each group of fish treated with stimulators, the cell numbers and DNA contents of lymphocytes were higher than those of untreated control group and reached the highest level between 1 week and 2 weeks after injection with mitogens. These results showed that BCG and Con A were strong stimulators of proliferation compared to PHA and LPS. However, PHA-treated fish twice showed the highest rosette formation response among the consecutive stimulations with the same mitogen. Also, the results on consecutive mitogen stimulation revealed that carps reinjected by different mitogens led to an increased stimulation higher than the one reinjected after 1 week with same mitogen. It seems that different mitogens may stimulate different cell populations and implies functionally separated subpopulations of lymphocytes in carp.

---

Key words : Lymphocytes, Mitogens, BCG, Blastogenic response, Rosette formation