

## 백혈구 표면항원 특이 단클론항체를 이용한 한우의 말초혈액 백혈구 아군에 관한 연구

문진산 · 박용호\* · 정석찬 · 구복경 · 강병규\*\*

농촌진흥청 수의과학연구소 · 서울대학교 수의과대학\*

전남대학교 수의과대학\*\*

(1995년 11월 24일 접수)

### Subpopulation in peripheral blood leukocyte of Korean native cattle by using monoclonal antibodies specific to bovine leukocyte differentiation antigen

Jin-san Moon, Yong-ho Park\*, Suk-chan Jung, Bok-gyeong Ku, Byong-kyu Kang\*\*

*Veterinary Research Institute · College of Veterinary Medicine, Seoul National University\**

*College of Veterinary Medicine, Chonnam National University\*\**

(Received Nov 24, 1995)

**Abstract :** The proportion of leukocyte subpopulation in the host is of a great importance in understanding their functions and disease progress. Many methods have been developed to separate leukocytes and to measure their activities.

Characterization of immune cell subpopulations in Korean native cattle was performed using a set of monoclonal antibodies specific which are specific to bovine leukocyte differentiation antigen. Peripheral blood leukocytes from fifty Korean native and ten Holstein cattle were collected and analyzed for the investigation of leukocyte subpopulation by using monoclonal antibodies and flow cytometry. The result indicated that Korean native cattle have significantly higher proportion of leukocyte subpopulations expressing MHC class II molecules and BoCD4 than Holstein cattle.

**Key words :** Korean native cattle, leukocyte differentiation molecules, major histocompatibility complex, cluster differentiation.

## 서 론

사람을 포함한 동물의 면역체계는 매우 복잡하여 그 성장과 기능을 달리하는 복수세포간 협동작용에 의하여 진행되는데 최근 마우스를 중심으로 세포 수준에서의 연구가 진행되어 그 윤곽이 급속히 밝혀지고 있다

<sup>1-3</sup>. 림프구를 기능별로 분류하기 위한 방법이 지금까지 SRBC와의 rosette 형성능, 세포 표면 면역글로불린 (surface immunoglobulin; sIg) 함유여부 및 nylon wool과의 부착성 검사 등이 연구 개발되어 왔으나 이러한 방법들로는 단순히 T 세포와 B 세포의 구별만이 가능할 뿐 그 이상의 세분화된 분류는 불가능하였다<sup>4-9</sup>. 그러

나 이러한 문제는 항원을 인식하고(recognition), 전달(presenting)하는데 중요한 역할을 하는 세포표면분자(cell surface molecules)에 대한 단크론항체의 개발이 이루어짐으로써 해결하게 되었고, 아울러 세포성 면역에 큰 진전을 가져오게 되었다<sup>10,11</sup>.

그리하여 젖소를 비롯한 양, 염소 등 반추류의 면역체계 분석결과, 면역반응의 중추역할을 하는 임파조직의 세포는 크게 T, B, N 림프구의 3종류로 구성되어 있음이 확인되었다<sup>12</sup>. 그중 가장 중요한 림프구는 T 림프구로서 CD2, CD5, CD6의 표면특이항원을 공통으로 가지고 있으며 CD4나 CD8을 선택적으로 하나 더 소유하고 있다. B 림프구는 표면에 면역글로블린(sIgM)과 B 림프구 특유의 표면항원(CD19, CD20, CD21 등)을 소유함으로써 구별되고 있다<sup>12</sup>. 또한 최근 그 기능 및 역할에 있어서 팔목할만한 연구가 집중되고 있는 N 림프구는 양에서 Non T/Non B 세포(N세포)로 구별되어 표현되기 시작한 후 젖소 및 면양에서 CD4/CD8 복합음성세포 또는 공(null)세포로 명명되었다. 그 뒤 N 세포는  $\gamma\delta$  T cell receptor(TCR1 ; WC1)와 CD3, CD5 표면항원을 소유하고 있음이 알려졌으며, 그중 TCR1<sup>+</sup> WC1<sup>+</sup> 림프구는  $\alpha\beta$  TCR을 공유하면서 CD3, CD5 항원을 가지고 있지만 CD2와 CD6 항원은 소유하지 않는 것으로 밝혀졌다<sup>11</sup>. 한편 TCR1<sup>+</sup> WC1<sup>+</sup> 림프구는 CD5이외에 CD2와 CD8 표면항원을 갖고 있는 세포로서 흉선이나 비장에서는 거의 찾아볼 수 없고 주로 상피세포에 많이 존재함이 밝혀졌다<sup>12-14</sup>.

이와같이 외국에서는 소를 비롯한 각종 동물에서 주조직적합체(major histocompatibility complex; MHC) 및 백혈구 감별항원(cluster differentiation; CD항원)에 대한 특이 단크론항체를 이용하여 정상 젖소와 여러 반추류의 전신면역체계에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

한편 국내에서는 우리나라 고유 품종인 한우의 혈액학치 및 혈액화학치에 관한 보고는 많으나 단크론항체를 이용한 림프구 아군별 분포율에 관한 보고는 거의 없으며, 단지 류 등<sup>15</sup>이 rosette 형성능을 이용하여 건강한 정상 한우의 말초혈액 T 및 B 세포의 분포율을 조사했을 뿐이다. 또한 병적인 한우의 백혈구 아군 분포 변화상을 알기 위해서는 건강한 한우의 분포율을 비교 검토함으로써 이상유무를 진단할 수 있기 때문에 건강한 한우의 백혈구 아군 분포의 기준치가 매우 필

요한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 젖소의 주조직적합체 및 백혈구 표면항원 특이 단크론항체와 flow cytometry를 이용하여 백혈구 아군별 분포율을 비교 조사함으로써 한우의 유전면역학적 특성을 밝히는데 있다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 경기도내 도축장에서 1~2세 전후의 한우와 젖소의 혈액을 채취한 뒤 혈액학치를 검사한 후 정상 범주에 있는 한우 50두와 젖소 10두를 실험에 사용하였다.

**혈액학치 검사** : Hematology blood cell counter (cell-Dyn 800)를 사용하여 적혈구치(RBC), 백혈구치(WBC), 헤모글로빈치(hemoglobin), hematocrit치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구헤모글로빈량(MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)를 측정하였다. 백혈구 분포율은 혈액을 slide glass에 도말한 후 methanol로 5분 고정된 뒤 Giemsa 염색액으로 30분간 염색하여 현미경하에서 백혈구 핵의 형태에 따라 조사하였다.

**단크론항체를 이용한 백혈구아군별 분포율 조사** :

1) 백혈구 분리 : 말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte ; PBL)는 Davis 등<sup>16</sup>의 방법에 따라 경정맥으로 부터 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD ; sodium citrate 22.0g, citric acid 7.3g, dextrose 24.5g, D.W 1,000ml)용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat층을 채취한 후 37℃ 로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH<sub>4</sub>Cl;0.01M tris, pH 7.2)용액과 혼합하여 37℃ 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린후 pellet을 phosphate buffered saline (PBS;sodium chloride 7.6g, disodium phosphate 1.2g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2g, pH 7.2) 과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 3회 이상 원심 세척하였다. 마지막 원심후 pellet는 1.0ml의 PBS로 부유시킨 다음, trypan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수

를 측정 한 후 최종농도가  $1 \times 10^7$ /ml 정도로 조절하여 이용하였다.

2) 젖소 백혈구 아군 검사용 단크론 항체 : 미국 워싱턴 주립대학교 수의과대학 단크론항체 센터로부터 분양받은 MHC class I 및 II, T cell, B cell, N cell, granunocyte, monocyte, interleukin 2(IL-2) 수용체에 대한 단크론항체와 식물성 유래의 concanavalin A(Con A) mitogen의 자극에 의해서 발현되는 활성화 세포(activated cell;ACT)에 특이적으로 반응하는 단크론항체 등 모두 23종을 실험에 사용하였다(Table 1).

3) 형광세포유출장치 분석 : Davis 등<sup>12</sup>의 방법에 준해서 conical bottom microplate의 한 well당 단크론항체  $50 \mu\text{l}$ ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와  $1 \times 10^7$ /ml의 림프구를 첨가한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분간 감작시킨 다음,  $4^\circ\text{C}$ 의 first washing buffer(PBS 450ml, ACD 50ml, 20%  $\text{NaN}_3$ , 5ml, gamma globulin free horse serum 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml)로 3회 원심(2,000rpm, 3분,  $4^\circ\text{C}$ ) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다. 부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (Caltag Lab, Inc, USA)를 200배 희석한 후 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이를 다시  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분간 감작시킨 다음,  $4^\circ\text{C}$ 의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심 세척한 다음, 2% PBS-formalin(38% formalin 20ml, PBS 980ml)용액을  $200 \mu\text{l}/\text{well}$  되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소( $4^\circ\text{C}$ )에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flowcytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysis program을 이용하여 실시하였다.

## 결 과

실험에 사용한 한우 및 젖소의 적혈구치(RBC), 백혈

구치(WBC), 헤모글로빈치, hematocrit치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구헤모글로빈량(MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)는 Table 2와 같다. 혈중 총백혈구수의 평균치는 한우와 젖소에서 각각  $8.4 \times 10^3/\mu\text{l}$ 와  $5.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ 로 정상범주를 나타내었다. 또한 림프구는 총백혈구중 한우와 젖소 각각 52.2%와 51.4%를 차지하였으며, 호중구는 37.7%, 37.6%, 호산구는 8.5%와 8.0%로 정상분포를 나타내었다. 또한 RBC를 비롯한 hemoglobin치도 한우와 젖소에서 모두 정상범위에 속하였다.

MHC class I molecule을 발현하는 세포의 분포율은 한우 94.3%, 젖소 95.3%로 서로 비슷한 결과를 나타내었다(Fig 1, Table 3). 또한 대부분의 B 림프구와 일부 T 림프구가 소유하고 있는 MHC class II molecule의 DP, DQ, DR에 대해서는 한우가 각각 15.9, 16.7, 19.0%의 분포율을 보였으나, 젖소에서는 이보다 낮은 9.6, 8.8, 12.5%의 분포율을 나타내었다.

BoCD2 양성 발현세포의 분포율은 한우 51.8%, 젖소 45.7%를 나타내었다. BoCD4 항원에 대해서는 한우가 평균 29.8%로 젖소 21.7%에 비해서 높은 분포율을 보였으나 개체별로는 약간의 차이는 있었다(Fig 2, Table 4). BoCD8 표면특이항원을 소유하는 세포의 분포율은 한우와 젖소가 각각 17.4%와 16.9%를 나타내었으며, BoCD5 항원에 대해서는 한우와 젖소가 각각 53.0%와 58.4%의 분포율을 나타내었다. 그리고 helper/inducer T 세포와 cytotoxic/suppressor T 세포와의 구성비를 알아보기 위하여 BoCD4 양성세포 분포율을 BoCD8 양성세포 분포율로 나눈 비율 (BoCD4/BoCD8)은 젖소에서는 1.2, 한우에서는 1.7이었다.

모든 성숙 B 세포가 발현하는 sIgM에 대해서는 한우와 젖소 각각 11.9% 및 9.7%의 분포율을 나타내었으며, 면역글로블린의 light chain를 코팅하는 kappa 유전자에 대한 분포율은 한우와 젖소가 각각 7.6%와 7.8%를 나타내었다. 또한 lambda 유전자에 대해서는 한우와 젖소가 각각 17.7% 및 10.7%의 분포율을 나타내었다(Table 5). Granulocyte + monocyte에 대해서는 한우와 젖소에서 각각 16.4%와 8.1%의 분포율을 나타내었다.

$\alpha\beta$  T 세포와 B 세포의 marker를 가지지 않고 모든  $\gamma\delta$  TCR 림프구에서 인정되는 N12라는 고유한 molecules를 소유하고 있는 세포의 분포율은 한우와 젖소가

**Table 1.** Monoclonal antibodies specifically reactive with bovine leukocyte differentiation antigens

Specificity * of monoclonal antibodies	Monoclonal** antibodies	Cell type ***
MHC class I	H58A	All nucleated cell
MHC class II	H42A(DP)	Antigen presenting cell
	TH81A5(DQ)	"
	TH14B(DR)	"
BoCD2	BAQ95A	T cell
BoCD4	CACT138A	T helper/inducer cell
BoCD8	CACT80C	T cytotoxic/suppressor cell
BoCD5	CATA105A	T cell, B subset
sIgM	PIG45A	B cell
	BAQ44A(B2)	B subset
	BIG501E(k)	B cell
	BIG43A( $\gamma$ )	"
TCR1-N12	CACT61A	Non T/B cell
WC1-N1	BAQ4A9	"
WC1-N2	B7A1	"
TCR1-N6	CACTB6A	"
TCR1-N7	CACTB81A	"
ACT1	CACT101A	Activated cell
ACT2	CACT26A	N cell and activated BoCD8
ACT3	CACT114A	N cell and activated BoCD4
IL-2 receptor	CACT16A	T helper cell
G	CH138A	Granulocyte
G+M	DH59B	Granulocyte + Monocyte

\* Bovine leukocyte differentiation molecules.

\*\* Monoclonal antibodies that specifically react with leukocyte differentiation antigen.

\*\*\* Cells expressing molecules.

**Table 2.** Hematological result of Korean native and Holstein cattle

Item	Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
Total WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8.4 $\pm$ 2.0**	5.0 $\pm$ 2.9
Neutrophil(%) band cell	6.4 $\pm$ 2.6	7.0 $\pm$ 2.5
segment cell	31.3 $\pm$ 8.3	30.6 $\pm$ 5.3
Lymphocyte(%)*	52.5 $\pm$ 9.9	51.4 $\pm$ 5.7
Eosinophil(%)	8.5 $\pm$ 4.8	8.0 $\pm$ 2.9
Basophil(%)	1.6 $\pm$ 1.4	1.2 $\pm$ 0.8
R B C ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.4 $\pm$ 1.3	5.7 $\pm$ 0.9
Hemoglobin(g/dl)	10.3 $\pm$ 2.3	7.4 $\pm$ 1.5
H C T (%)	34.0 $\pm$ 5.6	28.3 $\pm$ 5.8
M C V (fl)	44.8 $\pm$ 6.3	45.8 $\pm$ 3.7
M C H (pg)	13.1 $\pm$ 1.8	12.6 $\pm$ 1.6
M C H C (%)	29.4 $\pm$ 3.3	27.4 $\pm$ 2.7

\* Lymphocytes contained monocytes.

\*\* Mean  $\pm$  SD.

각각 20.2%와 36.3%를 나타내었다(Table 6). TCR1-N1<sup>2+</sup> 림프구의 대부분은  $\gamma\delta$  T 림프구 수용체(TCR1)와 N1, N2(WC1)라는 독특한 marker의 2가지 중 하나를 공유하고 있다. WC1(N1, N2)항원에 대해서는 한우가 각각

10.8%와 12.0%를, 젖소가 각각 18.8%와 28.4%의 분포율을 나타내었다. 또한  $\gamma\delta$  T 림프구 아군으로 인정되는 것으로 BoCD2 항원은 소유하지만 WC1 항원을 갖지 않은 TCR1-N6 항원을 소유하는 세포에 대해서는

**Table 3.** Proportion of leukocyte subpopulations expressing major histo-compatibility complex(MHC) molecules in Korean native and Holstein cattle

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	% Positive cells ( mean±SD )	
		Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
MHC class I	H58A	94.3±6.0	95.3±5.0
MHC class II			
D P	H42A	15.9±4.3	9.6±3.6
D Q	TH81A5	16.7±5.2	8.8±3.1
D R	TH14B	19.0±5.7	12.5±6.0

**Table 4.** Proportion of leukocyte subpopulations expressing T cell-specific BoCD2, BoCD4, BoCD8 and BoCD5 molecules in Korean native and Holstein cattle

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	% Positive cells ( mean±SD )	
		Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
BoCD2	BAQ95A	51.8±9.7	45.7±8.4
BoCD4	CACT138A	29.8±8.0	21.7±4.5
BoCD8	CACT80C	17.4±6.2	16.9±6.6
BoCD5	CACT105A	53.0±10.4	58.4±7.7
BoCD4/BoCD8		1.7	1.2

**Table 5.** Proportion of leukocyte subpopulations expressing B cell, granulocyte and monocyte in Korean native and Holstein cattle of monoclonal

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	% Positive cells ( mean±SD )	
		Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
sIgM	PIG45A	11.9±7.1	9.7±3.3
sIgM(B2)	BAQ44A	6.3±2.5	5.6±2.1
Kappa	BIG501E	7.6±3.5	7.8±3.6
Lambda	BIG43A	17.7±7.3	10.7±7.3
G*	CH138A	3.5±1.2	2.1±1.3
G+M**	CH59B	16.4±7.2	8.1±4.1

\* Granulocyte.

\*\* Granulocyte + monocyte.

**Table 6.** Proportion of leukocyte subpopulations expressing N cell-specific in Korean native and Holstein cattle

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	% Positive cells ( mean±SD )	
		Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
TCR1-N12	CACT61A	20.2±6.8	36.3±8.0
WC1-N1	BAQ4A	10.8±5.5	18.8±6.1
WC1-N2	B7A1	12.0±7.0	28.4±9.9
TCR1-N6	CACTB6A	8.5±8.3	15.6±5.1
TCR1-N7	CACTB81A	8.5±8.4	17.0±9.1

한우와 젃소가 각각 8.5%와 15.6%의 분포율을 나타내었으며, TCR1-N7 항원에 대한 분포율도 한우와 젃소가 각각 8.5%와 17.0%를 나타내었다.

활성화된 모든 N 세포와 BoCD8아군에 존재하는

ACT2 표면항원 발현율은 한우와 젃소가 각각 12.1%와 10.3%로 나타내었으며, 활성화된 BoCD4아군만이 발현하는 ACT3 항원에 대해서는 한우가 15.1%로 젃소의 7.1%에 비해서 2배정도 높은 분포율을 나타내었다

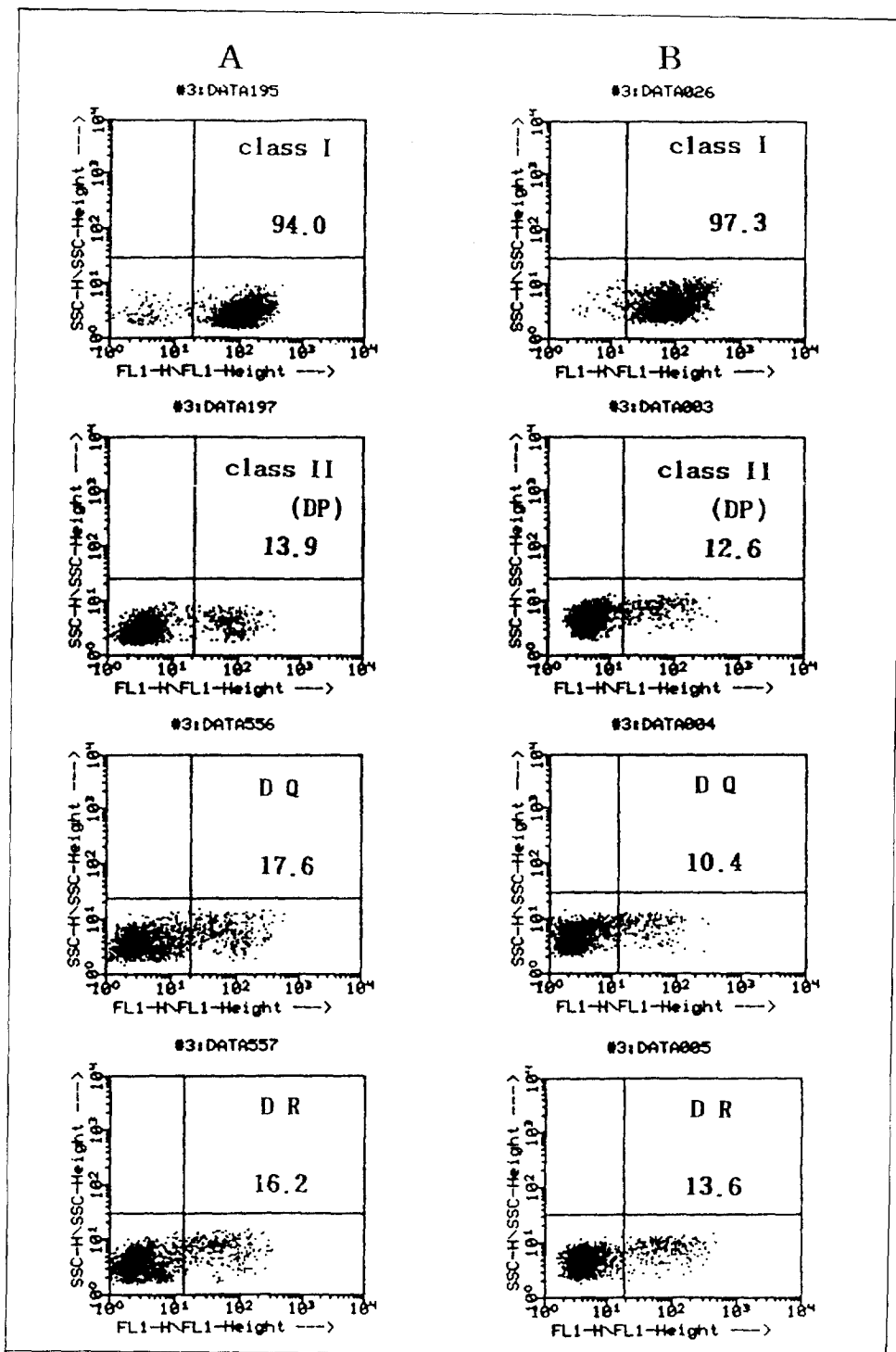


Fig 1. Representative dot plot profile of Korean native (A) and Holstein cattle (B) peripheral blood lymphocyte using monoclonal antibodies specifically reactive with bovine major histocompatibility complex class I and class II (DP, DQ, DR) antigen.

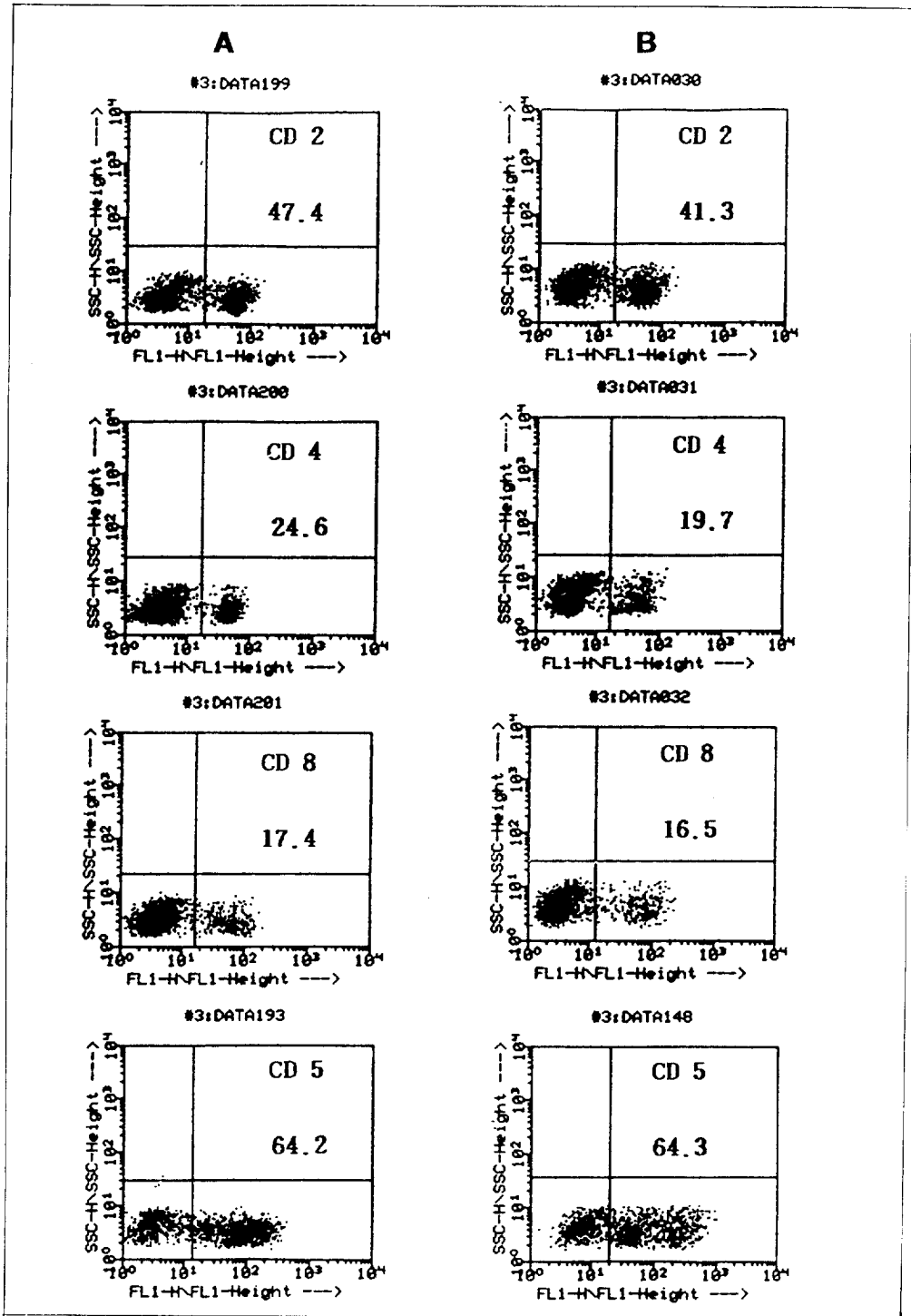


Fig 2. Representative dot plot profile of Korean native (A) and Holstein cattle (B) peripheral blood lymphocyte using monoclonal antibodies specifically reactive with bovine BoCD2, BoCD4, BoCD8 and BoCD5 antigen.

**Table 7.** Proportion of leukocyte subpopulations expressing activated molecules(ACT) and interleukin 2(IL-2) receptor in Korean native Holstein cattle

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	% Positive cells ( mean±SD )	
		Korean native ( n=50 )	Holstein ( n=10 )
ACT1	CACT101A	16.4±7.3	16.3±4.7
ACT2	CACT26A	12.1±6.3	10.3±5.4
ACT3	CACT114A	15.5±4.1	7.1±3.7
IL-2	CACT16A	7.7±3.5	10.7±7.3

(Table 7). 활성화된 림프구 또는 large granular lymphocyte 등에서 분비되어 T 세포의 증식 및 분화를 유도하는 물질로 알려진 IL-2의 수용체 발현세포 분포율은 한우와 젖소가 각각 7.7%와 10.7%를 나타내었다.

## 고 찰

백혈구아군의 분포율을 조사하여 질병의 진행, 백신 접종 및 공격적접종 등에 따른 숙주 면역기전의 변화를 확인하는 많은 연구가 현재 진행되고 있다<sup>17-21</sup>. 이러한 숙주면역체계중 면역반응의 중추적인 역할을 하는 림프구는 항원을 인식하는 표면구조(surface structure)에 따라 T 및 B 림프구로 나눌 수 있다. T 림프구는 T 세포수용체(T cell receptor;TCR)를 가지며, TCR는  $\alpha\beta$  TCR 와  $\gamma\delta$  TCR 두가지로 나눌 수 있다. B 림프구는 세포표면 면역글로불린(cell surface immunoglobulin)이라는 항원을 가지고 있다<sup>11</sup>.  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> 림프구는 항원-주조직 적합체구조를 인지할 수 있으며 흉선내 분화과정에서 self MHC 분자에 대한 친화력이 있는 TCR<sup>+</sup> T 림프구만이 선택되어 성숙 및 분화된다. 성숙된  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> 림프구는 MHC 분자에 결합된 항원 펩티드와 MHC 분자를 함께 인지한다. 즉, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T 림프구는 항원인지과정에서 MHC class II molecule 분자의 제한을 받고, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T 림프구는 MHC class I molecule의 제한을 받는다<sup>22,23</sup>. 또한 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T 림프구는  $\gamma\delta$  TCR이 대부분이며 항원인지과정에서 MHC molecule의 제한을 받지 않고 분화과정에서도  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> T 림프구와는 다른 방식을 이루고 있다.  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> T 림프구의 기능은 확실하게 밝혀져 있지 않지만 스트레스에 의해 표현되는 자가단백질(autologous protein)의 인식을 통하여 창상신호전달(trauma signal surveillance)에 관여하는 것으로 알려지고 있다<sup>23,24</sup>.

본 실험에서는 반추류 백혈구 표면특이항원에 대한

단클론항체를 이용하여 한우 말초혈액내에 존재하는 백혈구아군별 분포율을 조사함으로써 정상적인 한우의 근본적인 면역체계를 확인하고자 하였다.

T 림프구중 cytotoxic T 림프구 활성능력의 제한을 주는 MHC class I molecule을 발현하는 세포 분포율은 한우와 젖소가 매우 유사하게 나타났다. 이는 Davis 등<sup>16</sup>이 조사한 소 95%, 면양 94%, 산양 85% 등의 성적과 비슷한 결과를 나타내었다. 항원전달세포, B 림프구 및 활성화된 일부 T 림프구가 소유하고 있는 MHC class II-DP, DQ, DR에 대해서는 한우가 각각 15.9%, 16.7%, 19.0%의 분포율을 보였으며 젖소에서는 이보다 낮은 분포율을 나타내었다. 이것은 Davis 등<sup>16</sup>에 의해 보고된 DP molecule에 대한 분포율 소 20~35%, 면양 20~35%, 산양 11~20%보다는 낮은 성적이었다. 또한 DQ molecule에 대한 분포율에 있어서도 소 30%, 면양 22~30%, 산양 15~40%, DR molecule에 대해서도 소 20~30%, 면양 20~33%, 산양 34%의 성적보다 낮은 결과를 나타내었다. 그러나 한우에서는 젖소보다 높은 수준의 MHC class II molecule 발현세포가 정상적으로 존재하고 있는 것이 밝혀졌다. 또한 모든 T 림프구가 발현하는 것으로 알려진 CD2(양적혈구 수용체 특이표면항원)의 양성발현세포의 분포율은 한우와 젖소 각각 51.8%와 45.7% 수준을 나타내었는데 이것은 Holstein에서 이미 밝혀진 Mackay<sup>25</sup>의 62%, Kathy 등<sup>26</sup>의 67% 보다는 낮은 편이었으나, Park 등<sup>27</sup>의 비유 시기별 분포율 45.2~52.5%와는 유사한 수준으로 나타났다.

CD4 molecule 양성 발현의 helper/inducer T 세포의 분포율이 한우와 젖소에서 각각 29.8%와 21.7%로 나타났는데 이것은 Mackay<sup>25</sup>의 32%, Kathy 등<sup>26</sup>의 34%, Harp 등<sup>28</sup>의 39~42%에 비해서는 낮은 편이나, Park 등<sup>27</sup>의 25~31.5%와는 비슷한 수준을 나타내었다. 또한 Mackay<sup>25</sup>의 사람에서 57%, 면양 20%, Organ 등<sup>29</sup>의 랫트 56%, Dean 등<sup>30</sup>의 고양이 33.9%, 황 등<sup>31,32</sup>의 돼지에



서 19.4%의 성적과 비교해 볼 때 축종별로 다양한 차이가 인정되나 반추류에서는 유사한 것으로 나타났다.

CD8<sup>+</sup> cytotoxic T 세포는 helper T 세포에서 분비되는 IL-2와 MHC-class I 복합체에 의해 활성화 된다. 이렇게 활성화된 CD8<sup>+</sup> 세포는 바이러스 항원과 밀착된 MHC class I 항원을 감지함으로써 표적세포(target cell)에 직접 또는 간접적으로 작용하여 용해시켜 제거함으로써 바이러스 감염시 매우 중요한 역할을 한다<sup>24,33</sup>. 이러한 BoCD8<sup>+</sup> T 세포의 분포율은 한우와 젖소가 각각 17.4%와 16.9%로서 비슷한 결과를 나타내었다. 이는 Mackay<sup>25</sup>의 27%, Kathy 등<sup>26</sup>의 29%에 비해서는 다소 낮은 편이나 Harp 등<sup>28</sup>의 13~22%, Park 등<sup>27</sup>의 16.1~21.0%의 성적과는 매우 비슷한 수준을 나타냈다. 또한 Mackay<sup>25</sup>가 사람 13%, 면양 12%, Organ 등<sup>29</sup>이 랫트 23%, Dean 등<sup>30</sup>이 고양이 19.1%라고 보고한 성적과도 매우 유사한 것을 알 수 있다. 면역반응에 있어서 매우 중요한 것으로 알려진 BoCD4<sup>+</sup> 세포와 BoCD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 한우 1.7 그리고 젖소 1.2로 나타났는데 이는 사람(1.5~2.0), 소(1.2), 면양(1.7)에서의 성적과 매우 비슷한 것으로 나타났다<sup>25,29,30</sup>. 특히 한우에서는 젖소보다 높은 비율로서 BoCD4<sup>+</sup> T 림프구가 더 많은 것으로 사료된다.

모든 성숙 B 세포가 발현하는 sIgM에 대해서는 한우와 젖소가 각각 11.9% 및 9.7%의 분포율로 유의차가 없는 것으로 나타났는데 이것은 Mackay<sup>25</sup>의 35%, Park 등<sup>27</sup>의 16~26.4%, Davis 등<sup>16</sup>의 15~30%보다 낮은 것으로 나타났다. 또한 Mackay<sup>25</sup>가 다른 동물에서 면양 25%, 면양 12~28%, Paul 등<sup>34</sup>이 돼지에서 9.5%, Davis 등<sup>16</sup>이 면양 12~28%, 산양 10~17%, 돼지 10~17%, 말 12~17% 보다도 다소 낮은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 대상동물의 연령과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다<sup>35</sup>. Granulocyte와 monocyte에 동시에 특이적인 단크론항체를 이용한 분포율은 한우가 16.4%로 젖소(8.1%)보다 높게 나타났다. 이것은 Park 등<sup>27</sup>의 건유초기(early nonlactation)의 14.5%와 비슷하였으나 Davis 등<sup>16</sup>의 비유초기의 20~26%보다는 낮은 것으로 나타났다. 이러한 차이는 착유시기의 차이 때문일 것으로 판단된다.

한편 N 림프구는 종양과 바이러스성 발현세포에 대한 숙주방어의 제일선에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있어<sup>36</sup> N 세포에 대한 분포율을 조사

하였던 바 Wyatt 등<sup>35</sup>이 보고한 12% 보다 월등히 높은 비율을 나타냈으며, 이러한 결과는 우리나라 한우에서 특히 알려지지 않은 면역기능활성 기능이 있는 것으로 사료된다. N 림프구와 함께 활성화된 림프구 또는 large granular lymphocyte 등에서 분비되어 T 세포의 증식 및 분화를 유도하는 물질로 알려진<sup>37</sup> IL-2의 수용체 발현세포 분포율은 젖소에서 다소 높게 나타났으나, 이는 한우 및 젖소의 연령에 따른 것에 기인된 것으로 생각된다. 활성화된 림프구만이 발현하는 표면항원이 확인되어 발표된 바<sup>27</sup>, 활성화된 모든 N 세포와 BoCD8아군에 존재하는 ACT2 표면 항원 발현율은 한우에서 높은 분포율(12.1%)을 나타내었는데 이것은 Park 등<sup>27</sup>이 젖소 말초혈액에서의 1.5~2.9% 보다 매우 높게 나타난 것이며, 이는 한우에서 외부침습에 대한 면역기능이 이미 항진되어 효과적으로 대비하는 체제로 되어있다고 짐작할 수 있다. 또한 활성화된 BoCD4아군만이 발현하는 ACT3 항원에 대해서도 젖소(7.1%)에 비해서 한우(15.5%)가 높은 분포율을 보였던 바, 아직 활성화 림프구 기능 등에 대한 구체적인 연구가 되어 있지 않고 있는 현재로서는 명확한 판정을 하기가 어렵지만 한우에서 면역기전에서 중추 역할을 담당하는 T helper 세포의 기능항진을 예견할 수 있다. 따라서 앞으로 항진된 림프구를 분리하여 특정 항원과 반응시켜봄으로써 한우 특유의 면역형질을 파악할 수 있으리라 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 한우와 젖소의 면역체계는 서로 유사하였지만, 질병의 감수성과 내병성에 가장 깊은 관련이 있는 MHC class II 및 BoCD4 발현 림프구의 분포율과 활성화된 BoCD4<sup>+</sup> T 림프구의 분포가 젖소에 비해서 한우가 높은 것으로 밝혀졌다. 앞으로 유전면역학적 기법을 이용한 국내 한우의 특성을 정상우 및 질병감염에 따라 효과적으로 분석함으로써 한우의 우수성 및 고유성을 확인하는 한편, 우수한 유전인자를 발굴하여 이를 이용하는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

건강한 정상 한우와 젖소의 말초혈액 백혈구 아군별 분포율을 주조직적합체와 백혈구 표면항원에 특이적인 23종의 단크론항체와 flow cytometry를 이용하여 조

사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. MHC class I 표면항원을 발현하는 백혈구의 분포율은 한우와 젃소에서 각각 94.3%와 95.3% 였으며, MHC class II DP, DQ, DR에 대해서는 한우가 각각 15.9, 16.7, 19.0%의 분포율을 보였고, 젃소는 이보다 낮은 9.6, 8.8, 12.5%의 분포율을 나타내었다.

2. BoCD2 항원을 소유하는 세포의 분포율은 한우와 젃소가 각각 51.8%와 45.7%를 나타내었고 BoCD5 항원에 대해서는 각각 53.0%와 58.4%를 나타내었다. 또한 BoCD4 항원을 소유하는 세포의 분포율은 한우가 29.8%로 젃소 21.7%보다 높게 나타났으며, BoCD8 항원에 대한 분포율은 한우와 젃소에서 각각 17.4%와 16.9%로 매우 유사한 결과를 나타내었다.

3. B 세포 표면특이항원인 sIgM에 대한 분포율은 한우와 젃소에서 각각 11.9% 및 9.7%로 나타났다. 또한 면역글로빈의 L쇄를 코팅하는 kappa 유전자의 단크론항체에 대한 분포율이 한우와 젃소에서 각각 7.6%와 7.8%를 나타났으며, lambda 유전자에 대해서도 각각 17.7%와 10.7%의 분포율을 나타내었다.

4. 모든 N 세포가 소유한 TCR1-N12 molecule에 대한 분포율은 한우와 젃소에서 각각 20.2%와 36.3%로 나타났으며, N 림프구 두개의 그룹중  $\gamma\delta$  T 림프구 수용체를 공유하고 있는 TCR1(N6, N7)항원에 대해서는 한우가 모두 8.5%의 분포율을, 젃소는 이보다 높은 15.6%와 17.0%의 분포율을 나타내었다. 또한 WC1(N1, N2)항원에 대한 분포율은 한우에서 각각 10.8%와 12.0%를 나타내었으나 젃소에서는 이보다 높은 18.8%와 28.4%를 나타내었다.

5. ACT2 항원에 대한 분포율은 한우에서 12.1% 그리고 젃소에서 10.3%를 나타냈으며, ACT3 항원에 대해서는 젃소의 7.1%에 비해 한우에서 15.5%로 높은 분포율을 보였다. 또한 IL-2의 수용체에 대한 분포율은 한우 7.7%, 젃소 10.7%를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Bjotvedt G, Lee KW. A review of T-lymphocytes and their functions. *VM/SAC*, 77 : 1725~1728, 1982.
2. Tizard I. An introduction to veterinary immunology. 2nd ed. Philadelphia:WB Saunders Co, 74~118, 1982.

3. Higgins DA. Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet Bull*, 51 : 925~963, 1981.
4. Binns RM. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunopathol*, 3 : 95~146, 1982.
5. Outteridge PM, Binns RM, Licence ST. Subpopulations of pig blood E-rosette-forming lymphocytes and thymus-null cells: separation by nylon wool columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and antigen responsiveness. *Int Archs Allergy Appl Immunol*, 67 : 18~24, 1982.
6. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lymphocyte populations. I. Separation of porcine lymphocyte subpopulations. *Vet Immunol Immunopathol*, 1 : 215~224, 1980.
7. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lymphocyte populations. II. Characterization of porcine lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol*, 1 : 225~241, 1980.
8. Escajadillo C, Binns RM. Rosette formation with sheep erythrocyte: a possible T-cell marker in the pig. *Int Archs Allergy Appl Immunol*, 48 : 261~275, 1975.
9. Escajadillo C, Binns, R.M. Rosette formation of pig T lymphocytes with sheep erythrocytes. *Int Archs Allergy Appl Immunol*, 49 : 325~331, 1975.
10. Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol*, 133 : 368~375, 1984.
11. Lunn DP. A comparative review of human and equine leucocyte differentiation antigens. *Br Vet J*, 149 : 31~49, 1993.
12. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, et al. Ruminant leukocyte differentiation molecules In: Barta O, ed. *MHC, differentiation antigen, and cytokines in animal and birds. Monographs in Animal Immunol* Blacksburg, VA:BAR-LAB, Inc 47~70, 1990.
13. Binns RM, Pabst R, Licence ST. Subpopulations of T lymphocytes emigrating in venous blood draining

- munology*, 63 : 261~267, 1988.
14. Morrison WI, Davis WC. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4-CD8-T lymphocytes (WC1, WC2). *Vet Immunol Immunopathol*, 27 : 71~76, 1991.
  15. 류남선, 김종면, 송희중 등. 한우에서 면역조절세포의 활성화에 관한 연구. I. 말초혈액 림프구의 E rosette 형성능. *대한수의학회지*, 27 : 253~258, 1987.
  16. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*, 15 : 337~376, 1987.
  17. Parks DR, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Fundamental Immunol* 2nd ed. Raven press Ltd New York, 29 : 781~785, 1989.
  18. Bolin SR, McClurkin AW, Coria MF. Effects of bovine viral diarrhea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 46 : 884~886, 1985.
  19. Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol Today*, 11 : 406~410, 1990.
  20. Woldehiwet Z. Lymphocyte subpopulation in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Res Vet Sci*, 51 : 40~43, 1991.
  21. Biddison WE, Shaw S. CD4 expression and function in HLA class II-specific T cells. *Immunol Rev*, 109 : 5~16, 1989.
  22. Clever H, Machugh ND, Bensaid A, et al. Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4/CD8-negative T cell receptor  $\gamma$  *delta* positive T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 20 : 809~815, 1990.
  23. Born W, Happ MP, Dallas A. Recognition of heat shock proteins and cell function. *Immunol Today*, 11 : 40~43, 1990.
  24. Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing receptors. *Immunol Today*, 9 : 73~76, 1988.
  25. Mackay C. Sheep leukocyte molecules: a review of their distribution, structure and possible function. *Vet Immunol Immunopathol*, 19 : 1~20, 1988.
  26. Kathy LO, Reilly, Gary AS. Analysis of workshop antibodies to null cells in a non T/ non B lymphocyte population. *Vet Immunol Immunopathol*, 27 : 231~234, 1991.
  27. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretion during lactation. *J Dairy Sci* 75 : 998~1006, 1992.
  28. Harp JA, Kehrl ME, Hurley DJ, et al. Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Vet Immunol Immunopathol*, 28 : 29~37, 1991.
  29. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, et al. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. *Ann Surg*, 210 : 78~89, 1989.
  30. Dean GA, Quackenbush SL, Ackley CD, et al. Flow cytometric analysis of T-lymphocytes subsets in cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 28 : 327~335, 1991.
  31. 황의경, 임창형, Davis WC. 돼지의 혈액 및 림프계장기내 림프구의 아군에 관한 연구. I. 혈액, 비장, 장간막림프절, 악하림프절 및 편도 림프구의 아군별 분포율. *농업과학논문집*, 35 : 702~716, 1993.
  32. 황의경, 임창형, Davis WC. 돼지의 혈액 및 림프계장기내 림프구의 아군에 관한 연구. II. 회장과 공장의 Peyer's patches, 흉선 및 골수 림프구의 아군별 분포율. *농업과학논문집*, 35 : 720~732, 1993.
  33. Kaufmann SHE. Immunity against intracellular bacteria biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 198 : 141~176, 1988.
  34. Paul PS, van Deusen RA, Mengeling WL. Monoclonal precipitating antibodies to porcine immunoglobulin M. *Vet Immunol Immunopathol*, 8 : 311~328, 1985.
  35. Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, et al. Differential

- distribution of T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 40 : 187~199, 1994.
36. Herberman RB. Natural killer(NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Clin Immunol Rev*, 1 : 1~65, 1981.
37. Malkovsky M, Sondel PM, Strober W, et al. The interleukins in acquired disease. *Clin Exp Immunol*, 74 : 151~161, 1988.
-