

쥐의 태아 흉선 조직 배양을 이용한 면역조절제 검색방법 확립

이승각,[#] 송민동, 이광호^{*}

건국대학교 자연과학대학 분자생물학과

The Screening Condition for the Immune Regulatory Responser Using Mouse Fetal Thymic Organ Culture

Seung Gak Lee,[#] Min Dong Song and Kwang Ho Lee^{*}

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Kon-Kuk University,
Chung Ju, Chung Buk 380-701, Korea

Abstract - We studied the screening condition for immune regulatory responser. We focused on the T-lymphocytes for this purpose. Mouse fetal thymic organ culture (FTOC) system and flow cytometric analysis were mainly used in this experiment. Even if FTOC is carried out *in vitro* condition, the pattern of thymic development in the condition of FTOC is similar to that of *in vivo* condition. In this regard, FTOC system might be very powerful tool to screen the immune regulator, especially concerning on T cells. To establish the optimum condition of FTOC to screen the immune regulator, we focused on the optimum amount of dose and culture period. The cell number and surface antigens on T cells were also analysed by using hemacytometer and flow cytometer. To monitor the differentiation event, anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies were used. Alkoxyglycerol and Phellodendri Cortex were used for positive and negative control, respectively. *Astragalus membranaceus* was used as test sample. From our analysis, we reached to conclusions that the best dose of extract is 50 µg/ml of culture medium, the best culture period is for 9 days, and ethanol used as solvent has no toxicity to FTOC.

Key words - T lymphocytes; fetal thymic organ culture; immune regulator; flow cytometer.

항원에 대하여 체액성 면역과 세포성 면역은 평형을 이루면서 작용하여 항상성(homeostasis)을 유지하지만 체력의 약화 또는 항원의 과다 등에 의해 균형이 깨어짐으로써 병원 미생물의 감염, 아나피락시스 반응(천식, 닭마진, 비염 등), 과민증(hypersensitivity)(접촉 피부염, 결핵, 동종 이식편 거부

반응) 등의 질병을 유발 할 수 있다.¹⁾ 특히 현대 사회는 산업화와 환경 오염으로 인하여 내성이 생긴 세균, 신종 세균, 각종 알레르기 등의 질병이 증가하여 인류의 건강을 위협하고 있다. 따라서 이에 대비한 면역 조절제 개발에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

T 세포를 중심으로 면역 조절능을 검색하기 위하여 본 연구에서는 쥐의 태아 흉선 조직 배양법을 택하였다.^{2,3)} FTOC는 가능한 한 *in vivo*와 같은 조건을 부여한 상태로 *in vitro*에서 탐색을 행함으로써,

*교신저자 : Fax 0441-851-5235

[#]현주소 : 동신제약, 경기도 오산시 고현동 12.

연구 결과의 재현성과 많은 수의 screening이 적은 수의 mouse로 가능하다는 점, 시간적인 문제, 연구 진행 등을 고려 할 때 검색 대상이 많은 경우 적합하다고 본다. *In vitro*에서 유의성 있는 결과가 나올 경우는 *in vivo* 상태에서 확인해야 함은 물론이다. 이러한 FTOC는 T 세포의 증식과 분화를 연구하는데 있어 primary T 세포 배양의 난점을 극복하고, T 세포의 분화 활성 연구에 획기적인 방법을 마련하였다. T 세포는 흉선 자체에서 분비되는 thymopoietin,⁴⁻⁶⁾ thymulin⁷⁻⁸⁾과 같은 호르몬이 있기 때문에 호르몬의 영향을 받을 수 있다. 따라서 FTOC를 이용하여 세포간 상호작용, 분화, 조직 병리학, 생리학 등의 연구가 가능하다.⁹⁻¹²⁾

FTOC에 의한 배양후, T세포의 분석 방법은 lymphocytes의 표면 항원 및 수용체에 대한 단일 클론 항체와 flow cytometer를 이용하여 정량적으로 간편하게 측정 할 수 있다. 본 실험에서 면역 조절능의 검색을 위한 방법의 확립을 위해 사용한 검색 물질은 Alkoxyglycerol, *Astragalus membranaceus*(황기), *Phellodendri Cortex*(황백) 등을 사용하였다. Alkoxyglycerol은 심해 상어의 간에 다량 함유된 물질로서 현재 면역 증강제로 널리 사용되어지고 있고, *Astragalus membranaceus*는 예로부터 한방(韓方)의약에서 보혈 강장제로 사용되어져 오고 있으며, 면역학적인 측면에서 그 약효에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{13,14)} *Phellodendri Cortex*는 한방 의약에서 소염, 항생제로 쓰이며, 본 실험에서는 면역 억제능을 예상하고 사용하였으며, 황기와 마찬가지로 현재 그 효능이 활발히 연구되어지고 있는 천연물이다.¹⁵⁾

본 연구는 FTOC를 이용한 배양과 flow cytometer를 이용한 분석을 통하여 면역 조절제를 개발하기 위하여, 배양액에 처리할 후보 물질의 적절한 양, 후보 물질의 처리후 적절한 배양 기간을 확립하고, 또한 후보 물질을 포함한 용매의 독성 검사를 하여 면역 조절제 검색 방법을 확립함으로써 신속하고도 간편한 면역조절제의 screening 방법을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

· 실험 동물- 실험용 생쥐로는 6-8주령 된 C57BL/6 mouse(20g±2)를 생명과학연구소 또는 대한 실

험동물 센터에서 분양 받아 실험하였다. 실험 동물은 항온, 항습 장치가 설치된 사육장 내에서 온도 23℃±2, 습도 50%의 조건하에서 저녁 7시부터 새벽 5시까지 어둡게, 새벽 5시부터 저녁 7시까지는 밝게 유지하고 고품 사료와 물을 자유롭게 먹도록 공급하였다. 이런 환경에서 암컷을 임신시켜 임신 14일된 생쥐의 태아를 실험에 사용하였다.

검색 물질의 추출 및 분획-본 실험에서 사용할 검색 천연물인 황기, 황백의 추출 및 분획은 천연물 과학 연구소의 표준 추출법, 표준 분획 제조법으로 행하였다. 먼저 천연물을 잘게 부순 다음 일정량을 정량한 후 80% 메탄올(정량한 물질의 10배 첨가)에서 55℃, 3시간 동안 진탕(같은 방법으로 3회반복) 후, 그 여액을 모아서 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축하였다. 이 추출물을 동량의 CH₂Cl₂와 증류수를 이용하여 분획제조 하였다. 이때 수층은 동결건조 또는 감압농축하여 다시 증류수에 녹이고, 지층은 rotary evaporator를 이용하여 감압농축한 다음 70% 에탄올에 녹여 실험에 사용하였다. 이때 수층과 지층 모두 수율을 계산하였다.

FTOC-FTOC를 위한 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)내에 12% fetal calf serum(FCS)(Hyclon), 2 mM L-glutamine(Gibco), 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco), 100 µg/ml Gentamycin(Gibco), 110 µg/ml sodium pyruvate(Sigma), 50 mM 2-mercaptoethanol(ME)(Sigma), 10 mM(HEPES)(Gibco)를 첨가하고, sodium bicarbonate(GIBCO)를 이용하여 pH를 7.4로 조정하였다. 이 배양액을 0.22 µm pore size의 nitrocellulose filter(Sigma)를 이용하여 여과 시킨 후 4℃ 암소에 보관하며 사용하였다. serum은 56℃에서 30분간 heat-inactivation하여 사용하였다.

FTOC를 위한 plate는 6 well plate를 사용하였다. 6 well plate의 각 well에 배양액 5 ml을 첨가하고, 검색하려는 물질의 적당량을 첨가하였다. 그리고 가로, 세로 각각 1 cm, 높이 5 mm되는 gel foam(Upjohn)을 놓은 다음 흡수 팽창시켰다. 다음은 nuclepore filter를 70% 에탄올에 적셔 살균 시킨 후 따로 준비된 배양액에 행균 다음 gel foam 위에 얹어 놓았다. 최적 조건을 유지하기 위해 37℃, 5% CO₂ incubator에 pre-warm 시킨 후 사용하

였다. 위의 모든 실험은 무균 상태에서 행하였다.

임신 14일째 되는 mouse를 경추 탈골법을 이용하여 희생시킨 다음 70% 에탄올로 mouse 전체를 소독 하였다. 다음으로 배를 갈라 fetus가 들어 있는 태낭을 들어 낸 후, 태낭에서 fetus만을 꺼냈다. 꺼낸 fetus는 즉시 배양액에 넣어 보관하였다. 무균대에 stereo microscope를 설치하고, 멸균한 micro forcep을 이용하여 흉선을 적출 하였다. 적출한 흉선은 즉시 배양 plate의 nucleopore filter위에 올려놓았다.

위와 같은 방법으로 각 well에 5-6개의 thymic lobes를 올려놓고, 한 가지 검색 물질에 2개의 well을 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 실시하였고, 배양액은 3일에 한 번씩 배양액의 50%를 교환하였다.

T 세포의 분리 및 계수-배양된 thymic lobe로부터 T 세포를 분리하기 위해 nylon mesh를 이용하였으며 분리된 T 세포의 수를 세기 위하여 hemacytometer를 이용하였다.

세포 표면항원 염색-Suspension된 T세포를 1×10⁶개로 정량 한 후 FITC가 conjugate된 anti-CD3-FITC (Pharmingen)을 이용하여 분석하였다. Flow cytometer는 FACScan(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain view, CA, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다.

결 과

FTOC를 실시하면서 각각 시료의 양과 배양 기간을 달리하여 T 세포의 수를 계수하고, anti-CD3-FITC를 T 세포에 surface staining하여 flow cytometer로 분석하였다. 시료의 농도는 1, 10, 50, 100 µg/ml로 달리 하였고, 배양 기간은 5, 7, 9, 11일로 하였다. 검색한 물질로는 Alkoxyglycerol, *Astragalus membranaceus*, Phellodendri Cortex 추출물을 사용하였다. 이하 Alkoxyglycerol은 Alk, *Astragalus membranaceus* 추출물은 Ast 그리고 Phellodendri Cortex 추출물은 Phe로 표기한다.

배양 기간과 검색 물질 dose에 따른 T 세포의 계수-FTOC를 위와 같이 실행 한 후 흉선으로부터 T 세포를 분리하여, 0.4% trypan blue로 염색 한 후 hemacytometer를 이용하여 계수 하였다. Fig.

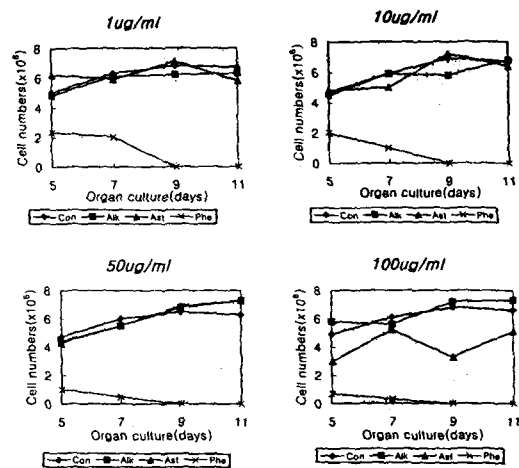


Fig. 1. Total cell counts per individual sample. 1, 10, 50, 100 µg/ml of samples were added and cultivated for indicated days. 8-10 lobes were taken at every two days from day 5, 7, 9, 11, and cell numbers were counted. Alk, Ast and Phe indicate Alkoxyglycerol, *Astragalus membranaceus* and Phellodendri Cortex, respectively. Con indicates control.

1은 Alk, Ast, Phe을 각각 1, 10, 50, 100 µg/ml를 배양액에 넣고 각각 5, 7, 9, 11일간 배양하여 계수한 결과이다.

Fig. 1을 볼 때 배양액만을 넣어 배양한 대조구는 9일째 최대 세포 수를 나타내고 있다. Mandel에 의하면 FTOC 7일째 최대 세포 수를 나타내고 있는데, 1) Mandel은 배양 조건을 37°C, CO₂ 10%로 하였으나, 본 실험에서는 CO₂ 농도가 5%이었기 때문에 성장이 다소 늦어진 것으로 사료된다. Alk, Ast 역시 각 시료의 양에 관계없이 배양 기간 9일에 최대 세포 수를 나타내고 있으나, Phe의 경우, 9일 배양 후 거의 모든 세포가 죽어 대조적인 면을 보이고 있다. 또한 Alk, Ast의 경우 대조구보다 세포의 수가 약간씩 많음을 볼 수 있다.

Fig. 1을 통하여 각 시료의 양의 관계를 살펴 볼 때 Alk의 경우 양의 증가에 따라 세포의 수가 약간씩 증가됨을 보이고 있다. Ast의 경우 1, 10, 50 µg/ml까지는 양의 증가에 따라 세포 수가 증가됨을 볼 수 있었으나 100 µg/ml에서는 세포 수가 급격히 감소됨을 보여 주었다. Phe은 양의 증가에 따라 세포 수의 급격한 감소를 보이는 것으로 보아 T 세포에 치명적인 독성이 있는 것으로 사료된다.

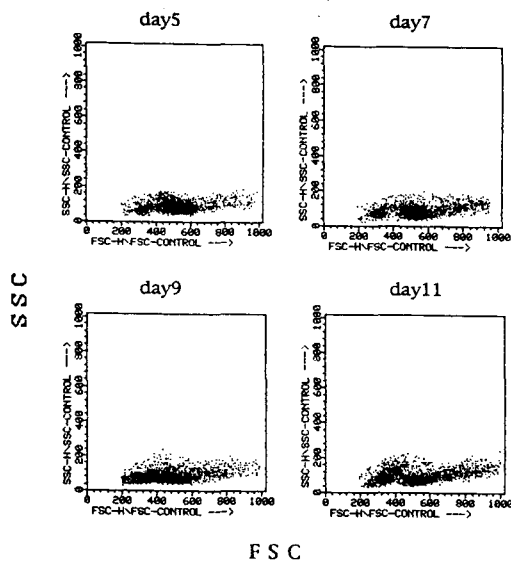


Fig. 2. Morphological change during FTOC. Samples cultivated for indicated periods were taken, and morphological changes were determined by the manner of SSC and FSC.

배양 기간과 검색 물질 dose에 따른 T 세포의 변화-FTOC를 통하여 각각 시료에 대한 양과 배양 기간에 따른 T 세포의 분화를 측정하기 위하여 anti-CD3 항체와 flow cytometer를 이용하였다. FTOC

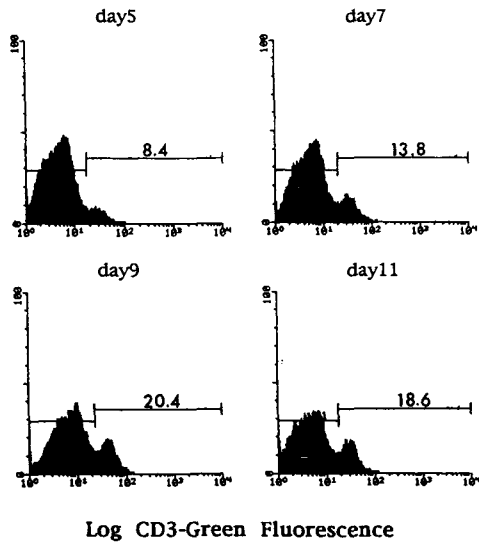


Fig. 3. CD3 expression during FTOC. Day 14 fetal thymic lobes were cultivated for indicated period in culture medium, and thymocytes were stained with anti-CD3-FITC, and analysed with flow cytometer.

를 통하여 배양액만으로 배양한 대조구에서는 T 세포의 형태학적 변화에서 모양의 변화(SSC)보다는 크기의 변화(FSC)가 더욱 현저하게 보이고 있다 (Fig. 2). 5일 배양에는 주로 T 세포의 크기가 작은 것이 많으며, 7, 9일 배양에는 T 세포의 크기가 큰 것이 많다. 11일 배양에는 T 세포의 크기가 작은 것과 큰 것이 뚜렷이 구분되는 것을 볼 수 있다. Fig. 3은 대조구의 T 세포에 anti-CD3-FITC로 staining한 것으로, 배양일을 달리하여 배양한 후 flow cytometry로 분석하였다. 배양 기간이 지남에 따라 CD3⁺가 증가하며, 11일째 CD3⁺의 T 세포가 최고에 있다가 11일 부터는 약간씩 감소 하고 있다. Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 Phe를 제외하고는 검색 시료의 첨가시 모두 대조구보다 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 나타나고 있다. 특히 Ast의 경우는 1 µg/ml의 첨가시 CD3의 비율이 아주 높게 나

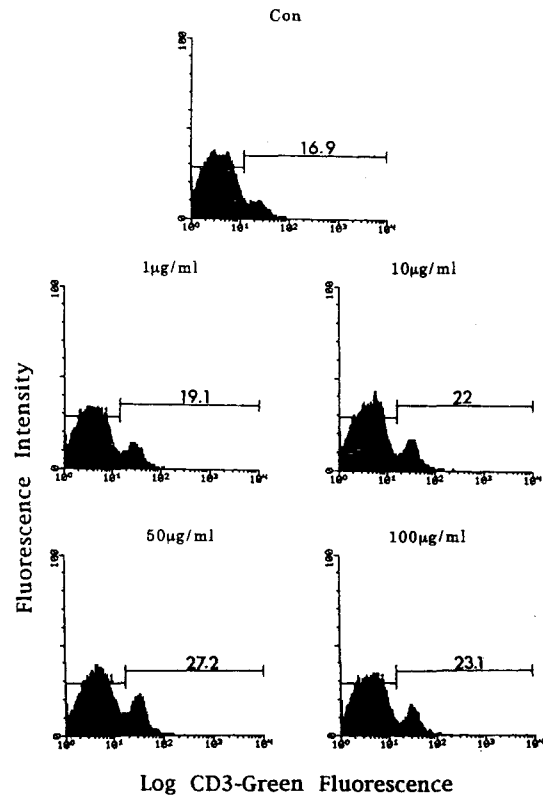


Fig. 4. CD3 expression with different amount of Alk. Day 14 fetal thymic lobes were cultivated for 9 days with indicated amount of Alkoxyglycerol (Alk), and thymocytes were stained with anti-CD3-FITC, and analysed with flow cytometer.

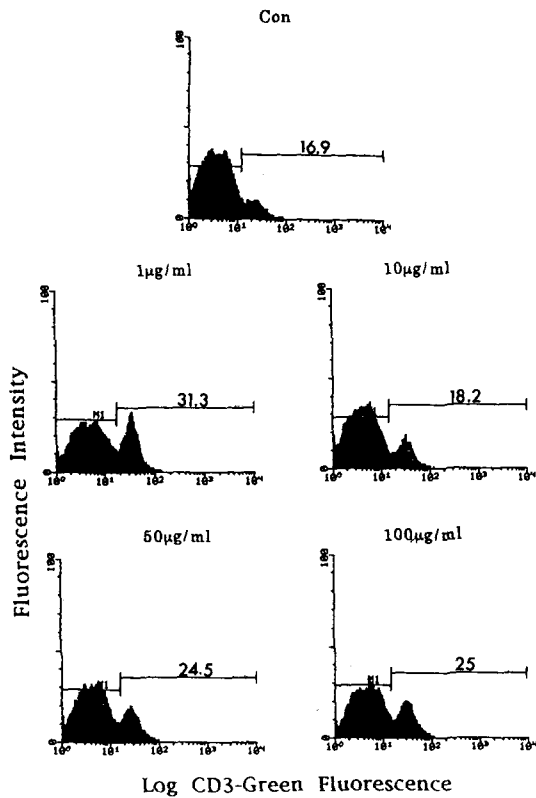


Fig. 5. CD3 expression with different amount of *Astragalus membranaceus*(Ast). Day 14 fetal thymic lobes were cultivated for 9 days with indicated amount of Ast, and thymocytes were stained with anti-CD3-FITC, and analysed with flow cytometer.

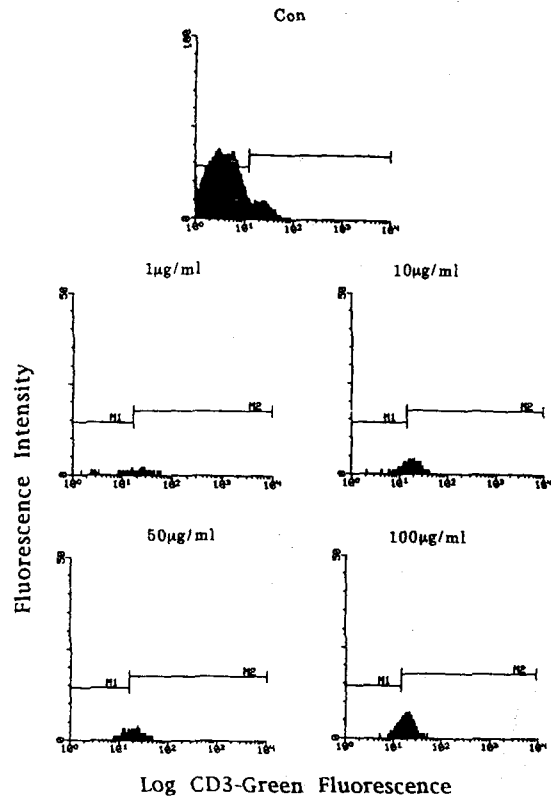


Fig. 6. CD3 expression with different amount of Phellodendri Cortex(Phe). Day 14 fetal thymic lobes were cultivated for 9 days with indicated amount of Phe, and thymocytes were stained with anti-CD3-FITC, and analysed with flow cytometer.

타나고 있다. Alk의 경우는 1, 10, 50 µg/ml 첨가 순으로 CD3의 비율이 높아지다가 100 µg/ml 첨가 때에는 약간 감소함을 보이고 있다. Phe의 경우는 세포가 모두 죽었기 때문에 분석이 불가능하다(Fig. 6).

위의 세포의 계수와 CD3의 분포를 배양일과 양을 달리하여 조사해 본 결과, 각 시료마다 차이를 볼 수 있으며, 특정한 양에서 CD3의 분포가 많이 변화하는 것도 있으나, 우선 다수의 후보 물질을 1차적인 검색을 실시 할 때에는 배양일은 9일, 검색 물질의 첨가량은 50 µg/ml을 하는 것이 검색 물질의 일반적인 효과를 가장 정확하게 볼 수 있으리라 사료된다.

검색 물질이 녹아 있는 용매의 독성 검사-용매가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 대조구와 추출물을 녹인 용매(ethanol)만으로 FTOC와 flow cytometer로 분석한 결과 세포수 및 CD3⁺ 분포가 두

경우에서 모두 흡사하게 나온 것을 보여 주었다. 결론적으로 추출물을 녹일 때 사용하는 ethanol은 검색 물질의 분석에 아무런 영향을 미치지 않는다고 사료된다.

고 찰

인체에 있어 질병의 해결은 주로 면역계에서 담당하고 있다. 이러한 이유로 최근 의약 또는 식품 개발에 있어 면역 조절, 면역 강화에 목표를 둔 제품 개발이 활발히 진행 중이다. 그러나 아직 면역계의 복잡성, 연계성 때문에 구체적인 연구가 상당히 어려운 실정이다.

현재 면역 조절 효과가 있는 물질은 Alkoxyglycerol, Thymomodulin, Tranilast, Interleu-

kin, Glycophosphopeptical, Thymus extract 등을 들 수 있다. 이들 물질은 대부분 흉선이나 T 세포에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며, 실제로 T 세포의 분화, 증식이 면역계에 미치는 영향은 매우 크다고 할 수 있다. 본 실험을 T 세포에 중점을 둔 것도 이와 같은 이유에서이다.

본 실험에서 배양 방법으로 택한 FTOC는 T 세포의 연구에 획기적인 공헌을한 방법으로 T 세포만을 키우는 세포 배양 보다 더 구체적이고 확실한 연구가 가능하다. 특히 T 세포의 증식,¹⁶⁾ 분화¹⁷⁾ 등이 1970년 말부터 이 방법을 이용하여 현재까지 활발히 연구되고 있다. 물질 탐색의 연구도 IL-2, IL-4, phenylephrine, nucleotide 등이 lymphopoiesis에서 T 세포의 변화에 미치는 연구 등 FTOC를 이용한 연구는 T세포의 분야에서 많은 발전을 가져왔다.¹⁸⁻²¹⁾

본 실험의 분석에 flow cytometer를 이용하였으며, 본 실험에서 사용한 anti-CD3-FITC는 성숙한 T세포에 발현하는 분자이다. 그외 anti-CD4 및 anti-CD8에 대한 항체를 이용하여 동일한 실험을 하였으나 anti-CD3와 유사한 결과를 얻었다.

본 실험으로 FTOC의 배양 기간과 시료의 양에 대한 기준을 찾을 수 있었으나, 물질의 1차 검색 후 유효성이 발견된 물질의 경우는 더욱 세밀한 배양 기간에 따른 연구도 필요하다고 본다. 일반적으로 검색 물질의 어떤 작용에 대한 효과를 검색하는데 세포 배양 또는 다른 *in vitro*의 실험에서 단일 물질 또는 정제된 물질일 경우 1-50 µg/ml을, 정제되지 않은 경우에는 10-200 µg/ml 정도의 물질을 첨가하여 검색을 한다. 본 실험에서도 50 µg/ml이 정제된 물질이나, 정제되지 않은 물질의 경우에도 적합하다는 실험 결과를 얻었다. 만약 1차 검색에서 유효성이 보인다면 다양한 범위의 양에서 검색이 이루어져야 함은 물론이다. 또한 본 검색 방법을 이용하여 유효성이 밝혀지면, *in vivo*에서의 검색이 병행되어야 한다고 본다.

본 실험을 통한 면역 조절능 검색 방법의 확립으로 천연물에 대한 면역 조절제의 검색이 재현성있고 체계적으로 수행 가능하리라 기대된다.

사 사

본 연구는 1995년도 건국대학교 학술진흥 연구비 지원과 한국과학재단 연구비 일부의 지원에 의한 논

문입니다.

인용문헌

1. Stites, D. P. and Terr, A. I. (1991) Basic and Clinical Immunology, 1. Appleton & Lange, East Norwalk.
2. Auerbach, R. (1960) Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. *Develop. Biol.* 2: 271-284.
3. Flynn, D., Yang, J. and Nandi, S. (1982) Growth and differentiation of primary culture of mouse mammary epithelium embedded in collagen. *Differentiation* 22: 191-194.
4. Bach, J. F., Goldstein, G. and Wigzell, H. (1986) The role of thymic hormones in T cell differentiation, immune regulation by characterized polypeptides, 245-258. Alan R. Liss, New York.
5. Heavner, G. A., Goldstein, G., Bach, J. F. and Wigzell, H. (1986) Structure-function studies of thymopietin: Immune regulation by characterized polypeptides, 93-100. Alan R. Liss, New York.
6. Denes, L., Szende, B., Hajos, G., Szporny, L. and Lapis, K. (1990) Selective restoration of immunosuppressive effect of cytotoxic agents by thymopietin fragments. *Cancer Immunol.* 32: 51-54.
7. Burstein, Y., Buchner, V., Pecht, M. and Trainin, N. (1988) Thymic humoral factor $\gamma 2$: Purification and amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus. *Biochemistry* 27: 4066-4071.
8. Stutman, O. and Bach, J. F. (1983) Role of thymic hormones in T cell differentiation: Clinics in immunology and allergy, Vol. 3, 9-82. WB Saunders, Philadelphia.
9. Rho, C., Robson, H. and Jenkinson, E. J. (1983) Flow microfluorometric analysis of mouse thymus development *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 13: 185-190.
10. Rho, C. (1988) Differentiation potential of 14-day fetal mouse thymocytes in organ culture: Analysis of CD4/CD8-defined single-positive and double-negative cells. *J. Immunol.* 141: 355-362.
11. Mandel, T. H. and Kennedy, M., M. (1978) The differentiation of murine thymocytes *in vivo* and *in vitro*. *Immunology.* 35: 317-331.
12. Dardenne, M. and Bach, J. F. (1988) Functio-

- nal biology of thymic hormones. 1. The micro-environment of the human thymus, 101-116. Harword Academic Publications, London.
13. Rittenhouse, J., R., Lui, P., D. and Lau, B., H. (1991) Chinese medicinal herbs reverse macrophage suppression induced by urological tumors. *L. Urol.* 146: 486-490.
 14. Zhao, K., S., Mancini, C. and Doria, G. (1990) Enhancement of the immune response in mice by *Astragalus membranaceus* extracts. *Immunopharmacology* 20: 225-233.
 15. Mori, H., Fuchigami, M., Inoue, N., Nagai, H., Koda, A., Nishioka, I. and Meguro, K. (1995) Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response: Effect of phellodendrine on cellular and humoral immune responses. *Planta Med.* 61: 45-49.
 16. Skinner, M., A., Moffatt, L. and Marbrook. (1993) Development of thymocytes in organ culture: migrant cell with natural killer cell characteristics. *Immunology* 151: 5887-5895.
 17. Kiesielow, P., Leiserson, W. and Boehmer, H., V. (1984) Differentiation of thymocytes in fetal organ culture: Analysis of phenotypic changes accompanying the appearance of cytolytic and Interleukin-2 producing cells. *J. Immunol.* 13: 18.
 18. Hardt., C., Fleisher, M., S., Steinmetz, M. and Wagner, H. (1986) Detection of rearranged T cell receptor β -chain gene and induction of cytolytic function in interleukin 2-responsive day 14-15 murine fetal thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 16: 1087-1092.
 19. Plum, J., Smedt, M., D., Leclercq, G. and Tison, B. (1990) Inhibitory effect of murine recombinant IL-4 on thymocyte development in fetal thymus organ cultures. *J. Immunol.* 145: 1066-1073.
 20. Singh, U. (1980) *In vitro* Lymphopoiesis in foetal thymic organ cultures: Effect of various agents. *Clin. Exp. Immunol.* 41: 150-155.
 21. Jenkinson, E., J., Franchi, L., L., Kingston, R. and Owen, J., J., T. (1982) Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment *in vitro*: Application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur. J. Immunol.* 12: 583-587.

(1997년 11월 12일 접수)