韓家衛誌 第22卷 第4號
Korean J Vet Serv(1999) 22(4) : 377~383

반추동물에서 과립구의 기능에 대한 연구
1. 소의 순환혈액에서 다형핵백혈구의 신속한 분리

박일규, 윤창용*, 이정원**, 송희종***

충청남도 보건환경연구원 공주지소, 식품의약품안전청 병리부*
전라북도 축산진흥연구소 익산지소**, 전북대학교 생체안전성연구소***

Functional studies of granulocytes in ruminants
1. Rapid separation of polymorphonuclear leucocytes from circulating blood in bovine

Il-Kyu Park, Chang-Yong Yoon*, Jeoung-Won Lee**, Hee-Jong Song***

Kongju branch, Chungnam Public Health & Environmental Research Institute,
Department of Pathology, Korea Food and Drug Administration,*
*Iksan branch, Chonbuk Livestock Development and Research Institute***,*
*Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University****

Abstract

Polymorphonuclear (PMN) leucocytes are fundamental importance to the body's defense mechanism and play a major role in the local and systemic reactions to infectious disease. Investigation of the physiological and pathological role of the various leucocyte subtypes in host defence mechanisms is dependent upon the isolation of adequate numbers of viable, pure leucocyte fractions.

This report describes the separate frequency of PMN leucocytes both from buffy coat layer and from packed RBC layer when bovine peripheral blood was treated with various anti-coagulants such as acid-citrate-dextrose(ACD), ethyldiaminetetraacetic acid(EDTA), sodium citrate and heparin.

The separate frequencies of PMN leucocytes from buffy coat layer was 60.4±9.6%(heparin), 56.8±11.8%(sodium citrate), 30.6±14.1%(ACD) and 6.2±3.7%(EDTA), in order. Those from packed RBC layer monitored with EDTA, ACD, sodium citrate and heparin was 85.0±4.7%, 84.3±5.5%, 83.8±6.5% and 76.3±7.7%, respectively.

The Ficoll-hypaque(FH) density gradient method was used to remove a small part of lymphocytes and/or monocytes from leucocytes in packed RBC layer. With the result that it increased separate frequency of PMN leucocytes from EDTA(89.9±2.4%), ACD(89.5±3.6%), and sodium citrate(83.6±10.3%) than heparin(68.4±13.9%).

These results indicate that the use of EDTA and ACD as anticoagulant is suitable for the separation of PMN leucocytes from bovine peripheral blood, and that the FH density gradient method is able to increase the separate frequency of PMN leucocytes from packed RBC layer.

Key words : Bovine, PMN leucocyte isolation, Anticoagulants, Centrifugation.

서 론

신체의 방어기구에 있어서 백혈구군의 중요성이 확인된 이후, 이들 세포군이 질병에 대한 국소 및 전신적 반응에 있어 중추적인 역할을 하고 있음은 주지의 사실이 되었다. 여러 백혈구 중, 특히 다형핵(PMN) 백혈구는 체내로 침입한 미생물의 식작용과 파괴가 그 주요 기능이다. PMN 백혈구의 이와 같은 기능은 숙주동물을 미생물의 감염으로부터 보호하는데 중요한 역할을 하기 때문에, 선천적 또는 후천적으로 PMN 백혈구의 기능에 손상을 받게 되면 병원체의 감염에 대한 감수성이 증가하게 된다[1, 2]. 만약 이러한 상태에 놓이게 되면 순환혈액내 PMN 백혈구의 분리와 탐식능을 측정하는 일련의 시험관내 실험이 요구된다[2~6].

한편, 숙주에서 질병발생기전 또는 질병에 대한 방어에 있어서 백혈구아형들의 생리학적 및 병리학적 역할에 대한 연구를 위해서는 적정량의 생존하는 순수백혈구를 분리하여야만 가능하다. 그러나 여러동물 중 특히 반추동물인 소에서의 이와같은 요구는 적혈구침강속도가 느리기 때문에 매우 까다롭다[7~9]. 따라서 침강법 또는 개량된 침강법에 기초를 둔 방법들은 소혈액으로 부터 순수한 백혈구군을 분리하는데 좋은 방법은 되지 못하였다[10].

이에, 소혈액으로 부터 PMN 백혈구를 분리하는 방법으로 buffy coats, silicone fluids, RBC용해법, 부유 침강법 등 다수의 방법이 개발되어 이용되어 왔다[7]. 그러나 이러한 방법으로서는 최고 60% 수준의 분리율을 보이고 분리하는 시간이 긴 단점들이 있어 이러한 점을 보완하면서 보다 효율적인 방법이 요구된다. 더우기 과립구의 평균 수명은 10일 이내이며, 특히 혈중에서는 6~10시간 존재하는 바[9], 이 세포의 분리과정에 특수장비가 요구되지 않고, 단순하면서 짧은 시간내에 얻을 수 있는 방법이 개발되어 소기의 시험관내의 실험을 수행할 수 있어야 된다고 본다.

따라서 이 실험에서는 반추동물에서 PMN백혈구의 기능적 연구를 수행하기 위한 기초실험의 일환으로 먼저 소를 대상으로 여러종류의 항응고제로 처리한 정맥혈을 이용 이들 항응고제 처리군 각각의 buffy coat층 내 및 packed RBC층내의 PMN백혈구의 순수분리 성적을 검토하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

항응고제

실험에 사용한 항응고제는 acid-citrate-dextrose(ACD), ethyldiaminetetraacetic acid (EDTA), heparin 및 sodium citrate이며, 이들은 적합한 용매에 녹여 사용하였다.

실험혈액

전주시 팔복동소재 도축장에서 외견상 건강한 한우를 대상으로 경정맥에서 상기한 항응고제를 처리한 주사기를 이용하여 각각 50ml를 채혈하였다.

백혈구 분리

백혈구는 Roth and Kaeberle[3] 및 Carlson

and Kaneko의 방법[7] 을 다소 보완하여 Fig 1에서 보는 바와 같이 buffy coat층내의 것과 packed RBC내의 것을 각각 구분하여 분리하였다. 요약하면 백혈구는 먼저 각종 항응고제를 처리하여 채혈한 혈액을 동량의 phosphate buffered saline solution(PBS, pH 7.2)과 혼합한 다음, 실온에서 1,000g로 15분간 원심하여 buffy coat층과 packed RBCs 부분을 분리하였다. 이어서 packed RBCs층의 하단부분은 18G/A needle을 부착한 주사기를 이용하여 흡인하였다.

그 후 증류수를 이용 hypotonic shock법으로 10~20초간 처리하여 RBCs를 파괴한 다음, 즉시 2×PBS를 첨가·혼합하여 salt balance를 맞추었고, 이어서 200g로 10분씩 2회 원심세척하였다. 한편, packed RBCs층에서 분리한 세포는 ficoll-hypaque(FH, d=1.083, Sigma) 원심구배법으로 400 g에서 10분간 원심하였다.

이상의 과정에서 분리된 세포의 생존율은 trypan blue dye exclusion test를 실시한 바 99% 이상이었다.

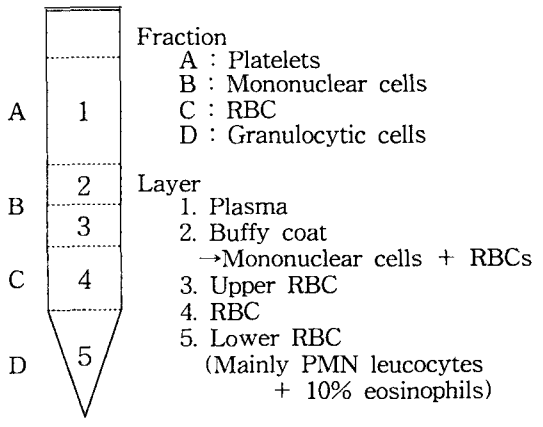

Fig 1. Blood cells distribution after centrifugation(1,000g for 15 minutes)

백혈구 수 및 백분율

분리된 백혈구의 총수는 hemocytometer 및 coulter counter를, 백혈구 백분율은 도말표본을 만들고 Giemsa's염색을 실시한 다음 검경하여 계산하였다.

결 과

Buffy coat층 내의 총백혈구수 및 분포도

항응고제 처리에 따른 buffy coat층 내의 총백혈구는 Table 1과 같이 heparin, sodium citrate, ACD 및 EDTA순으로 분리되었으며, PMN백혈구의 분포도는 heparin(60.4±9.6%), sodium citrate(56.8±11.8%), ACD(30.6±14.1%) 및 EDTA(6.2±3.7 %)순으로 나타나 heparin 처리군에서 PMN백혈구의 분포도가 높았다.

전혈 및 packed RBC층내의 총백혈구수 및 백분율

전혈중의 총백혈구수는 채혈 즉시 coulter counter로 측정하였으며, 처리군 각각의 항응고제의 함량을 조정하기 위하여 첨가된 용매의 량을 감안하면 항응고제 모두 비슷한 결과를 보였다. 그러나 packed RBC층 내의 총백혈구수는 처리된 항응고제에 따라 많은 차이를 보였고, 그 결과는 ACD, EDTA, sodium citrate 및 heparin순으로 나타났다.

한편, packed RBC층내의 PMN백혈구의 분포는 ACD, EDTA 및 sodium citrate처리군에서 서로 유사한 결과를 보였으나 heparin처리군의 경우 PMN백혈구의 분포가 다른 항응고제 처리군에 비하여 낮게 나타났다(Table 2).

Packed RBC층내의 백혈구 분리 후 ficoll-hypaque밀도구배법 처리에 의한 PMN백혈구의 분리빈도

Packed RBC층에 있는 백혈구를 분리한 후 이에 포함된 다수의 monocytes와 소수의 림프구를 효과적으로 제거하여 PMN백혈구의 분리

Table 1. Differential counts of leucocytes in buffy coats of peripheral blood in Korean cattle

	ACD	EDTA	Sod citrate	Heparin
Total WBC in buffy coats(No. × 10^6/ml)	14.1± 4.1*	7.1± 4.8	25.1±13.8	30.1±11.3
Neutrophils(%)	30.6±14.1	6.2± 3.7	56.8±11.8	60.4± 9.6
Monocytes(%)	16.7± 7.0	25.9±10.0	17.1± 5.8	14.2± 5.6
Eosinophils(%)	19.6± 8.2	5.2± 4.2	12.2± 4.1	11.1± 5.4
Lymphocytes(%)	31.8±17.0	58.8±13.9	12.0± 7.5	12.3± 5.5

Bovine blood was collected in tubes treated with various anticoagulants and diluted 1 : 1 with phosphate buffered solution(PBS, pH 7.2). Anticoagulated blood was centrifuged at low speed and the white buffy coat ring thus formed was aspirated by means of a disposable pasteur pipette. RBCs in buffy coat cells were removed by hypotonic shock with distilled water or Gey's solution treatment and then differential count of WBCs was examined

* : Values are expressed as M±SD from 10 cattles.

Table 2. Differential counts of leucocytes in pheripheral blood and packed RBC layers after ficoll-hypaque treatment

	ACD	EDTA	Sod citrate	Heparin
Whole blood ($10^3/\mu\ell$)	8.4 ± 1.3*	11.3± 1.8	9.5± 1.7	11.6± 4.6
No. of WBC in packed RBC (No. × 10^6/ml)	41.8 ±17.9	34.2±15.2	13.0±12.5	5.5± 3.4
Before FH				
Neutrophils (%)	84.3 ± 5.5	85.0± 4.7	83.8± 6.5	76.3± 7.7
Monocytes (%)	10.7 ± 3.4	12.2± 3.1	9.3± 4.2	8.4± 3.7
Eosinophils (%)	4.2 ± 3.9	2.2± 1.9	5.8± 5.6	7.2± 3.4
Lymphocytes (%)	0.8 ± 0.9	0.6± 0.9	1.0± 0.9	7.9± 5.6
After FH				
Neutrophils (%)	89.5 ± 3.6	89.9± 2.4	83.6±10.3	68.4±13.9
Monocytes (%)	6.5 ± 2.1	8.7± 2.1	9.7± 5.0	15.1± 7.1
Eosinophils (%)	4.1 ± 3.2	1.3± 1.2	6.5± 7.9	10.8± 4.4
Lymphocytes (%)	0.06± 0.1	0.1± 0.1	0.2± 0.3	5.7± 5.6

Bovine blood was collected, diluted and centrifuged at 1,000g for 20 minutes thus formed the deepest packed RBC layer was aspirated by means of a syringe attached with 18G/A needle. Carefully 2 volumes of diluted blood were laid over 1 volume of FH and it was centrifuged at 400g for 20 minutes in a swinging rotor at room temperature.

* : Results were the average percent and standard deviation of the values from 8 - 10 experiments(M ± SD).

빈도를 높이고자 FH 밀도구배법을 이용한 바 ACD와 EDTA 처리군은 PMN백혈구의 분리 빈도가 증가되었으나 sodium citrate와 heparin 처리군은 오히려 감소되었다(Table 2).

고 찰

숙주의 미생물감염에 대한 방어기전에 있어서 PMN 백혈구의 기능들을 in vitro에서 연구하기 위해서는 적절한 양의 순수세포의 분리가 선행되어야만 된다. 그러나 반추동물에 있어서 이러한 요구조건은 RBCs 침강속도가 너무 느려 충족시키지 못하여 왔다[11]. 그리하여 반추류에서 PMN 백혈구만을 분리해 내기 위하여 서론에서 언급한 다양한 방법들이 개발되어 이용되어져 왔지만, 이러한 방법들은 순수분리도가 약 60% 수준에 그칠 뿐이었다[7].

따라서 사람을 포함한 단위동물에서 최근에 자주 활용되고 있는 ficoll-hypaque (FH)원심구배법[12~14]을 적용하여 보면 다음과 같은 결과를 얻을 수 있다. 즉, 소의 순환혈액으로부터 PMN백혈구를 분리하기 위하여 전혈을 FH 위에 중층한 다음 400g로 20분 또는 30분간 원심분리하고, 그 결과를 시험관의 입구에서 아래쪽으로 층별을 순서대로 기술하면, ① 혈장과 혈소판, ② 주로 림프구 그리고 단핵구 및 소수의 과립백혈구, ③ FH, ④ 주로 PMN백혈구와 eosinophil과 같은 과립백혈구, ⑤ RBC 그리고 소수의 과립구와 밀도가 높은 림프구가 분포하고 있음을 알 수 있다. 이때 원심력을 증강(1,000g)시켜 보면, 과립백혈구들과 구배밀도가 높은 림프구는 대부분 packed RBC층의 하부로 이동함을 알 수 있다.

이 실험의 결과를 보면, 사용한 항응고제 별로 packed RBCs층 내에서 PMN백혈구의 순수분리도를 비교할 때, ACD, EDTA, heparin, sodium citrate 순으로 나타나, 항응고제의 선택이 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

그리고, 혼입된 RBC를 hypotonic shock방법으로 용혈할 때 백혈구막의 손상[3, 7]이 우려되고, 한편으로는 특종의 림프구아군에서 대사작용 및 형태학적인 변형이 유발됨도 보고되었다[14]. 그러나, 이 실험에서 확인한 결과에서는 2~3회 세척하는 과정에서 손상 받은 세포가 거의 제거되고 있음을 trypan blue dye exclusion test로 확인할 수 있었고, 한편으로는 림프구와 단핵구는 FH density gradient법을 이용한 진행된 실험에서 어느 정도를 제거할 수 있음으로서 순도높은 PMN 백혈구 분리가 가능하였다.

따라서 이 실험의 방법으로 분리하였던 PMN 세포들을 대상으로 세균의 탐식능에 대한 예비실험을 실시한 바 매우 활발한 식균능이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Carlson과 Kaneko[7]가 hypotonic shock 방법으로 분리한 PMN백혈구를 이용한 세균의 탐식능, PHA에 의한 자극시험, 광학 및 전자현미경적 소견에서 막구조에 손상이 없고, trypan blue dye exclusion test에서 기능적 생존율에 변함이 없음을 보고한 경우와 같다 하겠다.

이상을 요약하면, PMN백혈구 분리가 목적인 경우에는 먼저 항응고제를 처리한 전혈을 동량의 완충용액과 혼합한 다음 1,000g의 원심력을 15~20분간 가하고, 이어서 packed RBCs 윗부분까지를 조심스럽게 제거하고, packed RBCs 아래 부분을 흡인하여 RBCs를 파괴하면 소기의 목적을 얻을 수 있다. 따라서 실험과정의 단순함과 특수장비의 요구가 되지 않으면서, 단순한 실험과정으로 약 1시간 이내에 PMNs의 순수 분리도가 90% 수준까지 이루어지고 있어 목적하는 실험에서 즉시 활용할 수 있게 되었다.

한편, PMN백혈구의 기능적 연구를 수행함에 있어서 혼입된 다른 백혈구의 작용에 의해 야기될 수 있는 side effects를 없애기 위해서

는, PMN백혈구의 분리도를 더욱 높일 수 있는 방법에 대한 연구가 요구된다. 즉, 혼입된 eosinophil을 제거할 수 있는 방법으로서 eosinophil에 대하여만 특이적으로 반응할 수 있는 단일항체와 보체를 결합하는 complement mediated eosinophil lysis 방법을 적용하거나, 또는 PMN세포의 부착능을 이용한 일련의 실험을 병행한다면, 더욱 순수한 분리가 가능할 것으로 추측되어 추가 실험이 요구되었다.

결 론

한우의 순환혈액내에서 PMN 백혈구의 순수분리를 위한 기초적 실험을 수행하였다. 여러 종류의 항응고제를 처리한 정맥혈을 이용하여 이들 항응고제 처리군 각각의 buffy coat 내 및 packed RBC layer 내와 여기에 혼입된 monocytes와 lymphocytes를 효과적으로 제거하고자 ficoll-hypaque(FH) 밀도구배법을 적용하여 PMN백혈구의 순수분리빈도를 각각 비교하였다.

Buffy coat층 내의 PMN 백혈구 분리빈도는 heparin(60.4±9.6%), sodium citrate(56.8±11.8%), ACD(30.6±14.1%) 및 EDTA(6.2±3.7%) 순 이었다.

Packed RBC층 내의 PMN 백혈구 분리빈도는 EDTA(85.0±4.7%), ACD(84.3±5.5 %), sodium citrate(83.8±6.5%) 및 heparin(76.3±7.7%) 순 이었다.

Packed RBC층 내의 일부 림프구와 단핵구를 제거하고자 FH 밀도구배법을 이용한 결과, PMN백혈구의 분리빈도는 EDTA(89.9±2.4%), ACD(89.5±3.6%), sodium citrate(83.6±10.3%) 및 heparin(68.4±13.9 %) 순 이었다.

이상을 종합하면, 소 순환혈액내에서 순수도가 높고 높은 빈도의 PMN백혈구의 분리를 위해서는 원심분리 후 packed RBC층에서 분리하는 방법이 권장되었으며, 항응고제로는 EDTA 및 ACD가 적절하였고, ficoll-hypaque 밀도구배법을 병행할 때 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Baehner RL. 1972. Disorders of leucocytes leading to recurrent infection. *Pediatric Clinics of North America* 19 : 935.
2. Reddy PG, McVey DS, Chengappa MM, et al. 1990. Bovine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancement of bovine neutrophil functions *in vitro*. *Am J Vet Res* 51 : 1395~1399.
3. Roth JA, Kaeberle ML. 1981. Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. *J Immunol Methods* 45 : 153~164.
4. Roth JA, Kaeberle ML, Griffith RW. 1981. Effects of bovine viral diarrhea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am J Vet Res* 42(2) : 244~250.
5. Roth JA, Kaeberle ML. 1981. Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Vet Immunol Immunopaathol* 2 : 157~174.
6. Hallen SC, Nording I, Bjrk I. 1991. A new technique, requiring small amounts of cells, for the parallel study of chemiluminescence and phagocytosis via different receptors and the same cell population. *J Immunol Metods* 141 : 63~72.

7. Carlson GP, Kaneko JJ. 1973. Isolation of leucocytes from bovine peripheral blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 142 : 853~856.
8. Jain NC. 1986. Schalm's Veterinary hematology, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia : 1-19.
9. Swenson MJ. 1984. Physiological properties and cellular and chemical conditions of blood. In : Swenson MJ ed. *Dukes' physiology of domestic animals.* 10th ed., Ithaca & London. Comstock Publishing Assoc : 15~40.
10. Chambers WH, Taylor JR, Klesius PH. 1983. Isolation of bovine polymorphonuclear leucocytes by density gradient centrifugation. Vet Immun Immunopathol 5 : 197~202.
11. 이방환, 박영우, 신종욱. 1988. 소 혈액의 45도-경사-Wintrobe관에 의한 적혈구 침강율 측정에 있어서 환경온도 및 적혈구 침층용적치에 상관하는 관계적 예기 적혈구침강율. 대한수의학회지 28 : 187~192.
12. Boyum A. 1968. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methyl cellulose, dextran, and ficoll as erythrocytes aggregation agents. *Scan J Clin Lan Invest* 21 : Suppl 97 : 31~50.
13. Dutta SK, Baumgardener MK, Scott JC, et al. 1981. Separation and identification of leucocytes populations and subpopulations. *Am J Vet Res* 42 : 1037~1039.
14. 허억. 1996. 순수도와 viability가 높은 human eosinophil의 분리를 위한 개선된 방법. 대한면역학회지 18 : 135~142.