大韓獸醫學會誌(1987) 第27卷 第1號
*Korean J. Vet. Res.* (1987) Vol. 27, No. 1, pp. 41~45

# Phytomitogen에 의한 기니픽 임파구의 Blast Transformation: Ⅱ. 유사분열에 미치는 혈청농도와 배양시간의 효과

김 종 수
경상대학교 농과대학 수의학과
(1987. 1. 21 接受)

# Phytomitogen Induced Blast Transformation of Guinea Pig: I. Effect of Concentration of Serum and Time of Incubation on the Uptake of $^3$H-Thymidine

Jong-shu Kim
*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongsang National University*
(Received January 21st, 1987)

**Abstract**: The present study was carried out to investigate the optimal conditions on blastogenesis of guinea pig lymphocytes. A microculture system in conjuction with a semiautomatic multiple sample harvester was used to study the *in vitro* optimal condition of guinea pig lymphocytes.

Careful analysis of lymphocyte transformation to concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS) mitogen determined optimal conditions as:

(a) 10% fetal bovine serum in RPMI-1640 medium

(b) 48-hour culture period.

## 緖 論

Nowell(1968)이 phytohemagglutinin(PHA)이 시험관 내에서 사람혈액의 blast transformation을 유발시킨다고 보고한 이래로 세포성 면역반응과 시험관 내에서 plant mitogen에 의한 lymphocyte transformation과의 상호관계에 대한 연구가 광범위하게 수행되어졌다(Fitzgerald, 1972). Pokeweed(PWM), concanavalin A (Con A)와 lipopolysaccharide(LPS)도 임파구반응에 대하여 PHA와 비슷한 효과가 있다고 보고되었다(Janossy와 Greaves, 1971). 이와같은 시험관 내에서의 mitogen에 의한 임파구반응 시험은 임상적으로 사람의 immunologic competence를 monitoring하는데 사용되어져 왔다(Cooper 등, 1973; Oppenheim 등, 1965). PHA와 Con A는 T cell mitogens임이 닭의 임파구에 대한 연구에서 밝혀졌다(Byrd 등, 1973; Toivanen과 Toivanen 1973; Alm, 1970). PWM은 T와 B cell mitogens임이 밝혀졌고(Shortman 등, 1973; Weber, 1973), LPS는 B cell mitogen임이 밝혀졌다(Weber, 1973). 또한 endotoxin도 B cell mitogen이라고 보고되었다(Weber, 1973). 동물이 어떤 바이러스 감염이나 다른 면역기능에 이상이 있을 때 이러한 mitogen에 의한 임파구의 반응은 현저히 감소한다고 한다(Muscoplat 등, 1974a, b; Johnson과 Muscoplat, 1973).

시험관 내에서 임파구반응은 스트레스, 호르몬변화, 나이, 질병, 약물치료와 임파구반응 실험을 하는데 있어서 각종 조건 등 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다(Fernandez 등, 1976; Johnson과 Muscoplat, 1973; Outteridge와 Dufty, 1973; Zeman 등, 1972).

이와 같이 시험관 내에서 임파구반응에 영향을 미치

는 요소들을 개선하고, 정상과 비정상 임파구반응을 표준화하고저 많은 연구가 수행되어졌다(Carter 등, 1975; Muscoplat 등, 1974a, b).

따라서 T와 B cell mitogen을 사용함으로써 세포성, 체액성 면역체계의 competency를 monitor할 수 있게 되었고 또한 임파구 DNA합성 측정을 위한 microculture와 배양된 임파구들을 harvest하기 위한 semiautomatic multiple sample harvester(SAMSH) 기술의 발달은 여러 동물의 임파구 반응을 연구하는데 커다란 도움이 되었다(Robbins, 1972). 저자는 mitogen에 의한 기니픽 임파구반응의 최적조건을 찾고자 microculture system과 SAMSH를 사용하여 유사분열에 미치는 배지, 유사분열 촉진 물질 및 세포 농도의 효과를 보고한 바 있으며(김종수와 박응복, 1986) 본보에서는 배양 시간, serum 첨가 농도 등의 결과를 보고 하고자 한다.

## 材料 및 方法

**실험동물** : 체중이 400~500g되는 14개월령 Hartley 계통의 수컷 기니픽 25마리를 사용하였다.

**임파구 분리 및 배양** : 임파구 분리 및 배양은 Burrells와 Wells(1977) 그리고 Rouse와 Babiuk(1974)의 방법에 따라 임파구를 분리하여 생세포수를 ml당 $1\times10^6$개 되게 희석하여 RPMI 1640배지에 넣고 fetal bovine serum을 각각 농도를 달리하여 첨가하고 Con A와 LPS를 첨가한 후 $CO_2$ 인큐베이타에서 배양온도 및 시간을 달리하여 배양하였다. 배양완료 18시간 전에 methyl-[$^3$H]-thymidine($^3$H-TdR, Amersham제)을 1 $\mu$ci씩 각 시험관에 첨가하였다. 배양된 임파구는 harvesting하여 칵테일 첨가, $\beta$-counting 하였다.

## 結 果

**Serum 효과** : Fetal bovine serum을 농도를 달리하여 첨가한 결과 기니픽 임파구의 DNA 합성능력은 10%에서 가장 뛰어났다(Table 1, 2).

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

**Table 1.** Effect of Concentration of Bovine Fetal Serums in RPMI 1640 Medium on the Uptake of $^3$H-TdR by $1\times10^6$ Lymphocytes Stimulated with 6$\mu$g of Con A for 48 Hours

| Serum | No. of lymphocyte donor guinea pigs | Counts/minute (mean±SE) | Stimulation index (mean±SE) |
|---|---|---|---|
| 5% | 5 | 65347±2645 | 41.3±13.3 |
| 10% | 5 | 80132±2312 | 50.7±11.2 |
| 15% | 5 | 71241±3762 | 45.1±12.3 |
| 20% | 5 | 63549±4361 | 40.2±14.1 |
| None | 5 | 42165±5137 | 26.7± 9.7 |

SE ; Standard error

**Table 2.** Effect of Concentrations of Bovine Fetal Serums in RPMI 1640 Medium on the Uptake of $^3$H-TdR by $1\times10^6$ Lymphocytes Stimulated with 6$\mu$g of LPS for 48 Hours

| Serum | No. of lymphocyte donor guinea pigs | Counts/minute (mean±SE) | Stimulation index (mean±SE) |
|---|---|---|---|
| 5% | 5 | 51349±2314 | 33.8± 9.7 |
| 10% | 5 | 70214±3121 | 46.2±20.8 |
| 15% | 5 | 66034±2913 | 43.5±11.4 |
| 20% | 5 | 50265±3041 | 33.1± 9.5 |
| None | 5 | 45342±1467 | 29.8± 6.4 |

SE ; Standard error

**Table 3.** Effect of Incubation Time on the Uptake of $^{3}$H-TdR by $1\times10^{6}$ Lymphocytes in RPMI-1640 Medium Stimulated with 6$\mu$g of Con A

| Time (hours) | No. of lymphocyte donor guinea pigs | Counts/minute (mean±SE) | Stimulation index (mean±SE) |
|---|---|---|---|
| 24 | 5 | 76271±1831 | 48.3±14.2 |
| 48 | 5 | 82413±2143 | 52.2±16.1 |
| 72 | 5 | 51326±1246 | 32.5±11.3 |

SE ; Standard error

**Table 4.** Effect of Incubation Time on the Uptake of $^{3}$H-TdR by $1\times10^{6}$ Lymphocytes in RPMI-1640 Medium Stimulated with 6$\mu$g of LPS

| Time (hours) | No. of lymphocyte donor guinea pigs | Counts/minute (mean±SE) | Stimulation index (mean±SE) |
|---|---|---|---|
| 24 | 5 | 69382±3021 | 45.7±10.2 |
| 48 | 5 | 72413±3504 | 47.7± 9.4 |
| 72 | 5 | 43162±2344 | 28.4± 5.1 |

SE ; Standard error

## 考 察

Plant mitogen인 PHA, PWM, Con A, LPS 등은 시험관 내에서 lymphocyte blastogenesis를 자극시킨다(Fitzgerald, 1972; Janossy와 Greaves, 1971; Nowell, 1968). 시험관내에서 mitogen에 의한 임파구 반응의 형태학적, 생화학적 특징은 생체내에서 항원에 의한 면역반응과 아주 비슷하다는 것을 알 수 있다(Janossy와 Greaves, 1971). 본 실험에서 mitogen에 의한 기니픽 임파구 반응의 최적조건을 규명한 결과 serum은 10%, 배양시간은 48시간으로 나타났다. 본 실험에서 serum 농도에 따른 임파구의 최적 반응은 10%에서 가장 우수하였다. 이와 같은 성적은 토끼에서 보고 되어져 있다(Mansfield와 Wallace, 1973). 칠면조(Maheswaran과 Thies, 1975)와 닭(Maheswaran 등, 1975)에서는 혈청을 첨가하지 않았을 때에, 소(Muscoplat 등, 1974; Lazary 등, 1974)에서는 15%와 30%에서 lymphocyte blastogenesis가 현저하게 증가한다고 하였다. 이와 같이 각 연구자들에 따라 상이하게 보고 되어지고 있는 것은 동물의 종류와 제반요건이 다르기 때문이라 생각되어진다.

본 실험에서 배양시간에 따른 $^{3}$H-TdR incorporation의 최고치는 배양 48시간에서 나타났다. 이와 같은 성적은 소(Soper 등, 1978), 토끼(Mansfield와 Wallace, 1973), 칠면조(Maheswaran 등, 1975), 닭(Maheswaran과 Thies, 1975)에서 보고 되어 있다. 사람(Park과 Good, 1972), 면양(Larsen, 1979), 고양이(Cockerell 등, 1975), 생쥐(Heiniger 등, 1973), 소(Muscoplat 등, 1974a, b)에서는 20시간에서 부터 36, 72, 96시간 등으로 다양하게 보고 되어 있다. 이와 같은 상이한 결과는 동물의 종류, 배양조건, 첨가된 mitogen의 종류 및 농도 등 제반 요인이 게재되어 있는 것이라고 사료된다. 본 실험결과 기니픽 임파구의 $^{3}$H-TdR incorporation을 측정하여 나타난 최적 조건 성적을 요약하면 (1) 10% fetal bovine serum, (2) 48-hours culture period 이다. 이상의 성적과 다른 많은 보고자들의 성적을 요약해 볼 때 lymphocyte blastogenesis 효과가 가장 큰 최적 조건은 세포 희석 농도, mitogen 종류 및 농도, medium 종류, 첨가 혈청 농도, 배양 시간 등 다양한 요인이 있는 것으로 생각 되어진다.

## 結 論

Mitogen에 의한 기니픽임파구 반응의 최적조건을 규명코자 microculture system과 semiautomatic multiple sample harvester(SAMSH)를 사용하여 임파구유사분열에 미치는 배양시간, serum첨가 농도 등을 조사한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Fetal bovine serum 10%를 첨가 했을 때 lymphocyte blastogenesis가 가장 현저하게 나타났다.

2. 48시간에서 $^{3}$H-TdR incorporation이 최고로 나타났다.

## 參 考 文 獻


Alm, G.V. (1970) *In vitro* studies of chicken lymphoid cells. I. Phytohemagglutinin induced DNA, RNA and protein synthesis in spleen cells from control-irradiated and bursectomized irradiated chickens. Acta. Pathol. Microbiol. Scand (B)., 78:632~640.

Burrells, C. and Wells, P.W. (1977) *In vitro* stimulation of ovine lymphocytes by various mitogens. Res. Vet. Sci., 23:844~866.

Byrd, W.J., Von Boehmer, H. and Rose, B.T. (1973) The role of the thymus in maturational development of phytohemagglutinin and pokeweed mitogen responsiveness. Cell Immunol., 6:12~24.

Carter, J.B., Barr, G.D. and Levin, A.S. (1975) Standardization of tissue culture conditions for spontaneous thymidine-2-c in corporation by unstimulated normal human peripheral lymphocytes: Circadian rhythm of DNA synthesis. J. Allergy Clin. Immunol., 56:191~205.

Cockerell, G.L., Hoover, E.A., Lobuglio, A.F. and Yohn, D.S. (1975) Phytomitogen and antigen induced blast transformation of feline lymphocytes. Am. J. Vet. Res., 36:1489~1494.

Cooper, M.D., Peterson, R.D.A. and Good, R.A. (1973) Meeting report of the second international workshop on primary immunodeficiency diseases in man. Clin. Immunol. Immunopathol., 2:416~445.

Fernandez, L.A., Macsween, J.M. and Langley, G.R. (1976) Lymphocyte responses to phytohemagglutinin; Age-related effects. Immunology, 31:583~587.

Fitzgerald, M.G. (1972) A satisfactory quantitative test of lymphocyte response to phytohemagglutinin for the definition of normal control values and recognition of immunological defects. J. Clin. Path., 25:163~168.

Heiniger, H.J., Wolf, J.M., Chen, H.W. and Meier, H. (1973) A micromethod for lymphoblastic transformation of mouse lymphocytes from peripheral blood. Proc. Soc. Exp. Biol Med., 43:6~11.

Janossy, G. and Greaves, M.F. (1971) Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. Clin. Exptl. Immunol., 9:483~498.

Johnson, D.W. and Muscoplat, C.C. (1973) Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhea. Am. J. Vet. Res., 34:1139~1141.

Larsen H.J. (1979) A whole blood method for measuring mitogen induced transformation of sheep lymphocytes. Res. Vet. Sci., 27:334~338.

Lazary, S., Rivera, E., Weck, A.L., Gerber, H. and Nicolet, J. (1974) *In vitro* stimulation of bovine leucocytes by phytohaemagglutinin and mitogens. Res. Vet. Sci., 17:344~350.

Maheswaran, S.K. and Thies, E.S. (1975) Development of a micro-culture system for stimulation of chicken peripheral blood lymphocytes with Concanavalin A. Am. J. Vet. Res., 36:1053~1055.

Maheswaran, S.K., Thies, E.S. and Greimann, C. (1975) A micromethod for evaluation turkey lymphocyte responses to phytomitogens. Am. J. Vet. Res., 36:1397~1400.

Mansfield, J.M. and Wallace, J.H. (1973) Incorporation of $^{3}H$-thymidine into PHA stimulated rabbit peripheral blood lymphocytes. Kinetics of the response. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 143:408~413.

Muscoplat, C.C., Alhaji, I. and Johnson, D.W. (1974a) Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: Comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. Am. J. Vet. Res., 35:1053~1055.

Muscoplat, C.C., Chen, A.W., Johnson, D.W. and Alhaji, I. (1974b) *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. Am. J. Vet. Res., 35:1557~1561.

Nowell, P.C. (1968) Phytohemagglutinin: An Indicator of mitosis in cultures of human leukocytes. Cancer Res., 20:462~466.

Oppenheim, J.J., Whang, J. and Frei, E. (1965) Immunologic and cytogenetic studies of chronic

lymphatic leukemic cells. Blood, 26:121.

Outteridge, P.M. and Dufty, L.H. (1973) The immune response of cattle during pregnancy and early lactation. Res. Vet. Sci., 14:389~391.

Park, B.H. and Good, R.A. (1972) A new micromethod for evaluating lymphocyte responses to phytohemagglutinin: Quantitative analysis of the function of thymus-dependent cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 66:371~373.

Robbins, J.H. (1972) Measurement of DNA synthesis in leukocyte microcultures. J. Clin. Invest., 25:1075~1078.

Rouse, B.T. and Babiuk, L.A. (1974) Host defence mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus: *In vitro* stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. Infect. immun., 10:681~687.

Shortman, K., Byrd, W.J., Cerottini, J.C. and Brunner, K.T. (1973) Characterization and separation of mouse lymphocyte subpopulations responding to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. Cell Immunol., 6:25~40.

Soper, F.F., Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. (1978) *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle. Am. J. Vet. Res., 39:1039~1042.

Toivanen, P. and Toivanen, A. (1973) Selective activation of chicken T lymphocytes by Concanavalin A. J. Immunol., 111:1602~1603.

Weber, W.T. (1973) Direct evidence for the response of B and T cells to pokeweed mitogen. Cell Immunol., 9:482~487.

Zeman, G.D., Cohen, G. and Budrys, M. (1972) The effect of plasma cortisol levels on the lymphocyte transformation test. J. Allergy Clin. Immunol., 49:10~15.

김종수·박용복 (1986) Phytomitogen에 의한 기니픽 임파구의 Blast Transformation: I. 유사분열에 미치는 배지, 유사분열 촉진물질 및 세포농도의 효과, 대한수의학회지, 26:245~249.