

Sprague-dawley(SD) 랫드에서 natural killer cell의 분리·동정 및 형태적 특징

강 경 선·이 영 순
서울대학교 수의과대학
(1992. 3. 5 접수)

Isolation and morphological characterization of natural killer cell in the Sprague-dawley(SD) rats

Kyung-sun Kang, Yong-soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received March 5, 1992)

Abstract : This study was performed to demonstrate the presence of large granular lymphocyte(LGL) in Sprague-Dawley(SD) rats and morphologically observe NK cell and also establish the method of isolation of natural killer cell in SD rats.

By percoll discontinuous density gradients centrifugation, highly enriched LGL population were shown to fraction 2(border line between 44.2% and 50.8%). LGL were shown to bind selectively to YAC-1 mouse lymphoma cell. This fraction expressed very high NK cell cytotoxicity. Therefore, we thought that LGL have NK activity in SD rats. The Morphology of rat LGL is very similar to that of human LGL. These cells have an eccentric kidney-shaped nucleus. Their most distinctive feature was their cytoplasmic azurophilic granules. Another distinguishing feature of rat LGL was their high cytoplasmic : nuclear ratio. It was concluded that LGL played a role part in mediating natural killer activity in this species.

서 론

최근 항종양이나 바이러스 및 세균에 대하여 면역 감시(Immune surveillance) 기전에서 Natural Killer (NK)세포의 잠재적인 역할 때문에 많은 관심을 끌어들였다.^{1,2} 특히 종양과 관련하여 많은 연구가 이루어져 왔는데 랫드의 경우 종양세포의 clearance에 NK 세포가 직접적으로 관련을 맺고 있어 *In vivo*에서 종양세포에 대한 저항(resistance)과 NK세포가 밀접하게 관여한다는 사실을 뒷받침하는 연구결과가 최근 나왔다.³

한편 랫드의 여러장기에서 NK 세포활성을 갖는 것으로 추정되는 Large Granular Lymphocyte(LGL)

빈도를 살펴보면, 말초혈액=폐장>비장>복강 삼출액>임파절 순이다. 따라서 LGL의 활성을 알아보기 위해서는 말초혈액을 이용하는 것이 용이하다.⁴

랫드와 마우스의 간장에서 자연세포독성(natural cytotoxicity)을 species별, strain별로 비교해 보았을때 Fischer 344(F 344)와 Sprague-Dawley(SD) 랫드가 5개의 마우스 strain인 C3H, B6C3F1, CBA, BALB/c, C57BL/6 보다 훨씬 높은 간장의 NK 활성을 나타내었으며, 랫드 strain사이의 비교에서는 F344 랫드가 SD 랫드보다 높은 간장의 NK 활성을 나타내었다. 한편 마우스 strain사이의 비교에서는 C3H>B6C3F1>CBA>BALB/c로 나타났다.⁵ 이러한 연구 결과는 일반적으로 간장의

발암성 시험을 하는데 주로 이용되고 있는 두 종인 F344 랫드와 B6C3F1 마우스가 높은 간장의 NK 활성을 나타내고 있다. 따라서 이들 종의 자연적인 간암발생율이 적은 것은 NK 세포와 관련이 있다는 것을 강하게 시사해 주고 있다. 즉, 간장에서 낮은 NK 활성을 나타내는 동물은 간암발생율이 높으며 반대로 간장에서 높은 NK 활성을 나타내는 동물은 자연적인 간암발생율이 낮은 것으로 볼 때 간장에서의 종양발생과 NK 활성과는 밀접한 관련을 가지고 있다.

동물의 나이에 따른 NK 세포의 활성을 살펴보면 일반적으로 랫드의 간장에서는 15주에서 20주까지 높은 NK 활성을 나타내었으며⁵, BD X 랫드의 비장에서는 4주령에서 32주령까지 NK 활성이 높은 반면, WAB/Not 랫드의 비장에서는 10일령까지의 어린 나이에서는 매우 낮은 NK 활성을 나타내다가 8주에서 18달까지는 NK 활성이 높았다.^{6,7} 그러므로 각 동물의 여러 장기에서의 NK 활성의 측정은 그 동물의 나이를 반드시 고려해 보아야 할 사항이며 종간, 계통간의 차이가 심한 것으로 생각된다.

이와같이 20년동안 많은 연구실에서 사람과 동물의 자연살생세포(Natural Killer Cell, NK cell)의 기능과 특징에 관하여 많은 연구들이 있었다.^{8~10} 그러나 이러한 연구들은 마우스와 사람에서 주로 이루어져 왔기 때문에 랫드에 관한 연구는 이들에 비하여 많은 연구가 되어 있지 못한 실정이다. 특히 우리나라에서는 이 방면의 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 SD 랫드에서 NK 세포의 분리방법을 확립하고 NK 세포의 형태학적인 관찰과 더불어 종양표적세포에 대하여 자연살생력을 가지는 세포가 어떤 것인지들 평가하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 6주령의 Sprague-Dawley 숫컷 랫드를 한국화학연구소로부터 분양받아 15주령을 실험에 이용하였다.

종양표적세포(Tumor Target Cell) : Mouse YAC-1 lymphoma cell line을 10% FCS(Fetal Calf Serum)를 첨가한 RPMI 1640배지(GIBCO Lab., USA)에 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 유지, 계대배양하였으며, 일부는 -70°C deep freezer에 10% DMSO(dimethylsulfoxide)를 첨가한 배지에 부유시켜 장기보관용으로 하였다. YAC-1 cell은 연세대학교 의과대학 미생물학교실로부터 분양받았다.

임파구의 준비 : 헤파린(100 I.U./ml blood) 처리된

10ml 주사기를 이용하여 복대정맥으로 부터 혈액을 4ml씩 채취하여 PBS(-)(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free)를 동량으로 희석하여 Ficol-Paque(Pharmacia LKB)위에 희석된 혈액을 중층하고 1550rpm으로 20분간 원심하여 임파구를 분리하였다. 이렇게 분리된 임파구는 HBSS(Hanks' balanced salt solution)으로 2회 씻어낸 후 100 unit penicilin, 100µg streptomycin, 2mM glutamine, 1 mM pyruvate와 10mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid, GIBCO Lab.)를 첨가한 10% Fetal calf serum(FCS) RPMI 1640 배지에 다시 부유시켰다. 분리된 세포는 랫드 5마리로 부터 분리한 세포를 pooling 하여 시험에 이용하였다.

부착세포 및 탐식세포의 제거 : 탐식세포(단구, Monocyte)의 제거를 위하여 plastic culture dish(Corning Glass Works, N.Y)에 세포부유액을 부어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 60분간 배양하여 plastic에 부착된 세포를 제거하였다.

B 임파구의 제거를 위하여 5×10⁷/ml의 세포를 nylon wool column에 부어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 45~60분간 배양하였으며, nylon wool에 부착되지 않은 세포를 따뜻한 배지 50ml로 씻어내어 미부착 세포를 회수하였다.

생존세포수 확인 : 위에서 회수된 세포를 세포수와 생존률을 확인하기 위하여 10µl 세포부유액과 10µl의 tripan blue를 eppendorf tube에 넣어 잘 섞은후 혈구 계산판(hemocytometer)에 넣어 세포수를 계산하였으며 세포의 생존률은 trypan blue를 uptake한 세포를 죽은 세포로 계산하여 분리한 세포의 생존률이 95% 이상인 것을 확인하였다.

세포형태의 평가 : 2×10⁵/ml 세포를 1000rpm으로 5분간 원심하여 pellet으로 만든 후 상청액을 버리고 pellet를 pasteur pipett으로 3~4번 분산시켰다. 이렇게 분산된 세포를 slide 유리판에 도말하여 빠른시간에 공기중에서 말린 후 Wright액에 7분간 염색 후 10% Giema액에 20분간 넣어 세포를 염색하였다. 이 슬라이드를 oil immersion 현미경하에서 관찰하였다.

In vitro overnight 배양 : 10%의 FCS가 첨가된 배지 10ml에 총 세포수가 5×10⁷ 임파구가 되게 조정하여 30ml tissue culture flask(Corning)에 4°C에 overnight 시켜 다음날 percoll gradient(Pharmacia LKB)로 세포를 분리하였다.

자연살생세포(natural killer cell)의 분리 : Percoll(비중 1.130g/ml) 9 part에 10배 농축배지 1part를 가하여 등장화하고 이것을 100% Percoll(1.122g/ml)로 하였다.

¹¹ 100% Percoll액을 66.7%, 55.0%, 50.8%, 44.2%로

혈청이 첨가된 배지로 만든 후 15ml cornical test tube (Costar, USA)에 밀도가 높은 순으로 불연속 밀도분배를 만든 후 맨위에 세포수 5×10^7 되는 세포부유액 1.5ml을 맨위에 중층하였다.

이 시험관을 30분간 실온에서 3000rpm으로 원심한 후 Pasteur Pipett으로 각 분획별 주효세포(effector cell)를 분리해서 배지로 2회 세척하여 Percoll을 제거하였다.

^{51}Cr Release Assay : ^{51}Cr (Dupont, Boston, MA)로 표지한 $1 \times 10^4/100\mu\text{l/well}$ 의 표적세포가 들어 있는 U형의 96 well microplate(Costar, USA)에 5×10^5 의 주효세포(effector cell)를 $100\mu\text{l}$ 넣어 주효세포 : 표적세포의 비율을 50 : 1이 되게 조정하여 배양한다. 이들 plate는 37°C , 5% CO_2 배양기내에서 4시간동안 배양한 후 이 plate를 1500 rpm으로 10분간 원심후 상청액 $100\mu\text{l}$ 를 취하여 γ -counter로 3분간 측정하였다. 이때 최대방출을 위하여 ^{51}Cr 이 표시된 표적세포가 들어 있는 well에 0.25% Triton X-100(Sigma)를 가하였고, 자연방출을 위하여 ^{51}Cr 이 표시된 표적세포만을 넣었다. % cytotoxicity는 아래공식에 따른다. 각 실험값의 cpm 값은 3회 반복시험한 평균값이다.

% Cytotoxicity =

$$\frac{\text{Test release(cpm)} - \text{Spontaneous release(cpm)}}{\text{Maximum release(cpm)} - \text{Spontaneous release(cpm)}} \times 100$$

결 과

Ficol-paque에 의해 분리된 buffy coat층에는 주로 임파구들로 구성되어 있었으며 monocyte와 혈소판 등도 함께 관찰 되었고(Fig 1), 맨 밑의 pellet층은 주로 적혈구와 과립구(granulocyte)들로 구성되어 있었다. 이렇게 분리된 buffy coat층만을 따로 채취하여 NK 세포를 분리하기 위하여 Percoll 불연속 밀도분배로 4개의 분획으로 나누었으며 주로 분획 2(44.2%와 50.8%의 경계선)에서 얻어진 세포들이 Natural Killer 활

성을 나타내었다. 이 분획의 세포들은 CRA(Chromium Release Assay)에 의해 가장 큰 세포독성(18.21)을 나타낸 반면 다른 분획들의 세포들은 세포독성이 굉장히 낮은 것을 관찰하였다(Table 1). 한편 분획별 세포구성을 살펴보면 분획 1에서는 죽은 세포, 단구(monocyte), 혈소판(platelet)이었으며, 분획 2에서는 50% 이상이 LGL이었고(Fig 2), 분획 3를 주로 구성하고 있는 세포는 T 세포였다. 그리고 분획 4를 구성하고 있는 세포로는 50% 이상이 PMN이었으며 pellet층을 구성하고 있는 세포는 적혈구였다.

랫드에서 NK 세포는 사람이나 마우스에서 주로 자연살생능(Natural killing Activity)을 보이는 LGL(Large Granular Lymphocyte)이었으며, LGL이라고 부르는 것처럼 특징적으로 세포질 내 핵의 비율이 높고 azurophilic 과립을 세포질내에 함유하고 있으며 일반적으로 신장형태의 핵을 가지고 있다. 또한 세포의 크기는 small lymphocyte와 대식세포(macrophage)의 중간 크기이다(Fig 3). Table 1에서 나타낸 것과 마찬가지로 YAC-1 표적세포(Target cell)에 결합되어 있는 세포는 주로 LGL 세포로 결합률은 9.87%였다(Fig 4).

고 찰

Table 1에서 볼 수 있듯이 표적세포인 YAC-1에 결합하여 이 표적세포를 죽이는 세포들이 모여있는 분획은 Percoll 밀도분배에 의해 분획된 분획 2(Fraction 2)이며 이 분획의 주종을 이루는 세포는 LGL임을 알 수 있었다(Fig 4). 따라서 SD 랫드에서 LGL이 NK activity를 나타내는 세포라고 생각된다. 반면에 주의해야 할점은 모든 NK 세포가 LGL이라고 이야기 할 수는 있어도 모든 LGL이 NK 세포라고 말할 수는 없다는 것이다. 즉, 형태학적으로 LGL이라고해서 모두 NK activity를 갖는 것은 아니다. 왜 모든 LGL이 NK Activity를 나타내지 않는 지는 좀더 연구를 해야할 것으로 생

Table 1. LGL frequency and fraction distribution of NK activity in Sprague-dawley(SD) rats

Fraction	% of cells recovered ^b	% cytotoxicity ^c	% LGL	% of LGL in conjugate	% of other cell in conjugate
1	2.13	NT ^d	30	NT	NT
2	10.62	18.21	50.2	9.87	<1
3	60.05	1.12	4	NT	3
4	17.20	<0.01	1	NT	1

^a Peripheral Blood

^b Total Recovery of cells was >90%

^c Assayed in 4 hr ^{51}Cr -release assay against YAC-1 and effector : target ratio was 50 : 1.

^d Not tested

각되어진다. 지금까지 mouse NK system을 이용하여 여러학자들이 연구를 하였으나 사람과는 percoll 분획에 많은 차이가 있으며 분리에도 어려움이 많이 있다. 그러나 랫드 NK system과 사람의 NK system에는 많은 유사성이 있으므로 NK 세포 분리가 용이한 랫드를 이용하는 것이 사람에게 적용시에 유리하기 때문에 국내에서도 랫드의 LGL에 관하여 앞으로 더 많은 연구가 이루어질 것으로 생각되어진다.

Flow cytometry에 의해 LGL의 표면항원을 분석하여 본 결과 LGL은 monocyte, T cell, PMN(Polymorphic neutrophil)과는 다른 표면항원을 띄고 있는 것으로 밝혀졌다. 즉, 모든 LGL은 W₃/13, OX-8, leucocyte-common(L-C)항원과 asialo GM1항원을 필수적으로 나타낸다.¹² 그리고 제 5 회 국제 NK workshop에서 NK 세포를 정의한 것을 보면 다음과 같다. CD3⁻, T세포 receptor(α , β , γ , δ)-negative이고, 특히 표적세포에 CD16과 CD56을 표현하는 LGL이며 class I이나 class II MHC 분자의 표현을 추구하지 않으면서 cytotoxicity를 중재하는 세포로 되어 있다.⁹ 즉, 이러한 정의는 아래의 설명에 기초를 두고 있다. 첫째, 말초혈액으로부터 percoll density gradients 원심에 의해 분리된 LGL은 높은 NK 활성을 나타내고 둘째, NK 세포는 전형적인 T 임파구의 marker인 CD3를 나타내지 않는다. 두개의 NK 관련 marker는 CD16과 CD56이 있는데 CD16은 NK세포에서 거의 배타적으로 표현되고 CD56은 몇몇 활성화된 T 임파구에서도 표현된다.

LGL이 종양세포를 lysis하는 기전은 확실하게 밝혀져 있지는 않으나 LGL에 의한 NK lysis는 LGL의 azurophilic 과립으로부터 방출된 perforin이 표적세포 세포막을 뚫는 것으로 생각되어지고 있다. 실험적으로 EDTA와 같은 칼슘 chelator를 첨가해주었을때 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성이 방해받는 것으로 보아 이 과정을 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺과 같은 양이온 의존성의 "programmed" killing 작용이라고 믿어진다.^{5,13}

본 논문에서 NK활성을 보기 위한 종양 표적세포로

mouse 유래의 lymphoma cell line을 이용한 것은 non-mouse system에서도 이들 세포들이 높은 natural killing activity를 나타내며 세계적으로 natural activity를 알아보는 indicator로 공통적으로 많이 이용하고 있기 때문이다.¹⁴

결 론

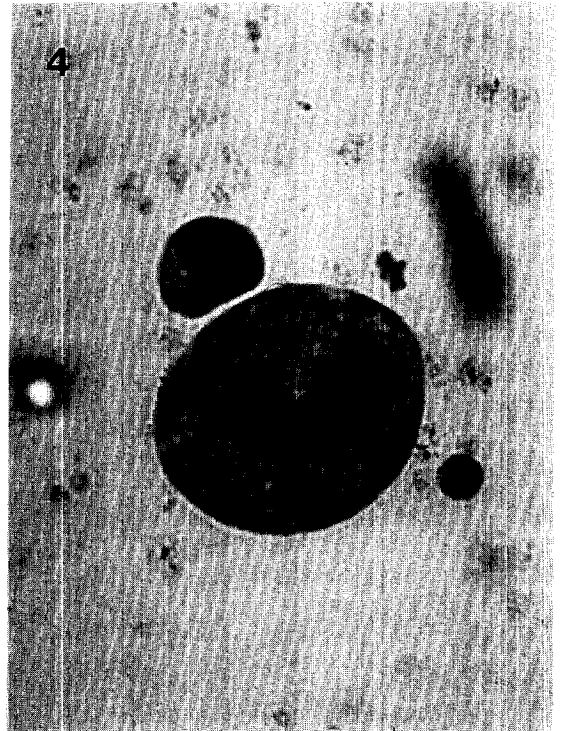
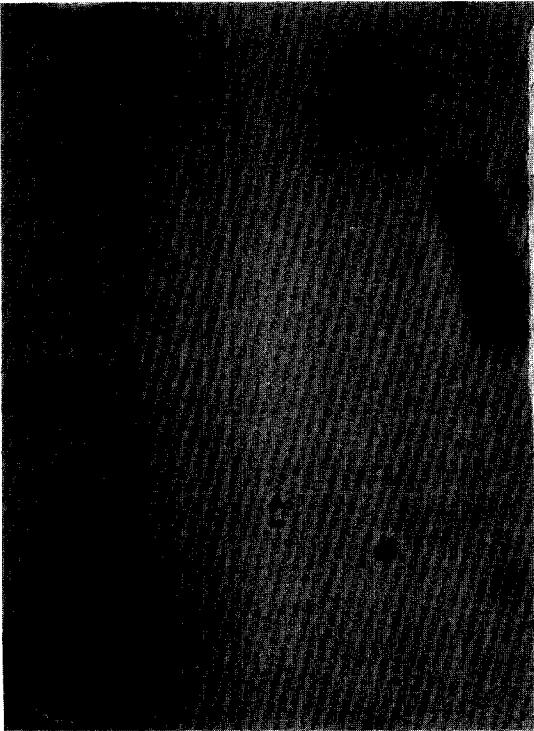
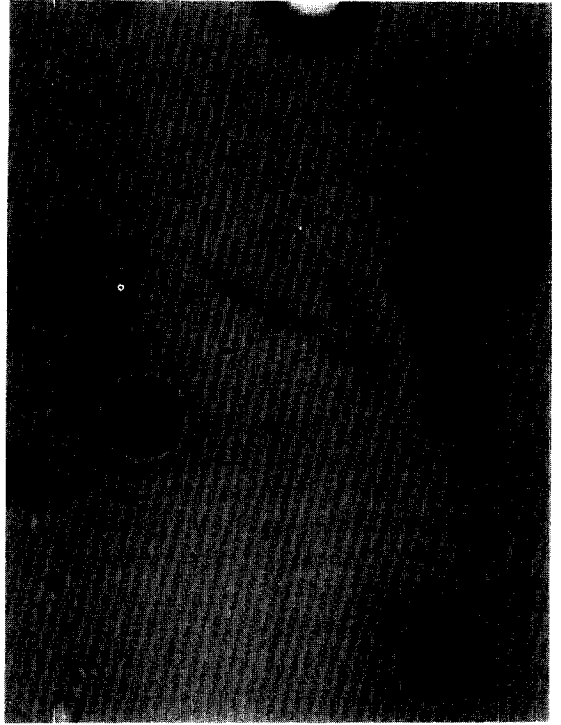
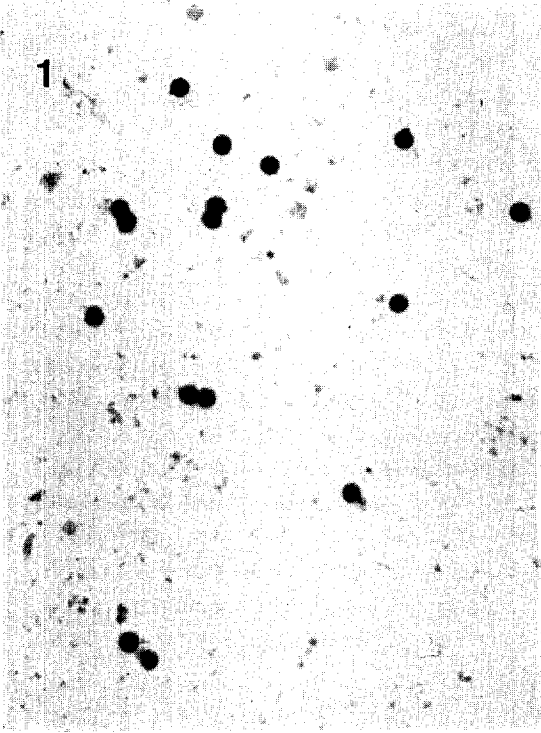
15주령의 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 이용하여 NK 활성을 나타내는 세포를 말초혈액에서 분리하여 보았을때 Percoll 불연속 밀도 분배 원심에 의해 4개의 분획으로 분리된 분획중 분획 2에서 높은 NK 활성을 나타내었고, 이 분획을 주로 구성하는 세포는 large granular lymphocyte(LGL) 이었으며 YAC-1 mouse lymphoma 세포에 결합되어 있는 세포도 주로 LGL이었다. 형태학적인 관찰에 의하여 이들 세포를 관찰해보면 일반적으로 신장형태의 핵을 가지고 있으며 세포질대핵의 비율이 다른 임파구에 비하여 높다. 또한 특징적으로 세포질내에는 azurophilic 과립을 함유하고 있어 단구나 다른 임파구와 구별이 잘된다. 따라서 랫드에서 NK 활성을 나타내는 세포는 주로 LGL이라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mankovic SM and Murasko DM. : Role of natural killer and T-cells in interferon Induced Inhibition of spontaneous metastases of B16F₁₀L murine melanoma. *Cancer Res.* 1991 ; 51(15) : 1124~1128.
2. Roder JC, Karre K and Kiessling R. : Natural killer cells. *Prog Allergy* 1981 ; 28 : 66~159.
3. Barlozzari T, Reynolds CW and Herberman RB. : *In vivo* role of natural killer cells : involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM₁-treated rats. *J of Immunology* 1983 ; 131(2) : 1024~1027.

Legends for figures

- Fig 1. Ficol-paque separated population. This population was mainly composed of lymphocyte. Wright-Giemsa stain. $\times 100$.
- Fig 2. By percoll density gradient centrifugation, fraction 2 was mainly composed of LGL. Wright-Giemsa stain. $\times 1000$.
- Fig 3. Large granular lymphocyte(LGL) have eccentric kidney-shaped nucleus and azurophilic granules in cytoplasm. Open Arrow is lymphocyte and closed arrow is LGL. Wright-Giemsa stain. $\times 1000$.
- Fig 4. Large granular lymphocyte in intimately contacting with YAC-1 mouse lymphoma cell. Wright-Giemsa stain. $\times 1000$.



4. Reynolds CW, Timonen T and Herberman RB. : Natural killer cell(NK) cell Activity in the rat. I. Isolation and characterization of effector cells. *J of Immunology* 1981 ; 127(1) : 282~287.
5. Paul FA, Wright and Stacey NK. : A species/strain comparison of hepatic natural lymphocytotoxic activity in rats and mice. *Carcinogenesis* 1991 ; 12(8) : 1365~1370.
6. Margot Z and Siegfried M. : Characterization of natural cytotoxicity *In vitro* in a spontaneous rat tumor model. *J of Immunology* 1980 ; 124(4) : 1683~1690.
7. Brooks CG, Flannery GR, Cantrell DA, et al. : Rat NK cells active against lymphoma and sarcoma tumor cells are probably identical. *J of Immunology* 1982 ; 128(2) : 913~919.
8. Herberman RB and Ortaldo JR. : Natural killer cells : Their role in defenses against disease. *Science* 1981 ; 214(2) : 24~30.
9. Saksela E, Timonen T, Panki A, et al. : Morphological and functional characterization of Isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunological Rev.* 1979 ; 44 : 71~123.
10. Herberman RB and Holden HT. : Natural cell-mediated immunity. *Advances in Cancer Research* 1978 ; 27 : 305~331.
11. Gutierrez C, Bernabe RR, Vega J, et al. : Purification of Human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J of Immunol. Method* 1979 ; 29 : 57~63.
12. Reynolds CW, Sharrow SO, Ortaldo JR, et al. : Natural killer cell(NK) cell Activity in the rat. II. Analysis of surface antigens on LGL by Flow cytometry. *J of Immunology* 1981 ; 127(6) : 2204~2208.
13. Inveradi L, Witson JC, Fuad SA, et al. : CD3 negative "small lymphocytes" are natural killer cells. *J of Immunology* 1991 ; 146(11) : 4048~4052.
14. Margaret M, Eckhard F and Rudolf S. : Liver as a Tumor cell killing Organ : Kupffer cells and natural killers. *Cancer Research* 1986 ; 46 : 3055~3060.