

Alamar Blue 색소의 환원량 평가에 의한 급성기 반응중 육계병아리의 비장세포와 PBMC 증식도 측정

임진택 · 박인경 · 고태송

건국대학교 동물생명과학대학 동물생명과학부

Proliferation Assay of Splenocyte and PBMC by the Evaluation of Alamar Blue Dye Reduction Value in Broiler Chicks

J. T. Im, I. K. Park and T. S. Koh

Department of Animal Life Sciences, College of Animal Life Sciences, Konkuk University,
Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT

In this study, hatched male broiler chicks (Ross) were fed on a basal diet and LPS was administered via intraperitoneal injection three times every other day, on the 9th, 11th and 13th days of the experiment, and then PBMC and splenocytes were isolated on day 14. The degree of alama blue reduction was evaluated at 4, 24, 48, 96 and 120 h in the splenocytes, and at 4, 8, 12, 24 and 48 h for PBMC of incubation after the addition of alama blue solution to the media. The cell numbers used in this experiment were 10³, 10⁴ and 10⁵ cells per well, and the con A levels were 0.0, 1.0, 5.0, and 10.0 µg per ml of medium. 1. The degree of alama blue reduction was found to increase in a linear fashion with increasing incubation time and cell numbers, for both splenocytes and PBMC. 2. During acute phase response, the degree to which alama blue was reduced was significantly elevated (*p*<0.05) at an incubation time of 24 hr for the splenocytes, 4 hr for PBMC, and a cell number of 10⁵ cells per well, respectively. 3. The raised reduction of alama blue to control was linear with Con A levels in medium, and higher reduction in Con A 10.0 µg relative to 1.0 or 5.0 µg in ml medium was shown 4. The medium with autologous serum evidenced a significantly (*p*<0.05) higher reduction of alama blue relative to FBS. 5. Splenocytes and PBMC from the LPS-injected birds evidenced significantly higher levels of alama blue reduction regardless of incubation time, number of cells, level of Con A added, or serum type, as compared with what was observed in normal birds.

The results indicated that the assay conditions for proliferative activity using the alama blue method in birds in which the acute phase response had been activated via intraperitoneal LPS injection requires 4 hrs of incubation for PBMC, 24 hrs of incubation for splenocytes, and 10µg of Con A per ml of medium.

(**Key words** : Reduction of alama blue, Acute phase response, Proliferation of splenocyte and PBMC, Broiler chicks)

I . 서 론

조류의 면역계는 여러 종류의 면역세포들에 의해 조절되어, 단구세포(monocyte), 헤테로필

(heterophyll), 대식세포(macrophage) 및 NK세포(natural killer cell)들은 선천성 면역, 그리고 T 임파구, NK 세포 및 대식세포는 세포성 면역, 한편 B 임파구는 항체를 생산분비하는 체액성

Corresponding author : Koh, T. S. Department of Animal Life Sciences, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel : 82-02-450-3698 Fax : 82-02-455-1044 E-mail : tskoh@konkuk.ac.kr

면역에 관여한다. 세포성 면역과 체액성 면역은 획득면역으로 분류된다(Erf, 2004). 동물에서 세균이나 바이러스 등 외부 항원의 침입에 의한 염증반응은 처음에 선천성 면역 반응으로 방어되고, 시간이 지나면 면역세포들이 기억한 획득 면역 반응에 의하여 조절된다(Abbas, 2000). LPS (lipopolysaccharide)는 그람 음성균 세포 외벽의 활성성분으로(Chaby, 1999), 면역세포의 LPS 수용체인 TLR (Toll-like receptor)과 반응한다(Poltrack 등, 1998). LPS는 동물의 선천성 면역반응과 획득 면역반응을 실험적으로 활성화하여 염증반응을 모델화하기 위하여 오랫동안 이용되어 왔다(Verdrengh와 Tarkowski, 1997).

본 연구실에서 실시한 LPS 주입에 의한 면역반응 활성화는 생산성을 감소시키고, 선천성 면역 및 세포성 면역에 영향을 미쳤다. LPS 주입에 의한 면역반응의 활성화는 크릴 밀이 단계적으로 함유된 사료(고 등, 2004; 임 등, 2003; 박 등, 2004) 또는 미역분말이 함유된 사료(고 등, 2005)를 급여한 육계병아리에서 일당 증체와 사료섭취량을 감소시켰다. 이때 증가하는 간장과 비장 무게는 면역반응의 활성화로 면역세포의 증식에 의한 것이다. 또한 LPS 주입은 크릴 밀(임 등, 2003) 그리고 미역분말(고 등, 2005)을 급여한 육계병아리에서 노산 배설량의 증가로 질소밸런스를 감소시켰다. LPS에 의한 면역반응은 크릴 밀 급여시(박 등, 2004) 그리고 미역사료 급여시(이 등, 2005) 육계병아리의 항산화계(선천성 면역)에 영향을 미쳤다. 한편 LPS 면역 활성화는 PHA-p에 대한 세포성 면역반응을 증가시켰다(고 등, 2004). 그러나 PHA-p 반응에 의한 *in vivo* 세포성 면역평가는

가능하나, 캘리포스의 눈금측정에 의한 것으로 오차범위가 너무 커서 급여사료(영양소)가 세포성 면역에 미치는 영향평가는 불완전하였다. 따라서 세포성 면역에 미치는 급여사료의 영향을 평가하기 위하여 *in vitro*에서 비장세포와 PBMC의 증식도 평가가 중요하다고 판단하였다. 본 연구는 alamar blue 법으로 세포성 면역을 평가하기 위한 비장세포와 PBMC 증식도의 측정조건을 검토하였다.

Alamar blue법은 산화환원 지시약인 alamar blue (resazurin)가 세포에 의해 resorufin으로 환원되는 양을 측정하는 것이다(Ansar Ahmed 등, 1994). 증식중인 세포는 청색의 산화형 resazurin를 적색의 환원형 resorufin로 환원하며, 이 양은 세포의 증식도를 반영한다(Ansar Ahmed 등, 1994; de Fries와 Mitsuhashi, 1995). O'Brien 등(2000)은 NMR을 이용하여 환원된 resorufin의 구조(Fig. 1)를 직접 확인하였다.

Alamar blue 법은 사람(de Fries와 Mitsuhashi, 1995)과 동물(Ansar Ahmed 등, 1996; Gogal 등, 1997; Zhi-jun 등, 1997)의 임파구 증식도 측정에 MTT와 ³H-thymidine법을 대신하여 이용되고 있다. Gogal 등(1997)은 가금에서 alamar blue법으로 측정된 Con A의 농도를 달리하여 자극한 T 임파구 증식도 변화가 ³H-thymidine 법으로 측정된 값과 유사하다고 하였다. 이 법은 세포 배양액에 alamar blue를 직접 첨가하는 것 외에 다른 조작을 하지 않고 비용도 저렴하다(Nakayama 등, 1997). 또한 증식도 측정시에 ³H-thymidine 법(Schlager와 Adams, 1983)이나 MTT 법(Denizot와 Lang, 1986)과 달리 세포를 용해시키지 않으며 또한 세포독성이 없어서 사용된 세포들을 다른 분석에 다시 이용할 수 있

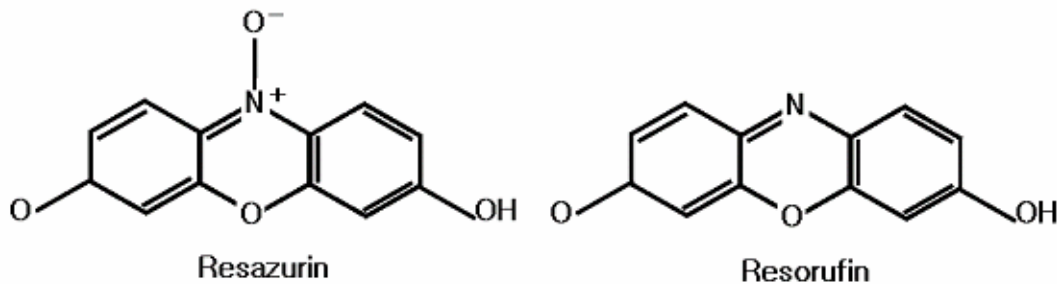


Fig. 1. Resazurin and resorufin structure.

는 잇점도 있다(Gloeckner 등, 2001). 그러나 면역 반응이 활성화한 가금의 면역세포 증식도 측정에 관한 연구는 보고되지 않았다.

Alamar blue 법으로 면역세포의 증식도를 측정할 때 보고된 alamar blue의 농도는 5% (v/v)(Pago 등, 1993; Lee 등, 2000)로부터 25% (v/v)(Gazzano-Santaro 등, 1997), 그리고 배양시간은 2로부터 72시간(Back 등, 1999; Nociari 등, 1998; Ansar Ahmed 등, 1994) 까지이다. HL60 등 백혈병 세포 주에서는 alamar blue의 농도가 10% (v/v)일 때 6시간 배양을 추천하고 있다(Nakayama 등, 1997). 한편, Gloeckner 등(2001)은 alamar blue 농도와 배양시간(3일)에 따라 CCRF-CEM, HL-60 및 REH 백혈병 세포주의 성장이 억제된다고 하였다. 이러한 성적들은 *in vitro* 세포배양에 의한 증식도 측정 실험시 실험 목적에 일치하는 배양조건을 결정해야 된다는 것을 나타내고 있다.

본 연구는 LPS 주입에 의한 면역반응이 활성화한 육계병아리에서 alamar blue를 이용한 면역세포 증식도 측정을 위한 배양조건들을 결정하기 위하여 수행하였다. 면역반응이 활성화한 육계병아리에서 채취한 면역세포의 증식도 측정조건이 배양액 내 10%(v/v) 첨가한 alamar blue 환원량과 LPS 주입에 의해 면역반응이 활성화한 육계병아리의 비장세포와 PBMC의 배양시간, 세포수 및 Concanavalin A (Con A) 농도의 상호작용을 조사하였다. 그리고 배양액 중 혈청의 종류가 alamar blue 환원량에 미치는 영향도 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 이용된 alamar blue는 Serotec Co. (USA)의 제품이며, LPS, Histopaque 및 RPMI-1640 등의 시약은 Sigma aldrich (USA)사에서 구입하였다. alamar blue 환원량은 Biotek Co. (USA)사의 Powerwave XS기종 ELISA reader로 측정하였다.

2. 공시동물

갯 부화된 육계 수컷 병아리(Ross) 24수를 1 마리당 4수씩 6개 우리로 할당하여 1일령부터 실험사료(Table 1)를 급여하여 2주간 사육하였다. 물과 사료는 자유로 섭취하게 하였다. 실험사료는 NRC 사양표준(1994)에 따라 조제하였으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 9, 11 및 13일령에 각 시험구의 절반인 3개 마리의 병아리에 면역원인 *Salmonella typhimurium* LPS 용액을 1수당 3.0ml(300 µg/수)씩 복강내에 주입하였다. LPS는 PBS(pH 7.4) 1,000 ml에 *Salmonella typhimurium* LPS 100 mg을 용해하고, 0.22 µm 필터로 여과 멸균하여 면역원으로 사용하였다.

Table 1. Composition (g/kg) of basal diet and experimental diet (NRC, 1994)

Ingredients	g/1000g
Ground yellow corn (8.8% Protein)	596
Soybean meal (48.5% Protein)	355
DL-Methionine	2.5
Soybean oil	5.0
Choline HCl (50 %)	1.5
(Iodized) Salt	5.0
CaCO ₃	10.0
CaHPO ₄ 2H ₂ O	20.0
Vitamin mix ¹⁾	2.5
Mineral mix ²⁾	2.5
Total	1,000g

¹⁾ Vitamin mix provided the following per kg diet vitamin K 0.55 mg, antioxidant 125 mg, vitamin E 10 IU, vitamin D₃ 400 IU, vitamin A 1,500 IU, biotin 0.15 mg, folacin 0.55 mg, pyridoxine HCl 3 mg, niacin 25 mg, Calcium panthothenate 10 mg, Riboflavin 3.6 mg, Thiamin. HCl 1.8 mg.

²⁾ Mineral mix provided the following per kg diet MnSO₄ H₂O 170 mg, ZnSO₄ H₂O 110 mg, Ferric citrate 500 mg, CuSO₄ 5H₂O 16 mg, Na₂SeO₃ 0.2 mg.

3. 혈장 및 PBMC 분리

마지막 LPS 주입 24시간 뒤인 14일령에 각 우리에서 임의로 선발한 육계병아리는 헤파린 처리 주사기로 심장천자하여 혈액을 취하고,

경추골 분리로 희생시킨 후 복부 절개로 비장을 적출하였다. 혈액 중 일부를 15 ml 튜브로 옮겨 3,000 rpm, 15분간 원심하고 상등 액인 혈장을 0.22 μm 필터로 여과 멸균하였다. 분리한 혈장은 2.5% 자가혈청 함유 RPMI-1640 배양액(자가혈청 배양액) 조제에 이용하였다.

혈액중 일부는 멸균 PBS로 2배 희석하고, 여기에 동량(6 ml)의 비중액(Histopaque, d = 1.077 g/ml)을 넣고 2,000 rpm, 15분간 원심하였다. 혈액 중 PBMC의 분리는 비중액과 배양액의 가운데 부분에 형성된 buffy coat층을 취하여, RPMI-1640 2.5% FBS 함유 배양액(배양액)으로 현탁하였다. 현탁액은 1,200 rpm, 10분간 원심하여 상등액을 제거하고 얻어진 PBMC 펠렛층에 3 ml의 배양액으로 현탁하였다. 현미경과 Hemacytometer로 세포수를 측정하였다.

4. 비장세포의 분리

비장은 비장세포를 분리하기 위하여 적출 후 PBS가 든 50 ml 튜브에 담아 클린벤취로 옮긴 뒤 페트리 접시에 담았다. 비장 위에 직경 200 μm 나일론 망을 얹고 배양액 3 ml를 넣어 주사기 피스톤의 앞부분으로 비장을 으깨었다. 흘러나온 비장세포 현탁액을 주사기로 흡입 후 나일론 망위에 세게 분사하여 결합조직을 분리하였다. 세포현탁액을 15 ml 튜브로 옮긴 뒤 동량의 비중액을 넣고, 2,000 rpm에서 15분간 원심하여 적혈구를 분리하였다. 원심 후 상등액과 buffy coat 층을 조심스레 취하여 배양액으로 현탁하였다. 현탁액을 1,200 rpm, 10분간 원심하여 상등액을 제거하고 얻은 비장세포 펠렛층은 3 ml의 배양액에 다시 현탁하였다. 현미경과 Hemacytometer로 비장세포수를 측정하였다.

5. 배양시간에 따른 alamar blue 환원량

PBMC와 비장세포현탁액은 배양액으로 세포수가 ml당 2.0×10^6 개로 조정하였다. 현탁액은 50 μl (세포 10^5 개)을 96웰 플레이트(Nunc Co., Denmark)의 각 웰에 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

PBMC는 배양 4시간째 웰당 Con A용액(10 $\mu\text{g/ml}$)을 40 μl 씩 넣고, 16시간 더 배양한 뒤 alamar blue (10%) 10 μl 를 첨가하였다. alamar blue 첨가 4, 8, 12, 24 및 48시간 째에 각각 ELISA 리더로 570 nm 흡광도에서 600 nm의 흡광도를 뺀 값(광학밀도)을 측정하였다.

비장세포는 배양 4시간째 PBMC 배양시와 같은 농도의 Con A용액 40 μl 를 넣고, 배양 24시간 째에 alamar blue(10%) 10 μl 를 첨가한 다음 4, 24, 48, 96 및 120시간 째에 각각 PBMC와 동일하게 광학 밀도를 조사하였다.

6. 배양 세포수에 따른 alamar blue 환원량

배양액으로 PBMC와 비장세포수를 조정하여 96웰 플레이트에 각 웰당 10^3 , 10^4 및 10^5 개/50 μl 의 세포를 각각 분주하였다. PBMC는 37°C와 5% CO₂에서 배양 4시간째 웰당 40 μl 의 Con A 용액(10 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하고, 배양 20시간째에 alamar blue(10%) 10 μl 를 첨가하였다. 비장세포는 PBMC와 같은 조건에서 배양하고, 같은 시간에 같은 양의 Con A를 첨가 하였으나, 배양 후 24시간째에 같은 양의 alamar blue를 첨가 배양하였다. alamar blue 첨가 후 PBMC는 4시간 그리고 비장세포는 24시간 배양한 뒤에 광학밀도를 측정하였다.

7. Con A 농도에 따른 alamar blue 환원량

웰당 PBMC와 비장세포 10^5 개/50 μl 를 접종하여 37°C와 5% CO₂에서 4시간 배양한 뒤에 각각 Con A 0.0, 1.0, 5.0 및 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 용액 40 μl 를 첨가하여 배양하였다. alamar blue는 PBMC는 배양 20시간째 첨가하고 4시간 더 배양한 뒤에 그리고 비장세포는 배양 24시간째에 첨가하고 24시간 더 배양 한 뒤에 광학밀도를 측정하였다.

8. 자가혈청 배양액이 alamar blue 환원량에 미치는 영향

비장세포 현탁액은 두 개의 15 ml 튜브에 나

누어 담아 1,200 rpm, 10분간 원심하여 얻은 펠렛층을 각각 하나는 3 ml의 배양액으로 다른 하나는 2.5% 자가혈청이 함유 한 RPMI-1640 배양액(자가혈청 배양액)을 첨가하여 현탁하였다. 웰당 비장세포 10^5 개/50 μ l를 접종하고 37°C와 5% CO₂에서 4시간 배양한 뒤 Con A 10.0 μ g/ml 용액 40 μ l를 첨가하여 배양하였다. alamar blue는 비장세포 배양 24시간째에 첨가하여 24시간 더 배양 한 뒤에 광학밀도를 측정하였다.

9. 통계처리

실험데이터는 LPS주입과 배양조건(배양시간, 세포수, Con A 농도 및 혈청 종류)의 2원배치 분산분석을 SAS프로그램의 GLM(general linear model) 법으로 주효과 및 상호관계를 조사하였다. 주효과가 유의하면($p < 0.05$), 평균값 사이의 유의차는 SAS의 최소 유의차 값으로 검정하였고, $p < 0.10$ 값은 경향을 나타내는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 배양시간

비장세포 또는 PBMC의 배양시간 경과와 첨가한 alamar blue(alamar blue) 환원량의 관계를 Fig. 2에 나타내었다. 비장세포와 PBMC에서 alamar blue 환원량은 LPS 주입과 관계없이 배양시간의 경과에 따라 비장세포($R^2=0.980\sim0.898$, $n=15$)는 120시간까지 PBMC($R^2=0.762\sim0.851$, $n=15$)는 48시간까지 직선적으로 증가하였다. LPS를 주입한 육계 병아리의 비장세포를 배양할 때 alamar blue 환원량은 대조구에 비해 배양 24시간째부터는 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였고 그 이후는 배양시간과 관계없이 높았다.

LPS를 주입한 육계 병아리의 PBMC를 배양할 때 alamar blue 환원량은 대조구에 비해 배양 4시간째부터는 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하여 그 차는 시간 경과에 따라 증가 하였으며 배양 48시간째에 그 차이가 가장 큰 것으로 나타났다.

2. 세포수

alamar blue 환원량에 미치는 비장세포와 PBMC의 세포수의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. alamar blue 환원량은 비장세포와 PBMC 세포수에 따라 LPS 주입과 관계없이 직선적으로 증가하였다 ($R^2=0.999$). alamar blue 환원량은 10^3 개에 비하여 10^4 개 세포를 이용할 때 증가하는 경향이 있었으나, 이들에 비해서 웰당 10^5 개의 비장세포 또는 PBMC를 접종했을 때 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다. LPS 주입한 육계 병아리의 비장세포 또는 PBMC는 웰당 10^5 개를 접종하였을 때 대조구에 비해서 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다.

3. Con A 농도

비장세포와 PBMC의 증식을 자극하기 위하여 첨가한 Con A 농도가 alamar blue 환원량에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다.

비장세포와 PBMC 증식중에 Con A 첨가는 첨가하지 않은 것(0 μ g/ml)에 비해 alamar blue 환원량을 유의하게($p < 0.05$) 증가시켰다. 그러나 LPS를 주입한 육계병아리에서 취한 비장세포에서 alamar blue 환원량은 대조에 비해서 배양액중 Con A 농도에 관계없이 유의하게 높았다. LPS 주입시와 대조사이의 alamar blue 환원량의 차이는 배양액중 Con A 농도의 증가에 따라 더 커져서 10.0 μ g/ml일 때 가장 많았다. LPS를 주입한 육계병아리에서 취한 비장세포와 PBMC에서 alamar blue 환원량은 배양액중 Con A 농도가 ml 당 10.0 μ g일 때 1.0과 5.0 μ g에 비해 유의하게($p < 0.05$) 높았으나, Con A 농도 1.0와 5.0 μ g/ml 첨가 사이에는 차이가 없었다. 한편 대조에서는 alamar blue 환원량이 Con A 농도에 의해 유의하지 않았으나 10 μ g/ml일 때 가장 높아지는 경향이 있었다.

4. 자가혈청 배양액의 영향

비장세포에서 RPMI-1640 자가혈청 배양액(자가혈청배양액)이 alamar blue 환원량에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었다. 자가혈청 배양액

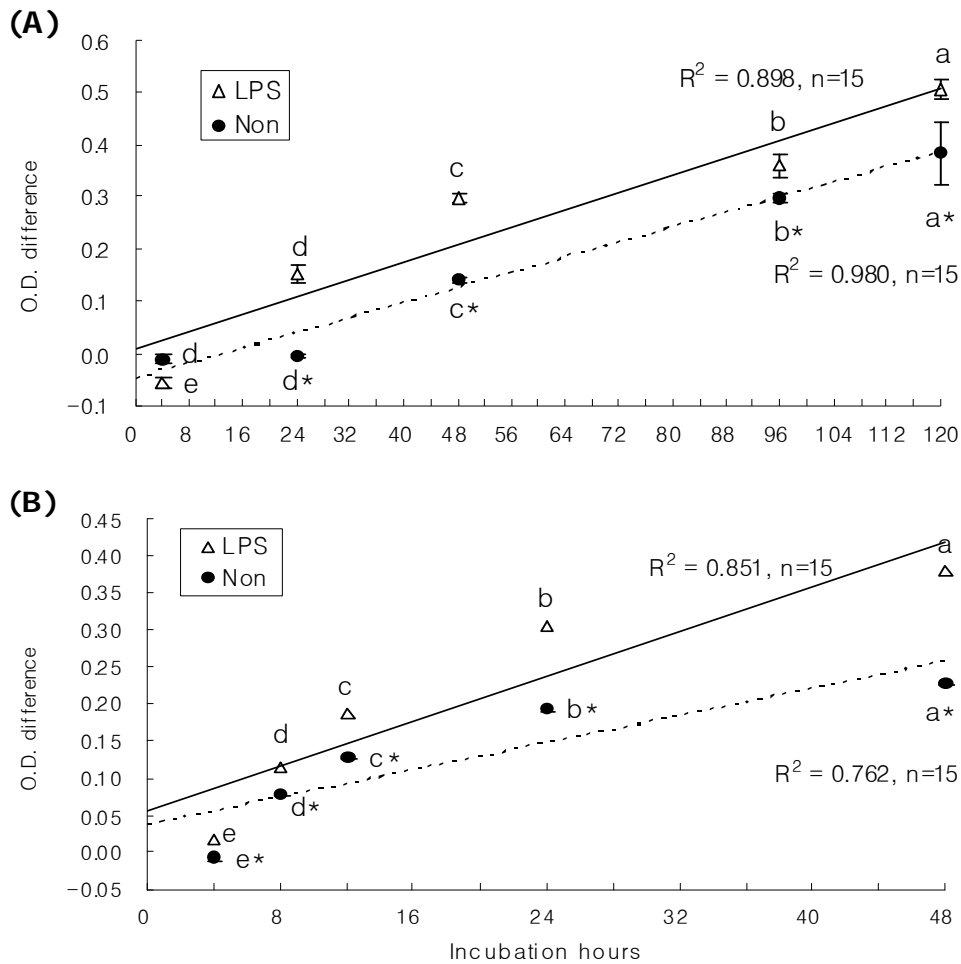


Fig. 2. Relationship of alamar blue reduction with incubation time in splenocytes (A) and PBMC (B) of male broiler chicks injected with LPS. Values are mean \pm SE of 3 birds. a~e: Means with different superscripts among incubation time of same treatment, and *: means between Non and LPS in same incubation time differ significantly at $p < 0.05$, respectively. Alamar blue reduction is differences between optical density at 570 and 600 nm and determined in 10^5 cells/well of splenocyte or PBMC stimulated with 40 μ l of Con A (10 μ g/ml media) at 4 h after seeding.

은 FBS 첨가 배양액(배양액)에 비해 alamar blue 환원량을 유의하게 ($p < 0.05$) 높였다. LPS 주입은 배양액중 혈청의 종류에 관계없이 대조구에 비해 높은 alamar blue 환원량을 나타내었다 ($p < 0.05$).

IV. 고 찰

1. 세포 증식도 측정법

In vitro 상에서 세포의 증식도는 방사성동위원소를 함유한 화학물질 (^3H -thymidine)이 세포

분열 중 세포의 DNA 증축으로 ^3H thymidine이 들어가는 것을 기초로 하는 방법으로 측정하는 것이 가장 일반적이고 명확한 방법이다(Schlage와 Adams, 1983). 방사성 동위원소 뉴클레오타이드(^3H -thymidine) 사용은 취급자의 건강에 해로울 수가 있고, 발생되는 폐기물은 환경오염원이며, 노력을 집중적으로 해야 할 뿐만 아니라, 특별한 장비가 요구된다. 최근 방사성 시약들을 사용하지 않는 여러 가지 비방사성 세포 증식도 측정법이 개발되고 있다. 이 중에는 미토콘드리아 효소들에 의해 tetrazolium 화합물이 환원되어 형성되는 포르마잔(formazan) 양을

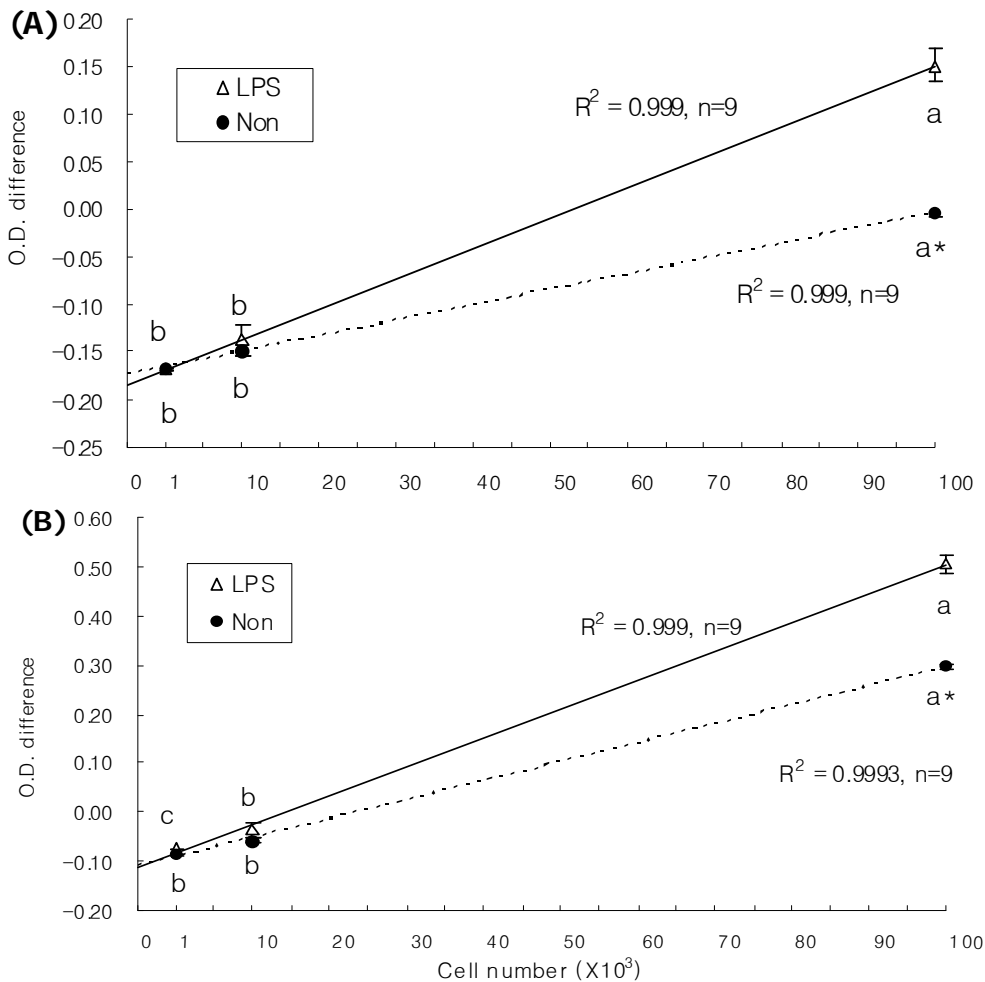


Fig. 3. Relationship of alamar blue reduction with cell numbers in splenocytes (A) and PBMC (B) of male broiler chicks injected with LPS.

Values are mean±SE of 3 birds. a-c: Means with different superscripts among incubation cell number of same treatment, and *: means between Non and LPS in same cell number differ significantly at p<0.05, respectively. Alamar blue reduction is differences between optical density at 570 and 600nm and determined in splenocytes for 48 h and PBMC for 24 h incubation stimulated with Con A (10 µg/ml) at 4 hours after seeding.

측정하는 증식도 평가방법들이 있다. Tetrazolium 화합물에는 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Mosmann, 1983; Denizot와 Lang, 1986), XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, Goodwin 등, 1995), MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, Goodwin 등, 1995) 및 INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium chloride, Bernabei 등, 1989) 등이 있다. 또한 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)이 DNA와 결합된 양을 BrdU 항체로 정량하는 방법

(Porstmann 등, 1985), Hoechst 33258 DNA 염색 방법(Begg와 Mooren, 1989), 그리고 ATP 생물 발광법(ATP bioluminescence, Squatrito 등, 1995) 등으로 세포증식도가 측정되어 왔다. 이 증식도 측정법들은 비용과 노력이 많이 소요되는 한편 세포를 용해하므로 증식도 측정 세포들을 다른 분석에 이용할 수 없다는 단점이 있다.

반면에 alamar blue(alamar blue) 세포증식도 측정법은 세포를 용해시키지 않으므로 임파구들을 항체 또는 싸이토카인 생성 연구에 다시 이용할 수 있는 장점이 있다. alamar blue법은 산화환원 지시약인 alamar blue(resazurin)가 세

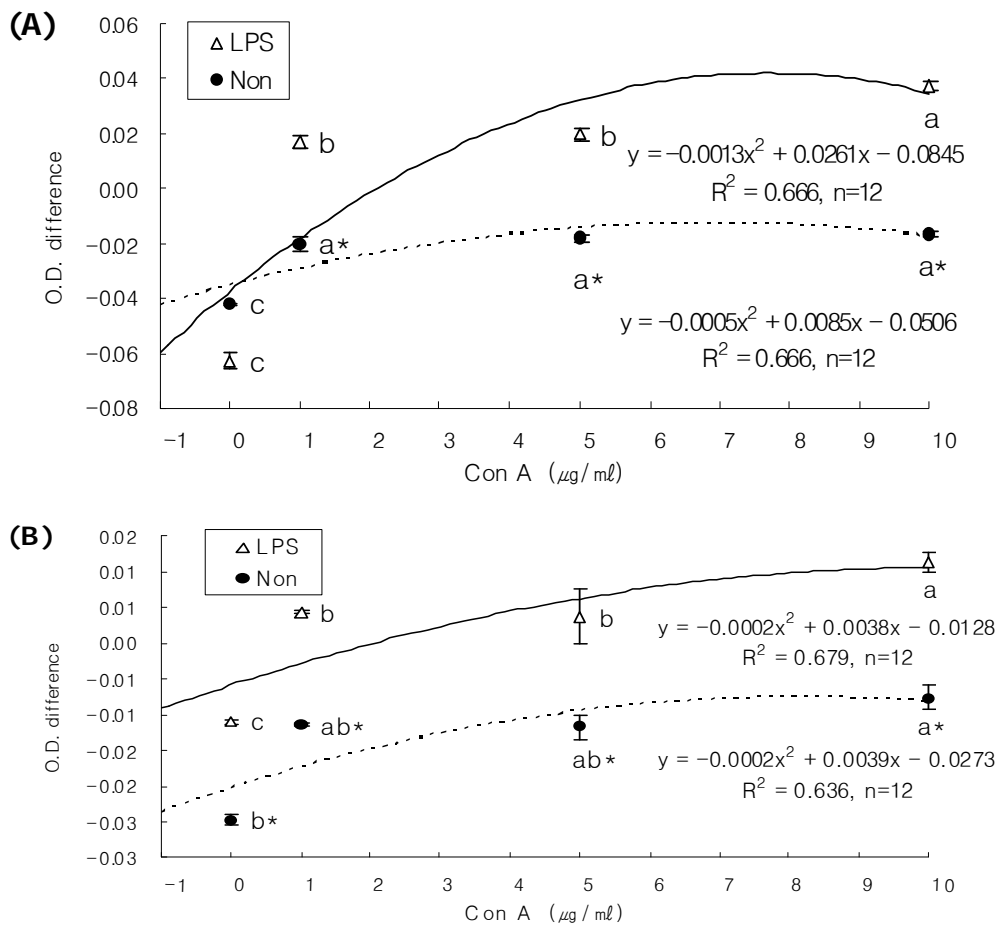


Fig. 4. Effect of concanavalin A (Con A) levels on the alamar blue reduction during splenocytes (A) and PBMC (B) proliferations in male broiler chicks injected with LPS. Values are mean \pm SE of 3 birds. a-c: Means with different superscripts among Con A levels of same treatment, and *: means between Non and LPS in a same Con A level differ significantly at $p < 0.05$, respectively. Alamar blue reduction is differences between optical density at 570 and 600 nm and determined in 10^5 cells/well of splenocytes for 48 h or PBMC for 24 h incubation, respectively.

포에 의해 resorufin으로 환원되는 양을 측정하는 것이다(Ansar Ahmed 등, 1994). 증식중인 세포는 청색의 산화형 resazurin를 적색의 환원형 resorufin로 환원하며, 이 양은 세포의 증식도를 반영한다(Ansar Ahmed 등, 1994; de Fries와 Mitsuhashi, 1995). alamar blue법은 세포에 대한 약물효과와 독성연구(Sawabe 등, 1996; Lee 등, 2000) 및 사람(de Fries와 Mitsuhashi, 1995)과 동물(Ansar Ahmed 등, 1996; Gogal 등, 1997; Zhi-jun 등, 1997)에서 MTT와 ^3H -thymidine법을 대신하여 임파구의 증식도 측정에 이용되고 있다. Gogal 등(1997)은 가금에서 Con A의 농도를 달리하여 자극한 T 임파구 증식도 변화를

alamar blue 법과 ^3H -thymidine 법과 비교하여 유사하다고 하였다.

2. Alamar blue 배양시간

본 연구는 세포배양액에 alamar blue 용액 10%(v/v)가 함유되었을 때 alamar blue 환원량에 미치는 배양시간, 세포수, Con A 농도 및 자가 혈청 배양액의 영향을 조사하였다.

alamar blue 환원량의 측정은 alamar blue 첨가 후 Ansar Ahmed 등(1994)은 가금 임파구의 경우 48시간이, Zhi-jun 등(1997)은 마우스 임파구의 경우 24시간 그리고, Nakayama 등(1997)

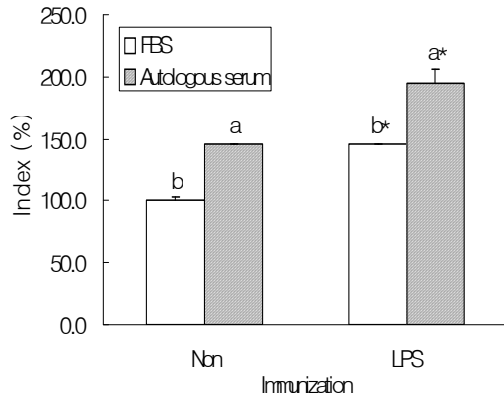


Fig. 5. Effect of autologous serum in culture media on the alamar blue reduction during splenocytes proliferation in male broiler chicks injected with LPS. Values are mean \pm SE of 3 birds. a-b: Means with different superscripts between FBS and autologous serum in same treatment, and *: means between Non and LPS differ significantly at $p < 0.05$, respectively. Alamar blue reduction is differences between optical density at 570 and 600 nm and determined in 10^5 cells/well of splenocytes after 24 h incubation.

은 백혈구 세포주의 증식도 측정시 6시간이 가장 적절한 배양시간이라고 하였다. 본 연구에서 alamar blue 환원량은 배양 4시간째부터 비장세포는 120시간까지, PBMC는 48시간까지 측정하였다. alamar blue 환원량은 비장세포와 PBMC의 배양시간 경과에 따라 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다. 본 연구에서 LPS로 면역반응을 자극하였을 때 alamar blue 환원량은 비장세포는 배양 24시간 그리고, PBMC는 4시간 이후부터 대조구에 비해서 유의하게 증가하였다. 이것은 alamar blue 환원량을 측정하는데 LPS로 면역반응이 활성화한 가금에서는 비장세포는 첨가 후 24시간 그리고, PBMC는 4시간 이상 배양해야 된다는 것을 나타낸다.

이러한 결과는 증식도 측정시 alamar blue가 면역세포들의 증식에 영향을 미치지 않고 그 색상만 변했다는 것을 나타낸다. 가금 임파구 (Ansar Ahmed 등, 1994)에서 그리고 인간의 B 임파구 세포주인 WILL-2 세포주 (Gazzano-Santoro 등, 1997)에서 alamar blue 첨가는 trypan blue 염색으로 평가한 생존율을 감소시키지 않았다. 또한 Zhi-jun 등(1997)은 alamar

blue에 노출된 설치류 비장 임파구는 노출되지 않은 것과 비교하여 염색체 변형이나 사이토카인 mRNA 발현에 차이가 없다고 하였다.

3. 세포수

Nakayama 등(1997)은 alamar blue를 이용한 포유류의 백혈구 세포주인 HL-60, K-562 및 MOLT-4의 증식도 측정시 웰당 세포수가 $0.5 \sim 5.0 \times 10^4$ 개에서 가장 높은 alamar blue 환원량을 얻었다. 한편 Zhi-zun 등(1997)은 5×10^5 개/웰의 C57BL/6 마우스의 비장임파세포를 이용하였다. 본 연구에서 alamar blue 환원량은 비장세포와 PBMC에서 세포수의 증가에 따라 직선적 ($R^2=0.999$)으로 증가하여, 10^5 개 접종시 LPS 주입은 대조에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다. 본 연구는 면역반응이 활성화한 가금에서 비장세포와 PBMC의 증식도 측정시 alamar blue 용액 10% 첨가되는 경우 면역세포는 웰당 10^5 개 접종이 필요하다는 것을 나타낸다. 비장세포 또는 PBMC 10^5 개는 Nakayama 등(1997) 보다는 많고, Zhi-zun 등(1997) 보다는 적었다. 이것은 본 연구에서는 면역반응이 활성화 된 가금에서 면역세포를 취했다는 실험 조건의 차이를 반영하는 것으로 생각되었다. 그러나 본 연구에서 적정 세포수를 결정하기 위해서 alamar blue 환원량에 미치는 웰당 alamar blue 농도와 세포수의 상호작용의 검토는 실시되지 않았다.

4. Con A 농도

Con A는 T 임파구의 증식을 자극하는 물질로(Cochet 등, 1997), T 임파구의 증식도 평가에 의한 세포성 면역을 평가하기 위하여 배양액에 첨가된다. 그러나 Con A의 농도가 높으면 세포 독성이 나타나므로(Ralph, 1976), 면역세포 증식도 측정시에는 배양액 중 Con A 첨가농도의 결정은 중요하다.

Zhi-zun 등(1997)은 C57BL/6 마우스의 비장세포를 여러 가지 Con A 농도의 배양액에서 72 시간 배양 중 마지막 24시간에 alamar blue를

첨가하여 배양하였다. 흡광도차, 형광광도 및 대조로 ^3H -thymidine의 흡입량으로 세포의 증식도를 측정하였다. 그 결과 배양액중 10 $\mu\text{g/ml}$ 일 때에 흡광도차, 형광광도 및 방사성 동위원소의 활성측정 모두 가장 높았고, 그 이후 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 계속 낮아진다는 것을 발견하였다.

본 연구에서 비장세포와 PBMC는 배양액내 Con A의 농도를 ml 당 0.0, 1.0, 5.0 및 10.0 μg 으로 첨가하여 배양하였다. alamar blue 환원량은 Con A 농도에 따라 직선적으로 증가하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높고, Zhi-jun 등(1997)의 연구결과와 일치하였다. 본 연구에서는 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 Con A를 첨가하지 않았으나, alamar blue 환원량이 설치류 비장세포의 증식도 측정시 배양액중 Con A 농도가 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상일 때 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 계속 감소하는 것은 Con A의 세포독성을 나타내는 것이라고 하였다(Zhi-jun 등, 1997). LPS를 주입한 육계병아리에서 분리해낸 비장세포와 PBMC증식에 의한 alamar blue 환원량은 Con A 10 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시 대조구에 비해서 가장 높았다. 따라서 면역반응이 활성화된 가금의 비장세포와 PBMC의 증식도 측정시 Con A의 농도는 배양액에 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 첨가가 적당하다는 것을 나타낸다.

5. 자가혈청 배양액의 영향

혈청은 세포의 성장에 필요하나 확실히 알 수 없는 단백질, 미네랄 또는 IGF 같은 성장인자들을 공급하기 위하여 배양액에 첨가한다(Freshney, 1994). 무혈청 배양액(serum free media)도 있으나, 세포 배양에는 일반적으로 FCS(fetal calf serum) 또는 FBS가 많이 이용된다(Freshney, 1994). 본 연구는 *in vitro* 상에서 세포가 동물체내에 있을 때와 유사한 배양환경을 조성하기 위해 비장세포와 PBMC의 배양액내 가금의 자가혈청을 첨가하여 배양하였다. alamar blue 환원량에 미치는 자가혈청 배양액의 영향을 배양액과 비교하였다.

본 연구에서 LPS를 주입하여 면역반응이 활성화한 육계병아리의 비장세포는 혈청의 종류에 관계없이 대조구에 비해 alamar blue 환원량

을 높였다($p<0.05$). 그러나 자가혈청 배양액은 배양액에 비해 alamar blue 환원량을 유의하게 높였다. 이러한 결과는 자가혈청 배양액은 세포의 증식을 증가시키는 물질이 함유되어 있다는 것을 의미한다. 자가혈청 배양액에 함유된 성장 인자의 내용은 잘 알 수 없으나 면역반응이 활성화 한 가금에서 면역세포 증식도 측정에는 자가혈청 배양액이 FBS 보다 더 효과적이라는 것을 나타내었다.

6. 면역반응 활성화의 영향

LPS 주입구에서 alamar blue 환원량은 대조구에 비해 첨가 후 배양시간이 비장세포에서는 24시간째부터, PBMC는 4시간째부터 유의하게 높았다. 이것은 면역반응이 활성화한 가금에서 취한 면역세포에서는 alamar blue 환원량을 정확히 측정하기 위해서는 alamar blue 첨가 후 비장세포는 24시간과 PBMC는 4시간 이상 배양해야 가능 하다는 것을 나타낸다. 세포수와 관련하여서는 LPS 주입구의 비장세포와 PBMC 수는 10^5 개의 세포 접종시에 대조구에 비해 alamar blue 환원량이 유의하게 높았다.

본 연구의 결과를 종합하면, LPS 주입에 의한 급성기 반응중인 가금에서 alamar blue를 이용한 비장세포의 증식도 측정을 위해서는 alamar blue 첨가 후 24시간이상 배양 그리고 PBMC 증식도는 alamar blue 첨가 후 4시간이상 배양해야 하고, 웰당 세포수 10^5 개 그리고 배양액 ml 당 10.0 μg 의 Con A 농도가 적당하다는 것을 나타내었다. 그리고 배양액내 혈청의 종류에 관해서는 FBS에 비해 2.5% 자가혈청이 더 비장세포의 증식도를 높인다는 것을 나타내었다.

V. 요약

급성기 반응중인 가금의 비장세포와 PBMC 증식도를 alamar blue(alamar blue) 환원량으로 측정하기 위한 조건들을 조사하였다. 갓 부화한 육계병아리(Ross 종) 수컷에 기초사료를 급여하고, 9, 11 및 13일령에 각각 복강내 LPS를 주입으로 급성기 반응중인 14일령 육계병아리

의 혈액에서 PBMC와 비장에서 비장세포를 분리하였다. alamar blue 환원량은 비장세포에서는 4, 24, 48, 96 및 120시간, PBMC는 4, 8, 12, 24 및 48시간에 그리고 웰당 10^3 , 10^4 및 10^5 개로 분배하고, 배양액 ml 당 0.0, 1.0, 5.0 및 $10.0 \mu\text{g}$ 의 Con A를 첨가하며, 배양액 중 2.5%의 자가혈청과 FBS를 첨가하여 측정하였다.

1. alamar blue 환원량은 배양시간의 경과 ($R^2=0.825\sim 1.000$)에 따라 그리고, 세포수($R^2=0.999$)의 증가에 따라 직선적으로 증가하였다.

2. 급성기 반응중인 병아리에서, alamar blue 환원량은 대조구에 비해 비장세포는 24시간이 후, PBMC는 4시간이후부터 10^5 개의 세포접종 시 유의하게($p<0.05$) 높았다.

3. 급성기 반응중인 병아리의 비장세포와 PBMC에서 alamar blue 환원량은 Con A 농도에 관계없이 대조구에 비해 높았으며, 배양액 ml 당 Con A 1.0 또는 $5.0 \mu\text{g}$ 첨가에 비해 $10.0 \mu\text{g}$ 첨가시 유의하게($p<0.05$) 높았다.

4. 그리고, 배양액중 2.5%의 자가혈청은 급성기 반응과 관계없이 FBS에 비해 alamar blue 환원량을 유의하게 높였다.

본 연구는 alamar blue 환원량 평가에 의한 급성기 반응중인 가금의 비장세포와 PBMC의 증식도 측정에는 alamar blue 첨가 후 PBMC는 4시간, 비장세포는 24시간 배양, 세포수는 웰당 10^5 개, 그리고, Con A는 배양액 ml 당 $10.0 \mu\text{g}$ 이 적당하다는 것을 나타낸다.

(Key words) : 알라마 블루 환원, 급성기반응, 비장세포와 PBMC의 증식, 육계 병아리

VI. 인 용 문 헌

1. Abbas, A. L., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th edition. WB Saunders, Philadelphia, PA.
2. Ansar Ahmed, S., Gorgal, R. M. Jr. and Walsh, J. E. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [^3H]thymidine incorporation assay. J. Immunol. Methods 170:211-224.
3. Ansar Ahmed, S., Gogal, R. M. Jr., Larsen, C. T. and Pierson, F. W. 1996. A novel non-radioactive diagnostic test for evaluating cell-mediated function in the chicken. Proc. XX world Poult. Congr. 2:533.
4. Back, S. A., Khan, R., Gan, X., Rosenberg, P. A. and Volpe, J. J. 1999. A new alamar blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. J. Neurosci. Methods 91: 47-54.
5. Begg, A. C. and Mooren, E. 1989. Rapid fluorescence-based assay for radiosensitivity chemosensitivity testing in mammalian cells *in vitro*. Cancer Res. 49: 565-569.
6. Bernabei, P. A., Santini, V., Silvestro, L., Pozzo, O. D., Bezzini, R., Viano, I., Gattei, V., Saccardi, R. and Ferrini, P. R. 1989. *In vitro* chemosensitivity testing of leukemic cells: development of a semiautomated colorimetric assay. Hematol. Oncol. 7:243-253.
7. Chaby, R. 1999. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. DDT 4: 209-221.
8. Cochet, O., Teillaud, J. L. and Sautes, C. 1998. Immunological techniques made easy. Wiley co, UK, pp.: 7.
9. de Fries, R. and Mitsuhashi, M. 1995. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of Alamar Blue assay to ^3H -thymidine incorporation assay. J. Clin. Lab. Anal. 9:89-95.
10. Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 89:271-277.
11. Erf, G. F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. Poult. Sci. 83:580-590.
12. Freshney, R. I. 1994. Culture of animal cells, third edition. Wiley-liss, England, chapter 10.
13. Gazzano-Santoro, H., Ralph, P., Ryskamp, T. C., Chen, A. B. and Mukku, V. R. 1997. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. J. Immunol. Methods 202: 163-171.
14. Gogal, R. M. Jr., Ansar Ahmed, S. and Larsen, C. T. 1997. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, non-radioactive

- assay. Avian Disease 41: 714-725.
15. Goodwin, C. J., Holt, S. J., Downes, S. and Marshall, N. J. 1995. Microculture tetrazolium salts XTT and MTS. J. Immunol. Methods 179: 95-103.
 16. Gloeckner, H., Jonuleit, T. and Lemke, H. D. 2001. Monitoring of cell viability and cell growth in hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar blue. J. Immunol. Methods 252:131-138.
 17. Lee, J. K., Kim, D. B., Kim, J. I. and Kim, P. Y. 2000. *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. Toxicol. *in Vitro* 14:345-349.
 18. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65:55-63.
 19. Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. and Parandoosh, Z. 1997. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. J. Immunol. Methods 204:205-208.
 20. Nociari, M. M., Shalev, A., Benias, P. and Russo, C. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. Methods. 213:157-167.
 21. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognaa, F. 2000. Investigation of the alamar blue fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 267:5421-5426.
 22. Poltrak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C. and Du, X. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 282: 2085-2088.
 23. Porstmann, T., Ternynck, T. and Avrameas, S. 1985. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J. Immunol. Methods 82:169-179.
 24. Ralph, P. 1976. Differential toxicity of concanavalin A and PHA on lymphoid and hematopoietic cell lines. In: Bittiger H, Schnebli HP, eds. Concanavalin A as a tool. New York: John Wiley and Sons, pp: 613-622.
 25. SAS Institute Inc. 1988. SAS user's Guide, statistics version 5 ed. SAS Institute Inc., NC, USA.
 26. Sawabe, Y., Yamagishi, H., Yamagishi, N., Yamamura, Y. and Oka, T. 1996. *In vitro* chemosensitivity of human pancreatic cancer cell lines. Int. J. Pancreatol. 20:185-190.
 27. Schlager, S. I. and Adams, A. C. 1983. Use of dyes and radioisotopic markers in cytotoxicity tests. Methods Enzymol. 93: 233-245.
 28. Squatrito, R. C., Connor, J. P. and Buller, R. E. 1995. Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. Gynecol. Oncol. 58:101-105.
 29. Verdrengh, M. and Tarkowski, A. 1997. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 65:2517-2521.
 30. Zhi-Jun, Y., Striranganthan, N., Vaught, S. K., Arastu, S. and Ansar Ahmed. 1997. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. J. Immunol. Methods 26:25-39.
 31. 고태송, 임진택, 박인경, 김재환. 2004. 급성기 반응중인 육계병아리의 생산성에 미치는 사료중 크릴밀의 영향. 동물자원과학회지, 46: 173-182.
 32. 고태송, 임진택, 박인경, 이해정, 최도열, 최준영, 이홍구, 최윤재. 2005. 급성기 반응을 활성화한 육계병아리에서 사료중 미역제품 수준이 단백질과 에너지 대사에 미치는 영향. 동물자원과학회지 47:379-390.
 33. 박인경, 김재환, 임진택, 고태송. 2004. 사료중 크릴밀을 급여한 육계의 생산성과 SOD 활성에 미치는 급성기 반응의 영향, 동물자원과학회지. 46:183-192.
 34. 이해정, 박인경, 임진택, 최도열, 최준영, 최종배, 이홍구, 최윤재, 고태송. 2005. 미역의 급여수준이 선천성 면역반응이 활성화한 육계병아리의 혈액 항산화 균형에 미치는 영향. 동물자원과학회지 47:29-38.
 35. 임진택, 김재환, 박인경, 고태송. 2003. 살모넬라 LPS를 주입한 육계병아리의 생산성과 질소밸런스 및 대사에너지 이용성에 미치는 사료중 크릴밀의 영향, 동물자원과학회지. 45:957-966.
- (접수일자 : 2006. 12. 5. / 채택일자 : 2007. 4. 23.)