

# 말(馬) 말초혈액으로부터의 수지상세포 분화 및 배양

정 일 구, 고 은 주, 김 미 형, 임 윤 규, 주 흥 구\*

제주대학교 수의과대학 수의약리학교실

## Abstract

### Differentiation and culture of dendritic cells from equine peripheral blood mononuclear cells

Il-Gu Jeung, Eun-Ju Ko, Mi-Hyoung Kim, Yoon-Kyu Lim, Hong-Gu Joo\*

College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju, Korea

Dendritic cells(DCs) derived from myeloid cells are the most potent antigen-presenting cells. In the mouse, it is possible to differentiate a number of DCs from bone marrow. However, the horse has trouble in sacrificing with economic problems. To our knowledge, the culture of equine DCs has not been performed yet in our country. Furthermore, the cytokine set for culture of equine DCs has not been established in this area. Thus, we tried some sets of cytokines and mitogen for this purpose. Mononuclear cells were isolated from blood by Ficoll histopaque, versene solution and an adhesion process and then cultured for 4 days. Specific morphology and viability of DC were determined by visual observation using an optical microscope. Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor(GM-CSF) and equine interleukin(IL)-4 were certainly effective for culturing equine DCs. Antigen-stimulatory ability of equine DCs was confirmed by Mixed Leukocyte Reaction using <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay. To verify antigen-uptake capability of DC, we used fluorescein isothiocyanate-dextran and analyzed by using FACSCalibur® flow cytometer(BD Biosciences). It was evident from our results that human GM-CSF could be used as an alternative cytokine for equine GM-CSF due to its genetic homogeneity. Taken together, this study demonstrated that human GM-CSF and equine IL-4 were effective to differentiate and proliferate DCs from peripheral blood mononuclear cells and enhanced its viability. The information from this study may provide the study of horse immunity with new insights and basic technology. (J Med Life Sci 2011;8:46-49)

Key Words : equine dendritic cells, differentiation, antigen stimulating ability, antigen uptake

## 서 론

수지상세포(dendritic cells; DCs)는 강력한 항원제시 작용을 지니는 세포이다. 골수로부터 유래된 수지상세포는 말초조직, 기관으로 이동하여 항원을 인식하고 탐식한다. 수지상세포 내에서 처리된 항원은 펩티드 형태로 Major histocompatibility complex 분자와 결합하여 제시된다. 이러한 항원성 펩티드 복합체(antigenic peptide complex)는 T 림프구를 자극하여 증식을 유도하게 된다. 결과적으로 수지상세포는 면역체계 내에서 매우 핵심적인 항원제시 역할을 수행하는 것이다<sup>1, 2)</sup>.

이러한 수지상세포의 기능적 특성을 연구하기 위해 여러 방법들이 진행되면서, 마우스나 랫드와 같은 실험동물의 수지상세포 배양방법이 확립되어져왔다<sup>3)</sup>. 종 특이성을 지닌 Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor(GM-CSF)를 포함해서

interleukin(IL)-4, IL-12, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등의 cytokine들이 골수로부터 단핵구 유래 수지상 세포를 배양하는데 이용되어왔다<sup>1, 2, 4)</sup>. 하지만 대동물 특히 말에서 골수로부터 단핵구를 분리해 수지상세포로 분화시키는 데는 경제적 측면 등 여러 가지 어려움이 많다.

비록 말의 말초혈액 내 단핵구에서 수지상세포로의 분화가 가능하지만<sup>5)</sup>, 혈액 내의 단핵구 세포수가 현저히 적을 뿐만 아니라 말에서는 수지상세포 분화에 특이적인 cytokine이 개발되지 못한 상태이다. 그러나 최근 연구에 따르면 개, 소, 그리고 사람의 GM-CSF가 말의 GM-CSF와 유전적 상동성이 유사하여 말에서 말초혈액으로부터의 수지상세포 분화의 가능성이 제시되었다<sup>6, 7)</sup>. 게다가 말초혈액으로부터의 수지상세포 분화에 이용 가능한 recombinant equine IL-4<sup>8, 10)</sup>가 상업적으로 개발된 상태여서 조금 더 효과적으로 수지상세포를 배양할 수 있게 되었다.

이 연구를 통해 human GM-CSF와 equine IL-4가 말의 말초혈액 내의 단핵구로부터 수지상세포를 분화 배양시키는데 효과적임을 증명했으며, 이러한 cytokine이 배양과정 중 수지상세포의 생존을 또한 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 이러한

Address for correspondence : Hong-Gu Joo  
College of Veterinary Medicine, Jeju National University, 102  
Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : jooh@jeju.ac.kr

실험방법의 개발은 앞으로 많은 말 질병과 관련된 수지상세포 연구에 기여할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 수지상세포의 준비와 배양

건강한 1년생의 암컷 Thoroughbred(제주도 마사회 육성마 목장)에서 혈액을 채취하여 항응고제인 Acid Citrate Dextrose (ACD) solution에 4:1(blood:ACD)의 비율로 혼합한 뒤 냉장상태로 실험실로 이동하여 사용하였다. 혈액 내의 백혈구만을 분리해 내기 위해서 Ficoll histopaque-1077(Sigma)을 이용하였다<sup>9)</sup>. 분리된 백혈구를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척 후, 남아있는 소량의 적혈구를 제거하기 위해서 ammonium chloride potassium lysis buffer를 첨가하고 실온에서 10분간 정치하였다. 다시 PBS로 세척한 백혈구에 10% fetal bovine serum(FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin / streptomycin (GibcoBRL)이 첨가된 RPMI-1640 medium(Sigma)를 넣고 culture dish로 옮긴 후 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37 °C incubator에서 배양하였다. 그 후 상층액은 걷어내고 세포를 바닥으로부터 떨어뜨리기 위해 versene solution(GibcoBRL)을 첨가한 후, 위와 동일한 조건의 incubator에서 15분 동안 배양했다. Scraping bar로 세포를 모은 다음, 6-well culture plate에 세포 수가 2×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 넣고 동일한 조성의 RPMI-1640 medium과 10 ng/ml human GM-CSF(Biosource International), 10 ng/ml equine IL-4(Roche)를 사용하여 4일 동안 배양하였다.

### 2. 수지상세포의 형태 관찰과 생존율 측정

배양 4일째 세포를 광학현미경으로 수지상세포의 특이적 형태를 관찰하고 디지털카메라를 이용하여 세포의 모양을 촬영하였다. 그 후 세포를 수거하여 Trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 세포 수와 생존율을 측정하고, FACSCalibur® flow cytometer(BD Biosciences)와 CellQuest software를 이용하여 세포의 크기를 분석하였다.

### 3. <sup>3</sup>H-Thymidine을 이용한 Mixed Leukocyte Reaction(MLR) 측정

수지상세포의 allostimulatory capacity를 알아보기 위해, 다른 개체의 혈액에서 분리된 T lymphocyte를 가지고 MLR을 실시하였다. 혈액 내 T lymphocyte는 수지상세포 분리 방법에서와 같이, Ficoll solution을 이용해 백혈구를 분리해내고 RPMI-1640 medium으로 동일한 조건의 incubator에서 90분간 배양한 후 상층액에서 얻어냈다. 96-well microplate에 T lymphocyte(2×10<sup>5</sup> cells/well)와 수지상세포(1×10<sup>4</sup> cells/well)를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acid, 50 μM 2-mercaptoethanol(all from GibcoBRL)이

첨가된 RPMI-1640 medium(Sigma)으로 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37 °C incubator에서 3일간 배양하였다. 배양 2일째 <sup>3</sup>H-thymidine(1 μCi/well)을 첨가하고 3일째 <sup>3</sup>H-thymidine의 DNA로의 편입을 automated liquid scintillation counter로 평가하였다.

### 4. FITC-dextran uptake assay

수지상세포의 항원탐식능력을 알아보기 위해서 fluorescein isothiocyanate(FITC, Sigma)-dextran uptake assay를 실시하였다. 배양 4일째 수지상세포(1×10<sup>4</sup> cells/well)에 25 μg/ml FITC-dextran을 첨가하여 4 °C와 37 °C에서 각각 1시간동안 배양하였다. 그 다음 ice-cold PBS로 세척한 후 0.1% sodium azide, 5% FBS, 1% paraformaldehyde이 첨가된 fixation solution에 고정한 후 FACSCalibur® flow cytometer(BD Biosciences)와 CellQuest software를 이용하여 형광강도를 측정하였다.

## 결과

### 1. Human GM-CSF와 equine IL-4에 의해 분화된 세포는 전형적인 수지상세포의 형태를 보였으며 높은 생존율을 나타냈다.

Human GM-CSF와 equine IL-4를 사용하여 수지상세포의 분화가 가능한지를 확인하기 위해서 수지상세포의 특이적인 형태를 광학현미경으로 관찰하고 세포의 크기를 Flow cytometry를 통해 알아보았다(Fig. 1). 또한 수지상세포의 생존율을 평가하기 위해서 cytokine을 처리하지 않은 대조군을 두고 trypan blue exclusion test를 통해 세포의 생존율을 확인하였다. 실험결과 대조군에서는 40%의 세포 생존율을 보인 반면, cytokine을 처리한 실험군에서는 66%의 세포 생존율을 보였다(Fig. 2).

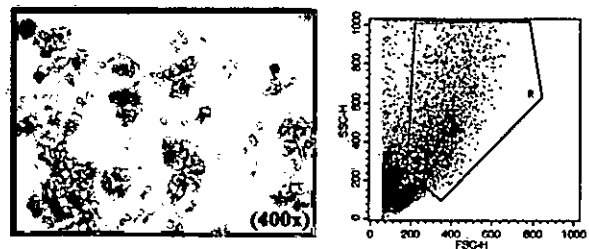


Figure 1. Cells propagated from peripheral blood mononuclear cells with human GM-CSF and equine IL-4. Cells display typical DC morphology with projections. ×400 optical microscope. The cells were then harvested for flow cytometric analysis. Dot plots were obtained and the Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) values were analyzed. Region R includes viable dendritic cells.

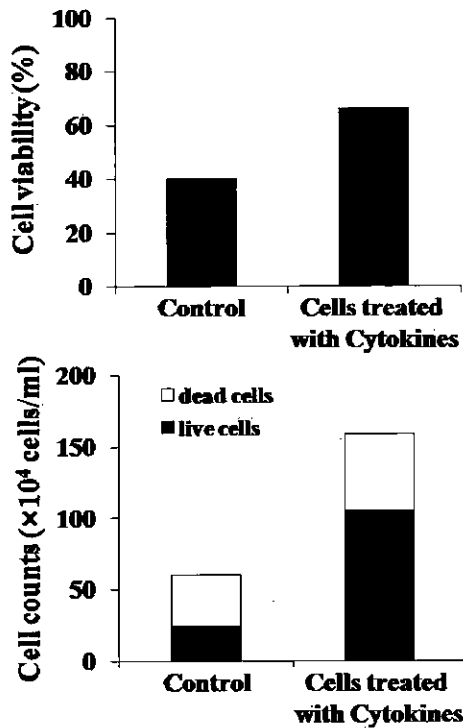


Figure 2. The viability of DCs was enhanced by human GM-CSF and equine IL-4. After 4 days culture, PBMCs were seeded at a concentration of  $1.3 \times 10^6$  cells/ml in 24-well culture plate. Cells were treated with human GM-CSF and equine IL-4 for 4 days. The viability of DCs was measured by using trypan blue exclusion test. Result is representative of two individual experiments.

2. Human GM-CSF와 equine IL-4에 의해 분화된 수지상세포는 동종자극 능력을 보였다.

수지상세포의 기능적 특성은 MLR 과정 중 allogeneic T lymphocyte를 활성화 시키는 능력을 포함하고 있다. 수지상세포와 T cell의 세포수 비율은 1:20으로 하고, 아무것도 처리하지 않은 T cell 대조군을 두어 실험을 실시하였으며 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation을 통해 평가하였다(Fig. 3). 결과적으로 human GM-CSF와 equine IL-4에 의하여 분화된 세포는 allogeneic T cell을 자극하여 증식을 유도하였다. Control T cell은  $28 \pm 2 \times 10^2$  counts per minute(cpm)을 보인 반면, cytokine에 의해 분화된 수지상세포는  $83 \pm 8 \times 10^2$  cpm을 보였다.

3. Human GM-CSF와 equine IL-4에 의해 분화된 세포는 항원탐식능력을 보였다.

미성숙 수지상세포는 성숙 상태일 때보다 항원을 탐식해서 처리하는 능력이 뛰어나다. 이 실험은 수지상세포의 receptor-mediated endocytosis를 알아보기 위하여 FITC-dextran을 soluble antigen으로 사용하고, flow cytometry를 통하여 분석하

였다. Cytokine을 이용해 분화시킨 수지상세포를 4 °C와 37 °C에서 반응시켰을 때 아래의 Fig. 4에서 나타난 것처럼 mean fluorescence intensity(MFI) 값의 차이를 보였다.

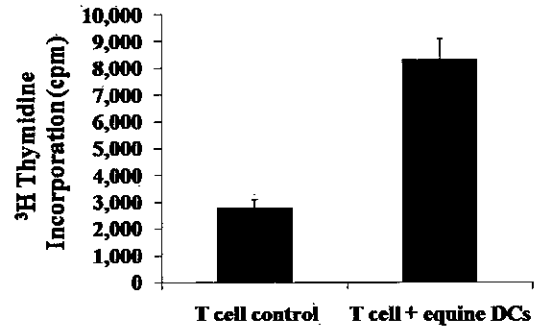


Figure 3. DCs treated by human GM-CSF and equine IL-4 stimulated allogeneic T lymphocytes. To quantitate the level of lymphocyte proliferation, the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was used. The ratio of 1:20 (DCs : T cells) was used during the stimulation. This data is the representative of two individual experiments.

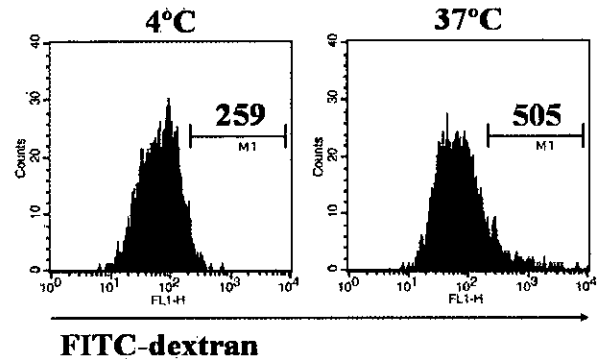


Figure 4. DC differentiated by cytokines obtained the capacity of antigen-uptake. FITC-dextran was used as soluble antigen, and then was added to DCs cultured for 4 days. Cells were incubated for 60 min at 4 °C and 37 °C respectively. Cells were analyzed with FACSCalibur® flow cytometer (BD Biosciences) and CellQuest software.

고찰

이번 연구에서는 recombinant human GM-CSF와 recombinant equine IL-4를 사용하여 말의 말초혈액으로부터의 수지상세포 분화와 증식을 확인하였다. 말 수지상세포는 형태학적, 기능적 특성이 이전에 알려진 사람 수지상세포와 유사하였다. 이번 실험을 통해서 말에서 수지상세포를 분화시키는데 어려움을 다소나마 해소할 수 있었으며, 앞으로의 연구에서 충분한 양의 수지상세포를 사용할 수 있게 되었다.

Cytokine 처리에 의해서 말초혈액으로부터 생성된 말 수지상세포는 배양 4일째에 특이한 세포 형태를 갖추었으며 생존율

증가를 보였다. 그러나 배양 5일 이후의 세포들은 수지상세포의 특유의 형태가 소실되고, 생존율도 저하되었다. 이는 사람 수지상세포의 경우 7일 이상을 배양해야 수지상세포의 특징을 갖추고 기능을 충분히 수행하는데 비해 말 수지상세포의 배양기간과 조건이 유의하게 구별됨을 알 수 있다. 말 수지상세포의 특이적 기능을 연구하는 여러 실험을 통해 T cell을 자극할 수 있는 가장 강력한 상태의 수지상세포는 cytokine을 처리한 후 4-5일 사이에 배양된 세포라는 것을 알 수 있었다.

또한 cytokine 처리 후 배양 4일째의 수지상세포가 MLR에서 유의한 면역자극 반응을 보였으며, 미성숙 수지상세포의 형태로 항원탐식능력을 지님을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 말에서는 비교적 단기간 배양된 세포가 특이적 상태를 지니며, 배양시간이 지연될수록 오히려 면역활성이 저하되는 것을 알 수 있었다.

이번 연구를 통해서 비교적 말 수지상세포를 간단하고 신속하게 분리 배양할 수 있게 되었다. 이번 실험 개발은 수지상세포와 T cell과의 상호작용에서 발생하는 면역학적, 병리학적 특성을 연구하는데 많은 도움이 될 것이라고 여겨진다. 게다가 말 바이러스 관련 질병에 대한 백신개발 등의 연구에 수지상세포가 응용될 수 있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어진 것임.

#### 참 고 문 헌

- 1) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
- 2) Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 2001;68(3):160-6.
- 3) Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara

- S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176(6):1693-702.
- 4) Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196(2):137-51.
- 5) Siedek E, Little S, Mayall S, Edington N, Hamblin A. Isolation and characterisation of equine dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;60(1-2):15-31.
- 6) Hammond SA, Horohov D, Montelaro RC. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71(3-4):197-214.
- 7) Vecchione A, Catchpole B, D'Mello F, Kanellos T, Hamblin A. Modulating immune responses with dendritic cells: an attainable goal in veterinary medicine? *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87(3-4):215-21.
- 8) Ahn JS, Agrawal B. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol* 2005;17(10):1337-46.
- 9) Siedek EM, Whelan M, Edington N, Hamblin A. Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: stimulation of T lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;67(1):17-32.
- 10) Vandergriff EV, Swiderski CE, Horohov DW. Molecular cloning and sequencing of equine interleukin 4. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;40(4):379-84.