

## 흰생쥐 비장세포들에서 재조합결핵성분예방약에 의한 세포증식활성과 사이토카인분비활성변화

윤재성, 이성현, 박숙영

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구기관들과 과학자, 기술자들은 우리 나라의 실정에 맞고 나라의 경제발전에 이바지할수 있는 과학기술적문제를 더 많이 풀어야 하겠습니다.》(《김정일선집》 증보판 제13권 173페이지)

우리는 유전자재조합기술로 만든 재조합결핵성분예방약의 세포성면역효과를 보기 위하여 실험동물인 흰생쥐 비장세포에서 세포증식활성과 세포성면역에 관계되는 몇가지 사이토카인들의 분비활성을 보았다.

### 재료와 방법

재조합결핵항원(85kD)은 대장균에서 발현시킨것이며 재조합결핵성분예방약은 재조합항원(20 $\mu$ g/mL)과 면역보조제인 DDA(디메틸디옥타데실암모늄브로미드, 1.0mg/mL)를 1:1로 혼합하는 방법으로 만든것(pH 5.0)이다.

흰생쥐에 재조합결핵성분예방약 0.5mL를 2주일 간격으로 3회 접종하고 두주일후에 흰생쥐의 비장세포에서 세포증식활성과 사이토카인함량을 측정하였다.

흰생쥐 비장세포에서 세포증식활성은 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움브로미드)법[2, 4]으로 측정하였다.

예방약을 접종한 흰생쥐로부터 비장을 무균적으로 떼내어 세포들을 분리하고 세포배양액에 넣은 다음 그것을 96공미량배양판에 분주하고 거기에 재조합결핵항원을 넣었다. 이것을 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>부란배양기에서 일정한 시간 배양한 다음 MTT시약을 넣고 배양한다. 배양이 끝나면 96공미량배양판을 원심분리하여 상청액을 버리고 침전물에 DMSO용액을 넣어 포르마잔을 용해시킨 다음 A<sub>570</sub>에서 흡광도를 측정한다.

재조합결핵항원의 세포증식활성은 증식지수에 의하여 평가하였다.

$$\text{증식지수} = \frac{D_{\text{자극}} - D_0}{D_{\text{비자극}} - D_0}$$

여기서  $D_{\text{자극}}$ 은 비장세포배양액에 재조합항원용액을 넣고 배양한 용액의 흡광도,  $D_{\text{비자극}}$ 은 비장세포배양액에 PBS용액을 넣고 배양한 용액의 흡광도,  $D_0$ 은 공백대조로서 비장세포가 없는 세포배양액에 PBS용액을 넣고 배양한 용액의 흡광도이다.

사이토카인은 비오틴-아비딘결합법[1, 3]을 리용한 효소면역검사키트(ELISA, 《Neobioscience》, 96공미량반응판)를 리용하여 측정하였다.

96공미량반응판에 재조합결핵항원을 넣고 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>부란배양기에서 48~72h동안 배양한 다음 배양상청액을 -20 $^{\circ}$ C 극동기에 보관하였다가 사이토카인검사시료로 리용하였다. 세포성면역효과판정에 리용된 사이토카인들은 인터로이킨-2(IL-2), 인터페론감마(IFN- $\gamma$ )와 종양괴사인자- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )였으며 검사키트의 표품을 리용하여 사이토카인수준을 평가하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 재조합결핵성분예방약에 의한 세포증식활성변화

먼저 재조합결핵성분예방약의 MTT비색검사에 앞서 MTT검사에 알맞는 비장세포농도, 항원자극농도 및 자극시간, MTT농도 및 작용시간 및 DMSO처리체적을 결정하였다.

재조합결핵항원의 항원자극농도를 결정하기 위하여 단백질농도가 100 $\mu$ g/L인 재조합결핵항원을 96공미량배양판에 5, 10, 20, 30, 40 $\mu$ L씩 각이하게 첨가하고 48h동안 배양하여 MTT비색검사를 진행하였다.(표 1)

표 1. 재조합결핵항원의 첨가량에 따르는 증식지수의 변화

재조합결핵항원첨가량/ $\mu$ L	5	10	20	30	40
증식지수	1.23 $\pm$ 0.01*	1.53 $\pm$ 0.02*	2.05 $\pm$ 0.01	2.06 $\pm$ 0.01	2.06 $\pm$ 0.01

n=3, 세포농도 5 $\times$ 10<sup>5</sup>개/구멍, \* p<0.05(첨가량 20 $\mu$ L와의 비교)

표 1에서 보는바와 같이 재조합결핵항원을 96공미량배양판에 30 $\mu$ L이상 첨가할 때 증식지수에서의 변화가 없으므로 MTT비색검사에 알맞는 재조합항원첨가량을 30 $\mu$ L로 정하였다.

다음으로 MTT비색검사에 알맞는 세포농도를 결정하기 위하여 10% 소혈청을 포함한 RPMI-1640배지로 비장세포농도를 1.5 $\times$ 10<sup>7</sup>개/mL로부터 각이하게 희석하여 96공미량배양판에 100 $\mu$ L씩 넣고 2일동안 배양한 다음 MTT발색시약을 넣어 비장세포농도에 따르는 포르마잔생성량을 측정하였다.(표 2)

표 2. 비장세포농도가 포르마잔생성량에 미치는 영향

비장세포농도 ( $\times$ 10 <sup>5</sup> 개·구멍 <sup>-1</sup> )	A <sub>570</sub>		항원자극 지수
	자극전	자극후	
15.0	1.235 $\pm$ 0.012	1.581 $\pm$ 0.028	1.28
12.5	1.149 $\pm$ 0.018	1.540 $\pm$ 0.021	1.34
10.0	0.921 $\pm$ 0.005	1.363 $\pm$ 0.016	1.48
7.5	0.736 $\pm$ 0.008	1.185 $\pm$ 0.018	1.61
5.0	0.533 $\pm$ 0.007	0.869 $\pm$ 0.009	1.63
2.5	0.363 $\pm$ 0.008	0.606 $\pm$ 0.006	1.67
1.3	0.238 $\pm$ 0.007	0.362 $\pm$ 0.008	1.52
0.6	0.128 $\pm$ 0.004	0.187 $\pm$ 0.005	1.46

n=4

표 2에서 보는바와 같이 세포농도가 높아질수록 항원자극전후 선형적으로 MTT발색세기가 높아졌으나 항원자극지수를 놓고볼 때 비장세포농도를 (2.5~7.5) $\times$ 10<sup>5</sup>개/구멍((25~75) $\times$ 10<sup>5</sup>개/mL) 되게 보장하는것이 합리적이라는것을 알수 있다.

다음으로 MTT첨가량 및 방치시간이 포르마잔생성에 미치는 영향을 검토하였다.

96공미량배양판에 비장세포(50 $\times$ 10<sup>5</sup>개/mL)를 100 $\mu$ L 넣고 MTT(5mg/mL)시약을 각이하한량을 넣어 MTT첨가량이 포르마잔생성에 미치는 영향을 보았다.(표 3)

표 3에서 보는바와 같이 MTT첨가량이 높아질수록 포르마잔생성량이 높아졌으나 첨가량 20 $\mu$ L이상부터는 발색세기에서 유의한 차이가 인정되지 않았다.(p<0.05)

표 3. MTT첨가량이 포르마잔생성에 미치는 영향

MTT첨가량/ $\mu$ L	5	10	20	30	40
$A_{570}$	$0.675 \pm 0.010^*$	$0.764 \pm 0.004^*$	$0.986 \pm 0.011$	$1.013 \pm 0.008$	$1.047 \pm 0.033$

$n=3$ , \*  $p<0.05$ (MTT첨가량 20 $\mu$ L와 비교)

MTT첨가량을 20 $\mu$ L로 고정하고 MTT첨가후 방치시간이 포르마잔생성에 미치는 영향을 보았다.(표 4)

표 4. MTT방치시간이 포르마잔생성에 미치는 영향

MTT방치시간/h	2	4	6	8	10
$A_{570}$	$0.232 \pm 0.006$	$0.344 \pm 0.005$	$0.563 \pm 0.011$	$0.880 \pm 0.011$	$1.049 \pm 0.011$

$n=3$

표 4에서 보는바와 같이 MTT첨가후 방치시간이 길어질수록 포르마잔생성량은 유의성있게 높아졌으나 우리는 방치시간을 6h로 정하였다.

포르마잔의 발색제인 DMSO첨가량이 MTT비색에 미치는 영향을 보았다.(표 5)

표 5. DMSO첨가량이 포르마잔생성에 미치는 영향

DMSO/ $\mu$ L	50	100	150	200
$A_{570}$	$0.408 \pm 0.004^*$	$0.431 \pm 0.004$	$0.440 \pm 0.003$	$0.437 \pm 0.005$

$n=4$ , \*  $p<0.05$ (DMSO첨가량 100 $\mu$ L와 비교)

표 5에서 보는바와 같이 DMSO첨가량이 많아질수록 발색세기가 높아지는 경향성은 있으나 첨가량이 100 $\mu$ L이면 포르마잔이 모두 용해되었다.

우리는 MTT비색검사에 알맞는 조건들을 확정하는데 기초하여 재조합결핵성분예방약을 접종한 흰생쥐에서 세포증식활성을 측정하였다.(표 6) 이때 양성대조로 비특이적자극제인 식물혈구응집소(PHA)자극조를 선택하였다.

표 6. 재조합결핵성분예방약접종흰생쥐에서 MTT세포증식활성측정

지표	비자극조	결핵항원자극조	PHA자극조
$A_{570}$	$0.198 \pm 0.004^*$	$0.303 \pm 0.001$	$0.234 \pm 0.004^*$
증식지수		$2.06 \pm 0.07$	$1.36 \pm 0.02^*$

공백대조  $A_{570}=0.099$ ,  $n=3$ , \*  $p<0.05$ (결핵항원자극조와 비교)

표 6에서 보는바와 같이 예방약접종흰생쥐 비장세포에 재조합결핵항원을 자극시켰을 때 증식지수는 비자극조와 양성대조인 PHA자극조에 비하여 유의성있게 높았다.

## 2) 몇가지 사이토카인의 분비활성변화

재조합결핵성분예방약접종흰생쥐의 비장세포에 항원자극을 주어 배양상청액에서 사이토카인수준을 측정하였다.(표 7) 이때 96공미량배양판에 첨가되는 비장세포농도는 구멍당  $10^6$  개( $10^7$ 개/mL)로 하였으며 항원자극시간은 IFN- $\gamma$ 인 경우 96h(4일), IL-2인 경우 24h(1일), TNF- $\alpha$ 인 경우 48h(2일)로 하였다.

표 7에서 보는바와 같이 재조합결핵성분예방약접종흰생쥐의 비장세포에서  $T_H1$ 형 사이토카인들인 IFN- $\gamma$ 와 IL-2, 염증성사이토카인인 TNF- $\alpha$ 수준은 항원자극전에 비하여 유의성

있게 높아졌다.( $p<0.001$ ) 이것은 우리가 제조한 재조합결핵성분예방약이 실험동물인 흰생쥐에서 세포성면역능을 높여준다는것을 보여준다.

표 7. 재조합결핵성분예방약접종흰생쥐에서 사이토카인수준

사이토카인 종류	사이토카인 농도/pg		
	항원자극전	항원자극후	농도차
IFN- $\gamma$	35.2 $\pm$ 0.2	550.5 $\pm$ 0.2*	515.30 $\pm$ 0.2
IL-2	6.2 $\pm$ 1.6	70.6 $\pm$ 2.3*	64.4 $\pm$ 1.9
TNF- $\alpha$	139.8 $\pm$ 2.9	1 302.8 $\pm$ 0.8*	1 163.0 $\pm$ 2.2

$n=3$ , \*  $p<0.001$ (항원자극전과 비교)

## 맺 는 말

재조합결핵성분예방약은 실험동물인 흰생쥐에서 MTT세포증식활성과  $T_H1$ 형 사이토카인들인 IFN- $\gamma$ 와 IL-2, 염증성사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 수준을 유의성있게 높여준다.

## 참 고 문 헌

- [1] T. Mark Doherty et al.; Journal of Immunological Methods, 298, 129, 2005.
- [2] T. Yoshimura et al.; Biol. Pharm. Bull., 17, 7, 921, 1994.
- [3] 靳亚西 等; 中国比较医学杂志, 26, 4, 46, 2016.
- [4] 庄金秋 等; 广东畜牧兽医科技, 41, 3, 26, 2016.

주제110(2021)년 1월 5일 원고접수

## A Change of Cellular Proliferate Activity and Secretion Activity of Cytokine by the Recombinant TB Vaccine in Mice Splenocytes

*Yun Jae Song, Ri Song Hyon and Pak Suk Yong*

The recombinant TB vaccine significantly increased the MTT cellular proliferate activity and the levels of the  $T_H1$  type cytokines, IFN- $\gamma$  and IL-2, and inflammatory cytokine, TNF- $\alpha$ , in mice splenocytes.

Keywords: cytokine, MTT, vaccine