

## PHA 및 conditioned medium 이 소의 순환혈액 림프구의 유약화와 rosette 형성에 미치는 영향

강세웅 · 윤창용 · 송희종

진북대학교 수의과대학  
(1994년 4월 6일 접수)

### Effect of PHA and conditioned medium on blastogenesis and rosette formation of bovine circulating blood lymphocytes

Sei-woong Kang, Chang-yong Yoon, Hee-jong Song

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University  
Chonju, Korea, 560-756

(Received April 6, 1994)

**Abstract :** This study was planned to estimate the activity of bovine circulating blood lymphocytes using phytohemagglutinin-M(PHA) known as T cell mitogen. Bovine circulating blood mononuclear cells(MNCs) was separated, and cultured with or without macrophage(PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>-</sup> or PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>+</sup>) in conditioned medium which stimulated with various concentration of PHA(0, 5, 10, 15 and 20 $\mu$ g/ml in medium), and then investigated the blastogenic response and rosette formation of lymphocytes.

Blastogenic rate(BR) was especially increased in PHA concentration(10 and 15 $\mu$ g/ml) of PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>+</sup> group and their BR were 41.5 $\pm$ 6.8% and 44.4 $\pm$ 8.9%, respectively and BR in PHA concentration(15 and 20 $\mu$ g/ml) of PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>-</sup> group was 32.8 $\pm$ 6.2% and 31.4 $\pm$ 4.6%, respectively. BR of lymphocytes was more increased in PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>+</sup> than PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>-</sup> group when these cells were stimulated by PHA.

Rosette forming rate(RFR) of lymphocytes to SRBC highly increased when SRBC was treated with AET and/or dextran, respectively. On the other hand, RFR significantly increased more in PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>+</sup> and PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>-</sup> group than in control group, but when compared with two groups, statistical significance was recognized only in PHA concentration(15 $\mu$ g/ml,  $p < 0.026$ ) of PHA<sup>+</sup>/M $\phi$ <sup>+</sup> group.

**Key words :** peripheral blood lymphocytes, mitogen, blastogenesis, rosette formation, cattle

## 서 론

시험관내에서 mitogen 자극에 대한 림프구의 반응은 생체내에서 특이 항원자극에 의하여 일어나는 일련의 반응과 유사하다.<sup>1</sup> 많은 연구들에서 알려진 mitogen 가운데 phytohemagglutinin(PHA), concanavalin-A (Con-

A), pokeweed-mitogen(PWM), lipopolysaccharide (LPS) 등과 같은 비특이적 유사분열 촉진물질을 이용하여 정상 림프구를 배양할 때에 유약화 반응을 유발한다고 보고하였다.<sup>1,3</sup>

여러 mitogen으로 자극한 림프구 증식능의 측정은 면역활성지표로서 응용되고 있으며, 위의 mitogen 가운데

데 PHA는 특히 흉선유래 림프구의 분열촉진인자로 밝혀져, 사람<sup>4</sup>은 물론, 동물에서도 소,<sup>5</sup> 말,<sup>6</sup> 면양,<sup>7</sup> 토끼,<sup>8</sup> 닭<sup>9</sup> 등에서 림프구 증식능에 관한 연구가 활발하게 진행되었다.

시험관내에서의 림프구반응은 실험의 기술적 문제와 제한적인 요소 때문에 많은 이점을 보이면서도 발전을 거듭해왔으며, <sup>3</sup>H-thymidine을 이용한 림프구 증식능 측정기술의 개발<sup>10</sup>로 림프구 유약화반응의 연구에 기여도가 높았다. 그러나 동위원소의 사용은 특수장비, 시약 및 동위원소를 이용하는데 엄격한 제한을 받게 되므로 일상의 실험방법으로는 많은 어려움이 따른다. 따라서 DeCock et al<sup>11</sup>은 동위원소의 이용을 대신하여 형태학적인 관찰을 병행한 실험에서 glucose consumption 검사법을 제시한 바, <sup>3</sup>H-thymidine을 이용한 결과와 유사한 성적을 보고하였다.

이에 저자들은 사람과 여러동물에서 림프구 증식능에 관한 연구는 활발히 진행되어 있으나, 한우에서의 림프구증식능을 관찰한 연구보고가 없어, 한우에서 PHA를 이용한 림프구 증식능을 형태학적으로 관찰하고, 한편으로는 대식세포와 림프구의 상호작용을 확인하기 위하여 대식세포의 혼합여부에 따른 림프구증식능과 PHA로 자극된 conditioned medium에 배양한 림프구들의 rosette 형성능 등을 비교하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 대식세포 및 림프구원으로는 전주시 팔복동 소재 도축장에서 도축중인 외견상 건강한 한우를, rosette 형성에 사용한 적혈구원으로서 전라북도 가축위생시험소에서 사육하고 있는 성숙한 면양을 각각 실험동물로 이용하였다.

**순환 혈액내 단핵세포(MNCs)분리** : 소의 순환혈액내 단핵세포는 경정맥혈 (heparin 20 IU/ml, Gibco)을 취하여 buffy coat 층을 분리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)과 혼합, 이를 Ficoll-Hypaque (F-H, d=1.083, Sigma)에 중층시켜 400g로 45분간 원심한 후 F-H interface에 있는 MNCs를 분리하였다. 이때 혼합된 적혈구는 Gey's sol<sup>12</sup>으로 파괴하였다.

**MNCs내의 단핵 및 대식세포 제거** : MNCs내의 단핵 및 대식세포는 cell adherent 법으로 제거하였다. 요약하면, 아래에 기술한 실험군 즉, 1) MNCs를 plastic 배양병에서 37°C, 1시간 배양한 다음 배양병을 조심스럽게 회전시키고 pasteur pipette을 이용하여 림프구 부유액을 취하여 사용한 경우, 2) MNCs를 plastic 배양병

에 주입한 후 PHA를 처리하고 72시간 배양한후 위와 같은 방법으로 배양병 표면에 부착된 단핵 및 대식세포를 제거하는 경우로 구분하였다.

**Mitogen** : 실험에 사용한 mitogen은 T림프구에만 특이적으로 반응하는 Bacto-phytohemagglutinin-M (PHA, 0528-56, Difco Lab, Detroit)이며, 5% FCS를 첨가한 RPMI 1640 배지에 농도별 (0, 5, 10, 15 및 20 µg/ml)로 첨가하였다.

**Conditioned medium(CM)** : MNCs를 plastic 배양병에 주입한 후 PHA를 농도별로 처리하여 72시간 배양한 경우 그 배양액을 CM으로 간주하였다.

**림프구 유약화반응** : PHA를 농도별 처리, 배양한 림프구의 유약화율은 DeCock et al<sup>11</sup>의 방법을 보완하여 실시하였다. 요약하면, MNCs 및 MNCs 내의 단핵 및 대식세포를 adherent법으로 분리한 림프구를 농도별의 mitogen으로 첨가(유약화반응용) 배지에 각각 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정된 후 plastic 배양병에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양하였다.

위 방법으로 배양한 세포부유액을 원심하여 상층액을 제거하고 cell pellet만을 취한 다음 다시 배지로 세척하고 이를 slide에 도말하여 Wright-Giemsa 염색한 후 0.5% methyl green으로 대조염색하여 광학현미경 (x 1,000) 하에서 림프구 유약화를 판정하였으며 림프구 유약화율은 아래 술식에 따라 계산하였다.

$$\text{Rate of blastogenesis} = \frac{\text{No of blastogenic cells}}{\text{Total lymphocytes counted}} \times 100$$

**PHA 처리된 림프구의 rosette 형성능** : 림프구의 rosette 형성능은 T (E-rosette) 및 B (EAC-rosette)로 구분하여 실시하였다. 요약하면, T림프구의 E-rosette은 유 등의 방법<sup>12</sup>에 따라 polymer를 처리하여 실시하였다. 즉, SRBC를 0.1 M 2-aminoethylisothiouonium bromide (AET, Sigma)로 처리한 군(E<sub>AET</sub> rosette), 0.1 M AET로 처리한 후 8% dextran(DEX, Sigma)을 첨가한 군(E<sub>AET+DEX</sub> rosette)으로 구분하였고, 대조로는 polymer를 처리하지 않은 SRBC를 사용하였다. 한편, B 림프구의 EAC-rosette은 SRBC를 적정희석한 IgM rich anti-SRBC serum 및 complement로 처리하여 실시하였다.

Rosette 형성은 검경시 림프구에 5개이상의 SRBC가 부착된 경우를 양성세포로 판정하였고, rosette 형성율(RFR)은 아래 술식에 따라 계산하였다.

$$\% \text{ of rosette} = \frac{\text{No of rosette forming cells}}{\text{Total cell counted}} \times 100$$

고 찰

림프구 유약화 반응 : 한우 10마리에서 얻은 순환 혈액 림프구를 이용하여 PHA를 농도별 첨가, 대식세포혼합군 및 제거군을 72시간 배양한 후 광학현미경 (x 100) 하에 림프구 유약화 반응을 형태학적으로 관찰하였다. 그결과 Table 1 에서와 같이 림프구 유약화율은 PHA를 첨가한 림프구군들이 무처리군보다 높은 증가를 보였으며, PHA 농도별 첨가군에서는 대식세포혼합군 및 제거군 모두 PHA를 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가한 군에서 가장 높은 유약화율을 보였다. 대식세포혼합군 및 제거군의 림프구 유약화율은 대식세포혼합군이 대식세포제거군보다 증가하였으며, 특히 대식세포혼합군에서는 PHA를 5 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  을 첨가한 군에서 유의성있게 증가되었다(P<0.03, P<0.0002).

Rosette 형성률(RFR) : E, E<sub>AET</sub>, E<sub>AET+DEX</sub> 및 EAC rosette 형성에서는 PHA를 농도별 첨가한 림프구군들이 PHA무처리군보다 RFR이 전반적으로 유의성 있는 증가를 보였다. RFR 은 polymer를 처리한 E<sub>AET</sub> 와 E<sub>AET+DEX</sub> 군에서 높았다. 대식세포혼합군과 제거군과의 rosette형성을 비교에서는 대부분 유의성이 인정되지 않았다. 한편 대식세포혼합군에서는 E<sub>AET+DEX</sub> rosette에서 PHA를 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가한 군에서만 대식세포제거군에서 보다 유의성있게 증가하였다(P<0.026). EAC rosette 형성율은 대식세포혼합군 및 제거군 모두 낮게

림프구의 증식은 어떤 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA 합성과 더불어 세포분열의 결과로 나타나는 하나의 과정이다. 이런 자극의 종류로는 각종 mitogen, lymphokine, 항원, 성장인자 등 여러 종류가 알려져 있다.<sup>13</sup> 이 중 mitogen을 이용하여 림프구를 배양하면 단백질, RNA 그리고 최종적으로 DNA 합성을 포함하는 일련의 복잡한 생화학적 사건이 발생하며,<sup>14</sup> 형태학적인 관찰하에서는 림프구의 핵용적의 증가와 세포질의 비대 등을 볼 수 있다.<sup>15</sup> Nowell<sup>16</sup>에 의해서 mitogen에 의한 림프구 증식능이 처음 보고된 이래, PHA에 의한 자극은 항원 특이적 반응 및 비특이적 자극에 의해서 IL-2의 기존 T 림프구의 증식이 발현된다고 하였다.<sup>17</sup>

다방면으로 연구되고 있는 림프구 증식능의 측정이 각 연구자마다 견해가 다른 것은 동물의 종류,<sup>18</sup> 연령,<sup>19</sup> 임신유무,<sup>20</sup> mitogen 종류<sup>21</sup> 및 농도,<sup>22</sup> 배지,<sup>23</sup> 온도<sup>24</sup> 등 여러가지 요인에 영향을 받기 때문이다. 이 실험에서는 기존연구에 의하여 최적조건을 규명한 배지(RPMI-1640) 및 세포농도(1x10<sup>6</sup>) 등을 맞추고,<sup>25</sup> PHA 를 농도별(0, 5, 10, 15 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 첨가하여 림프구 증

Table 1. Blastogenic response of lymphocytes added with or without macrophages

| PHA<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | M $\phi$ *       |                |                 | M $\phi$       |                |                |
|------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                    | +                | $\pm$          | -               | +              | $\pm$          | -              |
| Untreated                          | 5.9 $\pm$ 1.8    | 14.8 $\pm$ 1.7 | 79.6 $\pm$ 2.9  | 4.5 $\pm$ 2.0  | 10.2 $\pm$ 3.2 | 85.3 $\pm$ 5.0 |
| 5                                  | 30.3 $\pm$ 10.1* | 21.8 $\pm$ 5.7 | 47.9 $\pm$ 11.7 | 19.6 $\pm$ 4.3 | 21.3 $\pm$ 8.3 | 59.1 $\pm$ 8.9 |
| 10                                 | 41.5 $\pm$ 6.8** | 23.7 $\pm$ 5.6 | 34.7 $\pm$ 8.4  | 25.2 $\pm$ 6.5 | 26.2 $\pm$ 5.2 | 48.6 $\pm$ 7.3 |
| 15                                 | 44.4 $\pm$ 8.9   | 23.0 $\pm$ 3.6 | 32.6 $\pm$ 7.1  | 32.8 $\pm$ 6.2 | 25.8 $\pm$ 2.8 | 41.4 $\pm$ 3.7 |
| 20                                 | 36.7 $\pm$ 10.8  | 20.4 $\pm$ 7.2 | 42.8 $\pm$ 11.2 | 31.4 $\pm$ 4.6 | 23.4 $\pm$ 4.7 | 45.2 $\pm$ 2.3 |

Values are expressed as M $\pm$ S.D. from 10 cattle.  
\*P<0.03 vs M $\phi$  ; \*\*P<0.0002 vs M $\phi$

Table 2. SRBC-rosette forming rate of lymphocytes added with or without macrophages

| PHA<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | M $\phi$ *    |                  |                      |               | M $\phi$      |                  |                      |               |
|------------------------------------|---------------|------------------|----------------------|---------------|---------------|------------------|----------------------|---------------|
|                                    | E             | E <sub>AET</sub> | E <sub>AET+DEX</sub> | EAC           | E             | E <sub>AET</sub> | E <sub>AET+DEX</sub> | EAC           |
| Untreated                          | 0.6 $\pm$ 0.1 | 14.6 $\pm$ 3.0   | 41.9 $\pm$ 7.4       | 1.1 $\pm$ 0.3 | 0.5 $\pm$ 0.2 | 14.8 $\pm$ 3.2   | 48.0 $\pm$ 2.8       | 0.6 $\pm$ 0.1 |
| 5                                  | 3.9 $\pm$ 1.9 | 33.0 $\pm$ 14.8  | 68.3 $\pm$ 13.8      | 4.2 $\pm$ 3.3 | 2.5 $\pm$ 2.7 | 29.7 $\pm$ 10.2  | 68.6 $\pm$ 14.3      | 3.4 $\pm$ 2.3 |
| 10                                 | 4.4 $\pm$ 3.4 | 35.4 $\pm$ 12.7  | 68.0 $\pm$ 11.6      | 3.0 $\pm$ 1.7 | 3.6 $\pm$ 5.1 | 36.4 $\pm$ 12.3  | 69.4 $\pm$ 11.9      | 3.5 $\pm$ 2.4 |
| 15                                 | 5.0 $\pm$ 1.6 | 34.0 $\pm$ 10.6  | 80.6 $\pm$ 5.3*      | 3.0 $\pm$ 0.7 | 1.9 $\pm$ 1.3 | 26.7 $\pm$ 10.5  | 67.7 $\pm$ 8.6       | 3.4 $\pm$ 2.0 |
| 20                                 | 3.6 $\pm$ 2.5 | 34.0 $\pm$ 11.0  | 71.9 $\pm$ 11.1      | 2.6 $\pm$ 1.2 | 3.4 $\pm$ 3.7 | 32.8 $\pm$ 15.4  | 65.2 $\pm$ 8.7       | 3.2 $\pm$ 2.4 |

Values are expressed as M $\pm$ S.D. from 10 cattle.  
\*P<0.026 vs M $\phi$

식능을 형태학적으로 관찰하였다. 그 결과 대식세포 혼합군 및 제거군 모두  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  에서 가장 높은 림프구 유약화율을 보였다. 이와 같은 성적은 Ishikawa and Shirahata<sup>26</sup>가 Holstein에서 분리한 림프구를 PHA로 처리하였을 때  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  에서 가장 높은 림프구 유약화율을 보였다고 보고한 것과 일치하였다.

대식세포는 세균, 바이러스 등 외부물질을 파괴하는 탐식능이 있으며, superoxide anion( $\text{O}_2^-$ )과 hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )등 reactive oxygen species(ROS)와 lysosomal 효소 뿐아니라, monokine과 같은 물질을 생성하며 염증반응을 유도하고 종양세포를 제거하는 중요한 역할을 한다.<sup>27</sup> 대식세포에서 생성되는 monokine은 세포활성 조절기능을 하는 당단백질로서 타세포의 활성화에 영향을 주며, 림프구 유약화 반응에 interleukin-1(IL-1)등을 분비하여 booster effector로서 림프구 활성화 및 상호기전에 영향을 미친다.<sup>28</sup> 또한 T cell mitogen인 PHA 로 자극배양한 림프구는 대부분 T 림프구의 활성화로 lymphokine의 일종인 IL-2가 발생, 유도되어 림프구 유약화에 관여한다.<sup>29</sup> Morgan et al<sup>30</sup>에 의해서 최초로 발견된 IL-2 는 T cell growth factor (TCGF)로서 항원 특이적 및 비특이적인 자극을 받은 CD4 cell 및 large granular lymphocyte에서 생산되는 lymphokine의 일종으로서 그 기능은 T 세포성장 이외에, B세포의 분화인자 유도, 세포독성 림프구, 자연살해세포 및 대식세포 등의 증식 및 활성화 등에 관여하며,<sup>31</sup> 생성기전은 IL-2 수용체 발현활성과 autocrine system에 의해 증폭된다.<sup>32</sup>

대식세포의 혼합군 및 제거군에 따라 PHA를 농도별 첨가하여 배양한 CM이 림프구 활성화에 미치는 유약화 반응을 형태학적으로 관찰한 바, 본 실험에서는 대식세포 혼합군이 제거군보다 림프구 유약화율이 증가하였다. 이 결과는 Wahl et al<sup>33</sup>에 의해서 여러 항원과 mitogen에 의한 T 림프구의 활성화가 대식세포 활성화자 등에 의하여 증폭된다고 보고한 것과 일치하였다. 또한 PHA처리군과 무처리군의 림프구 유약화 반응에서 PHA처리군이 유의성있는 증가를 보여준 결과는 PHA에 의해 자극배양된 대식세포와 T 림프구가 각각 IL-1 과 IL-2인 세포활성물질을 분비하며 이들 세포들의 상호기전에 도움을 주어 증식분화에 관여하는 것으로 사료되었다.

사람에서 T 림프구는 면양적혈구에 대한  $\text{CD}_2$  receptor를 가지고 있어 T 림프구의 분리를 위하여 E-rosette을 실시한다. 그러나 동물 종에 따라서는 자연 E-rosette 형성율이 매우 낮기 때문에 많은 연구자들이 polymer를 이용하여 E-rosette형성율을 증가시키고 있다. 이 실험에서는 본 교실에서 수행하여온 E,  $\text{E}_{\text{AET}}$ ,

$\text{E}_{\text{AET+DEX}}$  rosette법으로 T림프구를, EAC rosette으로 B 림프구를 정하는 방법으로 이용하였다.<sup>12</sup> Mitogen을 이용하여 림프구를 배양하면 림프구는 자극활성되어 rosette형성율이 증가된다.<sup>34</sup> Miller et al<sup>35</sup>은 rosette에서 림프구의 phyto-mitogen자극이 무자극 림프구보다 2배 내지 3배 정도 E rosette 형성세포의 수를 증가시켰다고 보고 하였다.

위 rosette 방법을 이용, PHA를 첨가한 CM에 배양한 한우의 T 및 B 림프구의 rosette 활성화 여부를 관찰한 바, 이 실험에서는 대식세포의 혼합여부에 따른 림프구 rosette 활성화는 거의 보이지 않았다. 그러나 PHA 를 첨가 배양한 군과 대조군과의 비교에 있어서는 PHA 처리군에서 대부분 유의성 있는 증가를 보였다. 특히 T 림프구 활성을 반영하는 rosette 분석에서는 증가하였으며, B 림프구의 활성을 보기 위한 EAC rosette에서는 rosette 형성율이 감소하였다. 이러한 결과는 Gergely et al<sup>36</sup>이 사람과 말에서 림프구를 PHA로 자극한 다음 rosette 형성율을 검토한 바 오직 E-rosette형성율은 증가하지만 B세포에는 영향을 미치지 않는다고 보고한 결과와 유사하였다.

위 결과로 미루어 보아, PHA에 자극된 대식세포와 림프구는 활성물질로 알려진 monokine과 lymphokine인 IL-1 및 IL-2를 분비, 림프구 유약화와 더불어 rosette에서도 T 림프구 활성이 유지 및 증가되어 높은 rosette 형성율을 보이는 것으로 사료되었다.

## 결 론

여러 mitogen 가운데 T cell mitogen으로 알려져 있는 PHA를 이용, 한우 림프구의 유약화와 rosette 형성율을 대식세포 혼합여부에 따라 비교한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

림프구의 유약화반응은 PHA를 농도별(0, 5, 10, 15 및  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 첨가시  $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대식세포혼합군 및 제거군 모두 높은 유약화반응을 보였다. 대식세포혼합군과 제거군과의 비교에 있어서는 대식세포혼합군이 제거군보다 증가하였다.

한우림프구의 SRBC에 대한 rosette 형성율은 PHA를 농도별 첨가한 대식세포의 혼합군과 제거군 모두 무처리군보다 증가하였다. 그러나 두군을 비교시 대부분의 유의 있는 차이는 인정되지 않았다. 다만, 대식세포 혼합군에서 PHA를  $15\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하여 배양한 다음  $\text{E}_{\text{AET}}$ ,  $\text{DEX}$  rosette을 실시한 군에서만 유의성 있는 증가를 보였다( $P < 0.026$ ).

이상의 결과를 종합하면, 림프구를 PHA로 자극하면 유약화 반응과 rosette 형성이 증가되며, 대식세포와 혼합배양하면 림프구가 더욱 활성화 됨을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Janossy G, Greaves MF. Lymphocyte activation, I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. *Clin Exp Immunol* 1971; 9:483-498.
2. Parkhouse RME, Janossy G, Greaves MF. Selective stimulation of IgM synthesis in mouse B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Nature New Biol* 1972; 235:21-22.
3. Muscoplate CC, Johnson DW, Pomeroy KA, et al. Characteristics of lymphocytes responses to phytomitogens; Comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. *Am J Vet Res* 1974; 35:1053-1055.
4. 임대철, 김정목, 정태준 등. 마이토젠 및 림포카인이 마우스 비장세포 림프구 및 사람 순환혈액 림프구의 증식반응에 미치는 영향. *대한면역학회지* 1989; 11:89-95.
5. Pearson TW, Roelants GE, Lundin LB, et al. The bovine lymphoid system: Binding and stimulation of circulating blood lymphocytes by lectins. *J Immunol Methods* 1979; 26:271-282.
6. Ferrante A, Thong YH. Simultaneous preparation of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from horse blood on Ficoll-Hypaque medium. *J Immunol Methods* 1980; 34:279-285.
7. Chandra P, Chanana AD, Joel DD. Response of sheep lymphocytes to PHA: Quantitation by nuclear volume measurement and cell counts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980; 163:291-295.
8. Mansfield JM, Wallace JH. Incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into PHA stimulated rabbit circulating blood lymphocytes. Kinetics of the response. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143:408-413.
9. Maheswaran SK, Thies ES. Development of a microculture system for stimulation of chicken circulating blood lymphocytes with concanavalin A. *Am J Vet Res* 1975 ;36:1053-1055.
10. Barta O, Barta V. Lymphocyte transformation test. In: Barta O, ed. *Monographs in animal immunology, Veterinary clinical immunology laboratory*. Blacksburg: Bar-LAB Inc, 1993; B4:1-17.
11. DeCock W, DeCree J, VanWauwe J, et al. Measurement of mitogen stimulation of lymphocytes with a glucose consumption test. *J Immunol Methods* 1980; 33:127-131.
12. 유남선, 김종면, 송희종 등. 한우에서 면역조절세포의 활성화에 관한 연구 : I. 순환혈액 림프구의 E-rosette형성능. *대한수의학회지* 1987; 27:253-258.
13. Maluish AE, Strong DM. Lymphocyte proliferation, In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, ed. *Manual of clinical laboratory immunology*. 3rd ed, Washington DC, Am Soc Microbiol 1986; 274-281.
14. Ahern T, Kay JE. Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohemagglutinin lymphocyte stimulation. *Exp Cell Res* 1975; 92:513.
15. Berman L. Lymphocytes and macrophages *in vitro* : Their activities in relation to functions of small lymphocytes. *Lab Invest* 1966; 15:1084-1099.
16. Nowell PL. Phytohemagglutinin : An indicator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960; 20:462.
17. Robb RS. Interleukin-2, the molecule and its function. *Immunol Today* 1984; 5:203.
18. Peters GJ, Veerkamp JH. Stimulation by phytomitogen of circulating blood lymphocytes from horse, pig, sheep and man. *Vet Immunol Immunopathol* 1982; 3:295-300.
19. Wells PW, Burrells C, Martin WB. Reduced mitogenic responses in cultures of lymphocytes from newly calved cows. *Clin Exp Immunol* 1977; 29:159-161.
20. Soper FF, Muscoplate CC, Johnson DW. *In vitro* stimulation of bovine circulating blood lymphocytes: Analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle. *Am J Vet Res* 1977; 39:1039-1042.
21. Cockerell LC, Hoover EA, Lobuglio AF, et al. Phytomitogen- and antigen-induced blast transformation of feline lymphocytes. *Am J Vet Res* 1975; 36:1489-1493.
22. 김종수, 박응복. Phytomitogen에 의한 기니픽 입과구의 blast transformation: I. 유사분열촉진물질 및

- 세포농도의 효과. 대한수의학회지 1986; 26:245-249.
23. Chuang JC, Yu CL, Wang SR. Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:173-176.
  24. 김경래, 이봉기, 엄정란 등. 온도가 mitogen 자극에 의한 림프구의 반응에 미치는 영향. 대한면역학회지 1988; 10:131-142.
  25. Muscoplata CC, Chen AW, Johnson DW. *In vitro* stimulation of bovine circulating blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. *Am J Vet Res* 1974; 35:1557-1561.
  26. Ishikawa H, Shirahata T. Application of glucose consumption test for evaluating blastogenesis in bovine lymphocytes. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48:111-115.
  27. Durum SK, Schmit JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: An immunological perspective. *Ann Rev Immunol* 1985; 3:263-287.
  28. Simon PL, Laydon JT, Lee JC. A modified assay for interleukin-1 (IL-1). *J Immunol Methods* 1985; 84:85-94.
  29. Falk W, Krammer PH, Mannel DN. A new assay for interleukin-1 in the presence of interleukin-2. *J Immunol method* 1987; 99:47-52.
  30. Morgan DA, Ruscetzi FW, Gallo RC. Selective *in vitro* growth T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* 1976; 193:1007-1008.
  31. Rubin BY, Gupta SI. Differential efficacies of human type I and interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5928.
  32. Aussen C, Mary D, Peyron JF. et al. Inhibition and activation of interleukin-2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate binding proteins. *J Immunol* 1988; 140:215-220.
  33. Wahl SM, Wilton JM, Rosenstreich DL, et al. The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes. *J Immunol* 1975; 114: 1296-1301.
  34. Krakowka S. Mechanisms of E-rosette formation by mitogen stimulated canine lymphocytes. *Immunology* 1980; 39:255-261.
  35. Miller CH, Carbonell AR, Pong R, et al. Cell surface markers on canine lymphocytes. *Am J Vet Res* 1978; 39:1191-1194.
  36. Gergely P, Vanky F, Ebaklein. Spontaneous and PHA-induced rosetting of human blood, tonsil lymphocytes and MLC blast with sheep, human and horse erythrocytes. *Clin Exp Immunol* 1976; 15:23-27.
-