

랫드의 간암 발생과정에서 분리한 자연살해세포의 활성측정 및 특성연구

정자영 · 이국경 · 길광섭 · 이영순*

식품의약품안전청 독성연구소 병리부
서울대학교 수의과대학*
(1998년 9월 11일 접수)

Study on natural killer cell activity and its characteristics during hepatocarcinogenesis in rats

Ja-young Jeong, Kukkyung Lee, Sup-kwang Kil, Yong-soon Lee*

*Department of Pathology, National Institute of Toxicological Research, KFDA
College of Veterinary Medicine, Seoul National University**

(Received Sep 11, 1998)

Abstract : The purposes of this study were to set up the method of the natural killer(NK) cell activity assay using the flow cytometer and to examine the characteristics and distribution of the NK cell during rat hepatocarcinogenesis. Forty five male 6 week-old specific pathogen free(SPF) Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups. Group I was the non-treated control and given normal diet and water. Group II was treated with diethylnitrosamine(DEN, 200mg/kg, i.p.) and partial hepatectomy. Group III was treated with DEN, partial hepatectomy and 0.05% phenobarbital sodium in water from 3 to 16 weeks. All animals were examined the morphology of the large granular lymphocyte(LGL), the LGL percent of the total lymphocytes and the LGL conjugation rate with YAC-1 cell in peripheral blood, spleen and liver. Moreover, activity of the LGL isolated from peripheral blood lymphocytes was determined using the flow cytometer. As results, LGL were observed in the peripheral blood, spleen and liver. LGL were observed the relatively faintly staining basophilic cytoplasm with granules, and eccentric, often kidney-shaped nuclei in Giemsa stain. Its size was 11~13 μ m. LGL percentage of the isolated lymphocytes in peripheral blood, spleen and liver were 1.8~2.3%, 1.3~1.4% and 0.87~0.99%, respectively. LGL conjugation rate with YAC-1 cell was shown to be peripheral blood(9.3~10.3%) > spleen(7.7~8.7%) > liver(5.6~7.0%). The activity of the LGL isolated from peripheral blood lymphocytes in Group I, II and III was 33.7%, 30.5% and 35.4%, respectively. However, all values were not significantly between groups.

Key words : large granular lymphocytes, natural killer cell, flow cytometer, hepatocarcinogenesis, effector : target cell conjugation assay.

서 론

자연살해세포(Natural Killer Cell, NK cell)는 Fc 수용체를 가지고 있으며 비부착성이고 비탐식세포 독성(non-phagocytic cytotoxic)을 보이는 면역기능세포로서 사람과 동물의 순환혈액 속에 대부분 분포한다¹. 반면에 비교적 적은 양이 spleen, tonsils, lymphnodes 그리고 bone marrow에 존재한다. 이외에도 NK cell은 간장, 폐장, 장점막 하 조직 및 복강내 삼출액에서도 존재하는 것으로 보고되고 있다^{2,3}. 1989년 미국에서 개최된 Natural Killer Cell Workshop에서 'NK Cell은 CD3', T Cell receptor'인 반면 CD16*와 CD56*를 나타내는 large granular lymphocyte (LGL)'로서 정의하였다⁴.

지금까지 밝혀진 NK cell의 기능으로는 바이러스나 세균에 감염된 세포와 정상적인 태아 섬유모세포, 태아홍선 및 골수세포 등 미분화세포를 용해시키는 것으로 보고되고 있다^{1,4}. 더불어 숙주에 대한 면역감시 기능으로서 골수이식에 대한 거부반응인자 및 종양관련 감시기능 등이 알려져 있다⁵. 특히 NK cell이 갖는 종양에 대한 면역감시기능은 자연발생종양의 발생억제⁶, 이미 발생한 종양에서는 종양세포의 제거⁷, 전이억제⁸ 등의 기능이 있는 것으로 보고되고 있다.

마우스와 랫드의 간에서 분리한 림프구중 자연살해세포 기능에 대한 종 및 계통별 비교연구에^{3,6} 의하면 Fischer 344와 Sprague-Dawley 랫드의 NK cell이 5개의 마우스 계통인 C₃H, B₆C₃F₁, CBA, BALB/C, C₅₇BL/6의 NK cell 보다 상당히 높은 활성을 나타냈으며 랫드의 계통비교에서는 F344 랫드가 S.D. 랫드에서보다 높은 NK cell 활성을 나타내었다. 마우스 계통간의 비교에서는 C₃H와 B₆C₃F₁이 가장 높았다. 이는 F344 랫드와 C₃H나 B₆C₃F₁마우스에서 비교적 간의 자연발생종양이 다른 계통에 비하여 낮게 발생하는 결과와 깊은 상관성이 있다⁶. 즉, 자연살해세포의 분포와 활성이 종양의 자연발생을 억제시키는 한 요인이 된다는 사실을 알 수 있다. NK cell이

종양세포를 제거한다는 증거를 보여준 실험에 의하면 *in vitro* 에서 LGL에 의해 폐에서 기원된 종양세포가 쉽게 제거됨을 125-iododeoxyuridine(¹²⁵IUDR)을 이용하여 밝혔다⁷. 한편 NK cell과 전이의 상관성을 보고한 연구에 의하면 마우스에서 NK cell 활성수준에 따라 자연적으로 또는 실험적으로 유발된 폐암의 전이율이 반비례관계로 조절됨이 보고되었다⁸.

이러한 여러가지 기능은 NK cell이 표적세포를 용해시키는 기능을 가지기 때문이다. 표적세포에 대한 NK cell의 용해기능은 다단계과정을 거쳐 나타난다^{4,9}. 첫 단계로서 NK cell과 NK 특이적 표적세포의 세포막 구조를 서로 인지하므로서 NK cell과 표적세포간에 conjugation이 이루어지게 된다. 다음단계로서 강력한 단백질분해효소의 분비에 의하여 표적세포가 용해되는 것으로 알려져 있다. 이같은 현상은 많은 종양세포 뿐 아니라 바이러스에 감염된 세포에 대한 NK cell의 세포용해과정에서도 똑같이 설명된다. 또한 이러한 NK cell의 표적세포 용해능 측정방법으로는 ⁵¹Cr-release assay 법¹⁰과 유세포 측정기(Flow Cytometer, FCM)를 이용한 분석법^{11,12} 등이 소개되고 있다. 최근 들어서는 방사성 동위원소를 사용하는 ⁵¹Cr-release assay 법 보다는 본 연구에서 이용한 유세포 측정기를 이용한 분석법이 간편하고 경제적이며 정확한 분석법으로서 많이 이용되어지고 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 NK cell이 자연발생종양과 관련성을 보고하고 있지만 화학적 발암화 과정에서 NK cell의 역할에 대해서는 지금까지 연구가 부족한 상태이다. 또한 간장은 바이러스 감염이나 암과 밀접하게 관련되어 있으므로 NK cell 역시 간염과 간암의 조절을 위한 제일선의 방어자로서 역할이 있기 때문에^{6,13} 간장에서 NK cell 기능에 대한 조사는 꼭 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 화학적 간 발암화 과정에서 말초혈액, 비장 및 간장에 존재하는 NK cell 분포조사 및 conjugation rate를 조사하고 또한 유세포 측정기를 이용한 활성측정법 확립과 활성측정 등을 통하여 화학적 간 발암화 과정에서 NK cell의 특성을 이해하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 국립독성연구소 실험동물실에서 분양된 5주령, Sprague-Dawley계 수컷 랫드 45마리를 사용하였다. 동물의 사육조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 그리고 명암교대 12시간을 각각 유지하였다. 모든 동물은 분양후 사육실 내에서 1주간 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 또한 사료(신촌사료, 서울)와 음수는 자유로이 급식시켰고 polycarbonate 케이지에 4마리씩 넣어 관리하였다.

실험설계 및 약물투여 : 실험동물은 총 3개군으로 한 군에 15마리씩 나누었다(Fig 1). 모든 약물의 처치는 아래 실험계획에 따랐으며 조사항목에 대하여 8주부터 16주까지 조사하였다. 발암물질 처치군에는 실험개시일에 DEN을 체중 kg당 200mg씩 1회 복강내로 투여하였고 3주에는 간의 67%를 절제하였다. 제 I 군은 무처리대조군으로 설정하였고, 제 II 군에서는 실험개시일에 DEN만 투여하고 phenobarbital 투여없이 간의 일부분(67%)만을 절제하였다. 제 III 군은 실험개시일에 DEN 투여, 3주에 간 부분절제 및 3주부터 16주까지 phenobarbital을 음수로 하여 투여하였다.

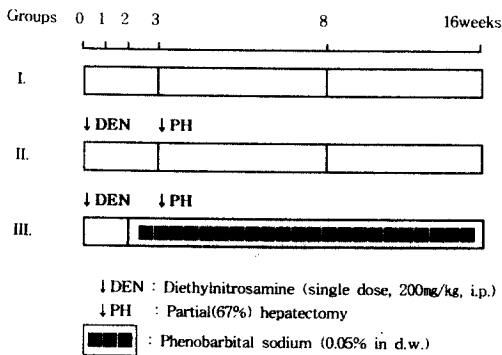


Fig 1. Desing of Experiment.

실험개시후 8주째부터 16주까지 다음의 각 항목을 조사하였다. 즉, 비장, 말초혈액 및 간장에서 분리한 임파구로부터 자연살해세포를 분리하여 형태적 특성과 분리를 결정하였고 분리된 자연살해세포와 그의 표적세포인 YAC-1과의 conjugation 비율을 결정하였다. 또한 말초혈액으로부터 분리한 자연살해세포의 활성검사를 조사

하기 위하여 유세포 측정기를 이용하였다.

NK 세포에 대한 표적세포 YAC-1의 준비 : 한국세포주은행으로부터 분양받은 mouse YAC-1 림프종 세포를 10% 소 태아혈청(fetal calf serum, GIBCO, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지(GIBCO, USA)에 부유시켜 37°C , 95% O_2 , 5% CO_2 배양기에서 유지 및 계대배양하였다. 표적세포로서 YAC-1은 95%의 생존율 및 형태학적으로 정상인 YAC-1 만을 실험에 사용하였다

림프구의 준비 : 말초혈액으로부터 림프구를 분리하기 위하여 헤파린(100IU/ml blood) 처리된 10ml 주사기로 심장 채혈하여 PBS(Ca^{++} , Mg^{++} free)로 동량희석한 다음 원심분리관에 ficoll-hypaque(LKB, Sweden) 5ml를 넣은 다음 그 위에 희석된 동량의 혈액을 중층하고 1,500rpm으로 20분간 원심하여 림프구를 분리하였다. 이렇게 분리된 림프구를 PBS로 2회 씻어낸 후 100 unit penicillin, 100 μg streptomycin, 2mM glutamine, 1mM pyruvate와 10 mM HEPES를 첨가한 10% 소 태아혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지에 다시 부유시켰다. 또한 비장과 간장은 내엽에서 26 게이지 주사침으로 긁어 모은 세포로부터 위의 방법으로 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구의 생존율을 확인하기 위하여 10 μl 의 세포부유액과 0.4% trypan-blue(GIBCO, USA) 10 μl 를 잘 희석한 후 혈구계산판을 이용하여 현미경하에서 세포의 생존율을 결정하였다. 분리된 세포의 생존율은 95% 이상이 되는 샘플만을 실험에 이용하였다.

Large granular lymphocyte의 분리 : Percoll(비중 1.130g/ml, Pharmacia) 9 part에 10배 농축 RPMI 1640 배지 1 part를 가하여 등장화하고 이것을 100% percoll(비중 1.22g/ml, 290mOs)로 간주하였다. 100% percoll 용액을 66.7%, 55.0%, 50.8%, 44.2%로 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배지로 희석하고 15ml 원심분리관에 밀도가 높은 순으로 불연속 밀도분배(percoll gradient method)를 만든 후 위의 과정에서 회수된 총림프구 부유액(약 1.0~2.0ml)을 맨 위에 중층하였다. 이어서 30분간 실온에서 3,000rpm으로 원심분리하여 4개의 분획을 확인한 후 이 중에서 pasteur pipette으로 분획 2 즉, percoll 44.2%와 50.8% 사이의 분획내 세포를 회수하였고 회수된 세포를 Giemsa 염색하여 형태적으로 LGL 세포임을 확인하였다. Percoll을 제거하기 위하여 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다.

말초혈액, 비장 및 간장으로부터 분리한 총림프구중 차지하는 LGL의 퍼센트 : LGL의 형태를 관찰하기 위하

여 위의 과정에서 회수된 두 번째 분획의 세포를 PBS 2ml에 부유하고 이중 5 μ l를 Cytospin 3(Shandon Inc., UK)로 슬라이드 위에 부착시켰다. 이 슬라이드를 Giemsa 염색한 후 현미경 하에서 관찰하였다. 또한 말초림프구 중에 차지하는 % LGL을 결정하기 위하여 전체 림프구수와 위의 방법으로 분리된 LGL의 수를 각각 H*1 system (Technicon Co., USA)을 이용하여 측정하였다.

Flow cytometer를 이용한 natural killer 세포의 활성 측정 : FCM을 이용한 NK 세포의 활성측정은 표적세포인 YAC-1의 형광염색을 위하여 carboxy-fluoresce diacetate(cFDA; 20mg/ml in acetone)를 사용하였고 표적세포 1 \times 10⁶/ml 수에 7.5 μ l씩 사용하였다. cFDA를 섞은 세포 부유액을 37 $^{\circ}$ C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한 후 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다.

분리된 LGL : cFDA에 염색된 YAC-1 세포를 100 : 1의 비율로 각각 준비하였다. 이와같이 준비된 시료를 37 $^{\circ}$ C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 FCM(Coulter Epics, V, USA)를 이용하여 NK 세포에 대한 YAC-1 세포의 살해효과를 측정하였으며 전과정은 4 $^{\circ}$ C 하에서 수행하였다.

FCM은 488nm에서 작동되는 spéctrophysics argon ion laser와 400mW light 출력을 갖추었다. Scattered laser light를 차단하기 위하여 515nm long pass interference filter와 515nm long pass absorption filter를 조합하였다. 형광은 590nm dichroic filter를 통하면서 적색과 녹색으로 분리되고 적색은 다시 630nm long pass absorption filter를 통과하게 하였다. 각 분석시료에는 internal control로서 분석전에 DNA check(Coulter Epics Co., 10 μ m, beads, USA) 6방울을 PBS 1ml에 희석한 액을 측정시 50 μ l씩 첨가하였다. cFDA에 의한 YAC-1의 형광을 forward angle light scatter (FALS)에 gating 된 log integrated green fluorescence(LGFL) channel에 모아 분석하였으며 DNA check의 적색 형광을 peak fluorescence(RFL)에 모아 DNA check가 1,000개 세어지면 분석을 종료케 하였다. 표적세포 YAC-1의 % specific lysis는 다음과 같이 구하였다.

$$\% \text{ specific lysis} = k \times \frac{CT - TE}{CT} \times 100$$

여기서 k는 YAC-1 세포 만의 자연적 형광소실율(4시간 배양후 형광을 갖는 YAC-1 세포수/배양직전(0시간)에 형광을 갖는 YAC-1 세포수)이며, CT는 NK : YAC-1

세포를 100 : 1로 섞은 직후 FCM으로 측정된 형광을 갖는 세포의 평균수이며 TE는 같은 sample을 4시간 배양한 후 측정된 형광을 갖는 세포의 평균수이다. 한편 모든 실험결과에 대한 통계적 처리는 ANOVA후 군간 다중비교(Student's *t*-test)를 하였다.

결 과

Large granular lymphocyte의 형태적 관찰 : 분리된 LGL의 형태관찰은 광학현미경을 이용하였으며 말초혈액, 비장 및 간장에서 각각 분리된 LGL 및 처치군에 따른 LGL의 형태차이는 없었으며 대조군에서 분리된 LGL 소견과 동일하였다. 즉, 핵이 한쪽으로 쏠려 있으며 신장형 핵을 가지고 있고 중심에 함몰부위가 관찰되었다. 세포의 크기는 11~13 μ m 정도로 확인되었고 세포질

Fig 2. Large granular lymphocytes isolated from rat peripheral blood lymphocytes. Note the high nucleus/cytoplasm ratio and kidney shaped eccentric nuclei. Giemsa stain. \times 400.

내에는 azurophilic한 과립들이 관찰되었다(Fig 2).

말초혈액, 비장 및 간장으로부터 분리한 총림프구중 차지하는 LGL의 퍼센트 : 말초혈액, 비장 및 간장에서 분리한 총림프구중 차지하는 LGL의 퍼센트를 결정하였다(Table 1). 처치군간 유의성이 없었으며 말초혈액에서 가장 높은 값을 가졌고 다음은 비장과 간장의 순이었다. 말초혈액은 1.85%에서 2.34%, 비장은 1.28%에서 1.43% 그리고 간장은 0.87%에서 0.99%를 각각 차지하는 것으로 조사되었다.

Natural killer cell과 YAC-1과의 conjugation rate 결정 : 말초혈액, 비장 및 간장에서 분리된 LGL과 이의 표적세포인 YAC-1을 100 : 1, 4시간 배양한 후 conjugation (Fig 3) 비율을 조사하여 Table 2에 정리하였다. 처치군간

Table 1. Percentage of isolated large granular lymphocyte from PBL, spleen and liver in rats

Group	Treat.	No. of animal	PBL	Spleen	Liver
			%LGL/PBL	%LGL/TL	%LGL/TL
I . Non-treated control		6	2.11±1.2	1.41±0.8	0.99±0.6
II . DEN+PH		6	2.34±0.9	1.43±0.7	0.93±0.3
III . DEN+PH+PB		6	1.85±1.1	1.28±0.7	0.87±0.4

Treat.: treatment, DEN: diethylnitrosamine, PH: partial hepatectomy(67%), PB: phenobarbital, LGL: large granular lymphocytes, PBL: peripheral blood lymphocytes, TL: total lymphocytes of tissue(1g).

^a: All values are expressed as mean±standard deviation.

Table 2. Conjugation rate of YAC-1 cell by natural killer cell isolated from PBL, spleen, liver in rats

Group	Treat.	No. of animal	PBL	Spleen	Liver
			%	%	%
I . Non-treated control		6	10.3 ^a ±6.5	8.7±3.7	5.6±2.2
II . DEN+PH		6	9.6±4.6	7.8±3.3	6.4±2.9
III . DEN+PH+PB		6	9.3±3.5	7.7±2.5	7.0±3.6

Treat.: treatment, DEN: diethylnitrosamine, PH: partial hepatectomy(67%), PB: phenobarbital, PBL: peripheral blood lymphocytes.

^a: All values are expressed as mean±standard deviation.

세포의 활성측정은 심장채혈된 말초혈액을 대상으로 수행되었다. NK 세포: YAC-1 세포의 비율을 100:1로 설정하여 분석하였고 그 결과는 Table 3에 정리하였다. 발암을 유발하기 위한 여러 처치에도 불구하고 군간 유의성은 인정되지 않았으며 제3군에서 35.4%, 제1군이 33.7% 그리고 제2군이 30.5%로서 조사되었다.

Table 3. Percentage specific lysis of YAC-1 cell by natural killer cell isolated from peripheral blood lymphocyte

Group	Treat.	No. of animal	PBL
			(E/T ration = 100 : 1)
1. Non-treated control		3	33.7 ^a ±12.5
2. DEN+PH		3	30.5±17.6
3. DEN+PH+PB		3	35.4±8.5

E/T ratio : effector(LGL) : target cell(YAC-1), Treat. : treatment, DEN: diethylnitrosamine, PH : partial hepatectomy(67%), PB : phenobarbital.

$$\% \text{ specific lysis} = k \times \frac{CT-TE}{CT} \times 100$$

(k: spontaneous loss rate of between 0 and 4 hours fluorescent YAC-1 cell. CT: mean number of fluorescent YAC-1 cell in control tubes, TE: mean number fluorescent YAC-1 cells in target+effector tubes).

^a: All values are expressed as mean±standard deviation.

Fig 3. Natural killer cells(arrow head) conjugated with YAC-1 cells(arrows). Natural killer cells were isolated from peripheral blood in the rat treated with diethylnitrosamine, partial hepatectomy, and phenobarbital sodium. Giemsa stain. × 400.

유의성은 없었으며 말초혈액에서 가장 높은 값을 가졌고 다음은 비장과 간장의 순이었다. 말초혈액에서의 conjugation 비율은 9.3에서 10.3%, 비장은 7.7에서 8.7% 그리고 간장은 5.6에서 7.0%를 각각 차지하는 것으로 조사되었다.

Natural killer 세포의 활성검사 : FCM을 이용한 NK

고 찰

세포독성(cytotoxicity)을 측정하는 *in vitro* 분석법은 일반적으로 두 그룹으로 나뉘볼 수 있다. 첫째는 보체(complement)와 관계없이 세포용해 효과를 갖는 것으로 T-cell mediated lysis, natural killing 효과 그리고 antibody-dependent cellular cytotoxicity(ADCC) 등이며, 둘째는 보체의 존재하에서만 반응이 일어나는 경우(complement-dependent cytotoxicity)가 이에 속한다. 이와같은 세포관련 독성을 나타내는 생체내의 면역기능 세포로서는 cytotoxic T cell, 단핵구, 대식구, polymorphonuclear leukocyte (PMN) 및 자연살해세포(natural killer cell, NK cell) 등이 있으며 이들의 역할은 종양세포나 이식된 조직의 파괴에 주요한 역할을 한다. 특히 이러한 세포들중 NK cell은 바이러스나 세균에 감염된 세포, 정상적인 태아 섬유모세포, 태아 홍선 및 골수세포 등 미분화세포 그리고 종양세포를 포함한 다양한 표적세포의 제거는 물론이며 종양의 발생억제, 전이억제 등의 기능도 보고되고 있다. 따라서 NK cell은 숙주의 건강유지 및 항상을 위한 가장 중요한 면역감시요인으로서 인정받고 있다.

최근의 연구결과에 의하면 NK cell과 large granular lymphocyte(LGL)는 형태적으로 일치됨이 알려져 왔다. 이같은 사실을 바탕으로 보면 LGL 형태가 NK cell의 가장 일반적인 지표로 여길 수 있다. 즉, LGL이 랫드의 다양한 림프계 장기에 존재하며 LGL 빈도와 NK cell의 활성은 밀접한 관련이 있으며 LGL은 NK cell의 특이적 표적세포와 특이성이 있으며 LGL의 밀도를 높이면 NK 활성이 높아진다는 연구보고에 의하면¹⁴⁻¹⁶ LGL이 곧 NK cell이라고 할 수 있는 증거가 된다. 따라서 본 연구에서도 NK cell의 분리과 활성측정은 이미 보고되어 있는 방법³과 동일한 방법으로 LGL을 분리하여 실험하였다.

NK cell의 세포독성 능력을 측정하는 방법으로는 통상적인 ⁵¹Cr-release assay를 이용하여 세포군의 전체 생존율을 간접적으로 평가하는 방법과 유세포 측정기(Flow Cytometer, FCM)를 이용하는 방법 등이 있다. 그러나 전자는 방사성 동위원소를 사용해야 하며 분석기간이 길어 effector/target cell의 분열이 일어날 수 있으며 손상받은 표적세포에서 ⁵¹Cr-labeled molecule이 분비되어 분석에 영향을 미칠 수 있다는 논란이 제기되고 있는 실정이다¹⁰. 한편 유세포 측정기를 이용한 분석법은 간편하고 정

제적이며 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있어서 많이 이용되고 있다¹¹⁻¹². 따라서 본 연구에서는 유세포 측정기를 이용해 자연살해세포의 활성을 측정하였다. 유세포 측정기는 세포생물학, 세포막의 각종 변화평가, DNA 함량분석, 특정 세포군의 순수분리 및 세포의 생존율과 분열주기 분석 등을 포함하여 여러 측면을 조사하는 유용한 수단이 되고 있다. 본 장비를 이용하여 NK cell의 활성을 측정하려면 carboxyfluorescein diacetate (c'-FDA)가 필요하다. 이는 비형광물질이며 non-polar fatty acid ester를 가지고 있어 막투과성이 용이하다. 세포질내에서 c'-FDA는 esterase에 의해 가수분해 되어 free polar carboxy-fluorescein이 생성되고 이 형광물질이 세포내 축적되게 된다¹². 그러므로 오직 살아있는 세포들은 손상되지 않은 enzyme 체계와 세포막을 가질 것이며 c'-FDA나 FDA로 labelling 되었을 때 형광을 갖게 된다. 또한 세포의 기능적, 형태적 손상이 있을 때 세포질내 형광물질은 생성되지 않는다. c'-FDA나 FDA에 labelling된 세포의 형광강도는 생존세포수와 비례하게 된다. 따라서 유세포 측정기의 레이저 빛을 이용하여 형광강도를 측정함으로써 NK cell의 활성을 측정하는 방법인 것이다.

간에 존재하는 NK cell에 대한 연구는 마우스를 대상으로 하여 보고되어 있다. 최근 연구에서는 설치류 NK cell은 NK 표적세포에 대한 용해기전 측면, LGL 형태, ASGM₁의 표현형 등에서 사람의 면역기관내의 NK cell과 그 특성이 유사함을 밝혔다¹⁷. 간에서 LGL의 형태는 "pit cell"과 일치하는 것으로 나타났다¹⁸. 간에서의 NK cell은 종양의 전이억제와 항바이러스 기능에 관여하는 것으로 나타났다¹⁸⁻²⁰. 또한 간장의 NK cell은 간세포가 재생될 때 세포독성을 선택적으로 보이는 것으로 알려져 있다²¹. 그러나 랫드에 대한 자료는 부족한 실정이며 동물모델의 개발측면에서는 동물의 취급과 처치면에서 랫드가 가지고 있는 장점이 마우스보다 많기 때문에 랫드를 대상으로 연구할 필요성이 있다. 또한 혈액에서 분리한 LGL은 마우스의 경우 여러마리의 혈액을 모아서 하나의 샘플로 만들어야 분석이 가능하지만 랫드의 경우엔 한 마리로도 충분한 혈액을 채취할 수 있어 개체별로 존재할 수 있는 차이를 배제하면서 실험할 수 있는 장점이 있기 때문에 본 연구에서는 랫드를 선택하여 실험하였다.

본 실험의 결과로서 모든 실험군에서 분리된 자연살

해세포의 형태적 특징은 세포의 대부분이 핵으로 차 있으며 핵의 위치는 한쪽으로 쏠려있고 신장형태의 모양으로 핵의 중심에 함몰부위가 관찰되는 등, 전 연구자의 결과와 일치되어 관찰되었다¹⁴. 자연살해세포의 크기는 11~13 μ m 정도로 확인되었고 세포질 내에는 azurophilic한 과립들이 관찰되었다. 말초혈액, 비장 및 간장에서 분리한 총 림프구로부터 차지하는 LGL의 분리율은 말초혈액이 1.8~2.3%, 비장이 1.3~1.4% 그리고 간장이 0.87~0.99%로 존재하는 것으로 조사되었다. LGL과 이의 표적세포인 YAC-1과의 conjugation 비율은 말초혈액(9.3~10.9%) > 비장(7.7~8.7%) > 간장(5.6~7.0%) 순으로 처치군간 유의성은 확인되지 않았다. 한편 말초혈액을 대상으로 유세포 측정기로 측정한 자연살해세포의 활성은 군간 유의성 없이 30~35%의 활성을 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 화학적 간 발암과정에 있는 랫드의 자연살해세포는 정상 랫드의 자연살해세포의 분포, 형태 및 활성에서 차이점이 없는 것으로 조사되었다. 그러나 이와같은 자료는 향후 NK cell의 활성증가물질을 *in vivo* 상태에서 검색하는 검색법 개발의 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 화학적 간 발암화 과정에서 NK cell의 분포, conjugation rate를 결정하고 또한 유세포 측정기를 이용한 활성측정법 확립 및 활성측정 등을 통하여 NK cell에 대한 응용적 연구를 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다. 본 연구에서 분리된 자연살해세포의 형태적 특성은 처치와 관계없이 세포의 대부분이 핵으로 차 있으며 핵의 위치는 한쪽으로 쏠려있고 신장형태의 모양으로 핵의 중심에 함몰부위가 관찰되었다. 자연살해세포의 크기는 11~13 μ m 정도로 확인되었고 세포질내에는 azurophilic한 과립들이 관찰되었다. 말초혈액, 비장 및 간장에서 분리한 총림프구로부터 차지하는 large granular lymphocyte(LGL)의 분리율은 말초혈액이 1.8~2.3%, 비장이 1.3~1.4% 그리고 간장이 0.87~0.99%로 존재하는 것으로 조사되었다. LGL과 이의 표적세포인 YAC-1과의 conjugation 비율은 말초혈액(9.3~10.3%) > 비장(7.7~8.7%) > 간장(5.6~7.0%) 순으로 군간 유의성은 없는 것으로 조사되었다. 한편 말초혈액을 대상으로 조사한 자연살해세포의 활성검사에서는 군간 유의성 없이 30~35%이 활성

을 확인하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 화학적 간 발암과정에 있는 랫드의 자연살해세포는 정상 랫드의 자연살해세포의 분포, 형태 및 활성에서 차이점이 없는 것으로 조사되었다.

참 고 문 헌

1. Herberman RB. Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic Press, New York, 1980.
2. Herberman RB, Nunn ME, Lavin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, 15:16(2):216-229, 1975.
3. Itoh K, Suzuki R, Umezumi Y, et al. Studies of murine large granular lymphocytes. II. Tissue, strain and age distributions of LGL and LAL. *J Immunol*, 129(1):395-405, 1982.
4. Lewis CE, McGee JO'D. The natural killer cell. *IRL press*, 1992.
5. Savary CA, Lotzova E. Suppression of natural killer cell cytotoxicity by splenocytes from *Corynebacterium parvum*-injected, bone marrow-tolerant, and infant mice. *J Immunol*, 120(1):239-243, 1978.
6. Wright PFA, Stacey NH. A species/strain comparison of hepatic natural lymphocytotoxic activities in rats and mice. *Carcinogenesis*, 12(8):1365-1370, 1991.
7. Barlozzari T, Reynolds CW, 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 Immunol*, 131(2):1024-1027, 1983.
8. Barlozzari T, Leonhardt J, Wiltrott RH. Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. *J Immunol*, 134(4):2783-2789, 1985.
9. Grimm E, Bonavida B. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J Immunol*, 123(6):2861-2869, 1979.
10. Brunner KT, Muel J, Cerottini JC, et al. Quantitative

- assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro* : inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 14(2): 181-196, 1968.
11. McGinnes K, Champman G, Marks R, *et al*. A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 22:86(1):7-15, 1986.
 12. Slezak SE, Horan PK. Cell-mediate cytotoxicity. A highly sensitive and informative flow cytometric assay. *J Immunol Methods*, 24:117(2):205-214, 1989.
 13. Malter M, Friedrich E, Suss R. Liver as a tumor killing organ : Kupffer cells and natural killers. *Cancer Res*, 46(6):3055-3060, 1986.
 14. Luini W, Boraschi D, Alberti S, *et al*. Morphological characterization of a cell population responsible for natural killer activity. *Immunology*, 43(4):663-668, 1981.
 15. Timonen T, Reynolds CW, Ortaldo JR, *et al*. Isolation of human and rat natural killer cells. *J Immunol Methods*, 51(3):269-277, 1982.
 16. Rolstad B, Herberman RB, Reynolds CW. Natural killer activity in the rat, V. The circulation patterns and tissue localization of peripheral blood large granular lymphocyte(LGL). *J Immunol*, 15:136(8):2800-2808, 1986.
 17. Wiltout RH, Mathieson BJ, Talmadge JE, *et al*. Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. Isolation and characterization of large granular lymphocytes from the liver. *J Exp Med*, 1:160(5):1431~1449, 1984.
 18. Wisse E, Luo D, Wake K. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis*. 17(4):265-286, 1997.
 19. Bouwens L, Remels L, Baekeland M, *et al*. Large granular lymphocytes or "pit cells" from rat liver : isolation, ultrastructural characterization and natural killer activity. *Eur J Immunol*, 17(1):37-42, 1987.
 20. Stevenson D, Binggeli R, Weinstein RC, *et al*. Relationship between cell membrane potential and natural killer cell cytolysis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 1:49(17):4842-4845, 1989.
 21. Itoh H, Abo T, Sugawara S, *et al*. Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regeneration hepatocytes. *J Immunol*, 1:141(1):315-323, 1988.