돼지(豚) 골수세포로부터의 수지상세포 분화 및 배양

박영욱, 추홍구

제주대학교 수의과대학 수의약리학실험실

(Received November 12, 2012; Revised November 19, 2012; Accepted November 26, 2012)

Abstract

Differentiation and culture of dendritic cells from swine bone marrow cell

Young-Wook Park, Hong-Gu Joo

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

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells that play a critical roles in connecting innate and adaptive immunity. Although many studies about mouse and human DCs have been performed, those using other mammalian species including domestic animals are lacking. In this study, we established an efficient experimental method for swine myeloid-origin DCs. Bone marrow cells (BMs) were cultured *in vitro* using an adequate cytokine for this purpose. BMs were harvested from bones of piglets and cultured in the presence of porcine recombinant granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) for 6-10 days. And also, we tried to find optimal conditions for cryopreservation of BMs. After 6 day culture, semi-floating cells were harvested and characterized as DCs (BMDCs). Interestingly, BMDCs revealed the excellent production of TNF-alpha, a representative innate cytokine, upon lipopolysaccharide exposure, but not the case of nitric oxide. In addition, we measured the expression level of immunological markers on the surface of BMDCs. Taken together, we established an efficient experimental method for swine myeloid-origin DCs. The information obtained from this study includes optimal culture conditions and thus may help researchers studying swine immunity in basic scientific and clinical fields. (J Med Life Sci 2012;9(2):84-87)

Key Words : Swine, Bone marrow-derived, dendritic cells, culture condition, DC function

서 론

수지상세포는 전문적인 항원제시세포로서 미경험 T 세포를 활성화시켜 면역반응을 일으키는 역할을 하고 있다[1]. 수지상세포는 다양한 형태의 항원을 포획하고 소화한 후 T 세포에 항원성펩타이드를 제시하는 특징적인 기능을 가지며, 비록 항원을 제시 하기는 하지만 각각 포식작용과 항체생산 기능에 특화된 대식세포, B 세포들과는 차별화 된다[2,3]. 또한, 활성화 T 세포를 억제할 수 있는 조절 T 세포의 분화를 유도하여 조직이식 거부반응, 자가면역반응 방지 및 면역관용의 유도에 있어서 중요한 역할을 수행한다[4]. 수지상세포에 염증성싸이토카인(interferon-γ, tumor necrosis factor-α, 등); 바이러스, 세균 등을 처리하면 미성숙 수지상세포는 성숙되고 성숙된 수지상세포는 MHC-II, CD80, CD86 등의 발현을 증가시켜 T 세포의 활성을 이끈다[5]. 이러한 수지상세포들 사이에서도 표현형과 기능적 측면에서 서로 차이점을 나타내는데, 예를 들어 plasmacytoid DCs (pDCs)는 다른 일반적인 수지상세포에 비해서 T 세포 활성화 측면에서 능력이 떨어진다고 알려져 있다[6].

돼지는 면역체계면에서 인간과 비교적 유사하기 때문에 중요한 동물 모델이 되어왔다. 예를 들어 Toll-like receptor의 분포도 측면에서 마우스보다는 돼지가 인간과 유사하다[7]. 최근에는 돼지를 이용한 이종이식(xenotransplantation)에 대한 연구가 이루어지고 있고 이로 인해 돼지의 면역체계에 대한 관심이 증가하고 있다[8]. 대표적으로 돼지를 이용한 췌장의 이종이식은 건강하고 살아있는, 유전자 조작된 췌장의 islet을 SPF (specific pathogen free) 돼지로부터 무한정 공급할 수 있는 가능성을 열어두고 있다. 하지만 돼지 세포의 이종이식을 임상적으로 현실화하려면 조직 거부반응과 관련된 더 많은 면역반응 연구가 요구된다[9]. 이를 위해 돼지 면역세포, 특히 자연면역과 적응면역에 필수적인 돼지 수지상세포에 대한 전문적인 연구가 매우 필요한 실정이다. 본 연구에서는 골수유래성 수지상세포를 배양할 수 있는 효율적인 배양법 등을 알아보고 이를 기초 및 임상분야의 연구에 적용시킬 수 있는 지 연구하였다.

Address for correspondence : Hong-Gu Joo, D.V.M, Ph.D.
College of Veterinary Medicine, Jeju National University, 121 Jejudaehakno, Ara-1-dong, Jeju-si, Jeju 690-756, Republic of Korea
E-mail : jooh@jejunu.ac.kr

재료 및 방법

1. 수지상세포의 준비와 배양

제주 농촌진흥청에서 얻은 3-4주령 사이의 Yorkshire돼지를 사용하였다. 자돈의 경골 및 장골을 조각낸 후, 도구를 이용해 골수를 채취 후 phosphate buffer saline (PBS) 25 ㎖에 넣는다. 세포가 충분히 섞이도록 흔들어 준 후 골수세포를 제외한 나머지는 strainer에 걸러주고 12.5 ㎖씩 두 개의 conical tube로 나눈다. 1500 rpm에서 7분간 원심분리 후 상층액을 제거한 후 세포를 10분간 ACK lysis buffer와 반응시켜 적혈구를 용혈 시키고 다시 동일한 조건으로 원심 분리하여 적혈구가 제거된 세포를 분리하였다. 6-well plate에 2×10^6 cell/well씩 세포를 넣어준 후 GM-CSF를 2 ng/㎖의 농도로 넣어주었다. 37℃ 5% CO_2 incubator에 6일간 배양하며 2일째와 4일째에는 윗줄의 배지를 새 배지로 교환하였다. 6일째, 바닥에 완전히 붙지 않고 반쯤 부유된 세포를 걷어내어 미성숙 수지상세포로 실험에 사용하였다[10].

2. 수지상세포의 형태 관찰

수지상세포의 특이적 형태를 확인하기 위해 광학현미경을 이용하여 배양 4일째 세포를 관찰하였고 디지털카메라를 이용하여 세포의 모양을 촬영하였다.

3. ELISA를 이용한 cytokine의 측정

96-well plate에 swine BMDC를 2.5×10^4 cells/㎖의 농도로 sample들을 준비하였다. 이후 lipopolysaccharide (LPS)를 0~1 ㎍/㎖ 농도 범위에서 3배 계단희석법으로 처리하였고 37℃에서 2일간 배양한 후 사용하였다. Swine TNF-a 특이 항체를 미리 coating 시킨 후 standard와 sample을 처리하였고, detection antibody (antibody specific for sTNF-a)를 차례로 넣어 주었다. 반응 후 substrate를 처리하였고 파란색의 생성유무를 확인하였다. 15-30분 후에 반응을 정지시키기 위해 stop solution을 처리하였다. Microplate reader를 이용해 405nm에서 흡광도를 측정하였다[11]. Standard를 이용해 표준곡선을 만들었고 샘플의 흡광도 수치를 대입하여 swine TNF-alpha를 정량하였다.

4. Nitric Oxide assay

TNF-alpha를 측정했을 때와 유사하게 96-well plate에 배양된 swine BMDC를 2.5×10^4cells/㎖의 농도로 넣어 setting하였다. 이후 LPS를 0~1㎍/㎖의 농도범위에서 2배 단계희석법으로 처리하였다. NO 생산량은 배양액에 녹아있는 NO_2 (nitrite)의 양으로 측정하였다. 배양액의 상층액과 동량으로 Griess reagent (0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid)를 넣어 섞어 준 뒤 10분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

5. Flow cytometric analysis

재조합 돼지 GM-CSF를 이용해 배양한 수지상세포를 6-well plate에 넣은 후 LPS를 처리하였다. 반응 후 scraper를 이용하여 회수하였고, 5% FBS와 0.1% sodium azide가 포함된 PBS로 세척한 후 anti-mouse CD16/32 (Fc blocker)를 처리하여 Fc receptor를 blocking하였다. 그 후 anti-SLA class I, anti-MHC class II (MSA3), anti-human CD40 antibody를 각각 처리하였으며 1% paraformaldehyde로 고정시켰다. 염색된 세포들은 FACSCalibur™ (BD Biosciences)와 CellQuest™ software(BD Bioscences)를 이용하여 유세포분석을 실시하였다[13].

결 과

1. sBMDC microscopic picture

6-well culture plate를 이용하여 수지상세포를 배양하였다. 재조합 돼지 GM-CSF (Granulocyte-macrophage stimulating factor)는 10 ng/㎖의 농도로 넣어주었다. 처음 배양 0일째 5% complete medium (CM) 12㎖에 세포를 넣은 뒤, 윗줄 3개 well에 4 ㎖/well씩 넣어주었다. 배양 2일째 윗줄의 배양세포가 포함된 배지를 전부 아랫줄의 빈 well로 내려주고, 윗줄에 전부 4 ㎖/well씩 GM-CSF가 포함된 새 배지를 넣어주었다. 4일째에는 5% CM 12 ㎖에 GM-CSF가 포함된 새 배지를 12 ㎖을 만든 뒤, 전체 well에서 떠 있는 세포들을 모두 버린 후 well당 2㎖씩 넣어주었다. 6, 8일째에는 배지를 갈아주기 위해 well당 배지상층액 1 ㎖을 뺀 뒤, GM-CSF가 포함된 5% 새 배지 9 ㎖을 만들어 well 당 1.5 ㎖씩 새 배지를 넣어주었다. 사진으로 보이듯 4일째에 비해서 6일째에는 수지상세포로 분화되는 모습이 잘 관찰되었다 (Fig. 1).

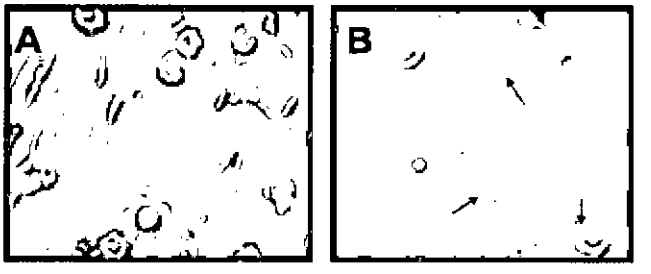

Figure 1. The microscopic morphology of swine BMDCs. Cells were cultured in the presence of GM-CSF after 4 days (A) 6 days (B). In B, arrows indicate dendritic process of DCs.

2. Tumor Necrotic Factor-alpha

LPS가 처리된 수지상세포에서 농도별 cytokine 생산량을 알아보기 위해 ELISA를 이용하여 수지상세포 배양액의 TNF-alpha 생산량을 측정하였다 (Fig. 2). TNF-alpha는 선천면역(innate immunity)에서 핵심적인 역할을 하는 면역 싸이토카인이다.

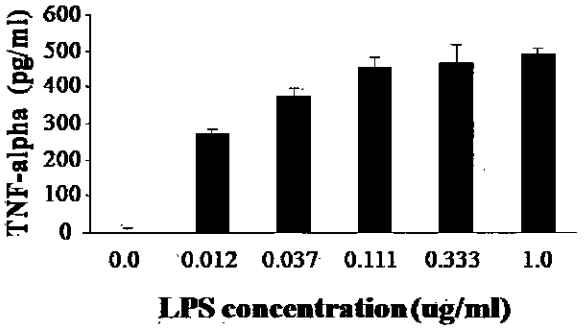

Figure 2. Effects of LPS on TNF-alpha production of swine BMDCs. LPS concentration ranges from 0 ㎍/㎖ to 1 ㎍/㎖ (mean ± S.E.M.).

Swine BMDC 2.5×10^4 cells/㎖에 LPS를 3배 계단희석으로 처리한 결과, LPS 1.0 ㎍/㎖에서는 TNF-alpha 490 pg/㎖, 0.333 ㎍/㎖에서는 465 pg/㎖, 0.111 ㎍/㎖에서는 454 pg/㎖, 0.037 ㎍/㎖에서는 375 pg/㎖, 0.012 ㎍/㎖에서는 270 pg/㎖이 정량되었다. 결과적으로 LPS의 일정농도, 즉 0-0.111 ㎍/㎖의 범위에서는 농도의존적으로 TNF-alpha의 생산을 증가시켰다. 그 이상의 농도에서는 생산능력이 올라가지 않고 포화되는 현상을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 임상의, 특히 백신개발을 포함한, 돼지 면역관련연구에서 고려되어야 할 것으로 판단된다.

3. Nitric Oxide

LPS가 처리된 수지상세포의 nitric oxide (NO) 생산량을 알아보기 위해 Griess reagent를 이용하여 LPS 농도별 수지상세포 배양액의 NO 생산량을 측정하였다 (Fig. 3).

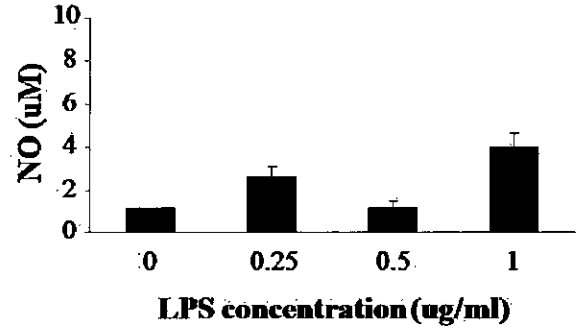

Figure 3. Effects of LPS on releasing nitric oxide (NO). LPS concentration range from 0 ug/ml to 1 ug/ml (mean ± S.E.M.).

Swine BMDC 2.5×10^4 cells/㎖을 96-well culture plate에 setting한 후 LPS를 농도별 2배 단계희석법으로 처리하였다. LPS의 처리농도별 NO의 생산량을 보면 LPS 처리 안 한 그룹에서는 1.14 ㎛M, LPS 0.25 ㎍/㎖에서는 2.57 ㎛M, LPS 0.5 ㎍/㎖에서는 1.14 ㎛M, LPS 1.0 ㎍/㎖에서는 4.0 ㎛M이 측정되었다. 그러나 LPS 0.5 ㎍/㎖의 경우 LPS를 전혀 처리하지 않은 대조군의 수치와 비슷하였고, 전반적인 NO의 생산량이 매우 낮은 편이라 LPS 1 ㎍/㎖을 제외하고는 NO의 생산이 유의하지 않았다. 돼지 골수세포 유래의 수지상세포의 경우 TNF-alpha의 생산과 비교해 NO는 다른 생산양상을 보이는 사실을 확인하였다.

4. Flow cytometric analysis

돼지 골수세포로부터 배양된 수지상세포를 회수해 6-well culture plate에 setting하였다. 이후 LPS를 처리하여 2일 간 배양한 뒤 세포를 scraper로 모두 회수하였으며, 특이항체를 이용하여 염색한 후 유세포분석을 실시하였다 (Fig. 4). Histogram의 우측상단에 있는 숫자는 MHC Ⅰ, MHC Ⅱ, CD40이 발현된 세포에서의 형광강도로서 숫자가 높을수록 세포표면에 많은 수의 특이항원이 있음을 뜻한다. LPS에 의해 MHC Ⅰ과 CD40의 발현은 증가한 반면, MHC Ⅱ는 감소하는 경향을 나타냈다.

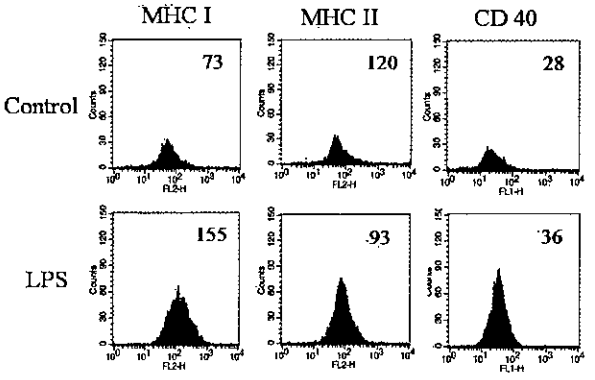

Figure 4. Upregulated expression of immune related-surface markers on BMDCs treated with LPS. The treated BMDCs were stained with antibodies specific for MHC I, MHC II and CD40.

고 찰

본 연구에서는 돼지의 골수세포를 채취한 뒤 재조합 돼지 GM-CSF를 처리하여 골수유래 수지상세포를 배양하는 방법을 최적화시켰으며, 배양된 수지상세포의 기능성 유무를 확인하기 위해 LPS를 농도별로 처리한 후 염증 cytokine의 일종인 TNF-alpha와 NO의 생산량을 측정하였다. 또한 수지상세포 표면에 발현하는 특이적인 면역학적 마커의 발현량을 측정하여 수지상세포의 생성유무, 성숙(maturation)정도를 증명하였다.

배양된 돼지 수지상세포는 LPS를 단계희석법으로 처치했을 때 농도 의존적으로 TNF-alpha의 양이 증가하였다. 이는 마우스와 사람의 수지상세포에서 연구되었듯이 LPS를 인지하는 수지상세포의 표면수용체인 Toll-like receptor 4 (TLR4)가 정상적으로 작동하고 있음을 의미한다[4]. 이는 돼지 수지상세포가 LPS에 반응하여 성숙되는 과정을 거치는 것으로 판단된다.

고 농도의 NO는 세균, 바이러스, 기생충, 암세포의 성장을 억제함으로써 자연 및 적응면역에서, 특히 intracellular 면역반응의 중요한 역할을 담당한다. 마우스의 단핵구, 대식세포의 경우 inducible nitric oxide synthase (iNOS)을 통해 NO가 잘 생산되는 반면, 다른 종에서는 iNOS의 활성도에 있어서 마우스와 차이를 보인다. 돼지의 경우 iNOS의 활성도가 마우스에 비해 많이 떨어지는 것으로 연구되었다[15]. 본 연구에서도 실험 결과 LPS를 비교적 고농도를 처리하였음에도 유의한 NO 생산량을 측정할 수 없었다. 이는 LPS에 의한 돼지 수지상세포의 활성화와 신호전달이 마우스의 경우와는 다를 수 있음을 보여주는 것이다.

돼지 골수세포로부터 배양된 수지상세포의 세포표면마커를 대상으로 유세포분석을 실시하였다. LPS에 대한 표면마커, 즉 MHC class I, MHC class II, CD40의 발현정도를 측정한 결과 MHC I과 CD40의 발현량은 증가한 반면 MHC Ⅱ의 발현량은 감소한 결과를 얻었다. T세포 수용체들은 주조직적합복합체(MHC) 세포막 단백질에 결합한 항원만을 인식할 수 있는데, 일반적으로 $CD4^+$ T 림프구는 class Ⅱ 분자들과 결합한 항원성 펩타이드를 인식하고, 반면에 $CD8^+$ T림프구는 class I 분자들과 결합한 항원성 펩타이드를 인식한다. 한편 T 림프구의 CD40 ligand (CD40L)은 수지상세포 표면의 CD40과 결합하고 이는 수지상세포를 더욱 활성화하고 성숙되게 하는 역할을 한다. 따라서 이 실험 결과 LPS 처리에 의해 수지상세포 표면에 증가된 MHC I와 CD40의 발현증가는 $CD8^+$ T림프구가 관련된 면역반응을 증가시킬 수 있다.

이번 연구에서는 돼지 골수세포를 이용해 수지상세포를 효율적으로 배양할 수 있었고 LPS처리를 통해 돼지 수지상세포의 면역학적 특성을 부분적으로 규명할 수 있었다. 이러한 기초정보들은 향후 돼지를 이용한 이종이식이나 돼지 질병에 대한 백신개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1) Paillot R, Laval F, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. Immunology 2001;102:396-404.
2) Drutman SB, Trombetta ES. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. J Immunol 2010;185:2140-6.
3) Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. J Immunol 2010;185:3426-35.
4) Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. J Virol 2005;79:7860-7.
5) Wang HF, Liu JL, Jiang XL, Lu JM, Li XL, et al. Suppressive effect of aqueous humor on lipopolysaccharide-induced dendritic cell maturation. Jpn J Ophthalmol 2011;55:558-64.
6) Hubo M, Jonuleit H. Plasmacytoid dendritic cells are inefficient in activation of human regulatory T cells. PLoS One 2012;7:e44056.
7) Facci MR, Auray G, Buchanan R, van Kessel J, Thompson DR, Mackenzie-Dyck S, et al. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. Immunology 2010;129:396-405.
8) Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S et al. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. Immunology 2001;104:175-84.
9) Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. Curr Diab Rep 2011;11:402-12.
10) Joshi N, Duhan V, Lingwal N, Bhaskar S, Upadhyay P. Adjuvant properties of thermal component of hyperthermia enhanced transdermal immunization: effect on dendritic cells. PLoS One 2012;7:e32067.
11) Leister KP, Huang R, Goodwin BL, Chen A, Austin CP, Xie M: Two High Throughput Screen Assays for Measurement of TNF-alpha in THP-1 Cells. Curr Chem Genomics 2011;5:21-9.
12) Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. PLoS One 2012;7:e44107.
13) Hattori T, Chauhan SK, Lee H, Ueno H, Dana R, Kaplan DH, et al. Characterization of Langerin-expressing dendritic cell subsets in the normal cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:4598-604.
14) Reis J, Guan XQ, Kisselev AF, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC, et al. LPS-induced formation of immunoproteasomes: TNF-alpha and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites. Cell Biochem Biophys 2011;60:77-88.
15) Pampusch MS, Bennaars AM, Harsch S, Murtaugh MP. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet Immunol Immunopathol 1998;61:279-89.