

비특이적인자가 거식세포활동에 미치는 영향에 관한 연구

Influences of Non-specific Stimulation on the Phagocytic Activities of Macrophages

서울大學校 醫科大學 微生物學教室

車 昌 龍 · 李 承 蕪

시 론

거식세포는 식균작용(phagocytosis)을 통하여 면역반응을 비롯한 숙주방어기능에 중요한 역할을 하며(van Furth, 1970; Pearsall, 1970; Carr, 1973; Nelson, 1975), *Mycobacterium*(Berthrong, 1968; Dannenberg, 1968), *Brucella*(Elberg, et al, 1958) 및 *Listeria monocytogenes*(Mackness, 1962)의 감염을 비롯하여 체내 독소(endotoxin) (Jenkin, et al, 1960), BCG, *Corynebacterium parvum*(Stuart, 1973; Stuart, 1975; Wilson, et al, 1975) 등 다양한 자극에 의하여 기능의 변화를 초래한다. 특히 BCG, *Corynebacterium parvum*, 및 endotoxin으로 자극받은 동물의 거식세포는 "activated macrophage"(Mackness, 1970)로 변하여 식균능을 비롯한 여러가지 기능이 항진됨이 알려져 있는데(Wilson, et al, 1975; Stuart, 1975) 그 작용기전은 확실치 않으나 이같은 자극을 받은 거식세포는 대사가 보다 활발해지고(Stubbs, et al, 1973; Karnovsky, et al, 1975) 이에 수반하여 거식세포의 활동에 변화가 초래된 것으로 설명되고 있다. 특히 실험동물의 복강내 여러세포중에 거식세포는 비교적 높은 비율로 분포된 세포성분이나(Mims, 1964; Pearsall, 1970; Stuart, 1975) 이 세포를 보다 많이 얻기 위하여 glycogen(Suter, 1952), mineral oil(Cohn, et al, 1963), new-born calf serum(van Furth, et al, 1963), thioglycollate broth(Stuart, 1973), sodium casinate(Simmons, et al, 1973) 등을 주입한 후에 이 세포가 가장 높은 시기에 복강삼출액과 함께 채취하는 시도가 많은 연구자들에 의하여 개발되어 왔다. 그러나 이와 같은 자극물질에 의하여 복강내 거식세포의

삼출이 증가되는 기전은 아직 확실히 설명되어 있지 않지만, van Furth(1973)들이 시사하였듯이 이같은 물질로 자극하여 얻은 거식세포는 곧 혈액에서 복강으로 이동한 세포와 이미 복강내에 존재하던 거식세포로 구성되어 있다고 하며 이런 거식세포는 이런 물질과 접촉하여 그 식균능력이 있어서 자극받지 않은 거식세포와는 기능상의 차이가 예측되고 있다. 특히 이런 자극물질이 거식세포의 주기능인 식균작용에 미치는 영향에 관한 실험적 보고는 아주 드문 실정이다.

이런 점을 감안하여 저자는 마우스복강내에 fluid thioglycollate medium 또는 태생우혈청(fetal calf serum)으로 주사 자극하여 얻은 거식세포와 자극받지 않은 정상 거식세포간에 *Staphylococcus aureus*의 식균활성에 있어서의 차이를 살펴보기 위하여 본 실험을 시도하였다.

재료 및 실험방법

1. 복강삼출세포의 수집

마우스의 복강삼출세포를 수집하기 위하여 Hoskin(1967)에 따라 제조한 Earle's balanced salt solution(BSS)에 van Furth(1973) 등의 방법에 따라 sodium heparin(Rinker Laboratories) (75 unit)을 첨가한 세포수집액을 사용하였다.

Earle's BSS에 sodium heparin(1 unit)을 첨가한 세포세척액은 수집한 세포를 세척하는데 사용하였다. 세포수집액 및 세포세척액의 pH는 4.4% NaHCO₃ 용액으로 7.2-7.3으로 조정 사용하였다. 또한 세포유지액은 Wu(1963) 등의 방법에 따라 Earle's BSS에 5% lactalbumin hydrolysate 및 태생우혈청(fetal calf serum)을 각각 10%씩 첨가한 용액이며 첨가시의 pH는 0.1N NaOH용액으로 조정하여 7.2-7.3이 되도록 하였다.

본 연구는 1977년도 문교부 정책과제 연구비에 의하여 수행되었음.

거식세포를 채취하는 방법으로는 Stuart(1973) 및 van Furth(1973) 등의 방법에 따라 생후 7-8주의 DDO 계의 마우스의 경부를 눌러 마우스를 죽이고 다공 18G 주사바늘을 통하여 3ml 세포수집액을 복강내로 주입한 후에 가볍게 1분간 복부를 문지른 다음 그 주사바늘을 통하여 복강삼출액을 채취하였으며 보통 5~6마리로부터 채취된 복강삼출액을 Siliclad(Clay-Adem Co.)로 실리콘 처리한 원추시험관에 모아서 빙수조에 보관하였다. 이렇게 수집한 복강삼출액을 110×g로 5분간 원심침전시켜 상청액을 버리고 침전된 세포를 세포세척액으로 2회 세척한 후에 세포유지액에 부유시켜 세포수를 ml당 1-2×10⁶개에 달하도록 세포유지액으로 조정하였다.

2. 비특이성 자극물질 및 자극방법

비특이성 자극물질로는 fluid thioglycollate medium (Difco Laboratories)을 0.3%(W/V)로 하여 사용하였고, fetal calf serum, desiccated(Difco Laboratories)을 멸균된 증류수에 용해하여 혈청으로 환원하여 사용하였다.

Stuart(1973)에 따라 0.3%(W/V) fluid thioglycollate medium은 2ml씩, 태생우혈청은 0.5ml씩을 마우스복강내에 주사한 후 매일 복강내의 거식세포의 분포를 조사한 결과, fluid thioglycollate medium으로 자극시에는 72시간만에 이 세포 비율이 가장 높은 70%에 달하였고 fetal calf serum으로 자극시에는 48시간만에 그 분포가 55%로 가장 높았으므로 이시기의 세포를 각각 채취하여 thioglycollate로 자극된 거식세포(thioglycollate stimulated macrophage) 및 태생우혈청으로 자극간주된 세포(fetal calf serum stimulated macrophage)로 하여 실험에 사용하였으며, 한편 전혀 자극을 가하지 않은 거식세포를 자극하지 않은 거식세포(unstimulated macrophage)라 하여 대조세포로 사용하였다.

3. 세균과 세포의 혼합 및 관찰

가. 세 균

서울대학교 의과대학 미생물교실의 보관균주인 *Staphylococcus aureus* Wood-46을 사용하였는데 이 세균을 배양하는데 사용한 배지는 peptone phosphate broth (Difco Laboratories)이었으며 여기에 agar reagent(BBL)을 1.5% 첨가하여 peptone phosphate agar의 평판을 만들어 생균수(viable bacterial counts)를 측정하는데 사용하였다. *S. aureus*을 18시간동안 peptone phosphate broth에 배양시킨 후 원심침전(1,500×g, 20분간)에 의하여 균을 회수, 세포유지액으로 2회 세척한 후에 220×g에 10분간 원심침전, 상청부유액을 수집하

여 Fenner(1951)의 방법에서와 같이 미리 만들어 놓은 peptone phosphate agar 평판배지에 10제단 회석, 균액을 0.1ml씩 떨어뜨려 37°C에서 24시간 배양한 후에 나타나는 집락수를 관찰, 생균수를 결정하였고 이를 기준하여 실험에 사용한 식균량(inoculum size)을 결정하였다.

220×g에 10분간 원심침전조작은 부유액내 세균을 집락을 제거하는 과정이었으며 이조작을 실시하면 2개 및 4개정도가 문쳐진 정도로 각각 세균이 떨어져 세포를 원심침전시키는 110×g에서 침전되지 않은 특징을 가졌다.

나) 세균에 대한 식균작용

세균에 대한 식균작용을 관찰할 시 van Furth(1973) 등의 권장방법에 따라 세균대 세포의 비율은 1 대 1로 혼합한 후에 가볍게 진탕하여 고무계 혼합시켰고 이 균-세포부유액을 각각 1ml씩을 실리콘 처리한 시험관에 분주한 후 진탕시켜 고무계 혼합되도록 하였다. 대조실험군으로 세포가 없고, 균-세포부유액내의 생균수와 동일하도록 균액을 세포유지액에 첨가한 균부유액을 각각 1ml씩을 실리콘 처리한 시험관에 분주하였다.

균-세포부유액을 37°C에서 30분, 60분, 90분 및 120분간 배양한 후에 배양시간에 따라 배양기에서 꺼내어 4°C에 보관한 후 110×g로 5분간 원심침전하였다. 그 상청액을 10제단 회석하여 회석액 0.1ml를 peptone phosphate agar 평판배지에 떨어뜨려 37°C에서 24시간 배양한 후에 나타나는 집락수를 관찰, 배양시간에 따르는 생균수를 측정하였다. 균-세포의 상청액내 생균수는 식균되지 않고 남아 있으면서 배양시간에 따라 증식한 균수로 배양시간에 따르는 변화양상을 처음 혼합시의 생균수에 대한 백분율로 계산도시 하였다. 또한 이 상청부유액내 생균수의 변화를 van Furth(1973) 등이 제시한 식균지수(phagocytic index) ($Ft = \log No - \log Nt$)로 계산 표현하였다. 즉, No는 배양시작시의 생균수이며, Nt은 일정한 배양시간 후 생균수로 Nt는 일정한 시간에 있어서 균-세포부유액내의 균수의 감소 정도를 식균한 결과로 표현하는 것이다.

한편 원심침전하여(110×g, 5분간) 얻은 침사를 멸균된 우혈청으로 재부유시켜 직접도말하여 Wright 염색한 것을 검경하였다.

이때에 형태가 건재한 거식세포 100개중에 세균과 부착된 거식세포의 수 및 구균을 식균한 거식세포를 식균한 세균수에 따라 10개 이상, 5-9개, 1-4개로 구분하여 관찰하였다. 거식세포내에 함유되어 있지 않지만 세포에 부착단계(attachment stage) 있는 상태로

이군에 속하는 세균은 110×g로 5분간 원심침전시 침사에 포함되어 있을 뿐만 아니라 균-세포부유액의 상층액내 생존수의 감소에 기여한 부분으로 간주하여 세포 부착세균(Cell-attached bacteria)으로 구별하였다. 따라서 이들 4군은 세균을 식균한 거식세포로 간주하였고 이들간의 분포를 백분율로 표시하였다.

실험 성적

1. Thioglycollate에 의한 식균능의 변화

fluid thioglycollate medium(0.3%)을 2ml씩 마우스 복강에 주사한 후 72시간만에 채취한 거식세포는 세포질내에 한천성분을 그대로 지닌 상태로 나타내는 것이 많아서 자극을 받지 않은 세포와 형태학적인 차이를 보였다.

이렇게 채취한 thioglycollate로 자극된 복강삼출세포와 *S. aureus*가 접촉한 후, 시간경과에 따라 거식세포에 의하여 식균되는 양상은 도 1 및 표 1에 표시하였다.

도 1 및 표 1에 표시된 바와 같이 복강삼출세포와 접촉하지 않은 *S. aureus*는 60분까지 생존수의 변화가 거의 없으나(p>0.05), 그후부터 증가하여 120분에는 생존수가 1.6배로 증가하였다.

한편 자극하지 않은 거식세포와 접촉된 세균은 30분까지 급격히 생존수가 감소하여 38%에 달하였으나 그후에는 완만히 감소하여 120분에는 생존수가 16%에 달했다. 또 thioglycollate로 자극된 거식세포에 접촉한 세균은 30분에 생존수가 21%로 감소되었고 그후에도 계속 감소되어 60분에는 14.5%에 달하였으나 그후에는 변화가 없었다(p>0.05). 따라서 thioglycollate에 자극된 거식세포와 접촉한 *S. aureus*의 생존수는 30분

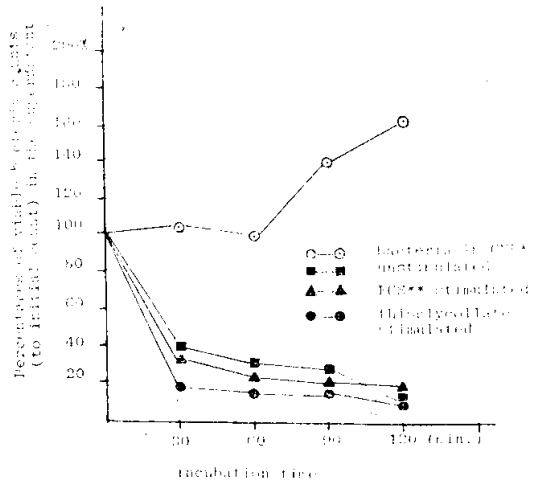


Fig. 1. Phagocytosis of *S. aureus* unstimulated, FCS**-stimulated, and thioglycollate stimulated macrophages in the bacteria-macrophage suspension during incubation.

*CMF; cell maintenance fluid
**FCS; fetal calf serum

및 60분까지 자극하지 않은 거식세포 접촉군에 비해 크게 감소하였으나(p<0.01) 그후에는 양군간에 생존수의 변화에 차이가 없었다(p>0.05).

시간경과에 따르는 균-세포부유액내 생존수의 감소 정도를 van Furth(1973) 등이 제시한 식균지수(phagocytic index) (Ft=log No-log Nt)로서 표 2에 표시하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 자극하지 않은 거식세포의 *S. aureus*에 대한 식균지수는 30분 및 60분에 각각 0.4224 및 0.5536이었으나 thioglycollate로 자극된 거식세포의 경우에는 30분 및 60분에 각각 0.6531 및 0.8468로 약 1.5배의 차이를 보였다. (p<0.01). 그러

Table 1. Comparison of phagocytosis expressed by the percentages of viable bacterial units to the initial units in the bacteria-macrophage (unstimulated, thioglycollate stimulated and fetal calf serum stimulated) suspension

incubation period (min.)	CMF* with bacteria (n=22)	unstimulated macrophages (n=7)	thioglycollate stimulated macrophages (n=8)	fetal calf serum stimulated macrophages (n=7)
30	104 ±31.0	38.4±7.24	21.0±0.03(p<0.01)	34.1±5.45(p>0.05)
60	98 ±27.9	28.2±4.76	14.5±7.50(p<0.01)	24.1±7.11(p>0.05)
90	139.8±29.8	23.5±6.27	17.2±6.39(p>0.05)	23.3±5.15(p>0.05)
120	161.4±61.1	16.1±5.05	16.0±3.82(p>0.05)	20.6±4.85(p>0.05)

*CMF; cell maintenance fluid

Table 2. Comparison of phagocytosis pattern expressed by the phagocytic indices among the unstimulated, thioglycollate stimulated and fetal calf serum stimulated macrophages.

phagocytic indices (F*t)	unstimulated macrophages (n=7)	thioglycollate stimulated macrophages (n=8)	fetal calf serum stimulated macrophages (n=7)
F 30	0.4224±0.0960	0.6531±0.0879(p<0.01)	0.4722±0.0790(p>0.05)
F 60	0.5536±0.0695	0.8468±0.0757(p<0.01)	0.6217±0.1300(p>0.05)
F 90	0.6424±0.1244	0.7905±0.1521(p>0.05)	0.6436±0.1078(p>0.05)
F120	0.7953±0.1204	0.8077±0.1128(p>0.05)	0.6978±0.1064(p>0.05)

* Phagocytic index: $F_t = \log N_0 - \log N_t$ (van Furth; 1973)

N_0 ; number of viable bacteria in the supernatant at the start

N_t ; number of viable bacteria in the supernatant at time (t) (min.)

나 90분 및 120분에서는 양군간에 식균지수의 차이가 없다. (p>0.05).

따라서 fluid thioglycollate medium(0.3%)으로 자극 받은 거식세포는 쉽게, 빨리 *S. aureus*을 식균함을 알 수 있었다.

한편 균-세포부유액에서 거식세포가 시간경과에 따라 식균하는 양상을 거식세포를 직접도말법으로 관찰하여 그 결과를 도 2 및 도 3에 표시하였다. 도 2에는 관찰한 100개의 거식세포중에 세균과 접촉하였거나 세포내 세균을 가진 거식세포수를 백분율로 표시했다. 즉, 자극하지 않은 거식세포가 *S. aureus*를 가지고 있는 세포비율은 30분, 60분, 90분에 각각 29%, 34%,

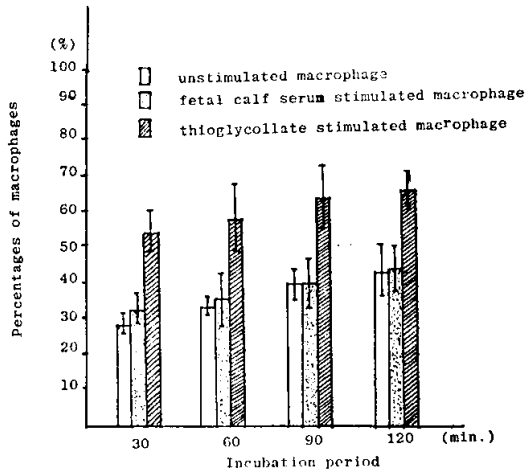


Fig. 2. Percentages of the unstimulated macrophages, fetal calf serum stimulated macrophages and thioglycollate stimulated macrophages with *S. aureus* in the sediments from the bacteria-macrophage suspension during incubation.

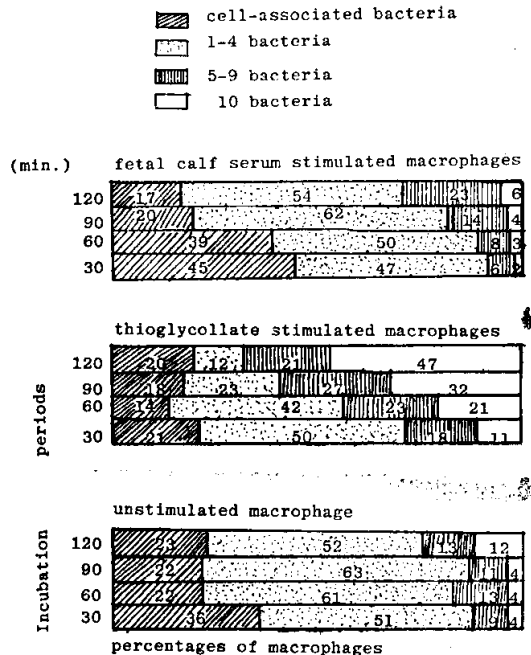


Fig. 3. Distribution of *S. aureus* within or attached to unstimulated, fetal calf serum stimulated and thioglycollate stimulated macrophages from the bacteria-macrophages suspension during incubation.

40%로 시간경과에 따라 증가하였으나(p<0.05), 120분에서는 90분에서와 차이가 없었다(p>0.05). thioglycollate로 자극된 거식세포는 세균을 가지는 비율은 30분에 54.5%로 자극하지 않은 거식세포에 비하여 아주 높은 비율을 가지며(p<0.01), 계속 시간경과에 따라 60분, 90분 및 120분에 각각 58.5%, 64.3% 및

66.3%로 자극하지 않은 거식세포보다 약 1.5~1.8배의 차이를 보였다($p < 0.01$). 그러나 thioglycollate에 자극된 거식세포가 세균을 가지고 있는 비율의 자기 시간간의 변화는 유의한 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

도 2에 표시되어 있는 세균을 가지거나 부착한 상태로 관찰된 거식세포를 세균을 가지고 있는 숫자에 따라 1~4개, 5~6개 및 10개 이상군으로 구분하였고 세포부착군을 추가하여 백분율로 도 3에 표시하였다.

도 3에서 보는 바와 같이 자극하지 않은 거식세포의 경우에는 1~4개군이 50%이나 그후 증가하여 60분 및 90분에 약 60%에 달하였고 5~9개군은 시간 경과에 따라 변화가 없었다. 10개 이상군은 90분까지는 변화 없이 4% 정도이었으나 120분에 12%로 증가하였다. 세포부착군은 30분에 36%이었으나 그후 감소하여 22%에 달하였다. 따라서 시간경과에 따라 세포내 균수의 증가가 계속적으로 서서히 진행함을 보여주었다. 반면에 thioglycollate로 자극된 거식세포의 경우에는 1~4개군은 30분에 50%로 대조군과 유사하나 점차로 감소하여 120분에는 12%에 달하였다. 그러나 5~9개군은 대조군보다 높은 양상을 보여 30분에 18%이었으나 90분에는 27%에 달하였다. 10개군 이상은 30분에 대조군보다 커서 11%이었으나 계속적으로 크게 증가하여 120분에는 47%에까지 달하여서 대조군에 비하여 세포내 균수의 급격한 증가를 보였다. 반면에 세포부착군은 대조군에 비해 21%로 낮았고 120분에는 비슷하여 20%에 달하였다. 결과적으로 thioglycollate로 자극된 거식세포는 세포내에 가지는 균수가 대조군에 비해 훨씬 높은 분포를 보여서 식균수의 증가로 해석되었다.

2. 태생우혈청(fetal calf serum)에 의한 식균능의 변화

태생우혈청을 0.5ml씩 마우스복강에 주입한 후 48시간만에 복강삼출세포를 채취하여 실험에 사용하였는데 이때의 거식세포는 세포질에 심하게 공포(vacuole) 형성이 증가된 형태학적인 특징을 지녔다.

이렇게 채취한 태생우혈청으로 자극된 거식세포에 접촉한 후 원심침전한 상청액내 *S. aureus*의 생균수의 변화는 표 1 및 도 1에 표시하였다.

태생우혈청으로 자극된 거식세포에 접촉한 후 시간경과에 따르는 생균수 및 식균지수(표 2 참조)의 변화는 대조군과 유의한 차이가 없었다. ($p > 0.05$).

한편 균-세포부착액에서 거식세포가 시간경과에 따라 식균하는 양상을 도 2 및 도 3에 표시하였다. 도

2에서 보는 바와 같이 세균이 부착되었거나 세균을 가지는 거식세포의 비율은 30분에 33%로 대조군에 비하여 높았으나($p < 0.05$). 그후의 변화는 대조군과 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 태생우혈청으로 자극된 거식세포가 세균을 가진 양상은 도 3에 표시되어 있다.

시간경과에 따라 각군의 변화를 살펴보면 1~4개군에 속하는 거식세포수는 대조군보다 90분까지 약간 낮은 인상을 주나 120분에는 유사하였다. 반면에 5~9개군은 시간경과에 따라 증가하는 인상을 주어서 120분에는 대조군보다 높아서 23%에 달했다.

10개 이상군에 속하는 거식세포수는 대조군보다 낮은 인상을 주었다. 그러나 세포부착군은 30분에 45%로 가장 높았으나 시간경과에 따라 급격히 감소하여 120분에는 17%에 달하였다.

대체적으로 세포내 균수의 분포는 대조군에 비하여 약간 낮은 인상을 주나 세포부착군은 오히려 높았기 때문에 전체적으로 대조군과 유사하게 식균한 세균의 분포를 보였다.

고 찰

실험동물의 복강내의 여러 세포중에 거식세포는 비교적 높은 비율로 분포된 세포성분으로서(Mims, 1964; Pearsall, 1970; Stuart, 1975) 이 세포의 기능을 탐구하기 위하여 복강내 거식세포를 채취하여 생체의 실험에 많이 이용해 왔는데(Pearsall, 1970), 이 세포를 보다 많이 얻기 위하여 glycogen(Suter, 1952), mineral oil(Cohn, et al, 1968), new-born calf serum(van Furth, et al, 1968), thioglycollate broth(Stuart, 1973), sodium casinate(Simmons, et al, 1973) 등을 주입하는 시도가 많은 연구자들에 의하여 개발되어 왔다. 그러나 이들 자극물질이 복강내 거식세포의 분포를 높이는 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 다만 Suter(1952) 및 Stuart(1973)는 이들에 의한 염증반응의 결과로 설명하고 있으나 실제로 이같은 염증반응이 유도되는 기전 및 거식세포의 반응성에 관한 실험적 보고는 아주 드문 실정이다.

본 실험에서 사용한 fluid thioglycollate medium(0.3%)을 마우스복강에 주입한 후에 72시간만에 70%정도의 거식세포의 분포를 보이는 복강삼출액을 채취하였는데 이때에 거식세포는 Hirsch(1970)가 기술한 형태와 유사하여, 광학현미경상에서 괴상한 형태로 소화안된 한천성분을 세포질내에 가지고 있는 세포가 많았다.

주사후 72시간 만에 복강내의 거식세포의 분포가 가장 높았는데 van Furth(1970)가 주장하였듯이 혈액내의 단핵구가 복강내로 이동된 결과로 설명되는데 복강내로 단핵구를 유인하는 화학주성(Chemotaxis)은 Unkless(1974)가 보고하였듯이 plasminogen activator를 thioglycollate broth에 자극받은 거식세포가 다량 분비하므로 이에 의하여 plasmin이 활성화 되어 결국 보체계(complement)가 활성화되어 야기된 것으로 해석되었다. 그러나 thioglycollate broth로 자극시에 거식세포가 plasminogen activator를 다량 생성분비하는 기전에 대해서는 확실히 알려져 있지 않지만(Unkless, 1974), endotoxin으로 자극시 소화시킬 수 없는 latex particle을 거식세포가 탐식하므로써 plasminogen activator가 다량 분비되므로(Gordon, et al, 1974), 소화시킬 수 없는 물질이 세포질내 존재하는 것과 plasminogen activator를 분비하는 기전과 관련이 있는 것 같다.

또한 thioglycollate로 자극된 거식세포는 세포막에 있는 보체수용체의 결합능이 증가되어 Ig-수용체를 방해해도 IgG나 IgM을 부착한 적혈구를 자극하지 않은 거식세포보다 쉽게 탐식하는 특징을 지니며(Bianco, et al, 1975), horse-radish peroxidase를 음작용(pinocytosis)함이 증가되어 있으며(Edelson, et al, 1975), antiviral activity(Morhan, et al, 1977)을 나타내는 등 거식세포의 기능에 변화가 있다는 보고와 더불어 5' nucleotidase작용(Edelson, et al, 1976) 및 lysozyme 생성분비(Gordon et al, 1974)에는 변화가 없었다는 사실이 알려지기 시작하였다. 본 실험에서 thioglycollate 자극된 거식세포는 대조군에 비하여 *S. aureus*을 식균하는 속도가 약 1.5배 정도 증가되어서 음작용(pinocytosis)의 증가와 거식세포의 세포막 수용체의 기능변화에 의한 결과로 해석되었다.

또한 본 실험에서는 신생우혈청(new-born calf serum) 대신에 태생우혈청을 마우스 복강에 주사한 후 48시간만 거식세포의 분포가 가장 높아서 55%에 달하였는데 이때에 채취한 거식세포의 형태는 Cohn(1965)이 신생우혈청(new-born calf serum)으로 자극한 거식세포에 기술한 바와 같이 세포질내 vesicle 형성이 상당히 증가된 상태로 나타났다.

Waarde(1975)들이 신생우혈청(new-born calf serum)으로 자극한 마우스에서 복강거식세포의 분포는 48시간 만에 약 50%에 달하여서 본 실험의 결과와 유사하였는데 신생우혈청(new-born calf serum)을 주사한 마우스의 혈액내에는 "monocytosis-inducing factor"가 유발된 결과로 해석하나(Waarde, et al 1975), 태생우혈

청에도 이와같은 인자를 유발하는 지는 확실치 않다. 그러나 신생우혈청(new-born calf serum)이 마우스 거식세포의 음작용(pinocytosis) 및 거식세포내 hydrolase 형성을 증가시켰다는 보고(Cohn, 1965)에 이어서 음작용(pinocytosis)을 조절하는 것이 증명됨에 따라(Cohn, 1965), 우혈청, 태생우혈청 및 마혈청도 신생우혈청같이 유발능력이 강해진 못하나 음작용유발인자(pinocytosis-inducing factor)가 있음이 보고 되었다.(Cohn, 1967). 따라서 태생우혈청도 음작용(pinocytosis)을 유도하여 lysosomal activity을 증가시켜 이에 수반하여 acid phosphatase, β -glucuronidase, lysozyme 등 효소의 생성분비가 증가되어(Cohn, et al, 1965) 이에 의하여 염증반응이 유발될 것으로 해석되었다. 또한 본 실험에서 사용한 태생우혈청에 자극받은 거식세포는 *S. aureus*을 식균하는 능력이 대조군과 유사하게 나타났는데 이것은 신생우혈청보다 태생우혈청에는 음작용유발인자(pinocytosis-inducing factor)가 워낙 미량이기 때문에(Cohn, 1967), 실제로 거식세포의 식균작용에 영향을 주지 못한 것으로 해석되었다. 그러나 세포내균수의 분포가 대조군보다 낮은 인상을 주었는데 이것은 대조군 보다 lysosomal activity가 태생우혈청에 의하여 증가되어서 세포내세균을 빨리 처리한 것으로 사료되나, 세포내균을 처리하는 양상을 다른 방법으로 추구해야지 본 실험의 방법으로는 설명할 수 없었다.

따라서 저자는 본실험을 통하여 fluid thioglycollate medium은 마우스 복강거식세포가 *Staphylococcus aureus*을 빨리, 쉽게 식균할 수 있도록 자극을 준 반면에 태생우혈청은 마우스거식세포의 식균능에 전혀 영향을 주지 않은 것으로 결론 지었다.

총 관

저자는 fluid thioglycollate medium이나 태생우혈청(fetal calf serum)으로 자극받은 마우스거식세포의 활동을 관찰하기 위하여, fluid thioglycollate medium (0.3%)을 2ml씩, 태생우혈청을 0.5ml씩 따로 마우스 복강에 주사한 후 각각 72시간 및 48시간 만에 채취한 복강삼출세포와 *Staphylococcus aureus*(Wood 46)를 같이 배양하여 생균수 및 세균을 함유하는 거식세포수의 변화를 30분, 60분, 90분 및 120분간에 걸쳐 식균작용의 변화로 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. fluid thioglycollate medium으로 자극받은 거식세포의 *S. aureus*에 대한 식균지수는 60분까지 대조군에 비해 1.5배이었으나 그 이후 유의한 차이가 보이지

않았다. 각 배양시간에 따라 *S. aureus*를 식균한 거식세포 수에 있어서 fluid thioglycollite medium으로 자극경우는 대조군에 비하여 그 수가 1.5~1.8배 이었으며 거식세포가 가지는 세균수도 대조군 보다 높았다.

2. 각 배양시간에 있어서 태생우혈청으로 자극된 거식세포의 *S. aureus*에 대한 식균지수는 대조군과 유의한 차이가 없었으며 또한 세균을 가지는 거식세포 및 거식세포가 가지는 세균수도 대조군에 비하여 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 fluid thioglycollate medium은 마우스 복강거식세포의 식균작용을 항진시키나 태생우혈청은 이 작용에 영향을 주지 않는다.

—ABSTRACT—

Influences of Non-specific Stimulation on the Phagocytic Activities of Macrophages

Chang-Yong Cha, Seung-Hoon Lee

Department of Microbiology, College of Medicine,
Seoul National University.

Various studies using the peritoneal macrophages of experimental animals have been reported to increase the population of the peritoneal macrophages by intraperitoneal injection of non-specific stimulants such as glycogen, mineral oil, newborn calf serum, thioglycollate broth, sodium casinate, etc. Recent reports suggested that many functional differences were expected between the normal resident macrophages and the macrophages induced with non-specific stimulation.

However, there were few reports concerning the phagocytic activities of such stimulated macrophages on the living particles such as bacteria. An experiment was performed to understand the influences of thioglycollate broth and fetal calf serum as non-specific stimulants on the phagocytic activities of the mouse peritoneal macrophages.

Mice of DDO strain were divided into two groups which were injected intraperitoneally with 2.0ml of fluid thioglycollate medium and 0.5ml of fetal calf serum, respectively. The peritoneal exudate cells were collected 72 hours after the injection of fluid thioglycollate medium and 48 hours after the injection of fetal

calf serum. The collected cells were pooled, suspended in the cell maintenance medium, and mixed with the suspension of *Staphylococcus aureus*(Wood-46) at 4°C. to make the bacteria-cell suspension. The bacteria-cell suspensions were incubated at 37°C. for 30min., 60min., 90min., and 120min., and each suspension was centrifuged (110g, for 5min.) after incubation. The viable bacterial units were counted from the supernatants. The percentages of the viable bacterial units and the phagocytic indices at each incubation time were determined to express the degree of phagocytosis. At the same time, from the stained sediments, the ratios of the macrophages associated with bacteria to the total ones and the distribution of the macrophages laden with bacteria by the bacterial number were also checked.

The results obtained in this experiments were summarized as follows;

1. The phagocytic indices of the thioglycollate stimulated macrophages were 1.5 times higher than those of the unstimulated ones until 60 minutes' incubation, but thereafter, were not significantly different between them. The thioglycollate stimulated macrophages were associated with *S. aureus* 1.5~1.8 times more than the unstimulated ones, and the numbers of the bacteria within or attached to the thioglycollate stimulated macrophages were also remarkably greater than in case of the unstimulated ones during incubation.

2. No significant differences in the phagocytic indices, the ratios of the macrophages associated with bacteria, and the numbers of bacteria within or attached to the macrophages were observed between the fetal calf serum stimulated macrophages and the unstimulated ones during incubation.

It, therefore, was concluded that the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by the mouse peritoneal macrophage was considerably enhanced with the treatment of fluid thioglycollate medium, whereas it was not altered with the treatment of fetal calf serum.

REFERENCES

Berthrong. M.: *The macrophages-tubercle bacillus rela-*

- tionship and resistance to tuberculosis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 154(1):157, 1968.
- Bianco, C., F.M. Griffin, Jr., and S.C. Silverstein: *Studies of the macrophage complement receptor, alteration of receptor function upon macrophage* *J. Exp. Med.* 141:1278, 1975.
- Carr, I.: *The Macrophage, A Review of Ultrastructure and Function*. 1st ed. Academic Press, London, 1973.
- Cohn, Z.A. and E. Wiener: *The particulate hydrolases of macrophages, I. comparative enzymology, isolation and properties*, *J. Exp. Med.* 118:991, 1963.
- Cohn, Z.A. and B. Benson: *The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes, II. The influences of serum on granule formation, hydrolase production and pinocytosis*, *J. Exp. Med.* 121:835, 1965.
- Cohn, Z.A.: *The regulation of pinocytosis in macrophages, I. Metabolic requirements as defined by the use of inhibitors*, *J. Exp. Med.* 124:557, 1966.
- Cohn, Z.A. and E. Parks: *The regulation of pinocytosis in mouse macrophages, IV. The immunological induction of pinocytic vesicle, secondary lysosome, and hydrolytic enzymes*, *J. Exp. Med.* 125:1091, 1967.
- Dannenbergh, A.M.: *Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis; specificity, systemic and local nature and associated macrophage enzyme*, *Bact. Rev.* 28:85, 1968.
- Edelson, P.J., R. Zwiebel and Z.A. Cohn: *The pinocytic rate of activated macrophages*, *J. Exp. Med.* 142:1150, 1975.
- Edelson, P.J., and Z.A. Cohn: *5' nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages, I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations*, *J. Exp. Med.* 144:1581, 1976.
- Fenner, F.: *The enumeration of viable tubercle bacilli by surface drop counts*, *Am. Rev. Tuberc.* 64:353, 1951.
- Elberg, S.S. P. Schneider and J. Fong: *Cross-immunity between Brucella melitensis and Mycobacterium tuberculosis, intracellular behaviour of Brucella melitensis in monocyte from vaccinated animals*, *J. Exp. Med.* 106:545, 1968.
- Gordon, S., J.C. Unkeless and Z.A. Cohn: *Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis*, *J. Exp. Med.* 140:995, 1974.
- Gordon, S., J. Todd and Z.A. Cohn: *In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes*, *J. Exp. Med.* 139:1228, 1974.
- Hirsch, J.G. and M.E. Fedorko: *Morphology of mouse mononuclear phagocyte p.7*, in *Mononuclear Phagocyte*, edited by R. van Furth. 1st ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1970.
- Hoskin, J.M.: *Appendices p. 303*, in *Virological Procedure*, Butterworths, London, 1967.
- Jenkin, C., and D.L. Palmer: *Changes in the titer of serum opsonins and phagocytic properties of mouse peritoneal macrophages following injection of endotoxin*, *J. Exp. Med.* 112:418, 1960.
- Karnovsky, M.L., J. Lasdin and S. Simmons: *Metabolism of activated mononuclear phagocyte at rest and during phagocytosis p. 423*, in *Mononuclear phagocytes in Immunity, Infection, and Pathology*, edited by R. van Furth. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975.
- Mackaness, G.B.: *Cellular resistance to infection*, *J. Exp. Med.* 116:381, 1962.
- Mackaness G.B.: *The mechanism of macrophage activation, p. 61*, in *Infectious Agents and Host Reaction*, edited by S. Mudd, 1st ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970.
- Mims, C.A.: *The peritoneal macrophage of mice*, *Brit. J. Exp. Med.* 45:37,
- Morahan, P.S., and others: *Comparison of Antiviral and anti-tumor activity of activated macrophages*, *Cell. Immunol.* 28:404, 1977.
- Nelson, D.S.: *Immunobiology of the macrophages*. 1st ed. Academic Press, N.Y., 1976.
- Pearsall N.N. and R.S. Weiser: *The macrophage*. 1st ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1970.
- Simmons, S.R. and M.L. Karnovsky: *Iodinating ability of various leucocytes and their bactericidal activity*, *J. Exp. Med.* 136:44, 1973.
- Stubbs, M.A.F., and others: *Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages*, *J. Exp. Med.* 137: 537, 1973.

- Stuart. A.E., J.A. Habsshas, and A.E. Davidson: The phagocytic cell *in vitro* p.24, In *Handbook of Experimental Immunology* edited by D.M. Weir. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1973.
- Stuart. A.E.: *The Reticuloendothelial system.* p.365, In *Clinical Aspect of Immunology*, edited by Gell. P.G.H., R.R.A, Coombs and P.J. Lachmann, 3rd ed. Blackwell Sciencific publications, Oxford, 1975.
- Suter, E.: *The multiplication of tubercle bacillus within normal phagocytes in tissue culture,* *J. Exp. Med.* 96:137, 1952.
- Unkeless, J.C., S. Gordon and E. Reich: *Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages.* *J. Exp. Med.* 139:834, 1974.
- van Furth, R.,J.G, Hirsch. and M.A. Fedorko: *Morphology and peroxidase cytochemisty of mouse promonocyte, monocyte and macrophages.* *J. Exp. Med.* 132:794, 1970.
- van Furth. R. and Z.A. Cohn: *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes,* *J. Exp. Med.* 128:415, 1968.
- van Furth, R. and T.L. Zweit: *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes,* p.36, 1. in *Handbook of Experimental Immunology.* edited by D.M. Weir. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1973.
- van Waarde, D., E.H. Hesslink and R. van Furth: *Humoral regulation of monocytosis during acute inflammatory reaction,* p.205, in *Mononuclear phagocytes in Immunity, Infection and Pathology*, edited R. van Furth. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975
- Wilson. G.S. and A.A. Miles: *The mechanisms of antibacterial immunity in the normal animal,* p. 1316. In *Topley and Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity* (vol 2). 6th ed., Arnold. Oxford, 1975.
- Wu, W.G. and S. Marcus: *Humoral factors in cellular resistance, I. The effect of heated and unheated homologous and heterologous sera on phagocytosis and cytopepiss by normal and "Immune" macrophages,* *J. Immunol.* 91:313, 1963.