

鼠의 Natural Killer Cell Assay의 標的細胞로 利用되는 Yac-1細胞의 染色體에 관한 研究

高神大學 醫學部 解剖學教室

金 岡 鍊

A Study on Chromosome of Yac-1 Cells for the use of Target Cells in Mouse Natural Killer Cell Assay.

Kang Ryune Kim

Department of Anatomy, Kosin Medical College, Pusan, Korea

= Abstract =

The metaphase chromosomes of the Yac-1 cells stained with trypsin-giems method were observed and the results obtained are summarized as following,

- 1) The basic karyotype of the Yac-1 cells was consisted of 40 chromosomes.
- 2) The chromosome types classified according to the position of centromere were acrocentric to telocentric in 20 pairs of the whole.
- 3) The staining intensity of the band recorded in four degrees were, very dark in 23, medium dark 19, weakly positive in 16, pale in 38 bands. And the total number of bands was recorded as 96 in 20 pairs of the whole.

I. 緒 論

Yac-1細胞는 A/Sn이란 mouse 계통의 moloney leukemia virus에서 유발된 lymphoma에서 얻어진³⁾ 細胞로부터 培養된 Cell Line이다.

最近에 와서 Yac-1細胞가 免疫細胞의 한 部類인 Natural Killer細胞의 活性에 대해 민감한 反應을 나타낸다고 알려졌으며^{4,12,19,22)} 宿主에 대한 免疫生物學

的 機轉을 究明하고 宿主의 免疫能力을 測定하는데 應用^{5,10,25)}되고 있을 뿐이다. 이와같은 淋巴腫은 Pulvertaft²¹⁾가 1964년에 Burkitt 淋巴腫患者의 白血球를 長期培養하는데 成功하였고 그後 各種 Virus性 疾患^{8,20)} 및 惡性腫瘍¹¹⁾患者에서 淋巴球의 細胞株가 培養되어 왔으며 Moore¹⁵⁾ 등이 1967년에 正常人의 淋巴球에서 細胞株를 樹立하였다. 이러한 細胞株는 染色體의 構成이 供血者의 染色體의 構成과 똑같이 維持되기 때문에 Yac-1細胞에 對하여 Moorhead¹⁶⁾ 등과 HSU 및 Kellogg¹¹⁾ 등의 進歩된 組織培養法과 Rothfels 및 Siminovitch²³⁾ 등의 空氣乾燥法과

Schright²⁴⁾, Drets⁵⁾, Dutrillaux⁶⁾, Patil¹⁸⁾의 染色體區別染色法の 變法을 使用하여 G-banding Pattern으로 Yac-1細胞의 染色體核型을 알아보고자 觀察分析하여 보았다.

II. 實驗材料 및 方法

本 實驗에 使用한 Yac-1細胞株는 高神大學 醫學部 微生物學敎室의 細胞株 保存研究室에서 保存되어 있는 것을 使用하였으며 實驗方法은 Yac-1細胞를 제대 培養時 교환되는 培養液에 浮遊하는 細胞와 培養液을 25ml의 배양플라스크에 담고 RPMI 1640, 15% 牛胎兒血清 및 항생-항진균제가 섞인 培養液을 첨가하여 전체가 10ml가 되도록하여 37℃인 5% CO₂ 배양기에서 72時間 培養後 Cell Harvest 2時間 前에 colchicine을 培養液에 첨가하여 細胞分裂을 억제시켰고 그 後 培養液을 10ml 플라스틱 원심분리管으로 옮긴 다음 1000rpm에서 8分間 遠沈시킨 후 그 침전물을 低張液으로 處理하고 다시 1000rpm에서 8分間 遠沈시켜 上澄液을 버리고 4℃로 冷却시킨 固定液(methanol : acetic acid=3 : 1)을 넣어 30分間 處理한 다음, 새로운 固定液으로 1回 정도 바꾼 後 여기 섞인 細胞는 Rothfels and Siminovitch 및 Tjo and Puck²⁶⁾의 空氣乾燥法에 따라 染色體標本을 作

成하였다. 이상과 같은 方法으로 얻은 Slide를 Sehright의 方法의 變法으로 PBS(Phosphate Buffer Saline)에 trypsin 0.2% 溶液을 만들어 10秒~1分間 trypsin Solution으로 處理 後, 2回 PBS로 씻어낸 다음 Giemsa 溶液으로 5~10分間 染色한 後에 分裂像이 좋은 Slide를 20枚씩 선택하여 分裂中期에 있는 染色體를 各 10枚당 100個의 細胞를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

Yac-1細胞의 中期分裂像에서 觀察된 染色體數 및 數의變異는 Table 1과 같다.

Table 1에서 밝힌 바와 같이 觀察細胞 中에서 Stem Line으로 인정되는 細胞의 染色體數는 40個이며 材料 I, II에서 各各 88%와 97%로 나타났다. 染色體의 形態學的 類型區分은 trypsin-giemsa method로 腕內의 差異를 容易하게 區別할 수 있어서 各 染色體의 크기와 Centromere의 位置에 따라 分類하여 染色體雙과 그 順位를 定하였다. 染色體를 S型(Submetacentric), M型(Metacentric), A型(Acentric & Telocentric)의 3型으로 區分하여 그 觀察結果는 Table 2에서 보는 바와 같이 染色體數는 40個로 나타났으며 전부 A型으로 觀察되었다.

Table 1. Frequency of chromosome numbers in the Yac-1 cells

chromosome numbers					total cells counted
number of specimens examined	38	39	40	41	
I	6	2	88	4	100
II	0	2	97	1	100

Table 2. Karyotype of Yac-1

number of specimens examined	chromosomal count	chromosome type			
		S	M	A	X-chromosomes
I, II	40	whole autosome			
					A

Table 3. Distribution to the intensity of chromosome band

staining intensity chromosome no	very bark	medium dark	weakly positive band	pale	NO of bands
1	2	1	3	1	7
2	1	2	2	2	7
3	1	1	1	2	5
4	1	1	1	2	5
5	2	0	1	2	5
6	2	1	0	3	6
7	1	1	1	2	5
8	1	0	0	2	3
9	1	1	0	3	5
10	2	1	0	2	5
11	1	1	1	2	5
12	2	1	1	1	5
13	1	1	0	3	5
14	1	1	2	1	5
15	0	2	2	1	5
16	1	1	1	1	4
17	0	1	0	2	3
18	1	0	0	2	3
19	0	1	0	2	3
XX	2	1	0	2	5

이와같은 染色體數는 Galton⁷⁾ 등이 報告한 유럽產 Mus musculus와 Kim 등¹⁴⁾이 報告한 한국產 Mus molossimus와 染色體數 및 形態 등이 일치하였다. 위에서 觀察한 바와같이 Yac-1細胞의 染色體數와 形態가 같은 것은 Yac-1細胞는 A/Sn이란 mouse의 moloney leukemia virus에서 유래된 lymphoma에서 얻어진 細胞이기 때문인 것 같다. 本 實驗에서 染色體의 band 상태의 表記法은 Chicago²⁾ 및 Paris Conference¹⁷⁾에 의해 決定된 方法에 따라 計數하였던 바 band의 總數는 96個로 나타났다. Band의 染色強度에 따라 very dark, medium dark, weakly positive band, pale의 4等級으로 區別하여 觀察하였으며 그 結果는 Table 3과 같다.

이러한 染色強度는 각 染色體마다 差異가 있어 區

別하는데 도움이 되었으나 작은 띠에 대하여는 實驗 과정에서나 觀察方法에서 差異가 있어서 band數를 計數하는데 많은 어려움을 가졌다. 이와같은 實驗結果로 Yac-1細胞株는 그대로 diploid complement로 維持하고 있음을 알 수 있었다. Giemsa 帶狀構造研究는 染色體의 構造的 異狀을 精確히 밝혀낼 수 있으므로 患者 진단에 많은 도움이 있을 것으로 생각된다.

IV. 結 論

本 實驗에 使用한 Yac-1細胞의 分裂中期 染色體의 核型을 分析하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 染色體數는 40個였다. 2) 染色體의 形態는 모

두 A型(Acrocentric to telocentric)이었다. 3) Band의 染色強度에 따라 very dark 23, medium dark 19, weakly positive band 16, pale 38로 나타났으며 總band數는 96個였다.

감사의 글

본 논문의 작성을 위하여 도와주신 고신대학 의학부 미생물학교실 장명웅교수님과 김광혁교수님께 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

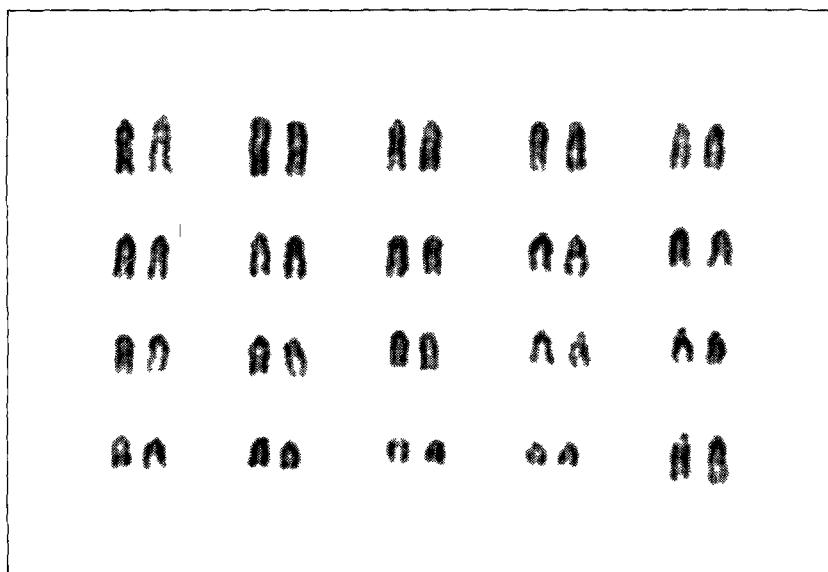
1. Armstrong D : Serial cultivation of human leukemic cells Proc Soc Exp Biol Med 122 : 475, 1966
2. Chicago conference : Standardization in human cytogenetics, Birth Defects. Orig Art Series II : 2, 1966
3. Christine AB, Lynn RT, Raymond MW : Increase in NK cell number and Turnover Rate during acute viral infection. J Am Ass Imm 133(3) : 1539~1545, 1983
4. Colin GB, Kagemasa K, George ES, Christopher SH : Characterization of five cloned murine cell lines showing high cytolytic activity against Yac-1 cells. J Immu 128(5) : 2326~2334, 1982
5. Drets ME, Shaw MW : Specific banding patterns of human chromosomes. Proc Natl Acade Sci(wash) 68 : 2073~2077, 1971
6. Dutrillaux B, Lejeune J : Cytogenetique humaine en evidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique(pronase en particulier). C R Acad Sci Paris 273 : 587~588, 1971
7. Galton M, SF Eolt : Asynchronous replication of the mouse sex chromosome. Exp Cell Rec 37 : 111~112, 1965
8. Glade PR, Kasel JA, Moses HL, Whangpeng J, Hoffman PF et al : Infectious mononucleosis : continuous suspension culture of peripheral blood leukocytes. Nature 217 : 564, 1968
9. Hellström KE, Hellström L : Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumour antigens. Advanc Immunol 18 : 20, 1974
10. Hersey P, Edwards A, Milton GW, McCarthy WH : Relationship of cell-mediated cytotoxicity against melanoma cells to prognosis in melanoma patients Br J cancer 37 : 505, 1978
11. HUS TC, Kellogg DS : Primary cultivation and continuous propagation of cells in vitro from cell biopsy specimens. J Natl Cancer Inst 25 : 211~235, 1960
12. Jeannine MD, Barbara NB, Edward AC, Christopher SH : Characterization of a lymphoma cell variant selectively resistant to natural killer cells. J Immu 125(2) : 683~688, 1980
13. Kagemasa K, Steven G, Donald EK, Christopher SH : Murine NK cell cultures : Effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. J Immu 126(6) : 2321~2327, 1981
14. Kim KR, Chang NS, Lee SW : Studies on the chromosome of the Korean mouse. J Zool Korea 15(1) : 35~38, 1972
15. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA : Culture of normal human leukocytes J Amer Med Asso 199 : 519, 1967
16. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Bittips DM, Hungerford DA : Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood Exp Cell Res 20 : 613~616, 1960
17. Paris conference : Standardization in human cytogenetics, Birth Defects : Orig Ant Series VIII : 7, 1972
18. Patil SR, Luhs HA : Identification of each human chromosome with a modified giemsa stain. Science 173 : 821~822, 1971
19. Phyllis BB : Immunogenetics of natural immunity. Aca Press Inc 401~409, 1980
20. Pope JH : Establishment of cell line from

- peripheral leukocytes in infection mononucleosis
Nature 216 : 810, 1967
21. Pulvertaft RJV : Cytology of burkitts tumor.
Lancet 1 : 238, 1964
 22. Robert CN Esther FH, Theresa D et al : Oncor-
naviruses produced by murine leukemia cells in
culture Virology 81 : 363~370, 1971
 23. Rothfels KH, Simunovitch L : An air drying
technique for flattening chromosomes in mamma-
lian cells grown in vitro. Stain Tec 33(2) : 73~
77, 1958
 24. Sehnght M : A rapid banding technique for hu-
man chromosomes Lancet 2 : 971, 1971
 25. Taylor-Papadimitriou J, Shearer M, Stoker
MGP : Growth requirements of human mam-
mary epithelial cells in culture Int J Cancer 20
: 903, 1977
 26. Tjio JH, Puck TT : Somatic chromosome of
man. Proc Natl Acad Sci 44 : 1229, 1968

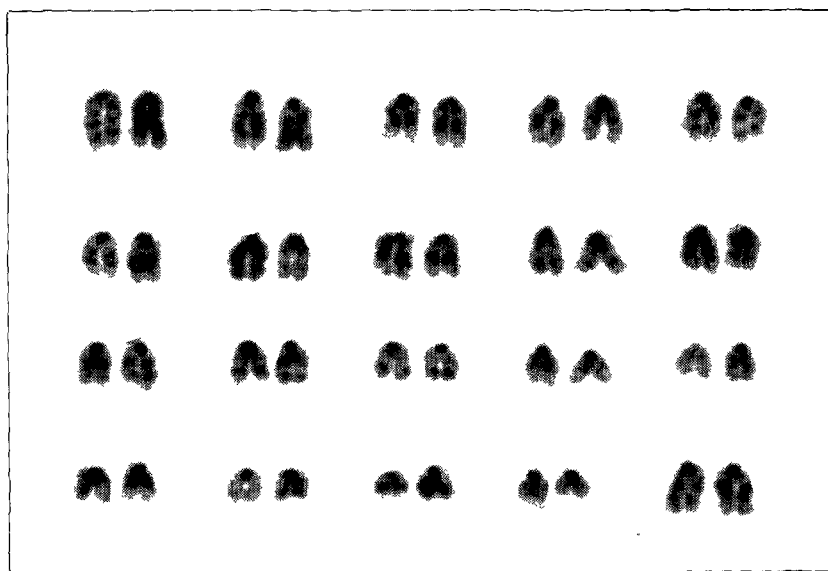
Explanation of Figures

Fig. 1. The Karyotype of Yac-1

Fig. 2. The karyotype of G-band pattern of Yac-1



1



2