

## 흰쥐 심장근육에 분포하는 MHC class II 양성반응 수지상세포의 연령에 따른 변화

김철우, 유기수<sup>1</sup>, 김강련

고신대학교 의과대학 해부학교실, <sup>1</sup>동아대학교 의과대학 해부학교실

**간추림** : 심장에서는 면역반응에 중요한 역할을 하는 major histocompatibility complex (MHC) class II 양성 면역반응 수지상세포가 분포한다고 알려져 있으나 연령에 따른 세포수의 차이와 형태 변화에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 이에 연구자들은 나이가 다른 실험동물을 비교하여 연령에 따른 변화를 밝히고자 이 연구를 시행하였다.

실험동물로는 1개월, 12개월, 24개월의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 15마리를 사용하였다. 흰쥐에 3.5% chloral hydrate (1 mL/100 g)를 복강내주사하여 마취시킨 후 심장을 절취하여 동결절편을 제작하였다. 동결절편에 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody를 이용하여 면역염색을 시킨 후 심장근육에 분포하는 양성 면역반응 수지상세포들을 광학현미경으로 검경과 계수하였다.

흰쥐 심장근육에 분포하는 수지상세포들의 수는 생후 1개월 때는 단위면적(0.2 mm<sup>2</sup>) 당 평균 1.4개, 생후 12개월 때는 평균 2.8개, 그리고 생후 24개월 때는 평균 4.6개로 나이가 많아짐에 따라 세포수는 증가하였다. 세포의 형태도 나이가 많아짐에 따라 세포질돌기가 많아지고 길어졌으며, 일부 세포들은 군집을 이루는 경우가 많았다.

그러므로 연령이 증가함에 따라 수지상세포의 수와 형태의 변화는 면역기능에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

**찾아보기 낱말** : 수지상세포, 심장근육, 연령, 흰쥐

### 서론

수지상세포는 신체내 전 부위에 걸쳐 광범위하게 분포하면서 T세포에 항원을 제공하기 위해 특수하게 분화된 세포군이다. 이러한 수지상세포들은 항원을 처리한 후 혈액이나 림프액을 통해 림프기관으로 이주해 가서 T세포에 항원을 제공하기 때문에 존재하는 부위에 관계없이 기능적으로 유사하다. 신체 내에서 수지상세포들은 분명한 계통을 이루고 있지만 각 장기와 미세환경조건, 발생단계, 기능적 상태에 따라 다양한 표현형으로 구성되며 복잡한 체계를 이루고 있다(Crowley 등 1989, Crowley 등 1990, Forrester 등 1994).

수지상세포(dendritic cell, DC)는 출현부위 및 세포막특성에 따라 3종류의 세포군으로 분류된다(Tew 1982). 첫째 세포군은 피부에 분포하는 랑게르한스세포(Langerhans cell)와 뇌를 제외한 대부분의 장기에 존재하는 수지상세포로 간질 수지상세포(interstitial DC)라고 한다. 둘째 세포군은 혈액 내에 있는 혈액 수지상세포(blood DC)와 림프 내에 존재하는 veiled cell과 같은 수지상세포로 순환수지상세포(circulating DC)라고 한다. 셋째 세포군은 T세포 지역 및 흉선수질에 분포하는 깎지수지상세포(interdigitating DC)와 종자중심(germinal center)내에 위치한 소포 수지상세포(follicular DC) 등 림프기관 내에 존재하는 수지상세포로 림프성수지상세포(lymphoid DC)라고 한다. 따라서 수지상세포는 신체 내 전 부위에 걸쳐 광범위하게 분포하면서 T세포에 항원을 제공하기 위해 특수하게 분화되어 있는 세포군이라고 할 수 있다(Lotze와 Thomson 2000).

\*이 논문은 고신대학교 의과대학 연구비의 일부 지원으로 연구되었음.

교신저자: 김강련(고신대학교 의과대학 해부학교실)  
전자우편: muskrkim@ns.kosinmed.or.kr

근래에 수지상세포에 존재하는 특이항원에 대한 단일클론항체가 개발되었으며, 이 중에서 MHC class II 항체는 수지상세포의 세포표면에 존재하는 MHC class II Ia 항원을 감지하는 특성을 가지고 있어 조직내의 수지상세포를 동정할 수 있게 되었다 (McMaster와 Williams 1979, Dijkstra 등 1985). 또한 최근 일부 연구자들은 수지상세포를 이용한 면역요법으로 종양을 치료하여 이 세포에 대한 관심이 고조되고 있다 (Lopez와 Hart 2002, Adams 등 2005).

심장에서는 면역반응에 중요한 역할을 하는 major histocompatibility complex (MHC) class II 양성 면역반응 수지상세포가 분포한다고 알려져 있으나 연령에 따른 수적 및 형태 변화에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다 (Yokoyama 등 2000). 이에 연구자들은 나이가 다른 실험동물을 비교하여 연령에 따른 변화를 밝히고자 이 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험대상

실험동물은 항온 항습이 유지되고 12시간마다 밤낮이 교체되며 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 동일한 조건하에서 사육한 생후 1개월 (평균 200 g), 12개월 (평균 700 g) 및 24개월 (평균 1,000 g) 된 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였다. 흰쥐는 각 실험군마다 연령별로 5마리씩 모두 15마리를 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 조직표본제작

조직은 흰쥐를 생리식염수에 녹인 3.5% chloral hydrate를 체중 100 g당 1 mL를 복강내주사하여 마취시킨 뒤 심장을 절취하였다. 절취한 조직은 즉시 gum tragacanth를 이용하여 콜크로 된 받침대에 정착시킨 후 액체 질소(liquid nitrogen)에 의해  $-160^{\circ}\text{C}$ 로 냉각된 isopentane에 넣어 약 10초 동안 동결 고정하였다.

동결 고정된 조직편을 동결절편기(cryocut, Rei-

chert-Jung, Germany)를 사용하여  $6\mu\text{m}$ 두께의 조직 절편을 만들고, 이들 절편을 poly-L-lysine coated slide 또는 probe on slide에 부착시켰다. 이중 일부는  $40^{\circ}\text{C}$  조직신전기(slide warmer)에서 40분간 충분히 말린 다음 아세톤( $4^{\circ}\text{C}$ )으로 15분간 고정하였고, 이를 다시 조직신전기에서 2시간 이상 충분히 건조시켰다. 나머지 조직절편들은 다음 염색에 사용하기 위하여 동결절편 후 말리지 않고 바로 5초 동안 아세톤( $4^{\circ}\text{C}$ )으로 고정한 후  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동기에 넣어 보관하였다.

#### 2) 면역조직화학염색

조직절편을 0.02 M 인산염완충액(pH 7.4; PBS)에서 약 10분 동안 2회 수세한 후 내재성 과산화효소의 활성을 제거하기 위해 0.3% 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말혈청(normal horse serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody (희석비율 1:500, Serotec, UK)를  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 14~16시간 동안 각각 적용시켰다.

일차항체를 적용시킨 뒤 PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab, USA)를 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 10분씩 3회 수세한 다음 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액(Vector Lab., USA)을 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 이어서 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6; Tris buffer)에 0.05% DAB (3, 3'-diaminobenzine tetrahydrochloride, Sigma Co., USA)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 정색상태를 현미경하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris' hematoxylin으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permunt (Polysciences, USA)로 봉입하였다.

면역염색의 정확도를 검증하기 위해 염색과정에

서 일차항체나 ABC 용액 적용과정을 생략시켜 본 결과, 이 과정을 거친 표본에서는 어떤 면역반응성도 나타나지 않았기 때문에 면역염색의 정확성이 입증되었다.

### 3. 검경과 계수

흰쥐 심장근에 나타나는 MHC class II 양성 면역 반응 수지상세포를 대상으로 광학현미경 (Axiophot, Zeiss, Germany)으로 검경하였다.

수지상세포의 계수는 연령별로 나누어 한 개체에서 3개의 연령 실험군으로 구분하고 한 개체에서 10개의 표본을 무작위로 선택하여 단위면적 (0.2 mm<sup>2</sup>)에 출현하는 양성 면역 반응성을 보인 세포만을 계수하였다. 이때 면역 반응세포의 형태가 불규칙하여 중복될 우려가 많아 핵이 있는 세포를 택하여 계수하였다. 각 세포군의 시기에 따른 수적 변화의 통계적 유의성을 확인하기 위해서 분산분석 (ANOVA)을 이용하여 검증하였다.

## 결 과

흰쥐 심장근육에 분포하는 항원제공세포인 수지상세포가 연령에 따라 세포 수와 형태가 어떤 변화 양상을 보이는 지를 알아보기 위해 생후 1개월, 12개월, 24개월 된 흰쥐의 심장을 대상으로 냉동 연속 조직절편을 제작하여 면역조직화학적 염색을 시행한 뒤 양성 면역 반응성을 보인 세포를 관찰하고 계수하여 얻은 결과는 다음과 같다.

#### 1. 연령에 따른 수지상세포의 세포수의 변화

MHC class II 양성 면역반응 수지상세포는 생후 1개월 때는 단위면적 (0.2 mm<sup>2</sup>) 당 평균 1.4개였으며, 생후 12개월 때는 2.8개, 생후 24개월 때는 4.6개로 나이가 증가함에 따라 세포수가 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

#### 2. 연령에 따른 수지상세포의 형태 변화

1개월 된 흰쥐의 심장근에서 갈색으로 염색된

**Table 1.** The numbers of MHC class II-positive dendritic cells in rat heart according to ages

| Age of rat   | 1 Month    | 12 Months  | 24 Months  |
|--------------|------------|------------|------------|
| Cell numbers | 1.4* ± 0.3 | 2.8* ± 0.5 | 4.6* ± 0.2 |

The numbers represent mean ± standard deviation.

Dendritic cells were counted on unit area (0.2 mm<sup>2</sup>) of 50 slides in each group.

\*:  $p < 0.05$  on ANOVA

MHC class II 양성 면역반응 수지상세포가 관찰되었다 (Figs. 1-3). 수지상세포는 난원형의 핵과 짧은 세포질돌기를 갖고 있었다 (Figs. 1-3). 가로절단된 심장근에서 보이는 수지상세포 (Fig. 1)가 세로절단된 심장근에서 보이는 세포 (Fig. 2) 보다 더 단순한 형태를 보여 주었다.

12개월 된 흰쥐의 심장근의 수지상세포들 (Figs. 4-6)은 세포질돌기가 증가되어 있었다. 일부 수지상세포는 서로 접촉하고 있었다 (Figs. 5, 6).

24개월 된 흰쥐의 심장근의 수지상세포들 (Figs. 7-9)은 세포질돌기가 발달되어 있었다. 수지상세포들이 심장근섬유사이에서 집단을 이루고 있었으며 (Fig. 8), 어떤 경우에는 심장근 안에서 무리를 짓고 있었다 (Fig. 9).

## 고 찰

대부분의 학자들은 대식세포가 면역반응의 주된 항원제공세포라고 생각해 왔지만 Steinman과 Cohn (1973)이 생쥐의 비장에서 최초로 수지상세포를 분리한 이후 최근 여러 학자들은 수지상세포가 다른 항원제공세포에 비해 T세포 의존성 면역반응에 있어서 가장 효과적인 항원제공세포라고 보고한 바 있다 (Bronstein 등 1983, Steinman 1991).

수지상세포에 대한 지금까지의 연구는 대부분이 in vitro에 국한되어 왔고, in vivo 연구는 빈약한 형편이다. 그리고 림프성 수지상세포에 대한 연구는 비교적 활발한 편이나 피부의 랑게르한스세포를 제외한 다른 간질 수지상세포에 대한 연구는 부진한 실정이다 (Hart와 McKenzie 1990, Inaba 등 1993).

이 연구의 대상이 되는 MHC class II 양성 수지상

세포는 현미경 관찰결과 세포질돌기를 갖는 전형적인 간질 수지상세포였다.

수지상세포가 여러 종류로 분류되어도 이 세포는 골수의 단핵구에서 유래한 세포로 믿고 있으며 (Bowers와 Berkowitz 1986), 형태학적으로 섬유모세포 그리고 기능적으로 대식세포 및 림프구와 유사한 점이 많지만 이들과는 별개의 골수성세포계열을 형성한다 (Lu 1980, Akasaka 1991).

초기에 출현하는 미숙한 수지상세포는 유도관용 (inducing tolerance)에 중요한 역할을 하나, 나중에 출현하는 성숙한 수지상세포는 병원성 항원 (pathogenic antigen)에 대한 면역적격세포 (immunocompetent cell)의 역할을 한다고 알려져 있어 (Hanson 1981), 성장과정에 따라 MHC class II 면역반응성 수지상세포의 역할이 변함을 추측할 수 있다. 이 연구에서 MHC class II 면역반응성 수지상세포는 나이에 따라 세포수가 점차 증가됨을 알 수 있었다 (Table 1 과 Fig. 1).

수지상세포의 분포양상은 동물의 종에 따라 다르며 같은 기관일지라도 부위에 따라 다르다. McMenamin 등 (1994)은 성숙한 흰쥐, 마우스, 사람의 홍채와 모양체에 분포하는 MHC class II 면역반응성 수지상세포를 관찰한 결과 흰쥐 홍채의 경우 1 mm<sup>2</sup> 당 평균 400개가 존재하며 홍채의 기저부, 중간부, 가장자리에 따라 차이가 났다고 보고하였다. Schon-Hegrad 등 (1991)은 성숙한 흰쥐 (Wister)의 기관지 상피에 분포하는 MHC class II 면역반응성 수지상세포는 큰 기관지의 경우 1 mm<sup>2</sup>당 평균 600~800개, 작은 기관지의 경우 1 mm<sup>2</sup>당 평균 75개 정도였고 복부보다는 배부에서 그 수가 많다고 보고하였다. 이 연구에서 관찰한 MHC class II 면역 반응성 수지상세포는 다른 조직보다는 그 숫자가 훨씬 적었는데 이에 대한 보충적인 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

수지상세포는 두 가지의 형태학적인 특징을 가지고 있다. 첫째, 그 이름이 시사하는 바와 같이 불규칙한 모양의 세포로서, 가지돌기, 곤봉형돌기 및 판상돌기 등과 같은 다양한 형태의 많은 돌기들을 가지고 있고, 둘째, 독특한 세포내 섭취장치로서 세포내 섭취액포 (endocytic vacuoles)를 가지고 있다 (Le-

vine과 Chain 1993).

이 연구에서 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포는 전형적인 랑게르한스세포의 형태를 나타냈고, 연령이 높아짐에 따라 다양한 형태의 많은 세포질돌기가 형성되어 불규칙한 모습을 나타내었다. 이와 같은 형태변화는 수지상세포가 항원처리기능을 효율적으로 수행하기 위해 항원과 접촉할 수 있는 세포 표면적을 증가시키기 위한 방법 중의 하나라고 생각되며, 앞으로 이에 대한 연구도 시행해 볼 가치가 있다고 여겨진다.

## 참 고 문 헌

- Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N : Recent advances in dendritic cell biology. *Clin Immunol* 25: 177-188, 2005.
- Akasaka Y, Fujimoto J, Harigaya K, Enomoto Y, Watanabe Y, Hata J : Monoclonal antibody against bone marrow stromal cells its production and characterization. *Acta Pathologica Japonica* 41: 499-505, 1991.
- Bowers WE, Berkowitz MR : Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. *J Exp Med* 163: 872-883, 1986.
- Bronstein BR, Murphy GF, Harrist TJ, Ruiter DJ, Mihm MC, Bhan AK : Location of HLA-A, B, C antigens in dendritic cells of normal human skin : An immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* 80: 481-484, 1983.
- Crowley M, Inaba K, Steinman RM : Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* 172: 383-386, 1990.
- Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM : The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol* 118: 108-125, 1989.
- Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G : The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : Distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54: 589-599, 1985.
- Forrester JV, McMenamin PG, Holthouse I, Lumsden L, Liversidge J : Localization and characterization of major histocompatibility complex class II-immunoreactive cells in the posterior segment of the eye : Implications for induction of

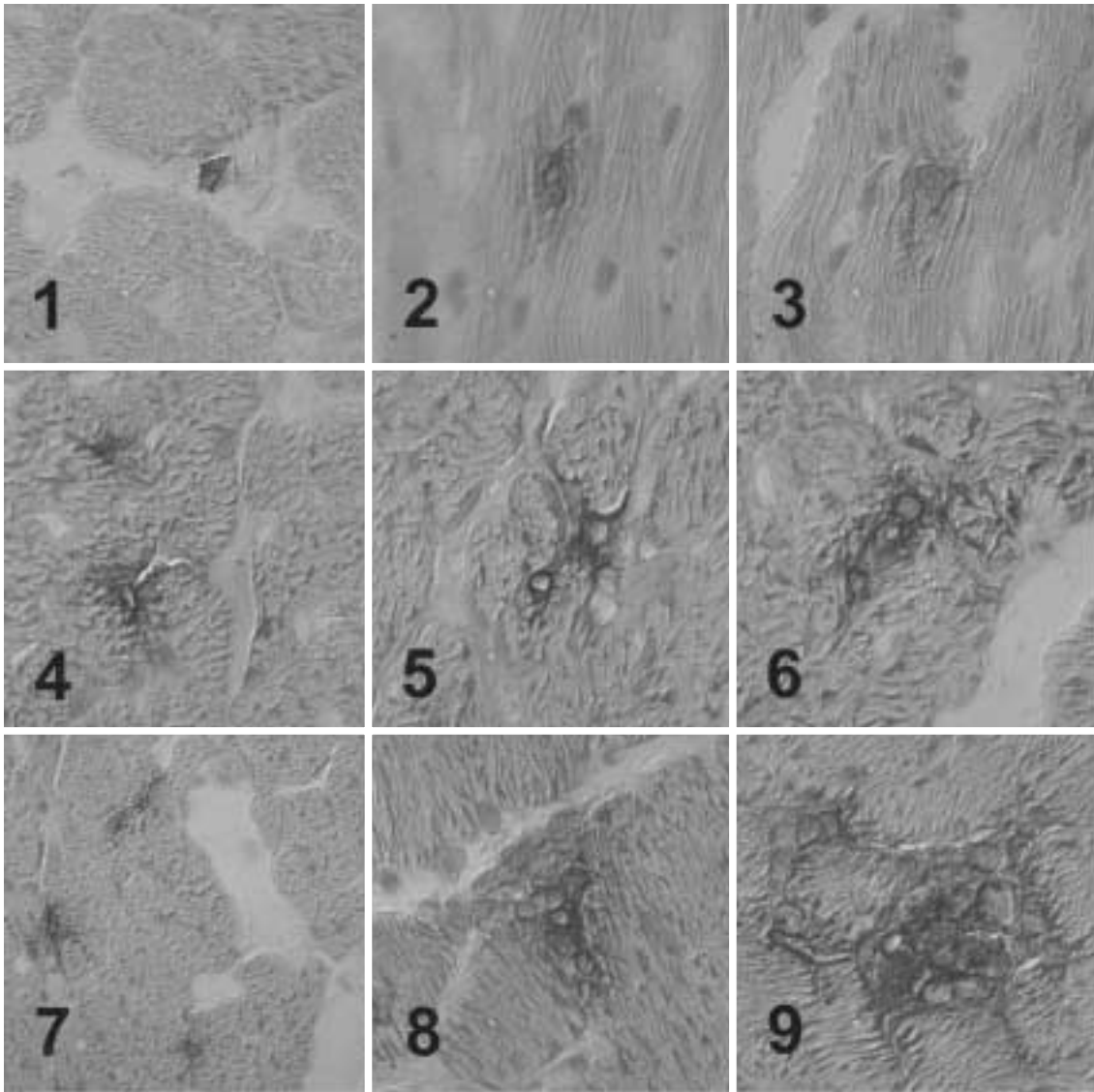
- autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 64-77, 1994.
- Hanson DG : Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. *J Immunol* 127: 1518-1524, 1981.
- Hart DNJ, McKenzie JL : Interstitial dendritic cells. *Intern Rev Immunol* 6: 127-138, 1990.
- Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM : Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci* 90: 3038-3042, 1993.
- Levine TP, Chain BM : Endocytic activity of dendritic cells is similar to other antigen presenting cells. *Adv Exp Med Biol* 329: 11-15, 1993.
- Lopez JA, Hart DN : Current issues in dendritic cell cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther* 4: 54-63, 2002.
- Lotze MT, Thomson AW : *Dendritic cells*, 2nd ed., San Diego, Academic Press, pp 3-11, 2000.
- Lu CY, Beller DI, Unanue ER : During ontogeny, Ia-bearing accessory cells are found early in the thymus but late in the spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1597-1601, 1980.
- McMaster WR, Williams AF : Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 9: 426-433, 1979.
- McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG : Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3234-3250, 1994.
- Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG : Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen(Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airway. *J Exp Med* 173: 1345-1356, 1991.
- Steinman RM, Cohn ZA : Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
- Steinman RM : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296, 1991.
- Tew JG, Thorbecke J, Steinman RM : Dendritic cells in the immune response : Characteristics and recommended nomenclature : A report from the Reticuloendothelial Society Committee on the Nomenclature. *J Reticuloendothel Soc* 31: 371-380, 1982.
- Yokoyama H, Kuwano S, Kohno K, Suzuki K, Kameya T, Izumi T : Cardiac dendritic cells and acute myocarditis in the human heart. *Jpn Circ J* 64: 57-64, 2000.

### Legends for Figures

- Fig. 1.** MHC class II-positive dendritic cell of 1 month old rat heart. A dendritic cell was appeared in this microscopic field. This dendritic cell had a oval nucleus and short cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 2.** MHC class II-positive dendritic cell of 1 month old rat heart. A dendritic cell had a oval nucleus and short cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 3.** MHC class II-positive dendritic cell of 1 month old rat heart. A dendritic cell was appeared in the longitudinal section of cardiac muscle. This dendritic cell had a oval nucleus and short cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 4.** MHC class II-positive dendritic cell of 12 months old rat heart. A dendritic cell was appeared in the cross section of cardiac muscle. This dendritic cell had a small nucleus and long cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 5.** MHC class II-positive dendritic cell of 12 months old rat heart. Two dendritic cells were appeared in this microscopic field. Dendritic cells had round nuclei and long cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 6.** MHC class II-positive dendritic cell of 12 months old rat heart. Three dendritic cells contacted each other were appeared in this microscopic field. Dendritic cells had round nuclei and long cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 7.** MHC class II-positive dendritic cell of 24 months old rat heart. Dendritic cells are contacted each other. Dendritic cells have round nuclei and long cytoplasmic processes. ×250.
- Fig. 8.** MHC class II-positive dendritic cell of 24 months old rat heart. Dendritic cells were contacted each other between muscle fibers. Dendritic cells had round nuclei and long cytoplasmic processes. ×400.
- Fig. 9.** MHC class II-positive dendritic cell of 24 months old rat heart. Dendritic cells were contacted each other in a muscle fiber. Dendritic cells had round nuclei and long cytoplasmic processes. ×400.

K C I

— 흰쥐 심장근육 수지상세포의 연령에 따른 변화 —



**Abstract**

## **Age-related Changes of MHC Class II Positive Dendritic Cells in Cardiac Muscle of Rat**

Cheol-Woo Kim, Ki-Soo Yoo<sup>1</sup>, Kang-Ryune Kim

*Department of Anatomy, College of Medicine, Kosin University*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy, College of Medicine, Dong-A University*

Cardiac dendritic cells are considered to play an important role in the immunoresponse of the heart. However, It is unknown that changes of shapes and numbers of these cells in the heart. The aim of this study is to reveal age-related changes of MHC class II positive dendritic cells in cardiac muscle of rat.

Male Sprague-Dawley rats (1 month, 12 months, and 24 months old) were used in this study.

Animals were deeply anesthetized with 3.5% chloral hydrate (1 mL/100 g) and hearts removed. Immunostaining was done according to standard methods used routinely. In brief, tissue sections were incubated with primary antibodies generated in mouse anti-rat MHC class II antibody for single immunostains. Tissue sections were observed by using light microscope and dendritic cells were counted.

Average numbers of MHC class II-positive dendritic cells were 1.4 cells per unit area (0.2 mm<sup>2</sup>) at 1 month old rat, 2.8 cells at 12 months old rat, and 4.6 cells at 24 months old rat, and then numbers of dendritic cells were increased according to ages. According as age increases, cytoplasmic processes of MHC class II-immunoreactive dendritic cells became longer and more complex and aggregated together.

It's suggested that age-related changes of MHC class II positive dendritic cells in the cardiac muscle would be related to immunity.

**Key words** : Dendritic cell, Cardiac muscle, Age, Rat