

포르말린 노출 후 흰쥐 자궁에서 나타나는 시크리토뉴린 면역반응신경의 염증반응

정정은, 유기수¹, 손창목¹, 정호석², 김형동², 길영기, 김강련

고신대학교 의과대학 해부학교실

¹동아대학교 의과대학 해부학교실

²동아대학교 의과대학 신경외과학교실

간추림 : 자궁목부위에는 화학주성을 갖고 있는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 이동성이 탁월한 항원제공세포인 major histocompatibility complex (MHC) class II 양성 면역반응 나뭇가지세포가 다수 분포한다고 알려져 있으나 그 관계성에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구자들은 정상적인 흰쥐의 자궁목부위에 분포하는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포의 분포를 관찰하였다. 또한 질을 통해 포르말린을 주입시켜 자궁목부위에 염증을 유발시킨 후 일어나는 변화를 파악하여 시크리토뉴린이 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포의 이동에 미치는 영향을 밝히고자 본 연구를 시행하였다. 성숙한 2개월 된 체중 약 200~250 g의 임신한 경험이 없는 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 20마리를 사용하였다. 실험군의 염증 유발은 흰쥐의 질을 통해 5% 포르말린용액을 구상주입기로 하루 0.5 ml씩 5일간 주입하였다. 흰쥐에 3.5% chloral hydrate (100 mg/kg)를 복강내 주사하여 마취시킨 후 자궁목부위를 절취하여 동결절편을 제작하였다. 동결절편에 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody 및 mouse anti-rat secretoneurin antibody를 이용하여 면역염색을 시킨 후 자궁목부위의 상피, 고유판 및 자궁근육층에서 나타난 양성 면역반응 세포들을 광학현미경 및 공초점 레이저 주사현미경으로 검경하였다. 정상 흰쥐의 자궁목부위에서 시크리토뉴린 양성 반응 신경섬유는 상피에는 없었고, 주로 고유판에 분포하였다. 정상 흰쥐의 자궁목부위에서 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포는 상피와 고유판에 주로 분포하였다. 염증상태에서 나뭇가지세포는 주로 고유판에서 발견되었고, 상피에서는 발견되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 보면 염증이 시크리토뉴린은 나뭇가지세포에게 화학주성 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되어진다.

찾아보기 낱말 : 시크리토뉴린, 나뭇가지세포, 자궁목부위, 포르말린, 흰쥐

서 론

시크리토뉴린(secretoneurin)은 33개의 아미노산으로 구성된 신경펩티드(neuropeptide)로서 중추신경계통, 말초신경계통 및 신경내분비계통에 광범위하게 분포한다고 알려져 있다(Wiedermann 2000). 시크리토뉴린은 실험관내에서 단핵구나 섬유모세

포, 그리고 민무늬근세포를 선택적으로 이동시키기 때문에 염증반응과도 관련이 있을 것으로 추측되어 왔다(Kahler 등 1997, Wiedermann 등 1999).

분만시 자궁목부위(uterine cervix)는 유사 염증반응을 일으켜 조직이 부드럽고 유연하게 변하는데 아직 근본적인 기전은 밝혀져 있지 않다. 그러나 자궁목부위에는 다수의 자율신경섬유와 감각신경들이 분포되어 있고 이 신경들이 신경성 염증반응과 관계가 있을 것으로 추측하고 있다. 최근 연구에 의하면 이 신경섬유들은 자궁목혈관이나 자궁

*이 연구는 고신대학교 의학부 연구비 일부 지원에 의해 이루어졌음.

correspondence to : 김강련 (고신대학교 의학부 해부학교실)

근육층에 분포하며 시크리토뉴린을 비롯하여 substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP) 및 nitric oxide synthase를 함유하고 있으며, 대부분이 직경이 작고, 무수신경섬유인 감각 C 신경섬유로 밝혀졌다. 그 중에도 최근 발견된 시크리토뉴린은 백혈구나 내피세포 및 중간엽세포(mesenchymal cell)를 조절하여 염증반응에 관여할 것으로 여겨지고 있다(Collins 등 2000).

말초신경에서 유리된 시크리토뉴린, CGRP, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), secretin과 같은 신경펩티드는 화학주성(chemotaxis)을 갖고 있어 염증부위에 나뭇가지세포(dendritic cell; DC)를 이주시킬 수 있을 것으로 예상하고 있다. 나뭇가지세포는 이동성이 탁월한 항원제공세포(antigen presenting cell)로서 다양한 조직과 림프기관에서 면역반응을 중재하는 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다(Dunzendorfer 등 2001).

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

근래에 나뭇가지세포에 존재하는 특이항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)가 개발되었으며, 이 중에서 MHC class II 항체는 나뭇가지세포의 세포표면에 존재하는 MHC class II Ia 항원을 감지하는 특성을 가지고 있어 조직내의 나뭇가지세포를 동정할 수 있게 되었다(McMaster와 Williams 1979, Dijkstra 등 1985).

나뭇가지세포는 사람의 자궁목부위에 풍부하며 임신말기와 출산시까지 면역계통을 활성화시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Stjernholm 등 2000). 이에 연구자들은 흰쥐의 자궁목부위를 포르말린에 노출시켜 인위적인 염증을 유발시킨 후 감각신경

에서 유리된 시크리토뉴린이 나뭇가지세포에 주는 영향을 면역조직화화학적 방법을 이용하여 시크리토뉴린이 염증반응에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험대상

실험동물로는 항온항습과 12시간마다 밤낮이 교체되고 고형사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 동일한 조건하에서 사육한 건강하고 성숙한 2개월 된 체중 200~250 g의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley 계) 20마리(정상군 10마리, 실험군 10마리)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 포르말린 투여

실험군의 염증 유발은 흰쥐의 질을 통해 5% 포르말린용액을 구상주입기(bulb syringe)로 하루 0.5 ml씩 5일간 주입하였고, 마지막으로 주입한 후 3일이 경과한 다음 동물을 희생시켰다.

2) 조직표본제작

흰쥐를 생리식염수에 녹인 3.5% chloral hydrate를 체중 100 g당 1 ml를 복강내주사하여 마취시킨 뒤 자궁목부위의 조직을 절취하였다. 절취한 조직은 즉시 gum tragacanth를 이용하여 콜크로 된 받침대에 접착시킨 후 액체질소에 의해 -160°C 로 냉각된 isopentane에 넣어 약 10초 동안 동결 고정하였다.

동결 고정된 조직편을 동결절편기(cryocut, Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 $6\mu\text{m}$ 두께의 조직절편을 만들고, 이들 절편을 poly-L-lysine coated slide 혹은 probe on slide에 부착시켰다. 이중 일부는 40°C 조직신전기(slide warmer)에서 40분간 충분히 말린 다음 아세톤(4°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°C)으로 고정된 후 -70°C 냉동기에 넣어 보관하였다.

3) 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(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분씩 3회 세척한 다음 5% 정상 말혈청(normal horse serum)에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어낸 다음 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody (희석비율 1 : 500, Serotec, UK) 및 mouse anti-rat secretoneurin antibody (희석비율 1 : 2,000, Fisher-Colbric Co., USA)를 4°C에서 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)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 Permount (Polysciences, USA)로 봉입하였다.

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

한편, 이중면역염색을 시행하기 위하여 조직절편을 -20°C acetone에서 10분간 고정시킨 후, 0.02

M PBS (pH 7.4)에서 약 10분씩 3회 수세한 후 5% normal goat serum에 30분간 두었다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 rabbit anti-rat secretoneurin (희석비율 1 : 2,000)을 4°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 일차항체 적용 후 PBS로 10분씩 3번 수세하였고, 이어서 이차항체인 goat anti-rabbit FITC (희석비율 1 : 100)를 처리한 후, 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이차항체 적용 후 PBS로 수세한 다음, 두 번째 면역형광염색을 하기 위해 다시 5% normal goat serum에 30분간 반응시켰다. 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody (희석비율 1 : 500, Serotec, UK)를 4°C에 16시간 이상 반응시킨 후, PBS로 수세한 다음 이차항체인 goat anti-mouse rhodamine (희석비율 1 : 100, Serotec, UK)을 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이중으로 면역조직 화학염색한 이들 조직을 PBS로 3회 세척한 뒤, Acquimount (Polysciences, USA)로 봉입하였다.

3. 검 경

흰쥐 자궁목부위의 상피, 고유판 및 자궁근육층에서 양성 면역반응을 일으킨 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포를 대상으로 광학현미경 및 공초점 레이저 주사현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope; LSM 510, Zeiss, Germany)으로 검경하였다.

결 과

정상적인 흰쥐의 자궁목부위에 분포하는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포의 형태 및 분포와, 질을 통해 포르말린을 주입시켜 염증을 유발시킨 후 일어나는 변화양상을 알아보기 위해 자궁목부위 냉동절편조직을 면역조직화학적 방법으로 염색한 다음 광학현미경 및 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상군

1) 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유의 분포
정상 흰쥐의 자궁목부위에서 갈색으로 염색된 다수의 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들이 주로 고유판에서 관찰되었다. 자궁근육층에서도 소수의 면역반응 신경섬유들이 발견되었지만, 상피에서는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들은 크기가 일정하지 않았으며, 염색성에서도 차이를 보였고, 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들은 주로 소구경의 혈관 주위를 둘러싸고 있었다(Fig. 2). 자궁근육층에서 발견된 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들은 무리를 지어 있는 경우가 많았다(Fig. 3).

2) MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포의 분포
정상 흰쥐의 자궁목부위에서 갈색으로 염색된 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포가 고유판과 상피에서 다수 관찰되었으며, 자궁근육층에서도 소수의 나뭇가지세포가 발견되었다(Fig. 4). 상피에 분포하는 나뭇가지세포들은 집단을 이루고 있는 경우가 많았고, 세포질돌기가 다수 있었다. 나뭇가지세포는 상피 보다 고유판에 더 많았으나, 세포크기는 고유판에 분포하는 세포가 상피에 분포하는 세포에 비하여 작았다(Fig. 5). 자궁근육층에서 관찰되는 나뭇가지세포의 크기는 상피나 고유판에 분포하는 세포에 비하여 작았고, 세포질 돌기도 적었다(Fig. 6).

3) 이중면역염색 소견

정상자궁목부위 조직을 이중면역염색하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰한 결과 상피에서 시크리토뉴린 양성 면역 신경은 관찰되지 않았으나 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포는 관찰되었다. 정상적인 흰쥐의 자궁목부위에서 나뭇가지 세포는 주로 상피와 상피밑층에 분포하였다(Fig. 7).

2. 실험군

1) 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유의 변화
포르말린으로 유도된 염증으로 인해 자궁목부위는 조직이 손상되었으나 소수의 시크리토뉴린 양

성 면역반응 신경섬유들이 고유판에서 관찰되었다. 신경섬유들은 결합조직섬유들 사이에 끼여 있는 경우가 많았다(Fig. 8). 그러나 일부 신경섬유들은 정상적인 형태를 갖추고 있었다(Fig. 9).

2) MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포의 변화
다수의 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포들이 고유판에서 관찰되었고, 자궁근육층에서도 소수의 나뭇가지세포가 발견되었으나, 상피에서는 관찰되지 않았다(Fig. 10). 고유판의 나뭇가지세포들은 염색성과 형태가 다양해졌으며, 손상이 적게 일어난 조직의 고유판에는 나뭇가지세포가 모여 있었고(Fig. 11), 혈관주위에 집단을 이루는 경우도 관찰되었다(Fig. 12). 일부 나뭇가지세포들은 결합조직섬유의 방향과 동일하게 배치되어 있었다(Fig. 13).

3) 이중면역염색 소견

포르말린에 노출시킨 자궁목부위 조직을 이중면역염색을 시행하여 공초점레이저현미경으로 관찰한 결과, 상피에서는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지 세포가 관찰되지 않았다. 그러나 고유판에서는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포가 관찰되었다(Fig. 14).

고 찰

최근 발견된 신경펩티드인 시크리토뉴린은 33개의 아미노산으로 구성되어 있으며, chromogranin A와 B로 형성된 전구물질인 secretogranin-II으로부터 생성되고(Fischer-Colbrie 등 1995), Glu3-Gln8와 Pro11-Gly25 잔류로 구성된 알파 나선구조를 하고 있다(Oulyadi 등 1997).

전구단백질(pro-protein)인 secretogranin-II는 흰쥐의 경우 배자기부터 나타나며(Leitner 등 1997, Saria 등 1997), 단백질 분해과정을 거쳐 유리 펩티드인 NS를 형성시키기 때문에 임신 13일부터 성체가 될 때까지 NS 양성 면역반응 세포의 수는 계

속 증가한다. 그러므로 본 연구에서 사용한 성숙한 흰쥐에는 적정 수의 NS 양성 면역반응 세포가 존재한다고 가정해도 타당할 것이다. 그리고 secretogranin-II의 단백질분해과정은 프로호르몬 전환효소(prohormone convertase; PC)-1과 PC-2에 의해 일어나는데 PC-1만이 활성화된 시크리토뉴린을 생성시킨다. 이런 이유 때문에 조직마다 특이한 PC가 존재할 것으로 추측하고 있다(Hoflehner 등 1995). 이 연구에서 정상 흰쥐의 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들이 주로 자궁목부위의 고유판에서 관찰되었고, 상피에서는 관찰되지 않았던 결과와도 관계가 있을 것으로 생각된다(Fig. 1).

시크리토뉴린은 중추신경계통에 광범위하게 분포한다고 알려져 왔다(Wiedermann 2000). Kirchmair 등(1994)은 정상적인 흰쥐의 구심성 C 신경섬유에 capsaicin을 처리하면 이 신경섬유의 신경체가 위치하는 척수의 흑색질(substantia nigra)에서 시크리토뉴린이 제거되므로 말초신경인 구심성 C 신경섬유에도 시크리토뉴린이 존재한다고 보고하였다. 그 밖에 흰쥐의 정관(Li 등 1998)이나 지라신경(Liang 등 1999)에서도 시크리토뉴린 신경섬유가 발견되었다. 한편, Collins 등(2000)은 흰쥐의 자궁과 자궁목부위에는 substance P와 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 함께 시크리토뉴린을 함유하고 있는 구심성 C 신경섬유가 분포하여 말초혈관확장, 모세혈관후 소정맥 투과성 및 염증반응 등에 관여할 것으로 추측하였고, 혈관세포들은 염증반응시 혈관주위신경에서 분비되는 신경펩티드의 영향을 받는다고 보고하였다. 이와 같은 보고들은 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유들이 소구경의 혈관 주위를 둘러싸고 있었던 본 실험결과(Fig. 2)와 일치하였다.

시크리토뉴린은 시험관 혹은 생체에서 피부 섬유세포나 단핵구의 이동에 관여한다고 보고되어 왔다(Kahler 등 1997). 골수의 단핵구에서 유래한 세포로 믿어지는 나뭇가지세포는 여러 종류로 분류될 수 있어도(Bowers와 Berkowitz 1986) 형태학적으로는 섬유세포와 유사하고, 기능적으로는 큰포식세포 및 림프구와 비슷한 점이 많다(Akasaka 등 1991). 나뭇가지세포는 항원제공기능 뿐만 아니

라, 염증반응과 시크리토뉴린과도 관련이 있을 것이라는 추측을 낳게 하고 있으며, 최근에는 나뭇가지세포를 이용하여 암치료 뿐만 아니라 암의 전이 문제까지 해결해 줄 가능성이 있는 면역치료법 연구가 세계적인 관심을 모으고 있다(Lopez와 Hart 2002).

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

국제 세망내피학회 용어위원회는 나뭇가지세포를 출현부위 및 세포막 특성에 따라 다음과 같은 3종류의 세포군으로 명명하여 분류하였다(Tew 등 1982). 첫째 세포군은 피부에 분포하는 랑게르한스 세포와 뇌를 제외한 대부분의 장기에 존재하는 나뭇가지세포로 간질나뭇가지세포라고 명명되었고, 둘째 세포군은 혈액 내에 있는 혈액나뭇가지세포와 림프 내에 존재하는 veiled cell과 같은 나뭇가지세포로 순환나뭇가지세포라고 명명되었으며, 셋째 세포군은 T세포지역 및 가슴샘 속질에 분포하는 깍지나뭇가지세포와 종자중심 내에 위치한 소포나뭇가지세포 등 림프기관 내에 존재하는 나뭇가지세포로 림프성나뭇가지세포라고 명명되었다. 따라서 나뭇가지세포는 신체 내 전 부위에 걸쳐 광범위하게 분포하면서 T세포에 항원을 제공하기 위해 특수하게 분화되어 있는 세포군이라고 할 수 있다(Lotze와 Thomson 2000).

이러한 나뭇가지세포들은 항원을 처리한 후 혈액이나 림프액을 통해 림프기관으로 이주해서 T세포에 항원을 제공하기 때문에 존재하는 부위에 관계없이 기능적으로 유사하다고 할 수 있다. 신체 내에서 나뭇가지세포들은 비록 분명한 계통을 이루고 있지만 각 장기, 미세환경조건, 발생단계 및 기능적 상태에 따라 다양한 표현형을 구성하며 복잡한 체계를 이루고 있다(Crowley 등 1989, Crowley 등 1990, Forrester 1994).

나뭇가지세포에 대한 지금까지의 연구는 대부분

이 *in vitro*에 국한되어 왔고, *in vivo* 연구는 빈약한 형편이다. 그리고 림프성나뭇가지세포에 대한 연구는 비교적 활발한 편(Hart와 McKenzie 1990, Inaba 등 1993, Inaba 등 1993)이나 피부의 랑게르한스세포를 제외한 다른 간질나뭇가지세포에 대한 연구는 부진한 실정이다.

이 연구에서 정상적인 흰쥐 자궁목부위의 상피에 있던 나뭇가지세포가 염증시에는 관찰되지 않는 것으로 보아(Fig. 9) 시크리토뉴린의 영향으로 고유판으로 이동한 것으로 생각되어진다. 그 근거로서 정상 자궁목부위에는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유가 다수 관찰되었기 때문이다(Figs. 1,2). 그리고 이중면역염색하여 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰한 결과 정상적인 자궁목부위의 상피에서는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유는 관찰되지 않았으나 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포는 상피와 고유판에 주로 분포하였는데(Fig. 7), 자궁목부위를 포르말린에 노출시킨 후 관찰한 결과 상피에서는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역 나뭇가지세포가 관찰되지 않았으나 고유판에서는 시크리토뉴린 양성 면역반응 신경섬유와 MHC class II 양성 면역반응 나뭇가지세포가 관찰되었기 때문에(Fig. 14) 염증시 시크리토뉴린은 나뭇가지세포를 이동시키는 데 관여했을 것으로 생각된다.

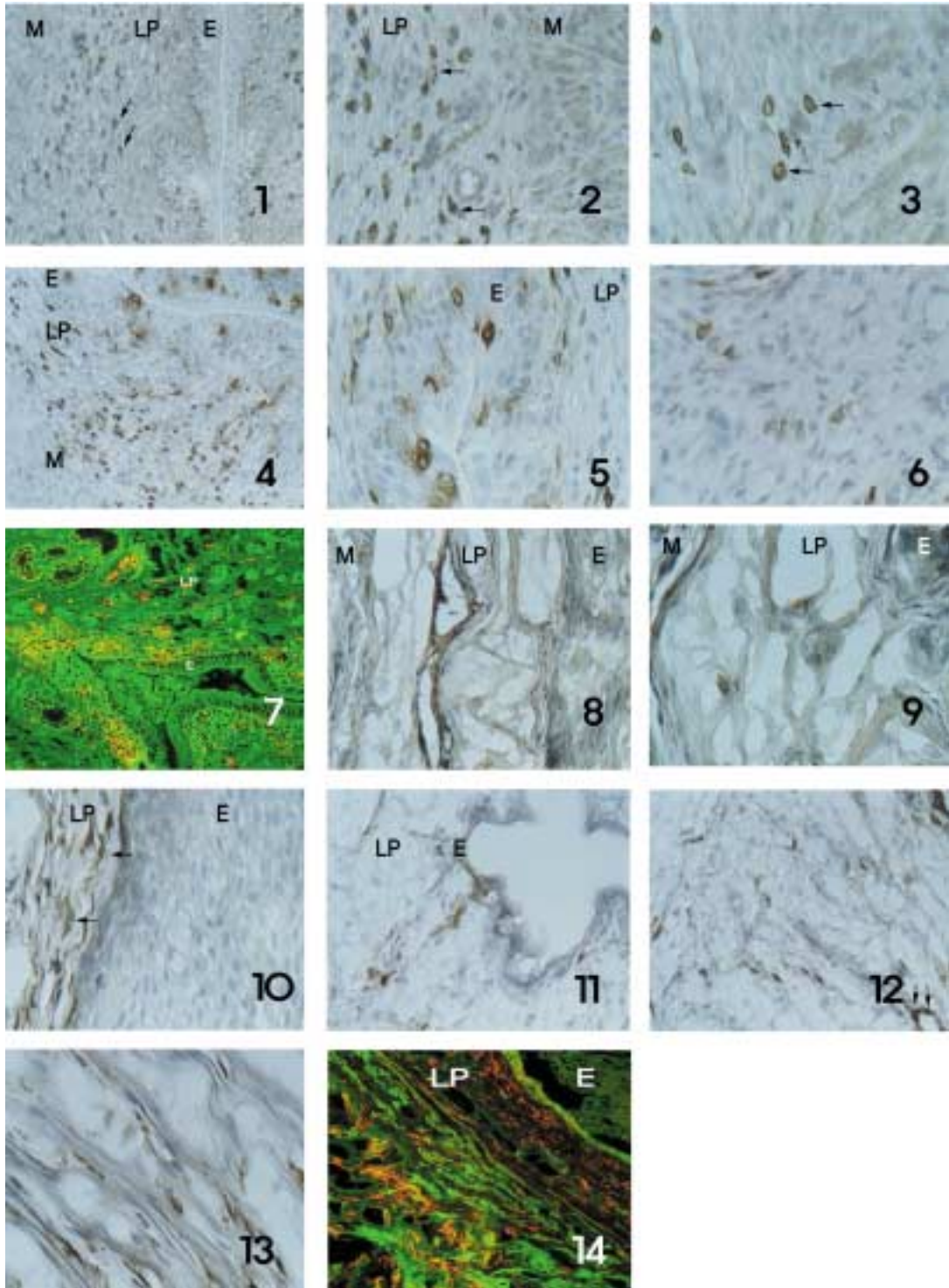
참 고 문 헌

- 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, Rutter 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.
- Collins JJ, Wilson K, Fischer-Colbrie R, Papka RE : Distribution and origin of secretoneurin-immunoreactive nerves in the female rat uterus. *Neuroscience* 95 : 255-264, 2000.
- 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 : 589-99, 1985.
- Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ : Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. *J Immunol* 166 : 2167-2172, 2001.
- Fischer-Colbrie R, Laslop A, Kirchmair R : Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol* 46 : 49-70, 1995.
- 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.
- Hart DNJ, McKenzie JL : Interstitial dendritic cells. *Intern Rev Immunol* 6 : 127-138, 1990.
- Hoflehner J, Eder U, Laslop A, Seidah NG, Fischer-Colbrie R, Winkler H : Processing of secretogranin II by prohormone convertases: importance of PC1 in generation of secretoneurin. *FEBS Lett* 1995 360 : 294-298, 1995.
- 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.
- Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM : Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus calmette-guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigen *in vivo*. *J Exp Med* 178 : 479-488, 1993.

- Kahler CM, Kirchmair R, Kaufmann G, Kahler ST, Reinisch N, Fischer-Colbrie R, Hogue-Angeletti R, Winkler H, Wiedermann CJ : Inhibition of proliferation and stimulation of migration of endothelial cells by secretoneurin in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 932-939, 1997.
- Kirchmair R, Marksteiner J, Troger J, Mahata SK, Mahata M, Donnerer J, Amann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Saria A : Human and rat primary C-fibre afferents store and release secretoneurin, a novel neuropeptide. *Eur J Neurosci* 6 : 861-868, 1994.
- Leitner B, Kaufmann WA, Marksteiner J, Hoflehner J, Traurig H, Saria A, Fischer-Colbrie R, Winkler H : Ontogenic development of secretogranin II and of its processing to secretoneurin in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 100 : 161-168, 1997.
- Li JY, Leitner B, Winkler H, Dahlstrom A : Distribution of chromogranins A and B and secretogranin II (secretoneurin) in rat pelvic neurons and vas deferens. *Neuroscience* 84 : 281-294, 1998.
- Liang F, Li JY, Lovisetti-Scamihorn P, Coen E, Depreitere J, Claeys M, Wechsung E, Dahlstrom A, Winkler H, De Potter WP : The processing of secretogranin II in the peripheral nervous system: release of secretoneurin from porcine sympathetic nerve terminals. *Brain Res* 818 : 459-467, 1999.
- 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.
- McMaster WR, Williams AF : Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 9 : 426-433, 1979.
- Oulyadi H, Davoust D, Vaudry H : A determination of the solution conformation of secretoneurin, a neuropeptide originating from the processing of secretogranin II, by 1H-NMR and restrained molecular dynamics. *Eur J Biochem* 246 : 665-673, 1997.
- Saria A, Kaufmann WA, Marksteiner J, Leitner B, Traurig H, Fischer-Colbrie R, Winkler H : Distribution and processing of secretoneurin in the developing rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 814 : 90-96, 1997.
- 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.
- Stjernholm Y, Sennstrom M, Granstrom L, Ekman G, Liang Y, Johansson O : Neurochemical and cellular markers in human cervix of late pregnant, postpartal and non-pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79 : 528-537, 2000.
- 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.
- Wiedermann CJ, Dunzendorfer S, Kahler CM, Reinisch N, Schratzberger P : Secretoneurin and neurogenic inflammation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20 : 789-794, 1999.
- Wiedermann CJ : Secretoneurin: a functional neuropeptide in health and disease. *Peptides* 21 : 1289-1298, 2000.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers (arrows) in cryostat section of the uterine cervix. Note that numerous secretoneurin-immunoreactive nerve fibers were scattered in the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria; M, myometrium. $\times 250$.
- Fig. 2.** Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers (arrows) were associated with small vessels. LP, lamina propria; M, myometrium. $\times 640$.
- Fig. 3.** Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers (arrows) in the myometrium of the uterine cervix. $\times 640$.
- Fig. 4.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells in cryostat section of the uterine cervix. Note that numerous MHC class II-immunoreactive dendritic cells were scattered in the epithelium and the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria; M, myometrium. $\times 250$.
- Fig. 5.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the epithelium of the uterine cervix. Note that numerous MHC class II-immunoreactive dendritic cells were scattered in the epithelium. E, epithelium; LP, lamina propria. $\times 640$.
- Fig. 6.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the myometrium of the uterine cervix. Note that a few MHC class II-immunoreactive dendritic cells were located in the myometrium. $\times 640$.
- Fig. 7.** Confocal laser scanning microscopic photograph of normal rat uterine cervix. Numerous secretoneurin-immunoreactive nerve fibers (green) were located in the lamina propria (LP) and were not found in the epithelium (E). MHC class II-immunoreactive dendritic cells (red) were mainly located in the epithelium and the lamina propria (LP). Double immunostain; Secretoneurin (FITC, green), MHC class II (rhodamine, red). $\times 320$.
- Fig. 8.** Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers in cryostat section of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers were found in the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria; M, myometrium. $\times 320$.
- Fig. 9.** Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers in cryostat section of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. Secretoneurin-immunoreactive nerve fibers were found in the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria; M, myometrium. $\times 640$.
- Fig. 10.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells (arrows) in the lamina propria of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. Note that MHC class II-immunoreactive dendritic cells were not found in the epithelium. E, epithelium; LP, lamina propria. $\times 640$.
- Fig. 11.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the lamina propria of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. Note that MHC class II-immunoreactive dendritic cells were found in the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria. $\times 250$.
- Fig. 12.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the lamina propria of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. Note that MHC class II-immunoreactive dendritic cells (arrows) were found around blood vessel. $\times 320$.
- Fig. 13.** MHC class II-immunoreactive dendritic cells (arrows) in the myometrium of the uterine cervix after formalin-induced inflammation. $\times 640$.
- Fig. 14.** Confocal laser scanning microscopic photograph of formalin exposed rat uterine cervix. Numerous secretoneurin-immunoreactive nerve fibers (green) and MHC class II-immunoreactive dendritic cells (red) were mainly located in the lamina propria. E, epithelium; LP, lamina propria. Double immunostain; Secretoneurin (FITC, green), MHC class II (rhodamine, red). $\times 320$.



Abstract

Inflammatory Response of Secretoneurin–Immunoreactive Nerves in the Rat Uterus after Formalin Exposure

Jung Eun Jung, Ki Soo Yoo¹, Chang Mok Son¹, Ho Suk Jung²,
Hyung Dong Kim², Young Gi Gil, Kang Ryune Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea*

²*Department of Neurosurgery, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea*

It is known that there are numerous chemotactic secretoneurin–immunoreactive nerve fibers and movable MHC class II–immunoreactive dendritic cells in the normal uterine cervix. And the relationships between them are not fully understood.

The aim of this study is to reveal that secretoneurin could give to chemotactic influence to dendritic cells in inflammatory state.

Virgin female Sprague–Dawley rats (n = 20; approximately 2 months old; 200–250 g body weight) were used in this study. Animals (n = 10) were injected with 5% formalin (0.5 ml/day, 5 days) in experiment group.

Animals were deeply anesthetized with 3.5% chloral hydrate (100 mg/kg, i.p.) and uterine cervix were 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 and mouse or rabbit anti–rat secretoneurin antibody for single and double immunostains. FITC for secretoneurin and rhodamine for MHC class II were used as secondary antibodies in double stains. Tissue sections were observed by using light and confocal laser scanning microscopes.

The results were as follows;

1. Numerous secretoneurin–immunoreactive nerve fibers were located in the lamina propria and those were not found in the epithelium of normal rat uterine cervix.
2. MHC class II–immunoreactive dendritic cells were mainly located in the epithelium and the lamina propria of normal rat uterine cervix.
3. On the inflammation state, MHC class II–immunoreactive dendritic cells were mainly located in the lamina propria and those were not found in the epithelium of rat uterine cervix.

According to above results, it is suggested that secretoneurin can give to chemotactic influence to dendritic cells in inflammatory state. Therefore, secretoneurin is considered to be used for dendritic cell immunotherapy.

Key words : Secretoneurin, Dendritic cell, Uterine cervix, Rat