

Rat 비장에서 MT1과 MB2 항체의 양성반응세포 분포

곽수동 · 고희옥 · 김종섭

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소
(1998년 4월 15일 접수)

Distribution of positive cells by two monoclonal antibodies (MT1, MB2) in rat spleens

Soo-dong Kwak, Phil-ok Koh, Chong-sup Kim

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received April 15, 1998)

Abstracts : This study was designed to investigate the distributions of the positive cells in rat spleens by two monoclonal antibodies of MT1 and MB2. The spleens of immature 10 rats (Sprague Duwely, approximately 200gm) were collected and paraffin-embedded sections of spleens were stained with immunohistochemical methods. Higher proportions of MT1-positive cell number in spleens were ordered as marginal zone(8.5~18.1%), red pulp(2.1~8.8%) and periarterial lymphoid sheath(0~1.6%) in white pulp, and those of MB2-positive cell number are ordered as the central area of the periarterial lymphoid sheath(100%), red pulp(29.1~45.0%), marginal zone(15.2~30.4%), and peripheral area of periarterial lymphoid sheath(2.3~3.5%). The positive cells by MB2 are more numerous in number than by MT1.

The above results were concluded that the positive cells by above two monoclonal antibodies were scattered throughout the red pulp and marginal zone, but in the central area of the periarterial lymphoid sheath, the MB2-positive cells only were present.

Key words : MT1, MB2, Immuno stain, spleen, rat.

서론

동물개체의 방어기능을 맡고 있는 림프기관은 연령에

따라 조기에 퇴축하거나 그 기능이 계속되면서 림프구를 생산하고 있고, 림프구는 처음 생산된 1차 림프기관인 흉선이나 골수 등의 생산기원에 따라 기능과 형태가 다른 T-cell 또는 B-cell로 구별하게 되고, 이들 림프구는

이 논문은 1996년도 한국과학재단의 특정기초연구과제(96-04-02-11-01-3)에 의한 과제를 수행중에 부수적으로 수행되었습니다.

Address reprint requests to Dr. Soo-dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

2차 림프기관에 가서 증식과 분화가 계속되어 다른 조직과 혈액내로 공급되게 된다. 혈액내서는 T-cells은 전 림프구 중에 70~75%를, B-cells은 10~12%를 점유하고 있다고 하며, 조직내 분포에 대하여도 보고자에 따라 또 조건에 따라 분포부위가 다르다. 이 두 종의 세포가 혼재하기도 하나 같은 장기에서도 조직내 일정한 분포부위가 있다고 하였다^{4,13}.

이들 두 종의 림프구들의 상호구별은 조직내 분포부위의 조사 림프종에 대한 분류 등으로 림프기관의 종양 연구에 기본자료가 되며 면역효과 연구, 암치료의 연구 등에 중요한 자료가 된다¹⁴⁻¹⁸.

그러나 종래의 광학현미경적 방법으로는 이들 세포들의 상호구별이 불가능하였으나 면역조직화학적 방법이 발달됨에 따라 이 두 종을 구별하기 위한 여러종의 단클론 항체(monoclonal antibody)가 소개되었다. 그 예로 T-cell 항체로는 UCHL1, MT1, Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, Lyt-3, T1, T3, T4, T8 등^{4,7,13,16,17,19}을, B-cell 항체로는 MB1, MB2, LN1, LN2, L26 등^{11,15,17}을 이용하여 조사보고한 바 있다. 그러나 이 두 림프구를 구별하는 단클론 항체는 다른 종의 세포들과 교차반응이 많다.

최근 여러회사에서 상업용으로 소개되고 있는 T-cell과 B-cell의 항체는 몇종의 다른 세포도 양성반응을 나타낸다고 제시되어 있고 이들 항체를 이용한 연구자들의 대부분도 다른 세포들에도 교차반응이 있는 것으로 보고 하였을 뿐 아니라 또 보고자에 따라 부위별 양성반응 세포의 분포부위나 분포율의 차이가 많고 같은 종의 세포에서도 성숙정도에 따라 반응여부와 염색성 강도의 차이가 다르다고 한다^{4,12,16,20}.

본 연구는 모 외국회사에서 T-cell 항체로 판매하고 있는 MT1과 B-cell 항체로 판매하고 있는 MB2를 이용하여 랫드의 비장에서 이들 두 항체에 대한 양성반응세포의 분포를 조사하고 그 결과를 상호비교하였던 바를 보고코자 한다.

재료 및 방법

임신경력이 없는 성숙단계의 랫드 암컷(Sprague-Dawley, 190~230gm)을 에테르로 마취하여 4% NBP(neutral buffered paraformaldehyde)로 관류하고 개복하여 비장을 채취한 후 10% 중성 포르마린액으로 재고정하여 5~6 μ m 정도의 두께로 파라핀 절편을 만들었다. 면역조직화학적

방법으로 peroxidase antiperoxidase(PAP) 법과 avidin biotin peroxidase complex(ABC) 법을 실시하였다. 면역염색에서 1차 항체는 T-cell을 위한 단클론 항체인 MT1(monoclonal antibody MT1, BioGenex Lab)와 B-cell을 위한 단클론 항체인 MB2(monoclonal antibody MB2, Bio Genex Lab)를 각각 1:50~100으로 희석하여 사용하였다. 이 두 항체에 대한 2차 항체는 1:50~1:100으로 희석한 goat anti-mouse IgG(Sigma)를, 3차 항체는 mouse PAP(Sigma)를 각각 1:50~100배액으로 희석하여 사용하거나 또는 2차 항체부터는 Vectastain elite ABC kit(Vector Lab)를 사용한 후, 발색제는 DAB substrate kit(Vector Lab)만을 사용하거나 또는 nickel chloride를 가하여 사용하여 발색토록 한후 hematoxylin으로 대조염색을 하여 황갈색 또는 흑색으로 발색된 세포를 양성반응세포로 하거나 alkaline phosphate를 이용하여 심홍색으로 염색되는 세포를 양성반응세포로 하여 그 비율을 접안 미측격자(ocular grid, 500 \times 500 μ m)를 사용하여 400배 확대하에서 각 부위별로 10개 부위 이상을 대상으로 하여 분포양상을 조사하였다.

결 과

상업용으로 판매되고 있는 T-cell 규명의 단클론 항체인 MT1 항체와 B-cell의 규명 단클론 항체인 MB2 항체를 이용하여 랫드의 비장조직을 백색수의 혈관주위 림프조직(혈관주위 림프초, periarterial lymphoid sheath)과 적색수와 백색수의 경계인 주연대(marginal zone) 및 적색수의 3부위로 구분하여 면역조직화학적 방법으로 전체의 세포중에 두 항체에 대한 양성반응세포수의 비율을 조사한 바, MT1 항체의 양성반응세포의 분포는 백색수는 혈관주위 림프조직(periarterial lymphoid sheath)과 림프소절에서는 0%에서 1.6% 범위로 낮은 비율로 나타났고, 주연대에서는 8.5%에서 18.1%로 이 평균은 12.0%였고, 적색수내서는 2.1%에서 8.8%의 범위로 이 평균은 5.2%였다. 그러므로 주연대, 적색수, 백색수 순으로 많이 분포하였다. 양성반응을 나타내는 세포핵의 형태는 크기가 균일한 경향이였다(Fig 1-4).

MB2 항체의 양성반응세포의 분포부위는 백색수의 혈관주위에서는 염색성은 다소 약하였으나 거의 100% 전체의 세포가 염색되었고, 백색수 주변부는 2.3%에서 3.5%로 극소수가 염색되었고, 주연대에서는 15.2%에서 30.4%의 범위로 이 평균은 25.2%였고, 적색수에서는 29.1%에

서 42.8%의 범위로 이 평균은 35.4% 였다. 그러므로 백색수의 중심부, 적색수, 주연대, 백색수의 주변부 순으로 많이 분포하고 있었고, MT1 항체에 대한 양성반응세포보다 MB2 항체에 대한 양성반응세포의 분포비율이 높았다. 양성반응을 나타내는 세포핵의 형태는 MT1 항체에 대한 양성반응을 나타내는 세포의 핵의 형태보다 크기가 더 불균일한 경향이였다(Fig 5, 6).

이상에서 혈관주위 림프조직에서 MB2 항체의 양성반응세포만의 분포를 제외하고는 두 종의 양성반응세포는 비장의 모든 부위에서 혼합되어 존재하였고, MB2 항체에 대한 양성반응세포의 수는 MT1 양성반응세포보다도 그 비율이 높았고, 백색수의 혈관주위 림프조직과 림프소절에서는 MT1의 양성반응세포는 소수가 나타났고, MB2는 혈관주위 림프조직에서는 거의 나타나지 않았다.

고 찰

T-cell과 B-cell의 분포에 관하여서는 대상동물과 이용한 항체, 보고자에 따라 차이가 많았다. 여러 보고를 요약해보면 T-cell이 많이 분포하는 부위는 림프절의 부피질부⁴, 편도의 소절간^{3,4} 비장의 백색수 혈관주위^{3,4,20}, 림프절의 림프소절의 외투대⁴와 림프소절간^{3,4}이라고 하였고, B-cell이 많이 분포하는 부위는 림프절의 림프소절내^{4,9,13}와 2차 림프소절의 외투대^{4,11}, 백색수 주연대²⁰라고 하였다.

Poppema *et al*²⁰는 mouse 비장에서 본 조사와 같은 종의 항체인 MT1 항체를 이용하여 조사한 바 양성반응세포는 주연대에는 나타나지 않았고, 백색수 혈관주위 림프조직에 나타났고, MB2 양성반응세포는 백색수 주연대에 많았고, 혈관주위 림프조직에는 낮은 비율로 나타났다고 하였다.

Ng *et al*¹¹은 MB2는 사람의 비장에 종자중심(배아중심)과 그 외투대는 50% 이상 세포가 강한 양성반응을 나타내었고, 백색수의 혈관주위 림프조직에는 1~10%의 세포가 강한 양성반응을 보였다고 하였다.

본 조사에서는 T-cell의 규명항체인 MT1의 양성반응세포가 많이 분포한 순서는 백색수의 주연대(8.5%~18.1%)와 적색수(2.1%~8.8%)에서는 높은 비율로 분포하였고, 백색수의 혈관주위 림프조직과 림프소절(0~1.6%)에서는 낮은 비율로 분포하여 Poppema *et al*²⁰의 mouse 비장에서의 분포보고와는 상이한 결과였다.

B-cell의 규명항체인 MB2의 양성반응세포는 백색수의 중심인 혈관주위 림프조직의 중심부위에서는 거의 100%의 세포가 양성반응을 나타내었고, 백색수에 주변부에서는 2.3%~3.5% 정도가 양성반응을 나타내었다. 다시 MB2의 양성반응세포는 주연대(15.2%~30.4%)에서 부터 증가되었고, 적색수(29.1%~45.0%) 부위로 갈수록 더 많이 분포하는 경향이 였다. 이러한 소견은 Ng *et al*¹¹의 사람의 비장에서의 보고와 같은 순서이나 약간 낮은 수준이었다.

MT1과 MB2가 T-cell과 B-cell외의 다른 종의 세포에 반응에 관하여는 Bhan *et al*⁴는 T-cell을 증명하는 단클론항체인 T10은 사람의 림프절에서 휴지상태의 T-cell 이외에 B-cell, 형질세포(plasma cell) 및 단핵구(monocyte)도 반응한다고 하였다. 본 실험에 이용한 MT1도 T-cell 이외에 흉선세포(thymocyte), 단핵구, 대식세포(macrophage), 상피의 Langerhans cell, 적혈구 전구세포(erythrocyte precursor), Kupffer cell 및 골수성 세포(myeloid cell) 등에 양성반응을 나타낸다고 제조회사에서 제시하였고, MB2에 대하여도 제조회사와 Poppema *et al*²⁰는 B-cell에 유래된 형질세포(plasma cell)는 반응하지 않으나 B-cell과 내피세포(endothelial cell) 및 상피세포(epithelial cell)도 양성반응을 나타낸다고 하였다. 그러므로 비장에서는 이들 양성반응세포 중에 MB2에 의한 양성반응세포는 내피세포가 포함되어 적색수내 여러 부위에서 나타나고 형태가 다양하게 되었고, MT1에 의한 양성반응세포는 단핵구와 대식세포가 여러 부위에 특히 적색수내에 많이 함유하고 있어 수가 증가된 것으로 생각된다. Ng *et al*¹¹은 MB2는 사람의 림프종에서 B-cell의 88.4%가 반응하고 T-cell의 18.2%가 교차반응을 한다고 하였다. Pappema *et al*²⁰은 MT1과 MB2는 200kd 정도의 분자량을 가진 항원과 반응하므로 어떤 성숙단계의 T-cell과 B-cell과는 서로 반응한다고 하였다. 본 조사에서도 이 두 항체의 양성반응세포의 분포부위가 중복되고 있으므로 위의 다른 세포는 물론 두 종의 임프구도 교차반응을 나타내는 경우가 있을 것으로 생각된다. 그래서 두 종의 항체에 의한 T-cell과 B-cell의 본래의 수 보다는 다소 많았을 것으로 생각된다.

결 론

상업용으로 판매되고 있는 T-cell 규명의 단클론 항체

인 MT1 항체와 B-cell의 규명 단클론 항체인 MB2 항체를 이용하여 랫드의 비장조직에서 면역조직화학적 방법으로 두 항체에 대한 양성반응세포의 분포를 조사한 바, MT1 양성반응세포는 백색수의 주연대(8.5~18.1%), 적색수(2.1~8.8%), 백색수의 혈관주위 림프조직(0%~1.6%) 순이었고, MB2 항체의 양성반응세포의 분포율은 백색수 내 혈관주위 림프조직의 중심부(100%), 적색수(29.1%~

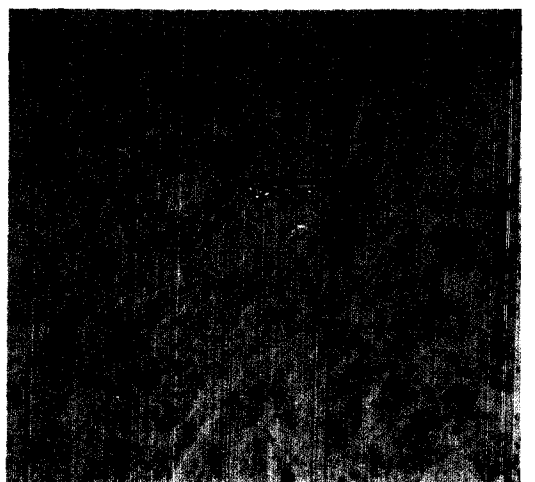
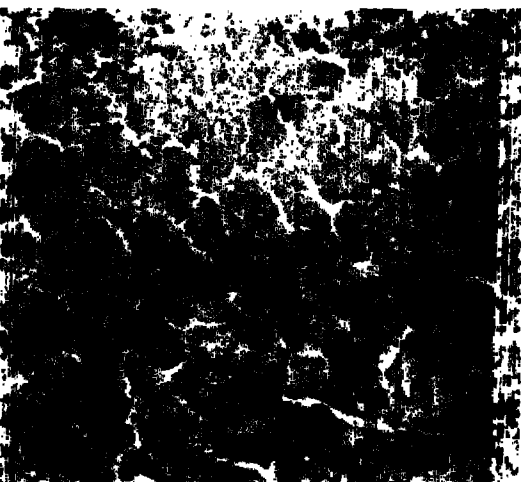
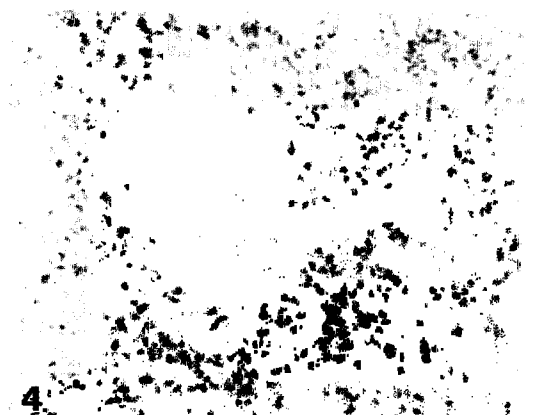
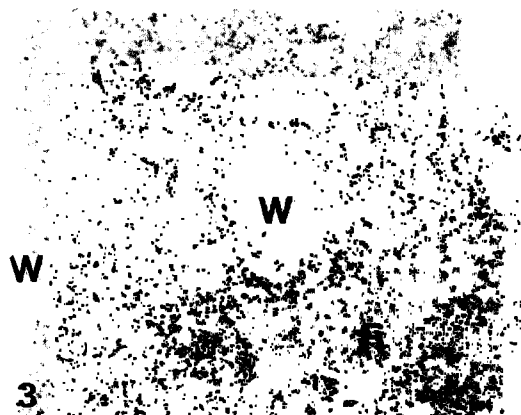
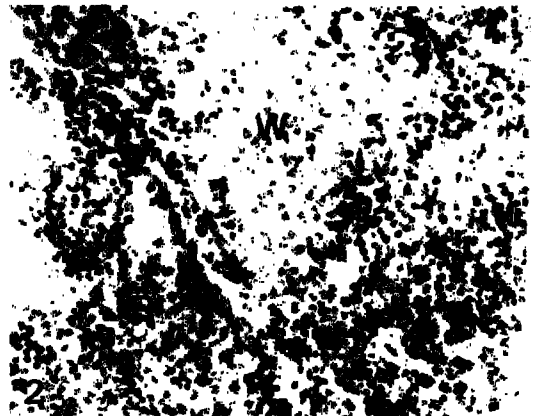
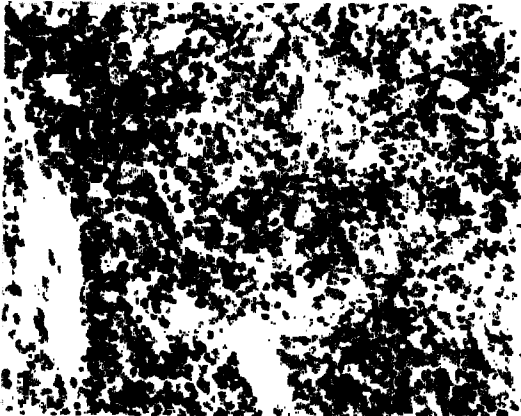
45.0%), 주연대(15.2%~30.4%), 백색수의 주변부(2.3~3.5%) 순으로 두 양성반응세포의 분포는 주연대와 적색수에서 많았고 혼재되어 있었으며, MT1 항체의 양성반응세포보다 MB2 항체의 양성반응세포 수가 더 많았고, 백색수의 혈관주위 림프조직의 중심부는 MB2 항체의 양성반응세포로 되고, MT1 항체의 양성반응세포는 그 주변부에 극소수가 나타났다.

Legends for figures

- Fig 1. Many MT1-positive cells are seen in red pulps of rat spleen. Immunohistochemical stain. X 100.
- Fig 2. Many MT1-positive cells are seen in red pulp(R) of rat spleen, but a small number are seen in periarterial lymphoid sheath(W). Immunohistochemical stain. X 100.
- Fig 3. Many MT1-positive cells are seen in the red pulp(R) of rat spleen, but a small number are seen in periarterial lymphoid sheath (W). These all positive cells are stained with black colour by nickel chloride. Immunohistochemical stain. X 50.
- Fig 4. Higher magnification of central area in Fig 3. Immunohistochemical stain. X 100.
- Fig 5. Many MB2-positive cells are seen in red pulp(R) of rat spleen, but are not seen in peripheral area(W) of periarterial lymphoid sheath. Immunohistochemical stain. X 100.
- Fig 6. Many MB2-positive cells are seen in red pulp(R) of rat spleen and much more number of MT1-positive cells with weak staining intensity are seen in the central area(arrow) of periarterial lymphoid sheath(W). These positive cells are stained with scarlet colour by alkaline phosphate. Immunohistochemical stain. X 100.

참고 문헌

1. Alders RG, Sheldon JN. Lymphocyte subpopulations in lymph and blood draining from the uterus and ovary in sheep. *J Reprod Immuno*, 17:27-40, 1990.
2. Aleksandersen M, Hein WP, et al. Distribution of lymphocytes subsets in large intestine lymphoid follicles of lambs. *Immunology*, 70:391-397, 1990.
3. Beya MF, Miyasaka M, et al. Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep two monoclonal antibodies that recognize all ovine T lymphocytes. *Immunology*, 57:115-121, 1986.
4. Bhan AK, Nadler LM, et al. Stages of B-cell differentiation in human lymphoid tissue. *J Exp Med*, 154:737-749, 1981.
5. Cartun RW, Bruce Coles E, et al. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. *Am J Pathol*, 129:415-421, 1987.
6. Chen K, Demetris AJ, et al. Methods in laboratory investigation. Double immunoenzyme staining method for analysis of tissue and blood lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Laboratory Investigation*, 56:114-119, 1987.
7. Clark JR, Williams ME, et al. Detection of B- and T-cells in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Clin Pathol*, 93:58-69, 1990.
8. Dvoretzky P, Wood GS, et al. T-lymphocyte subsets in follicular lymphomas compared with those in non-



- neoplastic lymph nodes and tonsils. *Hum Pathol*, 13: 618-625, 1982.
9. Hsu SM, Zhang HZ, *et al.* Utility of monoclonal antibodies directed against B and T lymphocytes and monocytes in paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol*, 80:415-420, 1983.
 10. Khan SM, Cottrell BJ, *et al.* T-cell-rich B-cell lymphoma presenting as liver disease. *Histopatholgy*, 23: 217-223, 1993.
 11. Ng CS, Chan JKC, *et al.* Critical assessment of four monoclonal antibodies reactive with B-cell in formaline-fixed paraffine-embedded tissues. *Histopatholgy*, 11:1243-1258, 1987.
 12. Norton AJ, Isaacson PG. An immunocytochemical study of T-cell lymphomas using monoclonal and polyclonal antibodies effective in routinely fixed wax embedded tissues. *Histopatholgy*, 10:1243-1260, 1986.
 13. van Ewijk W, Soest PL, *et al.* Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies to the antigens THY-1, LYT-1, LYT-2, and T-200. *Journal Immunology*, 127:2594-2604, 1981.
 14. Korkolpopoulou P, Oates J, *et al.* p53, c-myc p62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non- Hodgkin' lymphomas. *J Clin Pathol*, 47:9-14, 1994.
 15. Ng CS, Chan JKC, *et al.* Large B-cell lymphomas with a high content of reactive T-cells. *Hum Pathol*, 20:1145-1154, 1989.
 16. Norton AJ, Ramsay AD, *et al.* Monoclonal antibody (UCHL1) that recognises normal and neoplastic T-cells in routinely fixed tissues. *J Clin Pathol*, 39:399-405, 1986.
 17. Norton AJ, Ramsay AD, *et al.* Monoclonal antibody (UCHL1) that recognises normal and neoplastic T-cells in routinely fixed tissues. *J Clin Pathol*, 39:399-405, 1986.
 18. Park YN, Yang WI, *et al.* Histopathological and immunohistochemical studies of polymorphic reticulosis. *Yonsei Medical Journal*, 31:212-218, 1990.
 19. Ledbetter JA, Rouse RT, *et al.* T-cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. *J Exp Med*, 152:280-295, 1980.
 20. Poppema S, Hollema H, *et al.* Monoclonal antibodies (MT1, MT2, MB1, MB2, MB3) Reactive with leukocyte subsets in paraffin-embedded tissue secutions. *Am J Pathol*, 127:418-426, 1987.