

<원 저>

자가면역성 뇌척수염을 유도한 C57BL/6 마우스 큰포식세포에서의 Galectin-3의 과발현

김대승¹ · 황인선¹ · 박석재¹ · 안긴내² · 박상준³ · 박현정¹ · 주홍구¹ · 지영훈^{1,*}

¹제주대학교 수의과대학 수의학과, ²해양과학대학 해양생명과학과, ³경북대학교 수의과대학 수의학과
(게재승인: 2011년 3월 14일)

Overexpression of Galectin-3 in Macrophages of C57BL/6 mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Dae Seung Kim¹, Insun Hwang¹, Suk-jae Park¹, Ginnae Ahn², Sang-Joon Park³,
Hyun Jeong Park¹, Hong-Gu Joo¹, Youngheun Jee^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, and ²Faculty of Marine life science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Accepted: March 14, 2011)

Abstract : Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an inflammatory disease in the murine central nervous system (CNS) and has long been used as an animal model for human multiple sclerosis. Development of EAE requires coordinated expression of a number of genes that are involved in the activation and effector functions of inflammatory cells. Galectin-3 (Gal-3) is a member of the beta-galactoside-binding lectin family and plays an important role in inflammatory responses through its functions on cell activation, cell migration or inhibition of apoptosis. We investigated the functional role of Gal-3 in EAE mice following immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ peptide. During the peak stage of EAE, the localization of Gal-3 in inflammatory cells markedly increased in subarachnoid membranes and perivascular regions of CNS. In contrast, Gal-3 was weakly detected in cerebrum and spinal of the recovery stage of EAE. Consistent with this finding, western blot analysis revealed that Gal-3 expression was significantly increased at the peak stage while it was slightly decreased at the recovery stage in the CNS. In addition, the population of CD11b⁺ macrophage expressing Gal-3 in spleen of EAE mice was markedly increased compared with control mice. In fact, most of activated macrophages isolated from spleen of EAE mice expressed Gal-3. Taken together, our results demonstrate that the over-expression of Gal-3 in activated macrophages may play a key role in promoting inflammatory cells in the CNS during EAE.

Keywords : Central Nervous System, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Galectin-3, macrophage

서 론

실험적 자가면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T 세포 매개성 자가면역성 질병으로서, 중추신경계에서 염증세포의 침윤과 수초탈락의 특징을 가지는 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물 모델이다 [19]. 자가면역성 뇌척수

염의 진행은 뇌-혈관 장벽(Blood-brain barrier, BBB)을 통과해서 중추신경계에 침윤하는 단핵구 유래 큰포식세포와 CD4⁺의 T 세포의 염증세포의 침윤에 의해 악화되며 [1], 활성화된 큰포식세포의 수초의 탐식으로 인해 중추신경계의 탈수초화가 진행되는 것으로 알려져 있다 [27]. EAE 질병 과정동안 활성화된 큰포식세포는 TNF- α , IL-1, nitric oxide 등의 염증성 매개자의 분비에 의해 중추

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: yhjee@jejunu.ac.kr

신경계의 탈수초화를 유도해 EAE 질병의 악화에 밀접한 영향을 미치게 된다 [24, 27, 28]. 그리고 중추신경계에서 활성화된 큰포식세포는 항원제시에 결정적인 역할을 하는 B7분자의 발현을 증가시키며, 이는 자가반응성 T 세포의 자극에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다 [20]. 정상마우스의 중추신경계에서는 큰포식세포의 MHC class II가 약하게 발현되나, EAE 마우스에서는 큰포식세포의 MHC class II의 발현이 증가됨이 확인되어 [19, 25], 큰포식세포의 활성화는 EAE에서 질병의 진행에 있어 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되어지고 있다.

Galectin은 beta-galactoside 함유 oligosaccharides로 내인성 lectin의 한 종류로서 다양한 정상 조직과 병리학적으로 조직에서 나타나는 beta-galactoside-binding protein이다 [2]. Galectin은 활성화된 큰포식세포, 활성화된 B 세포, 수지상세포 및 활성화된 T 세포에서 발현 분비되며 [2, 33], 많은 면역세포에서의 활성화와 이주 및 세포자멸사(apoptosis)에 관여하는 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [15]. Galectin-3는 Ho와 Springer에 의해 thioglycollate에 의해 활성화된 큰포식세포에서 큰포식세포 분화항원(macrophage differentiation antigen, Mac-2)으로 처음 발견된 이래 34 kDa 갈락토시드 결합 단백질(galactoside binding protein), 인간 Lectin-31(human Lectin-31, hL-31), 탄수화물 결합 단백질 35(carbohydrate binding protein 35, CBP35), 종양 전이 연관 L-34(tumor metastasis associated L-34), IgE 결합 단백질(IgE binding protein) 등 서로 다른 이름으로 연구되었으나, 최근 Mac-2 단백질을 비롯한 유사 단백질을 통틀어 Galectin-3로 명명하였다 [3, 8].

이전 연구에 따르면 Galectin-3의 발현은 염증성 안질환, 류마티스성 관절염, 동맥경화증 등의 염증성 질환을 가진 환자의 염증 조직에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다 [9, 23]. 특히 이렇게 발현된 Galectin-3는 염증성 반응과 관련이 있는 큰포식세포를 활성화시키고, 큰포식세포, 단핵세포 및 상피세포의 이주를 유도하고, 이들 세포의 세포자멸사(apoptosis)의 억제에 관여하여 염증 세포의 염증성 반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다 [26, 32]. 최근 Kim 등 [13]은 랫드의 자가면역성 뇌척수염 모델의 척수조직에서 큰포식세포에서의 Galectin-3의 발현은 질병의 진행과정 중 염증 세포 활성화와 관련된 중요한 인자 중 하나이며, 질병 초기 염증 유도 및 질병 회복기의 염증 완화에 관련이 있는 것으로 보고하고 있다. 또한 Galectin-3는 염증성 반응과 관련이 있는 큰포식세포 뿐만 아니라 중추신경계의 미세아교세포를 활성화시키는 것으로 보고되었다 [13]. 이와 같이 자가면역성 질환과 Galectin-3의 활성화의 관련성에 관해 소수의 연구들이 수행되어 왔으나, 면역학적으로

로 격리된 중추신경계의 뇌조직의 손상 시 대뇌를 포함한 중추신경계에서 나타나는 염증세포와 Galectin-3와의 연관성과 Galectin-3가 사람의 다발성 경화증(MS)과 유사한 병변을 보이는 C57BL/6 마우스 모델에서 중추신경계에서의 Galectin-3를 발현하는 염증세포의 귀소(homing)와 관련이 있는 말초면역기관에서의 발현 및 분포 양상에 관한 연구는 아직까지 직접적 보고가 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 C57BL/6 마우스의 EAE 모델에서 중추신경계의 손상 시 Galectin-3의 중추신경계인 대뇌에서 발현 양상을 조사하고, 이와 함께 EAE 유발 마우스의 말초면역기관인 비장에서 Galectin-3의 발현과 분포 양상에 대해 관찰하고자 하였다. 이로부터 큰포식세포의 활성화와 밀접한 관련성을 가지는 Galectin-3의 중추신경계와 말초면역기관에서의 발현 양상과 자가면역성 질환인 EAE의 질병 경과에 따른 상관관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 6-8주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 Jackson Lab(USA)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 실험동물은 표준적인 사육조건으로서 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도를 $50 \pm 5\%$ 로 유지시키고, 사료는 NIH-07 식이를 주었고, 음수는 자유급식하게 하였다. 본 연구를 위한 동물실험 계획서는 제주대학교 동물관리 및 사용위원회의 승인을 받았으며, 모든 실험은 제주대학교의 동물실험 규정에 따라 수행되었다.

마우스에서의 EAE의 유도과 임상증상의 평가

마우스에서 EAE를 유도하기 위하여 각각의 마우스의 양쪽 엉덩이 둔부에 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG, 200 μg ; Bio Synthesis, USA)과 Mycobacterium tuberculosis H37Ra(500 μg ; Difco, USA)을 함유한 complete Freund's adjuvant(CFA; Difco, USA)를 동일량을 혼합하여 주사하였다. 그리고 pertussis toxin 200 ng(List Biological Laboratories, USA)을 면역 당일과 면역 후 2일째 꼬리 정맥주사 하였다. 면역한 마우스는 매일 체중과 임상증상을 측정하였다. EAE의 진행은 Riminton 등의 방법에 따라 특징적 임상 증상에 따라 5 단계로 나누었다: Grade(G)0, 무증상; G1, 꼬리마비; G2, 경도의 후지 마비; G3, 중중의 후지마비; G4, 사지마비; G5, 죽음; R0, 회복기 [30].

정상 대조군인 마우스(naive)와 EAE를 유도한 마우스에서 임상증상이 G2-G4를 나타내는 시기를 발병기(peak stage: 면역 후 18~22일째), 질병으로부터 회복되어 임상

증상이 나타나지 않은 시기(R0)를 회복기(recovery stage: 면역 후 30일경 이후)로 나누고, 각 시기별로 마우스를 에테르로 마취하여 희생시켜 대뇌와 척수를 채취하였다. 파라핀블록으로 제작할 조직은 10% 중성 포르말린으로 고정한 후 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 3~5 μm 의 두께로 조직절편을 만들어 H&E 염색을 실시하였다.

Western blot analysis

질병 경과에 따라 대뇌와 척수조직을 채취한 다음 용해액(lysis buffer)(40 mM Tris, 120 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin; Sigma-Aldrich, USA)에 넣어 균질화기(homogenizer)로 마쇄하고, 12,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 정량하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(10% SDS-PAGE)를 이용하여 동일 양의 단백질을 전기영동하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 100 V에서 2시간 동안 전이시켰다. 그 후에 비특이적 반응을 방지하기 위해 5% 탈지우유(nonfat milk)를 사용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Galectin-3에 대한 단클론항체를 생산하는 M3/38 hybridoma 세포배양 상층액 [14]을 1차 항체로 사용하여 1시간동안 반응시키고, 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하여 실온에서 45분간 반응시켰다. 단백질 밴드(band)는 암실에서 ECL detection kit(Amersham, UK)로 발현을 시켰다. 각각의 밴드 밀도는 scanning laser densitometer(GS-700; Bio-Rad, USA)를 통해 얻었으며, Molecular Analyst Software(Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다.

면역조직화학 염색

대뇌와 척수조직에서 Galectin-3의 분포 및 발현 양상을 관찰하기 위해 EAE를 유발시킨 마우스의 대뇌와 척수조직의 각각의 세 절편을 질병의 진행시기에 따라 시기별로 채취하여, 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀 포매하여 절편을 만들어 슬라이드를 제작하였다. 면역조직화학 염색은 Avidin-Biotin Complex Elite kit(Vector Laboratories, USA)를 이용하였다. 조직절편은 파라핀을 제거한 후, 내재성 과산화효소를 제거하기 위해 0.3% 과산화수소수에서 20분간 침적하였다. 그 후 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking goat serum을 30분간 반응시켰다. 이를 제거한 후 1차 항체로 Galectin-3 단클론항체(M3/38 hybridoma)을 1시간 실온에서 반응

시킨 후 biotinylated anti-rat IgG(Vector Laboratories, USA)를 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 Avidin-Biotin Complex(ABC) reagents(Vector Laboratories, USA)로 45분간 실온에서 반응시켰으며, 면역 반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine(DAB; Sigma-Aldrich, USA) 용액으로 발색시켰다. 각 단계 사이에는 PBS로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸 조직을 헤마톡실린(hematoxylin; Sigma-Aldrich, USA) 용액으로 대조염색하고, 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

유세포분석(Flow cytometry)

EAE를 유발시킨 마우스의 비장에서 Galectin-3의 발현 세포의 수적 변화를 관찰하기 위해 flow cytometry를 수행하였다. 마우스의 비장을 채취하여 세포 여과기를 통해 단일 세포 부유액을 얻었다. 이렇게 얻어진 세포는 적혈구를 용해시킨 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline(Gibco BRL, UK)로 세정한 다음, 10% 소태아 혈청(Gibco BRL, UK)과 1% 항생제(100 U/mL, penicillin-streptomycin; Gibco BRL, UK)가 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, UK)에 부유시켰다. 이후 Galectin-3 단클론항체(M3/38 hybridoma)을 30분간 4°C에서 반응시킨 후 FITC-labeled anti-rat IgG 항체와 PE-labeled anti-mouse CD11b 항체를 각각 넣고 다시 4°C에서 15분간 반응하였다. 반응이 끝난 세포에 1 mL 1% FBS를 포함하는 DPBS를 넣고, 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이어서 상층액을 제거하고 500 μL 1% paraformaldehyde에 재부유시켜 유세포 분

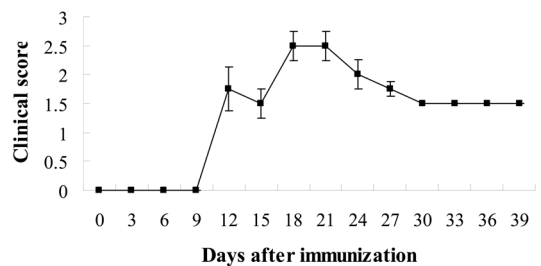


Fig. 1. Clinical course of EAE in C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were injected subcutaneously in the hind flank with 200 μg of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide complete Freund's adjuvant containing 500 μg of mycobacterium tuberculosis H37Ra. Mice were also injected i.p. with 200 ng of pertussis toxin before and 48 h after immunization, and clinical symptoms of EAE were monitored as described in the Materials and Methods. The symbol (■) indicates the mean clinical score for each group (n = 3~5) on the day indicated.

석기(FACSCalibur; Becton Dickinson, USA)로 분석하였다. 분석프로그램으로는 CellQuest software(BD Bioscience, USA)를 사용하였다.

면역세포화학 염색

비장에서 분리한 큰포식세포의 Galectin-3 발현 양상을 관찰하기 위해 EAE를 유발시킨 마우스의 비장으로 부터 세포를 분리하여 coating cover glass가 들어있는 6

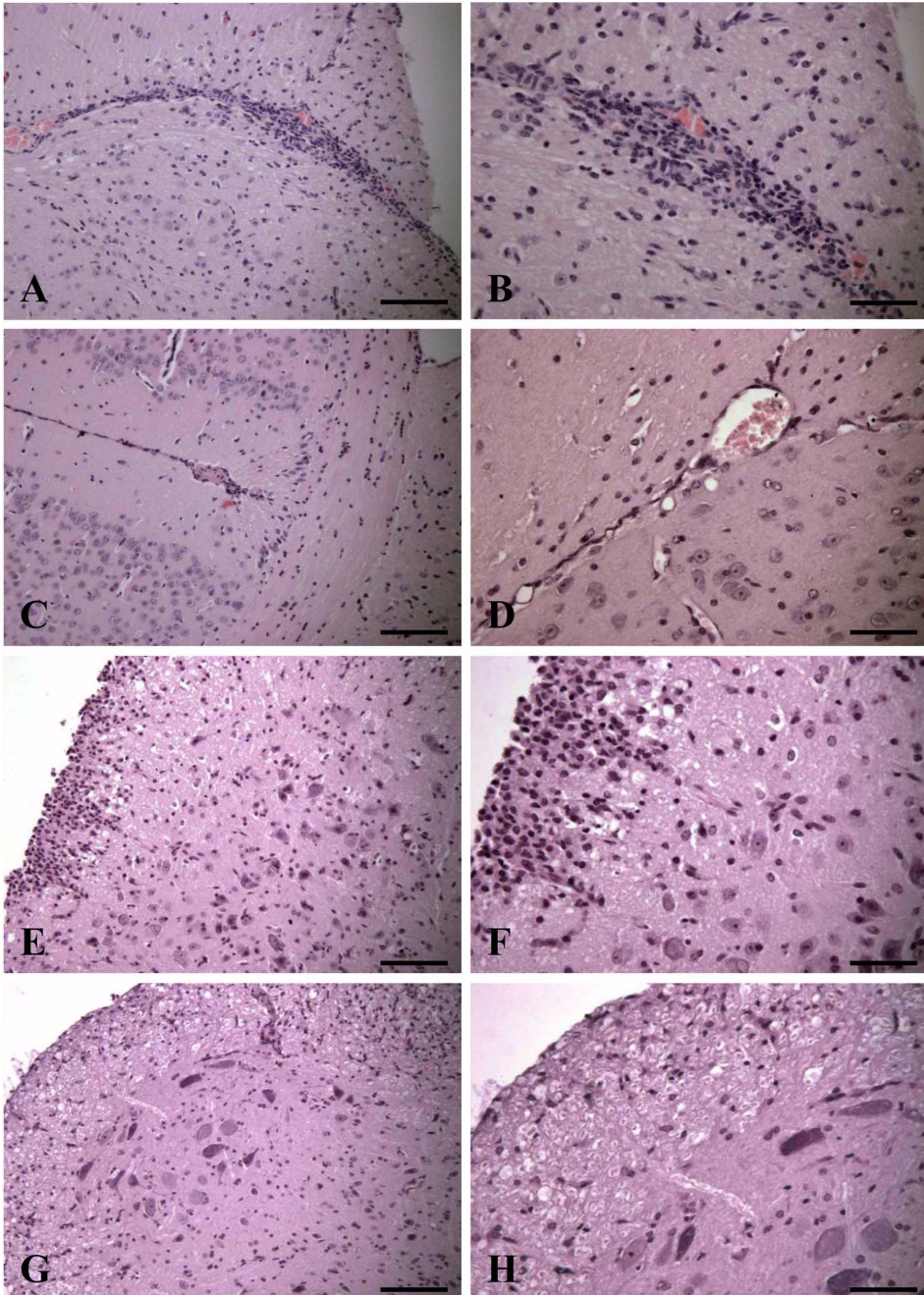


Fig. 2. Histopathological profiles of EAE mice. Cerebrum and spinal cord were fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with H&E stain. Scale bars = 60 μm (A, C, E, G); 30 μm (B, D, F, H).

well dish에 분주하여 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 상층액을 제거하고 큰포식세포를 24시간 동안 배양하였다 [5]. 부착된 세포를 4% paraformaldehyde로 고정 후 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking goat serum을 30분간 반응시켰다. 이를 제거한 후 1차 항체로 Galectin-3 단클론항체(M3/38 hybridoma)을 1시간 실온에서 반응시킨 후 biotinylated goat anti-rat IgG(1 : 100; Vector Laboratories, USA)를 사용하여 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 Avidin-Biotin Complex(ABC) reagents(Vector Laboratories, USA)를 이용하여 다시 45분간 반응시켰으며, 면역 반응이 끝난 세포는 3, 3'-diaminobenzidine(DAB; Sigma-Aldrich, USA) 용액에서 발색시켰다. 각 단계 사이에는 PBS로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸 세포를 헤마톡실린 용액으로 대조염색하고, 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 양성 세포의 수적 변화를 확인하기 위해 3~5개 이상의 시야에서 500개의 세포 중 양성 반응을 보인 세포의 수를 세어 그 변화를 확인하였다.

결 과

EAE의 임상 증상과 신경병리학적 소견

뇌조직 항원을 면역한 C57BL/6 마우스에서 EAE의 임상경과는 면역 후 9~15일경에 꼬리의 마비(G1)가 유도되는 초기 증상이 나타났다. 18~24일경에는 꼬리 및 양쪽 후지 마비(G2-G3)가 일어나며, 이 질병이 악화되었다가 잠시 회복되는 경향을 보였다. 그리고 30일경 이후부터는 회복되지 않고 마비 증상이 계속 유지되는 경향을 나타내었다. 임상증상의 최고값은 약 21일경에 G3.0 ± 0.2이었다(Fig. 1).

EAE의 신경학적 손상 정도는 마우스의 대뇌와 척수의 조직학적 병변을 관찰한 결과(Fig. 2), EAE 임상증상이 발병기의 대뇌(Figs. 2A and B)와 척수(Figs. 2E and F)에서는 염증세포들이 거미막밑공간과 연질막 근처의 실질 내로 염증이 침윤되면서 광범위하게 수막과 실질 내의 혈관주위에 침윤되었다. 반면 회복기에서는 대뇌(Figs. 2C and D)와 척수(Figs. 2G and H)에서 염증 세포가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

EAE 마우스 대뇌와 척수에서의 질병 경과에 따른 Galectin-3의 발현 양상

EAE를 유도한 마우스의 대뇌와 척수에서 질병 경과에 따른 Galectin-3 단백질 발현 양상의 변화를 알아보기 위해 Western blot을 실시하였다. 대조군으로서 건강한 마우스의 대뇌와 척수를 사용하였고, EAE 마우스에서는 질병의 경과에 따라 발병기(peak stage)와 회복기

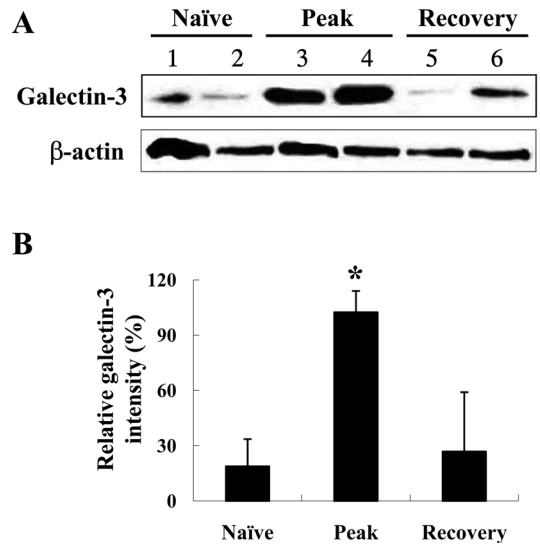


Fig. 3. Galectin-3 expression of the cerebrum and spinal cord in healthy control and EAE mice at various stages by Western blot analysis. (A) Minimal amounts of Galectin-3 were identified in CNS of control mice (naive; day 0 post immunization, PI) (lanes 1, 2). During disease, Galectin-3 expression significantly increased in CNS of EAE mice at the peak stage (G2-G4, days 18-22 PI) (lanes 3, 4) and gradually declined at the recovery stage (R0, days 30-35 PI) (lanes 5, 6). (B) The density of each band was measured and plotted in the graph. * $p < 0.05$, significantly different from control mice by student's *t*-test.

(recovery stage)로 나누어 단백질을 추출하여 사용하였다. 그 결과 Galectin-3는 약 29 kDa에서 특이적 밴드가 관찰되었고, 그 발현양은 정상 대조군 마우스에서는 미약하게 발현하였으나(Fig. 3A, lanes 1, 2), EAE 질병이 가장 심화되는 시기에서는 강하게 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A, lanes 3, 4). 또한 이와 같은 Galectin-3의 발현 양의 증가는 질병이 회복되면서 현저히 약화됨을 볼 수 있었다(Fig. 3A, lanes 5, 6). 또한 질병 경과에 따른 Galectin-3의 양적 변화에 대한 밴드의 밀도 분석 결과 대조군에 비해 EAE 마우스의 발병기에서 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.05$, Fig. 3B). 이상의 결과로부터 Galectin-3의 발현 양의 변화는 EAE 질병의 중증도(severity)와 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다.

EAE 마우스 중추신경계에서의 질병 경과에 따른 Galectin-3의 발현 세포의 특이성

EAE를 유도한 마우스의 대뇌와 척수에서 Galectin-3의 분포 및 발현 양상을 확인하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다(Figs. 4 and 5). 건강한 대조군 마우스

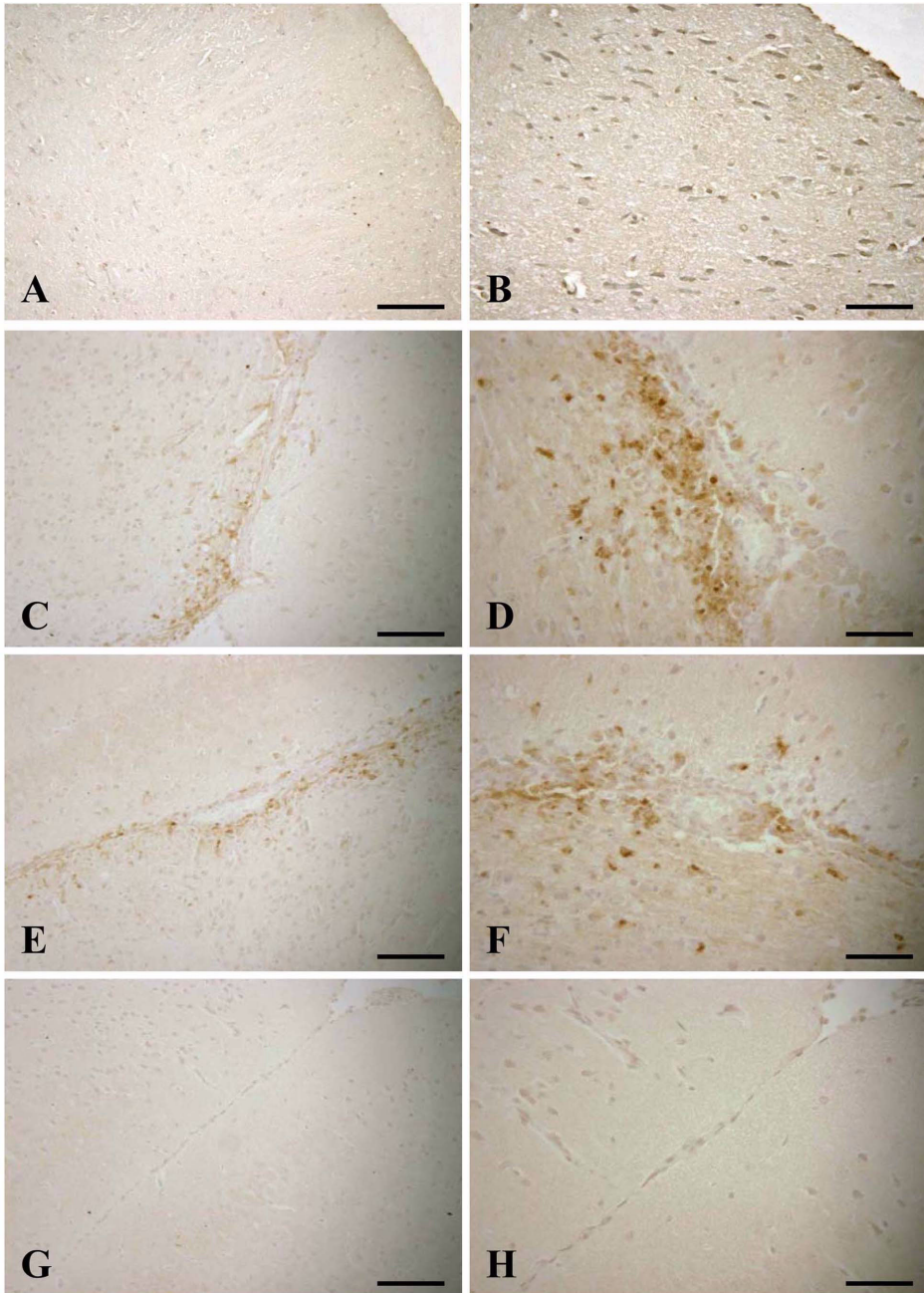


Fig. 4. Immunohistochemical staining of Galectin-3 in cerebrum during EAE. Galectin-3 immunoreactivity is not found in the cerebrum of control mice (A, B). During EAE, considerable numbers of infiltrating cells were present pia mater in the cerebral. Intense Galectin-3 immunoreactivity is present in perivascular clusters of inflammatory cells and glial cells in the parenchyma at the peak stage (C~F). However Galectin-3 was detected marginally in cerebrum at the recovery stage of EAE (G, H). Scale bars = 60 μm (A, C, E, G); 30 μm (B, D, F, H).

의 대뇌(Figs. 4A and B)와 척수(Figs. 5A and B)에서 Galectin-3 염색은 양성 반응이 거의 관찰되지 않았다.

그러나 EAE 마우스의 질병의 초기에는 지주막하강으로 침윤된 염증세포들에서 양성 세포를 관찰할 수 있었고,

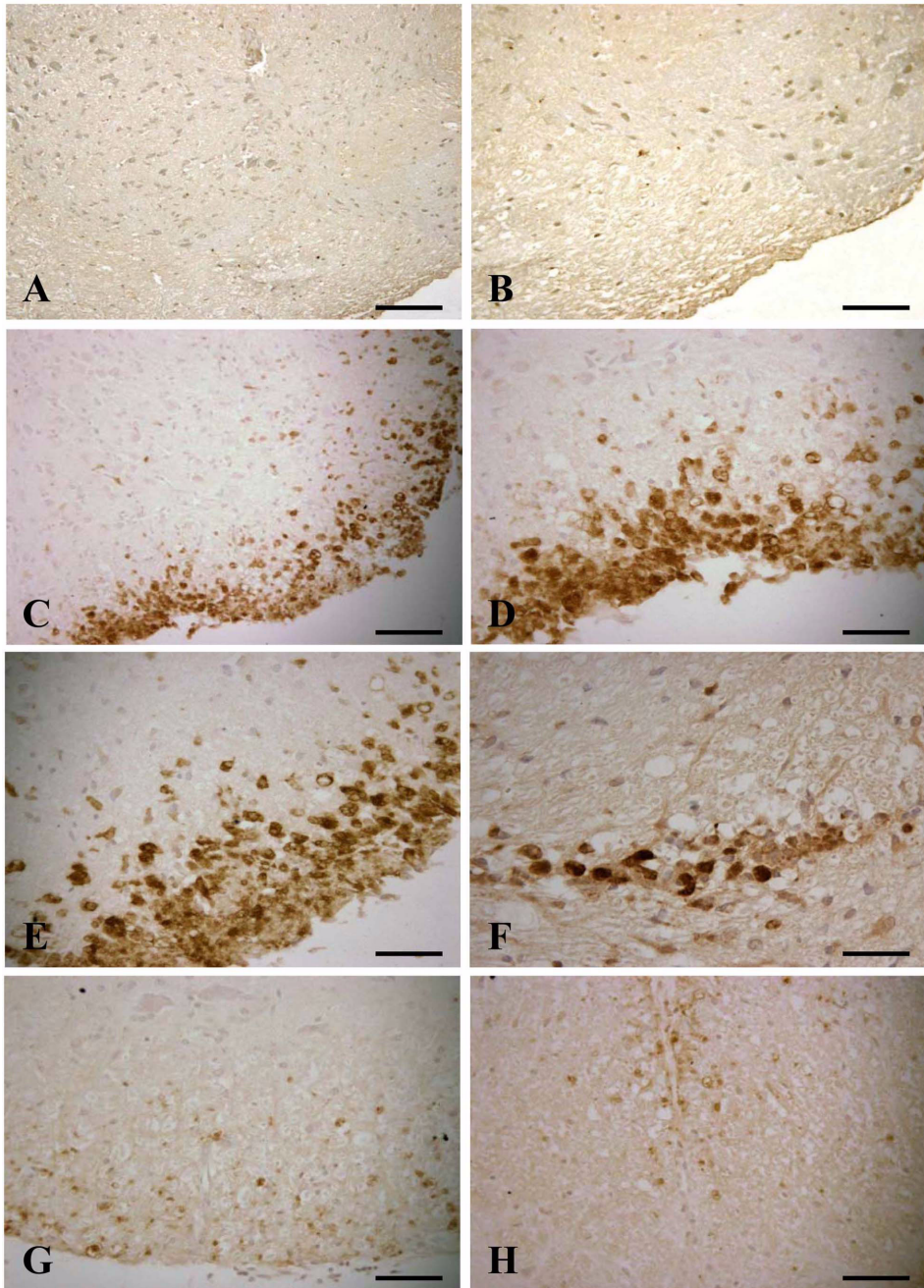


Fig. 5. Immunohistochemical staining of Galectin-3 in spinal cord during EAE. Galectin-3 immunoreactivity is not found in the spinal cords of control mice (A, B). In EAE, considerable numbers of infiltrating cells were present subarachnoid space in the spinal cords. Intense Galectin-3 immunoreactivity is present in perivascular clusters of inflammatory cells and activated glial cells in the parenchyma during the peak stage (C~F). At the recovery stage of EAE, Galectin-3 was weakly detected in a few glial cells of the white matter (G, H). Scale bars = 60 μ m (A, C, E, G); 30 μ m (B, D, F, H).

뇌실막세포와 척수 실질부위의 신경아교세포들에서 약한 양성 반응이 나타났다. 또한 질병이 경과함에 따라

양성 세포는 증가하였고, 대뇌에서는 지주막하강과 혈관주위의 염증세포 침윤 부위에서 양성 반응이 나타났

으며(Figs. 4C~F), 척수에서는 백색질의 실질과 혈관 주변부의 큰포식세포와 T 림프구 등의 염증세포들에서 강한 양성 반응이 나타났다(Figs. 5C~F). 특히 대뇌와 척수 실질내 특이적으로 강한 양성 반응을 보인 주된 세포는 염증성 세포 집단(cluster)에서 큰포식세포임을 알 수 있었다. 이러한 양성 반응은 주된 반응을 보이는 염증세포들 뿐만 아니라 미약하지만 신경아교세포들에서도 관찰되었다. 그러나 질병이 회복되면서 대뇌(Figs. 4G and H)와 척수(Figs. 5G and H)에서 양성 반응은 거의 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 Galectin-3의 발현 양상은 질병의 발달 및 경과와 일치하는 것을 알 수 있었고, 이들 결과는 Western blot에서 나타난 양상과 일치하였다. 이들 결과로부터 Galectin-3는 EAE의 발달과 진행에 매우 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

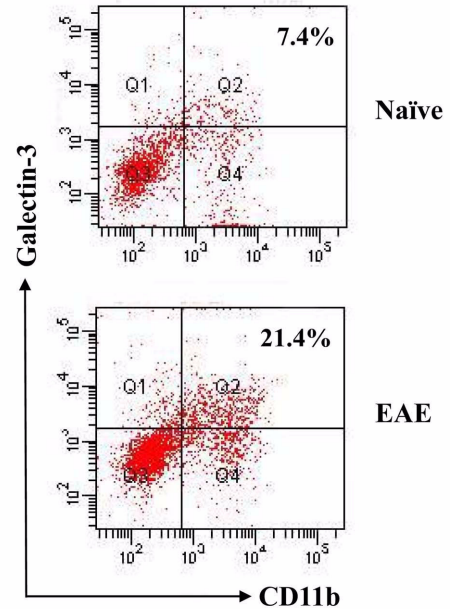
유세포분석을 통한 EAE 마우스 말초면역기관의 큰포식세포에서의 Galectin-3 발현 양상

말초면역기관으로부터 중추신경계로 유주한 자기 항원을 인식하는 염증성 세포들은 EAE의 질병 경과에 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [19, 27]. 따라서 EAE 마우스 중추신경계의 큰포식세포에서의 Galectin-3의 과발현과 함께 중추신경계로 유주하는 자기 항원을 인식한 세포들의 집단이 존재하는 말초면역기관인 비장의 큰포식세포에도 Galectin-3를 과발현하는지를 알아보기 위해 유세포분석기를 이용하여 Galectin-3를 발현하는 세포의 수적 변화를 관찰하였다. Fig. 6A에서 보듯이 비장에서 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수를 분석한 결과, 정상 대조군에 비해 EAE 유발 마우스에서 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수가 7.4%에서 21.4%까지 현저히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6B, 7.4 ± 0.00 vs. 21.4 ± 5.66 , $p < 0.05$). 이상의 결과로부터 EAE 마우스의 중추신경계 뿐만 아니라 말초면역기관에서 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수적 증가가 있음을 알 수 있었다.

면역세포화학염색법을 통한 EAE 마우스 말초면역기관의 큰포식세포에서의 Galectin-3의 발현

EAE가 유발된 마우스의 비장에서 Galectin-3를 발현하는 활성화된 큰포식세포의 수적 증가와 그 발현 강도를 확인하기 위해 EAE 유발 마우스 비장으로부터 큰포식세포를 분리하여, 이들 분리된 큰포식세포에 대해 Galectin-3에 대한 면역세포화학염색법을 실시하였다(Fig. 7). 그 결과, EAE 마우스에서 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수는 대조군에 비해 수적으로 유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었고(Fig. 7C, 82.5 ± 20.5 vs.

A



B

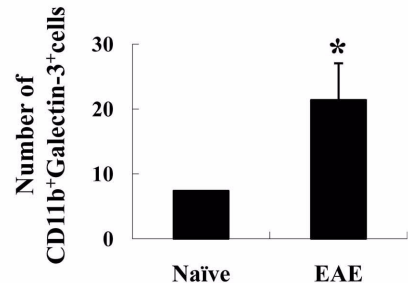


Fig. 6. The splenocytes from control or EAE mice were analyzed using flow cytometry for the expression of Galectin-3. The expression of Galectin-3⁺CD11b⁺ cells was compared with an appropriate isotype control within this gate. * $p < 0.05$, significantly different from control mouse by student's *t*-test.

289.5 ± 36.1 , $p < 0.01$), 그 발현 강도 또한 대조군에 비해 매우 강한 반응을 보였다(Figs. 7A and B). 따라서 면역세포화학염색법을 통해 말초면역기관의 큰포식세포에서의 Galectin-3의 발현을 확인한 결과 유세포분석에서의 결과와 일치하는 결과로서 EAE 유발 마우스의 말초면역기관에서 활성화된 큰포식세포에서 Galectin-3의 발현이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었고, 말초면역기관에서 활성화된 큰포식세포의 Galectin-3 발현 양의 증가는 중추신경계에서의 Galectin-3의 발현과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었다.

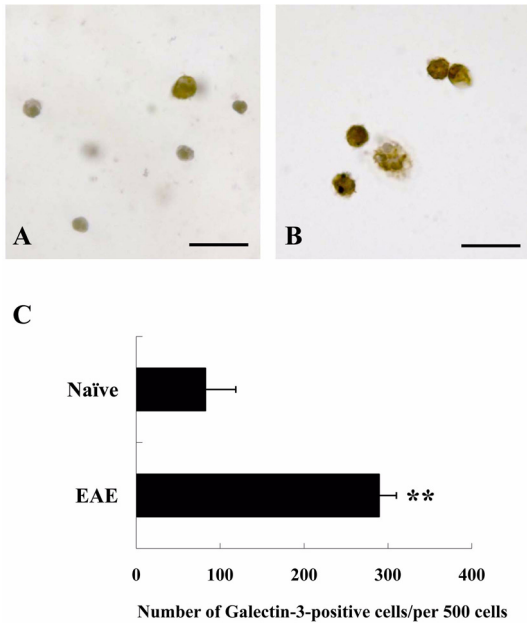


Fig. 7. Immunocytochemical staining of Galectin-3 in isolated macrophage from spleen. Immunoreactivity for Galectin-3 were significantly increased in EAE mice (B), compared to control mice (A). Quantitative analysis for Galectin-3 positive cells are shown as means \pm SD of five hundreds cell counting (C). ** $p < 0.01$, significantly different from control mouse by student's *t*-test. Scale bars = 30 μ m.

고 찰

Galectin-3는 마우스의 큰포식세포주(macrophage cell line)의 포식소체(phagosome)와 수지상세포주(dendritic cell line)에서 파생된 엑소솜(exosome)의 주요한 구성성분으로서 [7, 31], 단핵구가 큰포식세포로 분화 시에 높은 수준으로 그 발현이 증가되고, 단핵구가 수지상세포로 분화 시에 발현이 감소한다 [6, 17]. Galectin-3는 조직내 활성화된 큰포식세포, 수지상세포, 폐포 큰포식세포 또는 쿠퍼 세포 등을 포함한 큰포식세포 계통의 세포들과 장, 신장, 폐의 상피세포와 중추신경계 등의 다양한 세포에서 발현, 분비된다 [10, 18]. 이들 세포들 중 Galectin-3는 큰포식세포의 잠재적인 화학주성인자(chemotaxis)로서, 큰포식세포의 활성화(activation), 보충(recruitment)과 이주(migration) 등 염증 반응에 기여하는 것으로 알려져 있다 [29].

이러한 염증 반응과의 관련성에 대해서는 염증성 질환 환자를 대상으로 한 연구에서 보고되었듯이 염증성 안질환을 가진 환자의 눈물 [9], 류마티스성 관절염 환자의

활액(synovial fluid) 및 thioglycollate로 유도된 복막염(peritonitis) 환자의 복막 등 사람의 염증 부위에서 Galectin-3의 발현이 증가하였다 [4, 23]. 또한 *streptococcus pneumoniae*에 감염된 마우스의 폐로의 백혈구의 보충에도 중요한 역할을 하여 이 질병의 염증성 반응을 촉진 시키는 것이 밝혀졌다 [22]. 최근 Galectin-3가 결여된 마우스를 이용한 폐렴구균성 폐렴(pneumococcal pneumonia), 죽상 동맥경화증(atherosclerosis), dextran sulfate sodium으로 유도된 대장염(colitis) 등의 다양한 질환 모델의 연구에서 Galectin-3의 결여에 의해 이들 질병의 염증성 발달을 억제됨을 보고하였다 [11, 21, 22]. 또한 각 기관에 특이적으로 나타나는 자가면역성 질환(organ-specific autoimmune disease)의 일종인 전신성 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), 다발성근염/피부근염(polymyositis/dermatomyositis) 등의 자가면역성 질환의 환자에서 Galectin-3 자가항체(autoantibody)가 높은 빈도로 나타나는 것이 보고되었다 [16].

자가면역성 질환인 EAE 유발 마우스에서도 Galectin-3에 대한 소수의 연구들이 수행되어 Galectin-3가 EAE 유발 마우스의 염증세포, 특히 활성화된 큰포식세포나 미세아교세포에서 발현하며, 이들 세포의 활성화를 유도하는 것을 보고하였다 [26]. 또한 최근 Jiang 등 [12]은 Galectin-3가 결여된 자가면역성 뇌척수염 마우스에서 Galectin-3의 결여는 중추신경계에서 염증의 침윤의 억제, 단핵구나 큰포식세포의 세포자멸사 유도하고, IL-17과 IFN- γ 의 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 합성을 감소시키고, IL-5, IL-10의 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)의 합성을 증가시킴으로 자가면역성 뇌척수염 질병을 억제하는 것을 관찰하였다. 현재까지 밝혀진 EAE의 진행은 뇌-혈관 장벽(BBB)을 통과한 말초면역기관으로부터 중추신경계의 자가반응성 T 림프구와 큰포식세포의 이주가 매우 중요한 원인으로 밝혀져 있다 [27]. 이 과정 중 T 림프구와 큰포식세포의 활성화는 염증 반응의 촉진에 중요한 역할을 하며, 그 활성화 지표로는 다양한 lectin들이 이용되고 있다. 그 중 Galectin-3는 특히 큰포식세포의 이주를 유도하는 것을 알려져 있다 [26, 32]. 본 연구에서 Galectin-3는 EAE 질병 경과와 매우 밀접한 관련이 있으며, 질병이 경과함에 따라 중추신경계와 말초면역기관의 큰포식세포에서 발현이 증가함과 동시에 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수도 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. EAE가 유발된 마우스의 말초면역기관에서의 Galectin-3를 발현하는 활성화된 큰포식세포의 수적 증가와 발현양의 증가는 중추신경계에서의 Galectin-3를 발현하는 이들 세포의 증가와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 EAE가 유발된 C57BL/6 마우스의 말초면역기관으로부터 활성화된 큰포식세포에서 발현하는 Galectin-3는 중추신경계에서 과발현하는 큰포식세포와 더불어 EAE의 발병과 진행에 결정적 영향을 미치고, 염증 반응 발달에 중요한 지표가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 사람의 다발성 경화증(MS)과 유사한 병변을 보이는 C57BL/6 마우스 EAE 모델에서 중추신경계의 손상 시 Galectin-3의 중추신경계에서의 발현 양상과 염증세포의 귀소(homing)와 관련이 있는 말초면역기관에서의 발현 및 분포 양상에 관해 연구하고, 큰포식세포의 활성화와 밀접한 관련성을 가지는 Galectin-3의 발현 양상을 통해 자가면역성 질환인 EAE의 질병 경과에 따른 상관관계를 밝히고자 하였다. 그 결과 EAE 마우스의 중추신경계와 말초면역기계에서의 Galectin-3의 발현의 강도는 EAE 질병의 발달 및 경과와 일치하였으며, EAE 마우스의 질병이 경과함에 따라 중추신경계인 대뇌와 척수와 더불어 말초면역기계의 활성화된 큰포식세포에서도 Galectin-3의 발현이 증가함과 동시에 Galectin-3를 발현하는 큰포식세포의 수도 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 Galectin-3는 EAE의 발달과 진행에 매우 밀접한 관련이 있으며, EAE가 유발된 마우스의 말초면역기관에서의 Galectin-3를 발현하는 활성화된 큰포식세포의 발현양의 증가와 수적 증가는 중추신경계에서의 Galectin-3를 발현하는 이들 세포의 증가와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(KRF-2008-E00240)의 연구비 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

1. Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukoc Biol* 1999, **65**, 444-452.
2. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998, **28**, 2311-2319.
3. Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**, 7324-7328.
4. Colnot C, Ripoché MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 1998, **94**, 290-296.
5. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Sulli A, Seriola B, Villaggio B. Anti-inflammatory effects of leflunomide in combination with methotrexate on co-culture of T lymphocytes and synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2006, **65**, 728-735.
6. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasić R, Vuk-Pavlović S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **275**, 731-738.
7. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 2001, **152**, 165-180.
8. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982, **128**, 1221-1228.
9. Hrdlicková-Cela E, Plzák J, Smetana K Jr, Mělková Z, Kaltner H, Filipce M, Liu FT, Gabius HJ. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol* 2001, **85**, 1336-1340.
10. Huflejt ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, Leffler H. Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion. *J Biol Chem* 1997, **272**, 14294-14303.
11. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, Jouault T, Mordon S, Sendid B, Desreumaux P, Poulain D. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008, **197**, 972-980.
12. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu FT, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis.

- J Immunol 2009, **182**, 1167-1173.
13. **Kim HC, Joo HG, Moon CJ, Ahn MJ, Jee YH, Lim YK, Koh CS, Shin TK.** Expression of galectin-3 in the spinal cords of Lewis rats and NOD mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Korean J Vet Res* 2004, **44**, 349-355.
 14. **Lee YK, Kang HE, Woo HJ.** Expression of galectin-3 in rat brain. *Korean J Vet Res* 2004, **44**, 83-88.
 15. **Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F.** Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004, **19**, 433-440.
 16. **Lim Y, Lee DY, Lee S, Park SY, Kim J, Cho B, Lee H, Kim HY, Lee E, Song YW, Jeung DI.** Identification of autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **295**, 119-124.
 17. **Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr.** Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 1995, **147**, 1016-1028.
 18. **Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, Mercurio AM.** Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**, 3466-3470.
 19. **Martin R, McFarland HF, McFarlin DE.** Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992, **10**, 153-187.
 20. **Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, Pope JG, Karandikar NJ, Dal Canto MC, Bluestone JA.** Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 1995, **3**, 739-745.
 21. **Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M.** Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1998, **152**, 1199-1208.
 22. **Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S.** Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2008, **180**, 2466-2473.
 23. **Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M.** Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003, **48**, 2788-2795.
 24. **Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H, Esumi H, Ogura T, Yanagihara T, Sakoda S.** Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995, **62**, 103-112.
 25. **Owens T, Sriram S.** The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol Clin* 1995, **13**, 51-73.
 26. **Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A.** An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 2007, **66**, 143-158.
 27. **Raine CS.** Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. *Lab Invest* 1984, **50**, 608-635.
 28. **Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T.** TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J immunol* 1995, **154**, 944-953.
 29. **Sean Riminton D, Körner H, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD, Sedgwick JD.** Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient, mice. *J Exp Med* 1998, **187**, 1517-1528.
 30. **Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT.** Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000, **165**, 2156-2164.
 31. **Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S.** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001, **166**, 7309-7318.
 32. **Yang RY, Hsu DK, Liu FT.** Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**, 6737-6742.
 33. **Zuñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A.** Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001, **70**, 73-79.