지방내 crown-like-structure 대식세포의 새로운 표식인자로써 LYVE-1의 역할

이혁중

Cornell University

Abstract

Lee, Hyuek-Jong. LYVE-1 as a novel selection marker for crown like structure macrophage in adipose tissue. *Exercise Science*, 22(3) : 213-221, 2013. Although exercise training improves adipose tissue associated inflammation and systemic insulin resistance in obese patients, the underlying mechanisms how exercise effects on macrophage functions in obese adipose tissue have not been evaluated yet. The main reason for this is the absence of specific marker for isolating two different macrophages, resident macrophage(RM) and crown-like-structure macrophage(CLSM), from obese adipose tissue. Therefore, the purpose of this study is to identify a new phenotypic marker for the selection of RM and CLSM and to provide useful method for studying the effects of exercise training on adipose tissue macrophage. Pro-inflammatory cytokine expression, blood vessel activation, and ATM recruitment were analyzed in the adipose tissues from the mice fed low(control) or high fat diet(obesity) for 12 weeks. Also novel marker for detection of CLSM was evaluated with LYVE-1 staining in this study. TNF- α ($p<.001$), IL-1b($p<.01$) and Cox-2($p<.05$) were upregulated in obese adipose tissue. ICAM-1($p<.01$) and VCAM-1($p<.001$), which were known to play a role in recruiting leukocyte into adipose tissue, were highly expressed on adipose tissue blood vessel in obese group and more RM and CLSM were accumulated in obese adipose tissue. To identify a new marker for the detection of CLSM, MGL1 and LYVE-1, which were M2 markers, were evaluated. The expression of MGL1, which has been known not to be expressed on CLSM, was found on CLSM. It indicates that MGL1 is not an ideal marker for selection of CLSM. Instead, LYVE-1 was expressed on RM in lean and obese adipose tissue RM, but not in CLSM. Therefore, CLSM is redefined as F4/80+CD11c+LYVE-1-. This new novel marker would be useful for isolating and characterizing CLSM as well as for interrogating the effects of endurance exercise on adipose tissue macrophage in obese patients.

Key words : Obesity, Epididymal fat, Crown like structure, Macrophage, LYVE-1

초 록

이혁중. 지방내 crown-like-structure 대식세포의 새로운 표식인자로써 LYVE-1의 역할. 운동과학, 제22권 제3호, 213-221, 2013. 지구성 운동은 비만환자의 지방내 염증발현을 감소시키고 인슐린 민감성을 향상시킨다. 그러나 지구성 운동이 염증발현에 직접적으로 관여하는 지방내 대식세포의 기능에 미치는 영향에 관해서는 알려진 바가 없다. 대식세포의 기능을 알아내기 위해서는 비만군의 지방내 M2 대식세포로 알려진 레지던트 대식세포(resident macrophage)와 염증을 일으키는 M1 대식세포로 알려진 CLS 대식세포(Crown like structure macrophage)를 구분하여 분리한 후 실험관 실험을 수행하여야 하지만, 이 두 대식세포를 분리할 수 있는 표식인자의 부재로 효율적인 연구가 불가능한 실정이다. 따라서 본 연구는 CLS 대식세포를 찾아낼 수 있는 새로운 표식인자를 제시하여 향후 지구성 운동이 비만군 지방내 대식세포에 미치는 영향을 규명하는데 필요한 기초자료를 제시하는데 그 목적이 있다. 12주간 저지방 식이(통제군) 또는 고지방 식이(비만군)를 처치한 마우스의 지방으로 부터 real time PCR, 형광 염색 및 flow cytometry를 이용하여 지방내 염증 발현, 혈관의 활성화, 대식세포 및 CLS 수를 분석하고, CLS 대식세포에서 특이적으로 발현하는 표식인자를 찾기 위하여 LYVE-1을 이용한 형광염색을 시행하였다. 통제군에 비해 비만군의 지방에서 TNF- α ($p<.001$), IL-1b($p<.01$) 그리고 Cox-2($p<.05$)의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였고, 단핵세포의 조직내 침투를 돕는 혈관의 ICAM-1($p<.01$)과 VCAM-1($p<.001$) 발현이 유의하게 증가하였다. 비만군의 지방내 대식세포의 수 및 CLS 수가 증가하였다. 한편 CLS 대식세포의 표식인자로 알려진 MGL1은 레지던트 대식세포 및 CLS 대식세포 모두에서 발현되었으나 LYVE-1은 통제군과 비만군의 레지던트 대식세포에서만 발현되었고, 비만군의 CLS 대식세포에서는 발현되지 않았다. 본 연구에서는 새로운 표식인자인 F4/80+CD11c+LYVE-1-로써 CLS 대식세포를 재정의(redefine) 하였고, 이는 향후 지방내 대식세포의 역할을 밝히는데 있어서 뿐만 아니라 지구성 운동이 비만환자의 지방내 레지던트 및 CLS 대식세포에 미치는 영향을 규명하는데 있어 활용할 수 있는 중요한 표식인자가 될 것으로 사료된다.

주요어 : 비만, 지방, 대식세포, CLS 대식세포, LYVE-1

I. 서론

중등도의 만성적인 염증(inflammation)을 특징으로 하는 비만은 성인병의 주된 위험인자로 인식되고 있다. 비만군의 지방에서 염증을 일으키는 사이토카인은 대부분 지방세포 및 대식세포(macrophage)에서 분비된다(Olefsky & Glass, 2010). 지방내 대식세포는 골수(bone marrow)로부터 유도된 단핵세포(monocyte)가 활성화된(activated) 혈관을 통해 조직내 침투 후 분화하여 생성되며, 지방의 크기에 비례하여 그 숫자가 증가하는 것으로 알려져 왔다(Curat et al., 2004; Xu et al., 2003; Weisberg et al., 2003). 비만환자의 지방내 대식세포는 형태학적으로 죽은 지방세포의 주변에 군집(cluster)을 이루어 형성되는 것으로 알려진 CLS(crown-like-structure) 대식세포와 레지던트 대식세포(CLS 대식세포를 제외한 나머지 대식세포)로 구분된다(Ouchi et al., 2011). 특히 일부 CLS 대식세포는 죽은 지방세포로부터 CD36을 포함한 scavenger 수용체를 통해 지질을 섭취하여 거품세포(foam cell)을 형성함으로써 죽은 지방세포를 제거하는 것으로 알려져 왔다(Cinti et al., 2005).

대식세포는 염증 유발성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1b 등)을 분비하는 M1 대식세포와 M1에 의해 발생한 염증 반응을 감소시키는 M2 대식세포로 구분된다(Gordon, 2003; Herbert et al., 2004; Noel et al., 2004; Takahashi et al., 2004). 비만은 지방내 대식세포를 M1 대식세포로 변환시켜 염증발현을 강화시키는 것으로 알려져 있다(Lumeng et al., 2007; Lumeng et al., 2008).

신체활동은 강도 및 기간에 따라 대식세포의 기능 및 면역력에 변화를 유도한다. 중등도 이상의 1회성 운동만으로도 마우스 복막내 대식세포의 화학주성(chemotaxis)은 증가하며(Sugiura et al., 2001; Fomer et al., 1994), 마우스를 대상으로 한 탈진 강도의 1회성 수영 훈련 역시 복막내 대식세포의 식작용(phagocytosis)을 유의하게 증가시킨다(Fomer et al., 1996). 또한 16주간의 트레드밀 운동은 P815 암세포(P815 mastocytoma: 비만 암세포 셀라인 세포)에 대한 마우스 복강 대식세포의 세포용혈(cytolysis) 능력을 증가시켜 항암 능력을 증가시키고(Lu et al., 1999), 장기간의 수영 훈련 역시 마우스 복강 대식세포에서의 화학주성 및 식작용을 유의하게 증가시킨다(Ferrandez & De la Fuente, 1999). 이처럼 지구성 운동은 조직의 환경 및 안티젠(antigen)에 따라 대식세포의 식작용 및 화학주성을 서로 다른 방식으로 조절한다. 한편 지구성 운동은 비만환자 및 마우스 모델에서 지방의 염증성

사이토카인의 분비를 감소시키고, 인슐린 민감도를 증가시키며, 대식세포의 표식인자(marker)로 사용되는 F4/80 mRAN의 발현을 감소시키는 것으로 알려져 왔으나 구체적인 기전은 명확하지 않다(Bruun et al., 2006; Vieira et al., 2009).

이처럼 지구성 운동은 비만환자의 지방내 염증 발현을 감소시키고 인슐린 민감도를 증가시키면서도 불구하고, 지구성 운동이 염증성 사이토카인을 직접적으로 발현하는 대식세포에 미치는 영향에 관련된 연구는 전무한 실정이다. 이는 복강내 대식세포를 대상으로 한 연구들에서 보듯이 대식세포의 기능 분석은 조직내 대식세포만을 분리하여 실험관(in vitro) 실험을 수행하여야만 가능하나, 복강내 대식세포와 달리 비만군의 지방조직에 존재하는 대식세포는 레지던트 대식세포와 CLS 대식세포를 구분할 수 있는 표식인자(marker)의 부재로 형태학적으로 서로 다른 두 종류의 대식세포를 분리할 수 있는 방법이 발견되지 않았기 때문이다. 최근 CD11c 또는 MGL1(macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin-1) 등이 지방내 M1 또는 M2 대식세포의 표식인자로 제시되었으나 그 진위여부가 불투명하고 이와 같은 표식인자들이 레지던트 대식세포와 CLS 대식세포를 구분하는데 사용될 수 있는지에 대해서는 논란이 가중되고 있다(Lumeng et al., 2007; Lumeng et al., 2008; Shaul et al., 2010).

따라서 지구성 운동이 비만군의 지방조직내 대식세포의 축적 및 기능에 미치는 영향을 규명하기 위해서는 서로 다른 대식세포로 알려진 레지던트 대식세포와 CLS 대식세포를 구분할 수 있는 표식인자를 찾는 것이 시급하다. 이에 본 연구에서는 지구성 운동이 비만군의 지방내 대식세포에 미치는 영향을 규명하기에 앞서 두 종류의 대식세포를 분리하여 분리할 수 있는 새로운 표식인자를 제시함으로써 향후 지구성 운동이 비만군의 지방내 대식세포에 미치는 영향을 효과적으로 규명하는데 사용될 수 있는 기초자료를 제공하는데 그 목적이 있다.

II. 연구 방법

1. 연구 대상

본 연구는 수컷 C57BL/6J 마우스를 대상으로 실시하였다. 4주령 마우스 24마리 중 14마리를 두 개의 집단(통제군과 비만군)에 각각 7 마리씩 무선 할당하여 6주령부터 통제군은 저지방 식이(10 % fat diet; D12492i, Research Diets)를, 그리고

비만군은 고지방 식이(60 % fat diet; D12492i, Research Diets)를 12주 동안 섭취시켰다. 각 집단의 7마리는(통제군 N=7, 비만군 N=7) 부고환 지방(이하 지방으로 명명)내 mRNA 분석, flow cytometry 분석 및 형광염색을 위해 사용하였다. 나머지 10마리는(통제군 N=5, 비만군 N=5) MGL1 및 LYVE-1 염색에 이용하였다. 본 실험이 진행되는 동안 모든 마우스는 일정한 온도 및 습도가 유지되며 12시간 간격으로 명암이 조절되는 Weill Cornell Medical College의 동물실에서 사육되었으며 물과 사료는 제한 없이 충분히 주었다.

2. 분석 방법

1) mRNA 발현 측정

지방 조직의 mRNA를 측정하기 위하여 미세저울을 이용해 50 mg의 지방 조직을 정량하고 500 μ l의 TRIzol Reagent (Invitrogen, NY)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 샘플은 원심분리 후(1300 rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C), 상층액으로부터 RNeasy Mini columns (Qiagen, MD)을 이용해 Qiagen에서 제공한 분리 방법에 따라 mRNA를 분리하였다. 이후 Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, MD)을 이용하여 Qiagen에서 제공한 분리 방법에 따라 poly-A-RNA만을 추출하였다. 추출한 poly-A-RNA로부터 cDNA Synthesis Kits(Clontech, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하고 real time PCR(Applied biosystems, NY)을 시행하였다. 분석에 사용된 각 프라이머(primer)는 다음과 같다.

TNF- α (forward: CCAGACCCTCACACTCAGATC, reverse: CAC TTGGTGGTTTGCTACGAC), IL-1b(forward: TGGGCCTCAAAG GAAAGAAT, reverse: CAGGCTTGCTCTGCTTGT), Cox-2 (forward: ATTCTTTGCCAGCACTTCA, reverse: GGGATACACC TCTCCA CCAA).

결과의 정량은 GAPDH(forward: AGGTCGGTGTGAACGG ATTTG, reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA)를 이용하였다.

2) 형광 염색

모든 마우스는 CO₂ 가스를 이용해 희생시켰으며 지방의 이미지를 촬영하기 위해 모든 샘플은 채취 후 4 %의 formalin 으로 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후 5 %의 염소 혈청 으로 1시간 동안 실온에서 차단하고 지방을 anti-ICAM-1 antibody(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), anti-VCAM-1 antibody(R&D system, Minneapolis, MN), anti-PECAM-1 antibody

(Chemicon International, Temecula, Calif), anti-F4/80 antibody (Serotec, Oxford, UK), anti-CD11c antibody(AbD Serotec, Oxford, UK), anti-MGL1 antibody(R&D system, Minneapolis, MN), anti-LYVE-1 (Relia Tech, Germany) 등과 함께 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후 인산염완충식염수(PBS)로 세척 후 cy3-conjugated anti-goat IgG antibody, cy3-conjugated anti-hamster IgG antibody, cy5-conjugated anti-hamster IgG antibody, cy3-conjugated anti-rat IgG antibody 또는 FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 등과 함께 4시간 동안 상온에서 배양하였다. 지방의 대식세포의 형태적 분석을 위한 이미지는 Fluoview FV10i confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA)를 이용하여 촬영하였다.

3) Flow cytometry

지방내 대식세포의 수를 통제군과 비만군에서 비교하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 지방조직을 수술용 가위로 잘게 자른 후 .1 % collagenase Type II (Worthington, Lakewood, NJ)와 함께 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 원심분리하여 SVF(stromal vascular fraction)을 분리하였다. APC-cy7-conjugated CD45, percp-cy5.5-conjugated CD11b 그리고 PE-cy7-conjugated F4/80 (eBioscience, San Diego, CA)와 함께 SVF를 4 $^{\circ}$ C에서 40분간 배양한 후 4 만개의 세포를 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)로 카운팅하여, 그 중 CD45+CD11b+F4/80+만을 대식세포로 간주하였고, Flowjo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) 소프트웨어를 이용하여 대식세포의 숫자를 분석하였다.

3. 자료 분석

모든 변인은 평균과 표준편차 (mean $\pm$ SD)로 표기하였다. 본 연구에서는 통제군과 비만군의 모든 변인에 대한 통계적 유의성은 유의수준 .05에서 paired t-test이용한 통계분석을 실시하여 구하였다.

III. 연구 결과

CLS 대식세포의 새로운 표식인자를 찾아내기에 앞서, 비만군 지방에서의 염증 및 CLS 대식세포의 발현 여부를 확인

하기 위하여 첫째, 비만군 지방내 염증성 사이토카인 발현의 확인, 둘째, 단핵세포의 지방내 침투를 돕는 것으로 알려진 혈관의 활성화 검증, 셋째, 혈관 활성화와 동반된 지방내 대식세포의 증가 및 CLS 대식세포의 확인 순으로 실험을 진행하였다. 이후, CLS 대식세포의 표식인자를 찾아내는 실험을 진행하였다.

1. 비만군 지방내 염증성 사이토카인 증가

12주간의 고지방 식이가 비만군의 지방내 염증성 사이토카인 발현을 증가시키는지 확인하기 위하여 통제군과 비만군의 지방내 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1b 그리고 Cox-2의 mRNA 발현을 측정하였다. 비만군의 지방에서 TNF- α (1.08 ± 0.46 vs 8.83 ± 3.33 , $p < .001$), IL-1b(1.13 ± 0.54 vs 7.86 ± 4.17 , $p < .01$) 및 Cox-2(1.10 ± 0.46 vs 1.88 ± 0.43 , $p < .05$)의 mRNA 발현이 모두 유의하게 증가하였다(Fig. 1>.

Fig. 1. Inflammatory cytokine expression.

Values are mean $\pm$ SD. *, $p < .05$ vs control.
#, $p < .01$ vs control. ##, $p < .001$ vs control.

2. 비만군 지방내 혈관의 ICAM-1 및 VCAM-1 증가

염증 부위의 활성화된 혈관은 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule) 등을 발현하여 단핵세포의 조직 내 침투를 돕는다(Kevil et al., 2001; Yago et al., 1999). 따라서 비만군의 지방 혈관에서 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현이 증가 되었는지를 확인하기 위하여 통제군과 비만군의 지방을 ICAM-1 및 VCAM-1을 혈관에서 특이적으로 발현하는 PECAM-1과 함께 염색하였다. 비만군의 지방에서 ICAM-1(Fig. 2B) 및 VCAM-1(Fig. 2E)을 발현하는 혈관은 모세혈관 수준의 가는 혈관뿐만 아니라 굵은 혈관들에서도 관찰되었다. 통제군과 비만군의 각 7마리의

지방에서 각각 6부위의 사진을 찍어 Image J(NIH)를 이용하여 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현 영역(area)을 측정한 결과 비만군 지방에서 ICAM-1 발현 영역은 약 3.8배 증가하였고(6090.18 ± 3314.4 vs 23548.61 ± 17336.82 , $p < .01$, Fig. 2C), VCAM-1 역시 비만군에서 약 1.7배(69643.3 ± 1922.08 vs 12308.5 ± 5479.72 , $p < .001$, Fig. 2F) 증가하였다.

3. 비만군 지방내 대식세포 및 CLS 대식세포의 증가

혈관에서의 ICAM-1 및 VCAM-1의 증가가 대식세포의 지방내 축적을 동반하는지를 알아보기 위해 모든 대식세포에서 특이적으로 발현하는 F4/80 항체를 이용하여 지방을 염색하였다(Fig. 3A, 3B>. 통제군 및 비만군 모두 지방세포들 사이에 레지던트 대식세포가 존재하였으며 특히 비만군 지방에서는 통제군(Fig. 3A)에서 거의 발견되지 않은 CLS 대식세포를 확인하였다 (arrows on Fig. 3B). 통제군과 비만군의 각 7마리의 지방에서 각각 6부위의 사진을 찍어 그 숫자를 분석한 결과 CLS 대식세포의 수가 비만군에서 유의하게 증가하였다(2.2 ± 0.4 vs 2.53 ± 1.98 , $p < .01$) <Fig. 3C>. 또한 flow cytometry를 이용하여 통제군 <Fig. 3D>과 비만군 지방 <Fig. 3E>내 대식세포의 숫자를 비교한 결과, CD45+(백혈구에 대한 특이적 표식인자)세포에 대한 F4/80+CD11b+(대식세포에 대한 특이적인 표식인자) 대식세포의 비율이 유의하게 증가하였음을 확인하였다(69.91 ± 6.63 % vs 82.64 ± 4.95 %, $p < .01$) <Fig. 3F>.

4. CLS 대식세포에서의 MGL1 발현

비만군의 지방에서 CLS 대식세포를 확인한 후, CLS 대식세포에서 그 발현에 대한 논란이 있는 MGL1의 발현여부를 조사하였다. 비만군의 지방을 CD11c, F4/80 그리고 MGL1 항체를 이용하여 삼중염색을 시행하여 비만군의 지방내 CLS 대식세포를 관찰하였다. F4/80 <Fig. 4A>와 CD11c의 발현 <Fig. 4B>은 기존 연구에서와 같이 F4/80+ CLS 대식세포에서 그 발현이 관찰되었으나(Lumeng et al., 2007), 일부 레지던트 대식세포에서도 관찰되었으며 그 발현정도는 CLS 대식세포보다 낮았다. MGL1은 Shaul 등(2010)의 연구결과와 같이 본 연구에서도 CLS 대식세포 및 레지던트 대식세포 모두에서 발현되었으며 <Fig. 4C>, CLS 대식세포에서 MGL1과 F4/80 또는 CD11c의 시그널이 같은 세포에서 발현되는지 알아보기 위해 Fig. 4의 A와 C 그리고 B와 C의 이미지를 중첩(merge)

시킨 결과 MGL1은 F4/80 및 CD11c와 공존(colocalization)하였다<Fig. 4D, 4E>. 이는 MGL1이 레지던트 대식세포 및 CLS 대식세포 모두에서 발현되기에 CLS 대식세포를 분리할 수 있는 표식인자로써 적합지 않음을 보여주는 결과이다.

Fig. 2. ICAM-1 and VCAM-1 expression on blood vessel.

A. ICAM-1 and PECAM-1 expression on control adipose tissue. B. ICAM-1 and PECAM-1 expression on obese adipose tissue. D. VCAM-1 and PECAM-1 expression on control adipose tissue. E. VCAM-1 and PECAM-1 expression on obese adipose tissue. C & F. Measurement of ICAM-1(C) or VCAM-1(F) expression (area). Values are mean±SD. #, $p<.01$ vs control. ##, $p<.001$ vs control.

Fig. 3. Macrophage number in adipose tissue.

A. F4/80 staining with control adipose tissue. B. F4/80 staining with obese adipose tissue. C. Number of CLS macrophage (white arrow in panel B) (Mean±SD). D & E. F4/80+CD11b+ cluster from flow cytometry analysis. Control(D), Obesity(E) (Red box area). F. The ratio of F4/80+CD11b+ macrophage to CD45+ leukocyte (Mean±SD, N=7). #, $p<.01$ vs control. ##, $p<.001$ vs control.

5. 레지던트 대식세포에서의 LYVE-1 발현

LYVE-1(lymph vessel endothelial hyaluronan receptor-1)은

Fig. 4. MGL1 expression in CLS macrophage.

A. F4/80 expression in CLS macrophage. B. CD11c expression in CLS macrophage. C. MGL1 expression in CLS macrophage. D. Colocalization of MGL1 and F4/80. E. Colocalization of MGL1 and CD11c. 60X.

Fig. 5. LYVE-1 expression in resident macrophage.

A. F4/80 expression in CLS macrophage. B. CD11c expression in CLS macrophage. C. LYVE-1 expression in CLS macrophage. D. Merged image with LYVE-1 and F4/80. E. Merged image with LYVE-1 and CD11c. F. F4/80 expression in control adipose tissue. G. LYVE-1 expression in control adipose tissue. I. Merged image of LYVE-1 and F4/80 in control adipose tissue. 60X (A-E), 10X (F-I).

지방내 대식세포의 또 다른 표식인자이다(Cho et al., 2007). 또한 CD11c+MGL1mid 대식세포에서의 LYVE-1 mRNA 발현은 CD11b+MGL1- 대식세포에 비해 현저하게 감소됨이 보고되었다(Shaul et al., 2010). 그러나 LYVE-1 단백질의 발현이 CLS 대식세포에서 감소되는지는 연구된 바가 없다. 따라서 LYVE-1이 CLS 대식세포의 표식인자가 될 수 있는지를 확인하기 위해 비만군의 지방을 CD11c, F4/80 그리고 LYVE-1 항

체를 이용하여 삼중염색을 시행하여 관찰하였다. CD11c의 발현은 위에서 밝힌 바와 같이 F4/80+ CLS 대식세포 및 일부 레지던트 대식세포에서도 관찰되었으나 <Fig. 5A, 5B>, 흥미롭게도 LYVE-1은 레지던트 대식세포에서만 관찰되었다<Fig. 5C>. CLS 대식세포에서 LYVE-1의 발현이 나타나지 않는 것을 확인하기 위하여 F4/80와의 공존 여부를 확인했으나 F4/80와는 공존하지 않았고 <Fig. 5D>, 또한 CD11c와의 공존 여부를 확인했으나 CD11c와의 공존도 하지 않았다<Fig. 5E>. 그러나 CLS 대식세포가 거의 발견되지 않은 통제군의 지방에서는 대부분의 F4/80+ 대식세포는(Fig. 5F) LYVE-1을 발현하였으며 <Fig. 5G>, LYVE-1과 F4/80의 시그널이 같은 세포에서 발현되는지 알아보기 위해 Fig. 5의 F와 G의 이미지를 중첩시킨 결과 LYVE-1 거의 대부분의 F4/80와 공존 하였다<Fig. 5I>. 이는 LYVE-1이 지방내 레지던트 대식세포에서는 발현되나 CLS 대식세포에서만 특이적으로 발현하지 않음을 보여주는 결과이며 향후 F4/80+CD11c+ LYVE-1-를 CLS 대식세포의 표식인자로 사용하여 이를 분리 및 분석할 수 있음을 보여주는 중요한 증거이다.

IV. 논의

본 연구는 지구성 운동이 비만군의 지방내 대식세포에 미치는 영향을 규명하기 위해 필요한 레지던트 대식세포 및 CLS 대식세포의 특징적인 표식인자를 찾기 위해 시행되었다. Olefsky 등(2010)의 논문에서와 같이 본 연구에서도 고지방 식이는 지방내 대식세포의 증가를 동반한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1b, Cox-2)을 유의하게 증가시켰다<Fig. 1 & Fig. 3>. 조직내에서 대식세포로 분화되는 단핵세포는 활성화된 혈관내피세포 위에서 구름(rolling), 정지(arrest) 그리고 부착(adhesion)이라는 단계를 거쳐 조직 내로 이동하며 이 과정에는 많은 종류의 셀렉틴(selectin)과 endothelial adhesion molecule들이 관여를 하게 된다. 특히 단핵세포에서 발현되는 셀렉틴은 혈관내피세포의 ICAM-1 및 VCAM-1등에 부착되어 단핵세포의 혈관내 이동을 돕는다(Kevil et al., 2001; Yago et al., 1999). 이에 비만군 지방내 혈관의 활성화를 확인하기 위하여 지방을 ICAM-1과 VCAM-1을 염색하여 통제군과 비교한 결과, 비만군 지방에서의 발현양이 유의하게 증가하였으며 모세혈관 수준의 가는 혈관뿐만 아니라 굵은 혈관에서의 그 발현양이 증가함을 관찰하였다<Fig. 2>. 이와 같은 혈관의 활성화는 비만군의 지방내 대식세포 숫자의 증가를 동반

하였으며, 특히 비만군의 지방내 CLS 수가 유의하게 증가함을 확인하였다<Fig. 3>. 비만군은 지방내 CLS 대식세포에서 주로 발현되는 F4/80+CD11c+ 대식세포의 증가를 동반하며 CD11c+ 대식세포는 IL-6 및 iNOS와 같은 염증성 물질을 CD11c- 대식세포보다 더 많이 분비하므로 CD11c가 지방내 M1 대식세포의 표식자로 인식되었다(Lumeng et al., 2007). 또한 CD11c+ CLS 대식세포는 M2 대식세포의 표식자 중 하나인 MGL1을 발현하지 않는 것으로 보고되었으나(Lumeng et al., 2008), 이후 CLS 대식세포는 MGL1을 발현하는 세포와 발현하지 않은 세포를 모두 포함하고 있는 것으로 알려지면서 그 진위에 대한 논란이 가중되었다(Shaul et al., 2010). 그러나 본 연구의 결과는 Shaul 등(2010)의 연구결과와 동일하게 비만군에 있어 대부분의 CLS 대식세포는 CD11c와 MGL1 모두를 발현하며 레지던트 대식세포 역시 약하지만 CD11c 및 MGL1을 발현하였다<Fig. 4>. 이와 같은 결과는 CD11+ MGL1-는 CLS 대식세포의 표식인자로 적합하지 않음을 의미한다. 이처럼 기존의 연구 결과들과 본 연구결과의 차이는 기존의 연구들이 삼중 염색법이 아닌 단일 염색법을 이용하여 찾고자 하는 단백질이 대식세포에서 발현되는지를 직접적으로 검증하지 못했고 적합하지 않은 농도의 항체를 지방조직 염색에 이용했기 때문으로 사료된다. CLS 대식세포의 역할과 염증성 사이토카인의 분비 여부를 밝히기 위해 CLS 대식세포에서 특이적으로 발현되는 표식인자를 찾으려는 다양한 노력들이 시도되었으나 확실한 표식인자는 지금까지 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 CLS 대식세포의 표식인자를 찾기 위해 LYVE-1 항체를 이용하였다. LYVE-1은 림파틱 혈관의 표식인자로 알려졌으며(Banerji et al., 1999), LYVE-1 유전자 발현을 제거한(knock out) 마우스는 림파틱 배설의 발달 및 기능에 영향을 미치지 않아 LYVE-1의 기능은 아직 정확히 알려지지 않았다(Gale et al., 2007). 그러나 지방의 대식세포가 LYVE-1을 발현하며, LYVE-1+ 대식세포는 VEGF(vascular endothelial cell growth factor), SDF-1(stromal cell derived factor-1), MMP(matrix metalloproteinases)-2와 MMP-9 등을 분비함으로써 지방내 혈관 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다(Cho et al., 2007). 또한 CD11c+MGL1mid 대식세포에서 LYVE-1의 mRNA 발현이 CD11b+MGL1- 대식세포에 비해 현저하게 감소됨이 보고되었으나(Shaul et al., 2010), 단백질 수준에서는 검증된 바가 없다. 따라서 CLS 대식세포의 표식인자로써 LYVE-1의 발현여부를 확인하기 위해 지방을 CD11c, F4/80 그리고 LYVE-1 항체를 이용하여 삼중염색을 시행하여 관찰하였다. 흥미롭게도 LYVE-1은 통제군과 비만

군 지방내 대부분의 레지던트 대식세포에서 발현하였으나 CD11c 및 MGL1과는 달리 비만군의 CLS 대식세포에서는 전혀 발현되지 않았음을 처음으로 확인하였다(Fig. 5). 이는 F4/80+CD11c+ 대식세포를 LYVE-1의 발현여부에 의해 레지던트 대식세포 또는 CLS 대식세포로 분리할 수 있는 유용한 표식인자로써 사용될 수 있음을 의미한다.

지구성 운동은 비만군의 지방내 염증성 사이토카인의 분비를 감소시키고, 인슐린 민감도를 증가시키며, 대식세포의 표식인자(marker)로 사용되는 F4/80 mRNA의 발현을 감소시키는 것으로 알려져 왔다(Bradley et al., 2008; Bruun et al., 2006; Vieira et al., 2009). 그러나 F4/80 mRNA의 감소가 대식세포의 수의 감소를 의미하는지 아니면 대식세포의 F4/80 mRNA 자체의 감소를 의미하는지는 확실치 않다. 또한 F4/80은 레지던트 대식세포와 CLS 대식세포 모두에서 발현되므로 지구성 운동이 두 대식세포의 mRNA의 발현을 모두 감소시키는지 또는 CLS 대식세포의 축적만을 감소시키므로써 M1에 가까운 특성을 갖는 대식세포의 축적을 특이적으로 조절하는지에 대해서도 알려지지 않았다. 더욱이 CLS 대식세포의 일부에서 발견되는 거품세포에 있어서도 지구성 운동의 역할은 확인되지 않았다. 2 주간의 자발적 wheel 런닝 운동은 마우스 복강내 대식세포의 콜레스테롤 방출(efflux)을 증가시키며(Meissner et al., 2010), 또한 지구성 운동은 근육조직의 CD36의 발현을 감소시키므로써 고지방 식이에 의한 근육내 지방축적을 감소시킨다(Smith et al., 2007). 따라서 지구성 운동이 복강내 대식세포 및 근육세포에서처럼 죽은 지방조직으로부터 지질을 흡수에 중요한 역할을 담당하는 CD36의 발현을 감소시키거나 거품세포로부터 콜레스테롤 방출을 증가시켜 M1의 성격을 갖는 것으로 알려진 거품세포를 포함한 CLS 대식세포의 형성을 억제한다면 이는 지구성 운동을 통한 비만군의 지방내 염증발현을 감소시키는 새로운 기전을 밝힐 수 있다는 점에서 운동생리학적으로 중요한 의미를 가질 수 있다. 따라서 LYVE-1은 향후 지구성 운동이 비만군 지방내 레지던트 및 CLS 대식세포의 화학주성 및 염증발현 그리고 식작용 등을 포함한 다양한 기능에 미치는 영향을 밝히는데 있어 유용한 표식인자로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

비만군은 지방내 TNF- α , IL-1b 그리고 Cox-2등의 염증성

사이토카인의 발현 증가를 가져오며 혈관의 ICAM-1 및 VCAM-1 증가와 더불어 대식세포 및 CLS의 수를 유의하게 증가 시켰다. CLS 대식세포는 F4/80과 CD11c를 발현하였고 기존에 알려진 바와는 달리 MGL1 역시 발현하였다. 따라서 MGL1은 CLS 대식세포의 표식인자로서의 적합하지 않았다. 그러나 지방내 대식세포의 또 다른 표식인자인 LYVE-1은 통제군과 비만군의 레지던트 대식세포에서는 모두 발현하였으나 특이하게도 비만군의 CLS 대식세포에서는 그 발현이 발견되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 CLS 대식세포의 새로운 표식인자로써 F4/80+CD11c+LYVE-1-을 사용할 수 있음을 처음으로 확인하였다. 이와 같은 결과는 비만군의 지방내 레지던트 대식세포 및 CLS 대식세포를 따로 분리하여 그 역할과 특징을 향후 분석할 수 있는 중요한 표식인자로써 활용될 수 있고 또한 지구성 운동이 레지던트 대식세포 및 CLS 대식세포에 미치는 영향을 규명하는데 있어 유용한 방법으로써 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., & Jackson, D. G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Biol. Chem.*, 144: 789-801.
- Bradley, R. L., Jeon, J. Y., Liu, F. F., & Maratos-Flier, E. (2008). Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295(3): E586-E594.
- Bruun, J. M., Helge, J. W., Richelsen, B., & Stallknecht, B. (2006). Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 290(5): E961-E967.
- Cho, C. H., Koh, Y. J., Han, J., Sung, H. K., Lee, H. J., Morisada, T., Schwendener, R. A., Brekken, R. A., Kang, G., Oike, Y., Choi, T. S., Suda, T., Yoo, O. J., & Koh, G. Y. (2007). Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ. Res.*, 100(4): e47-e57.

- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.*, 46(11): 2347-2355.
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumie, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53: 1285-1292.
- Ferrandez, M. D. & De la Fuente, M. (1999). Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta. Physiol. Scand.*, 166: 47-53.
- Forner, M. A., Barriga, C., & Ortega, E. (1996). Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J. Appl. Physiol.*, 80: 899-903.
- Forner, M. A., Collazos, M. E., Barriga, C., De La Fuente, M., Rodriguez, A. B., & Ortega, E. (1994). Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mech. Ageing Dev.*, 75: 179-189.
- Gale, N. W., Prevo, R., Espinosa, J., Ferguson, D. J., Dominguez, M. G., Yancopoulos, G. D., Thurston, G., & Jackson, D. G. (2007). Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol. Cell Biol.*, 27(2): 595-604.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 23-35.
- Herbert, D. R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B., Forster, I., & Brombacher, F. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20: 623-635.
- Kevil, C. G., Patel, R. P., & Bullard, D. C. (2001). Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281(5): C1442-C1447.
- Lu, Q., Ceddia, M. A., Price, E. A., Ye, S-M., Woods, J. A. (1999). Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. *Am. J. Physiol.*, 276: R482-R489.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.*, 117(1): 175-184.
- Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J., & Saltiel, A. R. (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatio-temporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*, 57(12): 3239-3246.
- Meissner, M., Nijstad, N., Kuipers, F., & Tietge, U. J. (2010). Voluntary exercise increases cholesterol efflux but not macrophage reverse cholesterol transport in vivo in mice. *Nutr. Metab.*, 7: 54-60.
- Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P., & Beschin, A. (2004). Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.*, 20: 126-133.
- Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.*, 72: 219-246.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(2): 85-97.
- Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2010). Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes*, 59(5): 1171-1181.
- Smith, A. C., Mullen, K. L., Junkin, K. A., Nickerson, J., Chabowski, A., Bonen, A., & Dyck, D. J. (2007). Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293(1): E172-281.
- Sugiura, H., Sugiura, H., Nishida, H., Inaba, R., Mirbod, S. M., Iwata, H. (2001). Effects of different durations of

- exercise on macrophage functions in mice. *J. Appl. Physiol.*, 90(3): 789-794.
- Takahashi, H., Tsuda, Y., Takeuchi, D., Kobayashi, M., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Critical Care Medicine*, 32: 1879-1885.
- Vieira, V. J., Valentine, R. J., Wilund, K. R., Antao, N., Baynard, T., & Woods, J. A. (2009). Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 296(5): E1164-E1171.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112: 1796-1808.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 112: 1821-1830.
- Yago, T., Tsukuda, M., & Minami, M. (1999). P-selectin binding promotes the adhesion of monocytes to VCAM-1 under flow conditions. *J. Immunol.*, 163(1): 367-373.

K C I

논문투고일 : 2013. 05. 26
심사일 : 2013. 07. 10
심사완료일 : 2013. 08. 10