

Protease antigen recovery의 B-Cell에 대한 비특이반응 유발

김옥진¹ · 이성준²

¹미국 농무부 동물질병연구소, ²경북대학교 수의과대학

Protease antigen recovery induces non-specific reaction in B-Cells

Okjin Kim¹, Seong Joon Yi²

¹USDA-ARS, Animal Disease Research Unit, WSU, Pullman, WA 99164, USA,

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Republic of Korea

Abstract: Antigen retrieval (AR) techniques were widely used to recover the antigenicity from the fixed tissues, which were guided by the philosophy of rendering immunohistochemistry (IHC) applicable to routine formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for wide application of IHC in research and clinical filed for morphological observation like as anatomy, histology and pathology. Protease antigen recovery (PAR) is an AR technique, which is obtained the antigen retrieve by using enzyme digestion, and commonly used in IHC field. However, during the IHC for the detection of ovine herpesvirus 2 (OvHV-2) antigen, we noted lymphocyte-like cells-specific staining in the infiltrated cells into various organs like as liver and kidney, which was also shown in the IHC tissues with isotype control. However, those signals were not observed in the tissues conducted with *in situ* hybridization. Therefore, we analyzed the specificity of the IHC detection results. We found that PAR may induce false-positive result during IHC in lymphocyte-like cells, which were infiltrated mainly around vessels and in interstitial tissues. Through the Phenotyping, we realized that those false-positive cells were B-cell-related cells. These results suggest that PAR, a AR using protease, may induce non-specific false-positive reactions during IHC.

Key words: antigen retrieval technique, immunohistochemistry, protease

서 론

Immunohistochemistry (IHC)는 형태학적 관찰을 허용하며, 조직 내 항원의 분포를 확인할 수 있는 유용한 방법으로, 일련의 기술적인 진보들에 기초하여 해부학, 조직학 및 병리학 등의 형태학의 영역에서 널리 이용되고 있다. 조직의 형태를 고정하기 위하여 많은 종류들의 고정제가 사용되고 있으나, 10% buffered formalin이 고정 효과가 뛰어나고, 그 사용이 용이하기 때문에, 이들 형태학의 영역에서 널리 사용되고 있으며, 조직의 포매제로는 사용이 용이하고, 경제적인 paraffin이 많이 이용되고 있다.^{1,2} 10% buffered formalin에 함유되어 있는 formaldehyde는 methylene glycol [CH₂(OH)₂]의 형태로 존재하며, hydroxymethyl compound R-CH₂(OH)가 조직에서 더 많은 H 원자와 결합하여 methylene bridge [R-CH₂-R']을 형성함으로써, 조직의 단백질들이 강하게 결합하여, 조직의 고정효과를 얻는 것으로 알려져 있다.² 그러나, formaldehyde는 항원의 변성을 유발하기 때문에, formalin 고정된 파라핀 절편 조직을 이용한 IHC는 때때로 일관성 있는 항원-항체

반응을 얻지 못하는 경우가 발생한다.^{3,4} 이러한 이유로, formalin으로 고정하고 paraffin 포매 된 조직들을 이용한 IHC의 항원-항체반응을 보다 높이기 위한 방법들이 계속적으로 연구되고 있다. 이러한 노력들은 크게, formalin을 대체하는 다른 효과적인 고정제를 개발하려는 분야와 기존의 formalin 고정된 조직으로부터 항원의 효과를 극대화하려는 antigen retrieval technique (AR)의 개발 분야로 나누어 볼 수 있다. Formalin을 대체할 수 있는 새로운 이상적인 고정제의 개발 시도는 지난 20년 동안 계속되어왔으나, 사용의 용이성과 경제성에서 현재까지는 formalin을 대체하지 못하고 있다.¹ 따라서, 형태학의 영역에서 통상적으로 이용되고 있는 formalin 고정된 조직으로부터, 항원의 효과를 극대화하려는 AR의 개발은 IHC 분야 연구의 주된 관심분야가 되고 있다.⁵ IHC에 보편적으로 사용되는 AR로는 protease와 같은 단백질의 효소분해를 통한 방법이 주로 이용되고 있으며,⁶ 다른 방법으로는 가열이나 갈알칼리 용액을 가하는 방법으로 항원성을 회복시키는 방법들 또한, 개발되어 사용되고 있다.^{7,8}

본 연구는 formalin 고정된 조직의 antigen recovery를 위하여 사용되는 AR 방법 중, 널리 이용되고 있는 protease를 이용한 AR 방법에 의하여 비특이반응이 유발되는 것을 확인하고, 이들 비특이반응을 보이는 세포들의 phenotype을 알아보고자 수행되었다.

재료 및 방법

Preparation of tissue slides

Malignant catarrhal fever (MCH)로 의심되는 9개월령 수컷 Holstein heifer cattle (Animal No. 60446)의 포르말린 고정된 장기들을 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀포매한 후 4 μ m 두께로 절편하여 H & E 염색하고 병리조직학적 검사를 실시하였다. 별도의 4 μ m 두께로 절편된 조직들은 immunohistochemistry (IHC) 및 *in situ* hybridization (ISH)을 위하여, Superfrost® slide (Fisher, USA)에 준비하였다.

Immunohistochemistry

IHC는 protease를 사용한 antigen recovery를 거친 후, ABC 방법을 사용하였으며, 이의 과정은 다음과 같다. 준비된 조직을 탈파라핀 후 합수과정을 거쳐 3% H₂O₂에 30분간 전처리하고, 0.01 M PBS로 2회 세척한 후, protease K (Roche, USA)을 100 μ g/ml로 조직에 적용 후 37°C에서 20분간 반응하고, 0.01 M PBS로 2회 세척한 후, 1.5% normal horse serum으로 30분간 처리하였다. MCF의 병원체 ovine herpesvirus 2 (OvHV-2)의 capsid protein에 특이적인 단클론 항체 155-A를 100배 희석하여 적용하고 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 0.01 M PBS로 2회 세척한 후, Vectastain® Elite ABC Kit (Vector, USA)를 이용하여 biotin-conjugated anti-mouse IgG를 상온에서 30분 적용하였다. PBS로 3회 세척 후 avidin-biotin complex액을 적용하여 상온에서 30분간 반응하고, PBS로 세척 후 peroxidase의 기질인 DAB로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

In situ hybridization

OvHV-2의 특이 DNA 검출을 위한 ISH는 digoxigenin-labeled probe를 사용하여 수행되었으며,⁹ 이의 과정을 간략히 설명하면 다음과 같다. OvHV-2에 특이적인 556 및 555 primer를 사용한 PCR을 통하여 238 bp의 OvHV-2 특이 핵산증폭물을 얻었다.¹⁰ 이 후, Wizard DNA purification system® (Promega, USA)을 이용하여 purification한 OvHV-2 PCR 핵산증폭물을 Digoxigenin (DIG) DNA labelling and detection kit® (Roche, USA)로 임의 표지하여 시험에 사용될 probe를

준비하였다. 준비된 조직을 탈파라핀 후 합수과정을 거치고, 단백질 분해과정과 후고정 과정을 거친 후, 0.25%의 acetic acid를 함유한 Triethanol-HCl에서 acetylation과정을 거쳤다. Digoxigenin-labelled DNA probe를 1 ng/ μ l 농도로 standard hybridization buffer (4 \times SSC Buffer, 50% Deionized formamide, 0.1% lauryl sulfate, 1 \times Dendhart soln, 0.4 mg/ml Salmon sperm DNA, 10% Dextran sulfate)로 희석하여 95°C에 10분간 denaturation시킨 후 바로 얼음에 정제 후, 50 μ l를 준비된 slide에 적용하고, 45°C humidified oven에서 15-16 시간동안 hybridization 과정을 수행하였다. 이후, anti-digoxigenin-AP에 반응시키고, alkaline phosphatase의 기질인 NBT/BCIP (Roche, USA)를 섞어 발색시킨 후 methyl green으로 배경염색하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

Identification of non-specific reaction by PAR

Protease antigen recovery (PAR)에 의한 비특이반응의 유발을 확인하기 위하여, 간장, 신장, 임파절 및 비장의 조직을 면역염색을 위한 방법으로 Superfrost® slide (Fisher, USA)에 준비하였다. Isotype antibody와 OvHV-2-specific 155-A 두 종류의 항체를 이용하여, 각각 protease K 농도가 0, 50, 100 및 200 μ g/ml로 PAR을 실시하였다. 다른 과정은 위에 설명한 IHC의 방법과 동일하였다.

Phenotyping

PAR에 의하여 유발된 비특이반응을 보이는 세포들의 phenotyping을 위하여, B-cell specific BAQ155A antibody (VMRD, USA), T-cell specific BAQ136A antibody (VMRD, USA), monocyte specific BAQ151A antibody (VMRD, USA)를 사용하여 IHC를 실시하였다.

결 과

Histopathological findings

병리조직학적검사 결과, 신장, 간장, 폐장, 소장 등의 전신 장기에 임파구의 증식 및 침윤(Fig. 1), 혈관염 및 혈관의 섬유소성 괴사 소견이 관찰되었다. 식도, 위, 소장 및 대장 등의 소화기 점막에서는 심한 괴사와 염증세포침윤이 관찰되었다.

Immunohistochemistry and in situ hybridization

IHC의 결과, 신장의 사구체 주위 및 간질 조직에 침윤된 임파구양 세포들에서 DAB에 강한 반응이 관찰되었다(Fig. 2). 이러한, 반응은 비장 및 임파절의 일부 세포들에서도 또한 관찰되었다. ISH의 결과, IHC에서 관찰된 신장, 비장 및 임파절의 반응은 관찰되지 않았다(Fig. 3).

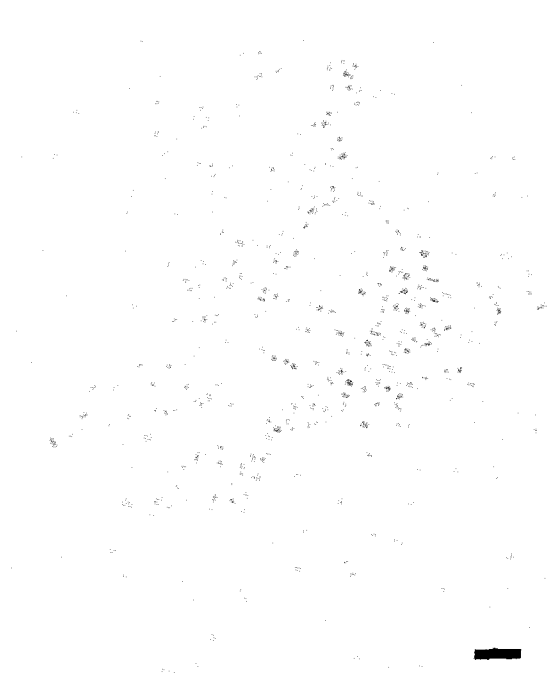


Fig. 1. Liver; cow infected with malignant catarrhal fever. Lymphoid cells are infiltrated in the periportal area. H&E, Bar=80 um.

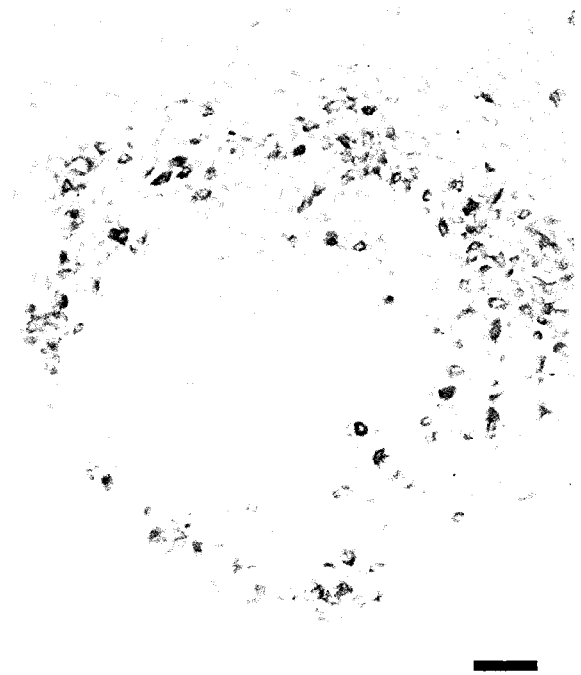


Fig. 2. Kidney; cow infected with malignant catarrhal fever. Immunohistochemistry for the detection of OvHV-2 capsid antigen. DAB-colored cells are detected among the infiltrated cells. ABC method, Bar=80 um.



Fig. 3. Kidney; cow infected with malignant catarrhal fever. *In situ* hybridization for the detection of OvHV-2 capsid protein-encoding gene. Note no signals among the infiltrated cells. NBT/BCIP, Methyl green counter stain, Bar=80 um.

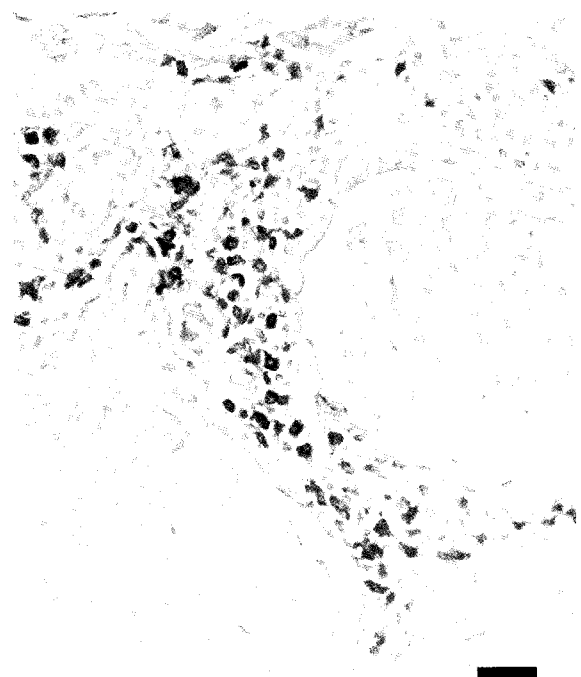


Fig. 4. Kidney; cow infected with malignant catarrhal fever. The DAB-colored cells in IHC were reacted with B-cell specific antibody-BAQ155A. Bar=80 um.

Table 1. Results of identification of non-specific reaction by protease antigen recovery

Antibody	Organ	Concentration of protease K (ug/ml)			
		0	50	100	200
Isotype	Liver	-	-	+	+
	Kidney	-	+	++	++
	Spleen	-	+	+	++
	Lymph N.	-	+	+	++
155A	Liver	-	+	+	++
	Kidney	-	+	++	+++
	Spleen	-	+	+	++
	Lymph N.	-	+	+	++

-. no colorized cells, +: mild, ++: moderate, +++: strong.

Non-specific reaction by PAR

IHC의 결과, 관찰된 DAB의 발색반응이 특이반응인지를 확인하고자 ISH를 실시한 결과, 이들 반응이 비특이반응으로 판단되었다. 이러한 비특이반응이 PAR에 의하여 유발되는지를 확인하고자, protease를 여러 농도로 적용 후, 실시한 IHC의 결과는 Table 1과 같다. Protease를 적용하지 않은 조직에서는 입파구양 세포에서 DAB의 발색반응을 관찰할 수 없었다. 반면, protease를 적용한 조직들에서 protease 농도가 증가할 수록 입파구양 세포들에서 DAB의 발색반응이 강하게 관찰되었다(Table 1).

Phenotyping of non-specific cells

PAR에 의하여 유발된 비특이반응을 보이는 입파구양 세포의 phenotype을 알아보기 위하여, 각각 B-Cell, T-Cell 및 monocyte specific antibody를 사용하여 IHC를 실시한 결과, 이들 세포들이 B-Cell specific antibody-BAQ155A에 반응하는 세포들임을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

항원-항체 반응은 IHC 과정동안 일어나며, formalin과 같은 고정제에 의한 항원의 변형은 종종 IHC의 일관성 없는 결과를 유발한다. 고정된 조직으로부터, 항원을 변형 전으로 회복시키려는 AR 방법들은 IHC의 연구분야에서 주된 관심 분야이며, 개발된 몇몇 방법들은 현재 IHC의 수행과정 동안에 흔히 이용되고 있다.^{4,11} Protease와 같은 효소를 이용하여, antigen recovery를 얻는 방법 (PAR)은 그 기전은 정확히 모르지만 고정제 또는 포매에 의하여 원인이 된 조직내 단백질들의 complex 형성(protein folding)을 단백질 분해 과정 동안에 풀어줌으로서 항원인식 부위를 제공하여, 항체와의 반응이 가능하도록 도와주는 것으로 파악되고 있다. 또한, PAR은 비

항원성 전구물질을 면역활성물질로 전환시켜주고, 포매 동안에 형성된 plastic monomer들과 항원물질들 사이의 결합을 끊어주어 antigen recovery를 얻는 것으로 알려져 있으며, 그 과정이 간략하고 적용이 용이하기 때문에 PAR은 IHC에 널리 이용되고 있다.^{1,12} 비록 PAR이 널리 이용되고, 매우 성공적인 antigen recovery를 얻는 방법이기도 하지만, 고정기간이나 조직의 종류, 검출하려는 항원의 종류 등의 요소에 따라, 효소의 농도 및 반응시간의 적절한 조건을 찾아야 되는 것으로 알려져 있으며, 또한, 과도한 효소의 처리는 조직 단백질의 분해에 의한 의양성(false-positive) 반응을 유발할 수 있음이 지적되고 있다.⁵

본 연구에서 PAR은 B-Cell 유래의 세포들에 의양성 반응을 유발할 수 있음이 확인되었다. 이러한 원인에 대한 명확한 기전은 알 수 없으나, protease에 의하여 유도되는 단백질 분해 과정 동안, B-cell 유래의 plasma cell 등의 세포질내 immunoglobulin이 노출되어 IHC 과정동안 항체와 비특이적인 반응을 유발하는 것으로 추측되어진다. 이러한 연구결과를 antigen retrieve를 위하여, IHC에 PAR을 사용하는 경우에, 입파구들에서 나오는 양성반응에 대하여, 의양성 반응 여부를 신중히 평가해보아야만 한다는 것을 시사해준다. 또한, 이러한 경우에, PAR과 다른 AR 방법들을 시도해보는 것도 고려하여야 한다는 것을 말해주고 있다.

참고문헌

1. Larsson LI. Immunohistochemistry: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, USA, 1988.
2. Montero C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 51:1-4, 2003.
3. Leong ASY, Gilham PN. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens.

- Pathology **21**:266-268, 1989.
4. Shi S-R, Cote RJ, et al. Antigen retrieval techniques: Current perspectives. *J Histochem Cytochem* **49**:931-937, 2001.
 5. Taylor CR, Cote RJ. Fixation, processing, special applications. *In: Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist. Major problems of in pathology.* 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, USA, 1994.
 5. Juang SM. Immunohistochemical demonstration of hepatitis 3 core and surface antigens in paraffin sections. *Lab Invest* **33**:88-95, 1975.
 7. Brown RW, Chirala R. Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* **3**:515-520, 1995.
 8. Werner M, von Wasielewski R, et al. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* **105**:253-260, 1996.
 9. Kim O, Chae C. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can J Vet Res* **66**:112-116, 2002.
 10. Li H, Shen DT, et al. Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **33**:2048-2053, 1995.
 11. Shi SR, Cote RJ, et al. Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present, and future. *J Histochem Cytochem* **45**:327-343, 1997.
 12. Bak PM, Panos RP. Protease antigen recovery decreases the specificity of Bromodeoxyuridine detection in formalin-fixed tissue. *J Histochem Cytochem* **45**:1165-1170, 1997.