

흰쥐 뇌에 분포하는 항원제공세포의 연령에 따른 변화

정 호 석, 유 기 수¹, 김 형 동

동아대학교 의과대학 신경외과학교실, ¹해부학교실

간추림 : 면역반응에 필요한 T세포의 활성화를 위해서는 주조직적합복합체 (major histocompatibility complex [MHC]) class II 분자를 그들의 세포표면에 출현시킬 수 있는 항원제공세포가 필요하다. 정상 뇌에도 항원제공세포인 큰포식세포와 수지상세포가 존재한다는 일부 보고가 있으나 이 세포들의 분포 상태 뿐 만 아니라 연령에 따른 세포 수 및 형태의 변화에 대해서 보고된 바 없는 실정이다. 그러므로 본 연구자들은 연령에 따른 항원제공세포의 수 및 형태학적인 변화를 면역조직화학적 방법으로 밝히고자 본 연구를 시도하였다.

실험동물로는 생후 1개월(250 g), 12개월(700 g) 및 24개월(1,000 g)된 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)계를 연령별로 5마리씩 모두 15마리를 사용하였다. 동물을 마취시킨 상태에서 뇌를 적출하여 rat brain matrix (RBM)에 넣고 면도날로 뇌하수체의 정중상을 통과하는 관상절단 뇌절편을 만든 후 탄산가스로 동결고정하였으며 동결절편기를 사용하여 연속조직절편을 제작한 후 면역조직화학염색을 시행하였다.

항원제공세포들은 흰쥐 뇌의 맥락열기와 백색질에서 관찰되었으며, 나이가 많아짐에 따라 항원제공세포의 수는 점차 증가되었다. 큰포식세포의 수는 수지상세포보다 연령 및 구역에 관계없이 항상 많았다. 연령이 증가함에 따라 항원제공세포들의 세포질돌기 분지양상은 더욱 복잡해졌고, 일부 세포들은 군집을 이루었다.

이상의 결과로 미루어 보아 항원제공세포들의 수적증가와 형태변화는 이들 세포로 하여금 항원과의 접촉기회를 증가시킴으로써 세포의존성 면역반응의 효율성 증대에 지대한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 수지상세포, 큰포식세포, 항원제공세포, 노화, 흰쥐, 뇌

서 론

수지상세포 (dendritic cell)와 큰포식세포 (macrophage)는 같은 단핵백혈구계열에 속하는 세포이지만 시험관에 부착하는 성질, 핵 및 세포질돌기의 형태, 항원발현세포로서의 기능, 용해소체 (lysosome)의 활성도 그리고 탐식능력 등에서 서로 다르다 (Steinman과 Nussenzweig 1980). 그럼에도 불구하고 많은 학자들은 두 세포가 면역반응에 필요한 잠재적 면역 자극세포 또는 보조세포인 항원제공세포 (antigen presenting cell)라는 점에서 같은 부류의 세포군으로 취급하고 있다 (van Voorhis 1983, Jenkins 1995).

항원제공세포는 항원을 세포 내에서 처리한 다음,

소포체 (endoplasmic reticulum)에서 합성된 주조직적합복합체 (major histocompatibility complex[MHC]) class II 분자에 결합시켜 T세포에 제공함으로써 T세포의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Austyn과 Wood 1993).

대부분의 학자들은 큰포식세포가 면역반응의 주된 항원제공세포라고 생각해 왔지만 Steinman과 Cohn (1973)이 생쥐의 비장에서 최초로 수지상세포를 분리한 이후 최근 여러 학자들은 수지상세포가 다른 항원제공세포에 비해 T세포 의존성 면역반응에 있어서 가장 효과적인 항원제공세포로 간주하고 있다 (Bronstein 등 1983, Steinman 1991).

국제 세망내피학회 용어위원회 (Reticuloendothelial Society Committee on the Nomenclature)는 수지상세포를 출현부위 및 세포막특성에 따라 다음과 같은

교신저자: 김형동 (동아대학교 의과대학 신경외과학교실)
전자우편: hdkim@dau.ac.kr

3종류의 세포군으로 분류하였다(Tew 1982). 첫째 부류는 피부에 분포하는 랑게르한스세포(Langerhans cell)와 뇌를 제외한 대부분의 장기에 존재하는 수지상세포를 간질수지상세포(interstitial DC)라고 하였고, 둘째는 혈액 내에 있는 혈액 수지상세포(blood DC)와 림프 내에 존재하는 장막세포와 같은 수지상세포를 순환수지상세포(circulating DC)라고 하였으며, 셋째는 T세포지역 및 가슴샘속질에 분포하는 깎지수지상세포(interdigitating DC)와 종자중심(germinal center)내에 위치한 소포수지상세포(follicular DC) 등 림프기관 내에 존재하는 수지상세포를 림프성수지상세포(lymphoid DC)라고 분류하였다. 따라서 수지상세포는 신체내 전 부위에 걸쳐 광범위하게 분포하면서 T세포에 항원을 제공하기 위해 특수하게 분화되어 있는 세포군이라고 할 수 있다.

이러한 수지상세포들은 항원을 처리한 후 혈액이나 림프액을 통해 림프기관으로 이주해 가서 T세포에 항원을 제공하기 때문에 존재하는 부위에 관계없이 기능적으로 유사하다고 할 수 있다. 신체 내에서 수지상세포들은 비록 분명한 계통을 이루고 있지만 각 장기, 미세환경 조건(microenvironmental condition), 발생단계(developmental stage) 및 기능적 상태(functional status)에 따라 다양한 표현형을 구성하며 복잡한 체계를 이루고 있다(Crowley 등 1989, Crowley 등 1990, Forrester 등 1994).

수지상세포에 대한 지금까지의 연구는 대부분이 *in vitro*에 국한되어 왔고, *in vivo* 연구는 빈약한 형편이다. 그리고 림프성 수지상세포에 대한 연구는 비교적 활발한 편이나 랑게르한스세포를 제외한 다른 간질 수지상세포에 대한 연구는 부진한 실정이다(Hart와 McKenzie 1990, Inaba 등 1993).

큰포식세포는 형태학적 및 기능적으로 이질적인 세포군이다. 큰포식세포는 세포의존성 면역, 염증반응, 조직재생, 맥관 형성, 종양파괴 및 미생물파괴에 관여한다. 또한 큰포식세포는 알파 종양괴사인자(tumor necrosis factor alpha : TNF α)나 산화질산(nitric oxide)과 같은 면역조절물질(immunomodulator)을 분비한다고 알려져 있다. 그러므로 큰포식세포는 면역반응에서 수지상세포의 기능을 하향조절(down regulation)시킬 것으로 추측하고 있다(Holt 1986,

Solbach 1991, Holt 등 1993). 그러므로 어떤 기관의 조직 내에 분포하는 큰포식세포와 수지상세포의 비율은 큰포식세포가 수지상세포의 항원제공기능에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

근래에 항원제공세포 중에서 수지상세포와 큰포식세포에 존재하는 특이항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)가 개발되었으며, 이 중에서 MHC class II 항체는 수지상세포의 세포표면에 존재하는 MHC class II Ia 항원을 감지하는 특성을 가지며(McMaster와 Williams 1979), ED2 항체는 조직 내에 상주하고 있는 큰포식세포 표면에 있는 특이한 항원에 결합하는 성질을 가지고 있어 조직 큰포식세포를 구분 동정할 수 있게 되었다(Dijkstra 등 1985, Beelen 등 1987).

정상 뇌에도 큰포식세포와 수지상세포가 분포되어 있다고 알려져 있으며, 특히 수지상세포를 두개강 내에 투여하여 종양을 치료하는 방법이 제시되어 항원제공세포에 대한 관심이 고조되고 있다(Lotze와 Thomson 2001, Osada 등 2001, Adams 등 2005). 그러나 정상 뇌에서 항원제공세포의 분포 상태 뿐 만 아니라 연령에 따른 세포 수 및 형태의 변화에 대해서 보고된 바 없는 실정이다. 그러므로 본 연구자는 생후 1개월, 12개월 및 24개월 된 흰쥐 뇌에 분포하는 항원제공세포들인 ED2 면역 반응성 큰포식세포와 MHC class II 면역 반응성 수지상세포의 연령에 따른 세포 수 및 형태학적인 변화를 면역세포화학적 방법으로 밝히고자 이 연구를 시도하게 되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 항온 항습이 유지되고 12시간마다 밤낮이 교체되며 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 동일한 조건하에서 사육한 생후 1개월(250 g), 12개월(700 g) 및 24개월(1,000 g) 된 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley)계를 사용하였다. 흰쥐는 각 실험군마다 연령별로 5마리씩 모두 15마리를 사용하였다.

2. 뇌절편 제작

3.5% chloral hydrate (1 mL/100 g)를 주사하여 동물을 마취시킨 상태에서 머리를 분리시킨 뒤 최단 시간 내에 뇌를 적출하였다. 뇌를 rat brain matrix (RBM)에 넣고 면도날로 뇌하수체의 정중앙을 통과하는 관상절단 뇌절편을 만들었다.

3. 표본제작

뇌절편을 탄산가스(CO₂ gas)로 동결고정한 후 동결절편기(cryocut, Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 약 6µm 두께로 조직절편을 제작하고, 이들 조직절편을 poly-L-lysine coated slide에 부착시켰다. 이때 조직절편은 interaural 5.70~6.70 mm 사이를 통과하는 절편만을 선택하였다. 조직절편을 40°C의 조직신전기에서 40분 정도 충분히 말린 다음 4°C에서 4% paraformaldehyde로 5분간 고정하였고, 이를 다시 조직신전기에서 2시간 이상 충분히 말렸다.

4. 면역조직화학적 염색

조직절편을 0.02 M 인산염 완충액(phosphate buffered saline : PBS, pH 7.4)에서 약 10분 동안 2회 세척한 후 조직 내 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 0.3% 과산화수소(H₂O₂)가 포함된 메틸알코올을 첨가시킨 용액에서 20분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 다음 5% 정상 말혈청(normal horse serum)에 30분간 유지하였다. 그 후 조직절편들을 세척하지 않고 가볍게 털어 낸 다음 일차항체인 mouse anti-rat MHC class II antibody (OX6, 희석비율 1 : 500, Serotec, Oxford, UK)와 mouse anti-rat ED2 antibody (희석비율 1 : 500, Serotec, Oxford, UK)를 4°C에서 14~16시간 동안 각각 반응시켰다.

일차항체를 적용시킨 뒤 PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 10분씩 3회 수세한 다음 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex) 용액 (Vector Lab, Burlin-

game, CA, USA)을 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 이어서 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05M Tris-HCl buffer (Tris buffer, pH 7.6)에 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAB, Sigma Co, USA)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직절편의 발색상태를 현미경하에서 확인한 후 Tris buffer, PBS 및 증류수로 각각 10분간씩 차례로 세척한 다음, Harris' hematoxylin으로 대조염색을 하고, 통상적인 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, Warrington, PA, USA)로 봉입하였다.

형광현미경 및 공초점 레이저 주사현미경으로 검경할 조직표본은 일차항체 적용 후 PBS로 10분간 3회 수세하였고, 이어서 이차항체인 horse anti-mouse FITC (희석비율 1 : 100)를 처리한 후, 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역조직 형광염색한 이들 조직을 PBS로 3회 세척한 뒤, Acquimount (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.

5. 검경 및 계수

뇌조직 표본을 광학현미경 (Axiophot, Zeiss, Germany) 및 공초점 레이저 주사현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope; LSM 510, Zeiss, Germany)을 이용하여 검경하였다.

관찰부위는 셋째뇌실 및 가쪽뇌실의 맥락얼기와 대뇌다리 (cerebral peduncle), 뇌들보 (corpus callosum) 및 바깥섬유막 (external capsule) 등의 백색질 (white matter) 이었다.

세포의 계수는 3개의 연령 실험군으로 구분하고 한 개체에서 10개의 표본을 무작위로 선택하여 각 실험군 당 50개의 표본을 250배율 현미경시야에서 단위면적 (mm²) 당 관찰되는 세포수를 계수하였다. 각 실험군의 수적 변화의 통계적 유의성을 확인하기 위해서 이원분산분석 (two-way ANOVA)을 이용

하여 검증하였다.

결 과

흰쥐 뇌에 분포하는 항원제공세포가 연령에 따라 세포 수와 형태가 어떤 변화 양상을 보이는 지를 알아보기 위해 생후 1개월, 12개월 및 24개월 된 흰쥐의 뇌를 대상으로 냉동 연속조직절편을 제작하여 면역조직화학적 염색을 시행한 뒤 양성 면역 반응을 보인 세포를 관찰하고 계수하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. MHC class II 양성 면역반응 수지상세포

1) 연령에 따른 세포수의 변화

(1) 맥락얼기

양쪽의 셋째뇌실 및 가쪽뇌실 맥락얼기에서 관찰되는 MHC class II 양성 면역반응 수지상세포를 계수하였다.

수지상세포는 생후 1개월 때는 평균 23.1개였으며, 생후 12개월 때는 28.9개, 생후 24개월 때는 30.2개로 나이가 증가함에 따라 세포수가 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$, Table 1).

맥락얼기에 위치하고 관찰되는 MHC class II 양성 면역반응 수지상세포는 백색질에 비해 세포수가 전 시기에 걸쳐 약 1.1배 더 많았다 ($p < 0.05$, Table 1).

(2) 백색질

대뇌다리, 뇌들보 및 바깥섬유막 등의 백색질에서 관찰되는 MHC class II 양성 면역반응 수지상세포의 수는 생후 1개월 때는 평균 18.5개였으며, 생후 12개월 때는 21.3개, 생후 24개월 때는 23.4개로 나이에 따라 세포수가 소폭으로 증가하였다 ($p < 0.05$, Table 1).

2) 연령에 따른 세포 형태의 변화

(1) 맥락얼기

맥락얼기에 분포하는 MHC class II 양성 면역반응 수지상세포는 연령이 증가하면서 세포의 염색성

Table 1. The number of MHC class II-immunoreactive dendritic cells in rat brain

Regions	Ages of rat		
	1 Month	12 Months	24 Months
Choroid plexus	23.1*±0.8	28.9*±0.7	30.2*±0.6
White matter	18.5*±0.6	21.3*±0.9	23.4*±0.8

The numbers represent mean±standard deviation. Cells were counted per unit area (mm²) under ×250 magnification on 50 slides in each rat groups. *: $p < 0.05$ on two-way ANOVA

과 형태가 변화하였다. 대부분의 수지상세포는 맥락 뇌실막세포 (choroidal ependymal cell)들 사이에 위치하고 있었다 (Figs. 1~3).

생후 1개월군에서는 염색성이 약한 수지상세포가 많았고, 세포의 크기도 작은 편이었다. 수지상세포의 세포체로 부터 세포질돌기가 양옆으로 뻗어 이웃한 맥락상피세포 (choroidal epithelium)를 감싸고 있었다 (Fig. 1).

생후 12개월군에서 수지상세포는 다소 진한 양성 면역반응성을 보였으며, 대부분의 세포핵들은 둥글고 뚜렷하였다. 수지상세포들은 맥락조직 (tela choroidea)에서도 관찰되었지만 맥락상피층을 따라 일렬로 배열된 경우가 많았다 (Fig. 2). 생후 24개월군에서 수지상세포는 강한 면역반응성을 나타냈으며, 세포질돌기의 분지양상도 더욱 복잡해 졌다. 수지상 세포들은 세포질돌기를 서로 접촉시켜 군집을 이루는 경우가 많았다 (Fig. 3).

(2) 백색질

대뇌다리, 뇌들보 및 바깥섬유막 등의 백색질에서 관찰되는 MHC class II 양성 면역반응 수지상세포도 연령이 증가하면서 세포 형태의 변화가 뚜렷하였다. 대부분의 수지상세포들은 백색질에 광범위하게 분포하였다 (Figs. 4~6).

생후 1개월군의 수지상세포는 양성 면역 반응성이 약했으며, 둥근 핵과 가는 세포질돌기들을 갖고 있었다 (Fig. 4).

생후 12개월군의 수지상세포는 양성 면역 반응성이 강해졌으며, 세포핵은 타원형이 대부분이었으며 불규칙한 세포질돌기들이 주위의 결합조직 내로 들어가 있었다 (Fig. 5).

생후 24개월군에서 수지상세포는 강한 양성 면역 반응성을 나타냈고, 세포질돌기도 길었으며 분지양상도 더욱 복잡해 졌다. 인접한 수지상세포의 세포질돌기는 서로 접촉하여 집단을 이루는 경우가 많았다(Fig. 6).

2. ED2 양성 면역반응 큰포식세포

1) 연령에 따른 세포수의 변화

(1) 맥락열기

양쪽의 셋째뇌실 및 가쪽뇌실 맥락열기에서 관찰되는 양성 면역반응 큰포식세포를 계수하였다.

ED2 양성 면역반응 큰포식세포는 생후 1개월 때는 평균 24.3개였으며, 생후 12개월 때는 29.2개, 생후 24개월 때는 32.5개로 나이에 따라 세포수가 증가하였다($p < 0.05$, Table 2).

맥락열기에 위치하고 관찰되는 ED2 양성 면역반응 큰포식세포는 백색질에 비해 세포수가 전시기에 걸쳐 약 1.1배 더 많았다($p < 0.05$, Table 2).

(2) 백색질

대뇌다리, 뇌돌보 및 바깥섬유막 등의 백색질에서 관찰되는 ED2 양성 면역반응 큰포식세포의 수는 생후 1개월 때는 평균 19.2개였으며, 생후 12개월 때는 23.6개, 생후 24개월 때는 24.7개로 나이가 증가함에 따라 세포수가 증가하였다($p < 0.05$, Table 2).

2) 연령에 따른 세포 형태의 변화

(1) 맥락열기

맥락열기에 분포하는 ED2 양성 면역반응성 큰포식세포는 연령이 증가하면서 세포의 염색성과 형태

가 변화하였다. 대부분의 큰포식세포는 맥락뇌실막 세포(choroidal ependymal cell)들 사이에 위치하고 있었다(Figs. 7~9).

생후 1개월군에서는 큰포식세포의 염색성은 약하였고, 비교적 큰 세포핵을 갖는 세포들이 많았다. 큰포식세포의 세포체로부터 세포질돌기가 양옆으로 뻗어 이웃한 맥락상피세포를 감싸고 있었다(Fig. 7).

생후 12개월군에서 큰포식세포는 다소 진한 양성 면역반응성을 보였으며, 대부분의 세포핵들은 둥글고 뚜렷하였다. 큰포식세포들은 맥락상피를 따라 일렬로 배열된 경우가 많았다(Fig. 8).

생후 24개월군에서 큰포식세포는 강한 면역반응성을 나타냈으며, 세포질돌기의 분지양상도 더욱 복잡해 졌다. 수지상세포들은 세포질돌기를 서로 접촉시켜 맥락뇌실막에서 군집을 이루는 경우가 많았다(Fig. 9).

(2) 백색질

대뇌다리, 뇌돌보 및 바깥섬유막 등의 백색질에서 관찰되는 ED2 양성 면역반응성 큰포식세포도 연령이 증가하면서 세포 형태의 변화가 뚜렷하였다. 대부분의 큰포식세포들은 백색질에 광범위하게 분포하였다(Figs. 10~12).

생후 1개월군의 큰포식세포는 양성 면역 반응성이 약했으며, 크고 둥근 핵과 소수의 짧고 가는 세포질돌기를 갖고 있었다(Fig. 10).

생후 12개월군의 큰포식세포는 양성 면역 반응성이 강해졌으며, 세포핵은 타원형이 대부분이었으며 세포질돌기들이 대부분 길었고 주위의 결합조직 내로 들어가 있었다(Fig. 11).

생후 24개월군에서 큰포식세포는 강한 양성 면역 반응성을 나타냈고, 세포질돌기도 길었으며 분지양상도 더욱 복잡해 졌다. 인접한 큰포식세포의 세포질돌기는 서로 접촉하여 집단을 이루는 경우가 많았다(Fig. 12).

Table 2. The number of ED2-immunoreactive macrophages in rat brain

Regions	Ages of rat		
	1 Month	12 Months	24 Months
Choroid plexus	24.3*±0.5	29.2*±0.3	32.5*±0.6
White matter	19.2*±0.7	23.6*±0.4	24.7*±0.8

The numbers represent mean±standard deviation. Cells were counted per unit area (mm²) under ×250 magnification on 50 slides in each rat groups. *: $p < 0.05$ on two-way ANOVA

고 찰

항원제공세포는 단백항원을 섭취하여 분쇄한 다음 적절한 입체구조를 갖도록 처리하여 소포체에서

합성된 MHC class II 분자에 비공유결합으로 부착시키고, 이 peptide-MHC 복합체를 세포 표면에 발현시키는 역할을 한다(Beckman 1984). 이러한 방법으로 처리된 항원은 T림프구의 세포표면에 존재하는 T세포 수용체(T cell receptor)에 의해 인식될 수 있다. T세포 중에서도 MHC class II 분자를 인식할 수 있는 T세포는 조력 T세포(helper T cell)로서, 이 세포의 특이 수용체와 복합체를 이루게 된다. 이러한 과정은 T세포 활성화에 필수적이다(Young과 Steinman 1990, Deng 1993).

최근 수지상세포는 일차 면역반응(primary immune response)에서 항원제공기능에 관여하는 필수적인 세포로 간주되고 있으며, 이차 면역반응(secondary immune response)에서 항원제공기능은 MHC class II 결정기(determinants)를 가지고 있는 어떠한 세포에 의해서도 수행될 수 있는 것으로 믿고 있다(Schon-Hegrad 1990). 수지상세포는 세포표면에 고농도의 MHC class II 분자를 발현하고 있으며, MHC class II에 제한된 T세포의 감작, 증식 및 분화 뿐만 아니라, 장기이식후 거부반응 그리고 T세포 의존성 항체의 생산 등과 같은 면역반응을 야기한다(Holt 1992, Bhardwaj 1993). 수지상세포는 표면항원특성이 Ia(+), Immunoglobulin(-) 그리고 Thy 1(-)인 세포로서, 탐식능력은 약하지만 mixed lymphocytic reaction (MLR)을 유발하고, 초자 및 프라스탁에 부착하지 않는 성질을 갖는다는 사실이 밝혀졌다(Pure 1988, Clark 1992).

수지상세포는 Steinman과 Cohn(1973)에 의해 생쥐의 림프기관에서 최초로 분리되었다. Tew(1993)에 의해 과거에는 각각 독립된 세포로 인식되어온 랑게르한스세포, 깍지수지상세포 그리고 장막세포 등이 비록 분화단계, 위치 및 미세환경의 차이로 인해 이질성(heterogeneity)을 보이지만, 수지상세포라는 동일한 세포군이라는 사실이 밝혀진 이래로 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(Inaba 1983, Austyn 1987, Hart와 McKenzie 1988). Tew 등(1990)은 수지상세포를 신체내에 널리 퍼져 있는 T cell associated DC 및 고도로 국제화되어 있는 B cell associated DC로 구분하였지만, 일반적으로 수지상세포는 림프성수지상세포, 비림프성 간질수지상세포

및 순환수지상세포로 구분될 수 있다.

수지상세포가 여러 종류로 구분되어도 이 세포는 골수의 단핵구(monocyte)에서 유래한 세포로 믿고 있으며(Bowers와 Berkowitz 1983), 형태학적으로 섬유모세포 그리고 기능적으로 큰포식세포 및 림프구와 유사한 점이 많지만 이들과는 별개의 골수성세포계열(myeloid lineage)을 형성한다(Akasaka 1991).

발생 초기에 출현하는 미숙한 수지상세포는 유도관용(inducing tolerance)에 중요한 역할을 하나, 나중에 출현하는 성숙한 수지상세포는 병원성 항원(pathogenic antigen)에 대한 면역적격세포(immunocompetent cell)의 역할을 한다고 알려져 있어(Lu 1980, Hanson 1981), 성장과정에 따라 MHC class II 면역반응성 수지상세포의 역할이 변함을 추측할 수 있다.

수지상세포의 분포양상은 동물의 종에 따라 다르며 같은 기관일지라도 부위에 따라 다르다고 알려져 있다. McMenamin 등(1994)은 성숙한 흰쥐, 마우스, 사람의 홍채(iris)와 모양체(ciliary body)에 분포하는 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포를 관찰한 결과 흰쥐 홍채의 경우 1 mm²당 평균 400개가 존재하며 홍채의 기저부, 중간부, 가장자리에 따라 차이가 났다고 보고하였다. Schon-Hegrad 등(1991)은 성숙한 흰쥐의 기관지 상피에 분포하는 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포는 큰 기관지의 경우 1 mm²당 평균 600~800개, 작은 기관지의 경우 1 mm²당 평균 75개 정도였고 배쪽부위보다는 등쪽부위에서 그 수가 많다고 보고하였다.

본 연구에서 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포는 연령에 따라 세포수가 점차 증가됨을 알 수 있었다(Table 1). 그리고 관찰한 MHC class II 면역반응성 수지상세포는 다른 조직보다 세포수가 훨씬 적었는데 이는 뇌에 존재하는 혈뇌장벽과 혈뇌척수장벽으로 인한 것으로 추측되어진다. 그리고 수지상세포가 신경섬유와 결합조직으로 구성된 백색질보다는 모세혈관이 더 많은 맥락알기에서 자주 발견되었던 것은 수지상세포는 혈관을 따라 이동한다는 것을 반증한 것이라고 생각된다. 수지상세포는 두 가지의 형태학적인 특징을 가지고 있다. 첫째, 그 이름이 시사하는 바와 같이 불규칙한 모양의 세

포로서, 가시돌기, 곤봉형돌기 및 판상돌기 등과 같은 다양한 형태의 많은 돌기들을 가지고 있고, 둘째, 독특한 세포내 섭취장치로서 세포내섭취액포(endocytic vacuoles)를 가지고 있다(Levine과 Chain 1993, Holt와 Stumbles 2000).

본 연구에서 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포는 전형적인 랑게르한스세포의 형태를 나타냈고, 연령이 높아짐에 따라 다양한 형태의 많은 세포질돌기가 형성되어 불규칙한 모습을 나타내었다. 이와 같은 형태변화는 수지상세포가 항원처리기능을 효율적으로 수행하기 위해 항원과 접촉할 수 있는 세포 표면적을 증가시키기 위한 방법 중의 하나라고 생각된다.

큰포식세포는 세포의존성면역, 염증반응, 조직재생 그리고 맥관형성(angiogenesis)에 효과적인 역할을 담당하며, 종양파괴 및 미생물 파괴세포로도 작용한다(Dijkstra 등 1985, Spencer와 Fabre 1990).

조직 큰포식세포인 ED2 면역 반응성 큰포식세포는 현재까지 림프질 수질, 골수(Holt와 Schon-Hegrad MA 1987), 폐포사이중격, 기관지 연관 림프조직(Schon-Hegrad 1991), 눈의 홍채 및 모양체(McMenamin 2000)에 있는 결합조직에 널리 분포한다고 알려져 있다.

ED2 면역 반응성 큰포식세포는 성숙한 흰쥐(Sprague-Dawley)의 홍채에서 1 mm^2 당 평균 600~800개 정도 분포하여 MHC class II 면역 반응 수지상세포보다 약 1.4배 정도 많다고 한다. 본 연구에서는 약 1.1배 정도 많았다. 또한 이 세포는 단핵구에서 유래하며, 성숙함에 따라 모양도 불규칙해지고, 세포질돌기의 형태와 그 크기도 다양해지며, 세포질 내에는 많은 액포와 용해소체를 갖는다고 한다(Austyn 2000). 본 연구에서 뇌의 ED2 양성 면역 반응성 큰포식세포도 MHC class II 양성 면역반응성 수지상세포와 같이 연령에 따라 숫적으로 증가하며, 그 과정에서 세포 형태의 변화가 뚜렷함을 확인하였다(Table 2). 이와 같은 양상은 연령이 증가함에 따라 항원성 물질과의 접촉을 대비하기 위한 일단의 생체현상으로 여겨진다.

본 연구의 결과는 수지상세포를 두개강 내에 투여하여 종양을 치료하려는 각 종 임상치료에 기초

자료로 이용될 수 있을 것으로 사료되어진다.

참 고 문 헌

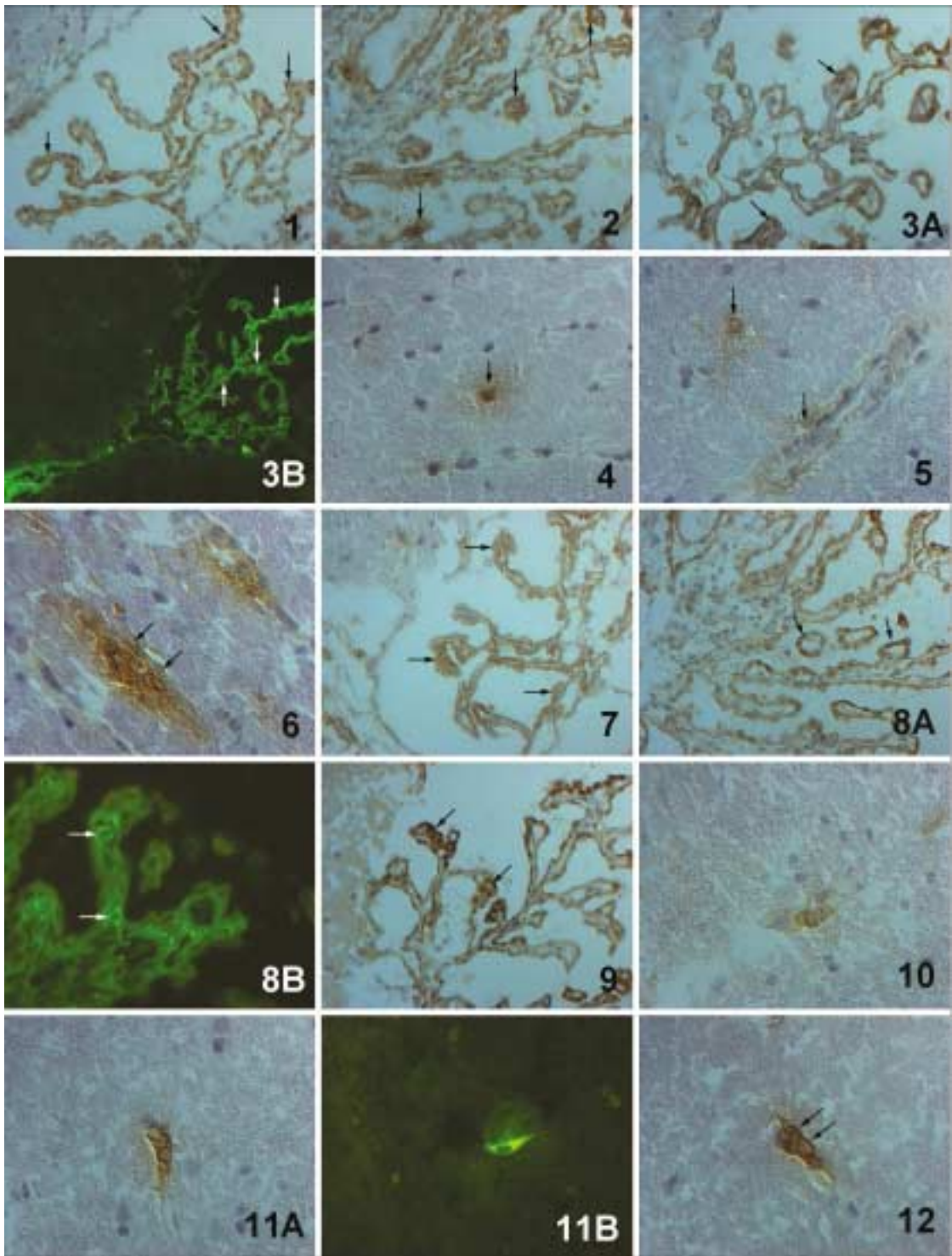
- Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N : Recent advances in dendritic cell biology. *Clin Immunol* 25: 177-188, 2005.
- Akasaka Y, Fujimoto J, Harigaya K, Enomoto Y, Watanabe Y, Hata J : Monoclonal antibody against bone marrow stromal cells its production and characterization. *Acta Pathologica Japonica* 41: 499-505, 1991.
- Austyn JM : Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 162: S146-150, 2000.
- Austyn JM : Lymphoid dendritic cells. *Immunology* 62: 161-170, 1987.
- Austyn JM, Wood KJ : Antigen-presenting cells. In principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press, Oxford, pp 115-177, 1993.
- Beckman IGR, Bradley J, Brooks D, Zola H : Delineation of serologically distinct monomorphic determinants of human MHC class II antigens : Evidence of heterogeneity in their topographical distribution. *Mol Immunol* 21: 205-214, 1984.
- Beelen RHJ, Eestermans IL, Dopp EA, Dijkstra CD : Monoclonal antibodies ED1, ED2, and ED3 against rat macrophages : Expression of recognized antigens in different stages of differentiation. *Transplant Proc*, 109: 3166-3170 1987.
- Bhardwaj N, Young JW, Nisanian AJ, Baggers J, Steinman RM : Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J Exp Med* 178: 633-642, 1993.
- 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, Ruiter 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.
- Clark EA, Grabstein KH, Shu GL : Cultured human follicular dendritic cells : Growth characteristics and interactions with B lymphocytes. *J Immunol* 148: 3327-3335, 1992.
- 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.
- Deng H, Fosdick L, Sercarz E : The involvement of antigen processing in determinant selection by class II MHC and its relationship to immunodominance. *APMIS* 101: 655–662, 1993.
- 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: 589–599, 1985.
- 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.
- Hanson DG : Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. *J Immunol* 127: 1518–24, 1981.
- Hart DNJ, McKenzie JL : Interstitial dendritic cells. *Int Rev Immunol* 6: 127–138, 1990.
- Hart DNJ, McKenzie JL : Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 168: 157–170, 1988.
- Holt PG : Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract : The role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 63: 261–270, 1986.
- Holt PG, Oliver J, Biltk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, Theper T : Down regulation of the antigen presenting cell function (s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 177: 397–407, 1993.
- Holt PG, Oliver J, McMenamin C, Schon-Hegrad MA : Studies on the surface phenotype and functions of dendritic cells in parenchymal lung tissue of the rat. *Immunology* 75: 582–587, 1992.
- Holt PG, Schon-Hegrad MA : Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology* 62: 349–356, 1987.
- Holt PG, Stumbles PA : Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells : The respiratory tract as a paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 105: 421–429, 2000.
- 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, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S : Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody response in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci* 80: 6041–6045, 1983.
- Jenkins MK : The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity* 1: 443–446, 1995.
- Knight SC, Farrant J, Bryant A, Edwards AJ, Burman S, Lever A, Clarke J, Webster V : Non-adherent, low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunology* 57: 595–603, 1986.
- Kraal G, Breeel M, Janse M, Bruin G : Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163: 981–997, 1986.
- Levine TP, Chain BM : Endocytic activity of dendritic cells is similar to other antigen presenting cells. *Adv Exp Med Biol* 329: 11–15, 1993.
- Lotze MT, Thomson AW : Dendritic cells. In DC-based therapies. Academic Press, Boston, pp 559–650, 2001.
- Lu CY, Beller DI, Unanue ER : During ontogeny, Ia-bearing accessory cells or found early in the thymus but late in the spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1597–1601, 1980.
- McMaster WR, Williams AF : Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 9: 426–433 1979.
- McMenamin PG : Optimal methods for preparation and immunostaining of iris, ciliary body, and choroidal whole-mounts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3043–3048, 2000.
- McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG : Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3234–3250, 1994.

- Osada T, Fujimaki T, Takamizawa M, Tsuno NH, Kirino T, Shibata Y : Dendritic cells activate antitumor immunity for malignant intracranial germ cell tumor : a case report. *Jpn J Clin Oncol* 31: 403-406, 2001.
- Pure E, Inaba K, Metlay J : Lymphokine production by murine T cells in the mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 168: 795-800, 1988.
- Rochester CL, Goodell EM, Stoltenborg JK, Bowers WE : Dendritic cells from rat lung are potent accessory cells. *Am Rev Respir Dis* 138: 121-128, 1988.
- Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG : Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airway. *J Exp Med* 173: 1345-1356, 1991.
- Solbach W, Moll H, Rollinghoff M : Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunol today* 12: 4-6, 1991.
- Spencer SC, Fabre JW : Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of rat heart. *J Exp Med* 171: 1841-1851, 1990.
- Steinman RM : The dendritic cell system and its role in immunogenecity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296, 1991.
- Steinman RM, Cohn ZA : Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
- Steinman RM, Nussenzweig MC : Dendritic cells : Features and functions. *Immunol Rev* 53: 127-147, 1980.
- Tew JG : Follicular dendritic cells and dendritic cell nomenclature. *Adv Exp Med Biol* 329: 467-468, 1993.
- Tew JG, Kosco MM, Burton GF, Szakal AK : Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev* 117: 186-211, 1990.
- 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.
- van Voorhis WC, Witmer MD, Steinman RM : The phenotype of dendritic cells and macrophages. *Fed Proc* 42: 3114-3118, 1983.
- Young JW, Steinman RM : Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4⁺ helper T cells. *J Exp Med* 171: 1315-1332, 1990.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Photograph of choroid plexus in the third ventricle of 1 month old rat brain, Cryosectioned brain tissues were immunostained with OX6 antibody for dendritic cells. Dendritic cells (arrows) were showed in brown color and had small nuclei. ×250.
- Fig. 2.** Choroid plexus in the third ventricle of 12 months old rat brain, OX6-positive dendritic cells (arrows) were immunostained strongly. Dendritic cells were arranged along choroidal ependymal cells. ×250.
- Fig. 3.** Choroid plexus in the third ventricle of 24 months old rat brain, (A) Strong immunostained OX6-positive dendritic cells (arrows) were arranged along choroidal ependymal cells. ×250. (B) OX6-positive dendritic cells (arrows) were immunostained with secondary antibody FITC. ×250.
- Fig. 4.** Photograph of white matter in the cerebral peduncle of 1 month old rat brain, OX6-positive dendritic cells (arrows) were immunostained weakly and had small nuclei and short cytoplasmic processes. ×250.
- Fig. 5.** White matter in the cerebral peduncle of 12 months old rat brain, OX6-positive dendritic cells (arrows) were observed in the blood vessel. ×500.
- Fig. 6.** White matter in the cerebral peduncle of 24 months old rat brain, OX6-positive dendritic cells (arrows) were immunostained very strongly and had more complex cytoplasmic processes and aggregated together. ×500.
- Fig. 7.** Choroid plexus in the third ventricle of 1 month old rat brain, ED2-positive macrophages (arrows) were immunostained in brown color and had small nuclei. ×250.
- Fig. 8.** Choroid plexus in the third ventricle of 12 months old rat brain, (A) ED2-positive macrophages (arrows) were immunostained strongly. Macrophages were arranged along choroidal ependymal cells. ×250. (B) ED2-positive macrophages (arrows) were immunostained with secondary antibody FITC. ×250.
- Fig. 9.** Choroid plexus in the third ventricle of 24 months old rat brain, ED2-positive macrophages (arrows) were immunostained strongly. Macrophages were arranged along choroidal ependymal cells. ×250.
- Fig. 10.** White matter in the cerebral peduncle of 1 month old rat brain, A ED2-positive macrophage was immunostained weakly and had small nuclei and short cytoplasmic processes. ×500.
- Fig. 11.** White matter in the cerebral peduncle of 12 months old rat brain, (A) A ED2-positive macrophage had long cytoplasmic processes. ×500. (B) This tissue section was immunostained with secondary antibody FITC. ×500.
- Fig. 12.** White matter in the cerebral peduncle of 24 months old rat brain, ED2-positive macrophages (arrows) were aggregated together. ×500.



Abstract

Age-related Changes of Antigen Presenting Cells in Rat Brain

Ho-Suck Jung, Ki-Soo Yoo¹, Hyung-Dong Kim

Department of Neurosurgery, ¹Department of Anatomy, College of Medicine, Dong-A University

Activation of T cells for an immune response requires the participation of antigen presenting cells that express class II major histocompatibility complex gene products on their surface. As far as we know, there is no study on the age-related changes of ED2 immunoreactive macrophages and MHC class II immunoreactive dendritic cells in the normal rat brain. The aim of the present study is to investigate the age-related changes of dendritic cells and macrophages in rat brain.

The distribution and morphology of the macrophages and dendritic cells in the rat brain were studied from the 1 month-, 12 month- and 24 month-old rats by means of immunohistochemical methods using anti-rat MHC class II and anti-rat ED2 monoclonal antibodies.

Antigen presenting cells were observed in choroid plexuses and white matter of the rat brain. The numbers of antigen presenting cells gradually increased with age. At all age stages and regions of the rat brain, the numbers of ED2 immunoreactive macrophages was higher than that of MHC class II immunoreactive dendritic cells. According as age increases, shapes of antigen presenting cells became more complex and aggregated together.

In conclusion, the above results suggest that the increases of the number and the changes of the morphology in two kinds of the antigen-presenting cells, MHC class II-immunoreactive dendritic cells and ED2-immunoreactive macrophages, with age may influence on effects of cell-mediated immune responses.

Key words : Dendritic cell, Macrophage, Antigen presenting cell, Aging, Rat, Brain