

흰쥐 뇌의 냉동손상 후 항원제공세포와 신경교원섬유산단백의 발현 양상

강미영 · 김강련¹

대구산업정보대학 뷰티스타일리스트과
고신대학교 의과대학 해부학교실¹

Expression Pattern of Antigen Presenting Cells and GFAP in Rat Brain after Cryoinjury

Mi-Young Kang · Kang-Ryune Kim¹

Department of Beauty Stylist, Daegu Polytechnic College University
¹*Department of Anatomy, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea*

Abstract

Background : Traumatic brain injury is a multifaceted injury that involves direct mechanical damage, intraparenchymal and subarachnoid hemorrhage, breakdown of the blood-brain barrier, excitotoxicity, and ischemia. Even though much investigations were performed, acceptable mechanical informations were rare. The aim of this study was to reveal the migration of antigen presenting cells associated with inflammation and the expression pattern of GFAP associated with gliotic scars in cerebral cortex of rats after cryoinjury.

Material & Method : A total of 18 male Sprague-Dawley rats weighing 300 g, 2 months old, were used throughout the experiments. To injure the brain, rats were anesthetized for surgery with 3.5% chloral hydrate(1 ml/100 g, intraperitoneally); the frontal bones were exposed by elevating the skin; and craniectomies were performed adjacent to the central suture, midway between lambda and bregma. A cryoinjury was then created by applying a cold probe (3-mm-diameter steel rod chilled in liquid nitrogen) to the left frontal cortex (ipsilateral cortex) for 1 minute. Rats were sacrificed at 6 hours, 1, 4, 7 and 14 days postsurgery (n=3, per time point), and three rats were sacrificed as normal controls. Serial brain cryosections were made by cryostat. For immunohistochemistry, brain tissue sections were allowed to react with mouse anti-rat MHC class II antibody(1:500), mouse anti-rat ED2 antibody(1:500), and mouse anti-rat GFAP antibody(1:200).

Results : MHC class II positive dendritic cells were absent in normal cerebral cortex parenchyme, but were more 16 times number in injured rats at 7 days after cryoinjury. ED2 positive macrophages were rare in normal cerebral cortex parenchyme, and were more 14 times number in injured rats at 4 days after cryoinjury. GFAP positive astrocytes were not observed in normal rats, and increased suddenly at 4 days rats after cryoinjury. GFAP positive neurons were not expressed in normal rats, and in cryoinjured rats.

Conclusion : In conclusion, the above results suggest that the increases of the number of the two kinds of the antigen-presenting cells affect cell-mediated immune responses and phagocytosis, and GFAP positive cells attends in the formation of gliotic scars.

Key words : Antigen presenting cell, Dendritic cell, Macrophage, GFAP, Cryoinjury, Rat brain

서 론

뇌의 외상은 종합적인 손상으로서 이로 인해 뇌는 직접적인 기계적 손상, 실질내출혈 및 거미막밑출혈

(intraparenchymal and subarachnoid hemorrhage), 혈액뇌장벽 (blood-brain barrier) 파괴, 흥분독성 (excitotoxicity), 그리고 허혈 (ischemia) 등의 광범위한 손상을 입게 된다.¹⁾

지금까지 뇌외상을 유발시키는 실험적 모델로는 액체 타진손상법 (fluid percussion injury method)과 대뇌겉질 충돌손상법 (cortical impact injury method)이 사용되었고, 이와 같은 실험 모델을 이용하여 외상 후 일어나는 신경세포사망, 축삭손실, 미세아교세포 (microglia)의 활성화, 큰포

교신저자 : 김 강 련
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 해부학교실
TEL : 051-990-6411 FAX : 051-990-3081
E-mail : muskrkim@ns.kosinmed.or.kr

식세포의 여과 (filtration), 그리고 별아교세포 (astrocyte)의 반응에 대한 정보를 얻을 수 있었다.²⁻⁵⁾

그러나 위와 같은 방법들은 객관성과 일관성이 부족한 결점을 가지고 있어 이를 극복하기 위해 최근에는 냉동손상법 (cryoinjury method)이 일부 연구자들에 의해 시도되고 있다. 냉동손상법은 액체질소로 냉동시킨 쇠막대를 이용하여 직접 대뇌겉질 (cerebral cortex)에 국소적인 손상과 염증(inflammation)을 유발시키기 때문에 일관성과 객관성을 확보할 수 있는 장점이 있다.⁶⁾

뇌가 손상된 후에 염증반응이 나타나고 회복되는 과정에서 항원제공세포 (antigen presenting cell)인 수지상세포 (dendritic cell, DC)와 큰포식세포 (macrophage)가 출현하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)} 그러나 이 세포들은 정상적인 뇌막 (meninges), 맥락얼기 (choroid plexus), 그리고 뇌 척수액 (cerebrospinal fluid)에는 존재하나 뇌실질 (brain parenchyma)에는 없는 것으로 알려져 있기 때문에 외부에서 손상부위로 이동할 것으로 추정되고 있다.^{9,10)}

수지상세포와 큰포식세포는 같은 단핵백혈구계열에 속하는 세포이지만 시험관에 부착하는 성질, 핵 및 세포질돌기의 형태, 항원발현세포로서의 기능, 용해소체 (lysosome)의 활성도 그리고 탐식능력 등에서 서로 다르다.¹¹⁾ 그럼에도 불구하고 많은 학자들은 두 세포가 면역반응에 필요한 잠재적 면역자극세포 또는 보조세포인 항원제공세포라는 점에서 같은 부류의 세포군으로 취급하고 있다.^{12,13)}

항원제공세포는 항원을 세포 내에서 처리한 다음, 소포체 (endoplasmic reticulum)에서 합성된 major histocompatibility complex (MHC) class II 분자에 결합시켜 T세포에 제공함으로써 T세포의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

대부분의 학자들은 큰포식세포가 면역반응의 주된 항원제공세포라고 생각해 왔지만 Steinman 등¹⁵⁾이 생쥐의 비장에서 최초로 수지상세포를 분리한 이후 최근 여러 학자들은 수지상세포가 다른 항원제공세포에 비해 T세포 의존성 면역반응에 있어서 가장 효과적인 항원제공세포로 간주하고 있다.^{16,17)}

국제세포내피학회 용어위원회 (Reticuloendothelial Society Committee on the Nomenclature)는 수지상세포를 출현부위 및 세포막특성에 따라 다음과 같은 3종류의 세포군으로 분류하였다.¹⁸⁾ 첫째 부류는 피부에 분포하는 랑게르한스세포 (Langerhans cell)와 뇌를 제외한 대부분의 장기

에 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 흉선수질에 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.^{19,20)}

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.^{21,22)}

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)나 산화질산 (nitric oxide)과 같은 면역조절물질 (immunomodulator)을 분비한다고 알려져 있다. 그러므로 큰포식세포는 면역반응에서 수지상세포의 기능을 하향조절(down regulation)시킬 것으로 추측하고 있다.²³⁻²⁷⁾ 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 가지며²⁸⁾, ED2 항체는 조직 내에 상주하고 있는 큰포식세포 표면에 있는 특이

한 항원에 결합하는 성질을 가지고 있어 조직 큰포식세포를 구분 동정할 수 있게 되었다.^{29,30)}

뇌가 손상되면 신경아교세포 (glial scar)가 생겨 신경세포 축삭 재생이 방해받게 되는데 이 때 중간세포단백질이 신경아교세포를 형성시키는 주된 역할을 한다고 알려져 있다.³¹⁾

발생중이거나 성숙한 중추신경계의 특수세포에는 vimentin, nestin 또는 GFAP와 같은 중간 세사가 발견된다.^{32,33)} 이 중 GFAP 양성반응 다능성세포 (multipotent cell)는 손상 자극을 받게 되면 그들의 표현형 (phenotype)이 별아교세포 (astrocyte)로 변형된다.^{34,35)} 그러므로 뇌가 손상 되고 회복되는 과정에서 GFAP에 대한 발현 양상을 추적하면 회복정도를 추정할 수 있을 것으로 생각된다.

중간세사는 일반적으로 세포내 단백질의 약 1%를 차지하지만 각질형성세포나 신경세포에서는 약 85%를 차지한다.³⁶⁾ 중간세사는 직경이 10nm되는 섬유로서 유전자의 DNA 염기서열과 아미노산 구성에 따라 6개의 종류로 분류된다.³⁷⁾ 제 I 형부터 제IV형 그리고 제VI형은 세포질내 중간 세사이고 제V형은 nuclear lamin으로서 핵의 중간세사이다. 사람에서는 50가지 이상의 중간세사 유전자가 존재하며 신체 대부분의 세포에 중간세사가 존재하지만 세포마다 다른 양상으로 발현된다.³⁸⁾ 세포질내 중간세사는 핵 주위에서부터 세포막 쪽으로 방사상으로 배열된 망상구조를 이루는데, 세포의 종류에 따라서 서로 다른 종류와 형태의 망상구조를 갖는다.³⁹⁾

그러므로 본 연구자는 생후 2개월 된 흰쥐 뇌에 냉동손상을 입힌 후 대뇌절질의 파괴 시기와 회복 시기에 따라 항원제공세포들인 MHC class II 양성반응 수지상세포와 ED2 양성 반응 큰포식세포의 이동과정과 중간세사인 GFAP의 발현 양상을 면역세포화학적 방법을 이용하여 밝히고자 이 연구를 시도하게 되었다.

연구대상과 방법

1. 실험동물

실험동물은 항온 항습이 유지되고 12시간마다 밤낮이 교체되며 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 동일한 조건하에서 사육한 생후 2개월(평균 300 g)된 웅성 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였다.

실험군은 냉동손상 후 경과시간에 따라 6시간군, 1일

군, 4일군, 7일군, 14일군으로 분류하였고, 정상군을 실험군에 대한 대조군으로 사용하였다. 흰쥐는 각 실험군마다 3마리씩 모두 18마리를 사용하였다.

2. 냉동손상방법

흰쥐를 3.5% chloral hydrate(1 ml/100 g)로 복강 주사하여 마취시킨 후 두피를 절개하여 머리뼈를 노출시킨 다음 정수리점 (bregma)과 시옷점 (lambda)사이에서 micro motor handpiece (Forte 300, 세신정밀, 대구, 한국)를 이용하여 머리뼈절제 (craniectomy)를 시행하여 왼쪽 이마엽(frontal lobe)을 노출시킨 뒤 액체질소로 미리 얼려 두었던 직경 3 mm 철판대로 1분간 이마엽 표면을 냉동 손상시켰다.

3. 뇌절편 제작방법

3.5% chloral hydrate(1 ml/100 g)를 복강내주사하여 동물을 마취시킨 상태에서 머리를 분리시킨 뒤 최단시간 내에 뇌를 적출하였다. 뇌를 rat brain matrix (RBM)에 넣고 면도날로 냉동손상시킨 이마엽 부위의 중앙을 통과하는 관상절단 뇌절편을 만들었다.

4. 조직표본제작

뇌절편을 탄산가스 (CO₂ gas)로 동결고정한 후 동결절편기 (cryocut, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany)를 사용하여 약 6 μ m 두께로 조직절편을 제작하고, 이들 조직절편을 poly-l-lysine coated slide에 부착시켰다. 조직절편을 40℃의 조직 신전기에서 40분정도 충분히 말린 다음 4℃에서 4% paraformaldehyde로 5분간 고정하였고, 이를 다시 조직 신전기에서 2 시간이상 충분히 말렸다.

5. 면역조직화학적 염색

조직절편을 0.02M 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 말 혈청 (normal horse serum)에 30분간 유치하였다. 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)를 4℃에서 14-16 시간 동안 각각 적용시켰다.

일차항체를 적용시킨 뒤 PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 이어서 이차항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 그 후 조직절편들을 PBS로 10분씩 3회 세척한 다음 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액 (Vector Lab)을 실온에서 1시간동안 적용시켰다. 이어서 이들 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05M Tris-HCl buffer (Tris buffer, pH7.6)에 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAB, Sigma Co, St Louis, MO, USA)와 0.01% 과산화수소가 혼합된 용액으로 처리하여 약 10분간 실온에서 발색시켰다. 조직 절편의 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.

뇌조직을 공초점레이저현미경으로 관찰하기 위하여 일차항체인 mouse anti-rat GFAP antibody (희석비율 1:200, Serotec)를 적용한 다음 이차항체인 horse anti-mouse FITC (fluorescein isothiocyanate, Boehringer Mannheim, Germany)를 실온에서 1시간동안 조직절편에 적용시켰으며, PBS로 10분씩 3회 세척한 뒤 Acquimount (Polysciences, Warrington, PA, 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.

6. 검경 및 계수

뇌조직 표본을 광학현미경 (Axiophot, Zeiss, Hallbergmoos, Germany)과 공초점레이저현미경 (CLSM 510, Zeiss)을 이용하여 검경하였으며 관찰부위는 왼쪽 이마엽의 관상절단면의 대뇌겉질 (cerebral cortex) 이었다.

항원제공세포의 계수는 6개의 실험군으로 구분하고 한 개체에서 10개의 표본을 무작위로 선택하여 각 실험군 당 50개의 표본을 계수하였다. 각 실험군의 수적 변화의 통계적 유의성을 확인 하기 위해서 일원분산분석 (one-way ANOVA)을 이용하여 검증하였다.

결 과

흰쥐 대뇌겉질에 분포하는 항원제공세포들이 국소적인 냉동손상을 받았을 때 이 세포들이 손상부위로 이동하는 양상과 중간세사인 GFAP의 발현 여부를 알아보기 위해 생후 2개월 된 흰쥐의 뇌를 대상으로 냉동 연속조직절편을 제작하여 면역조직화학적 염색을 시행한 뒤 양성 면역 반응성을 보인 세포를 관찰하고 계수하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 수지상세포와 큰포식세포의 세포수의 변화

정상군을 대조군으로 하여 왼쪽 이마엽의 대뇌겉질 뇌실질에 분포하는 세포수를 계수하였다.

MHC class II 양성반응 수지상세포는 정상군에서는 관찰되지 않았고 냉동손상 후 6시간째에는 단위면적당(mm²) 평균 1.0개, 손상 후 1일째에는 1.4개, 손상 후 4일째에는 7.5개로 증가하다가 손상 후 7일째에는 16.3개로 급격히 증가하였으며, 손상 후 14일째에는 10.1개로 세포수가 유의성 있게 감소하였다(p<0.05, Table 1).

ED2 양성반응 큰포식세포는 정상군에서는 평균 1.2개가 관찰되었고, 냉동손상 후 6시간째에는 3.6개, 손상 후 1일째에는 4.4개로 조금 증가하다가 손상 후 4일째에는 14.2개로 급격한 증가를 보였으며 손상 후 7일째에는 5.2개로 급격하게 감소하였고, 손상 후 14일째에는 3.4개로 세포수가 유의하게 감소하였다(p<0.05, Table 1).

Table 1. The number of MHC class II positive dendritic cells and ED2 positive macrophages in the ipsilateral frontal cortex parenchyme of normal and cryoinjured rat brains

Cell types	Normal	Time after cryoinjury				
		6 hours	1 day	4 day	7 day	14 day
Dendritic cells	0.0±0.0*	1.0±0.2*	1.4±0.5*	7.5±0.4*	16.3±0.3*	10.1±0.6*
Macrophages	1.2±0.2*	3.6±0.4*	4.4±0.7*	14.2±0.5*	5.2±0.4*	3.4±0.3*

The number represents mean±standard deviation.

Cells were counted per unit area(mm²) on 50 slides in each rat groups.

* : p<0.05 on one-way ANOVA.

2. 조직화학적 변화

1) 정상군

정상군의 이마엽 대뇌겉질의 실질에서는 MHC class II 양성반응 수지상세포는 관찰되지 않았 으나(Fig. 1A), ED2 양성반응 큰포식세포는 혈관벽에서 관찰되었다(Fig.

1B). 그리고 연질막에서는 수지상세포와 큰포식세포가 관찰되었다(Fig. 1A, 1B). GFAP는 혈관벽과 연질막에 매우 약한 양성반응을 나타내었다(Fig. 1C).

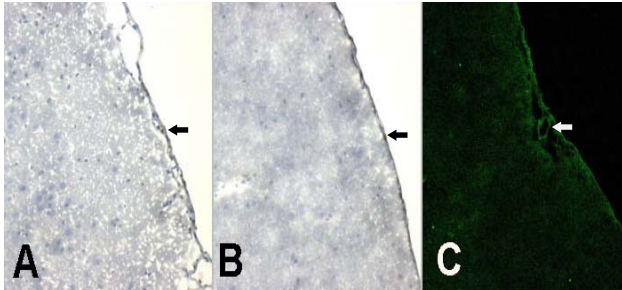


Fig. 1. Serial sections of cerebral cortex of normal rat brain. (A) A (OX6) antibody for dendritic cells, MHC class II positive cells were absent in parenchyme, but several dendritic cells were located on pia mater (black arrow). (B) ED2 positive macrophages were visible on the wall of a blood vessel (white arrow) and on pia mater (black arrow). (C) A very weak immunoactivity of GFAP was detected on the wall of blood vessels (white arrow). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

2) 6 시간군

냉동손상을 준 후 6시간째에 대뇌겉질의 손상부위에서 연질막밑공간(subpial space)이 넓어 졌으며 출혈과 약간의 괴사가 있었다. 소수의 MHC class II 양성반응 수지상세포들이 연질막(subpial mater)에서 관찰되었으나 손상된 뇌실질에서는 발견되지 않았다(Fig. 2A). ED2 양성 반응 큰포식세포들이 손상된 뇌실질에서 발

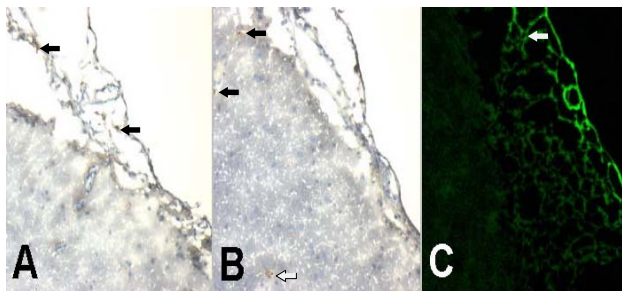


Fig. 2. Serial sections of cerebral cortex lesions at 6 hours after cryoinjury. There were extension of subpial space, hemorrhage and necrosis. (A) Several MHC class II positive dendritic cells were observed in subpial mater (black arrows) and other positive cells were not in injured parenchyme. (B) ED2 positive macrophages were visible in injured parenchyme (black arrows). A macrophage with round nuclei was located adjacent a blood vessel (white arrow). (C) GFAP positive intermediate filaments were observed in pia mater and subpial mater and in injured parenchyme (white arrow). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

견되었다(Fig. 2B). 뇌실질에서 발견된 큰포식세포는 혈관옆에 위치하고 있었고 둥근핵을 갖고 있었다(Fig. 2B). GFAP 양성반응 중간세포들이 연질막과 연질막 밑막, 그리고 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 2C).

3) 1 일군

냉동손상을 준 후 1일째에 대뇌겉질의 손상부위에서 광범위한 괴사가 나타났다. 약간의 MHC class II 양성반응 수지상세포들이 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 3A). 매우 큰 수지상세포가 손상 받지 않은 뇌실질에 나타났다(Fig. 3A). 소수의 ED2 양성반응 큰포식세포들이 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 3B). 다수의 GFAP 양성반응 세포들이 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 3C).

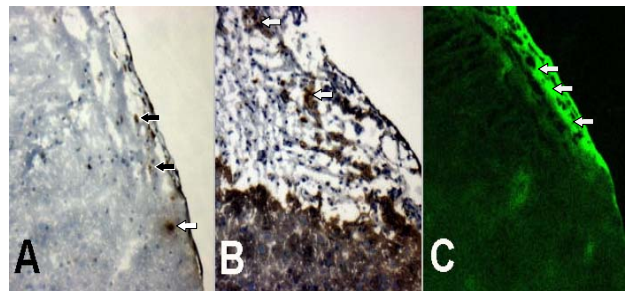


Fig. 3. Serial sections of cerebral cortex lesions at 1 day after cryoinjury. There was a extensive necrosis. (A) Several MHC class II positive dendritic cells were observed in injured parenchyme (black arrows). A large dendritic cell was appeared in uninjured parenchyme (white arrow). (B) A small number of ED2 positive macrophages were visible in injured parenchyme (white arrows). (C) Many GFAP positive cells were observed in injured areas (white arrows). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

4) 4 일군

냉동손상을 준 후 4일째에 대뇌겉질의 손상부위에서 괴사와 신경아교세포가 관찰되었다. MHC class II 양성반응 수지상세포들이 손상된 뇌실질 부위의 중심부와 주변부에서 관찰되었다(Fig. 4A). ED2 양성반응 큰포식세포들이 손상된 뇌실질 부위에서 관찰되었다(Fig. 4B). 강하게 염색된 GFAP 양성반응 세포들이 손상된 뇌실질에서 많이 관찰되었다(Fig. 4C).

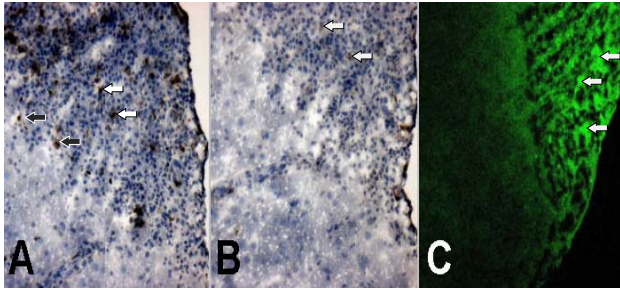


Fig. 4. Serial sections of cerebral cortex lesions at 4 days after cryoinjury. There were necrosis and gliotic scar. (A) Several MHC class II positive dendritic cells were observed in core area (white arrows) and peripheral area (black arrows) of injured parenchyme. (B) ED2 positive macrophages were observed in injured parenchyme (white arrows). (C) Many GFAP strongly immunoreactive cells were observed in injured area (white arrow). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

5) 7 일군

냉동손상을 준 후 7일째에 대뇌겉질의 손상부위에서 괴사와 신경아교흉터가 관찰되었다. 다수의 MHC class II 양성반응 수지상세포들이 손상된 뇌실질 부위에서 발견되었다(Fig. 5A). 다수의 수지상세포들이 군집을 이루고 있었다(Fig. 5A). 소수의 ED2 양성반응 큰포식세포들이 손상된 뇌실질 부위에서 관찰되었다(Fig. 5B). 약하게 염색된 GFAP 양성반응 세포들이 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 5C).

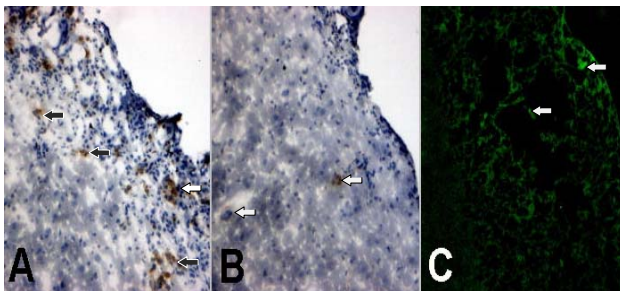


Fig. 5. Serial sections of cerebral cortex lesions at 7 days after cryoinjury. There were necrosis and glial scar. (A) Many MHC class II positive dendritic cells were observed in injured parenchyme (black arrows). There was a cluster of dendritic cells in injured area (white arrow). (B) Several ED2 positive macrophages were observed in injured parenchyme (white arrows). (C) Pale GFAP positive cells were observed in injured parenchyme (white arrow). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

6) 14 일군

냉동손상을 준 후 14일째에 대뇌겉질의 손상부위에서 괴사와 신경아교흉터가 관찰되었다. 소수의 MHC class II 양성반응 수지상세포들이 손상된 뇌실질 부위에서 관찰되었다(Fig. 6A). 소수의 ED2 양성반응 큰포식세포들이 손상된 뇌실질 부위에서 관찰되었다(Fig. 6B). 약하게 반응된 GFAP 양성반응 세포들이 손상된 뇌실질에서 관찰되었다(Fig. 6C).

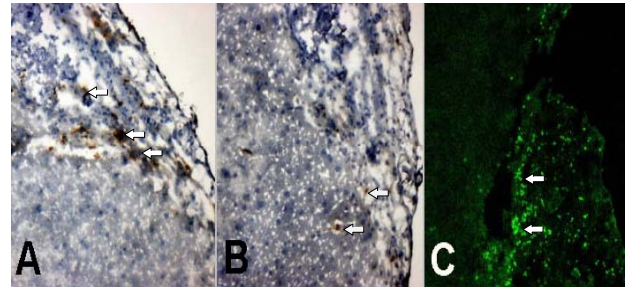


Fig. 6. Serial sections of cerebral cortex lesions at 14 days after cryoinjury. There were necrosis and glial scar. (A) Several MHC class II positive dendritic cells were observed in injured parenchyme (white arrows). (B) Several ED2 positive macrophages were observed in injured parenchyme (white arrows). (C) Small GFAP positive cells were observed in injured parenchyme (black arrows). A: OX6, DAB; B: ED2, DAB; C: GFAP, FITC, Confocal microscope. x 100.

고 찰

경증뇌외상 (mild traumatic brain injury)은 뇌손상의 흔한 형태로서 야외 여가생활이 많은 현대사회에서 증가되는 추세에 있다.^{40,41)}

경증뇌외상은 순간의식불명, 기억상실, 인식과 감정의 불균형 등을 수반하며 환자는 수주일 내에 정상으로 회복되는 경우도 있지만 일부 환자들은 수개월 내지 수년간 학습능력과 기억장애를 호소하는 경우도 있다.⁴²⁻⁴⁴⁾

지금까지 경증뇌외상으로 인한 생물학적 기전을 여러 동물모델을 이용하여 시도하였지만 연구결과는 아직 미진한 상태이다.⁴⁵⁾ 본 연구에서 시도된 냉동손상법은 인간의 경증뇌외상과 완전히 같을 수는 없지만 뇌에 너무 심한 손상을 입히지 않는 점과 국소적이고 반복적인 손상을 줄 수 있다는 점에서 이 방면의 연구에 채택되어도 좋을 것으로 생각되어진다.

수지상세포와 큰포식세포와 같은 항원제공세포는 단

백항원을 섭취하여 분쇄한 다음 적절한 입체구조를 갖도록 처리하여 소포체에서 합성된 MHC class II 분자에 비공유결합으로 부착시키고, 이 peptide-MHC 복합체를 세포 표면에 발현시키는 역할을 한다.⁴⁶⁾ 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.⁴⁷⁻⁴⁹⁾

정상적인 뇌에서 수지상세포와 큰포식세포는 뇌막이나 맥락얼기에 주로 분포되어 있다고 알려져 있다.⁹⁾ 수지상세포는 뇌실이나 지주막밑공간 (subarachnoid space)에서도 관찰되는 반면, 큰포식세포는 경질막이나 지주막의 결합조직, 맥락얼기의 버팀질 (stroma), 그리고 연질막 (subpial mater)에서 발견되어진다.⁵⁰⁾ 뇌실질에 있는 토박이큰포식세포 (resident macrophage)는 미세아교세포 (microglia)로 존재하며 주로 혈관주위에 위치한다.⁵¹⁾ 본 연구자는 정상군에서 이런 사실을 재확인할 수 있었다 (Fig. 1).

이와 같이 정상뇌에도 항원제공세포들이 존재하나 다른 조직에 비해 매우 적은 편이다. MHC class II 양성반응 수지상세포는 동물의 종에 따라 다르고 같은 기관일지라도 부위에 따라 다르다. 성숙한 흰쥐, 마우스, 사람의 홍채와 모양체에 분포하는 수지상세포는 흰쥐 홍채의 경우 1 mm²당 평균 400개가 존재하며 홍채의 기저부, 중간부, 가장자리에 따라 차이가 난다⁵²⁾고 하며, 성숙한 흰쥐의 기관지 상피에 분포하는 MHC class II 양성반응 수지상세포는 큰 기관지의 경우 1 mm²당 평균 600-800개, 작은 기관지의 경우 1 mm²당 평균 75개 정도였고 배쪽부위보다는 등쪽부위에서 그 수가 많다고 한다.⁵³⁾

또한 ED2 양성반응 큰포식세포는 림프절 수질, 골수^{54,55)}, 폐포사이중격, 눈의 홍채 및 모양체^{56,57)} 등 결합조직에 널리 분포한다고 알려져 있다. ED2 양성반응 큰포식세포는 성숙한 흰쥐의 홍채에서 1 mm²당 평균 600 - 800개정도 분포하여 MHC class II 양성반응 수지상세포보다 약 1.4배 정도 많다고 한다.^{56,57)}

본 연구에서 정상군의 뇌실질에서는 MHC class II 양성반응 수지상세포를 관찰하기 어려웠으나, ED2 양성반응 큰포식세포는 1 mm²당 평균 1.2개 정도 분포하는 것을 확인하였다(Table 1). 발견된 큰포식세포들이 혈관벽을 따라 분포하기 때문에 미세아교세포로 여겨진다.

그러나 본 연구에서 냉동손상 후 항원제공세포들이 손상된 부위에서 다수 관찰되었고 세포군에 따라 차이를 보였다. MHC class II 양성반응 수지상세포는 손상 후 7일째에 평균 16.3개였으며, ED2 양성반응 큰포식세포는 손상 후 4일째에 평균 14.3개였다(Table 1). 이와 같은 현상은 항원제공세포들이 외부에서 이동했다는 것을 의미하는 것이다. 많은 큰포식세포가 수지상세포보다 더 일찍 손상부위에 도달할 수 있었던 것은 뇌실질내에 있는 혈관을 통해 용이하게 이동하였고 냉동손상에 의한 초기의 출혈과 괴사로 인해 출현한 염증세포들을 포식했을 것이며 연질막에서 이동한 큰포식세포도 있었을 것으로 생각된다. 정상군과는 달리 손상된 부위의 수지상세포는 큰포식세포보다 세포수가 더 증가되어 있었는데 그 이유는 수지상세포가 연질막 뿐만 아니라 지주막밑공간의 뇌척수액에도 있었기 때문에 이동시간이 더 걸렸지만 이동한 전체 세포수는 더 많아졌다고 여겨진다.

뇌가 손상받으면 다능전구세포 (multipotent progenitor cell)가 활성화되어 신경세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포와 같이 뇌조직을 회복시키는 세포로 분화한다.^{34,35)} 그러므로 이 전구세포들의 증식과 분화를 조절하면 뇌의 재구성 형태를 자유롭게 바꿀 수 있을 것이다. 발생중인 뇌에서 세포가 이동하거나 성장할 때 GFAP이나 nestin 같은 발생중간세사 (embryonic intermediate filament)가 관여하는 것처럼 손상된 뇌에서도 중간세사들이 뇌를 회복시키기 위해 증가한다는 보고가 있다.⁵⁸⁾ 그러므로 GFAP 양성반응 세포들은 대부분 별아교세포들이라고 할 수 있다.

이 연구에서 신경세포가 정상군과 실험군 모두에서 GFAP에 반응하지 않았지만(Fig. 1C), GFAP 양성반응 세포들이 손상 후 4일째에 손상부위에서 가장 많이 나타났다(Fig. 4C). 이 세포들은 신경아교흉터 (glial scar)를 형성하는 별아교세포라고 할 수 있겠다. 한편, 혈관을 둘러싸는 세포들이 GFAP에 강한 양성반응을 보였다. 이 세포들은 정상군에서도 발견되었으며(Fig. 1C), 손상 후 4일째에 혈관에서 아주 많았다(Fig. 4C). 이 세포들은 혈관을 재구성하는데 필요한 중간세사를 갖는 세포들로 보여진다.

결 론

흰쥐 대뇌겉질에 분포하는 항원제공세포들이 국소적인 냉동손상을 받았을 때 이 세포들이 손상부위로 이동하는 양상과 중간세포인 GFAP의 발현 여부를 알아보기 위해 생후 2개월 된 흰쥐의 뇌를 대상으로 냉동 연속조직절편을 제작하여 면역조직화학적 염색을 시행한 뒤 양성 면역 반응성을 보인 세포를 관찰하고 계수하였다. MHC class II 양성반응 수지상세포는 정상적인 이마엽 대뇌겉질의 뇌실질에서는 관찰되지 않았지만, 냉동손상 후 7일째에 정상보다 16배 이상 증가하였고, ED2 양성반응 큰포식세포는 정상적인 이마엽 대뇌겉질의 뇌실질에 있어 소수 관찰되었으나 냉동손상 후 4일째에는 정상보다 14배 이상 증가하였으며, 그리고 GFAP 양성반응 별아교세포들은 정상군에서 관찰되지 않았으나, 손상 후 4일 때에 급격한 증가를 보였으며, 신경세포는 정상군 뿐만 아니라 냉동손상을 준 실험군 모두에서 GFAP 양성반응을 보이지 않았다는 실험결과를 얻었다.

위와 같은 실험결과로 미루어 보아 두 종류의 항원제공세포는 세포의존성 면역반응과 포식작용을 하며, GFAP 양성반응세포들은 신경아교흥터형성에 관여한다고 생각되어진다.

참고문헌

- McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee VM, Trojanowski JQ : The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury : pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:251-267, 1998.
- Sun D, Tani M, Newman TA, Krivacic K, Phillips M, Chernosky A, Gill P, Wei T, Griswold KJ, Ransohoff RM, Weller RO : Role of chemokines, neuronal projections, and the blood-brain barrier in the enhancement of cerebral EAE following focal brain damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1031-1043, 2000.
- Aihara N, Hall JJ, Pitts LH, Fukuda K, Noble LJ : Altered immunoexpression of microglia and macrophages after mild head injury. *J Neurotrauma* 12:53-63, 1995.
- Baldwin SA, Scheff SW : Intermediate filament change in astrocytes following mild cortical contusion. *Glia* 16:266-275, 1996.
- Sato M, Chang E, Igarashi T, Noble LJ : Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Res* 917:45-54, 2001.
- Kim MD, Min DS, Sim KB, Cho HJ, Shin T : Expression and potential role of phospholipase D1 in cryoinjured cerebral cortex of rats. *Histol Histopathol* 19:1015-1019, 2004.
- Austyn JM, Wood KJ : Antigen-presenting cells. In principles of cellular and molecular immunology. Oxford, Oxford University Press, 1993, pp115-177.
- Pashenkov M, Teleshova N, Link H : Inflammation in the central nervous system : the role for dendritic cells. *Brain Pathol* 13:23-33, 2003.
- McMenamin PG, Wealtheal RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B : Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus : three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 313:259-269, 2003.
- Newman TA, Ian Galea I, van Rooijen N, Perry VH : Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury. *J Neuroimmunol* 166:167-172, 2005.
- Steinman RM, Nussenzweig MC : Dendritic cells : Features and functions. *Immunol Rev* 53:127-147, 1980.
- Van Voorhis WC, Witmer MD, Steinman RM : The phenotypes of dendritic cells and macrophages. *Federation Proc*, 42:3114-3118, 1983.
- Jenkins MK, Desilva DR, Johnson JG : Costimulating factors and signals relevant for antigen presenting cell function. *Adv Exp Med Biol*, 329:87-92, 1993.
- Jenkins MK : The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity*, 1:443-446, 1995.
- Steinman RM, Cohn ZA : Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 137:1142-1162, 1973.
- 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.
- Steinman RM : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296, 1991.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hart DNI, McKenzie JL : Interstitial dendritic cells. *Intern Rev Immunol* 6:127-138, 1990.
- 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.
- 23) Holt PG : Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract : The role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 63:261-270, 1986.
- 24) Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J : MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat : Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 167:262-274, 1987.
- 25) Solbach W, Moll H, Rollinghoff M : Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunol today* 12:4-6, 1991.
- 26) 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.
- 27) Strickland DH, Thepen T, Kees UR, Kraal G, Holt PG : Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunology* 80:266-277, 1993.
- 28) McMaster WR, Williams AF : Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 9:426-433, 1979.
- 29) 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.
- 30) 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. *Transplantation* 109:3166-3170, 1987.
- 31) Lin J, Cai W : Effect of vimentin on reactive gliosis : in vitro and in vivo analysis. *J Neurotrauma* 21:1671-82, 2004.
- 32) Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M : Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274:23996-24006, 1999.
- 33) Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS : Nestin containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Dev Brain Res* 139:9-17, 2002.
- 34) Calvo JL, Carbonell AL, Boya J : Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res* 566:333-336, 1991.
- 35) Calza L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L : Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3258-3263, 2002.
- 36) Fuchs E, Cleveland DW : A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279:514-519, 1978.
- 37) Stewart M : Intermediate filaments structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 5:3-11, 1993.
- 38) Fuchs E, Weber K : Intermediate filaments : structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63:345-382, 1994.
- 39) Goldman RD, Gold AE, Green KJ, Jones JC, Jones SM, Yang HY : Intermediate filament networks : Organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *J Cell Sci Suppl* 5:69-97, 1986.
- 40) Kraus J, Nourjah P : The epidemiology of mild head injury. In: Benton A (Ed.), *Mild Head Injury*. Oxford, Oxford Univ Press, 1989, pp8-22.
- 41) Zhang L, Yang KH, King AI : Biomechanics of neurotrauma. *Neurol Res* 23:144-156, 2001.
- 42) Blostein PA, Jones SJ, Buechler CM, Vandongen S : Cognitive screening in mild traumatic brain injuries: analysis of the neurobehavioral cognitive status examination when utilized during initial trauma hospitalization. *J Neurotrauma* 14:171-177, 1997.
- 43) Arciniegas D, Adler L, Topkoff J, Cawthra E, Filley CM, Reite M : Attention and memory dysfunction after traumatic brain injury : cholinergic mechanisms, sensory gating, and a hypothesis for further investigation. *Brain Inj* 13:1-13, 1999.
- 44) Ryan LM, Warden DL : Post concussion syndrome. *Int Rev Psychiatry* 15:310-316, 2003.
- 45) Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK : Lateral fluid percussion brain injury : a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma* 22:42-75, 2005.
- 46) Beckman IGR, Bradley J, Brooks D, Zola H : Determination of serologically distinct monomorphic determinants of human MHC class II antigens : Evidence of heterogeneity in their topographical distribution. *Mol Immunol* 21:205-214, 1984.
- 47) Rochester CL, Goodell EM, Stoltenberg JK, Bowers WE : Dendritic cells from rat lung are potent accessory cells. *Am Rev Respir Dis* 138:121-128, 1988.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ : Lymphocyte targeting of the central nervous system : a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 6:275-288, 1996.
- 51) McMenamin PG : The distribution of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges and choroid plexus of the normal rat brain as demonstrated by wholemount preparations. *J Comp*

- Neurol 405:553-562, 1999.
- 52) 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.
 - 53) 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.
 - 54) 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.
 - 55) 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.
 - 56) McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG : Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-immunoreactive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:3234-3250, 1994.
 - 57) McMenamin PG : Optimal methods for preparation and immunostaining of iris, ciliary body, and choroidal wholemounts. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:3043-3048, 2000.
 - 58) Shin T, Lee Y, Sim KB : Embryonic intermediate filaments, nestin and vimentin, expression in the spinal cords of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Vet Sci 4:9-13, 2003.