KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第11卷 第1號 2000
J Clinical Otolaryngol 2000;11:87-91

알레르기성 비염의 비점막에서 γδ T림프구의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

가천의과대학 부속길병원 이비인후과학교실,[1] 고려대학교 의과대학 이비인후과학교실[2]
김선태[1] · 오승철[1] · 김찬우[1] · 장일환[1] · 차흥억[1] · 이흥만[2]

Immunohistochemical Study of γδ T Cells in Allergic Nasal Mucosa

Seon Tae Kim MD[1], Seung Chul Oh, MD[1], Chan Woo Kim, MD[1], Il Hwan Jang, MD[1], Heung Eog Cha, MD[1] and Heung-Man Lee, MD[2]

[1]Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Gil Hospital, Gachon Medical School, Inchon, [2]Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

－ ABSTRACT －

Background and Objectives：T cells expressing γδ receptors are present in various organs and are known to play an important role in local immunity against foreign antigens. They are supposed to be activated by the superantigen or heat shock protein. However, characteristics of γδ T cells in nasal mucosa was not known. We observed the distribution of $CD3^+$ T cells and γδ T cells in nasal mucosa to investigate the role of γδ T cells in allergic rhinitis. **Materials & Methods**：Mucosal specimens were obtained from inferior turbinate of patients with allergic rhinitis, chronic hypertrophic rhinitis, and normal inferior turbinate. Frozen specimens were stained using immunohistochemistry and immunopositive cells were counted. **Results**：$CD3^+$ T cell distribution was not different between the groups. In epithelial layer, number of γδ T cells were higher in allergic rhinitis (2.1±0.7/high power field) than chronic hypertrophic rhinitis (0.5±0.1/high power field) and normal inferior turbinate (0.3±0.2/high power field), but in lamina propria their counts were not different between the groups. **Conclusions**：Increased proportion of γδ T cells in allergic rhinitis suggests that γδ T cells may play an some role in pathogenesis of allergic rhinitis in epithelial layer of allergic rhinitis. **(J Clinical Otolaryngol 2000;11:87-91)**

KEY WORDS： γδ T cells · $CD3^+$ Tcells · Allergic rhinitis.

서 론

T 림프구는 면역계의 주된 조절 세포이며 세포성 면역과 체액성 면역에 중요한 여러 세포 활성 물질을 분비하게 된다. T 림프구는 원래 항원을 그대로 인지하는 B 림프구와는 달리 외부에서 들어온 항원이 항원 전달 세포(antigen presenting cell)에 의해 처리되어 주조직적합성 복합체(MHC, major histocompatibility complex) 분자에 결합된 항원만을 인식하는데 이를 주조직적합성 복합체 제한이라고 한다. 이러한 주조직 적합성 복합체 - 항원의 인식은 T 림프구 표면에 있는 항원 수용

논문접수일 : 2000년 3월 30일
심사완료일 : 2000년 5월 22일
교신저자 : 김선태, 405 - 760 인천광역시 남동구 구월동 1198
가천의과대학 부속길병원 이비인후과학교실
전화 : (032) 460 - 3762 · 전송 : (032) 467 - 9044
E - mail : Rhinokim@ghil.com

체(T cell receptor)가 담당한다. 이 수용체는 αβ와 γδ 항원수용체의 2종류로 분류된다.[1-3)]

αβ항원수용체 T 림프구는 말초혈액에서 T 림프구의 90%를 차지하고 있으며 $CD3^+/CD4^+$ 또는 $CD3^+/CD8^+$ T 림프구 표면에 주로 표현된다. γδ 항원수용체 T 림프구는 αβ 항원수용체와 유사한 구조를 갖는데 주로 $CD3^+CD4^-CD8^-$ T 림프구 표면에 존재한다. γδ 항원수용체를 갖는 T 림프구의 비율은 조직과 종간에 많은 차이를 보이지만 대개 전체 T 림프구의 5% 미만에서 표현되는 것으로 알려져 있고 인간에서는 말초혈액과 여러 상피조직에 소수로 존재하는 것으로 알려져 있다.[1-4)]

γδ T 림프구는 가장 중요한 특징으로 숙주와 외부환경이 자주 접촉되는 상피 경계에서 항원을 인지하여 상피세포에서 미생물 감염에 대한 초기 방어 기전에 관여하는 것으로 추정하고 있다.[5)6)] 따라서 알레르기성 비염에서 보이는 T-림프구중 γδ T 림프구가 어떠한 역할을 할 수 있다고 생각한다.

지금까지 γδ T 림프구가 αβ T 림프구와 같이 면역반응기전에 관여하는 것으로 알려져 있지만 비점막에서의 정확한 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 따라서 저자들은 γδ 항원수용체 T 림프구의 비점막에서의 분포 양상을 보고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상과 방법

연구대상

대상 환자군은 통년성 알레르기성 비염 10례(남 5, 여 5, 평균 37세), 만성비후성 비염 5례(남 3, 여 2례, 평균 35세) 그리고 정상군 5례(남3, 여 2례, 평균 31세) 등 세 군으로 나누어 시행하였다. 통년성 알레르기성 비염군은 알레르기성 비염의 전형적인 임상적 증상을 보이며 피부단자 검사상 집먼지 진드기(D.P., D.F.) 등에 3+ 이상의 반응이 있었고, 집먼지 진드기에 대한 RAST 검사상 3+이상으로 증가된 경우로 하였다.

만성 비후성 비염군은 알레르기 검사에 음성반응을 보이면서, 비점막 수축반응에 변하지 않고 비가역적 변화를 보인 경우로 하였다.

정상대조군은 비중격 교정술을 시행한 환자에서 채취한 편측의 정상 하비갑개 점막조직을 사용하였다. 실험재료는 하비갑개 전단에서부터 1 cm 뒤에서 겸자로 비점막을 채취하였고 대상군 모두에서 표본 채취전 2주간은 약제의 사용을 금하였다.

실험방법

면역조직화학적 염색

표본을 10% buffered formalin으로 하룻밤 고정시키고 다시 30% 자당에 하루 밤 담근후 동결절편기로 5 μm 두께의 연속 동결 절편을 만들어 사용하였다. 동결절편은 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 3%과산화수소로 5분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하였다. 조직내의 항원과 항체와의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제하기 위하여 LSAB Kit(Zymed, South San Francisco, CA)에 들어있는 단백질 억제제(Research Genetics, Huntsville, AL)을 상온에서 15분간 처리한 후 1 : 20으로 희석한 단크론성 CD3 (Dako, Carpitenia, CA)와 단크론성 γδ T-cell receptor항체(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 부착시켜 4℃에서 하룻밤 반응시키고 완충액으로 세척하였다. 바이오틴이 부착된 이차 항체(Histostain™ SP Kit, Zymed)를 상온에서 30분간 반응시킨 후 스트렙아비딘-퍼옥시다제(Histostain™ SP Kit)를 15분간 반응시켰다. 발색제로는 스트렙아비딘에 반응하는 3-amino-9 ethyl carbarzole(Zymed)를 사용하였으며 대조 염색으로 Meyer's hematoxylin을 사용하였다. 음성 대조군은 일차항체 대신 인산완충용액을 사용하여 같은 방법으로 시행한 후 관찰하였다. 양성 세포 판독은 하나의 표본에서 상피층과 고유층으로 나누어 저배율하에 격자를 이용하여 임의로 10군데를 선정한 후, 400배 고배율하에서 염색되는 세포수를 산술 평균하여 구하였다.

통계분석

통계학적 분석은 SPSS 7.5(version 7.5, SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 paired t-test를 시행하였고 p값이 0.05이하인 경우 통계학적으로 유의하다고 하였다.

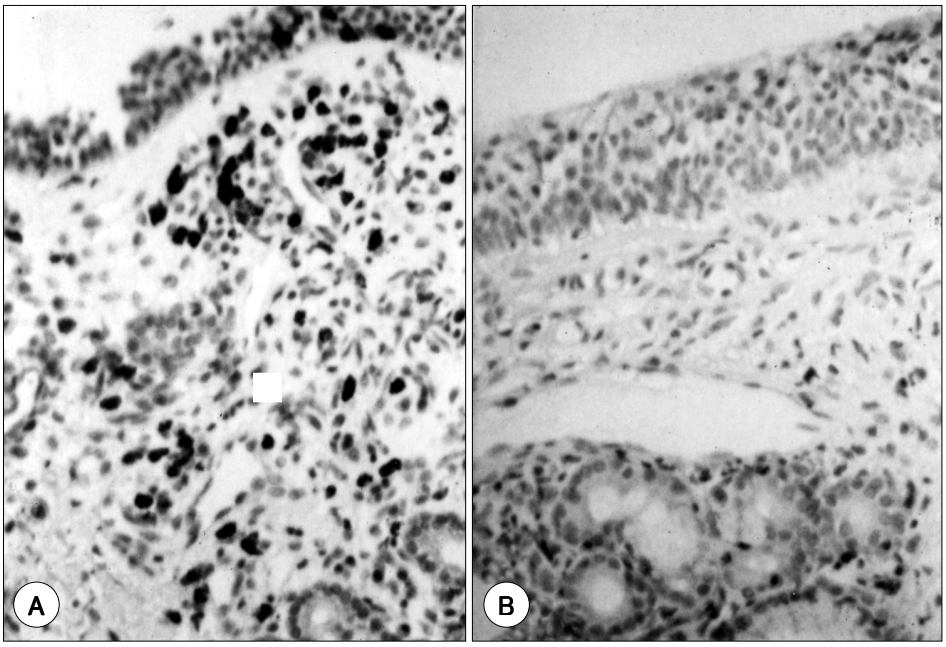

Fig. 1. Immunohistochemical staining for $CD3^+$ T cells in nasal mucosa of patient with perennial allergic rhinitis. $CD3^+$ T cells are more distributed in lamina propria than in epithelial layer (A), (B) ; negative control (ABC stain, ×100).

Table 1. Distribution of $CD3^+$ T cells in the nasal mucosa*

	Epithelium	Lamina propria
Allergic rhinitis	5.5±0.2	35.4±0.4
Chronic hypertrophic rhinitis	6.1±0.5	31.7±0.7
Normal turbinate	5.8±0.8	28.2±0.1

* : Number of positive cells (Mean±SD, ×400/ High power field)

결 과

$CD3^+$ T 림프구의 발현

$CD3^+$ T 림프구 면역 양성세포는 비점막 상피층과 고유층 모두에서 관찰되었으며 각 층에서 세 군간에 유의한 차이는 없었다($p>0.05$, Table 1, Fig. 1).

γ δ 항원 수용체 T 림프구

정상 대조군과 비후성 비염군에서 상피층에서는 각각 0.5±0.1개, 0.3±0.2개이었고(Fig. 2) 알레르기성 비염군에서는 2.1±0.7개로 알레르기성 비염군에서 다른 두 군에 비해 유의하게 많이 발현되었다($p<0.05$, Fig. 3).

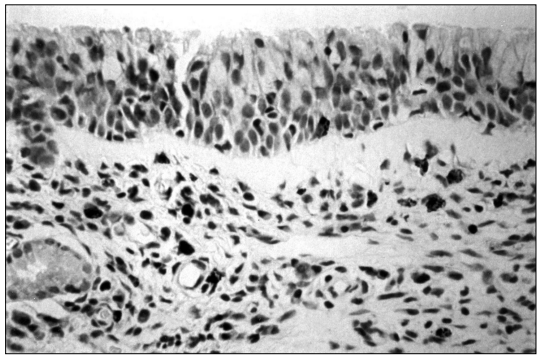

Fig. 2. Immunohistochemical staining for γδ T cells in normal inferior turbinate (ABC stain, ×200).

그러나 고유층에서는 각 군간에 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$)(Table 2).

$CD3^+$ T 림프구에 대한 γ δ 항원 수용체 T 림프구의 비율

$CD3^+$ T 림프구에 대한 γ δ T 림프구의 비점막내 분포비율은 상 피층에서는 알레르기성 비염군에서 만성 비후성 비염이나 정상군에 비해 유의하게 높았으나($p<0.05$), 고유층내에서는 각 군간에 유의한 차이가 없었다

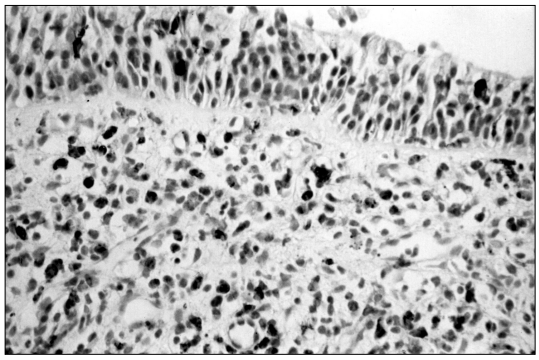

Fig. 3. Immunohistochemical staining for γδ T cells in allergic nasal mucosa. Nasal mucosa of allergic rhinitis showed more abundant immunopositive cells than normal inferior turbinate in epithelial layer (A, B, C stain, ×200).

Table 2. Distribution of γδ T cells in the nasal mucosa*

	Epithelium	Lamina propria
Allergic rhinitis	2.1±0.7†	11.6±0.1
Chronic hypertrophic rhinits	0.5±0.1	9.3±0.3
Normal turbinate	0.3±0.2	8.2±0.5

*: Number of positive cells (Mean±SD, ×400/ High power field)
†: $p<0.05$, compared with epithelium of chronic hypertrophic rhinitis and normal turbinate

Table 3. Proportion of γδ T cells/$CD3^+$ T cells (%)

	Epithelium	Lamina propria
Allergic rhinitis	38.1±2.2*	32.7±2.4
Chronic hypertrophic rhinitis	8.0±2.4	29.3±0.9
Normal turbinate	5.1±2.1	29.1±1.2

*$p<0.05$, compared with epithelium of chronic hypertrophic rhinitis and normal turbinate

($p>0.05$, Table 3).

고 찰

지금까지 알려진 γδ T 림프구의 기능은 특히 세포융해(cytolysis)에 관여하며, IL-2나 IL-4를 소량 분비하고, 면역글로불린 생성에 보조작용 등 αβ T 림프구와 유사한 것으로 알려져 있다.[5]

γδT 림프구가 αβ T 림프구와 다른점은 첫째, 많은 γδ T 림프구의 반응이 MHC 제한이 없이도 일어나는 것이다. αβ T 림프구가 모든 경우에 MHC분자에 제한된 항원만을 인지하는 것에 비해 γδ T 림프구는 MHC 분자로 제한된 항원 뿐 아니라 CD1 등도 항원표시 인자로 인식한다고 알려져 있다. 이것은 γδ T 림프구가 전형적인 MHC 제한이 없는, αβ T 림프구가 인식하지 못하는 다른 종류의 항원을 인식할 수 있는 특징을 보여주는 것이다.[5] 둘째, γδ T 림프구가 활성화되는 기전은 αβ T 림프구와 같은 방법으로 활성화되어 숙주의 방어기전에 관여하며 또한 박테리아, 곰팡이, 기생충, 미생물 생성물 등과 heat shock protein에 의해 주로 자극 받는다고 알려져 있다. 따라서 상피세포에서 αβ T 림프구가 활동하기 전에 미리 외부 자극에 대해 면역반응을 일으키거나 외부항원에 반응하여 αβ T 림프구가 Th1 이나 Th2 세포로 분화하는 데도 관련있다고 알려져 있다.[7] 이와같은 차이점들 때문에 전체 T 림프구중 5%밖에 되지 않지만 γδ T 림프구가 면역방어기전에 있어 αβ T 림프구와는 다른 독자적인 역할을 할 가능성을 보여주고 있다.

여러 병적 상태에서 γδ T 림프구의 비율이 증가되는 것으로 보고되고 있는데 소아 지방변증환자의 장 상피,[8] 전신성 홍반성 난창 환자의 피부 표피층, 류마토이드 관절염 환자의 활액,[9] 폐 유육종증 환자의 폐 상피층과 말초혈액,[10] 일부 면역기능 저하 질환[11]과 미코박테리움증 환자의 말초혈액[12]에서 γδ T 림프구의 비율이 증가된다고 보고되고 있다. 아토피성 천식환자에서 기관지폐포세척내에 γδ T 림프구가 증가된 반면 정상에서는 증가하지 않은 것이 보고된 바 있다.[13] 그러나 비점막에서의 γδ T 림프구의 역할은 확실히 알려져 있지 않다.

알레르기성 비염환자의 비점막에서 T 림프구는 항원전달세포나 heat shock protein(superantigen)에 의해 자극받는다. Pawankar 등[14][15]에 의하면 알레르기성 비염환자의 비점막과 혈액에서 $CD3^+$ T 림프구를 분리하여 측정한 결과 γδ 항원수용체 T 림프구의 분포는 만성 비염환자보다 의미있게 높게 나왔으며, 알레르기성 비염환자에서는 혈액보다 비점막에서 4 5배 높게 나왔다고 보고하였다. 또한 유세포계측기로 이용하여 비상피층에서 $CD3^+$ T 림프구에서 γδ T 림프구의 비율은 알레르기성 비염환자에서 25%이상으로 만성비염환자의 12%보다 높게 나왔다고 보고하였다. Takeuchi 등[16]은 γδ 항원수용체 T 림프구의 유전형을 분류한 결과 알레르기성 비염에서 대부분의 우세한 V ge-

ne은 Vδ1-Jδ1 이라고 하였다. Okuda 등[17)18)]은 만성비염환자의 비점막에서 유세포계측기를 이용하여 비상피층에서 T 림프구의 아형을 분류한 결과 γδ T 림프구는 $CD45RO^+$이고 $CD8^+$ 림프구 및 CD8-CD4-T 림프구가 주로 많이 존재하였고 특히 주로 $CD3^+CD8^-CD4^-$ T 림프구에 존재하였다고 하였다.

본 연구에서는 $CD3^+$ T 림프구가 상피층과 고유층 모두에서 세 군간의 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 전체적인 $CD3^+$ T 림프구의 숫자가 알레르기성 비염에서 대조군보다 증가되는 양상을 보이지 않아 단순한 $CD3^+$ T 림파구의 숫자가 알레르기 반응에 크게 관여하지는 않을 것으로 생각된다. 저자들의 실험에서도 유세포 계측기를 이용한 Pawankar의 실험에서와 같이 알레르기성 비염의 비점막 상피층에서 γδ T 림프구가 유의하게 증가되어 이러한 비점막 상피층에서의 γδ T 림프구의 증가가 알레르기성 비염에 일부 영향을 줄 수 있다고 생각한다.

알레르기성 비염에서 이러한 비상피층에서의 γδ T 림프구의 선택적 증가는 단순한 염증반응이라기 보다는 외부에서 들어온 항원에 의해서 유발되어 증가한 것으로 생각되며, 자극에 대한 염증반응의 초기 방어기전에 γδ T 림프구가 나타날 수 있다고 생각한다. 따라서 알레르기 비점막에는 αβ T 림프구를 자극시키는 기전과 다른 γδ T 림프구 만을 자극하는 다른 항원전달 인식기전이 존재할 수 있으며 향후 비점막에서 heat shock protein의 자극과 γδ T 림프구의 관계를 밝히는 일이 필요할 것으로 생각된다

결 론

알레르기성 비염의 비상피층에서 γδ T 림프구의 증가는 알레르기성 비염의 염증반응에 일부 영향을 줄 수 있다고 생각한다.

중심 단어 : 알레르기성 비염 · γδ T 림프구.

REFERENCES

1) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;1994. p.136-65.*
2) Holgate ST, Church MK. *Allergy. NewYork: Gower Medical Publishing;1993. p.1-14.*
3) Janeway CA, Travers P. *Immunobiology. 2nd ed. New York: Churchil Livingstone;1994. p.1-47.*
4) Raulet DH. *The Structure, function, and molecular genetics of the γδ T cell receptor. Annl Rev Immunol 1989; 7:175-208.*
5) Porcelli S, Brenner MB, Band H. *Biology of human gamma delta T-cell receptor. Immunol Rev 1991;120:137-83.*
6) Ferrick DA, Braun RK, Lepper HD, Schrenzel MD. *γδ T cells in bacterial infections. 67th Forum in Immunology 1996;Dec:532-41.*
7) Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. *Differential production of interferon-γ and interleukin-4 in response to Th 1 and Th 2 stimulating pathogens by γδ T cells in vivo. Nature 1995;373:255-7.*
8) Trejdosiewicz LK, MacDonald TT, Diss TO, Walker JA, Ciclitrira PJ, Issacson PG. *Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulation in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma. Gut 1989;30:339-44.*
9) Bucht A, Sonderstrom K, Hultman T, Mathias U, Nilsson E, Kiessling R *et al. T cell receptor diversity and activation markers in the Vδ subset of rheumatoid synovial fluid and peripheral blood lymphocytes. Eur J Immunol 1992;22:567-74.*
10) Balbi BD, Moller R, Kirby M, Holroyd KJ, Crystal RG. *Increased numbers of T lymphocytes with γδpositive antigen receptors in a subgroup of individuals with pulmonary sarcoidosis. J Clin Invest 1990;8:1353-61.*
11) Morio T, Nagasawa M, Nonoyama S, Okawa H, Yata J. *Phenotype profile and functions of T cell receptor-γδ bearing cells from patients with primary immune deficiency synrome. J Immunol 1990;144:1270-5.*
12) Modlin RL, Pirmez C, Hofman F, Torigan V, Uyemura K, Rea TH, *et al. Lymphocytes bearing antigen specific γδ T cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. Nature 1989;339:544-8.*
13) Spinozzi F, Agea E, Forenza N, Monaco A, Bassotti G, Nicoletti I, *et al. In creased allergen -specific, steroid -sensitive γδ T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. Ann Intern Med 1996;124:223-7.*
14) Pawankar RU, Okuda M, Suzuki K, Okumura K, Ra C. *Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal γδ T cells in allergic and infectious rhinitis. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:1655-65.*
15) Pawankar RU, Okuda M, Okubo K, Ra C. *Lymphocytes subsets of the nasal mucosa in perennial allergic rhinitis. Am J Respr Crit Care Med 1995;152:2049-58.*
16) Takeuchi K, Hirata N, Ukai K, Sakakura Y. *Analysis of γδ T cell receptor repertoire in the human nasal mucosa. J Allergy Clin Immunol 1997;99:251-3.*
17) Okuda M, Pawankar R. *Flow cytometric analysis of intraepithelial lymphocytes in the human nasal mucosa. Allergy 1992;47:255-9.*
18) Okuda M, Azuma M, Suzuki K, Yagi T, Okumura K, Ra C. *Characterization of nasal γδ T cells in perennial allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 1995;jan:200.*