

## 흰쥐 대뇌 피질의 동결 손상 후 재생과정에서 세포외기질과 별아교세포의 반응

대전을지병원 및 연세대학교 의과대학 해부병리과\*

최수임·양우익·김태승\*

### Extracellular Matrix and Astrocytic Response during Regeneration following Cryogenic Injury in Adult Rat Cerebral Cortex

Sooim Choi, M.D., Woo Ick Yang, M.D. and Tae Seung Kim, M.D.\*

Department of pathology, Eul Ji General Hospital and Yonsei University College of Medicine\*

Astrocytes are the most numerous cellular elements in the cerebrum, and they normally have a very slow turnover rate. But during regeneration after injury, they proliferate markedly resulting in astrogliosis. The extracellular matrix in the central nervous system is present in the vessel walls and in the external glia limitans as a basal lamina. The presence of an intact extracellular matrix framework is important in regeneration after injury. Understanding the properties of astrocytic proliferation will be helpful to find out new treatment for functional recovery in the central nervous system. In this study, after cryogenic injury was performed on the cerebral cortex in rats, changes in astrocytes and the extracellular matrix were observed using light microscopy, immunohistochemical stain for glial fibrillary acidic protein(GFAP), proliferating cell nuclear antigen(PCNA), fibronectin, laminin, and type IV collagen, autoradiography and electron microscopy.

The results were as follows;

- 1) The coagulative necrosis, which followed cryogenic injury on the cerebral cortex was healed, forming a new pia mater above the lesion.
- 2) Some of the PCNA positive cells were astrocytes and some of the GFAP positive cells showed a positive reaction to PCNA.
- 3) Proliferating astrocytes labelled by autoradiography or immunohistochemical stain for PCNA reached maximal numbers 3days after the injury and they were no longer found 2 weeks after injury.
- 4) In autoradiography with immunohistochemical stain for GFAP, about 1% of GFAP positive astrocytes were labelled by autoradiography and in double immunohistochemical stain for PCNA and GFAP, about 8~16% of GFAP positive astrocytes were also stained by PCNA.
- 5) In immunohistochemical stain for fibronectin, laminin and type IV collagen, laminin and

접수 : 1995년 8월 23일, 게재승인 : 1995년 10월 9일

주소 : 대전시 중구 목동 24번지, 우편번호 301-070

대전을지병원 해부병리과, 최수임

type IV collagen were present in the newly formed blood vessel walls and fibronectin showed a diffuse positive reaction within the lesion. The new pia mater was formed within 2 weeks after the injury.

6) On electron microscopic examination, basal lamina material was found in the vessel wall 1 week after the injury and at 2 weeks, a nearly complete and continuous basal lamina was formed although the thickness was uneven.

According to these findings, astrocytes in the cerebral cortex of adult rats proliferate very early in the regenerative period after cryogenic injury. At 2 weeks after the injury, this regeneration ceases and the damaged basal lamina of pia mater and vessel wall were reconstituted. (**Korean J Pathol 1996; 30: 473~486**)

**Key Words:** Cerebral cortex, Cryogenic injury, Astrocytes, Extracellular matrix

## 서 론

별아교세포는 대뇌에서 가장 많은 세포 성분으로 전체 세포 수의 25%를 차지하고<sup>1,2</sup> 세포질에 7~9 nm의 섬유를 가지는데 이것들은 glial fibrillary acidic protein(GFAP)과<sup>3-7</sup> vimentin으로<sup>8-10</sup> 구성되어 있다. 별아교세포는 대뇌의 구조유지에 세포골격 역할을 하고 발생 도중 신경원의 이주를 유도하며 혈뇌장벽 역할을 하고 그 이외에 다른 대사상의 역할 및 면역학적 기능과 탐식작용 등이 있다.<sup>11-13</sup> 정상적으로 대뇌 회색질에 있는 별아교세포의 0.08%와 백색질에 있는 별아교세포의 0.03%가 세포분열중임이 밝혀져 대뇌에서 별아교세포의 증식은 낮고 교체율은 매우 느리다<sup>14</sup>. 중추신경계에서 손상, 탈수초 및 퇴행성 질환등에서 일어나는 반응으로 별아교세포증이 가장 중요한데 이것은 별아교세포의 증식과 별아교세포의 크기 증가 및 세포질돌기의 심한 비대를 특징으로 한다<sup>15</sup>. 이런 반응성 별아교세포에서 볼 수 있는 변화로는 핵의 직경 증가, 핵산의 양 증가, GFAP와<sup>1,11,16-19</sup> vimentin의 합성 증가 등이 있다<sup>12</sup>.

대뇌 피질의 손상 후 별아교세포의 증식에 관해 많은 연구가 있었는데 그 연구 방법에 따라 결과에 약간의 차이들이 있다. 별아교세포증에서 핵의 수는 증가하지만 세포분열상은 잘 관찰되지 않아 무사분열로 생각되어져 왔으나<sup>20</sup>, 자가방사기록법과 Feulgen 염색을 이용한 연구로는 대뇌 피질의 손상 후 분열하는 세포의 19.3%가<sup>21</sup>, 전자현미경을 이용한 연구로는 30~50%가 별아교세포라고 하였다<sup>22</sup>. 그 이

후 자가방사기록법과 GFAP에 대한 면역조직학적 염색을 이용한 연구로는 병변 부위에서 GFAP에 양성반응을 보이는 별아교세포의 1~5%가<sup>23,24</sup> 분열중이라고 하였으며, 축적적인(cumulative) 자가방사기록법으로는 17~40%가<sup>24,25</sup> 분열중이었다. 세포증식의 새로운 표식자인 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 면역조직 화학적 염색을 이용한 연구로<sup>26-28</sup>, 손상 후 2.5~3일에 GFAP에 양성반응을 보이는 별아교세포의 5~6%가 분열 중이라고 하였다<sup>29</sup>.

별아교세포증에서 증가된 별아교세포들 중 일부는 앞에서와 같이 세포분열에 의해 생기지만 대부분의 반응성 별아교세포들은 비대된 내인성 별아교세포이거나 주위에서 이주한 것이고<sup>30</sup>, 그의 전구는 원형질성 및 섬유성 별아교세포이다<sup>2,8,29,31-33</sup>. 그리고 대뇌의 기계적 손상 후 증식하는 별아교세포들은 상처 주위에 제한되어 있다가 시간이 지나면서 전체의 동측 피질로 퍼졌다가 퇴행한다<sup>32,34</sup>.

한편 세포외기질은 자연적으로 존재하는 물질로 그 위에서 세포가 이주하고, 증식 및 분화하며<sup>35</sup> 생물학적 부착제 역할을 하고, 여러가지 조직의 세포 구조를 유지시키며 상이한 세포들 사이에 위치적인 관계를 정의한다<sup>35</sup>. 이 중 기저막은 상피세포와 결합 조직 기질을 분리하는 세포외기질의 중요한 구조적 요소로서 신장 강도를 제공하고, 물리적으로 구조물을 지지하며, 세포부착을 위한 기질을 제공하고, 종양세포 침습에 대한 장벽 역할등을 한다<sup>35,39</sup>.

대뇌에서 세포외기질은 기저막의 형태로 대뇌 혈관 주위와 외신경교 경계에 존재하고 제 1, 3, 4형 교원질과, fibronectin, laminin, 및 heparan sulfate pro-

teoglycan으로 구성된다<sup>40-45</sup>. 신경계에서 기저막의 재건은 신경원의 성장을 유도하는데 있어 적당하게 합성된 무손상의 세포외기질이 필수적인 것으로 되어 있다<sup>36</sup>. 그러나 중추신경계에서는 말초신경계에서처럼 세포외기질의 손상 기질화 같은 골격이 없어서 재생이 불가능하다<sup>35,36</sup>. 중추신경계에서 기저막을 생성하는 것은 세포배양 실험에서는 미성숙 교세포나<sup>46-51</sup> 뇌막세포들이지만<sup>52</sup>, 생체 실험에서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다<sup>52-55</sup>. 중추신경계에서의 손상 후 교세포의 증식은 정상적인 세포외 환경을 유지시키는 역할을 하지만<sup>56</sup>, 한편으로는 물리적 장벽을 형성하여 신경회로의 재구성을 방해하는 좋지 못한 효과도 있으므로<sup>2,11,57</sup> 이를 억제하려는 연구들이 있다<sup>58-62</sup>. 이때 교세포의 증식 성질을 이해하고 그의 반응이 억제되거나 변형되는 방법에 대해 아는 것은 여러가지 조건에서 교세포의 역할에 대해 자세히 알게 될 기회를 제공하고 중추신경계의 기능 회복을 촉진할 수 있는 치료 방법을 발견하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되어<sup>11,25,63</sup> 본 연구를 시행하였다.

본 실험은 흰쥐의 대뇌 피질에 동결 손상을 준 후에 그 재생되는 과정을 형태학적으로 관찰하고, GFAP, PCNA, fibronectin, laminin, 및 제 4형 교원질 (type IV collagen)에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 이들의 생성과정과 분포들을 밝히며 GFAP와 PCNA에 대한 이중 면역조직화학적 염색과 자가방사기록법을 이용하여 별아교세포의 세포분열 유무를 조사함으로써 그의 증식상을 관찰하는 한편, 전자현미경적 검사를 통하여 이들 세포외기질들의 재생과정을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 실험군

기초 사육 후 1주일간 환경에 적응시킨 체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 68마리를 대조군 7마리와 실험군 61마리로 나누었다. 실험군은 동결 손상 후 3일, 1주, 2주, 4주, 8주, 12주 및 16주 후 각각 7마리씩 도살하여 변화를 관찰하였다. 실험 기간 중 사망한 4마리와 수술 부위에 이차감염이 생긴 8마리는 실험군에서 제외하였다.

### 2. 실험 방법

Ketalar® (Ketamine HCl, 유한양행) 0.8~1 cc를 복강내에 주사하여 마취한 후 두부 표피를 절개하여 두개골을 직경 8 mm의 원형으로 제거한 다음 액체

질소에  $-196^{\circ}\text{C}$ 로 미리 냉동시킨 직경 5 mm의 알루미늄 원주를 뇌 표면에 90초간 접촉시켜서 국소적으로 동결 손상을 유발하였다. 대조군은 두부 표피 절개후 두개골을 원형으로 제거한 다음 동결 손상 없이 다시 접합하였다(Sham operation).

### 3. 검사 방법

1) **일반적인 조직학적 검색:** 적출된 뇌조직을 통상의 조직 표본 제작방법에 따라 10% 중성 포르말린액에 고정된 다음 손상 부위를 중심으로 이등분하여 파라핀에 포매하고 5~6  $\mu\text{m}$  두께로 세절한 후 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 시행하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

2) **면역조직화학적 검색:** 파라핀에 포매된 조직절편을 xylene으로 탈파라핀하고 알코올로 탈수한 후 증류수로 수세하였다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위해 3% 과산화수소용액에 10분간 반응시키고, 전자레인지에서 pH 6의 citric acid 용액에 10분간 반응시킨 후 정상 염소 혈청에 30분간 방치하였다. 일차 항체로는 세포외물질인 laminin(BioGenex, Temecula, CA, USA, 1:20 희석), fibronectin(DAKO, Santa Barbara, CA, USA, 1:200 희석) 및 제 4형 교원질(DAKO, Santa Barbara, CA, USA, 1:100 희석)와 GFAP(DAKO, Santa Barbara, CA, USA, 1:500 희석), PCNA(DAKO, Santa Barbara, CA, USA, 1:50 희석)등을 사용하여 먼저 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에서 하룻밤 동안 반응시키고 인산 완충액으로 수세하였다. Goat anti-mouse antibody와 30분간 반응시킨 후 인산 완충액으로 수세하였다. Streptavidin 3,3-diaminobenzidine으로 발색시킨 후 hematoxylin 으로 대조 염색하고 glycerine jelly로 봉합하였다.

3) **이중 면역조직화학적 염색:** 먼저 PCNA에 대한 일차 항체에 대해 실온에서 1시간 동안 반응시키고 avidin biotinylated peroxidase complex(ABC) kit를 이용하여 염색하였고 3,3-diaminobenzidine으로 발색시켰다. 다음에 GFAP에 대한 일차 항체에 대해  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에서 하룻밤 동안 반응시키고 labelled streptavidin biotin (LSAB) kit를 이용하여 염색하였고 nuclear fast red 로 발색시켰다.

4) **자가방사기록법:** 희생 24시간 전에 methyl- $\text{H}^3$ -thymidine (1mCi/ml, Amersham, Buckinghamshire, UK)을 체중 gram 당 6  $\mu\text{Ci}$ 를 복강내에 주사하고 희생시킨 후 통상적인 조직표본 제작방법에 따라 5~6  $\mu\text{m}$  두께의 파라핀 절편을 만들어 탈파라핀하고 흡수한 후 건조시켰다. 건조시킨 슬라이드를 암실에서



hypercoat emulsion LM-1(Amersham, Buckinghamshire, UK)에 담갔다가 4°C 냉장고에서 2주간 노출시키고, D-19(Kodak, Rochester, NY, USA)에 20°C에서 4분간 현상한 후 H&E 염색과 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

5) 전자현미경적 검색: 적출된 대뇌 조직의 일부를 cacodylate buffered 4% glutaraldehyde에 24시간 동안 고정시키고 1% osmium tetroxide에 2시간 동안 재고정한 후 배수 알콜로 탈수하였다. Epon에 포매

하여 500~600Å 두께로 세절한 후 uranyl acetate와 lead citrate 복염색하여 Hitachi H-500형 전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 일반적인 조직학적 변화

손상 후 3일에는 손상 부위에 응고성 괴사의 소견을 보였다. 병변내에는 많은 호중구 및 대식세포

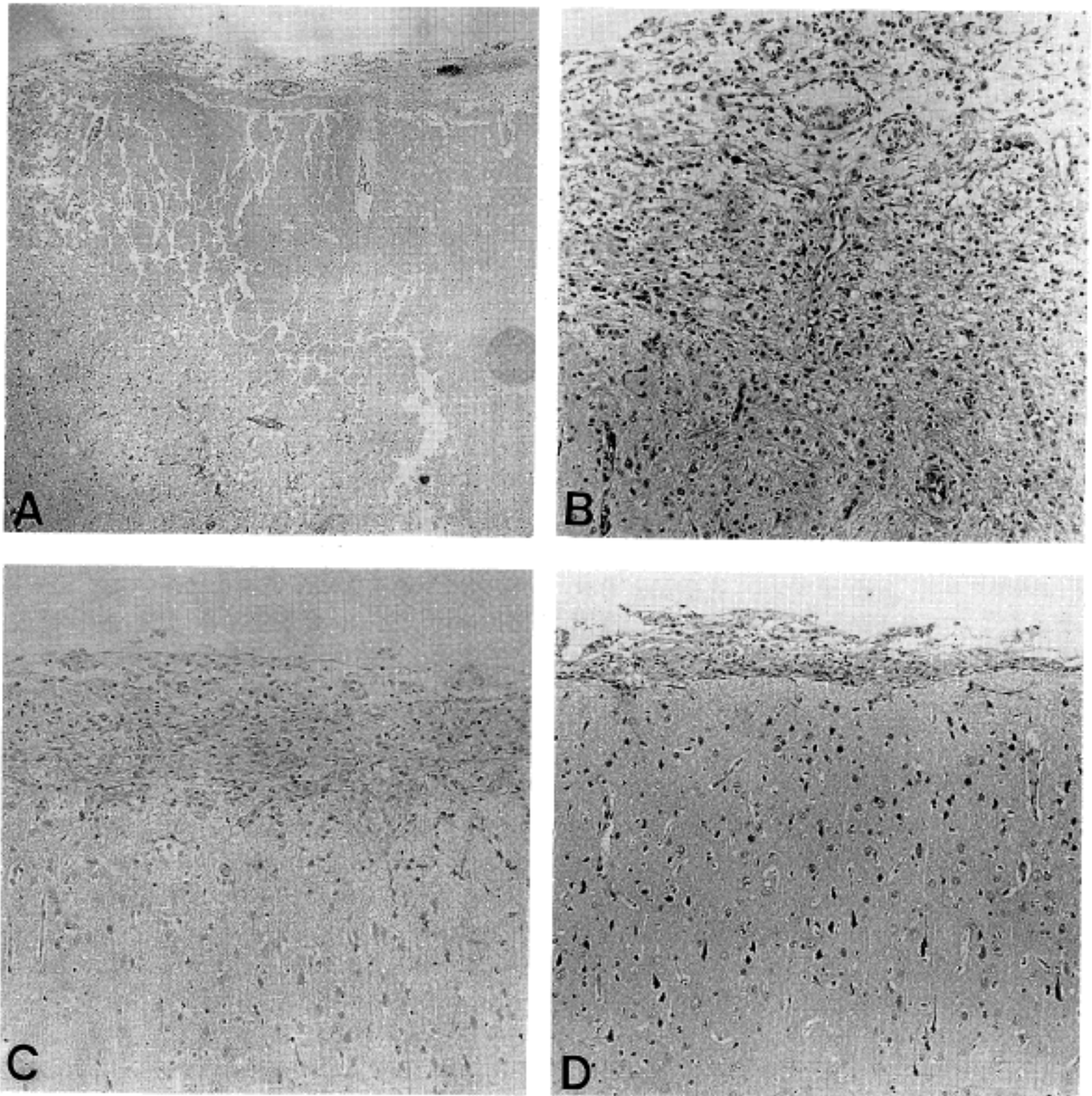


Fig. 1. Histologic changes after cryogenic injury in adult rat cerebral cortex. A(3 days after injury):Coagulative necrosis. B(1 week after injury):Vascular proliferation within and base of the lesion. C(2 weeks after injury):The granulation tissue within the lesion is disappeared and it is covered by newly formed pia mater.

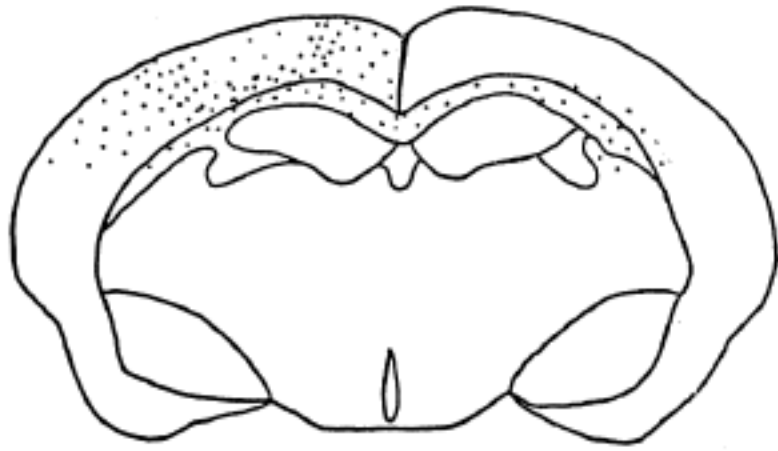


Fig. 2. Distribution of astrocytes showing positive reaction to glial fibrillary acidic protein in rat cerebrum. They are most numerous in the vicinity of the lesion and the number is decreased according to the distance.

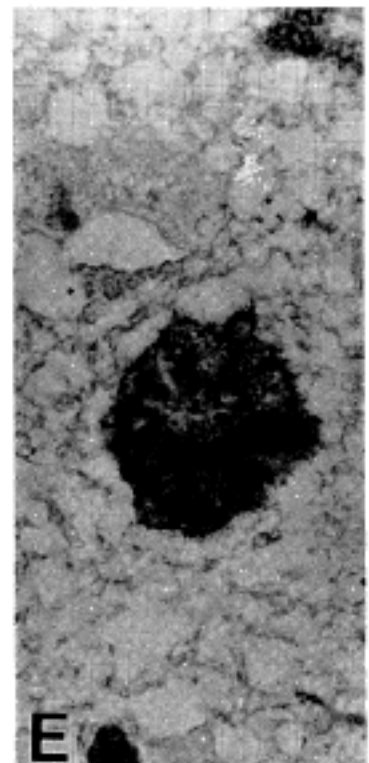
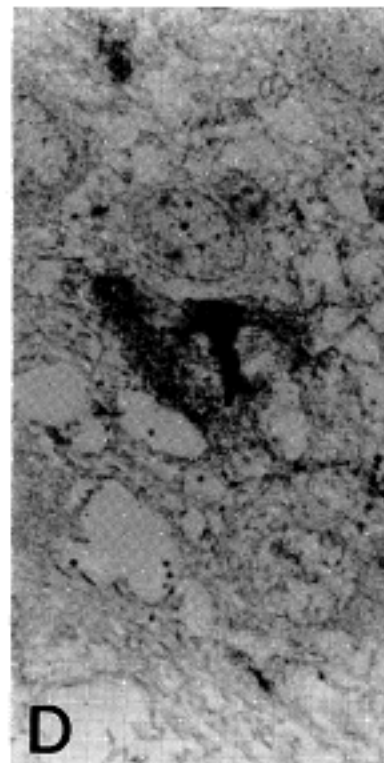
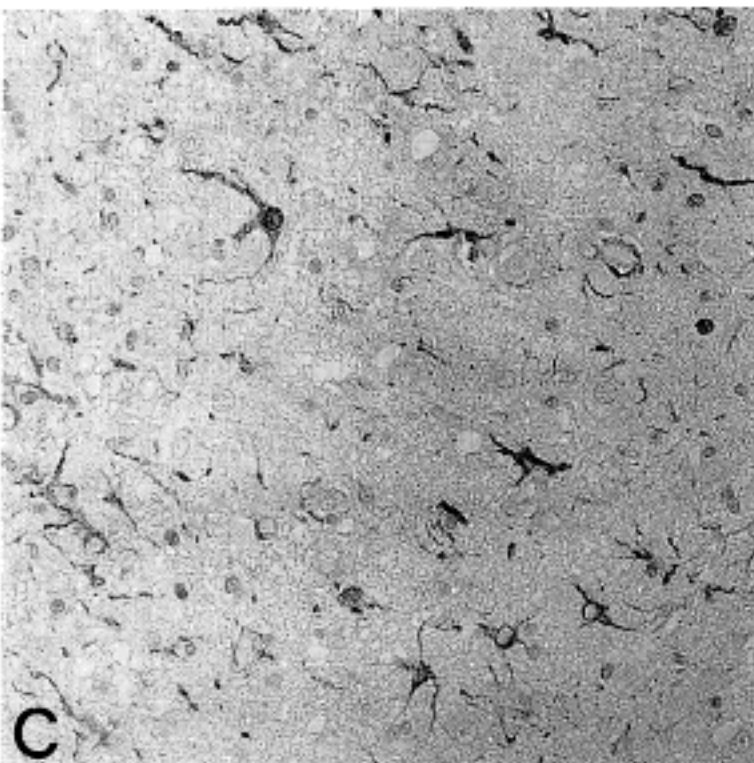
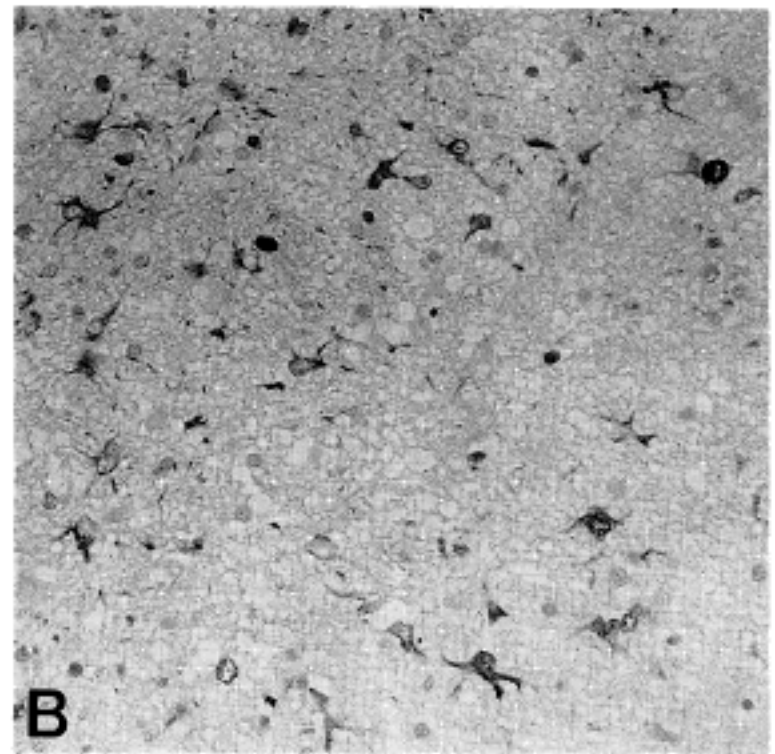
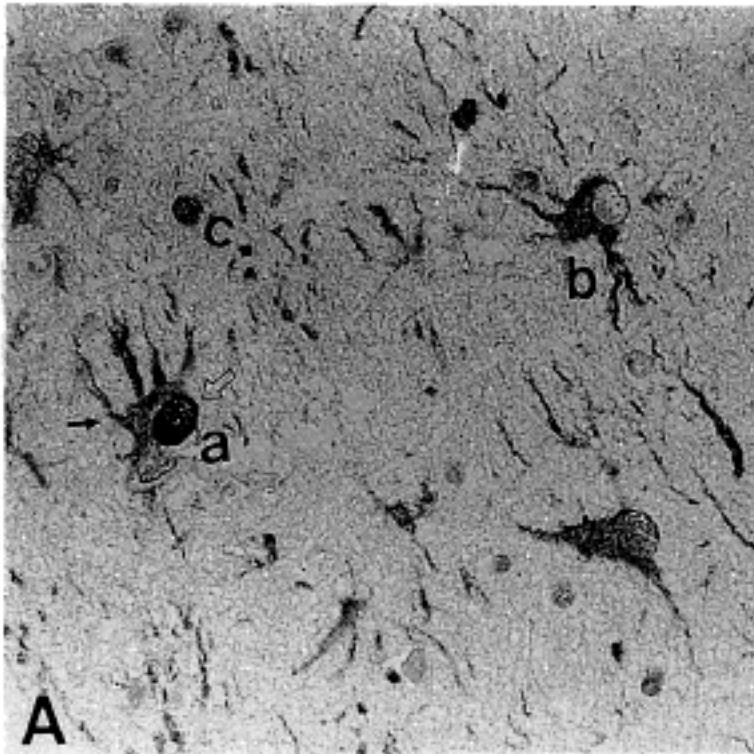


Fig. 3. Double immunohistochemical stain for proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and glial fibrillary acidic protein(GFAP). A:The nuclei of the proliferating astrocytes are stained by brown( $\Rightarrow$ ), and the cytoplasm is by red( $\rightarrow$ ) simultaneously. a:PCNA(+)/GFAP(+), b:PCNA(-)/GFAP(+), c:PCNA(+)/GFAP(-). B(3 days after injury):GFAP(+)/PCNA(+) cells are frequently seen. C(1 week after injury):The number of GFAP(+)/PCNA(+) cells are decreased. D,E: Astrocytes showing mitoses.



들이 모여 있었고 혈관들의 증식도 관찰되었다. 손상 후 1주일에는 병변내에서 호중구들이 사라지고 림프구나 대식세포들이 관찰되었으며 혈관증식도 더욱 심해졌다.

이들 혈관들은 주로 병변의 기저부에서 병변을 감싸듯이 늘어서면서 병변을 향해 수직으로 배열되어 있었다. 손상 후 2주가 되면 염증반응은 거의 사라지고 병변의 상부가 연막으로 덮히기 시작하였으며 4주 이후에는 손상 부위가 약간 함몰되고 그 위

의 연막이 약간 두꺼워지며 연막세포들과 뇌막혈관들의 증식이 관찰되는 것 이외에는 손상 전과 거의 같아졌다(Fig. 1).

2. 면역조직화학적 검색의 결과

1) GFAP: 대조군에서는 대뇌 피질에서 GFAP에 양성인 비대 별아교세포가 거의 관찰되지 않았다. 손상 후 3일부터 병변 부위의 측면과 기저부에서 양성 반응을 보이는 별아교세포의 수가 증가되었고

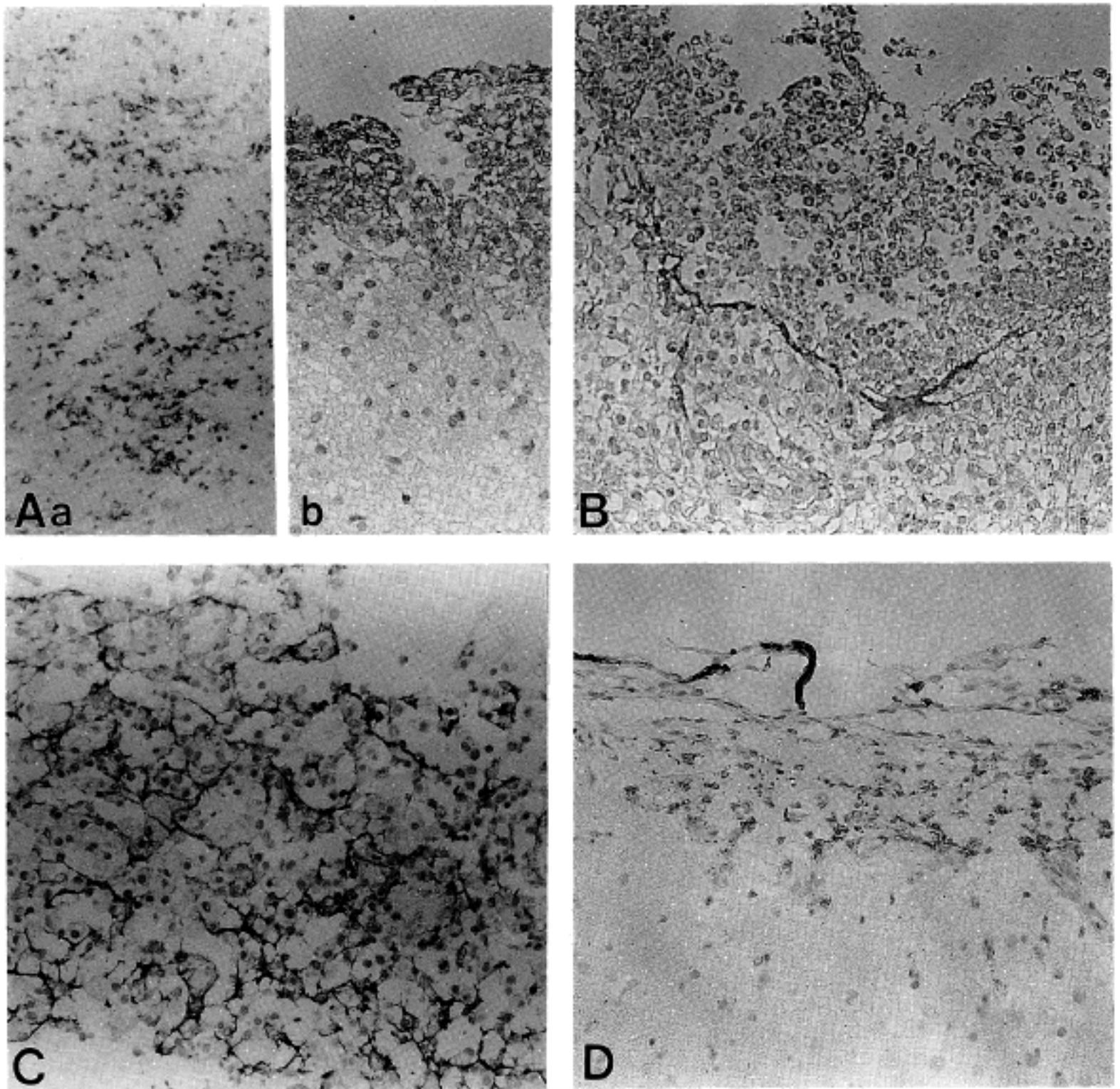


Fig. 4. Immunohistochemical stain for fibronectin. A(3 days after injury):Spotty(a), or diffuse(b) positive reaction within the lesion. B(1 week after injury):Linear positive reaction like a border between the lesion and the base. C:Positive reaction fine meshwork pattern within the lesion. D(2 weeks after injury):Positive reaction in the newly formed pia mater above the lesion.

1주후에는 그 수가 더욱 증가되었으며 염색 정도도 더욱 강하여졌는데, 이들은 주로 혈관주위로 돌기를 내밀어 혈관을 둘러싸고 있는 것처럼 보였으며 세포돌기들은 병변 부위를 향하여 방향성을 나타내고 있었다. 이들은 병변 부위 가까이에 가장 많았고 거리가 멀어짐에 따라 그 수가 감소하였으며 일부는

반대측 대뇌에서도 뇌실과 뇌량 주변에서 관찰되었다(Fig 2). 이 GFAP양성 별아교세포들은 손상 후 2주부터는 현저히 감소되어 4주 이후에는 손상 전과 거의 같아졌다(Fig 3).

2) PCNA: 대조군에서는 PCNA에 양성반응을 보이는 별아교세포가 없었다. 손상 후 3일에는 주로 병변하부와 측면에 있는 세포의 핵에서 양성 반응을 보였고 이들 중 일부는 핵의 크기도 상당히 증가되어 있었다. 이들은 손상 후 7일에는 약간 감소되었고 손상 후 2주부터는 관찰되지 않았다. PCNA에 양성반응을 보이는 세포들의 염색 정도도 손상 후 3일에 가장 강하였고 7일 이후에는 약해졌다. 이들 PCNA에 대한 반응은 세포질이 풍부한 세포들에서 양성이었다.

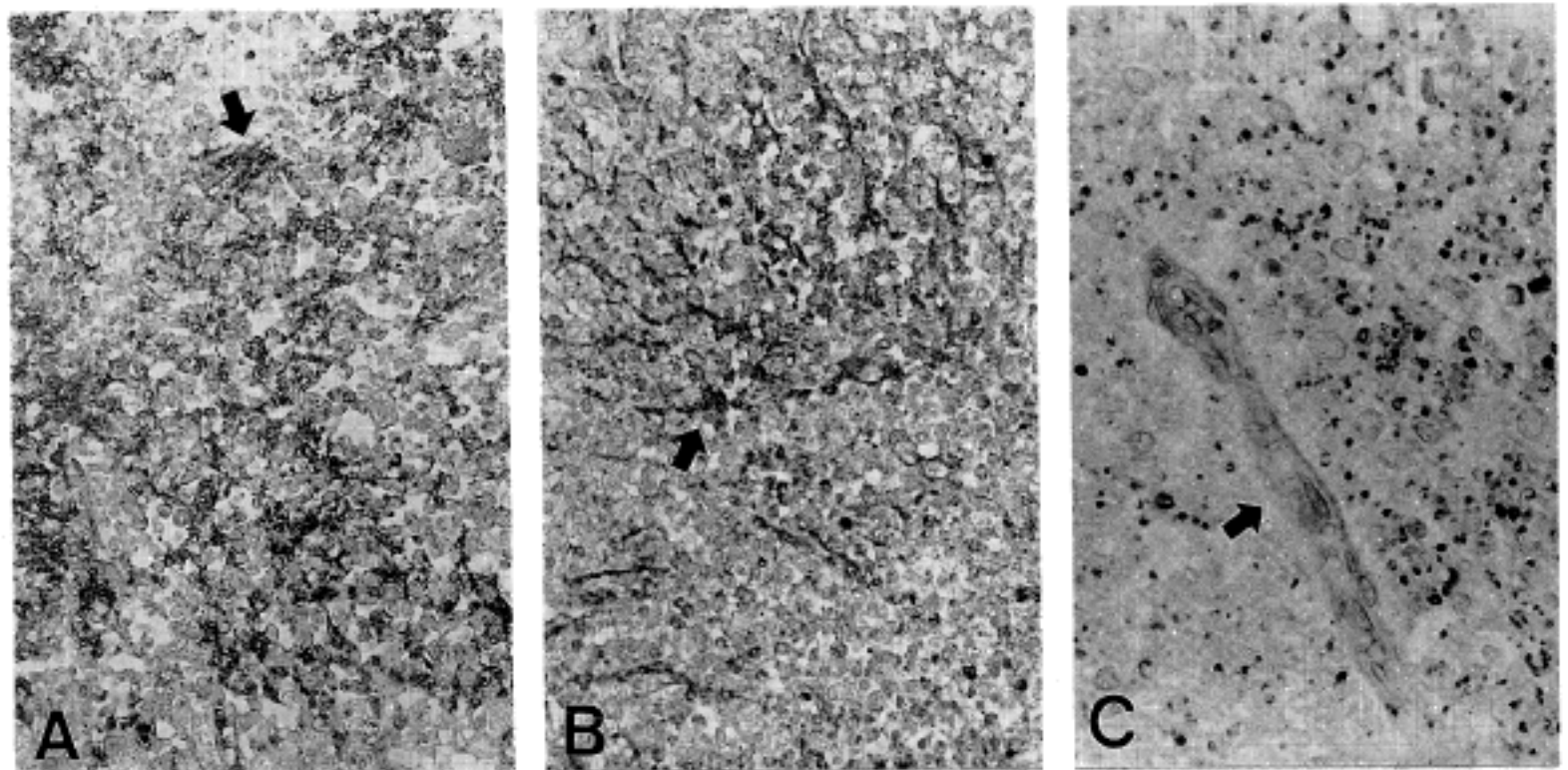
3) GFAP와 PCNA에 대한 이중 면역조직화학적 염색: 증식중인 별아교세포들은 이중 면역조직화학적 염색에서 nuclear fast red로 발색시킨 세포질은 적색으로, 그리고 diaminobenzidine으로 발색시킨 핵은 갈색으로 동시에 염색되었다. 이들은 대조군에서는 관찰되지 않았고 손상 후 3일에 그 수가 가장 많아서 GFAP에 양성인 별아교세포들 중 PCNA에 양성인 세포는 16%이었고 손상 후 1주에는 약간 감소하여 8%이었다(Table 1). 이들은 손상 후 2주부터는 관찰되지 않았다. 이들 중에는 실제 유사분열중의 모습으로 염색체들이 배열되어 있는 것들도 관

**Table 1.** Numbers of cells showing positive reaction to immunohistochemical stain for glial fibrillary acidic protein(GFAP) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA)<sup>1)</sup>

Groups	GFAP(+)	GFAP&PCNA (+)	% <sup>2)</sup>
3일	34.0	5.4	16
1주	34.8	2.8	8
2주	5.3	0	0
4주	0	0	0
8주	0	0	0
12주	0	0	0
16주	0	0	0

1) An average number of cells observed within 1 mm from the lesion under the one microscopic field of  $\times 200$ .

2) Ratio of GFAP & PCNA(+) cells per GFAP(+) cells



**Fig. 5.** Immunohistochemical stain for laminin. A(3 days after injury):Diffuse positive reaction within the lesion. B(1 week after injury):Linear positive reaction between the cells within the lesion. C(2 weeks after injury):Positive reaction in the newly formed vessle wall in the lesion.



찰되었다(Fig. 3).

4) **Fibronectin**: 대조군에서는 뇌막에서는 한 개의 선으로 그리고 대뇌의 기질에서는 혈관 주위에서 양성반응을 보였다. 손상 후 3일에는 병변의 기저부에서 양성반응을 보였는데 이들은 가는 선으로, 혹은 미만성이거나 점상으로 나타났다. 손상 후 1주에는 병변과 그 아래의 정상 대뇌 피질 사이에 경계처럼 비연속적인 선으로 나타났으며 병변 내에 침

윤된 세포들 사이에서는 가는 선으로 된 체 모양으로 나타났다. 손상 후 2주에는 새로 형성된 연막부위에서만 양성반응을 보였고 손상 후 4주 이후에는 병변 부위 상부의 연막이 주변보다 약간 두껍게 나타났다(Fig. 4).

5) **Laminin 및 제 4형 교원질**: Laminin과 제 4형 교원질은 서로 같은 양상을 보였는데 대조군에서는 주로 연막-교 경계와 신경망 사이의 혈관 벽에서 양

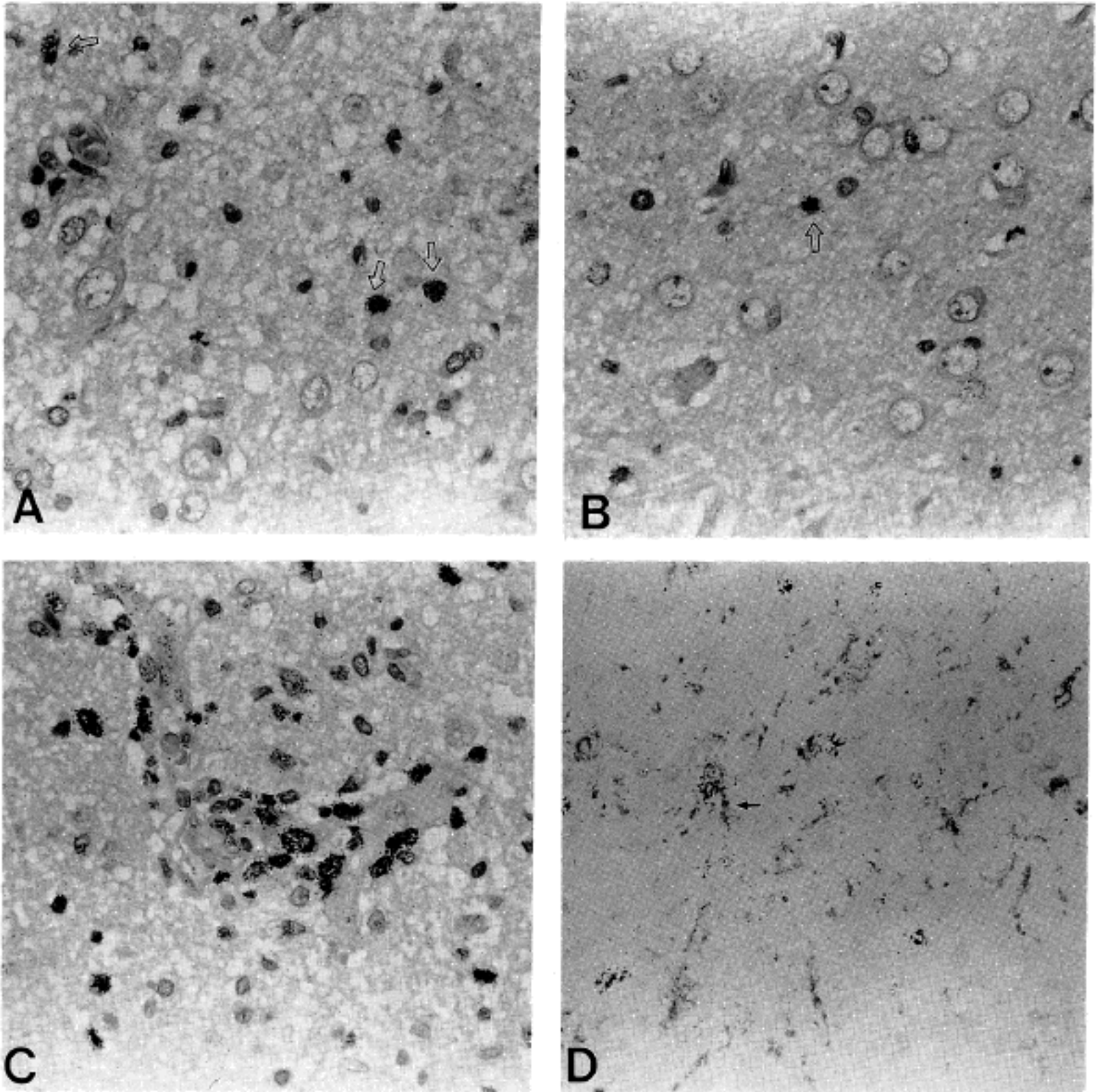
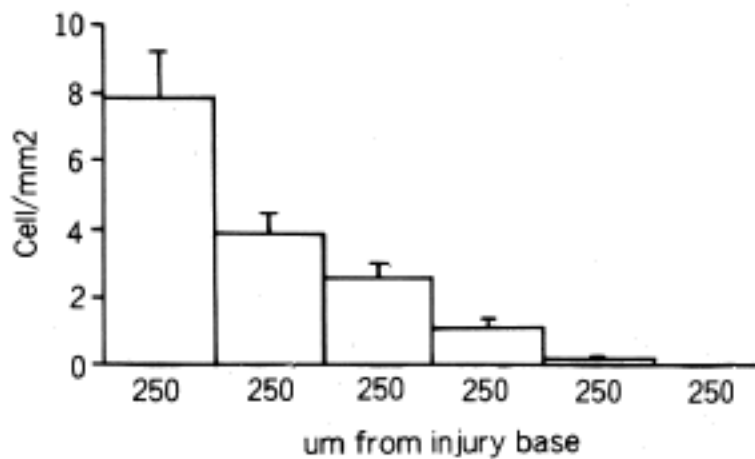


Fig. 6. Autoradiography after administration of Methyl- $H^3$ -thymidine. A(3 days after injury):Cells labelled by thymidine are frequently seen within 250 $\mu$ m from the lesion. B(1 week after injury):Cells labelled by thymidine are decreased in number. C:Some of them are clustered about the vessel wall. D(3 days after injury):GFAP(+) cells labelled by thymidine( $\rightarrow$ ).



성 반응을 나타내었다. 손상 후 3일에는 병변부위와 그 기저부에서 미만성으로 강한 양성반응을 보였고 손상 후 1주에는 병변내에서 점상이나 선상으로, 그리고 증식된 혈관들의 벽에서 양성반응을 보였다. 이 새로 생긴 혈관들은 그 혈관벽의 두께가 대조군에서보다 현저히 증가되어 있었다. 이런 양성반응은 손상 후 2주부터는 병변내에서 줄어들고 4주 이후부터는 새로 형성된 연막을 따라 국한되어 나타났으며, 혈관벽의 두께들도 손상 이전과 같아졌다(Fig. 5).



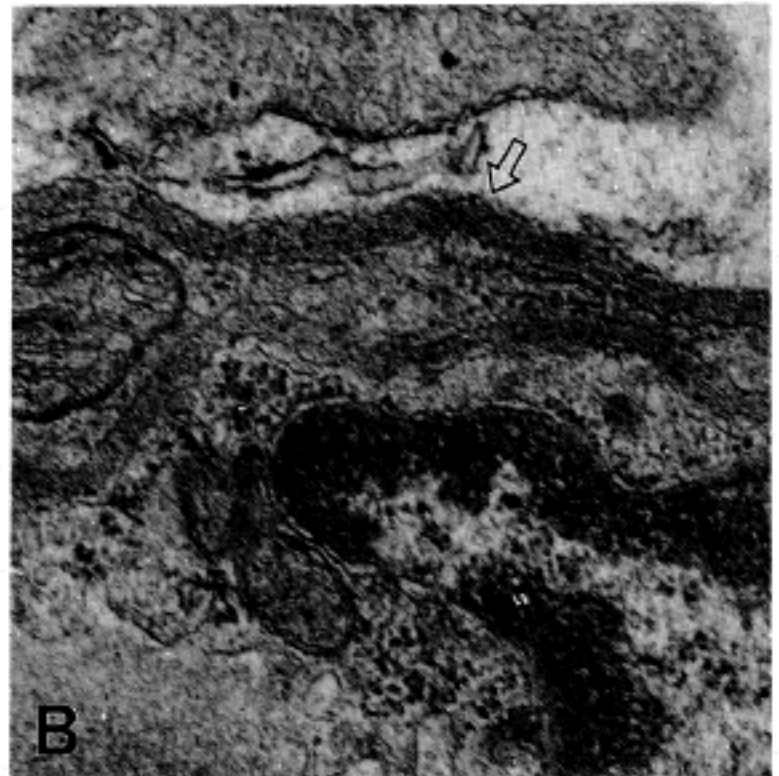
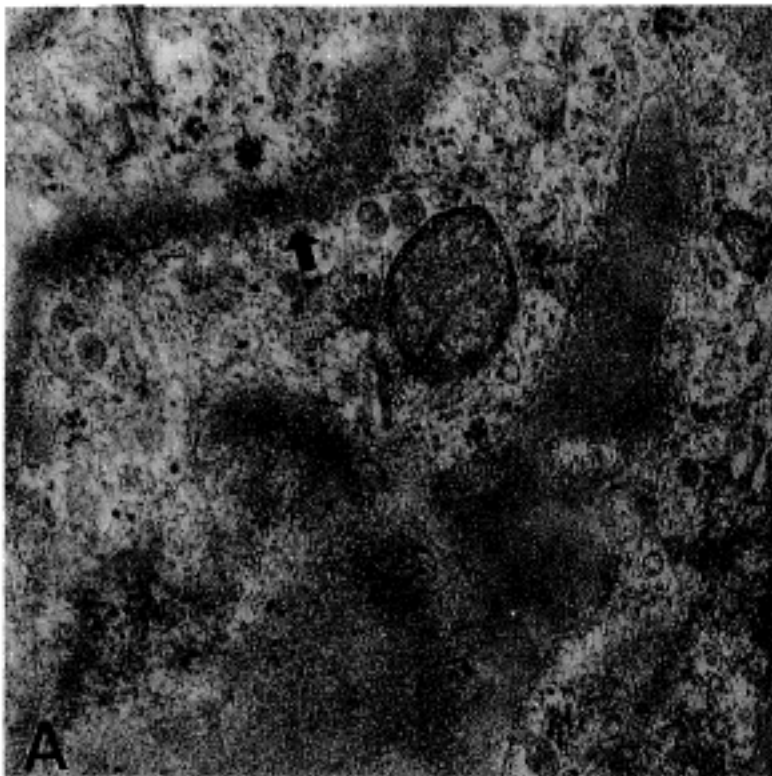
**Fig. 7.** Distribution of cells labelled by thymidine on 3 days after injury according to the distance from the lesion. It is most numerous within 250  $\mu\text{m}$  from the lesion, decreases according to the distance and most of them are found within 1mm from the lesion.

### 3. 자가방사기록법

자가방사기록법에 의해 표지되는 세포들은 손상 후 3일에 가장 많았고 손상 후 1주에는 현저히 감소하였으며 2주 이후에는 나타나지 않았다(Fig. 6). 이들 중 일부는 병변 주위의 혈관에 모여 있었는데 이들은 증식중인 섬유모세포들로 생각하였다. 손상 후 3일에 thymidine에 의해 표지되는 세포들은 병변으로부터 250  $\mu\text{m}$  이내의 부위에 가장 많았고 병변으로부터 거리가 멀어짐에 따라 그 수가 감소하였으며 대부분이 병변에서 1 mm 이내에서 관찰되었다(Fig. 7).

### 4. 전자현미경적 검색의 결과

손상 후 3일에는 기저판의 성분들이 관찰되지 않았고 손상 부위에 호중구 및 대식세포들과 세포 부스러기들로 차 있었다. 손상 후 1주에는 새로 형성되는 혈관벽 주위에서 기저판 성분같은 물질들이 전자밀도가 높게 관찰되었다. 손상 후 2주에는 기저판이 연속적으로 잘 형성되었고 4주 후에는 더욱 기질화되어 치밀판(lamina densa)과 그 양측의 lamina rara가 잘 구별되었다. 이들 새로 형성된 혈관들의 기저판은 그 두께가 부분적으로 두꺼워져 있었으며 일부 혈관에서는 한 층이 아니라 2~3층으로 중첩되어 있었고 그 층들 사이에서는 세포 부스러기들이 관찰되었다(Fig. 8).



**Fig. 8.** Electron microscopic findings. A(1 week after injury): The component of the basal lamina is seen. (x 15,600). B(2 weeks after injury): Well formed basal lamina is found as multiple layers ( $\times 37,500$ ).

## 고 찰

정상적으로 대뇌의 별아교세포는 회색질에서는 0.08%와 백색질에서는 0.03%가 methyl- $H^3$ -thymidine에 의한 자가방사기록법으로 표지되어 그 증식율이 낮고 교체율은 매우 느리다<sup>14</sup>. 그러나 대뇌 피질의 손상 후 병변에서 분열하는 세포의 19.3%와<sup>21</sup> 퇴행하는 시신경에서 분열 중인 세포의 30~50%가 별아교세포였다<sup>22</sup>. GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 이용한 연구로는 대뇌 피질의 바늘 손상 후 3~4일에 병변 부위에서 GFAP에 양성인 별아교세포의 1~5%가<sup>23,24</sup> 분열 중이었고 축적 자가방사기록법을 이용한 연구로는 바늘 손상 후 GFAP에 양성인 별아교세포의 17~40%가<sup>24,25</sup> 분열 중이었다. 그 이후 세포증식의 새로운 표식자인 PCNA에 대한 면역조직화학적 염색을 이용한 연구로는 바늘 손상 후 2.5~3일에 GFAP에 양성인 별아교세포의 5~6%가 표지되어서<sup>29</sup> 자가방사기록법을 이용한 연구에서보다 약간 높은 표지율을 보였다.

GFAP에 양성 반응을 보이는 세포들은 병변 주변에서 가까운 부분에 가장 많았고 그 거리가 멀어짐에 따라 그 수가 감소하였으며 일부는 반대측 대뇌에서도 관찰이 되었다. 이렇게 손상받지 않은 반대측 대뇌 반구에서 관찰되는 별아교세포들은 실험 방법과 범위의 차이에서 기인하는 것으로 생각되어지고 있다<sup>64</sup>. 바늘 손상을 이용한 연구들에서는 대부분 동측의 대뇌 반구에서만 관찰이 된다고 하지만<sup>24,34,72</sup> 좀더 크기가 작은 바늘을 이용했을 경우나<sup>64</sup> 손상의 크기가 큰 경우<sup>16</sup> 및 레이저<sup>17</sup> 혹은 동결 손상을 이용한 경우에는<sup>66</sup> 반대측 대뇌 반구에서도 GFAP에 양성인 별아교세포들이 관찰된다고 한다. 본 연구에서도 동결 손상을 이용하였으므로 반대측 대뇌에서도 별아교세포들이 관찰된 것으로 생각된다. 이런 반대측 대뇌 반구에서 관찰되는 반응성 별아교세포들의 기원은 손상 부위로부터 이주했거나, 별아교세포의 반응성을 촉진하는 어떤 삼투성이 있는 물질의 분비 및 확산 때문일 가능성이 있는데<sup>2,32,91</sup> 뇌량을 통한 이주의 가능성은 적고 아직 확실히 밝혀지지 않는으나 삼투성 물질에 의한 것으로 생각되어지고 있다.<sup>64</sup>

본 연구에서는 동결 손상 주변의 1 mm 이내에서 GFAP에 양성인 별아교세포들 중 손상 후 3일에 자가방사기록법으로는 약 1%가 그리고 PCNA를 이용한 방법으로는 약 16%가 표지되었다. 이것은 이전의 연구들에서보다 더 높은 표지율인데 이는 손상

방법과 손상 정도 및 면역조직화학적 염색 방법의 차이 때문인 것으로 생각된다<sup>17,32,65</sup>. 본 연구에서는 동결 손상을 이용하였는데 이는 바늘 손상 보다 손상 부위가 더 넓고 손상 깊이는 더 얇다. 바늘 손상을 이용한 연구에서는 탐지되지 않았던 GFAP에 양성인 별아교세포들이 동결 손상을 이용한 연구에서는 탐지되었으므로 보아<sup>66</sup> 본 연구에서도 동결 손상을 이용하였기 때문에 PCNA에 의해 표지된 GFAP 양성 별아교세포들의 비율이 더 높은 것으로 보인다. 그리고 본 실험에서는 면역조직화학적 염색시 전자레인지에서 10분간 미리 반응시켰는데 이것이 표지율을 더 높여준 것으로 생각된다<sup>67</sup>.

PCNA에 양성 반응을 보이는 증식 중인 별아교세포들은 thymidine에 의해 표지된 별아교세포들보다 훨씬 많은데 PCNA는 유사분열의 주기 중 G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S 및 G<sub>2</sub> 시기에 양성이고<sup>68~70</sup> thymidine은 S 시기에 표지되어서<sup>71</sup> PCNA에 의해 표지되는 수가 더 많기 때문인 것으로 생각할 수 있다<sup>29,33</sup>.

PCNA에 양성인 별아교세포의 수는 손상 후 3일에 최대치를 나타내는데 비해 GFAP에 양성인 별아교세포의 수는 손상 후 7일에 최대치를 나타내는 것은 유사분열을 일으킨 별아교세포가 손상 후 3일에는 그 세포질내의 GFAP가 면역조직화학적 염색에 양성 반응을 나타낼 만큼 성숙되어 있지 못하거나 충분하지 못하다가 그것이 점점 성숙하고 많아져서 손상 후 7일에 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색에 양성 반응을 나타내기까지 시간이 걸린 것으로 생각하였다<sup>29,32</sup>.

Thymidine에 의해 표지되는 세포들은 병변으로부터 250  $\mu$ m 이내의 부위에서 가장 많이 관찰되고, 병변에서부터 거리가 멀어짐에 따라 그 수가 점점 감소하였으며, 대부분이 병변에서 1 mm 이내에서 관찰되었다. 이는 증식하는 별아교세포들은 병변에서 가까운 곳에서 발견된다는 보고들과 일치한다<sup>29,33,72,73</sup>. 대뇌 피질의 손상 후 일어나는 별아교세포증에서 증가되는 별아교세포들의 근원으로는 대부분이 원래 있던 별아교세포들에서 GFAP의 합성이 증가되어 나타나는 것이거나<sup>1,11,16~19</sup> 주위로부터 이주한 것이고,<sup>30</sup> 일부만이 세포분열에 의한 것으로 생각되고 있다. 이 중에서도 병변으로부터 가까운 곳에서 증가된 별아교세포는 세포분열에 의해 생기고<sup>8,10,29,33</sup> 병변으로부터 먼 곳에서 증가된 별아교세포들은 비대된 내인성 별아교세포들로 생각되고 있다.

대뇌 피질에서 세포외기질은 기저막으로서 연막-교 경계와 신경망 사이의 혈관벽 등에 주로 존재하는데<sup>40~45,52</sup> 이들은 세포 배양 실험에서는 미성숙 교

세포나<sup>46-51</sup> 뇌막세포들에 의해 합성되지만<sup>52</sup>, 생체 실험에서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다<sup>53-55</sup>.

본 연구에서 세포외기질 중 fibronectin은 손상 후 3일에 병변 내의 세포들 사이에서 미만성으로, 점상으로 혹은 가느다란 선으로 나타났는데 이들은 손상 후 1주에는 병변과 주변의 정상적인 대뇌 피질 사이의 경계선처럼 병변 기저부에 선상으로 나타났으며, 병변내의 세포들 사이에서는 가느다란 선이 서로 얽힌 체 모양으로 나타났다. Laminin과 제 4형 교원질은 서로 같은 양상을 보였는데 손상 후 3일에는 fibronectin과 같이 병변내에서 미만성으로 양성 반응을 보였고 손상 후 7일에는 병변 주변의 혈관벽에서 주로 관찰되었으며 손상 2주 이후에는 병변 상부에 새로 형성된 연막 부위에서만 양성 반응을 보였다. 세포외기질 중 제 4형 교원질, laminin 및 heparan sulfate proteoglycan은 모든 기저막에서 발견되는 기저막 본래의 성분이고 fibronectin은 일부의 기저막에만 존재하고 기저막 바로 옆의 결합조직에서 발견되는 비고유의 성분이다<sup>37</sup>. 본 연구에서 fibronectin은 이전의 연구들에서와 같이<sup>42,55</sup> 병변내에서 어떤 기질화된 형태가 없이 미만성으로 나타나고 laminin과 제 4형 교원질은 혈관벽으로 기질화되는 것으로 보아 fibronectin은 기저막 형성에 적당한 기질을 제공하고 laminin과 제 4형 교원질은 기저막 성분중 일부가 되는 것으로 생각하였다.

전자현미경적 검색상 새로 형성되는 혈관들의 기저판은 손상 후 1주에 처음 그 성분들이 관찰되었고, 손상 후 2주에는 연속적으로 완전한 기저판을 형성하였으며, 손상 후 4주에는 더욱 기질화되어 치밀판(lamina densa)과 그 양측의 lamina rara가 잘 구별되었다. 이들 새로 생긴 혈관들은 그 두께가 불규칙하며, 한 층이 아니라 두세 층으로 중첩되어 있었는데 이것은 이전의 연구들에서의 관찰과 일치한다<sup>54,74</sup>.

대뇌의 손상 후 일어나는 교세포증이 대뇌의 기능 회복을 위해 도움을 주는지 아니면 방해하는 역할을 하는지에 관해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 별아교세포들은 세포골격의 역할뿐 아니라 그 외에도 대뇌의 기능에 중요한 여러가지 역할들 즉, 신경원의 이주, 신경초의 성장, 신경 접합부의 형성, 수분, 이온 및 신경전달 물질의 조절, 신경원에 열량 공급, 면역학적 기능 같은 것들이 있어서<sup>2,11</sup> 대뇌의 손상 후 별아교세포의 증식은 대뇌의 기능 유지를 위해 중요하지만 한편으로는 물리적인 장벽을 형성하고 신경원의 성장을 억제하여 신경 회로의 재구성을 방해하는 단점이 있다<sup>1,11,25,57</sup>. 그래서 DNA

합성의 억제제<sup>58</sup>, glucocorticoid<sup>59,60</sup>, 성선 호르몬 및<sup>60</sup> cytokine 등을<sup>62</sup> 사용하여 별아교세포의 증식을 억제하거나 지연시켜서 중추신경계의 기능 회복을 촉진시키려는 연구들이 있다. 본 연구에서는 별아교세포의 증식과 손상된 대뇌의 기능 회복에 대한 구체적인 관찰은 없었지만 앞서와 같이 별아교세포의 증식상을 변화시킴으로써 대뇌의 기능 회복을 촉진시키려는 연구들을 하는데 있어 본 연구에서 관찰한 별아교세포의 증식상과 세포외기질의 재생 양상이 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

흰쥐의 대뇌 피질에 동결 손상을 준 후 광학 현미경적 검색, 면역조직화학적 염색, 자가방사기록법 및, 전자현미경적 검색을 통하여 별아교세포와 세포외기질을 관찰하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 대뇌 피질의 동결 손상 후에 생긴 응고성 괴사의 소견은 병변 상부에 새로운 연막을 형성하면서 회복되었다.

2) 대뇌 피질의 동결 손상 후에 증가된 세포에서 PCNA에 양성 반응을 보이는 세포들 중 일부가 별아교세포이고, GFAP에 양성 반응을 보이는 세포들 중 일부가 PCNA에 의해 표지되었다.

3) 자가방사기록법이나 PCNA에 의해 표지되는 증식중인 별아교세포들은 손상 3일 후에 가장 많이 나타나고 2주부터는 나타나지 않았다.

4) 자가방사기록법과 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색에서 GFAP에 양성반응을 보이는 별아교세포의 1%가 자가방사기록법에 의해 표지되었고, PCNA와 GFAP에 대한 이중 면역조직화학적 검색에서는 GFAP에 양성반응을 보이는 별아교세포의 16%(3일)~8%(1주)가 PCNA에 의해 표지되었다.

5) Fibronectin, laminin 및 제 4형 교원질에 대한 면역조직화학적 염색에서 laminin과 제 4형 교원질은 병변 부위에 새로 생성된 혈관벽으로 기질화되었고, fibronectin은 병변내에서는 미만성으로, 병변의 기저부와 정상 대뇌 피질 사이의 경계부에서는 선상으로 양성반응을 보였으며, 병변의 상부에서는 손상 후 2주 만에 새로운 연막이 생성되었다.

6) 전자현미경적 검색상 기저판 성분들은 손상 후 1주부터 혈관벽에서 관찰되기 시작하였으며, 이들은 손상 후 2주에 그 두께가 불규칙하기는 하나 완전한 기저판을 형성하였다.

이상과 같은 소견으로 동결 손상 후 흰쥐의 대뇌 피질의 별아교세포들은 재생과정의 3일 이내의 아



주 초기에 세포분열을 함으로써 증식하며, 이런 증식은 2주 후면 관찰할 수 없고 손상된 연막의 기저판은 손상 후 2주만에 재생됨을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Eng LF, Yu ACH, Lee YL. Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res* 1992; 94: 353-65.
2. Norenberg MD. Astrocytes responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 213-20.
3. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 1971; 28: 351-4.
4. Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 1972; 43: 429-35.
5. Lazarides E. Intermediate filaments: A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann Rev Biochem* 1982; 51: 219-50.
6. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): The major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 1985; 8: 203-14.
7. Faddis BT, Vijayan VK. Application of glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the quantification of astrocytes in the rat brain. *Am J Anat* 1988; 183: 316-22.
8. 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* 1991; 566: 333-6.
9. Arai N. The role of swollen astrocytes in human brain lesions after edema - an immunohistochemical study using formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Neurosci Lett* 1992; 138: 56-8.
10. Janeczko K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci* 1993; 11: 139-47.
11. Eng LF, Reier PJ, Houle JD. Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res* 1987; 71: 439-55.
12. Prochiantz A, Mallat M. Astrocyte diversity. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 540: 52-63.
13. Adams JH, Duchon LW. Greenfield's neuropathology. 5th ed. London, Edward & Arnold. 1992: 34-41.
14. Kaplan MS, Hinds JW. Gliogenesis of astrocytes and oligodendrocytes in the neocortical grey and white matter of the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *J Comp Neurol* 1980; 193: 711-27.
15. da Cunha A, Jefferson JJ, Tyor WR, Glass JD, Jannotta FS, Vitkovic L. Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes. *Brain Res* 1993; 600: 161-5.
16. Ludwin SK. Reaction of oligodendrocytes and astrocytes to trauma and implantation: A combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1985; 52: 20-30.
17. Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res* 1986; 374: 110-8.
18. Hozumi I, Chiu FC, Norton WT. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res* 1990; 524: 64-71.
19. Vijayan VK, Lee YL, Eng LF. Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol* 1990; 13: 107-18.
20. Lapham LW. Cytologic and cytochemical studies of neuroglia. I. A study of the problem of amitosis in reactive protoplasmic astrocytes. *Am J Pathol* 1962; 41: 1-21.
21. Cavanagh JB. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J Anat* 1970; 106: 471-87.
22. Skoff RP, Vaughn JE. An autoradiographic study of cellular proliferation in degenerating rat optic nerve. *J Comp Neurol* 1971; 141: 133-56.
23. Latov N, Nilaver G, Zimmerman EA, et al. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury. A study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Develop Biol* 1979; 72: 381-4.
24. Miyake T, Hattori T, Fukuda M, Kitamura T, Fujita S. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res* 1988; 451: 133-8.
25. Topp KS, Faddis BT, Vijayan VK. Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia* 1989; 2: 201-11.
26. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;

- 121: 2228-34.
27. Louis DN, Edgerton S, Thor AD, Hedley-Whyte ET. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. *Acta Neuropathol* 1991; 81: 675-9.
  28. van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-72.
  29. Miyake T, Okada M, Kitamura T. Reactive proliferation of astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res* 1992; 590: 300-2.
  30. Rose G, Lynch G, Cotman CW. Hypertrophy and redistribution of astrocytes in the deafferented dentate gyrus. *Brain Res Bull* 1976; 1: 87-92.
  31. Janeczko K. The proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1991; 564: 86-90.
  32. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 1992; 17: 877-85.
  33. Schiffer D, Giordana MT, Cavalla P, Vigliani MC, Attanasio A. Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: double stainings and markers of cell proliferation. *Int J Dev Neurosci* 1993; 11: 269-80.
  34. Mathewson AJ, Berry M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res* 1985; 327: 61-9.
  35. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous system: structure and function. *J Neurosurg* 1988; 69: 155-70.
  36. Vracko R. Basal lamina scaffold - Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure: A review. *Am J Pathol* 1974; 77: 314-46.
  37. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 1983; 48: 656-77.
  38. Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 761-99.
  39. Leblond CP, Inoue S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 1989; 185: 367-90.
  40. Schachner M, Schoonmaker G, Hynes RO. Cellular and subcellular localization of LETS protein in the nervous system. *Brain Res* 1978; 158: 149-58.
  41. Shellswell GB, Restall DJ, Duance VC, Bailey AJ. Identification and differential distribution of collagen types in the central and peripheral nervous systems. *FEBS Lett* 1979; 106: 305-8.
  42. Jones TR, Ruoslahti E, Schold SC, Bigner DD. Fibronectin and glial fibrillary acidic protein expression in normal human brain and anaplastic human gliomas. *Cancer Res* 1982; 42: 168-77.
  43. Sanes JR. Roles of extracellular matrix in neural development. *Ann Rev Physiol* 1983; 45: 581-600.
  44. Maxwell WL, Duance VC, Lehto M, Ashurst DE, Berry M. The distribution of types I, III, IV and V collagens in penetrant lesions of the central nervous system of the rat. *Histochem J* 1984; 16: 1219-29.
  45. McComb RD, Moul JM, Bigner DD. Distribution of type VI collagen in human gliomas: comparison with fibronectin and glioma-mesenchymal matrix glycoprotein. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 623-33.
  46. Liesi P, Dahl D, Vaheri A. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 920-4.
  47. Kusaka H, Hirano A, Bornstein MB, Raine CS. Basal lamina formation by astrocytes in organotypic cultures of mouse spinal cord tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44: 295-303.
  48. Price J, Hynes RO. Astrocytes in culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin. *J Neurosci* 1985; 5: 2205-11.
  49. Liesi P, Kirkwood T, Vaheri A. Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain. *Exp Cell Res* 1986; 163: 175-85.
  50. Chiu AY, Espinosa de los Monteros A, Cole RA, Loera S, de Vellis J. Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, schwann cells and schwannomas in culture. *Glia* 1991; 4: 11-24.
  51. Liesi P, Risteli L. Glial cells of mammalian brain produce a variant form of laminin. *Exp Neurol* 1989; 105: 86-92.
  52. Rutka JT, Giblin J, Dougherty DV, McCulloch JR, DeArmond SJ, Rosenblum ML. An ultrastructural and immunocytochemical analysis of leptomenigeal and meningioma cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986; 45: 285-303.
  53. Liesi P, Kaakkola S, Dahl D, Vaheri A. Laminin is induced in astrocytes of adult brain by injury. *EMBO J* 1984; 3: 683-6.
  54. Bernstein JJ, Getz R, Jefferson M, Kelemen M.

- Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord. *Brain Res* 1985; 327: 135-41.
55. Suzuki M, Choi BH. The behavior of the extracellular matrix and the basal lamina during the repair of cryogenic injury in the adult rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 355-61.
  56. Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures - a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol* 1983; 3: 10-6.
  57. Stensaas LJ, Partlow LM, Burgess PR, Horch KW. Inhibition of regeneration: the ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsal root. *Prog Brain Res* 1987; 71: 457-68.
  58. Billingsley ML, Mandel HG. Effects of DNA synthesis inhibitors on post-traumatic glial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222: 765-70.
  59. Vijayan VK, Cotman CW. Hydrocortisone administration alters glial reaction to entorhinal lesion in the rat dentate gyrus. *Exp Neurol* 1987; 96: 307-20.
  60. O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS. Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem* 1991; 57: 860-9.
  61. Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 1993; 628: 271-8.
  62. Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci* 1994; 14: 846-56.
  63. Billingsley ML, Straw JA, Mandel HG. Glial DNA synthesis and cell proliferation in the lesioned frontal cortex of the rat. *Brain Res* 1982; 247: 325-34.
  64. Moundjian RA, Antel JP, Yong VW. Origin of contralateral reactive gliosis in surgically injured rat cerebral cortex. *Brain Res* 1991; 547:223-8.
  65. Fernaud-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 1993; 8: 277-91.
  66. Moore IE, Buontempo JM, Weller RO. Response of fetal and neonatal rat brain to injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987; 13: 219-28.
  67. Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote J. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: Androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* 1994; 25: 263-70.
  68. Bravo R, MacDonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin(PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985; 4: 655-61.
  69. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986; 166: 209-19.
  70. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-9.
  71. Korr H, Schultze B, Maurer W. Autoradiographic investigations of glial proliferation in the brain of adult mice. II. Cycle time & mode of proliferation of neuroglia and endothelial cells. *J Comp Neurol* 1975; 160: 477-90.
  72. Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Develop Brain Res* 1988; 466: 201-10.
  73. Janeczko K. Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res* 1989; 485: 236-43.
  74. Berry M, Maxwell WL, Logan A, et al. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir(Supp)* 1983; 32: 31-53.
-