

88개로서 현저한 증가를 보였고 5~7일째까지는 유지되다가 서서히 감소되어 4주 부터는 대조군과 비슷한 양상을 나타내었다. 이는 Graeber등⁶의 연구결과와 일치하는 소견이다. 활성화되어 증식된 소교세포들은 형태학적으로 타원형의 핵과 방추형의 세포질을 가지고 있어 중추신경계의 자가면역질환⁸과 대뇌허혈⁹ 및 신경변성질환¹⁰ 등의 질환이 있을 때 관찰되는 소교세포들의 형태학적 소견과 비슷하지만 증식된 소교세포들이 출현하는 부위는 요추 척수의 복측 회백질에서는 신경세포 주위에서 주로 관찰되고 배측 회백질에서는 신경망 사이에서 관찰되었다. 이것은 요추 척수의 신경세포의 분포와 관련이 있을 것으로 생각되고 축삭절개술 후 구심성 입력 (afferent input)의 소실 결과로 인한 축삭 및 신경세포의 변성 때문일 것으로 판단된다.

한편 증식된 소교세포들의 감소를 형태학적으로 관찰한 연구들^{12,13}에서 증식된 소교세포들이 서서히 사멸하여 휴지기 상태로 환원된다고 알려져 있지만 사멸하는 기전에 대하여 잘 알려져 있지 않았다. 그러나 최근에 Gehrmann등¹⁴이 apoptosis가 증식된 소교세포들의 사멸 기전임을 보고하였다.

일반적으로 모든 세포들은 항상성의 유지가 필수적이며 이를 위해서 세포의 증식과 사멸의 균형이 조화롭게 이루어져야 한다.³⁵ 자연적 세포사는 주로 apoptosis라고 불리는 진화적으로 유지되어온 세포자살 기전을 통해서 이루어진다. 세포가 apoptosis가 되기 위한 결정은 아주 다양한 조절인자에 의해 영향을 받으며 최근에 암, 바이러스 감염질환, 자가면역질환, 신경변성질환 및 후천성 면역결핍 증후군 (acquired immunodeficiency syndrome)등과 같은 여러 질환에서 세포생존과 관련된 apoptosis가 중요한 병인인이 밝혀졌다.²¹ 파라핀에 포매된 조직을 이용하여 apoptosis 세포를 검출하는 방법은 SGP-2 (Sulfated glycoprotein-2)의 mRNA 혹은 단백질을 검출하는 방법³⁶과 cathepsin D³⁷ 및 조직 glutaminase를 이용한 검출법,³⁸ 겔 전기영동을 이용한 DNA laddering을 관찰하는 방법¹⁸등이 있으나 최근에 개발된 *in situ* TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick end labeling을 이용한 TUNEL 방법이 조직 내에서 apoptosis 세포를 검색하는 가장 일반적인 방법^{19,20}의 하나이다. TUNEL 방법은 apoptosis과정에서 nucleosome 사이에 있는 분절된 DNA에 3'-OH end가 있는 점을 착안한 방법으로 biotinylated nucleotide가 TdT의 작용에 의해 3'-OH end에 결합하고 여기에 streptavidin-horseradish peroxidase를 결합시켜 DAB로 발색하여 조직 내에서 특정세포의 분절된 DNA를 관찰할 수 있다. 이 방법의 장점은 조직내의 특정세포에서 국한되어 발생하는 apoptosis를 관찰할 수 있고 형태학적으로 정상으로 보이지만 apoptosis의 초기에 해당되는 DNA분절을 가진 세포들도 검색이 가능하다. 본 연구에서는 대조군에서 DNA 분절을 관찰할 수 없었고 실험군에서 절단 후 5일째부터 나타나기 시작하여 3주째

에 가장 많은 DNA 분절을 보인 세포를 관찰할 수 있었으며 그 후 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 소견을 활성화된 소교세포의 증식과 종합해 보면 절단 후 1일째부터 활성화되어 증식하기 시작한 소교세포들은 2~3일째에 가장 현저한 증식을 보이고 5일째부터 apoptosis가 시작되어 절단 후 3주째에 가장 많은 apoptosis를 보이면서 소교세포들의 사멸이 진행되는 것으로 요약할 수 있다. 또한 절단 후 5일째까지는 많은 활성화된 소교세포들의 증식만 관찰될 뿐 DNA분절을 보이는 세포를 관찰할 수 없어 Bursch등³⁹이 기술한 apoptosis는 여러 단계가 있어 세포 내외적 요인에 의해 자극이 있어도 아무런 변화가 없는 시기가 있다가 결국 apoptosis를 보인다는 연구결과와 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.

Kerr¹⁵는 투과전자현미경적 검색에서 초기의 apoptosis의 소견으로 이질염색질의 핵막으로 편재, 세포질의 농축 및 비교적 보존된 세포내 소기관 등이 관찰됨을 지적하였다. 본 실험에서도 절단 후 3일째에 투과전자현미경적 관찰에서 초기의 apoptosis 소견이 관찰되어 일치되는 소견을 보였으나 TUNEL 방법으로는 발현신호를 관찰할 수 없어 초기의 apoptosis의 과정이 비교적 짧은 시간 내에 이루어지던가 혹은 DNA 분절이 생기지 않을 가능성을 제시할 수 있지만 이에 대한 더 많은 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다. apoptotic body는 절단 후 5일째 출현하여 3주째에 가장 현저하게 관찰되었으며 투과전자현미경적 소견으로 반달모양의 핵분절과 잘 보존된 정상 소기관들을 관찰할 수 있었고 apoptotic body가 막으로 둘러싸여 있어 apoptotic body에 대한 초미형태학적 보고들과 같은 소견을 얻을 수 있었다.⁴⁰

소교세포가 활성화되는 기전과 활성화된 소교세포의 역할에 대하여 면역학적인 측면에서 그 기전의 일부분이 밝혀져 있다. 이를 살펴보면 MHC class II의 발현에 의해 up-regulate된 T 세포가 interferon- γ 와 IL-4를 방출하면 소교세포들의 증식 및 활성화가 유발되며,⁴¹ 그 외에 다른 인자로써 MCSF (macrophage colony stimulating factor)와 GMCSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)를 포함하는 CSFs (colony stimulating factors)들도 같은 역할을 하는 것이 증명되었다.⁴²⁻⁴⁴ 소교세포의 증식을 down-regulate하는 대표적인 cytokine들은 TGF- β 1과 IL-10이 보고되어 있으며 TGF- β 1의 경우는 autocrine 작용으로 소교세포들의 증식을 억제한다. 특히 TGF- β 1는 실험적 알레르기성 신경염 (experimental allergic neuritis)과 실험적 자가면역성 뇌척수염 (experimental autoimmune encephalomyelitis)에서 증식된 소교세포들을 감소시키는 기능을 하며 IL-10은 실험적 자가면역성 뇌척수염의 후기에 생성되어 증식된 소교세포를 감소시키고 정상세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다.⁴⁵⁻⁴⁸ IL-1, IL-6, TNF- α 및 TGF- β 1는 활성화된 소교세포에서 분비되

는 대표적인 cytokine들로서 IL-1은 중추신경계의 손상 때에 손상부위의 활성화된 소교세포에서 선택적으로 분비되어 성상세포의 증식과 혈관형성을 유도하고^{49,50} TNF- α 는 펄피세포(oligodendrocyte)에 작용하여 탈수초화를 진행시킨다.^{2,51} TGF- β 1는 염증 때에 분비되는 cytokine으로서 강력한 면역억제 기능을 가지는 것으로 보고되어 있고 IL-6의 역할은 아직까지 잘 규명되어 있지 않으나 대뇌피질 외상 시에 활성화된 소교세포에서 합성되며 신경세포의 유지에 필수적인 NGF (nerve growth factor)를 자극하는 것으로 설명하고 있다.^{45,52} 본 연구의 대조군에서 원인을 알 수 없는 신경교증 부위에 미약한 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 관찰된 1예를 제외하고는 나머지 4예에서는 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현을 관찰할 수 없어 활성화되지 않는 소교세포에서는 cytokine mRNA들이 발현되지 않음을 증명하였다. 본 연구의 실험군에서는 우측 요추 척수 부위에서 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 절단 후 1일째에 나타나기 시작하여 3일째에 가장 강한 발현신호를 관찰할 수 있어 활성화된 소교세포들이 가장 많이 증식되는 시기와 일치되는 것을 알 수 있었고, 절단 후 3일째부터 점차적으로 감소하여 10일 이후에는 발현을 관찰할 수 없는 점은 증식 및 활성화된 소교세포들에서 apoptosis가 시작되면서 cytokine mRNA들의 발현이 같이 감소되어 지는 것으로 생각할 수 있다. 또 하나 흥미로운 점은 실험군에서 술 후 3일째까지 IL-1 α mRNA가 발현을 보이지만 그 후에 IL-1 α 의 역할로 알려진 성상세포의 증식에 의한 신경교증이 동반되지 않는 점이다. 이것은 IL-1 α mRNA가 단백질 형성과정에서 해독 (translation)되지 않았을 가능성과 백서에서는 IL-1 α 가 신경교증을 초래하지 않을 가능성을 추측해 볼 수 있다. TNF- α mRNA의 발현은 절단 후 1일째에 인지되기 시작하여 7일째까지 유지되어 있었으며 그 이후에 감소하는 경향을 보여 TNF- α 의 기능으로 알려진 펄피세포의 탈수초 현상에 대한 형태학적 및 기능적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 소교세포들의 증식을 down-regulate하는 대표적인 cytokine들인 TGF-1과 IL-10의 발현과 소교세포의 apoptosis와의 관계도 역시 규명되어야 할 과제들이다. 본 실험에서는 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현들은 주로 활성화된 소교세포와 성상세포의 세포질 내에서 관찰할 수 있었으며 전반적으로 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 TNF- α mRNA의 발현보다 강한 경향을 보여 IL-1 α 와 IL-6가 흰쥐 말초신경 축삭절개술 모델에서 소교세포의 증식과 사멸에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다.

이상의 연구성과 문헌적 지견을 요약하면 흰쥐의 우측 좌골신경을 절단한 후 우측 요추 척수에서 활성화된 소교세포들이 증식을 보인 뒤 apoptosis에 의해 사멸되는 것을 알 수 있었다. 활성화된 소교세포들이 많이 증식하는 시기에 소교세포에서 분비되는 cytokine들로 알려진 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현이 관

찰되어 중추신경계의 강력한 면역세포임을 확인하였으며 증식된 소교세포들에서 apoptosis가 진행됨과 비례하여 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현이 현저히 감소하는 경향을 보여 활성화된 소교세포의 증식과 apoptosis가 cytokine의 생성과 강한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

결 론

저자들은 소교세포의 증식과 apoptosis의 진행과정을 알아보고 그 과정에 따라서 소교세포에서 분비되는 cytokine들인 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α 의 발현양상을 파악하기 위하여 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 75 마리의 우측 좌골신경을 절단한 후 0일에는 5 마리, 1, 2, 3, 5일 및 7일째에는 각각 8 마리씩, 10일, 2, 3, 4, 5주 및 6주째에 각각 5 마리씩 도살하여 요추 척수를 채취한 후 소교세포 표지자인 GSA I-B₄와 apoptosis를 검색할 수 있는 TUNEL방법을 이용한 광학현미경적 관찰과 투과전자현미경적 관찰 및 *in situ* RT-PCR 방법으로 관찰하여 그 성적을 분석하였다. 그 결과 절단 2~3일째에 우측 요추 척수에서 소교세포들의 증식이 복측 회백질의 운동신경세포 주위와 배측 회백질의 신경망 사이에서 많이 관찰되었으며 GSA I-B₄ 양성 소교세포들은 우측 요추 척수에서 절단 후 1일째부터 증가하기 시작하여 2~3일째에 현저한 증가를 보였고 절단 5~7일째까지는 유지되다가 서서히 감소하여 4주 부터는 대조군과 비슷한 수를 보였다. TUNEL 양성 소교세포들은 절단 후 5일째에 관찰되기 시작하여 점차 증가하였으며 3주째에 가장 많은 발현을 나타내었고 이와 관련된 IL-1 α , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현은 절단 1일째부터 우측 요추 척수 부위에서 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 나타나기 시작하여 3일째에 가장 강한 발현신호를 보였고 그 후 감소하기 시작하여 10일 이후에는 관찰할 수 없었다. TNF- α mRNA 발현은 절단 1일째에 나타나기 시작하여 7일째까지 관찰되었다. 투과전자현미경 소견에서도 절단 3일째에 apoptosis의 초기에 해당하는 소견을 볼 수 있었으며 절단 5일째부터 분명한 apoptotic body가 출현하였고 절단 3주후 부터는 감소하는 경향을 보였다. 이상의 성적으로 미루어 보아 증식 및 활성화된 소교세포들에서 cytokine mRNA의 발현이 관찰되어 면역세포임을 확인하였고 증식된 소교세포들의 죽음은 apoptosis에 의해 사멸되어지는 것을 증명하였다. 또한 증식된 소교세포들에서 apoptosis가 진행됨에 따라 IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현이 현저히 감소하여 활성화된 소교세포의 증식과 apoptosis가 이들 cytokine mRNA의 생성과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia:

- intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Rev* 1995; 20: 269-87.
2. Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SC, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 1993; 7: 75-83.
 3. Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreutzberg GW. Detection of lysosomal cysteine proteinases in microglia: flow cytometric measurement and histochemical localization of cathepsin B and L. *Glia* 1993; 7: 183-91.
 4. Colton AC, Gilbert DL. Production of superoxide by a central nervous system macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987; 223: 284-8.
 5. Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7: 111-8.
 6. Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW. Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 1988; 85: 317-21.
 7. Gehrman J, Monaco S, Kreutzberg GW. Microglial and satellite cell reactions in response to axotomy of the rat sciatic nerve. *Restor Neurol Neurosci* 1991; 2: 181-98.
 8. Gehrman J, Gold R, Lington C, Lannes-Vieira J, Wekerle H, Kreutzberg GW. Microglial involvement in experimental autoimmune inflammation of the peripheral and central nervous system. *Glia* 1993; 7: 50-9.
 9. Gehrman J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Hossman KA, Kreutzberg GW. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 1: 257-69.
 10. McGeer PL, Kawamoto T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993; 7: 84-92.
 11. Streit WJ, Schulte BA, Balentine JD, Spicer SS. Histochemical localization of galactose-containing glycoconjugates in sensory neurons and their processes in the central and peripheral nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 1042-52.
 12. Gehrman J, Mies G, Bonnekoh P, et al. Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol* 1993; 3: 11-7.
 13. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Peripheral nerve lesion produces increased levels of MHC antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1989; 21: 117-23.
 14. Gehrman J, Banati RB. Microglial turnover in the injured central nervous system: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 680-8.
 15. Kerr JF. Some lysosomes functions in liver cells reacting to sublethal injury. 1st ed. Amsterdam: North-Holland. 1972: 126-42.
 16. Webster DA, Gross J. Studies on possible mechanisms of programmed cell death in the chick embryo. *Dev Biol* 1970; 22: 157-84.
 17. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
 18. Tian Q, Streuti M, Saito H, Schlossmann SF, Anderson P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 1991; 67: 629-39.
 19. Kishimoto M, Ueda K, Nakata M, et al. Detection of the DNA strand breaks by in situ translation using non-radioactive nucleotide. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1052-5.
 20. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Analysis of TNF- α induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol* 1991; 139: 251-4.
 21. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
 22. Fujita H. Procedures from fixation to embedding. *J Clin Electron Microsc* 1989; 21: S31-5.
 23. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
 24. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophysic Biochem Cytol* 1958; 6: 475-9.
 25. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-12.
 26. Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Rev* 1992; 17: 61-74.
 27. Kreutzberg GW, Barron KD. 5'-Nucleotide of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J Neurocytol* 1978; 7: 601-10.
 28. Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 1988; 21: 18-24.
 29. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: A review. *Glia* 1988; 1: 301-7.
 30. Gehrman J, Gold R, Lington C, Lannes-Vieira J, Wekerle H, Kreutzberg GW. Spinal cord microglia in experimental allergic neuritis: Evidence for fast and remote activation. *Lab Invest* 1992; 67: 100-13.
 31. Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 1987; 16: 249-60.
 32. Mannoji H, Yeger H, Becker LE. A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol* 1986; 71: 341-3.
 33. Gehrman J, Kreutzberg GW. Characterization of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia. *J Comp Neurol* 1991; 313: 409-30.

34. Robinson AP, White TM, Mason DW. Macrophages heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunol* 1986; 57: 239-47.
35. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1071-4.
36. Buttyan R, Olsson CA, Pintar J, et al. Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3473-81.
37. Sensibar JA, Liu XX, Patai B, Alger B, Lee C. Characterization of castration-induced cell death in the rat prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. *Prostate* 1990; 16: 263-76.
38. Piacentini M, Autuori F, Dini L, et al. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res* 1991; 263: 227-35.
39. Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1985; 50: 153-66.
40. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986; 7: 115-9.
41. Suzumura A, Sawada M, Marunouchi R, Yamamoto H. Proliferation of microglia with IL-4. *Neuroimmunology* 1993; 1: 122-3.
42. Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T. Activation and production of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* 1990; 509: 119-24.
43. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 1990; 30: 111-20.
44. They C, Hetier E, Evard C, Mallat M. Expression of macrophage colony-stimulating factor in mouse brain during development. *J Neurosci Res* 1990; 26: 129-33.
45. Keifer R, Lindholm D, Kreutzberg GW. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in the rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 775-81.
46. Kiefer R, Gold R, Gehrman J, Lindholm D, Wekerle H, Kreutzberg GW. Transforming growth factor beta expression in reactive spinal cord microglia and meningeal inflammatory cells during experimental allergic neuritis. *J Neurosci Res* 1993; 36: 391-8.
47. Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra R, Thoenen H. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992; 117: 395-400.
48. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Morhler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 1992; 149: 2496-505.
49. Giulian D, Baker TJ, Shin LN, Lachman LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 1986; 164: 594-604.
50. Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 1985; 228: 497-9.
51. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988; 23: 339-46.
52. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral disease. *Eur J Immunol* 1989; 19: 689-94.

흰쥐의 좌골신경 절단 후 요추척수에서 소교세포의 증식과 소멸에 따른 Cytokine의 발현

계명대학교 의과대학 병리학교실, ¹미생물학교실, ²면역학교실 및 의과학연구소
³경북대학교 의과대학 법의학교실

김상표 · 서성일¹ · 조영록 · 조승제 · 김승필 · 박종욱² ·곽정식³

Cytokine Expression on Microglial Proliferation and Apoptosis in Rat Lumbar Spinal Cord Following Unilateral Sciatic Nerve Transection

Sang Pyo Kim, Seung Il Suh¹, Young Rok Cho, Seung Che Cho
Seung Pil Kim, Jong Wook Park², and Jyung Sik Kwak³

Departments of Pathology, ¹Microbiology and ²Immunology, Institute for Medical Science
Keimyung University School of Medicine, Taegu 700-712, Korea and

³Department of Forensic Medicine, Kyungpook National University School of Medicine

This study was carried out to elucidate the cytokine mRNAs expression and morphological features according to a microglial proliferation and apoptosis in a rat lumbar spinal cord, after a right sciatic nerve transection. The control group was composed of 5 rats (Sprague-Dawley) and the experimental group was composed of 70 rats. On post operation day (pod) 1, 2, 3, 5, and 7 eight rats were sacrificed on those days. On pod 10 five rats were sacrificed as well as five rats sacrificed on post operation weeks 2, 3, 4, 5, and 6. On light microscopy, activated microglia were often found in a perineuronal position around motoneurons in the ventral gray matter and more randomly distributed throughout the neuropil in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord. GSA I-B₄-positive microglia began to increase from 1 day after transection, and reached peak at 2~3 days and it persisted at 5~7 days and decreased thereafter. TUNEL-positive microglia was not observed in control group and began to increase from 5 days after transection and increased gradually until 3 weeks and decreased thereafter. On *in situ* RT-PCR, the positive signal for IL-1 α and IL-6 mRNA was found mainly in the cytoplasm of the activated microglia and astrocytes at 1 day after transection and showed stronger signal at 3 days and decreased gradually until 10 days. TNF- α mRNA was detected 1 day after transection and remained for 7 days and localized to activated microglia as well as probably some astrocytes. The signal intensity of IL-1 α and IL-6 mRNA was generally stronger than TNF- α mRNA. On transmission electron microscopy, there were chromatin condensation with margination toward nuclear membrane and condensation of cytoplasm at 3 days after transection. Apoptotic bodies were found after 5 days and increased gradually until 3 weeks. According to the above findings, it is concluded that apoptosis appears to be one mechanism by which activated microglia are gradually eliminated and cytokine expression seems to played an active role in the microglial turnover. (Korean J Pathol 1998; 32: 94~103)

Key Words: Microglia, Cytokines, Apoptosis, Lumbar spinal cord

접 수: 1997년 8월 26일, 게재승인: 1997년 11월 25일
주 소: 대구광역시 중구 동산동 194, 우편번호 700-712
계명대학교 의과대학 병리학교실, 김상표

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(기초의학 BM 97-39)에 의해서 연구되었음.

서 론

소교세포 (microglia)는 중추신경계에서 강력한 면역 체계를 구성하는 세포로서 여러 가지 병리적인 상황에서 활성화될 때 세포독성 및 염증반응의 매개체로써 역할을 하고 MHC (major histocompatibility complex) 항원들을 발현하며 강력한 탐식세포로서 작용한다.¹ 활성화된 소교세포는 정상세포와 내피세포보다 강한 면역반응을 보이며 IL (interleukin)-1, IL-6, TNF (tumor necrosis factor)- α 및 TGF (transforming growth factor)- β 1 등의 cytokine들을 분비하고,² 그 외에 단백분해효소³와 과산화수소⁴ 및 산화질소⁵를 분비하여 세포독성의 기능을 수행한다.

소교세포의 증식 및 활성화는 말초신경의 축삭절개술 (axotomy) 후,^{6,7} 중추신경계의 자가면역질환,⁸ 대뇌 허혈⁹ 및 신경변성질환¹⁰ 등과 같이 여러 가지 병리적인 상황에서 흔히 관찰된다. 소교세포의 증식 및 활성화를 관찰할 수 있는 실험적 연구는 말초신경의 축삭절개술을 시행한 후 그 신경을 지배하는 중추신경계에서 소교세포의 변화를 관찰하는 것이 비교적 간편한 방법으로서^{6,7} 증식 및 활성화된 소교세포들을 형태학적으로 확인할 수 있는 방법은 흰쥐의 경우 소교세포에 친화성이 있는 *Griffonia simplicifolia* B₄ isolectin과 horseradish peroxidase (GSA I-B₄-HRP) 결합체를 이용하여 면역조직화학적으로 검색하면 가능하다.¹¹ 소교세포의 교체 (turnover)에 대한 많은 연구에서 신경조직의 손상초기에 소교세포들이 증식과 활성을 보이다가 서서히 사멸하여 휴지기상태 (quiescent state)로 환원된다고 한다.^{12,13} 일반적으로 세포증식의 조절에 대한 기전은 많이 알려져 있지만 세포사멸에 대한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 최근에 증식 및 활성화된 소교세포가 사멸하는 기전으로 Gehrman 등¹⁴이 쥐를 이용한 실험에서 좌골신경 (sciatic nerve)을 절단한 후 2~3일째에 요추 척수 (lumbar spinal cord) 부위에서 가장 현저한 증식을 보인 소교세포들이 apoptosis에 의해 급격히 감소하는 경향을 보인다고 보고하였다.

한편 apoptosis는 세포가 내적으로 지령된 자살기전의 활성을 통해서 능동적인 죽음을 초래하는 기전으로 Kerr 등¹⁵에 의해 처음으로 제시된 이후 많은 연구가 있다. Apoptosis는 여러 종류의 세포외적 및 내적 요소에 의해 개시되며, 과다하게 생겨난 세포와 발생학상 문제가 생긴 세포 및 지속적인 유전적 문제점을 가진 세포 등을 제거하는 중요한 생리적 기전으로 인식되고 있다.¹⁵⁻¹⁷ Apoptosis를 인지하는 가장 좋은 방법은 겔 전기영동에서 DNA laddering현상을 관찰하는 것이지만 이것은 조직의 특정세포에 국한되어 발생하는 apoptosis는 관찰하기 어렵다.¹⁸ 이와 같은 한계를 극복하기 위하여 조직의 형태가 유지된 상태에서 apoptosis를 관찰하는 여러 가지 방법들이 소개되었으며 이중에서 Kishimoto 등¹⁹과 Fehsel 등²⁰이 처음으로 고안한 *in situ* TdT

(terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick end labeling, 즉 TUNEL 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있다.

중추신경계의 apoptosis에 대한 연구는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis), 망막색소변성증 (retinitis pigmentosa) 및 소뇌변성 (cerebellar degeneration) 등과 같은 신경변성 장애 (neurodegenerative disorder)에서 특정 신경세포를 중심으로 많이 이루어졌으나,²¹ 중추신경계에서 강력한 면역체계를 구성하는 소교세포에서는 그 연구가 미흡하다.

이에 저자들은 상기한 문헌적 지견을 기반으로 하여 흰쥐의 좌골신경을 절단한 후 요추 척수에서 소교세포들의 증식과 apoptosis의 발생 양상을 소교세포 표지자인 GSA I-B₄와 TUNEL방법을 이용한 광학현미경적 관찰과 투과전자현미경적 관찰을 통해서 그 형태학적 변화의 과정을 알아보고, *in situ* reverse transcription polymerase chain reaction을 이용하여 소교세포에서 분비되는 cytokine인 IL-1 α , IL-6 및 TNF- α mRNA에 대한 발현을 분석함으로써 소교세포들의 증식 및 apoptosis가 cytokine의 발현과 어떤 상관관계가 있는지를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

일정기간 사육하여 건강이 양호하다고 생각되는 평균체중 200~250 gm 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 75마리를 골라 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

실험군은 에테르 마취 하에 우측 서혜부를 절개하여 우측 좌골신경을 노출시킨 후 좌골 절흔 (sciatic notch) 부위의 좌골신경을 약 5 mm 가량 절단한 다음 서혜부의 절개면을 봉합한 뒤 술 후 1, 2, 3, 5, 7일 및 10일과 2, 3, 4, 5주 및 6주에 각각 도살하여 요추 척수를 채취하였다. 각 경시적 실험군의 흰쥐 수는 5마리씩 사용하였는데 추시를 위하여 1, 2, 3, 5일 및 7일군은 각각 3마리씩 추가 실험하였다. 대조군은 우측 좌골신경을 절단한 후 즉시 도살한 동종의 흰쥐 수컷 5마리의 요추 척수를 채취하였다.

1) 광학현미경적 관찰: 광학현미경적 검색을 위한 시료는 적출된 흰쥐의 요추 척수 조직 중 *in situ* RT-PCR 및 전자현미경적 검색을 위한 시료를 채취한 나머지 조직 모두를 이용하였다. 시료는 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수 및 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 박절편을 만들어 hematoxylin & eosin과 toluidine blue 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) GSA I-B₄ (*Griffonia simplicifolia* B₄ isolectin)를 이용한 면역조직화학적 관찰: 증식 및 활성화된 소교세포

들을 관찰하기 위하여 GSA I-B₄-biotin 결합체 (Sigma, U.S.A.)를 사용하여 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 5 μ m 두께의 파라핀 절편을 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열 알코올로 탈파라핀과 함수를 한 후 GSA I-B₄-biotin 결합체를 적용하기전 10분 이내에 0.1 mM의 CaCl₂와 MgCl₂ 및 MnCl₂가 함유된 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)에 처리하였다. GSA I-B₄-biotin 결합체를 1:10으로 희석하여 4°C에서 12시간 반응시키고 PBS로 수세한 후 streptavidin-peroxidase로 20분간 처리하였다. 그 후 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) - H₂O₂로 5~10분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 우측 요추 척수의 소교세포 수는 복측 (ventral) 및 배측 (dorsal) 회백질에서 각각 $\times 400$ 배 현미경시야로 관찰한 후 양성으로 발현되는 전체의 세포 수를 세어 이에 대한 평균을 내어 계산하였다.

3) *in situ* TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 방법을 이용한 apoptosis의 면역조직화학적 관찰: 5 μ m 두께로 파라핀절편을 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열에탄올로 탈파라핀 및 함수를 시행한 다음 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세척하였다. 그 후 조직절편내의 단백질을 소화시키기 위해 proteinase K로 15분간 처리한 후 내인성 peroxidase의 차단을 위해 2% 과산화수소 용액에 5분간 처리하여 PBS로 세척하였다. 그 후 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) (Trevigen, U.S.A.)를 가하여 37°C에서 60분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하고 streptavidin-horseradish peroxidase (Trevigen, U.S.A.)를 가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 그 다음 다시 PBS로 수세하고 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 10분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 양성 대조군으로는 정상 백서의 소장점막을 이용하였으며 음성대조는 TdT 효소 대신에 증류수를 사용하여 동일한 과정으로 염색하였다. 결과 판독은 핵이 갈색으로 염색되는 것만을 양성으로 인정하였고 DNA분절을 보인 세포 수는 복측 및 배측 회백질에서 각각 $\times 400$ 배 현미경시야로 관찰한 후 양성으로 발현되는 전체의 세포 수를 세어 이에 대한 평균을 내어 계산하였다.

4) *in situ* RT-PCR (*in situ* reverse transcription polymerase chain reaction) 방법을 이용한 IL-1 α , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현의 관찰: *in situ* RT-PCR용으로 제공된 요추 척수 조직을 -70°C의 isopentane에 10초 가량 넣어 동결시킨 다음 -20°C의 동결절편기에서 OCT 블록을 만든 후 30분간 방치시킨 뒤 약 10 μ m의 동결절편을 만들었다. 동결절편을 50°C hot plate에 1~2분간 둔 후 즉시 4% paraformaldehyde 용액에 고정한 다음 계열에탄올로 탈수하고 실온에서 건조시켰다. 고

정 및 탈수된 동결절편 조직에 trypsinogen 용액 (2 mg/ml)을 부어 조직이 완전히 덮이게 한 후 실온에 15분 두었다. DEPC-DW로 조직을 3회 세척한 후 RQ1 RNase-free DNase (8 U/100 μ l)를 조직에 부어 37°C에서 30분간 둔 후 70°C에 10분간 두어 DNase활성을 없앤 뒤 DEPC-DW로 3회 세척하였다. 5X RT buffer를 4 μ l, 10 mM 농도의 dATP, dTTP, dCTP 및 dGTP를 각각 0.5 μ l, DNase inhibitor (40 U/ μ l)를 0.5 μ l, MMLV reverse transcriptase (200 U/ μ l)를 0.2 μ l, oligo dT primer (50 μ M)를 1 μ l, DW를 12.3 μ l 첨가하여 RT-mixture를 만든 뒤 조직 위에 분주하고 para-film으로 조직을 덮은 뒤 가습된 용기에 넣어 42°C에 60분, 95°C에 5분간 두어 역전사 반응을 완료하였다. RT 반응이 끝나면 2X SSC, 1X SSC 및 0.5X SSC로 각각 5회씩 세척한 후 최종 DW로 1회 세척한 후 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응시에 사용한 각각의 cytokine에 대한 primer들의 염기서열은 IL-1 α 의 경우는 5'-AGATGGCCAAAGTTCCAGACATG-3'/5'-CTACGCCTGGTTTTCCAGTATCTG-3', IL-6는 5'-ATGAAC TCCTTCTCCACAAGC-3'/5'-CTACATTTGCCGAAGAGC CCT-3' 및 TNF- α 는 5'-ATGAGCACTGAAAGCATG ATC-3'/5'-TCACAGGGCAATGATCCCAA-3'였다.

DW 60.15 μ l, 10X PCR buffer 7.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 4.5 μ l, 10 mM dNTP를 각각 0.6 μ l, 350 μ M dig-dUTP를 0.375 μ l, 5 U/ μ l의 Taq polymerase를 0.375 μ l, 50 μ M의 각 primer를 0.75 μ l 첨가하여 PCR mixture를 제작하였다. RT반응이 끝난 조직슬라이드 위에 Slide seal (Hybaid Co.)을 붙인 후 75 μ l의 PCR mixture를 Slide seal내로 분주하고 mineral oil로 seal입구를 막은 뒤 PCR을 실시하였다. PCR은 slide를 94°C에 3분간 둔 후 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간을 1 cycle로 하여 5 cycle 반응시켰다. Slide seal을 떼어낸 후 2X SSC, 1X SSC, 0.5X SSC로 각 5회씩 세척한 후 ALP (alkaline phosphatase)가 부착된 anti-digoxigenin antibody로 RT-PCR반응으로 합성된 cDNA에 삽입되어 있는 dig-dUTP를 검출하였다. Dig-dUTP검출방법은 슬라이드를 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl이 들어있는 buffer I에 1분간 둔 후, buffer I에 blocking reagent가 10%함유된 buffer II에 넣어 실온에서 30분간 두었다. 그 후 ALP가 부착된 anti-digoxigenin antibody를 buffer II로 희석한 후 조직에 분주하여 실온에서 3시간 두었다. 슬라이드를 buffer I으로 10분간 2회 세척한 뒤 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂(pH 8.2)가 들어있는 buffer III로 10분간 1회 세척하였다. Buffer III에 NBT 45 μ l와 X-phosphate 35 μ l가 함유된 발색용액을 조직에 분주한 후 암실에서 10~20분간 반응시켰으며 DW로 세척하고 건조 후 봉입 (mounting)하여 현미경으로 관찰하였다.

5) 투과전자현미경적 관찰: 투과전자현미경용으로 제공된 요추 척수의 우측 조직편을 1 mm³의 크기로 세절

하여 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7, 4)으로 1~4°C에서 2시간 선고정을 하고 0.1 M PBS로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에 2 시간 후고정을 실시한 다음 같은 완충용액으로 세척을 하여 계열에탄올로 탈수하였다.²² Propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법²³에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48 시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절한 후 toluidine blue 염색을 하여 관찰부위를 선택한 다음 초박편은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색 (60~90 nm)의 간섭색을 나타내는 초박편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson 및 Reynolds 방법^{24,25}에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경적 소견

백서의 우측 좌골신경을 절단한 후 2~3일째 우측 요추 척수에서 대조군에 비해 많은 소교세포들의 증식이 복측 회백질의 운동신경세포 주위와 배측 회백질의 신경망 사이에서 주로 관찰되었으며 증식되어 활성화된 소교세포들은 타원형의 긴 핵과 빙추형의 세포질을 가지고 있었다 (Fig. 1A, B).

2. GSA I-B4을 이용한 소교세포의 증식 검색

GSA I-B₄를 이용한 염색에서 소교세포와 혈관 내피

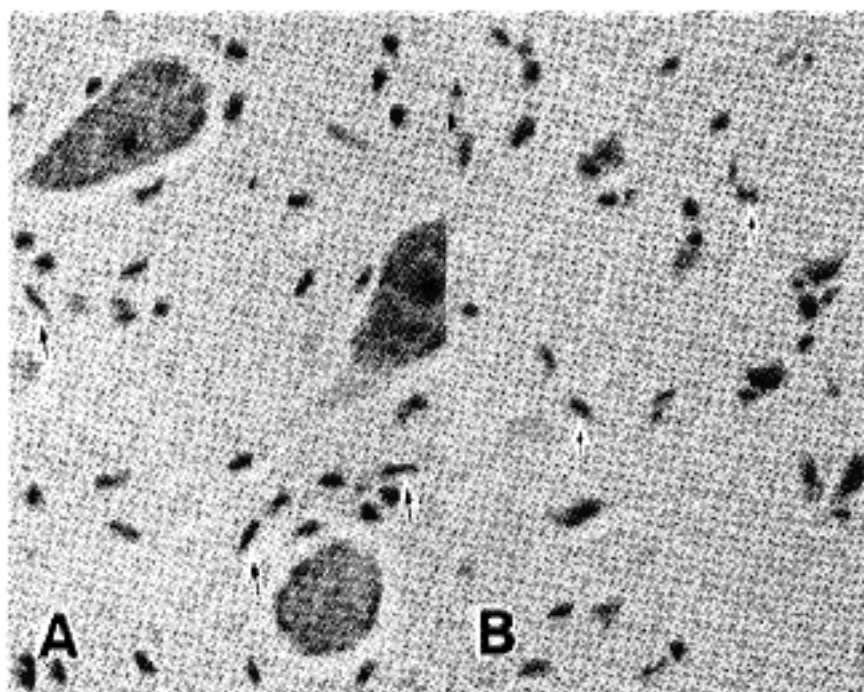


Fig. 1. Three days after right sciatic nerve transection. (A) Activated microglia(arrows) are noted at a perineuronal area in the ventral gray matter of lumbar spinal cord. (B) Activated microglia(arrows) are randomly distributed throughout the neuropil in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord.

세포의 세포질에서 양성반응을 보였으며 신경세포는 염색되지 않았다. 대조군에서 GSA I-B₄양성 소교세포의 수는 평균 8개 인데 (Fig. 2A) 비해 실험군에서는 절단 후 1일째에 24개로서 증가하기 시작하여 2~3일째에는 평균 76~88개로서 현저히 증가하였다 (Fig. 2B). 절단 후 5~7일째까지 유지되다가 서서히 감소하기 시작하여 절단 후 4주부터는 대조군과 비슷한 양상을 나타내었다 (Fig. 3). 좌측 요추 척수에는 소교세포의 증식 및 활성화는 관찰할 수 없었다.

3. TUNEL 방법을 이용한 DNA 분절 검색

TUNEL 방법에 의한 염색결과 우측 요추 척수에서 apoptosis가 진행중인 소교세포의 핵에 미탄성 혹은 과

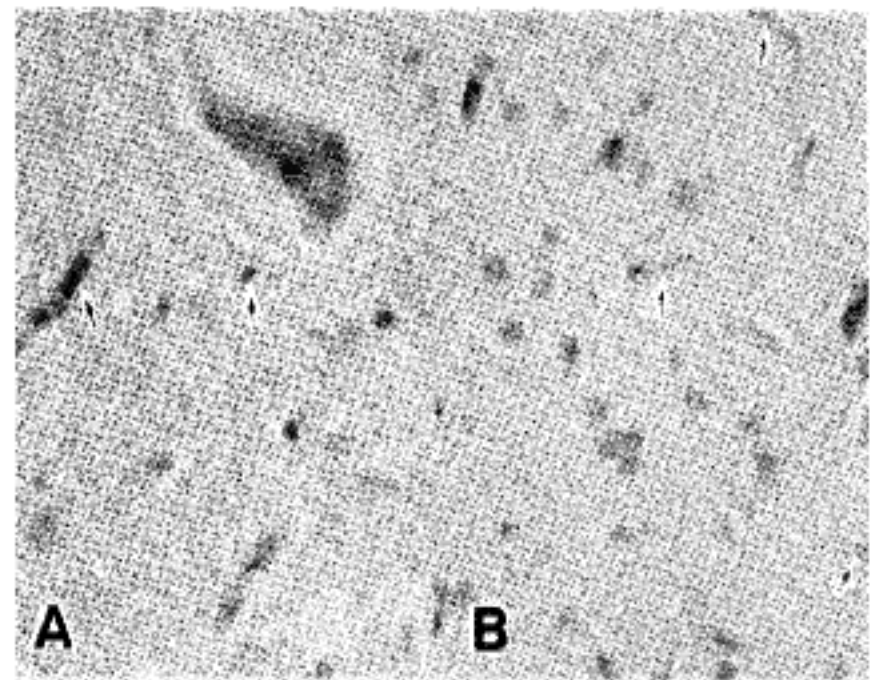


Fig. 2. Control group(A) versus three days(B) after right sciatic nerve transection. (A) GSA I-B₄ immunostain shows positive cytoplasmic immunoreactivity(arrows) of microglia and endothelial cells in the ventral gray matter of lumbar spinal cord. (B) There are many GSA I-B₄-positive microglia(arrows) among the neuropil in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord.

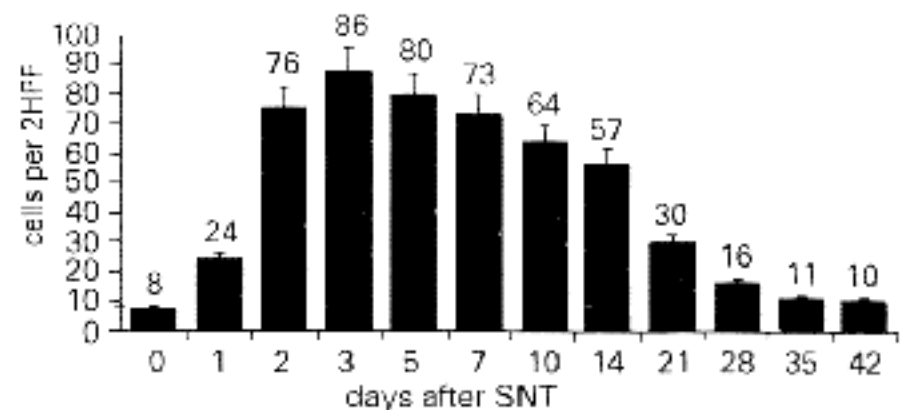


Fig. 3. Quantitative analysis of microglial proliferation in the gray matter of lumbar spinal cord after sciatic nerve transection. Values represent means. HPF, high power field; SNT, sciatic nerve transection.

립상으로 염색되었으며 이들 중 갈색으로 염색된 것을 양성으로 판정하였다. 대조군에서 DNA 분절을 보이는 세포는 관찰할 수 없었고 실험군에서는 절단 후 5일째에 평균 4개가 관찰되었으며 (Fig. 4A) 그 후 점차 증가하여 3주째에 평균 26개로서 가장 많이 관찰되었고 (Fig. 4B) 그 후 점차적으로 감소하여 6주째에는 평균 3개만 관찰되었다 (Fig. 5).

4. in situ RT-PCR 방법을 이용한 IL-1 α , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현 검색

대조군 4예에서 IL-1 α 및 IL-6 mRNA의 발현을 관찰할 수 없었으나 나머지 1예에서 원인을 알 수 없는 신경교종 부위에 미약한 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이

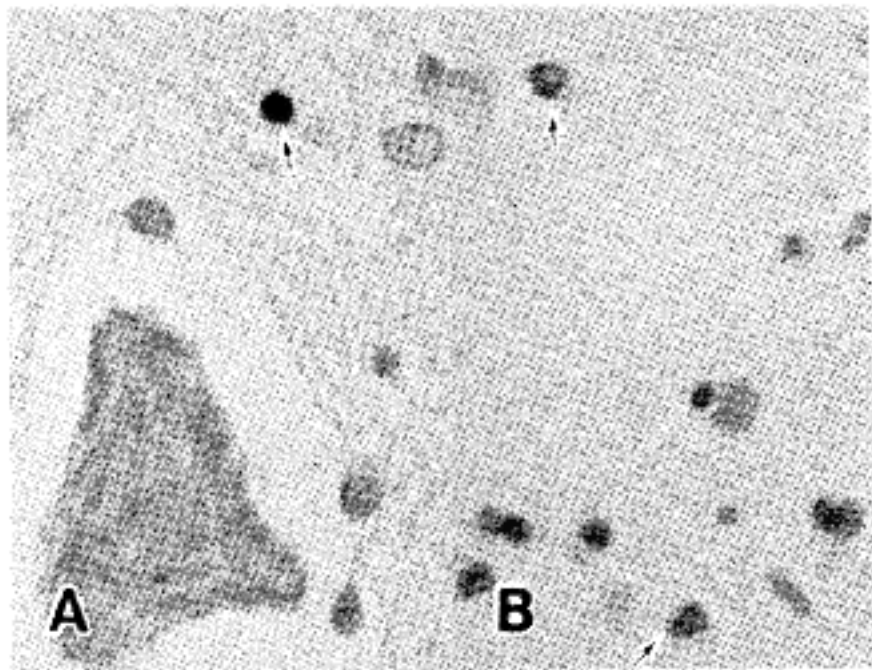


Fig. 4. Five days(A) versus three weeks(B) after right sciatic nerve transection. (A) TUNEL immunostain demonstrates apoptotic microglia(arrows) in the ventral gray matter of lumbar spinal cord. (B) TUNEL-positive microglia(arrows) are markedly increased in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord.

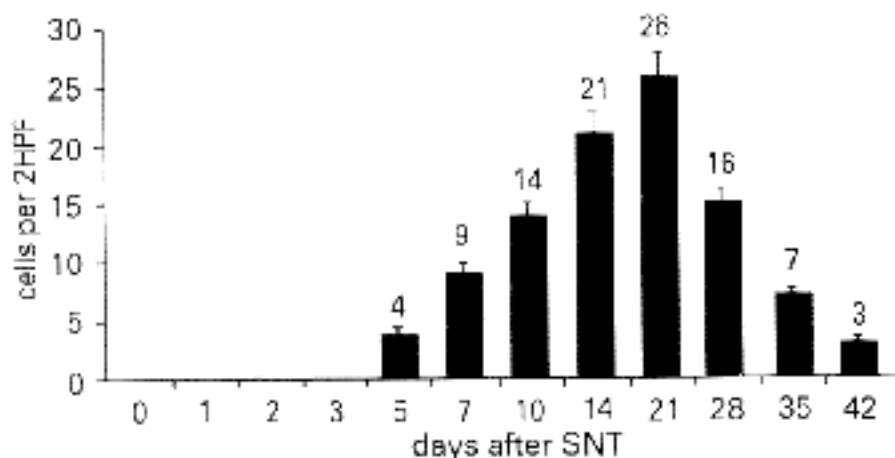


Fig. 5. Quantitative analysis of DNA fragmentation in microglia in the gray matter of lumbar spinal cord after sciatic nerve transection. Values represent means. HPF, high power field; SNT, sciatic nerve transection.

관찰되었다. 실험군의 우측 요추 척수 부위에서 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 절단 후 1일째에 나타나기 시작하여 3일째에 가장 강한 발현신호를 관찰할 수 있었고 (Fig. 6A, B) 그 후 점차적으로 감소하여 절단 후 10일 이후에는 발현을 관찰할 수 없었다. TNF- α mRNA의 발현은 대조군에서는 볼 수 없었고 절단 후 1일째에 인지되기 시작하여 7일째까지 유지되어 있었으며 (Fig. 7) 그 이후에 감소하는 경향을 보였다. IL-1 α 와 IL-6 및 TNF- α mRNA의 발현은 주로 소교세포와 상상세포의

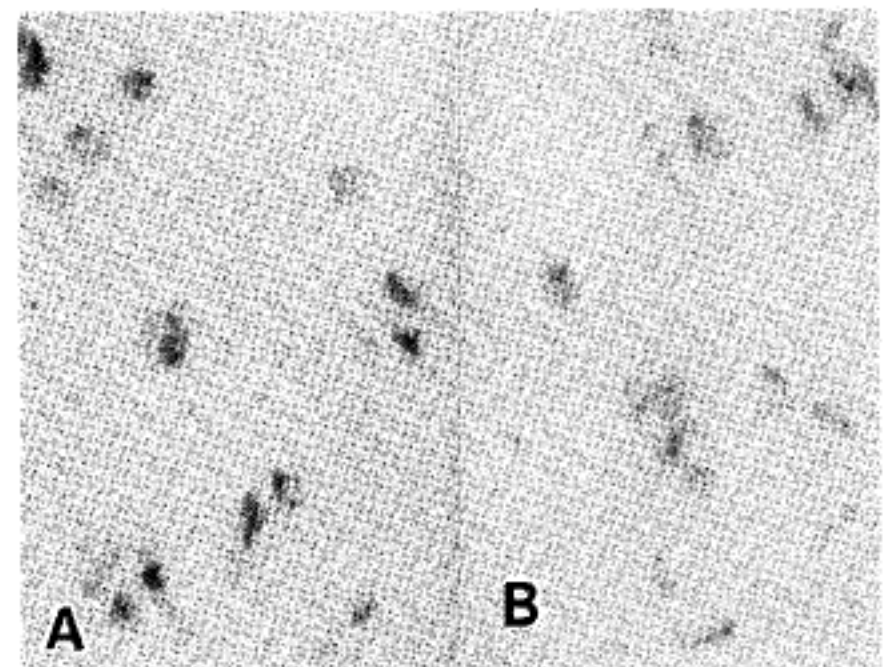


Fig. 6. Three days after right sciatic nerve transection. (A) The signal for IL-1 α mRNA demonstrates strong positive reaction in the activated microglia and astrocytes in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord. (B) Note the strong positive signal for IL-6 mRNA in the activated microglia and astrocytes in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord.

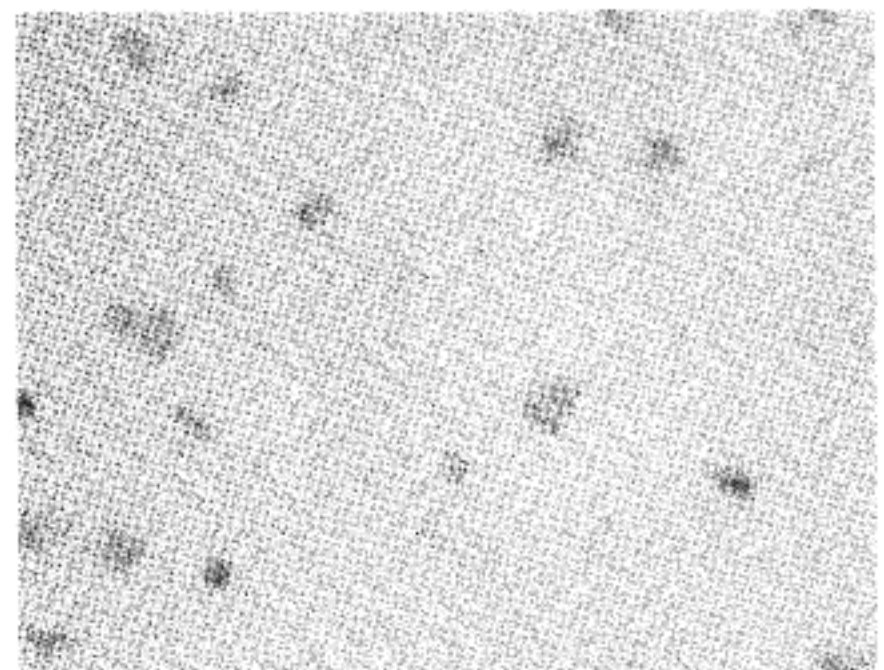


Fig. 7. Five days after right sciatic nerve transection. The positive signal for TNF- α mRNA is detected to activated microglia as well as some astrocytes in the dorsal gray matter of lumbar spinal cord.

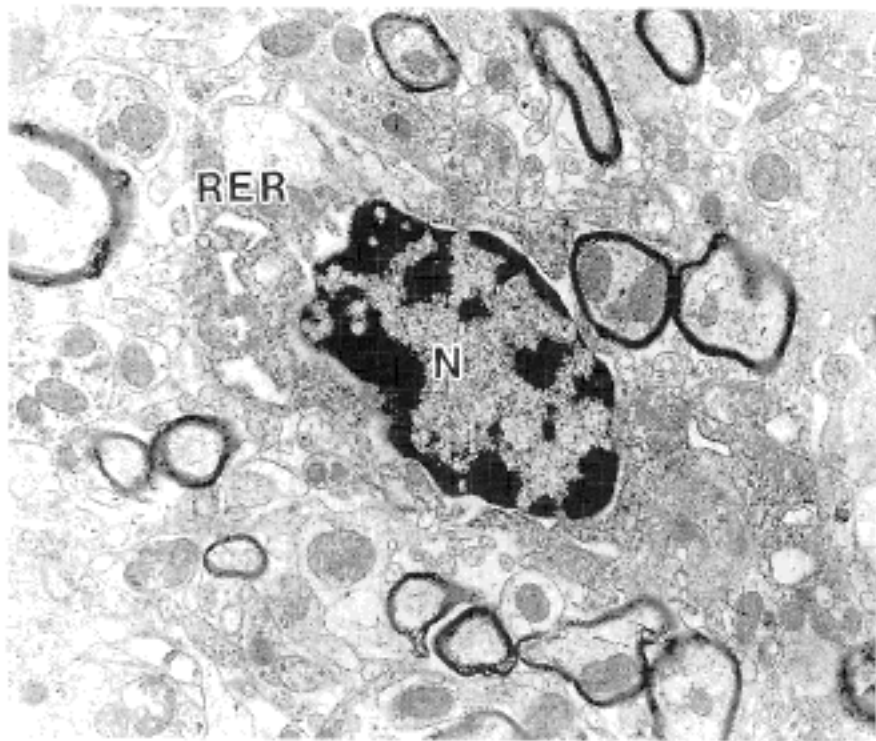


Fig. 8. Control group. The microglia shows elongated nucleus with dense heterochromatin and the prominent wide cisternae of rough endoplasmic reticulum (TEM, X 13,600)

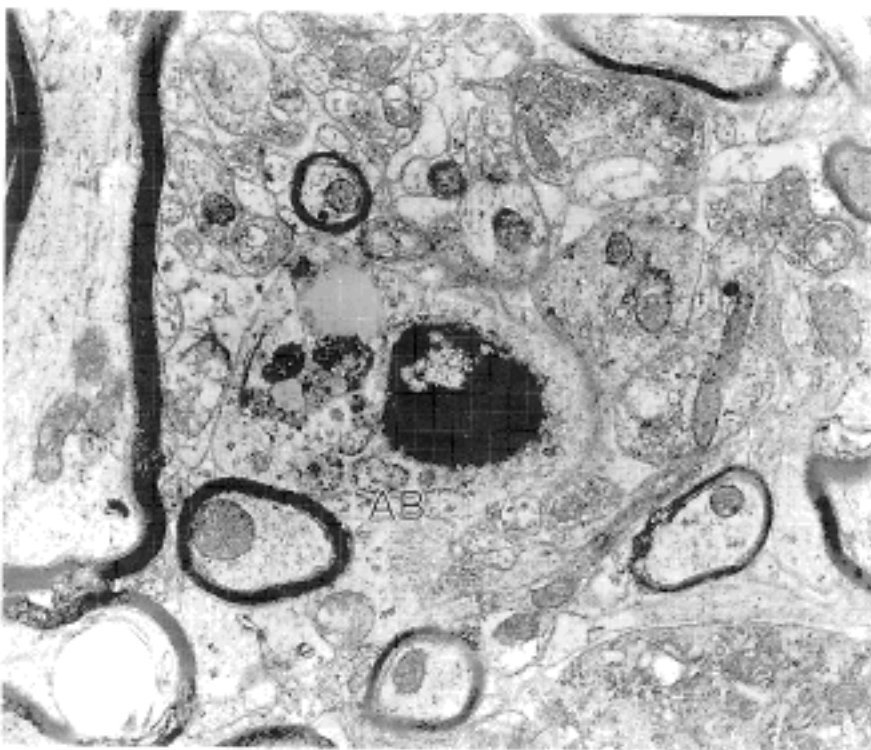


Fig. 9. Five days after right sciatic nerve transection. Membrane-bound apoptotic body shows chromatin condensed nucleus with relatively intact organelle (TEM, X 17,000).

핵과 세포질 내에서 관찰할 수 있었으며 전반적으로 IL-1 α 와 IL-6 mRNA 발현이 TNF- α mRNA의 발현보다 강한 경향을 보였다.

5. 투과전자현미경적 소견

대조군에서 소교세포들은 신경세포 및 혈관주위에서 관찰되었으며 비교적 세포의 크기가 작고 타원형의 핵을 보이면서 세포질 내에는 넓은 조면세포질내망(RER)을 가지고 있었다 (Fig. 8). 혈관주위에서 관찰되는 소교세포는 세포막에 기저판 (basal lamina)이 관찰되었다. 실험군에서 절단 후 3일째 소교세포의 핵에서

전자밀도가 높은 이질염색질 (heterochromatin)이 핵막에 인접하여 응집되었으며 핵질의 중앙부에는 전자밀도가 낮게 관찰되었고 세포질은 농축되는 소견을 보였다. 핵의 모양과 크기가 매우 다양하였고 세포질 내에는 전자밀도가 낮은 공포가 많이 형성되어 있었다. 그 후 점차적으로 소교세포의 핵내 염색질과 세포질에서 농축 및 분절이 진행되어 절단 후 5일째에는 apoptotic body가 출현하였으며 3주째 가장 현저하게 관찰되었다 (Fig. 9). 막으로 둘러싸인 apoptotic body는 반달모양의 핵 분절편과 이들 주위로 잘 보존되어 있는 정상 소기관 (intact organelle)으로 구성되어 있었고 일부의 apoptotic body는 인접한 소교세포에 의해 탐식된 소견을 관찰할 수 있었다. 절단 후 3주 이후부터 apoptotic body가 점차적으로 감소하는 경향을 보였다.

고 찰

휴지기의 소교세포는 중추신경계에 널리 분포되어 있으며 여러 가지 병적인 자극이 발생하게 되면 활성화되어 그 수가 증가하게 되고 면역세포로서의 중요한 역할을 수행한다.²⁶ Kreutzberg 등²⁷이 백서의 말초신경 축삭절개술 후 그 지배영역의 중추신경계에서 소교세포들의 증식에 대한 형태학적 변화를 보고한 이래로 활성화된 소교세포들은 일종의 대식세포로써 인식되어 왔으며 최근의 분자생물학적 연구에서 CR3 보체수용체²⁸와 major histocompatibility complex (MHC) class I 및 class II 항원의 발현,¹³ interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 및 transforming growth factor (TGF)- β 1 등의 cytokine 분비,² 단백질효소³와 과산화수소⁴ 및 산화질소⁵의 분비를 관찰하게 되어 면역세포로서의 기능을 확인하게 되었다. 흰쥐의 중추신경계의 소교세포는 비교적 안정된 세포로써 병적인 상황에서 활성화되지 않으면 잘 관찰되지 않는다.¹ 소교세포 증식에 대한 동물모델 중에서 말초신경의 축삭절개술을 이용한 모델은 중추신경계의 혈뇌장벽 (blood-brain barrier)을 보존할 수 있기 때문에 중추신경계 내에 분포하고 있는 소교세포만의 증식을 관찰할 수 있는 장점이 있고 혈액에서 기원한 단핵탐식세포의 침윤을 배제할 수 있다.²⁹ 또한 중추신경계에 직접 손상을 주지 않아 정상세포들의 증식에 의한 신경교증은 관찰할 수 없다.³⁰ 활성화된 소교세포를 형태학적으로 관찰할 수 있는 방법은 *Griffonia simplicifolia* isolectin I-B₄³¹ 및 *Ricinus communis* agglutinin I³²와 같은 lectins을 이용하는 방법, MUC-101와 MUC-102³³ 및 OX-42³⁴등과 같은 항체를 이용하는 방법 등이 있으나 본 실험에서는 비교적 사용이 간편한 *Griffonia simplicifolia* isolectin I-B₄를 사용하였다.

본 연구에서 대조군은 평균 8개의 소교세포가 신경망과 혈관주위에서 관찰되었으나 실험군에서는 절단 후 1일째에 증식하기 시작하여 2~3일째에 평균 76~